

醋酸甲羟孕酮对人结肠癌细胞增殖和凋亡的影响

王伟军^{1*}, 王 强¹, 张 伟¹, 屠小卿², 张玲珍², 范列英²

(1. 第二军医大学长征医院普通外科, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

[摘要] **目的:**检测醋酸甲羟孕酮(MPA)对人结肠癌细胞 LS174T 增殖和凋亡的影响并初步分析其机制。**方法:**人结肠癌细胞 LS174T 体外培养,以不同浓度的 MPA(12.5、25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)进行干预 120 h,MTT 法测定其对细胞增殖的抑制作用,流式细胞仪分析细胞周期、凋亡率和细胞表面 Fas 表达。**结果:**不同浓度 MPA 对结肠癌细胞具有显著的抑制作用。MPA 处理后阻止 G₁ 期细胞向 S 期的进程,S 期和 G₂/M 期细胞相对减少。LS174T 细胞的自然凋亡率为 4.8%,12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率为 15.1%,25 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率为 25.6%;MPA 作用后结肠癌细胞表面 Fas 表达显著增强。**结论:**MPA 对结肠癌细胞具有显著的抑制作用和诱导凋亡的作用,其机制可能与 MPA 使结肠癌细胞停滞于 G₁ 期及细胞表面 Fas 表达上调有关。

[关键词] 醋酸甲羟孕酮;结肠肿瘤;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R 735.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0051-03

Effect of medroxyprogesterone acetate on proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cells

WANG Wei-jun^{1*}, WANG Qiang¹, ZHANG Wei¹, TU Xiao-qing², ZHANG Ling-zhen², FAN Lie-ying² (1. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Clinical Diagnosis, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cells. **Methods:** Human colorectal cancer cell line LS174T was treated with different concentrations of MPA(12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) for 120 h. The inhibitory effect of MPA was measured with MTT method; the cell cycle, cell apoptosis, and cell surface Fas expression were analyzed with flow cytometry. **Results:** MPA had significant inhibitory effect on the growth of LS174T human colon cancer cells. Cell growth was found to be arrested in G₁ phase and cells in S phase and G₂/M phase were decreased. The natural apoptosis rate and the apoptosis rates at MPA 12.5 and 25 $\mu\text{mol/L}$ were 4.8%, 15.1% and 25.6%, respectively. Cell surface Fas expression in cancer cells increased after treated with MPA. **Conclusion:** MPA has significant inhibitory effect on the growth of human colon cancer cells, which may be related to Fas expression upregulation on cancer cell surface and G₁ phase arrest.

[KEY WORDS] medroxyprogesterone acetate; colonic neoplasms; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 51-53]

结直肠癌为妇女常见的第三大癌症,占妇女癌症死亡率的第三位。随着年龄的增加,发生结直肠癌的危险性逐年上升。据美国 2002 年统计,每年约有 24 000 名妇女死于结肠癌。妇女 40 岁以后,每 5 年结肠癌的发病率几乎增加一倍。这不仅与物质生活条件优越、饮食结构、生活方式有关,而且与妇女逐渐进入绝经期,激素水平下降有关。越来越多的研究表明,绝经后的激素替代治疗(hormone replacement therapy, HRT)能降低女性结直肠癌的危险^[1]。HRT 治疗方案为每日口服雌二醇 0.625 mg 加甲羟孕酮(MPA)2.5 mg,而先前的研究^[2,3]发现雌二醇对结肠癌细胞系增殖无影响,因此孕激素对结肠癌是否有预防、治疗作用值得探讨。

本研究通过检测不同剂量 MPA 对培养结肠癌细胞株的影响,以探讨 MPA 对结直肠癌化学预防的机制,为结肠癌的孕激素治疗提供临床应用依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 人结肠癌细胞株 LS174T 购自中科院上海细胞生物研究所细胞库;RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibcobl 公司),10%小牛血清(杭州四季青公司),MTT 为 AMRESCO 产品,MPA 购自 Sigma 公司;PE 标记的抗人 Fas 抗体购自晶美公司。

1.2 细胞培养和不同浓度的 MPA 细胞毒性试验 LS174T 细胞以含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃,5% CO₂ 的条件下培养。MPA 以 0.1 mol/L 的浓度-20℃避光储存于 70%乙醇中。以 RPMI 1640 将 MPA 的最大工作浓度调整为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组加入等体积的乙醇[$\leq 0.3\%$ (V/

[作者简介] 王伟军,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: wwj411@sh163.net

V)],此浓度下乙醇对细胞生长无影响。采用小号培养皿 8 只,分别加入 100、50、25、0 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的 MPA。MPA 先溶于 70%乙醇后加入 RPMI 1640 培养液,调整 MPA 浓度分别为 100、50、25 $\mu\text{mol/L}$,每天取出培养皿观察 2 次。

1.3 MTT 法检测 MPA 联合化疗药物抑制 LS174T 细胞的增殖 取第 3~6 代生长状态良好的对数生长期细胞,常规消化、分离、收集细胞、细胞计数及测定细胞活力,活细胞率达 95%,按每孔 3×10^5 个细胞接种于 5 块 96 孔板中,每孔 200 μl ,每组设 8 个复孔。贴壁后,接种细胞 24 h 后加入不同浓度的 MPA(按终浓度为 12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$),每个浓度设 8 个复孔,设空白对照孔(RPMI 1640 培养液+细胞)。药物处理结束后 24、48、72、96、120 h,每孔加入 5 g/L MTT 20 μl ,继续于 37℃ 孵箱培养 4 h 后,吸去上清,加入 DMSO 150 μl /孔,震荡 5 min 后于自动酶标仪上进行比色,测定光密度值(D_{492}),重复 3 次,取平均值。细胞存活率(%)=实验孔平均 D 值/对照孔平均 D 值 $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪(FCM)分析细胞周期和凋亡率 LS174T 细胞以 5×10^5 /瓶接种于 100 ml 培养瓶中,加入 MPA 的工作浓度为 0、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 的 RPMI 1640 后于 48 h 收集细胞后离心弃去培养液制成单细胞悬液,70%冰乙醇固定后加入 0.05%碘化丙啶 1 ml 染色,4℃ 黑暗处静置 30 min 后上机分析细胞周期和凋亡率,增殖指数 = $(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + G_2/M + S)$ 。每个标本分析 10 000 个细胞,用随机所附软件对测量值进行分析,流式细胞仪型号为 Coulter 公司的 EPICS XL 型。

1.5 流式细胞仪检测细胞表面 Fas 表达 LS174T 细胞以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后加入 RPMI 1640 作对照组,加入 MPA 25 $\mu\text{mol/L}$ 为处理组,处理结束后收集细胞离心去除培养液,加入 PE 标记的抗人 Fas 抗体于黑暗处静置 30 min,PBS 漂洗 3 遍后流式细胞仪分析荧光强度。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度 MPA 对大肠癌 LS174T 细胞生长的影响 加入 MPA 4 h 后,从培养箱中取出小培养皿,在倒置显微镜下可见 100 $\mu\text{mol/L}$ MPA 浓度的条件下,大部分 LS174T 细胞都脱落贴壁状态而漂浮起来,有许多成为碎片,只有少数仍留在瓶底;50 $\mu\text{mol/L}$ 条件下,24 h 几乎死亡 50%;25 $\mu\text{mol/L}$ 条件下毒性反应较轻;不加 MPA 组,细胞贴壁生长良好,未见明显死亡细胞。由此可见,100 $\mu\text{mol/L}$

MPA 几乎已经是 LS174T 细胞的致死剂量。

2.2 MPA 对大肠癌 LS174T 细胞生长抑制作用(MTT 法) 在 100 $\mu\text{mol/L}$ MPA 作用下,少许存在的 LS174T 细胞始终没能很好地生长,几乎近似一条直线;50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下,细胞在第 5 天能达到峰值的 33.1%;而在 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下可达 55%;RPMI 1640 对照组则达 89%。结果表明 MPA 对结肠癌细胞具有显著的生长抑制作用,并且这种抑制作用表现为剂量和时间依赖关系(图 1)。

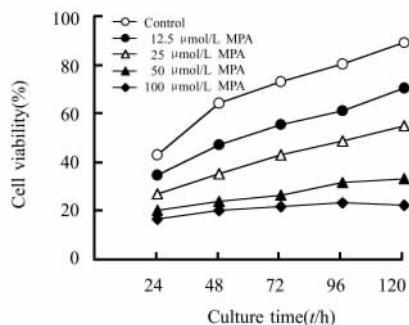


图 1 MPA 作用于 LS174T 细胞的剂量、时间依赖关系

Fig 1 Dose-time response effects of MPA in LS174T cells

2.3 MPA 对大肠癌 LS174T 细胞的细胞周期和凋亡率的影响 经 MPA 处理 48 h 后,FCM 结果显示 LS174T 细胞周期发生明显变化。培养的 LS174T 细胞经不同浓度的 MPA 处理后阻止 G_1 期细胞向 S 期的进程, S 期和 G_2/M 期细胞相对减少。25 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_0/G_1 期上升达到 76.9%, S 期比例降至 14.2%,与对照组相比,增殖指数由 0.57 降至 0.23,差异有统计学意义($P < 0.05$),显示 MPA 有抑制结肠癌 LS174T 细胞增殖作用。流式细胞仪检测 MPA 处理后细胞凋亡比例的变化显示,在 G_1 期峰前出现亚 G_1 期峰,即凋亡峰,12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率为 15.1%,25 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率为 25.6%,而 RPMI 1640 对照组细胞凋亡率为 4.8%,两组间差异非常显著($P < 0.01$)。说明 MPA 可促进结肠癌 LS174T 细胞凋亡,随着浓度增大而凋亡率增高。

2.4 流式细胞仪检测细胞表面 Fas 表达 MPA 作用后 LS174T 细胞表面 Fas 阳性细胞比例从 60.3% 升高到 97.9%,平均荧光强度从 1.76 增强到 6.71。

3 讨论

MPA 是一种孕激素,我国于 20 世纪 80 年代开始应用,起始使用剂量较小,后经过临床使用,发现剂量增大疗效显著,在治疗过程中,又发现 MPA 不仅易使激素敏感性肿瘤患者体质量增加,食欲增强,还可以使其他各种类型的肿瘤患者体质量增加,同

时能减轻播散性患者慢性疼痛,化疗时合用能保护骨髓,经过几十年的临床实践,除用于激素敏感性的肿瘤(乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾癌等)治疗外,现已广泛用于癌症恶病质及疼痛的姑息治疗。洛杉矶加州大学哈博医学中心(Harbor-UCLA)的研究人员分析了 16 608 名参与了 WHI (女性健康促进活动)的 HRT 临床试验的女性,结果发现 HRT 使用者罹患结肠癌的风险要比非使用者低 44%^[1]。而 Slattery 等^[4]在 2000 年评价了美国尤他州从 1991 年 9 月至 1994 年 9 月间诊断为结肠癌的共 156 名妇女的肿瘤 ER 和 PR 表达情况,用 ER、PR 抗体对石蜡切片进行免疫组化染色,结果发现没有 1 例肿瘤标本 ER 阳性,仅 1 例肿瘤标本 PR 阳性,这些数据不支持先前所报道的结肠肿瘤常常表达雌孕激素受体的结论,用 HRT 降低患结肠癌风险与雌孕激素受体作用途径无关。

本实验结果表明,MPA 对大肠癌细胞具有显著的生长抑制作用,并且这种抑制作用表现为剂量和时间依赖关系。除了显著的生长抑制作用,MPA 对 LS174T 细胞具有较强的凋亡诱导作用,随着 25 $\mu\text{mol/L}$ 作用时间的延长,大肠癌细胞的凋亡率相应升高,提示 MPA 对肿瘤细胞的生长抑制作用主要通过诱导细胞的凋亡来实现。凋亡机制的减弱或障碍在肿瘤的发生、发展过程中所起的作用越来越受到关注,并希望通过药物诱导细胞凋亡以达到治疗肿瘤的目的。结果显示,高浓度 MPA 导致 LS174T 细胞死亡,低浓度则可促进其凋亡;在一定范围内,MPA 浓度增大,凋亡比例增高,呈剂量依赖性,目前 MPA 临床上治疗剂量也属于本实验的低浓度范围。低剂量 MPA 可诱导结肠癌细胞发生凋亡,这一点从理论上可解释 Chlebowski 等^[1]报道绝经后口服雌孕激素进行 HRT 的妇女中结肠癌的发病率较普通人群明显降低的结论。

本研究结果还显示,LS174T 细胞经不同浓度 MPA 处理 48 h 后细胞各时相变化, G_1 期细胞明显增多,S 期和 G_2/M 期相对减少,并且这种状况与药物作用的浓度成正比,这一结果说明 MPA 抑制细胞增殖可能与其阻滞细胞周期的有序运行有关,即阻滞肿瘤细胞从 G_1 期向 S 期转化,并驱使细胞“脱离”细胞分裂周期而进入 G_0 期,证实了 MPA 具有抑制结肠癌细胞增殖的作用。

通过 FCM 还观察到在 G_1 期前出现亚 G_1 期峰,即凋亡峰,其凋亡率在不同浓度的 MPA 处理后两组间差异显著,进一步证实了 MPA 具有诱导结肠

癌细胞凋亡作用。FCM 检测显示:MPA 作用后 LS174T 细胞表面 Fas 阳性细胞比例 60.3% 升高到 97.9%,平均荧光强度从 1.76 增强到 6.71。Fas 低表达是肿瘤细胞产生凋亡抗性的重要机制之一。因此,上调 Fas 在肿瘤细胞的表达,增强了对凋亡的敏感性,是启动凋亡的重要手段。大肠癌的细胞凋亡可能是通过癌细胞表面特殊受体 Fas 等起作用而诱导。虽然 Fas/FasL 系统在恶性疾病中的生物学作用还没完全了解,但它在凋亡中的作用表明了它可以作为肿瘤生长的抑制因子。根据 Fas 信号可以诱导某些肿瘤细胞凋亡的特点,利用特异性抗体或配体作为拮抗剂,可以产生有效的抗肿瘤治疗作用^[5],而细胞膜表达有功能的 Fas 蛋白,并且其表达量一定强度是通过 Fas/FasL 途径诱导凋亡作用的首要条件^[6]。通过某些药物可以上调 Fas 的表达水平,进行基因的转录来提高 Fas 表达水平也是有效的方法。推测 MPA 促进结肠癌 LS174T 细胞凋亡的机制是由于诱导细胞表面 Fas 表达所导致的。

由此可见,MPA 能抑制结肠癌细胞增殖,诱导和促进 LS174T 细胞株的细胞凋亡,促凋亡机制与诱导 Fas 表达有关,可能是 MPA 抗肿瘤作用的机制之一。

[参 考 文 献]

[1] Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women[J]. N Engl J Med, 2004, 350: 991-1104.

[2] Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, et al. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth[J]. Cancer Res, 1996, 56: 4516-4521.

[3] Huerta S, Arteaga JR, Irwin RW, et al. PC-SPES inhibits colon cancer growth *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Res, 2002, 62: 5204-5209.

[4] Slattery ML, Samowitz WS, Holden JA. Estrogen and progesterone receptors in colon tumors[J]. Am J Clin Pathol, 2000, 113: 364-368.

[5] Arbuckle E, Langlois NE, Eremin O, et al. Evidence for Fas counter attack *in vivo* from a study of colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2000, 7: 45-47.

[6] Weller M, Malipiero U, Aguzzi A, et al. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation[J]. J Clin Invest, 1995, 95: 2633-2643.

[收稿日期] 2005-05-13 [修回日期] 2005-09-23
[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群