



中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358

CN 31-1794/R

肿瘤微环境促进子宫内膜癌细胞分泌雌激素

车祺, 刘素英, 董曦

引用本文:

车祺, 刘素英, 董曦. 肿瘤微环境促进子宫内膜癌细胞分泌雌激素[J]. 中国临床医学, 2020, 27(2): 313–316.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20192041>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

白细胞介素6与子宫内膜癌侵袭和转移的相关性分析

Relevance of interleukin-6 with invasion and metastasis of endometrial cancer

中国临床医学. 2018, 25(1): 52–55 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170271>

经阴道超声检测激素替代周期子宫内膜血流参数对胚胎移植妊娠结局的评估价值

Evaluation of endometrial-subendometrial blood flow measured by transvaginal ultrasound in hormone replacement cycle on outcome of embryo transplantation

中国临床医学. 2020, 27(1): 79–82 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20190372>

经阴道超声测量对绝经后子宫内膜癌的诊断价值

Diagnostic value of transvaginal ultrasonographic measurement of polypoid mass in uterine cavity in identifying postmenopausal endometrial cancer

中国临床医学. 2016, 23(6): 768–772 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160711>

自制子宫内膜取样器在子宫内膜病变诊断中的应用价值

Application value of self-made endometrial sampler in the diagnosis of endometrial lesions

中国临床医学. 2017, 24(3): 412–415 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160735>

过表达锌指蛋白A20可抑制肺泡巨噬细胞炎症反应

A20 regulates the inflammatory responses of alveolar macrophage

中国临床医学. 2016, 23(6): 715–719 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160822>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20192041

肿瘤微环境促进子宫内膜癌细胞分泌雌激素

车 祺, 刘素英*, 董 曦*

复旦大学附属中山医院生殖医学中心, 上海 200032

[摘要] 目的:筛选子宫内膜癌微环境中促进子宫内膜癌细胞雌激素分泌的细胞因子,并探讨相关机制。方法:提取子宫内膜癌间质细胞,用双重免疫荧光法进行鉴定。检测子宫内膜癌细胞(RL95-2、HEC-1A 和 HEC-1B)与间质细胞共培养和单独培养模式下,培养液上清雌激素浓度和肿瘤细胞芳香化酶的表达情况。用细胞因子芯片筛选 2 种模式下差异性表达的细胞因子,并用 real-time PCR 进行验证。结果:成功提取肿瘤间质细胞(波形蛋白为阳性)。共培养组上清雌激素浓度和肿瘤细胞中芳香化酶 mRNA 表达量均高于单独培养组($P<0.01$)。共培养组上清中生长分化因子-15(GDF-15)的表达高于单独培养组,10 ng/mL 的 GDF-15 可显著上调子宫内膜癌细胞中芳香化酶的表达($P<0.01$)。结论:子宫内膜癌细胞与间质细胞共培养情况下,子宫内膜癌细胞中芳香化酶的表达,进而促进间质细胞雌激素浓度的合成,其中子宫内膜癌细胞中 GDF-15 可能发挥重要作用。

[关键词] 子宫内膜癌;雌激素;共培养;肿瘤微环境;生长分化因子-15

[中图分类号] R 737.33 **[文献标志码]** A

Tumor microenvironment promoting estrogen secretion in endometrial cancer

CHE Qi, LIU Su-ying*, DONG Xi*

Reproduction Medicine Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To screen the cytokines promoting estrogen secretion in endometrial cancer cells in tumor microenvironment, and to study the related mechanism. **Methods:** Stromal cells of endometrial carcinoma were isolated and identified by double immunofluorescence. The concentrations of estrogen and expression of aromatase in endometrial cancer cells (RL95-2, HEC-1A, and HEC-1B) were measured under the co-culture with stromal cells and individual culture modes. The differentially expressed cytokines were screened by cytokine chip and further verified by real-time PCR. **Results:** The vimentin in the extracted cells was positive, which indicated the extraction of tumor stromal cells was successful. The concentration of estrogen in the supernatant and the expression of aromatase in tumor cells in the co-culture group were significantly higher than that in the individual culture group ($P<0.01$). The expression of growth differentiation factor-15 (GDF-15) in the supernatant of co-culture group was significantly higher than that in the individual culture group ($P<0.01$), and the expression of aromatase in endometrial cancer cells was significantly upregulated by 10 ng/mL GDF-15 ($P<0.01$). **Conclusions:** Under the condition of co-culture of endometrial cancer cells and stromal cells, the expression of aromatase is significantly increased in endometrial cancer cells, which promotes the estrogen secretion in stromal cells, and GDF-15 in endometrial carcinoma cell might play an important role.

[Key Words] endometrial cancer; estrogen; co-culture; tumor microenvironment; growth differentiation factor-15

子宫内膜癌是威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一,发病率在发达国家占女性恶性肿瘤的第 4 位,在发展中国家占女性恶性肿瘤的第 7 位,且近年来呈持续上升趋势^[1]。子宫内膜癌的高发病率及高死亡率严重危害妇女健康及生存质量,早期诊断及有效治疗至关重要^[2]。

已有研究^[3-4]证实,子宫内膜癌组织中雌激素的浓度高于正常组织,说明雌激素不仅能以传统的内分泌方式作用于靶器官,还可能以局部分泌的方式,促进肿瘤的发展。芳香化酶是雌激素合成的限速酶,但是其在子宫内膜癌中的具体作用机制至今仍不清楚^[5]。本研究通过子宫内膜癌细胞与间质细

[收稿日期] 2019-11-11

[接受日期] 2020-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金(81701435, 81971345)。Supported by National Natural Science Foundation of China(81701435, 81971345)。

[作者简介] 车 祺,博士,主治医师。E-mail: cheqi1477@126.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-60265925, E-mail: lsy6592@163.com; Tel: 021-60265925, E-mail: dong_xi@zs-hospital.sh.cn

胞的共培养模型,研究子宫内膜癌细胞中芳香化酶及间质细胞中雌激素的合成关系,并筛查相关细胞因子。

1 资料与方法

1.1 子宫内膜癌间质细胞的提取 子宫内膜癌组织标本来自复旦大学附属中山医院。无菌条件下获取子宫内膜癌组织,0.9%氯化钠液洗涤,除去血块及黏液后,剪成 1 mm^3 左右小块。离心后,加入0.1% I型胶原酶,37℃恒温孵箱内消化。分别用100目和400目不锈钢筛网过滤消化后的细胞悬液。

1.2 双重免疫荧光染色鉴定间质细胞 细胞经甲醛固定,血清封闭后,同时用小鼠抗人波形蛋白抗体和兔抗人角蛋白抗体4℃孵育过夜;次日磷酸盐溶液(PBS)冲洗,滴加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔(绿色)荧光和罗丹明标记的羊抗小鼠(红色)荧光二抗,避光放置2 h;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染细胞核,抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜观察染色结果。

1.3 子宫内膜癌细胞系的选取和培养 选取雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性的子宫内膜癌细胞系 RL95-2 (ER α 和 ER β 均阳性)、HEC-1A (ER α 和 ER β 均阳性)和 HEC-1B(ER β 阳性),用含10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液培养,在37℃、5% CO₂ 培养箱培养。当细胞增殖至80%时,用0.25%胰酶(含有0.02% EDTA)消化传代,每2~3 d换液或传代1次,观察细胞生长情况。

1.4 荧光定量 real-time PCR 用 TRIZol 试剂(Invitrogen, 美国)法提取待测细胞的总 RNA,提取步骤按照说明书进行。芳香化酶引物由上海生工生物公司用软件 Primer 5.0 合成。引物正向:5'-CCT TCT GCG TCC-3';反向:5'-GGA GAG CTT GCC ATG CAT CAA-3'。Real-time PCR 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书进行,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 表达,以 GAPDH 作为参考。

1.5 细胞培养模式及雌激素合成检测 24孔细胞培养板购自美国 Corning 公司。Transwell 小室滤膜孔径为 $0.4\text{ }\mu\text{m}$,膜为聚碳酸酯膜,保证细胞之间不直接接触,而培养液和可溶性因子可自由通过。共培养组24孔板下室中以 $2.3\times 10^5/\text{L}$ 的密度接种子宫内膜癌间质细胞;Transwell 小室中以 $(1\sim 1.5)\times 10^5/\text{L}$ 的密度接种3种子宫内膜癌细胞株

(RL95-2、HEC-1A 和 HEC-1B)。单独培养组只在 Transwell 小室中接种子宫内膜癌细胞株。2组均培养5 d后,留取一部分培养液用于后续芯片筛查细胞因子,余培养液用于检测雌激素的含量。用化学发光免疫(UniCel DxI 800 全自动化学发光免疫分析仪)雌激素的含量;荧光定量 real-time PCR 法检测肿瘤细胞内芳香化酶 mRNA 的表达。

1.6 细胞因子芯片筛查 选取差异最明显的一组细胞,留取细胞培养液上清,进行子宫内膜癌局部雌激素合成相关调控细胞因子的芯片筛查。人细胞因子芯片(RayBio™ 抗体芯片)购自上海 BioTNT 公司,含507个人源性细胞因子抗体。根据芯片说明书,通过激光荧光检测芯片信号,芯片亮度越强说明相应的细胞因子含量越高。

1.7 生长分化因子-15(GDF-15)刺激芳香化酶的表达 将 RL95-2、HEC-1A 和 HEC-1B 分别接种于24孔板,孵育24 h至密度70%~80%融合,PBS洗3遍,换无血清培养液孵育过夜,分别用5、10、20、50、100 ng/mL 浓度的 GDF-15 刺激24 h,提取细胞 mRNA,经 real-time PCR 检测芳香化酶表达情况。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 子宫内膜癌间质细胞鉴定 双重免疫细胞荧光染色结果图1显示,间质细胞的特征性蛋白(波形蛋白)为阳性染色,上皮细胞的特征性蛋白(角蛋白)为阴性染色,证实成功提取和培养了子宫内膜癌间质细胞。

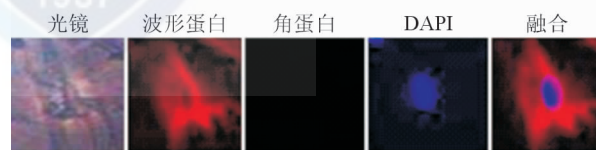


图1 双重免疫细胞荧光染色鉴定子宫内膜癌间质细胞

2.2 雌激素合成和芳香化酶表达情况 结果(图2)表明:共培养组培养上清中雌激素的浓度及肿瘤细胞中芳香化酶 mRNA 的含量均高于单独培养组。

2.3 2组差异性表达细胞因子的筛选 HEC-1A 细胞中芳香化酶的表达的在2组间差异性最大,因此将其用于细胞因子筛查,结果表明,与代谢相关的细胞因子中,2组 GDF-15 的表达差异性最大($P<0.01$),见图3。

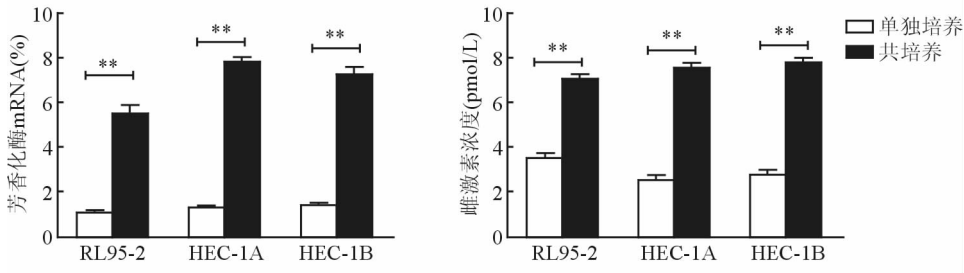


图2 2种培养模式下上清液中雌激素和肿瘤细胞内芳香化酶 mRNA 的表达

** P<0.01 与单独培养相比

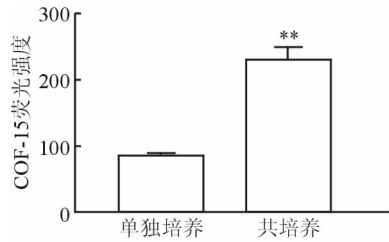


图3 2种培养模式下 GDF-15 的表达

** P<0.01 与单独培养相比

2.4 不同浓度 GDF-15 对内膜癌细胞株芳香化酶表达的调节 real-time PCR 结果(图4)显示:5、10、20、50、100 ng/mL 的 GDF-15 刺激 3 种子宫内膜癌细胞株后,以 10 ng/mL 的 GDF-15 刺激细胞株中芳香化酶表达的作用最明显($P<0.01$)。

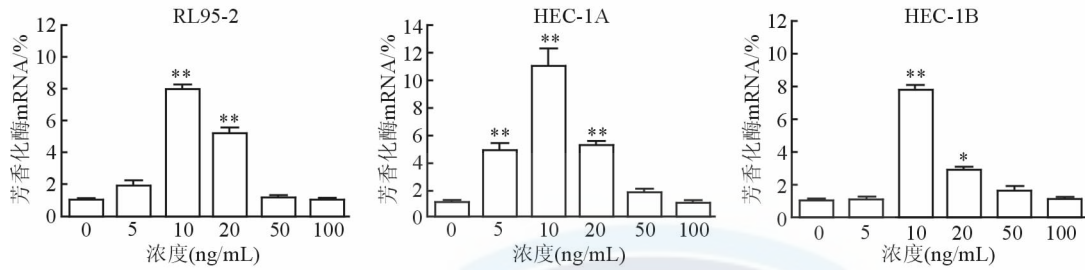


图4 不同浓度的 GDF-15 对 3 种子宫内膜癌细胞株中芳香化酶表达的影响

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与 0 ng/mL 组相比

3 讨论

长期过量的雌激素可诱发子宫内膜癌的发生^[6],而子宫内膜癌中雌激素浓度远高于健康妇女血液和子宫内膜^[3]。由此推测,子宫内膜癌中异位雌激素合成在其发生发展中起重要作用。芳香化酶是雌激素合成的限速酶,在卵巢的颗粒细胞、脂肪细胞、胎盘合体滋养层细胞和脑细胞等多种雌激素合成部位表达^[5]。已有研究^[7-8]表明,子宫内膜癌中芳香化酶的异常表达与肿瘤预后密切相关;在口服孕激素无效的绝经前子宫内膜癌患者中,芳香化酶抑制剂的治疗效果较好。

本研究中,子宫内膜癌细胞与间质细胞共培养组培养液上清中的雌激素及肿瘤细胞中的芳香化酶 mRNA 含量均高于子宫内膜癌细胞单独培养组,证实了肿瘤微环境对雌激素原位合成的作用。进一步培养液上清进行细胞因子芯片筛查,显示共培

养组 GDF-15 升高。

GDF-15 是一种应激反应蛋白,1997 年由 Bootcov 等^[9]首次在激活的巨噬细胞中发现。其定位于 19p12.1~13.1,含有 2 个外显子和 1 个内含子,主要参与组织修复和调节器官生长、分化等生物学进程。GDF-15 可促进肿瘤的转移,但也可促进肿瘤细胞的凋亡,这 2 种相互矛盾的作用及具体机制尚未被完全阐明^[10]。研究^[11]显示,血浆 GDF-15 的浓度可以作为前列腺癌、胰腺癌和结肠癌等多种恶性肿瘤的生物学预测指标。而且,GDF-15 可以通过调节肿瘤微环境(如巨噬细胞的功能)来促进早期肿瘤的发展^[12]。本研究中,GDF-15 可以促进 3 种子宫内膜癌细胞株中芳香化酶的表达。由此推测,在子宫内膜癌微环境中,肿瘤间质细胞通过分泌 GDF-15,调控癌细胞中芳香化酶的合成,进而导致子宫内膜癌原位雌激素的增加。

在卵巢癌患者血清中,GDF-15 表达水平升高,

可与CA125一起作为卵巢癌的早期诊断指标^[13-14]。李会平等^[15]发现,GDF-15在子宫内膜癌组织中表达较高,且与肌层浸润深度正相关。国外研究^[16-17]也表明,子宫内膜癌患者血清GDF-15水平与肿瘤的淋巴结转移和预后密切相关,且可以作为肿瘤进展的独立预测因子,因此可作为子宫内膜癌进展、复发和预后的有效预测指标。另外,GDF-15与肥胖及新陈代谢之间存在明显的相关性^[18]。GDF-15可通过延迟胃排空、激活末梢区神经元及促进脂肪分解的作用方式预防及治疗肥胖^[19]。本研究证实,GDF-15可促进子宫内膜癌中芳香化酶的表达,这可能是GDF-15促进子宫内膜癌发展的新机制。

肿瘤细胞通过产生多种生长因子和趋化因子,并以旁分泌的方式激活间质细胞而活化肿瘤基质,而间质细胞被肿瘤细胞诱导后,也产生多种细胞因子及酶,进一步促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[20]。正常细胞与周围的组织微环境之间存在着动态平衡,进而使维持细胞的正常生长和凋亡。而肿瘤恶变则破坏了这一平衡^[21]。本研究发现,子宫内膜癌中GDF-15可以促进局部雌激素合成,这一细胞因此可能成为子宫内膜癌发病机制研究和治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] MOORE K, BREWER M A. Endometrial cancer: is this a new disease? [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017, 37: 435-442.
- [2] LÓPEZ-REIG R, FERNÁNDEZ-SERRA A, ROMERO I, et al. Prognostic classification of endometrial cancer using a molecular approach based on a twelve-gene NGS panel[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18093.
- [3] BERSTEIN L M, TCHERNOBROVKINA A E, GAMAJUNOVA V B, et al. Tumor estrogen content and clinic-morphological and endocrine features of endometrial cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(4): 245-249.
- [4] OGANE N, HORI S I, YANO M, et al. Preponderance of endometrial carcinoma in elderly patients[J]. Mol Clin Oncol, 2018, 9(3): 269-273.
- [5] ROMERO S A D, SU H I, SATAGOPAN J, et al. Clinical and genetic risk factors for aromatase inhibitor-associated arthralgia in breast cancer survivors[J]. Breast, 2019, 49: 48-54.
- [6] WASNIEWSKI T, WOCLAWEK-POTOCKA I. Altered expression of lysophosphatidic acid receptors, in association with the synthesis of estrogens and androgens in type 1 endometrial cancer biology[J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(5): 422-427.
- [7] SEGAWA T, SHOZU M, MURAKAMI K, et al. Aromatase expression in stromal cells of endometrioid endometrial cancer correlates with poor survival[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(6): 2188-2194.
- [8] STRAUBHAR A, SOISSON A P, DODSON M, et al. Successful treatment of low-grade endometrial cancer in premenopausal women with an aromatase inhibitor after failure with oral or intrauterine progesterone[J]. Gynecol Oncol Rep, 2017, 21: 10-12.
- [9] BOOTCOV M R, BAUSKIN A R, VALENZUELA S M, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(21): 11514-11519.
- [10] ARFSTEN H, CHO A, FREITAG C, et al. GDF-15 in solid vs non-solid treatment-naïve malignancies [J]. Eur J Clin Invest, 2019, 49(11): e13168.
- [11] FANG L, LI F, GU C. GDF-15: A multifunctional modulator and potential therapeutic target in cancer[J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(6): 654-662.
- [12] RATNAM N M, PETERSON J M, TALBERT E E, et al. NF-κB regulates GDF-15 to suppress macrophage surveillance during early tumor development[J]. J Clin Invest, 2017, 127(10): 3796-3809.
- [13] 张博, 张颖, 牛力春, 等. 血清GDF15和CA125水平检测对上皮性卵巢癌患者的诊断价值[J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(2): 225-227.
- [14] ZHANG Y, HUA W, NIU L C, et al. Elevated growth differentiation factor 15 expression predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients[J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 9423-9431.
- [15] 李会平, 代爱军. 磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白、生长分化因子15表达水平与子宫内膜癌肌层浸润深度的关联性分析[J]. 医药论坛杂志, 2019, 40(2): 102-104.
- [16] STAFF A C, TROVIK J, ERIKSSON A G, et al. Elevated plasma growth differentiation factor-15 correlates with lymph node metastases and poor survival in endometrial cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(14): 4825-4833.
- [17] ENGERUD H, HOPE K, BERG H F, et al. Plasma growth differentiation factor-15 is an independent marker for aggressive disease in endometrial cancer [J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210585.
- [18] LEE S E, KANG S G, CHOI M J, et al. Growth differentiation factor 15 mediates systemic glucose regulatory action of T-helper type 2 cytokines[J]. Diabetes, 2017, 66(11): 2774-2788.
- [19] TRAN T, YANG J, GARDNER J, et al. GDF15 deficiency promotes high fat diet-induced obesity in mice[J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0201584.
- [20] QIAN S, GOLUBNITSCHAJA O, ZHAN X. Chronic inflammation: key player and biomarker-set to predict and prevent cancer development and progression based on individualized patient profiles[J]. EPMA J, 2019, 10(4): 365-381.
- [21] CALABRETTA E, D'AMORE F, CARLO-STELLA C. Immune and inflammatory cells of the tumor microenvironment represent novel therapeutic targets in classical hodgkin lymphoma[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): pii: E5503.