维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)02-0176-05

莪术对人子宫内膜癌作用的光镜及超微结构研究

赵 华,骆云鹏

(重庆医科大学基础医学院病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究莪术油注射液在体外对人子宫内膜癌细胞株 RL-952 生长的抑制作用及其可能机制。方法:通过 MTT 法实验观察莪术油注射液在体外对 RL-952 的抑制作用;光镜及透射电镜观察癌细胞的形态学改变。结果:莪术油注射液对 RL-952 的抑制率呈时间-剂量依赖性。光镜下见:癌细胞核固缩,胞浆有大量的空泡出现;透射电镜见:细胞浆内细胞器明显肿胀,线粒体嵴增粗;细胞染色质断裂、凝集。结论:莪术油注射液在体外作用于人子宫内膜癌细胞株 RL-952,可能系通过非凋亡性程序性死亡方式抑制癌细胞增殖。

【关键词】莪术;人子宫内膜癌细胞株 RL-952;坏死;细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】D22 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-07-16

A light and an electron microscopy study on inhibition of Eleo-Zedoary to human endometrial cancer

ZHAO Hua, et al

(*Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibition of Eleo-Zedoary solution to human endometrial cancer cell line RL-952 in vitro and its possible mechanism. *Methods*: Using the MTT assay to display the sensitivity to the drug, the inhibition of Eleo-Zedoary parenteral solution to RL-952 cells in vitro was observed; and using light microscope and transmission electron microscope, the morphological alterations of the cells were observed. *Results*: The inhibition rate of Eleo-Zedoary parenteral solution to RL-952 indicated both dose-dependent and time-dependent anti-proliferative effect. Microscopically, the large vacuoles in the cytoplasm of the cells were found. Ultramicroscopically, many fat-like drops and obvious swelling of organelles as well as the mitochondrial cristaes in the cytoplasm of cells were observed. In addition the nucleus concentration and the chromatin fragmentation and coagulation, including the apoptotic bodies were observed. *Conclusion*: Eleo-Zedoary parenteral solution can inhibit the proliferation of human endometrial cancer cell line RL-952 by induing apoptosis and secondary necrosis.

【Key words】Eleo-Zedoary parenteral solution; Human endometrial cancer cell line RL-952; Apoptosis; Necrosis

莪术(Curcuma phaeocanlis valeton)为姜科多年生草本植物莪术、郁金、广西莪术的根茎。其性辛、苦、温,归肝、脾经,传统功效:破血行气,消积止痛[1]。子宫内膜癌与激素密切相关,治疗以手术治疗+放疗为主,但许多化疗药对其不敏感。子宫内膜癌在中医学上的病因属气滞血淤,且已有研究证明莪术油注射液体内注射宫颈癌瘤体有效[2],但其作用机制尚不明确。为了解莪术油注射液对子宫内膜癌体外抑制效果,探讨其可能的机制,本实验选用不同浓度的莪术油注射液对人子宫内膜癌细胞株 RL-952 作用不同的时间进行体外实验。现报道如下。

作者介绍:赵 华(1976-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤病理生理。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人子宫内膜癌细胞株 RL-95-2 为重庆医科大学病理生理教研室提供,莪术油注射液购自山东鲁抗辰欣药业有限公司。RPMI1640 为 Hyclone 公司生产,新生小牛血清来自杭州四季青生物工程材料有限公司。四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide, MTT)美国 Gibco 公司;二甲亚砜(DMSO)苏州工业园区正兴化工研究院;0.4% 台盼蓝 上海化学试剂分装厂;96 孔板 浙江拱东医用塑料厂;全自动酶标读数仪 Bio

维普资讯 http://www.cqvip.com

RAD 550 型,美国;透射电子显微镜 Hitachi－600 型,日本。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定莪术油注射液对 RL－95－2 的抑制作用 常规细胞培养:取对数生长期的 RL－95－2 细胞计数后以浓度 5×10^4 个/ml,200μl/孔接种于 96 孔板,实验设立细胞对照组、溶剂对照组、药物实验组(浓度分别为 400μg/ml,300μg/ml 250μg/ml,200μg/ml,150μg/ml,每孔 20μl),每实验组设 8 个平行孔。分别于 20、44、68h 后取出 96 孔板,2000r/min 离心 10min,超净工作台下弃上清,加 200μl/孔 RPMI1640,及 20μl/孔 MTT,37℃ 孵育箱放置 4h,取出后 2000r/min 离心 10min,弃上清,加 200μl/孔 DMSO,用微量振荡器摇振 5min,待甲臜结晶完全溶解后酶标仪比色,波长 570nm[3~5]。

抑制率＝1－药物实验组的平均 OD 值/细胞对照组的平均 OD 值

1.2.2 光学显微镜观察 细胞爬片制备:取对数生长期的 RL－95－2 细胞计数后以浓度 5×10^4 个/ml,1ml 接种于预先放置小玻片的 24 孔板内,同时设立细胞对照组和药物实验组,药物浓度为中效浓度[6]的 1/2。72h 后弃去上清,PBS 洗两次,用 4% 多聚甲醛固定 20min,做 HE 染色。

1.2.3 电子显微镜观察 细胞制备:取对数生长期的细胞,以浓度 5×10^4 个/ml,20ml/瓶接种于 200ml 的培养瓶内,药物浓度为中效浓度的 1/2,同时设立细胞对照组。于 72h 后收集细胞到 1.5ml 的 EP 管内,PBS 洗两次,用 3% 戊二醛固定,1% 四氧化锇再固定,环氧树脂包埋,作超薄切片,电子染色,透射电镜观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包分别作方差分析。

2 结 果

2.1 MTT 法检测结果

MTT 法检测不同浓度的莪术油注射液对 RL－95－2 作用不同时间的抑制效果(见表 1)。结果表明:莪术油注射液对 RL－95－2 的抑制作用随时间、浓度的增加而加强,呈时间－剂量依赖性。

2.2 光镜结果

光镜下显示:人子宫内膜癌细胞株 RL－95－2 细胞镶嵌排列,呈栅栏状,并有成腺的趋势;细胞大小不一,染色质较深,分裂相不多见(图 1①)。高倍镜下显示瘤细胞的形态结构(图 1②)。

表 1 莪术油注射液对 RL－95－2 的抑制作用(抑制率 $\bar{x}\pm s$)

浓度(μg/ml)/时间	24h	48h	72h	
400	0.883±0.012	0.920±0.026	0.957±0.035	$F=114.310$
300	0.633±0.015	0.650±0.020	0.733±0.035	$P<0.01$
250	0.337±0.047	0.440±0.036	0.653±0.035	
200	0.020±0.020	0.150±0.040	0.323±0.025	
150	－0.056±0.081	0.043±0.041	0.167±0.032	
$F=832.482$				
$P<0.01$				

中效浓度$_{72h}$＝222.36μg/ml $\gamma=0.9845$

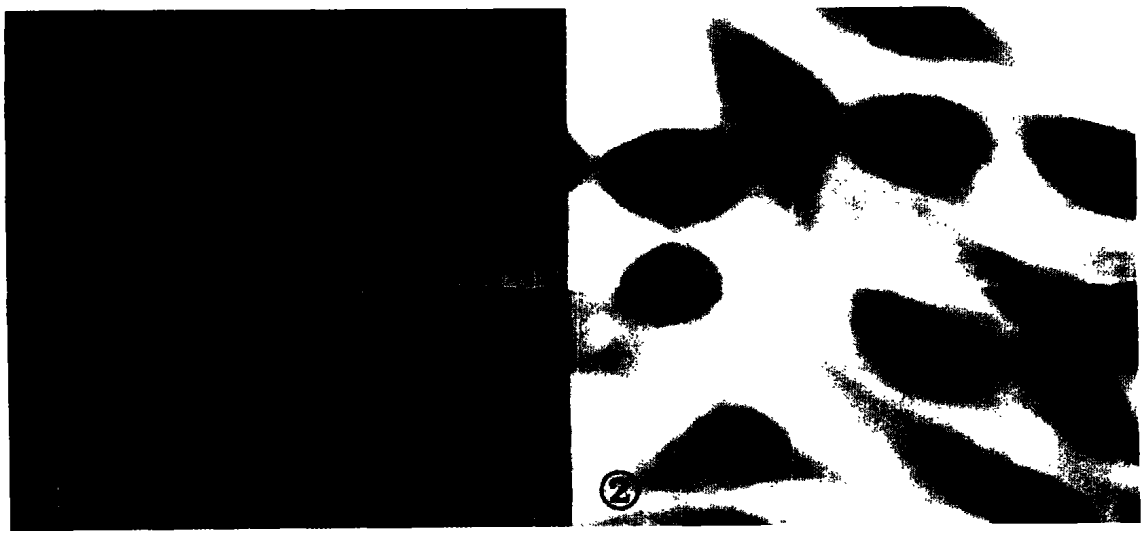


图 1 对照组瘤细胞:①细胞镶嵌排列,呈栅栏状或成腺趋势生长(HE×400)②显示瘤细胞形态(HE×1000)

维普资讯 http://www.cqvip.com

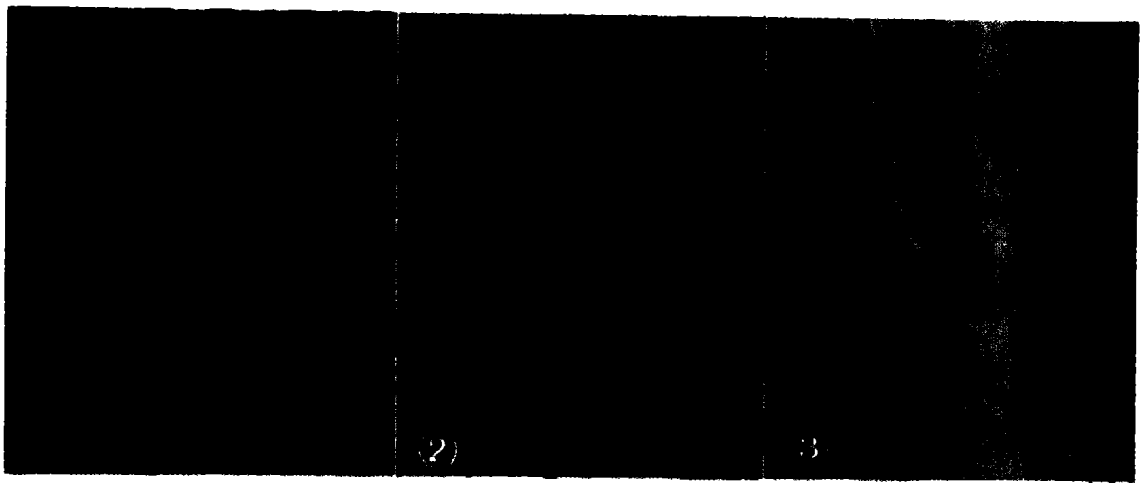


图 2　中效浓度 1/2 剂量的莪术油注射液作用于 RL－95－2 细胞 72h 后，细胞损伤的严重程度（HE×400）
①密集区　瘤细胞胞浆减少，细胞排列极性不明显，胞浆略嗜酸；不少细胞胞浆内有大量空泡；②中度密集区　细胞损伤明显加重：细胞数减少，核浆比例增大，细胞排列极性消失；③稀疏区　细胞密度明显下降，胞浆接近溶解，细胞损伤严重

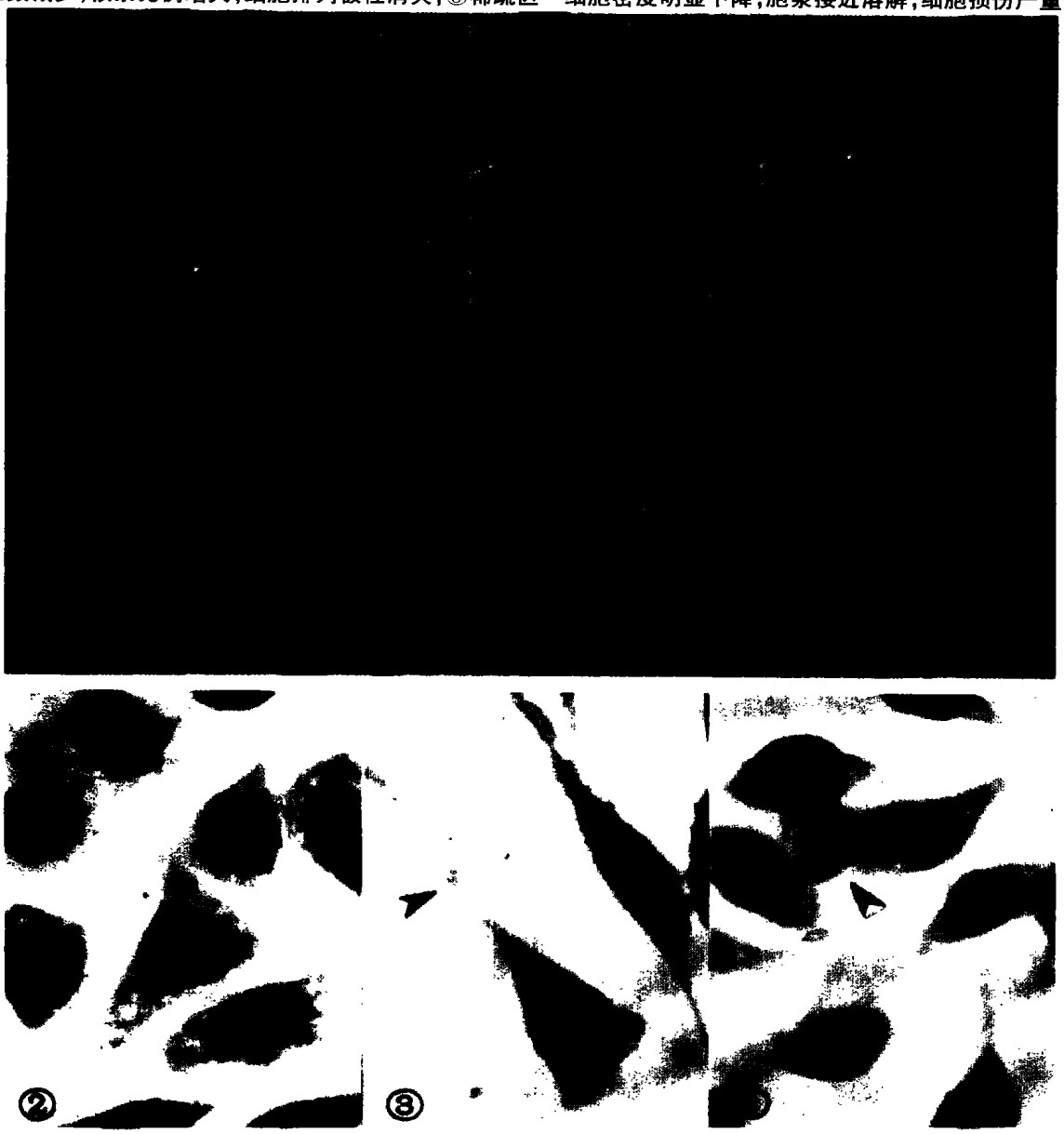


图 3　显示 autophagocytosis 及继发性细胞损伤，可见：①暗视野显微镜下的胞浆内空泡（HE×400）；②胞浆内空泡（HE×1000）；③胞浆溶解（HE×1000）；④胞核溶解（HE×1000）

维普资讯 http://www.cqvip.com

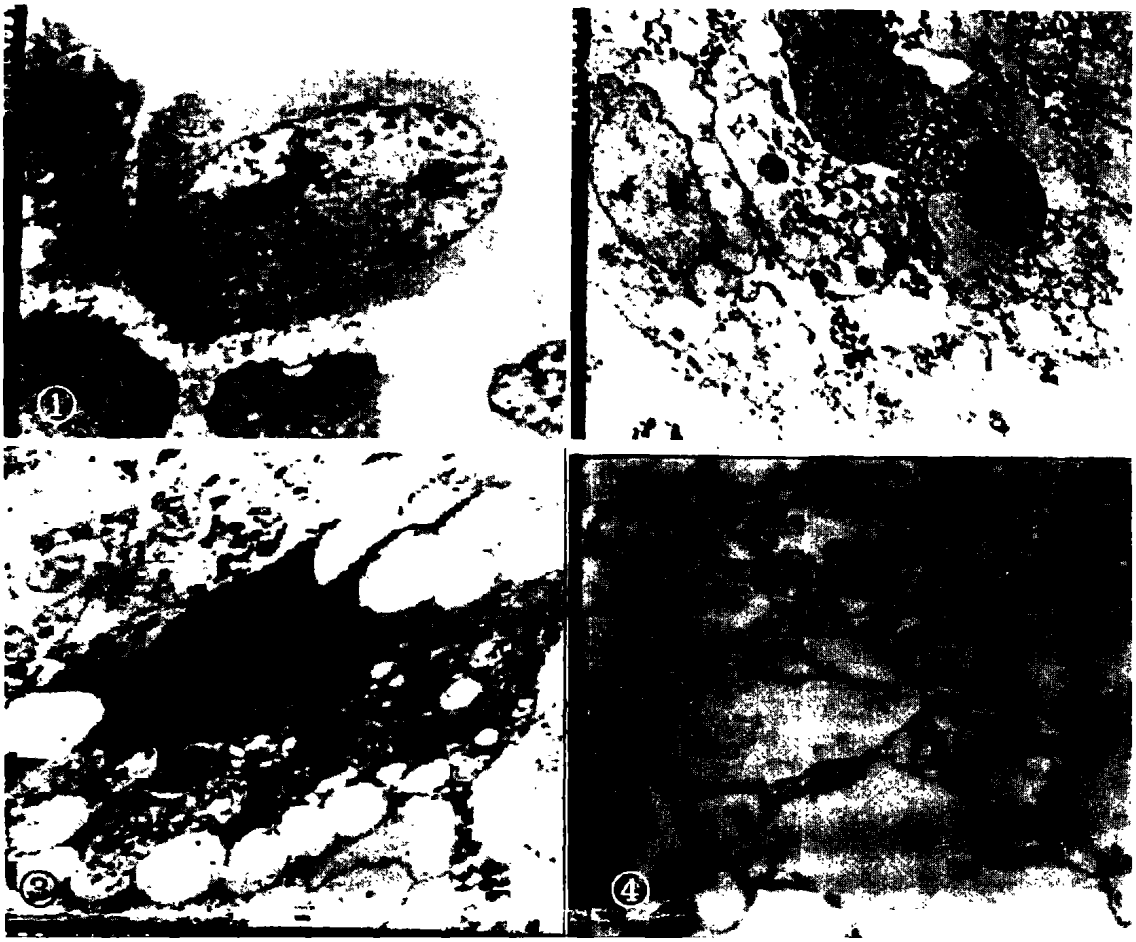


图 4 透射电镜 ①示对照组瘤细胞核大、核浆比例增大、染色质深染、胞膜上可见绒毛 × 5000;②示细胞肿胀,数量增加,亦可见凋亡早期细胞 × 3500;③示细胞核固缩,细胞质电子密度增加 × 5000;④示坏死细胞 × 20000

中效浓度 1/2 剂量的莪术油注射液作用于 RL－95－2 72h 后,镜下显示细胞分布不均,见:(1)密集区(图 2①)瘤细胞胞浆明显减少,核浆比例增大;细胞排列紊乱,很多细胞由长梭形变为短梭形、椭圆形、甚至圆形;胞浆略嗜酸;不少细胞胞浆内有大量空泡存在。(2)中度密集区(图 2②)细胞损伤较上图明显加重:细胞数减少,细胞排列极性消失。(3)稀疏区(图 2③)细胞密度明显下降,细胞损伤严重,胞浆接近溶解。高倍镜下可见:细胞胞浆减少,呈浅伊红色,浆内充满大量不均一的空泡,空泡可融合并压迫胞核(图 3②);有些瘤细胞可见胞浆溶解(图 3③),严重时可有胞核溶解、消失(图 3④)。

2.3 电镜结果

电镜下可见人子宫内膜癌细胞株 RL－95－2 细胞体积较大,核浆比例增大。核形态多不规则,核内常染色质丰富,核仁明显,部分可见多个核仁。胞浆内可见少许内质网及线粒体。细胞表面有较多微绒毛(图 4①)。

中效浓度 1/2 剂量的莪术油注射液作用于 RL－95－2 72h 后,可见细胞皱缩,胞质电子密度增高。染色质聚集于核膜周围,呈团块状。未见典型的凋亡小体,但可见部分细胞呈早期凋亡图像(图 4②)。有些细胞肿胀,表面微绒毛短缩,胞浆中可见大量脂肪滴(图 4③④);有些胞质溶解,进而细胞溶解。

3 讨 论

子宫体癌是最常见的妇科肿瘤,约 90% 的宫体恶性肿瘤起源于子宫内膜上皮,即子宫内膜癌[7]。药物治疗只能作为全身性辅助治疗的措施,且所用细胞毒性药物阿霉素等毒副作用大,影响患者的生存质量。莪术油注射液是临床常用的抗病毒的药物之一,尤多用于婴幼儿合胞病毒感染引起的肺炎。莪术的主要成分包括:莪术醇、莪术酮等 20 多种倍半萜烯类物质及姜黄素。本实验所用的莪术油注射液包含许多成分,其中包括姜黄素和榄香烯。

近年来的研究表明姜黄素具有很强的抗肿瘤作

维普资讯 http://www.cqvip.com

用，对各细胞周期都有抑制作用；而且榄香烯可将肿瘤细胞阻滞于 G_2/M 期[8,9]。

试想如果能将莪术油注射液在体内和瘤体内同时应用于抗肿瘤治疗，方便、快捷、经济。故本实验从分子生物学出发研究了莪术油注射液对人子宫内膜癌细胞株 RL－95－2 的体外抑制作用。MTT 比色法作为抗肿瘤细胞化疗药物敏感性检测，体外药物的敏感性与临床疗效有较高的一致性。因此，在测定个体病例对各种药物不同浓度的敏感性以及选择治疗药物，判断疗效，有重要参考价值[3]。通过 MTT 法证实莪术油注射液对人子宫内膜癌细胞株 RL－95－2 的增殖有明显的抑制作用，呈时间－剂量依赖性。说明莪术油注射液对人子宫内膜癌细胞有细胞毒作用。当药物浓度为 400μg/ml 时，72h 对 RL－95－2 的抑制率可达 95.7%，表明 400μg/ml 时对 RL－95－2 极度敏感。这对临床治疗有一定的指导意义。

对莪术油注射液抗肿瘤作用机制初步探讨，光镜下可见明显的形态学改变：细胞排列的腺样结构消失，细胞变圆、肿胀；胞浆减少、核浆比例增加；胞浆空泡等，即显示“坏死样形态”[10]；暗视野下这种变化尤为明显。透射电镜下可以见到莪术油注射液引起细胞凋亡的多个不同阶段：染色质边集、固缩、断裂；细胞核固缩、碎裂，胞浆内可见多个电子密度增强的核碎片等凋亡早期细胞。此外还可见细胞器肿胀，线粒体嵴增粗，胞浆的脂肪滴大量增加，进而细胞直接坏死、崩解。因此证实莪术油注射液在体外对人子宫内膜癌细胞株 RL－95－2 的增殖有抑制作用。由光镜和电镜的形态学结果推测：莪术油注射液可能是通过坏死和凋亡两种途径共同抑制肿瘤细胞生长，也可能是通过一种 noncaspase 性程序性死亡方式[11]抑制肿瘤细胞生长。但其具体的作用机制及细胞信号转导方式正在进一步研究中。

参 考 文 献

[1] 徐树楠，主编．中药临床应用大全[M]．河北：河北科学技术出版社，1999；1：452－453.

[2] 王茂盛，主编．中药学[M]．北京：科学技术出版社，2001；1：263－264.

[3] 骆云鹏，殷玉柄，汤为学，等．中国医药荟萃（消化道疾病专辑）[M]．北京：北京科学技术出版社，1991；89－92.

[4] 王瑞雪，骆云鹏，汤为学．抗癌药敏实验 MTT 法在癌细胞株研究中的应用[J]．重庆医科大学学报，1991；16(4)：60－65.

[5] 井上雄弘，小川一诚．药剂敏感性实验[J]．日癌志，1990；25(4)：845－846.

[6] 汤为学，程平艳，骆云鹏．顺铂 5－氟尿嘧啶长春新碱配伍对人肝癌细胞株(7721)的相互作用[J]．中国临床药学杂志，1998；7(1)：5－9.

[7] Vincent T, De Vita, Jr. samuel Hellman, et al. Cancer Principles & Oncology[M]. The Fifth Edition, 山东：山东科学技术出版社，2001；1526－1540.

[8] Hour TC, Chen J, Huang CY, et al. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21 (WAF1/CIP1) and C/EBP beta expressions and Suppressing NF－kappaB activation[J]. Prostate, 2002；51(3)：211－218.

[9] Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and Jnduces micronucleation in MCF－7 breast cancer cells[J]. Mutat Res, 2002；518(1)：71－84.

[10] 北中千史，口野嘉幸．ネクロシ－ス形态を示すカスハ－ズ非依存的细胞死——制御机构を细胞死亡アポト－シス[J]．蛋白质 核酸 酵素，1999；4(14)：2091－2100.

[11] Guido M, Isabelle J. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis [J]. AJP, 1995；146(1)：3－15.