DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.019
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
42 2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000
文章编号:1000-5404(2000)01-0042-04

论著

重组人肿瘤坏死因子致肺癌细胞(LC-6)凋亡的研究

赵云平,陈惠孙,蒋耀光,王如文 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所胸心外科,重庆 400042)

提 要 目的:探讨重组人肿瘤坏死因子(rhTNF)引起肺癌细胞(LC-6)死亡的机制。方法:应用原位细胞毒性分析、DNA降解片段琼脂糖凝胶电泳、形态学和流式细胞学测定的动态分析。结果:rhTNF作用于肺癌细胞(LC-6)数小时后,引起细胞核DNA解成寡聚核苷酸片断,说明肺癌细胞(LC-6)以细胞凋亡的方式死亡,并且细胞凋亡的程度与重组人肿瘤坏死因子作用的时间及浓度呈正相关。单纯应用放线菌素D后则肺癌细胞(LC-6)表现为细胞坏死,rhTNF与放线菌素D伍用后可以明显增强这种作用。结论:rhTNF是通过激发LC-6细胞发生细胞凋亡而发挥其细胞毒性作用。

关键词 肺癌细胞(LC-6);细胞凋亡;重组人肿瘤坏死因子
中图法分类号 R394.2;R394.3;R734.2 文献标识码 A

Apoptosis of lung cancer cells induced by recombinant human tumor necrosis factor

Zhao Yun-ping, Chen Hui-sun, Jiang Yao-guang, Wang Ru-wen (Department of Thoracic Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract Objective: To explore the mechanism of apoptosis of lung cancer cells (LC-6) induced by recombinant human tumor necrosis factor (rhTNF). Methods: The *in situ* cytotoxicity assay, qualitative analysis of DNA fragmentation and flow cytometry were used in this study. Results: Treatment with rhTNF led to fragmentation of DNA into nucleosemal oligomers. This event preceded cell death in several hours and had close correlation with concentration of rhTNF and time of treatment. Treatment with DNA topoisomerase II inhibitor accelerated the rhTNF-mediated DNA fragmentation. Conclusion: rhTNF exerts its cytotoxic effects on the lung cancer cells through activating their apoptosis.

Key words lung cancer cell; apoptosis; recombinant human tumor necrosis factor

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)是一种在体内和体外均对肿瘤细胞具有杀伤作用的细胞因子[1],实验证明肿瘤坏死因子对肺癌患者[2]。但TNF对肿瘤细胞发挥毒性作用的机制仍不清楚。最近的研究表明:TNF可能通过与敏感靶细胞结合,激活细胞Ca^{2+}~Mg^{2+}依赖的限制性核酸内切酶,导致基因组DNA分子降解为寡聚核苷酸片段,引发细胞凋亡而发挥其毒性作用[3,4]。本研究应用重组人肿瘤坏死因子(Recombinant human tumor necrosis factor, rhTNF)作用于肺癌细胞株(LC-6),观测其原位细胞毒性时相变化,定性分析靶细胞基因组DNA分子的降解模式和流式细胞学测定细胞凋亡的变化,探讨rhTNF对LC-6细胞发挥毒性作用的机制,为肿瘤坏死因子治疗肺癌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

rhTNF(SIGMA美国);肺癌细胞(LC-6)株LIFE-TECH;ΦX-174-RF DNA/Hae-Ⅲ(Promega美国);放线菌素D(华美公司);新型蛋白酶K(LIFETECH美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 LC-6细胞用含10%来活小牛血清的RPMI 1640培养液,于37℃,5%CO_2条件下长期维持培养,实验前需传3代以上,实验分为:培养液对照组;低剂量rhTNF组(100 ng/ml);高剂量rhTNF组(200 ng/ml);单纯放线菌素D组(100μmol/L);低剂量rhTNF组(100ng/ml)+放线菌D组。

作者简介:赵云平,男(1968.5),云南省宜良市人,硕士,主治医师,主要从事胸心外科学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68757241

收稿日期:1999-01-23;修回日期:1999-08-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

孵育时间分别为 6、12、25、36 h。

1.2.2　原位细胞毒性分析　　消化传代的 LC-6 细胞按 1 ∶ 2～1 ∶3 的比例（V/V）加入 RPMI 1640 培养液培养过夜，待细胞铺满细胞培养瓶达 80%左右时，更换培养液，培养 48～72 h 后，细胞呈对数生长旺盛期，吸去培养上清液，加入 0.25%胰蛋白酶消化细胞约 1 min 后弃去，用培养液将细胞吹打下后制成单细胞悬液，400× g，离心 5 min，再用培养液将 LC-6 细胞悬液浓度调至 4× 10^5/ml。在 96 孔微量培养板上，每孔入 LC-6 细胞悬液 100 μl，置培养箱过夜，细胞贴壁伸展生长，吸去上清，分别加入培养液、rhTNF（100 ng/ml）培养液、放线菌素 D（10 μmol/L）、rhTNF（100 ng/ml）和放线菌素 D（10 μmol/L）各 100 μl，与此相同共准备 4 块培养板，分别培养 6、12、24、36 h 后，吸出上清，各孔入生理盐水 200 μl 洗涤，再加入 0.05%结晶紫染色固定液（20%乙醇），染色 10 min，冲洗培养板，残留并染上色的细胞为 LC-6 活细胞，在 450 型酶联免疫标记自动分析仪上选择 595 nm 波长处测定各孔光密度值（D_{λ}），根据公式：（1－样品孔 D_{595} 值）/对照孔 D_{595} 值× 100%，计算出原位杀伤细胞的百分率。

1.2.3　DNA 降解片段琼脂糖凝胶电泳[5]　　取处理后各时相 LC-6 细胞约（1.5～2.0）× 10^6 个，4 ℃，250× g，离心 5 min，弃上液，加入 30 μl 细胞溶解液和 15 μl RNase A，轻轻混匀 37 ℃温育 6 h 加入 10 μl 新型蛋白酶 K（20 mg/ml），50 ℃温育 18 h。取 1.5 g 琼脂糖加入到 100 ml 1× TBE 电泳缓冲液（pH 8.0）中，放至微波炉中强热加温约 2 min 使其溶解，待凝胶冷至 50 ℃时，加入 5 μl 溴化乙锭（EB 10 mg/ml）溶液混匀，于水平电泳槽中制胶，以 φX-174-RFDNA/Hae- Ⅲ为 DNA 分子量标记，加入不同样品，55 V 电压下电泳 2～3 h，紫外照相系统下观察并照相。

1.2.4　细胞凋亡的流式细胞学检测[6]　　取处理后各时相 LC-6 细胞约 1× 10^6 个，悬浮于 200 μl PBS 中，以 70%冷乙醇快速固定至少 2 h，250× g 离心 10 min，弃上清液，以 1 ml PBS 重新溶解沉淀细胞，加入 PI 及 RNase A 于 37℃孵育 30 min，细胞经微孔滤膜过滤后，利用流式细胞仪在激发光波长为 488 nm 条件下进行分析。

1.2.5　形态学观察　　处理后的 LC-6 细胞以 3%戊二醛液固定，环氧树脂包埋，在电子显微镜下观察并照相。

1.3　统计学分析

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，差异的显著性以 t 检验、方差分析及 χ^2 检验分析。

2　结果

2.1　原位细胞毒性分析

见表 1。单纯 rhTNF（100 ng/ml，200 ng/ml）处理 24 h 后，分别有 32.0%、58.4%的细胞死亡，36 h 后则有 52.6%，80.4%的细胞死亡。单纯放线菌素 D 处理 24 h 后，约有 58.7%的细胞死亡，36 h 后则有 96.6%的细胞死亡，低剂量 rhTNF（100 ng/ml）与放线菌素 D 伍用 6 h 后，即有 22.4%的细胞死亡，12 h 后则有 38.8%的细胞死亡，24 h 后即有 64.4%的细胞死亡。

表 1　不同处理组 LC-6 细胞细胞毒性和流式细胞学测定（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Cytotoxicity and flow cytometry in LC-6 cells treated differently（$\bar{x} \pm s$）

Treatment	Times（t/h）	Cytotoxicity（%）	Flow cytometry
rhTNF（100 ng/ml）	6	5.5 ± 0.2	3.64 ± 0.8
	12	15.4 ± 0 6	10.31 ± 1.3
	24	32.0 ± 1.4	27.42 ± 2 0
	36	52.6 ± 2 4	33.71 ± 3.1
rhTNF（200 ng/ml）	6	14.0 ± 0.3	10.78 ± 1.0
	12	34.6 ± 0.8	22.07 ± 1.4
	24	58.4 ± 1.6	32.64 ± 2.9
	36	80.4 ± 2.5	44.36 ± 3.8
Dactinmycin（10 μmol/L）	6	4.6 ± 0.2	1.59 ± 0.4
	12	18.6 ± 0.8	15 24 ± 0.9
	24	58.7 ± 2.0	13 69 ± 1.1
	36	96.6 ± 2 8	22.87 ± 1.8
rhTNF（10 μmol/L） + Dactinmycin（10 μmol/L）	6	22.4 ± 0.7	15.73 ± 1.7
	12	38.8 ± 0 8	26.55 ± 1.9
	24	64.4 ± 2.8	38.71 ± 2 4
	36	86.4 ± 3.0	48.32 ± 3.1

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 不同处理组 LC-6 细胞基因组总 DNA 分子断裂片段的特征，见图 1、2

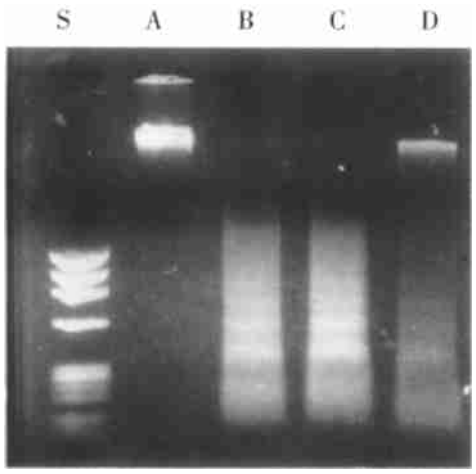


图 1 DNA 电泳分析

S：DNA 分子量标准对照；A：正常肺癌细胞基因组总 DNA 分子；B：肺癌细胞经 rhTNF(100 ng/ml)处理 12 h；C：肺癌细胞经 rhTNF(100ng/ml)处理 24 h；D：肺癌细胞经 rhTNF(100 ng/ml)处理 36 h

Fig 1 Electrophoretic analysis of DNA on 1.5% agarose gel. DNA was extracted from untreated LC-6 cells (lane A) and from intubation with rhTNF (100 ng/ml) alone for 12 h (lane B), 24 h (lane C) and 36 hours (lane D)

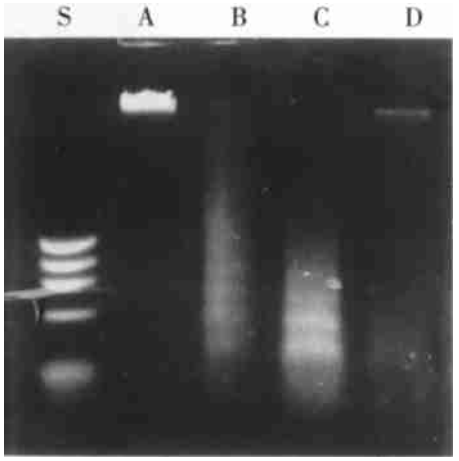


图 2 DNA 电泳分析

S：DNA 分子量标准对照；A：正常肺癌细胞基因组总 DNA 分子；B：肺癌细胞经 rhTNF(100ng/ml)＋放线菌素 D 处理 12 h；C：肺癌细胞经 rhTNF(100 ng/ml)＋放线菌素 D 处理 24 h；D：肺瘤细胞经 rhTNF(100 ng/ml)＋放线菌素 D 处理 36 h

Fig 2 Electrophoretic analysis of DNA on 1.5% agarose gel. DNA was extracted from untreated LC-6 cells (lane A) and from intubation with rhTNF (100 ng/ml)＋dactinmycin D(10 μmol/L) for 12 h (lane B), 24 h (lane C) and 36 hours (lane D)

2.3 流式细胞学检测表明

见表 1。高剂量 rhTNF 组，各时相亚二倍体细胞变化比例分别为 10.78%、22.07%、32.64%、44.36%，其变化程度与细胞内 DNA 分子降解程度相近；低剂量 rhTNF 组也与此一致。而单纯放线菌素 D 组，各时相亚二倍体细胞变化程度明显低于细胞内 DNA 分子降解。

2.4 电镜观察

高剂量 rhTNF 组 LC-6 细胞表现为细胞体积缩小，胞膜皱缩，细胞核深染，核内染色质呈块状聚集于核膜下以及凋亡小体形成，见图 3。

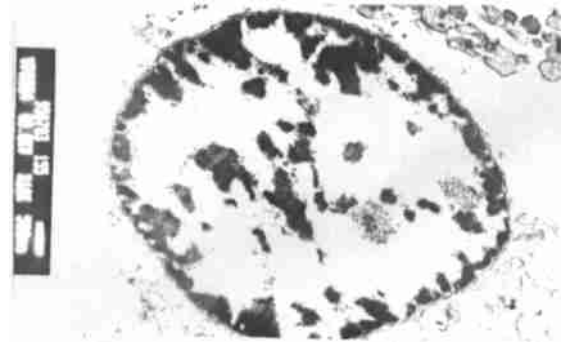


图 3 LC-6 细胞形态学观察：细胞体积缩小，核膜皱缩，细胞核深染，核内染色质呈块状聚集于核膜下 (TEM× 10 000)

Fig 3 LC-6 cell death under Transmission electron micrographs death：Condensation of chromatin and contract of the nuclear membrane (TEM × 10 000)

3 讨论

细胞凋亡(Apoptosis)是一种在各种刺激因素作用下细胞的自主死亡方式，其形态学表现为细胞体积缩小、细胞核固缩、染色质边聚、胞膜呈泡状突起[7]。生化特征表现为基因组 DNA 分子降解呈相差 180～200 bp 的核苷酸片段，在琼脂糖凝胶电泳上呈梯状改变[8]。流式细胞学测定出现亚 G_1 期细胞。肿瘤坏死因子(TNF)是一各具有多种生物学活性的细胞因子，对多种肿瘤细胞均具有杀伤作用[1]。近年文献对其作用机制进行了有益探索，本研究以肺癌细胞 (LC-6)为靶细胞，通过原位细胞毒性分析，DNA 降解模式及流式细胞学动态分析，说明 rhTNF 通过激发细胞凋亡的方式对肺癌细胞发挥毒性作用，此结论与最近的结果相似[3]。与此相反，LC-6 细胞持续暴露于 10 μmol/L 放线菌素 D 液中时，细胞内 DNA 碎片及流式细胞学改变并不随细胞毒性而改变，细胞以坏死为主，说明放线菌素 D 是通过细胞坏死方式发挥细胞毒性的。有研究说明：将 LC-6 细胞与放线菌素 D 作用 1 h 后，洗去培养液，加入

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

新鲜培养液继续培养, 细胞仍于 2 d后死亡, 但这与持续暴露引发的细胞死亡方式有些不同: 短暂暴露于放线菌素 D 后第 1 天可见到细胞内 DNA 分子降解, 这种降解片断的特征与细胞凋亡相似, 因此短暂暴露于放线菌素 D 可以引发细胞凋亡, 而持续暴露于放线菌素 D 也许不仅可以引发细胞凋亡, 更可引发细胞坏死的过程。已有文献[9] 报道: 在特定条件下, 细胞坏死的发生远比细胞凋亡发生快, 如果这适合于 LC-6 细胞 , 就可以解释肺癌细胞持续暴露于放线菌素 D 液中能引起细胞毒性, 却不能检测到 DNA 分子降解片段的特征性改变。放线菌素 D 作为 Topo- Ⅱ的有效抑制剂, 与 rhTNF 伍用后明显加快肺癌细胞凋亡过程, 其可能是抑制 Topo- Ⅱ的活性, 增强细胞内限制性核酸内切酶活性, 通过改变染色体的形状, 增加 DNA 分子对限制性核酸内切酶的敏感性, 导致 DNA 分子降解, 具体机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Zinetti M, Galli G, Demitri M T, *et al*. Chlorpromazine inhibits tumour necrosis factor synthesis and cytotoxicity *in vitro*[J]. Immunology, 1995, 86(3):416－421.

[2] Powell C B, Herzog T J, Scott J H, *et al*. Evidence for a protein synthesis-dependent and -independent TNF alpha cytolytic mechanism[J]. Gynecol Oncol, 1995, 58(3):327－335.

[3] Enari M, Hug H, Hayakawa M, *et al*. Different apoptotic pathways mediated by Fas and the tumor-necrosis-factor receptor. Cytosolic phospholipase A 2 is not involved in Fas-mediated apoptosis[J]. Eur J Biochem, 1996, 236(2):533－538.

[4] Deocster E, Vanhaesebroeck B, Vandenabeele P, *et al*. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor[J]. J Biol Chem, 1995, 270(31):18 473－18 478.

[5] Cui S, Reichner J S, Mateo R B, *et al*. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms[J]. Cancer Res, 1994, 54(9):2 462－2 467.

[6] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, *et al*. Features of apoptostic cell measured by flow cytometry[J]. Cytometry, 1992, 13(6):795－808.

[7] Kerr J F R, Wyllie A H . Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kine-tics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(1):239－257.

[8] Borner C, Martinou I, Mattmann C, *et al*. The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis[J]. J Cell Biol, 1994, 126(4): 1 059－1 068.

[9] Chang N S. Hyaluronidase induces murine L929 fibrosarcoma cells resistant to tumor necrosis factor and Fas cytotoxicity in the presence of actinomycin D[J]. Cell Biochem Biophys, 1995－96, 27(2):109－132.

(编辑　汪勤俭)

(上接 41 页)

点状坏死, 其中常有中性粒细胞浸润。肝窦周网状纤维增多和胶原纤维形成。电镜下肝窦周间隙,肝细胞间隙增宽,可见明显肝窦周隙和肝细胞之间有大小不等胶原纤维束形成。本组还观察到窦周隙的贮脂细胞大多数富含脂滴, 部分转化为纤维母细胞并形成胶原纤维。肝细胞内主要以滑面内质网增生, 高尔基器发达, 线粒体形态不规则, 大小不等改变为主, 有时可见巨大线粒体。

3　讨论

关于酒精性肝病的发生已知为乙醇过多进入肝细胞以后, 氧化为乙醛, 由于乙醛干扰了三羧酸循环的正常进行,脂肪酸氧化受阻, 造成合成甘油三酯过量, 沉积于肝细胞内, 因而脂变多见[2]。此外,由于代谢紊乱,线粒体肿胀,嵴消失可形成巨大线粒体[2]。酒精性肝病的另一个显著特点是窦周纤维化, 研究证实, 乙醛可直接刺激肝窦贮脂细胞(Ito 细胞)增生, 也可通过刺激枯否氏细胞分泌一些细胞因子激活 Ito 细胞[2]。在肝纤维、肝硬化时, Ito 细胞变形, 增生, 转化为肌纤维母细胞样的细胞, 它产生的 ECM 及胶原沉积于 Disse 腔内,引起窦周纤维化。本组也观察到在纤维化的形成过程中, Ito 细胞由"静止"的胞浆富含脂滴的细胞"活化"逐渐失去脂滴, 转变肌纤维母细胞样细胞。在各种细胞因子的参与下, 大量合成胶原纤维,而在观察中见到较多中性粒细胞浸润, 这些炎细胞是否成为胶原纤维合成的一种细胞因子,还有待进一步研究。据报道, 滑面内质网的增生主要与肝脏内药物及毒物代谢有关[3], 因此, 酒精性肝病时滑面内质网的增生可能是肝细胞处理酒精代谢毒物的一种适应性反应。

上述超微病理改变及发生机制与平原较一致[2,4]。但由于高原藏民族长期大量饮酒、种族差异、生活习惯及地理环境, 酒精性肝病的发生率, 、分型及各型病变程度与国内平原和国外比较,均存在一定的差异,另文报道。

关键词　高原; 藏族; 酒精性肝纤维化; 超微结构

中图法分类号　R575　　文献标识码　B

参考文献

[1] 范建高 . 脂肪肝与肝纤维化的关系及其机制[J]. 国外医学: 消化系疾病分册, 1997, 17(2): 92－95.

[2] 赵静波, 王泰龄, 刘　霞, 等 . 酒精性肝病与慢性病毒性肝炎的病理鉴别[J] . 诊断病理学杂志, 1994, 1(2): 68－71.

[3] 周晓军, 张泰和, J C E Underwood. 慢性丙型肝炎的超微病理学研究[J] . 中华病理学杂志, 1993, 22(3): 157－159.

[4] 武忠弼 主编 . 超微病理学[M] . 北京: 人民卫生出版社, 1990. 228－229.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net