DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.018

维甲酸诱导喉癌及鼻咽癌细胞株凋亡的研究

汪 建 (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科)重庆,630038
林代诚 梁传余 (华西医科大学附一院耳鼻咽喉科)成都,610041

提 要 目的:研究维甲酸诱导鼻咽癌和喉癌细胞株凋亡。方法:采用 DNA电泳、透射电镜及 PI染色及流式细胞技术。结果:4μmol/L的维甲酸作用于喉癌及鼻咽癌细胞株 22h,成功地诱导出细胞凋亡。结论:维甲酸能诱导喉癌及鼻咽癌细胞株的凋亡,可以此作为进一步研究喉癌及鼻咽癌细胞株凋亡的模型。

关键词 细胞凋亡;维甲酸;喉肿瘤;鼻咽肿瘤;DNA
中图法分类号 R739.6

细胞增殖、分化和死亡构成细胞生活周期,增殖和死亡间的动态平衡是维持机体自身稳定的基础[1]。细胞凋亡有别于坏死[2],是生物细胞广泛存在的现象,在生理和病理过程中起着重要的作用。研究发现这种细胞凋亡不仅限于发生、分化、正常组织以及细胞转化等生理过程,也与癌细胞退缩、放射线照射及抗癌药的应用有着密切的关系。

本实验旨在建立用维甲酸诱导喉癌及鼻咽癌细胞株凋亡的模型。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

低分化鼻咽癌细胞(CNE-2)购自中山医科大学肿瘤医院遗传室,低分化喉癌细胞株 Hep-2购自北京动物所,培养液为 RPMI 1640内含15%灭活小牛血清,细胞置 CO_2孵箱,37℃培养。

1.2 维甲酸处理

全反式维甲酸(All transretinoic acid, RA, Sigma)以不同浓度(1 2 4 8μmol/L)作用于各细胞 10 22 48 h。

1.3 DNA电泳[3]

收集培养细胞,用 140 mmol/L NaCl 20 mmol/L EDTA洗涤细胞,加 400μl/L裂解液(200 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA,蛋白酶 K 50μg/ml, 1% SDS),37℃、4h,等体积饱和酚抽提,加 RNA酶 200 mg/L,37℃、4h,加蛋白酶 K 300 mg/L,37℃、4h。再加等体积的饱和酚、氯仿、异戊醇(25∶24∶1)抽提,2倍体积无水乙醇沉淀 DNA,-20℃过夜,用 TE液 20μl溶解 DNA。取 6μl DNA在 1%琼脂糖中电泳,溴化乙淀显色,观察电泳情况并照像。

1.4 细胞凋亡的形态学观察

1.4.1 透射电镜观察 常规方法制备电镜标本,于日立 H600型透射电镜下观察各组细胞内超微结构变化。

1.4.2 荧光显微镜下观察凋亡小体[4] ①收集细胞;②PBS悬浮、离心;③悬浮细胞于 1 ml PBS;④用带针头的针筒将细胞迅速挤入 3 ml无水乙醇,放置 5 min;⑤离心并悬浮细胞于 200μl 0.4% TritonX-100,加 200μg RNA酶,室温 10 min;⑥加 400μg PI,暗处 4℃过夜;⑦细胞涂片,荧光显微镜下观察,拍照。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡峰

收集待测细胞,PBS洗 2次,75%乙醇悬浮固定,溴化乙淀荧光染料对细胞进行荧光染色后即可上机检测[5]。

2 结果

2.1 DNA电泳

只有维甲酸 4μmol/L组作用 22 h, Hep-2及 CNE-2出现典型的 DNA凋亡梯状带(Ladder),见图 1。

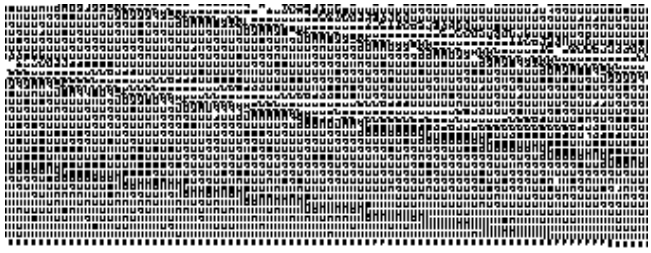


图 1 琼脂糖凝胶电泳:Lane 1, 2为 Hep-2 CNE-2对照组,Lane 3, 4为 4μmol/L维甲酸作用于 Hep-2 CNE2细胞 22 h, M:标准分子量 DNA, EcoI/HandIII

Fig 1 Agarose gel electrophoresis: DNA fragmentation after treatment of Hep-2 CNE-2 with (lane 3, 4) or without (lane 1, 2) 4μmol/L RA for 22 h

2.2 流式细胞仪测定 DNA含量变化

结果发现在各组细胞中,在 G_0/G_1期前有一群 DNA含量低的细胞形成的峰(凋亡峰),测定时细胞均完整并无碎片,因而表明有凋亡群体存在。其所占细胞总数比例见图 2 3。

2.3 细胞凋亡的形态学观察见图 4

可见细胞微绒毛减少、核浓缩、边缘起皱、染色质分块,凝缩在核膜周边,胞浆内细胞器聚集,内质网膨胀,形成一系列的膨胀小泡。

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

2.4　凋亡小体的 PI显色

在荧光显微镜下细胞核均染红色,可见细胞核碎裂,明显小的细胞核可认为是凋亡小体,见图 5

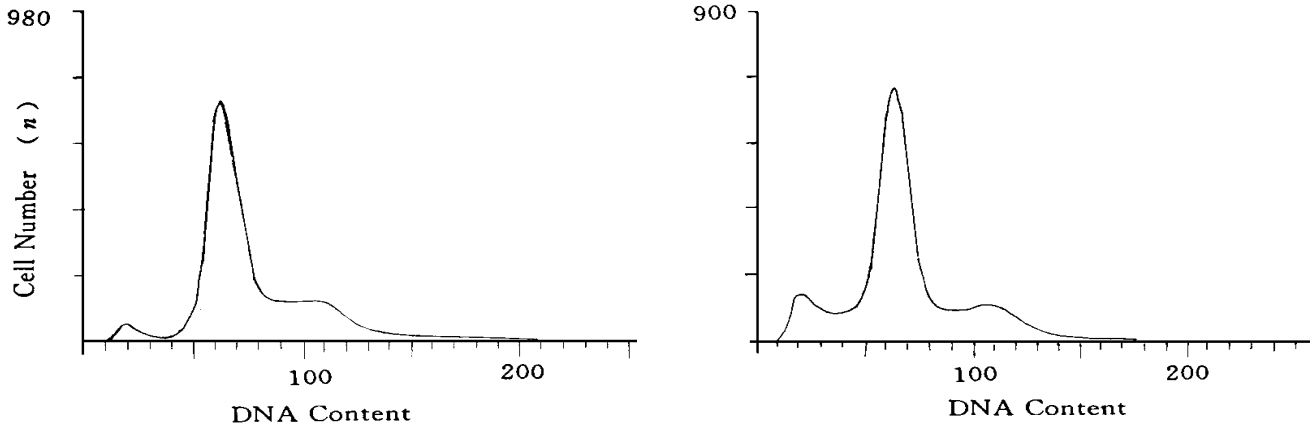


图 2　左: Hep-2细胞,传代 22 h,凋亡峰为 5.5%。右: 4μmol/LRA作用 Hep-2细胞 22 h,凋亡峰为 17.2%

Fig 2　Apoptosis peak in Hep-2 cell line was 17.2% treated with (right) or 5.5% without (left) RA 4μmol/L for 22 h

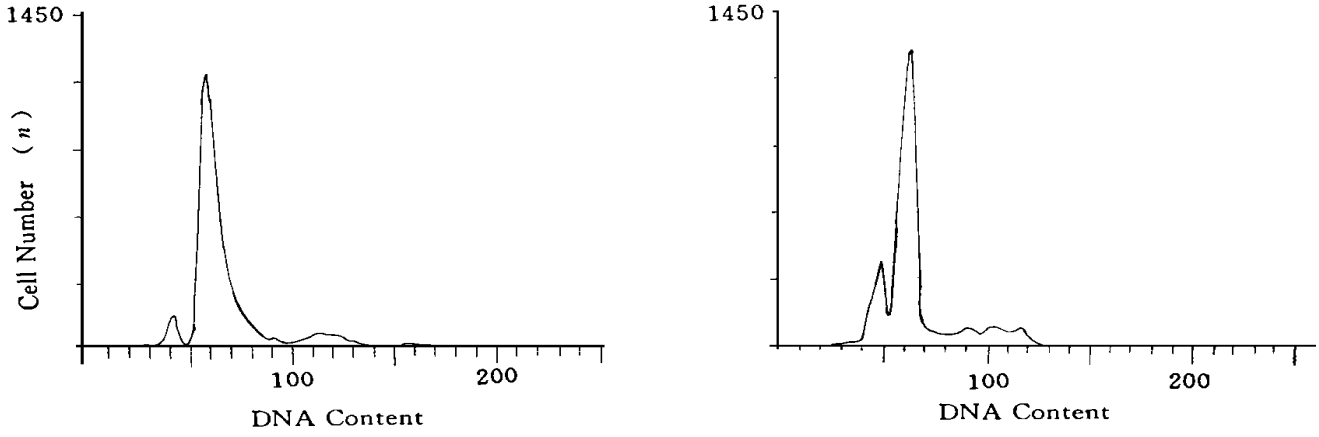


图 3　左: CNE-2细胞,传代 22 h,凋亡峰为 4.5%。右: 4μmol/L RA作用于 CNE-2细胞 22 h,凋亡峰为 14.5%

Fig 3　Apoptosis peak in CNE-2 cell line was 14.5% treated with (right) or 4.5% without (left) RA 4μmol/L for 22 h



图 4　左: Hep-2细胞对照组电镜观察(× 4 000)。中(× 12 000),右(× 6 000): Hep-2加 RA组电镜观察。可见细胞微绒毛减少,染色质浓聚、分块,核起皱的早期凋亡变化

Fig 4　Early changes of apoptosis decreased in microvilli, condensation and fragmentation of chromatin and shrinkage of the nuclei. Hep-2 cell were treated with (right TEM× 6 000 middle TEM× 12 000) or without (left TEM× 4 000) RA

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

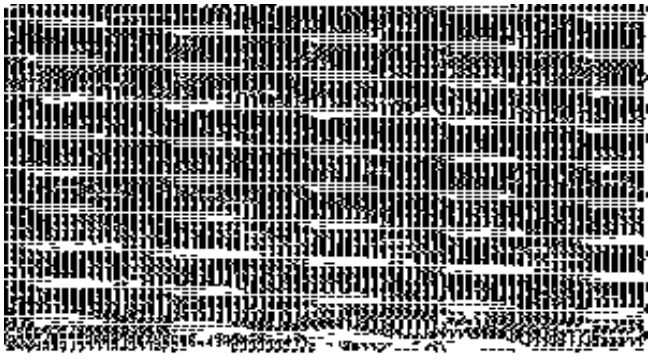


图 5 细胞 PI染色: 左为 Hep-2细胞未加药组,右为 Hep-2细胞加 4μmol/L维甲酸作用 22 h,可见核碎裂,碎裂的核构成凋亡小体

Fig 5 Fragmentation of nuclei, the fragmented nuclei forming the apoptotic body. Cells staining with PI (Propidium iodide): Hep-2 cells were treated with (right) or without (left) 4μmol/L RA for 22 h

3 讨论

细胞凋亡是在人或动物的许多组织中发现的一类程序性细胞死亡过程。通过细胞凋亡可使体内失去生命力的细胞或生理上不需要的细胞,以有序的方式被清除,从而维持组织中的细胞形成(有丝分裂)与细胞破坏(凋亡)之间的平衡关系。

凋亡的细胞在形态上的特征为细胞表面微绒毛减少,细胞核浓缩,染色质浓聚成一新月形于核膜周边,胞质浓缩,细胞体积缩小,细胞器聚集。本研究中,在维甲酸处理的人鼻咽癌、喉癌细胞中通过透射电镜及 PI染色荧光显微镜,可观察到较为典型的细胞凋亡的形态学变化。

细胞凋亡最具特征性的改变就是染色体 DNA的片段化,成为(180~200) bp及其倍数的系列 DNA片段,进行电泳后就可能看到一个 DNA阶梯。我们的研究证实维甲酸能诱导喉癌及鼻咽癌细胞株凋亡,并能观察到 DNA特征性断裂。

采用流式细胞技术,检测 DNA含量的变化,在二倍体峰之前检测到亚二倍体峰,用凋亡程序软件分析确认为凋亡峰,表明有凋亡群体存在,并得出凋亡细胞占总数的百分比,维甲酸组凋亡细胞数较对照组高。

本研究用维甲酸成功地诱导人喉癌、鼻咽癌细胞发生凋亡,我们可以此作为研究喉癌及鼻咽癌细胞株凋亡的模型,将有助于我们进一步开展对喉癌及鼻咽癌细胞株凋亡分子机理的研究。

参考文献

1 Schwartzman R A, Cidlowski J A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocr Rev, 1993; 14(2): 133

2 Gerschenson I E, Rotello R J. Apoptosis: a different type of cell death. FASEB J, 1992; 6(6): 2450

3 Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J *et al*. Wild-type p53 induces apoptosis are characterized by interleukin-6. Nature, 1991; 352(25): 345

4 Pandey S, Wang E. Cells *en route* to apoptosis are characterized by upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2, and RB phosphorylation, resembling events of early cell-cycle traverse, J Cell Biochem, 1995; 58(2): 135

5 Sylvie F, Laurent G, Rouanlt J P *et al*. Apoptosis without decrease of cell DNA content. FEBS Lett, 1995; 367(2): 188

(收稿: 1996-10-22;修回: 1997-01-29)

(编辑 汪勤俭)

Induction of apoptosis of cell strains of laryngeal and nasopharyngeal carcinoma with retinoic acid

Wang Jian, Lin Daicheng, Liang Chuanyu (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To study the inducing role of retinoic acid (RA) in the apoptosis of cell strains of laryngeal and nasopharyngeal carcinoma. Methods: In the study, fluorescent microscopy, electron microscopy, DNA electrophoresis and flow cytometry were applied. Results: Apoptotic cells could be seen at the 22nd hour after the treatment with 5μmol/L RA. Conclusion: RA can induce the apoptosis of the cell strains of laryngeal and nasopharngeal carcinoma.

Key words apoptosis; retinoic acid; flow cytometer.

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