

原位末端标记技术检测咖啡酸锗对小鼠宫颈癌 U14 瘤的凋亡诱导作用^{*}

刘春花,肖 纯,支雪萍,徐优慧(江西中医学院基础医学院,南昌 330006)

【摘要】 目的 应用脱氧核苷酸转移酶介导的原位末端标记技术(TUNEL),检测咖啡酸锗对小鼠宫颈癌 U14 瘤的凋亡诱导作用。**方法** 建立小鼠宫颈癌 U14 移植瘤动物模型,观察抑瘤率,并应用 TUNEL 检测各组瘤细胞凋亡阳性率。**结果** 咖啡酸锗对小鼠有明显抑制作用,其高、中、低剂量分别为 45.47%、57.86%、55.83%,差异有统计学意义($P<0.01$),TUNEL 显示咖啡酸锗低剂量组细胞凋亡阳性率最高,达 80.00%,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 咖啡酸锗对小鼠 U14 瘤有明显的抑制作用,可诱导 U14 移植瘤细胞凋亡,可能是其抑癌机制之一。

【关键词】 原位末端标记技术; 咖啡酸锗; 宫颈癌 U14; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.001

中图分类号:R446;R737.33

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)20-2177-02

TUNEL determination of apoptosis effects induced by caffeic acid Ge on rat cervical carcinoma U14* LIU Chun-hua, XIAO Chun, ZHI Xue-ping, XU You-hui. Basic Medical College, Jiangxi College of TCM, Nanchang, Jiangxi 330006, China

【Abstract】 Objective To use situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated -UTP nick end labeling (TUNEL) for detecting the apoptosis effect induced by caffeic acid Ge on rat cervical carcinoma U14. **Methods** To establish the rat model of transplantable cervical carcinoma U14. The tumor inhibition rate was observed and the positive rate of apoptosis in various groups of tumor cells was detected by TUNEL. **Results** Caffeic acid Ge had the significant inhibitory effect on rats. The positive rate of apoptosis in high, middle and low dose groups were 45.47%, 57.86% and 55.83%, respectively ($P<0.01$). The TUNEL method showed that the positive rate of apoptosis in low dose group was the lowest, reaching 80.00% with statistical difference compared with the control group ($P<0.01$).

Conclusion Caffeic acid Ge has the significant inhibitory effect on rats cervical carcinoma U14 and induces the apoptosis of transplantable tumor U14, which could be the one of suppression tumor mechanisms

【Key words】 TUNEL; caffeic acid Ge; cervical carcinoma U14; apoptosis

癌症是严重危害人类健康的一大顽症,宫颈癌(cervical cancer)是最常见的妇科恶性肿瘤,调查发现其发病率呈逐年上升及年轻化趋势。前期工作中已经发现本课题组合成的新化合物——咖啡酸锗(专利号:03118635.1)具有抗肿瘤作用,本实验应用原位末端标记技术(TUNEL),从诱导肿瘤细胞凋亡角度进一步探讨其抑制肿瘤的机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 瘤株和动物 近交系昆明种清洁级雌鼠,年龄 6~8 周,江西中医学院实验动物中心提供(合格证号 JZDWN02006-072),小鼠宫颈癌 U14 细胞株由浙江科学院杭州药物研究所提供,本室常规传代保种。

1.1.2 药品及试剂 咖啡酸锗由江西中医学院化学实验中心合成,TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒由南京凯基生物科技发展有限公司提供,注射用环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)由江苏恒瑞医药公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物实验 取接种后 6~7 d 生长良好的 U14 腹水瘤源小鼠,无菌条件下抽取瘤液(经台盼蓝染色法检验瘤细胞活性大于 95%),灭菌生理盐水 1:3 稀释,调整细胞浓度为 3.63

$\times 10^7$ /mL,每只小鼠右腋下接种 0.2 mL。将小鼠随机分为 5 组:生理盐水阴性组(NS 组)、阳性组(CTX 组)、咖啡酸锗实验组;按接种剂量分为:低剂量组(0.05 mg/mL)、中剂量组(0.1 mg/mL)、高剂量组(0.2 mg/mL)。每组 10 只小鼠。

1.2.2 抑瘤率的测定 接种次日开始行尾静脉注射给药(0.2 mL/20 g),每天给药 1 次,连续 10 d,常规饲养。停药次日断椎处死,称体质量,解剖剥离皮下瘤体,计算肿瘤生长抑制率。抑瘤率(%)=(CTX 组平均瘤重-给药组平均瘤重)/CTX 组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.2.3 TUNEL 检测细胞凋亡 剥离瘤块,常规 10%中性甲醛固定,石蜡包埋,4~5 mm 切片。切片常规脱蜡及水合,加蛋白酶 K(Proteinase K),37℃反应 30~50 min,封闭液作用 10 min(3% H_2O_2 溶于甲醇),封闭内源性过氧化物酶活性。脱氧核苷酸末端转移酶(TDT)反应液加盖玻片 37℃避光湿润反应 60 min 后滴加 Streptavidin-HRP 工作液,加盖玻片 37℃避光湿润反应 30 min,过氧化氢素反应物(DAB)显色,苏木素复染,二甲苯透明,显微镜下观察。阴性对照片,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替 TDT 反应液。TUNEL 阳性表达定位于肿瘤细胞的细胞核或核膜。阳性细胞单个、散在分布,细胞核固缩、呈棕色着染,染色质聚集成致密的团块状,或沿核膜凝集而呈

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30460148);江西省教育厅科技项目(赣教技字[2007]252 号)。

新月形“帽”状或戒指状,或碎裂成几个核膜包裹的凋亡小体;非凋亡细胞的核呈蓝色。结果判定采用半定量计分法。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 进行统计学处理,对所有计量资料和数据进行单因素方差分析及显著性、相关性检验,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P > 0.05$ 为差异无统计学意义;对等级资料用多个独立样本的秩和检验分析。

2 结 果

2.1 咖啡酸锗对小鼠 U14 瘤的抑制作用 咖啡酸锗各剂量组对 U14 小鼠均有明显的抑制作用,以中剂量抑瘤效果最明显,并且各剂量组之间呈现一定的剂量关系。咖啡酸锗组、CTX 组与 NS 组比较肿瘤重量有显著性降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而用药前后各组小鼠体质量之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 咖啡酸锗对小鼠宫颈癌 U14 瘤的抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

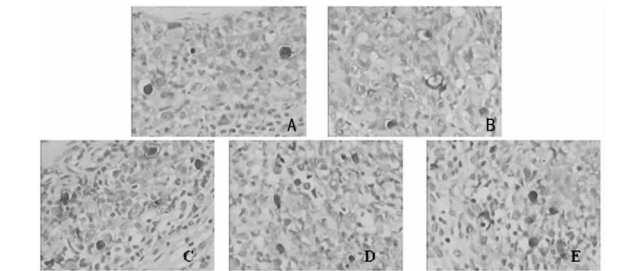
组别	剂量 (mg/mL)	体质量(g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		实验前	实验后		
NS 组		19.01±1.20	26.91±2.38	1.55±0.36	
CTX 组	2.5	19.00±1.48	22.44±3.17	0.43±0.16*	71.94
实验组					
低剂量	0.05	19.01±1.11	24.47±1.97	0.68±0.31*	55.83
中剂量	0.1	19.05±1.50	24.35±4.29	0.65±0.36*	57.86
高剂量	0.2	19.02±1.02	25.15±3.41	0.84±0.25*	45.47

注:与 NS 组比较,* $P < 0.01$ 。

表 2 TUNEL 法检测各组肿瘤组织阳性结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/mL)	—	+	++	+++	阳性率(%)
NS 组		6	2	2	0	40.00
CTX 组	2.5	4	3	3	0	60.00*
实验组						
低剂量	0.5	2	2	5	0	80.00*
中剂量	1	3	3	4	0	70.00*
高剂量	2	3	5	2	0	70.00*

注:与 NS 组比较,* $P < 0.01$ 。



注:A:(NS 组);B:(CTX 组);C:(咖啡酸锗低剂量组);D:(咖啡酸锗中剂量组);E:(咖啡酸锗高剂量组)。

图 1 TUNEL 染色法结果

2.2 细胞凋亡(APO)阳性率(APO 积分) 染色结果显示,NS 组凋亡细胞较少,可见数个典型的凋亡细胞,核仁着色。CTX 组凋亡细胞多见,呈散在分布,可见核仁及核膜着色。咖啡酸锗各剂量组凋亡细胞增多,呈灶状、片状分布,可见较多着

色粗大、典型的凋亡细胞(图 1)。TUNEL 检测各组肿瘤组织阳性结果见表 2。从表 2 可见,各实验组均表现一定的凋亡,CTX 组和咖啡酸锗各剂量组阳性率均明显高于 NS 组,其中低剂量组阳性率最高,达 80.00%。各实验组与 NS 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而咖啡酸锗各实验组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

有机锗生物学效应的研究已受到国内外学者的极大重视,国内外许多学者从不同领域对其抗肿瘤作用进行了研究,以进一步提高其抗肿瘤活性。咖啡酸锗是新合成的化合物,动物实验表明其对小鼠 U14 瘤的生长具有明显抑瘤效应,以中剂量抑瘤效果最明显,达 57.86%,并且各剂量组之间呈现一定的剂量关系。

细胞凋亡是细胞在基因调控下程序性死亡的方式,细胞凋亡与增殖调控机制失衡则导致肿瘤的发生,随着细胞向恶性转变,细胞凋亡水平呈下降趋势^[1]。因此,通过特异性诱导肿瘤细胞凋亡已成为治疗肿瘤的新策略。许多放、化疗方法正是通过诱导肿瘤细胞凋亡而实现抑瘤作用的^[2]。1992 年,Gavrieli 等^[3]建立了 TUNEL 法,其原理是在 TdT 催化下生物素或荧光素等标记物被标记在 DNA 缺口末端的 3'-OH 上,通过标记物显色系统在组织细胞原位检测凋亡细胞,可对完整的单个凋亡细胞或凋亡小体进行原位染色,能准确反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征。可在显微镜下计数凋亡细胞,较适于研究体内组织细胞凋亡,通常应用于石蜡组织切片的细胞凋亡检测及定量研究,是检测细胞凋亡敏感性和特异性较高的实验方法^[4-5]。

本实验通过 TUNEL 法检测咖啡酸锗各实验组的阳性率明显高于 CTX 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),其低剂量组阳性率达 80.00%,提示咖啡酸锗能诱导宫颈癌 U14 细胞的凋亡,可能通过细胞凋亡途径发挥对肿瘤的细胞毒作用,但其诱导肿瘤细胞凋亡的主要信号传导通路或信号分子十分复杂,有待于进一步深入研究。

参考文献

[1] 周殿元,姜泊.细胞凋亡基础与临床[M].北京:人民军医出版社,1999:252.
[2] 李秀真,曹蕊,曹卉,等. TUNEL 法检测乳酸杆菌对小鼠宫颈鳞癌的凋亡诱导作用[J]. 中国微生态学杂志,2006,18(3):189-190.
[3] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119(3): 493-501.
[4] Shridan MT, Cooper RA, West CM, et al. A high ratio of apoptosis to proliferation correlates with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma[J]. J Radia Oncol Biol Phys, 1999, 44(3): 507-512.
[5] 郭晓红,刘立新. Annexin V/PI 流式细胞分析法和 TUNEL 法检测肝细胞凋亡的对比研究[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(5): 476-478.

(收稿日期:2010-04-28)