

维甲酸诱导的人大肠癌细胞凋亡*

高 丰 宋今丹**

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室 沈阳 110001)

细胞凋亡(Apoptosis)也称程序性细胞死亡(Programmed cell death),是具有特殊形态学和生化改变的生理性细胞死亡形式。1972年由Kerr等首次提出这一概念^[1]。凋亡是由基因编程控制的经多种途径信号传递的细胞主动“自杀”过程,对于维持机体自稳状态具有积极的生物学意义。在肿瘤研究领域,细胞凋亡与细胞增殖、细胞分化同等重要,这三个过程的失控可能是肿瘤发生的根本原因。许多抗肿瘤药物能够诱导肿瘤细胞凋亡,而达到治疗肿瘤的目的。全反式维甲酸(ATRA)是维生素A的代谢衍生物,能抑制多种肿瘤细胞增殖并具有诱导分化作用,是很有价值的分化诱导剂。近来研究表明,RA诱导细胞终末分化的同时,还可以在多种肿瘤细胞中诱导凋亡^[2-4],但尚未见RA诱导大肠癌细胞凋亡的报道。本文研究了ATRA诱导人大肠癌细胞凋亡的特征,以初步探讨其作用机制。

材料与方 法

一、细胞培养

人大肠癌细胞系CCL229(美国哈佛大学医学院Dana-Farber肿瘤所惠赠),单层培养于含10%小牛血清的DMEM培养液(Gibco产品)中,在37℃,5%CO₂,饱和湿度的CO₂培养箱中培养。

二、给药处理

收集对数生长期细胞,以10⁵/ml浓度接种细胞,培养24h待细胞贴壁后给药。全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, Sigma)以无水乙醇配成10⁻²mol/L贮存液,-20℃避光保存,使用终浓度分别为10⁻⁵mol/L, 10⁻⁴mol/L, 10⁻⁷mol/L, 10⁻⁸mol/L。对照组加入等体积无水乙醇(<0.1%, V/V),此浓度下乙醇对细胞生长无

明显影响。实验组每隔48h换新鲜培养液及维甲酸。全部实验操作在避光条件下进行。药物处理不同时间后收集实验及对照组细胞。

三、细胞形态学观察

荧光染料丫啶橙(Acridine Orange AO, Fluka)配成0.025% AO-醋酸染液,取盖片培养细胞,入AO染液染色5s, 20%乙醇-生理盐水溶液分色2s,置于载片上,蓝光(502nm)激发,荧光显微镜下观察。

四、末端脱氧核苷酰转移酶原位标记(TUNEL)

参考Gavrieli等的TdT原位标记法^[7](Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling TUNEL)。盖片培养细胞在4%中性缓冲甲醛中固定15min, 20μg/ml Proteinase K室温处理15min, 2% H₂O₂室温5min封闭内源性过氧化物酶,水洗后浸入TdT缓冲液,加入TdT酶及生物素标记dUTP(Biotin-11-dUTP), 37℃温育30min, 2%BSA室温封闭10min,加入辣根过氧化物酶标记亲和素(Avidin-HRP), 37℃温育30min, PBS洗3次, H₂O₂-DAB显色,镜下见到胞核棕色着染的阳性细胞后终止反应,苏木素复染,常规封片镜检。

五、细胞超微结构观察

按常规方法制备透射及扫描电镜标本。

六、DNA断裂分析

收集贴壁及悬浮细胞^[5],按常规方法提取细胞基因组DNA。UV-160紫外分光光度计测定260nm光吸收值。DNA上样量为5μg/lane,经1.5%琼脂糖凝胶电泳,0.5μg/ml溴化乙锭染色,紫外灯下观察DNA条带并拍照。

七、细胞周期时相中DNA含量测定

采用Nicoletti等的方法^[6]。收集细胞样品,70%冷

本文1998年11月13日收到,11月27日接受。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39040005)。

** 联系人。

乙醇 4℃ 固定 1h, RNA 酶 37℃ 作用 30min, 50 μ g/ml 碘化丙啶 (Propidium Iodide PI, Sigma) 4℃ 染色 1h, FAC-Scan (Becton Dickinson, CA, USA) 流式细胞仪测定荧光强度, 激发波长 488nm, 每次测定至少 10⁴ 个细胞。采用 Modfit 分析软件进行细胞周期 DNA 含量分析, 低于 G₁ 期二倍体 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。

结 果

一、凋亡细胞的形态特征

荧光显微镜下见 AO 染色的 CCL229 细胞铺展良好, 多为梭形, 胞质呈桔红色荧光, 胞核呈黄绿色荧光。经 10⁻⁶mol/L RA 作用后可见胞核固缩, 染色质高度浓缩凝聚、分块成亮黄色荧光。凋亡严重时, 细胞固缩成多个小亮点形成凋亡小体 (apoptotic bodies)。

二、TUNEL 方法检测的 RA 诱导 CCL229 细胞凋亡特征

TdT 原位末端标记法可清楚地将凋亡细胞同周围正常细胞区别开。对照组 CCL229 细胞呈梭形, 胞核被苏木素复染成蓝色。经 10⁻⁶mol/L RA 处理后可见凋亡阳性细胞: 胞核呈棕色或棕褐色着色, 浓缩的染色质紧贴核膜内侧成新月形, 或呈均匀一致的染色。尚可见到许多细胞形态尚未改变的早期凋亡细胞呈阳性着色。图 1 示经 TUNEL 方法检测的 10⁻⁶mol/L RA 诱导 CCL229 细胞凋亡的时相规律。随时间推移凋亡指数逐渐增加, 至 48h 达最高点 (47%), 此后未见明显增长。

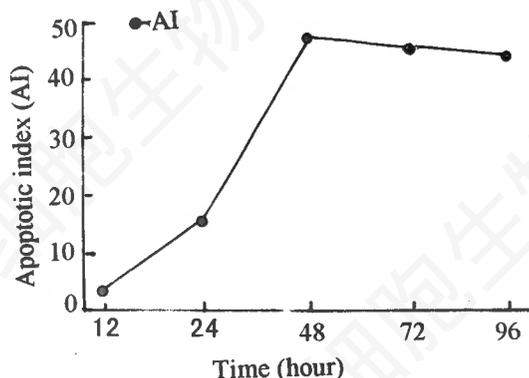


图 1 TUNEL 方法检测 10⁻⁶mol/L RA 诱导 CCL229 细胞凋亡的时相规律

三、透射电镜下凋亡细胞超微结构变化

与对照组细胞相比, CCL229 细胞经 10⁻⁶mol/L RA 处理后, 随药物作用时间的推移, 可观察到一系列凋亡特征性的形态学改变。RA 诱导初期 (12h), 细胞变圆, 表面微绒毛明显减少。RA 作用 24h, 核内染色质边集, 沿核膜内侧分布, 核膜皱褶内陷。核周片层状内质网较多, 可见轻微扩张。RA 诱导 48h, 核染色质更加致密, 浓缩分块, 胞质中有空泡形成, 细胞表面微绒毛消失。凋亡后期 (72h), 细胞表面出泡 (blebbing), 脱落形成膜包裹的凋亡小体, 有些含有固缩的核碎片。在胞质中及凋亡小体中含有内质网, 部分形态正常, 另有相当一部分明显扩张, 形成许多大小不等的小泡状或短管状结构 (图 A), 结构仍保持完整。胞质中尚可见到结构完整的线粒体及高尔基体, 在上述全过程中细胞膜结构也始终保持完整。

四、扫描电镜下凋亡细胞超微结构改变

正常培养的 CCL229 细胞多呈长梭形, 表面不光滑, 有丰富的微绒毛及小泡状突起, 并伸出许多丝状伪足。10⁻⁶mol/L RA 诱导后细胞收缩变圆, 伪足消失, 微绒毛显著减少。细胞表面突起出泡, 逐渐与正在凋亡的细胞分离 (图 B), 最后形成多个大小不等的凋亡小体。

五、凋亡细胞的 DNA 断裂

不同浓度 RA 处理 CCL229 细胞 24h 的 DNA 凝胶电泳结果 (图 C) 提示: 10⁻⁸mol/L RA 作用 24h 即诱导细胞产生典型的梯形 DNA 条带 (DNA ladder), 大小呈约 180bp 整数倍递增。从 10⁻⁸mol/L 至 10⁻⁵mol/L, 随药物浓度增高, DNA 条带亮度增加, 说明 RA 诱导凋亡作用呈剂量依赖性增强。图 D 示 10⁻⁶mol/L RA 作用 CCL229 细胞不同时间后的 DNA 断裂情况。RA 处理 12h 即出现清晰的 DNA ladder, 作用从 12h 开始, 一直持续至 96h, 均可见典型的 DNA ladder。最初 48h 内, RA 引起的 DNA 断裂程度随作用时间延长而逐渐增强, 至 48h 达高峰; RA 作用较长时间 (72h 至 96h) 也能引起 DNA 断裂。

六、凋亡细胞 DNA 含量变化

流式细胞术分析不同浓度 RA 对 CCL229 细胞凋亡诱导作用的结果显示, 10^{-8} mol/L - 10^{-5} mol/L RA 处理细胞 24h, 在 DNA 直方图 (DNA histogram) 上均出现低于 G_1 期二倍体 DNA 含量的亚二倍体峰 (hypodiploid peak, Ap 峰)。随药物浓度增加, 亚 G_1 峰升高, 亚二倍体细胞百分比逐渐增加, 从 10^{-8} mol/L RA 时的 3.7% 增加到 10^{-5} mol/L 的 20.3% (图 2)。从 10^{-6} mol/L RA 作用不同时间后的 DNA 直方图 (图 3) 可以看出, 对照组呈现典型的二倍体峰; 实验组 RA 处理 12h 即出现亚 G_1 峰, 处理 24h 亚 G_1 峰更加明显, 同时二倍体峰的百分比明显减少。随时间推移, 亚 G_1 峰显著升高, 亚二倍体细胞百分比从 12h 时的 4.5% 增至 48h 时的 55.4% 至 96h 时的 50.7%, 提示 RA 对 CCL229 细胞凋亡的诱导作用表现出明显的时间依赖性。

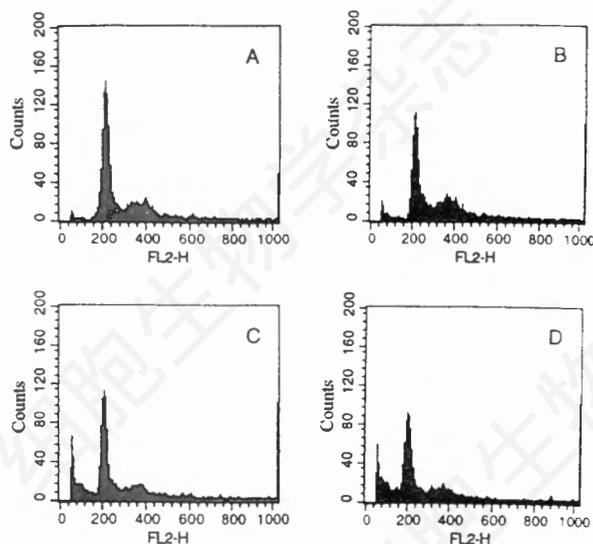


图 2 不同浓度 RA 处理 CCL229 细胞 24h 的 DNA 直方图

- A. 10^{-8} mol/L RA, sub G_1 peak: 3.7%;
 B. 10^{-7} mol/L RA, sub G_1 peak: 4.9%;
 C. 10^{-6} mol/L RA, sub G_1 peak: 16.7%;
 D. 10^{-5} mol/L RA, sub G_1 peak: 20.3%.

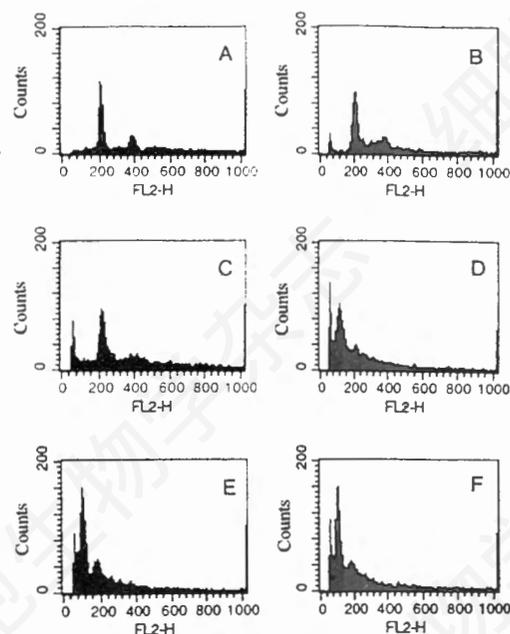


图 3 10^{-6} mol/L RA 处理不同时间后 CCL229 细胞的 DNA 直方图

- A. control;
 B. 12h, sub G_1 peak: 4.7%;
 C. 24h, sub G_1 peak: 14.8%;
 D. 48h, sub G_1 peak: 55.4%;
 E. 72h, sub G_1 peak: 53.2%;
 F. 96h, sub G_1 peak: 50.7%.

讨 论

细胞凋亡是不同于坏死的细胞自杀性死亡, 具有一系列典型的形态及生化改变。凋亡细胞的形态学特征表现为细胞核染色质浓缩、分块, 细胞收缩变圆, 表面微绒毛消失, 细胞质浓缩, 细胞膜出泡, 形成包含有细胞内容的凋亡小体, 在凋亡过程中细胞膜结构保持完整。凋亡最突出的生化特征是内源性 Ca^{2+}/Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶的活化^[8], 在核小体连接区 (linker DNA) 切割 DNA 双链使 DNA 降解成 180—200bp 或其整数倍的寡核苷酸片段, 在琼脂糖凝胶电泳上产生特征性的 DNA ladder。另外, 凋亡的发生还受到细胞内外诸多因素的调控。

本研究应用光、电镜技术、DNA 凝胶电泳、

流式细胞术及 TUNEL 方法,证明 RA 可在体外诱导人大肠癌 CCL229 细胞凋亡。药代动力学研究显示,体内 RA 可达到的有效浓度约为 10^{-7} mol/L 左右。本实验观察到,在 10^{-8} mol/L— 10^{-5} mol/L 范围内,RA 均能诱导 CCL 229 细胞凋亡,且呈剂量依赖性增强。由于 10^{-5} mol/L RA 可能具有细胞毒性作用,选择 RA 的药理浓度 10^{-6} mol/L 来观察诱导凋亡的形态特征及时相规律。在这一浓度,RA 在显著抑制细胞增殖的同时又诱导 CCL229 细胞呈现凋亡的典型特征。DNA 凝胶电泳、FACS DNA 含量分析及 TUNEL 方法均提示 RA 作用 12h 即能诱导凋亡出现,至 48h 达最高峰,作用一直持续至 96h,表现出明显的时间依赖性。维甲酸是公认的肿瘤分化诱导剂,对多种肿瘤细胞都有诱导分化作用。王芸庆在国内首先开展了维甲酸诱导肿瘤细胞分化的研究,证实 RA 对人早幼粒白血病 HL-60 细胞确有诱导分化作用。近来,随着细胞凋亡研究的日益深入,分化与凋亡的相关性问题也逐渐成为新的研究热点。Martin 等^[2]对诱导分化模型 HL-60 细胞的研究证明,HL-60 细胞在被 RA 诱导向终末分化为成熟粒细胞后发生凋亡。Atenica 等^[3]在用 RA 诱导胚胎癌细胞凋亡时发现,伴随着细胞分化表型的出现/观察到了凋亡的形态改变及 DNA 断裂现象。Ponzoni 等^[4]发现 RA 在诱导人神经母细胞瘤 NB 细胞分化的后期诱导凋亡,凋亡继发于 RA 诱导的细胞分化。在本实验中发现:RA 作用 CCL229 细胞初期,细胞变圆,表面微绒毛减少甚至消失,观察到细胞向成熟分化的趋势。之后随 RA 作用时间推移,继续表现出凋亡的一系列形态学特征。由此推测,肿瘤细胞在被诱导向终末阶段分化后有可能趋向最后死亡,凋亡可能是细胞被诱导分化成熟以后的死亡形式,是诱导分化的结局。

许多研究表明,凋亡细胞中最早可检测到的变化是胞浆内 $[Ca^{2+}]$ 迅速持续的升高^[9]。 $[Ca^{2+}]$ 升高可激活许多 Ca^{2+} 依赖性酶,如激活 Ca^{2+}/Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶使 DNA 断裂,

染色质凝聚;激活谷氨酰胺转移酶使胞浆蛋白质交联。本实验室先前研究工作已证实 RA 能诱导人大肠癌细胞内 $[Ca^{2+}]$ 升高^[10]。内质网是细胞内重要的钙库,细胞凋亡时 $[Ca^{2+}]$ 浓度升高的机制,除可能依赖于胞外 Ca^{2+} 内流外,内质网 Ca^{2+} 的释放亦可能是原因之一,尚有待进一步探讨。

在 RA 处理 CCL229 细胞过程中,动态观察细胞形态变化时发现贴壁细胞不断脱落,培养液中悬浮细胞逐渐增多,而悬浮细胞中凋亡细胞所占比例很大。推测这种与凋亡相伴随发生的细胞粘附性的丧失可能是由于凋亡过程中细胞表面及细胞骨架发生变化,从而改变了细胞与细胞、细胞与支持物之间的相互作用而造成的^[5]。

摘 要

本研究应用光镜、电镜技术、DNA 凝胶电泳、流式细胞术及末端脱氧核苷酰转移酶原位标记(TUNEL 法),观察全反式维甲酸 ATRA 诱导的人大肠癌 CCL229 细胞凋亡特征。RA 诱导 CCL229 细胞凋亡,光、电镜下观察到凋亡小体形成等典型的形态学改变,琼脂糖凝胶电泳上呈现特征性的 DNA ladder, DNA 直方图上显示亚二倍体峰。 10^{-8} mol/L— 10^{-5} mol/L 范围内,RA 诱导 CCL229 细胞凋亡表现出时间和剂量依赖性。

关键词:维甲酸 细胞凋亡 结肠肿瘤

参 考 文 献

- [1] Kerr, J. F. R. et al., 1972, *Br. J. Cancer.*, 26: 239—257.
- [2] Martin, S. J. et al., 1990, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 448—453.
- [3] Atenica, R. et al., 1994, *Exp. Cell. Res.*, 204: 663—667.
- [4] Ponzoni, M. et al., 1995, *Cancer. Res.*, 55: 853—861.
- [5] Hague, A. et al., 1995, *Int. J. Cancer.*, 60: 400—406.

- [6] Nicoletti, I. et al., 1991, *J. Immunol. Methods*, **139**:271-279.
- [7] Gavrieli, Y. et al., 1992, *J. Cell. Biol.*, **119** (3):493-501.
- [8] Wyllie, A. H., 1980, *Nature*, **284**: 555 - 556.
- [9] McConkey, D. J. et al., 1989., *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**:365-370.
- [10] 王红梅等, 1997, 中国应用生理学杂志, **13**: 97-99.

COLORECTAL CARCINOMA CELL APOPTOSIS INDUCED BY ALL-TRANS RETINOIC ACID

GAO Feng SONG Jin Dan

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health,
China Medical University, Shengyang 110001)

ABSTRACT

An in vitro model of apoptosis in human colorectal carcinoma cells was developed to study the mode and mechanisms of cell death induced by treatment with all-trans retinoic acid (ATRA). ATRA was found to induce pronounced morphological changes characteristic of apoptosis and extensive DNA fragmentation in the CCL229 cell line 12 hrs after treatment. Morphological examination by fluorescence and electron microscopy showed cells with chromatin condensation and margination, nuclear fragmentation, cell shrinkage, and the presence of "apoptotic bodies". Degradation of the nuclear DNA of apoptotic cells was demonstrated by visualization of "DNA ladders" on gel electrophoresis. Moreover, DNA flow cytofluorimetric analysis and TdT-mediated in situ nick end labeling of DNA breaks also demonstrated that apoptosis induced by ATRA was dose- and time-dependent. In addition, RA-treatment of CCL 229 cells resulted in morphological maturation prior to apoptosis, which suggest that the mode of cell death in cultures of terminally differentiated CCL 229 cells is that of apoptosis.

Key words: Retinoic acid Apoptosis Colorectal neoplasms

* Supported by the National Natural Science Foundation of China.

星形胶质细胞条件培养液对 活性氧所致的神经元损伤的防护作用

莫永炎 陈 璇 周 玫

(第一军医大学分子生物学研究所自由基医学研究室 广州 510515)

人们对神经元和神经胶质细胞关系的认识,已获得了快速的进展,发现了一些胶质源神经营养因子能滋养神经元细胞^[1],而可溶性神经因子能调节星形胶质细胞谷氨酸转运体GLT1和GLAST的表达^[2]。国内有学者观察到星形胶质细胞条件培养液能促进神经元的生长,提高神经元体外存活率及神经元活力^[3]。但脑组织经常会遭受缺血、缺氧、脑瘤的放疗、化

疗等损伤,产生大量活性氧自由基,如 $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{LOO}\cdot$,使神经元继发损伤。脑组织细胞代谢旺盛,耗氧量大,产生的活性氧多,细胞膜含不饱和脂肪酸丰富,脑区过渡金属离子含量较高及只拥有中等水平的抗氧化酶,脂肪酸极易过氧化,因而脑组织对氧化应激特别敏感。有

本文1999年1月26日收到,11月1日接受。