

DNA 末端标记法检测番荔枝内酯诱导人乳腺癌细胞凋亡^①

程冠军¹ 潘启超¹ 朱振宇² 周宁宁¹ 冯公侃¹ 杨小平¹

(中山医科大学 1 肿瘤研究所; 广州, 510060 2 生化教研室)

摘要 目的: 用 DNA 末端标记法(TUNEL 法)研究番荔枝内酯凋亡诱导作用, 以及 TUNEL 法用于凋亡检测和抗癌药所致凋亡的探讨。方法: 用台盼蓝拒染法, TUNEL 法, DNA 凝胶电泳, 电镜等技术, 研究番荔枝内酯对具有多药抗药性的耐阿霉素的人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞的生长抑制作用及凋亡诱导。结果: 电镜下观察到细胞染色质浓缩, 聚集核膜下, 核碎裂等典型的凋亡细胞形态学改变。凝胶电泳可见明显的 DNA 梯形条带。TUNEL 法检测的凋亡细胞明显多于形态学改变的凋亡细胞。结论: 番荔枝内酯对人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞具有明显生长抑制作用, 半数抑制浓度(IC₅₀)为 10.5 mg/L, 并诱导其凋亡。TUNEL 法可配合其他方法用于检测抗癌药诱导的人癌细胞凋亡及抗癌药的评价。

关键词 脱噬作用/药物作用; 抗肿瘤药/药理学; 番荔枝内酯^②/药理学

中图分类号 R 793.53

STUDY ON ACETOGENIN-INDUCED APOPTOSIS IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINE BY TUNEL ASSAY

Cheng Guanjun¹ Pan Qichao¹ Zhu Zhenyu²
Zhou Ningning¹ Feng Gongkan¹ Yang Xiaoping¹

(1 Cancer Institute 2 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Abstract Objective: To investigate the induction of apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7/ADR by acetogenins, to detect apoptosis by TUNEL assay and to evaluate its significance in new anticancer drug. **Methods:** TUNEL assay, DNA gel electrophoresis, electron microscopy were performed to detect the induction of apoptosis of MCF-7/ADR cell line by acetogenins. **Results:** Condensation of chromatin clinged to periphery of the nucleus and fragmentation were detected by electron microscopy, DNA ladders were observed in gel electrophoresis. Number of apoptotic cells labelled by TUNEL assay were more than that of seen with morphology changed. **Conclusion:** acetogenins can induce apoptosis of MCF-7/ADR cell line, TUNEL assay can be used to detect apoptosis induced by anticancer drug and to evaluate new anticancer drug.

Subject headings apoptosis/drug effects; antineoplasms agents/pharmacology; acetogenins/pharmacology

凋亡又称程序性细胞死亡,是与细胞坏死不同的、具有特殊形态学和生物化学改变的、受基因调控的主动的细胞死亡。多种抗癌药物可引起癌细胞凋亡^[1],诱导细胞凋亡可能是不同机制抗癌药发挥作用的共同通路。常用的凋亡研究方法检测早期凋亡细胞不够敏感。DNA 末端标记法(TUNEL 法)可将生物素标记的脱氧尿苷三磷酸(dUTP)掺入到 DNA 断端 3'-OH 末端,是观察早期凋亡细胞的敏感方法^[2]。我们比较研究一系列方法,用于番

荔枝内酯(annonaceous acetogenins)诱导的 MCF-7/ADR 细胞凋亡观察,以期找到敏感的凋亡检测及抗癌药物评价的方法。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养与药物

MCF-7/ADR 细胞用含小牛血清的 DMEM 培养液,在 $\varphi(\text{CO}_2)=0.05, 37^\circ\text{C}$ 条件下培养,番荔枝内酯由华南植物研究所陈文森教授提供,溶解于含

① 国家教委博士点基金资助课题; ② 自由词

$\varphi[(\text{CH}_3)_2\text{SO}] = 0.001$ 生理盐水中, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.2 细胞生长曲线

对数生长期 MCF-7/ADR 细胞接种于培养板, 设 5 mg/L、10 mg/L、20mg/L 药物组及溶剂对照组, 分别于第 12、24、48 h 台盼蓝染色, 计算拒染的活细胞百分率。

1.3 电镜观察

细胞用戊二醛作前固定, 锇酸作后固定, 乙醇脱水, 树脂包埋, 超薄切片, 铀铅染色, 电镜观察。

1.4 DNA 凝胶电泳

细胞用 PBS 缓冲液冲洗 2 次后, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 0.7$ 固定, 离心去除固定液, 再用 PC 缓冲液重悬, 离心; 上清转入新的 Eppendorf 管中, 真空抽干, 加入 NP40 溶液, 1 mg/mL RNase A 溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min; 加入蛋白酶 K, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, w (琼脂糖凝胶)=0.015 电泳观察。

1.5 TUNEL 法

细胞多聚甲醛固定, H_2O_2 孵育, Triton X-100 冰上处理, 加 TUNEL 反应液 (BOEHRINGE 产品), $37\text{ }^\circ\text{C}$, 60 min 温育后, PBS 冲洗, 过氧化物酶标记的生物素-卵白素温育 30 min, PBS 冲洗后, $\varphi(\text{H}_2\text{O}_2)$ -DAB 0.01% 溶液显色 10 min, 光镜检查。

2 结果

2.1 药物对细胞增殖影响

番荔枝内酯对 MCF-7/ADR 细胞具有明显生长抑制作用, IC_{50} 为 10.5 mg/L, 呈一定的量效和时效关系(图 1)。

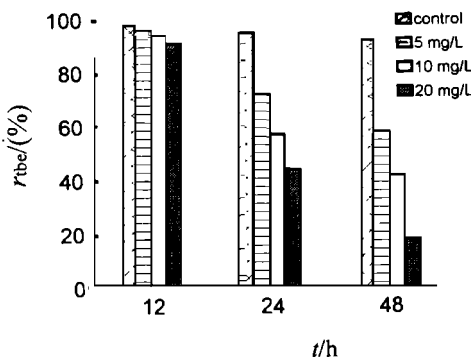


图 1 番荔枝内酯作用于 MCF-7/ADR 细胞后台盼蓝拒染率
Fig. 1 Trypan blue expulsion rate of acetogenins on MCF-7/ADR cells

2.2 电镜结果

可见部分凋亡细胞, 其体积缩小, 染色质浓缩,

常聚集于核膜下, 呈境界分明的颗粒状或新月形小体(图 2)。



图 2 番荔枝内酯处理后的 MCF-7/ADR 凋亡细胞
Fig. 2 Apoptosis of MCF-7/ADR cells treated by acetogenins $\times 6000$

2.3 DNA 凝胶电泳结果

番荔枝内酯诱导 MCF-7/ADR 细胞 48 h, 10 mg/L、20 mg/L 组 DNA 提取物在琼脂糖凝胶电泳可见典型 DNA 梯形条带, 大小约呈 180 ~ 200 bp 整数倍(图 3)。

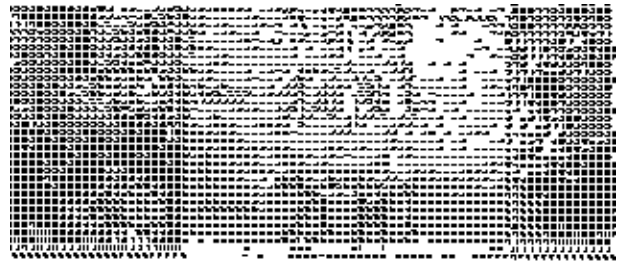


图 3 MCF-7/ADR 细胞的 DNA 电泳
Fig. 3 Agarose electrophoresis of MCF-7/ADR cellular DNA
M. marker; λ DNA/ Hind III; 1~4 control, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L acetogenins groups for 12 h, separately; 5~6 as 3~4 for 24 h, 7~8 as 3~4 for 24 h, 17~8 as 3~4 for 24 h

2.4 DNA 末端标记结果

TUNEL 优先标记凋亡细胞中的 DNA 链断裂末端, 这使凋亡与坏死等引起的初期 DNA 链断裂相区别。随药物作用时间延长, 用 TUNEL 或电镜方法检测到的凋亡细胞均逐渐增多, 但 TUNEL 检测的表现有弥漫性棕色沉淀的凋亡细胞明显多于形态学改变的凋亡细胞。TUNEL 法检测凋亡细胞有明显时间效应, 10 mg/L 番荔枝内酯作用 48 h 细胞凋亡率达 57.3% (图 4)。

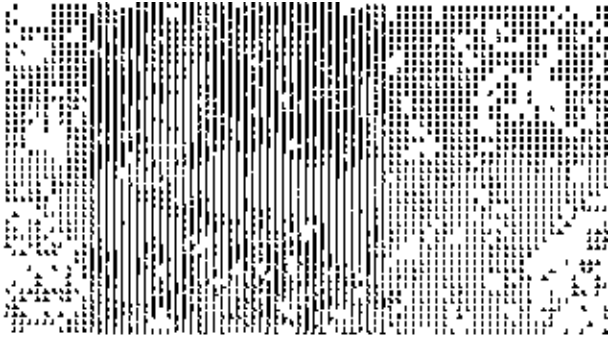


图4 TUNEL法标记番荔枝内酯处理的MCF-7/ADR凋亡细胞
Fig. 4 Apoptosis labelled by TUNEL assay of MCF-7/ADR cells acetogenins treated $\times 200$

3 讨论

多种抗癌药物可引起癌细胞凋亡,诱导细胞凋亡可能是不同作用机理的抗癌药物发挥作用的共同通路,药物诱导凋亡是当前肿瘤研究的热点之一。

DNA断裂是细胞凋亡生化改变特征之一^[3],凋亡细胞核小体连接区断裂产生180~200 bp断片,在电泳图上可形成梯形条带。本实验番荔枝内酯作用于MCF-7/ADR后,电泳图上可见梯形条带,电镜观察到典型的凋亡形态学改变,TUNEL标记的凋亡细胞与形态学上表现为凋亡细胞同步增加而又显著多于后者,有明显时间效应。国际上番荔枝内酯抗肿瘤研究发展迅速⁴。我国对番荔枝内酯抗肿瘤的研究刚刚起步。华南植物所陈文森教授发现,广东独有产量高的阿蒂莫耶植物种子中番荔枝内酯含量极丰富,我们发现它对多种肿瘤细胞株具有体外抗肿瘤作用。国外报道番荔枝内酯抗肿瘤作用与抑制线粒体NADH氧化酶或还原酶有关^{4,5},这是否与它诱导肿瘤细胞凋亡有关值得探讨。

常用的凋亡研究方法检测早期凋亡细胞不够敏感,TUNEL法可精确地检测凋亡细胞中的片段化DNA。由于细胞在标记前已经被固定,故小分子DNA不会迁出细胞而丢失。TUNEL法可以标记DNA的单链和双链断裂末端,由凋亡引起的DNA损伤均可被标记和检测。另外,TUNEL法直接标记DNA,非特异性背景较低,在实验不同阶段可分别用荧光显微镜流式细胞仪和光学显微镜等立即观察,较其它观察标记DNA的方法耗时更少、更简单。

我们的研究说明番荔枝内酯对MCF-7/ADR细胞具有明显生长抑制作用,IC₅₀为10.5 mg/L,并诱导凋亡。同时表明,TUNEL法是较敏感、简单、节省时间的凋亡检测方法之一,并可配合其他方法用于抗癌药物的评价。

参 考 文 献

- 1 Ohmori T, Podack E R, Nishio K, *et al*. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anticancer agents (MMC, CPT-II, ADM) is inhibited by *bcl-2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(1): 30
- 2 Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*, 1993, 53(8): 1945
- 3 Kerr J F, Winterford C M, Hammon B V. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994, 73(8): 2013
- 4 Ahammadsahib K I, Hollingworth R M, McGovern J P, *et al*. Mode of action of Bullatacin: A potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sci*, 1993; 53(14): 1113
- 5 Morre D J, de Cabo R, Farley C, *et al*. Mode of action of Bullatacin, a potent antitumor acetogenin; Inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sci*, 1995, 56(5): 343

(1997-11-05 收稿 1998-01-30 修回)