

抗癌药物诱导 Molt-4 细胞凋亡的周期时相性分析

王家顿¹, 谢大兴², 陈金明², 龚建平²

(1. 武汉科技大学医学院基础医学部, 湖北 武汉 430080; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

An Analysis of Cycle Specificity of Molt-4 Cell Apoptosis Induced by Anti-cancer Drugs

WANG Jia-dun, XIE Da-xing, CHEN Jin-ming, et al.

摘要: [目的]应用流式细胞术(FCM)分析抗肿瘤药物诱导细胞凋亡的周期特异性。[方法]将喜树碱、紫外线和槐耳清膏诱导的 Molt-4 细胞分别用 Sub-G₁ 法和 PA 法(FITC-Annexin V 和 PI 标记法)检测细胞凋亡。[结果]Sub-G₁ 法可简便地检测晚期凋亡细胞, PA 法可检测早期凋亡细胞,并可较准确分析细胞凋亡的周期时相性。[结论]结合 Sub-G₁ 法和 PA 法可简便、有效筛选出细胞周期特异性抗肿瘤药物,为抗癌新药的开发和研制提供技术平台。

关键词: 抗肿瘤药物;流式细胞术;细胞周期;凋亡;Sub-G₁ 法;PA 法

中图分类号: R979.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-0242(2002)09-0533-02

越来越多的资料表明肿瘤是一类细胞周期性疾病^[1,2]。同时,我们发现,大多数抗肿瘤药物都具有周期特异性。从而使得细胞周期分析在抗癌药物的研究领域中显得格外重要。流式细胞术(FCM)因不需对细胞进行同步化处理,从而使其大大优于过去的同步化分析。这使得 FCM 在细胞周期研究中得到广泛应用^[3,4]。我们将 Sub-G₁ 法和 FITC-Annexin V 和 PI 标记法(PA)法同时用于分析抗癌药物抗肿瘤的周期特异性,以便于研究其抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

喜树碱(CAM)、碘化丙锭(PI)、核糖核酸酶(RNase A), FITC 标记的膜联蛋白(FITC-Annexin V)、甲醛均为 Sigma 公司产品。槐耳清膏由江苏盖天力药业有限公司提供。

1.2 仪器

美国 B. D 公司 FACSORT 流式细胞仪。Mini-transilluminator 型紫外照射仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 细胞培养和处理

Molt-4 肿瘤细胞株(购自美国 ATCC 公司)用常规方法培养,取对数生长期细胞进行实验。将细胞分为对照组、喜树碱诱导组(以 0.15 μmol/L CAM 诱导培养 4 小时)、槐耳清膏诱导组(以 3.0 g/L 槐耳清膏诱导培养 16 小时)、紫外线照射组(UV 照射 20 秒后培养 4 小时)。收集细胞,然后将每组细胞

平分两份进行染色。(1)新鲜细胞:PBS 洗涤一次, Binding Buffer 洗涤一次,倒干残液,加 FITC-Annexin V (100 μl: 5 μl), 室温避光放置 20 分钟, Binding Buffer 洗涤两遍,加 500 μl 甲醛(浓度为 1%),冰浴 25 分钟, Binding Buffer 洗涤两遍,加 10 mg/L PI 100 μl 和 0.1% RNase A 50 μl, 室温避光放置 20 分钟,待流式细胞术分析。(2)固定细胞:用 80% 的冰乙醇固定过夜, PBS 洗涤一次,加 10 mg/L PI 100 μl 和 0.1% RNase A 50 μl, 室温避光放置 20 分钟,待流式细胞术分析。

1.4 流式细胞术检测分析

经上述处理后的细胞,荧光标记成功后,应用 FAC Sort 流式细胞仪进行检测,然后用 Cellquest 软件(美国 B. D 公司)对所测细胞的双参数荧光强度、任一细胞群体的平均荧光强度进行分析。

2 结果

2.1 Sub-G₁ 法

与对照组相比,诱导组在 DNA 直方图上均出现典型的细胞凋亡峰(Sub-G₁ 峰),见图 1。

且喜树碱诱导后, G₁ 期细胞增加, S 期和 G₂/M 期细胞减少;槐耳清膏诱导后, G₁ 期细胞减少, S 期细胞增加;紫外线诱导后, G₁ 期细胞增加, S 期细胞减少 ($P < 0.001$, 见表 1)。Sub-G₁ 法可初步检测出诱导组的细胞周期时相性变化。

2.2 PA 法

以参数荧光 1 高度对数放大检测 FITC 荧光强度,以参数荧光 2 面积检测 DNA 含量。结果显示,与对照组相比, CAM 诱导组在 G 和 S 期的上方出现凋亡细胞群,提示 CAM 主要

收稿日期:2002-03-27;修回日期:2002-06-13

基金项目:国家自然科学基金(39730270), 国家杰出青年基金(39725027), 973 肿瘤计划(G1998051212), 卫生部临床重点学科(97070239)资助

诱导 G₁和 S期细胞凋亡;槐耳清膏和 UV 诱导组在 G₁期的上方出现凋亡细胞群,提示其主要诱导 G₁期细胞凋亡(见图 2)。

表 1 不同方式处理的 Mblt-4 细胞周期时相变化(%)

诱导剂	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	Sub-G ₁
对照	59.75	25.98	13.70	0.84
喜树碱	82.51	4.71	4.46	8.43
槐耳清膏	49.70	33.36	10.22	6.55
紫外线	66.96	16.03	11.23	9.62

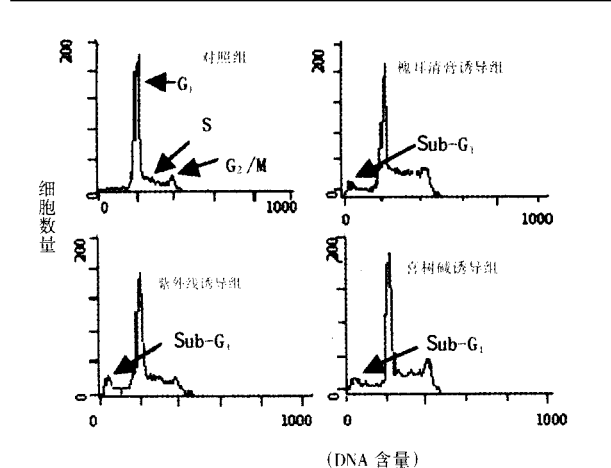


图 1 不同方式处理的 Mblt-4 细胞的 DNA 含量直方图

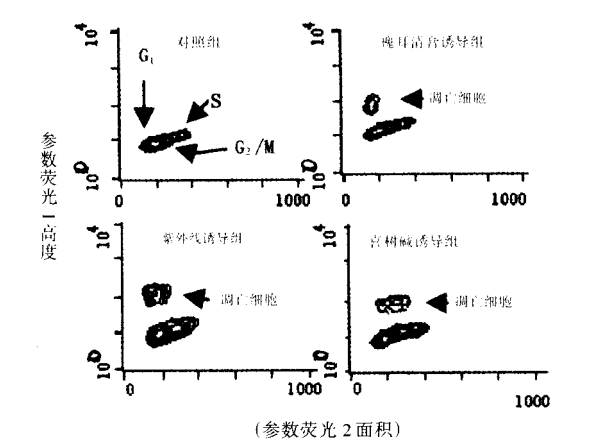


图 2 不同方式处理的 Mblt-4 细胞凋亡的周期时相性

3 讨论

细胞凋亡 (apoptosis, Ap) 是不同于坏死 (necrosis) 的一种自主的程序性自杀性死亡 (programmed cell death, PCD)。在细胞凋亡晚期,细胞内核酸内切酶激活,并在核小体间切割 DNA 链,使 DNA 降解为以核小体 (200bp) 为单位的片段。细胞被固定后,小分子 DNA 片段由胞内渗出,细胞内 DNA 含量明显降低,在 G₁期峰前以 Sub-G₁峰的形式出现而被识别^[3,5,6]。由此原理建立的 Sub-G₁法因其操作简便快捷且费用低而得到广泛应用。但对于早期凋亡细胞而言,断裂的 DNA 片段较少或片段较大, DNA 因而渗出较少,故应用

Sub-G₁法无法检测到早期凋亡细胞,且其不能准确地分析细胞凋亡的周期时相性。因此,Sub-G₁法的应用具有一定的局限性。

对活细胞质膜内外两层脂类分子的化学分析表明,质膜的主要成分磷脂呈不对称分布,含胆碱的磷脂如磷脂酰胆碱及鞘磷脂暴露于质膜外表面,而磷脂酰丝氨酸则主要位于质膜内表面,细胞凋亡时,会出现“膜外翻”现象,质膜内侧的磷脂酰丝氨酸则暴露于膜的外表面,凋亡细胞这一典型的膜结构改变在细胞凋亡的早期便已发生。利用 FITC 标记的 Annexin-V 与带负电荷的磷脂酰丝氨酸结合,可有效地对细胞凋亡进行定量检测,并可区分坏死细胞。同时,活细胞经 1% 甲醛 (不含甲醇) 固定,然后用洋地黄皂苷对细胞膜作通透处理,最后用 PI 染色。在此原理的基础上建立的 FITC-Annexin-V 和 PI 标记法 (PA 法) 既可对凋亡细胞进行定量分析,又能对凋亡细胞的细胞周期特异性进行分析^[7]。此技术因灵敏度高,操作简便,费用较低而受到人们的关注。

这样,我们结合 Sub-G₁法和 PA 法建立了一个用于筛选和分析细胞周期特异性抗癌药物的新的技术平台:①应用 Sub-G₁法检测药物是否诱导肿瘤细胞凋亡而初步筛选出细胞周期特异性抗癌药物;②应用 PA 法分析药物诱导细胞凋亡的周期特异性。

我国有丰富的中药资源,从中筛选并提取抗癌的有效成分,进而开发研制出新的抗癌药物,具有广阔的市场前景。在此技术平台上,我们筛选出槐耳清膏能诱导 G₁期肿瘤细胞凋亡,并引起肿瘤细胞阻滞在 S 期。目前已有其成品 (金克槐耳颗粒 国家一类新药) 运用于临床,对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌等均有独特疗效,其抗癌机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266:1821 - 1828.
- [2] Sherr CJ. Cancer cell cycle[J]. Science, 1996, 274: 1672 - 1677.
- [3] Gong JP, Triaganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry[J]. Anal Biochem, 1994, 218:314 - 319.
- [4] Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis) [J]. Cytometry, 1997,27:1 - 20.
- [5] Górczyca W, Gong J, Darynkiewicz Z, et al. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl translation assays[J]. Cancer Res, 1993, 52:1945 - 1951.
- [6] Elstein KH, Thomas DJ, Zucker RM. Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis[J]. Cytometry, 1995, 21:170.
- [7] 陶德定,冷彦,覃吉超,等. 膜联蛋白 V 和碘化丙啶用于细胞周期特异性凋亡的检测 [J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(2):79 - 81.