

顺铂诱导颊癌细胞凋亡及凋亡分子(Apo-1)表达的实验研究

江宏兵 廖小宜 李 芄

摘要 目的: 研究细胞毒类化疗药——顺铂诱导人颊癌细胞凋亡发生的规律以及凋亡分子Apo-1的表达。探讨口腔癌化疗的细胞凋亡机制。方法: 以建株人颊癌细胞系BcaCD885为对象, 采用光镜、电镜以及流式细胞术等手段观察顺铂诱导颊癌细胞凋亡的形态特征及规律, 同时检测顺铂对颊癌细胞Apo-1表达的影响。结果: 顺铂作用后的颊癌细胞出现典型的凋亡细胞形态学特征; 顺铂诱导颊癌细胞凋亡呈现时间及剂量依赖性效应关系; 顺铂能上调颊癌细胞Apo-1的表达。结论: 细胞凋亡可能是顺铂杀灭颊癌细胞的重要机制, Apo-1在顺铂诱导颊癌细胞凋亡中可能起着关键性调节作用。

关键词 顺铂 颊癌细胞 细胞凋亡 凋亡分子

细胞凋亡(apoptosis)是细胞在生理或病理条件下主动启动相关凋亡基因而发生的一种死亡形式。近来的研究表明, 大多数化疗药物均可通过细胞凋亡途径杀灭肿瘤细胞。从细胞凋亡角度来重新审视恶性肿瘤的化学药物治疗, 对进一步揭示化疗的作用机制, 提高临床化疗疗效具有重要意义¹。顺铂为一种广泛应用于口腔癌临床化疗的细胞毒类药物, 当其进入癌细胞后可直接造成DNA损伤。这种DNA损伤能诱导细胞周期的停滞和凋亡的发生, 然而, 细胞又是如何将损伤信号转变为凋亡信号至今尚不清楚。本实验以建株人颊癌细胞系为对象, 建立化疗药物作用下肿瘤细胞凋亡模型并采用光镜、电镜以及流式细胞术(flow cytometry, FCM)等手段探讨顺铂诱导人颊癌细胞凋亡的规律及分子机制。为研究肿瘤细胞凋亡的有关机制奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 肿瘤细胞及培养

人颊癌细胞系BcaCD885由华西医科大学口腔医学院建株并提供, 细胞解冻后培养于含15%小牛血清的RPMI1640(GBCO公司产品)培养基中, 37℃恒温水育孵箱中密闭培养, 实验前24h半量换液, 0.4%台盼蓝染色, 活细胞数在95%以上。

1.2 药物处理

体外加顺铂(锦州制药厂)浓度参考公式“ $60 \times$ 临床用

药量/ $5000 \times 2 \times 10^3$ ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)”进行计算, 加药至培养瓶后的终浓度为所设计的浓度, 终止药物作用采用Hanks液充分洗涤3次。设计不同浓度的顺铂作用组, 20、15、10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 分别相当于体内大剂量、常规剂量及小剂量。药物作用12h后再培养24h, 0.25%胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, FCM分析凋亡率。再以15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 顺铂分别作用2、4、6、12、24h后, 培养24h。对照组加等量的培养液, 离心收集细胞, FCM分析凋亡率。

1.3 FCM检测

消化、离心收集颊癌细胞, 0.01 mol/L PBS洗涤, 70%乙醇固定, 4℃过夜, 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 碘化丙啶(Sigma公司)染色, FACS-ESP型流式细胞仪(Coulter公司)检测, 氩离子激光激发波长488 nm。结果经电脑处理并打印出各组细胞DNA含量分布组方图及各细胞周期所占百分比, 计算凋亡率。根据文献³介绍的方法计算增殖指数(proliferation index, PI)衡量细胞的分裂增殖活动, $PI = \frac{S+G_2M}{G_0/G_1+S+G_2M} \times 100\%$ 。

1.4 Apo-1(又名Fas, 或CD95)表达测定

15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 顺铂作用颊癌细胞6h后分别于第18h、42h收集细胞, PBS洗涤后加Fas-PE单抗(Immunotech公司), 每样本同时设自身对照, 加入IgG-PE, 25℃下作用15min后于FCM上检测, 计算单细胞阳性蛋白标记荧光强度。

1.5 形态学观察

15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 顺铂37℃下作用12h后常规行吉姆萨染色及透射电镜标本制备。

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院(江宏兵现在皖南医学院附属弋矶山医院口腔科)

2 结 果

2.1 形态学变化

顺铂处理后颊癌细胞,经吉姆萨染色光镜下见胞浆浓缩,核致密、固缩裂解并见凋亡小体形成(图 1);透射电镜下见细胞体积缩小,胞核浓缩边集于核膜下,核仁消失,胞质内细胞器退变,胞膜上出现小泡但连续性完整,呈现凋亡细胞特征(图 2)。未经药物处理的颊癌细胞核大而均匀染色,核仁清晰可见,胞质内细胞器完整(图 3, 4)。

2.2 顺铂诱导颊癌细胞凋亡的时间-效应关系

经 FCM 分析,15 $\mu\text{g}/\text{m}^1$ 顺铂作用颊癌细胞不同时间后凋亡率及细胞周期分布见表 1,顺铂能明显地诱导颊癌细胞凋亡,随着作用时间的延长,凋亡细胞发生率不断增加。当药物作用达 12 h 后凋亡发生率与对照组相比有统计学差异($P < 0.01$),同时,细胞各周期所占百分比也相应地发生变化, G_0/G_1 期细胞增多,S 期细胞数减少($P < 0.05$),颊癌细胞的增殖指数明显下降($P < 0.01$) (表 1)。另外,从 DNA 组方图上可见到 G_0/G_1 期前亚二倍体凋亡峰(Ap) (图 5)。

表 1 15 $\mu\text{g}/\text{m}^1$ 顺铂作用不同时间
对颊癌细胞周期的影响

组别	细胞周期分布(%)				PI 值 (%)
	凋亡细胞	G_0/G_1	S	G_2+M	
空白对照组	4.8	39.9	41.3	18.8	60.1
2 h 组	5.4	56.7	34.2	9.1	43.3
4 h 组	7.4	47.2	39.9	12.9	52.8
6 h 组	9.4	46.0	42.7	11.3	54.0
12 h 组	20.3**	82.8*	9.1*	8.1	17.2**
24 h 组	22.6**	74.6*	14.2*	11.2	2.4**

注:与对照组相比,经卡方检验,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

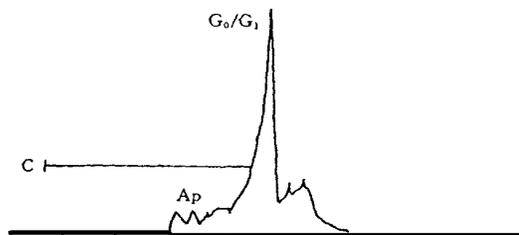


图 5 DNA 组方图 可见 G_0/G_1 期前凋亡峰(Ap)

2.3 顺铂诱导颊癌细胞凋亡的剂量-效应关系

以 10、15、20 $\mu\text{g}/\text{m}^1$ 3 种浓度顺铂作用颊癌细

胞 12 h 后凋亡发生率依次增加,但各组间凋亡发生率及细胞周期各时相百分比无统计学差异($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 不同浓度顺铂作用 24 h 后对颊癌细胞周期的影响

组别	细胞周期分布(%)				PI 值 (%)
	凋亡细胞	G_0/G_1	S	G_2+M	
10 $\mu\text{g}/\text{m}^1$	15.8	62.2	26.5	11.3	37.8
15 $\mu\text{g}/\text{m}^1$	23.1	60.5	32.1	7.4	39.5
20 $\mu\text{g}/\text{m}^1$	25.3	57.9	30.4	11.7	42.1

注:经卡方检验 $P > 0.05$

2.4 顺铂诱导颊癌细胞 Apo-1 表达

15 $\mu\text{g}/\text{m}^1$ 顺铂作用颊癌细胞 6 h 后再分别培养 18 h 和 24 h,FCM 检测得单细胞 Apo-1 蛋白表达荧光强度值(表 3),与对照组相比,顺铂作用后的颊癌细胞 Apo-1 表达增强,分别增加了 58% 和 62%。

表 3 15 $\mu\text{g}/\text{m}^1$ 顺铂作用不同时间中颊癌细胞 Apo-1 表达

组别	单细胞 Apo-1 表达 (荧光强度值, $\bar{x} \pm s$)	n
对照组	1.133 \pm 0.625	4645
18 h 组	1.789 \pm 0.758	5759
42 h 组	1.830 \pm 0.737	6771

3 讨 论

凋亡细胞具有如下形态学特征:细胞皱缩,核染色体浓缩密集于核膜下,核碎裂崩解成多个小块连同萎缩退变的细胞器被膜性结构包裹形成凋亡小体,胞膜可内陷或突起成小泡但连续性完整,胞浆无溶解性破坏⁴。本实验通过光镜和电镜观察到顺铂作用后的颊癌凋亡细胞特征,从形态学角度证实顺铂可以诱导颊癌细胞发生凋亡。

凋亡细胞于核小体间断裂导致部分染色质缺失形成亚二倍体细胞型是 FCM 检测凋亡细胞的工作原理。本研究观察了不同浓度和不同作用时间下顺铂对颊癌细胞凋亡的诱导率,结果表现为时间及剂量依赖性效应关系。2~24 h,凋亡率依次从 5.4% 增加到 22.6%;而不同浓度顺铂组虽表现为随浓度加大凋亡率不断提高的效应,但各剂量组间并无统计学差异。因此,从诱导癌细胞凋亡角度考虑,对颊癌应用顺铂化疗时小剂量持续给药可能更为合理。当然,任何一种化疗药在诱导不同癌细胞系细胞凋亡时会产生不同的结果。有学者认为,

这种差异可能与不同部位肿瘤的化疗敏感性有关⁵。由此提示,建立化疗药敏试验的凋亡指标,对口腔癌临床化疗方案的选择具有指导意义。

顺铂作为一种细胞毒类化疗药进入细胞后与DNA结合形成DNA加合物从而造成DNA损伤,此时,野生型p53被启动,积极参与损伤修复和凋亡的诱导⁶。本文结果表明,顺铂可将人类癌细胞阻止于G₀/G₁期,特别是随着作用时间的延长表现得更加明显,从而抑制了DNA合成和细胞的增殖。细胞被阻止于G₀/G₁期是DNA损伤后细胞主动参与的自我修复,主要由野生型p53介导,对损伤不能修复的细胞便启动下游相关凋亡基因从而使之进入凋亡过程。关于颊癌细胞中p53分子的表达情况及其在凋亡中的调控机制有待进一步深入研究。

Apo-1,即凋亡分子-1,是最先发现与凋亡发生有关的物质而得名,后经研究证实,其分子结构完全等同于Fas抗原,是一种分子量为48 kD的跨膜糖蛋白,属肿瘤坏死因子受体家族成员,Fas与其配体FasL(Fas ligand)的结合可诱导Fas表达细胞发生凋亡,Fas/FasL系统是介导细胞凋亡发生的重要途径之一⁷。据报道,经化疗药处理后的某些肿瘤细胞会出现Fas/FasL表达的增加,并且与肿瘤细胞的凋亡发生有关,因此,化疗药诱导肿瘤细胞凋亡可能通过对Fas/FasL的上调作用,借助Fas凋亡途径完成凋亡过程⁸。本实验以顺铂处理颊癌细胞后测得Fas表达强度的增加,说明顺铂作用下的颊癌细胞凋亡很可能通过Fas/FasL这一分子机制得以实现。由顺铂造成的损伤信号经野生型p53分子感应并启动相关基因从而导致Fas表达增强,由此转化成凋亡信号²。有学者通过体内实验发现,小剂量顺铂可激活巨噬细胞,NK细胞等免疫

细胞的杀瘤活性,其功能相当于一种潜在的生物反应调节剂⁹。如此,小剂量顺铂联合局部应用凋亡诱导分子FasL可望成为一种新的抗癌治疗方法。

(本文图1~4见中心插页13)

4 参考文献

- 1 Debatin KM. Cytotoxic drugs, programmed cell death, and the immune system: defining new roles in an old play. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(11): 750~ 751
- 2 Muller M, Strand S, Hug H, et al Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest*, 1997, 99(3): 403~ 407
- 3 黄韧敏,袁淑应,宋毅,等.丹参酮诱导HL-60细胞分化及凋亡的流式细胞术分析. *中国肿瘤临床*, 1997, 24(7): 500~ 503
- 4 Steward BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(17): 1286~ 1292
- 5 Hayashi H, Tatebe S, Osaki M, et al Expression of Fas antigen and its mediation of apoptosis in human gastric cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(1): 49~ 55
- 6 Chaney SG, Sancer A. DNA repair: enzymatic mechanism and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(19): 1346~ 1360
- 7 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995, 267(5283): 1449~ 1455
- 8 Micheau O, Solary E, Hammann A, et al Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(11): 783~ 789
- 9 Sodhi A, Shishodi S, Shrivastava A. Cisplatin-stimulated murine bone marrow-derived macrophages secrete oncostatin M. *Immunol Cell Biol*, 1997, 75(3): 492~ 496

(1998-06-23 收稿, 1999-07-23 修回)

Experimental Study on Apoptosis and Apo-1 Expression of Buccal Carcinoma Cell(BCC) Induced by Cisplatin

Jiang Hongbin, Liao Xiaoyi, Li Pong

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: To study apoptotic characteristics and expression of apoptosis molecule Apo-1 (Fas, CD95) on buccal carcinoma cell (BCC) induced by cytotoxic drug cisplatin and exploit the apoptotic mechanisms of oral cancer chemotherapy. **Methods:** Human BCC line BcaCD885 was used as in vitro study object. Morphological features of apoptotic BCC induced by cisplatin were observed by use of light microscopy and electron microscopy, meanwhile, apoptotic rates (AR) were analysed by the flow cytometry. **Results:** Condensation and crack of nucleus and apoptotic bodies appeared in apoptotic BCC; There existed time

and dosage dependent AR, and AR were respectively 5.4%, 7.4%, 9.4%, 20.3% and 22.6% after BCC had been acted by 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ cisplatin for 2, 6, 12 and 24 hours, moreover, there was significantly difference ($P < 0.01$) among the 12-hour group, the 24-hour group and the control group; Cell cycle of BCC was apparently arrested at G_0/G_1 by cisplatin ($P < 0.05$); Apo-1 expression of BCC were enhanced 58% and 62% respectively after it was induced by 25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ cisplatin for 18 and 42 hours ($P < 0.05$). **Conclusion:** Apoptosis may be an important mechanism of BCC killed by cisplatin, and Apo-1 may play a role in the process of apoptosis induced by chemotherapy drugs

Key words buccal carcinoma cell apoptosis cisplatin apoptotic molecule

治疗残髓炎 97 例临床分析

王海龙 瞿百玲

残髓炎是牙髓经过治疗后残余的生活牙髓发生的炎症。多见于干髓治疗后并发症。作者从 1992 年以来治疗 97 例残髓炎患牙 101 个, 现总结分析如下。

1 临床资料

本组共诊治 97 例患者, 男性 52 例, 女性 45 例, 年龄 18 ~ 62 岁, 共 101 个患牙。其中前磨牙 34 个, 上颌磨牙 42 个, 下颌磨牙 25 个。所有患牙均作过牙髓治疗, 其中干髓术 83 个患牙, 占 82.18%; 去髓术 7 个患牙, 占 6.93%; 治疗方法不明的患牙 11 个, 占 10.89%。症状表现为自发痛 39 个牙, 温度刺激痛 72 个牙, 咬合痛 58 个牙。该病发生距原治疗的间隔时间为 5 d ~ 4 年, 多数在半年内。所有患牙去除充填物后, 在根管的不同部位出现探痛, 大部分患牙有叩痛或不快感, 冷试验不敏感。

本组病例采用重新失活或局麻下拔髓, 同时配合安抚、止痛、消炎, 待症状消失后, 重新作牙髓治疗或根管治疗。术中 1 周复诊。术后 1 月、6 月、1 年、2 年复诊或随访观察。

疗效标准: 术后症状消失, 无叩痛, 不松动, 功能正常, X 线片示牙周、根尖周正常者为痊愈。无自觉症状或偶感不适, 叩痛轻微, X 线片示牙周无明显变化者为好转。出现自发痛、咬合痛, 松动度和牙周袋深度增加, X 线片示根尖周、牙周出现明显稀疏区, 以及牙折, 凡有任何一项即为失败。

2 结 果

本组 97 例残髓炎 101 个牙术后疗效见表 1。

97 例 101 牙残髓炎经重新治疗, 6 牙失败, 其主要原因有: 适应证选择不当 (2 例), 牙周情况差, 为牙髓牙周联

合疾病, 未按时复诊治疗, 牙体缺损过多, 未做全冠修复, 导致牙折 (2 例), 并继发根部龋坏。

表 1 97 例残髓炎 101 个患牙术后疗效 (牙数)

观察时间 (月)	痊愈		好转		失败		合计
	n	%	n	%	n	%	
1	89	88.12	10	9.90	2	1.98	101
6	94	93.07	3	2.97	4	3.96	101
12	95	94.06	1	0.99	5	4.95	101
24	95	94.06	0	0	6	5.94	101

3 讨 论

残髓炎为牙髓炎的一种类型, 症状不典型, 自发痛常为隐痛、钝痛, 患者多以冷刺激痛为主诉, 但对冷刺激又不敏感。这种主诉与检查结果不甚相符的现象是残髓炎的特点之一。由于炎症可能累及根尖周, 患牙常伴有咬合痛或咬合不适感, 这是残髓炎的另一特点。残髓炎多为干髓术后的并发症。干髓治疗引起残髓炎的可能原因有: 缺乏组织学愈合的充分证据。干髓剂存放过久, 药效下降。药物未放在根管口。对于曾作过牙髓治疗, 而又出现自发痛、冷热刺激痛和咬合痛者, 不论其距原始治疗间隔的时间长短, 在排除其它牙患后, 应考虑残髓炎的可能。

(1999-05-31 收稿)

作者单位: 610031 成都市第三人民医院口腔科 (王海龙), 成都铁路局中心医院口腔科 (瞿百玲)

质粒DNA在大鼠舌肌中的表达

(正文见第297页)

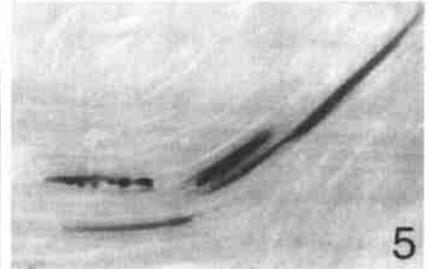
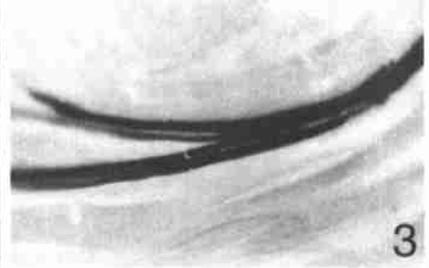
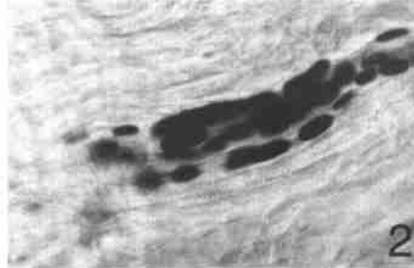
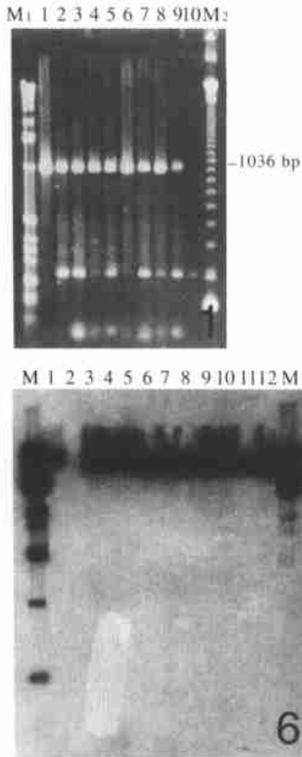
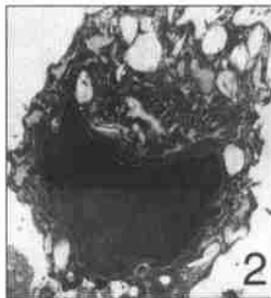
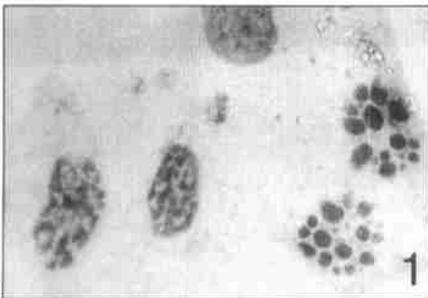


图1 舌肌摄取质粒DNA分析 M₁:1kb DNA标尺, M₂: 100bp DNA标尺, 1:p^{M3TnC3}对照, 2-9:实验组舌肌DNA, 10:对照组舌肌DNA
图2 p^{M3TnC3}报导基因在大鼠舌肌中的表达, 几组肌纤维摄取并表达大肠杆菌nLacZ报导基因, 肌细胞核被染成蓝色, 呈串珠状排列 X-gal × 66
图3 p^{SV40-LacZ}报导基因在大鼠舌肌中的表达 X-gal × 33

图4 p^{M3TnC3}和p^{SV40-LacZ}报导基因在舌肌中共同表达, 肌细胞核被染成蓝色, 肌浆被染成浅蓝色 X-gal × 33
图5 p^{M3TnC3}和p^{SV40-LacZ}分别在舌肌纤维中表达 X-gal × 33
图6 质粒DNA在大鼠舌肌中存在状态 Southern杂交分析 M:λDNA Hind III标尺, 1:p^{M3TnC3}对照, 2:对照组舌肌DNA, 3-12:实验组舌肌DNA



顺铂诱导颊癌细胞凋亡及凋亡分子(Apo-1)表达的实验研究

(正文见第300页)

图1 加顺铂后颊癌细胞核固缩、裂解 吉姆萨 × 1000
图2 加顺铂后颊癌凋亡细胞, 胞膜皱缩或突起, 胞核半月形, 染色质浓缩边集于核膜下, 核仁消失, 细胞器退变 × 6000
图3 未加药组人类颊癌细胞核大而均匀着色, 核仁清晰 吉姆萨 × 1000
图4 未经顺铂作用之颊癌细胞, 胞膜延续完整, 胞核椭圆形, 核仁清晰, 胞浆内细胞器完整 × 6000

