

# TNP-470 作用于体外培养 GNM 细胞系的形态学研究

彭利伟 李金荣

**摘要** 目的:观察 TNP-470 作用于体外培养的人口腔鳞癌颈淋巴结转移癌细胞系 GNM 后的形态学改变,探讨 TNP-470 的作用机理。方法:利用体外培养技术,采用相差显微镜、扫描电镜、透射电镜观察法,观察 TNP-470 对 GNM 细胞形态及超微结构的影响。结果:TNP-470(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 作用于 GNM 细胞 48 h,大量细胞变圆、细胞膜皱缩,并出现较多悬浮死亡细胞。作用 72 h 后,扫描电镜下可见细胞表面的微绒毛数量减少、长度变小、细胞一端有较大的球状突;透射电镜下可见 GNM 细胞大量坏死、线粒体和内质网破坏。结论:TNP-470 对 GNM 细胞具有明显杀伤作用;TNP-470 可使 GNM 细胞线粒体和内质网发生破坏,这可能是其具有直接癌细胞毒作用的机制之一;TNP-470 可使 GNM 细胞膜表面结构发生改变。

**关键词** TNP-470 GNM 细胞系 形态学

## Effect of Angiogenesis Inhibitor ( TNP-470) on the Morphology of GNM Cell Line in vitro

Peng Liwei

*The Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Faculty of Stomatology, Zhengzhou University*

Li Jinrong

*The Stomatological College, Wuhan University*

### Abstract

**Objective :** The purpose of this study was to investigate the effect of an angiogenesis inhibitor (TNP-470) on the ultra micro-structural morphological changes of GNM cell line, which was derived from human oral squamous cell carcinomas in vitro. **Methods :** The GNM cells were cultured and, the effect of TNP-470 on ultra micro-structural morphological changes of GNM cells was observed under the inverted microscope, the scanning electron microscope (SEM) and the transmission electron microscope (TEM). **Results :** Numerous round cells, shrinkage of cellular membrane and dead cells were observed 48 hours after 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of TNP-470 was added into the GNM cellular suspension. After 72 hours, GNM cells became shortened and, the number of microvilli of the cellular surface was observed under the SEM and TEM. A large number of GNM cells turned into necrosis, accompanying with the destruction of mitochondria and endoplasmic reticula. **Conclusion :** TNP-470 has a strong tumor cytotoxic effect on GNM cells, which may be due to its destructibility on mitochondria and endoplasmic reticula of GNM cells. TNP-470 can alter the surface structure of GNM cell membrane, which suggests that TNP-470 may interrupt the metastasis of GNM cells.

**Key words :** angiogenesis inhibitor GNM cell line cellular morphology

采用体外培养的转移癌细胞系,筛选针对转移癌细胞有效的药物,避免了临床用药的盲目性,可为转移癌细胞的治疗提供有力的理论依据。

TNP-470 ( angiogenesis modulator-1470, AGM-1470) 是一种新合成的血管生成抑制剂,为烟曲霉素的一种类似物。据文献报道<sup>1-4</sup>,TNP-470 对一些肿瘤的转移具抑制作用,并可抑制一些肿瘤细胞系如人绒膜癌细胞系、子宫内膜癌细胞系、卵巢癌细胞系等的生长。但迄今尚未见 TNP-470 对口腔转移癌细胞系作用的研究报道。

本研究旨在观察 TNP-470 作用于体外培养的人口腔鳞癌颈淋巴结转移癌细胞系 GNM 后的形态学变化,探讨 TNP-470 的作用机理,为临床应用 TNP-470 抗口腔鳞癌转移癌提供理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞系

人口腔鳞癌颈淋巴结转移癌细胞系,来自上颌牙龈癌颈部淋巴结转移性鳞状细胞癌,由湖北医科大学口腔医学院建立<sup>5</sup>。

#### 1.2 药品

TNP-470,日本 Takeda 公司惠赠。

#### 1.3 主要仪器

倒置光学显微镜(Nikon, Japan);透射电镜,日立 H-300 型(日本);扫描电镜,日立 S-450 型(日本)。

#### 1.4 试剂

常规细胞培养试剂。

#### 1.5 实验方法

常规方法进行细胞培养及传代。

1.5.1 相差显微镜观察 取指数生长期的 GNM 细胞制备成浓度为每毫升  $10^4$  个细胞的单细胞悬液,接种于 5 ml 培养瓶中,每瓶 4 ml。24 h 后实验组每瓶加 TNP-470,使其终浓度为  $2 \mu\text{g/ml}$ ,对照组不加药物,再培养 48 h 后用倒置相差显微镜观察细胞形态。

1.5.2 扫描电镜观察 将 GNM 细胞传代接种至含小盖玻片之 25 ml 培养瓶中,培养 24 h 后加入 TNP-470,使其浓度为  $2 \mu\text{g/ml}$ ,继续培养 72 h,从培养瓶中取出盖片,以 PBS 液漂洗、2%戊二醛固定,再经一系列常规处理,最后镀膜、扫描电镜观察。

1.5.3 透射电镜观察 上述加药(TNP-470)之细胞培养 72 h 后,用细胞刮将其刮下,将细胞悬液置于 EP 管中,2000 r/min 离心约 10 min,弃去上清液,加入 4℃ 预冷之 2%戊二醛,再经常规处理,制备超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察。

### 2 结果

#### 2.1 相差显微镜下观察

对照组细胞均呈自然贴壁生长,细胞形态为扁平的多角形上皮样细胞,胞浆透亮,胞质近中央处有圆形的细胞核,核浆比例大,核仁较多。细胞界限清楚,细胞伸展,彼此互相连接,且可见重叠生长的细胞及处于分裂期的细胞(图 1)。



图 1 对照组细胞形态 ×25

Fig 1 Cells presented adherent growth, and their shapes were flat and polygonal. The cells extended and linked one another ×25

TNP-470 用药组细胞培养瓶中可见大量细胞变圆、细胞膜皱缩,并出现较多悬浮死亡细胞(图 2)。



图 2 TNP-470 用药组细胞 ×25

Fig 2 A large number of round cells, shrinkage of cells membrane and dead suspension cells were observed ×25

#### 2.2 扫描电镜观察

扫描电镜下可见 TNP-470 作用后的细胞膜表面的微绒毛数量减少,长度变小,但表面仍有许多皱褶,在细胞一端可见较大的球状突(图 3)。

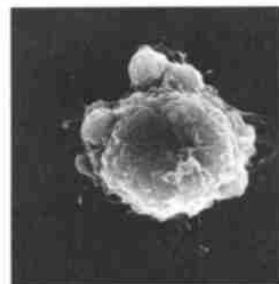


图 3 扫描电镜观察 TNP-470 作用后的 GNM 细胞 ×5000

Fig 3 The length and the number of microvilli reduced on cell surface, and big ball-form bulge presented on the side of the cell SEM ×5000

#### 2.3 透射电镜观察

透射电镜下可见 TNP-470 作用后的细胞中出

现崩解的核碎块、核仁、核膜消失,残存之线粒体肿胀,张力原纤维未发现,粗面内质网不明显,细胞膜消失,细胞表面有胞质泡形成(图4)。

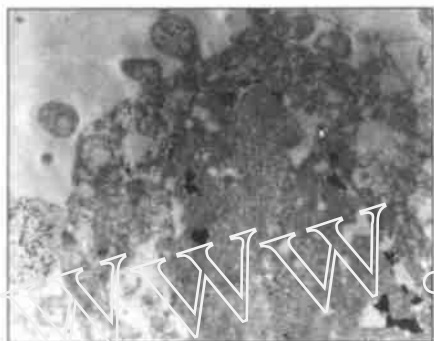


图4 透射电镜观察 TNP-470 作用后的 GNM 细胞 醋酸铀、柠檬酸铅双重染色  $\times 7000$

Fig 4 The cell turned to necrosis accompanying with the damage of mitochondria and endoplasmic reticulum TEM Uranium acetate, citric acid lead double dye  $\times 7000$

### 3 讨 论

利用人癌细胞进行短期或长期培养,以观察药物的抗癌作用,这是肿瘤药敏研究的途径之一。GNM 细胞系是从人牙龈癌颈部淋巴结转移灶中分离建立起来的细胞系,以它为对象筛选针对转移灶的有效药物,可以避免临床上药物筛选的盲目性,为口腔转移癌的防治提供理论依据。

TNP-470 可通过抑制肿瘤的血管生成进而抑制肿瘤的生长,且还可抑制一些恶性肿瘤的转移。Mori 等<sup>3</sup>的研究认为,TNP-470 可抑制骨肉瘤细胞系 LM8 的肺转移,且该作用缘于其抗血管活性及抑制 LM8 细胞生长的作用。Yanase 等<sup>2</sup>对绒膜癌等 8 种人肿瘤细胞系用浓度为  $10 \sim 10^{-2} \mu\text{g}/\text{ml}$  的 TNP-470 处理 7 d 后,发现这 8 种细胞系的生长均受到抑制。

本研究利用细胞培养技术,首次观察了 TNP-470 对培养的 GNM 细胞系作用的形态学变化。本研究结果显示 TNP-470 ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 可使培养的贴壁 GNM 细胞变圆、细胞膜皱缩,并悬浮死亡。这提示它对人口腔鳞癌颈淋巴结转移癌 GNM 细胞有明显杀伤作用。

Antoine 等<sup>6</sup>的研究认为,TNP-470 可特异抑制正常内皮细胞的周期控制通道的活性,阻止其进入 G1 期,并认为这可能是内皮细胞对其较敏感的原因。本研究电镜观察发现,TNP-470 作用于 GNM 细

胞后,可引起其表面结构的改变,如细胞膜表面微绒毛数量减少、长度变小等,这些结构的改变可能表明 GNM 细胞转移机制的削弱<sup>7</sup>。另外,TNP-470 还可引起 GNM 细胞线粒体和粗面内质网的破坏。线粒体是细胞有氧呼吸的基地和供能场所,粗面内质网是合成内源性蛋白质的基地<sup>8</sup>。因此,这两个结构的破坏是导致细胞无法生存的原因。这表明 TNP-470 对 GNM 细胞的杀伤作用可能是通过干扰破坏线粒体和粗面内质网的机能来实现的。

综上所述,TNP-470 对 GNM 细胞具有明显的杀伤作用,可使 GNM 细胞线粒体和内质网发生破坏,使其细胞膜表面结构发生改变。

### 参考文献

- 1 Yamaoka M, Yamamoto T, Masaki T, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis of rodent tumors by the angiogenesis inhibitor O (chloroacetylcarbonyl) fumagillol (TNP-470, AGM-1470). *Cancer Res*, 1993, 53(18):4262~4267
- 2 Yanase T, Tamura M, Fujita K, et al. Inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis of human cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 1993, 53(11):2566~2570
- 3 Mori S, Ueda T, Kuratsu S, et al. Suppression of pulmonary metastasis by angiogenesis inhibitor TNP-470 in murine osteosarcoma. *Int J Cancer*, 1995, 61(1):148~152
- 4 Tanaka T, Konno H, Matsuda I, et al. Prevention of hepatic metastasis of human colon cancer by angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res*, 1995, 55(4):836~839
- 5 金辉喜. 人口腔鳞癌颈淋巴结转移癌细胞系和人舌癌细胞系的建立及其生物学特性分析. 湖北医科大学博士学位论文, 1997:17~25
- 6 Antoine N, Greimers R, De Roanne C, et al. AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res*, 1994, 54(8):2073~2076
- 7 Sica G, Natoli C, Marchetti P, et al. Tamoxifen induced membrane alterations in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem*, 1984, 20(1):425~428
- 8 谭曾鲁,周柔丽主编. 医学细胞生物学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1992:116~121,155~166

(2000-08-31 收稿)

(本文编辑 王 晴)