

咖啡酸锗对小鼠肝癌 H22 端粒酶活性及凋亡的影响^{*}

★ 张晓春 肖纯^{**} 乔玉丹 刘春花 周志愉 林波 (江西中医学院基础医学院 南昌 330006)

摘要:目的:探讨咖啡酸锗对小鼠肝癌 H22 端粒酶活性及细胞凋亡的影响。方法:建立小鼠肝癌 H22 移植瘤模型,应用咖啡酸锗腹腔注射给药后,通过电镜观察 H22 细胞凋亡的情况以及用 ELISA 法半定量检测端粒酶活性。结果:咖啡酸锗能诱导 H22 细胞凋亡以及抑制端粒酶的活性,并与药物浓度有关。结论:咖啡酸锗能显著抑制 H22 细胞端粒酶的活性,抑制其细胞增殖,诱导其细胞凋亡。

关键词:咖啡酸锗;H22 细胞;端粒酶;细胞凋亡

中图分类号:R 965 **文献标识码:**A

Effects of Caffeic Acid Ge on H22 Cancer Cells Telomerase Activity and Apoptosis in Mice

ZHANG Xiao-chun, XIAO Chun, QIAO Yu-dan, LIU Chun-hua, ZHOU Zhi-yu, LIN Bo

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To investigate the effects of Caffeic acid Ge on telomerase activity and apoptosis on H22 cancer cells in mice. Methods: Establishing model of H22 cancer cells in mice and after the treatment for abdominal using Caffeic acid Ge. Cell apoptosis was observed by transmission electron microscopy, and mice telomerase enzyme linked immunoassay (小鼠端粒酶 TE ELISA) was used to assay telomerase activity of H22 cells. Results: Caffeic acid Ge could induced H22 cells apoptosis and inhibit telomerase activity by different concentrations. Conclusion: Caffeic acid Ge could inhibit H22 cells telomerase activity and cell proliferation obviously and could also induce apoptosis.

Key Words: Caffeic acid Ge; H22 cells; Telomerase; Apoptosis

端粒酶为 RNA 的核糖核蛋白,有逆转录酶活性,可合成端粒重复序列以维持端粒长度从而使细胞获得异常增殖能力。端粒酶与细胞调控及恶性肿瘤形成密切相关,而端粒酶的调控及其与细胞凋亡的关系已成为人类肿瘤研究的新热点^[1]。咖啡酸锗是我院合成的新化合物,前期工作中已经发现其具有抗肿瘤作用。本文通过体内实验用小鼠端粒酶 TE ELISA 试剂盒半定量检测咖啡酸锗对小鼠肝癌 H22 细胞端粒酶的影响及用透射电镜观察 H22 细胞凋亡的诱导作用。现报道如下:

1 实验材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 近交系昆明种清洁级小鼠 50 只,雄性,18 ~ 22 g,一级屏障环境饲养、温度 20 ~ 24 ℃、相对湿度 40% ~ 60% 的环境下完成动物实验,小鼠由江西中医学院实验动物中心提供。

1.1.2 瘤细胞 小鼠肝癌 H22 细胞株,购自浙江省医学科学院肿瘤研究所,本实验室常规传代保存。

1.1.3 主要药物及试剂 咖啡酸锗(由本院化学实验室黄桂林教授合成),注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司),小鼠端粒酶 TE ELISA 试剂盒(由美国 CHEMICON 公司生产,上海郎卡生物有限公司进口分装。)

1.2 实验方法

1.2.1 建立荷瘤鼠模型及分组 选取传代接种后 7 ~ 10 d、肿瘤生长良好、腹部隆起明显的瘤源小鼠,断椎处死,于超净工作台无菌条件下,从腹腔抽取瘤液置于冰浴上的无菌三角烧瓶中,经台盼蓝检验瘤细胞活性 > 95%,用灭菌生理盐水稀释,调整瘤细胞数至 2.28×10^7 个/ml,于每只小鼠右前肢腋下皮下接种 0.2 ml,形成实体瘤。将接种了肝癌 H22 细胞的小鼠随机分为生理盐水组[NS, 90mg/(kg·d)]、环磷酰胺组[CTX, 25 mg/(kg·d)]、咖啡酸锗低、中、高剂量组[Caffeic-acid Ge, 1 mg/(kg·d), 2 mg/(kg·d), 4 mg/(kg·d)],每组 10 只。各组小鼠于接种次日进行腹腔注射给药,给药量均为 0.2 ml/20 g,每日给药一次,连续 10 d。次日,处死小鼠后剥离瘤块。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30460148);江西省教育厅科技资助项目[No. 赣教技字(2007)252 号]

** 通讯作者:肖纯,病理学教授,硕士生导师, E-mail: xiaochun0791@163.com

1.2.2 透射电镜观察(EM)方法 取 $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$ 瘤组织 2 ~ 3 块在 2.5% 的戊二醛中前固定,后经 1% 锇酸后固定,丙酮梯度脱水,然后环氧树脂浸透包埋以及电子染色,最后用 HITACHI-600 型电镜下观察并拍照。

1.2.3 端粒酶提取及测定 取每个新鲜的瘤组织共 50 个样本各 100 mg,加入 500 μl 生理盐水,组织匀浆,5000 r/min 离心 1 min,取上清液。然后按照试剂盒说明书进行。结果:(1)Cutoff = Calibrator 的 OD 值。(2)TE Index = 样品的 OD 值/Cutoff 值。(3)Index ≥ 1 为阳性;Index 在 0.91 ~ 0.99 间为可疑;Index ≤ 0.90 为阴性。

2 结果

2.1 EM 结果判定

透射电镜可观察到细胞超微结构在凋亡不同时期的变化,是迄今为止判断凋亡最经典、可靠的方法。EM 下,凋亡细胞(APO)表面微绒毛消失,胞膜空泡化,细胞体积缩小,出现固缩。胞浆浓缩,细胞器退变;核染色质边聚、浓集成团块状于核膜处,并可形成凋亡小体等。见图 1。

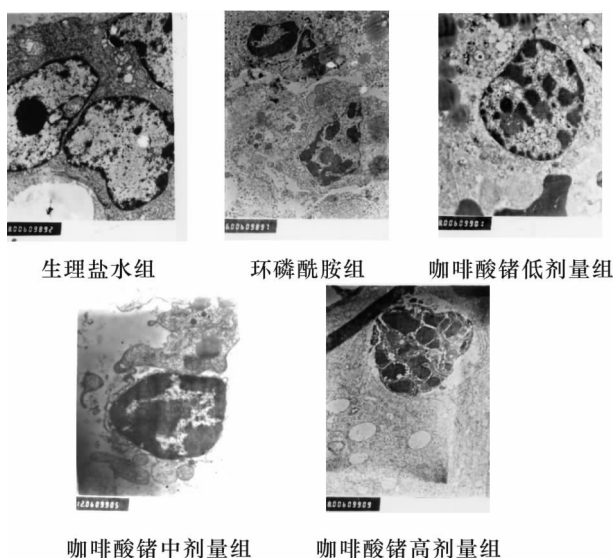


图 1 各组瘤组织透射电镜观察结果

生理盐水组(9892):细胞生长旺盛,呈圆形或多边形,结构清晰;核膜完整,核仁明显,可见多个核仁;内质网发达,核染色质均匀,线粒体丰富。未见典型凋亡细胞。

环磷酰胺组(9897):细胞结构尚存,微绒毛减少或消失;核染色质块状浓集、边聚成块状或条状,线粒体等细胞器结构不清,部分胞质中可见大小不等的空泡及电子致密颗粒。还可见坏死。

咖啡酸锗(低 9901、中 9905、高 9909)组:瘤细胞形态表现相似,程度不等。可见典型的凋亡细胞:细胞核膜凹陷或消失,染色质浓集、边聚于核膜处呈新月状,可见凋亡小体形成。细胞器减少,线粒体受损严重,嵴变低或溶解、消失,部分空泡化。部分细胞胞质内可见电子致密颗粒沉积。

2.2 咖啡酸锗对小鼠肝癌 H22 端粒酶活性的影响

见表 1。

按照试剂盒结果评定分析:从表 1 可见,阴性对照组(生理盐水组)端粒酶浓度值的为阳性,咖啡酸锗作用于 H22 细

胞在一定浓度范围内,随着咖啡酸锗浓度增加,其抑制 H22 细胞端粒酶活性的作用以中剂量最强($P < 0.05$);低剂量在可疑围内,高剂量为阳性,但其抑制端粒酶活性的作用弱于中剂量。

表 1 咖啡酸锗对小鼠
肝癌 H22 细胞端粒酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	TE Index
生理盐水组	90	1.11 ± 0.17
环磷酰胺组	25	0.63 ± 0.11
低剂量组	1	$0.94 \pm 0.04^*$
中剂量组	2	$0.71 \pm 0.07^*$
高剂量组	4	$0.87 \pm 0.09^*$

* P 值 < 0.05 (与生理盐水组比)。

3 讨论

端粒是真核细胞染色体末端的一组重复 DNA 序列,正常情况下,随细胞分裂而缩短,端粒长度被认为是细胞衰老和癌变的一个“有丝分裂时钟”。目前,端粒酶在肿瘤发生过程中的作用已日益被人们所关注。端粒酶能合成端粒,其活性是大多数细胞恶化的共同通路,是目前已知最具有特异性和普遍性的恶性肿瘤标志物^[2]。近年研究发现了多种具有抗癌活性的有机锗化合物,咖啡酸锗^[3]是一种新型的介吗川类有机锗化合物。实验研究表明其对小鼠 U14 官颈癌肿瘤有明显的抑制作用。且毒性很小。本实验研究发现其也能降低小鼠肝癌 H22 细胞的端粒酶活性。与此同时,本实验还发现,咖啡酸锗诱导了 H22 细胞的凋亡。凋亡在肿瘤的发生发展过程中主要起调控作用,可阻遏肿瘤细胞迅速生长^[4],电镜观察超微结构是确定细胞凋亡最可靠的方法之一^[5],所以本实验通过电镜观察发现,咖啡酸锗能明显诱导肿瘤细胞凋亡,减少肿瘤细胞的增殖活性,从而抑制肿瘤生长及浸润。另外,咖啡酸锗各组部分瘤细胞的线粒体畸形或空泡化、内质网减少、核糖体减少或消失,以及电子致密颗粒的沉积,推测咖啡酸锗可能通过影响瘤细胞的线粒体能量及核糖体的合成,而抑制瘤细胞生长。但是咖啡酸锗降低端粒酶活性和诱导凋亡的相互关系,有待进一步深入的研究^[6]。本实验结果提示咖啡酸锗抗肿瘤的作用机制至少包括了其抑制端粒酶活性和诱导凋亡两个方面。

参考文献

- [1]程鹏,彭志刚,杨杰,等. 芒果甙对白血病 K562 细胞端粒酶活性和凋亡的影响[J]. 中药材,2007,30(3):6-10.
- [2]Schiff PB, Fang J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol[J]. Nature,1979,277(5698):665-667.
- [3]叶连宝,陈晓冬,王琴,等. 咖啡酸锗对小鼠移植瘤 U14 的抑制作用[J]. 江西中医学院学报,2005,17(5):53.
- [4]Waxman DJ, Schwartz PS. Harnessing apoptosis for improved anti-cancer gene therapy[J]. Cancer Res,2003,63(24):8563-8572.
- [5]Negoescu A, Guilmet C, Lorimier P, et al. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity[J]. Biomed Pharmacother,1998,52(6):252-259.
- [6]何松,左国庆,张燕,等. 顺铂、氧化苦参碱对肝癌 QGY 细胞生长及端粒酶活性的影响[J]. 重庆医科大学学报,2006,31(5):677-680.

(收稿日期:2008-12-10)