

· 实验研究 ·

克癌 7851 对小鼠 HepA 肝癌细胞 DNA 及细胞周期影响的流式细胞光度分析

迟永春* 周 舒 万 方 徐 梅 辛育龄
(临床医学研究所生理病理生理室 胸外科)

摘要 取灌喂克癌 7851 (160 mg/kg) 20d 的荷 HepA 肝癌小鼠的腹水癌细胞进行细胞生物学特性的研究, 把经过一系列处理和荧光染色的癌细胞在 FACS 420 型流式细胞光度计上进行分析。结果表明: ①克癌 7851 可使癌细胞的 DNA 含量明显下降 (从 151.7 ± 1.2 降至 133.5 ± 4.4 AU 或从 157.0 ± 1.7 降至 146.0 ± 3.0 AU); ②DNA 指数 (DI 值) 和增殖指数 (PI 值) 亦明显下降 ($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$); ③可使癌细胞的 G1 期细胞数明显增加, 从 $43.2 \pm 4.5\%$ 增加到 $78.3 \pm 5.5\%$, 而 S 期和 G2M 期的细胞数明显减少, 而且 DNA 组方图的多倍体峰变得低平。提示克癌 7851 可以抑制癌细胞的 DNA 合成。

关键词 HepA 腹水癌细胞 DNA 指数 增殖指数 细胞周期 克癌 7851

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF THE EFFECTS OF AC7851 ON DNA AND CELL CYCLE OF HEPA LIVER CANCER CELLS

Chi Yongchun, Zhou Shu, Wan Fang, et al

1993, 7(1): 1

(Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Clinical Medical Sciences)

Abstract: By flow cytometric analysis, cell biological properties of the cancer cells from BALB/c mice with ascites were studied. The results showed that: ①In AC 7851 treated group, the DNA content of the cancer cells decreased about 20 AU, i. e. from 151.7 ± 1.2 AU to 133.5 ± 4.4 AU or from 157.0 ± 1.7 to 146.0 ± 3.0 ; ②DNA index (DI) and proliferation index (PI) also decreased obviously ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively); ③The number of cancer cells of G1 phase increased from $43.2 \pm 4.5\%$ to $78.3 \pm 5.5\%$, and that of the cells in S and G2M phases decreased. The polyploid peaks of the DNA histogram of the cancer cells in AC 7851 group became lower and flat, which suggested that AC 7851 could inhibit the DNA synthesis of the cancer cells.

Key words: hepA ascites cells; DNA content; DI value; PI value; cell cycle; AC 7851

以铜、铁微量元素为主的克癌 7851 具有较强的抗癌作用, 它不仅表现在对肿瘤有较高的抑瘤率, 延长荷瘤动物的活存时间, 而且表现

在能降低癌细胞的分裂指数, 使癌细胞的 DNA 含量下降 (MPV₃ 细胞光度计测定)。^[1] 为了进一步探讨克癌 7851 对癌细胞生物学特性的影

* 男, 49 岁, 副研究员

响,我们用流式细胞光度计对服用克癌 7851 小鼠的腹水癌细胞进行了分析研究。

1 材料与方法

1.1 腹水癌动物模型

BALB/C 小鼠,雄性,18~22 g,腹腔接种 1×10^6 /只 (5×10^6 /ml, 0.2 ml) 的 HepA 小鼠肝癌细胞,7~10d 后出现腹水。

1.2 给药方法及剂量

克癌 7851 (含铜盐和铁盐,铜元素与铁元素之比为 1:5),配成 16 mg/ml 之浓度,每只体重 20 g 的小鼠 1 次灌喂 0.2 ml (相当于 160 mg/kg 体重)。从接种肿瘤细胞后次日开始,1 次/d,连续喂药 20d。取腹水,进行流式光度计测定前的细胞处理。

1.3 腹水癌细胞的流式细胞光度分析

分别取对照组动物和给药组动物的腹水癌细胞,用 pH 7.4 之磷酸盐缓冲液洗 3 次,每次洗后离心 10 min (1000 r/min),4℃ 下用 70% 乙醇固定,细胞浓度为 1×10^6 /ml,于 2 周内测定。测定前再用 pH 7.4 PBS 洗 2 次,1 mg/ml RNA 酶处理 (37℃ 下 30 min),碘化丙啶 (PI) 染色 30 min 以上 (PI 最终浓度为 5 μ g/ml),200 目尼龙网过滤, FACS 420 型流式细胞光度计测定 (10^4 个细胞/S),给出 DNA 含量、DNA 散点图和组方图、G 1、S 和 G 2M 期的峰道值以及细胞周期值。^[2,3]

2 结果

2.1 铜、铁盐制剂对癌细胞 DNA 含量的影响

2 批实验的结果基本一致 (表 1),表明 HepA 小鼠肝癌细胞在该制剂作用下,癌细胞的

表 1 铜、铁盐制剂对小鼠肝癌 (HepA) 细胞 DNA 含量的影响

批次	样品数	癌细胞 DNA 含量 AU ($\bar{x} \pm s$)		t 检验
		对照组	给药组	
1	5	151.72 $\pm$ 1.16	133.47 $\pm$ 4.38	$p < 0.01$
2	5	157.00 $\pm$ 1.73	146.00 $\pm$ 3.00	$p < 0.01$

DNA 含量明显下降。

2.2 用药后癌细胞的 DNA 指数和增殖指数变化

表 2 显示,癌细胞的 DNA 指数 (DI 值) 和增殖指数 (PI 值) 均有不同程度的下降,DI 和 PI 值分别代表如下含意:

DI 值 = $\frac{\text{癌细胞的 G 1 期峰道值}}{\text{正常细胞 G 1 期峰道值}}$ (代表细胞的倍数)

PI 值 = S 期值 + G 2M 期值之和 (代表细胞增殖能力)

2.3 铜、铁盐制剂对癌细胞周期的影响

铜、铁盐制剂作用下,S 和 G 2M 期的癌细胞数量明显减少 (表 3),而 G 1 期的癌细胞数量明显增加,表明铜、铁元素对癌细胞的抑制作用主要在 S 期之前 (附图)。

3 讨论

克 7851 具有明显的抗癌作用已有报道。^[1]

其抗癌作用的机理尚未得到实验证明。我们从癌细胞的某些生物学特征着手,研究癌细胞的增殖分裂能力、DNA 含量乃至细胞周期等的变化。经流式细胞光度计分析研究证明,正常二倍体细胞 (淋巴细胞) 为单一峰的组方图,而小鼠肝癌细胞 (HepA) 为多峰组方图,多倍体细胞占 81.5%。给铜、铁盐制剂后,尽管癌细胞的 DNA 组方图仍以多倍体为主,但多倍体数

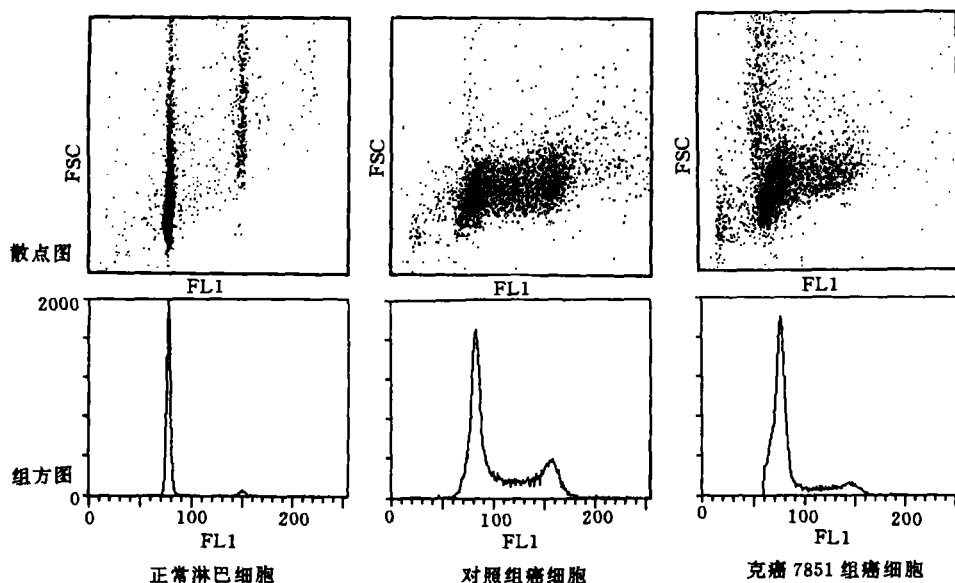
表 2 铜、铁盐制剂对小鼠肝癌细胞 DI 值

	和 PI 值的影响		$n=5$ $\bar{x} \pm s$
	对照组	给药组	
DI 值	1.11 $\pm$ 0.02	1.07 $\pm$ 0.03	$p < 0.05$
PI 值	239.0 $\pm$ 1.7	222.0 $\pm$ 3.0	$p < 0.01$

表 3 铜、铁盐制剂对小鼠肝癌 (HepA)

细胞周期的影响 $n=5$ $\bar{x} \pm s$

细胞周期	细胞比率 %		t 检验
	对照组	给药组	
G 1	43.2 $\pm$ 4.5	78.3 $\pm$ 5.5	$p < 0.01$
S	33.8 $\pm$ 7.5	14.3 $\pm$ 7.5	$P < 0.05$
G 2M	23.5 $\pm$ 7.1	7.0 $\pm$ 2.6	$p < 0.01$



附图 克癌 7851 作用下的小鼠肝癌细胞 (HePA) 的流式细胞光度分析

已减少到 48.1%。由于癌细胞 DNA 含量及倍体多少代表癌细胞的恶性程度^[3~7], 本研究应用的小鼠肝癌细胞是典型的异倍体、多倍体细胞, 具有一定的恶性度。在铜、铁盐制剂作用下, 其倍体有所减少, DNA 指数明显下降, 细胞增殖指数也明显降低。从而表明, 铜、铁制剂有削弱癌细胞的恶性程度的作用。

进一步分析研究发现, 铜、铁盐制剂对小鼠肝癌细胞周期有明显影响, 细胞周期的变化表现在 G1 期的细胞数量明显增加 (对照组为 $43.2 \pm 4.5\%$, 而给药组则增加到 $78.3 \pm 5.5\%$, $p < 0.01$), 而 S 期的细胞以及 G2 期细胞明显减少 (对照组的 S 期值为 $33.8 \pm 7.5\%$, 给药组为 $14.3 \pm 5.8\%$; 对照组 G2M 期值为 $14.3 \pm 5.8\%$, 给药组为 $7.0 \pm 2.6\%$, 均有统计学意义。由此可见, 铜、铁盐制剂不仅可降低癌细胞的 DNA 含量, 而且可以改变癌细胞的细胞周期, 将癌细胞阻断在 S 期之前, 也就是把癌细胞抑制在 DNA 合成期之前。故认为该制剂抑制了癌细胞的 DNA 合成, 阻断了癌细胞 DNA 分子链的复制, 抑制癌细胞的增殖分裂。

总之, 本文得到的几项关于癌细胞的生物学特性的分析结果, 初步地阐述了以铜、铁盐为主的克癌 7851 的抗癌作用的机理。

4 参考文献

- 1 周舒, 迟永春, 杜皓萍, 等. 克癌 7851 抗癌作用的实验研究. 中日友好医院学报, 1991, 5 (1): 37
- 2 Tafuri A, Meyers J, Lee B, et al. DNA and RNA flow cytometric study in multiple myeloma. Cancer, 1991, 67 (2): 449
- 3 Rua S, Comino A, Fruttero A, et al. Relationship between histologic features, DNA flow cytometry and clinical behavior of squamous cell carcinomas of the larynx. Cancer, 1991, 67 (1): 141
- 4 Bourhis J, Devathaire F, Wilson GD, et al. Combined analysis of DNA ploidy index and N-myc genomic content in neuroblastoma. Cancer Res, 1991, 51 (1): 33
- 5 Fossa SD, Nesland JM, Waehre H, et al. DNA ploidy in the primary tumor from patients with non seminomatous testicular germ cell tumors clinical stage I. Cancer, 1991, 67 (7): 1874
- 6 Chi Yongchun and Liu Zonghou. Microspectrophotometric measurements of DNA contents in cells of rat thyroid carcinoma. Chinese Medical Journal, 1985, 98 (1): 595
- 7 Cuvelier CA & Roels Hi. Cytophotometric studies of the nuclear DNA content in cartilagenous tumors. Cancer, 1979, 44: 1363

(1991-10-15 收稿 1991-12-29 修回)