

细胞 CT 技术分析抗癌宝 II 号抗肿瘤作用的实验研究

谢锦玉 刘铭福 胡庆和 王玉萍 李 岩 沈联慈

内容提要 细胞激光扫描断层(CT)技术系借助于现代先进的激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)来实现的。研究了本室系列抗癌中药之一的抗癌宝 II 号对小鼠腹水癌细胞的作用。以细胞 CT、光切 0.6μ 、三维重组、立体旋转和 DNA 荧光强度分布图像进行分析, 结果发现抗癌宝 II 号使癌细胞核 DNA 荧光物质凝聚、裂解, 分布图呈切齿状, 荧光强度明显减弱, 与未用药的对照组有明显区别; 并发现分裂期的染色体碎裂。这种关于单细胞 CT 技术, 能达到荧光显微镜、流式细胞仪、电子显微镜所达不到的效果, 因此使中药抗癌机理的研究提高到一个新的水平。

关键词 激光扫描断层 抗癌宝 II 号 癌细胞

Experimental Study on Effect of Kang Ai-bao II to Cancer Cells with Cell CT Analysis in Mice
Xie Jin-yu, Liu Ming-fu, Hu Qing-he, et al *Inst. of Basic Theory of TCM, China Academy of TCM, Beijing (100700)*

The result of the experiment indicated that Kang Ai-bao II (抗癌宝 II) had a destructive effect on DNA and RNA of cancer cells. Our study provided the basis for the clinical practice. The effect of Kang Ai-bao II on U14 cancer cell in C57 BL mice was investigated with confocal laser scanning microscopy.

Key words laser scanning tomography, Kang Ai-bao II, cancer cell

中药抗癌宝 II 号为本院基础所提取制作的中药制剂, 本室曾对其进行了一系列抗肿瘤作用的实验研究, 发现有较好的效果^(1, 2)。本研究就其对癌细胞作用的进行细胞激光扫描断层分析, 以对 DNA 和 RNA 大分子水平的变化做深层次的研究。

材料和方法

1 材料

1.1 试剂 中药抗癌宝 II 号(大蒜有效成分)1 g 制成 1% 乳剂, 4°C 保存备用, 按 100 mg/kg 腹腔注射, 0.2 ml/只·d; 对照组用等量无菌生理盐水腹腔注射。RNA 酶、碘化丙啶(PI), 吖啶橙(AO)均为 Sigma 公司产品。

1.2 动物 雄性 C₅₇BL/6 J 纯系小鼠共 42 只, 体重 18~20 g, 购于中国医学科学院动物中心。

1.3 癌细胞 由本院中药所提供 U₁₄ 腹水宫颈瘤种鼠, 于对数增生期取癌细胞接种于实验动物。

2 实验方法 42 只小鼠, 腹腔接种癌细胞 $4\times$

10^6 /只, 第 3 天随机分为 3 组: 对照组和抗癌宝 II 号组。抗癌宝 II 号组在腹腔注射用药 1 次后 3、6、12 h 和每日用药、连续 3 日用药、停药后 9、12、24、48 h 分别与对照组同步取材并重复 2 次。各组动物常规断头处死, 获取腹水, 按本技术的特殊要求, 充分洗涤癌细胞, 经 RNA 酶消化、PI 荧光染色显示 DNA; 同时另用 AO 荧光染色显示 DNA 和 RNA。所制标本置激光扫描共聚焦显微镜(美国 Meridian 公司 1992 年产品)观察, 激光输出谱线 488 nm 蓝光, 输出功率 5 mW, 于 Z 轴方向行 0.6μ 步进光切片, 对细胞进行断层扫描, 用特殊专业图像板进行图像处理, IQ 软件三维立体重组。其中 PI 染色荧光通过 585/20 带通滤光片, AO 双染, 绿色荧光通过 530/30、红色荧光通过 583/20 带通滤光片探测。

结 果

1 对照组 各时相癌细胞圆形, 无缺损或破坏, DNA 和 RNA 荧光强度分布完整无损。PI 荧光染色, 细胞核为 54 个光切面, 荧光由小→大→小, 每

一光切面图像的不同颜色代表不同荧光强度的DNA, 由桔黄色、浅黄色至蓝色, 示DNA荧光强度由强渐至弱(图1)。三维立体重组显示DNA荧光强度分布的立体图像, 形似蛋糕, 顶部的强荧光相当于核中央, 底部的弱荧光相当于核周边, 由橙红、黄、浅青紫、蓝色示DNA荧光强度由强至弱, 且有颜色标尺显示荧光强度变化(图5)。三维立体重组旋转动态观察, 沿癌细胞长轴作顺时针旋转15、30、45、60、75、90、105、120度, 细胞由扁圆渐至圆形, 未见缺损或破坏(图3)。AO荧光染色的光切片, 显示核内DNA为黄色, 胞质内RNA为红色荧光,

均未见异常变化(图7)。2 抗癌宝II号组 PI 荧光染色, 细胞核CT有54个光切片的放大画面, 显示核畸形, DNA黄色荧光减弱, 分布不均, 出现缺损、断裂、凝聚现象(图2)。三维立体重组, 也显示核畸形的立体像, 与对照组对比看出DNA明显的缺损(图4)。三维立体DNA荧光强度分布图呈距齿状(图6)。AO荧光染色各时相的三维立体重组, 旋转20、40、60、68、100、120度, 均见癌细胞不完整, 核畸形, DNA凝聚、断裂、缺损, RNA亦被破坏断裂(图8)。1次或3次用药的各时相结果相似, 直至停药后48h仍

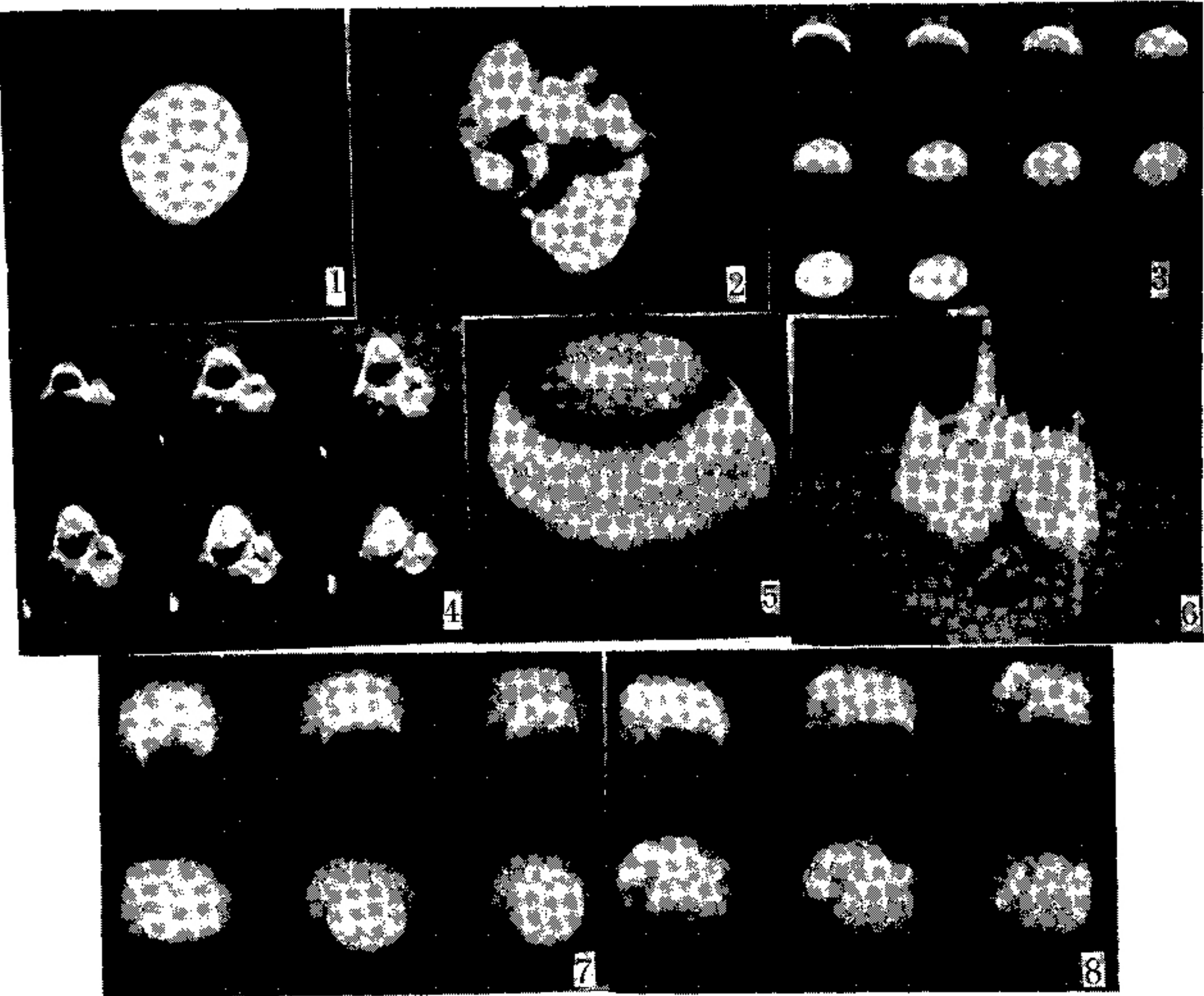


图1 对照组C₅₇BL小鼠, U₁₄腹水瘤细胞CT 54个光切片, 核为圆形, 完整无缺。PI染色, CLSM×1000 图2 抗癌宝II号组, 与图1条件一致, 核畸形, DNA分布不均, 凝聚、断裂 图3 C₅₇BL小鼠, U₁₄腹水瘤细胞CT, 三维重组立体旋转15、30、46、60、75、90、105及120度, 细胞核圆形, 完整。PI染色, CLSM×1000 图4 抗癌宝II号组, 与图3条件一致, 见核碎裂立体像 图5 对照组, 癌细胞CT后三维重组显示核DNA立体荧光强度分布图呈完整“蛋糕形”。×1000 图6 抗癌宝II号组, 与图5条件一致, 核被破坏, 呈距齿状, DNA物质断裂、缺损 图7 对照组 癌细胞CT, 细胞完整, 黄绿色荧光显示DNA, 桔红色荧光为胞质的RNA, 三维重组立体旋转。×1000 图8 抗癌宝II号组 与图7条件一致, 核DNA物质断裂、凝聚、RNA也被破坏

可见细胞的破坏。

讨 论

激光扫描共焦聚显微镜,集多种高精尖细胞分析及工程技术为一体,以每秒120张画面的高速扫描激光共焦观察,无时差间断,提供即时的激光共焦原色影像,利用点或狭缝对细胞断层扫描,再多层迭加影像推进到真正的平面影像水平(似临床放射诊断学的CT技术),不但能揭示细胞内的结构和细胞外表长度、厚度、断层面积、细胞体积等的参数,还给人以三维立体概念,通过计算机,旋转被测细胞,即可随意看到细胞各个侧面的形态。还可研究活细胞和定量分析细胞内的遗传物质DNA、RNA,细胞器酶的定量,细胞内各种荧光标记物包括分子或离子的浓度及其分布;并能以其微型激光光子刀对细胞进行筛选、分离、克隆和各种细胞及染色体的显微切割手术,分析细胞间的通讯,测定膜流动及膜电位变化,高分子物质的扩散、通透及相互作用和受体的移动等功能^(3~5)。

本研究仅用核仪器的部分新技术,分析了抗癌宝II号的抗癌作用,实验观察到破坏的癌细胞DNA、

RNA和染色体断裂,提示它破坏了癌细胞的信息传递和蛋白质的合成,直接影响了癌细胞的繁殖和生存,而起到抗癌作用。因此,该新技术为中医中药在临床诊断、治疗的对比研究,开辟了新的途径。

参 考 文 献

1. 谢锦玉,高玉民,宁 干. 定量细胞化学分析大蒜油抗癌的作用. 中国组织化学与细胞化学杂志 1993; 2(1): 1.
2. 谢锦玉,高玉民,沈联慈. 流式细胞术分析大蒜油对癌细胞DNA合成及细胞周期的影响. 中国中西医结合杂志 1992; 12(2): 92.
3. Powell KL. Characterization of subsurface damage in Ceramic-matrix composites by confocal scanning laser microscopy. Journal of Microscopy 1993; 109: 189.
4. Beak JPA, Makkink-Nombrabo, S Takola. P Quantitative microscopical and confocal laser scanning microscopy for intermediate endpoint biomarkers in breast cancer. J Cell Biochem 1993; 53 Suppl 176: 78.
5. Brakenhoff G J. Van der Voot HTM, Spronsen EAV. Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. Nature 1985; 317: 748.

(收稿: 1994-08-15 修回: 1994-12-10)

第二届全国中医药信息研讨会征文通知

全国中医药图书情报工作委员会、中国中医研究院中医药信息研究所、《中国中医药信息杂志》社及国家中医药管理局中医药文献检索中心拟定于1995年9月23~28日在北京联合召开第二届全国中医药信息研讨会,以便及时掌握国内外中医中药发展动向,交流信息,寻求对策,以促进中医药事业的发展。

1 征文内容

1.1 国际中医中药信息 包括世界各地及港澳地区的有关中医中药、传统养生保健等的研究现状与展望,有关中医中药的药事法规,中医医疗保健品贸易应注意的问题及对策等,国外中医药产品的生产、应用及销售情况等。

1.2 国内中医中药信息 (1)中药新药研究开发的思路与方法、中药新药及保健品的市场调研与评价、中药资源的开发与利用,有关新药报批过程中存在的问题与解决办法等。(2)中医药治疗临床各科疑难杂证的现状、进展情况与展望,临床实用新疗法的介绍。(3)在市场经济体制下,中医药企事业单位转换内部机制的探索。(4)中医药事业发展的战略研究。(5)中医药戒毒、戒酒和戒烟研究的现状及展望。(6)中医药减肥降脂研究的现状及展望。(7)中医药抗衰老研究的现状及展望。(8)传统及现代性医学研究现状及展望。(9)国家重点中医药课题中标分析。(10)中医药成果及专利产品的开发与利用。(11)中医药新产品及新技术的开发推广。(12)中医药科技文献的现代检索技术及其利用。

2. 征稿要求

来稿必须是未在公开期刊上发表者,字数一般不超过4000字为宜,并提交800字以内的论文摘要,并注明作者姓名、职称及详细联系地址。所有入选论文均将收入大会正式出版的论文汇编——《95,96国内外中医药市场预测与分析》一书,并将择优在《中国中医药信息杂志》发表。截稿日期:1995年8月25日。来稿请寄:北京市东直门内北新仓18号(邮政编码:100700)《中国中医药信息杂志》社,毕俊英收。