

洛铂对人胆管癌 RBE 细胞凋亡显微结构及超微结构的作用观察

王天阳, 吕海涛, 王文斌, 张建生, 刘建华

(河北医科大学第二医院肝胆外科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的** 观察洛铂诱导人胆管癌 RBE 细胞凋亡显微结构及超微结构的变化, 探讨洛铂对诱导胆管癌细胞凋亡作用. **方法** 体外培养 RBE-TCHU179 人胆管癌细胞, 给予不同剂量洛铂处理, 瑞氏-姬姆萨染色及 AO/EB 染色观察细胞形态学和计数细胞凋亡百分率, 扫描电镜和透射电镜观察细胞表面超微结构和细胞内超微结构的变化. **结果** AO/EB 荧光染色观察到洛铂作用 24 h 后, 随洛铂剂量加大, 人胆管癌 RBE 细胞凋亡百分率升高, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用凋亡细胞占 47.8%. 光镜和扫描电镜可见细胞形态学呈现典型的凋亡变化, 可见凋亡小体的形成. 透射电镜可观察到细胞核呈新月状改变. **结论** 洛铂能引起人胆管癌 RBE 细胞凋亡显微结构及超微结构改变, 可能与细胞凋亡和侵袭力有关.

[关键词] 胆管癌; 洛铂; 形态学; 电镜

[中图分类号] R735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 03-0023-05

Effect of Lobaplatin on Apoptosis of Human Cholangiocarcinoma Cells Line RBE: Histochemical and Electron Microscopic Observations

WANG Tian - yang, WANG Wen - bin, LIU Run - tian, ZHANG Jian - sheng, LIU Jian - hua
(Dept. of Hepatobiliary Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050000, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to observe the effect of lobaplatin on human cholangiocarcinoma cells line RBE by histochemical and electron microscopic, for investigating the mechanism of lobaplatin-induced RBE cells apoptosis. **Methods** The RBE cells were cultured in vitro, followed by treating with various concentration of lobaplatin for 24 h. Wright-Giemsa staining and AO/EB staining were used to determine the inhibition rate and microstructure changes. And the ultrastructural changes were studied by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. **Results** AO/EB staining showed that the apoptosis rate of RBE cells increased with increasing dose of lobaplatin. After treatment by 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lobaplatin for 24 h, the apoptotic cells accounted for 47.8%. Light microscopy and scanning electron microscopy showed typical apoptotic changes, and the formation of apoptotic bodies was observed. The nucleus crescent-like change also could be observed by TEM. **Conclusion** Lobaplatin can induce the morphological and ultrastructural changes on RBE cell line, which may be closely related to apoptosis and invasion. The results provide a valuable reference for the further study of lobaplatin antitumor effect.

[Key words] Cholangiocarcinoma; Lobaplatin; Morphology; Electron microscopy

胆管癌仅次于肝细胞癌的第二位肝脏原发性恶性肿瘤^①, 患者生存期短, 预后极差. 现在, 根治

性手术仍然是治愈胆管癌唯一的方法^②. 但是由于胆管癌的发病率低, 现有化疗敏感性低, 至今没有

[基金项目] 河北省卫生厅医学科学研究重点课题计划 (20090095); 河北医科大学第二医院科学研究基金资助项目 (2h1201309)

[作者简介] 王天阳 (1989~), 男, 辽宁沈阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事肝胆外科临床工作.

[通讯作者] 刘建华. E-mail: Email:ljh@medmail.com.cn

统一化疗的方案。洛铂为第三代铂类化疗药物，疗效与顺铂相似，以其抗癌谱广、与顺铂无交叉耐药性，无肾毒性，毒副反应低，良好的水溶性等特点，目前已用于肺癌、乳腺癌、胃癌等的临床治疗。本研究旨在体外观察洛铂诱导胆管癌细胞凋亡显微结构及超微结构的变化，初步讨论洛铂诱导胆管癌细胞凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 材料

胆管癌细胞系 RBE-TCHU179 购自中国科学院上海生命科学研究院。注射用洛铂购自海南长安国际制药有限公司。AO/EB 试剂购自染料购自罗莱宝科技有限公司。胎牛血清购自杭州四季青公司。青霉素和链霉素购自 Solarbio 公司。RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 RBE-TCHU179 胆管癌细胞培养 应用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度环境下培养 RBE-TCHU179 胆管癌细胞。

1.2.2 瑞氏-姬姆萨染色观察细胞形态 将对数期生长的 RBE-TCHU179 胆管癌细胞以 5×10^4 每孔种于底面预置有盖玻片的六孔板中，常规培养 24 h，倒置显微镜观察到细胞贴壁良好并对数期增值。吸尽原培养基，分别加入 2.5、5、10、25 $\mu\text{g/mL}$ 洛铂 1640 溶液或等体积的 1640 培养基，培养 24 h。去除培养基，用温生理盐水轻轻润洗 3 次后，瑞氏-姬姆萨染料固定 3 min，加入等量的蒸馏水染色 7 min 后，立即在油镜下观察并拍照。

1.2.3 AO/EB 染色法观察细胞凋亡 RBE-TCHU179 胆管癌细胞以同样的方式处理后，去除培养基，用温生理盐水轻轻润洗 3 次后，盖在滴有 50 mL 的 AO/EB 染液的载玻片上，37 °C 避光染色 1 min 后，立即在荧光显微镜下观察并拍照，激发波长为 510 nm。

1.2.4 扫描电镜观察细胞膜超微结构变化 取对数生长期的 RBE-TCHU179 胆管癌细胞，胰酶消化后制成细胞悬液，用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ ，以每孔 2 mL 细胞悬液加入到预置有盖玻片的六孔板中，待 24 h 细胞贴壁并进入对数期生长后，弃去原培养基并用不含血清的 RPMI1640 洗涤，分别加入 25、10 $\mu\text{g/mL}$ 洛铂，对照组加入等体积的 RPMI1640 培养基，作用 12 h。PBS 液冲洗，1% 戊二醛固定 5

min，PBS 冲洗 3 遍，50%、70%、80%、90%、无水乙醇逐级脱水各 5 min，其中无水乙醇脱水 2 遍，固定于铜标本台上后，临界点真空干燥。镀金（离子镀膜仪 IB-3）后于扫描电子显微镜（日立 S-3500N）观察

1.2.5 透射电镜观察细胞超微结构变化 RBE-TCHU179 胆管癌细胞传代接种于 25 mL 培养瓶中正常培养 24 h，待进入对数生长期后弃去原培养基，加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 洛铂干预 12 h，阴性对照组加入 RPMI1640 完全培养液。将处理后的细胞用胰酶消化，后 1 500 rpm/min 离心 10 min，弃去上清，用 PBS 洗涤，重复洗涤 2 遍。细胞团块用 2.5% 戊二醛 4 °C 固定 24 h，洗去戊二醛后 1% 二酸固定 2 h，PBS 洗涤后丙酮梯度脱水，环氧丙烷置换，环氧树脂包埋并在 70 °C 聚合 8 h。超薄切片后经过醋酸双氧铀-枸橼酸铅染色，透射电镜观察。

2 结果

2.1 洛铂诱导胆管癌细胞凋亡作用

AO/EB 染色荧光显微镜下观测细胞凋亡结果显示：阴性对照组细胞均显现绿色荧光；洛铂作用于 RBE 细胞 24 h 后，5 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时，细胞大部分显现绿色荧光，散在分布橙色荧光的凋亡细胞。10、25 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时，随剂量升高橙色荧光细胞中呈簇出现并在视野中所占比例升高。25 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时，视野中橙色细胞占 47.8% (IC95:43.1% ~ 52.5%)，明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$)，见图 1。

2.2 洛铂对 RBE-TCHU179 胆管癌细胞结构的影响

瑞氏-姬姆萨染色和 AO/EB 染色观察细胞结构变化结果显示：瑞氏-姬姆萨染色阴性对照细胞细胞质均匀，细胞核呈紫红色，细胞形态不规则、多边形、边界清晰，有长丝状突起，胞浆丰富，核大、圆，核膜清晰，染色质分布均匀，核仁明显，可见核分裂象；AO/EB 染色阴性对照细胞胞浆中绿色荧光呈均匀分布，核膜清晰明显；5 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时，瑞氏-姬姆萨染色细胞变圆，胞膜皱缩丝状突起减少，胞质明显减少，核膜增厚皱缩，染色质团块状、边聚，核仁边界不清，AO/EB 染色细胞偶见胞核橙色荧光显现；10、25 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时，瑞氏-姬姆萨染色细胞圆形，包膜泡状突起增多，突起内可见染色质，胞浆进一步减少，AO/EB 染色橙色荧光细胞数目增多，核膜进一步皱缩，染色质团块状、边聚，并分成大小不一的团块，偶见裸核的坏死细胞见图 2、图 3。

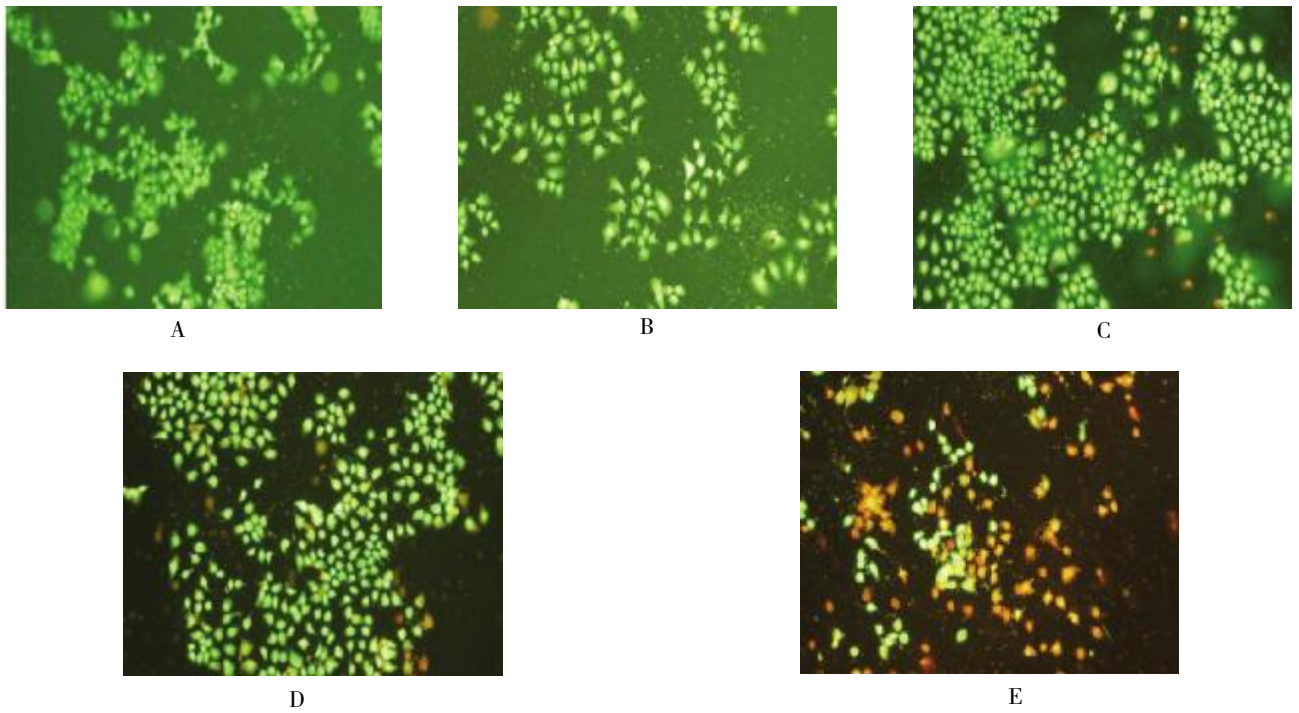


图 1 洛铂诱导 RBE 胆管癌细胞凋亡影响 (AO/EB 荧光染色 100×)

Fig. 1 Apoptosis effect of lobaplatin on human cholangiocarcinoma RBE cells treated by different concentrations (AO/EB, 100×)

A:阴性对照; B:2.5 μg/mL ; C:5 μg/mL; D:10 μg/mL; E:25 μg/mL.

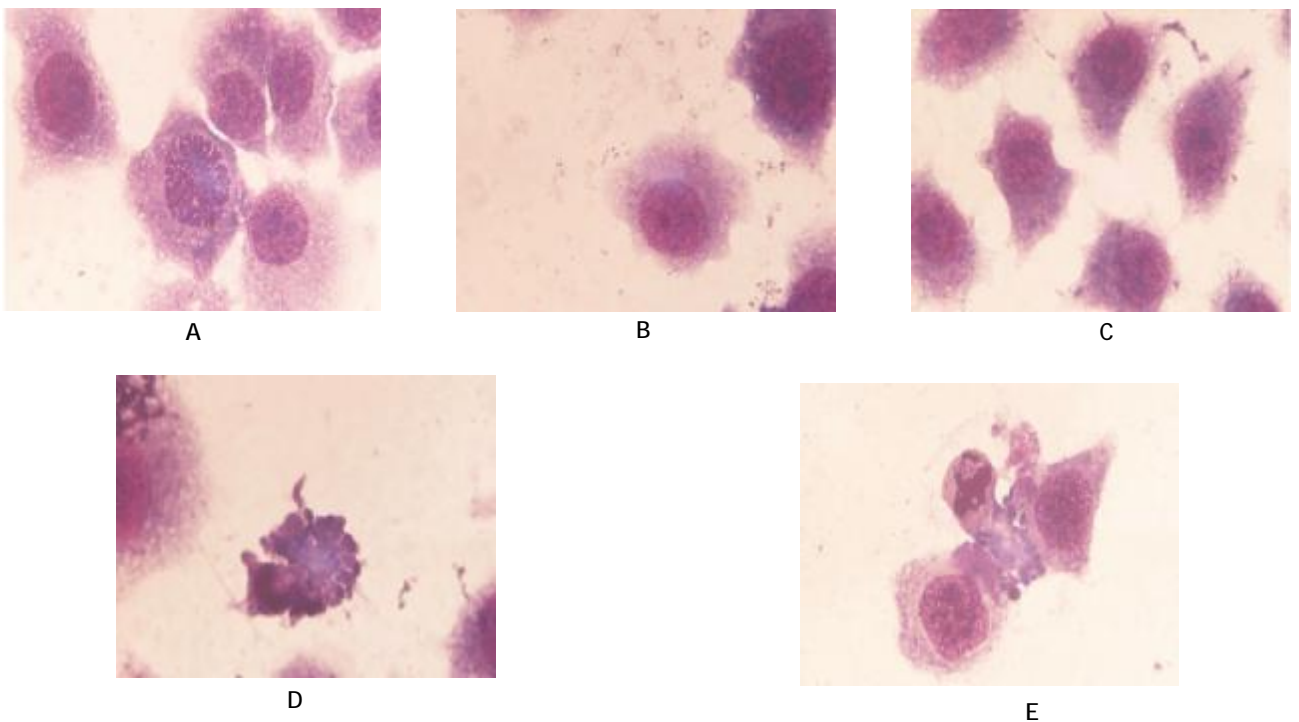


图 2 不同浓度洛铂对 RBE-TCHU179 胆管癌细胞结构的影响 (瑞氏 - 姬姆萨染色 1 000×)

Fig. 2 Morphology changes of human cholangiocarcinoma RBE cells exposed by various concentrations of lobaplatin (Wright-Giemsa staining 1 000×)

A:阴性对照; B:2.5 μg/mL ; C:5 μg/mL; D:10 μg/mL; E:25 μg/mL.

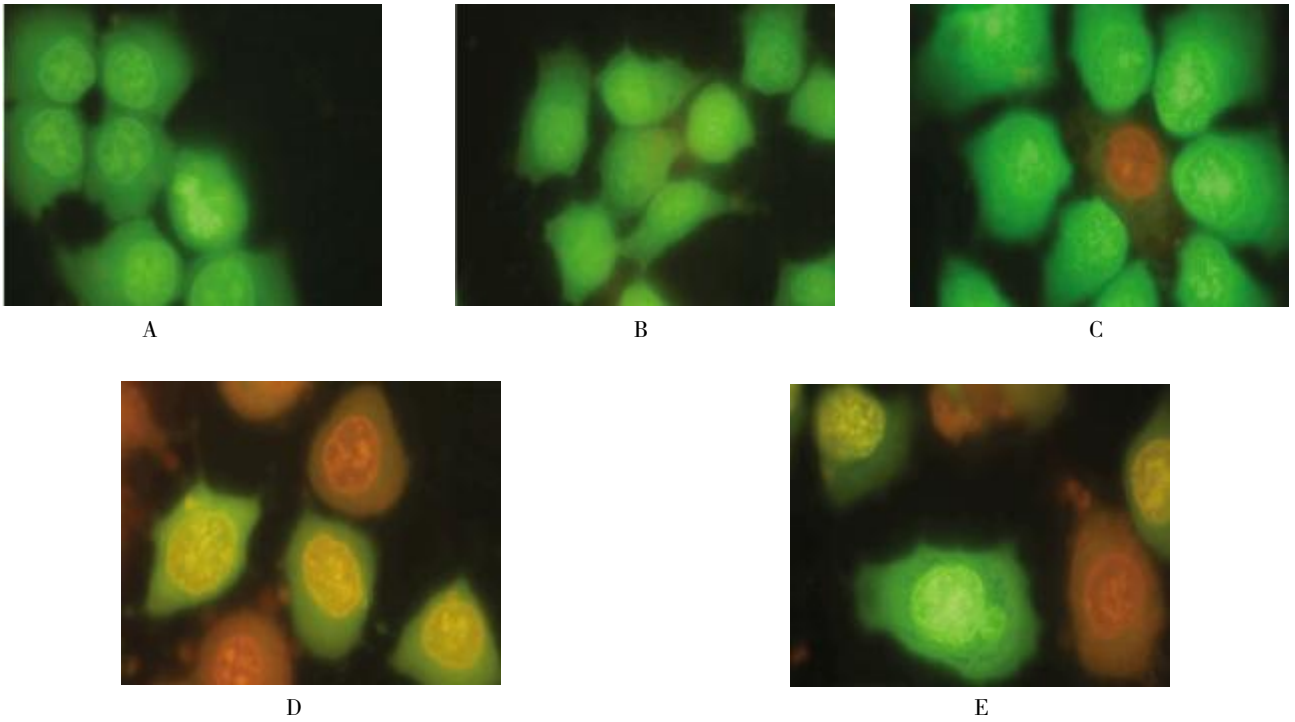


图 3 不同浓度洛铂对 RBE 胆管癌细胞结构的影响 (AO/EB 荧光染色 $1\ 000\times 24\text{ h}$)

Fig. 3 Morphology changes of human cholangiocarcinoma RBE cells exposed by various concentrations of lobaplatin (AO/EB, $1\ 000\times 24\text{ h}$)

A:阴性对照; B:2.5 $\mu\text{g/mL}$; C:5 $\mu\text{g/mL}$; D:10 $\mu\text{g/mL}$; E:25 $\mu\text{g/mL}$.

2.3 洛铂诱导 RBE-TCHU179 胆管癌细胞超微结构变化

扫描电镜观察洛铂诱导胆管癌细胞超微结构变化: 阴性对照细胞多边形, 包膜完整, 四周有数个细长光滑突起, 细胞表面不平, 体部包膜形成皱褶样和微绒毛结构, 细胞间可见连接 (图 4

A) . 10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时, 细胞表面微绒毛消失, 突起变细断裂, 表面卷曲、畸形, 小球样结构出现 (图 4B) . 25 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时, 细胞体积明显缩小, 表面微绒毛和突起完全消失, 形成大量有完整包膜小泡样结构, 呈大小不一凋亡小体样结构 (图 4C) .

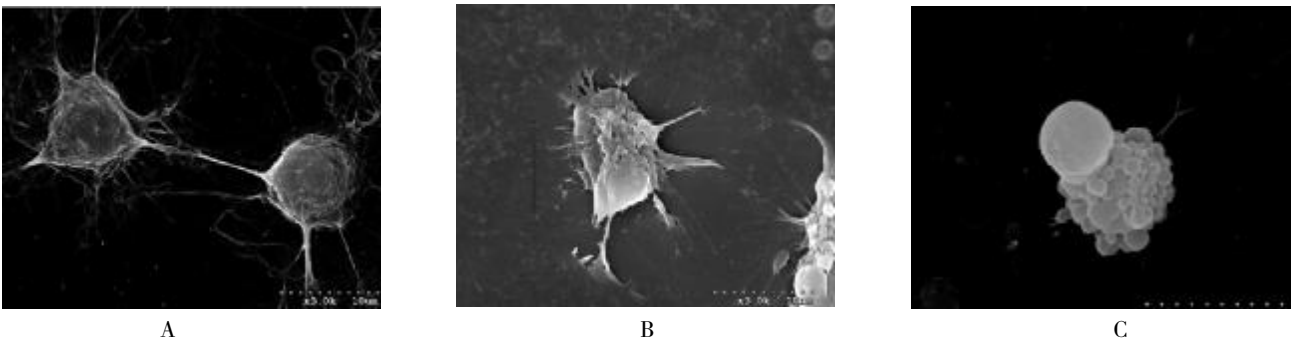


图 4 洛铂诱导 RBE-TCHU179 胆管癌细胞超微结构变化 (扫描电镜)

Fig. 4 Ultrastructural changes of RBE cholangiocarcinoma cells induced by lobaplatin (electron microscopy)

A:阴性对照 (3.0 K \times); B:10 $\mu\text{g/mL}$ (3.0 K \times); C:25 $\mu\text{g/mL}$ (4.5K \times) .

透射电镜观察观察洛铂诱导胆管癌细胞超微结构变化: 阴性对照细胞表面可见微绒毛突起, 胞浆丰富, 可见线粒体、粗面内质网、游离核糖体, 核大, 核膜光滑, 染色质均匀, 可见大而明显的核仁(图 5A)。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量时, 细胞表面微绒毛消失, 胞质减少, 核染色质浓缩, 电子密度增加, 边集与核膜下, 薄厚不均。亦可见部分包膜向外球形

膨出, 胞质中出现空泡(图 5B)。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量时, 细胞皱缩, 表面微绒毛消失, 胞质出现空泡, 出现同心圆样结构的髓样体, 细胞核中染色质浓缩, 体积缩小, 电子密度增加, 边集于核边呈新月形, 并脱落于胞质中, 形成双层膜的凋亡小体(图 5C)。

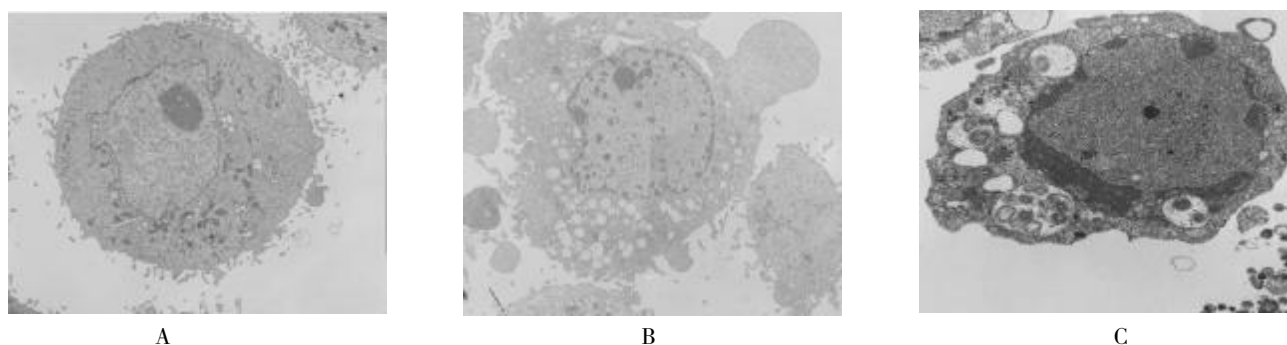


图 5 洛铂诱导 RBE-TCHU179 胆管癌细胞超微结构变化(透射电镜)

Fig. 5 RBE cholangiocarcinoma cells ultrastructural changes induced by lobaplatin (electron microscopy)

A: 正常对照 (3.5 K \times); B: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4.0 K \times); C: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3.0 K \times) .

3 讨论

研究表明正常癌细胞可被 AO 染色呈绿色荧光, 早期凋亡细胞因染色质浓缩致密, 并被切割成片段而呈现边聚等变化, 晚期凋亡细胞并且因为包膜受损被 EB 染色而呈现橙色荧光。吖啶橙(acridine orange, AO) / 溴乙锭(ethidium bromide, EB) 双荧光染色为一种检验细胞凋亡的染色方法。AO/EB 染色计数凋亡细胞所占的比例结果显示 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洛铂凋亡细胞占总数的 47.8%, 提示洛铂可以诱导 RBE-TCHU179 胆管癌细胞凋亡, 这可能是洛铂抑制胆管癌 RBE 细胞增殖的作用机制。此外, 瑞氏-姬姆萨染色是简便、快捷的细胞染色方法, 能够反映出细胞总体上的变化趋势。通过油镜对两种染色的观察发现, 洛铂能引起细胞核、细胞质、细胞膜典型的细胞凋亡特征性变化, 染色质浓缩边聚, 细胞核浓缩断裂、并可见凋亡小体^[3]。

扫描电镜观察发现经洛铂作用后的胆管癌 RBE 细胞呈典型的凋亡形态学变化, 泡状的凋亡小体出现。笔者观察到即使在高浓度洛铂干预下, 细胞的膜结构依然保持相对的完整。膜结构的完整, 可以减少炎症反应的发生。肿瘤细胞中, 细胞运动的主要手段是依赖肌动蛋白正确组装而形成的伪足^[4,5]。细胞变圆, 细胞伪足突起消失, 使

细胞失去转移的微观结构, 癌细胞的侵袭会被抑制^[6]。

透射电镜观察发现: 胆管癌细胞成典型的肿瘤细胞形态学结构, 核大, 核仁增多, 膜表面出现微绒毛等结构; 洛铂作用后的胆管癌 RBE 细胞呈典型的凋亡形态学变化, 微绒毛消失, 胞质浓缩, 染色质固缩边聚, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洛铂可见半月形形成, 呈典型早期凋亡染色质损伤的变化。前期实验证实洛铂诱导胆管癌 RBE 细胞凋亡可能是通过影响胆管癌 RBE 细胞 bax/bcl-2 通路, 释放细胞色素 C 到胞质中, 激活 Caspase-3 级联反应, 实现细胞凋亡^[6]。洛铂诱导胆管癌 RBE 细胞凋亡确切机制有待进一步阐明。

实验中笔者还观察到胞质中的空泡样改变。这种空泡样和髓样结构很有可能来自于肿胀的线粒体, 具体机制还有待进一步实验证明。

综上所述, 洛铂可以引起胆管癌 RBE 细胞显微和超微结构改变, 这些改变与细胞凋亡和侵袭力有着密切的关系, 为进一步研究洛铂的抗肿瘤作用提供了有价值的参考。

[参考文献]

[1] FRIMAN S. Cholangiocarcinoma—current treatment options

(下转第 35 页)

- [4] KIONKE J, GRUNDMANN T, BULLMANN C, et al. Multiple hemangiomas, polyposis coli, endometrial and papillary thyroid cancer [J]. *Internist (Berl)*, 2012, 53(5):625 - 629.
- [5] GU F, PFEIFFER R M, BHATTACHARJEE S, et al. Common genetic variants in the 9p21 region and their association with multiple tumors [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(6):1378 - 1386.
- [6] HA J W. Autosomal dominant inherited Cowden's Disease in a family [J]. *Clin Endosc*, 2013, 46(1):85 - 90.
- [7] BUBIEN V, BONNET F, BROUSTE V, et al. High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome [J]. *J Med Genet*, 2013, 50(4):255 - 263.
- [8] WANG JIN-TAO, WANG ZHI-MIN, DING LING, et al. Effects of estradiol and estrogen receptor alpha XbaI /PvuII gene polymorphism on cervical cancer [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2011, 18(10):746 - 749.
- [9] CHUNG S H, LAMBERT P F. Prevention and treatment of cervical cancer in mice using estrogen receptor antagonists [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(46):19467 - 19472.
- [10] KANSAKARE, CHANG Y J, MEHRABI M, et al. Expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and vascular endothelial growth factor-A, in thyroid cancer [J]. *Am Surg*, 2009, 75(9):785 - 789.
- [11] LI FEI, LUO HAO-JUN, LUO PING, et al. Expression of GPR30, ER α and PR in thyroid carcinoma tissues and their association with thyroid carcinoma [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2011, 33(16):1691 - 1694.
- [12] ZENG Q, CHEN G G, VLANTIS, et al. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway [J]. *Cell Prolif*, 2007, 40(6):921 - 935.
- [13] KABAT G C, KIM M Y, WACTAWSKI-WENDE J, et al. Menstrual and reproductive factors, exogenous hormone use, and risk of thyroid carcinoma in postmenopausal women [J]. *Cancer Causes Control*, 2012, 23(12):2031 - 2040.
- [14] IMPICCIATORE G G, TIBONO G M. Ovulation inducing agents and cancer risk: review of literature [J]. *Curr Drug Saf*, 2011, 6(4):250 - 258.

(2014-01-11 收稿)

(上接第27页)

- [J]. *Scand J Surg*, 2011, 100(1):30 - 34.
- [2] KHAN S A, THOMAS H C, DAVIDSON B R, et al. Cho-
langiocarcinoma [J]. *Lancet*, 2005, 366(9493):1303 -
1314.
- [3] 李甘地, 陈杰. 八年制病理学 [M]. 第2版. 北京:人民
卫生出版社, 2005:34.
- [4] PANOPOULOS A, HOWELL M, FOTEDAR R, et al. Gli-
oblastoma motility occurs in the absence of actin polymer
[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(13):2212 - 2220.
- [5] ARJONEN A, KAUKONEN R, IVASKA J. Filopodia and
adhesion in cancer cell motility [J]. *Cell Adh Migr*, 2011,
5(5):421 - 430.
- [6] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase func-
tions in cell death and disease [J]. *Cold Spring Harb Per-
spect Biol*, 2013, 5(4):a8656.

(2014-01-13 收稿)