

猪鼻支原体抗原对 K562 细胞增殖的影响

刘艳红¹, 李 艳², 刘东瀛², 汤纪路², 刘先洲¹, 白瑞珍²

Effectsofm ycoplasmah yorhinisanti gensonK 562 cell proliferation

LIUYan -hong, LIYan, LIUDon g-ying, etal

Department of Clinical Laborator y Ren Min Hospital of Wuhan Universit y, Wuhan 430071, China

Abstract: Objective Toinvesti gatetheeffectsofm ycoplasmah yorhinisanti gensonhumantumorcells. **Methods** Wedetectedtheeffectsofm ycoplasmah yorhinisanti gensonthe proliferationofK562cellsbyMTT method, anddetectedtherateofa poptosisbyterminaldeox ynucleotidyltransferasemediatednickendlabelin g (TUNEL) techni que. **Results** Mycoplasmah yorhinisanti genssignificantlydecreasedK562cell proliferationina dose-dependent patternThecharacteristicDNA "Ladder"ona garose gelswas appearedineffectiveconcentration group, whichrevealedthea poptoticcelldeathofK562cells. The percenta geofa poptosiscellbyTUNELwas 38.6%, whichwasmuchhi gherthanthecontrol group(10.2%). **Conclusion** Mycoplasmah yorhinisanti gens inhibitedK562cell proliferationbytheinductionofa poptoticcelldeath.

Keywords: Mycoplasmah yorhins; Anti gen; A poptosis

摘 要:目的 探讨猪鼻支原体抗原对肿瘤细胞的作用。方法 以 MTT 法测定猪鼻支原体抗原对肿瘤细胞增殖的影响;琼脂糖凝胶电泳定性检测细胞凋亡;TUNEL 法定量检测细胞凋亡。结果 猪鼻支原体抗原呈浓度依赖性抑制 K562 细胞的增殖;在有效浓度的猪鼻支原体抗原作用下, DNA Ladder 显示 K562 细胞以凋亡方式死亡, TUNEL 法获得凋亡率为 38.6%, 显著高于正常对照组(10.2%)。结论 猪鼻支原体抗原可通过诱导 K562 细胞凋亡的方式抑制其增殖。

关键词:猪鼻支原体;抗原;细胞凋亡

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2003)01-0012-03

0 引言

关于支原体,大量研究的是其与各种疾病的关系,即作为诸如肺炎、盆腔感染、泌尿生殖道感染、关节炎、不育及自发流产,以及 AIDS 和肿瘤的协同致病因子^[1]。但 2000 年, Robert EHall 报道了一种来源于发酵支原体的膜表面蛋白,其具有抑制白血病细胞 HL-60 和 U937 增殖及诱导其分化和凋亡的功能,为支原体膜蛋白的研究提供了一个新的视点,即可能作为治疗肿瘤及其他疾病的免疫调节剂,成为治疗白血病的一种较有潜力的新型制剂,为肿瘤的治疗提供重要线索^[2]。近年也有报道指出^[3,4],猪鼻支原体与细胞凋亡有密切关系。本文以白血病细胞系 K562 为靶细胞,探讨猪鼻支原体抗原对肿瘤细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

K562 细胞系购自武汉大学典型培养物保藏中心。猪鼻支原体 ATCC17981 株购自北京生物药品鉴定所。RPMI1640、HEPES 及谷氨酰胺为 GIBICO 公司产品;四甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Fluka 公司产品;小牛血清购自浙江三利;TUNEL 试剂盒为北京中山公司产品;PPLO 为 Difco 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。二氧化碳培养箱(GCAPRECI-SION);高速冷冻离心机(Heraeus);酶标仪(DG3022A)。

1.2 方法

1.2.1 猪鼻支原体抗原的制备^[5]

培养猪鼻支原体标准株接种 PPLO 培养基,于 95%N₂, 5%CO₂ 37℃ 培养 7d。收集培养 7d 后的菌液,低温高速离心机离心, 16000rpm, 4℃, 30min。弃上清, PBS 洗涤 2 次, 加原培养液 1/100 体积 PBS 悬浮沉淀, 超声破碎, 160W, 500s, 离心 16000rpm, 30min。收集上清, 加入 25.8 g/100ml 固体硫酸铵, 混匀, 4℃ 过夜, 16000rpm 离心, 4℃, 1h, 收集沉淀, 溶于相同体积 PBS, PBS 透析后, 取透析液离心, 20000rpm, 4℃, 1h, 收集上清, 即为猪鼻支原体抗原。

收稿日期: 2002-03-26; 修回日期: 2002-04-23

基金项目: 湖北省卫生厅资助项目(97402)

作者单位: 1. 430071 武汉大学人民医院检验科; 2. 武汉大学医学院微生物学教研室

用 752 分光光度计测定蛋白浓度。

1.2.2 细胞培养

将 K562 细胞系用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 5%CO₂ 饱和湿度条件下培养,待细胞进入对数增殖期时,收获培养瓶中的细胞,调配成所需浓度待用。

1.2.3 MTT 法

猪鼻支原体抗原(最高浓度为 2mg/ml)于培养板中倍比稀释,然后将生长良好的 K562 细胞以 2 × 10⁵/ml,0.1ml/ 孔接种于 96 孔培养板,37 5%CO₂ 孵育 72h 后每孔加入 MTT (5mg/ml) 10μl,37 4h, Heraeus 离心机 2000rpm 离心 10min, 弃上清,每孔加入 DMSO100 μl,充分溶解。酶标仪上读取 570nm 处的 A 值。

1.2.4 DNA 提取和电泳

用碘化钠法^[6] 分别提取处理组及正常对照组 K562 细胞的 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1h, 电压 80V, 紫外灯下观察并照相。

1.2.5 TUNEL 法

按试剂盒操作步骤说明进行。阴性对照用 PBS 代替一抗,胞核染成棕色为凋亡阳性细胞。每组观察 3 张玻片,每片观察 5 个视野,随机计数 1500 个细胞,计算凋亡率。凋亡率的组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 猪鼻支原体抗原对 K562 细胞系增殖的影响

将不同浓度的猪鼻支原体抗原与 K562 细胞共孵育,MTT 测其对 K562 细胞增殖的影响。结果表明:不同浓度的猪鼻支原体抗原均对细胞增殖有抑制作用,且呈浓度依赖趋势,见表 1。

表 1 猪鼻支原体抗原对 K562 细胞系增殖的影响

抗原剂量 (mg/ml)	样本数 (n)	A ₅₇₀
0.0000	6	0.90 ±0.015
0.0625	6	0.78 ±0.058
0.1250	6	0.72 ±0.042
0.2500	6	0.68 ±0.042
0.5000	6	0.65 ±0.031
1.0000	6	0.45 ±0.025
2.0000	6	0.32 ±0.083

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳

将较高浓度猪鼻支原体抗原处理的 K562 细胞 DNA 电泳后呈典型的“阶梯状”条带,与标准 DNA Marker 比较,为多倍的 180 ~ 200bpDNA 片断。未加猪鼻支原体抗原处理的 K562 细胞,DNA 无类似改变,见图 1。

2.3 TUNEL 法定量测定 K562 细胞的凋亡程度

将 2m g/ml 猪鼻支原体抗原处理的 K562 细胞经 TUNEL 法定量测定凋亡程度。对照组细胞胞核被苏木素染成蓝色,见图 2A; 凋亡阳性细胞核呈棕色或棕褐色,浓缩的染色质紧贴核膜内侧成新月形,或呈均匀一致的染色,见图 2B。凋亡阳性率为 38.6%,显著高于正常对照组(10.2%),见表 2。

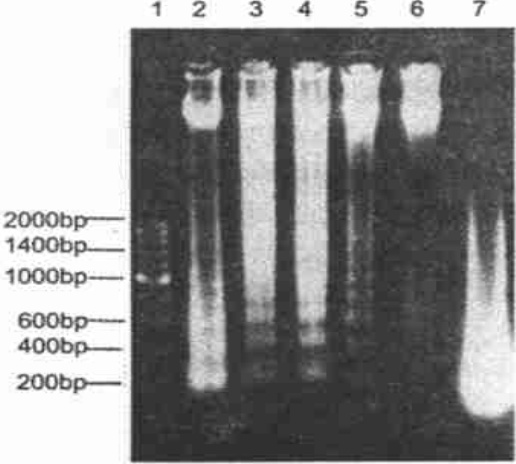


图 1 猪鼻支原体抗原诱导 K562 细胞凋亡的 DNA 阶梯 1DNAmarker;2,3,4,5 细胞凋亡;6 细胞正常对照;7 细胞坏死对照

表 2 TUNEL 法定量测定 K562 细胞的凋亡程度

组别	抗原剂量 (mg/ml)	凋亡率 (%)
正常	0	10.2 *
处理	2	38.6

* *P* < 0.01

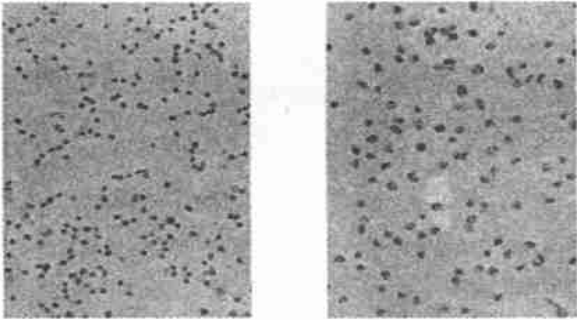


图 2A 对照组细胞 TUNEL ×200 图 2B 处理组细胞 TUNEL ×400

3 讨论

大量的研究表明,猪鼻支原体与肿瘤形成有密切关系^[7];但最近有研究指出,猪鼻支原体与细胞凋亡有一定的关系。细胞凋亡被认为是与有丝分裂功能相反的调节细胞群体的方式,在控制细胞增殖、肿瘤的发生和生长中起重要的作用。细胞凋亡的起因是多种多样的,其中之一是细胞代谢或核酸/蛋白质合成紊乱,这正是多数抗肿瘤药物作用所在^[8]。因此,有理由相信能诱导肿瘤细胞凋亡的猪鼻支原体抗原是有成为抗肿瘤药物潜力的。深入研究猪鼻支原体

及其抗原与肿瘤的关系,对于猪鼻支原体感染及感染的早期诊断和及时治疗以及其抗原作为抗肿瘤生物制剂的研究有着极其重要的意义。

支原体抗原与细胞凋亡关系的研究是 RobertE Hall 对于发酵支原体污染培养的白血病细胞系 U937 和 HL-60 后其膜表面蛋白 p48 诱导细胞凋亡的一系列报道。本文据此首先进行了猪鼻支原体抗原对白血病细胞系 K562 的作用的研究,以期获得凋亡的阳性结果;然后进一步阐明其作用机制以及猪鼻支原体抗原对其他肿瘤细胞的作用,为猪鼻支原体抗原作为新型的抗肿瘤生物制剂的研制、开发奠定一定的理论基础。

参考文献:

[1] Coronato S.Mycoplasmas and AIDS[J]. Rev Ar gent Microbiol, 1997,29 (3):157-166.
[2] Hall RE, Agarwal S, Kestler DP, et al. Induction of leukemia cell differentiation and apoptosis by recombinant P48, a modulin derived from mycoplasma fermentans[J]. Biochem Biophys Res Commun,

2000,269 (1):284-289.
[3] Padden R, Wulf S, Weber A, et al. Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases[J]. Eur J Cell Biol, 1996,71 (1):105-119.
[4] Padden R, Wulf S, Weber A, et al. Mycoplasma nucleases able to induce internucleosomal DNA degradation in cultured cells possess many characteristics of eukaryotic apoptotic nucleases[J]. Cell Death Differ, 1998,5 (6):517-528.
[5] 刘斌波,刘先洲,刘东瀛,等.猪鼻支原体抗原在人结肠腺癌细胞表达的研究[J]. 武汉大学学报(医学版),2001,22 (1):6-7.
[6] Hamilton ML, Guo Z, Fuller CD, et al. A reliable assessment of 8-oxo-2'-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2001,29 (10):2117-2121.
[7] 刘东瀛,刘先洲,张绍金.支原体与肿瘤关系研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,2000,27 (3):141-143.
[8] Thompson LE. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995,267 (5203):1456-1462.

(刘红武校对)

短篇个案

Douglas 氏腔寄生性子宫肌瘤 1 例

姜云福,胡丹,扬宇杰

关键词:子宫肌瘤;Douglas 氏腔;寄生;手术
中图分类号:R737.33 文献标识码:D
文章编号:1000-8578 (2003)01-0014-01

女性,45 岁,农民,因月经过多及不规则阴道出血来妇科就诊。妇检发现子宫增大 10 × 12cm,不规则,与此同时还发现子宫后下方有一 8 × 7cm 大小肿块,与子宫无关。B 超及 CT 扫描均提示:子宫肌瘤(多发性),盆腔腹膜后肿瘤;外科会诊时肛诊发现盆腔肿块位于直肠右前方,距肛缘约 8cm,肿块向直肠腔内挤压,但无肠粘膜破坏,内窥镜及钡灌检查,均发现肿瘤向直肠腔内挤压突入约 5 × 6cm 大小,粘膜完整无损。

遂以“盆腔腹膜后肿瘤”,子宫肌瘤收入外科,入院后外科与妇科医生同台手术,先行子宫全切,接着行盆腔腹膜后肿瘤切除。术中见子宫肌瘤为多发性,外观呈薯块状,除了多个肌间质肌瘤外还有 2 个长出子宫表面的浆膜下肌瘤,此两浆膜下肌瘤都有一直径不到 0.5cm 的蒂连接,几乎要脱离子宫。而腹膜后肿瘤亦为多发性,有一大一小 2 个,均位于子宫与直肠之间的 Douglas 腔内,大者约

7 × 8cm,小者 5 × 3cm,均有一定的活动度,且互不相连,与周围组织无紧密粘

连。切开后腹膜较易分离出肿瘤,手术经过顺利。术后病理诊断:1. 子宫平滑肌瘤;2. “腹膜后”平滑肌瘤(多发性)。将上述标本送武汉大学中南医院病理科会诊,证实三者来源于同一组织——子宫平滑肌。

讨论

子宫肌瘤寄生于 Douglas 氏腔尚不多见。本病例两浆膜下肌瘤都有一很细的蒂,几乎要断离子宫,有可能这种带蒂的浆膜下肌瘤因某种原因,如外力的作用下或蒂扭转,其蒂断离子宫,肌瘤掉入盆腔,由于子宫直肠窝为体腔最低位且固定、体温适宜,故肿瘤得以寄生。黄荣丽等描述过,浆膜下肌瘤在腹腔内可发生扭转,由于血运受阻瘤蒂可以断裂,粘着于大网膜或附近组织,并建立新的血运关系,从这些组织中吸取养料,成为“游走性”或“寄生性”肌瘤。

(贺文校对)

收稿日期:2002-03-11;修回日期:2002-04-17

作者单位:430081 武汉科技大学医学院附属博爱医院外科