

视黄酸对 BEL-7402 细胞酶活性 及基因表达的影响^①

陈瑞川 杨善民 张 铮 汪德耀

(厦门大学抗癌研究中心 厦门 361005)

摘要 人肝癌 BEL-7402 细胞分别以 $5\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$ 和 $50\mu\text{mol/L}$ 的视黄酸(RA)处理后, 细胞生长明显受抑, 平均细胞群体倍增时间延长, 并呈 RA 浓度及处理时间依赖性关系. 经 $20\mu\text{mol/L}$ RA 处理的细胞中, r-谷氨酰转肽酶(r-GT) 活性自给药后第 2 天即持续下降, 至第 6 天降至 44.5%, 而酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶(TAT) 活性则持续增高, 至第 6 天较对照组高近 1 倍. 经 $20\mu\text{mol/L}$ RA 处理 5 d 后, RNA 斑点杂交分析表明 p^{53} 基因转录加强, 而 N-ras 基因表达下降, 提示该两基因的表达变化可能在 BEL-7402 细胞的生长抑制及逆转过程中起重要作用, 有关机制尚待深入研究.

关键词 视黄酸, BEL-7402, 生长抑制

中国图书分类号 Q 2.24

肿瘤细胞的诱导分化和分化治疗是肿瘤化疗的一个新领域, 并已显示良好的应用前景. 目前的实验研究已发现大量的诱导分化剂, 其中视黄酸(RA) 是临床和实验研究较多的诱导分化剂, 其对入白血病来源的肿瘤细胞如 HL-60 等的诱导分化作用及其机制已有较多的报道, 但在实体瘤肿瘤细胞尤其是人肝细胞癌等诱导分化方面的研究报道较少. 肝癌是世界上最常见的十大肿瘤之一, 研究显示肝癌的发生, 发展是一个涉及多种癌基因、抑癌基因表达异常的多阶段积累过程. 现有资料表明: p^{53} 和 N-ras 等癌基因突变和表达异常与肝癌的发生和演变有密切的关系^[1], 因此在研究肝癌细胞诱导分化时, 有必要将抑癌基因和癌基因的表达联系在一起研究, 以便对肝癌诱导分化的机制甚至癌变的机理进行分子水平上的阐述. 艾兆伟等^[2]曾对人肝癌 SM-MC-7721 株在诱导分化过程中 N-ras 基因的表达变化作了研究, 但未涉及抑癌基因. 本文选择上皮细胞来源的人肝癌细胞 BEL-7402 株^[3]为材料, 研究了对该细胞株的细胞生长、胞内酶活性及 p^{53} 和 -ras 基因表达的影响.

1 材料与方 法

1.1 细胞及试剂

细胞株及培养条件: 人肝癌细胞株 BEL-7402 为本单位细胞生物化学研究室保存, 培养条件为: 以 $5\sim 10\times 10^4$ 细胞/mL 接种, 在含 10% 小血清和 100 Iu/mL 青霉素及 $100\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI1640(GIBCO) 培养液中, 37℃、5% CO_2 培养传代.

^① 本文 1997-05-28 收到; 厦门大学肿瘤细胞工程国家教委开放研究实验室开放基金和福建省自然科学基金资助项目

试剂: 视黄酸、鲑精 DNA、多聚甲醛等生化试剂购自 Sigma 公司, 内切酶、蛋白酶 K 等购自 Promega 公司, 地高辛 DNA 标记检测试剂盒为 Boehringer Mannheim 产品, 硝酸纤维膜为 Amersham 产品, N-ras cDNA 购自上海华美生物工程公司, 质粒 p⁵³B(含 p⁵³cDNA) 由天津医科大学刘恩莉老师惠赠, 其余均为国产分析纯试剂。

1.2 RA 配制及给药

RA 以无水乙醇配成 50 mmol/L 贮液, 0.22 μm 滤膜过滤后于 -20℃ 避光保存, 使用时以细胞培养液配成 1 mmol/L 原液; 实验组 RA 终浓度分别为 5 μmol/L、20 μmol/L 和 50 μmol/L, 对照组仅添加相应量的无水乙醇, 每 24 h 换液一次。

1.3 细胞计数及光镜观察

以常规苔酚蓝拒染法于血球计数板上进行活细胞计数, 并观察细胞死亡状况。

1.4 r-谷氨酰转肽酶(r-GT) 活力测定

经 RA 处理的 BEL-7402 细胞从培养瓶收集后, 以 0.1 mol/L, pH7.0 的 PBS 离心洗涤 2 次, 悬浮于 0.05 mol/L, pH7.0 的 Tris · HCl 缓冲液中, 超声波(vc600) 超声细胞破碎仪(Sonics & Materials 公司) 冰浴破碎 2 次, 每次 20~30 s, 间隔 1 min, 于 4℃、5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 改良 Lowry 法^[4] 蛋白定量后, 以 0.05 mol/L, pH7.0 Tris · HCl 缓冲液将各样品调至同一蛋白浓度; 按文献报道方法^[5], 以重氮试剂比色法测定 r-谷氨酰转肽酶活力, 并计算比活力(单位为: mIU/mg 蛋白), 作图分析结果。

1.5 酪氨酸-α-酮戊二酸转氨酶(TAT) 活力测定

取上述(1.4) 已调整蛋白浓度的上清液, 按 Diamondstone 报道的方法^[6], 以 L-酪氨酸和 α-酮戊二酸为底物, 测定酪氨酸-α-酮戊二酸转氨酶活力, 反应后的溶液直接于紫外/可见分光光度计(DU 65, BECKMAN 公司) 测定波长 331 nm 处的光吸度值, 以光吸度值表示酪氨酸-α-酮戊二酸转氨酶相对活力, 作图分析结果。

1.6 探针标记

质粒 p⁵³B 经 BamHI 酶切后, 低熔点琼脂糖胶电泳法分离、纯化 p⁵³cDNA 片段(2.0 kb); 按地高辛 DNA 标记检测试剂盒说明、以随机六核苷酸引物延伸法标记 p⁵³ 和 N-ras cDNA 探针。

1.7 RNA 斑点杂交

经 RA 处理的 BEL-7402 细胞收集后, 以无菌生理盐水离心洗涤 2 次, 制成 2×10^6 、 1×10^6 、 2×10^5 和 1×10^5 细胞/mL 悬液, 各取 50 μL 于自制真空点膜器上点于硝酸纤维膜上(每实验组样品各 4 点); 参照鲍家驹介绍的方法^[7], 以 4% 的多聚甲醛 4℃ 固定 1 h 后, 用 20 μg/mL 蛋白酶 K 于 37℃ 温箱消化 1 h, 空气干燥后进行预杂交 2 h、杂交 8 h, 杂交温度为 42℃, 最后按地高辛 DNA 标记检测试剂盒说明进行洗膜和显色。

2 结果与讨论

2.1 细胞计数及观察

人肝癌 BEL-7402 细胞分别以 5 μmol/L、20 μmol/L、和 50 μmol/L RA 处理, 每天取样苔酚蓝拒染法计数活细胞数, 结果见表 1, 细胞存活率分析发现, 随 RA 浓度的提高及处理时间的延长, 细胞存活率明显下降(见图 1), 显示 RA 对 BEL-7402 细胞的生长具有明显的抑制作

用, 并呈 RA 浓度及处理时间依赖关系; 在计数的第 7 天的细胞增殖倍数及平均细胞群体倍增时间也显示 RA 对 BEL-7402 细胞增殖速率具抑制作用(见表 2)。苔酚蓝染色计数时, 极少见死亡细胞, 表明 RA 对 BEL-7402 细胞生长的抑制作用并非来自细胞毒作用, 这与 RA 对其它肿瘤细胞的作用观察结果一致, 提示 RA 对 BEL-7402 细胞具有诱导逆转作用。

2.2 r-谷氨酰转肽酶和酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶活力变化

经 20 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理 BEL-7402 细胞超声破碎后测定离心上清 r-谷氨酰转肽酶和酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶活力结果见图 2 和图 3。自给药后的第 2 天, r-谷氨酰转肽酶活力即降至对照组的 87.8%, 至第 5 天则降至对照组的 44.5%, 与此同时, 对照组的 r-谷氨酰转肽酶始终维持于较高水平; 经 20 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理的实验组细胞中, 酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶活力则自

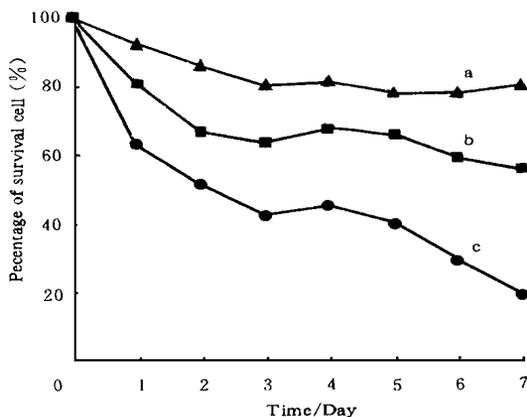


图 1 视黄酸处理对 BEL-7402 存活率的影响

RA 终浓度($\mu\text{mol/L}$) a. 5; b. 20; c. 50

Fig. 1 Effect of RA on survival rate of BEL-7402 cell

表 1 细胞计数结果

Tab. 1 Results of cell counting

处理时间 (d)	细胞数量 ($\times 10^4$ 细胞/ mL)			
	对照组	5 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$
1	11.50	10.58	9.25	7.25
2	17.58	15.08	11.75	9.00
3	25.83	20.75	16.33	11.67
4	32.58	26.42	21.92	14.75
5	40.33	31.33	26.75	16.25
6	54.00	41.83	31.58	15.92
7	65.33	52.08	36.25	12.83

表 2 视黄酸对 BEL-7402 细胞增殖的影响

Tab. 2 Effect of RA on cell proliferation of BEL-7402

RA 浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	2	20	50
第 7 天细胞增殖倍数	12.5	9.9	6.9	2.4
平均细胞群体倍增时间(h)	13.4	16.9	24.2	68.9

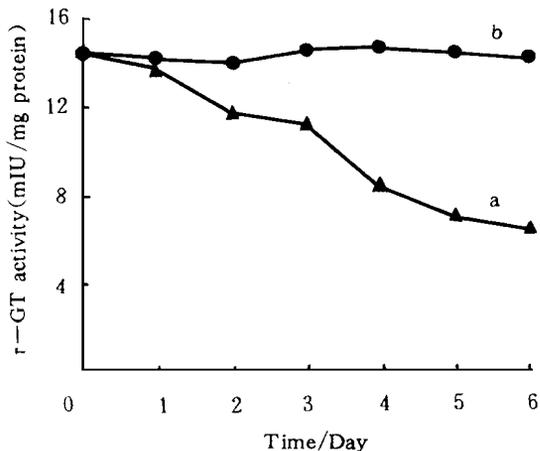


图 2 视黄酸对 BEL-7402 细胞 r-GT 酶活力的影响

a. 对照组 b. RA 处理组

Fig. 2 Effect of RA on r-GT activity of BEL-7402 cell

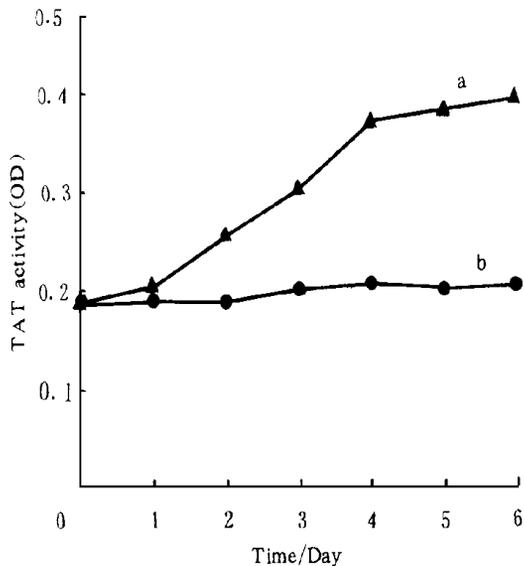


图 3 视黄酸对 BEL-7402 细胞 TAT 酶活力的影响

a. 对照组 b. RA 处理组

Fig. 3 Effect of RA on TAT activity of BEL-7402 cell

给药后的第 2 天即有所提高, 至第 6 天已为对照组的 1.94 倍, 提高了近 1 倍, 而对照组细胞的酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶活力基本没变化; 表明经 RA 处理 BEL-7402 细胞内的生化代谢过程已发生改变. r-谷氨酰转肽酶及酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶已分别被用作肝细胞增殖恶变或细胞分化的指标^[8], r-谷氨酰转肽酶活力下降或酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶活力升高均指示细胞的逆转分化. 本研究结果提示, 经 RA 处理的 BEL-7402 细胞呈去恶性的逆转趋势, 该结果与夏明明用异视黄酸(IRA) 诱导处理人肝癌细胞 SMMC-7721 株逆转转时, 这两种酶活力的变化趋势一致^[9].

2.3 RA 处理对 p⁵³ 和 N-ras 基因转录表达的影响



图 4 视黄酸对 BEL-7402 细胞 p⁵³ 和 N-ras 基因表达的影响

A. p⁵³ a. 对照组 b. RA 处理组(20 μ mol/L)

B. N-ras a. 对照组 b. RA 处理组(20 μ mol/L)

Fig. 4 Effect of RA on expression of p⁵³ and N-ras genes

20 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理 BEL-7402 细胞 5 d 后收集细胞, 各样品分别按 1×10^5 、 5×10^4 、 1×10^4 和 5×10^3 个细胞/点进行点膜, 处理后 RNA 斑点杂交分析 p^{53} 和 $N-ras$ 基因转录产物 (mRNA) 水平, 结果见图 4. 可见经 RA 处理后, p^{53} 基因转录加强, mRNA 水平较对照组提高, 与此同时, $N-ras$ 基因转录受抑, mRNA 水平较对照组下降, 表明 RA 对 BEL-7402 细胞的 p^{53} 和 $N-ras$ 基因转录具有影响. Shaulsky 等的报道^[10]认为野生型 p^{53} 基因的表达在前 B 细胞 (pre-B-cell) 的分化过程中起促进分化的作用, 在前 B 细胞中导入野生型 p^{53} 基因后可诱导细胞向成熟阶段分化, 并伴随生长抑制, 但认为生长抑制是细胞成熟分化后的现象, 而非 p^{53} 基因的直接抑制作用. $N-ras$ 基因是人肝癌细胞的转化基因之一, 其点突变或过度表达均可导致细胞的分裂增殖^[11]. 上述结果提示: BEL-7402 的诱导分化和生长抑制可能分别与 p^{53} 基因表达增强和 $N-ras$ 基因表达下降有关. Elighah 等的研究曾指出^[12]: 与 ras 基因共转染的野生型 p^{53} 基因可有效抑制 ras 基因对原胚成纤维细胞的恶性转化作用. 在人肝癌诱导分化过程中是否存在 $P53$ 基因和 $N-ras$ 基因的协同作用尚有待进一步研究.

由于 RA 通过其核受体的顺式调控, 在细胞诱导分化过程中引起相当复杂的基因表达调控变化^[13], 因此, 尚需对 RA 诱导 BEL-7402 细胞分化的详尽机制作进一步研究. 此外, 也有必要对 BEL-7402 细胞的 p^{53} 基因及 $N-ras$ 等癌基因是否存在突变进行检测

参 考 文 献

- 1 苏文金主编. 肿瘤的分子生物学研究. 厦门: 厦门大学出版社, 1993: 77 ~ 81
- 2 艾兆伟等. 视黄酸对人肝癌细胞癌基因 ras 表达的抑制. 生物化学与生物物理学报. 1991, 23(5): 453 ~ 457
- 3 陈瑞铭等. 人体肝癌体外细胞系 BEL-7402 的建立及其特征. 实验生物学报, 1978, 11(3): 37 ~ 47
- 4 Lowry OH et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 195: 256 ~ 260
- 5 上海市医学化验所编. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 329 ~ 332
- 6 Diamodstone TL et al. Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde. Ana Biochem, 1996, 16: 395 ~ 400
- 7 鲍家驹等. 一种简便且灵敏的核酸杂交新方法—地高辛配基标记探针细胞原位杂交法应用于癌基因表达研究. 中国医学研究学报, 1991, 13(6): 439 ~ 442
- 8 汤钊猷主编. 现代肿瘤学. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 157 ~ 167
- 9 夏明明等. 异视黄酸对人肝癌细胞的诱导分化作用. 细胞生物学杂志, 1991, 13(3): 127 ~ 130
- 10 Shaulsky G et al. Involvement of wild-type p^{53} in pre-B-cell differentiation in vitro. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8 982 ~ 8 986
- 11 顾建人等. 人原发性肝癌及 7402 细胞株和髓细胞白血病细胞株 (K 562) 的癌基因 (转化基因) 的基因属性 $N-ras$ 基因. 中国科学 B 辑, 1985, 2: 452
- 12 Eilyahu D et. Wild-type p^{53} can inhibit oncogen-mediated focus formation. Proc Natl Acad Sci U SA, 1989, 86: 8 763 ~ 8 767
- 13 雷薇等. 维甲酸对增殖分化调节的分子机制. 国外医学分子生物学分册, 1994, 16(1): 83 ~ 86

Effect of Retinoic Acid on Enzyme Activity and Gene Expression of BEL-7402

Chen Ruichuan Yang Shanmin Zhang Zhen Wang Deyao
(Cancer Res. Cent. of Xiamen Univ., Xiamen 361005)

Abstract The growth of human hepatocarcinoma cell line BEL-7402 was obviously inhibited when the cell line was treated with 5, 20 and 50 $\mu\text{mol/L}$ retinoic acid (RA) respectively. The inhibition of cell growth depended on the concentration and treatment time of RA. Comparing with control, the activity of r-glutamyltransptidase (r-GT) of BEL-7402 greatly decreased during 20 $\mu\text{mol/L}$ RA treatment, and decreased to 44.5% activity of control at sixth day. On the contrary, the activity of tyrosin- α -ketoglutarate transaminase (TAT) in RA treated cells continuously increased and was near one fold higher than the control at sixth day. The results of RNA dot blot showed that the transcription of p⁵³ gene increased, but the expression of N-ras gene decreased during five day's treatment with 20 $\mu\text{mol/L}$ RA. These results suggested that the different expression patterns of the two genes may play an important role in the growth inhibition of BEL-7402 treated with RA. However, the more detail studies may be needed in future.

Key words Retinoc acid, Growth inhibition, BEL-7402