

Sciences, Guangzhou 510089, China).

Abstract Aged rats were divided into aged memory-impaired rats and normal aged rats based on their behaviour in the Morris water maze. Brain synaptosomal membrane fluidity and the effect of GM1 on it was evaluated by fluorescence polarization technique. The results showed that statistically significant decreases of the synaptosomal membrane fluidity in the neocortex and hippocampal formation were found in the aged memory-impaired rats compared with the young and normal aged

rats, and that GM1 could ameliorate the abnormal membrane fluidity. Correlation analysis indicated that the brain synaptosomal membrane fluidity was closely related to aged learning and memory impairment. It was suggested that GM1 has a potential therapeutic value for aged memory impairment through altering neuronal membrane structure.

Key words aged learning and memory impairment, synaptosomal membrane fluidity, rat

CCL₂₂₉细胞经诱导后蛋白激酶 C 及抑制剂活性的变化

王红梅 于秉治¹⁾ 王芸庆 宋今丹

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 检测以维甲酸 (RA)、1, 25-二羟基维生素 D₃ (1, 25 (OH)₂VD₃) 诱导 2 d、佛波酯 (PMA) 诱导 6 h 的人大肠癌细胞 CCL₂₂₉ 的蛋白激酶 C (PKC) 及其抑制剂活性。结果显示: 诱导后 PKC 总活性升高 ($P < 0.05$); RA、1, 25 (OH)₂VD₃ 诱导引起细胞质 PKC 活性增加, PMA 诱导后细胞膜 PKC 比率 (细胞膜活性/总活性) 显著升高 ($P < 0.01$); 诱导后 PKC 抑制剂活性均降低, 其中 1, 25 (OH)₂VD₃ 组与对照组有显著差异 ($P < 0.05$); 提示 PMA 引起 PKC 从细胞质向细胞膜转移, 不同药物诱导后 PKC 及其抑制剂活性出现不同的相对均衡关系。

关键词 PKC, 抑制剂, 人大肠癌细胞, 诱导分化

细胞的增殖与分化及其调控是细胞生物学中的基本问题之一, 而肿瘤细胞的主要特征在于细胞的增殖分化异常。因此, 研究肿瘤细胞的体外诱导分化, 有助于认识细胞分化及其调控机制。蛋白激酶 C (PKC) 作为信号传递系统的关键酶, 广泛参与细胞的增殖与分化^[1], 它的作用日益受到生物学界与医学界的重视。自 1983 年以来本实验室就系列研究了维甲酸 (RA) 作为有效的分化诱导剂对人早幼粒白血病细胞 HL-60 的诱导分化作用^[2,3]。最近, 我们

发现 RA、1, 25-二羟基维生素 D₃ (1, 25 (OH)₂VD₃), 佛波酯 (PMA) 可从形态学、生物学特性等多方面诱导 CCL₂₂₉ 细胞分化 (另文发表), 为研究 PKC 在其诱导分化中的作用, 本文以 RA、1, 25 (OH)₂VD₃ 及 PMA 诱导人大肠癌细胞 CCL₂₂₉, 检测 PKC 及其抑制剂活性, 观察与研究 PKC 及其抑制剂活性在人大肠癌细胞诱导分化中的变化。

¹⁾中国医科大学生物化学教研室, 沈阳 110001.

收稿日期: 1995-01-20, 修回日期: 1995-07-05

1 材料与方法

1.1 细胞培养及给药处理

人大肠癌细胞 CCL₂₂₉ (美国哈佛大学医学院 Dana-Farber 肿瘤研究所惠赠) 在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中、5% CO₂、100% 相对湿度、37℃ 条件下培养。

全反式 (all-*trans*) RA (Sigma)、1, 25 (OH)₂VD₃ (华美公司) 分别配成 10⁻³ mol/L 和 10⁻⁴ mol/L 乙醇溶液, 工作浓度分别为 10⁻⁶ mol/L 和 10⁻⁷ mol/L。对照组加入等体积的无水乙醇, 终浓度不超过 0.1%, 此浓度的无水乙醇对细胞生长无明显影响。PMA (Sigma) 配成 10⁻⁴ mol/L 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 工作浓度为 10⁻⁷ mol/L, 对照组加入等体积 DMSO, 其终浓度为 0.01%, 此浓度对细胞的生长无影响。实验全过程均在无菌避光条件下进行。RA 和 1, 25 (OH)₂VD₃ 诱导 2 d, PMA 诱导 6 h 后收集细胞。

1.2 PKC 及其抑制剂活性测定

所有实验操作均在 0~4℃ 条件下进行。

1.2.1 PKC 提取: 分别在诱导后 6 h、2 d 收集细胞, 用预冷的 PBS 冲洗 2 次, 取相同数目 (10⁷ 个) 细胞 (给药和对照) 溶于缓冲液 A (buffer A) 中 (20 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.25 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L 乙二醇双 (α-氨基乙基) 醚四乙酸, 2 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠), 分别以超声粉碎机 (上海超声波仪器厂) 粉碎, 每次 20 s, 间隔 20 s, 共 6 次, 然后 100 000 g、4℃ 离心 1 h (杜邦离心机 Sorvall RC 28S DU POUT), 上清为细胞质 PKC 部分, 其沉淀加含 1% Triton X-100 的 buffer A 抽提细

胞膜 PKC 30 min, 每 10 min 振荡 1 次, 然后超声粉碎, 100 000 g、4℃ 离心 1 h, 取上清为细胞膜 PKC 部分。

1.2.2 进行牛精子中 PKC 抑制剂的纯化^[4]。

1.2.3 PKC 及其抑制剂活性测定: 以鱼精蛋白为底物, 反应体积 250 μl, 含有 0.5 mol/L Tris-HCl pH7.5, 2.5 × 10⁻⁴ mol/L ATP (Sigma), 0.25 mmol/L 醋酸镁, 0.75 mmol/L 2-巯基乙醇, 0.5 Ci [γ-³²P] ATP (北京福瑞公司), 不加抑制剂或加入 20 μg 抑制剂, 反应以加入 [γ-³²P] ATP 开始, 30℃ 反应 3 min, 3 ml 10% 三氯乙酸中止反应, 微孔滤膜抽滤 (硝酸纤维素膜 Φ0.45 μm, TOYOROSHI), 将滤膜放入有 10 ml 蒸馏水的闪烁瓶中, 于 Beckman 液闪仪测定放射活性。酶活性表示为 30℃ 时每毫克蛋白质每分钟催化多少 pmol γ-³²P 掺入底物蛋白, 抑制活性表示为 PKC 活性下降的百分数, 即无抑制剂存在时 PKC 活性减去有抑制剂存在时 PKC 活性, 再除以无抑制剂存在时 PKC 活性, 乘以 100%。

1.3 蛋白定量

采用 Lowry 法^[5], 牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.4 统计学处理

各组实验重复 3 次, 取平均值, 多因素比较经方差分析。

2 结果

2.1 CCL₂₂₉ 细胞诱导前后 PKC 活性

RA、1, 25 (OH)₂VD₃ 诱导 CCL₂₂₉ 细胞 2d、PMA 诱导 6 h 后 PKC 活性比较如表 1 所示。可见, 诱导后 PKC 总活性较对照组明显升高

表 1 RA、1, 25 (OH)₂VD₃ 及 PMA 诱导 CCL₂₂₉ 细胞 PKC 活性比较

	细胞质 PKC 比活性 /pmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	细胞膜 PKC 比活性 /pmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	总活性 /pmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹	倍数
RA	14.17 ± 2.89 ¹⁾	6.17 ± 2.30	20.34 ± 5.17 ¹⁾	2.69
1, 25 (OH) ₂ VD ₃	12.74 ± 2.89 ¹⁾	10.23 ± 2.35	22.96 ± 4.98 ¹⁾	2.40
PMA	2.82 ± 0.94 ¹⁾	15.59 ± 1.97 ¹⁾	18.41 ± 2.93 ¹⁾	0.53
对照	5.31 ± 1.45	6.67 ± 1.92	11.98 ± 3.35	1

¹⁾表示与对照比较, P < 0.05。

($P < 0.05$), RA、1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 引起细胞质 PKC 比活性升高 ($P < 0.05$), PMA 引起细胞质 PKC 比活性降低 ($P < 0.05$), 细胞膜 PKC 比活性上升 ($P < 0.05$), 细胞膜 PKC 比率 (细胞膜活性/总活性) 显著增加. 提示 CCL $_{229}$ 细胞经 PMA 诱导后 PKC 从细胞质向细胞膜转移.

2.2 CCL $_{229}$ 细胞诱导前后 PKC 抑制剂活性

本实验以牛精子中 PKC 抑制剂对 CCL $_{229}$ 细胞中 PKC 的抑制活性来反映 CCL $_{229}$ 细胞内 PKC 抑制剂活性. 取各样品细胞质上清, 分别为 10、20、40、80 μ l, 测定其对 PKC 活性抑制程度. 可见随着细胞质上清量的增加, PKC 抑制活性逐渐升高 (图 1). 经 RA、1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 及 PMA 诱导后抑制活性分别为 (40.75 $\pm$ 16.43)%, (21.43 $\pm$ 4.20)% 及 (54.11 $\pm$ 6.49)%, 较对照组 (57.24 $\pm$ 9.60)% 降低, 其中 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 与对照组有明显差异 ($P < 0.05$).

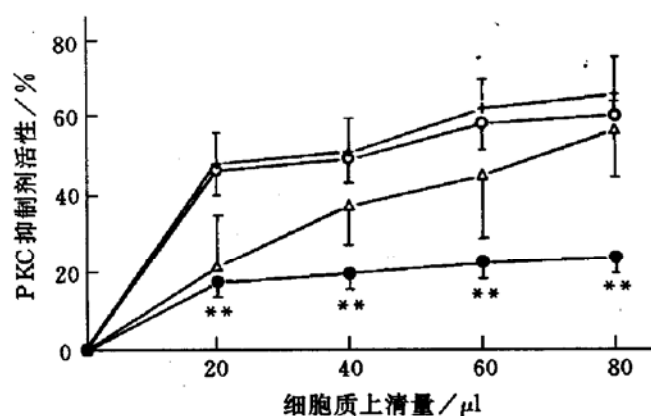


图1 RA、1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 、PMA 诱导 CCL $_{229}$ 细胞 PKC 抑制剂活性比较

●—●: 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$; Δ — Δ : RA; ○—○: PMA; +—+, 对照. ** 表示与对照比较 $P < 0.05$.

3 讨 论

PKC 广泛参与细胞的增殖与分化, 被认为是大肠癌发生的生理标志^[6], 其活性在正常人大肠粘膜中比患大肠癌患者的正常大肠粘膜中的高, 我们曾检测大肠癌患者术后正常大肠粘

膜、癌周及癌组织这一连续癌变过程 PKC 活性, PKC 总活性依次降低^[7]. 本实验发现 CCL $_{229}$ 细胞经 RA、1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 及 PMA 诱导后 PKC 总活性较对照组升高, 作用趋势与癌变过程相反, 可见 CCL $_{229}$ 细胞经诱导向成熟细胞分化过程中, PKC 活性起重要作用.

关于不同分化诱导剂通过 PKC 途径作用的机制, 许多研究认为^[8], 诱导剂与细胞表面特异受体结合, 通过 G 蛋白, 激活磷酸二酯酶, 从而降解磷脂酰肌醇, 产生二酰基甘油 (DG) 和 1, 4, 5-三磷酸肌醇 (IP $_3$), DG 激活 PKC, IP $_3$ 引起 Ca $^{2+}$ 从内质网贮库中释放出来^[9], 同时, PKC 与 Ca $^{2+}$ 、磷脂形成复合物从细胞质向细胞膜转移, 继而 PKC 受中性蛋白酶降解为催化片段 (PKM) 和调节片段 (R), 前者使细胞内某些蛋白质磷酸化, 后者结合到 DNA, 激活基因表达, 从而调节细胞分化信息. PMA 是一种佛波酯, 具有 DG 作用, 能直接激活作为佛波酯受体的 PKC, 从实验结果看, 它诱导 CCL $_{229}$ 细胞分化是通过 PKC 向细胞膜转移机制而起作用的. RA 虽引起细胞质 PKC 活性升高, 但细胞膜 PKC 比率降低, 可见, 在 RA 作用过程中未发生 PKC 向细胞膜转移现象, 这与 RA 诱导 HL-60 细胞^[10] 和 SMMC-7721 细胞分化^[11] 结果符合. Hashimoto 等^[10] 发现 RA 在诱导 HL-60 细胞分化时, 细胞质 PKC $_{\beta}$ 亚型活性升高, PKC $_{\alpha}$ 和一未确定的 PKC 亚型活性降低, 至于 PKC 亚型在 RA 诱导 CCL $_{229}$ 细胞分化时如何起调节作用的尚待进一步研究. 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 对不同细胞株作用引起的 PKC 活性变化是不同的, 它在诱导人组织细胞淋巴瘤细胞株 U-937 分化^[12] 和 BALB 3T3 细胞转化^[13] 时未引起 PKC 向细胞膜转移, 这与我们以 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 诱导 CCL $_{229}$ 细胞 2 d 的结果一致. 而 Wali 等^[14] 以 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 作用结肠癌细胞株 CaCo-2 1~15 min, 发现在 1~5 min 出现最明显的 PKC 向细胞膜转移现象, 这我们的结果不一致, 可能有以下原因: a. 大肠癌细胞株不同; b. 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 作用时间不同, 当 Wali 等以 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 作

用到 5~15 min 时,发现 PKC 向细胞膜转移趋势逐渐减弱直至恢复到原先水平,这可以解释为什么我们以 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 诱导 2 d 时未发生 PKC 向细胞膜转移,是否我们将 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 作用时间缩短也出现此现象,尚待进一步证实。

目前发现的内源性 PKC 抑制剂有许多种^[15,16],有着不同的特性及功能,本实验应用的是于秉治等^[4,17]从牛精子中分离纯化的一种 PKC 抑制剂,已证明该种 PKC 抑制剂对 PKC 活性呈反竞争性抑制,对培养的 L₉₂₉ 细胞和 HeLa 细胞的生长增殖有抑制作用。文献 [18] 报道该种抑制剂在正常白细胞中的活性高于白血病细胞,被认为可能是一种未知的抗癌基因的产物。从我们的实验结果看,这种 PKC 抑制剂在 RA、 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 及 PMA 诱导的 CCL₂₂₉ 细胞成熟分化后却降低,其中 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 组与对照组有明显差异,与上述学者报道不一致。有可能是因为: a. 我们采用的是体外培养的肿瘤细胞,经 RA、 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 及 PMA 体外诱导后未完全分化成正常细胞; b. 研究的肿瘤不同,我们研究的对象是大肠癌细胞。因此,有可能这种 PKC 抑制剂在不同的肿瘤细胞在不同刺激条件下表现出不同的活性强度,其作用有待进一步研究。

我们还发现, CCL₂₂₉ 细胞经 RA、 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 及 PMA 诱导后, PKC 活性与 PKC 抑制剂显示出不同的相对均衡关系。RA、 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 组 PKC 活性相对 PKC 抑制剂活性高, PMA 组 PKC 活性与 PKC 抑制剂活性均降低。这与 RA、 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 及 PMA 通过 PKC 途径诱导 CCL₂₂₉ 细胞的作用机制有一定关系。RA、 $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 不引起 PKC 向细胞膜转移,其 PKC 活性均相对 PKC 抑制剂活性高; PMA 引起 PKC 向细胞膜转移,其 PKC 活性与 PKC 抑制剂活性均降低。这种相关性可能与不同药物在诱导 CCL₂₂₉ 细胞分化过程中的作用机制有关。我们认为,有可能这种 PKC 抑制剂在不同细胞和不同诱导刺激下产生不同的效应,参与对 PKC 活性的正、负两方面调节,

实现对信息的上调、下调,以协调细胞功能,促进细胞分化。目前发现,内质网(ER)膜上分布着一种 PKC 亚型 PKC_γ^[19],这种 PKC 亚型与细胞分化密切相关。众所周知,ER 是分泌蛋白、磷脂、胆固醇合成的场所,具有蛋白糖基化的作用,ER 膜上 PKC_γ 的分布变化可能与 PKC 激活、PKC 抑制剂活性调节密切相关。我们将继续进行这方面的研究工作,这对深入了解细胞分化及其调控机制是十分有意义的。

参 考 文 献

- 1 Nishizuka Y. Science, 1986; **233**: 305
- 2 王芸庆,刘友华,谢荣林等. 中国医科大学学报, 1992; **21** (5): 321
- 3 刘友华,王芸庆. 实验生物学报, 1985; **18** (4): 389
- 4 于秉治. 中国医科大学学报, 1989; **18** (4): 241
- 5 Lowry O H. J Biol Chem, 1951; **193**: 265
- 6 Sakanoue Y, Hatada T, Kusunoki M *et al.* Int J Cancer, 1991; **48**: 803
- 7 王红梅,宋今丹. 肿瘤, 1995; **15** (2, 增刊): 154
- 8 Berridge M J, Irvine R F. Nature, 1989; **341**: 197
- 9 Alkon D L, Rasmussen H. Science, 1988; **239**: 998
- 10 Hashimoto K. Kobe J Med Sci, 1990; **36**: 87
- 11 刘毅,艾兆伟,陈惠黎. 生物化学杂志, 1990; **6**(6): 553
- 12 Mezzetti O, Bagnara G P, Monti M C *et al.* Life Sci, 1987; **40**: 2111
- 13 Sasaki K, Chida K, Hashiba H *et al.* Cancer Res, 1986; **46**: 604
- 14 Wali R K, Charles L B, Merry J G *et al.* Endocrinology, 1992; **131** (3): 1125
- 15 Schwantke N, Lepeuch C J. FEBS Lett, 1984; **177**: 36
- 16 Eyster K M. Biochem Biophys Res Commun, 1990; **168** (2): 609
- 17 金壮,于秉治. 中国医科大学学报, 1989; **18** (增刊): 5
- 18 杨斌,于秉治. 中国医科大学学报, 1993; **22** (专刊): 16
- 19 Kazuhiro C, Hiroshi S, Yasutoshi S *et al.* Mol Cell Biol, 1994; **14** (6): 3782

Study on Relationship Between Protein Kinase C, Its Inhibitor and Differentiation of Human Colorectal Cancer Cell CCL₂₂₉. Wang Hongmei, Yu Bingzhi¹⁾, Wang Yunqing, Song Jin-

dan (Department of Cell Biology, China Medical University, Shenyang 110001, China;

¹⁾Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001, China).

Abstract Protein kinase C (PKC) and its inhibitor activities were measured in human colorectal cancer cell line CCL₂₂₉ induced by retinoic acid (RA) and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25 (OH)₂VD₃) both for two days and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for six hours. The results showed that total PKC activity was markedly increased after treatment with three inducers ($P < 0.05$). The cytosolic PKC activities were significantly increased in RA and 1, 25 (OH)₂VD₃ treated

CCL₂₂₉ cells ($P < 0.05$). In PMA-treated cells, the membrane ratio (membrane activity/total activity) was significantly increased ($P < 0.01$). The levels of PKC inhibitor in cytosolic membrane supernatants after treatment with three inducers were all decreased. Among these three inducers, 1, 25 (OH)₂VD₃ caused significantly difference compared with control. The results implied that PMA translocates PKC from the cytosolic to membrane fraction, PKC and its inhibitor in RA, 1, 25 (OH)₂VD₃ and PMA-induced cells are in different relatively parallel relationship.

Key words protein kinases C, inhibitor, human colorectal cancer cells, differentiation

人 GM-CSF 在链霉菌中分泌表达的研究

刘岱岚 强伯勤 袁建刚 李元¹⁾ 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要 对链霉菌表达体系 pIJ459/*S. lividans* TK54 中表达外源基因 hGM-CSF 的可行性进行了探索, 分析了影响外源基因表达的某些因素如: SD 与 ATG 之间的距离, 时间对表达的诱导等. 为获得外源基因的高效表达探索了最适条件, 然后利用 MEL 信号肽与目的基因片段融合, 在链霉菌中获得了分泌型 hGM-CSF 表达产物, 其中有 1/3 直接分泌到培养基中, 其纯化产物经 TF-1 细胞培养及集落形成实验均证实其生物学活性达到 5 MU/L.

关键词 集落刺激因子, 基因表达, 链霉菌, 信号肽

1 引言

链霉菌是一种很有应用前景的表达体系, 它可以获得外源基因的分泌表达, 表达产物直接进入培养基中, 并且具有糖基化形式. 粒细胞-单核巨噬细胞集落刺激因子有多种生物学活性, 作用于多种细胞系, 其主要作用是刺激造血祖细胞增殖, 从静止期进入 S 期并分化为粒细胞、单核巨噬细胞. 临床上用于治疗多种原因引起的白细胞减少症. 首先在链霉菌中获得了 GM-CSF 的胞内表达产物, 在此基础上利

用 MEL 信号肽分泌表达 GM-CSF, 其中有 1/3 直接分泌到培养基中. 表达蛋白占菌体总蛋白的 15%. 集落形成实验及 TF-1 细胞培养均证实了表达产物的生物学活性.

2 材料与方法

2.1 材料

链霉菌表达质粒 pIJ459^[1]、pIJ702^[2] 和变铅青链霉菌 *S. lividans* TK54 菌株均来自英

¹⁾中国医学科学院医药生物技术研究所.

收稿日期: 1995-02-13, 修回日期: 1995-06-10