

神经节苷脂类抑制 BT325 细胞系的生长

李爱华 黄如彬 杨典洱 金有豫¹⁾

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

摘要 应用自提的神经节苷脂 GM3, 牛脑神经节苷脂 (bovine brain gangliosides, BBG) 加入低血清培养的人多形成胶质细胞瘤 BT325 细胞中观察其对该细胞系的影响; 以及 GM3、BBG 对表皮生长因子 (EGF) 刺激该细胞系生长的拮抗作用. 结果表明 GM3、BBG 均能抑制 BT325 细胞生长, GM3 的抑制作用远高于 BBG, 其抑制率为 60.28% ($P < 0.01$), BBG 为 19.33%, 在含不同浓度的 EGF 培养液中分别加入 GM3、BBG 均可拮抗 EGF 对 BT325 生长的刺激作用, GM3 的拮抗作用远高于 BBG.

关键词 神经节苷脂 GM3, 牛脑神经节苷脂, 抑制作用, 人多形成胶质细胞瘤 BT325, 表皮生长因子

神经节苷脂 (gangliosides, GLS) 广泛存在于各种脊椎动物细胞质膜的外侧面, 为膜的组成单位, 其中以神经组织尤其是脑组织中含量最高, 神经节苷脂具有多种重要生物学功能^[1,2], 文献报道外源性神经节苷脂可抑制某些癌细胞的生长^[3,4], 但未见它对人多形成胶质细胞瘤 BT325 细胞系生长影响的报道. 我们选择北京天坛医院神经外科研究所邵文钊教授从病人取材建立的 BT325 细胞系^[5]为实验材料, 用自提 GM3、BBG 研究对该细胞生长的影响及 GM3、BBG 与表皮生长因子 (EGF) 共同作用对 BT325 细胞系增殖的影响.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

GM3, BBG (自提取)^[6]; EGF (Sigma); IMDM 培养基 (GIBCO); 全自动酶联检测仪 (Sigma); 96 孔细胞培养板 (NUNC, 丹麦); 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 BT325 细胞培养: 用含 5% 小牛血清的 IMDM 培养液 (pH 7.4), 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 72 h 传代一次.

1.2.2 GM3, BBG 的配制: 将一定量自行提取的 GM3 和 BBG 超声溶于少量不含小牛血清

的 IMDM 中, 用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤除菌.

1.2.3 GM3 和 BBG 对 BT325 生长曲线的影响: 取对数期的 BT325 细胞, 用 0.5% 的胰酶消化, 以含 5% 血清的培养基将细胞稀释成 1×10^5 /ml, 按每瓶 1 ml 接种于 10 ml 的小培养瓶中, 待贴壁后分别加入终浓度为 100 μmol/L 的 GM3、BBG 继续培养, 每隔 24 h 取细胞消化, 台盼蓝染色, 镜下计数, 连续 6 d, 测定其生长曲线.

1.2.4 GM3 和 BBG 对 BT325 细胞增殖的影响: 取对数期的 BT325 细胞, 用 0.5% 的胰酶消化, 以含 5% 血清的培养基细胞稀释至 1×10^5 /ml, 按每孔 100 μl 接种于 96 孔细胞培养板 (1×10^4 /孔), 置 37℃ 二氧化碳培养箱中保温 12 h, 加入不同剂量的 GM3 (25、50、75、100 μmol/L), BBG (25、50、75、100 μmol/L), 各孔加含血清培养基至 200 μl, 继续保温不同时间 (24、48、72、96、120 h) 后取出, 在细胞固定染色液中浸染 20 min, 然后用去离子水漂洗, 浸泡 15 min, 待自然晾干后, 每孔加入 100 μl 结晶紫提取液, 在全自动酶联免疫检测仪于 595 nm 处测定吸光

¹⁾首都医科大学药物研究所, 北京 100054.

收稿日期: 1995-05-07, 修回日期: 1996-11-11

值^[7]。

1.2.5 GM3、BBG 与 EGF 共同作用对 BT325 细胞增殖的影响: 取对数期的致密单层 BT325, 用 0.5% 胰酶消化后, 以含 5% 血清培养基将细胞稀释至 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 按每孔 200 μl 接种于 96 孔细胞培养板 ($2 \times 10^4/\text{孔}$), 分成 4 组, A 组不加 EGF 作为空白对照, B、C、D 各组分别加入不同剂量 EGF (1、2、4、6、8、10、20 $\mu\text{g/L}$), 温育 12 h 后, 再于 C、D 组分别加入 GM3、BBG ($100 \mu\text{mol/L}$), 继续温育 72 h, 自细胞固定染色后, 各步骤同 1.2.4。

2 实验结果

2.1 GM3、BBG 对细胞增殖的影响

神经节苷脂 GM3 和 BBG 对 BT325 有抑制作用, 其中 GM3 的作用大于 BBG (图 1),

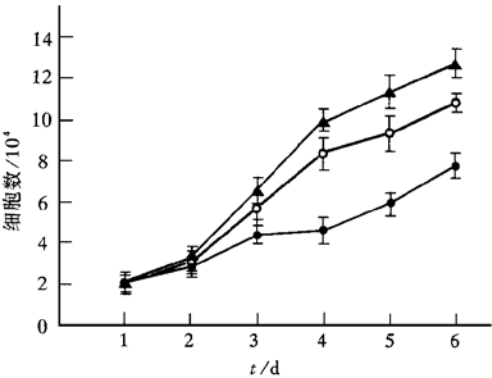


图 1 100 $\mu\text{mol/L}$ GM3、BBG 对 BT325 细胞生长曲线的影响

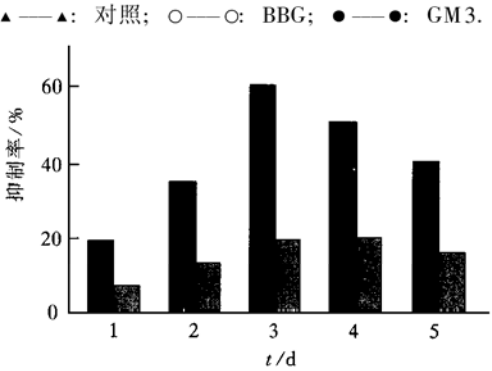


图 2 GM3、BBG 对 BT325 作用的时效曲线

且第三天抑制率最强, GM3 为 60.28%, BBG 为 19.33%, 所以最适的时间选择 72 h (图 2), 在 25~100 $\mu\text{mol/L}$ 之间, GM3 与 BBG 的抑制作用呈浓度依赖性, 所以选择 GM3 与 BBG 的最适浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ (图 3, 表 1)。

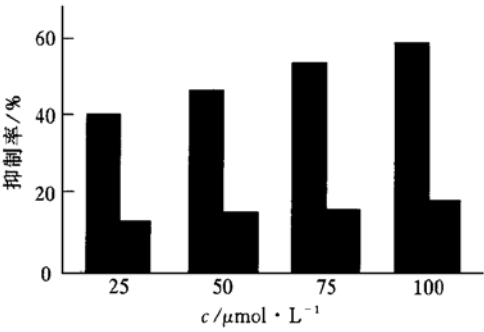


图 3 GM3、BBG 对 BT325 作用的量效曲线

表 1 GM3、BBG 对 BT325 细胞增殖的作用

c/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	吸光值		
	GM3	BBG	对照
25	$0.337 \pm 0.056^{1)2)}$	0.495 ± 0.058	0.564 ± 0.049
50	$0.297 \pm 0.053^{1)2)}$	$0.476 \pm 0.052^{3)}$	
75	$0.261 \pm 0.078^{1)2)}$	0.468 ± 0.063	
100	$0.224 \pm 0.068^{1)2)}$	0.455 ± 0.059	

$\bar{x} \pm s$, $n = 4$. ¹⁾ $P < 0.01$ ³⁾ $P < 0.05$ vs 对照组; ²⁾ $P < 0.01$ vs BBG.

由表 1 可以看出, BBG 对 BT325 有抑制作用, GM3 的抑制作用有显著性意义 ($P < 0.01$), 而且 GM3 与 BBG 对 BT325 抑制作用有显著性差异 ($P < 0.01$).

2.2 半抑制浓度 IC_{50}

以 $\lg c$ 为横坐标, 抑制率为纵坐标, 从图 4 求出 $IC_{50} = 56.23 \mu\text{mol/L}$, 而 BBG 在 25~100 $\mu\text{mol/L}$ 之间最大抑制率 $< 50\%$, 所以 GM3 的作用大于 BBG。

2.3 GM3、BBG 与 EGF 的拮抗作用

当培养基中加入的 EGF 浓度由低到高递增时, 对照组的增殖倍数递增. 在上述 EGF 浓度中分别加入 GM3 和 BBG 时, 与对照组相比较, GM3 的拮抗作用最明显 ($P < 0.01$)

(图 5, 表 2).

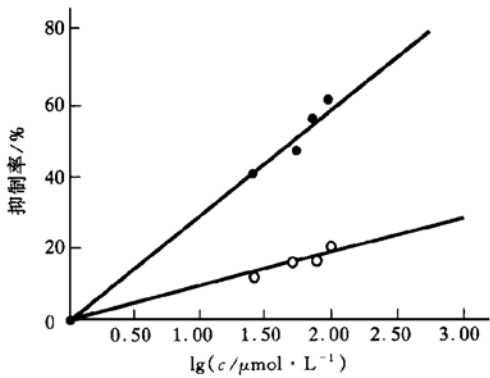
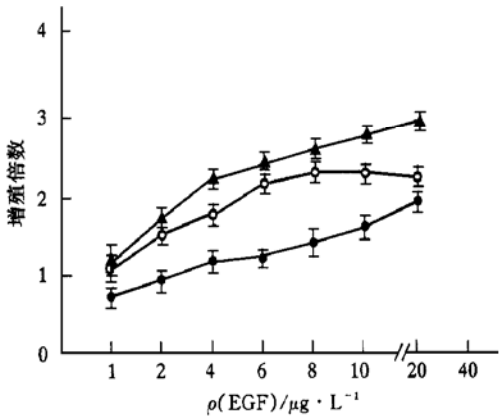


图 4 GM3、BBG 处理 BT325 的 IC_{50}
●—●: GM3; ○—○: BBG.



5 GM3、BBG 抑制 EGF 刺激的 BT325 细胞增殖
▲—▲: 对照; ○—○: BBG; ●—●: GM3.

表 2 GM3、BBG 对 EGF 刺激的 BT325 细胞增殖的作用

ρ (EGF) / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	增殖倍数		
	GM3	BBG	对照
1	$0.728 \pm 0.122^{1)2)}$	1.065 ± 0.129	1.175 ± 0.160
2	$0.953 \pm 0.115^{1)2)}$	1.558 ± 0.073	1.723 ± 0.137
4	$1.188 \pm 0.115^{1)2)}$	$1.810 \pm 0.079^{1)}$	2.243 ± 0.099
6	$1.245 \pm 0.068^{1)2)}$	$2.198 \pm 0.100^{3)}$	2.440 ± 0.096
8	$1.465 \pm 0.163^{1)2)}$	$2.345 \pm 0.087^{1)}$	2.635 ± 0.123
10	$1.658 \pm 0.141^{1)2)}$	$2.330 \pm 0.066^{1)}$	2.838 ± 0.076
20	$2.000 \pm 0.128^{1)2)}$	$2.310 \pm 0.127^{1)}$	3.015 ± 0.093

$\bar{x} \pm s$, $n = 4$. ¹⁾ $P < 0.01$ ³⁾ $P < 0.05$ vs 对照组; ²⁾ $P < 0.01$ vs BBG. 增殖倍数 = 细胞数 (加入 EGF) / 细胞数 (未加 EGF).

3 讨 论

80 年代, 华盛顿大学的 Hakomori 实验室发表了系列文章, 证明多种细胞的生长都可被神经节苷脂所抑制. Bremer 和 Hakomori^[8] 选用鼠 Swiss3T3 细胞, 在无血清培养条件下加入外源性神经节苷脂发现, GM1 与 GM3 均能抑制其细胞生长. 后来用同样的方法研究发现 GM3、GM1 对人口腔上皮样细胞癌 (KB) 及人卵巢上皮样细胞癌 (A431)^[9] 亦有抑制作用. 本实验结果表明: 在低血清培养的多形胶质母细胞中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ GM3 能明显抑制其细胞增殖, 而 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 BBG 的作用则明显减弱. 我们推测在 BT325 细胞膜上可能存在着相应受体, 外源性神经节苷脂与膜受体结合后, 使膜脂流动性受影响, 并与膜结合的功能蛋白相互作用, 调节蛋白质活性从而影响膜介调的信号功能, 这与 Yoshisaka 提出在 4 种糖介调的信号转导作用中, GM3 可以改变膜受体的功能的观点相似. 上述两种神经节苷脂抑制作用的差异在于 BBG 只含有 GM1、GD1a、GD1b 和 GD3 而不含有 GM3, 推测在 BT325 细胞膜上只存在着单唾液酸神经节苷脂受体, 这类受体对双、三-唾液酸神经节苷脂很少或无结合能力, 并对单唾液酸在神经节苷脂分子中的位置有一定要求.

EGF 是一种通过第二信使调节细胞生长的生长因子. 但 EGF 对不同的肿瘤细胞表现出不同结果, 在 Werner 等^[10] 的研究中, 用 EGF 处理 4 个恶性胶质瘤细胞系, 结果表明 EGF 对 2 个呈现促进作用, 1 个呈现抑制作用, 1 个呈现无作用. 本实验结果表明 EGF 促进 BT325 细胞的增殖, 并随浓度增加而递增. GM3 可抑制 EGF 对 BT325 的促进增殖作用, 而 BBG 则不同, 只是在 EGF 浓度高于 8 $\mu\text{g/L}$ 时才有抑制作用, 此现象如何解释以及 GM3 抑制 EGF 的机理, 其详尽机制有待于进一步探讨.

参 考 文 献

1 Schneider S. Recovery from experimental parkinsonism in

primates with GM1 ganglioside treatment. *Science*, 1992, **256**: 843~ 846

2 Hakomori S I. Biofunctional role of glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interaction. *J Biol Chem*, 1990, **256**: 18713~ 18716

3 Chandrabose K A, Graham J M, Macpherson I. Glycolipid glycosyl transferase of a hamster cell in culture. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **429**: 112~ 122

4 Langenbach R, Kennedy S. Gangliosides and their cell density-dependent changes in control and chemically transformed C3H/10T1/2 cell. *Exp Cell Res*, 1978, **112**: 361~ 372

5 邵文钊, 郑玉书, 历俊华等. 人脑多形胶质母细胞瘤细胞系 BT325 的建立及生物学特性. *中华神经外科杂志*, 1988, **64** (2): 103~ 107

6 黄如彬, 潘颖, 王泽生等. 猪脑中提取高纯度神经节苷脂. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21** (5): 444~ 446

7 Gillied R T, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer culture. *Anal Biochem*, 1986, **159**: 109~ 111

8 Bremer E G, Hakomori S. Ganglioside-mediated modulation of cell growth factor binding and receptor phosphorylation. *J Biol Chem*, 1984, **259**: 6818~ 6825

9 Bremer E G, Schlessinger J. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. *J Biol Chem*, 1986, **261**: 2434~ 2440

10 Werner K H. Growth effects and monoclonal antibody against the EGF receptor on four glioma cell. *Acta Neuropathol*, 1988, **77**: 196~ 201

Gangliosides Inhibit Growth of Human Glioblastma Multiform Cell Line BT325. LI

Aihua, HUANG Rubin, YANG Dianer, JIN Youyu¹⁾ (*Department of Biochemistry, Capital University of Medical Science, Beijing 100054, China;* ¹⁾ *Institute of Pharmaceutics, Capital University of Medical Science, Beijing 100054, China*).

Abstract Ganglioside GM3 and bovine brain Gangliosides (BBG) were added exogenously to human glioblastma multiform cell line BT325 to observe their effects on BT325. The results showed that GM3 and BBG inhibited BT325 cell growth. The maximum of cell proliferation inhibition rate of GM3 and BBG were 60.28% and 19.33%, respectively. GM3 and BBG were added to medium which has different concentration of EGF. Both GM3 and BBG inhibited the EGF-stimulated BT325 cell growth and the effects of GM3 is far stronger than BBG.

Key words ganglioside GM3, bovine brain gangliosides, inhibition, human glioblastoma multiform cell line BT325, epidermal growth factor (EGF)

细胞周期和骨架在 CNE-2Z 细胞凋亡中的变化*

何志巍 陈南岳 廖新波¹⁾ 蔡康荣²⁾
(广东医学院病理生理学教研室, 湛江 524023)

摘要 采用 DNA 电泳、PI 染色流式细胞仪 (FCM) 分析和激光共聚焦显微镜 (LCM) 观察, 检测了蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂诱导 CNE-2Z 细胞凋亡时细胞周期和骨架的改变. PKC 抑制剂 staurospoine (ST)、sphingosine (SS), 终浓度分别为 1×10^{-6} mol/L 和 4×10^{-5} mol/L, 诱导细胞 24 h. 结果发现处理组细胞均有典型的 DNA 亚二倍体峰, DNA 电泳有梯状图谱; 细胞周期百分比 SS 组较对照组 S 期增加及 G1 期减少明显 ($P < 0.05$); ST 组 G2 期增加、G1 和 S 期显著减少 ($P < 0.01$). 对照组细胞染色质分布均匀; 胞质微丝呈细颗粒状, 均匀分布. 诱导细胞染色质碎裂呈不规则缺损; 胞质微丝散乱, 颗粒粗大, 排列不均. 结果表明, SS、ST 可诱导 CNE-2Z 细胞凋亡, 细胞周期和骨架在细胞凋亡时, 均发生了明显改变.

关键词 蛋白激酶 C, 抑制剂, 鼻咽肿瘤, 凋亡, 细胞周期, 骨架

* 广东省科委课题资助 (950661). ¹⁾ 广东医学院病理教研室, 湛江 524023.
²⁾ 广东医学院中心实验室, 湛江 524023. 收稿日期: 1996-05-07, 修回日期: 1996-10-14