

胰 RNA 对瘤细胞作用的研究

——胰 RNA 对离体瘤细胞的杀伤作用及其有效组分的初步探讨

郑益星 韩明爱* 申忠健

(延边医学院生化教研室)

提 要

在体外培养瘤细胞的实验中,胰 RNA 提取物不仅对艾氏腹水癌细胞而且对其他瘤细胞(S_{180} 、 P_{388} 、 H_{22})也具有杀伤作用。在胰 RNA 提取物中,对瘤细胞具有杀伤作用的活性物质不是外源性凝集素样多糖类或能透过半透膜的低分子化合物,而是具有一定二级结构的低分子 RNA。

根据胰 RNA (BPRNA) 在体外对艾氏腹水癌细胞 (EC) 具有直接杀伤作用的实验结果^[1],我们进一步观察了 BPRNA 对其他瘤细胞的影响。结果表明,BPRNA 不仅对 EC 而且对其他几种瘤细胞(S_{180} 、 P_{388} 、 H_{22})也具有同样的杀伤作用。

为了解 BPRNA 的作用和性质又作了接触试验(BPRNA 与瘤细胞在加进培养液之前先把两者混合接触后同时加入培养液中再观察其杀伤瘤细胞的作用)、透析处理、除糖操作、凝胶层析以及破坏二级结构的因素处理等实验。结果表明,BPRNA 与瘤细胞直接接触的时间越长,其杀伤瘤细胞的效果越大。表现活性的物质不是外源性凝集素样多糖类物质或能透过半透膜的低分子化合物,而是具有一定二级结构的低分子的 RNA。

材 料 与 方 法

1. BPRNA 用动物胰脏组织为原料,用 SDS-热酚法^[2]提取 RNA,其主要成分是低分子 RNA。

2. 瘤细胞株 EC、 S_{180} 、 P_{388} 、 H_{22} 等瘤细胞株由北京中国医学科学院药物研究所肿瘤药

理研究室供应。

3. 培养液 含 10% 小牛血清的 Eagle 培养液。

4. 台盼蓝染料排斥试验^[3] 以瘤细胞是否与台盼蓝染液着色做为瘤细胞死活标准,并计算出瘤细胞的死亡率 $\left(= \frac{\text{死细胞计数}}{\text{总细胞计数}} \times 100 \right)$ 。

5. 接触实验 在培养瘤细胞的实验中,为观察 BPRNA 对瘤细胞的直接接触能否影响杀伤效果,先把 BPRNA 与瘤细胞混合接触不同时间后,再把两者同时一起加到培养液中,增加 BPRNA 与瘤细胞的直接接触,以便与两者分别加到培养液的实验加以比较。

结 果 与 讨 论

1. 杀伤实验 在每 ml 含有 2.5×10^5 个瘤细胞的 Eagle 培养液中,各加 BPRNA 200 μg (4.4A)/ml 和 400 μg (8.8A)/ml,在 37°C 培养 24 小时后,观察台盼蓝染料的排斥程度,以判断瘤细胞的死亡,并求瘤细胞的死亡率。结果见表 1。体外细胞培养结果表明,BPRNA

* 延边肿瘤医院肿瘤研究室。

表1 BPRNA 对四种瘤细胞的杀伤试验

BPRNA 浓度	瘤细胞死亡(台盼蓝着色)部分(%)			
	EC	P ₃₈₈	S ₁₈₀	H ₂₂
200μg/ml	88±7.2	87±6.7	89±5.3	85±4.2
400μg/ml	99.7±0.58	99.7±0.58	100±0	98±1.5
(对 照)	2.7±2.08	3.3±1.53	3.3±2.52	3.3±1.51

对四种瘤细胞的杀伤作用基本相同。

2. 接触试验 将 BPRNA 与瘤细胞(S₁₈₀)直接接触半分钟或2分钟后,将其加到培养液中,37℃培养24小时,做台盼蓝染料排斥试验观察瘤细胞的死亡率,结果见表2。

表2 BPRNA 与瘤细胞的直接接触试验

BPRNA 浓度	瘤细胞死亡(台盼蓝着色)部分(%)		
	接触2分钟	接触半分钟	分别加样组
50μg/ml	85±6.9	43±5.7	4±2.2
100μg/ml	100±0	81±7.0	8±3.0
200μg/ml	100±0	100±0	79±5.8

未加 BPRNA 的对照组其瘤细胞自然死亡率为5±3.2%。结果表明,BPRNA 与瘤细胞接触时间越长或接触机会越多,其杀伤瘤细胞的效果越好。甚至加样至200 μg/ml的培养瓶经3小时培养后,1500 r/min 离心,沉淀瘤细胞,倒弃培养液,再加未含有 BPRNA 的新培养液,继续培养24小时,也能观察到其杀伤瘤细胞的作用。这种现象具有实际意义,即在临床应用时,BPRNA 与瘤组织直接接触能提高疗效。

3. 透析处理 把 BPRNA 溶液3ml(54A=24.6 mg)装入透析袋,用0.14 mol/L NaCl 溶液做透析外液,在低温下(5—7℃)透析一天,其透析内液的回收率为99.1%,即透析内液仍然含有536 A(24.4 mg)的 BPRNA。其透析内液与透析前的原样品具有同样的杀伤瘤细胞的能力。由此可见,BPRNA 中杀伤瘤细胞的物质不是能透过透析膜的低分子化合物。

4. 除糖处理 用 SDS-热酚法提取胰 RNA,其提取物中可能含有糖类物质,故接着用乙二醇甲醚法^[4]和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[5]除去糖类,这样得到的 BPRNA

不仅具有相同的紫外吸收光谱,而且也具有杀伤瘤细胞的生物活性,其杀伤实验结果见表3。

表3 除糖后的 BPRNA 对瘤细胞杀伤作用的比较

BPRNA 浓度	瘤细胞死亡(台盼蓝染料着色)部分(%)		
	未经除糖处理	乙二醇甲醚法处理	CTAB 处理
300μg/ml	99.3±0.9	97±2.1	95±4.0
600μg/ml	100±0	100±0	100±0

未加 BPRNA 的对照瓶瘤细胞死亡率为4±3%。

此结果表明,BPRNA 对瘤细胞的杀伤作用,与外源性凝集素样多糖类物质的作用无关,而仅是 RNA 本身对瘤细胞的作用。

5. 凝胶过滤层析 在过 Sephadex G50 凝胶柱时可看出 BPRNA 含有两个大组分(图1),第一个大组分又能分成两个组分,把第1个大组分的 BPRNA 用冷酒精沉淀回收后,再加入到 Sephadex-G100 凝胶柱上,就能得到两个组分(见图2),第一组分没有杀伤瘤细胞的作用,杀伤瘤细胞的物质主要分布在第二组分中。如果把 BPRNA 直接加入到 Sephadex G100 凝胶柱上,可看到三个组分(见图3),用冷酒精回收法,把三个组分分别浓缩成一定浓度,然后做瘤细胞(S₁₈₀)的杀伤实验,结果如下。

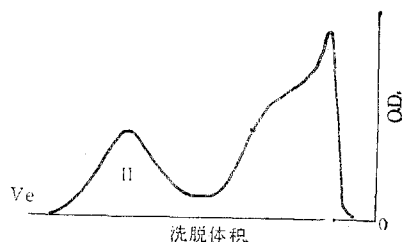


图1 BPRNA 过 Sephadex G50 凝胶时有二大组分

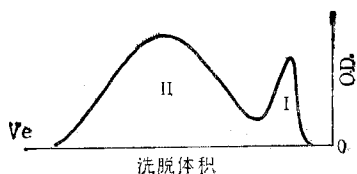


图2 过 Sephadex G50 柱的第一大组分再经过 Sephadex G100 时的层析图

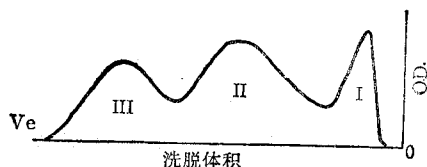


图3 样品直接过 Sephadex G100 柱的层析图

表4 过 Sephadex G100 凝胶柱的三个组分对癌细胞杀伤作用的比较

BPRNA 浓度	癌细胞死亡(台盼蓝染料着色)部分(%)		
	组分 I	组分 II	组分 III
300 μ g/ml	5 $\pm$ 2.5	52 $\pm$ 9.0	14 $\pm$ 6.2
600 μ g/ml	9 $\pm$ 5.0	90 $\pm$ 7.0	46 $\pm$ 6.9

未加 BPRNA 的对照瓶死亡率为 $4 \pm 3\%$ 。从表中可知,能杀伤瘤细胞的活性物质主要分布在组分 II,其次为组分 III。组分 I 是排阻于 Sephadex G 100 凝胶网孔外的大分子核酸,它没有杀伤瘤细胞的作用。在这里能看到过柱后的 BPRNA 失掉一部分原有活性物质,在室温过柱后的 BPRNA 回收率为 $96 \pm 3.2\%$;在低温下 ($5-7^{\circ}\text{C}$) 的回收率为 99.2% 。即 BPRNA 过柱后的回收率为 95% 以上,但是其活性回收只有 $50-60\%$,即过柱的 BPRNA 比原样品只有一半杀伤瘤细胞的活性。这可能意味着, BPRNA 在过柱时其二级结构受到部分的破坏。因此我们做了以下实验。

6. 破坏 BPRNA 二级结构试验 用 0.14 mol/L NaCl 溶液稀释 BPRNA 5 倍,然后把盐酸胍或尿素加至 8 mol/L 或 7 mol/L 的浓度,置于 37°C 水浴 15 分钟,用冷酒精沉淀法回收 BPRNA,做对瘤细胞 (S_{180}) 的杀伤实验,结

果见表 5。

表5 破坏二级结构的 BPRNA 对瘤细胞的杀伤作用

BPRNA 浓度	癌细胞死亡(台盼蓝染料着色)部分(%)		
	盐酸胍处理	尿素处理	原样品
300 μ g/ml	9 $\pm$ 4.1	13 $\pm$ 4.9	100 $\pm$ 0
600 μ g/ml	40 $\pm$ 6.9	51 $\pm$ 7.5	100 $\pm$ 0

未加 BPRNA 的对照瓶的自然死亡率为 $6 \pm 3.3\%$ 。结果表明,经高浓度盐酸胍与尿素处理的 BPRNA 失去原有活性的 $50-60\%$ 。由此可见,这种 BPRNA 的活性与其二级结构有一定关系。我们又发现经冻干浓缩处理 (大气压 20 mmHg , 温度 -50°C) 过的 BPRNA 也同样失去部分杀伤瘤细胞的活性。这种现象具有实际意义。即在制备 BPRNA 注射剂时,其冻干制剂的活性虽能保存较长时间,但其杀伤瘤细胞的生物活性不如新制备的水剂注射液。

到目前为止,尚未阐明 BPRNA 对瘤细胞的作用机制,但在我们前一段实验中发现 ^{125}I 标记的 BPRNA 能参入瘤细胞而抑制 DNA 合成,导致瘤细胞死亡^[1]。本实验结果表明,在 BPRNA 中杀伤瘤细胞的活性物质是具有一定二级结构的低分子 RNA,关于这种 BPRNA 参入瘤细胞后经什么途径杀伤瘤细胞,需要继续研究,其中一个可能性是参入到瘤细胞内的 BPRNA 与瘤细胞信息载体物质之间形成互补结合的杂交体复合物,这种可能性只有在阐明 BPRNA 和瘤细胞信息载体物的一级结构并发现它们之间的共同碱基序列时,才能得到证实。

参 考 文 献

- [1] 韩明爱等:《生物化学与生物物理进展》,1985,3,44.
- [2] Girad, M.: *Methods in Enzymology*, 1967, 12, 581.
- [3] Manford, K. and Patterson, JR.: *Methods in Enzymology*, 1979, 58, 150.
- [4] Kirby, KS: *Biochem. J.*, 1956, 64, 405.
- [5] 木村考一:《蛋白质 核酸 酵素》,1966,11,457.

[本文于 1988 年 2 月 2 日收到]