

二氟甲基鸟氨酸对 HL₆₀ 细胞生长、分化及 c-myc、c-fos 基因表达的影响*

范慕贞 齐上乐 赵成龙 马宇玲 吴克斌

(中日友好临床医学所生化室, 北京)

提 要

多胺生物合成抑制剂—— α -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 对人早幼粒细胞白血病细胞系 HL₆₀ 的生长及 DNA 合成均有剂量依赖的抑制作用。NBT 反应证明 DFMO 能诱导 HL₆₀ 细胞分化。核酸分子杂交实验表明, DFMO 引起 c-myc 基因表达的减少, 而 c-fos 基因表达水平随 DFMO 浓度增加明显增加。c-myc 与 c-fos 表达的相互变化可能与 DFMO 对 HL₆₀ 细胞生长、分化影响有一定关系。

前 言

生理性多胺(腐胺、精胺、精胺)在细胞生长、分化中起着重要作用^[1-3]。生长旺盛的组织中多胺生物合成增加, 其限速酶鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 活性在许多恶性转化组织中明显增高^[4]。ODC 活性的抑制引起多胺合成受阻, 多胺的缺失将引起细胞生长的抑制^[5]。二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 是 ODC 的一种酶激活不可逆抑制剂, 它能引起细胞内腐胺、精胺的减少, 抑制细胞生长^[6], 而且有促细胞分化的作用^[7]。因而多胺生物合成的抑制有可能成为防治肿瘤的新途径。本文不仅证明 DFMO 对 HL₆₀ 细胞有明显的生长抑制和分化诱导作用, 而且能引起 c-myc 基因表达减少、c-fos 基因表达增多。

材 料 与 方 法

1. 细胞培养

HL₆₀ 细胞在含有 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 中, 置 37℃、5% CO₂ 恒温箱内培养。1 × 10⁵ 细胞/ml 中加不同浓度 DFMO (Merrell Dow Research Center, cinci-

nnati, OH), 观察细胞生长。

2. NBT^[8] 还原试验

5 × 10⁴ 细胞/ml 悬浮培养液离心 1000r/min (Hitachi, 20PR-520) 5 分钟, 细胞沉淀中加入 0.5ml, 0.1% NBT/0.9% NaCl, 15μl 0.01% TPA²⁾/PBS³⁾, 37℃ 保温 20 分钟, 离心取细胞涂片计数。细胞内有蓝紫色颗粒沉淀的为阳性反应细胞, 至少计数 200 个细胞, 计算阳性细胞百分数。

3. 细胞质制备^[8]

0.8 × 10⁷ 培养细胞离心 600g, 5 分钟, 将细胞转至 Eppendorf 小管内, 并悬浮在 1ml PBS 中离心 15000g, 15 秒, 细胞沉淀悬浮在 45μl、10mol/L Tris-HCl (pH7.0)/1mol/L EDTA 溶液中, 加 5μl 5% NP-40, 在冰浴中混合 5 分钟, 离心 15000g, 2.5 分钟去细胞核, 取上清 50μl, 加入盛有 30μl 的 20 × SSC⁴⁾, 20μl, 37% 甲醛溶液消毒小管内, 置 60℃ 保温 15 分钟, -70℃ 保存备用。此胞浆

* 国家自然科学基金资助。

1) NBT = Nitroblue Tetrazolium.

2) TPA = 12-O-tetradecanoyl-phorbol-acetate.

3) PBS = 磷酸盐缓冲的生理盐水。

4) SSC = 0.15mol/L NaCl/0.015mol/L 柠檬酸钠。

液用 $15 \times \text{SSC}$ 系列对倍稀释后用 96 孔点样板 (Bio-Rad. U. S. A.) 点在硝酸纤维薄膜上, 薄膜置真空干燥箱 80°C 烤 4 小时后用于斑点杂交。

4. 基因探针制备

c-myc 及 v-fos 基因探针是 Dr. Hartmut Land (MIT. U. S. A.) 惠赠的(分别含有 8.5 kb, EcoRI/HindIII 片段及 5.8kb, HindIII 片段的 PBR322 质粒)。

经在 *E. coli* HB101 中扩增后分离重组质粒, 采用 BRL 公司的 Nick Translation Kit 进行 α - $[-^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (Amersham) 标记。放射比活性为 $5 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{g}$ 。

5. 斑点杂交

按文献 [9] 进行。上述烤干的薄膜先在 $5 \times \text{SSC}$ 中浸透, 再置于 42°C 的预杂交液 (50% 甲酰胺, $5 \times \text{SSC}$ 、0.05mol/L 磷酸钠缓冲液, pH6.5、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鲑精 DNA、0.02% 牛血清白蛋白 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、(0.02% Ficoll 400) 中 24 小时。换含有 $[-^{32}\text{P}]$ 标记的 c-myc 或 v-fos 探针的预杂交液 ($10^6 \text{cpm}/\text{ml}$) 中。在 42°C 杂交 24 小时后, 用 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 室温洗四次, 每次 5 分钟, 再用 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 于 50°C 洗二次, 每次 15 分钟, 薄膜室温晾干后用 x-光胶片加增感屏在 -80°C 曝光 3 天, 显影后进行放射自显影片密度扫描定量 (MPM-2 microdensitometer)。

6. $[\text{H}]\text{-}$ 胸腺嘧啶脱氧核苷参入实验

6×10^5 细胞置 7ml 含有不同浓度 DFMO 的培养基中 37°C 、5% CO_2 恒温箱内培养 24, 48, 72 小时后换去培养基, 加含 $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{-thymidine}$ (80Ci/mmol, 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) 的培养基, 继续培养 1 小时, 用不含血清的培养基洗二次再悬浮在 0.5ml PBS 溶液中, 加等体积 10% TCA, 沉淀用玻璃纤维膜抽滤, 5% TCA 洗膜, 抽干后放入液体闪烁液中 (3gPPO, 0.3g POPOP/L 二甲苯), 置液闪计数器 (Beckman, LS9800) 计数。

结 果

一、DFMO 对 HL₆₀ 细胞生长的影响

HL₆₀ 细胞培养液中加入 DFMO (0.5mmol/L—5mmol/L) 观察细胞生长情况。结果如图 (1) 所示。DFMO 对 HL₆₀ 细胞生长有明显抑制作用, 且与 DFMO 有剂量依赖关系。DFMO 作用时间愈长其影响愈为显著 (图 1, 图 2a)。当 DFMO 浓度为 3mmol/L 时, 一天后细胞约为对照组的 85%, 二天后为 65%, 三天后为 33%,

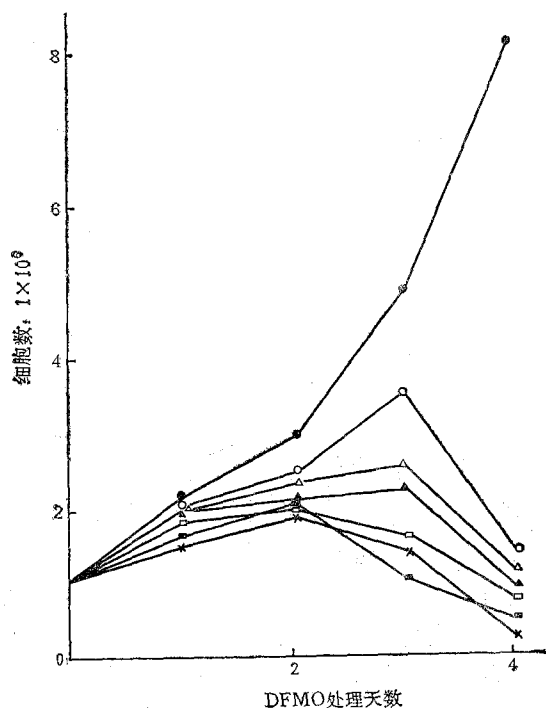


图 1 DFMO 对 HL₆₀ 细胞生长的影响
DFMO (mmol/L): —●— 0, —○— 0.5, —△— 1, —▲— 2, —□— 3, —■— 4, —×— 5mmol/L

至四天时细胞减至对照组的 10% 左右。

二、DFMO 抑制 HL₆₀ 细胞 DNA 的生物合成

$[\text{H}]\text{-}$ 胸腺嘧啶脱氧核苷参入实验结果表明 DFMO 能抑制 HL₆₀ 细胞的 DNA 生物合成。如加 3mmol/L DFMO 于 HL₆₀ 细胞培养液中, 一天后 DNA 合成减少至对照组的 40%, 三天后仅为对照组的 5% 以下 (图 2b)。

三、DFMO 对 HL₆₀ 细胞 NBT 还原反

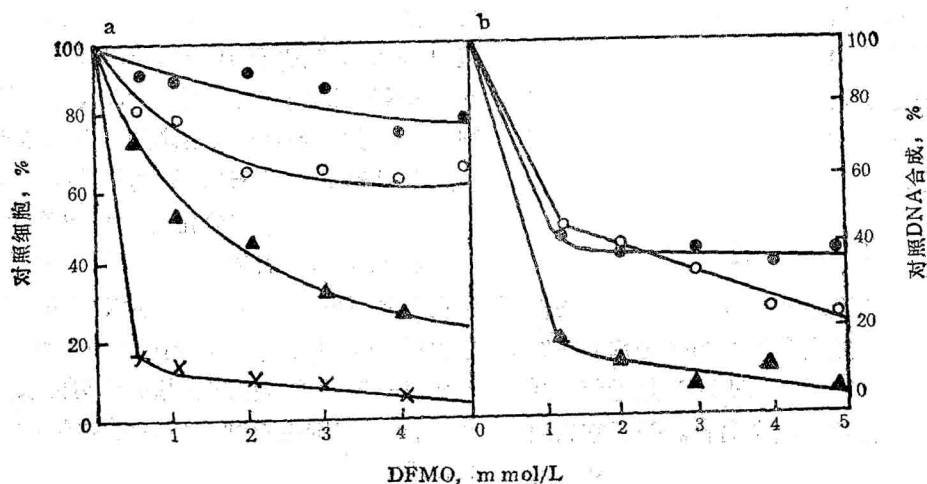


图2 DFMO 对 HL₆₀ 细胞生长及 DNA 合成的影响

DFMO 处理天数: --1, -○-2, -▲-3, -×-4 天

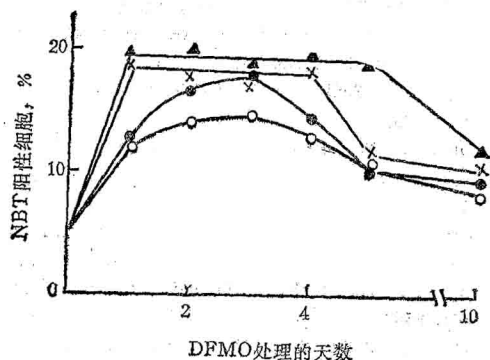


图3 DFMO 对 HL₆₀ 细胞的分化诱导

DFMO (mmol/L): --○-0.5, --□-1.0,

--▲-2.0, --×-3.0 mmol/L

应的诱导

正常中性粒细胞在 TPA 刺激时使 NBT 还原能力增强,而 HL₆₀ 细胞群中一般仅有 5% 左右细胞具有 NBT 还原能力。本文结果所示 HL₆₀ 细胞群 NBT 阳性反应细胞平均为 5%。

在 DFMO 作用下 HL₆₀ 细胞的 NBT 还原能力明显增强 (图 3)。当 DFMO 浓度为 2 或 3mmol/L 时,作用一天后阳性细胞百分数约增至对照组的 4 倍(20%)。在不再重新加 DFMO 的情况下,这样增高的水平仍能维持 3—4 天,说明 DFMO 有一定的诱导分化作用。

四、DFMO 对 HL₆₀ 细胞 c-myc, c-fos 基因表达的影响

3×10^6 HL₆₀ 细胞在不含有或含有 2.5 mmol/L DFMO 培养基中分别培养三天后,各取相同细胞数的细胞 (8×10^6) 制备胞浆 RNA, 并系列对倍稀释后与 c-myc 基因探针进行斑点杂交分析。结果表明上述条件处理 HL₆₀ 细胞中 c-myc mRNA 水平约为对照组

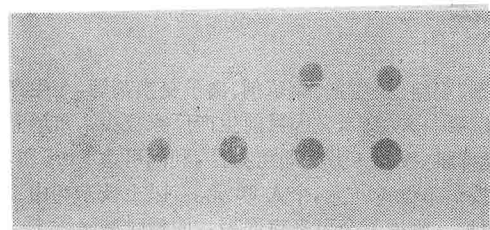


图4 DFMO 对 HL₆₀ 细胞 c-myc 基因表达的影响 (RNA 点杂交分析)

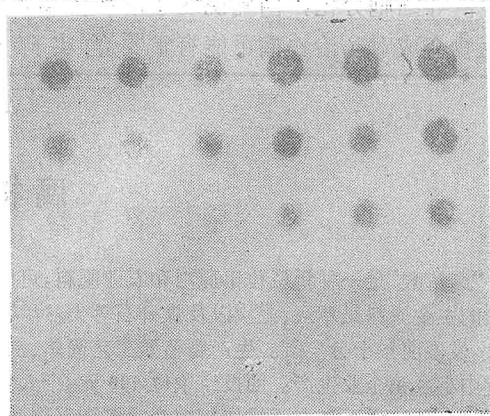


图5 DFMO 对 HL₆₀ 细胞 c-fos 基因表达的影响 (RNA 点杂交分析)

细胞的 25% (图 4)。

用不同剂量的 DFMO (0.5—8 mmol/L) 处理 HL₆₀ 细胞三天后与 v-fos 探针杂交, 细胞中 c-fos 转录水平随 DFMO 浓度增加而明显增加(图 5)。

讨 论

由于多胺在细胞增殖、分化中起着重要作用^[1,5]。因而抗多胺代谢物作为抗癌剂的研究已引起人们的注意, 其中 DFMO 是近年来最使人感兴趣的一种抗多胺代谢物。关于它在阻断癌, 抑制肿瘤生长及防止癌细胞浸润、转移等方面^[10-12]的作用国外最近已有报道。我们认为 DFMO 抗癌作用的关键仍然是对细胞增殖与分化的影响。由于多胺对细胞增殖与分化是个复杂的调节过程, 不同的研究者用不同的模型研究所得结果也不尽相同, 细胞增殖需要多胺是已被公认的事实。细胞分化需多胺也得到实验证明。但有的结果表明细胞分化诱导并不受多胺生物合成的影响^[13], 反而多胺生物合成抑制可诱导细胞分化^[14]。本文结果指出适当浓度的 DFMO 不仅能抑制 HL₆₀ 细胞的生长, 而且有分化诱导作用。由于 DFMO 同时对细胞增殖和分化起相反作用, 细胞分化又需要多胺的存在以保证细胞必要的增殖。因此只有当 DFMO 适量时, 既能抑制多胺生物合成以控制细胞增殖, 又使有一定量的多胺合成满足细胞分化的需要。此时 DFMO 既能抑制细胞生长又能诱导细胞分化, 由此说明了解和控制多胺的生物合成对防治肿瘤可能有重要的实际意义。

曾有资料报道, 与正常细胞相比 HL₆₀ 细胞中 c-myc 基因有 10—30 倍的扩增, 且 c-myc RNA 水平增高。当 TPA 处理 HL₆₀ 细胞时, 迅速使 c-fos 表达增加, 并抑制细胞增殖。同时也观察到 HL₆₀ 被诱导分化时 c-myc 表达减少, 说明细胞分化诱导和增殖抑制与 c-myc 和 c-fos 表达有一定关系。我们的结果也表明 DFMO 对 HL₆₀ 细胞的生长抑制和分化诱导作用可能与 c-myc 及 c-fos 表达的改变有一定相关, 但这些基因表达的改变是否是 HL₆₀ 细胞生长抑制与分化诱导所必需的, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Heby, O.: *Differentiation*, 1981, 19, 1.
- [2] Kufe, D. W. et al.: *Cancer Res.*, 1984, 44, 4281.
- [3] Sunkara, P. S.: *Novel approaches to cancer chemotherapy*, P. S. Sunkara (ed), New York, Academic Press, 1984, 93.
- [4] Olson, J. W. et al.: *Cancer Res.*, 1980, 40, 4373.
- [5] Luk, G. D., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, 78, 2355.
- [6] Gray, S. J., et al.: *Exp. Cell Res.*, 1981, 131, 209.
- [7] Niskanen, E. O., et al.: *Blood*, 1983, 4, 740.
- [8] White, B. A., et al.: *J. Biological Chemistry*, 1982, 257, 8569.
- [9] Thomas, P. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, 77, 5201.
- [10] Yukio Homma, et al.: *Cancer Res.*, 1985, 45, 648.
- [11] Sunkara, P. S. et al.: *Cancer Res.*, 1987, 47, 933.
- [12] Upp, J. R. et al.: *Cancer Res.*, 1988, 48, 3265.
- [13] Huberman, E., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, 78, 1062.
- [14] Chen, K. Y., et al.: *Cancer Res.*, 1983, 43, 2812.

[本文于 1988 年 9 月 2 日收到]

腐植酸制法

“腐植酸”是一种新型化工原料和农业肥料, 可作土壤改良剂、肥料、杀虫剂、除草剂、离子交换剂等。生产腐植酸的主要原料是草炭、泥炭以及煤矸石等天然矿物, 成本低廉, 原料来源广, 又因目前生产厂家极少, 市场需求量大, 发展前景十分广阔。生产腐植酸工艺简单、主要设备是搅拌机, 投资 1 万元即可办厂, 利润可达 50% 左右, 适宜中小乡镇企业生产。面授: 单位 400 元, 个人 350 元。函授: 单位 100 元, 个人 80 元。以上技术均由工程师授课, 理论学习和亲手操作相结合, 培训采用面授和函授两种, 函授不会可来京面授, 面授时减除函授费。(B119)。北京市星火技术研究所提供, 通信处: 北京市 867 信箱 20816 组, 邮政编码: 100024。