

# 亚硒酸钠对人早幼粒白血病细胞的 RB 蛋白磷酸化的影响

刘新光 于树玉

**摘要** 以人早幼粒白血病细胞(HL-60)为实验对象,利用 Western-blotting 方法和流式细胞仪分析,研究亚硒酸钠对 HL-60 细胞的 RB 蛋白产物磷酸化的影响和探讨其抗癌机制。Western-blotting 结果显示:与对照组相比,在第四天  $5.8\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  可使磷酸化 RB 蛋白减少 49%,去磷酸化 RB 蛋白仅轻度增加,但在加硒组中去磷酸化 RB 蛋白占 RB 蛋白总量的 71.1%。与此同时,细胞周期的结果表明:亚硒酸钠对 HL-60 细胞的  $G_2$ +M 和 S 期有一定的阻滞。该实验在蛋白分子水平上研究了亚硒酸钠抑制 HL-60 细胞增殖的作用机制。

**关键词** 亚硒酸钠;HL-60 细胞;RB 蛋白磷酸化;Western-blotting;细胞周期

硒是人类的必需微量元素,硒的抗肿瘤作用已引起人们的广泛重视,在动物模型和体外实验中已观察到它的抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>。我们曾用亚硒酸钠进行 HL-60 细胞生长与分化的研究,发现它可抑制该细胞的增殖,但未观察到有诱导分化作用<sup>[2]</sup>。

视网膜母细胞瘤抑癌基因(Rb)可作为一已知的细胞增殖和可能的细胞分化的调节剂<sup>[3]</sup>。RB 蛋白产物是调控细胞增殖和分化的核内磷蛋白,它可与许多转录因子相互作用,直接和间接调控转录活性<sup>[4]</sup>。RB 蛋白引起的抑增殖作用,和它与 E2F 形成复合物的能力密切相联<sup>[4]</sup>。有研究表明<sup>[5,6]</sup>;在静止和终末分化的细胞中,RB 蛋白以去磷酸化形式存在,该形式具有抗癌活性;而在快速增殖细胞中则为磷酸化形式的,无抗癌活性。此外 RB 蛋白的磷酸化状态随细胞周期而改变,在细胞从  $G_1$  期进入 S 期过程中 RB 蛋白常需磷酸化<sup>[4~6]</sup>。为进一步探讨硒抑制 HL-60 细胞增殖的作用机制,我们进行了本实验。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人早幼粒白血病细胞株(HL-60),由中日友好医院临床医学研究所惠赠。亚硒酸钠为北京化工厂产品。RPMI-1640 培养基,鼠抗人 RB 蛋白单克隆抗体(PMG-245)为美国 Cibo 产品,生物素偶联的山羊抗鼠抗体为美国 Cappel 产品,抗生物素蛋白偶联的碱

性磷酸酶、磷酸 Naphthol AS-Mx,固紫 B 盐等为美国 Sigma 产品。硝酸纤维膜为美国 Schleicher & Schuell 公司产品。

## 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养** 见文献<sup>[2]</sup>

**1.2.2 细胞的裂解和蛋白的提取** 在加硒处理第四天,每组收集  $4 \times 10^6$  细胞,用冷 PBS 洗涤,加入 1ml 预冷的细胞裂解液,其中含  $50\text{mmol/L}$  Tris-HCl, pH7.4,  $0.25\text{mol/L}$  NaCl, 0.2% Nonidet P-40,  $5\text{mmol/L}$  EDTA,  $50\text{mmol/L}$  NaF,  $1\text{mmol/L}$  PMSF。振荡混匀,于冰浴中作用 60 分钟,以  $20000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 5 分钟,取上清分装备用。按 Lowry 法<sup>[7]</sup>,以 BSA 为标准测定蛋白质含量。

**1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳** 按 Laemmli<sup>[8]</sup>方法,制备  $0.75\text{mm}$  厚,7.5%分离胶进行垂直板电泳。每组上样的蛋白量约为  $12\mu\text{g}$ 。电泳结束后,测量分离胶长和溴酚蓝的移动距离。切下一半凝胶用银染试剂盒(Bio-Rad)进行银染色,根据已知蛋白质分子量标记物的迁移率作标准曲线,确定 105KD 和 115KD 蛋白带在凝胶中的位置。

**1.2.4 免疫印迹(Western-blotting)** 按 chen 等<sup>[5]</sup>修改法进行。切下的另一部分凝胶上的蛋白电转移至硝酸纤维膜(NC 膜)上。取出膜,装在相应大小的塑料盒内,用溶液 A(含  $50\text{mmol/L}$  Tris,  $0.5\text{mol/L}$  NaCl, 0.5% Tween-20, 3%BSA)浸泡 NC 膜,以封闭一抗非特异性结合点,置室温反应 2 小时以上。倾去溶液 A 后,立即

作者单位:524023 湛江,广东医学院医用生化研究所(刘新光);中国医学科学院肿瘤研究所生化室(于树玉)

加入新鲜配制的小鼠抗人RB单克隆抗体溶液(抗体浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ), $4^\circ\text{C}$ 过夜。换用溶液B(含 $10\text{mmol}/\text{L}$  Tris, $0.5\text{mol}/\text{L}$  NaCl, $0.5\%$  Tween-20)洗涤NC膜3次,再用含 $0.5\%$  BSA的溶液B洗涤。加入生物素偶联的山羊抗小鼠抗体(终浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ),于 $37^\circ\text{C}$ 保温一小时。再依次用溶液B和含 $0.5\%$  BSA的溶液B洗涤3次和1次,加入抗生物素蛋白偶联的碱性磷酸酶于 $37^\circ\text{C}$ 温育一小时,用溶液B洗涤3次,再用底物缓冲液(含 $100\text{mmol}/\text{L}$  Tris, $5\text{mmol}/\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ , pH 9.0)洗涤一次,加底物磷酸 Naphthol AS-Mx 和固紫B盐的混合液,于 $37^\circ\text{C}$ 孵育30分钟显色。每个泳道主要在105KD和115KD处显示清晰的两条蛋白带,拍摄照片。并对蛋白带进行密度扫描(日本岛津)。

1.2.5 细胞周期分析 在加硒处理第四天进行细胞裂解提取蛋白的同时,收获 $10^6$ 细胞,按文献<sup>[9]</sup>方法,用流式细胞仪(EPICS-V型,美国Coulter公司)分析细胞周期分布。

## 2 结果

2.1 亚硒酸钠对HL-60细胞的RB蛋白磷酸化的影响 结果(图1和附表)表明:与对照组相比, $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 可使磷酸化RB蛋白(115KD)减少49%,而去磷酸化RB蛋白(105KD)仅轻度增加,但两蛋白中去磷酸化的RB蛋白占主要,为71.1%,这比例明显高于对照组(占53.9%)。本实验是首次观察到亚硒酸钠对HL-60细胞的RB蛋白产物磷酸化的作用。

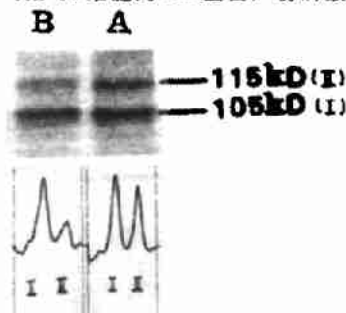


图1 硒对HL-60细胞的RB蛋白磷酸化的影响(第4天)

(Western-blotting的具体方法见“材料与与方法”)

A: 对照组 B:  $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

2.2 亚硒酸钠对HL-60细胞的细胞周期的影响 第4天流式细胞仪的结果(图2显示: $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对HL-60细胞的 $G_2+M$ 和S期有轻度的阻滞。

附表 图1蛋白带的密度扫描面积结果

组别	105KD蛋白带 (%对照组)	115KD蛋白带 (%对照组)
对照组	12097(100)	10364(100)
$5.8\mu\text{mol}/\text{L}$ $\text{Na}_2\text{SeO}_3$	13110(108)	5314 (51)

## 3 讨论

Rb是细胞内具有维持正常生长和抑制细胞转化的抗癌基因,其蛋白产物的研究表明:它能以基本调节剂的功能对细胞的生长和分化过程起双重作用<sup>[10]</sup>。细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)介导的蛋白磷酸化可使RB蛋白引起的抑增殖和促分化作用减弱,它可作为增殖-分化开关的调节剂<sup>[11]</sup>。RB蛋白的磷酸化与去磷酸化状态依细胞周期而变化,在细胞的 $G_0/G_1$ 期,RB蛋白以去磷酸化的RB蛋白(105KD)存在;而在 $G_1/S$ 交界处直至S和 $G_2$ 期,则发生多位点磷酸化,以磷酸化RB蛋白形式(115KD)存在<sup>[12-14]</sup>。Chen等<sup>[5]</sup>报道:当RA诱导HL-60细胞或U-937细胞分化时可导致RB蛋白去磷酸化,主要以去磷酸化RB形式存在,并认为新合成的RB蛋白的磷酸化状态减少或RB蛋白去磷酸化是RA诱导生长阻滞的后果而非原因。

有实验表明<sup>[12]</sup>:当HL-60细胞被诱导分化时,多伴有 $G_1$ 期阻滞, $G_1$ 期细胞增多,S期细胞减少。故一般认为这两者之间存在一定的相关性。本实验表明亚硒酸钠处理HL-60细胞,主要是使 $G_2+M$ 期和S期细胞轻度增加,故可解释硒对HL-60细胞未表现出分化作用<sup>[12]</sup>。

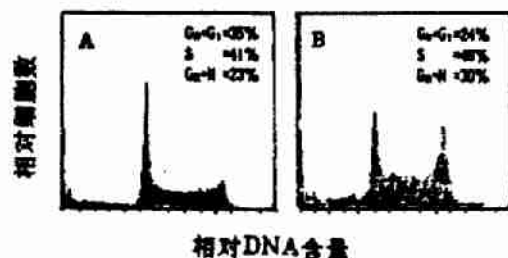


图2 亚硒酸钠对HL-60细胞的DNA含量的影响  
(方框右上角表示的数据为各期细胞所占的百分数)

A: 对照组 B:  $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

本实验首次观察了亚硒酸钠对HL-60细胞的RB蛋白磷酸化的影响。由于硒不能诱导该细胞的分化,而且主要是使 $G_2+M$ 期和S期细胞轻度增加,而 $G_1$ 期细胞并无增加,因此硒处理HL-60细胞后RB蛋白就不太会进行去磷酸化,与对照组相比,去磷酸化的RB蛋白变化不明显,仅有轻度增加。但是,因硒可抑制HL-60细胞的增殖<sup>[2]</sup>,就会抑制磷酸化的RB蛋白的表达,因此在该组的两种RB蛋白中,新合成的RB蛋白的磷酸化状态就减少,相对去磷酸化的RB蛋白的比例就增加(占RB蛋白总量的71.1%),而去磷酸化的RB蛋白是具有抗癌活性的,从而表现出抗癌作用。因此,本实验进一步在蛋白分子水平上解释了亚硒酸钠抑制HL-60细胞增殖的作用机制。

# 参 考 文 献

- 1 Schrauzer GN. Selenium and cancer. In: Selenium in medicine and biology (Neve J and Favier A eds) Berlin. New York; Walter de Gruyter & Co, 1988;251
- 2 刘新光,于树玉.亚硒酸钠和维甲酸联合对 HL-60 细胞生长、分化的影响.肿瘤防治研究,1996 23:209
- 3 Brooks SC, Kazmer S, Levin AA, et al. Myeloid differentiation and retinoblastoma phosphorylation changes in HL-60 cells induced by retinoic acid receptor-and retinoid X receptor-selective retinoic acid analogs. Blood, 1996, 87:227
- 4 Sellers WR, Kaelin WG. RB as a modulator of transcription. Biochim Biophys Acta, 1996, 1288:M1
- 5 Chen PL, Scully P, Shew JY, et al. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. Cell,1989,58:1193
- 6 Mihara K, Cao XR, Yen A, et al. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. Science, 1989,246:1300
- 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951,193:265
- 8 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, 1977, 227:680
- 9 Jing YK, Hashimoto S, Nakajo S, et al. Topoisomerase inhibitors potentiate the effect of retinoic acid on cell growth inhibition and induction of differentiation of leukemia HL-60 cells. Leukemia Res, 1994, 18:299
- 10 Chen PL, Riley DJ, Lee WH. The retinoblastoma protein as a fundamental mediator of growth and differentiation signals. Crit Rev Eukaryot Gene Expr,1995, 5:79
- 11 Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell, 1995, 81:323
- 12 Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL Jr. Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents (Part I). Cancer Treat Rep, 1987, 71:391

## Effect of sodium selenite on phosphorylation of retinoblastoma protein of human promyelocytic leukemia cells (HL-60)

Liu Xinguang, et al

Biochemistry Institute, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023

Human promyelocytic leukemia cells(HL-60) was used to study the effect of sodium selenite on phosphorylation of retinoblastoma (RB) protein and its anticancer mechanism. Method of western-blotting and flow cytometric analysis were undertaken. The result of western-blotting showed that 4 days after treatment of 5.8 $\mu$ mol/L Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, the amounts of the phosphorylated RB protein decreased some 49%that of control group, while the hypophosphorylated RB protein increased a little. However, in this selenium group the phosphorylated RB protein was 71.1% in total RB protein amounts. In the same time, the result of cell cycle revealed that sodium selenite could slightly arrest HL-60 cells at G<sub>2</sub>+M and S phase. The experiments studied the mechanism of sodium selenite inhibited HL-60 cells proliferation at protein molecules level.

**Key words:** Sodium selenite; Human promyelocytic leukemia cell line (HL-60); Retinoblastoma protein phosphorylation; western-blotting; cell cycle.