

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 $5.8\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_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^[1]。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^[2]。

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^[3]。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^[4]。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关^[4]。有研究表明^[5,6];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^[4~6]。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 Cibco 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 Scheicher & Schuell 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 见文献^[2]

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 4×10^6 细胞,用冷 PBS 洗涤,加入 1ml 预冷的细胞裂解液,其中含 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.25mol/L NaCl, 0.2% Nonidet P-40, 5mmol/L EDTA, 50mmol/L NaF, 1mmol/L PMSF。振荡混匀,于冰浴中作用 60 分钟,以 $20000 \times g$, 4℃ 离心 5 分钟,取上清分装备用。按 Lowry 法^[7],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^[8]方法,制备 0.75mm 厚,7.5% 分离胶进行垂直板电泳。每组上样的蛋白量约为 12μg。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^[5]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 50mmol/L Tris, 0.5mol/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

加入新鲜配制的小鼠抗人RB单克隆抗体溶液(抗体终浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$)，4℃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°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，加入抗生素蛋白偶联的碱性磷酸酶于 37°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, $5\text{mmol}/\text{L}$ MgCl₂, 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°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 10^4 细胞，按文献^[9]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， $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$ Na₂SeO₃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。

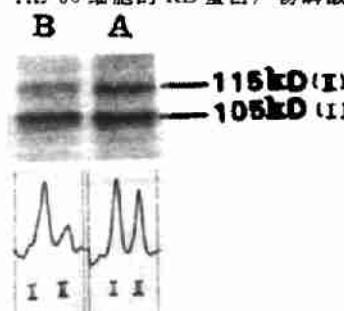


图 1 硒对 HL-60 细胞的 RB 蛋白磷酸化的影响(第 4 天)
(Western-blotting 的具体方法见“材料与方法”)

A: 对照组 B: $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$ Na₂SeO₃

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： $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$ Na₂SeO₃ 对 HL-60 细胞的 G₂+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)
$5.8\mu\text{mol}/\text{L}$ Na ₂ 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^[10]。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^[11]。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 G₀/G₁ 期，RB 蛋白以去磷酸化的 RB 蛋白(105KD)存在；而在 G₁/S 交界处直至 S 和 G₂ 期，则发生多位点磷酸化，以磷酸化 RB 蛋白形式(115KD)存在^[1~4]。Chen 等^[5]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^[12]：当 HL-60 细胞被诱导分化时，多伴有 G₁ 期阻滞，G₁ 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 G₂+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^[13]。

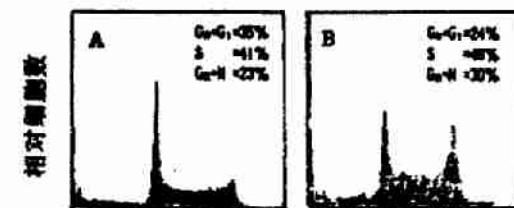


图 2 亚硒酸钠对 HL-60 细胞的 DNA 含量的影响
(方框右上角表示的数据为各期细胞所占的百分数)

A: 对照组 B: $5.8\mu\text{mol}/\text{L}$ Na₂SeO₃

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 G₂+M 期和 S 期细胞轻度增加，而 G₁ 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^[2]，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 T₄. 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 5.8μmol/L Na₂SeO₃, 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 G₂+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.