

三尖杉酯碱诱导HL-60细胞分化时 对c-myc原癌基因表达的影响

大连医学院组胚教研室 敖翔 杨佩满 于丽敏

【摘要】 本文报告了小剂量三尖杉酯碱对HL-60细胞的分化诱导作用和c-myc蛋白质表达的影响,并探讨了相互间的关系。证明小剂量三尖杉酯碱除可抑制HL-60细胞增殖外,还可诱导其向单系及粒系定向分化,并使c-myc蛋白质的表达程度下降,二者呈负相关,这一结果提示,c-myc原癌基因表达的变化可能是三尖杉酯碱诱导HL-60细胞分化的机制之一。

关键词: 诱导分化;三尖杉酯碱;c-myc原癌基因

三尖杉酯碱是Powell等于七十年代从粗榧属植物中分离得到的一种抗肿瘤有效成分^[1],其主要杀瘤机制是抑制肿瘤细胞的蛋白质和DNA的合成。近年来发现小剂量三尖杉酯碱可促进肿瘤细胞分化,从而达到抑制肿瘤细胞分裂增殖的目的,但对其促分化机制的研究尚不多见。本研究用小剂量三尖杉酯碱以HL-60细胞株为模型进行实验,检测细胞c-myc原癌基因的表达情况,进一步探讨三尖杉酯碱诱导细胞分化的机理。

材料与方法

一、HL-60细胞培养

将HL-60细胞置于含10%小牛血清的RPMI 1640培养液中,37℃,5%CO₂孵箱中培养,每三天传代一次。实验时将细胞密度调整为 2×10^5 /ml,分5组,三组加三尖杉酯碱,剂量分别为0.0125μg/ml,0.025μg/ml,0.05μg/ml,一组加二甲基亚砜,浓度为1.2%,一组为阴性对照,不加药,每组三瓶,分别于培养后第1、2、4和6天取细胞样品。

二、药品与试剂

抗c-myc蛋白兔多克隆抗体(美国Roswell Park Memorial Institute 血液肿瘤系),Goat anti rabbit Ab—Biotin,Avidin—Peroxidase,抗phthalate兔多克隆抗体、羊血清等(美国VECTOR),三尖杉酯碱(医科院药研所实验药厂,批号—890504,1mg/ml,以PBS稀释)。

三、细胞生长曲线测定

细胞加药物后分别于第1、2、4和6天取少量样品,用0.5%台盼兰拒染法,在光镜下计数活细胞数,以细胞数作纵坐标,时间为横坐标,画出生长曲线。

四、细胞形态学检查

将取样之细胞离心涂片,瑞氏姬姆萨染色,油镜下计数200个细胞,计算分化细胞百分数。分化细胞包括:类似成熟的单核—巨噬样细胞,类似中幼粒及以下阶段的细胞。

五、NBT还原能力测定

将取样之细胞悬于含1mg/ml NBT和100ug/ml TPA之RPMI1640培养液中,在37℃,5%CO₂条件下孵育30分钟,冰浴终止反应,再用冷PBS洗二次,涂片,甲醇固定2分钟,0.1%碱性藏红花水溶液复染2分钟,油镜下计数200个细胞,胞质内有棕黑色颗粒为阳性细胞。

六、c-myc蛋白质的检测

将取样之HL-60细胞制成 6×10^6 /ml悬液,滴于经Alcianblue处理过的盖玻片上经2%多聚甲醛固定20分钟,以甲醇:3% H₂O₂ (4:1)处理,去除内源性过氧化物酶,PBS洗涤,滴加抗c-myc蛋白兔多克隆抗体,37℃下孵育一小时,用PBS洗去抗体,然后加生物素化的羊抗兔血清,再以Avidin/Peroxidase放大显示信号,最后用AEC显棕红色沉淀。与此同时,用抗phthalate兔多克隆抗体作阴性对照。在油镜下计数300个细胞,用(-)、(+), (++)和(+++)表示c-myc蛋白表达强度,计算出,阳性1数细胞百分数引用下例公式^[2]计算每组细胞(平均每100个细胞)c-myc蛋白质的总表达量,即,总c-myc蛋白表达量=(+)细胞数%×1+(++)细胞数%×2+(+++细胞数%×3。

结 果

一、三尖杉酯碱对HL-60细胞增殖的影响

图1表明,三尖杉酯碱对HL-60细胞的生长呈抑制作用,且呈时间及剂量依赖关系。可见于0.0125ug/ml浓度时即显出抑制效应,随着浓度升至0.025ug/ml,抑制作用亦增强。当浓度达0.05ug/ml作用四天时,虽然抑制效应很强,但已出现细胞毒性,可见细胞活力呈现下降(见表1)。

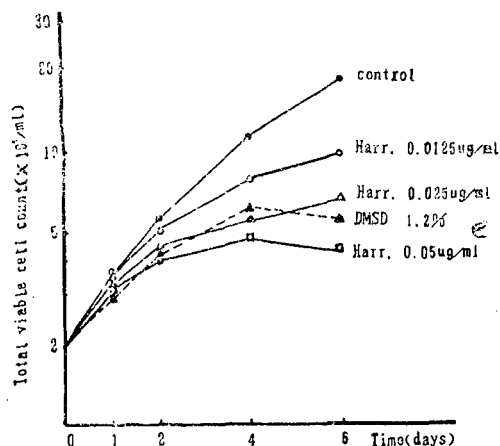


Fig.1 Growth of HL-60 cells in various concentrations of Harringtonine

二、三尖杉酯碱对HL-60细胞形态的影响

对照组HL-60细胞为幼稚的原始未分化状态,胞体大而圆,胞浆少,含少量嗜天青颗粒,核大而圆,核染色质细,核仁2—4个,大而圆,见照片1。

经药物处理三天后,倒置镜下可见部分细胞变形,呈不规则椭圆形,有的有突起,少数贴壁,以高浓度组尤甚;W—G染色,细胞大小不一,有的形态不规则,核椭圆、肾形或扭曲状,形态上类似单核样细胞,见照片2,另部分细胞的核呈杆状及分叶状,核仁减少或消失,细胞质内含特殊颗粒,形态上类似成熟之粒细胞,见照片3。结果见表1。

三、三尖杉酯碱对HL-60细胞NBT还原能力的影响

对照组细胞约10%有弱的NBT还原能力,经药物诱导后,细胞明显地增强了对NBT的还原能力,见照片4,阳性率呈剂量及时间效应。可见在0.025ug/ml浓度组,给药后六天,阳性率达70%,见图2。

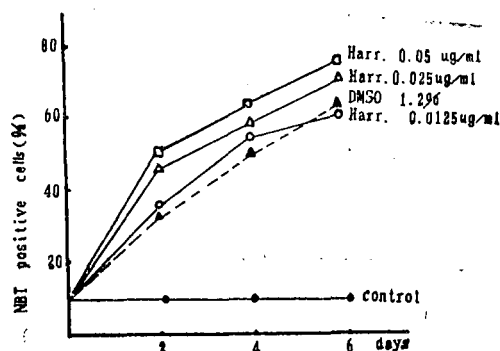


图2 三尖杉酯碱对HL-60细胞NBT还原能力的诱导作用

表1. 三尖杉酯碱诱导后HL-60细胞的不同数据及c-myc表达

加入 时间 (天)	不同细胞数 (%) *						C-myc表达		
	早幼粒	神经系统	晚幼粒	带状及节状	单核细胞样	总计**	生存率	细胞阳性率	总蛋白量
	细胞	灰质细胞	细胞	neutrophils的胚细胞	细胞	(×10 ⁵)	(%)	(%)	
Harr 0.0125ug/ml	1	94	3	1	1	3.7	94	94	181
	2	94	3	0	2	5.6	95	94	184
	4	95	2	0	1	11.4	94	94	183
	6	94	3	1	1	18.4	94	95	183
	1					3.6		93	187
	2	42	20	12	18	5.2		89	150
Harr 0.025ug/ml	4	28	25	15	20	7.8	89	88	128
	6	20	18	12	27	9.6		84+	119
	1					3.4		90	156
	2	34	18	12	24	4.5		85+	140
	4	21	20	20	22	5.6	86	79++	120
	6	12	16	19	27	6.8		79++	106
Harr 0.05ug/ml	1					3.2		87	147
	2	13	15	27	31	4.1		83+	141
	4	7	12	28	30	4.8	64	76++	107
	6	2	7	23	38	4.4		75++	103
	1					2.9		91	145
	2	26	29	26	15	4.4		88	135
DMSD 1.2%	4	14	26	30	24	6.2	85	83+	119
	6	6	18	36	36	5.6		74++	95

* 此数据是200个细胞的百分率 ++<0.05

** 引用2×10⁵细胞/ml液培养 ++<0.05

四、三尖杉酯碱对HL-60细胞c-myc蛋白质表达的影响

c-myc蛋白位于核内,阳性细胞的核染呈棕红色,见照片5。实验结果见表1。从表中可见,c-myc蛋白的表达程度与诱导剂浓度及作用时间呈负相关。当药物浓度达0.025ug/ml,作用至6天时,c-myc蛋白表达阳性的细胞及总蛋白量均明显下降,分别由94%降至79%,183降至106。这与形态学变化及生物学行为和功能改变相一致。

讨 论

本研究用HL-60细胞为材料,发现小剂量三尖杉酯碱对以早幼粒为主的白血病细胞有明显的促分化作用,主要表现为明显地改变了细胞的形态,细胞核由圆变为椭圆、肾形或变为杆状、分叶核,核仁减少或消失,有的细胞质内出现特殊颗粒,NBT阳性细胞比例增大。与此同时,也明显地抑制了HL-60细胞的增殖,这些结果和Boyd的报道结果基本一致^[3],其不同点是,我们发现三尖杉酯碱可使细胞除了象Boyd报道的那样向单核细胞系分化以外,还向粒细胞系分化。

关于三尖杉酯碱促细胞分化的机制研究,还较少报道,已经知道,CAMP作为细胞的第二信号物质在细胞内浓度的升高,可能是三尖杉酯碱促细胞分化的重要机制之一^[4]。我们的研究证明,三尖杉酯碱在诱导细胞分化过程中,其c-myc原癌基因在蛋白质水平上的表达随之下降。这一结果表明,三尖杉酯碱诱导细胞分化和c-myc原癌基因

表达的下降有关。已知道,c-myc原癌基因与细胞增殖和分化关系极为密切,其基因产物蛋白质存在于细胞核内,可能与DNA结合调节细胞的增殖和分化。c-myc原癌基因的表达常与细胞增殖呈正相关,与细胞分化呈负相关^[5]。对HL-60细胞的研究已经证明,c-myc原癌基因在该细胞中有大量扩增^[6,7]。而三尖杉酯碱抗肿瘤作用主要是抑制了蛋白质生物合成^[8-11]。综上所述,我们认为三尖杉酯碱可能通过抑制蛋白质的生物合成这一环节,抑制了c-myc原癌基因的表达,而降低了c-myc蛋白的合成,这可能是其促进细胞分化抑制细胞增殖的机制之一。(本文图见封3)

参 考 文 献

1. Powell RG, et al. J Pharm Sci 1972, 61:1227
2. Preisles HD, et al. Leuk Res, 1988, 12(6):507
3. Boyb AW, et al. Bloob, 1984, 63:384
4. 李占荣,等.中草药,1986,17(3):39
5. McCachren SS Jr, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1988, 151(1):574
6. Misawa S, et al. Cancer Genet Cytogenet 1987, 28(1):127
7. Collins S, et al. Nature, 1982, 298:679
8. Sta AM, et al. Cell, 1978, 14:33
9. Chou TC, et al. Cancer Res, 1983, 43:3074
10. Huang MT. Mol Pharmacol, 1975, 11(5):511
11. 吴冠芸,等.中国医学科学院学报,1982,4:77

(上接第19页)

39:297

2. 林巧稚. 妇科肿瘤, 人民卫生出版社, 1982
3. Hill BT, Cancer Treat Rev, 1987, 4:197
4. Michael CA, et al. Cancer Res, 1988, 48:589
5. Ajani JA. Cancer Bull, 1937, 39:263
6. Carenza LC, et al. Gyneco Oncol, 1990, 36:13
7. 吴中明,等. 遵义医学院学报, 1991, 2:95
8. Daniels IR, et al. Cancer Chemother Pharmacol, 1981, 6:245

9. Von Hoff DD, et al. Cancer Chemother Pharmacol, 1981, 6:265
10. Von Hoff DD, et al. Cancer Res, 1983, 43:1928
11. Bertelsen CA, et al. Cancer, 1984, 53:1240
12. Bertoncetto I, et al. Br J Cancer, 1982, 45:803
13. Rupniak HT, et al. Br J Cancer, 1980, 40:255
14. Hill BT, et al. Br J Cancer, 1980, 41:203
15. Carmichael J, et al. Cancer Res, 1987, 47:943
16. Begg AC, et al. Cancer Res, 1989, 49:56

BBN诱发大鼠膀胱肿瘤实验研究

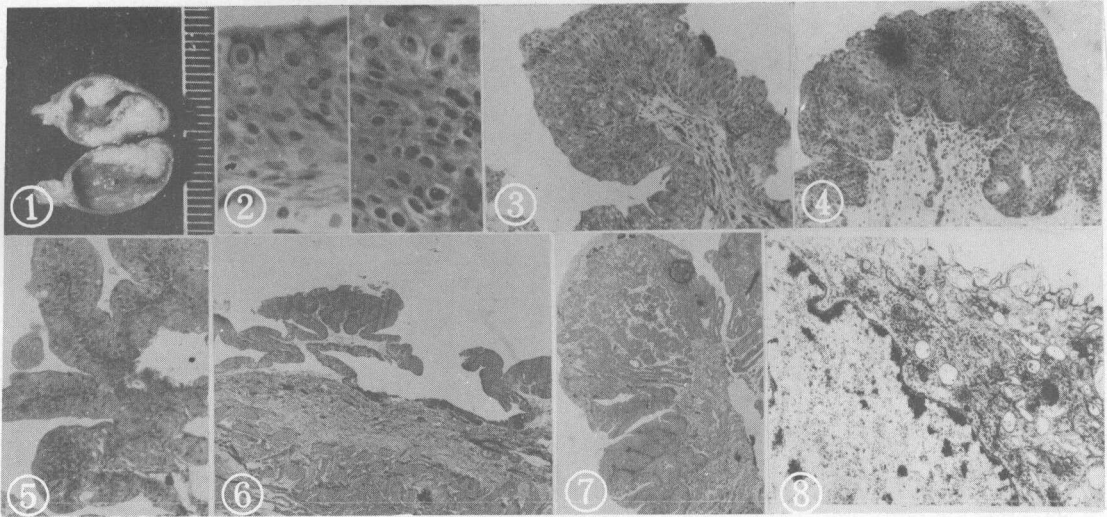


图1 BBN诱发大鼠膀胱肿瘤呈多发性。图2 BBN诱癌2周(a), 膀胱粘膜上皮轻度增生, 4周时(b)呈中度增生, HE10×40。图3 诱发8周时膀胱粘膜上皮呈重度(乳头状)增生, HE10×10。图4 诱癌8周时膀胱粘膜上皮呈重度(结节状)增生, HE10×10。图5 诱癌20周时大鼠膀胱乳头状瘤 HE10×10。图6 BBN诱发膀胱肿瘤呈多发性 HE2.5×10。图7 BBN诱癌30周大鼠膀胱移行细胞癌, 浸润浅肌层。图8 BBN诱癌8周时膀胱增生的粘膜上皮细胞膜表面微绒毛增多, 胞浆内梭形小泡减少, 游离核糖体增多 EM×12,000

三尖杉酯碱诱导HL-60细胞分化时对C-myc原癌基因表达的影响

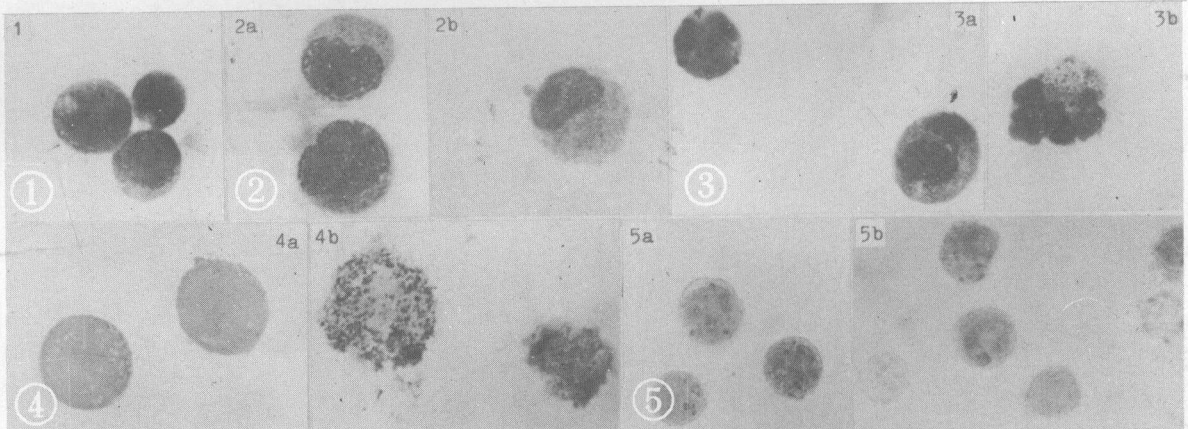


图1 HL-60细胞形态。图2 a.经0.0125ug/ml三尖杉酯碱处理4天的HL-60细胞。 b.经0.025ug/ml三尖杉酯碱处理4天的HL-60细胞。图3 a.经0.0125ug/ml三尖杉酯碱处理4天的HL-60细胞。 b.经0.025ug/ml三尖杉酯碱处理4天的HL-60细胞。图4 a.HL-60细胞的NBT反应。 b.经0.025ug/ml三尖杉酯碱诱导4天后HL-60细胞的NBT反应, 阳性细胞胞质内布满甲腺颗粒。图5 a.HL-60细胞的C-myc表达, 阳性细胞胞核深染。 b.HL-60细胞经0.025ug/ml三尖杉酯碱诱导4天后的C-myc表达, 阳性细胞胞核深染, 阴性细胞胞核不着色(浅淡)。