维普资讯 http://www.cqvip.com

346-348

(6)

第23卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.4
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

维甲类化合物Ro13－7410对白血病细胞端粒酶活性的抑制

临床学院血液科 刘小珊* 娄陵生 唐宗山
检验系临床生化室 蒋纪恺 张莉萍 康格非

R733.705
R977.21

提 要 为深入探讨第三代维甲类化合物Ro13－7410诱导白血病细胞凋亡和分化的机制，本文采用PCR－ELISA和PCR－PAGE两种方法观察了Ro13－7410对HL－60细胞端粒酶活性的影响。实验结果显示在Ro13－7410诱导HL－60细胞凋亡和分化的过程中端粒酶活性逐渐下降。结论:Ro13－7410能明显抑制HL－60细胞端粒酶活性，且可能与白血病细胞的增殖抑制和诱导凋亡及分化作用有关。

关键词 端粒酶; 人白血病细胞; 维甲类化合物
中图分类号 R53.2

白血病 细胞凋亡
HL-60细胞

端粒(telomere)为真核细胞线性染色体末端的蛋白质－DNA结构。其DNA顺序相当保守，一般由短核苷酸序列串联重复构成$(TTAGGG)_n$。其作用为保护和稳定染色体末端。在DNA复制时，由于DNA聚合酶不能完全复制染色体末端，因此端粒DNA会逐渐丢失[1]。端粒酶(telomerase)是由蛋白质和RNA组成的复合体。此酶以独特方式即依赖酶中的RNA为模板经逆转录而合成端粒DNA[2]。端粒酶活性与细胞增殖、分化、凋亡这一调控网络有关。生殖细胞和具有较高增殖能力的少数体细胞以及大多数肿瘤细胞(包括HL－60细胞)中可以检测到端粒酶的活性。一些肿瘤细胞的分化伴有端粒活性的丢失[3]。既往研究表明，HL－60细胞在被全反式维甲酸(RA)，二甲亚砜(DMSO)等诱导分化时伴有端酶活性的明显下降[4]。

我们在以往的工作中发现合成的第三代维甲类化合物Ro13－7410可诱导HL－60细胞凋亡和分化同时发生[5]，并且将细胞阻止在G_2/M期。本文进一步采用PCR－ELISA和PCR－PAGE两种方法[6]观察了Ro13－7410对HL－60细胞端粒酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人白血病HL－60细胞系引自军事医学院附属医院药理室。用含10％小牛血清的PRMI－1640培养基在37℃，5％CO_2条件下培养。

1.2 Ro13－7410和RA处理HL－60细胞

Ro13－7410及RA(all－trans－retinoic acid)均由重庆华邦制药有限公司赠送。分别用无水乙醇配成储液；置－20℃冰箱避光保存。试验时用生理盐水稀释，乙醇终浓度小于0.1％。收集对数生长期细胞，配成浓度为1×10^5/ml的细胞悬液。药物组加入不同浓度的Ro13－7410及RA，对照组加入等体积的溶剂，于给药后不同时间收集细胞测端粒酶活性。

1.3 端粒酶PCR－ELISA检测

端粒酶PCR－ELISA检测试剂盒购自BOEHRINGER MANNHEIM公司。

1.3.1 端粒酶的提取

收集各实验组的细胞，调整细胞数为1×10^6/ml，4℃ 3000r/min离心10min，弃上清液，用PBS重悬细胞，重复离心，弃上清液，加入200μl裂解剂(5％CHAPS)，冰浴30min，4℃ 16000r/min离心20min，移上清于用DEPC处理的离心管，－80℃冻存提取液备用。

* 女，1967－11出生，主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3.2 RT－PCR扩增 逆转录:取上述提取液2μl,与逆转录酶和dNTP,缓冲液等在25℃反应30min.PCR扩增:50μl反应体系,包括逆转录产物,dNTP,Taq酶,生物素标记的引物Ⅰ(biotin－labeled－P1)和引物Ⅱ,94℃,30s;50℃,30s;72℃,90s循环30次.平衡:72℃,10min.

1.3.3 扩增产物检测 5μl扩增产物,20μl变性试剂,室温下孵育10min,加入225μl杂交混合液(含地高辛标记的检测探针DIG－Labeled probe),充分混匀,加入100μl混合液于抗生物素蛋白包被的微孔板上,之后加入酶标抗体100μl,18℃～22℃,30min,最后加100μl TMB显然10min,测定450min和690nm的OD值.根据$OD=1.5OD_{450}-OD_{690}$计算酶活性.

1.4 端粒酶PCR－PAGE检测

采用ONCO公司的PCR－PAGE端粒酶测试剂盒(香港大学医学院生物化学系谭荣安教授惠赠).

1.4.1 端粒酶提取同上

1.4.2 PT－PCR扩增 50μl反应体系,逆转录30℃,30min;PCR扩增逆转录产物,94℃,30s;60℃,30s循环35－40次.

1.4.3 扩增产物检测 将扩增产物在15%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),400v,75mA,40min,后在0.5×TBE缓冲液中,用EB(溴乙锭)染色即可在紫外光下观察到相差6 bp的梯阶片段.

2 结果

2.1 端粒酶PCR－ELISA检测

10^{-6}mol/L Ro13－7410作用HL－60细胞1,3,5天时检测的端粒酶活性分别为0.504,0.392,0.250(OD值).同等浓度的RA作用HL－60细胞5天时检测的端粒酶活性为0.104(OD值).对照HL－60细胞为0.606(OD值)

2.2 端粒酶PCR－PAGE检测

同端粒酶PCR－ELISA检测结果一样,对照有明显的端粒酶活性,10^{-6}mol/L和10^{-7}mol/L的Ro13－7410均抑制了端粒酶活性,但10^{-7}mol/L浓度的Ro13－7410的作用弱于10^{-6}mol/L.10^{-6}mol/L的RA相对明显抑制了端粒酶活性.

3 讨论

在生理或病理条件下,细胞在增殖、分化、凋亡、癌变等自身存在一个多种因素参与的复杂的"调控网络".近来研究表明,端粒酶与细胞的这一调控网络有密切联系,在生殖细胞和具有较高增殖能力的少量体细胞以及大多数肿瘤细胞可检测出端粒酶活性.一部分肿瘤细胞分化成熟时伴有端粒酶活性的明显下降,但另有一部分细胞分化时端粒酶活性却未发生明显改变.虽然端粒酶的作用机理未阐明,但与肿瘤不可分割的联系为抗癌剂作用机理的阐明提供了新的思路[6].

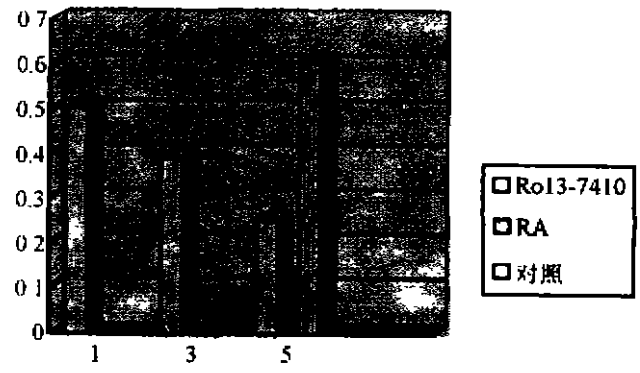


图1 Ro13－7410和RA作用HL－60不同时间的端粒酶活性

Ro13－7410是合成的第三代维甲类化合物,临床上用于治疗皮肤病时疗效好,且无全反式维甲酸的严重毒副反应[7].我们以往的研究发现Ro13－7410能明显抑制白血病细胞HL－60的增殖.在观察其诱导HL－60细胞分化时偶然发现诱导了细胞凋亡的发生,并且将细胞阻止在G_2/M期(另有文报道).为进一步探讨其作用机理,本文采用PCR－ELISA和PCR－PAGE两种方法均表明Ro13－7410对HL－60细胞的作用与端粒酶活性有密切联系.从检测结果看,端粒酶活性的抑制与时间呈依赖关系.在Ro13－7410作用HL－60细胞第1天即发生酶活性的下降,以后逐渐降低,此结果表明端粒酶活性的下降不是Ro13－7410对HL－60细胞产生的直接抑制作用,而是诱导细胞凋亡和分化后自身调控网络变化的结果.在细胞调

维普资讯 http://www.cqvip.com

控网络中有人认为端粒酶与细胞周期有共同的调节因素，被阻止于S期和M期的细胞有较高的端粒酶活性[3]。也有研究表明一部分肿瘤细胞被阻止在G_0/G_1期时，端粒酶活性无明显改变，被阻止在S期的细胞端粒酶活性明显增高，处于G_2/M期的细胞端粒酶活性明显下降[6]。Ro13－7410主要将细胞阻止在G_2/M期且伴有端粒酶活性明显下降。RA在诱导细胞分化时主要将细胞阻止在G_0/G_1期，也明显抑制端粒酶活性[4]。这是否是由于细胞受到的调控因素不同而引起的不同变化有待进一步研究。

从两种检测方法均可看出，Ro13－7410对HL－60细胞端粒酶活性的抑制弱于同等浓度的全反式维甲酸，这虽然同端粒酶活性的下降与细胞分化程度相关以及Ro13－7410对HL－60细胞分化作用弱于同等浓度的RA结果相一致，但端粒酶活性的抑制是否与Ro13－7410诱导HL－60细胞凋亡的过程有关，还需进一步研究证实。

参 考 文 献

1.Blackburn EH. Nature, 1991;350:569
2.Morin GB. Cell. 1989;59:521
3.Sharma HW, et al. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 1995;92:12343
4.Bestilny LJ, et al.. Cancer Res. 1996;56:3796
5.刘小珊，等.中华血液学杂志 1998;19:241
6.Kim NW, et al. Science. 1994;266:2011
7.Saurat JH, et al. Dermatologica 1998;176:191
8.Zhu XL, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:6091

(收稿日期 1998－02－13)

Inhibition of Telomerase Activity during Induction of HL－60 Cells by Ro13－7410

Liu Xiaoshan, et al
Department of hematology, college of clinical medicine

Our previous studies showed that HL－60 cells treated with Ro13－7410 exhibited apoptosis and differentiation. To determine whether the effects are associated with the alteration of telomerase activity, folomerase activity was detecaed by PCR－ELISA and PCR－PAGE The results showed that telomerase activity declined gradually after 10^{-6}mol/L and 10^{-7}mol/L Ro13－7410 treatment.

KEY WORDS Telomerase; Leukemia cell; Retinoid