DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.001
第18卷第3期 第三军医大学学报 Vol,18,No.3
1996年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun.1996

维甲酸诱导人肺腺癌细胞基因表达和分化作用的研究*

论著

黎伯铨 毛宝龄 张雪艳** 蔡 岩** 王秀琴** 吴 旻** (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所)
重庆,630037

提 要 应用10^{-5} mol/L全反式维甲酸(RA)诱导人肺腺癌细胞系GLC-82,观察到:①细胞体外生长速度减慢、堆叠性生长消失、胞浆内出现空泡、细胞逐渐衰老和死亡;②双层软琼脂中细胞集落形成受到明显抑制;③细胞DNA合成能力降低;④细胞周期出现向G_1/G_0期移行的特征性动力学改变;⑤细胞分化和凋亡的效应器因子-谷氨酰胺转移酶(TGase)基因早期即被激活并持续表达。研究结果表明,RA通过激活人肺腺癌细胞GLC-82分化相关基因表达进而启动细胞分化。

关键词 诱导分化;人肺腺癌细胞系;维甲酸
中图法分类号 R734.205

肿瘤的分化治疗和基因治疗是肿瘤生物学和肿瘤临床治疗学研究的新领域,前者是应用化学药物诱导肿瘤细胞分化成正常或接近正常的细胞,后者是以遗传工程手段来修复、替代或补充肿瘤细胞中受损伤或缺失的基因。分化治疗和基因治疗都是通过矫正肿瘤细胞生长与分化调控的异常达到肿瘤治疗的目的。

全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid,RA)是迄今研究最为深入、作用最强的分化诱导剂之一,可以诱导多种肿瘤细胞分化、逆转多种肿瘤细胞的恶性表型[1],体内、外研究还发现,RA可以预防和逆转支气管上皮鳞状化生[2]。

在本实验中用10^{-5} mol/L全反式维甲酸诱导人肺腺癌细胞系GLC-82,观察了RA对细胞基因表达和恶性生长状态的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞系GLC-82由昆明医学院引入。PRMI 1640培养基、异硫氰酸胍购自美国GIBCO BRL公司。全反式维甲酸(RA)、二甲亚砜(DMSO)为美国Sigma公司产品。^{3}H-TdR由中国科学院原子能研究院提供。α-^{32}P-dCTP(>3000 μCi/mmol,10 μCi/μl)和zeta-probe尼龙膜分别购自美国NEN公司和Bio-Rad公司。人内皮组织谷氨酰胺转移酶(transglutaminase,TGase)由Texas大学Peter JA Davies教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及RA诱导 于80 ml培养瓶中接种5×10^4细胞,加入8 ml RPMI-1640培养液(含10%小牛血清、100 u/ml青、链霉素)于37℃、5%CO_2条件下培养传代。RA于使用前溶于少量DMSO,用小牛血清稀释至10^{-3} mol/L。细胞培养液中,RA终浓度为10^{-5} mol/L,每日换液。未处理细胞培养液中仅含相应量(0.02%)的DMSO。

1.2.2 生长速度测定、裸鼠异体接种和软琼脂集落形成试验 采用本实验室常规方法。

1.2.3 ^{3}H-TdR掺入试验 采用文献[3]的方法。

1.2.4 细胞周期分析-流式细胞光度术 收获经RA诱导不同时间的细胞,1%TV消化分散,RNase处理,95%乙醇于4℃固定4 h以上。用碘化丙啶(PI)和SR101工作液染色,混匀后过尼龙网,EPLS-r型流式细胞仪作DNA单参数分析,每个样品测定2000个细胞,测得数据自动贮存于计算机,采用仪器程序用最小二乘法拟合曲线及直线分割法计算各期细胞比例。

1.2.5 cDNA探针标记 带有TGase cDNA和人Tubulin cDNA重组质粒的细菌以LB培养基扩增后,Triton-溶菌酶法裂解,CsCl密度梯度离心,分离纯化的质粒DNA用限制性内切酶酶解、电泳分离、回收目的片段。随机引物法制备^{32}P标记的TGase和Tubulin cDNA探针。

1.2.6 RNA提取与Northern印迹杂交 异硫氰酸胍小量快速提取细胞总RNA,取未处理及RA处理(0.5、1~7 d)细胞的总RNA各30 μg,10%琼脂糖甲醛变性凝胶电泳分离、毛细管法吸印转移。杂交按zeta-probe尼龙膜要求条件进行。与TGase cDNA杂交过的膜,脱探针后再与人Tubulin cDNA探针杂交。

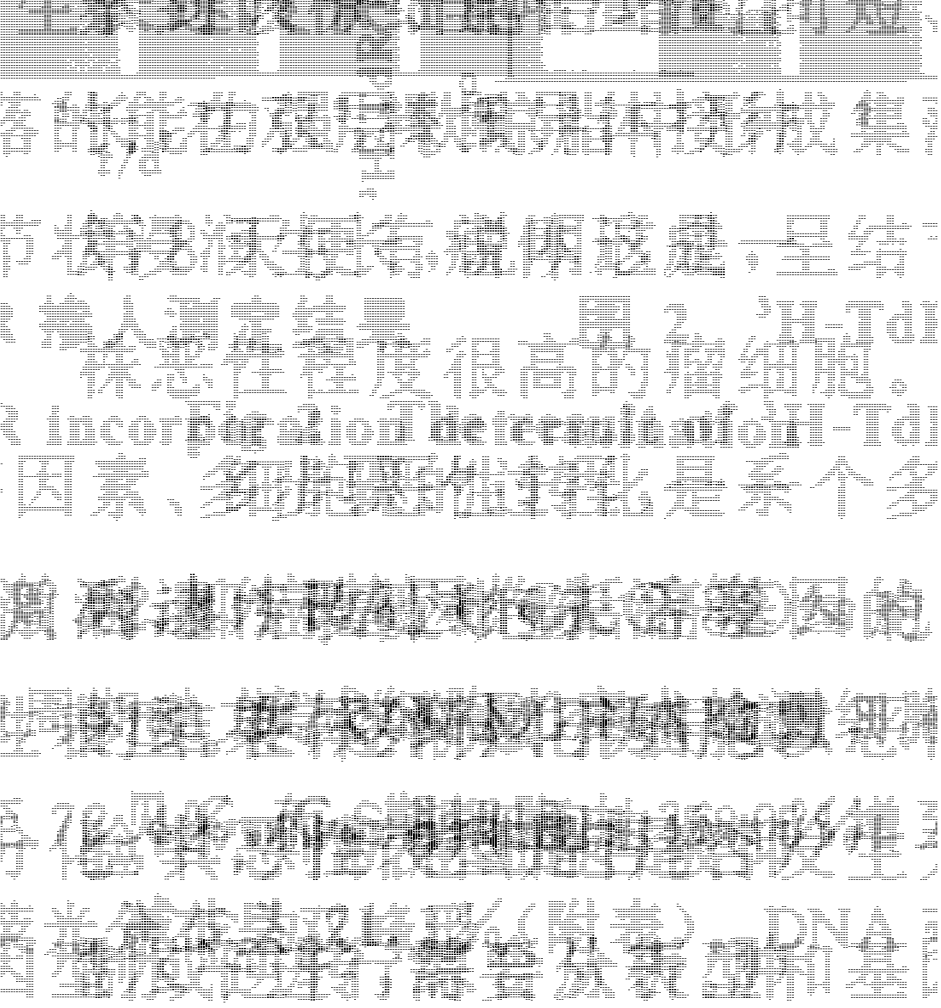
2 结果

2.1 RA对GLC-82细胞体外生长状态的影响

GLC-82细胞呈多边棱形,倍增时间约为48 h,接种裸鼠后第8天即出现瘤体,肿瘤呈结节状浸润生长。RA处理后,细胞生长速度减缓,根据细胞生长抑制率公式GI%=(1-N_t/N_0)

* 国家863高科技发展计划和世界实验室资助项目
** 中国医学科学院肿瘤研究所 北京,100000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

瘤的去恶化，最终应以体内生长和转移受到控制为标准，在体外培养条件下，细胞生长抑制和锚泊不依赖性生长恶性特征的消失，可以代表肿瘤细胞的去恶化表现。众多资料表明，细胞的增殖与分化呈负相关[3]，细胞分裂、增殖速度减慢常常是细胞分化的结果。我们用10^{-5}mol/L RA 连续诱导 GLC-82 细胞，细胞生长抑制逐渐加深，没有看到急剧的形态破坏和明显的细胞死亡，说明10^{-5}mol/L RA 对 GLC-82 细胞的作用是非细胞毒介导的生长抑制效应。细胞生长的密度调节与瘤细胞恶性行为之间关系密切[4]，相差显微镜下见到，在 RA 持续诱导下，GLC-82 细胞逐渐伸展，由棱柱型变得扁平，堆叠性生长状态消失，表明细胞恢复了生长的接触抑制特性。肿瘤细胞的锚泊非依赖性生长(Anchorage independent growth)特性是癌细胞区别于正常细胞的重要标志，它与肿瘤在体内的生长状态高度相关[5]。实验观察到 GLC-82 细胞在生长减慢的同时，基本上丧失了在双层软琼脂中形成集落的能力，表明 GLC-82 细胞在 RA 诱导下恶性程度降低，出现了分化细胞的特征。脱氧胸腺嘧啶核苷是 DNA 合成的前体，^{3}H-TdR 掺入可以反映细胞 DNA 合成速率[6]，实验观察到，在 RA 诱导第 6 天时，GLC-82 细胞^{3}H-TdR 掺入率下降了 60%，表明 GLC-82 细胞的 DNA 合成能力降低。肿瘤细胞的细胞周期动力学特点是细胞群体主体分布于 DNA 合成活跃的 S 期，而分化细胞群体分布于 DNA 合成静止的 G_1/G_0。流式细胞光度术检测结果表明，RA 诱导下的 GLC-82 细胞出现分化细胞特有的周期分布：RA 诱导第 5 天，G_1/G_0 期细胞由诱导前的 36.6%增至 72.4%，而 S 期细胞由 58.5%减少为 21.1%，RA 作用下的 GLC-82 细胞所呈现出的 G_1 期延滞和 G_1-S 期转换的抑制，是处于分化过程中的细胞所具有的共同特征[7]。谷氨酰胺转移酶(TGase)是一种 Ca^{2+} 依赖性的具有催化蛋白交联和多胺与蛋白结合的酶。近年来，因发现在正常和病理过程中 TGase 作为细胞分化和凋亡(apoptosis)的效应器分子(effector molecule)的作用而备受关注[8]，更有人将其视作后选的抑癌基因而加以研究。TGase 还可以作为 RA 抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化的指标[9]。实验观察到 RA 诱导的 GLC-82 细胞在生长状态、恶性转化能力、DNA 合成速率及细胞周期移行等表型特征改变的同时，TGase 基因早期、持续表达，表明 TGase 基因激活是 RA 启动 GLC-82 细胞分化的早期事件，提示 TGase 基因是与 GLC-82 细胞分化相关的基因或促分化基因。细胞分化是一个级联式的连续过程，有许多基因参与，本实验也证明了 RA 可激活人肺腺癌细胞分化相关基因表达，这为进一步克隆肺腺癌细胞促分化基因提供了线索和依据。

参考文献

1 Smith MA, David RP, Bruce DC *et al*. Retinoids in cancer therapy. J Clin Oncol, 1992; 10: 839

2 Lotan R. Retinoids and squamous cell differentiation. In: Hong WK, Lotan R ed. Retinoids in oncology, New York: Marcel Dekker, 1993: 43～72

3 Zou CP, Clifford JL, Xu XC *et al*. Modulation by retinoic acid(RA)of squamous cell differentiation, cellular RA-binding proteins, and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Res, 1994; 54: 5479

4 Lotan R. Mechanism of inhibition of tumor cell proliferation by retionoids, in Retinoids: New trends in research and therapy. Saurat JHO (eds), J Basel Karger, 1985: 97～105

5 Amos B, Reuben L. Retinoid-sensitive cells and cell line. Methods Enzymol, 1990; 190: 217

6 Decaprio JA, Ludlow JW, Lynch D *et al*. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of cell cycle regulatory element. Cell, 1989; 58: 1085

7 Lotan R, Nicolson GL. Inhibitory effects of retinoic acid or retinyl acetate on the growth of untransformed, transformed and tumor cell in vitro. J Natl Cancer Inst, 1977; 59: 1717

8 Nagy L, Thomazy V, Davies PJA. Transglutaminases: effector molecules in physiologic cell death. Cancer Bull, 1994; 46: 136

9 黎伯铨，张雪艳，蔡　岩等.维甲酸对人肺腺癌细胞系分化作用的实验研究.中华医学杂志，1995；75(11)：683

(收稿：1995-09-20；修回：1996-05-08)

(编辑　刘　鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Induction of differentiation and activation of gene expression in a human pulmonary adenocarcinoma cell line with all-trans-retinoic acid

Li Baiquan, Mao Baolin, Zhang Xueyan, Cai Yan, Wang Xiuqing, Wu Wen (Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract All-trans-retinoic acid (RA) is a powerful differentiation-inducing agent. This effect of RA at the dosage 10^{-5} mol/L on the differentiation and gene expression of a human pulmonary adenocarcinoma cell line GLC-82 was observed and the findings were as follows; ① Cellular proliferation *in vitro* was suppressed, accumulative proliferation disappeared, vacuolization in the cytoplasm occurred in the cytoplasm and senile degradation and death of the cells were seen. ② Inhibition of clony formation on the double-layered soft agar. ③ Decrease of the cellular capacity to synthesize DNA. ④ Characteristic shift to the G_1/G_0 phase of the cell cycle. ⑤ Persistent expression of transglutaminase, which is the effector of cellular differentiation and apoptosis. These findings indicate that RA initiates the differentiaton of human pulmonary adenocarcinoma cells through the activation of differentiation-related gene expression.

Key words differentiation induction; human pulmonary adenocarcinoma cell line; retinoic acid

个案与短篇

食管重建手术治疗食管化学灼伤

Surgery of rebuilding oesophagus for the treatment of esophageal caustic burns

陈虎平 王明荣 高景源 （第三军医大学附属西南医院心胸外科）重庆，630038

我院1988年6月至1993年12月共收治食管化学灼伤36例。其中碱性灼伤30例，酸性灼伤6例。伤后因食管瘢痕性狭窄行食管重建术20例。其中带蒂结肠旁路移植术11例，术后发生吻合口瘘6例，同时存在吻合口狭窄5例，单纯吻合口狭窄1例。食管胃吻合术9例，分两种术式：狭窄位于食管中或下段，经左胸后外侧切口切除病变食管，行食管胃胸内吻合5例，食管胃左颈部吻合1例；经上腹正中切口游离全胃经胸骨后至左颈部行胃食管吻合3例。术后发生吻合口狭窄及颈部吻合口瘘各1例。

讨论

带蒂结肠旁路移植术为食管灼伤后瘢痕狭窄病例行食管重建较为常用的方法。其优点为手术创伤小，操作较为简单，但其术后并发症较为突出[1]。本组半数以上病例发生不同程度的吻合口狭窄及瘘，其原因是多方面的。除与术者技术水平有关外，吻合口张力过大，移植结肠血供不良，结肠胃吻合部排空受阻等均有影响。本组吻合口瘘与狭窄常同时存在或先后出现，互为因果。大多数作者认为瘢痕性食管与周围组织粘连紧密，切除时较为困难，具有造成大出血的可能[2]，故多主张采用旁路术。本组6例病变部位在中段或下段食管者，切除病变食管后行胃食管吻合，术中切除病变食管并不十分困难，亦未增加术中出血量。此法可切除瘢痕化食管，从而减少瘢痕癌发生的可能性[3]。采用胃旁路术，胃食管左颈部吻合，具有结肠旁路术的优点，但避免了缺点。本组3例均无并发症发生。我们认为此术式具有较强的适应症，临床须进一步观察。本组9例食管胃吻合术，术后吻合口狭窄及颈部吻合口瘘各1例，明显低于结肠旁路术。

关键词 食管灼伤；狭窄；外科处理

中图法分类号 R655.4

参考文献

1 李朝先，温剑虎，李法荫. 右半结肠代食管治疗食管良性狭窄的体会. 中华胸心血管外科杂志，1992；8：186

2 万国泰，孙耀昌，答作为等. 咽食管化学性烧伤后狭窄的外科治疗. 中华胸心血管外科杂志，1991；7：168

3 蒋耀光，范士志，王如文等. 食管及胃腐蚀伤的外科治疗. 中华胸心血管外科杂志，1993；9：105

（收稿：1995-09-24；修回：1996-05-13）

（编辑 冷怀明、汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net