DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.019

β-胡萝卜素对促癌剂抑制细胞间隙连接通讯的影响*

朱俊东 陈东升 糜漫天 杨家驹 石元刚 (第三军医大学预防医学系营养与食品卫生学教研室) 重庆,630038

提 要 研究了β-胡萝卜素(β-carotene)在 Swiss NIH/3T3细胞中的代谢情况及其对促癌剂 TPA(12-o-tetradecanoyl-13-phorbol-acetate)抑制 NIH/3T3细胞间隙连接通讯(GJIC)的影响。结果显示:β-胡萝卜素在 NIH/3T3细胞中不能转化为视黄醇,对 NIH/3T3细胞 GJIC功能有诱导作用,同时对 TPA抑制 NIH/3T3细胞 GJIC功能有不同程度的拮抗作用。提示β-胡萝卜素的抗癌作用可能与细胞 GJIC功能变化有关。

关键词 β-胡萝卜素;促癌剂;细胞间隙连接通讯
中图法分类号 Q562; R730.1

β-胡萝卜素(β-carotene)的抗癌作用已被大量的实验所证实,但其作用机理至今仍未完全阐明。细胞间隙连接通讯(Gap junctional intercellualr communication, GJIC)是细胞间近距离基因信号传递的主要方式,在调节细胞的增殖和分化中起重要作用,并与癌变的发生有关[1]。现已证实大量促癌物均能抑制细胞 GJIC功能,目前认为细胞 GJIC功能的抑制是促癌阶段的重要机理[2]。β-胡萝卜素的抗癌作用与细胞 GJIC功能变化的关系已引起人们关注。本研究通过体外实验在观察 Swiss NIH/3T3细胞对β-胡萝卜素代谢的基础上,运用近年新发展的划痕标记染料示踪技术(Scrape loading and dye transfer, SLDT)检测细胞 GJIC功能,研究了β-胡萝卜素对促癌剂 TPA(12-o-Tetradecanoyl-13-phorbol-acetate)抑制 NIH/3T3细胞 GJIC功能的影响,以期从细胞水平上探讨β-胡萝卜素的抗癌作用机理。

1 材料与方法

1.1 细胞株

Swiss NIH/3T3成纤维细胞。

1.2 主要试剂及仪器

Eagle's MEM培养基, GIBCO;β-胡萝卜素标准, E. Merck视黄醇标准, Clonbrook. Brocks;二甲基亚砜(DMSO),苏州正兴化工研究所; TPA, Sigma;荧光染料 Lucifer Yellow CH, Sigma 35 mm直径塑料培养皿, Denmark. MPF-4型荧光分光光度计,日立; Olympus荧光显微镜,日本。

1.3 主要指标及方法

1.3.1 NIH/3T3细胞传代培养 NTH/3T3细胞培养于 Eagle's MEM培养基中(内含10%小牛血清,青霉素100 u/ml,链霉素100 u/ml, 2 mmol/L谷氨酰胺),按常规方法进行传代。

1.3.2 NTH/3T3细胞对β-胡萝卜素的代谢[3] 取2×10^6/ml细胞悬液3 ml接种于25 ml培养瓶中,加入终浓度为10^{-6} mol/L的β-胡萝卜素(溶剂为 DMSO)培养72 h,同时设不加β-胡萝卜素的对照。培养完毕后用0.25%胰酶消化数分钟,离心收集细胞,再以 PBS液1 ml调成悬液,加入1 ml无水乙醇振摇数次使其混匀,尔后加入2 ml正已烷混合持摇30 s提取细胞,重复提取2次,合并正已烷层待测。在 MPF-4型荧光分光光度计上,激发波长为345 nm条件下,分别观察β-胡萝卜素处理的细胞提取物及对照细胞提取物, 10^{-6} mol/L视黄醇标准(溶于正已烷中)的各自荧光发射光谱特征。

1.3.3 SLDT检测细胞 GJIC功能变化[4] 接种1×10^6个细胞于35 mm直径塑料平皿内,次日细胞达单层密度饱和即可用于实验。实验分组:对照组;促癌剂 TPA处理组;β-胡萝卜素处理组;β-胡萝卜素+ TPA处理组。不同剂量的β-胡萝卜素(10^{-8} ~ 10^{-6} mol/L)于实验开始时加入, TPA(终浓度为20 ng/ml,溶于 DMSO中)于培养结束前6 h加入。各组均培养72 h结束后除去培养液,用 PBS液洗3次,将含0.05% Lucifer Yellow CH的 PBS液约2 ml加入平皿中,用手术刀片在平皿上轻轻划痕数条,记时3 min,吸净荧光染料,再以 PBS液洗2次,最后细胞浸在 PBS液中在 Olympus荧光显微镜下观察、照相。

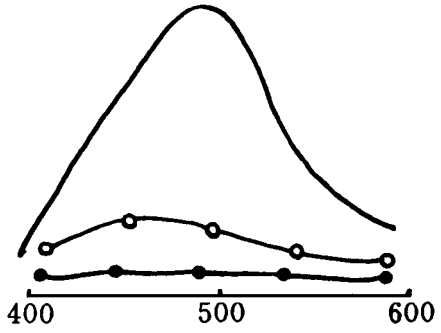
2 实验结果

2.1 β-胡萝卜素在 NTH/3T3细胞中的代谢

10^{-6} mol/Lβ-胡萝卜素处理的 NIH/3T3细胞提取物在激发波长为345 nm条件下扫描未出现480 nm处的特征荧光发射光谱(视黄醇的特征荧光发射光谱)。结果提示β-胡萝卜素在 NIH/3T3细胞中不能转化为视黄醇(见附图)。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39170657

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



附图　NIH/3T3细胞提取物荧光发射光谱扫描图

Fig　Fluorescence emission spectra of NIH/3T3 cells extracts

—— Retinol(10^{-6} mol/L); ·—· Control cells extracts; ·—·—· β-carotene treated cells extracts

2.2　NIH/3T3细胞 GJIC功能的变化

对照组 NIH/3T3细胞具有 GJIC功能,LY荧光传输达标记细胞附近4层细胞。促癌剂 TPA处理的 NIH/3T3细胞 GJIC功能完全受到抑制,无荧光染料传递现象,荧光只分布在划痕伤沿细胞列。不同浓度β-胡萝卜素处理的 NIH/3T3细胞 GJIC功能表现为增强趋势,10^{-8} mol/L浓度时与对照近似,10^{-7} mol/L浓度时荧光传递4或5层细胞,10^{-6} mol/L浓度时荧光传递6层细胞。β-胡萝卜素+ TPA处理组 NIH/3T3细胞 GJIC功能得到一定程度的恢复,10^{-8} mol/L浓度时荧光传递1层细胞,10^{-7} mol/L浓度时荧光传递2层细胞,10^{-6} mol/L浓度时荧光传递2或3层细胞。上述结果提示β-胡萝卜素对 NIH/3T3细胞 GJIC功能有一定的拮抗作用,随浓度升高作用增强(见附表)。

附表　NIH/3T3细胞 GJIC功能变化

Table　Changes of GJIC between NIH/3T3 cells

Group	Dose (mol/L)	GJIC
Control		†††
TPA		-
β-carotene	10^{-8}	†††
	10^{-7}	††† ,++††
	10^{-6}	††††
β-carotene+ TPA	10^{-8}	+
	10^{-7}	††
	10^{-6}	†† ,†††

Note: GJIC was indicated by LY dye transfer;
"-" means blockage of LY dye transfer;
"+" means one cell of LY dye transfer in sequence;
"††" means two cells of LY dye transfer in sequence;
The others on the analogy of above.

3　讨论

3.1　β-胡萝卜素在 NIH/3T3细胞中作用的分子形式

在体外实验中不同的细胞株对β-胡萝卜素的代谢能力并不完全一样。Quick等[5]报道 Caco-2细胞(人结肠腺瘤细胞)能在体外生物转化β-胡萝卜素为视黄醇,而多数非肠源性细胞如 $C_3H_{10}T1/2$细胞、CHO细胞等则无此转化作用[6,7]。β-胡萝卜素作为视黄醇的前体物质其生物学作用与视黄醇也有许多相似之处,尤为重要的是已经公认两者都具有抗癌作用。Hossain等[8]报道包括视黄醇在内的类视黄素(retinoids)抑制细胞肿瘤转化作用与其提高细胞 GJIC功能密切有关。因此在体外实验研究β-胡萝卜素对细胞 GJIC功能的影响与其抗癌作用的关系时有必要对其代谢进行定性研究,以确定β-胡萝卜素发挥作用的有效形式。本实验结果显示β-胡萝卜素在 NIH/3T3细胞中不能转化为视黄醇,表明β-胡萝卜素在 NIH/3T3细胞培养系统中的作用是以其自身分子形式存在的。

3.2　β-胡萝卜素的抗癌作用与 GJIC的关系

GJIC是组织或细胞群体内信号传输的重要途径,它在细胞间物质交流、代谢协调、调节和控制细胞增殖和分化以及在有电兴奋活动的组织内传递信号等功能方面都起着极为重要的作用。因此细胞 GJIC功能受到抑制或破坏对细胞的生命活动会产生一系列不良影响。Yamasaki[1]认为癌变的发生与细胞 GJIC功能变化密切相关。肿瘤被认为是一种增殖和/或分化异常的疾病,在细胞癌变过程中,GJIC的阻断可能使开始癌变的细胞失去与周围正常细胞传输的增殖调控信息的联系而获得自主性生长,进而形成肿瘤[9,10]。许多学者研究发现大量促癌物均有抑制细胞 GJIC功能的作用,目前认为细胞 GJIC功能的抑制是癌变发生多步骤学说促癌阶段的重要机理之一[2]。TPA是最早发现的促癌剂之一,具有极强的促癌活性,有学者研究认为 TPA抑制细胞 GJIC功能是其促癌作用的重要机理[11]。本实验结果显示 TPA抑制 NIH/3T3细胞 GJIC功能,进一步证实了 TPA的促癌作用与其抑制细胞 GJIC功能有关。虽然目前关于β-胡萝卜素的抗癌作用研究较多,但其作用机理尚未完全揭示清楚。由于细胞 GJIC功能改变与癌变的发生有密切关系,提示β-胡萝卜素的抗癌作用可能和 GJIC有某种内在的联系。Zhang LX等[12]报道β-胡萝卜素可通过提高细胞

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

GJIC功能从而降低致癌剂诱导的细胞转化频率,抑制转化细胞生长,表明β-胡萝卜素的抗癌作用可能和细胞 GJIC功能变化有关。本研究观察到β-胡萝卜素对 NIH/3T3细胞 GJIC功能有促进作用,同时对促癌剂 TPA抑制细胞 GJIC功能有一定的拮抗作用,随β-胡萝卜素剂量升高上述作用表现为增强趋势,上述结果提示β-胡萝卜素诱导细胞 GJIC功能、拮抗促癌剂对 GJIC的抑制效应可能与其抗癌作用密切相关。

参考文献

1 Yamasaki H. Cap junctional intercellular communication and cell proliferation during rat liver carcinogenesis. Environ Health Perspect, 1993; 101(suppl 5): 191

2 Ruch RJ. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. Ann Clin Lab Soi, 1994; 24(3): 216

3 Manoharan K. Carotenoids: chemistry and biology. In: Krinsky, ed. International symposium on carotenoids 8th. 1987. Boston Mass. New York: Pleaum Press, 1989: 293~300

4 Mercier T, Honikman-Leban E, Chaumontet C *et al*. Studies on the modulating effects of retinoic acid and retinol acetate using dye transfer and metabolic cooperation assays. Fundam Appl Toxicol, 1993; 21(2): 270

5 Quick TC, Ong DE. Vitamin A metabolism in the human intestinal Caco-2 cell line. Biochem J, 1990; 29(50): 11116

6 Rundhaug JE, Pung A, Read CM *et al*. Uptake and metabolism of β-carotene and retinol by $C_3H_{10}T_1/2$ cells. Carcinogenesis, 1988; 9(9): 1533

7 Stich HF, Dunn BP. Relationship between cellular levels of β-carotene and sensitivity to genotoxic agents. Int J Cancer, 1986; 38(5); 713

8 Hossain MZ, Wilkens LR, Mehta PP *et al*. Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation. Carcinogenesis, 1989; 10(9): 1743

9 Banrud H. Effects of ultraviolet radiation on intercellular communication in V79 chinese hamaster fibroblasts. Carcinogenesis, 1994; 15(2): 233

10 Trosko JE, Chang CC, Madhukar BV *et al*. Chemical, oncogene and growth factor inhibition gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. Pathobiology, 1990; 58(5): 265

11 Rivedal E, Sanner T, Enomoto T. Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamaster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. Carcinogenesis 1994; 15(4): 689

12 Zhang LX, Cooney RV, Betram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit peroxidation in $C_3H_{10}T1/2$ cells: relationship to their cancer chemopreventive action. Carcinogenesis, 1991; 12(11): 2109

(收稿: 1995-11-24;修回: 1996-06-12)

(编辑 刘 鹏)

Effects of β-carotene on the inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoter

Zhu Jundong, Chen Dongsheng, Mi Mantian, Yang Jiaju, Shi Yuangang (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The metabolism of β-carotene and its effects on the inhibition of gap junctional intercellular communication (GJIC) by the tumor promoter 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol-acetate (TPA) in Swiss NTH/3T3 cells were determined. It was found that β-carotene enhanced GJIC among the normal NTH/3T3 cells in a dose-dependent manner and exerted antagonizing effects to various degrees on the inhibition of GJIC by TPA but it could not be converted to retinol in these cells. Our findings suggest that the anticarcinogenic effects of β-carotene might be correlated to the functional changes of GJIC.

Key words β-carotene; tumor promoter; gap junctional intercellular communication

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