



环孢霉素A对体外NIT-1胰岛 β 细胞增殖及其增殖相关基因表达的影响

环孢霉素A(cyclosporine A, CsA)是一种真菌代谢产物,目前已广泛应用于器官移植及自身免疫疾病的治疗。研究发现,环孢霉素除了有效的免疫抑制作用外,对多种细胞的增殖具有抑制作用[1][2][3],在临床上希望成为抗增殖或抗代谢药物。本实验通过观察CsA对NIT-1胰岛 β 细胞的增殖及对pol α 1 mRNA表达的影响,探讨了CsA在临床上用于治疗胰岛素瘤的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

NIT-1胰岛 β 细胞由华中科技大学同济医学院免疫学教研室提供(非肥胖型糖尿病小鼠转入大鼠胰岛素基因启动子和Simian病毒 40 的大 T抗原杂交基因后会自发产生胰岛 β 细胞瘤[1])购自Gibco BRL公司;胎牛血清(杭州四季青公司);1:250胰酶(美国AMRESCO公司);环孢霉素A(瑞士NOVARTIS公司);MTT(华美生物工程公司);MEM、TRIzol(Gibco);逆转录试剂(Promega);PCR试剂、琼脂糖(Takara),100bp DNA ladder(MBI)。

引物由上海博亚公司合成,其他试剂均为分析纯级。

1.2 仪器

CO₂细胞培养箱(日本 NAPCO)、倒置显微镜(日本 NIKON)、低温离心机和紫外分光光度计(德国 Beckman)、405型ELISA酶标仪(美国BIO-RAD公司)、PCR仪(美国 MJ Research)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与MTT法检测 冻存于液氮中的细胞株经常规复苏后,接种于DMEM培养基中(胎牛血清含量15%),在37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下培养。细胞生长至指数生长期时,用0.25%胰酶和0.02% EDTA(体积比为1:1)消化,1 000 r/min离心5 min,细胞沉淀后用完全培养基调整细胞数为0.5~1×10⁵/ml。于96孔板每孔接种100 μ l,条件同上培养48 h之后加入不同浓度的CsA(使用前先用完全培养基配成浓度为100 μ mol/L的母液)至终体积为200 μ l,每种浓度6孔,分别继续培养24、48和72 h,再加入5 mg/ml MTT 20 μ l,继续培养4 h,吸出孔内培养液,每孔加入150 μ l DMSO,室温下将平板置于微孔板震荡器上震荡10 min,使结晶物溶解。再从每孔吸出100 μ l转移至一新的96孔板中,置酶标仪中以570 nm为检测波长,测定各孔的光密度D(λ)值,重复3次。

1.3.2 RNA的提取 NIT-1胰岛 β 细胞按1.5×10⁶个/孔密度接种于6孔板,培养48 h后,抽弃培养基,换上含10 μ mol/L CsA的培养基,继续培养48 h。采用Trizol法制备总RNA,用Trizol裂解细胞后,加入氯仿并离心使之分为水相和有机相两层。转移RNA所在的水相,并用异丙醇沉淀RNA,经75%乙醇洗涤后用水(RNase free)溶解。制备的RNA样品用紫外分光光度计检测D₂₆₀、D₂₆₀/D₂₈₀的值,并计算产量。

1.3.3 RT-PCR

1.3.3.1 cDNA第一链的合成 使用25 μ l体系,主要包括以下成分:反应缓冲液、10 mmol/L dNTP、2

μg 总 RNA、1 μg oligo(dT)18、40 U RNA酶抑制剂、30 U AMV逆转录酶，于42 $^{\circ}\text{C}$ 反应60 min。

1.3.3.2 PCR 建立50 μl 的反应体系，主要成分如下：反应缓冲液、10 mmol/L dNTP、引物(上、下游引物终浓度均为 0.4 $\mu\text{mol/L}$)、0.2~2 μl cDNA产物(通过预试验确定最适模板浓度使得PCR扩增在指数级范围内)、1.25 U Taq聚合酶。引物序列见表1。95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min灭活AMV逆转录酶，反应25个循环，每循环95 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec、50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，再72 $^{\circ}\text{C}$ 保温10 min。实验分正常对照组和CsA处理组。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Specific primers used in RT-PCR

mRNA	Size of PCR product(bp)	Primer sequence(5'→3')
Pol α 1	442	gtggatgacgatgggatacagcacgtttaagaggaat
β -actin	274	ccagagcaagagaggtatccctgtggtacgaccagaggca

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 2%琼脂糖凝胶(含0.5 $\mu\text{g/ml}$ EB)电泳，紫外灯下观察结果并照相。

1.4 统计方法

采用SPSS10.0统计软件进行Dunnett分析。

2 结果

2.1 形态学观察结果

倒置显微镜下观察细胞形态，对照组NIT-1细胞接种贴壁48 h进入指数生长期后，细胞表现为高折光性，呈不规则多边形，细胞相互嵌合(图1A)。10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理的NIT-1胰岛 β 细胞48 h即可见明显的细胞损伤现象，表现为细胞生长缓慢，部分细胞变圆变小，折光度下降(图1B)。处理72 h后，对照组细胞变化不大(图2A)，而CsA处理组正常形态细胞减少，细胞碎屑增加，大量细胞变圆变小，透光性进一步下降，还有部分细胞漂浮于培养基中(图2B)。

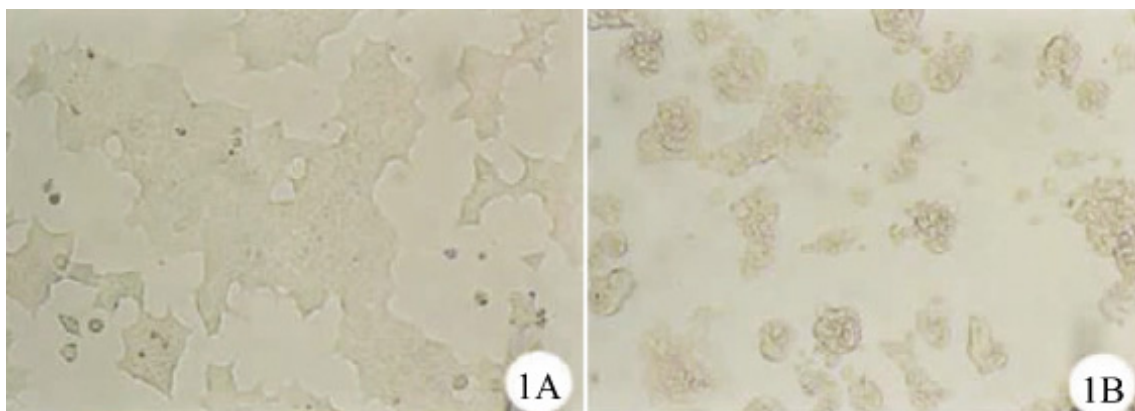


图1 经CsA(10 $\mu\text{mol/L}$)处理48 h后对照组细胞(A)和NIT-1细胞形态(B) (原放大倍数: $\times 100$)
Fig.1 Morphology of the control cells (A) and NIT-1 cells with a 48-hour exposure to 10 $\mu\text{mol/L}$ cyclosporine A (B) (Original magnification: $\times 100$)

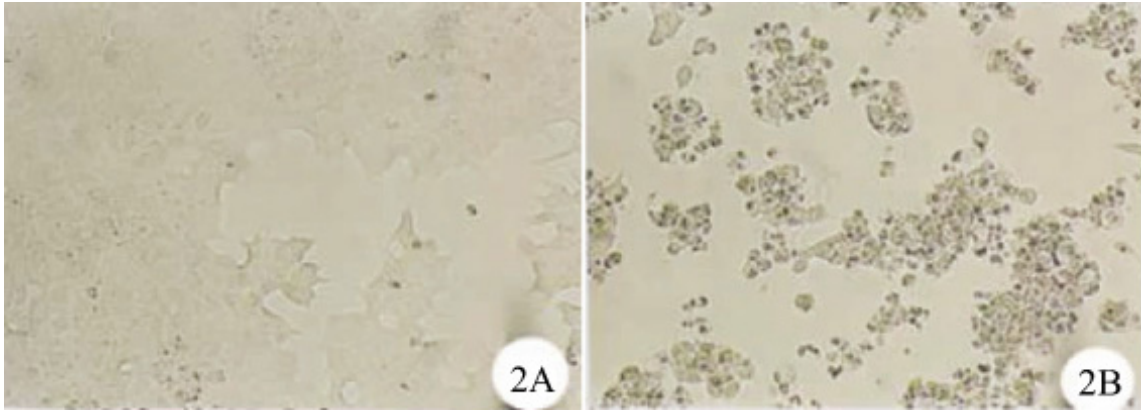


图2 经CsA(10 $\mu\text{mol/L}$)处理72 h 后对照组细胞(A)和NIT-1细胞形态(B) (原放大倍数: $\times 100$)
 Fig.2 Morphology of the control cells (A) and NIT-1 cells with a 72-hour exposure to 10 $\mu\text{mol/L}$ cyclosporine A (B) (Original magnification: $\times 100$)

2.2 CsA对NIT-1胰岛 β 细胞增殖的影响

CsA(0.05~10 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞后, NIT-1胰岛 β 细胞增殖被抑制。CsA处理细胞48 h后, 剂量在5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 开始对细胞增殖有抑制作用, 处理细胞72 h后, 剂量在0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞增殖有显著抑制作用($P < 0.01$), 且随剂量的加大、作用时间的延长, 抑制作用越明显(图3)。

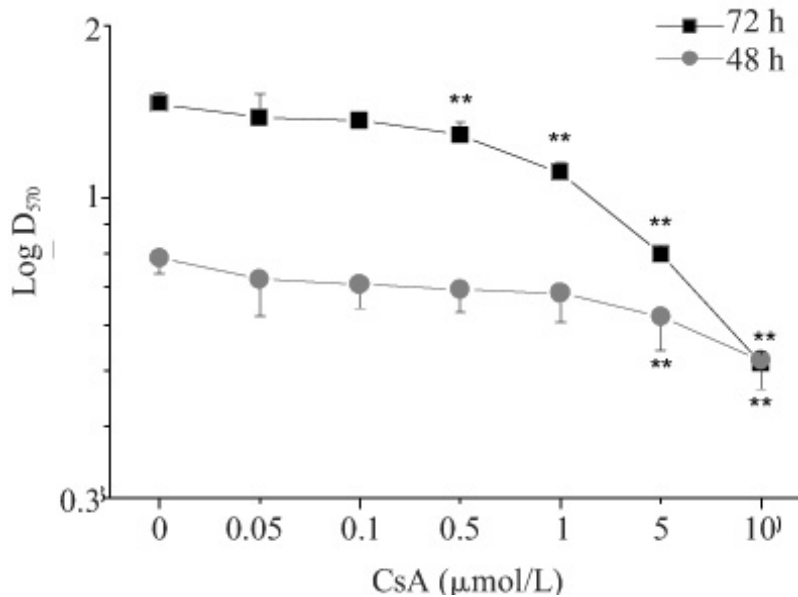
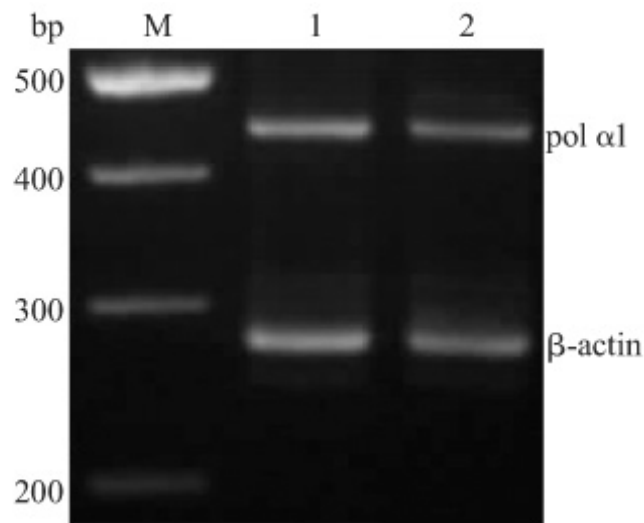


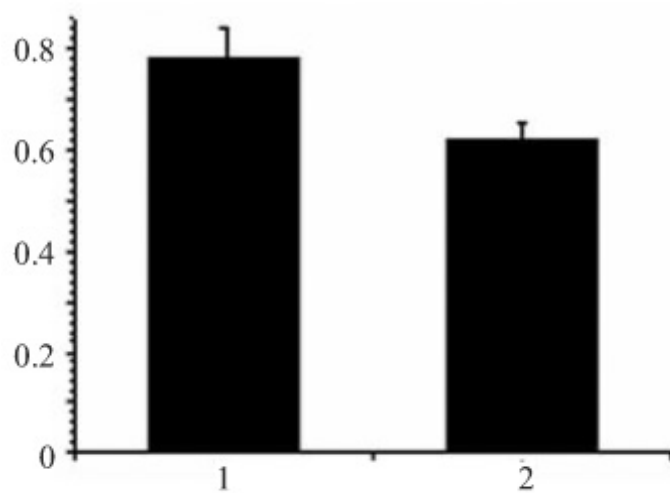
图3 环孢霉素A处理48和72 h后对NIT-1胰岛 β 细胞增殖的影响
 Fig.3 NIT-1 cell proliferation after 48- and 72-hour cyclosporine A exposure
 ** $P < 0.01$ vs control

2.3 环孢霉素A对NIT-1胰岛细胞Pol $\alpha 1$ mRNA表达的影响

10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理NIT-1胰岛 β 细胞48 h后, 对Pol $\alpha 1$ mRNA表达进行半定量分析, 以PCR产物与内参 β -actin产物灰度积分值(volume)的比值(relative volume, RV)反映CsA对pol $\alpha 1$ mRNA表达的影响。结果显示, 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA处理NIT-1胰岛 β 细胞48 h后, 与对照组相比, pol $\alpha 1$ mRNA表达下调(图4), 其下调的百分率为20.6%。



A



B

图4 CsA作用48h 后pol α 1 mRNA的表达

Fig.4 pol α 1 mRNA expression after 48-hour cyclosporine A exposure

A: Electrophoretic patterns; M: DNA size marker; Lane 1: Control group; Lane 2: 10 μ mol/L cyclosporine A

B: Semi-quantification of pol α 1 mRNA expression in the absence or presence of 10 μ mol/L cyclosporine A.

RV: Relative volume; 1: Control group; 2: 10 μ mol/L cyclosporine A

3 讨论

CsA除了具有强大的免疫抑制效应外还具有抗增殖作用，在适当的浓度下能有效的抑制血管内皮细胞、视网膜上皮细胞、表皮细胞、结膜成纤维细胞、平滑肌细胞、晶体上皮细胞及纤维原细胞等多种细胞以及HL-60、K562和RINm5F等多种细胞株的增殖[2][3][4][5][6]。

药物对体外细胞的抑制作用可以通过细胞活性的检测来反映。本实验采用MTT法检测CsA对体外培养的NIT-1胰岛 β 细胞增殖的影响，结果发现CsA对该细胞的生长具有明显的抑制作用，随着药物浓度的提高、作用时间的延长，抑制作用相应增强，呈剂量、时间相关性。

由于DNA复制是细胞增殖的关键，而DNA聚合酶 α 是真核生物染色体复制的一个关键酶，参与滞后链冈崎片断的引物合成核先导链DNA复制起始区引物合成，可引发酶的活性[7]。本实验通过半定量RT-PCR检测了CsA对

NIT-1胰岛 β 细胞 $\alpha 1$ mRNA表达的影响。结果显示CsA可抑制NIT-1胰岛 β 细胞该基因的表达,从基因水平上探讨了CsA对细胞增殖影响的可能机制。

CsA作为免疫抑制剂,已经在临床上应用了20多年,但作为抗增殖剂应用于临床才刚刚起步。胰岛 β 细胞瘤是胰腺内分泌肿瘤中的常见病,治疗措施主要是外科手术切除肿瘤,对不能切除或已有转移的胰岛细胞癌,常用链脲霉素和其它化疗药物。但药物毒性很大,治疗过程中几乎每例都有胃肠道等严重的副作用。CsA可抑制NIT-1胰岛 β 细胞增殖,这对临床应用CsA治疗不能切除或已有转移的胰岛 β 细胞癌可能有一定的意义,至于其确切的作用机制尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] Hamaguchi K, Gaskins HR, Leiter EH. NIT-1, a pancreatic beta-cell line established from transgenic NOD/Lt mouse[J]. *Diabetes*, 1991, 40(7): 842-9.

[2] 杨燕, 吴铁, 刘刚, 等. 乳大鼠表皮细胞体外培养及环孢素A对其增殖抑制作用[J]. *中国临床药理学与治疗杂志*, 1998, 3(3): 181-3.

Yang Y, Wu T, Liu G, et al. Culture of epidermal cells and inhibition of cyclosporin A on cell proliferation in infant mice[J]. *Chin J Clin Pharm Ther*, 1998, 3(3): 181-3.

[3] Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, et al. Effects of cyclosporine A on human conjunctival fibroblasts [J]. *Arch Ophthalmol*, 2001, 119(10): 1512-7.

[4] Sindermann JR, Skaletz-Rorowski A, Bartels A, et al. Paclitaxel and cyclosporine A show supra-additive antiproliferative effects on smooth muscle cells by activation of protein kinase C[J]. *Basic Res Cardiol*, 2002, 97(2): 125-31.

[5] Cortina P, Comez-Lechon MJ, Navea A, et al. Diclofenac sodium and cyclosporin A inhibit human lens epithelial cell proliferation in culture[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1997, 235(3): 180-5.

[6] Azzola A, Havryk A, Chhajed P, et al. Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation[J]. *Transplantation*, 2004, 77(2): 275-80.

[7] Izumi M, Miyazawa H, Harakawa S, et al. Identification of a point mutation in the cDNA of the catalytic subunit of DNA polymerase α from a temperature-sensitive mouse FM2A cell line[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(10): 7639-44.

参考文献:

[1] Hamaguchi K, Gaskins HR, Leiter EH. NIT-1, a pancreatic beta-cell line established from transgenic NOD/Lt mouse[J]. *Diabetes*, 1991, 40(7): 842-9.

[2] 杨燕, 吴铁, 刘刚, 等. 乳大鼠表皮细胞体外培养及环孢素A对其增殖抑制作用[J]. *中国临床药理学与治疗杂志*, 1998, 3(3): 181-3.

Yang Y, Wu T, Liu G, et al. Culture of epidermal cells and inhibition of cyclosporin A on cell proliferation in infant mice[J]. *Chin J Clin Pharm Ther*, 1998, 3(3): 181-3.

[3] Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, et al. Effects of cyclosporine A on human conjunctival fibroblasts [J]. *Arch Ophthalmol*, 2001, 119(10): 1512-7.

[4] Sindermann JR, Skaletz-Rorowski A, Bartels A, et al. Paclitaxel and cyclosporine A show supra-additive antiproliferative effects on smooth muscle cells by activation of protein kinase C[J]. *Basic Res Cardiol*, 2002, 97(2): 125-31.

[5] Cortina P, Comez-Lechon MJ, Navea A, et al. Diclofenac sodium and cyclosporin A inhibit human lens epithelial cell proliferation in culture[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1997, 235(3): 180-5.

[6] Azzola A, Havryk A, Chhajed P, et al. Everolimus and myco-phenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation[J]. Transplantation, 2004, 77(2): 275-80.

[7] Izumi M, Miyazawa H, Harakawa S, et al. Identification of a point mutation in the cDNA of the catalytic subunit of DNA polymerase α from a temperature-sensitive mouse FM2A cell line[J]. J Biol Chem, 1994, 269(10): 7639-44.

[回结果列表](#)