

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

余乐, 雷林生, 吴曙光(第一军医大学药物研究所, 广东广州 510515)

摘要:目的 观察环孢霉素 A(CsA)对体外培养的 NIT-1 胰岛 β 细胞增殖和 pol $\alpha 1$ mRNA 表达的影响。方法 用 MTT 法检测不同浓度的 CsA (0.05~10 $\mu\text{mol/L}$)作用 48 和 72 h 后 NIT-1 胰岛 β 细胞增殖的情况。利用半定量 RT-PCR 法检测 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA 处理 NIT-1 胰岛 β 细胞 48 h 后 pol $\alpha 1$ 在 mRNA 水平上的表达。结果 CsA 可抑制 NIT-1 胰岛 β 细胞的增殖,且与时间、剂量正相关。另外, CsA 还下调了 pol $\alpha 1$ mRNA 的表达。结论 CsA 可抑制 NIT-1 胰岛 β 细胞增殖,其机制可能与下调 pol $\alpha 1$ mRNA 表达有关。

关键词:环孢霉素 A; 细胞增殖 / 药物作用; RT-PCR; NIT-1 细胞

中图分类号: R979.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)11-1278-03

Effects of cyclosporine A on NIT-1 β cell proliferation and pol $\alpha 1$ gene expression *in vitro*

YU Le, LEI Lin-sheng, WU Shu-guang

Institute of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effects of cyclosporine A on the proliferation and pol $\alpha 1$ mRNA expression of cultured NIT-1 β cells. **Methods** After exposure to cyclosporine A at various concentrations (0.05 to 10 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h and 72 h, NIT-1 cell proliferation was analyzed by MTT assay and the gene expression determined by reverse transcriptional PCR (RT-PCR). **Results** Forty-eight-hour and 72-hour cyclosporine A exposure inhibited the cell proliferation in a concentration-dependent manner, and at the concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$, cyclosporine A also decreased pol $\alpha 1$ mRNA expression after a 48-hour exposure. **Conclusion** Cyclosporine A can effectively inhibit the proliferation of NIT-1 cells possibly through down-regulating the expression of pol $\alpha 1$ mRNA.

Key words: cyclosporine A; cell proliferation/drug effects; reverse transcriptional polymerase chain reaction; NIT-1 cells

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^[1-3],在临床上有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 $\alpha 1$ mRNA 表达的影响,探讨了 CsA 在临床上用于治疗胰岛肿瘤的可能性。

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 $^{\circ}\text{C}$ 、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 $\times 10^5$ /ml。于 96 孔板每孔接种 100 μl ,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 $\mu\text{mol/L}$ 的母液)至终体积为 200 μl ,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 μl ,继续培养 4 h,吸出孔内培养液,每孔加入 150 μl 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

收稿日期:2004-05-03

作者简介:余乐(1979-),女,湖北英山人,2003年毕业于第一军医大学,硕士,现工作单位第一军医大学中心实验室, E-mail:yule@fimmu.com
通讯作者:吴曙光,电话:020-61648167, E-mail:shuguang@fimmu.com

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 $D(\lambda)$ 值,重复 3 次。

1.3.2 RNA 的提取 NIT-1 胰岛 β 细胞按 1.5×10^6 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 D_{260} 、 D_{260}/D_{280} 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 μ g 总 RNA、1 μ g oligo (dT)18、40 U RNA 酶抑制剂、30 U AMV 逆转录酶,于 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min。

1.3.3.2 PCR 建立 50 μ l 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 μ mol/L)、0.2~2 μ l 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 $^{\circ}$ C 2 min 灭活 AMV 逆转录酶,反应 25 个循环,每循环 95 $^{\circ}$ C 30 sec、50 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min,再 72 $^{\circ}$ C 保温

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	gtggatgacgatgggatacagcacggttaagaggaat
β -actin	274	ccagagcaagagaggtatccctgtgtacgaccagaggca

10 min。实验分正常对照组和 CsA 处理组。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 2%琼脂糖凝胶(含 0.5 μ 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 μ 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)。

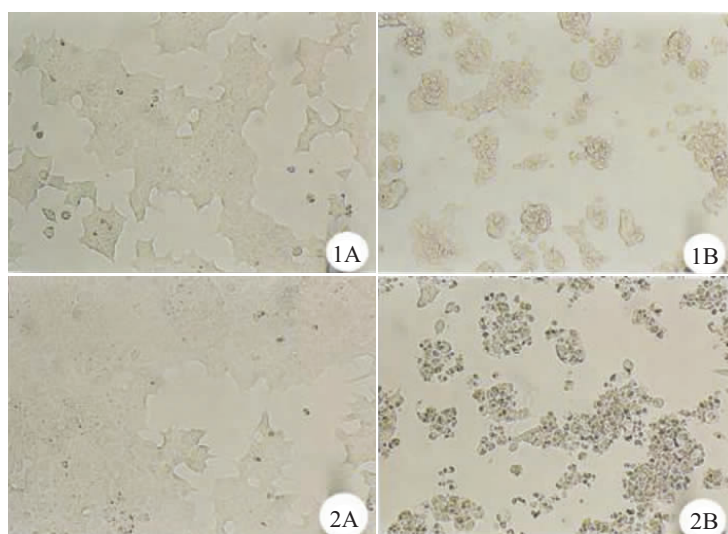


图 1 经 CsA(10 μ mol/L)处理 48 h 后对照组细胞(A)和 NIT-1 细胞形态(B)(原放大倍数: $\times 100$)

Fig.1 Morphology of the control cells (A) and NIT-1 cells with a 48-hour exposure to 10 μ mol/L cyclosporine A (B) (Original magnification: $\times 100$)

图 2 经 CsA(10 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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)。

2.3 环孢菌素 A 对 NIT-1 胰岛细胞 Pol α 1 mRNA 表达的影响

10 μ mol/L CsA 处理 NIT-1 胰岛 β 细胞 48 h 后,对 Pol α 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 α 1 mRNA 表达的影响。结果显示,10 μ mol/L CsA 处理 NIT-1 胰岛 β 细胞 48 h 后,与对照组相比,pol α 1 mRNA 表达下调(图 4),其下调的百分率为 20.6%。

3 讨论

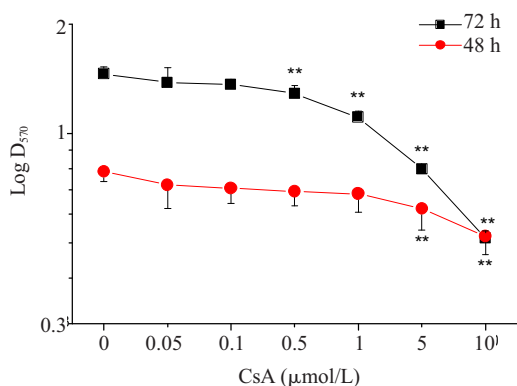


图 3 环孢霉素 A 处理 48 和 72 h 后对 NIT-1 胰岛 β 细胞增殖的影响

Fig.3 NIT-1 cell proliferation after 48- and 72-hour cyclosporine A exposure
**P<0.01 vs control

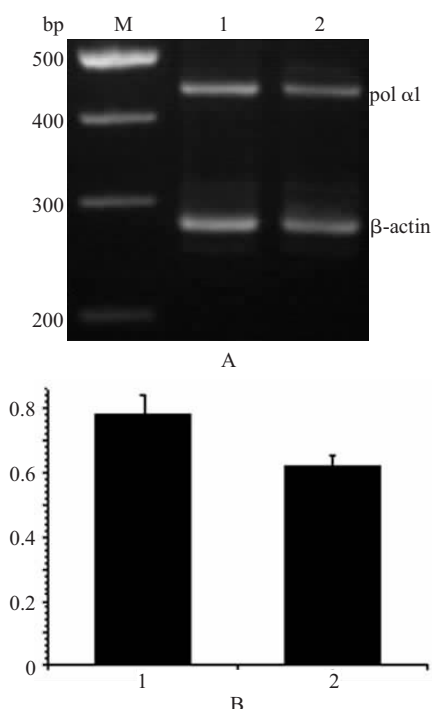


图 4 CsA 作用 48h 后 pol α1 mRNA 的表达

Fig.4 pol α1 mRNA expression after 48-hour cyclosporine A exposure

A: Electrophoretic patterns; M: DNA size marker; Lane 1: Control group; Lane 2: 10 μmol/L cyclosporine A
B: Semi-quantification of pol α1 mRNA expression in the absence or presence of 10 μmol/L cyclosporine A.
RV: Relative volume; 1: Control group; 2: 10 μmol/L cyclosporine A

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^[2-6]。

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 pol α1 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 β 细胞瘤,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 细胞瘤可能有一定的意义,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.