

稀土化合物氯化亚铈对人肺癌细胞 PG、 人胃癌细胞 BGC-823 的作用

李晓滨 周爱儒* 俞文华

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

陈兴安

(国家稀土开发应用卫生评价中心, 北京 100088)

摘要 以人肺癌细胞 PG 和人胃癌细胞 BGC-823 作为研究对象, 利用 MTT 测定、 ^3H -TdR 参入、流式细胞术、软琼脂培养、Northern blot、Western blot 等实验方法, 观察了稀土化合物氯化亚铈 (CeCl_3) 抑癌作用。结果表明, CeCl_3 浓度为 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 可抑制 PG 细胞的增殖; 浓度为 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 可抑制 PG 细胞 DNA 的合成, 其 G1 期细胞比例增加而 S 期细胞比例减少, 在软琼脂中的生长能力降低, 原癌基因 *c-myc* 和 *c-ras* 表达降低, p16 蛋白质表达降低。而同样浓度的 CeCl_3 对 BGC-823 细胞和正常细胞 2BS 未见影响。提示: 稀土化合物抑制肺癌细胞 PG 的增殖以及降低其恶性度的作用机制可能与一些增殖相关的原癌基因的表达和细胞周期的调控有关, 其确切的机理还需进一步的研究。

关键词 氯化亚铈, 细胞增殖, 细胞周期, 基因表达

The Effect of Cerium Compounds on Two Cell Lines: Human Lung Cancer Cells and Human Gastric Carcinoma cells BGC-823

LIXiaobin, ZHOU Airu, YU Wenhua

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083)

CHEN Xingan

(National Center of Hygienic Evaluation for Rare-earth Element Development and Utilization, Beijing 100088)

Abstract The effect of CeCl_3 on human lung cancer cells PG, human gastric carcinoma cells BGC-823 and human diploid fibroblasts 2BS were studied by using MTT assay, ^3H -TdR incorporation, flow cytometry, soft agar culture, Northern blot and Western blot. The results indicated that CeCl_3 inhibited PG cells proliferation and ^3H -TdR incorporation; decreased the proportion of PG cells in S phase, while increased the proportion of PG cells in G1 phase; inhibited the growth of PG cells in soft agar and the expression of proto-oncogenes *c-myc*, *c-ras* and p16 protein in PG cells. But CeCl_3 had no effect on BGC-823 cells and 2BS cells. The mechanism, by which the rare earth compound CeCl_3 inhibited the proliferation of PG cells' and decreased its malignancy, may be concerned with some proto-oncogenes relating to proliferation and protein expression and the regulation of cell cycle. But further studies are needed to learn the exact mechanism.

Key words CeCl_3 , Cell proliferation, Cell cycle, Gene expression

稀土放射性同位素早已广泛应用于肿瘤的诊断和治疗。非放射性稀土化合物亦具有抗癌作用。国外从 50 年代起, 对稀土抗癌已有报道^[1]。我国从 80 年代中期开始在稀土防癌方面开展了一些工作, 并从抑癌机理方面进行了研究^[2-3]。为了进一步探讨稀

* 联系人 Tel: (010) 62091153

Email: zhouar@mail.bjnu.edu.cn

李晓滨, 女, 1968 年 7 月生, 硕士

收稿日期: 1998-08-11, 修回日期: 1998-12-07

士化合物的抑癌作用及其作用机制,我们观察了氯化亚砷($CeCl_3$)对人肺癌细胞PG、人胃癌细胞BGC-823的增殖、DNA合成、细胞周期、软琼脂生长、原癌基因及蛋白质的表达的影响,同时观察其对正常细胞2BS生长的影响

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞株PG由北京医科大学病理系赠送,人胚肺二倍体成纤维细胞株2BS购于卫生部生物制品研究所,人胃癌细胞BGC-823由北京医科大学第三临床医院赠送; 3H -TdR:上海原子能研究所; α - ^{32}P -dCTP:北京亚辉生物技术公司;Primer- α Gene Labeling kit:美国Promega公司;cmyc探针:购于北京市肿瘤研究所;c-ras探针:北京天象人生物工程公司;抗p16多抗:北京中山生物技术公司。其它试剂均为国产分析纯、优级纯产品

1.2 细胞培养

PG细胞、BGC-823细胞培养于含5%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,2BS细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中置37℃,5%CO₂的培养箱中培养,隔天换液,用胰酶/EDTA消化液分散细胞进行传代培养

1.3 MTT测定

细胞以 1.5×10^4 /ml密度接种于96孔培养板,每孔200 μ l饥饿同步化处理后,用 $CeCl_3$ (0.01 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L)处理48 h,同时给予5-FU 0.2 mmol/L作为阳性对照,用MTT比色法测D_{570 nm}。

1.4 3H -TdR 参入

细胞以 3×10^4 /ml密度接种于24孔培养板,每孔1 ml,饥饿同步化处理,药物浓度同1.2,处理24 h,加入 3H -TdR 1 μ Ci,参入8 h后,用液闪计数仪测cpm值

1.5 流式细胞术

细胞以 1×10^5 /ml密度接种于细胞培养瓶,每瓶10 ml,饥饿同步化处理后,用 $CeCl_3$ (0.5 mmol/L, 1 mmol/L)处理24 h,单细胞以 1×10^6 /ml悬浮于1 ml PBS中,上机测试

1.6 软琼脂培养

细胞密度、饥饿同步化处理、药物浓度同1.5,处理14 d,双层软琼脂培养10 d,观察细胞集落,计数,照相

1.7 Northern blot分析

细胞密度、饥饿同步化处理、药物浓度同1.5,处理2 h、6 h、12 h,依文献[4]提取总RNA,进行Northern杂交试验

1.8 Western blot分析

细胞密度、饥饿同步化处理、药物浓度同1.5,处理18 h,依文献[5]提取总蛋白,进行Western杂交试验

2 结果

2.1 MTT测定

$CeCl_3$ (0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L)与PG细胞作用48 h,可明显抑制细胞的增殖,见Table 1;而相同处理对BGC-823细胞和2BS细胞增殖未见明显影响,5-FU(0.2 mmol/L)作为阳性对照可抑制细胞增殖

Table 1 The effect of various concentration of $CeCl_3$ on the cell proliferation in PG cells by MTT assay

Group	Dosage /mmol · L ⁻¹	D _{570 nm} ($\bar{x} \pm s$)	Viability (%)	Inhibition rate (%)
Control		0.815 ± 0.021	100	
5-FU	0.2	0.270 ± 0.022**	33.1	66.9
$CeCl_3$	0.05	0.760 ± 0.029*	93.3	6.7
	0.1	0.733 ± 0.010**	89.9	10.1
	0.5	0.615 ± 0.029**	75.5	24.5
	1	0.433 ± 0.022**	53.1	46.9

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, vs control by t test

2.2 3H -TdR 参入

$CeCl_3$ (0.5 mmol/L, 1 mmol/L)处理PG细胞24 h,与对照组相比,处理组 3H -TdR参入明显减少,见Table 2;而相同处理对BGC-823细胞和2BS细胞DNA合成未见明显影响,5-FU(0.2 mmol/L)作为阳性对照可抑制细胞DNA合成

Table 2 The effect of various concentration of $CeCl_3$ on 3H -TdR incorporation in PG cells

Group	Dosage /mmol · L ⁻¹	cpm ($\bar{x} \pm s$)	Inhibition rate (%)
Control		3683 ± 272	
5-FU	0.2	1988 ± 153**	46.0
$CeCl_3$	0.5	2202 ± 142**	41.2
	1	1658 ± 156**	55.0

** $P < 0.01$, vs control by t test

2.3 流式细胞术

CeCl₃ (0.5 mmol/L, 1 mmol/L) 处理 PG 细胞 24 h, 与对照组相比, 处理组 G1 期细胞均有增加, 分别增加了 30.5% 和 32.5%, 而 S 期细胞则分别减少了 12.3% 和 27.6%, 见 Table 3, 而相同处理对 BGC-823 细胞未见明显影响

Table 3 The effect of various concentration of CeCl₃ on cell cycle progression in PG cells

Group	Dosage /mmol · L ⁻¹	G1	S	G2+ M
		$\bar{x} \pm s$ (%)	$\bar{x} \pm s$ (%)	$\bar{x} \pm s$ (%)
Control		37.80 ± 1.05	49.33 ± 0.68	12.87 ± 1.70
CeCl ₃	0.5	43.33 ± 0.86**	43.27 ± 1.47**	13.36 ± 0.76**
	1	50.10 ± 2.15**	35.73 ± 0.90**	14.1 ± 3.10

** P < 0.01, vs control by t test

2.4 软琼脂培养

CeCl₃ (0.5 mmol/L, 1 mmol/L) 处理细胞 14 d, 与对照组比较, 处理组集落数减少, 且集落较小(见

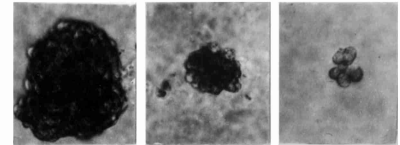


Fig 1 The effect of various concentration of CeCl₃ on growth of PG cells in soft agar

(A) number of focus; (B) cell focus

** P < 0.01, vs control by t test

Fig 1). 而相同处理对 BGC-823 细胞未见明显影响

2.5 Northern blot 分析

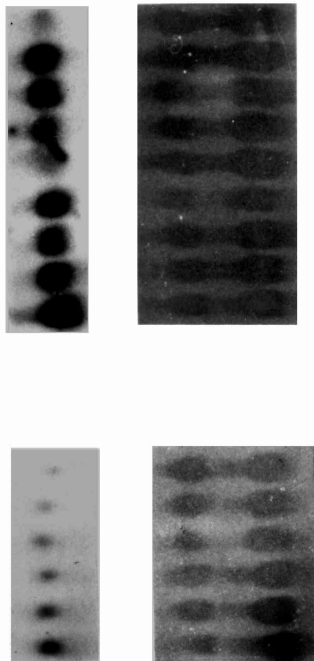


Fig 2 The effect of various concentration of CeCl₃ on c-myc and c-ras mRNA expression in PG cells

(A) The effect of CeCl₃ on c-myc mRNA expression in PG cells;

(B) The effect of CeCl₃ on c-ras mRNA expression in PG cells

I: Right panel, autoradiogram of Northern blot hybridization; Left panel, total RNA. II: Densitometric scanning

CeCl₃ (0.5 mmol/L, 1 mmol/L) 处理 PG 细胞后, 与对照组相比, 2 h、6 h、12 h 时处理组的 c-myc 表达下降, 6 h、12 h 时 c-ras 的表达下降, 见 Fig. 2

2.6 Western blot 分析

CeCl₃ (0.5 mmol/L、1 mmol/L) 处理 PG 细胞 18 h, 与对照组相比其 p16 蛋白表达增加, 见 Fig. 3

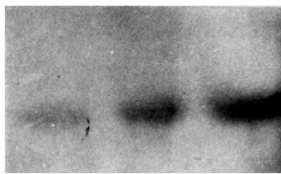


Fig. 3 The effect of various concentration of CeCl₃ on p16 protein expression in PG cells
(A) Western blot analysis; (B) Densitometric scanning

3 讨 论

稀土元素的抗癌作用早有报道 我们以 PG 细胞和 BGC-823 细胞作为研究对象, 观察了 CeCl₃ 的抑癌作用, 同时观察了其对 2BS 细胞生长的影响 本文的实验结果表明, CeCl₃ 对肿瘤细胞的增殖、DNA 合成有抑制作用, 可影响其细胞周期, 但这种抑制作用并不是针对所有肿瘤细胞, 这可能和细胞对药物的敏感性不同有关 本实验结果还提示, CeCl₃ 对正常细胞的生长无影响 软琼脂集落形成状况是反映肿瘤细胞恶性程度的重要参数, 本实验结果显示, CeCl₃ 不但能抑制细胞的增殖, 还能降低细胞的恶性程度

为了对其机制进行了探讨, 我们观察了 CeCl₃ 对 PG 细胞 c-myc 和 c-ras 的 mRNA 表达 c-myc 是具有促增殖作用的原癌基因, 其编码的蛋白质为核内蛋白质, 是一种转录因子, c-myc 在肿瘤中过量表达, 可导致细胞的增殖失控 本实验表明 CeCl₃ 可

能通过抑制 c-myc 的表达, 从而抑制细胞的增殖 至于它是如何影响 c-myc 表达的, 具体机理还不清楚 ras 基因编码的蛋白质 p21^{ras} 位于膜内侧, 是生长信号传导中非常重要的中介物质^[6], 本实验结果提示 CeCl₃ 可能通过抑制 c-ras 的表达来影响 Ras Raf MAPK 的传递途径, 从而发挥其抑制增殖的作用 p16 是抑癌基因 p16^{NK4} 编码的蛋白质, 通过影响 G1/S 的转换直接负向调控细胞增殖周期 p16 蛋白能与 cyclinD₁ 竞争结合而使 CDK 失活, 细胞不能进入 S 期, 从而抑制细胞的增殖^[7]. 本实验结果提示 CeCl₃ 可刺激 p16 的表达, p16 表达的增加使细胞不能从 G1 期进 S 入期而停留在 G1 期, 流式细胞术也证实在处理 24 h 时, 处理组 G1 期细胞增加

综上所述, 稀土化合物 CeCl₃ 可抑制肺癌细胞 PG 的增殖, 降低细胞的恶性程度, 作用机制可能与影响一些与增殖相关的原癌基因表达和细胞周期的调控有关, 但其确切机理还需进一步研究

References

- 1 Anghileri L J. Antitumor activity of gallium and lanthanum: Role of cation-cell membrane interaction. *Anticancer Research*, 1987, 7: 1205~ 1208
- 2 彭少华, 纪云晶, 王宗惠, 庞新民, 苏英. 混合硝酸稀土体内抗肿瘤作用的实验研究. *卫生毒理学杂志* (Peng Shaohua, Ji Yunjing, Wang Zonghui, Pang Xinming, Su Ying. Study of the anticancer effect of rare earth nitrate mixture. *J Health Toxicol*), 1994, 8(3): 218~ 219
- 3 肖白, 纪云晶, 崔明珍, 赵素娟, 孙梅, 高崇峰, 李文梅, 林仲翔, 吕有勇. 镧对癌细胞恶性增殖抑制及相关基因表达的影响. *中华预防医学杂志* (Xiao Bai, Ji Yunjing, Cui Mingzhen, Zhao Sujuan, Sun Mei, Gao Chongfeng, Li Wenmei, Lin Zhongxiang, Lu Youyong. Effect of lanthanum and cerium on malignant proliferation and expression of tumor-related gene. *Chin J Prev Med*) 1997, 31(4): 228~ 230
- 4 Ausubel FM, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd, U. S. A. Gene Publishing Associates and John Wiley & Sons, 1992: 4-1~ 4-28
- 5 萨姆布鲁克(美)等著, 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 1992: 880~ 898
- 6 Ginelli R, Brown J H. G-protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J*, 1996, 10: 741~ 749
- 7 Hengstschlager M. The role of p16 in the E2F-dependent thymidine kinase regulation. *Oncogene*, 1996, 12: 1635~ 1643