

维甲酸和 1, 25 二羟维生素 D₃ 对 LoVo 细胞株 细胞周期的影响

郭俊明, 罗超权

(中山医科大学生物化学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】观察全反式维甲酸(ATRA)和 1, 25-二羟维生素 D₃ 对大肠癌细胞株 LoVo 细胞周期的影响。【方法】流式细胞术测定细胞周期的分布。【结果】ATRA 和 1, 25-二羟维生素 D₃ 使 LoVo 阻止在 G₀/G₁ 期, 未发现明显的亚 G₁ 峰。【结论】单独或联合使用 ATRA 和 1, 25-二羟维生素 D₃ 均具有诱导分化 LoVo 细胞的作用, 这种诱导分化与细胞凋亡无关。

关键词: 全反式维甲酸; 1, 25-二羟维生素 D₃; LoVo 细胞; 诱导分化; 细胞周期

中图分类号: R735.34 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0130-03

Effects of Retinoic Acid and 1, 25-dihydroxy Vitamin D₃ on Cell Cycle of LoVo Cell Line

GUO Jun-ming, Luo Chao-quan

(Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effects of all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and 1, 25-dihydroxy vitamin D₃ on cell cycle of large intestinal cancer cell line LoVo. 【Method】The distribution of cell cycle was determined by flow cytometry. 【Results】The LoVo cells were arrested in the G₀/G₁ phase by ATRA and 1, 25-dihydroxy vitamin D₃, the sub-G₁ peak was not found. 【Conclusion】The differential effects of LoVo cells are observed not only in the combination of using ATRA and 1, 25-dihydroxy vitamin D₃ but also in using one inducer only. These kinds of differentiation are not related with apoptosis.

Key words: all-*trans*-retinoic acid; 1, 25-dihydroxy vitamin D₃; LoVo cells; differentiation; cell cycle

传统化学治疗是治疗恶性肿瘤的主要方法之一, 但由于它的基本原理在于杀死细胞, 这无疑也会对增殖旺盛的正常细胞(例如, 骨髓细胞、生殖细胞等)产生杀伤作用而具有严重的副作用。诱导分化是治疗肿瘤的一种有效方法, 它不是杀伤肿瘤细胞而是使其向正常细胞分化, 因而对正常细胞的毒副作用低^[1]。本课题组实验证实全反式维甲酸(All-*trans*-retinoic acid, ATRA)和 1, 25-二羟维生素 D₃[1, 25-(OH)₂VD₃] 可诱导大肠癌细胞株 LoVo 向正常细胞分化^[2]。为进一步探讨诱导分化的作用机制, 本文作者观察了 ATRA 和 1, 25-(OH)₂VD₃ 对 LoVo 细胞周期的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

ARTA (Sigma) 和 1, 25-(OH)₂VD₃ (Roche) 用无水乙醇溶解后无菌过滤, 避光保存。

1.2 细胞株与细胞培养

LoVo 细胞株由本校动物中心提供, 常规培养于含体积分数为 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液(Gibco)中, 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 培养。48 h 弱光下换液 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3 药物作用

收稿日期: 1999-06-02

基金项目: 广州市科委科研基金资助项目(98-J-018-01)

作者简介: 郭俊明(1965-), 男, 江西南康人, 副教授, 中山医科大学 1997 年一级博士生。

实验分成3组:第1组,10 μmol/L ATRA;第2组,0.1 μmol/L 1,25-(OH)₂VD₃;第3组,10 μmol/L ATRA+0.1 μmol/L 1,25-(OH)₂VD₃。对照组加入等体积的无水乙醇,终体积分数不超过0.1%,此浓度的无水乙醇对细胞生长无明显影响^[2]。实验全过程均在无菌避光条件下进行。

1.4 细胞周期测定

经药物作用2、4和6 d收集细胞(10⁻⁶),加体积分数为70%冷乙醇3 mL固定过夜(4 °C),然后用磷酸盐缓冲液(PBS)把乙醇洗干净,加入DNA-Prep Reagent Kit(Coulter公司)中的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液0.5 mL,染色30 min,用美国Coulter公司ELITE型流式细胞仪测定细胞周期(波长488 nm,功率15 mW)。用鸡红细胞作为标准并调至通道数为100±2,计数10 000个细胞,测出的直方图用Multicycle软件(Phoenix公司)处理,算出细胞各周期的DNA相对含量和百分数。

2 结果

在诱导剂的作用下,G₀/G₁期的细胞比例增高,G₂+M和S期比例下降,并随作用时间的增加而变化更明显,说明细胞被阻滞于G₁期(图1,表1)。无论是单独用药还是联合用药均未见有明显的亚G₁峰(图1)。

表1 ATRA和1,25-(OH)₂VD₃对LoVo细胞周期分布的影响(%)

Table 1 Effects of retinoic acid and 1,25-dihydroxy vitamin D₃ on cell cycle of LoVo cell line

	t(G ₀ /G ₁)/d			t(G ₂ +M)/d			t(S)/d		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
Control	37.7	32.0	35.4	11.6	18.5	17.8	50.7	49.5	46.8
Group 1	43.4	52.8	75.5	19.1	14.3	9.6	37.5	32.9	14.9
Group 2	44.8	54.0	69.7	14.2	13.9	8.1	41.1	32.1	22.2
Group 3	59.2	54.1	63.9	22.3	10.5	10.2	18.5	35.3	25.9

3 讨论

细胞通过分裂而增殖,从细胞前一次分裂结束到下一次分裂结束的间隔时间称为细胞周期(cell cycle)。通过DNA荧光染料PI等染色后可以用流式细胞仪测定细胞周期G₀/G₁、G₂+M和S等各期的分布情况,发现细胞增殖的变化。

正常细胞和肿瘤细胞的主要差别之一是后者具有无休止分裂的特点。生长抑制取决于增殖周期的延长或/和细胞死亡的增多。在流式细胞仪检

测术的直方图中,细胞凋亡具有特征性的亚二倍体(亚G₁)峰^[3],而从图1可知无论是单独还是联合使用ATRA和1,25-(OH)₂VD₃均未见有亚G₁峰。细胞周期长短主要决定于G₁期,G₁期阻滞可使细胞增殖周期延长,导致细胞增殖减慢^[4]。本实验结果表明,在ATRA和1,25-(OH)₂VD₃的作用下,LoVo细胞被阻滞于G₁期,这说明LoVo细胞的生长抑制不是由于细胞凋亡而是由于细胞增殖减慢所致。从实验结果可知,两药单独使用时随作用时间延长,G₁期阻滞作用更明显。

目前认为ATRA和1,25-(OH)₂VD₃通过相应受体(分别为维甲酸受体retinoic acid receptor, RAR和维生素D₃受体vitamin D₃ receptor, VDR)介导的核内信号传递途径激活某些基因表达,引起G₁期细胞生长阻滞而产生诱导分化作用的^[5]。用某些药物(如腺苷酸环化酶激活剂)与1,25-(OH)₂VD₃联合使用可使人原始巨核白血病细胞株的G₁期细胞百分数升高得比单独使用D₃的更明显^[6]。

有人用合成的第三代维甲类化合物Ro13-7410诱导白血病细胞株HL-60发现诱导分化同时伴有细胞凋亡的发生^[7]。但本实验用ATRA、1,25-(OH)₂VD₃和两者联用对大肠癌LoVo细胞进行诱导分化均未见明显的细胞凋亡的发生。这说明使用不同的诱导剂对不同的肿瘤细胞进行诱导分化的机制有所不同。由于细胞调控机制非常复杂,这些变化与细胞分化、凋亡的关系值得进一步深入研究。

前文研究已证实,在ATRA和1,25-(OH)₂VD₃的作用下,LoVo的碱性磷酸酶活性升高,表现出具有正常大肠上皮细胞的功能^[2]。本实验结果说明ATRA和1,25-(OH)₂VD₃使细胞阻滞在G₁期是诱导分化的机制之一,为大肠癌的防治提供了一种新途径。

参考文献:

- [1] Friend C, Scher W, Holland J G, et al. Hemoglobin synthesis in muinevirus induced leukemia cells *in vitro*: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, 68(2): 378.
- [2] 郭俊明,何小洪,罗超权.体外诱导大肠癌细胞分化及其碱性磷酸酶活性的变化[J].中国胃肠外科杂志,1999,2(1):53.
- [3] 张亚历,姜泊,周殿元.程序化细胞死亡常用研究方

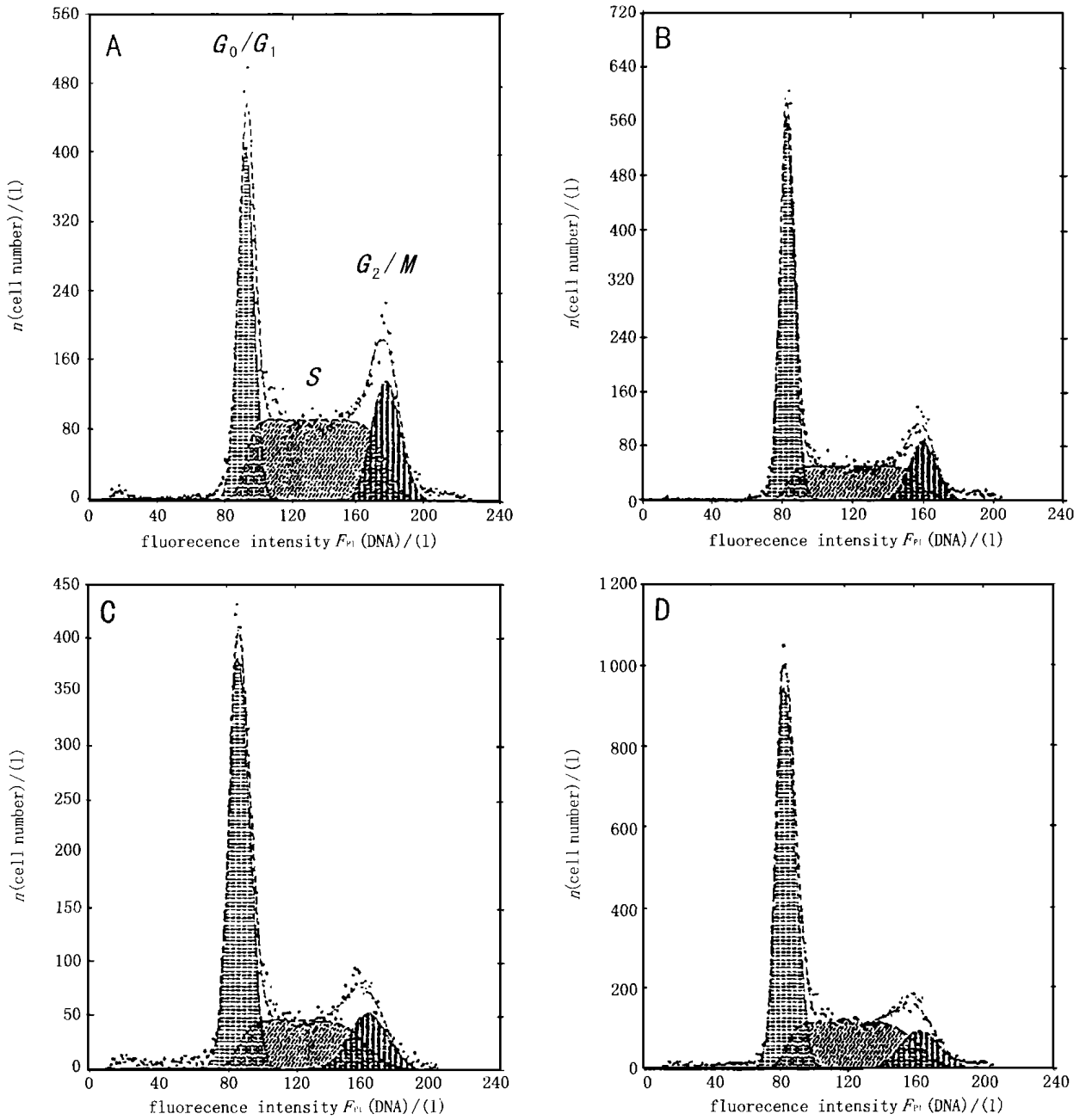


图 1 ATRA 和 1, 25-(OH)₂VD₃ 对 LoVo 细胞周期分布的影响

Fig. 1 Effects of retinoic acid and 1, 25-dihydroxy vitamin D₃ on cell cycle of LoVo cell line

A. Control; B. 10⁻⁶ mol/L ATRA; C. 0.1⁻⁶ mol/L 1, 25-(OH)₂VD₃; D. 10⁻⁶ mol/L ATRA+0.1⁻⁶ mol/L 1, 25-(OH)₂VD₃. The cells were incubated for four days. Fluorecence intensity (A, B, C, D) F_{PI} (DNA) / (1) indicate DNA content

法. 见: 姜泊, 张亚历, 周殿元主编. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 170.

[4] 朱继业. 细胞生长与细胞分裂. 见: 陈诗书, 汤雪明主编. 医学细胞与分子生物学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1994. 328. 170 ~ 183.

[5] Brools S C, Kazmer S, Levin A A, et al. Myeloid differentiation and retinoblastoma phosphorylation changes in HL-60 cells induced by retinoic acid receptor and

retinoid X receptor-selective retinoic acid analogs [J]. Blood 1996, 87(1): 227.

[6] 宋亮年, 孙琳琳. Forskolin 对 1, 25-二羟维生素 D₃ 受体 mRNA 表达的调节及其生物学意义 [J]. 第二军医大学学报, 1996, 17(6): 513.

[7] 刘小珊, 娄陵生, 蒋纪恺, 等. 维甲类化合物 Ro13-7410 对 HL-60 细胞的作用 [J]. 癌症, 1998 17(6): 428.

(编辑 张敏瑞)