

全反式视黄酸抑制人大肠癌细胞Ⅳ型胶原酶的分泌

张亚辉 宋今丹* 王芸庆

(中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室 沈阳 110001)

Ⅳ型胶原酶包括 72kDa Ⅳ型胶原酶/MMP-2 和 92kDa Ⅳ型胶原酶/MMP-9 两种类型,主要降解细胞外基质中的Ⅳ型胶原,它在肿瘤细胞中的表达水平与许多恶性肿瘤细胞的侵袭和转移能力密切相关^[1,2]。本研究的目的旨在探讨全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, RA)对肿瘤细胞分泌Ⅳ型胶原酶的作用。

材料与方法 (1) 无血清培养:常规培养人大肠癌细胞 CloneA 48 小时后,换无血清培养基。同时,在实验组加入以无水乙醇配制的 RA 母液至浓度为 5×10^{-6} mol/L,在对照组加入与 RA 母液等量的无水乙醇。培养 72 小时后,收集上清液。(2) 底物 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[3]:常规 SDS-PAGE 的分离胶中加入明胶,且在 4℃ 下进行。电泳完毕后,用含 2.5% Triton X-100 的洗液室温下洗两次,不含 Triton X-100 的洗液洗一次,37℃ 条件下温育 12 小时。最后,考马斯亮蓝染液染色、脱色。(3) RT-PCR:CloneA 细胞的 MMP-9 和 GAPDH(内参照)的预计扩增产物的片段长度分别为 640bp 和 298bp,扩增后进行琼脂糖凝胶电泳分析。

结果 (1) 明胶酶谱分析:底物 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中,MMP-9 的非活性形式和活性形式,MMP-2 的非活性形式均显示为蓝色背景下的透明条带。用凝胶图象分析系统进行图象分析及数据处理,所得体积值与酶的活性大小成正相关。结果表明各实验组的酶活性皆低于相应的对照组,且统计学上有显著性差异($P < 0.01$),说明 RA 对活性与非活性的 MMP-9,非活性的 MMP-2 皆有明显的抑制作用。(2) RT-PCR:同等条件下,对照组与实验组扩增出的内参 GAPDH 基本一致,而实验组扩增出的 MMP-9 mRNA 含量明显低于对照

组,可初步认为 RA 作用后的人大肠癌细胞 CloneA 分泌的 MMP-9 的 mRNA 表达下调。

讨论 本研究结果表明,RA 作用后的人大肠癌细胞Ⅳ型胶原酶的分泌明显降低($P < 0.01$)。MMP-2 的活性形式未见表达,也许因为其表达低于此法的检测限而未能显现。RT-PCR 结果显示 RA 作用后的 MMP-9 的 mRNA 表达明显下降,说明 RA 对人大肠癌细胞 CloneA 分泌 MMP-9 的作用在 mRNA 水平和蛋白表达水平是一致的。有文献报道,RA 浓度增高,对Ⅳ型胶原酶的抑制效率提高^[4]。RA 对已分泌的Ⅳ型胶原酶无抑制作用,为其作用发生于转录水平,抑制酶基因表达提供了证据。总之,本研究结果支持 RA 可能通过抑制Ⅳ型胶原酶的分泌来抑制肿瘤细胞侵袭和转移的能力的推论,为进一步研究有效的抑癌药物提供了依据。

关键词: 侵袭与转移 Ⅳ型胶原酶全反式视黄酸 人大肠癌细胞

参 考 文 献

- [1] Huhtala, P. et al., 1990, *Genomics*, **6**: 554 - 559.
- [2] Zeng, Z S. et al., 1996, *J. Clin. Oncol.*, **14**: 3133-3140.
- [3] Huessen, C. et al., 1980, *Analytic Biochem.*, **102**: 196-202.

本文 1999 年 7 月 9 日收到。2000 年 3 月 6 日接受。

* 联系人。

[4] Nakajima, M. et al., 1989, *Cancer Res.*, **49**:1689

-1706.

RETINOIC ACID INHIBITS THE SECRETION OF TYPE IV COLLAGENASE BY HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELLS

ZHANG Ya Hui SONG Jin Dan WAN Yun Qing

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, China Medical University, Shenyang, China, 110001)

ABSTRACT

Type IV collagenase, consisting of 72kDa and 92kDa type IV collagenase, have close relationship with tumor invasion and metastasis. Human colorectal carcinoma cells clone A was treated with all-trans-Retinoic Acid. Gelatin zymography showed that the activity of both active and latent forms of type IV collagenases decreased. RT-PCR showed that 92kDa type IV collagenase gene expression was down regulated. So, we conclude that the secretion of type IV collagenases in human colorectal carcinoma cells can be inhibited by RA and the effect probably happens in the level of transcription.

Key words: Invasion and metastasis Type IV collagenase All-trans-RA Human colorectal carcinoma cell

实验技术

一种简单、快速、高效的基因定点突变方法*

任彩萍 刘卫东 何志巍 姚开泰

(湖南医科大学肿瘤研究所 长沙 410078)

为了探索鼻咽癌(NPC)的病因发病机制,最重要的是要建立与 Epstein-Barr 病毒(EBV)有密切关系的 NPC 动物模型,但至今尚未成功。在人类,EBV 受体为补体 I 型受体基因(CR2)编码^[1]。在小鼠亦有 CR2 基因,且与人的 CR2 有高度同源性^[2],不同的是,它可以有 4.5kb 和 3.3kb 两种不同的 mRNA 剪接形式^[3,4],但是 EBV 不能感染小鼠细胞,原因在于两种受体构像不同。有研究表明,当 mCR2 基因中第 15 位和 68 位密码子发生 CCC→TCC 和 ACC→TAC 突变,则分别导致脯氨酸变成丝氨酸(P15S)和苏氨酸变成酪氨酸(T68Y)后,EBV 就可能感染小鼠细胞^[5],也就有可能建立小鼠 NPC 动物模型。因此,我们首要工作

就是要对 mCR2 进行这两个位点的突变。目前,定点突变方法有很多,主要可分为三类:1) PCR 反应介导的;2) 非 PCR 反应介导的;3) 体内定点突变技术^[6]。PCR 技术自从问世就成为定点突变技术的一个强有力的工具。根据实验目的不同,PCR 反应设计方案可以多样化。在此,本文介绍一种可以简单、快速、高效地引入点突变的 PCR 介导的基因定点突变方法。

材料与方 法

1. 材料与仪器

本文 1999 年 4 月 9 日收到,7 月 1 日接受。

* 国家自然科学基金资助重点项目(39730200)和面上项目(39870370)。