

细胞合成和分泌 ANP 的机能已经退化。

摘 要

用包埋后免疫电镜方法对 14 例人胚心肌细胞内的 ANP 分布进行了观察。2 个月人胚心肌细胞内开始出现 SG, 3 个月人胚心房肌细胞的 SG 已可见 ANP 免疫反应性和分泌现象。6 个月人胚心室肌细胞内仍含少数 SG, 但 ANP 免疫反应性弱。A、B、D 三型 SG 内 ANP 的分布与其机能状态有关。

图 版 说 明

1. 3 个月人胚心房肌细胞的 SG 分布, $\times 7,000$ 。箭头示 SG, 散在于胞浆。
2. 3 月人胚心房肌细胞核一端的成堆 SG 和高尔基器关系密切, $\times 7,000$ 。箭头示成堆的 SG, G 为高尔基器。
3. 未经电子染色的 3 个月人胚心房肌细胞内 SG 对 ANP 免疫反应的特异性, $\times 50,000$ 。
4. 3 月人胚心房肌细胞内 A、B、D 型 SG 的 ANP 免疫反应性, $\times 50,000$ 。
5. 3 月人胚心房肌细胞 A、B 型 SG 的 ANP 免疫反应性, A 型 SG 的 ANP 免疫反应性不一定都比 B 型强, $\times 50,000$ 。
6. 3 月人胚心房肌细胞内 SG 与高尔基器(G)关系密切, $\times 30,000$ 。

7. 3 月人胚心室肌细胞内 SG 靠近细胞膜(箭头)或出到细胞外, 示分泌现象, $\times 20,000$ 。

8. 6 月人胚心室肌细胞内含少数 SG(箭头), $\times 5,000$ 。

参 考 文 献

- [1] Jamison J. D. and Palade G. E., 1964, *J. Cell Biology*, 23: 151—172.
- [2] Berger J. M. and Rona G., 1971, *Methods Achiev Exp. Pathol.*, 5: 540—590.
- [3] Cantin M. et al., 1979, *Anat. Rec.*, 193: 55—69.
- [4] Cantin M. et al., 1984, *Histochemistry*, 80: 113—127.
- [5] De Bold A. J. 1979, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 161: 508.
- [6] Currie M. G. et al., 1984, *Science*, 223: 67.
- [7] Kanagawa K. and Matsuo H., 1984, *Biochem. Biophysical Res. Communications*, 118: 131.
- [8] Gutkowska J. et al., 1986, *Fed. Proc.*, 45: 2101.
- [9] Jo Anne V Simson et al., 1989, *J. Histochem. Cytochem.*, 37(12): 1913—1917.
- [10] Kramer H. J. and Lichardus B., 1986, *Klin. Wochenschr.*, 64: 719—731.
- [11] Skepper J. N. et al., 1988, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 20: 343—351.
- [12] 志村保雄等, 1989, *J. Clin. Electron Microscopy*, 22(1): 111—126.

异视黄酸对人肝癌细胞的诱导分化作用

夏明明* 陈惠黎* 蒋秉坤**

(上海医科大学生化教研室*

蚌埠医学院生化教研室**)

我们曾证明全反式视黄酸(又称维甲酸, RA)对人肝癌细胞株 SMMC-7721 诱导分化^[1-4]。目前 RA 的同分异构体 13-顺视黄酸(又称异视黄酸或异维甲酸 IRA)已由国内生产, 但 IRA 是否具有 RA 相似的促分化作用, 即 RA 的作用是否与 13 位双链的顺反异构有关则未见报道。本文以 γ -谷氨酰转肽酶(γ -

GT)和甲胎蛋白(AFP)以及酪氨酸 α -酮戊二酸

致谢: 上海第六制药厂赠送 IRA, 上海医科大学化学教研室汪迺经教授赠送生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体和辣根过氧化物标记的亲合素, 上海医科大学生化教研室查锡良副教授赠送兔抗人 Fn 抗体, 特表谢意。

陈惠黎: 通讯作者。

转氨酶(TAT)^[2,5], 和纤维连接蛋白(Fn)^[3]为指标, 定量观察 IRA 对这些指标的升降影响, 结果证实 IRA 同样具有使 SMMC-7721 细胞诱导分化的作用。

材料和方法

一、细胞培养及处理

人肝癌细胞 SMMC-7721 为上海第二军医大学建株, 以 8×10^5 细胞/瓶接种于 80 ml 培养瓶中, 培养液为含 10% 小牛血清和青霉素 (100 IU/ml), 链霉素 (100 μ g/ml) 的 RPMI-1640 (GIBCO 产品)。RA (Sigma 产品) 和 IRA (上海第六制药厂) 分别溶解于纯乙醇中, 除菌过滤备用。处理组细胞的培养液中 RA 和 IRA 的终浓度为 10 μ mol/L, 对照组细胞培养液中仅含相应量 (终浓度为 0.05%) 的乙醇, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养。细胞用分裂相脱离法使其同步化^[6], 以后每 24 小时在弱光下更换培养液一次。

二、样品制备及 γ -GT、TAT 活力测定

培养 2、4、6、8 天的处理和对照细胞经 pH 7.4 50 mmol/L 的 PBS 洗 3 次后, 用橡皮刷将贴壁细胞刮下, 悬浮于适量 PBS 中, 在冰浴中经 10 万 Hz 超声粉碎 (15 秒 \times 5 次), 5000 rpm 离心 10 分钟后, 上清液按改良的 Sereni 比色法^[5]测定 TAT, 按 Husby 法^[7]测 γ -GT, 活力以毫国际单位 (mIU) 表示, 并以 Bradford 法^[8]定量蛋白质, 计算 γ -GT 和 TAT 的比活力。

三、AFP 和 Fn 的测定

处理和对照细胞分别生长在盖玻片上, 于第 2、4、6、8 天取出, 冷丙酮固定, PBS 洗三次, 10% H₂O₂ 甲醇液处理 30 分钟, 再用 PBS 洗三次, 加 1:100 稀释的兔抗人 AFP 或 Fn 抗体 (均为上海生物制品所产品)。37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次, 加 1:100 生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体 (上海医科大学化学教研室提供), 37 $^{\circ}$ C 保温 45 分钟, PBS 洗三次, 加 1:100 辣根过氧化物酶标记的亲合素 (Avidin, 上海医科大学化学教研室提供), 37 $^{\circ}$ C 保温 45 分钟, PBS 洗 3 次, 加 DAB 显色液 (50 mg DAB 溶于 100 ml PBS 加 50 μ l 30% H₂O₂), 避光染色 8 分钟, 水洗后用酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 采用 PDP 11/13 计算机控制的显微分光光度计 Leitz MPV3 型作三维扫描定量, 扫描波长 460 nm, 点直径 0.1 μ m, 物镜 16 \times , 测量强度 1300 左右。

结果和讨论

一、IRA 及 RA 对 SMMC-7721 细胞 γ -GT 比活力的影响

对照细胞的 γ -GT 活力在培养过程中略有波动, 但均无统计学的显著差别。经 10 μ mol/L IRA 和 RA 处理后, γ -GT 比活力逐步下降 (图 1), 第 2、4、6、8 天的比活力分别为对照的 75.6%、63.4%、58.3% 和 57.3% (IRA) 以及 75.2%、70.7%、65.2% 和 71.7% (RA)。可见 IRA 对 γ -GT 的下降作用在早期 (第 2 天) 与 RA 接近 ($P > 0.05$), 但后期 (第 6、8 天) 略胜过 RA (P 值分别为 < 0.05 及 < 0.01)。

二、IRA 及 RA 对 SMMC-7721 细胞 TAT 比活力的影响

TAT 仅存在于成年人的肝脏中, 是肝细胞分化的标志。对照细胞中 TAT 的比活力在培养过程中呈峰形变化, 以第 4 天最高; 而 IRA 处理细胞中 TAT 比活力逐日上升 (图 2), 高峰延至第 6 天。这可能和处理细胞的细胞周期延长有关。处理细胞的比活力于第 2、4、

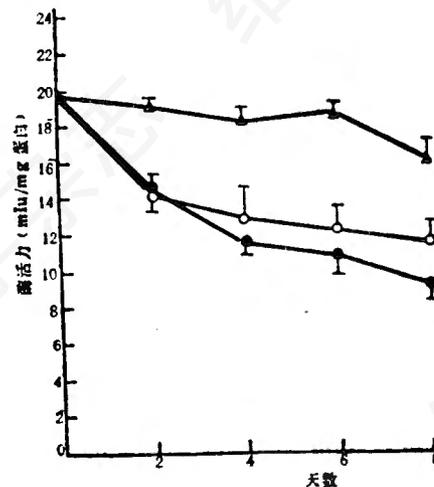


图 1 异视黄酸、视黄酸在不同培养天数对人肝癌细胞 SMMC-7721 株 γ -GT 酶活力的影响

▲—— 对照组 ○—— RA 处理组 ●—— IRA 处理组

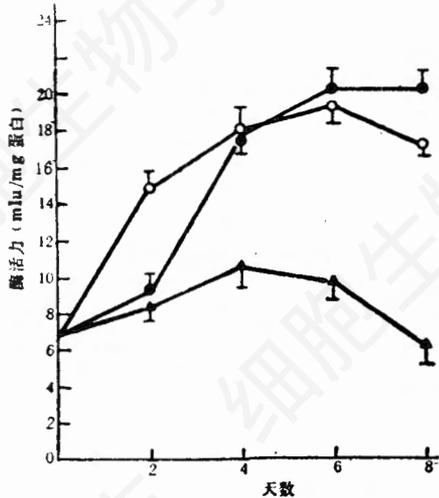


图2 异视黄酸、视黄酸在不同培养天数对人肝癌细胞 SMMC-7721 株 TAT 酶活力的影响

▲ 对照组 ○ RA 处理组 ● IRA 处理组

6、8天分别为对照的109.4%、166.3%、216.3%和330.5% (IRA) 以及178.9%、169.5%、198.8和283.4% (RA), 说明IRA在第2天的作用低于RA ($P < 0.01$), 而后期(第6、8天)的作用则强于RA (P 值分别为 < 0.05 及 < 0.01)。可见RA上13位双链的顺反异构对其生物作用略有影响, 其机理有待于进一步研究。

γ -GT/TAT 两酶的活力比值, 经IRA和RA处理后, 分别从用药前(对照)的2.885下降至用药后第8天的0.456和0.665。

三、IRA对SMMC-7721细胞AFP生成的影响

用ABC免疫组织化学法测定IRA对肝癌细胞内AFP生成的影响, 经激光扫描后用相对数字表示AFP的色泽的面积, 总吸光强度和染色密度(吸光强度/面积), 结果列于表1。如从总吸光度来看, 对照细胞的AFP生成在第4天达高峰, 第6天下降, 第8天又回升。Leffert^[9]报道: 处在不同细胞周期的胎肝细胞分泌AFP的能力不同, 这和我们的结果相近。IRA处理细胞, 不论以总吸光强度或染色密度比较, 其AFP量除处于低谷的第2天外, 均低于对照细胞, 尤其是处于高峰的第4天的抑制最明显, 仅为对照的23% (总吸光度) 及32% (密度)

我们曾经用放免法发现RA可使SMMC-7721细胞分泌至培养液中的AFP减少^[1,2], 本文证明IRA可使细胞内AFP含量也减少, 提示RA或IRA类化合物可使AFP合成下降, 分泌的减少不是由于细胞内滞留增多的结果。

四、IRA对SMMC-7721细胞Fn生成的影响

用ABC免疫组织化学法结合显微分光光度计扫描细胞表面的Fn, 并以数字表示其相对含量(表2), 发现IRA处理4天后, 其总吸光度、染色密度均明显增高至对照的6.685和8.154倍。这一结果与我们过去用荧光免疫

表1 IRA处理不同天数的SMMC-7721细胞内甲胎蛋白相对含量

天数	分组	细胞数	面积 MN±SD	总吸光度 MN±SD	染色密度 MN±SD
2	对照组	60	138.82±22.54	13.21±4.96	0.10±0.02
	IRA 处理组	60	141.09±26.51	12.70±3.88	0.90±0.01
4	对照组	60	167.72±28.31	167.38±19.27	1.00±0.07
	IRA 处理组	60	120.45±19.78	38.54±8.28	0.32±0.02
6	对照组	60	175.44±24.85	26.32±8.07	0.15±0.03
	IRA 处理组	60	119.85±20.00	14.38±7.75	0.12±0.06
8	对照组	60	146.75±19.96	38.16±5.46	0.26±0.01
	IRA 处理组	60	97.54±20.16	11.70±6.28	0.12±0.01

表2 IRA处理第4天的SMMC-7721细胞纤维连接蛋白相对含量的变化

细胞分组	细胞数	面积 (MN±SD)	总吸光度 (MN±SD)	染色密度 (MN±SD)
对照组	30	178.74±29.13	23.33±3.11	0.13±0.02
IRA处理组	30	147.12±20.50	155.97±5.47	1.06±0.08
P		<0.05	<0.01	<0.01

染色法^[3]定性观察的结果是一致的。我们还用酶联免疫吸附测定法(ELISA)证明:经IRA处理4天的SMMC-7721细胞分泌至培养液中的Fn也增高1倍以上(待发表资料)。已证明Fn是细胞膜表面的骨架蛋白,参与细胞间的粘附伸展和大分子结合,与细胞生长的接触抑制及维持正常形态有关^[10]。肝癌细胞表面的Fn减少使细胞接触抑制丧失,而后者又可导致细胞生长加速。IRA使Fn生成增多,在一定程度上可部分解释IRA使SMMC-7721人肝癌细胞生长减慢,细胞周期延长^[4]等作用。故对肝细胞来说,Fn可以看作是一个与分化有关的蛋白质。

综上所述,IRA可使人肝癌细胞的增殖标志 γ -GT和AFP下降,而使肝细胞分化标志TAT和Fn上升。说明IRA可使肝癌细胞某些表型向正常方向转变,即具有诱导分化作用,和RA作用相仿,唯在作用前、后期的强度上两者略有不同而已。

摘 要

10 μ mol/L的异视黄酸(13顺视黄酸,IRA)可使培养的人肝癌细胞株SMMC-7721中肝癌标志酶 γ -GT逐日下降,而肝细胞分化酶TAT明显增加,峰值从对照的第4天延至第6天。这些作用基本上和视黄酸(全反式视

黄酸,RA)相仿,唯IRA培养后期(第6、8天)的作用强于RA。用ABC免疫组织化学法发现:IRA还可使该细胞生成的甲胎蛋白(AFP)减少,尤其在培养的第4天作用最为明显,仅为对照细胞的1/3—1/4。并且,在IRA培养4天后,细胞表面的纤维连接蛋白Fn增高至对照的6.7—8.2倍。这些结果提示IRA能使肝癌细胞某些恶性表型转变,向正常细胞的方向诱导分化。

参 考 文 献

- [1] Chen, H. L. et al., 1990, *J. Tumor Marker Oncol.*, 5: 59—70.
- [2] 艾兆伟等, 1990, 生物化学与生物物理学报, 22: 135—140.
- [3] 艾兆伟等, 1990, 生物化学与生物物理学报 22: 147—151.
- [4] 艾兆伟等, 1990, 生物化学杂志, 6: 163—168.
- [5] 盛宗梅, 陈惠黎, 1983, 上海第一医学院学报, 10: 283—288.
- [6] 鄂征, 1988, 组织培养技术, 鄂征等主编, PP 267, 人民卫生出版社, 北京.
- [7] Husby, N. E. et al., 1974, *Scand J. Clin Lab. Invest.*, 34: 357—363.
- [8] Bradford, M. M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72: 248—254.
- [9] Leffert, E. L. and Sell, S., 1974, *J. Cell Biol.*, 61: 823—829.
- [10] Yamada, K. M. et al., 1978, *Nature*, 275: 179—184.

鉴于本刊稿挤, 版面有限, 致使一些文章发表周期延长, 望作者谅解。

编辑部

1991年8月