

# 肾上腺糖皮质激素对体外培养的人体肝癌细胞的影响\*

## 一、对细胞生长及 DNA 合成的抑制

张仕明 许河生 卢延龄

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

一些研究工作证明,肾上腺糖皮质激素对其相应的靶组织或靶细胞的生长、分化有诱导功能,能诱导大鼠肝或离体培养的肝癌细胞专一性地合成某些酶,并抑制 DNA 的合成(Loeb 1973<sup>[1]</sup>);离体培养的大鼠肝癌细胞膜同时还出现表型变化,如:微绒毛数目的减少、粘附性的增加,表面电荷减少及抗原性改变(Ballard 及 Tomkins 1970<sup>[2]</sup>)等。糖皮质激素对离体培养的淋巴母细胞功能的影响也有很多研究,并发现它能抑制 DNA 的合成(Terenius 和 Simonsson 1976<sup>[3,4]</sup>)。我们利用人体肝癌细胞株为材料,观察了糖皮质激素对肝癌细胞 DNA 合成的影响,希望能为进一步研究糖皮质激素与肝癌细胞的生长、分化的关系提供一些实验数据。

### 材料与 方法

#### 材 料

**细胞** 体外培养的人体肝癌细胞株 BEL-7402 (陈瑞铭等 1978<sup>[5]</sup>)。

1640 培养液,内含 20% 小牛血清。

**激素** 水溶性地塞米松磷酸钠盐(92-氟-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-三羟基-16 $\alpha$ -甲基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮-21-磷酸酯二钠盐),上海第九制药厂生产(分子量 516.51)。

**标记物** <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷,北京 401 研究所生产,比强度为 25 ci/mmol。

#### 方 法

**细胞培养** 将培养 BEL-7402 细胞的旧培养液弃去,用 Hank's 液洗两次后,加入定量新鲜培养液,将细胞冲散成单个细胞,配制成  $4 \times 10^5$  细胞/毫升的细胞悬液,充分混匀后,从中取 1 毫升,接种在小北京瓶(55 毫米 $\times$ 23 毫米)中,另外,再加 4 毫升培养液,贴壁培养。

**激素处理** 将地塞米松磷酸钠盐溶于无菌的 Hank's 液中,使激素浓度为 600 微克/毫升。一般在细胞贴壁 24 小时后加激素温育,根据实验设计的具体要求,控制加入培养液中激素的量。

**<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷 参入实验** 经过一定时间培养的、激素处理不同时间或未处理的 BEL-7402 细胞,撤去原有培养液,加入 2 毫升新鲜培养液,内含 3 微居里 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷,37 $^{\circ}$ C 温育 3—4 小时。然后,倾去各瓶含 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的培养液,各用 2 毫升 0.05M, PH7.4 的 PBS 将细胞洗两次,再用 0.15% 的胰酶消化细胞约 1—2 分钟,倒去消化液,最后用 2 毫升 PBS 将细胞充分自瓶壁上冲下,冲匀,用 0.25 毫升的注射器吸 0.1 毫升细胞悬液,均匀地滴在直径为 2 厘米的圆形滤纸(Whatman No 3)片上,俟滤纸片在红外线上烘干后,依次用 10%、5% TCA 固定,95% 及 100% 乙醇、乙醚处理,再次烘干,将纸片置入闪烁液内,最后用闪烁仪测定。

**细胞计数** 细胞自瓶壁上分离下来之后,尽量用 PBS 冲散为游离的单个细胞悬液,用血球计数板计数,并在 650 nm 测定细胞悬液的光密度,以便校对用血球计数板所得之数据。

\* 徐惠均同志参加部分工作。

[2] 朱至清、王敬驹、孙敬三, 1975, 中国科学, (5):484—490。

[3] 赵成章、孙宗修、郑康乐, 1980, 植物生理学报, (3) 283—289。

[4] 孙立华、王则僖、冯玉生, 1977, <sup>60</sup>Co 辐射处理水稻花药及愈伤组织试验。《花药培养学术讨论会文集》 278—279。

[5] 黄仕周、胡忠、庄承纪, 1977,  $\gamma$  辐射预处理对水稻花粉植株诱导的影响和花粉植株的性状变异。《花药培养学术讨论会文集》 279—280。

[6] Nitch. J. P. Nitsch. C., PEReau-leroy. M. P., 1969, *Compt Rend. D.* 269:1650—1652, 1969.

## 实验结果

### 一、激素对 BEL-7402 细胞的生长抑制作用

1. 不同激素剂量的影响 三组肝癌细胞, 每组 2—4 瓶, 激素浓度分别为  $3.75 \times 10^{-6} M$ 、 $1.87 \times 10^{-5} M$  及  $5.6 \times 10^{-5} M$ , 于  $37^\circ C$  继续培养 48 小时。这三组细胞作为实验组, 与未经激素处理的对照组在接种的细胞数、培养时间、培养液体积均相同的条件下进行比较。当激素浓度从  $3.75 \times 10^{-6} M$  开始以 5 倍的浓度递增时, 各组细胞的增殖均出现抑制现象, 其抑制程度随培液中地塞米松含量的增加而上升。 $3.75 \times 10^{-6} M$  组的细胞增殖与对照组比, 抑制率为 40%。而当激素浓度提高到  $5.6 \times 10^{-5} M$  时, 抑制率上升为 73% (图 1)。

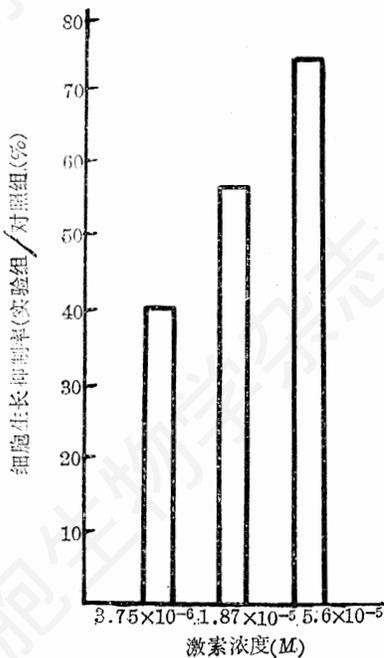


图 1 不同浓度的地塞米松处理 BEL-7402 细胞 72 小时, 细胞生长抑制率

2. 激素作用不同时间的影响 当把激素剂量恒定为  $7.5 \times 10^{-6} M$ , 分别观察 24、48、72 小时三个不同作用时间对 BEL-7402 细胞所产生的影响, 对照是 (0 小时) 不经激素处理

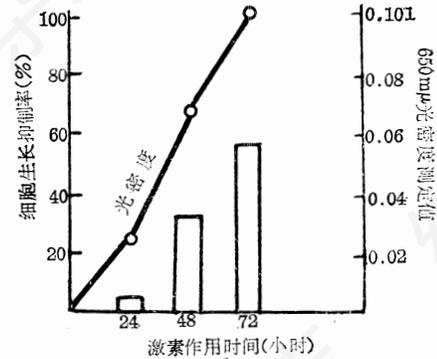


图 2 地塞米松作用不同时间对肝癌细胞生长的抑制作用  
激素浓度为  $7.5 \times 10^{-6} M$

的细胞。实验结果说明, 对肝癌细胞增殖的抑制效应可因激素作用于细胞的时间长短而不同。图 2 表示, 细胞经地塞米松磷酸钠盐处理 24 小时后与对照组相比, 无明显的抑制作用, 细胞生长抑制率仅为 4%。48 小时之后, 抑制率达 32%。当激素作用的时间延长为 72 小时, 抑制率上升为 56%。在 650nm 测定各组的细胞悬液, 得到的光密度依次为 0.026、0.068 及 0.100, 与用细胞计数法所得的结果基本上平行。

3. 激素引起 BEL-7402 细胞生长抑制的可逆性 经  $7.5 \times 10^{-6} M$  地塞米松磷酸钠盐处理 24、48、72 小时及未经激素处理的 BEL-7402 细胞, 均撤销原先的培养条件, 各自以同样的细胞数 ( $4 \times 10^5$ ) 重新接种, 在无激素的新鲜培液中培养 48 小时, 然后细胞计数。图 3 说明, 三个实验组细胞生长速度的恢复, 因激素处理的时间不同而有差异。激素处理 24 小时的细胞和对照组相比, 细胞的数量无甚区别, 48 小时组的细胞生长与对照组相比, 差异不甚明显。72 小时组的细胞生长速度最慢, 显示出细胞生长能力的恢复与细胞原来接受激素作用的时间长短有一定的关系。撤销激素后, 细胞生长虽慢, 但确能恢复生长。

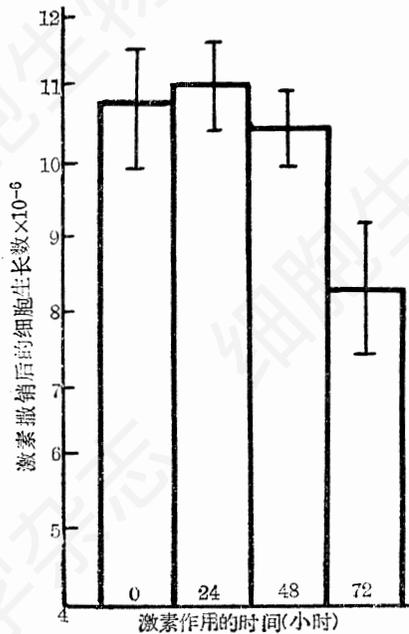


图3 地塞米松对肝癌细胞增殖抑制作用的可逆性  
激素浓度为  $7.5 \times 10^{-6} M$

二、激素对 BEL-7402 细胞 DNA 合成的抑制作用

1. 地塞米松磷酸钠盐对细胞 DNA 合成抑制的剂量效应 地塞米松处理细胞后, 加入含  $^3H$ -胸腺嘧啶核苷的培液继续培养 3—4 小时, 然后测定细胞内  $^3H$ -胸腺嘧啶核苷的参入率, 以观察细胞内 DNA 合成的水平。对照组为未经激素处理的 BEL-7402 细胞。实验结果 (图

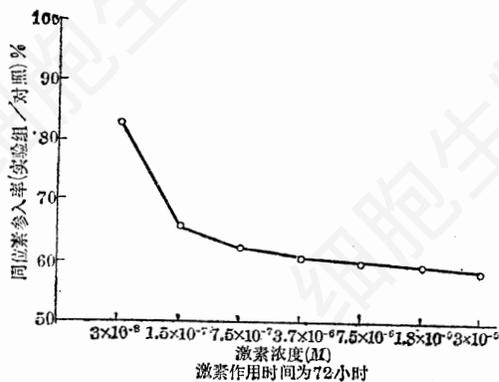


图4 地塞米松对肝癌细胞 DNA 的抑制作用

4) 说明, 不同剂量的激素对  $^3H$ -胸腺嘧啶核苷参入细胞的量造成不同程度的下降。从  $3 \times 10^{-8} M$  开始, 随着激素浓度不断提高,  $^3H$ -胸腺嘧啶核苷的参入率则逐渐下降, 当激素浓度提高到  $7.5 \times 10^{-6} M$  之后,  $^3H$ -胸腺嘧啶核苷参入值不再有明显的下降, 即使激素剂量增加到  $8.4 \times 10^{-4} M$ , 参入值仍维持在 58% 的水平。

2. 激素对 BEL-7402 细胞 DNA 合成抑制的时间效应 延长激素对细胞作用的时间, 可使  $^3H$ -胸腺嘧啶核苷参入细胞的量降低得更加明显。图 5 表示在激素浓度为  $7.5 \times 10^{-7} M$  的条件下, 细胞接受激素处理的时间分别为 24、48、72 小时, 其 DNA 的参入值分别为对照组的 85%、76% 及 65%, 以 72 小时组参入率为最低, 似乎激素剂量与作用时间之间存在一定的互补关系。

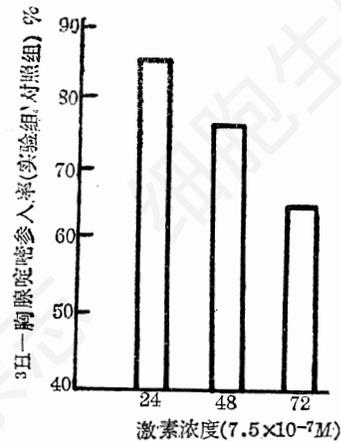


图5 激素作用不同时间对  $^3H$ -胸腺嘧啶参入的影响

讨 论

地塞米松作用于离体培养的人体肝癌细胞 (BEL-7402) 的实验, 显示了它对细胞生长及 DNA 合成有抑制作用, 可以认为 BEL-7402 细胞是对人工合成的肾上腺糖皮质激素敏感的一种细胞。

除了 BEL-7402 细胞之外, 我们曾用不同

剂量的激素处理了另一株人体肝癌细胞, BEL-7404(未发表资料), 所得到的<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷参入曲线与7402细胞是平行的, 进一步说明了体外培养的人体肝癌细胞对肾上腺糖皮质激素的反应与大鼠肝癌细胞(Loeb 1973)<sup>[1]</sup>有类似的特点。

但是从<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的参入来看, 在 $3 \times 10^{-5} M$ 浓度的激素作用下, 72小时后达到细胞的最高抑制率。BEL-7402或BEL-7402人体肝癌细胞株, DNA合成的抑制率最高为42%左右, 即使激素的量继续增加, 抑制率也并不因此而有所升高。这一现象, 与Loeb(1973)在大鼠肝癌细胞中所获得的实验结果有些差别, Loeb等以 $3 \times 10^{-9} M$ 地塞米松处理克隆的大鼠肝癌细胞36小时, 胸腺嘧啶核苷的参入抑制率为50%。地塞米松对我们所使用的两株人体肝癌细胞抑制作用较低的现象, 其可能的原因是, BEL-7402和BEL-7404细胞不是单克隆细胞株, 可能不是所有的细胞对地塞米松都有敏感性。至于靶细胞对糖皮质激素反应的强弱, 似乎与细胞内的激素受体的数量有关, Kaiser等(1974)<sup>[6]</sup>在鼠移植性淋巴瘤中见到, 对糖皮质激素不敏感的瘤株其激素受体量比敏感株低20—50%, 这一结果, 也说明了这一点。

糖皮质激素作用于靶细胞的机制是十分复杂的。也极需要更多的工作加以阐明。根据前人(Harris, 1979)<sup>[7]</sup>的报道, 肾上腺糖皮质激素对其靶器官或离体培养的靶细胞有多种多样的作用, 例如它能专一性地诱导肝细胞和肝癌细胞的酪氨酸转氨酶以及鸡视网膜色氨酸加氧酶的合成增高; 但又能抑制肝细胞、肝癌细胞以及淋巴瘤细胞DNA的合成, 甚至通过细胞自溶而导致死亡。对于上述诸现象的产生Thompson(1976)<sup>[8]</sup>曾作过这样的解释: 可能由于

细胞内介导激素作用的相应受体的特性因靶细胞不同而有所差异; 也可能同一靶细胞具有不同类型的糖皮质激素受体, 因而使靶细胞表现出不同的生理功能。

在地塞米松浓度高达 $10^{-6} M$ 的情况下, 实验组细胞比对照组细胞生长缓慢, 当一旦撤销激素条件, 实验组细胞的生长速度即逐渐提高, 接近正常状态。说明细胞生长受到地塞米松的抑制, 作用是可逆的。与此同时, 我们看到, 在细胞培养过程中, 实验组与对照组细胞皆生长良好: 贴壁紧密, 培液清澈, 未见细胞脱落, 更无细胞自溶现象。在显微镜下, 细胞轮廓清楚, 未见异常改变, 似乎地塞米松的作用并不是对细胞的毒性反应。

### 参 考 文 献

- [1] Loeb T. N., 1973, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol 70:3852—3856.
- [2] Ballard, P. L., Tomkins, G. M., 1970, *J. Cell Biol.* Vol 47:222—234.
- [3] Terenius L., B. Simonsson. 1976, *J. Steroid Biochem.*, Vol 7:905—909.
- [4] Thompson, E. Brad, M. R. Norman, and M. E. Lippman., 1977, in "Recent Progress in Hormone Research" Vol 33:571—607. Edited by Greep R. O.
- [5] 陈瑞铭, 朱德厚、叶秀珍、沈鼎武, 1978, 实验生物学报, 第11卷第1期37—49页.
- [6] Kaiser, N., R. J. Milholland and F. Rosen, 1974, *Cancer Res.*, 34:621—626.
- [7] Harris, A. W., and J. D. Baxter, in "Glucocorticoid Hormone Action" Edited by Baxter J.D., and G. G. Rousseau.
- [8] Thompson E. B., 1976, in "Current Topics in Molecular Endocrinology" Vol 4: Steroid Hormone Action and Cancer, pp. 114—132. Edited by K. M. J. Menon and Jerry R. Reel 1976.