



肾上腺糖皮质激素对体外培养 的人体肝癌细胞的影响

II. 细胞表面伴刀豆球蛋白受体以及细胞粘附性的改变

毛祖成 卢延龄

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

离体条件下,正常、转化和癌变细胞的细胞膜特性有许多差别。例如,转化和癌变细胞能被多种外源凝集素凝集,而正常细胞一般无此特性,或仅显示微弱的凝集现象。Nicolson (1971, 1972) 曾利用铁蛋白标记的伴刀豆球蛋白(ConA)比较了小鼠3T3细胞以及经SV₄₀或多瘤病毒转化的3T3细胞其ConA结合位点的情形,前者的结合位点多半是均匀地分布在细胞表面,而转化的细胞其结合位点往往成簇地聚集起来^[1,2]。另外,转化和癌变细胞的粘附性较正常细胞也显然为低。

肝癌细胞是肾上腺糖皮质激素的靶细胞,因而它们是研究糖皮质激素诱导肿瘤细胞出一些逆转特征的理想模型。我们曾报道^[3]地塞米松有抑制人体肝癌细胞(BEL-7402) DNA合成的作用。为了探索人体肝癌细胞在糖皮质激素作用下可能出现的表型变化,本工作着重观察了有关细胞膜一些特性的改变。

材料和方 法

1. 细胞和化学试剂

实验所用人体肝癌细胞BEL-7402系^[4],用RPMI-1640培养液加20%小牛血清进行培养。ConA和FITC-ConA为Sigma产品,α-甲基-甘露糖苷为pharmacia产品。人工合成的肾上腺糖皮质激素——地塞米松磷酸钠盐(水溶性)系上海第九制药厂赠送。

2. 激素处理

将培养3—4天的细胞制成悬液,每个中瓶(3.5×8厘米)接种1.3×10⁶细胞,用于膜荧光和凝集实验。用于细胞脱落实验的细胞,每个小瓶(2.3×6厘米)接种2×10⁵细胞。约24小时待细胞贴壁生长后,

加溶有地塞米松的培养液。激素浓度分别为7.5×10⁻⁶M, 7.5×10⁻⁷M和7.5×10⁻⁸M。继续培养48小时或72小时,对照组的细胞在同样条件下培养,但不加激素。然后进行荧光标记、细胞凝集和细胞脱落实验。

3. 细胞膜荧光实验

实验组和对照组的细胞培养48或72小时后,倾去培养液,用0.05M PBS(PH 7.2—7.4)漂洗数次,然后将细胞自瓶壁冲下,再用PBS离心洗涤3次。将3—4×10⁶细胞悬浮于0.5毫升FITC-ConA液中,其浓度为100微克/毫升,用PBS配制,置37℃温育20分钟,再用PBS洗涤5次以上,然后用9份甘油1份PBS配成的封固剂封片。置荧光显微镜下观察。为了检验细胞表面ConA受体荧光反应的特异性,经FITC-ConA标记的细胞,再悬浮于0.5毫升10%的α-甲基甘露糖苷PBS溶液中,37℃温育20分钟,进行抑制反应。

4. 细胞凝集实验

地塞米松处理和不处理的两组细胞经PBS洗涤后,在PBS中制成3—4×10⁶细胞/毫升的悬液,每组悬液各取4份,每份为0.5毫升,置直径为3.5厘米左右的培养皿中,然后分别加入0.5毫升浓度为200微克/毫升、100微克/毫升和50微克/毫升的ConA-PBS溶液,使ConA的浓度每毫升分别为100、50和25微克。空白对照组仅加0.5毫升PBS。充分混匀后,在室温(20—25℃)温育,分别在10、20和30分钟时,于显微镜下观察凝集的程度。本文参照Aub等(1963)^[5]的分级方法将凝集程度按“0—Ⅲ”的等级进行记录。

5. 细胞脱落实验

7.5×10⁻⁶M和7.5×10⁻⁷M的地塞米松分别处理肝癌细胞48和72小时,实验前将各瓶培养液倒掉,瓶内加入3毫升含0.5mM EDTA的0.05M pH 7.2的PBS,即刻将激素处理时间相同而剂量不同的两个实验

组和对照组的培养瓶置振荡器上振荡1或3分钟。振荡频率为10HZ,振荡毕,先将脱落的细胞用血球计数板计数,再把未脱落的细胞自瓶壁冲下计数,求出脱落细胞占细胞总数的百分率。每次实验,每一剂量组和对照组皆为双份。

结 果

1. 细胞膜荧光阳性率的比较

每次实验,对实验组和对照组分别随机地观察200个左右游离的细胞,计算膜荧光阳性

细胞的百分率。见表1。BEL-7402细胞经 $7.5 \times 10^{-6}M$; $7.5 \times 10^{-7}M$ 和 $7.5 \times 10^{-8}M$ 三种浓度的地塞米松处理48小时后,细胞膜荧光阳性率分别为81.5%、84.4%和82.7%;对照组则为93.1%(表1)。经同样三种浓度的激素处理72小时后,其膜荧光阳性率分别为86.4%、83.3%和83.5%;而对照组的膜荧光阳性率为94.8%(表1)。经统计学处理,实验组与对照组的差异是显著的。

表1 不同浓度地塞米松处理BEL-7402细胞48或72小时后膜荧光阳性率

组 别	地塞米松 浓度(M)	48小时		72小时	
		膜荧光阳性率(%)	P值	膜荧光阳性率(%)	P值
实 验 组	7.5×10^{-6}	81.5 (7)*	<0.01	86.4 (8)	<0.01
	7.5×10^{-7}	84.4 (5)	<0.05	83.3 (3)	<0.01
	7.5×10^{-8}	82.7 (5)	<0.01	83.5 (3)	<0.01
对 照 组		93.1 (8)		94.8 (10)	

* ()内的数字代表实验次数。

此外,激素处理的细胞较对照组的细胞大,膜荧光的强度比对照组的弱。膜荧光减弱可能是由于细胞体积增大后,细胞表面单位面积上的ConA受体分子的数量减少所致。

2. 细胞环状膜荧光的比较

BEL-7402细胞表面的ConA受体分子多呈簇状(图1)或帽状(图2)分布,仅在少数细胞可见环状膜荧光(图1)。但是细胞经地塞米松处理后,呈环状膜荧光的细胞数在各实验组均有增加,在72小时后更为显著。见表2。经

统计学处理72小时的三个剂量组,其P值均小于0.05。

由于实验组和对照组的细胞经FITC-ConA标记后,再经10%的 α -甲基-甘露糖苷处理,阳性膜荧光的细胞全部转为阴性,说明我们所观察到的膜荧光特异地代表了ConA受体的分布。

3. 细胞凝集测定

继 $7.5 \times 10^{-6}M$ 地塞米松处理48小时或72小时的细胞,用三种不同浓度的ConA(每

表2 不同浓度地塞米松处理BEL-7402细胞48或72小时后的环状膜荧光的百分率*

组 别	地塞米松 浓度(M)	48小时		72小时	
		环状膜荧光分布(%)	P值	环状膜荧光分布(%)	P值
实 验 组	7.5×10^{-6}	12.8 (7)	>0.05	10.2 (8)	<0.05
	7.5×10^{-7}	13.2 (5)	<0.05	15.7 (3)	<0.01
	7.5×10^{-8}	13.3 (5)	>0.05	13.6 (3)	<0.05
对 照 组		7.9 (8)		6.3 (10)	

* 每组随机观察100—200个细胞

表3 BEL-7402细胞经 $7.5 \times 10^{-6}M$ 地塞米松处理不同时间后,对ConA的凝集反应

ConA 浓度		100 微克		50 微克		25 微克		PBS		实验次数
组	别	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	
温育时间	激素处理时间									
10 分钟	48 小时	+++	+++	++	+++	+	++	0	0	3
	72 小时	+++	+++	++	++	+	++	0	0	4
20 分钟	48 小时	+++	+++	+++	+++	++	+++	0	0	3
	72 小时	+++	+++	++	+++	++	+++	0	0	4
30 分钟	48 小时	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	3
	72 小时	+++	+++	+++	+++	++	++	0	0	4

毫升含 100、50 和 25 微克)溶液进行凝集试验,结果如表 3 所示。ConA 浓度为 100 微克和 50 微克的两个实验组与对照组相比较,其凝集程度基本没有差异(图 5, 6)。但是当 ConA 浓度较低(25 微克/毫升)时,尽管地塞米松作用时间不同,或在 ConA 溶液中温育的时间长短不一,实验组与对照组均有差别(图 3, 4)。由此可看出,当 ConA 浓度较低时,两组的差别较为明显,但随着 ConA 浓度的增高或温育时间的延长,两组间凝集程度实际上所存在的差别有被掩盖的可能性。

4. 对细胞粘附性的影响

激素处理组和对照组细胞粘附性的比较是

表4 地塞米松对肝癌细胞脱落的影响

细胞培养 或激素处 理时间	组 别	振荡 1 分钟		振荡 3 分钟	
		细胞脱 落%	实验 次数	细胞脱 落%	实验 次数
48 小时	对 照 组	14.7	7	27.8	10
	$7.5 \times 10^{-7}M$	11.7	7	12.8	10
	$7.5 \times 10^{-6}M$	11.0	7	11.4	10
72 小时	对 照 组	31.6	4	34.2	5
	$7.5 \times 10^{-7}M$	10.4	4	8.0	5
	$7.5 \times 10^{-6}M$	9.2	4	8.5	5

以细胞脱落百分率来表示的。实验组分为 $7.5 \times 10^{-6}M$ 和 $7.5 \times 10^{-7}M$ 两个剂量组;每两个剂量组的细胞,激素作用的时间又分别为 48

和 72 小时。各个不同的实验组和相应的对照组其振荡时间又分为 1 分和 3 分钟。实验结果如表 4 所示,激素处理 48 或 72 小时的细胞不论振荡 1 或 3 分钟,细胞脱落百分率皆较对照组的为低。振荡 3 分钟时,对照组细胞的脱落百分率达最高值,其中培养 48 小时的对照细胞比两个实验组的高 2 倍以上,而培养 72 小时的细胞,比两个实验组的高 4 倍。另外,细胞经不同浓度的激素处理后,其脱落百分率稍有差别。除激素处理 72 小时、振荡 3 分钟的两个实验组外,似乎 $7.5 \times 10^{-6}M$ 组细胞的粘附性稍高些。从激素作用时间的长短来看,处理 72 小时的细胞其脱落率也稍低于 48 小时者。

讨 论

近年来已证明,肾上腺糖皮质激素能使离体培养的大鼠肝癌细胞膜产生一系列变化,诸如细胞粘附性的增加、蛋白水解酶(纤维蛋白溶酶原激活因子)的降低以及糖蛋白的改变^[6]。我们的实验结果亦显示了类似的变化:细胞体积增大,细胞表面 ConA 受体膜荧光阳性率降低,荧光强度减弱,呈环状荧光的细胞增多,同时 ConA 对细胞的凝集程度下降。所有这些变化说明地塞米松有诱导人体肝癌细胞产生表型性状改变的功能。

有关正常和肿瘤细胞表面外源凝集素受体

的数量和分布以及凝集机制,已有大量的工作。然而,迄今还无完全一致的看法。Nicolson^[1,2]认为,正常的3T3细胞经病毒诱导后,细胞质膜的流动性发生改变,使原来随机分布的ConA受体出现簇状分布,从而有利于多价的ConA分子对细胞产生凝集作用。Inbar^[7]用同样的用3T3细胞材料,借助免疫荧光技术研究温度对ConA受体移动的影响,也得到类似的结论。本实验观察到地塞米松处理的细胞呈环状膜荧光的百分率比对照组增高1倍左右,这一现象说明,地塞米松可能影响细胞质膜的流动性,使原来成簇或帽状分布的ConA受体分子向两侧流动,在细胞表面呈随机分布,从而导致环状膜荧光的细胞增多,实验组细胞的凝集程度降低亦可能是这一原因所致。然而,当ConA浓度增高,温育时间延长,实验组与对照组的差异被掩盖。我们分析,这是由于单位容积内ConA分子的数量增加,其与细胞表面受体结合的机率增高,致使实验组也呈现最大程度的凝集。至于细胞经糖皮质激素处理后,膜荧光阳性率降低7—10%,是否由于细胞表面ConA分子的数量有所减少还是其它原因所致,尚有待于精确的定量方法检测。

从本文结果可见,不同振荡时间和不同浓度的地塞米松分别作用48或72小时后,细胞脱落率均低于相应的对照组,尤以激素作用48小时、振荡3分钟和作用72小时、振荡1和3

分钟的实验结果更为明显。这说明地塞米松促使肝癌细胞的粘附性增加。在这方面国外也有类似报道,例如,Ballard等^[8]见到放线菌素D和放线菌素酮有抑制糖皮质激素诱导大鼠肝癌细胞粘附性增高的作用;Berliner^[9]在RLC-GAI细胞株(转化的大鼠肝上皮细胞株)也见到类似现象。至于人肝癌BEL-7402细胞粘附性的改变是否因细胞膜的某些组分产生了改变,以及这种改变的机制所在,都是有待进一步阐明的问题。

参 考 文 献

- [1] Nicolson, G. L. 1971. *Nature New Biol.* 233: 244—246.
- [2] Nicolson, G. L. 1972. *Nature New Biol.* 139: 193—197.
- [3] 张仕明, 许河生, 卢延龄, 1983年细胞生物学杂志, 5(1) 24—27.
- [4] 陈瑞铭, 朱德厚, 叶秀珍, 沈丁武. 1975. *科学通报*, 20: 434—436.
- [5] Aub, J. C., et al., 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 50: 613—619.
- [6] Heinz, B., et al., 1980. *J. Cell Biol.* 85: 1—8.
- [7] Inbar, M. E. Ben-Bassat, H. and L. Scachs, 1971a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68: 2748—2751.
- [8] Ballard, P. L., and Tomkins, G. M., 1970. *J. Cell Biol.* 47: 222—234.
- [9] Berliner, J. A., and Gerschenson, L. E., 1975. *J. Cellular Physiol.* 86: 523—532.

肾上腺糖皮质激素对体外培养的人体肝癌细胞的影响

Ⅲ. 细胞表面伴刀豆球蛋白受体及相关胚胎抗原的测定*

许河生 张仕明 毛祖成 卢延龄

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

肾上腺糖皮质激素能诱导大鼠肝癌细胞出现一些正常肝细胞的表型特征,因而使人们对肝癌细胞的逆转问题深感兴趣。关于糖皮质激素对人体肝癌细胞膜特性的影响,我们实验室

毛祖成等的初步工作(未发表)说明,细胞表面伴刀豆球蛋白受体分布出现改变,细胞对外源

* 徐惠均同志参加部分工作。