

三种化合物对石棉致 HEL 细胞增殖周期及 c-fos 癌基因转录活性改变的影响

樊晶光 王起恩 刘世杰

摘要 目的 寻求一种适宜的石棉表面改性剂。方法 利用流式细胞技术测定细胞周期以及 Northern 杂交技术测定 c-fos 癌基因转录活性, 观察几种化合物对温石棉促人胚肺 (HEL) 细胞增殖作用的影响。结果 将 HEL 细胞与温石棉共同孵育后, 其 S 期细胞所占比例增加, c-fos 癌基因的转录活性也明显增强。用 3 种化合物预处理的石棉组, 其 S 期细胞所占比例以及 c-fos 癌基因的转录活性均低于未处理石棉组。结论 用上述 3 种化合物预处理石棉, 均可不同程度地抑制石棉的促细胞增殖作用。

关键词 石棉类 人胚肺细胞 细胞增殖周期 c-fos 癌基因

Effects of Three Kinds of Chemicals on the Changes in Chrysotile-induced Cell Proliferation Cycles and c-fos Oncogene Transcription Activity in Human Embryo Lung Cells Fan Jingguang, Wang Qi'en, Liu Shi-jie. Department of Occupational Health, Beijing Medical University. Beijing 100083

Abstract Objective To seek for an ideal chemical for surface modification of asbestos. **Methods** Cell cycles were measured with flow cytometry and activity of c-fos oncogene transcription was determined by Northern blotting technique to observe the effects of several kinds of chemicals on cell proliferation cycles in human embryo lung (HEL) cells induced by chrysotile. **Results** Proportion of HEL cells in the S-phase, as well as activity of transcription of c-fos oncogene, increased obviously after incubation with chrysotile. Proportion of HEL cells in the S-phase and activity of transcription of c-fos oncogene reduced after pretreatment with three kinds of chemicals as compared to those before pretreatment. **Conclusion** Pretreatment with the three kinds of chemicals could inhibit proliferation-promoting effect of chrysotile, to various extent.

Key words Asbestos Human embryo lung cells Cell proliferation cycle c-fos oncogene

有研究表明, 石棉具有促癌作用, 但目前对石棉的促癌机理尚不清楚。有学者报道, 石棉在低剂量的情况下, 可持续诱导 c-fos 和 c-jun 癌基因的表达而促进细胞增殖, 这可能是石棉促癌的机理之一^[1]。本研究利用流式细胞术和 Northern 杂交技术测定了温石棉对人胚肺 (HEL) 细胞增殖周期及 c-fos 癌基因转录活性的影响, 同时观察了柠檬酸铝、混合稀土和亚硒酸钠等 3 种化合物对温石棉致 HEL 细胞增殖周期及 c-fos 癌基因转录活性改变的影响。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞株

HEL 细胞由军事医学科学院惠赠。用 0.125% 胰蛋白酶+0.01% EDTA 消化传代, 用含 10% 小牛血清和双抗的 MEM 培养液于 37℃, 5% CO₂ 的条件下培养, 3 天传代 1 次。

1.2 石棉样品的制备

选用青海茫崖产温石棉, 用冰冻切片机切割成 5~20 μ m (>10 μ m 者占 50%) 的石棉纤维, 置 60℃ 烤箱中烘干备用。临用前将石棉加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 或双蒸水中, 超声 10 分钟, 并用混悬器振荡 2 分钟, 配成一定浓度均匀的混悬液。

1.3 石棉纤维的预处理

将一定量的温石棉悬液与不同浓度的混合稀土、柠檬酸铝 (含 Al³⁺ 9.3%) 或亚硒酸钠溶液相混后, 分别在室温下作用 1 小时, 2 000 转/分离心 10 分钟, 弃去上清液后, 再用 PBS 将下部沉淀配成一定浓度均匀的混悬液。

1.4 细胞增殖周期分析 (流式细胞仪)

取指数生长期的 HEL 细胞, 按一定浓度接种于 150ml 培养瓶中, 培养 24h, 换液, 加入不同浓度的石棉悬液或经浸泡过的石棉悬液, 继续培养 24h, 终止染毒, 用胰酶消化, 收集细胞, PBS 清洗, 调整浓度为 10⁶ cell/ml, 加入终浓度为 50 μ g/ml RNase, 室温 30min, 然后将 RNase 洗去, 再加入含 0.1% Triton100 的终浓度为 50 μ g/ml 的 PI, 混匀, 室温放置 20~30min, 上机检测, 波长为 488nm。

作者单位: 100083 北京, 北京医科大学劳动卫生教研室 (樊晶光*、王起恩、刘世杰)

*现在劳动部劳动保护科学研究所工作 (北京, 100029)。

1.5 c-fos 癌基因转录活性的测定^[2,3]

细胞染毒过程与细胞增殖周期分析相同。终止染毒后,提取细胞总 RNA,用 Northern Blotting 分析 c-fos 癌基因的转录活性。具体步骤如下。

1.5.1 细胞总 RNA 的提取及比色鉴定 细胞用冰冷的 PBS 洗 2~3 遍,加入 0.5ml 冰冷的变性液将其消化裂解,加入 0.05ml 2mol/L 醋酸钠 (pH4.0), 0.5ml 酚、氯仿-异戊醇 (49:1), 振荡混匀,冰浴 20 分钟, 4℃10 000r/m 离心 20 分钟,转移上相至新管中,同上重复抽提 1 次,取上层水相与等体积异丙醇混合, -20℃1 小时, 4℃12 000r/m 离心 15 分钟,弃液相,沉淀溶于 600μl 变性液中,加等体积异丙醇再次沉淀, 4℃12 000r/m 离心 15 分钟,沉淀用 75%乙醇洗涤,真空干燥,溶于 DEPC 处理的去离子水中,紫外分光光度计比色定量后,分装, -70℃保存备用。

1.5.2 探针标记 随机引物法标记双链 DNA 探针 (GIBCO 公司, RADPRIME LABELING SYSTEM)。取 25ng 双链 DNA 纯化片段,变性后置冰浴中,加入相应的缓冲液和 dNTPS, 3~5μg ³³P 同位素标记的核苷酸,加入 1μl Klenow 酶,轻柔混匀, 37℃温浴 20~40 分钟,标记之后变性,冰浴,测定比活性后使用。

1.5.3 细胞总 RNA 的电泳鉴定 取 20μg 已定好量的 RNA,体积定为 5μl,加入 10×MOPS 1μl, 甲醛 3.5μl, 去离子甲酰胺 10μl, 68℃温浴 15 分钟使样品变性,加入 2μl 甲醛凝胶加样缓冲液,水浴,同时用 1×MOPS 配制 1%的凝胶,微波炉溶胶,冷却至 60℃,加入甲醛使终浓度为 2.2mol/L,铺胶。上样,在 1×MOPS 缓冲液中 20~40V 电泳 6~12 小时,当溴酚兰走至凝胶全长 3/4 时停止电泳,用 0.5μg/ml EB 染色,长波紫外灯下拍照留下记录。

1.5.4 Northern Blotting 分析 采用毛细管虹吸法将 RNA 由甲醛变性凝胶中转移至 Bio-Rad 尼龙膜上。转膜液为 10×SSC。转移完毕后在 80℃真空烘烤 2 小时,固定 RNA。将尼龙膜装入塑料杂交袋,加入预杂交液, 65℃预杂交 5 分钟,倒尽预杂交液,按 150μl/cm² 膜加入杂交液 (杂交液含变性的同位素探针), 65℃杂交 4~24 小时,弃尽杂交液按如下条件依次洗膜: (1) 1mmol/L EDTA, 40mmol/L Na₂HPO₄, pH7.2, 5%SDS, 65℃每次 20~40 分钟,洗 1~3 次。(2) 1mmol/L EDTA, 40mmol/L Na₂HPO₄, 1% SDS, 65℃, 10~30 分钟,洗 1~2 次。以微型同位素检测器检查膜上放射线强度,在 10CPM 时即终止洗膜。将湿润的尼龙膜封入保鲜膜中,同富士 X-线胶片一

起夹于配有增感屏的 X-线暗合内, -70℃条件下曝光,时间为 1~2 周,胶片经显影、定影后留作结果分析。放射自显影后冲洗的 X 光片经积分光度扫描仪定量。

1.6 数据处理

采用 Primer 软件中的 *t* 检验程序对数据进行统计分析。抑制率=(未处理石棉组所测值-处理后石棉组所测值)÷(未处理石棉组所测值-对照组所测值)。

2 结果与分析

2.1 3 种化合物对石棉致 HEL 细胞增殖周期改变的影响

表 1 3 种化合物对石棉致 HEL 细胞增殖周期改变的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

石棉 (μg/ml)	化合物 (μg/ml)	细胞周期 (%)		
		G ₁	S	G ₂ +M
0	0	72.97±4.79	24.07±4.80	2.97±2.53
5	0	67.30±1.71	30.97±1.62	1.73±0.45
5	1.25 ^a	69.20±7.92	26.67±8.96	4.13±1.37*
5	2.5 ^a	74.56±4.37	22.74±4.19*	2.70±1.87
5	5.0 ^a	74.90±4.45	21.13±6.56	3.97±2.83
5	1.25 ^b	73.50±2.19*	25.13±2.66*	1.37±0.81
5	2.5 ^b	77.77±1.72**	21.50±1.22**	0.73±0.18*
5	5.0 ^b	77.07±8.06	19.63±9.69	3.30±2.04
5	1.25 ^c	69.65±12.94	27.95±12.3	2.40±1.10
5	2.5 ^c	70.53±9.47	27.43±7.81	2.03±1.79
5	5.0 ^c	81.40±4.55**	16.87±5.08**	1.73±0.64

a: 柠檬酸铝, b: 混合稀土, c: 亚硒酸钠; 与未处理石棉组相比
* $P<0.05$ ** $P<0.01$

表 1 显示,正常培养的 HEL 细胞处于 G₁ 期的最多,占 72.97%。5μg/ml 石棉染毒 24 小时后, G₁ 期细胞构成比有所降低,而 S 期细胞比例增加,表现为促细胞增殖作用。但经 3 种化合物处理的石棉组,其 G₁ 期细胞比例又有所回升,而 S 期细胞比例明显下降,提示用 3 种化合物处理石棉,均可不同程度地抑制石棉的促细胞增殖作用。

2.2 3 种化合物对石棉致 HEL 细胞 c-fos 癌基因转录水平改变的影响



A: 对照, B: 5μg/ml 石棉, C: 5μg/ml 等量柠檬酸铝处理的石棉, D: 5μg/ml 等量混合稀土处理的石棉, E: 5μg/ml 等量亚硒酸钠处理的石棉

图 1 不同石棉处理的 HEL 细胞 c-fos 癌基因 Northern 杂交图象

表2 三种化合物对石棉致 HEL 细胞 *c-fos* 基因转录水平改变的影响

石棉 ($\mu\text{g/ml}$)	化合物 ($\mu\text{g/ml}$)	积分光密度	抑制率 (%)
0	0	436	—
5.0	0	797	—
5.0	5.0 ^a	553	67.59
5.0	5.0 ^b	509	79.78
5.0	5.0 ^c	581	59.83

a: 柠檬酸铝, b: 混合稀土, c: 亚硒酸钠

由图和表2可见, $5\mu\text{g/ml}$ 石棉染毒24小时可使 HEL 细胞 *c-fos* 癌基因转录增强, 为对照组的1.83倍。用3种化合物处理的石棉组, 其 *c-fos* 癌基因的转录水平均低于未处理石棉组, 其中以混合稀土的抑制率最高, 为79.78%。

3 讨论

有学者报道, 在几种器官和组织肿瘤发生发展过程的启动、促进及进展阶段, 或是在一个细胞周期, 或是在多个细胞周期, 细胞增殖都起着关键性的作用^[4,5]。如间皮瘤的靶细胞——间皮细胞通常处于非增殖状态, 但石棉要诱导细胞染色体改变, 正常的间皮细胞就需要被刺激增生。

本研究结果发现, 将 HEL 细胞与温石棉共同孵育后, 其 S 期细胞数所占比例增高, 证实了石棉有促细胞增殖作用。还有学者报道, 将小鼠和大鼠吸入或气管注入石棉染尘后, 也可引起动物肺、胸膜及胸膜下细胞增殖^[6]。这可能是石棉促癌的机理之一。

c-fos 和 *c-jun* 基因家庭的成员属即刻早期反应基因, 与转录调控和细胞增殖有关。在细胞受到一定刺激时这组基因首先转录, 并通过其编码产物启动与细胞分裂有关的其他基因的转录, 促使细胞从 G_1 期进入 S 期。*c-fos* 和 *c-jun* 基因的表达失调可导致细胞的异常增殖。Heintz^[1] 将大鼠胸膜间皮 (RPM) 细胞与石棉共同孵育后发现, 石棉可诱导 *c-fos* 和 *c-jun* 癌基因的表达持续而显著地增强, 其编码产物 AP-1 转录因子 (一种二聚体蛋白) 也相应增加。石棉的这种持续激活早期反应基因途径的作用可能是其诱导靶细胞增殖的重要机制。本研究结果显示, 将 HEL 细胞与

温石棉共同孵育24小时后, 其 *c-fos* 基因的表达也明显增强, 提示, 石棉可能通过刺激与细胞增殖密切相关的 *c-fos* 基因的表达而促使 HEL 细胞增殖。

本研究结果还发现, 与未处理石棉组相比, 经3种化合物处理的石棉组, 其 S 期细胞数所占比例及 *c-fos* 癌基因的转录活性均有所回降, 提示用3种化合物预处理石棉, 均可抑制石棉的促细胞增殖作用, 其中以混合稀土的抑制效果较好。

Ganssen^[7] 最近报道, 在石棉染毒的同时, 若加入抗氧化剂 N-乙酰-半胱氨酸则可抑制石棉对 RPM 细胞 *c-fos* 和 *c-jun* 的诱导作用。而且, N-乙酰半胱氨酸还可抑制石棉诱导的增殖素基因表达^[8]。因此, 认为石棉可能通过调节细胞内巯基水平而影响细胞增殖。本研究发现, 用3种化合物预处理石棉后, 其诱导 HEL 细胞谷胱甘肽下降的程度明显减弱 (另文发表), 这可能是3种化合物抑制其促细胞增殖的机理之一。

(本研究承蒙军事医学科学院赵修南同志大力支持 志谢。)

4 参考文献

- Heintz NH, Janssen YM, Mossman BT. Persistent induction of *c-fos* and *c-jun* expression by asbestos. Proc Natl Acad Sci (USA), 1993, 90: 3299~3303
- 卢圣栋, 主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 147~149
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993. 362~395
- Farber E. Hepatocyte proliferation in stepwise development of experimental liver cancer. Dig Dis Sci, 1991, 36: 973~978
- Farber E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res, 1995, 55: 3759~3762
- Coin FG, Moore LB, Roggli V, et al. Pleural incorporation of 3H-TdR after inhalation of chrysotile asbestos in the mouse. Am Rev Respir Dis, 1991, 143: A604
- Janssen YMW, Heintz NH, Mossman BT. Induction of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogene expression by asbestos is ameliorated by N-acetylcysteine in mesothelial cells. Cancer Res, 1995, 55: 2085~2089
- Parfett CL, Pilon R, Caldeira AA. Asbestos promotes morphological transformation and elevates expression of a gene family invariably induced by tumor promoters in C3H/10T1/2 cells. Carcinogenesis, 1996, 17 (12): 2719~2726

(收稿: 1998-12-25)