

天然类胡萝卜素抑制细胞恶性转化机理的初步研究

王强 吕飞杰 张涛 中国农业科学院农产品加工综合研究中心 北京 100081
韩雅珊 中国农业大学食品学院 北京 100094

摘 要 实验对天然类胡萝卜素抑制细胞恶性转化的机理进行研究, 结果表明: 斑螋黄素、 β -胡萝卜素和番茄红素均能显著上调细胞间隙连接通讯功能、抑制细胞生长, 并使细胞周期时相左移、M 期百分比下降、MI 降低; 细胞转化及类胡萝卜素处理过程中不伴随间隙连接蛋白基因 Cx 43 染色体 DNA 的丢失或突变。提示: 类胡萝卜素抑制细胞增殖, 上调细胞间隙连接通讯功能及其参入间隙连接蛋白基因 Cx 43 的表达与调控可能是其抑制细胞恶性转化的重要机制之一。

关键词 天然类胡萝卜素 恶性转化 细胞增殖 细胞间隙连接通讯 Cx 43

Abstract The mechanism of natural carotenoids (including canthaxanthin, β -carotene, lycopene) on inhibiting DMBA-induced neoplastic transformation has been investigated. The mouse embryo fibroblast C3H10T1/2 cell was used as cell model and the method of microinjecting fluorescence probe transfer was used for analyzing gap junctional intercellular communication (GJIC). The results showed that: carotenoids tested inhibited cell growth rate, proliferation and up-regulated GJIC significantly. There were no changes of chromosomal DNA of Cx 43 in different groups. It suggested that the effects of carotenoids on inhibiting proliferation and enhancing GJIC by regulating the protein gene Cx 43 might be one of the important mechanisms for inhibiting neoplastic transformation.

Keywords Natural carotenoids Neoplastic transformation Proliferation GJIC Cx 43

间隙连接介导的细胞间隙连接通讯 (Gap Junctional Intercellular Communication, GJIC) 在胚胎发育、细胞分化、生长控制及维持内环境平衡等方面起重要作用^[1]。许多研究发现 GJIC 与癌变发生密切相关, 大多数肿瘤细胞的 GJIC 功能微弱或缺失; 细胞发生转化后其 GJIC 减弱或抑制; GJIC 的缺失或抑制被认为是促癌变阶段的重要机制^[2]。GJIC 功能的上调则会使转化的癌起始细胞不断接受周围正常细胞有规律的生长控制信号, 从而抑制转化细胞的无性克隆, 阻止了转化表型的表达。目前有报道认为类胡萝卜素 (Carotenoids, Car.s) 对各种癌症的预防与其增强癌起始细胞与正常细胞间的 GJIC 功能有关^[3]。本研究以小鼠胚胎成纤维细胞系 C3H10T1/2 为细胞模型, 用显微注射荧光探针示踪技术 (Microinjecting and fluorescence probe transfer), 研究该细胞经 7, 12-二甲基胆蒽 (DMBA) 诱导转化后类胡萝卜素对转化细胞的周期及 GJIC 功能的影响, 旨在初步探讨 Car.s 抑制细胞恶性转化的机理, 并为其化学防癌机理的研究提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Opton 显微注射系统, Olympus 荧光显微镜, BD 公司 FACS111 型流式

细胞仪, NAPCO 5140 型 CO₂ 培养箱, Beckman GS-15R 型超速离心机。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基及小牛血清 (GIBCO), 荧光探针 Lucifer

Yellow CH (Sigma), DMBA (Fluka), β -胡萝卜素 (β -Carotene, β -C)、斑螋黄素 (Canthaxanthin, Can.), 番茄红素 (Lycopene, Lyco., Roche), 间隙连接蛋白基因 Cx 43 cDNA 由华盛顿大学 Beyer 教授馈赠。

1.3 实验细胞

小鼠胚胎成纤维细胞系 C3H10T1/2, 北京师范大学生物系提供。

2 方法

2.1 细胞的培养和实验分组

正常 10T1/2 细胞经 DMBA 转化后, 接种细胞 10⁴/33mm 于培养皿中, 用 5% DMEM 培养基进行传代培养^[4]。按培养液的不同分四组: 一般培养液对照组; 三种 Car.s 培养液处理组。各组均于培养 48h 时进行各项指标的测定。

2.2 有丝分裂指数 (MI)

从培养皿中取出长满细胞的盖玻片, 经 Carnoy's 液固定, Giemsa 染色, 显微镜检各组 1000 个细胞内的有丝分裂相。

2.3 细胞周期时相的分析 (FCM)

将细胞用胰蛋白酶消化液后制成 PBS 悬液, 经 70% 冷乙醇固定、RNA 酶处理后以 0.05mg/ml 的 PI 染色 20min, 尼龙网过滤上机进行流式细胞光度术分析。

2.4 细胞 GJIC 的评价方法

接种细胞于预先放有盖玻片的 60mm 的无菌培养皿中,

48h时取出长有细胞的盖玻片,用PBS洗去培养液后固定在载玻片上,并在显微注射系统下单细胞注射荧光探针,于荧光显微镜下观察探针传递情况。10min时记录探针传递细胞数目,以12次重复测定荧光探针传递的细胞总数表示细胞的交流通讯功能。

2.5 Cx43 染色体 DNA 的检测

提取各处理组细胞的染色体DNA,用Dig试剂盒进行斑点杂交实验,检测各种对转化细胞Cx43染色体DNA的影响。

3 结果

3.1 各种类胡萝卜素对细胞生长及增殖的影响

表1的分析结果表明:转化细胞经各种Car.s处理后,其生长均受到明显的抑制。Can.抑制作用最强,与对照相比第3天抑制率为24.07%,达显著水平($P<0.05$),第5天为41.02%,达极显著水平($P<0.01$);第5天 β -C的抑制率为38.70%,达极显著水平,Lyco.为31.11%,达显著水平($P<0.05$)。

Table 1 Effects of carotenoids on cells growth

Group	Cell numbers (1×10^5) 3rd(x+s)	Inhibition Rate(%)	Cell numbers (1×10^5) 5rd(x+s)	Inhibition Rate(%)
CK	1.08±0.2775	—	6.46±0.4832	—
Can.	0.82±0.1338	24.07*	3.81±0.3985	41.02**
β -C	0.89±0.1450	17.59	3.96±0.4226	38.70**
Lyco.	0.97±0.2461	10.19	4.45±0.4701	31.11*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CK; the concentration of carotenoids is 10^{-5} mol/L^[4]。

FCM及有丝分裂指数(MI)检测结果如表2。可以看出:各Car.s处理组的MI值明显降低,与对照组相比均达显著水平;细胞周期时相与对照组相比发生左移,S、G2+M期细胞减少,G1期细胞增多,说明Car.s使DNA的合成受阻,抑制了细胞的增殖。

Table 2 Effects of carotenoids on cell division cycle and mitotic index

Group	G1 (%)	S (%)	G2+M (%)	MI (%)
CK	41.0	35.5	23.6	2.08
Can.	64.2	20.1	15.7	1.43*
β -C	58.8	24.9	16.3	1.59*
Lyco.	56.2	26.2	17.6	1.65*

* $P<0.05$ vs CK; the concentration of carotenoids is 10^{-5} M。

3.2 类胡萝卜素对GJIC的影响

GJIC功能的分析表明:各Car.s处理组表现出荧光探针传递现象(如图1),重复测定的平均值为 3.68 ± 0.91 ($n=12$);而对照组则几乎没有探针传递现象(如图2),重复测定的平均值仅为 1.26 ± 0.30 ($n=12$)。

3.3 类胡萝卜素对间隙连接蛋白基因Cx43染色体DNA的影响

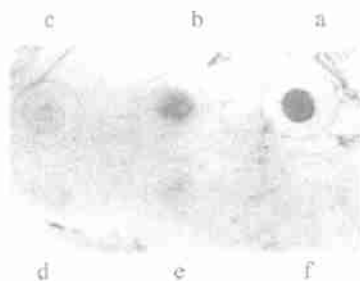
各处理组细胞染色体DNA斑点杂交检测的结果如图3。可以看出:各Car.s处理组与对照组均表现阳性结果,说明DMBA并没有引起细胞间隙连接蛋白基因Cx43染色体DNA的改变,而类胡萝卜素上调GJIC的结果提示:Car.s可能通过参与连接蛋白基因Cx43的表达和调控来上调GJIC功能。



图1 Can. 处理细胞探针传递图



图2 无Car.s 处理细胞探针传递



a. 阳性对照
b. Can.
c. β -C
d. Lyco.
e. CK
f. 阴性对照

图3 斑点杂交检测结果

4 讨论

正常C3H10T1/2细胞系经DMBA诱导转化后其外部特征亦表现出恶性化特征,Car.s可遏制细胞转化并可抑制转化灶的形成^[1]。本实验结果进一步证实Car.s能明显抑制细胞的生长,并使细胞周期时相左移,M期百分比下降,MI降低,充分说明Car.s对细胞的抑制作用。提示Car.s对细胞增殖及周期的影响可能是其抑制细胞恶性转化的重要事件。

GJIC的阻断或异常被认为是促癌阶段的重要机制^[2],而Car.s上调GJIC可能是其抑制细胞恶性转化的机理之一。Car.s增强GJIC功能与其影响细胞周期的实验结果提示二者间存在相关性。Loewenstein^[3]认为GJIC的阻断是细胞进入增殖周期的重要因素,GJIC的缺失使细胞得以逃避周围正常细胞的调控而进入增殖周期。

斑点杂交的结果说明细胞转化后虽然GJIC被抑制,但并不伴随连接蛋白基因组DNA的丢失或突变,只是该基因表达的异常或表达水平的下降。提示Car.s上调GJIC功能与其参与连接蛋白基因的表达与调控有关。Car.s对Cx43 mRNA表达水平影响的实验结果将进一步证实其对Cx43表达的调控作用。

Car.s抑制细胞增殖,上调GJIC功能及其参与连接蛋白基因Cx43的表达与调控可能是其抑制细胞恶性转化的重要机制,该结果为进一步研究Car.s化学防癌的机理奠定了基础。

参 考 文 献

电场对蒸馏水、豆腐冻结与解冻过程的影响

李法德 李里特 中国农业大学中日食品研究中心

辰巳英三 日本农林水产省国际农林水产业研究中心

摘 要 对蒸馏水和豆腐在电场作用下的冻结和解冻过程进行了研究, 由实验结果可以看出: 在实验条件下, 电场对蒸馏水冻结和熔化过程(冰水共溶)中蒸馏水中心温度的变化影响不明显, 对豆腐冻结和解冻过程中试样中心温度的变化影响也不明显。但施加电场后豆腐在冻结过程中, 其外观形状发生了变化: 表面细腻、不破裂, 在豆腐的底部与容器(培养皿)之间发生了翘起, 其原因可能是在电场作用下, 豆腐中的水分向豆腐的上表面发生了迁移。因此, 有必要进一步研究。

关键词 静电场 豆腐 蒸馏水 冻结 解冻

Abstract In this paper, the process of the freezing and the thawing of the distilled water and the tofu had been studied in the electrostatic field. The experiment results showed that the effect of the electrostatic field on the change of the center temperature of the distilled water were not noticeable in the process of the distilled water freezing and the ice melting in the experiments. The effect of the electrostatic field on the change of the center temperature of the tofu in the process of the freezing and the thawing was also not noticeable, but the shape of the sample tofu has changed in the experiment because of the effect of the electrostatic field. The top was fine and smooth, better than the control's. There was no split on the top, but the upwarp of the tofu at the bottom of the glass incubator has occurred because of the electrostatic field. The author analyzed that the main reason was possibly that the water in the tofu perhaps moved toward the top of the tofu in the electrostatic field. Thus a further study on this field is needed.

Keywords Electrostatic field Tofu Distilled water Freezing Thawing

我国是最早种植大豆的国家, 利用大豆制成豆腐制品已有上千年的历史。在我国豆腐有南豆腐、北豆腐、老豆腐、嫩豆腐等之分。近年来研究发现, 大豆制品可以预防心脏病和癌症。另外, 新鲜豆腐经冷冻后, 内部组织结构和成分发生了变化, 其形态呈蜂窝状, 但所含维生素、蛋白质、矿物质等破坏较少。研究证明, 冻豆腐有促进胃肠道及全身组织脂肪吸收的作用, 经常食用可以达到减肥的目的, 因此, 具有广阔的市场前景。但目前我国对冻豆腐及其制品的研究还很少。因此, 为了开发利用大豆资源、增加农产品的附加值以及满足人们对冻豆腐及其干制品日益增长的消费需求, 必须对冻豆腐生产过程中的有关问题进行研究, 如冻豆腐制作的最佳工艺条件以及对解冻、干燥等工艺过程的影响因素等。

根据浅川效应^[1], 在电场作用下, 水的某些性质将发生变化。作者的有关实验也证明: 在电场作用下, 蒸馏水的蒸发速度、冰的熔化速度、豆渣的干燥速度等都有明显提高^[2-3]。因此, 有必要对在电场作用下蒸馏水和豆腐的冻结与解冻过程进行研究, 这也是该文的主要目的。

1 实验装置与方法

1.1 实验装置

实验装置如图1所示, 实验台是用环氧树脂绝缘板制成的, 针状电极与板状电极之间的距离可调, 整个实验台可放入低温试验箱(WD4005 重庆试验设备厂)和恒温恒湿箱(KCL1000 东京理化器械株式会社)中。漏泄试验变压器(TDM2.5/60 北京互感器厂)由控制仪控制可产生0~60kV的高压负电, 电压的大小由JGM-100型高压电压表(精度: 0.5级, 北京丰源高压电器厂)显示。盘形板状电极(直径: 100mm)固定在实验台底部并与接地线相连, 接高压负极的针状电极(大圆规针脚)安装在护套内并可上下自由调节以改变极间距离。

1.2 实验方法

1.2.1 蒸馏水冻结与熔化

用电子天平(KLC-1000 Switzerland)称量100g蒸馏水分别放入塑料杯内, 把温度记录仪(TR-71 式会社)的两个传感器固定在杯子内水的中部(如图2所示)。调节护套使针状电极至板状电极的距离为70mm, 温度记录仪(71)的采样间隔时间设置为3min。预先使低温试验箱的温度降至设定温度(分别为-10℃和-20℃), 当把准备好的蒸馏水放入实验装置后, 启

- 1 Werner R, Loewenstein WR, Birgit R. The cell-cell channel in the control of growth. *Cell Biology*, 1992;3:59~79.
- 2 Buch RJ. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 1994;24(3):216~231.
- 3 Bertram JS, Bortkiewicz H. Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse

and human cells. *Am J Clin Nutr*, 1995;62:1327s~1336s.

- 4 Pung A, Rundhang JE, Yoshizawa CN, et al. β -Carotene and canthaxanthin inhibit chemically and physically induced neoplastic transformation in 10T1/2 cells. *Carcinogenesis*, 1988;9:1533~39.
- 5 Loewenstein W. Junctional intracellular communication and control of growth. *Biochem. Biophys. Acta*, 1979;560:1~65..