

12-0-十四酰基吡啶醇-13-乙酸酯(TPA)诱导的 NIH 3T3 细胞核内癌基因 c-fos, c-myc, c-myb 的表达能被十六酰基肉毒碱(PMC)抑制*

斯民良 罗建红¹ 余应年

浙江医科大学病理生理教研室 杭州 310006

¹浙江医科大学医学分子生物学实验室

摘要 用快速印迹(quick blot)和延续转录法(run-off transcription assay), 证明在 12-o-十四酰基吡啶醇-13-乙酸酯(12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, TPA)刺激下, 静止期 NIH 3T3 细胞中 c-fos, c-myc, c-myb 表达均有增加, 但在蛋白激酶 C(protein kinase c, PK-C)抑制剂十六酰基肉毒碱(pamitoyl-L-carnitine chloride, PMC)存在下, TPA 诱发的 c-fos, c-myc, c-myb 表达均受到抑制, 说明促癌剂 TPA 的基因诱导作用是通过 PK-C 介导的. c-fos 等初级反应基因表达的检测和 PK-C 在这些基因表达中的作用分析有希望作为 TPA 型促癌物的检测方法.

关键词 吡啶醇酯; 蛋白激酶 C; 癌基因表达

THE EXPRESSION OF C-FOS, C-MYC, C-MYB IN NIH 3T3 CELLS INDUCED BY 12-0-TETRADECANOYL PHORBOL-13-ACETATE(TPA) CAN BE INHIBITED BY PAMITOYL-L-CARNITINE CHLORIDE(PMC)

Si Minliang, Luo Jianhong¹, Yu Yingnian

Department of Pathophysiology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006

¹Laboratory of Medical Molecular Biology, Zhejiang Medical University

Abstract Using quick blot and run-off transcription assay, It was demonstrated that in quiescent NIH 3T3 cells, after 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate(TPA) treatment, the expression level of c-fos, c-myc, c-myb increased, but the TPA induced expression of c-fos, c-myc, c-myb can be inhibited by the protein kinase c inhibitor, pamitoyl-L-carnitine chloride(PMC). These results indicated that the gene induction of

* 国家自然科学基金资助项目

TPA was mediated by PK-C. The authors supposed that detection of induced expression of primary response gene such as *c-fos* etc. combined with the analysis of the role played by PK-C in these biological reactions may be used as a detection method for TPA type tumor promotor.

Key words tetradecanoyl phorbol acetate; protein kinase C; expression of oncogene

TPA 型促癌剂作用在细胞质膜中的特异性受体即 Ca^{++} -磷酸依存性蛋白激酶, 蛋白激酶 C, 并使之激活⁽¹⁾, 继而引起 PK-C 底物磷酸化⁽²⁾⁽³⁾, 已知 PK-C 在细胞内通过磷酸酰肌醇代谢回路的信号传达起刺激、应答偶联作用⁽³⁾, 由此途径诱发的细胞应答反应中包括细胞的增殖和分化效应⁽⁴⁾. 已知癌基因如 *c-fos*, *c-myc*, *c-myb* 在细胞周期和促癌和促癌剂作用下都有一过性表达⁽⁵⁾⁽⁶⁾, 并参与细胞的增殖和分化调控⁽⁴⁾⁽⁷⁾. 细胞的增殖和分化效应被认为是促癌剂作用下最重要的生物学效应之一. 本文用快速印迹⁽⁸⁾和延续转录法⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾观察了静止期(G_0 期)NIH 3T3 细胞中 *c-fos*, *c-myc*, *c-myb* 在 TPA 作用下以及 PK-C 抑制剂十六酰基肉毒碱(PMC)⁽¹¹⁾对 TPA 诱发这些原癌基因表达的影响, 以进一步阐明这些原癌基因表达在促癌剂生物效应中的作用.

材料和方法

1. 细胞培养与实验处理

本文实验均在小鼠 NIH 3T3 细胞中进行, 传代 3~4d 后长至将近汇合的细胞, 继续培养 24h 使其进入 G_0 期, 吸除培养基, 对细胞作分组处理. 对照组仅换入不含小牛血清的 DMEM 培养基; TPA 处理组换入含 100ng/ml TPA 的上述培养基; 而 PMC 组则换入 100ng/ml TPA 加 30 μ mol/L PMC 的上述培养基; 上述培养基中二甲亚砜终浓度为十万分之一, 细胞继续孵育 45min 至 2h, 分别取样分析.

2. 快速打点印迹(quick blot)及杂交

收集处理后细胞经计数并调节至一定浓度, 按文献⁽⁸⁾描述的方法制备快速打点印迹样品, 打点印迹好的膜晾干后即用于 $\alpha^{32}P$ -dATP (比活度 3,000 Ci/mmol, 10uCi/ml 北京福瑞公司产品) 标记的探针 (比活为 $2-5 \times 10^7$ cpm/ μ g DNA) 按文献⁽⁸⁾叙述的方法杂交、洗膜、放射自显影. 癌基因 *c-myc* 的 HindIII 片段 (1.7Kb), *v-myb* 的 Kpn I 片段 (2.0Kb) 和 *v-fos* 的 BglII 片段 (1.5Kb) 分别由质粒 PM-*c-myc*-54 (美国纽约州立大学 Stony Brook 的 K.B.Marcu 教授提供), pVM-2 (美国加州大学 J.M.Bishop 教授提供), PFBJ-3 (美国 Salk 研究所, 分子生物学和病毒学实验室的 Verma I.M. 教授提供) 按常规方法制备.

3. 延续转录测定法

延续转录反应与标记 RNA 探针的制备及分离按 Greenberg 介绍的方法⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾进行, 标记好的各组 RNA 探针浓度调整至 5×10^6 cpm/ml, 与预先分别经限制性内切酶 (质粒 pFBJ-3, pM-*c-myc*-54 用内切酶 HindIII pVM-2 用 BamHI) 酶切后并点于 Duralose 膜上的 pFBJ-3, pM-*c-myc*-54, pVM-2 质粒 DNA, 于 65 $^{\circ}$ C 杂交 36h. 杂交好后用 $2 \times$ SSC, 65 $^{\circ}$ C 洗 2 次, 再于 37 $^{\circ}$ C, 10 μ g/ml RNaseA 温育 30min, 再用 $2 \times$ SSC, 37 $^{\circ}$ C 洗涤 1h, 晾干后 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 4~5d 后洗出片子.

结果

1. c-myc, v-myb, v-fos 片段的回收
质粒 pM-c-myc-54, pVM-2, pFBJ-3 分别用限制性内切酶 Hind III, Kpn I,

Bgl II 酶切后, 于 1% 琼脂糖胶上电泳分离, 然后用 DEAE NA-45 膜片法按文献⁽²⁾ 阐述的方法回收相应的癌基因片段。

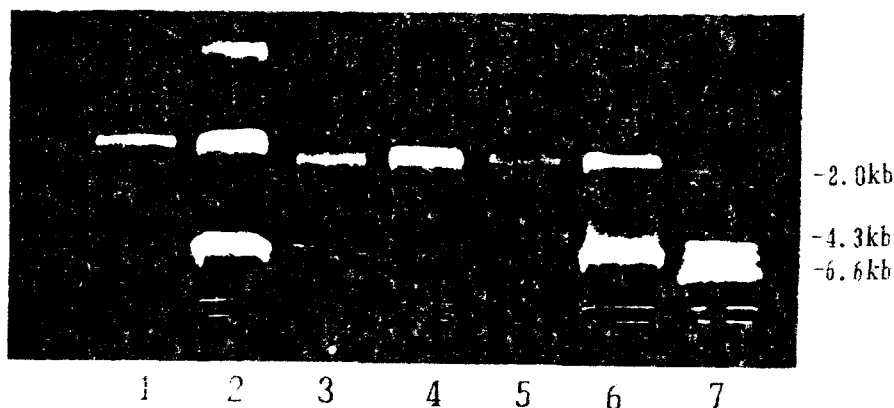


图 1: 质粒酶切后及回收的癌基因片段电泳图 (1. v-fos 片段; 2. 质粒 pFBJ-3/Bgl II 酶切; 3. c-myc 4. 质粒 pM-c-myc-54/Hind III 酶切; 5. v-myb 6. 质粒 pVM-2/Kpn I 酶切; 7. DNA/Hind III 酶切)

由图 1 可知: 回收的片段符合质粒构建时插入的 c-myc, v-myb, v-fos 片段的长度。

2. 快速印迹法检测 PK-C 抑制剂 PMC 对 TPA 刺激诱发 NIH 3T3 细胞 c-myc, c-myb, c-fos 基因表达的影响

快速印迹杂交法用于检测某一时刻细胞内已转录好的特异 mRNA 的水平, 根据文献⁽⁹⁾⁽¹³⁾的结果, 我们选定长至汇合的 NIH 3T3 细胞经 TPA 刺激 2h 或 45min 后用快速印迹杂交法检测 NIH 3T3 细胞内已转录完全的 c-myc, c-myb, c-fos 的 mRNA 水平。

图 2 的结果表明: NIH 3T3 细胞长至汇合后再培养 24h, 经 TPA 刺激 2h 或 45min 后 c-myc, c-myb, c-fos 基因表达均比对照组增加, 但在 PK-C 抑制剂 PMC 存在下, TPA 诱发的 c-myc, c-myb 和 c-fos 基因表达受到抑制。

3. 延续转录法检测 PK-C 抑制剂

PMC 对 TPA 刺激 NIH 3T3 细胞 c-myc, c-myb, c-fos 基因表达的影响

延续转录法用于检测细胞核内某一时刻正在转录中的特异 mRNA 的水平, 根据文献⁽⁹⁾⁽¹³⁾的结果, 我们选定长至汇合的 NIH 3T3 细胞经 TPA 刺激 45min 后用延续转录法检测 NIH 3T3 细胞核内正在转录中的 c-myc, c-myb, c-fos 基因的转录水平。

由图 3 的结果可见, G₀ 期 NIH 3T3 细胞经刺激 45min 后细胞核内正处于转录的基因中 c-myc, c-myb, c-fos 的转录水平也均比对照组增高, 而在 PK-C 抑制剂 PMC 存在下, 这些基因的转录水平均受到抑制。

讨论

本文用快速印迹和延续转录 2 种方法, 分别检测细胞内已完成转录的 mRNA 水平和细胞核内某一时刻正处于转录中的

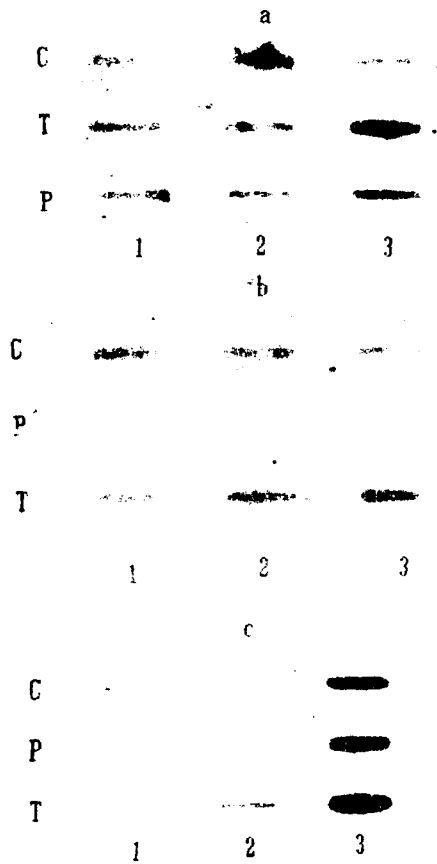
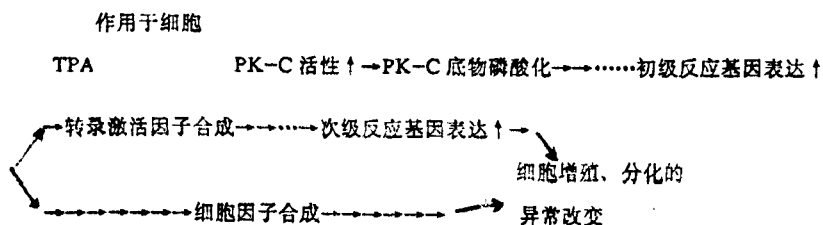


图2 PK-C抑制剂 PMC对 TPA 诱发 NIH 3T3 细胞 c-myc, c-myb, c-fos 基因表达的影响。快速印迹法 (a:c-myc 表达情况; b:c-myb 表达情况; c:c-fos 表达情况; C:对照组; T:TPA 处理组; P:PMC 加 TPA 处理组; 1. 细胞数 1.0×10^5 ; 2. 细胞数 2.0×10^5 ; 3. 细胞数 5.0×10^5 。TPA 处理时间在 c-myc, c-myb 表达为 2h, 在 c-fos 为 45min)

基因转录水平。2 者均证明静止期 NIH



3T3 细胞经促癌剂 TPA 刺激后 c-myc, c-myb, c-fos 3 个原癌基因的表达均有增加, 说明它们均为 TPA 诱导应答的基因。但在 PK-C 抑制剂 PMC 存在下, TPA 诱发的这 3 个原癌基因的表达增高均被抑制。提示 TPA 诱导这些原癌基因的表达确是通过激活细胞内 PK-C 活性, 使 PK-C 底物磷酸化, 然后传递信号入细胞

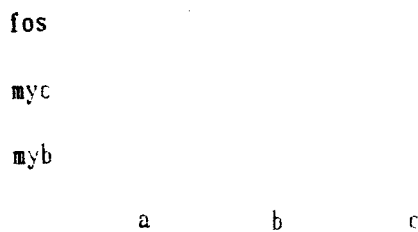


图3. PK-C 抑制剂 PMC 对 TPA 刺激诱发的 NIH 3T3 细胞 c-myc, c-myb, c-fos 基因表达的影响。延续转录法 (a: 对照组; b: TPA 刺激组; c: PMC 加 TPA 处理组, TPA 处理时间为 45min)

核内, 从而引起核原癌基因的表达。细胞原癌基因 c-fos, c-myc, c-myb 均为促癌剂或生长因子类诱导下的初级反应基因 (primary response gene), 在促癌剂等的作用下, 它们在几十 min 或数 h 内表达即有增加⁽⁵⁾⁽⁶⁾, 继而才有次级反应基因 (secondary response gene) 或一些功能蛋白质的表达或合成。根据我们的实验结果及国外的有关报道⁽¹⁻⁴⁾, 促癌剂作用于细胞上引起基因表达的简略机理可归纳如下:

结合我们实验室在促癌剂对 NIH 3T3 细胞间通信影响的研究中发现 PK-C 抑制剂 PMC 等能拮抗 TPA 型促癌剂对细胞间通信的抑制作用, 而对非 TPA 型促癌剂对细胞间通信的抑制作用没有影响⁽¹⁴⁾, 说明 TPA 型促癌剂是通过 PK-C 介导抑制细胞间通信的, 来源于人的羊膜细胞 FL 系中, 也证实 TPA 可引起 PK-C 活力的增加及 PK-C 自胞液组份向颗粒性组份的转位。我们设想应用对初级反应基因如 c-fos, c-myc, c-myb 等基因表达的诱导反应和 PK-C 在这些反应中的作用分析及对经缝隙连结的细胞间通信的影响, 以及直接测量对细胞 PK-C 的激活作用及其在亚细胞组分中的分布, 可望组成 1 套用于促癌剂及其分型的检测方法。

参考文献

1. Robert WL, et al. Induction of tumor promotor-inducible genes in murine 3T3 cell lines and tetradecanoyl phorbol acetate-non proliferative 3T3 variants can occur through protein kinase c-dependent and independent pathways. *molecular and Cellular Biology* 1989; 9(5):1790.
2. Gernard MH, et al. Overproduction of protein kinase c causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell* 1988; 52(3):343.
3. Yasutomi Nishizuka. Studies and prospectives of the protein kinases c family for cellular regulation. *Cancer* 1989; 63(10):1892.
4. Whitfield JF, et al. Calcium, cyclic AMP and protein

kinase c-partners in mitogenesis. *Cancer and Metastasis Review* 1987; 5(3):205.

5. Eisenman RN, et al. Oncogens with potential nuclear function:myc, myb and fos. *Cancer Surver* 1986; 5(2):309.
6. 陈卫三. 癌基因的表达与细胞周期. 国外医学. 分子生物学分册 1987; 9(5):222.
7. Frick KK, et al. platelet-derived growth factor-induced c-myc RNA expression. *J Biol Chem* 1988; 263(6):2948.
8. 唐建清, 等. 介绍一种快速印迹杂交法. 生物化学与生物物理进展 1987 14(6): 59.
9. Greenberg ME, et al. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 1984;311(4):433.
10. Greenberg ME. Identification of newly transcribed RNA. In:Ausubel FM, et al. eds. *Current Protocol in Molecular Biology. the U.S.A.:* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987; 2:4.10.1-4.10.9.
11. Brockenbrough JS, et al. Inhibition of epidermal growth factor binding in rat pancreatic acini by pami-toyl carnitine: evidence for Ca and protein kinase c independent regulation. *Cancer Res* 1987; 47(7):1805.
12. Sambrook J, et al. Recovery and purification of DNA fractionated on agarose gels. In:Sambrook j, et al. eds. *Molecular cloning, a laboratory manual.* second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Prese, 1989:p6.22-6.27.
13. Herschman HR. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 281.
14. 高贤龙, 等. 几种促癌剂对 NIH / 3T3 细胞经缝隙连结的细胞间通信的影响. 中国病理生理杂志 1992; 8 (3): 249.

(上接第 17 页)

9. 营养卫生教研室, 启东二公社部分社员家庭熟饭菜黄曲霉毒素 B₁ 含量调查, 上海第一医学院医学科研资料 1977; P17.
10. Salbioni G., et al. Isolation and characterisation of the major serum albumin

adducts formed by aflatoxin B₁ *in vivo* in Rats. *Carcinogenesis* 1987;8(3):819.

11. Wild, CP, et al. Evaluation of methods for quantitation of AFT-album adducts and Their application to exposure assesment. *Cancer Res* 1990; 50(2):245.