

内毒素联合精氨酸对人肝癌细胞Bel-7402增生及凋亡的影响

孟 玫, 姜军梅, 尹晓燕, 朱菊人

孟玫, 姜军梅, 尹晓燕, 朱菊人, 山东大学山东省立医院消化内科
山东省济南市 250021
孟玫, 女, 1974-12-13 生, 江苏徐州人, 汉族, 博士研究生在读。
山东省自然科学基金资助项目, No. 2000BB2DBA1
项目负责人: 姜军梅, 250021, 山东省济南市, 山东省立医院消化内科。
电话: 0531-7938911
收稿日期: 2004-06-08 接受日期: 2004-07-22

Effects of lipopolysaccharide with L-arginine on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402

Mei Meng, Jun-Mei Jiang, Xiao-Yan Yin, Ju-Ren Zhu

Mei Meng, Jun-Mei Jiang, Xiao-Yan Yin, Ju-Ren Zhu, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China.
Supported by the National Natural Science Foundation of Shandong Province No. 2000BB2DBA1
Correspondence to: Jun-Mei Jiang, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China.
Received: 2004-06-08 Accepted: 2004-07-22

Abstract

AIM: To study the effect of endogenous nitric oxide (NO) on the proliferation and apoptosis in human liver carcinoma cell line 7402 through regulation of the speed limit enzyme and the concentration of substrate in the process of NO production.

METHODS: The speed limit enzyme in the process of NO production in 7402 cell is inducible nitric oxide synthase (iNOS), and its substrate is L-arginine (L-Arg). The cells were cultured in the Dulbecco's modified Eagle medium, which was without L-Arg. Different concentration of L-Arg was added into the culture medium and lipopolysaccharide (LPS) of 100 ng/L was added at the same time. MTT method was adopted to describe the proliferation of the cells. Immunohistochemical method was performed to determine the expression of iNOS. The TUNEL method was used to detect the apoptosis in situ.

RESULTS: Without change of the expression and activity of iNOS, L-Arg of 0.625 mmol/L produced NO with low concentration, it could promote the proliferation of the cells. On the contrary, L-Arg of 2.5 mmol/L inhibited the proliferation of the cells and improved the apoptotic rate of the cells. LPS of 100 ng/L could promote the expression and activity of iNOS in the cells. The production of NO in unit time was increased if the substrate was enough.

CONCLUSION: Low concentration of NO promotes the pro-

liferation of the cells. High concentration of NO can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of the cells. Increasing the production of endogenous NO by stimulating the expression and activity of its own iNOS is an effective way to inhibit the cells' proliferation and promote its apoptosis.

Meng M, Jiang JM, Yin XY, Zhu JR. Effects of lipopolysaccharide with L-arginine on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(9): 2053-2056

摘要

目的: 通过内毒素联合精氨酸诱导自分泌的一氧化氮(NO)及其限速酶的表达, 观察人肝癌细胞Bel-7402自分泌的一氧化氮的改变对其增生及凋亡的影响。

方法: Bel-7402 细胞中 NO 产生的限速酶为诱导型合酶(iNOS), 其底物为精氨酸(L-Arg)。采用 MTT 法观察不同浓度的L-Arg及内毒素(LPS)对细胞增生的影响。采用细胞免疫组化的方法对iNOS在细胞中的表达进行观察。Tunel法观察NO对细胞凋亡的影响。

结果: 在iNOS的表达不受影响的情况下, 0.625 mmol/L的L-Arg产生低浓度的NO, 对细胞的增生有促进作用(对照组 0.86 ± 0.01 , 处理组 0.87 ± 0.02 $P > 0.05$), 2.5 mmol/L-Arg产生高浓度的NO, 对细胞的增生有抑制作用(对照组 0.86 ± 0.01 , 0.83 \pm 0.01 $P < 0.05$)。100 ng/L LPS使iNOS的表达增强, 使单位时间内NO的生成增多, 细胞增生受抑。与L-Arg有协同作用。高浓度的NO能够促进细胞的凋亡。

结论: LPS可能通过促进iNOS的产生, 在精氨酸的协同作用下, 促进细胞凋亡, 抑制细胞增生。

孟玫, 姜军梅, 尹晓燕, 朱菊人. 内毒素联合精氨酸对人肝癌细胞 Bel-7402 增生及凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(9):2053-2056
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2053.asp>

0 引言

一氧化氮(NO)在人体内具有广泛的生物学活性^[1-5], 目前对于与肿瘤关系的研究表明, 不论是巨噬细胞、自然杀伤细胞、内皮细胞分泌的NO, 还是化学反应提供的外源性NO, 都能通过内分泌或旁分泌的方式诱导肿

瘤细胞凋亡和/或细胞毒作用抑制肿瘤细胞的增生^[6-12]. 但对于诱导表达 iNOS 的肝癌细胞自身 NO 的生成对其增生和凋亡的影响尚未见报道, 我们通过在不含反应底物 L-Arg 的肝癌细胞株培养基中补充 L-Arg, 在 L-Arg 充足的情况下用内毒素诱导肝癌细胞株 iNOS 的表达, 提高 NO 的产生, 从而对 NO 在肝癌细胞中的分泌作用进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 兔抗人 iNOS 一抗, S_{ABC} 试剂盒和 TUNEL 细胞凋亡试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司; 无 L-精氨酸培养基 DMEM 和新生牛血清购自美国 Hyclone 公司; L-精氨酸及其拮抗剂 L-NAME(N^ω-nitro-L-Arginine methyl ester)购自美国 Sigma 公司; 内毒素由上海第二军医大学微生物教研室王路先生惠赠; 胰蛋白酶购于上海华美生物工程公司; 人肝癌细胞株 Bel-7402 由山东省立医院中心实验室王春霞老师惠赠. 细胞置于 37℃, 50 mL/L CO₂ 孵育箱内, 以含 100 mL/L 新生牛血清的无 L-精氨酸的 DMEM 培养液培养, 培养液中因小牛血清中含有的 L-Arg < 10 μmol/L, 在细胞培养生长 1 d 后, 已基本消耗, 可忽略不计(Blood 1996;87:5136), 传代数次以耗尽 Bel-7402 细胞内的 L-Arg 库. 然后取对数生长期的细胞, 实验时以 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 按实验所需进行处理.

1.2 方法 实验孔分别加入终浓度为 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mmol/L 的 L-Arg 处理, 观察不同浓度的 L-Arg 对 Bel-7402 增生的影响, 诱导人肝癌细胞 Bel-7402 中 iNOS 的表达对人肝癌细胞 7402 增生的影响. 由 LPS 诱导 iNOS 的表达, 研究 NO 对细胞增生的影响, 根据肝硬化患者体内门静脉的 LPS 浓度范围是 88 ± 35 ng/L, 故本研究取 LPS 的浓度为 100 ng/L. LPS 组加入 LPS 100 ng/L. LPS(100 ng/L)加 L-Arg 组, L-Arg 所设的 5 组浓度同上. 同时设置对照孔, 不加任何干扰因素. 每组设 6 个复孔, 作用 24 h 后观察细胞的形态学改变. 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法向已无培养液的孔中加入 1 g/L MTT 200 μL, 作用 4 h 后, 甩掉培养液, 加入 20 g/L DMSO 200 μL, 孵育 10 min, 在酶标仪(Denley Drangon Wellscan MK₂) 570nm 处测吸光度 A 值. 免疫组织化学按试剂盒说明 ABC 法操作, 检测 iNOS 在胞质中的表达. DNA 末端原位标记染色法(TUNEL)检测细胞凋亡. iNOS 的免疫组化结果以胞质中出现棕褐色颗粒为阳性结果, TUNEL 结果以胞核中出现蓝色着色为阳性结果. 凋亡指数(apoptosis index, AI)计算方法: 数 5 个高倍镜视野 > 1 000 个细胞, 分别计算凋亡细胞数和总细胞数. AI = 细胞凋亡/总细胞数 × 100%.

统计学处理 MTT 的吸光密度值及生化测定结果采用 One-way ANOVA、Two-way ANOVA 法进行分析, 免疫组化的着色程度经高清晰度彩色病理图文分析仪(HIPA1000)进行光密度分析, 进行 *t* 检验.

2 结果

在未加 L-Arg 的培养基中生长的细胞形态肿胀, 体积增大, 分裂相比较少, 细胞密度减少, 细胞之间的连接较疏松, 培养液的颜色变化较慢, 培养液中悬浮的细胞较多; 在低浓度 L-Arg 的培养基中生长的细胞形态正常, 体积较小, 增生较快, 分裂相比较多, 细胞的分布密度较大, 细胞之间的连接较紧密, 培养液的颜色变化较快, 上清液中悬浮的细胞较少; 而高浓度的 L-Arg 对细胞的增生有抑制作用, 细胞形态明显肿胀, 体积增大, 增生缓慢, 贴壁细胞明显减少, 细胞间的连接最为疏松, 培养液中悬浮的细胞明显增多, 培养液的颜色变化较慢. L-Arg 和内毒素对细胞增生的抑制具有协同作用, 使细胞增生明显受抑.

2.1 内毒素诱导 iNOS 的表达 细胞中的棕褐色颗粒明显高于对照组, 两组 A: 0.028 ± 0.02 和 0.25 ± 0.05 (*P* < 0.05, 图 1).

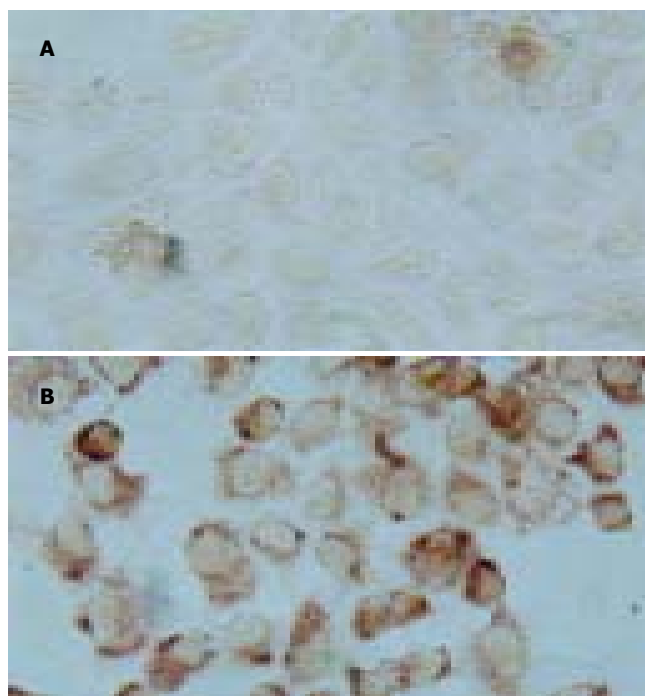


图 1 免疫组化 ABC 法检测 LPS 诱导 iNOS 在 Bel-7402 中的表达. A: (ABC × 400) 无 LPS 刺激的 Bel-7402 细胞胞质中棕黄色颗粒弱阳性表达; B: (ABC × 400) 有 LPS 刺激的 Bel-7402 细胞胞质中棕黄色颗粒强阳性表达.

2.2 NO 对细胞凋亡的诱导 以只加 L-Arg 的实验组为对照组, 在内毒素诱导 iNOS 表达并加 L-Arg 组, 细胞凋亡率明显增加, 两组凋亡率: 9.3 ± 5.2%, 18.6 ± 4.6%, *P* < 0.05 MTT 法测细胞增生无诱导 iNOS 表达变化的因素存在时, 0.625 mmol/L L-Arg 处理过的肝细胞的增生 (0.86 ± 0.01) 与对照组 (0.87 ± 0.02) 无明显差异, 而较低浓度 (0.625 < L-Arg 浓度 ≤ 1.25 mmol/L) 的 L-Arg (0.91 ± 0.01) 对细胞的增生有促进作用. 高浓度 (≥ 2.5 mmol/L) 的 L-Arg (0.83 ± 0.01, 0.82 ± 0.03, 0.82 ± 0.02) 对细胞的增生有抑制作用. 并且在达到一定的浓度 (5 mmol/L) 以后,

对细胞增生的抑制处于平台期, 差异无显著性. L-Arg 和内毒素抑制细胞增生具有协同作用, 可提高 L-Arg 的有效浓度(图 2).

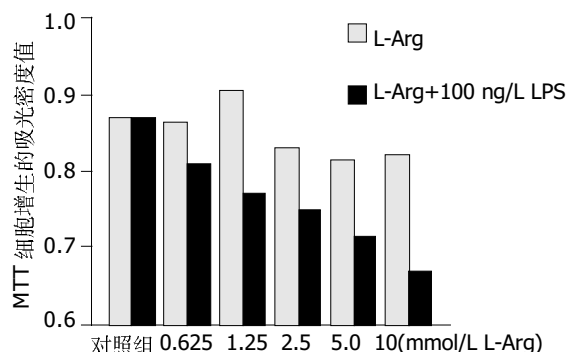


图2 L-Arg 与 LPS 对细胞增生的协同抑制作用.

3 讨论

我们将肝癌细胞株 Bel-7402 培养在无 L-Arg 的培养基中, 使其处于基本无 NO 的环境中, 然后在培养基中加入由低至高的不同浓度的 L-Arg, 镜下观察到在无 NO 的培养条件下 Bel-7402 细胞形态肿胀, 分裂相较少, 细胞密度较底, 细胞之间的连接松散, 培养液的颜色变化较慢, 提示在无 NO 的条件下细胞的代谢较缓慢生长受抑制. 在培养基中加入 0.625 mmol/L 的 L-Arg 继续培养细胞, 我们观察到 Bel-7402 细胞呈现特征性的多角形, 细胞核分裂相明显增加, 细胞密度较大, 细胞间的连接紧密, 培养液的颜色变化较快, 提示细胞的生长代谢旺盛, 低浓度的 L-Arg 对 Bel-7402 有促进增生的作用. 而 2.5 mmol/L 以上的 L-Arg 培养组我们观察到贴壁细胞减少, 悬浮细胞增多, 提示高浓度 L-Arg 对细胞增生起抑制作用. 在 L-Arg 联合 LPS (100 ng/L) 的各培养组观察到细胞的增生呈抑制状态. 免疫组化显示 LPS 诱导了细胞中 iNOS 的表达. DNA 末端原位标记染色法 (TUNEL) 证实 L-Arg 联合 LPS 培养组细胞凋亡率明显增加.

低浓度的 L-Arg 则可能被优先作为细胞的营养成分被利用, 从而促进了细胞的生长. 用 LPS 刺激肝癌细胞, 使肝癌细胞中 iNOS 的表达及活性增强, 发现各种 L-Arg 浓度对肝癌的增生的抑制作用明显增强, 低浓度的 L-Arg 对细胞的增生亦呈抑制作用. 原因可能是在无 L-Arg 培养基中培养的肝癌细胞表达较弱且低活性的 iNOS, 加入大于 2.5 mmol/L 的 L-Arg 可满足 iNOS 对底物的需要, 使细胞内 NO 的单位时间生成量达到最大, 部分细胞因此而发生凋亡或死亡.

细胞中 iNOS 的表达受许多因素的影响^[13-14], LPS 是确定因素之一, 还能增强其活性^[15]. 所以在用 LPS 刺激以后 iNOS 的表达增强, 对底物量的要求增高, 故在 2.5 mmol/L 以上浓度组单位时间 NO 的生成因底物的增加而增加, 而低浓度的 L-Arg 联合 LPS 后对细胞的增生亦呈抑制作用, 可能是因为 LPS 刺激 iNOS 的活性增强,

在单位时间内产生的 NO 增多, 浓度增大使细胞死亡的缘故. 有研究证实 NO 对细胞的作用决定于其单位时间内的生成量, 即 NO 在达到一定的浓度后才可以发挥细胞毒作用或促进细胞凋亡的作用, 低浓度的 NO 在体参与正常的细胞信息传递和生长代谢^[16-19]. 本研究的结果与之相符. LPS 诱导 Bel-7402 中 iNOS 的表达, 在培养基中有充分的底物的前提下, 迅速合成大量的 NO 分泌至培养基中, 对自身的增生与凋亡发生影响. 有研究证实内毒素血症时, 选择性抑制 iNOS 对内毒素肝损伤有保护作用, 提示 iNOS 及其合成的 NO 对肝细胞具有损伤作用^[20], 这可能因为 L-Arg 为非必需氨基酸, 可在体内合成, 能够在限速酶充足的情况下, 产生大量的 NO, 对肝脏造成损伤. 本结果内毒素与 L-Arg 的协同作用相符合.

调节 NO 在肿瘤细胞中的代谢可能有一定的治疗潜能^[21-27]. 本实验结果提示在诱导 iNOS 的表达及活性的同时补充适当的 L-Arg, 对肝癌的治疗可能有一定的辅助作用. 除内毒素外可考虑其他能够刺激 iNOS 表达的药物如 5- 氟尿嘧啶、 γ - 干扰素等并补充其底物 L-Arg, 对原发性肝细胞癌进行辅助治疗.

4 参考文献

- Oktem G, Karabulut B, Selvi N, Sezgin C, Sanli UA, Uslu R, Yurtseven ME, Omay SB. Differential effects of doxorubicin and docetaxel on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Res* 2004;14:381-386
- Caron MH, Alling C. Role of nitric oxide in ethanol-induced up-regulation of muscarinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1107-1113
- 骆鸿, 鲍光宏, 屈金河, 郑永芳. 肠系膜动脉阻力血管平滑肌钙离子单通道特性及硝普钠的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:55-58
- Vi jh AK. High infectious burden, low cancer incidence, and early malignancy in developing countries: a molecular hypothesis in term of the role of nitric oxide. *Med Hypotheses* 2004;63:208-210
- Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol* 2004;10:1699-1708
- 陈会松, 柳利明, 黄华, 杨晋辉. 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:838-840
- Xia HH, Wong BC. Nitric oxide in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis and its significance in gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1227-1230
- Vekemans K, Braet F, Muylaert D, Wisse E. Nitric oxide from rat liver sinusoidal endothelial cells induces apoptosis in IFN gamma-sensitized CC531s colon carcinoma cells. *J Hepatol* 2004;41:11-18
- Kumamoto H, Suzuki T, Ooya K. Immunohistochemical analysis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and heat shock proteins (HSPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2002;31:605-611
- Broholm H, Rubin I, Kruse A, Braendstrup O, Schmidt K, Skriver EB, Lauritzen M. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in human brain tumors. *Clin Neuropathol* 2003;22:273-281
- 刘文超, 穆怀兴, 任军, 张学庸, 潘伯荣. 防御素对胃癌细胞系体外的杀伤作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:622-626
- Kasper HU, Wolf H, Drebbler U, Wolf HK, Kern MA. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. *World J Gastroenterol* 2004;10:1918-1922

- 13 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 14 Oshima T, Imada T, Nagashima Y, Cho H, Shiozawa M, Rino Y, Takanashi Y. Role of nitric oxide in human gastric cancer cells treated with 5-fluorouracil. *Oncol Rep* 2001;8:847-849
- 15 Ikezoe T, Yang Y, Heber D, Taguchi H, Koeffler HP. PC-SPES: a potent inhibitor of nuclear factor-kappa B rescues mice from lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Pharmacol* 2003; 64:1521-1529
- 16 Liu J, Li C, Qu W, Leslie E, Bonifant CL, Buzard GS, Saavedra JE, Keefer LK, Waalkes MP. Nitric oxide prodrugs and metallochemotherapeutics: JS-K and CB-3-100 enhance arsenic and cisplatin cytotoxicity by increasing cellular accumulation. *Mol Cancer Ther* 2004;3:709-714
- 17 Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Fukuzawa M. The role of nitric oxide (NO) in the human internal anal sphincter. *J Gastroenterol* 2001;36:386-391
- 18 王福文, 李杰, 胡志力, 解砚英. 外源性 NO 预防大鼠应激性胃黏膜损伤中胃运动的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:2036-2038
- 19 章敏, 曲瑞瑶. NO 和 VIP 与胃肠电-机械活动的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:1059-1063
- 20 Wang H, Chen XP, Qiu FZ. Increased hepatic expression of nitric oxide synthase type II in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:1923-1927
- 21 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 22 Lim SY, Jang JH, Surh YJ. Induction of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during nitric oxide-induced apoptotic PC12 cell death. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:648-658
- 23 Xu MH, Deng CS, Zhu YQ, Lin J. Role of inducible nitric oxide synthase expression in aberrant crypt foci-adenoma-carcinoma sequence. *World J Gastroenterol* 2003;9:1246-1250
- 24 Inano H, Onoda M. Role of nitric oxide in radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Nitric Oxide* 2003;8:144-148
- 25 Li HL, Sun BZ, Ma FC. Expression of COX-2, iNOS, p53 and Ki-67 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1862-1866
- 26 Song ZY, Wen SQ, Peng JP, Huang X, Qian KD. Significance of vascular endothelial growth factor expression and its correlation with inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:1250-1255
- 27 Wang Z, Cook T, Alber S, Liu K, Kovesdi I, Watkins SK, Vodovotz Y, Billiar TR, Blumberg D. Adenoviral gene transfer of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances the radiation response of human colorectal cancer associated with alterations in tumor vascularity. *Cancer Res* 2004;64:1386-1395

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文, 如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文, 将优先发表, 使 WJG 成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理。WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点。(1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色。若不符, 请提出具体修改意见。(2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符。(3)引言: 是否包括该研究的目的是与其他相关研究的关系。(4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术的有无创新性、系统性或特色。改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当。(5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足。临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果。(6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论。(7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况。(8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。