

新生牛促肝细胞生长素对 HL-60 细胞增生的影响

朱宏丽, 卢学春, 范辉, 辛宏, 庄晓萌, 姚善谦

朱宏丽, 卢学春, 范辉, 辛宏, 庄晓萌, 姚善谦, 中国人民解放军总医院南楼血液科 北京市 100853
项目负责人: 朱宏丽, 100853, 北京市海淀区复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院南楼血液科, bjzhl202_cn@sina.com
电话: 010-66936403
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-12-06

Effect of hepatocyte growth-promoting substance on proliferation of HL-60 cell line

Hong-Li Zhu, Xue-Chun Lu, Hui Fan, Hong Xin, Xiao-Mei Zhuang, Shan-Qian Yao

Hong-Li Zhu, Xue-Chun Lu, Hui Fan, Hong Xin, Xiao-Mei Zhuang, Shan-Qian Yao, Department of Hematology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Hong-Li Zhu, Department of Hematology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. bjzhl202_cn@sina.com
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-12-06

Abstract

AIM: To explore the effect of hepatocyte growth-promoting substance(HGS)on the proliferation of HL-60 cell line and its possible mechanism.

METHODS: HL-60 cells were cultured with different concentrations of HGS, As₂O₃, or As₂O₃ (107 mol/L) plus HGS(40 mg/L). At day 0, 1, 2 and 3, cell growth was examined by MTT assay and Trypan blue, cell cycle was measured by flow cytometry. Meanwhile, DNA damage and repair was determined by men single-cell gel electrophoresis.

RESULTS: HGS inhibited the growth of HL-60 cells in a dose-dependent manner at concentrations ranging from 11.5 to 40 mg/L, with 40 mg/L HGS exhibiting the strongest inhibitory effect. HGS(40 mg/L)not only prevented HL-60 cells from entering G1 phase but also inhibited. DNA damage repair. (-HGS and As₂O₃ synergically inhibited the growth of HL-60 cells.

CONCLUSION: HGS can inhibit the proliferation of HL-60 cells at a rather low concentration, which may be related to its effect on the control of cell cycle and the inhibition of DNA repair.

Key Words: Hepatocyte growth-promoting substance;

As₂O₃;DNA repair

Zhu HL, Lu XC, Fan H, Xin H, Zhuang XM, Yao SQ. Effect of hepatocyte growth-promoting substance on proliferation of HL-60 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(3):351-354

摘要

目的: 研究促肝细胞生长素(hepatocyte growth-promoting substance, HGS)对急性早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 增生的影响, 并探讨可能的作用机制。

方法: 体外悬浮培养法培养 HL-60 细胞, 分为空白对照组、三氧化二砷组、HGS 组以及三氧化二砷(10⁻⁷ mol/L)加 HGS(40 mg/L)组共四个实验组进行培养;在培养的第 1、2、3 和第 4 d 分别利用台盼蓝染色和 MTT 法检测细胞增生情况;采用流式细胞技术检测细胞周期动态变化;利用单细胞凝胶电泳技术检测细胞 DNA 损伤情况。

结果: HGS 终浓度在 11.5-45 mg/L 之间时对 HL-60 细胞的增生有剂量相关性抑制作用, 以 11.5 mg/L 抑制作用最弱, 22.5 mg/L 组次之, 40 mg/L 有最大的抑制作用;浓度为 40 mg/L 的 HGS 能够推迟 HL-60 细胞由 G0 期向 G1 期转化, 减少进入细胞周期的细胞数量;浓度为 40 mg/L 的 HGS 能够抑制 HL-60 细胞 DNA 损伤后的修复;40 mg/L 的 HGS 与 10⁻⁷ mol/L 浓度的三氧化二砷对 HL-60 细胞的抑制有一定协同作用。

结论: HGS 在较低浓度时即对 HL-60 细胞的增生有抑制作用, 这种抑制作用可能是通过细胞周期调控和抑制细胞 DNA 损伤修复来实现的。

关键词: 促肝细胞生长素;三氧化二砷;DNA 修复

朱宏丽, 卢学春, 范辉, 辛宏, 庄晓萌, 姚善谦. 新生牛促肝细胞生长素对 HL-60 细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(3):351-354
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/351.asp>

0 引言

1975 年 LaBrecque *et al* 首次报道幼龄动物肝内存在一种能特异性促进肝细胞生长的小分子蛋白活性物质, 当时称之为肝再生刺激物质(hepatic stimulatory substance, HSS), 此后 LaBrecque 进一步研究认为 HSS 是一种耐热的、仅存在于生长状态肝脏中的小分子活性蛋白, 其作用没有种属特异性, 但有组织特异性^[1]. 国内有报道大鼠肝再生过程中 HSS 提取物对

大鼠原代肝细胞有刺激作用,但对大鼠原代脾细胞、人早幼粒细胞(HL-60)、人肺癌细胞(PLA801D)无刺激作用^[2].近年来,我国军事医学科学院研究人员从健康未哺乳新生牛肝脏提取分子质量在10 ku以下的生物活性肽制成的促肝细胞生长素(hepatocyte growth-promoting substance, HGS),其作用和性质与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)类似,具有明显的刺激肝细胞DNA合成和促进肝细胞再生、加速肝脏组织修复的生物学活性.由于这种生物活性肽有组织特异性,尽管其对入肝癌细胞也有促进增生作用,但在预实验中我们观察到HGS对白血病细胞系的增生有抑制作用,为此我们系统地观察了不同浓度HGS对HL-60细胞系生长的影响,并对可能的作用机制进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 新生牛HGS由军事医学科学院辛宏博士馈赠(分子质量小于10 ku,活性分析为10.8-11.3倍(与生理盐水相比),蛋白含量为9.14-9.47 mg/mL);高糖型RPMI 1640培养基(Sigma);淋巴细胞分离液(天津TBD);台盼蓝(Sigma);碘化丙啶(Sigma);HL-60为本科备存细胞系;CO₂培养箱(Heraeus);FACS Calibur流式细胞仪(Becton Dickinson);CK2倒置显微镜(olympus).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HL-60细胞在无血清RPMI 1640培养基(青霉素100 U/mL,链霉素100 mg/L)中培养24 h后将细胞浓度调整为 2.5×10^8 / L,后加入终浓度50 mL/L的胎牛血清和一定终浓度的HGS在24孔培养板中继续培养,实验分为11.5 mg/L、22.5 mg/L和40 mg/L 3个药物剂量组及1个空白对照组,每组细胞共设3个平行孔.台盼蓝染色法计数生长指数曲线.

1.2.2 台盼蓝染色法检测细胞活性 4 g/L台盼蓝,按实验室操作常规进行.

1.2.3 细胞周期的检测 取不同培养阶段和不同剂量组HL-60细胞悬液加入750 mL/L乙醇在-20℃中冻存,碘化丙啶(PI)染色,利用流式细胞仪进行细胞周期测定.

表1 MTT比色法检测不同浓度HGS与HL-60细胞的共同培养结果

分组 (mg/L)	<i>A</i> ₄₉₀			
	0 d	第1 d	第2 d	第3 d
0	0.496 ± 0.006	0.560 ± 0.010	0.803 ± 0.011	0.890 ± 0.020
11.5	0.493 ± 0.006	0.530 ± 0.010	0.570 ± 0.020 ^b	0.617 ± 0.015 ^b
22.5	0.493 ± 0.006	0.516 ± 0.011	0.536 ± 0.015 ^b	0.603 ± 0.006 ^b
40.0	0.493 ± 0.006	0.507 ± 0.021 ^a	0.510 ± 0.010 ^b	0.557 ± 0.006 ^b

^a*P*<0.05 vs 对照组, ^b*P*<0.01 vs 对照组.

1.2.4 单细胞凝胶电泳检测HL-60细胞DNA损伤 方法参考文献[3]进行.

1.2.5 HGS和三氧化二砷对HL-60细胞生长的影响 采用空白对照、用HGS(40 mg/L)和三氧化二砷(10^{-7} mol/L, Promega)

统计学分析 采用重复采样的方差分析计算各组间的统计学差异,以*P*<0.05为差异具有显著性,以上分析均用SPSS11.0软件完成.

2 结果

2.1 HGS对HL-60细胞生长的影响 HL-60细胞在含有50 mL/L胎牛血清中生长良好.与空白对照组相比,浓度为11.5 mg/L的HGS对HL-60细胞的生长即有抑制作用,而终浓度为40 mg/L的HGS对HL-60细胞的抑制作用最强(图1).

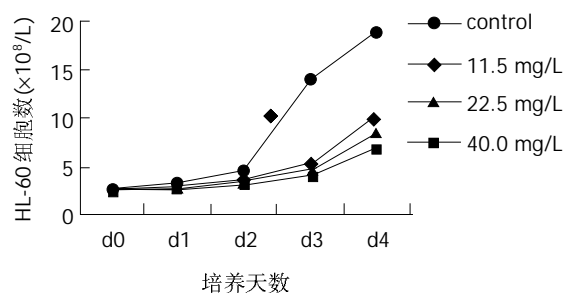


图1 不同浓度HGS对HL-60细胞生长的影响.

2.2 MTT法检测HGS对HL-60细胞生长的抑制作用 与生长曲线结果类似,MTT法检测结果表明HGS对HL-60细胞的生长有明显抑制作用,且这种抑制作用呈现剂量相关性,以11.5 mg/L抑制作用最弱,22.5 mg/L组次之,40 mg/L有最大的抑制作用(表1).

2.3 HGS对HL-60细胞周期的影响 以二倍体细胞内的DNA含量作为DNA的相对含量1,利用流式细胞仪检测细胞内DNA含量,根据DNA相对含量来推算处于不同细胞周期的细胞数量.与对照组相比,终浓度为40 mg/L的HGS处理过的细胞能够推迟HL-60细胞由G0期向G1期转化,减少进入细胞周期的细胞数量(图2).

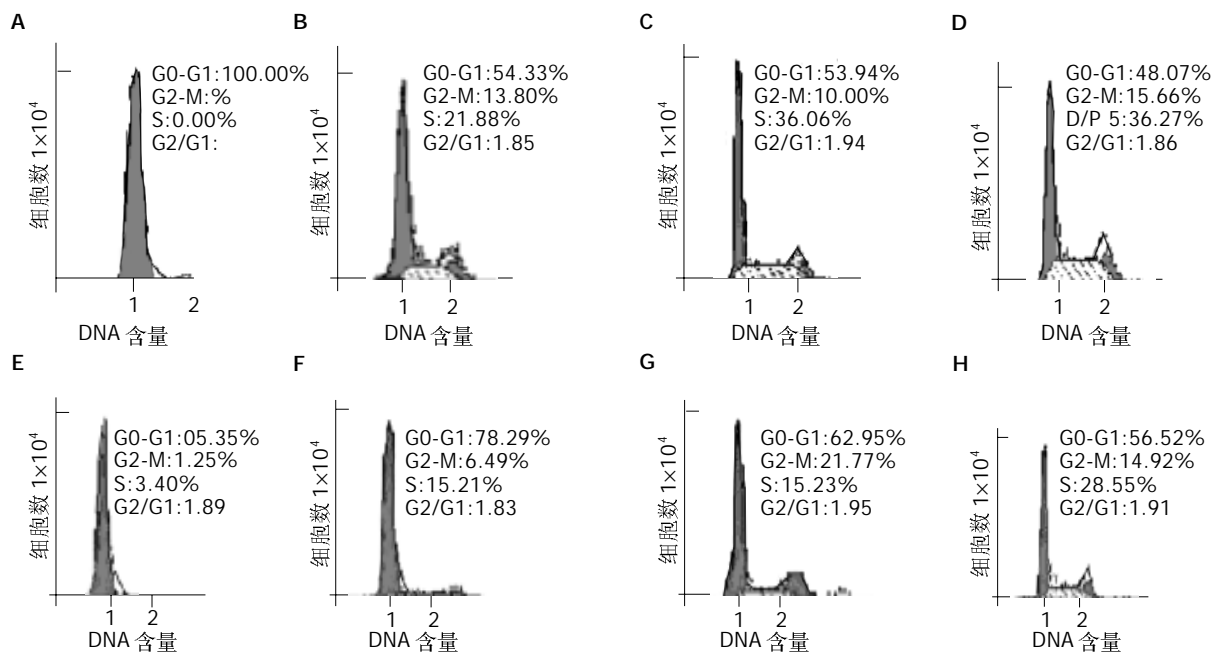


图2 HGS对HL-60细胞周期的影响. A: control, 0 d; B: control, 第1 d; C: control, 第2 d; D: control, 第3 d; E: HGS, 0 d; F: HGS, 第1 d; G: HGS, 第2 d; H: HGS, 第3 d.

2.4 SCGE 法检测 HGS 对 HL-60 细胞 DNA 损伤修复的影响 以 SCGE 法检测 HL-60 细胞的 DNA 损伤情况, 结果浓度为 40 mg/L 的 HGS 对 HL-60 细胞 DNA 损伤的修复有抑制作用, 这种作用要弱于三氧化二砷, 且二者对 HL-60 细胞 DNA 损伤的修复有协同抑制作用(图 3).

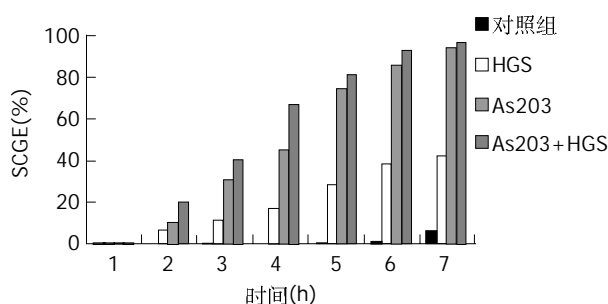


图3 HGS和三氧化二砷对HL-60细胞SCGE的影响.各组与对照相比均 $P<0.01$.

3 讨论

HGS 来源于肝脏, 但也有人^[3]认为某些白血病细胞可能也能分泌 HGS. 研究发现, HGS 具有双向性作用, 能促进某些种类细胞的增生, 但却抑制另外一些细胞的生长. 不同作用取决于不同组织和细胞类型, 即 HGS 作用具有组织特异性. 对肝脏来源细胞, 包括正常肝组织细胞和肝癌细胞, HGS 有显著性促进增生作用, 而对其他肿瘤细胞, 既可能是促进作用也可能是抑制作用, 目前尚缺乏系统研究. 就白血病而言, HGS 对不同白血病亚型的作用也不一致. Aref *et al*^[4]检测了 63 例髓系白血病患者和 15 名健康人血清游离肝细胞生长因子(sHGF)浓度, 结果发现不同类型初诊

白血病患者血清 sHGF 的浓度各不相同, 以 M5 为最高 (1 425 $\mu\text{g/L}$), M4 (1 295 $\mu\text{g/L}$) 次之, 且 sHGF 水平与外周血白细胞数量相关 ($r = 0.718$; $P = 0.000$). 从所观察的病例来看, sHGF 与疾病的预后密切相关. 死亡患者在初诊时的 sHGF 水平要显著高于缓解和复发者. sHGF 是白血病预后不良的指征之一. 在白血病初诊时测定 sHGF 浓度, 可能有助于白血病预后判断和选择适当治疗方案以期获得尽可能好的疗效. 对于骨髓增生异常综合征(MDS), HGF 也有重要的临床意义. 为此, 需要对 HGF 在白血病诊治中的潜在作用进行深入研究.

我们在进行 HGS 功能对比试验时发现, HGS 能够抑制 HL-60、K562 以及某些肺癌细胞系的增生. 但尤以对 HL-60 的抑制作用最强, 目前还未见到相关文献报道. 通过对不同剂量 HGS 作用的对比研究发现, 即便是很小剂量, HGS 对 HL-60 细胞也具有抑制作用, 说明 HGS 可能在急性早幼粒细胞白血病的治疗方面具有潜在的应用价值. 因大多数化疗药物对肝脏的毒副作用是限制白血病强化治疗的制约因素, 也是影响白血病的预后因素之一. 选择一种既能够杀伤或者抑制白血病细胞的生长, 同时又能够保护肝脏, 甚至是促进肝细胞修复的药物, 需进一步的大样本临床试验加以证实.

在观察到 HGS 抑制 HL-60 生长的同时, 利用流式细胞仪检测了 HL-60 细胞周期的变化情况, G0 期的延迟出现可能部分解释了 HGS 发挥作用的途径, 而 HL-60 细胞 DNA 损伤修复的抑制从更深层次阐明了 HGS 对 HL-60 细胞生长抑制的机制. 由于细胞周期与细胞增生和细胞分化密切相关, 我们正积极在前面实验的基础上进行 HGS 对 HL-60 细胞分化影响方面的研究, 以期

能进一步明确HGS在白血病诊治中的重要意义,阐明HGS的作用机制,提高白血病疗效.总之,HGS有可能是某些类型白血病新的理想治疗药物,如急性早幼粒细胞白血病,需进一步深入研究.

4 参考文献

1 罗运权,吴孟超.肝细胞生长因子.新消化病学杂志 1997;5:198-199

2 邱华,贺福初,杨晓明.大鼠肝再生过程中肝再生刺激物质及其mRNA的动态变化.中国应用生理学杂志 1996;12:236-238

4 Mabed M, Aref S, Aladle DA. Hepatocellular carcinoma of a short malignant transformation time in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 2003;82:318-320

5 Aref S, Mabed M, Sakrana M. Soluble hepatocyte growth factor (sHGF) and vascular endothelial growth factor (sVEGF) in adult acute myeloid leukemia: relationship to disease characteristics. *Hematology* 2002;7:273-279

6 Albitar M. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2001;106:170-176

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届全国胃肠动力学术研讨会征文通知

胃肠动力障碍性疾病是消化病学领域最常见的疾病之一,近年来该领域的研究进展十分迅速,为提高国内胃肠动力障碍性疾病临床和基础研究水平,吸取国外最新研究成果,加强对外交流与合作,中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于2005-11月上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学术会议,届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲,并进行广泛的学术交流.现将征文有关事项通知如下:

1 征文内容

(1)胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究;(2)胃肠功能性疾病的基础和临床研究;(3)胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究;(4)胃肠动力学检测方法的临床应用.

2 征文要求

(1)论文摘要不得超过800字,电脑打印(附软盘),格式为:题目,作者,单位,邮编,目的,方法,结果和结论,附联系电话及E-mail地址;(2)已在全国公开发表的论文不予受理.

3 投稿地址

武汉市解放大道1277号协和医院消化科 刘劲松收(邮编:430022),电话:027-85726381;2 武汉市丁字桥路100号湖北省医学会林勇 胡丽萍收(邮编:430064),电话:027-87893467.

4 截稿日期

2005-07-30

5 会议具体地点

另行通知.会议信息,论文投稿,表格下载请登陆网站:<http://hubeiyiyuan.go.nease.net>.

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组