

伏马菌素 B1 对人结肠腺癌细胞培养倍增时间的影响

唐建华, Victoria L. Stevens

摘要:目的 观测伏马菌素 B1 (FB1) 对培养细胞倍增时间的影响, 探讨 FB1 诱发肿瘤的可能机理。方法 利用荧光分光光度法测定原位溶解的人结肠腺癌培养细胞的 DNA, 以 DNA 总量的倍增作为培养细胞数目的倍增, 通过比较对照组和 FB1 处理组 DNA 倍增的时间, 判断出 FB1 对该细胞株细胞倍增时间的影响。结果 对照组结肠腺癌细胞的倍增时间在 39~42 小时, FB1 处理组细胞的倍增时间为 34~36 小时。结论 伏马菌素 B1 可明显缩短人结肠腺癌细胞株的倍增时间。

关键词: 伏马菌素 B1; 细胞培养; 倍增时间; 脱氧核糖核酸
中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2000)03-0170-02

伏马菌素 B1 (Fumonisin B1, FB1) 是霉变玉米中串珠镰刀菌的主要产物^[1]。已发现 FB1 是大鼠肝癌的始动剂和促进剂^[2], 并且与食管癌发病也密切相关^[1,3]。为了探讨 FB1 诱发肿瘤的可能机理, 本文观测了 FB1 对人结肠腺癌细胞株 (Caco-2) 细胞倍增时间的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

FB1、二苯并咪唑、DNA 标准品等试剂购自 Sigma, RPMI1640 培养基、小牛血清购自美国生物技术公司, 人结肠腺癌细胞株 (Caco-2) 购自美国细胞公司。全自动荧光分光光度计 (PE 产品)。

1.2 细胞培养

在 6 孔培养板的每一孔穴中接种 6×10^3 个 Caco-2 细胞, 一次接种 10 块培养板, 共两批。每块培养板选 3 个孔穴用含 5% 小牛血清及青霉素/链霉素 RPMI1640 培养液培养细胞, 作为对照组; 另 3 个孔穴用含 $20 \mu\text{g/ml}$ FB1 的上述培养基培养细胞, 作为处理组。对照组和处理组细胞均每天换半量的相应培养液, 实验共接种培养了两批细胞。另外, 按对照组培养方法, 用 75ml 培养瓶培养两批 Caco-2 细胞供细胞计数用。

1.3 荧光法测定细胞 DNA

表 1		Caco-2 细胞计数与 DNA 总量的对应关系 ($n=6$)							
细胞计数 (个)	3×10^3	5×10^3	1×10^4	2×10^4	5×10^4	1×10^5	2×10^5	5×10^5	1×10^6
DNA 总量 (μg)	0.041	0.083	0.162	0.312	0.766	1.453	2.986	5.960	9.888

从表 1 可以看出, 用荧光法测得的细胞 DNA

按 West 方法^[4]进行。主要过程为: 去除培养板孔穴内的培养液, 用平衡盐缓冲液轻轻洗涤 Caco-2 细胞三次, 每穴加入 1.8 ml 含 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 NaOH 溶液 ($\text{pH} = 12.3$), 溶解细胞 20min; 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 溶液调节 pH 值至 7.0, 然后加入 2ml Hoescht 33258 试剂 (200 ng/ml 二苯并咪唑, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $\text{pH} 7.0$), 充分混匀后进行荧光测定, 激发波长 350nm、检测波长 455nm。

同时, 用 DNA 标准品按上述方法作同样处理, 制得标准曲线, 通过标准曲线求得待测样品的 DNA 含量。

1.4 细胞倍增时间的计算

细胞繁殖代数 =

$$\frac{\log(\text{第一天以后测得的 DNA 总量}) - \log(\text{第一天测得的 DNA 总量})}{\log 2}$$

$$\text{细胞倍增时间 (小时)} = \frac{(\text{观测点的细胞培养天数} - 1) \times 24}{\text{细胞繁殖代数}}$$

2 结果

2.1 Caco-2 细胞数目与 DNA 含量之间的关系

准确计数经胰蛋白酶处理后的 Caco-2 细胞, 用激发荧光法测出不同数目 Caco-2 细胞的 DNA 总量。获得的 Caco-2 细胞数目与 DNA 总量之间的关系, 见表 1。

总量与细胞数目之间有很好的对应关系, 表明用测定 DNA 总量的方法完全可以取代细胞计数, 而测定 DNA 总量方法更快捷, 一次可做大批标本。

2.2 FB1 对 Caco-2 细胞倍增时间的影响

每天在同一时间取出一块培养板, 分别测出

收稿日期: 1999-07-25; 修回日期: 1999-09-06
作者单位: 1. 410078 长沙, 湖南医科大学生物化学教研室; 2. 美国 Emory 大学生物化学系

FB1 处理组和对照组（均为 3 个样本）Caco-2 细胞的 DNA 总量，十天测完一批细胞；共测定两批细胞，所得结果见表 2。

表 2 对照组和 FB1 处理组 DNA 总量的递增情况 (n = 6)										
细胞培养时间 (小时)	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
对照组 DNA (μg)	0.095	0.144	0.206	0.341	0.575	0.823	1.146	1.632	2.270	3.270
FB1 处理组 DNA (μg)	0.096	0.156	0.253	0.398	0.683	1.177	1.585	2.282	4.810	6.660

从表 2 中可以发现，第十天测得的对照组穴内 DNA 的总量约为第一天测得该组 DNA 总量的 34 倍，表明该组细胞自第一天测定后共繁殖了约 5 代，即细胞平均倍增时间约为 42 小时。同理，FB1 处理组穴内 DNA 总量在第十天约为第一天的 69 倍，说明该组细胞在此期间共繁殖了 6 代以上，细胞平均倍增时间约 36 小时。处理组比对照组的平均倍增时间缩短了约 6 小时。

3 讨论

国内外研究资料表明,伏马菌素 B1 与肝癌、食管癌等的发病密切相关^[1~3]。但 FB1 诱发细胞癌变的机理尚不明了。本文显示 FB1 能明显缩短人结肠腺癌细胞株的倍增时间,提示 FB1 促使消化道上皮细胞增生,也许是其诱发食管癌的机制之一。

已知 FB1 的化学结构与神经鞘氨醇极为相似^[5]。神经鞘氨醇是细胞内第二信使神经酰胺的主要构成成分，神经酰胺具有多种细胞生物学作用；它在不同的细胞种系中可引发不同的细胞反应，如细胞增殖、分化、细胞周期阻断、细胞凋亡等等^[6]。Schroeder 等曾报道 FB1 能阻断神经酰胺的生物合成并刺激成纤维细胞的 DNA 合成增强^[7]。我们也发现 FB1 能导致细胞膜内神经鞘脂类的含量减少^[8]。综合这些，我们推测 FB1 可能通过影响细胞内神经酰胺信使系统的信息传递，从而使某些细胞的繁殖、分化、凋亡等过程失去控制，最终导致细胞癌变。

Fumonisin B1 May Reduced the Doubling Time of Cultured Cells

TANG Jian-hua , Victoria L. STEVENS

Department of biochemistry , Hunan Medical University , Changsha 410078 , China

Abstract : Objective To determine whether fumonisin B1 (FB1) affects the doubling time of cell strain from cultured human colon adenocarcinoma (Caco-2), and to probe the possible mechanism that FB1 induced cancer. **Methods** The fluorescence spectrophotometry was used to determine the contents of DNA from *in situ* solubilized cultured cells ,the doubling of total DNA contents was used as the quantity doubling of cultured cells. After matched the total DNA contents of control groups with the treated groups by FB1 ,the effect of FB1 on the doubling time of Caco-2 cells was determined. **Results** The doubling time of control Caco-2 cells was about 39 to 42 hours. However ,for the treated groups by FB1 ,the doubling time of Caco-2 cells was 34 to 36 hours. **Conclusion** Fumonisin B1 obviously reduced the doubling time of the cells from cultured human colon adenocarcinoma.

Key words : Fumonisin B1 ; Tissue culture ; Doubling time ; DNA

参考文献 :

[1] 王海涛,魏慧娟,马吉林,等. 食管癌高发区玉米中伏马菌素 B1 的检测 [J]. 肿瘤防治研究, 1999, 26 (3): 168 - 170.

[2] WCA Gelderblom, et al. Mitoinhibitory effect of fumonisin B1 on rat hepatocytes in primary culture [J]. Carcinogenesis, 1995, 16 (3): 625 - 631.

[3] Fun S Chu, Gua Y Li. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the P. R. China in regions with high incidences of esophageal.[J]. Cancer Appl Environ Microbiol, 1994, 60 (3): 847 - 852.

[4] West DC, Sattar A, Kumar S. A simplified *in situ* solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells [J]. Anal Biochem, 1985, 147 : 289 - 295.

[5] Wang E, Ross PF, Wilson TM, et al. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins [J]. J Nutr, 1992, 122 : 1706 - 1716.

[6] 叶珉,王亚新. 神经酰胺与细胞凋亡 [J]. 生命的化学, 1998, 18 (4): 22 - 24.

[7] Schroeder JJ, Crane HM, Xia Jianhui, et al. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1 [J]. J. Biol. Chem, 1994, 269 (5): 3475 - 3481.

[8] Stevens VL, Tang Jianhua. Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the GPI anchored folate receptor [J]. J. Biol. Chem, 1997, 272 (29): 18020 - 18025.