

杂色曲霉素诱导胃黏膜上皮细胞 细胞周期 G₂ 期阻滞

邢欣 邢凌霄 李月红 王娟 姚志刚 王俊灵 刘亚玲 张祥宏*

(河北医科大学病理研究室, 石家庄市 050017)

摘要 探讨杂色曲霉素(sterigmatocystin, ST)对体外培养的永生化胃黏膜上皮细胞 GES-1 细胞周期的影响及细胞周期蛋白 D1、真核起始因子 eIF4E 和其结合蛋白 4E-BP1 在 ST 诱导细胞周期变化中的可能作用。采用细胞培养、噻唑蓝(MTT)比色法、流式细胞定量检测(FCM)、吉姆萨(Giemsa)染色、蛋白质免疫印迹(Western 印迹)以及反转录聚合酶联反应(RT-PCR)等方法, 研究不同浓度(100、500、1 000、2 000 $\mu\text{g/L}$) ST 处理 24 h 后, GES-1 细胞的增殖、细胞周期分布及 eIF4E、4E-BP1 及细胞周期蛋白 D1 表达的变化情况。MTT 法检测结果显示, ST 可明显抑制 GES-1 细胞的增殖, ST 100、500、1 000、2 000 $\mu\text{g/L}$ 处理组的增殖抑制率分别为 12.76%、16.35%、21.65% 和 32.06%。FCM 检测结果显示, 给予 500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ ST 处理 24 h 可剂量依赖性提高 G₂/M 期细胞比例。吉姆萨染色结果表明, 在 0~2 000 $\mu\text{g/L}$ 的剂量范围内随 ST 剂量增高, 细胞分裂指数逐渐降低, 提示 ST 可诱导胃黏膜上皮细胞周期发生 G₂ 期阻滞。Western 印迹分析结果显示, 在 0~2 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内, ST 可剂量依赖性地上调 eIF4E 和 4E-BP1 在蛋白质水平上的表达(eIF4E: $r=0.844$, $P<0.01$; 4E-BP1: $r=0.930$, $P<0.01$), 而降低 eIF4E 和 4E-BP1 的磷酸化水平(peIF4E: $r=-0.663$, $P<0.01$; p4E-BP1: $r=-0.656$, $P<0.01$); 同时使细胞周期蛋白 D1 的表达下降($r=-0.559$, $P<0.05$)。RT-PCR 检测在 mRNA 水平进一步证实了 ST 对 eIF4E 和 4E-BP1 表达的影响。研究结果表明, ST 可抑制体外培养永生化胃黏膜上皮细胞增殖, 诱导细胞发生 G₂ 期阻滞, 4E-BP1 表达升高, 而 eIF4E 和 4E-BP1 的磷酸化水平降低及细胞周期蛋白 D1 表达下降可能是 ST 抑制胃黏膜上皮细胞增殖, 诱导周期分布变化的重要机制。

关键词 杂色曲霉素; eIF4E; 4E-BP1; 细胞周期蛋白 D1

杂色曲霉素(sterigmatocystin, ST)是曲霉菌属真菌所产生的一种毒性代谢产物, 可与 DNA 形成加合物, 是一种具有致癌性真菌毒素^[1-3], 在我国胃癌高发区居民饮食及胃液中污染率很高^[4]。研究表明, ST 可诱发体外培养人胚胃黏膜细胞增殖活性增高、DNA 异倍体出现及抑癌基因 P53 过表达^[5,6], 长期灌胃 ST 可以引起小鼠腺胃黏膜的肠上皮化生和腺上皮不典型增生^[7]。ST 还可影响小鼠胚胎纤维母细胞细胞周期调控^[8]。但目前, 尚未见有关 ST 直接暴露对人胃黏膜上皮细胞细胞周期影响的研究报道。

eIF4E 是蛋白质合成的重要调节因子, 可与 4E-BP1 结合, 调节细胞蛋白质的合成, eIF4E 磷酸化水平增高可增强其促进蛋白质合成的作用。研究表明, eIF4E 与细胞周期调控有关^[9], 参与细胞恶性转化, 在多种恶性肿瘤中表达增高^[10,11]。

细胞周期调控异常是恶性肿瘤发生的重要因素,

为探讨 ST 对胃黏膜上皮细胞细胞周期调控的影响及可能机制, 以期进一步评价 ST 在人类胃癌发生中的可能作用, 本研究采用细胞培养、Western 印迹及 RT-PCR 等方法观察了不同浓度 ST 对体外培养胃黏膜上皮细胞 GES-1 细胞增殖、细胞周期分布、eIF4E 和 4E-BP1 及细胞周期蛋白 D1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

永生化人胃黏膜上皮细胞购自北京肿瘤研究所; ST 和二甲基亚砷(DMSO)购自 Sigma 公司; DMEM 培

收稿日期: 2008-07-07 接受日期: 2008-09-12

河北省自然科学基金(No.C2007000819)、教育部科学技术研究重点项目(No.205021)和河北省科技攻关研究重点项目(No.07276102 D)资助

* 通讯作者。Tel: 0311-86266229, Fax: 0311-86266229, E-mail: zhangxianghong2008@163.com

培养基购自 Gibco BRL 公司; 小鼠抗人 eIF4E 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 兔抗人 4E-BP1 单克隆抗体, 兔抗人磷酸化型 eIF4E 单克隆抗体, 兔抗人磷酸化型 4E-BP1 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司; 兔抗人细胞周期蛋白 D1 多克隆抗体购自 NeoMarkers 公司; DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; 异硫氰酸胍、AMV 反转酶、RNasin、Oligo(dT)₁₅、Taq DNA Polymerase 等 RT-PCR 试剂购自 Promega 公司。

1.2 试验分组

取对数生长期的永生化人胃黏膜上皮细胞 GES-1, 随机分组, 根据预实验结果, 实验组给予 DMSO 溶解、生理盐水稀释的 ST, 使其终浓度分别为 100、500、1 000、2 000 μg/L, 对照组给予等体积生理盐水, 溶剂对照组给予等体积生理盐水稀释的 DMSO 溶液, 继续培养 24 h 收集细胞进行相关指标检测。

1.3 MTT 检测 ST 对 GES-1 细胞增殖的影响

取对数生长期 GES-1 细胞, 按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞进入对数生长期后更换培养基, 加入 ST, 使其终浓度为 100、500、1 000、2 000 μg/L, 每孔终体积为 200 μl, 同时设空白对照孔、对照孔和溶剂对照孔, 每组 6 孔, 于实验结束前 4 h 分别加入 20 μl 5 g/L MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃去上清液, 加入 150 μl DMSO, 振荡器上震荡 10 min, 多功能微板分析仪检测 570 nm 的 A 值。按照下列公式计算细胞增殖抑制率; 增殖抑制率(%)=(对照组 A₅₇₀ 值 - 实验组 A₅₇₀ 值)/对照组 A₅₇₀ 值 × 100%。

1.4 FCM 检测 ST 对 GES-1 细胞周期的影响

分别收集各组细胞, PBS 洗涤, 70% 乙醇固定, 调整细胞浓度为 4×10^8 个/L。进行溴化乙啶(50 mg/L)染色, 采用 Epics-XL II 型流式细胞仪检测细胞周期分布情况, 以 Muticycle AV 软件进行细胞周期分析。

1.5 细胞有丝分裂指数计数

取对数生长期细胞, 以 1×10^5 个/ml 接种与放置有盖玻片的 6 孔板中, 制备细胞爬片。4% 多聚甲醛固定 10 min。用吉姆萨(Giemsa)染色, 光学显微镜下观察, 在双盲条件下计数有丝分裂期细胞的平均百分比, 即为细胞有丝分裂指数(MI)。

1.6 Western 印迹检测 ST 对 GES-1 细胞内 eIF4E/磷酸化型 eIF4E、4E-BP1/磷酸化型 4E-BP1 和细胞周期蛋白 D1 表达的影响

将收集的各组细胞分别用 PBS 洗涤, 加入预冷的细胞总蛋白裂解液, 提取细胞总蛋白, 考马斯亮蓝方

法进行蛋白质定量。15% SDS-PAGE, 电转移于 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶封闭过夜。一抗(1:1 000) 37 °C 温育 4 h, 二抗(1:4 000) 37 °C 温育 2 h, DAB 显色。Snygene 全自动凝胶成像分析系统分析 eIF4E、4E-BP1、磷酸化型 eIF4E、磷酸化型 4E-BP1 和细胞周期蛋白 D1 的表达, 以 β-肌动蛋白表达作为内参照, 以各蛋白质与 β-肌动蛋白的比值分别表示其相对表达量。

1.7 RT-PCR 检测 ST 对 GES-1 细胞内 eIF4E 和 4E-BP1 mRNA 的影响

采用异硫氰酸胍一步法提取 GES-1 细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 含量。取 15 μl RNA 在 50 μl 反应体系中 42 °C 1.5 h 逆转录 cDNA, 冰浴 10 min 后放置 -80 °C 冰箱备用。PCR 扩增; 反应体系为 50 μl。取 5 μl 反转录产物, 5 μl 10× 缓冲液, 3 μl 25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μl 10 mmol/L dNTP, 0.3 μl Taq DNA 聚合酶, 上、下游引物各 10 pmol, 加水至终体积为 50 μl。扩增参数为; 94 °C 变性 5 min, 循环周期依次为; 94 °C 50 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 次循环后 72 °C 延伸 10 min。eIF4E 引物序列: 有义: 5'-TAATC AGGAG GTTGC T-3', 反义: 5'-TTCTCATCTT CCCAC A-3', 产物长度 246 bp。4E-BP1 引物序列: 有义: 5'-GGGGA CTACA GCACG AC-3', 反义: 5'-CGCCC GCTTA TCTTC T-3', 产物长度 228 bp。GAPDH 引物序列: 有义: 5'-GGAAG GTGAA GGTCG GAGT-3', 反义: 5'-CCTGG AAGAT GGTGA TGGG-3', 产物长度 231 bp。GAPDH 作为内参照基因, 与目的基因同时进行 PCR 反应。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察并照相。采用凝胶分析软件(BIO1D)分析各条带平均灰度值, 各组以目的基因 eIF4E 和 4E-BP1 与内参照基因 GAPDH 比值分别表示 eIF4E 和 4E-BP1 mRNA 相对表达量。

1.8 统计学处理

各项数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析, 时效关系采用相关回归分析。

2 结果

2.1 ST 对 GES-1 细胞增殖影响的 MTT 检测结果

MTT 结果表明, 各 ST 处理组 GES-1 细胞增殖抑制率均明显高于溶剂对照组($P < 0.05$)。溶剂对照组无明显细胞增殖抑制作用, 其细胞增殖抑制率与对照组无明显差异($P > 0.05$)。在 0~2 000 μg/L 浓度范

围内, 随着 ST 浓度的升高细胞的增殖抑制率明显升高($r=-0.680$, $n=6$, $P<0.01$), 尤其以 1 000 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ ST 处理组最为明显($P<0.05$, 表 1)。

2.2 ST 对 GES-1 细胞周期影响的 FCM 检测结果

FCM 检测结果表明, 溶剂对照组与对照组细胞周期分布无明显差异。除 100 $\mu\text{g/L}$ ST 处理组外, 500 $\mu\text{g/L}$ 、1 000 $\mu\text{g/L}$ 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ ST 处理组细胞 G₀/G₁ 期和 S 期细胞所占比例显著下降, 而 G₂/M 期细胞比例则明显增加($P<0.05$), 并且在 0~2 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内, G₂/M 期细胞比例与 ST 的处理浓度呈正相关

Table 1 Effect of sterigmatocystin (ST) on the proliferation

Groups	A ₅₇₀	Inhibition ratio (%)
Control	2.7384±0.1417	0.00
Solvent control	2.6488±0.6775	3.27
ST 100 $\mu\text{g/L}$	2.3889±0.1726	12.76
ST 500 $\mu\text{g/L}$	2.2908±0.1875	16.35
ST 1 000 $\mu\text{g/L}$	2.1456±0.1312*	21.65*
	1.8604±0.2436*	

Compared with solvent control group, * $P<0.05$.

Table 2 Effect of ST on cell cycle of GES-1 cells *in vivo* detected by FCM ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	Cell cycle distribution		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	43.53±3.65	44.80±4.36	11.65±2.38
Solvent control	43.53±2.64	45.07±2.06	10.06±2.90
ST 100 $\mu\text{g/L}$	41.10±5.63	45.83±0.74	9.75±1.55
ST 500 $\mu\text{g/L}$	36.80±3.90*	43.03±2.66	20.17±1.42*
ST 1000 $\mu\text{g/L}$	35.10±1.83*	38.30±1.91*	26.60±0.53*
ST 2000 $\mu\text{g/L}$	28.77±1.47*	38.77±4.65*	31.77±4.35*

Compared with solvent control group, * $P<0.05$.

关系($r=0.825$, $n=3$, $P<0.01$)。提示较高浓度 ST 处理可显著影响体外培养人胃黏膜 GES-1 细胞细胞周期分布, 引起细胞 G₂/M 期比例增高(表 2, 图 1)。

2.3 ST 对胃黏膜上皮细胞有丝分裂指数的影响

吉姆萨染色分析结果显示, 溶剂对照组与对照组相比, GES-1 细胞 MI 没有明显差别。与溶剂对照组相比, 100 $\mu\text{g/L}$ ST 处理 24 h, 对 GES-1 细胞 MI 没有明显影响, 而 500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ ST 处理组 GES-1 细胞 MI 则随着 ST 处理浓度的增高明显降低($r=-0.912$, $n=10$, $P<0.01$), 见表 3。

2.4 ST 对胃黏膜上皮细胞增殖相关蛋白表达的影响

Western 印迹检测结果显示, 以预染蛋白质标准为参照确定细胞周期蛋白 D1 (36 kDa)、eIF4E/磷酸化型 eIF4E (25 kDa) 和 4E-BP1/磷酸化型 4E-BP1 (15 kDa) 的位置, 各组均在相应蛋白质的位置出现了棕色的阳性条带。结合扫描条带密度定量结果显示(目的条带/ β -肌动蛋白), 各目的蛋白在溶剂对照组和对照组细胞中的表达没有明显差异。各 ST 处理组 GES-1 细胞 eIF4E 和 4E-BP1 表达量均明显高于对照及溶剂对照组($P<0.05$), 在 0~2 000 $\mu\text{g/L}$ ST 浓度范围内, 随 ST 浓度增高, GES-1 细胞 eIF4E 和 4E-BP1

Table 3 Effect of ST on mitotic index (MI) of GES-1 cells stained by Giemsa ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	MI (%)
Control	10.67±2.26
Solvent control	9.95±0.67
ST 100 $\mu\text{g/L}$	8.23±1.32
ST 500 $\mu\text{g/L}$	6.84±0.79*
ST 1000 $\mu\text{g/L}$	4.94±0.77*
ST 2000 $\mu\text{g/L}$	3.61±0.74*

Compared with solvent control group, * $P<0.05$.

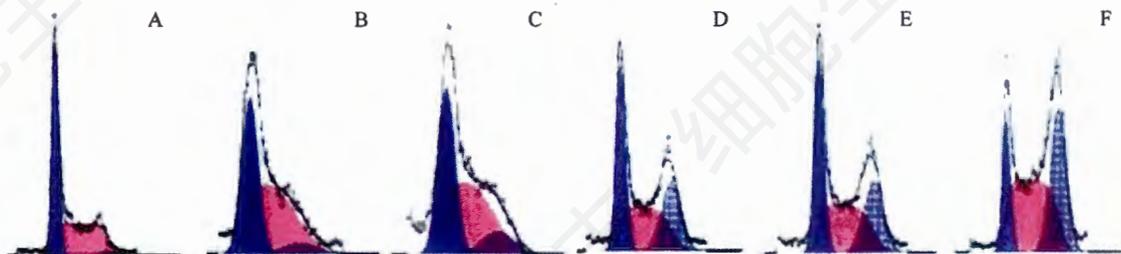


Fig.1 The histograms of cell cycle distribution phases by FCM, which showed the increase of G₂/M fraction treated by ST

A: control group, G₀/G₁=51.3%, G₂/M=2.17%; B: solvent Control group, G₀/G₁=44.5%, G₂/M=6.15%; C: ST 100 $\mu\text{g/L}$ group, G₀/G₁=42.5%, G₂/M=11.1%; D: ST 500 $\mu\text{g/L}$ group, G₀/G₁=36.7%, G₂/M=27.0%; E: ST 1 000 $\mu\text{g/L}$ group, G₀/G₁=35.5%, G₂/M=26.0%; F: ST 1 000 $\mu\text{g/L}$ group, G₀/G₁=16.6%, G₂/M=36.0%.

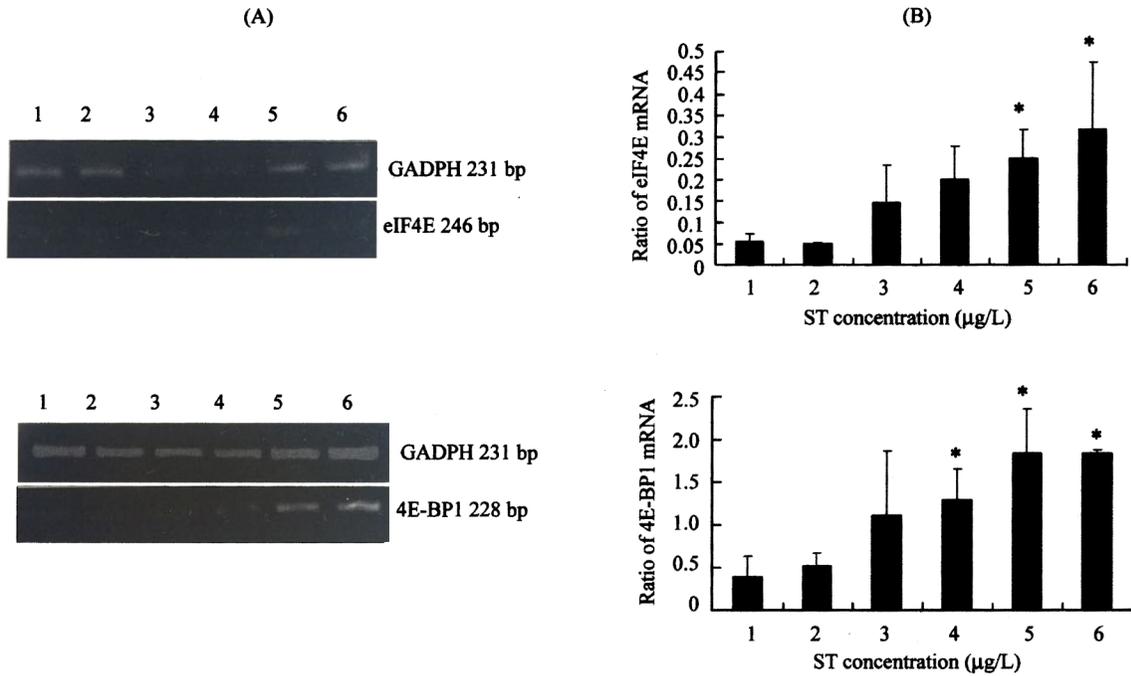


Fig.3 RT-PCR analysis of eIF4E and 4E-BP1 mRNA expression on GES-1 cells

A: agarose gel electrophoresis of PCR-amplified cDNA fragments of GADPH, eIF4E and 4E-BP1; B: the histograms of semiquantitative RT-PCR analysis of eIF4E and 4E-BP1. 1: control group; 2: solvent control group; 3: ST 100 μg/L group; 4: ST 500 μg/L group; 5: ST 1 000 μg/L group; 6: ST 2 000 μg/L group. Compared with solvent control group, * $P<0.05$.

2.5 ST对GES-1细胞eIF4E和4E-BP1 mRNA的影响

RT-PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳及半定量分析表明,溶剂对照组和对照组细胞内各目的基因的mRNA的表达没有明显差别。给予ST作用24 h后,在0~2 000 μg/L ST浓度范围内,与溶剂对照组相比,GES-1细胞eIF4E和4E-BP1 mRNA的表达量逐渐升高,与ST浓度呈显著正相关关系(eIF4E: $r=0.693$, $n=5$, $P<0.01$; 4E-BP1: $r=0.531$, $n=5$, $P<0.05$; 表4, 图3),说明ST处理可以上调GES-1细胞eIF4E和4E-BP1在mRNA水平上的表达。

3 讨论

肿瘤是细胞周期紊乱、细胞失控性生长所致的一类疾病,细胞周期异常在肿瘤的发生过程中发挥重要作用。研究表明,诱导细胞周期的变化是很多致癌剂致癌作用的重要机制^[12]。杂色曲霉素是我国胃癌高发区居民饮食中最常见的一种具有致癌性的真菌毒素,流行病学和体外实验初步研究结果提示ST可能与我国胃癌高发区居民胃癌的发生有关,但目前仍缺乏ST对人胃上皮细胞作用的直接证据。本研究采用细胞培养、MTT、FCM等多种方法探讨了不同

Table 4 The effect of ST on eIF4E and 4E-BP1 mRNA of GES-1 cells detected by RT-PCR ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	eIF4E	4E-BP1
Control	0.054±0.02	0.390±0.25
Solvent control	0.049±0.00	0.518±0.16
ST 100 μg/L	0.146±0.09	1.113±0.75
ST 500 μg/L	0.200±0.08	1.294±0.36*
ST 1 000 μg/L	0.248±0.07*	1.841±0.51*
ST 2 000 μg/L	0.316±0.16*	1.841±0.04*

Compared with solvent control group, * $P<0.05$.

浓度ST对体外培养的人永生化胃黏膜上皮细胞增殖和细胞周期分布的影响,发现不同浓度ST对体外培养胃黏膜上皮细胞GES-1的增殖活性有抑制作用,ST处理可明显影响GES-1细胞的细胞周期分布,使GES-1细胞的G₀/G₁期和S期细胞比例明显下降,而使G₂/M期细胞比例显著增加。进一步吉姆萨染色结果证明,在0~2 000 μg/L的剂量范围内,随ST浓度增高,细胞分裂指数(MI)逐渐降低。综合FCM和吉姆萨染色结果可见ST可诱导胃黏膜上皮细胞周期G₂期阻滞。ST诱导胃黏膜上皮细胞G₂期阻滞作用可能是其致癌作用的机制之一。

细胞周期蛋白D1是细胞周期的正性调控因子,

蛋白的表达量逐渐升高(eIF4E: $r=0.844$, $n=5$, $P<0.01$; 4E-BP1: $r=0.930$, $n=5$, $P<0.01$); 而磷酸化的 eIF4E 和 4E-BP1 的量逐渐降低(磷酸化型 eIF4E: $r=-0.663$, $n=5$,

$P<0.01$; 磷酸化型 4E-BP1: $r=-0.656$, $n=5$, $P<0.01$); 同时细胞周期蛋白 D1 的表达量也逐渐降低, 剂量依赖关系显著($r=-0.559$, $n=5$, $P<0.05$, 图 2)。

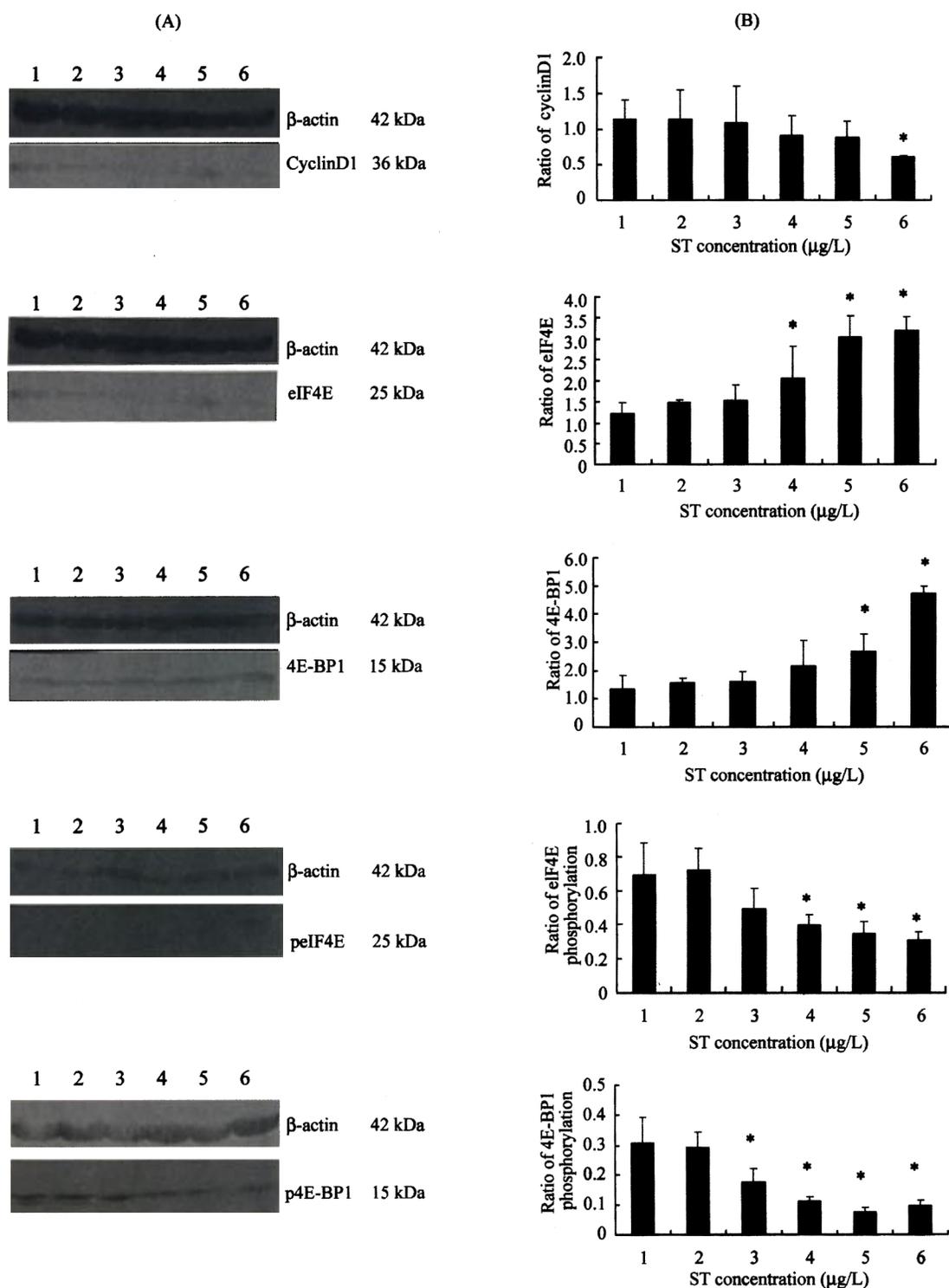


Fig.2 Western blot analysis of gene protein expression on GES-1 cells

A: the Western blot representative of triplicate experiments; B: the histogram of relative protein level estimated from the corresponding band densities and normalized to those of β -actin. 1: control group; 2: solvent control group; 3: ST 100 $\mu\text{g/L}$ group; 4: ST 500 $\mu\text{g/L}$ group; 5: ST 1 000 $\mu\text{g/L}$ group; 6: ST 2 000 $\mu\text{g/L}$ group. Compared with solvent control group, * $P<0.05$.

在细胞增殖中起重要的作用,细胞内、外刺激均可通过影响细胞周期蛋白 D1 表达进而影响细胞周期,对细胞增殖产生影响^[13,14]。eIF4E 是真核细胞蛋白质合成的启动因子,正常情况下,处于低水平表达,而在人类肿瘤组织和肿瘤细胞株中 eIF4E 的表达水平普遍升高^[10,11]。细胞恶性转化过程中 eIF4E 高表达会促使 c-Myc、细胞周期蛋白 D1 等与恶性肿瘤发生相关的分子过量表达,进而导致肿瘤恶性表性的产生,并协同促进转移进程^[15,16]。eIF4E 的磷酸化水平增高可以增强其促进蛋白质合成的作用^[17]。4E-BP1 是 eIF4E 的结合蛋白,可通过自身的磷酸化水平来调节其与 eIF4E 的结合,影响后者的功能,去磷酸化的 4E-BP1 可与 eIF4E 结合,从而使后者丧失活性^[18];而 4E-BP1 磷酸化水平增高,使其与 eIF4E 彻底分离,而恢复 eIF4E 的活性,这在细胞有丝分裂过程中起决定性作用^[19]。体内外多种刺激因素可通过影响 eIF4E 和 4E-BP1 的表达及其磷酸化水平,影响二者的相互作用,进而引起 c-Myc、细胞周期蛋白 D1 等的表达改变,从而对细胞的增殖过程进行调控^[20,21]。

为探讨 ST 引起细胞周期分布紊乱的可能机制,本研究观察了不同浓度 ST 处理对细胞周期蛋白 D1、eIF4E 及其结合因子 4E-BP1 的影响,研究结果表明,与诱导细胞周期 G₂ 期阻滞相同浓度 ST 处理 GES-1 细胞,可使其细胞周期蛋白 D1 的表达量明显下调,剂量依赖性地上调 GES-1 细胞 eIF4E 和 4E-BP1 在蛋白质及 mRNA 水平上的表达,同时降低 eIF4E 和 4E-BP1 的磷酸化水平。提示细胞周期蛋白 D1 表达量下降, eIF4E 和 4E-BP1 表达量增高、而磷酸化水平下降,可能与 ST 诱导 GES-1 细胞的 G₂ 期阻滞以及增殖抑制有关。

参考文献(References)

- [1] Gopalakrishnan S, Liu X, Patel DJ. Solution structure of the covalent sterigmatocystin-DNA adduct, *Biochemistry*, 1992, 31(44):10790-10801
- [2] Ma F, Misumi J, Zhao W, et al. Long-term treatment with sterigmatocystin, a fungus toxin, enhances the development of intestinal metaplasia of gastric mucosa in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils, *Scand J Gastroenterol*, 2003, 38(4): 360-369
- [3] Misumi J. The mechanisms of gastric cancer development produced by the combination of *Helicobacter pylori* with sterigmatocystin, a mycotoxin, *Nippon Rinsho*, 2004, 62(7): 1377-1386
- [4] Zhang XH, Xie TX, Li SS, et al. Contamination of fungi and mycotoxins in foodstuffs in high risk area of esophageal cancer, *Biomed Environ Sci*, 1998, 11(2):140-146
- [5] 谢同欣,张祥宏,严霞,等.杂色曲霉毒素体外对人胃细胞 P53 蛋白表达和 DNA 含量的影响, *科学通报*, 1995, 40(14): 1329-1331
- [6] 谢同欣,张祥宏,严霞,等.杂色曲霉毒素对人胃粘膜的致癌作用, *肿瘤防治研究*, 1996, 23(6): 341-343
- [7] 谢同欣,王凤荣,谭少波,等.杂色曲霉毒素诱发小鼠肺腺癌和腺胃不典型增生, *中华肿瘤杂志*, 1990, 12(1): 21-23
- [8] Xie TX, Misumi J, Aoki K, et al. Absence of p53-mediated G₁ arrest with induction of MDM2 in sterigmatocystin-treated cells, *Int J Oncol*, 2000, 17(4):737-742
- [9] Shenberger JS, Adams MH, Zimmer SG. Oxidant-induced hypertrophy of A549 cells is accompanied by alterations in eukaryotic translation initiation factor 4E and 4E-binding protein-1, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(2):250-256
- [10] Avdulov S, Li S, Michalek V, et al. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells, *Cancer Cell*, 2004, 5(6):553-563
- [11] Cui J, Han SY, Wang C, et al. c-Jun NH₂-terminal kinase 2 α promotes the tumorigenicity of human glioblastoma cells, *Cancer Res*, 2006, 66(20): 10024-10031
- [12] Yih LH, Lee TC. Induction of C-anaphase and diplochromosome through dysregulation of spindle assembly checkpoint by sodium arsenite in human fibroblasts, *Cancer Res*, 2003, 63(20):6680-6688
- [13] DuMond JW Jr, Singh KP. Gene expression changes and induction of cell proliferation by chronic exposure to arsenic of mouse testicular Leydig cells, *J Toxicol Environ Health A*, 2007, 70(13):1150-1154
- [14] Vikhanskaya F, Toh WH, Dulloo I, et al. p73 supports cellular growth through c-Jun-dependent AP-1 transactivation, *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 698-705
- [15] Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5, *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11851-11858
- [16] Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuglio D, et al. Antiangiogenic potential of the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus, *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5549-5554
- [17] Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL, et al. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities, *Cancer Res*, 2004, 64(23): 8639-8642
- [18] Gingras AC, Gygi SP, Raught B, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism, *Genes Dev*, 1999, 13(11): 1422-1437
- [19] Heesom KJ, Gampel A, Mellor H, et al. Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF4E binding protein-1 (4E-BP1), *Curr Biol*, 2001, 11(17):1374-1379
- [20] Neeli I, Yellaturu CR, Rao GN. Arachidonic acid activation of translation initiation signaling in vascular smooth muscle cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309(4):755-761
- [21] Lynch M, Fitzgerald C, Johnston KA, et al. Activated eIF4E-binding protein slows G₁ progression and blocks transformation by c-myc without inhibiting cell growth, *J Biol Chem*, 2004, 279(5):3327-3339

Sterigmatocystin Induced G₂ Arrest of Gastric Epithelial Cells *in Vitro*

Xin Xing, Ling-Xiao Xing, Yue-Hong Li, Juan Wang, Zhi-Gang Yao, Jun-Ling Wang,
Ya-Ling Liu, Xiang-Hong Zhang*

(Laboratory of Experimental Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To explore the effects of sterigmatocystin (ST) on the cell cycle distribution and the expression of cyclinD1, eIF4E and 4E-BP1 of human gastric cell line (GES-1) *in vitro*. GES-1 cells were treated with ST at different concentrations (100, 500, 1 000 and 2 000 µg/L) for 24 h. The effects of ST on the cell proliferation of GES-1 cells were determined with MTT, flow cytometric (FCM) DNA analysis and Giemsa staining, while that on the expression of proliferation related gene——eIF4E, 4E-BP1 and cyclinD1 at protein level and mRNA level were studied with Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. MTT results showed that ST treatment could significantly inhibit the proliferation of the GES-1 cells. The inhibition rate of ST 100, 500, 1 000 and 2 000 µg/L group was 12.76%, 16.35%, 21.65% and 32.06% respectively. FCM cell cycle analysis revealed that the G₂/M fraction was significantly increased in 500, 1 000 and 2 000 µg/L ST treatment group 24 h after treatment. The results of Giemsa showed that within the concentration range from 0 to 2000 µg/L, ST could decrease the mitosis index (MI) of GES-1 dose-dependently. The FCM and Giemsa results suggest that ST could induce cell cycle G₂ arrest on human gastric cells (GES-1) *in vitro*. Western blot analysis showed that ST could significantly increase the expression of eIF4E and 4E-BP1 within the concentration range from 0 to 2 000 µg/L, and there is a significant dose-effect correlation between ST concentration and the intensity of eIF4E and 4E-BP1 expression at protein level (eIF4E: $r=0.844$, $P<0.01$; 4E-BP1: $r=0.930$, $P<0.01$), while the phosphorylation of eIF4E and 4E-BP1 were significantly decreased by ST in a dose-dependent way (peIF4E: $r=-0.663$, $P<0.01$; p4E-BP1: $r=-0.656$, $P<0.01$). At the same time, the expression of cyclinD1 was down-regulated ($r=-0.559$, $P<0.05$). The results of RT-PCR confirmed that ST could increase the expression of eIF4E and 4E-BP1 at mRNA level of GES-1 cells *in vitro*. Thus, the results in this study suggested that ST could inhibit the proliferation and induce G₂ arrest of human gastric GES-1 cells *in vitro*. The increase of eIF4E and 4E-BP1 and decrease of peIF4E, p4E-BP1 and cyclinD1 may be the putative mechanism.

Key words sterigmatocystin; eIF4E; 4E-BP1; cyclinD1

Received: July 7, 2008 Accepted: September 12, 2008

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2007000819), the Key Sci-technology Project of Ministry of Education (No.205021) and Key Technologies Research and Development Program of Hebei Province (No.07276102 D)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86266229, Fax: 86-311-86266229, E-mail: zhangxianghong2008@163.com