

复方中药白龙对 G₁ 期人胃癌细胞中抑癌基因的影响 及与 PKA 信号通路的相关性*

刘 军² 柳惠图² 梁云燕¹ 王代树¹

内容提要 目的:探讨复方中药白龙(简称白龙)对人胃癌 BGC82-3 G₁ 期细胞周期蛋白激酶抑制因子 (CKI) p16^{INK4a}、p21 以及 Rb、c-myc 等基因转录的影响和 cAMP-PKA 信号通路的调节关系。方法:通过实验室常规分子生物学手段(细胞同步化、分子杂交——Northern 杂交、Western 杂交等)检测相关基因的表达变化。结果:白龙对 G₁ 期细胞 p16^{INK4a} 表达有强烈促进作用, mRNA 和蛋白水平均显著升高;处理细胞的同时加入 PKA 抑制剂阻断该信号通路后,白龙作用丧失, p16^{INK4a} mRNA 和蛋白水平明显下降;白龙还可以促进抑癌基因 Rb、p21 的 mRNA 表达和抑制癌基因 c-myc mRNA 的表达;同样在白龙作用的同时阻断该信号通路,则白龙的上述作用随之丧失。结论:白龙可以通过影响 BGC82-3 G₁ 期细胞中众多抑癌基因(包括 p16^{INK4a}、p21、Rb)和癌基因(包括 c-myc)的转录发挥其抑癌生理效应,而这种变化发生的机理是与 cAMP-PKA 信号通路的调节机制密切相关的。

关键词 复方中药白龙 G₁ 期 BGC82-3 CKI p16^{INK4a} cAMP-PKA 信号通路 PKA 抑制剂

Effect of Compound Chinese Drug Bailong on the Expression of Tumor Suppressor Genes and Relationship with Prekallikrein Activator Signal Pathway in Human Gastric Carcinoma BGC82-3 Cell Line Liu Jun, Liu Huitu, Liang Yunyan, et al. *Department of Cell Biology, Medical University, Beijing Institute for Cancer Research (100034)*

Objective: To study the effect of compound Chinese drug Bailong on the transcription of Cyclin Dependent Kinase Inhibitor (CKI) p16^{INK4a}, p21 and Rb, c-myc genes, and the relationship between gene expression and cAMP-PKA pathway. **Methods:** Using the traditional molecular biology methods (cell synchronization, molecular hybridization——Western blotting, Northern blotting, etc.) examine the gene expression. **Results:** Bailong promoted the expression (both mRNA and protein) of p16^{INK4a} obviously in G₁ phase cells. When prekallikrein (PKA) inhibitor was added in the cells which were treated by Bailong, the mRNA and protein level of p16^{INK4a} decreased. It was shown that the inhibited proliferation of BGC82-3 cell by Bailong may come from the enhanced p16^{INK4a} gene expression in G₁ phase. Being same as p16^{INK4a}, tumor suppressor genes Rb, p21 and oncogene c-myc expression were all affected by Bailong. When PKA inhibitor was added, the results were reversed. **Conclusion:** Bailong can affect many anticancer genes (including p16^{INK4a}, p21 and Rb genes) and oncogenes (including c-myc) transcription by regulating cAMP-PKA pathway.

Key words Bailong, G₁ phase, BGC82-3, CKI, p16^{INK4a}, cAMP-PKA pathway, PKA inhibitor

我室已有的工作⁽¹⁾证明了复方中药白龙(简称白龙)对人胃癌 MGC80-3 细胞的作用和 cAMP-PKA、DG-PKC 两套信号系统正负调节作用具有因果关系,且以 G₁ 期最为显著。cAMP-PKA 信号通路作为较早被人们阐明机制的通路之一,被认为与细胞增殖和分

化均密切相关^(2,3)。最近几年的研究表明,真核细胞周期的运转由周期引擎分子(Cyclins-CDKs, 细胞周期蛋白-细胞周期蛋白激酶)引发⁽⁴⁾,如 CyclinD-CDK4/6 主要调控靶点是 G₁ 期的 R 点(Restriction Point)⁽⁵⁾,因而对这对引擎分子的调控就成为细胞能否顺利通过 G₁ 期的关键。p16^{INK4a}作为一种抑癌基因,它是细胞中固有的专一抑制 CyclinD-CDK4/6 复合物活性的 CKI。目前对周期运转调控的周期蛋白激酶抑制因子 p16^{INK4a}、p21 和 p15^{INK4b}等的研究已成为研究热点之一,特别是 p16^{INK4a}已成为当前肿瘤基因治疗的希望。

* 国家自然科学基金资助(No. 39480026, 39780014)和北京市自然科学基金资助(No. 7961001)

1. 北京医科大学临床肿瘤学院北京肿瘤防治研究所(北京 100034); 2. 北京师范大学生命科学院细胞所

因此, 本工作进一步研究癌细胞在白龙诱导下 G_1 期 cAMP-PKA 信号系统调节变化和 $p16^{INK4a}$ 等基因表达变化之间的关系, 进而了解信号系统与周期运转调节的相关基因表达的关系及其作用机理是非常必要的。

材料和方法

1 药品 白龙由白英、当归和龙葵等中药组成, 由天津中药制药厂生产, 生产批号: 930315。白龙应用液的配制: 将白龙粉剂制成 30mg/ml 的原液, 并高压灭菌促溶, 贮存。无菌条件下按以下比例制成 3mg/ml 的溶液: 双蒸水 32.5ml; $2 \times$ DMEM 培养液 42.5ml; 小牛血清 15ml; 白龙应用液 10ml。

2 细胞培养 人胃癌 BGC82-3 细胞用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基, 在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。

3 实验分组 a. 对照组 (BGC82-3 细胞); b. 3mg/ml 白龙处理组; c. 3mg/ml 白龙加 $80\mu\text{g/ml}$ PKA 抑制剂 (Sigma 公司) 处理组。

4 细胞同步化 用 N_2O -TdR 阻断法⁽⁶⁾: BGC82-3 细胞接种 24h, 细胞进入对数生长期后, 更换含 2.5mM TdR 阻断剂培养液于 37°C 继续培养 16h, 换入新鲜培养液释放细胞 5h, 装入笑气罐充入 400ml CO_2 气体, 再通入 N_2O 至压力为 $5.5\text{kg}/\text{cm}^2$, 37°C 恒温培养 18h。从笑气罐取出培养瓶, 轻轻振荡, 使 M 期细胞脱落悬浮, 将其转入另一培养瓶继续培养 2~3h 使其进入 G_1 期, 待细胞贴壁完全后, 加药处理 3h。

5 免疫印迹技术 (Western blot)

5.1 蛋白提取 贴壁细胞用冷 PBS 洗 2 次后, 转移至 eppendorf 离心管中, 加入适量细胞裂解液 (10mM Tris, HCl pH6.8, 2.5% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 1mM PMSF, 10% 甘油) 充分裂解 10min, 沸水浴 10min, 12 000r/min 离心 10min, 取上清作为电泳样品。Bradford 法⁽⁷⁾测定蛋白浓度。

5.2 电泳及免疫显色 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移到硝酸纤维素膜上, 用血清和 BSA 封闭, 与一抗溶液和辣根过氧化物酶标记的二抗溶液室温下分别振荡孵育 1.5~2h 后, 按照 ECL 免疫检测试剂盒 (Amersham) 说明进行显色、曝光。

6 细胞总 RNA 的制备及分子杂交

6.1 细胞总 RNA 的提取 采用 TRIPureTM Reagent (Boehringer Mannheim) 提取法 (方法见产品说明书)。

6.2 Northern 印迹转移 取 RNA 样品 65°C 变性 15min, 1% 琼脂糖凝胶进行电泳 2h。真空转移至硝

酸纤维素膜上, 室温干燥, 80°C 烤膜 2h。

6.3 分子杂交 用随机引物标记试剂盒 (Promega) 标记探针, 按试剂盒说明书进行。将标记后的探针与点有 RNA 样品的硝酸纤维素膜在 42°C 下孵育 22~24h, 分别用 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 和 $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 洗膜。室温晾干, -70°C 曝光, 常规显影、定影。

结 果

1 白龙和 PKA 抑制剂对 CKI ($p16^{INK4a}$ 、p21) 表达的影响

1.1 $p16^{INK4a}$ 从 Northern 杂交结果 (图 1-A) 可以看出, 在 G_1 期细胞白龙组和白龙加 PKA 抑制组 $p16^{INK4a}$ 基因表达变化显著, 灰度扫描定量显示, 白龙组 $p16^{INK4a}$ 的 mRNA 水平升高了 1 倍, 白龙处理的同时加入 PKA 抑制剂, $p16^{INK4a}$ mRNA 水平迅速下降, 仅为白龙组的 10%。Western Biotting 结果显示在 G_1 期 $p16^{INK4a}$ 水平变化与 mRNA 保持一致 (图 1-B)。

1.2 p21 G_1 期细胞白龙处理组 p21 mRNA 水平升高 2 倍多, 白龙处理的同时加入 PKA 抑制剂其 mRNA 表达返回对照水平, 且略低于对照组 (图 2)。

2 白龙和 PKA 抑制剂对癌基因 c-myc 和抑癌基因 Rb 表达的影响

2.1 c-myc 癌基因 c-myc 在 G_1 期时对照组的表达是白龙组的 2.4 倍 (图 3), 白龙对 G_1 期 c-myc 基因的表达具有显著的抑制作用, 而白龙加 PKA 抑制剂组

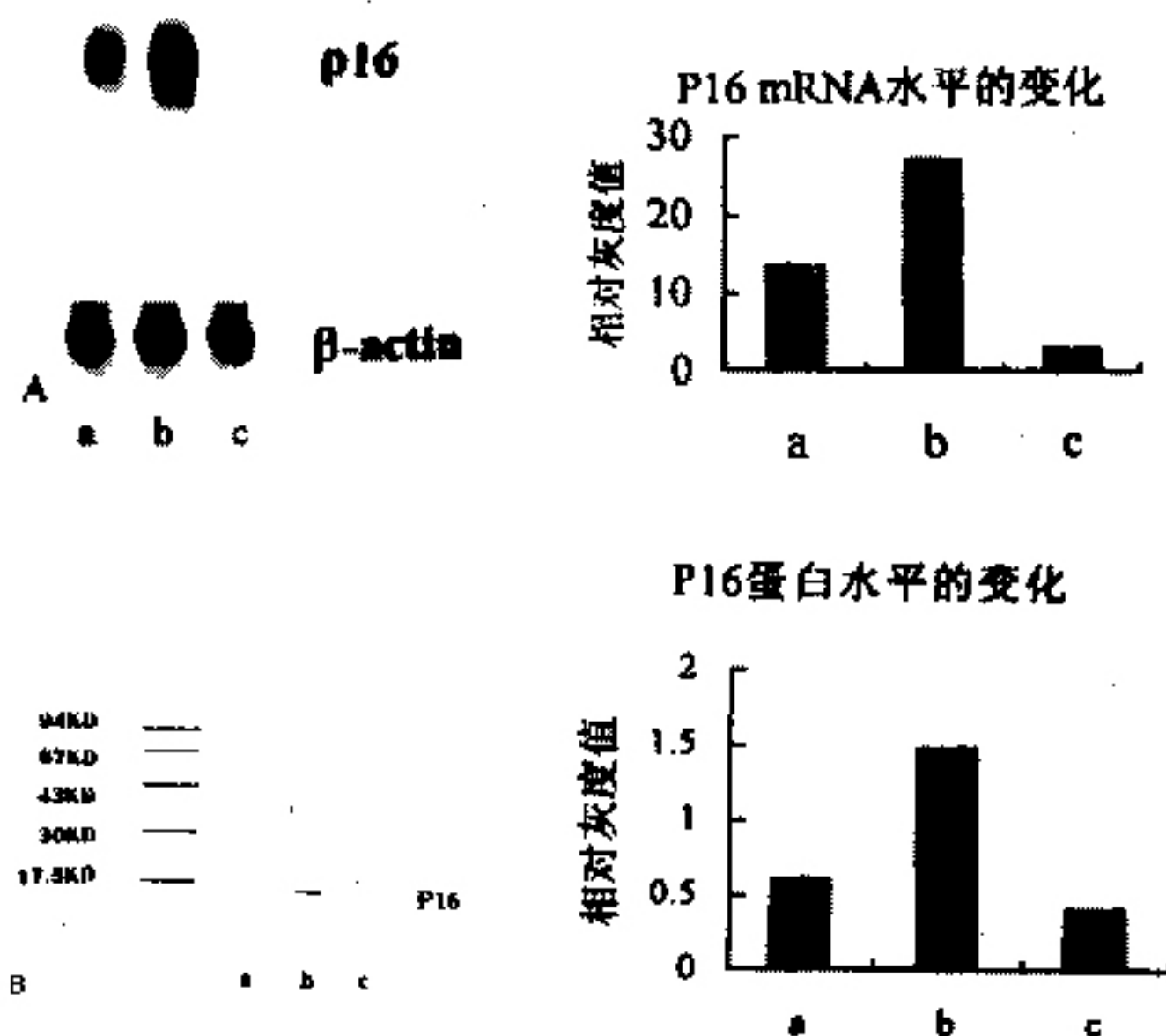


图 1 人胃癌 BGC82-3 G_1 期细胞中 $p16^{INK4a}$ 的表达变化

A. Northern 杂交结果 B. Western 杂交结果

a. 对照组 b. 白龙 (3.0mg/ml) 组 c. 白龙 (3.0mg/ml) 加 PKA 抑制剂 ($80\mu\text{g/ml}$) 组 (下图同)

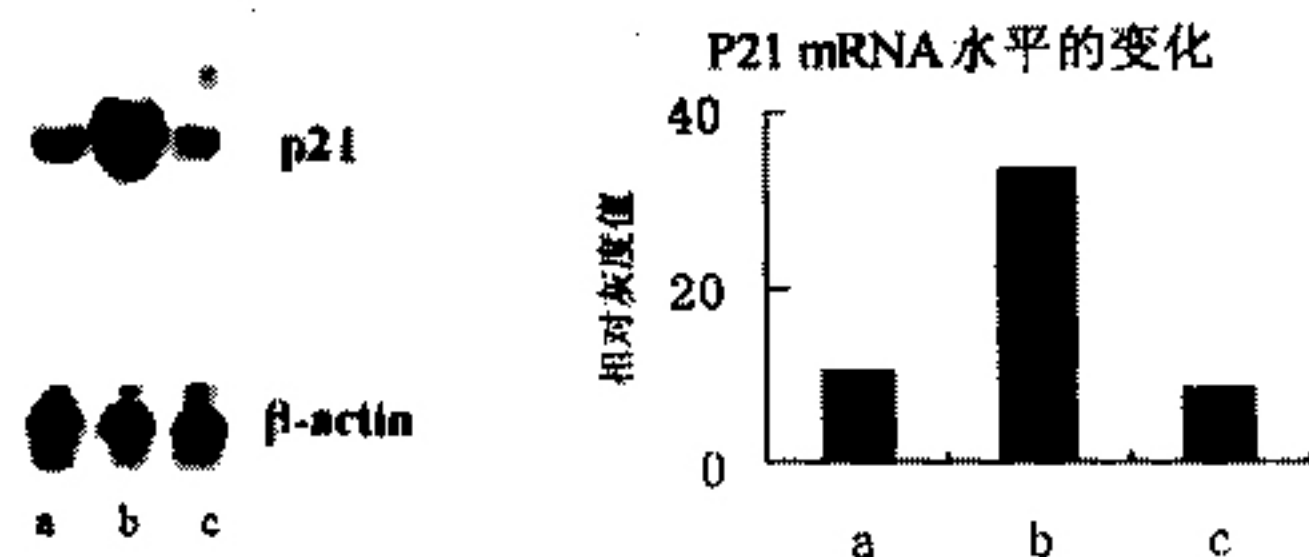


图 2 Northern 杂交显示 G_1 期细胞中抑癌基因 p21 mRNA 的表达变化

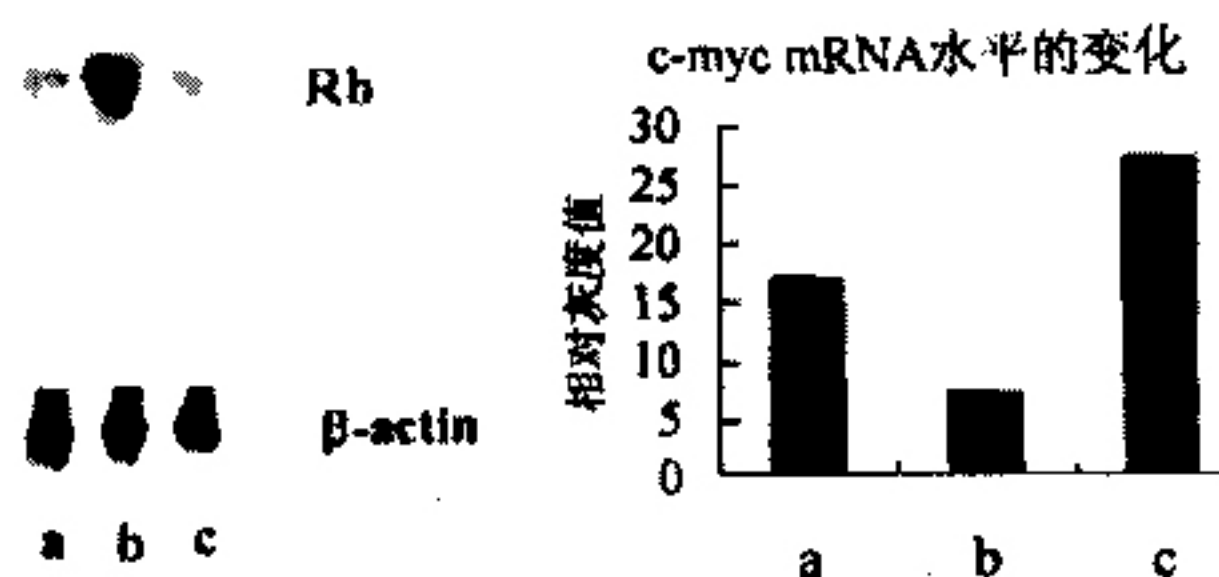


图 3 Northern 杂交显示 G_1 期细胞中癌基因 c-myc mRNA 的表达变化

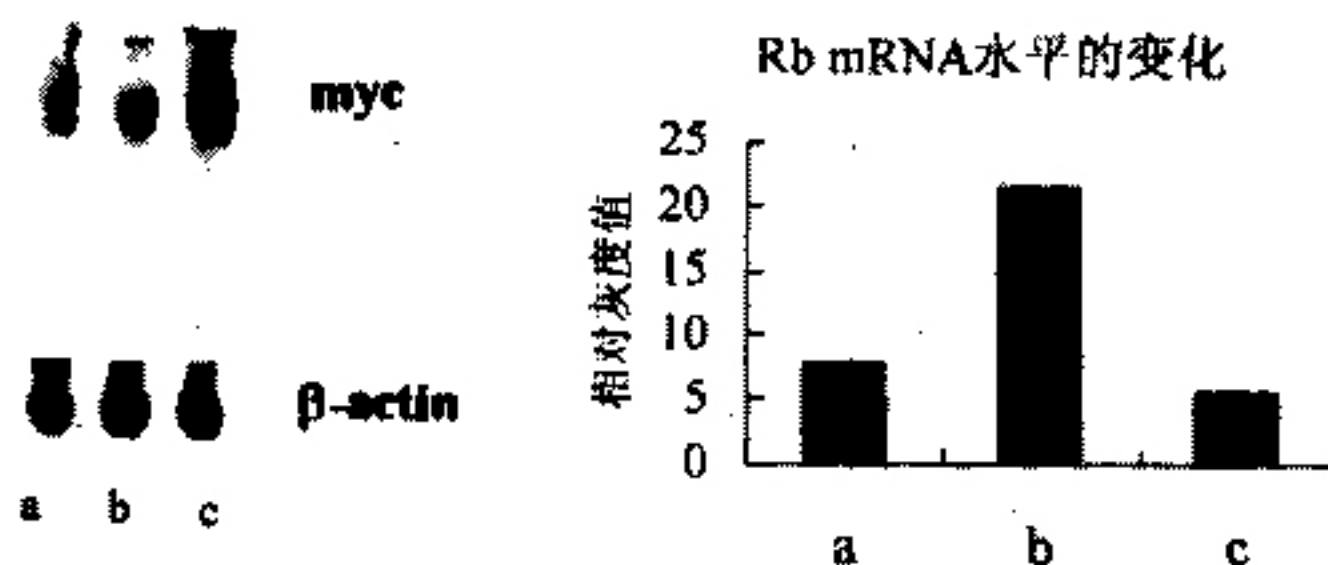


图 4 Northern 杂交显示 G_1 期细胞中 Rb mRNA 的表达变化 c-myc mRNA 表达水平上升, 是白龙组的 3.8 倍。

2.2 Rb G_1 期细胞经白龙处理后(图 4), Rb 的 mRNA 水平显著升高, 为对照组的 2.8 倍, 同时加入 PKA Inhibitor 后, Rb 表达降低, 仅为白龙处理组的 26%。

讨 论

目前在理论上对肿瘤的认识, 科学家们都趋向一种新的看法, 它不仅仅是原癌基因的活化和抑癌基因的失活或丢失的结果, 还包括细胞周期调控中 Rb、p53 和 CKI(Cyclin-dependent Kinase Inhibitor)等一系列因子丧失活性, 导致肿瘤抑制信号系统无法再对细胞周期中的调节蛋白家族 Cyclin-CDKs 的调控, 从而形成周期运转失控^(8~10)。本研究把 p16^{INK4a} 表达的调节作为研究核心, 从图 1 看出白龙对 BGC82-3 G_1 期细胞 p16^{INK4a} 具有显著的促表达作用, 与对照组比较 mRNA 水平升高 1 倍, 蛋白表达也升高 2.4 倍, 白龙处理细胞的同时加入 PKA 抑制剂阻断 cAMP-PKA 通路, 白龙

促 p16^{INK4a} 表达作用消失, p16^{INK4a} mRNA 表达降低, 仅为白龙组的 10%, 蛋白水平下降 72%, 说明 BGC82-3 细胞 p16^{INK4a} 与 cAMP-PKA 信号通路的调节关系密切, 表现出该信号通路为 p16^{INK4a} mRNA 和蛋白表达的上游事件的调控者之一。可以推断, 白龙促 p16^{INK4a} 转录表达正是通过 cAMP-PKA 通路使信息传递入核, 导致 p16^{INK4a} 转录增加, 而高水平表达的 p16^{INK4a} 可能通过抑制 cyclinD-CDK4 复合物的活性导致周期的迟滞作用。pRb 是 cyclinD-CDK4 复合物的一个很重要的底物^(11~13), 此复合物促使 pRb 磷酸化而释放包括 E₂F 在内的一些转录因子, 这些因子刺激 DNA 复制酶基因的转录⁽¹⁴⁾, p16^{INK4a} 的表达抑制 CyclinD-CDK4 的活性, 导致 pRb 与 E₂F 转录因子结合, 抑制增殖。我们检测到 pRb 的基因转录水平在 G_1 期受到白龙的作用后有明显的升高趋势, 再加入 PKA 抑制剂后, mRNA 水平又迅速下降(图 4), 说明白龙对 pRb 表达升高的刺激作用同样与 cAMP-PKA 信使通路相关。p21 作为另一种 CKI 比 p16^{INK4a} 发现较早, 它几乎和所有周期的 CDKs-cyclins 结合并抑制其激酶活性⁽¹⁵⁾。白龙对 BGC82-3 细胞 p21 的表达影响与 p16^{INK4a} 类似, 在 G_1 期中 mRNA 显著比对照组升高 2 倍以上, 同时看到 p21 在 G_1 期水平的变化亦受到了 cAMP-PKA 通路的调控, 阻断这条通路, 白龙的促进作用将被阻抑(图 2)。与上述结果相反的是癌基因 c-myc 在 BGC82-3 细胞中表达较弱。当白龙处理后, c-myc mRNA 水平下降了 59%, 说明白龙对癌基因 c-myc 表达拮抗作用显著。同时加入 PKA 抑制剂后 c-myc 表达升高 2.8 倍(图 3), 显示白龙对 c-myc 表达的影响也和 cAMP-PKA 通路有关。

以上实验说明, 白龙对 BGC82-3 细胞的调节是一个多途径的复合调节, 对 G_1 期众多抑癌基因(包括 p16^{INK4a}、p21、Rb)的活化及癌基因(包括 c-myc)表达的抑制, 是白龙有效控制 BGC82-3 细胞恶性度最重要的周期调控靶区, 而这种变化的发生均与 cAMP-PKA 信号通路的调节相关。因此白龙对人胃癌细胞增殖抑制及促分化作用是受控于信号系统下的多个抑癌基因和癌基因正负共调作用的复合调节作用, 反映了中医药对人癌细胞基因分子调节的阴阳控制关系。

参 考 文 献

1. 谷善清, 梁云燕, 樊立人, 等. 复方白龙片对人胃癌细胞两条信号通路的调控. 中国中西医结合杂志 1997; 17(70): 404—407.
2. Robison GA. Biological actions and clinical applications. New

- York: Academic Press, 1973:229—247.
3. Taylor SS. cAMP-dependent protein kinase model for an enzyme family. *J Biol Chem* 1989;264:8443—8446.
 4. David OM. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374(9):131—134.
 5. Jonathon P. Protein kinase and cell cycle control. *Seminars in Cell Biology* 1994;5:399—408.
 6. 梁云燕, 王代树, 方家椿, 等. 一种高效率细胞同步化方法的改良与应用. *细胞生物学杂志* 1991;13(3):137—140.
 7. F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, 等. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998:322.
 8. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995;11:211—219.
 9. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G₁ cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149—1163.
 10. MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Critical Reviews in Eucaryotic Gene Expression* 1995;5(2):127—156.
 11. Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, et al. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993;73:499—511.
 12. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, et al. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73:487—497.
 13. Kato JY, Matsushime H, Hiebert SW, et al. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 1993;7:331—342.
 14. Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 1998;280(15):1035—1036.
 15. Di Cunto F, Topley G, Calautti E, et al. Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* 1998;280:1069.

(收稿:1999-04-09 修回:1999-06-12)

蟾砂散应用不当致死 1 例

乔洪华

病历简介 患者男, 20 岁, 学生。患者 1996 年 9 月 9 日在大学新生入学报到后体检复查时发现肝功能异常, 两对半报告: HBsAg(+), MBsAb(-), HBeAg(-), HBeAb(+), HBcAb(+), HBV-DNA(+). 诊断为乙型肝炎。休学回家治疗。先后在本埠及外地四家医院就诊, 两次住院治疗 3 个月, 连续门诊治疗未间断, 但病情仍逐渐加重。1997 年 6 月 17 日查肝功能: 总胆红素(TBIL)47.0 μ mol/L; 总蛋白(TP)63.7g/L、白蛋白(ALB)27.0g/L, 球蛋白(G)36.7g/L, ALT 83U/L, AST 140U/L, 碱性磷酸酶(ALP)326U/L, 谷氨酸转氨酶(GGT)30U/L, 乳酸脱氢酶(LDH)274U/L, 胆固醇(CHL)1.64mmol/L, HBV-DNA(+). B 超: 肝右肋下斜径 113mm, 左肝剑下厚 73mm, 肝区回声密集增粗不均, 肝区结构紊乱, 显示欠清; 胆囊大小 39mm $\times$ 20mm, 囊壁厚 6mm, 多层; 脾长 121mm, 脾门厚 38mm, 肋下未触及; 胰头 17mm, 胰体 10mm; 腹水肝前 19mm, 侧卧 58mm; 右胸腔见多量液性暗区。提示: 肝硬化腹水、脾大、右胸水。6 月 18 日至 8 月 25 日在本院中西医结合肝病病区住院治疗(住院号: 7798), 病情逐渐好转。但因经济原因, 要求改为定期门诊治疗。1997 年 11 月 25 日复查肝功能: TBIL 52.9 μ mol/L, TP 59.42g/L, ALB 30.75g/L, G 28.67g/L, ALT 84.6U/L, AST 77.5U/L, ALP 194.9U/L, GGT 24.76U/L, LDH 222U/L, HBeAg1:64。患者精神尚可, 纳食一般, 牙龈无渗血, 喉咙干, 小便黄多, 夜间多白天少, 大便 1 日 2~3 次, 尚成形, 下肢

不肿, 两肋不太胀, 但腹部膨隆作胀, 上午轻, 午饭后逐渐加重。12 月 10 日患者父母听信传言, 求治于一民间老中医, 授方蟾砂散(砂仁 50g 纳入 5 只蟾蜍腹内, 瓦上焙干, 研末, 分 2 次服, 温水送下)。12 月 12 日上午 8:30 左右服第 1 次后, 患者感脘腹不适, 未吐泻。下午 4:00 左右又服第 2 次, 至 5:30 左右患者腹部绞痛, 随即腹泻, 先泻黄水夹粪垢, 后全为黄水, 出现腹泻时患者感腹内轻松舒服。腹泻持续 2h 左右, 脐下腹部明显缩小, 但脐上脘腹仍膨胀不消。晚 8:00 左右腹泻渐止, 患者已形疲神萎, 无力坐起, 只能卧床。8:30 出现呕吐, 先吐出胃内容物, 继为白粘痰, 后为黄水, 共约 5000ml 左右。13 日凌晨患者呈昏睡状态, 至当日上午 10:00 左右患者清醒约十几分钟, 继又昏迷, 13:20 死亡。

讨 论 蟾砂散(在 1964 年版中医学院试用教材重订本《中医方剂学讲义》中选入)为消导、化积剂, 功用: 行气、健脾、消积, 主治大腹胀, 并治小儿疳积。用量为大蟾蜍 1 只, 砂仁不拘多少, 制后研末作 3 服。本案为乙肝后肝硬化腹水, 本虚标实, 忌用攻伐。蟾砂散不宜用, 又蟾蜍 5 只, 用量太大, 患者服后大量泻吐黄水, 严重失水, 血容量骤降, 肝血流短时间内锐减, 电解质紊乱, 诱发肝昏迷, 蟾蜍有微毒, 对解毒功能已低下的肝脏会造成毒害, 又未采取积极有效的后续救治措施, 因而使患者在 30h 内死亡。应用蟾砂散时务必对其适应症、制法、用量, 后续善后措施一定要严格掌握好, 切忌乱用。

(收稿:1998-11-16 修回:1999-01-15)