中药白龙与 HMBA 对人癌周期细胞 CKI-P16 的调控*

王代树[1] 施学东[2] 梁云燕[1] 刘 军[1]

内容提要 **目的**:研究中药白龙与西药环六亚甲基二乙酰胺(HMBA)对人癌细胞中周期蛋白抑制因子 P16 的表达与调节。**方法**:采用 Northern blot、Western blot 等方法检测人癌细胞在白龙或 HMBA 作用下 P16 的表达调节。**结果**:在白龙或 HMBA 作用下癌细胞 G_1 期 P16 的表达增加,这一作用与 cAMP-PKA 和 DAC-PKC 两套信号通路共调节作用密切相关。当以 PKA 抑制剂阻断 PKA 通路时,P16 表达下降,相反当 PKC 通路被阻断时 P16 表达水平升高。**结论**:(1)癌细胞 G_1 期 P16 的低表达(与其他时相比较)可能是 P16 不能有效抑制癌细胞恶性变化的重要原因。(2)白龙和 HMBA 对肿瘤细胞的增殖抑制机理与 G_1 期细胞 P16 表达升高相关。(3)白龙和 HMBA 对人癌细胞内 P16 的表达调节表现了中西药对肿瘤细胞调节机理的共性。(4)首次阐明了 P16 上游调控与 cAMP/PKC 信号通路密切相关。

关键词 中药白龙 环六亚甲基二乙酰胺 细胞周期 周期蛋白抑制因子 P16

Regulation of Chinese Medicine Bailong and Hexamethylene Bisacetamide on Cyclin Dependent Kinase Inhibitor P16 Genes in Human Cancer Cell WANG Dai-shu, SHI Xue-dong, LIANG Yun-yan, et al *The School of Clinical Oncology, Peking University, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing* (*100034*)

Objective: To study the regulation of bailong, a Chinese herbal anticancer preparation and hexamethylene bisacetamide (HMBA) on cyclin dependent kinase inhibitor P16 (CKI-P16) genes in human cancer cells. **Methods**: The expression of CKI-P16 in different human cancer cells treated by Bailong or HMBA under different condition, was examined using Northern hybridization, Western blotting assay, etc. **Results**: After being treated by Bailong or HMBA, the P16 expression increased. This effect was closely related to co-regulation of cAMP-PKA and DAC－PKC signal pathway. When PKA pathway was blocked with PKA inhibitor, the P16 expression decreased, while PKC pathway was blocked, it enhanced. **Conclusion**: (1) The low P16 expression in G_1 phase of cancer cell, as compared with that in S, G_2 and M phases, might be an important factor responsible to the incompetence of P16 in inhibiting effectively the malignant change of cancer cell. (2) Mechanism of Bailong and HMBA on cancer cell proliferation inhibition might be correlated with the enhancement of P16 expression in G_1 phase of cancer cells. (3) Regulation and expression of Bailong and HMBA on P16 showed the common character of Chinese and western medicine in regulating cancer cells. (4) This study elucidated that upstream of P16 was related to cAMP/PKC signal pathway closely.

Key words Bailong, hexamethylene bisacetamide, cell cycle, cyclin dependent kinase inhibitor P16

肿瘤病的实质就是细胞周期异常性的疾病。当前对肿瘤的发生发展新概念不再是单纯的原癌基因活化或抑癌基因的失活或丢失,它还包括细胞周期调控中 Rb,P53 和 CKI(周期蛋白激酶抑制因子,cyclin dependent kinase inhibitor)等系列因子丧失活性,导致肿瘤抑制信号无法再对细胞周期中的周期蛋白家族(cyclins)、周期蛋白依赖性激酶家族(CDKs, cyclin-dependent kinase)进行调控,从而形成细胞周期运转失控[1,2]。因此,CKI 的研究已成为当前国际前沿课题。P16 是已知 CKI 家族中的重要成员[3,4],也是目前已知的唯一直接参与细胞周期调控的抑癌基因,它在哺乳动物中的调节位点是 G_1 期 R 检查点(Restriction check point)[5],P16 对细胞增殖与癌变具有重要意

* 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. 北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤防治研究所(北京 100034);
2. 北京大学第一临床医学院骨科

万方数据

义[6,7]。本工作拟通过药物对癌细胞中 P16 的表达调控作用，来探讨中西药物对细胞周期中 P16 调节共性，同时也为临床医学提供理论依据。

材料和方法

1 药物 环六亚甲基二乙酰胺（hexamethylene bisacetamide，HMBA，Sigma 公司）配成 5mmol/L 工作液；白龙（天津中药制药厂生产的成药粉剂，批号 930315），将粉剂配成 0.5mg/ml 工作液（pH7.2）蛋白激酶 A 抑制剂（PKAI）和 PKC 抑制剂（Bisindolylmaleimide）均购自 Sigma 公司。

2 实验分组：(a)对照组；(b)5mmol/L HMBA 培养液处理组；(c)3mg/ml 生药量白龙处理组；(d)3mg/ml 生药量白龙 + 80μg/ml PKAI 组；(e)5μmol/L PKC 抑制剂（PKCI）处理组。

3 细胞培养 人癌细胞（BGC82-3，MGC80-3，OS732）用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基（GIBCO 公司）于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养。

细胞接种 24～48h 后，先用过量 TdR（2.5mol/L，Sigma 公司）预处理，其方法步骤参照高压笑气法[8]，先将细胞阻断于 M 期，经有丝分裂选择法收集 M 期细胞，转入新的培养瓶内，培养 2～3h 细胞贴壁进入 G_1 期待用。S 与 G_2 期细胞亦按同样方法收集。

4 Western blot 分析 收集 G_1 期细胞或群体细胞，经洗涤，裂解，离心以及蛋白浓度测定等步骤，再经电泳与免疫显色、曝光等步骤完成，观察 P16 表达。

5 Northern blot 分析 收集 G_1 期细胞或群体细胞，提取总 RNA 经 Northern 印迹，转移（至硝酸纤维素膜上），干燥等步骤，进行分子杂交、洗膜、晾干和曝光，显影、定影等步骤完成，观察 P16 表达。

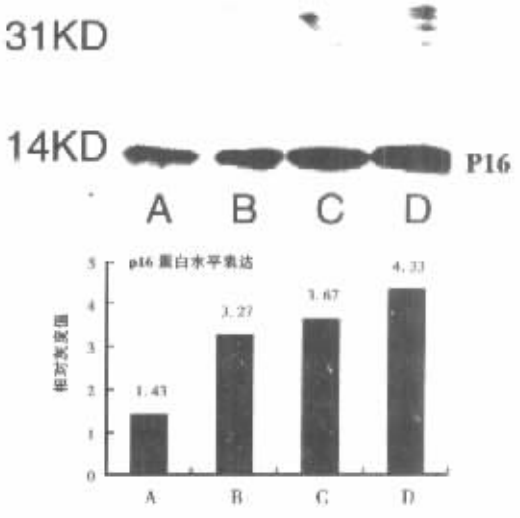
6 流式细胞光度术周期测定 用 0.02% EDTA 消化收集细胞，PBS 洗涤，离心，乙醇（75%）固定，RNase 处理，最后用荧光染料 PI 染色 30min。于流式细胞光度仪测定，观察细胞周期分布。

结 果

1 P16 在人癌细胞不同生长周期时相的表达 见图 1、2。从 Western blot 方法观察了 MGC80-3、BGC82-3 和 OS732 等人癌细胞不同生长周期时相 P16 蛋白水平的表达。结果显示几种细胞在 G_1 期具有显著共性，其表达水平均低于其他时相，而其他时相的强弱则随细胞种类而异。人骨肉瘤 OS732 细胞 P16 表达，G_1 期分别比 S、G_2、M 期低 1.28、1.5 和 2 倍（图 2）。

1. 对照，2. M 期，3. G_1 期，4. S 期，5. G_2 期

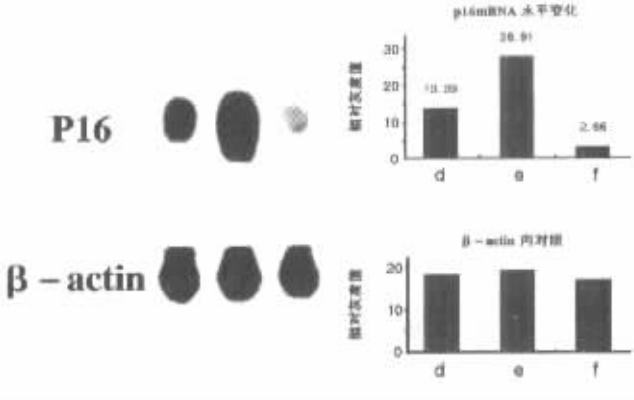
图 1 人胃癌 MGC80-3 细胞 P16 的表达



A. G_1 期，B. S 期，C. G_2 期，D. M 期

图 2 人骨肉瘤 OS732 细胞 P16 的表达

2 Northern 杂交结果 见图 3。BGC82-3 G_1 期细胞经白龙处理后，P16 基因表达显著提高，灰度扫描定量显示，比对照组提高 1 倍以上。当白龙处理细胞的同时加入 PKA 抑制剂阻断 PKA 通路，P16 基因表达很快下降 90%。

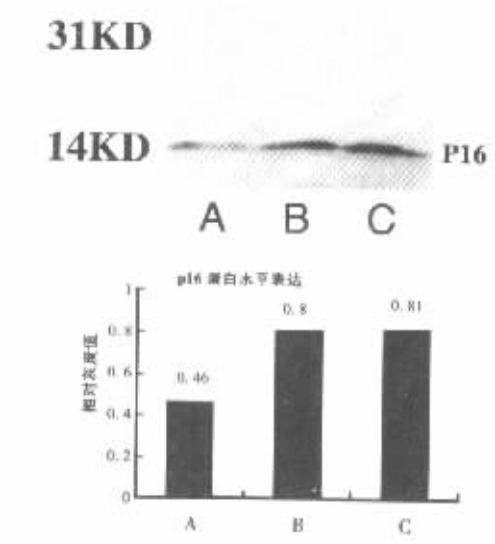


d. 对照组， e. 白龙组， f. 白龙 + PKA 抑制剂组

图 3 白龙对人胃癌 BGC82-3 G_1 期细胞 P16 表达调节

3 Western blot 结果，白龙与 HMBA 对 P16 表达影响比较 白龙与 HMBA 对人骨肉瘤细胞具有同样作用，分别提高 P16 蛋白水平 73.9% 和 76.1%（见图 4）；同时 $G_0 + G_1$ 期细胞比值随之增加 19% 和 27.6%，

万方数据



A. 对照组 B. 白龙组 C. HMBA 组

图 4 白龙与 HMBA 对 P16 表达影响比较

表 1 3 组周期细胞的分布比较 (%)

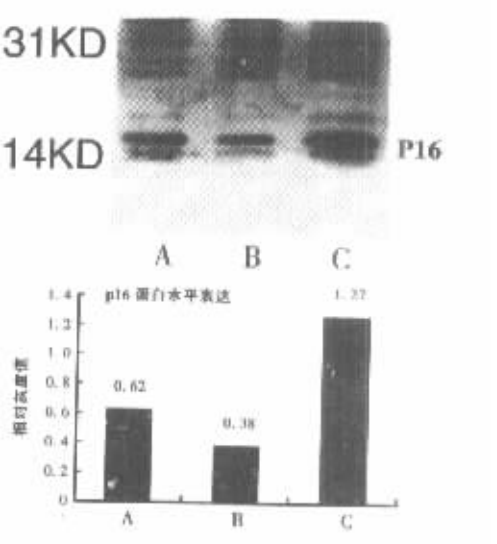
组别	G_0+G_1	S	G_2+M
对照	42	35	23
中药白龙	50	27	22
HMBA	58	17	25

而 S 期细胞比值则分别下降 22.9% 和 51.43% (见表 1)。

4 信号通路对 OS732 细胞 P16 表达影响 见图 5。结果表明人骨肉瘤细胞 P16 的表达调节同样是通过两种信号系统介导。阻断 cAMP-PKA 通路时,P16 表达下降 39%;阻断 DAG-PKC 通路时,P16 则表达上升达 104%。

讨 论

P16 作为细胞周期固有调控基因,又是一个新的抑癌基因,其作用靶点是 G_1 期 R 点,它与 G_1 期内周期蛋白 CyclinD 竞争结合 CDK4/6 抑制其活性,以此调节 Rb 磷酸化[3,7],这与细胞增殖、癌变密切相关。但是很多体外肿瘤细胞 P16 表达并不缺失,甚至很强。这是由于很多癌细胞株在很大比例上存在 P16 的突变[9,10]。除突变学说外,我们作了新的探索,在三种人癌细胞不同周期时相中 P16 的表达,均以 G_1 期最低(图 1、2),这一结果回答了一些癌细胞 P16 表达虽然很强,但在 G_1 期表达很弱,不能有效抑制 CyclinD/CDK4 的活性,导致 Rb 快速磷酸化,使细胞恶性度仍不能得到有效控制。为了证明这一认识,我们通过药物提高 G_1 期细胞 P16 表达,观察是否可逆转上述异常发生。采用自己研制的复方中药白龙。实验



A. 对照组;B. PKA 抑制剂处理组;C. PKC 抑制剂处理组

图 5 信号通路对 OS732 细胞 P16 表达影响

结果表明:白龙处理人胃癌 BGC82-3 G_1 期细胞后,P16 表达升高(图 3);免疫荧光染色中也观察到中药白龙主要提高 G_1 期细胞 P16 表达,而对其他周期表达强弱基本无影响(待发表)。说明只有提高 P16 功能区——G_1 期的表达才可发挥它的抑癌作用。这也是中药白龙临床疗效的重要理论基础。为了进一步阐明中药白龙提高 P16 表达的机理,我们探讨了它和 cAMP-PKA 信号通路的关系,当白龙作用的同时以 PKA 抑制剂(PKAI)阻断 cAMP-PKA 通路,白龙促 P16 的表达作用消失,P16 转录表达下降(图 3),这是由于机体内任何化学物质:包括激素、神经介质以及药物分子都不能直接进入细胞,必须通过细胞的信号转换与细胞内信号通路调节,因此白龙对 BGC82-3 G_1 期 P16 表达升高是通过信号通路的调节而实现。而 PKA 通路通常和细胞增殖抑制及促细胞分化相关[13],PKA 通路一旦被阻断,白龙作用必然消失。这种作用我们在人胃癌细胞增殖抑制实验中也曾证明,且与诱导分化剂 HMBA 作用极为相似[11,12]。为了进一步深层次探讨中药白龙与 HMBA 对其它实体瘤细胞内 P16 的调节,我们以 OS732 细胞为靶标进行平行实验。结果证明:HMBA 或中药白龙不仅能提高 P16 的表达(图 4),而且将细胞阻滞于 G_1 期,并降低 S 期细胞百分比(表 1),这暗示 DNA 合成下降,导致细胞增殖抑制,出现了逆转与分化表型[14]。这是由于 HMBA 与白龙主要调节了 OS732 细胞 G_1 期 P16 的表达升高,使 CDK4 活性受到抑制,节制了 Rb 的快速磷酸化,进入 S 期细胞的比值下降,G_1 期细胞数量增加,与中药白龙对 BGC82-3 G_1 期作用相呼应。其作用机理

万方数据

同样和信号通路密切相关。所以当 PKA 抑制剂阻断 PKA 通路时，P16 表达下降 39%（图 5）；单纯阻断 PKC 通路，P16 表达上升 1.04 倍（图 5），说明 PKA 和 PKC 两条信号通路对 P16 的调节作用具有显著的正负拮抗关系。这是由于 PKC 促进细胞增殖或癌变相关，恰好和 PKA 通路形成拮抗性调节。

总之本工作说明：(1)癌细胞 G_1 期 P16 的低表达（与其它时相比较）可能是 P16 不能有效抑制癌细胞恶性变化的重要原因。(2)复方中药白龙对人癌细胞的治疗的调节作用和直接参与细胞周期固有调控者 CKI P16 密切相关，也有力阐明了中药复方白龙作用分子机理之一。同时还进一步阐明了调节 P16 的作用机制与其上游调控的信号通路密切相关。(3)中药白龙与西药诱导分化剂 HMBA 对癌细胞调节机理具有极大的共性。(4)这种共性反应了中西药对肿瘤细胞治疗调节的实质和中医阴阳平衡学说相呼应。

参 考 文 献

1. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: red of cyclin-dependent kinase (CDKs), growth suppressor genes and cyclin kinase inhibitors (CKIs). Oncogene 1995; 11: 211—219.
2. Maclachlan TK, Sand N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinase and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. Critical Reviews in Eucaryotic Gene Expression 1995; 5(2): 127—156.
3. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specified inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 1993; 366: 704—707.
4. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Fcldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 1994; 264: 436—440.
5. Jonafhon P. Protein kinase and cell cycle control. Serminars in Cell Biology 1994; 5: 399—408.
6. Serrano M, Gomez-lahoz E, Depinho RA, et al. Inhibition of ras-induced proliferation and celluar transformation by $P16^{ink4}$. Science 1995; 267: 249—252.
7. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor $P16^{ink4}$. Cancer Res 1994; 54: 5816—5820.
8. 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运用. 细胞生物学杂志 1991; 13(3): 137—140.
9. LIU Q, Niuhausen S, Meclure M, et al. CDKN2(MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines. Oncogene 1995; 10: 1061—1067.
10. Kamb A. Cell cycle regulators and cancer. TIG 1995; 11(4): 136—140.
11. 谷善青，梁云燕，王代树，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(7): 404—406.
12. 彭　敬，梁云燕，王代树，等. 两种第二信使系统在人胃癌 MGC80-3 细胞增殖分化调节中的相互关系. 实验生物学报 1993; 26(3): 187—195.
13. Taylor SS. cAMP-dependent protein kinase model for an enzyme family. J Biol Chem 1989; 264: 8443—8447.
14. 李宝元，梁云燕，王代树. 中药白龙与环六亚甲基二乙酰胺对人胃癌不同周期细胞生长与表型调节的共性研究. 中国中西医结合杂志 2001; 21(5): 354—458.

（收稿：2000－12－22　修回：2001－07－16）

欢迎订阅 2002 年《中国医药学报》

《中国医药学报》是中国科学技术协会主管、中国中医药学会主办的国家级高级中医药学术期刊，是中国科协所属的自然科技期刊中反映中医药进展的中医药学科学报。本刊主编为中华人民共和国卫生部副部长、国家中医药管理局局长、中国中医药学会会长佘靖教授。本刊自 2002 年第 1 期起改为国际标准 16 开，月刊。2002 年本刊将设名家访谈、发展论坛、专题讨论、论著、临证经验、学术经纬、名医论坛、读书心得、科研思路与方法、杏林指南、专题讲座、综述、会议述要、海外中医药、书评、研究动态、医药心悟、信息窗等栏目。

本刊国内外公开发行，国际标准连续出版物编号 ISSN 1000－4971，国内刊号 N 11－2134/R，定价 5 元，全年 60 元。订阅代号 18－90，请及时向当地邮局订阅，亦可直接汇款至我刊订阅，免收邮寄费。地址：北京市和平街北口樱花路甲 4 号《中国医药学报》编辑部，邮编：100029，联系人：赵东。电话：010－64216650，传真：010－64297983。

《山西中医》2002 年征订启事

《山西中医》是由山西省卫生厅主管，山西省中医药学会主办，国内外公开发行的中医药、中西医结合综合性学术期刊，为中国生物医学核心期刊、全国中医药优秀期刊、山西省一级期刊。本刊主要栏目有老中医经验、学术探讨、专题笔谈、傅山医学研究、临床报道、中西医结合园地、专家论坛、成功之路、名医轶事、实验研究、针灸经络、文献综述等。

本刊为大 16 开，64 页，双月刊，逢双月 15 日出版。2002 年每册定价仍为 3.50 元，全年 21.00 元。请及时到当地邮局办理订阅手续。本刊国内统一刊号为 CN14－1110/R，国内邮发代号：22－30，国外代号：BM977。国外读者请向中国国际图书贸易总公司订购。本刊编辑部代办邮购，地址：太原市东华门 23 号，邮政编码：030013，电话：0351－4173499。

万方数据