

# 中药白龙片与 HMBA 对人胃癌不同周期细胞癌基因与抑癌基因表达调控的共性研究\*

李宝元<sup>△</sup> 梁云燕 王代树

**内容提要** 目的 探讨复方中药白龙片与环六亚甲基二乙酰胺(HMBA)对人胃癌(MGC80-3)细胞不同周期时相细胞癌基因 c-H-ras、c-myc 抑癌基因 Rb、p53 和 p21 以及 PKC- $\alpha$  基因表达的影响。方法 采用 Northern 印迹法检测基因表达情况。结果 :MGC80-3 细胞不同周期时相用中药白龙片或 HMBA 处理 ,癌基因 c-H-ras 和 c-myc 的表达下降 ,多数周期的抑制率达 50.0% 以上 ,促增殖的信使激酶亚类 PKC- $\alpha$  基因的表达基本与癌基因表达抑制相似。两类药物对抑癌基因的影响则有显著差异。HMBA 处理细胞后 ,Rb 与 p21 在 G<sub>1</sub> 期的表达不是增加而是下降 ,抑制率分别为 39.5% 和 33.3% ,Rb 在 S 期也抑制 3.0%。而中药白龙片对 Rb 与 p21 作用在各个周期内均是促进表达的作用 ,有的周期升高 1~2 倍以上。但是中药白龙片对抑癌基因 p53 的表达作用和 HMBA 都很近似 ,各个周期都有显著增加 ,多数时相达 125.0%~233.4%。结论 (1)中药白龙片对癌基因和抑癌基因的调节作用基本与诱导分化剂 HMBA 相似 ,但中药白龙片的作用优于 HMBA。(2)中药白龙片或 HMBA 对 MGC80-3 细胞增殖抑制和促分化作用的分子机理和两类药物对细胞周期内癌基因与抑癌基因调节相关。

**关键词** 白龙片 环六亚甲基二乙酰胺 细胞周期 癌基因 抑癌基因

**Study on Common Character of Regulative Molecular Mechanism of Chinese Drug Bailong and Hexamethylen Bisacetamide in Human Cancer Cell Cycle and Their Oncogene and Tumor Suppressor Gene Expression** Li Bao-yuan , Liang Yun-yan , Wang Dai-shu *The School of Clinical Oncology , Peking University . Beijing Institute of Cancer Research Beijing ( 100034 )*

**Objective :** To investigate the common regulative effects of the Chinese drug Bailong and hexamethylen bisacetamide ( HMBA ) on expressions of oncogenes ( c-H-ras and c-myc ) , and tumor suppressor genes ( Rb , p53 and p21 ) of MGC80-3 in human cancer cell cycle. **Methods :** Adopting RNA Northern Blot to survey the levels of gene expressions of MGC80-3 different phases cells treated with Bailong and HMBA respectively. **Results :** In different phases of MGC80-3 cells treated with Bailong and differentiation inducer HMBA , expressions of oncogenes c-H-ras and c-myc were inhibited by over 50.0% , messenger kinase subspecies PKC- $\alpha$  gene is similar with the expression inhibition of oncogenes , except effect of Bailong on the G<sub>2</sub> phase in cell cycle. Effect of Bailong differs greatly from HMBA in the expression of tumor suppression genes. The expression of Rb and p21 in cells treated by HMBA did not increase but were inhibited by 39.5% and 33.3% respectively in G<sub>1</sub> phase. The level of Rb gene expression was decreased , too by 3.0% in S phase. Comparison with HMBA the expression of Rb and p21 genes were increased after treatment by Bailong in all cell cycle. But the effect of Bailong on the expression of p53 gene which was increased obviously by 125.0% - 233.4% in majority phase of MGC80-3 cells is similar to HMBA. **Conclusion :** (1) The effect of Bailong on the regulation of oncogenes and tumor suppressor gene is similar to HMBA but the effect of Bailong is better than that of HMBA. (2) Molecular mechanism of the Bailong or HMBA on the proliferative inhibition and differentiation of MGC80-3 related to regulation of the Bailong and HMBA on the oncogenes and tumor suppressor genes in cell cycle of MGC80-3.

**Key words** drug Bailong , hexamethylen bisacetamide , oncogene , tumor suppressor gene , cell cycle

\* 本课题为国家自然科学基金资助项目( No. 39480026 )北京市科委重大项目( No. 852680300 )

北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所细胞室( 北京 100034 )

<sup>△</sup>现在山西省大同医学专科学校( 山西 037000 )

环六亚甲基二乙酰胺(hexamethylen bisacetamide, HMBA)作为一种诱导分化剂对癌细胞的诱导分化已有大量报道<sup>(1-3)</sup>,但在细胞 4 个生长时相内对多个癌基因与抑癌基因的分析比较,尚未见报道。白龙片是我们研制的一种活血扶正的抗癌中药(天津中药厂生产,即将上市),它与 HMBA 虽然是两种不同体系不同性质的药物,但对人胃癌(MGC80-3)细胞的生物效应极为相似<sup>(4,5)</sup>。本实验研究中药白龙片与 HMBA 对 MGC80-3 细胞不同生长周期时相细胞癌基因 c-H-ras、c-myc 与抑癌基因 Rb、p53、p21 以及 PKC-α 基因表达影响,以探求中药白龙片与 HMBA 对癌细胞诱导分化调节中分子机理的共性,这不仅为其临床治疗(HMBA 目前美国也正在一期临床)提供更深入的中西医结合理论依据,而且也可进一步阐明中药治疗肿瘤的现代科学机理,并为中医药基础研究开辟新的途径。

### 材料与方 法

1 材料 中药白龙片为本室研制,由天津中药制药厂生产的中成药,由白英、龙葵、当归等组成。本实验成品粉剂批号为 930315。用蒸馏水溶解,经高压灭菌后离心,制成 3mg/ml 生药量培养液,进行细胞药物培养;试剂:HMBA、TdR 为 Sigma 公司产品;RPMI-1640 培养粉为 GIBCO 公司产品;小牛血清由天津血液研究所生产;α-<sup>32</sup>P-dcTP 购自北京亚辉生物工程公司;c-myc、c-H-ras、PKC-α 等探针由北京师范大学分子细胞生物室提供;p53、p21、Rb 探针由北京市肿瘤防治研究所生化室提供。

2 方法 细胞培养:MGC80-3 细胞培养在含 10%

小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。细胞同步化:采用高压笑气法将 MGC80-3 细胞进行同步<sup>(6)</sup>,分别得到 M、G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 4 个时相细胞。用 3mg/ml 生药量中药白龙片培养液和 5mmol/L HMBA 培养液分别处理各周期细胞 4h,之后提取各时相细胞 RNA 进行 Northern Blot 实验分析。RNA 印迹分析按《分子克隆实验指南》中快速提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测 OD 值,取 20μg RNA 加 10μl 加样缓冲液,95℃ 加热 2min,使 RNA 变性,每孔加 20μg RNA 样品,进行甲醛凝胶电泳,按吸印法将胶中 RNA 转移到 NC 膜上,80℃ 干燥 2h<sup>(4)</sup>,进行 Northern Blot,所得结果在灰度扫描仪上进行分析处理。

### 结 果

由于细胞每个周期时相的进展时间不同,收集细胞与检测时间也随之而异,因此无论癌基因与抑癌基因的表达结果只能以每个周期时相为单位进行比较,所有结果均以灰度扫描进行相对定量分析。

1 癌基因表达 从图 1 A、B、C 和表 1 可见:癌基因 c-H-ras 与 c-myc 在中药白龙片或 HMBA 处理细胞后,均有显著的表达抑制。其抑制率除 HMBA 对两种癌基因在 S 期的表达抑制率较低(分别为 28.6% 和 26.8%)外,其余时相均在 50.0% 以上。

2 促增殖作用的信使激酶亚类 PKC-α 基因的表达 除中药白龙片对细胞 G<sub>2</sub> 期外,其余均和癌基因表达抑制相同。

3 抑癌基因表达 从图 2 A、B、C 和表 2 看出:

表 1 中药白龙片与 HMBA 对癌基因和 PKC-α 基因表达的抑制作用

细胞周期	c-H-ras			c-myc			PKC-α		
	对照	白龙片	HMBA	对照	白龙片	HMBA	对照	白龙片	HMBA
G <sub>1</sub>	523.4	153.4(70.7)*	204.4(61.0)*	521.7	208.7(60.0)*	143.5(72.2)*	694.6	113.1(83.7)*	339.4(51.2)*
S	536.8	178.7(66.7)*	382.9(28.6)*	534.8	182.6(65.9)*	391.3(26.8)*	452.3	113.1(75.0)*	177.7(60.7)*
G <sub>2</sub>	306.4	153.4(50.0)*	89.4(70.8)	313.0	156.3(50.0)*	78.3(75.0)*	355.4	445.8(25.4)**	145.4(59.1)*
M	434.0	127.7(70.6)*	166.0(61.8)*	430.4	117.4(72.7)*	156.3(63.6)	323.1	177.7(45.0)*	284.3(12.0)*

注:\*为抑制率(%),\*\*为提高率(%);下表同

表 2 中药白龙片与 HMBA 对抑癌基因表达的增强作用

细胞周期	Rb			p53			p21		
	对照	白龙片	HMBA	对照	白龙片	HMBA	对照	白龙片	HMBA
G <sub>1</sub>	554.2	685.4(23.7)**	335.4(39.5)*	102.1	229.8(125.0)**	268.1(162.5)**	92.9	257.1(33.3)**	128.6(33.3)*
S	495.8	656.3(32.4)**	481.3(3.0)*	178.7	459.6(157.1)**	548.9(207.2)**	150.0	407.1(171.4)**	184.3(22.9)**
G <sub>2</sub>	145.8	568.8(290.0)**	393.8(170.0)**	127.7	395.8(210.0)**	173.6(36.0)**	471.4	1028.6(118.2)**	557.1(18.2)**
M	379.2	452.1(19.2)**	247.9(34.6)**	76.6	255.3(233.4)**	140.4(83.3)**	257.1	300.0(16.7)**	385.7(50.0)**

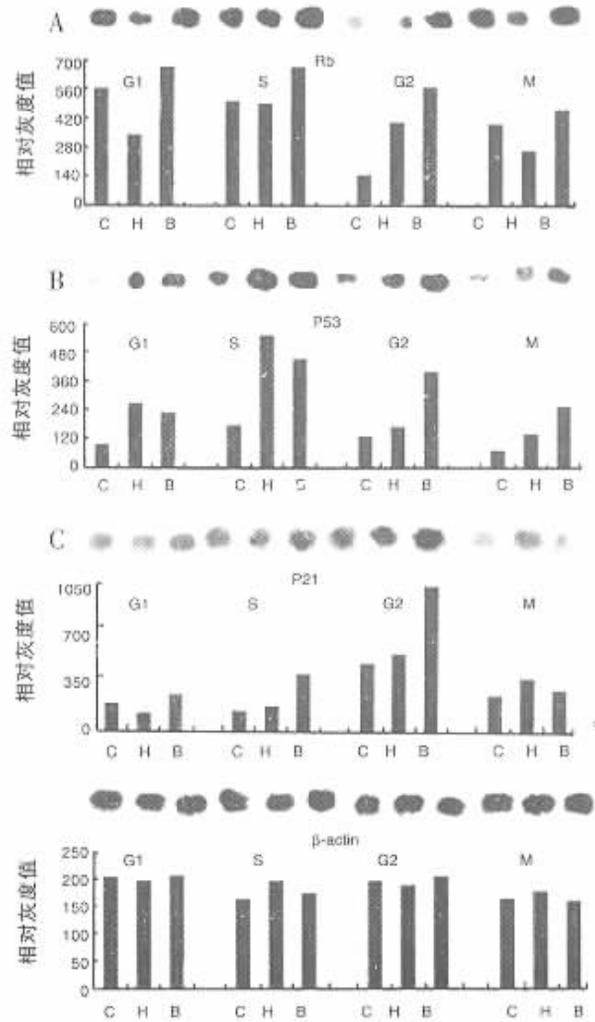
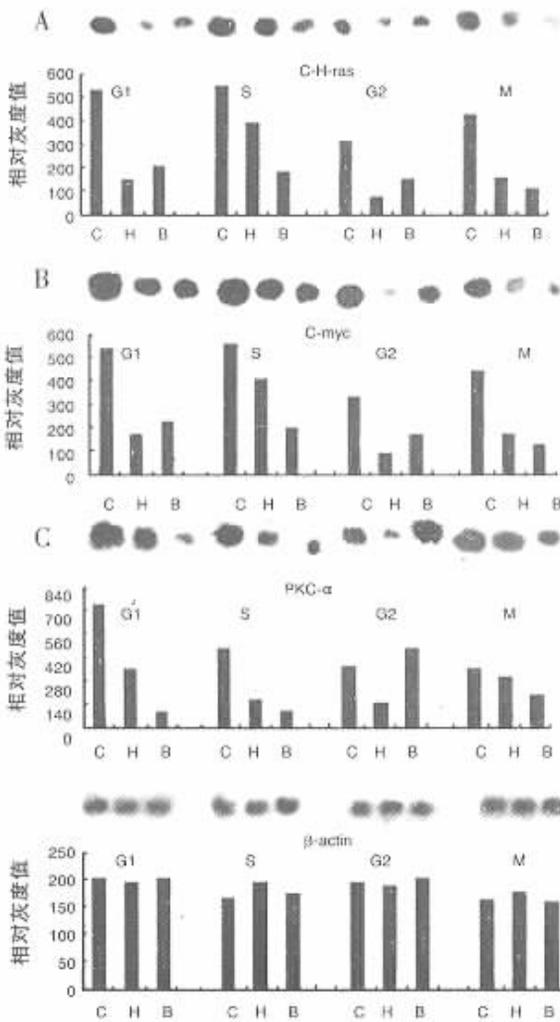


图 1 Northern 杂交显示 MGC80-3 细胞不同周期细胞中癌基因 c-H-ras、c-myc、PKC-α 基因 mRNA 的表达水平变化

图 2 Northern 杂交显示 MGC80-3 细胞不同周期细胞中抑癌基因 Rb、p53、p21 mRNA 的表达水平变化

注 :C 为对照组 ;H 为 HMBA 组 ;B 为白龙片组

两种药物对 MGC80-3 细胞不同周期时相细胞的作用差异较大 ,HMBA 组 Rb 与 p21 在 G<sub>1</sub> 期的表达不是增加 ,而是抑制 ,抑制率分别为 39.5% 和 33.3% ,Rb 在 S 期的抑制率为 3.0% ,而中药白龙片对 Rb 和 p21 的作用在各个周期内都是促表达作用 ,甚至有的周期提高 1~2 倍以上。但是两类药物对 p53 基因的促表达作用十分相似 ,在各个周期时相中 p53 的表达都显著增加 ,多数时相中提高 125.0%~233.4%。

注 :C 为对照组 ;H 为 HMBA 组 ;B 为白龙片组

入中药复方的研究 ,另一方面从细胞生长周期观察了与西药 (HMBA) 对肿瘤细胞调节的共性比较。我们也曾报道中药白龙片与 HMBA 对 MGC80-3 群体细胞的增殖抑制与 cAMP-PKA、DG-PKC 两套信使系统的共调作用具有因果关系<sup>(4,5)</sup>。细胞外信号诱发核内基因转录的改变 ,必须通过信号转导 ,因此本实验结果的作用机制与以前报道<sup>(4,5)</sup>密切相关 ,而且我们在另一实验中也得到证实 (待发表)。细胞癌变机制曾有人证明 ras 与 myc 对正常细胞必须同时转染才能发生癌变。说明了 MGC80-3 细胞在中药白龙片与 HMBA 作用下 c-myc 与 c-H-ras 两种癌基因的表达抑制对细胞去恶化“逆转”具有重要意义。myc 能与 ras 协同转化培养细胞 ,PKC 在此过程中发挥了重要作用<sup>(7)</sup>。我们也曾证明 c-H-ras、c-myc 基因的活化和 PKC-α 信号介导相关<sup>(8)</sup> ,因此本实验测定了 PKC-α 亚类的基因表达 ,如图 1C 和表

### 讨 论

肿瘤发生中 ,癌基因活化与抑癌基因的失活是当前研究恶性肿瘤发生的重要分子基础 ,以药物诱导和矫正两类基因正常表达 ,常视为抗肿瘤药物筛选的标志 ,但在大量的已有报道中注意细胞周期敏感性或障碍性的观察极少。本实验一方面把基因分子的观察引

1 所示:PKC- $\alpha$  基因表达抑制率与 c-H-ras, c-myc 的表达抑制相似,只有白龙片在 G<sub>2</sub> 期表达有异常变化,这可能是中药白龙片作用的周期障碍。PKC 是肿瘤促进剂—佛波酯在细胞内的高亲和力受体, Dong CQ 等人认为其它一些非佛波酯类的促进剂的作用也可能由 PKC 来介导<sup>(9)</sup>。这说明本试验中 PKC- $\alpha$  表达下降与 ras, myc 表达抑制之间具有密切的因果关系。还有实验表明:PKC- $\alpha$  表达抑制将提高药物敏感性,降低细胞的耐药性<sup>(10)</sup>。根据该理论与本实验结果,也许可以解释中药白龙片在临床放化疗中的有效辅助作用,增加肿瘤患者对化疗药物敏感性的机理所在。

癌基因表达的阻扼因子主要是抑癌基因。但中药白龙片与 HMBA 对不同抑癌基因的作用差异较大, HMBA 对 MGC80-3 细胞 Rb 和 p21 基因作用在 G<sub>1</sub> 期不是促表达,而是表达抑制,抑制率高达 39.4% 和 33.3%。在 S 期 Rb 也抑制 3.0%。以上结果说明 HMBA 对抑癌基因 Rb 和 p21 的周期靶点缺乏相应敏感性,导致作用的周期障碍。但中药白龙片则无此障碍,仅仅是 Rb 在 G<sub>1</sub> 期的表达较低,比对照组只提高 23.7%,不过 Rb 在 G<sub>1</sub> 期表达下降常常和 G<sub>1</sub> 期一个重要的周期蛋白激酶抑制因子(CKI)p16 的表达上升密切相关。p16 表达升高,可导致 Cyclin D/CDK4 活性下降, Rb 磷酸化降低, Rb 转录也常常下降。本实验用中药白龙片与 HMBA 均可显著提高 G<sub>1</sub> 期 p16 的表达<sup>(11)</sup>(HMBA 的工作待发表),从而有效的抑制细胞增殖。至于 Rb 与 p21 在 M 期的低表达,这主要是细胞处于分裂阶段,生长抑制因子的表达降低,完全是可能的。中药白龙片对 Rb 和 p21 的促表达作用与 HMBA 比较,表现了作用的周期差异性,但两种药物对 p53 的激活作用却十分一致,在多数周期内均可提高 1~2 倍以上。p53 不是细胞周期的直接调控者,但它是 p21 的上游调控基因,后者(p21)作用于每个周期时相,除此之外 p53 还存在新的调控途径,如它还和 G<sub>1</sub> 期检查点(check point)的控制相关,而且它(p53)在当前倍受人们关注,有人称它为警察基因,十分灵敏,如很多患者尚无临床指征时,其痰液中的细胞就发生 p53 基因的突变<sup>(14)</sup>,由此说明中药白龙片与 HMBA 对 p53 在各个周期时相中的促表达作用意义十分重大。Rb 也是这样,除 G<sub>1</sub> 期外,在细胞经过 S 期与 G<sub>2</sub> 期时也起着主要作用<sup>(13)</sup>。所以我们认为中药白龙片与 HMBA(特别是白龙片)对 MGC80-3 细胞 G<sub>2</sub> 期的 Rb 的显著激活作用可能正是阻止细胞从 G<sub>2</sub> 期进入 M 期抑制其分裂,对导致细胞增殖抑制具有一定意义。

中药白龙片与 HMBA 诱导 MGC80-3 细胞多种抑癌基因的活化与癌基因表达抑制的拮抗与统一协调性,是两类基因分子对癌细胞去恶化“逆转”过程的正负共调作用的表现。其实质正是对表达失控的两类基因进行“阴阳(正负)平衡”的调节过程。

## 参 考 文 献

1. Siegel DS, Zhang X, Feinman R, et al. Hexamethylene bisacetamide induces programmed cell death (apoptosis) and down-regulates BCL-2 expression in human myeloma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(1):162—166.
2. Zaker F, Darley RL, Sabah A, et al. Oncogenic RAS genes impair erythroid differentiation of erythroleukaemia cells. Leuk Res 1997;21(7):635—640.
3. Bernstein SH, Sherman ML, Hass R, et al. Effects of hexamethylene bisacetamide on induction of monocytic differentiation of human U-937 myeloid leukemia cells. Biochem Pharmacol 1991;42(2):403—407.
4. 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;26:187—195.
5. 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影响.中国中西医结合杂志 1997;17(7):404—407.
6. 梁云燕,王代树.一种高效率的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. Barr LF, Mabry M, Nelkin BD, et al. c-myc gene-induced alterations in protein kinase C expression: a possible mechanism facilitating myc-ras gene complementation. Cancer Res 1991;51(2):5514—5519.
8. 王代树,梁云燕,彭敬.在人胃癌 MGC80-3 细胞中 PKA-R II 和 PKC- $\alpha$  两套信使激酶系统亚类对 c-myc 和 c-H-ras 表达的共调作用关系.实验生物学报 1995;29(3):197—205.
9. Dong L, Stevent JL, Fabbro D, et al. Regulation of protein kinase C isozymes in kidney regeneration. Cancer Res 1993;53(19):4542—4549.
10. Wang XY, Liu HT. Antisense expression of protein kinase C alpha improved sensitivity to anticancer drugs in human lung cancer LTEPa-2 cells. Chung Kuo Yan Li Hsueh Pao 1998;19(3):265—268.
11. 刘军,柳慧图,王代树.复方中药白龙片抑制人胃癌细胞增殖中 RKA 信号通路与 G<sub>1</sub> 期调控因子的研究.中国中西医结合杂志 1999;19(10):613—616.
12. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. Related articles, protein, nucleotide, genome, OMIM WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993;75(4):817—825.

13. Chen PL, Scully P, Shew JY, et al. Related articles, OMIM phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989;58(6):1193—1198. 万方数据

14. Walker C, Robertson LJ, Myskow MW, et al. p53 expression in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 1994;70(2):297—303.

(收稿 2000-12-29 修回 2001-01-25)