

环六亚甲基双乙酰胺对胃癌不同细胞周期 两条信号系统的调节*

谷善青¹⁾ 梁云燕 王跃民¹⁾ 李宝元 王 俊 马 燕 王代树²⁾

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学实验室, 北京 100034)

摘要 环六亚甲基双乙酰胺 (HMBA) 对 MGC80-3 不同时相细胞内 cAMP-PKA 与 DAG-PKC 两大系统不仅具有正负调控作用, 而且其作用具有周期特异性. 其中 G1 期是最敏感的调控时相, 与对照组相比, cAMP 水平上升 102.3%, PKA 活性升高 348%, DAG 含量下降 51.4%, PKC 活性降低 32.3%; 次敏感时相为 G2 期; M 期基本没受影响; S 期变化规律不同于其他时相.

关键词 环六亚甲基双乙酰胺, 信号系统, 细胞周期

环六亚甲基双乙酰胺 (HMBA) 对不同恶性细胞系如: MELC、U-937、HL-60 等均具有诱导终末分化的作用^[1]. Melloni^[2] 证明其作用机理与 DAG-PKC 信号系统关系密切, 我们发现 HMBA 对 MGC80-3 细胞的分化调节作用与 DAG-PKC 和 cAMP-PKA 两大系统的正负调控有关^[3]. 但对细胞 (包括 MELC) 不同周期时相的影响尚未见报道, 而且现代观点认为, 肿瘤的发生不仅仅是癌基因的活化与抑癌基因的失活或丢失的结果, 还与细胞周期调控中的一系列因子丧失活性, 从而形成周期运转失控有关^[4]. 本实验拟进一步观察两套信号系统的正负调控与周期敏感时相的关系.

1 材料和方法

1.1 材料

³H-甘油 (Amersham 产品), 蛋白激酶 A 抑制剂、HMBA、BSA (Sigma 产品), Bisindolymaleimide (蛋白激酶 C 抑制剂, 又称 GF-109203 X, Boehringer Mannheim 产品), ³H-cAMP (中国原子能研究所).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: MGC80-3 细胞为胃粘液低分化腺癌细胞, 引种于山东师范大学生物系. 该细胞在 RPMI-1640 培养液 (含 15% 小牛血

清) 中, 放入 37℃, 含 5% CO₂ 的条件下培养.

1.2.2 细胞同步化: 按过去方法^[5] 分别获取 M、G1、S、G2 期细胞. 各时相细胞同步率 M、G1、S 均在 95%, G2 期为 85% 以上. 各时相细胞分为两组分别用含有和不含 5 mmol/L HMBA 的培养液作用 3 h, 作以下指标测定.

1.2.3 cAMP 水平测定: 利用 cAMP 与 ³H-cAMP 对蛋白激酶的竞争结合原理测定细胞中 cAMP 含量, 样品提取采用 Jakobsen 方法^[6], 测定试剂盒购自中国医学科学院基础医学研究所, 测定程序按试剂盒说明, 细胞 cAMP 含量以 10⁶ 细胞中 cAMP pmol 数表示.

1.2.4 DAG 含量测定: 按 Wolfman 等^[7] 用 ³H-甘油标记细胞的方法, 标记细胞 15 h, 然后收集细胞抽提展层, 刮板液闪测定.

1.2.5 PKA、PKC 样品提取: 4℃ 冲洗收集细胞并离心, 沉淀中加入细胞裂解液 (4 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, pH 7.5), 0℃ 超声破碎细胞, 镜检核膜不破, 在加入等体积蔗糖-Tris 缓冲液 (40 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 0.66 mol/L 蔗糖,

* 国家自然科学基金资助课题 (39480026).

¹⁾ 山东青岛第六人民医院肿瘤实验室, 青岛 266033.

²⁾ 课题负责人和通讯联系人.

收稿日期: 1996-08-26, 修回日期: 1996-10-31

0.1 mol/L 2-巯基乙醇, 2 mmol/L PMSF), 4℃ 3 000r/min 离心 5 min 沉淀细胞核, 留部分上清测 PKA. 其余沉淀在剩余上清中打散, 0℃ 超声破核膜, 加 10% Triton X-100 至终浓度为 1%, 冰浴振荡 1 h, 34 000r/min 4℃ 离心 1 h, 上清用 DEAE-52 柱纯化, 柱先以平衡缓冲液 (5 mmol/L Tris · HCl, pH 7.5, 1 mmol/L EGTA, 50 mmol/L 2-巯基乙醇) 平衡, 样品上柱后 10 ml 柱平衡液洗, 用含有 0.15 mol/L NaCl 的平衡液洗脱, 洗脱液可供 PKC 测定.

1.2.6 PKA、PKC 活性测定: PKA 活性按 Plet 法^[8], PKC 活性按 Darbon 法^[9], 两者活性以每分钟每毫克蛋白质的放射性计数值表示, 蛋白质浓度按 Lowry 法^[10]测定.

2 结 果

2.1 HMBA 对各时相细胞内信使水平的影响

从图 1 和图 2 可以看出, HMBA 对各时相细胞内 cAMP 水平和 DAG 含量的影响同其对照组相比, 作用效果大致按 G1> G2> M 顺序增减, cAMP 水平较各对照组增高幅度依次为 102.3%, 22.7%, 3.2%; DAG 含量降低幅度依次为 51.4%, 32.6%, 18.9%. cAMP 水平在 S 期变化最大, 比对照组升高 104%, 而 DAG 含量在该期改变最小为 3%, 几乎与对照组无异.

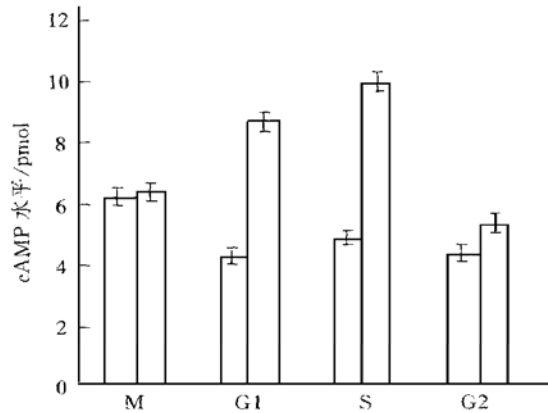


图 1 不同时相细胞内 cAMP 水平的变化
□:对照, □:HMBA.

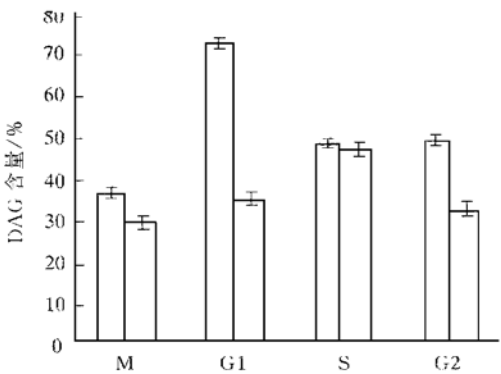


图 2 不同时相细胞内 DAG 含量的变化
□:对照, □:HMBA.

2.2 HMBA 对各时相细胞内激酶活性的影响

从图 3 和图 4 可以看出, HMBA 对各时相细胞内 PKA 和 PKC 活性的影响与信使水平

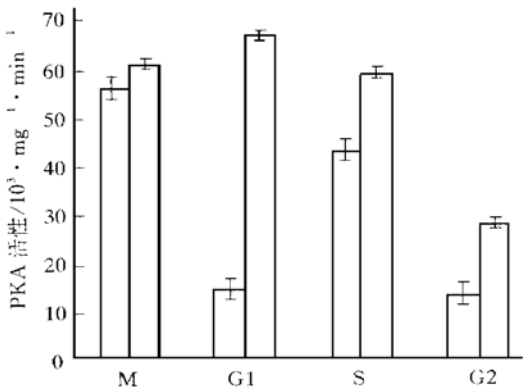


图 3 不同时相细胞内 PKA 活性的变化
□:对照, □:HMBA.

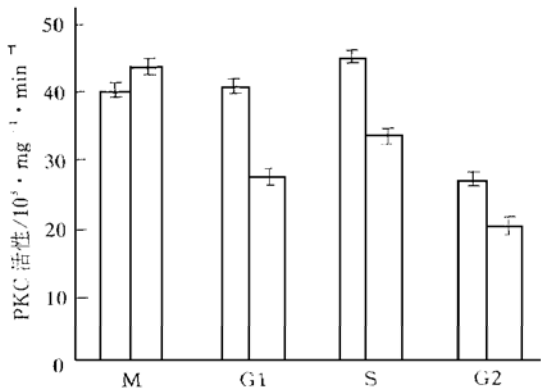


图 4 不同时相细胞内 PKC 活性的变化
□:对照, □:HMBA.

的变化相似,也遵循 $G1 > G2 > M$ 的增减顺序,PKA 活性较对照组增高幅度依次为 348%, 110.5%, 9.1%; 而 PKC 活性的降低幅度为 G1 期 32.3%, G2 期 25.1%, M 期却增高 9%; S 期 PKA 活性较对照组增高为 37.8%, PKC 活性则较对照组降低 25.7%.

3 讨 论

HMBA 作为一种极性平面分化诱导剂,人们对其机理进行了大量的研究^[1],但对信号系统方面报道不多,特别是对两套信号系统在不同时相细胞内的动态调控尚未见报道.从本实验结果可以看出两个重要问题: a. HMBA 对 MGc80-3 细胞内 cAMP-PKA 和 DAG-PKC 两套信号系统的调控具有明显的周期特异性,无论是对细胞增殖起负调作用的 cAMP-PKA 还是起正调作用的 DAG-PKC 系统,在 G1 期的改变最为显著,其差异总趋势是 $G1 > G2 > M$ 这一渐弱顺序,只有 S 期的调控较不规律. b. 在不同时相细胞内的信号调控中,两者基本都呈正负拮抗的调控关系,即 cAMP 水平与 PKA 活性上升,而 DAG 含量与 PKC 活性则下降,与对照组的表达恰恰相反,这可能同细胞周期与增殖分化的调控密切相关.综合 HMBA 诱导分化的众多报道,可能对其作用机制有进一步的了解.

G1 期内信使和激酶水平的显著变化说明:该期内以细胞增殖的负调信号为主导的调控作用,可能正是 HMBA 诱导细胞分化时 G1 期延长、细胞数目增加的机理之一.我们在过去曾发现^[11,12] HMBA 诱导 MGc80-3 细胞分化时, G1 期细胞百分比增加 18.4%; cAMP-PKA 通路表达增强,而 DAG-PKC 通路表达受抑; PKA (R II) 移位入核,而 PKC α 仍在胞质表达,此时, c-myc, H-ras 的表达受抑,若阻断 cAMP-PKA 通路,则入核和癌基因表达情况相反. 80 年代初, Nesterova 和 Severin 曾发现 3T3 细胞内 cAMP 水平升高时, PKA 移位入核,可诱导产生一生长因子 (分子质量为 15 ku 或 16.3 ku)^[13], 这有可能就是今日

的 p16 蛋白. 另外, Kiyokama^[14] 证明 HMBA 诱导 MELC 分化时, CDK4 蛋白快速下降,如合成过表达时,将阻断 HMBA 的作用. 而 CDK4 活性在 G1 期是受 p16 调控的,本实验结果有可能从周期时相上进一步把上述各家报道联系起来,而从中获得新的启示,当然我们目前还需 (正在) 进一步研究.

正常细胞中 G2 期 cAMP 水平最高,而细胞癌变后,该水平下降. 本实验证明 HMBA 诱导 G2 期细胞 cAMP 水平与 PKA 活性上升,说明这是向正常细胞水平恢复的表型,这有利于肿瘤细胞的逆转; S 期为 DNA 合成期,其调控可能较为特殊,所以 HMBA 对该期的调控与别的时相不同,如对 cAMP 水平调节敏感,而 DAG 含量几乎与对照组无异,对激酶活性调节幅度 PKA 强于 PKC,但 PKA 活性改变比 G1、G2 期小,而 PKC 活性改变则与 G2 期改变相当. 尽管这些结果显得缺乏规律,但总的来讲,无论是对细胞增殖起负调作用的 cAMP 系统还是起正调作用的 DAG 系统,其终端效应决定于它们各自的激酶系统即 PKA 与 PKC 的活性, DAG 含量虽然无改变,但 PKC 活性下降, PKA 活性上升,这对降低 DNA 合成显然有益. 有人报道^[15,16]: PKA (R II) 可改变 DNA 构象, PKC 可促进 NRK 细胞复制,因此 HMBA 无论对 MELC 还是 MGc80-3 细胞的种种去恶性表型的影响,必然和它对 S 期内两套信号系统的正常调控密切相关, PKA 活性高于 PKC 活性正是这种相关的体现; 与 G1、S、G2 三个时相不同的是, M 期细胞内 cAMP-PKA 与 DAG-PKC 通路几乎未受 HMBA 的影响,这反映了周期特异性的不同.

参 考 文 献

- 1 Beere H M, Hickman J A. Differentiation: a suitable strategy for cancer chemotherapy? *Anticancer Drug Design*, 1993, **8**: 299~ 232
- 2 Melloni M, Pontremol S, Michetti M. Protein kinase C activity and hexamethylenebisacetamide induced erythroleukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 5282~ 5286

- 3 彭敬, 梁云燕, 石永进. 两种第二信号系统在胃癌 MGC803 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
- 4 Grana X, Reddy E P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, CDKs, growth suppresser genes and CKIs. *Oncogene*, 1995, **11**: 211~ 219
- 5 梁云燕, 王代树, 方家春. 一种高效率细胞同步化技术的改良与运用. 细胞生物学杂志, 1991, **13** (3): 137~ 140
- 6 Jacobsen A. Cellular cyclic AMP content independent of ascites tumor growth rate *in vivo*. *Eur J Cancer*, 1975, **11**: 203~ 204
- 7 Wolfman A, Macara I G. Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras-transformed fibroblasts. *Nature*, 1987, **325**: 359~ 361
- 8 Plet A, Brion D E, Gerband P. Retinoic acid-induced rapid loss of nuclear cyclin AMP-dependent protein kinase in tetrastocarcinoma cells. *Cancer Res*, 1987, **47**: 5831~ 5834
- 9 Darbon J M, Feassus M I, Bayand F. Phorbol esters induce both intracellular translation and down regulation of protein kinase C in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, **137** (3): 1359~ 1366
- 10 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1953, **193**: 265~ 275
- 11 彭敬, 方家春, 王代树. 环六亚甲基双乙酰胺对人胃癌 MGC80-3 细胞诱导分化及 PKA-R II 与 PKC- α 亚基在细胞分布的变化. 生物物理学报, 1993, **9** (2): 196~ 202
- 12 王代树, 梁云燕, 彭敬. 在人胃癌 MGC80-3 细胞中 PKA-R II 和 PKC- α 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, 1996, **29** (3): 197~ 205
- 13 Andrey A. Cyclin AMP and regulation of gene expression. *Trends in Biochemical Sciences*, 1985, **10**: 97~ 98
- 14 Kiyokama H, Ichons V M, Rifkind R A *et al*. Suppression of cyclin-dependent kinase 4 during induced differentiation of erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (11): 7195 ~ 7203
- 15 Constantinou A I, Squinto S P, Jungmann R A. The phosphoform of the regulatory subunit R II of cyclic AMP dependent protein kinase possesses intrinsic topoisomerase activity.

Cell, 1985, **42**: 429~ 437

- 16 Chefonleas J G, Boydoll W E, Means A R. Calmodulin and the cell cycle: involvement in regulation of cell cycle progression. *Cell*, 1982, **28**: 41~ 50

Effects of HMBA on cAMP-PKA and DAG-PKC Signal Pathways in the Cell Cycle of MGC80-3 Cells. GU Shanqing¹⁾, LIANG Yunyan, WANG Yuemin¹⁾, LI Baoyuan, WANG Jun, MA Yan, WANG Daishu (*Department of Cell Biology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034, China; ¹⁾ Laboratory of Oncology, Qingdao No. 6 People's Hospital, Qingdao 266033, China*).

Abstract Modulation of HMBA on cAMP-PKA and DAG-PKC signal pathways in the cell cycle of MGC80-3 cells showed that: 1. there were positive and negative regulation between them; 2. signal regulation was different in the cell cycle. G1 phase was the most sensitive one among the four phases, cAMP level and PKA activity were increased by 102% and 348%, respectively, as compared with the control; while DAG content and PKC activity were decreased by 51.45 and 32.3%, respectively, as against the control. G2 phase was the second sensitive phase. Effects of HMBA on the signal regulation in M phase were not found. Changes of signal transduction in S phase were different to others.

Key words cell cycle, signal transduction, HMBA

人白介素 6 受体胞外区三维结构的同源模拟*

孙涛 任蕴芳¹⁾ 鲁中正²⁾ 李松²⁾ 焦克芳²⁾ 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 IL-6 受体是造血因子超家族成员, 其胞外区细胞因子结合结构域 (CBD) 是受体结合配基和偶联 gp130 转导 IL-6 信号的功能域. 据预测, IL-6R 功能域的 β 片层折叠模式和人生长激素受体 (hGH-

* 国家自然科学基金资助课题 (39480025). ¹⁾ 论文撰写人.

²⁾ 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850. 收稿日期: 1996-07-23, 修回日期: 1996-12-05