

# 细胞周期阻断剂作用的分子基础\*

王龙贵

(中国医学科学院药物研究所)

自1951年Howard等<sup>[1]</sup>首先提出细胞周期的概念以来,经过许多学者的共同努力,人们对细胞周期的本质有了越来越深刻的认识。本文主要讨论细胞周期中有关物质的分子变化,进而初步阐述一些细胞周期阻断剂作用的分子基础。

近年来,流式细胞光度术(Flow Cytometry, FCM)的使用,为辨别细胞周期各阶段的不同功能状态及相互变迁提供了有力手段。FCM测定主要根据DNA/RNA或DNA/染色质的变化。

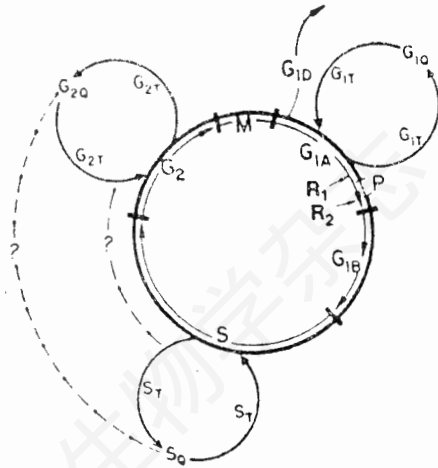


图1 细胞生长的各种不同功能状态及其可能的相互变迁

(引自 Darzynkiewicz, Z. et al., 1982, Genetic Expression in the Cell cycle, 104, Padilla G. M. and McCarty K. S. (eds), Academic Press, New York.)

由图1可以看出,有丝分裂细胞(M)先进入DNA合成前期的G<sub>1A</sub>亚期,还可以从G<sub>1A</sub>进入分化途径(G<sub>1D</sub>)或通过转变期(G<sub>1T</sub>)进入静止期(G<sub>1Q</sub>)。此时,这些细胞在它们进入DNA

合成期之前,某些物质如rRNA、蛋白质等必需成分需要累积到一定的阈值,才能顺利地进入DNA合成期(S)。R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>是限制点,可能与这些关键阈值有关。细胞通过G<sub>1B</sub>亚期需要较长的时间。在某些体系中,S期细胞可能经S期的转变期(S<sub>T</sub>)到静止期(S<sub>Q</sub>)。同样G<sub>2</sub>期细胞也可以离开周期成为静止期细胞。

对细胞周期阻断剂(主要是抗癌药)作用分子基础的研究,不仅使人们能够进一步认清这些抗癌药作用机制,为临床合理用药提供依据,而且在理论上对分子生物学和分子药理学研究也具有重要意义。近年来,人们对许多抗癌药物对细胞周期的影响进行了详细研究,发现许多药物能使细胞阻断于不同时期。如三尖杉酯碱,高三尖杉酯碱及半合成三尖杉酯碱能使P<sub>388</sub>白血病小鼠细胞G<sub>1</sub>期向S期的过渡受阻<sup>[2]</sup>;癌前预防药维生素甲酸能使S<sub>01</sub>细胞阻断于G<sub>1</sub>期;在体外用5微克/毫升浓度顺铂能使产生癌胚抗原的人腺癌细胞(LOVO)阻断于G<sub>1</sub>期或G<sub>1</sub>/S交界处<sup>[3]</sup>;羟基脲、阿糖胞苷能使CHO细胞阻断于G<sub>1</sub>/S交界处<sup>[4]</sup>;阿霉素<sup>[6]</sup>、博莱霉素A<sub>5</sub><sup>[6]</sup>、阿克拉霉素<sup>[7]</sup>能使细胞阻断在G<sub>2</sub>期;氟脲嘧啶、阿糖胞苷能分别使CCRF-CEM和HLC细胞阻断于S期<sup>[8]</sup>;秋水仙碱、长春花碱能使细胞停止于有丝分裂中期。

## 1. 蛋白质合成抑制剂的作用

人们现已知道,细胞周期中蛋白质不断合成对于细胞完成周期是必不可少的。Taylor<sup>[9]</sup>

\* 本文得到籍秀娟指教,特此致谢。

在研究嘌呤霉素对人肿瘤细胞的作用时指出, 在加入嘌呤霉素后大约1小时, 细胞则不能进入有丝分裂。Terasima和Highfield<sup>[10,11]</sup>也指出, 在G<sub>1</sub>期向S期的移行中, 蛋白质合成是不可缺少的先决条件, 抑制此期的蛋白质合成能延迟G<sub>1</sub>期细胞向S期进行。Huang<sup>[12]</sup>的实验表明, 三尖杉酯碱能抑制蛋白质合成的起始阶段, 使多聚核糖体降解为单核糖体, 是一较强的蛋白质合成抑制剂。徐煜庭等<sup>[18]</sup>研究表明, 三尖杉酯碱在1/5LD<sub>50</sub>剂量下, 能使<sup>[3H]</sup>-TdR掺入DNA抑制达72%。Huang<sup>[12]</sup>认为, 这种对DNA合成抑制可能是由于抑制最初蛋白质合成所致。Baaske等<sup>[14]</sup>也报道, 三尖杉酯碱能抑制G<sub>1</sub>期蛋白质合成的70%, G<sub>2</sub>期45%。薛绍白等认为三种三尖杉酯类生物碱阻断细胞于G<sub>1</sub>期, 其对蛋白质合成的抑制是主要原因。

此外, 对细胞蛋白质代谢的干扰, 还表现在对其结构的化学修饰, 而其结构变化, 特别是组蛋白结构的变化导致细胞内许多生命过程改变。有人认为, 组蛋白乙酰化, 中和了核小体组蛋白氨基末端的正电荷, 降低了组蛋白和DNA之间相互作用, 进而使核体结构松散, 特别是组蛋白H<sub>3</sub>和H<sub>4</sub>乙酰化, 使具有转录活性的染色质活化了。D'Anna等人<sup>[15]</sup>指出, 组蛋白的高度乙酰化使细胞阻断于G<sub>1</sub>期。在正丁酸盐存在下对L<sub>1210</sub>细胞周期动力学的详细分析表明, 在加入正丁酸盐后第1小时, 各期细胞生长随加入剂量增加而不同程度减慢。与正丁酸盐进一步共同温育, 则越来越多的细胞停止于G<sub>1A</sub>。这些细胞染色质中的DNA对DNA酶敏感性增加, 对酸耐受性下降, 顺铂也是烷化剂, 它不仅可损伤DNA模板功能, 也能使DNA-蛋白质交叉联接, 并伴有抑制DNA修复酶作用<sup>[16]</sup>。Houssier<sup>[17]</sup>等人证明顺铂能使核小体和染色质二级结构发生改变, 对酸变性和热变性的耐受性下降。这很可能与组蛋白的烷化有关。因此不难理解顺铂为什么也能使细胞阻断于G<sub>1</sub>或G<sub>1</sub>/S交界处。

## 2. RNA合成抑制剂的作用

RNA代谢在整个细胞生长中占有重要地位。早在1965年, Killander等<sup>[18,19]</sup>采用扫描显微分光光度计与缩时电影术, 测定了细胞周期中RNA含量变化, 发现细胞周期中出现RNA的不断累积, 但在细胞分裂时, 子细胞中RNA含量是不相等的。

根据DNA含量变化, 细胞可分为G<sub>1</sub>、S和G<sub>2</sub>+M期。而RNA在细胞间期逐渐增加, G<sub>2</sub>+M期几乎是G<sub>1</sub>期的两倍。G<sub>1</sub>期细胞中RNA含量是非常不相等的。图2是采用FCM同时测定L<sub>1210</sub>细胞中DNA和RNA含量差异而确定各期细胞。其中A是各期细胞散点图, B和C是根据DNA和RNA含量而表示的指数生长的L<sub>1210</sub>细胞分布的双参数等高图。由图2A容易看出, 在G<sub>1</sub>期细胞中只有G<sub>1B</sub>细胞才能直接进入S期, 而G<sub>1A</sub>则不能。

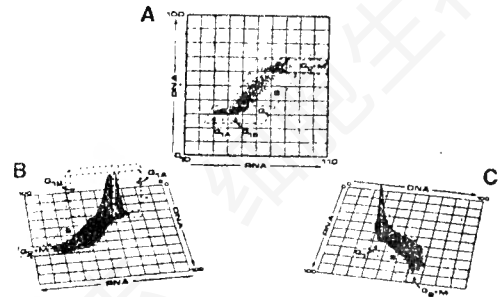


图2 采用流式细胞光度术, 根据DNA和RNA含量差异对L<sub>1210</sub>细胞周期分析。

A: 散点图; B和C: 指数生长的L<sub>1210</sub>细胞分布的双参数等高图。

(引自Darzynkiewicz Z. et al., 1981, Expt Cell. Res. 136: 279—293.)

用同步化细胞进行实验表明, 低RNA含量的G<sub>1A</sub>期代表了有丝分裂后的早G<sub>1</sub>期细胞, 而G<sub>1B</sub>期则代表进入S期之前的晚G<sub>1</sub>期细胞。可见在G<sub>1</sub>期细胞进入S期之前, RNA必须达到一个阈值。对于细胞周期速率与RNA含量相互关系, 有人进行了广泛研究。Danzykiewicz等和Fujikawa、Yamamoto<sup>[20,21,22]</sup>用最初同步于M期的CHO细胞实验, 发现RNA含量与G<sub>1</sub>和S期的间隔时间具有良好的相关性,

即有丰富RNA的G<sub>1</sub>期细胞通过S期比含RNA较少的那些细胞要快。许多抗癌药物正是由于干扰了RNA代谢而阻断细胞生长的。Taylor<sup>[9]</sup>在小鼠细胞中加入0.075微克/毫升的放线菌素D抑制RNA合成,结果2小时内引起细胞分裂活动停止。Traganos等<sup>[8]</sup>发现阿克拉霉素(ACM)能使细胞阻断于G<sub>2</sub>+M期,认为ACM对细胞进入并通过S期的作用可能是由于其对RNA合成抑制。在ACM作用后,G<sub>1</sub>期细胞中RNA含量降低35%到50%,这种抑制不仅使必需的RNA缺失,而且有可能影响细胞分裂所必需的蛋白质合成,进而阻断细胞周期。另外,细胞通过S期也与RNA含量有关,所以RNA合成的抑制也能阻止S期细胞进入G<sub>1</sub>期。

### 3. 干扰DNA代谢

染色质是细胞生长分裂的物质基础,于是任何影响染色质的因素都能导致基因表达受阻,以致细胞生长停止,甚至死亡。临床应用的抗癌药,有许多是通过损伤染色质,抑制DNA复制而发挥阻断细胞周期作用的。Traganos<sup>[23]</sup>等报道,玫瑰树碱在1微克/毫升浓度下,能使L<sub>1210</sub>细胞阻断于G<sub>2</sub>期,并且阻断在G<sub>2</sub>期的细胞与无药物作用下的G<sub>1</sub>和S期细胞相比,原位DNA对酸变性敏感性下降,染色体浓缩程度降低。作者认为由于有丝分裂细胞、分化的成红细胞以及G<sub>0</sub>期淋巴细胞都具有高度浓缩的染色体,它们比未分化的及周期细胞对酸变性更敏感,所以上述现象都是由于药物直接与原位DNA相互作用的结果。Rao等<sup>[24]</sup>为了考察这类干扰DNA代谢的细胞周期阻断剂的作用机理,随机地用许多已知引起G<sub>2</sub>期阻断的药物处理HeLa细胞,24至48小时后,借助于早熟染色体浓缩(Premature Chromosome Condensation, PCC)法进行细胞周期分析。用仙台病毒将药物处理的细胞与同步于M期的HeLa细胞融合,根据形态学特征,画出各种类型的早熟浓缩染色体图。结果表明,所试药

物都能引起G<sub>2</sub>期阻断。人们还观察到,大多数G<sub>2</sub>期细胞出现染色体畸变,如缺失、断裂或交换。另一有意义的事实是G<sub>2</sub>期PCC量与停止在G<sub>2</sub>期细胞的百分比之间呈正相关,即药物引起DNA损伤能力越大(以染色体的畸变表示),则G<sub>2</sub>期阻断的频率越高。至于染色体的损伤是如何引起G<sub>2</sub>期阻断的问题,重要因素之一是蛋白质合成抑制。即由于DNA的损伤导致其转录的翻译发生障碍。将细胞暴露于X射线或其它染色体损伤物如抗癌药,则可能引起基因或基因调节的特殊蛋白质(染色体开始浓缩及有丝分裂所必需的蛋白质)的丢失或修饰。染色体损伤越显著,这种丢失或修饰的可能性就越大。有人<sup>[25]</sup>为了证明这种假设,采用聚丙烯酰胺凝胶双向电泳比较了同步G<sub>2</sub>期细胞、S期细胞及药物作用后阻断于G<sub>2</sub>期细胞的蛋白质情况,结果表明这三种细胞总的蛋白质具有时相特异性。作者假设了药物引起G<sub>2</sub>期阻断的分子模型:在染色质损伤的药物如烷化剂作用下,由于对DNA烷化作用,造成染色体损伤,出现DNA链断裂、重排,最终可能引起染色单体或染色体断裂、缺失或交换,进而引起某些基因变性或失活,导致基因表达受阻。由于S期细胞的基因损伤严重,细胞由G<sub>2</sub>期进入M期所必需的RNA和蛋白质合成也就受到影响,进而使细胞不能进入M期。事实上,人们发现因药物作用而阻断于G<sub>2</sub>期的细胞比同步于G<sub>2</sub>期细胞至少缺少九种不同的蛋白质。若将药物诱导而阻断于G<sub>2</sub>期细胞与同步于G<sub>2</sub>期细胞融合,则后者因提供了缺失蛋白质,使前者也能进入M期<sup>[25]</sup>。

### 4. 干扰cAMP的作用

有关cAMP在细胞周期中的调节作用,已引起了人们注意。许多学者研究表明在哺乳动物细胞周期中,细胞内cAMP浓度是不恒定的,G<sub>1</sub>期和S期出现峰值。有人测定了细胞中环核苷酸磷酸二酯酶(cyclic nucleotide phosphodiesterase, PDE)的活性,表明在细胞周

期中, cGMP-PDE 和 cAMP-PDE 都有明显的峰值, 分别在 S 期及有丝分裂期。将同步于 M 期的 HeLa 细胞加入 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (MIX) 而使 PDE 抑制, 可导致 85% 细胞停止于 G<sub>1</sub> 期。然而若将 S 期细胞中加入 MIX, 对 S 期的完成无影响, 但这些细胞有 86% 停止于 G<sub>2</sub> 期。由此可见, 细胞内 cAMP 水平变化, 直接影响细胞周期。至于 cAMP 作用于细胞周期那一时相, 取决于细胞类型和实验方法。许多实验表明, 高浓度的 cAMP 主要使细胞阻断在 G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 期, 及个别被阻断在 S 期<sup>[26]</sup>。cAMP 对细胞周期的阻断作用, 原因之一可能与它调节 DNA 合成有关。人们已注意到, 在加入能使 G<sub>0</sub> 期细胞进入周期的药物后, 随着 DNA 合成增加和分裂增殖, 细胞内 cAMP 浓度迅速下降。反之当细胞维持高浓度的 cAMP 时, 其生长刺激受到抑制。于树玉等<sup>[27]</sup>给腹水型肝癌小鼠腹腔注射磷酸二酯酶抑制剂亚硒酸钠 (1 毫克/公斤), 给药后两小时, 发现癌细胞 cAMP 含量升高 2.7 倍。Tisdale 等<sup>[28]</sup>发现苯丁酸氮芥 5 微克/毫升使组织培养的 W 256 癌细胞内 cAMP 提高二倍, 且癌细胞内 cAMP 增高发生在该药抑制 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入之前, 故认为苯丁酸氮芥对 DNA 合成的影响是通过 cAMP 调节的。此外, cAMP 尚可促进细胞进入分化途径<sup>[29]</sup>。

总之, 细胞周期阻断剂之所以能发挥对细胞生长的阻断作用, 是由于干扰了细胞内许多与生长分裂有关的重要物质如 DNA、RNA、蛋白质及 cAMP 的正常代谢。然而, 由于许多药物作用是多方面的, 如三尖杉酯碱, 既是蛋白质合成抑制剂, 又能直接干扰 DNA 复制, 同时还能使细胞 cAMP 含量升高, 促进细胞分化。因此很难以某一方面来解释其对细胞周期的阻断作用, 很可能是所有作用的综合效应。目前对分子水平的细胞周期变化中的许多环节如组蛋白修饰作用与基因调控间的相互关系, 药物对基因调控的影响等方面的知识了解得还很少, 所以对有些药物作用的分子基础的认识也很肤浅。

这些尚待以分子生物学和分子药理学知识, 结合现代先进的分析技术而作深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Howard, A. et al., 1951, *Expt. Cell Res.* 2: 178—187.
- [2] 薛绍白等, 1984, 中国医学科学院学报, 6: 28—31.
- [3] Burgerat Jean-Pierre, et al., 1979, *Cancer Res.* 39: 4356—4363.
- [4] Robert, A. T. et al., 1972, *Cancer Res.* 32: 2726—2732.
- [5] Krishanos, K. et al., 1976, *Cancer Res.* 36: 143—150.
- [6] 薛绍白, 1984, 中国药理学报, 5 (2): 112—114.
- [7] Traganos, F. et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 2728—2737.
- [8] Yataganas, X. et al., 1974, *Cancer Res.* 34: 2795—2806.
- [9] Taylor, E. W. 1963, *J. Cell Biol.* 19: 1—18.
- [10] Terasima, T. et al., 1966, *Expt. Cell Res.* 44: 669—672.
- [11] Highfield, DP. et al., 1972, *Expt. Cell Res.* 75: 314—318.
- [12] Huang, M. 1975, *Mol. Pharmacol.* 11(5): 511—519.
- [13] 徐煜庭等, 1981, 中国药理学报 2 (4): 252—255.
- [14] Baaske, D. M. et al., 1977, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 12: 298—300.
- [15] D'Anna, I. A. et al., 1980, *Biochemistry*, 19: 2656—2671.
- [16] Zwelling, L. A. et al., 1978, *Cancer Res.* 38: 1762—1768.
- [17] Houssier, C. et al., 1983, *Biochimica et Biophysica Acta*, 739:317—325.
- [18] Killander, D. et al., 1965, *Expt. Cell Res.* 40: 12—20.
- [19] Killander, D. et al., 1963, *Expt. Cell Res.* 38: 272—284.
- [20] Darzynkiewicz, Z. et al., 1979, *J. Cell Physiol.* 100: 425—438.
- [21] Fujikawa-Yamamoto, K. 1982, *J. Cell Physiol.* 112: 60—66.
- [22] Darzynkiewicz, Z. et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 358—362.
- [23] Traganos, F. et al., 1980, *Cancer Res.* 40 (4): 2390—2399.
- [24] Rao, A. P. 1976, *J. Natl. Cancer Inst.* 57: 1139—1143.

- [25] Al-Bader, A. A. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 6064—6068.
- [26] Pastan, I. H. et al., 1975, *Ann. Rev. of Biochem.* 44: 491—522.
- [27] 于树玉等, 1982, *中华肿瘤杂志*, 4 (1): 50.
- [28] Tisdale M. J. et al., 1975, *Biochem. Pharmacol.* 24: 1271—1274.
- [29] Scheid M. P. et al., 1978, *J. Exp. Med.* 147: 1727—1743.

## 胚胎癌细胞体外诱导分化

施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

小鼠胚胎癌细胞 (embryonal carcinoma cells, 简称 EC 细胞) 与早期多能性胚胎细胞具有许多生物学共性。目前已分离和克隆了许多 EC 细胞株, 其中大多数移植到同系宿主体内后, 形成癌块中除了 EC 细胞外, 常混杂有各种类型的分化组织, 这种癌块称为畸胎瘤 (teratoma); 有些癌块中 EC 细胞增殖不占优势, 几乎全是各种分化组织, 成为非移植性畸胎瘤 (teratoma); 也有些 EC 细胞分化能力在体内受到限制, 癌块全由 EC 细胞组成, 无任何类型的分化组织, 成为很恶性的胚胎癌 (embryonal carcinoma)。这三种恶性和分化程度不同的肿瘤组织的形成主要取决于 EC 细胞生长和分化的净平衡。这种性质不仅表明 EC 细胞能在一定的条件下分化成不同类型的非恶性细胞; 也表明恶性畸胎瘤的发生是由于细胞正常增殖控制的失调。鉴于 EC 细胞这种特性, 不少实验室已用以研究细胞异常增殖、恶性表型的发育调节以及哺乳类早期胚胎生长和分化的基因表达调控等问题。近年来, 这些问题的研究大多借助于 EC 细胞体外诱导分化实验。现根据有关文献和我们自己的工作结果, 对 EC 细胞体外诱导分化问题作一简单的综述。

### 一、体外诱导细胞分化的条件

1; EC 细胞 许多 EC 细胞象在体内一样,

在体外也具有分化能力, 要保持未分化表型得依赖于滋养层细胞 (feed cell) 或白明胶一类支持介质, 培养条件改变往往使 EC 细胞分化。大多数 EC 细胞具有分化和发育多能性等共同特点, 但所形成的分化细胞存在着很大的异质性。这难以分析特定分化细胞的基因表达和生物学特种异质性可能是由于胚胎多能细胞在转化成 EC 细胞时所处的不同发育阶段而造成<sup>[1]</sup>。因此通常选用在常规条件下不分化, 但通过化学物质诱导或改变细胞环境而进行有限分化的克隆 EC 细胞作为实验模型。

2. 无血清培养液 由于血清因子本身的复杂性, 近年来常用一些特定的物质替代血清加入基础培养液, 配成人工培养液研究体外细胞分化。根据现有一些 EC 细胞和其它细胞的无血清培养资料, 表明大多数细胞的增殖需要激素、生长因子和转运蛋白。例如 F9 EC 细胞可在含胰岛素、纤维凝结蛋白和转铁蛋白的基础培养液中生长<sup>[2]</sup>; PC 13 EC 细胞需要转铁蛋白和血浆脂蛋白<sup>[3]</sup>。不同类型的细胞需要不同的补充物, 甚至无机盐。因此, 目前还没有一种对较多细胞 (包括 EC 细胞) 都适用的无血清培养液, 也没有一种只对某一种特定细胞适用的无血清培养液。至少有 4 种不同系统的无血清培养液适于 BHK-21 肾上皮细胞生长<sup>[4]</sup>。人工培养液的应用和发展, 促进了体内微环境的一些物质分子的研究。由于 EC 细胞性质类似早期胚胎细