

中药固真方对 UMR106 细胞周期蛋白表达及细胞周期的影响*

刘晓军 俞文华 刘德富 李平风**

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 应用流式细胞技术和 Western blot 技术, 观察了中药固真方对大鼠成骨肉瘤细胞 UMR106 细胞的细胞周期及细胞周期蛋白 cyclin E 和 cyclin A 表达的影响。结果显示: 固真方处理 UMR106 细胞后 24 h, S 期细胞百分比达高峰, 占 49.6%, 而对照组 30 h 时, S 期细胞才增高, 达 43.2%。cyclin E 的表达在固真方处理 8 h 时增高, 而对照组在 16 h 时, cyclin E 表达才达高峰。cyclin A 的表达在给药组处理 24 h 时最高, 而对照组在 30 h 时, cyclin A 表达才增高。揭示固真方可缩短细胞周期的时程, 加速细胞周期的运行, 从而促进细胞增殖。

关键词 固真方, 细胞周期蛋白, 细胞增殖

中图分类号 Q 28

The Effect of VRF on Cyclin and Cell Cycle in UMR 106 Osteosarcoma Cells

LIU Xiao-jun, YU Wen-hua, LIU De-fu, LI Ping-feng

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

Abstract Chinese recipe Vitality Reinforcing Formula (VRF) is effective in improving kidney function and delaying senility in clinic practice. Recent studies indicate that VRF increased the DNA synthesis and oncogene expression. Now, the effects of VRF on cyclin expression and cell cycle were investigated in serum-free cultured osteoblast-like UMR 106 cells. The results showed that the cells entered S-phase in advance and the relative percentage of S-phase cells was increased in VRF treated cells; cyclin E expression was increased after the cells were treated with VRF for 8 hours; the peak of cyclin A expression was reached 6 hours ahead of time after treatment with VRF. These results suggest that Chinese recipe VRF can affect the cell cycle and stimulate the proliferation of osteoblast-like cells.

Key words Chinese recipe, Cyclin, Cell cycle

中药固真方是由肉苁蓉、首乌、生地等六味中药组成, 具有补肾益精、延缓衰老的作用^[1], 能促进成骨样细胞的 DNA 合成^[2], 促进 c-Ha-ras、c-myc 等细胞增殖正性调控基因的表达, 抑制细胞增殖负性调控基因——p53 的表达^[3], 表明固真方有助于细胞的生长增殖, 可以延缓衰老。本实验以大鼠成骨肉瘤细胞株 UMR106 为研究对象, 观察中药固真方对该细胞的细胞周期蛋白(cyclin)及细胞周期的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠成骨肉瘤细胞株 UMR106 引自美国哈佛大学医学院麻省总医院内分泌研究室。MEM 为 GBCO

公司产品, 抗 cyclin E 单克隆抗体、抗 cyclin A 单克隆抗体、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 Ig 为 Sigma 公司产品, 其它试剂均为分析纯。中药固真方提取液由上海中医药大学药系提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

UMR106 细胞以含 5% 胎牛血清的 MEM 培养, 按 $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 密度接种于 100 ml 细胞培养瓶中。培养 12 h 后, 换无血清 MEM 培养液。无血清培

* 国家自然科学基金资助项目(39770931)

** 联系人 Tel: (010) 62092418

刘晓军, 女, 1967 年生, 硕士, 讲师

收稿日期: 1999-05-17, 修回日期: 1999-07-22

养 24 h 后, 将固真方原液以无血清 MEM 培养液进行 10 万、100 万、1000 万倍的稀释, 得到 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 3 种不同浓度的固真方溶液, 分别处理细胞; 对照组无血清培养。

1.2.2 Western blot 检测 cyclin E 和 cyclin A 的表达

固真方处理 8 h、16 h、24 h、30 h, 收获并裂解细胞。裂解液用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量。取含总蛋白 100 μ g 的细胞裂解液, 以 7.5% SDS-PAGE 电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 分别以抗 cyclin E 单抗和抗 cyclin A 单抗检测 cyclin E 和 cyclin A 的表达。

1.2.3 细胞周期分析

细胞培养同 1.2.1。以 10^{-6} 浓度的固真方处理 UMR 106 细胞, 对照组予无血清 MEM 培养液。处理 8 h、16 h、24 h、30 h, 分别用胰酶-EDTA 消化分散细胞, PBS 洗 2 次, 2.5 倍体积冰乙醇固定过夜。PBS 洗 2 次, 每毫升细胞悬液中加入 10 mg/ml RNase 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, PBS 洗 2 次。碘化丙啶 (PI) 染色, FACS-440 流式细胞仪测定细胞周期各时相细胞所占百分比。

2 结 果

2.1 固真方对细胞 cyclin E 蛋白表达的影响

UMR 106 细胞经不同浓度固真方处理后, 8 h 时, 处理组 cyclin E 的表达明显增高, 与对照组相比, 10^{-5} 浓度组、 10^{-6} 浓度组、 10^{-7} 浓度组分别增加 415.1%、327.3% 及 281.7%; 16 h 时, 对照组 cyclin E 的表达增高, 固真方处理的 10^{-5} 浓度组和 10^{-6} 浓度组 cyclin E 的表达下降, 而 10^{-7} 浓度组表达继续升高, 与对照组相近; 24 h 和 30 h 时, 对照组和处理组 cyclin E 的表达均显著下降。见 Fig 1。

2.2 固真方对细胞 cyclin A 蛋白表达的影响

UMR 106 细胞经不同浓度固真方处理后, 8 h 和 16 h 时, 对照组和处理组 cyclin A 的表达均很低; 24 h 时, 处理组 cyclin A 的表达增高, 与对照组相比, 10^{-5} 浓度组、 10^{-6} 浓度组、 10^{-7} 浓度组分别增加 214.3%、128.5% 及 71.4%; 30 h 时, 对照组 cyclin A 的表达增高, 固真方处理的 10^{-5} 浓度组和 10^{-6} 浓度组 cyclin E 的表达下降, 而 10^{-7} 浓度组表达略有升高。见 Fig 2。

2.3 固真方对细胞周期的影响

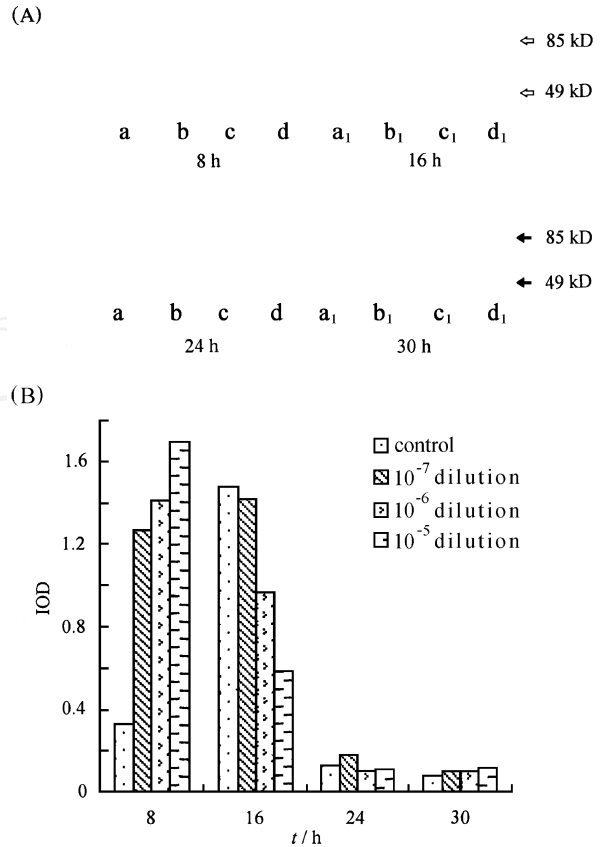


Fig 1 The effect of VRF on cyclin E expression in osteoblast-like UMR 106 cells

UMR 106 cells were exposed to 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dilution of VRF for the varying period of time. 100 μ g of the cell lysate were separated on 7.5% SDS-PAGE and blotted using anti-cyclin E monoclonal antibody

(A) Western blot analysis (a, a1: control; b, b1: 10^{-7} dilution; c, c1: 10^{-6} dilution; d, d1: 10^{-5} dilution)

(B) Densitometric scanning (DD) of cyclin E expression induced by VRF

固真方处理 UMR 106 细胞 24 h 时, 可刺激细胞 DNA 合成, 经流式细胞仪测定显示, 处理组的 S 期细胞百分比增高, 而对照组 S 期细胞百分比的增高延迟至 30 h 时出现。见 Table 1。

Table 1 Effect of VRF on cell cycle of UMR 106 (%)

	Control			Treated group		
	G ₁	S	G ₂ +M	G ₁	S	G ₂ +M
8 h	56.1	33.1	10.8	63.3	27.3	9.4
16 h	59.6	34.2	6.2	55.0	35.5	9.4
24 h	56.3	38.9	4.8	42.2	49.6	8.3
30 h	50.1	43.2	6.7	46.0	42.8	11.2

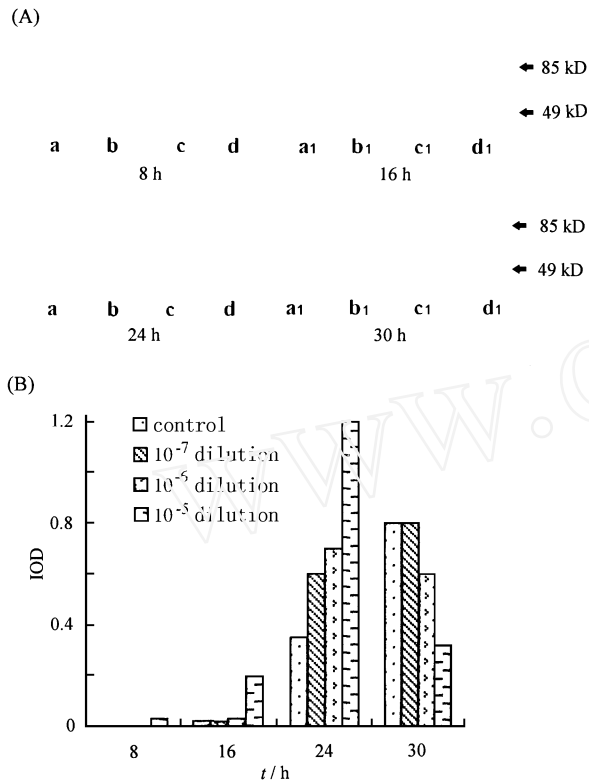


Fig 2 The effect of VRF on cyclin A expression in osteoblast-like UMR106 cells

UMR 106 cells were exposed to 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dilution of VRF for the various period 100 μ g of the cell lysate were separated on 7.5% SDS-PA GE and blotted using anti-cyclin A monoclonal antibody.

(A) Western blot analysis (a, a1: control; b, b1: 10^{-7} dilution; c, c1: 10^{-6} dilution; d, d1: 10^{-5} dilution)

(B) Densitometric scanning (IOD) of cyclin A expression induced by VRF

3 讨 论

中药固真方的前期实验已经发现: 固真方可使 ROS17/2.8 细胞的³H-TdR 参入率增高, 具有促进细胞增殖的作用^[2]. 而许多因素对细胞增殖的影响, 往往是通过调节细胞周期的进程而起作用的. 我们实验测定了固真方对 UMR 106 细胞周期蛋白 (cyclin) E 和 A 的表达及细胞周期的影响, 以进一步探讨中药固真方的促增殖机制. 细胞周期各时相存在不同的特征性 cyclin^[4], cyclin E 为 G₁ 期的特征性 cyclin, 在 G₁ 期表达增高, 促进细胞通过 G₁ - S 期的限制点; 当细胞进入 S 期后, cyclin E 降解. 本实验结果表明: UMR 106 细胞经血清饥饿 24 h, 细胞同步化后, 固真方处理 8 h 时 cyclin E 表达最高, 较对照组提前 8 h, 提示固真方处理后, 可使 UMR 106

细胞提前进入 G₁ 期, 并促进细胞越过 G₁ 期的限制点. cyclin A 是 S 期的特征性 cyclin, 是 DNA 复制所必需的^[5], 在 S 期表达增高, G₂ 期迅速失活. 本实验结果显示: 固真方处理 24 h 时, cyclin A 表达达高峰, 而对照组至 30 h 时 cyclin A 表达最高, 较处理组延迟 6 h, 揭示固真方处理后, 可使 UMR 106 细胞提前进入 S 期. 结合 cyclin E 和 cyclin A 的实验结果可以发现, 经固真方处理后, UMR 106 细胞 G₁ 期和 S 期相应的 cyclin 提前合成, G₁ 期和 S 期时相提前, 细胞周期时间缩短, 从而使细胞增殖速度加快. 实验结果还显示, 固真方对 cyclin E 和 cyclin A 表达的影响呈剂量依赖性. 至于 10^{-7} 浓度组 cyclin E 和 cyclin A 的表达高峰出现时间与对照组相同, 考虑是由于药物浓度较低所致. 据此, 我们选用 10^{-6} 浓度的固真方, 通过流式细胞仪, 观察了它对细胞周期的影响, 发现 24 h 时处于 S 期的细胞比例最高, 而对照组迟至 30 h 时最高, 也说明固真方处理组 24 h 时, 细胞处于 S 期, 而对照组推迟 6 h 处于 S 期. 该结果与 cyclin A 表达的结果相一致. 综上所述, 中药固真方是通过推进细胞周期的进程而促进细胞增殖的.

参考文献 (References)

- 1 林水淼. 固真饮延缓衰老的临床研究. 上海中医学院上海市中医药研究院学报 (Lin Shuimiao. The clinic study of Vitality Reinforcing Formula on delaying senility. *Acta Shanghai Coll Tradit Chin Med Shanghai Tradit Chin Med Inst*), 1990, 4: 3-6
- 2 顾文聪, 韩志芬, 杜国光. 中药固真方对 ROS17/2.8 细胞增殖分化的影响. 生物化学杂志 (Gu Wencong, Han Zhifen, Du Guoguang. The effect of chinese herb Vitality Reinforcing Formula on DNA biosynthesis in ROS 17/2.8 cells. *Chin Biochem J*), 1993, 9: 257-259
- 3 姚明忠, 顾文聪, 丁卫, 杜国光. 固真方对老年大鼠肝脏原癌基因和抗癌基因表达的影响. 中国中西医结合杂志 (Yao Mingzhong, Gu Wencong, Ding Wei, Du Guoguang. The effect of Vitality Reinforcing Formula on proto-oncogene and antioncogene expression of senile rat liver. *Chin J Integrat Tradit West Med*), 1997, 17: 67-68 (基础理论研究特集)
- 4 Dou Q P, Levin A H, Zhao S H, Pardee A B. Cyclin E and cyclin A as candidates for the restriction point protein. *Cancer Res*, 1993, 53: 1493-1499
- 5 Xavier Grana E, Pemkum an Keddy. 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