

## 高三尖杉酯碱对HL-60细胞内癌基因mRNA的影响

刘杰、杨胜利、胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 分子杂交实验表明, 高三尖杉酯碱(HHRT)可显著降低癌基因mRNA在细胞质中的含量而不影响其在核内的含量。药物作用结果其浓度和细胞密度有关。各种基因的mRNA受影响程度不一, 依次为c-myc(82%), N-ras(30%),  $\beta_2$ (3.5%), rDNA(0%)。HHRT对mRNA的核质转运无显著影响, 但可降低癌基因mRNA的稳定性, 推测这是HHRT的原发效应。

**关键词** 高三尖杉酯碱; 致癌基因; 核酸杂交; 信使核糖核酸稳定性; 信使核糖核酸核质转运

高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHRT)系从我国特产三尖杉属(*Cephalotarus fortunei*)植物中提取分离的一种抗肿瘤有效成分<sup>(1)</sup>。它对多种动物移植性肿瘤有效, 对多种体外培养细胞有杀伤作用。临床观察表明, HHRT对急性非淋巴细胞白血病疗效显著, 并对某些实体瘤

有效。其作用机理为抑制细胞内蛋白质和DNA合成, 阻滞细胞由G<sub>1</sub>期向S期和G<sub>2</sub>期向M期转变, 降低有丝分裂指数, 杀伤各时相细胞<sup>(2)</sup>。本工作利用分子杂交手段阐明其作用的分子机理, 研究药物作用的早期变化。

### 材 料 和 方 法

HHRT由本所植化室提供; 放线菌素D(actinomycin D, Act D)为西德Merck产品; 放线菌酮(cycloheximide, CH)系瑞士Fluka AG产品, 药物均溶解于生理盐水中, 经过滤灭菌后使用。 [<sup>32</sup>P]dATP和 [<sup>32</sup>P]dGTP系英国Amersham产品; DNase I为西德Boeringer产品; 大肠杆菌DNA聚合酶I和各种限制酶均购自华美公司。

**细菌培养、质粒提取和基因分离** c-myc的第三外显子、N-ras的第一外显子。 $\beta_2$ 微球

蛋白基因的第二外显子和 *fos*, *erb B* 的基因片段均克隆于质粒 pBR 322 上, 质粒均来源于美国癌基因公司 (Oncogene), 所用宿主菌为大肠杆菌 C 600 和 HB 101, 细菌培养、转化和质粒提取、酶切片段分离均按常规方法<sup>(3)</sup>。

**细胞培养** 人早幼粒细胞白血病细胞株 HL-60 接种于含 20% 热灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 于 37°C, 10% CO<sub>2</sub>, pH 6.8-7.0 和饱和湿度下培养, 每 3 d 传代一次, 由于此细胞易自发分化, 每次实验前克隆纯化一次。

**RNA 的提取** 将细胞悬浮于冰冷的 HYPO-TKM 溶液 (含 KCl 0.15 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.5) 加入 NP-40 至终浓度为 0.5%, 同时加入氧钒核苷复合物至 10 mmol/L, 10 min 后, 立即于 4°C 下 15 000 × g 离心 20 min, 取上清液用热酚法<sup>(4)</sup>提取胞质 RNA, 取沉淀用盐酸胍法<sup>(5)</sup>提取核内 RNA。

**点杂交** RNA 溶解于 3 × SSC/7% 甲醛溶液, 点于尼龙膜上, 烘干后预杂交、杂交、洗涤、放射自显影, 用密度仪扫描定量。

**RNA 稳定性分析** 用 Act D 1.0 μmol/L 完全阻断细胞内的转录作用, 然后加入待测药物, 一定时间后提取胞质 RNA 进行点杂交分析。

**RNA 的核质转运** 采用细胞核体外转录法<sup>(6)</sup>。

**缺口转译** 制备比度达 10<sup>8</sup> cpm/μg DNA 的探针。

**显微观察** 电镜样品制备用常规方法, 髓过氧化物酶细胞化学染色用联苯胺法。

## 结 果

**点杂交用于定量的实验基础** 将提取自 2 × 10<sup>7</sup> 个 HL-60 细胞的 RNA 溶于 30 μl 水, 分别取 1, 2, 4, 6, 8 μl 点样, 与 *myc* 探针杂交。2 组实验的结果表明杂交斑点的密度与 RNA 的量呈线性关系, 在 RNA 溶液中加入等容

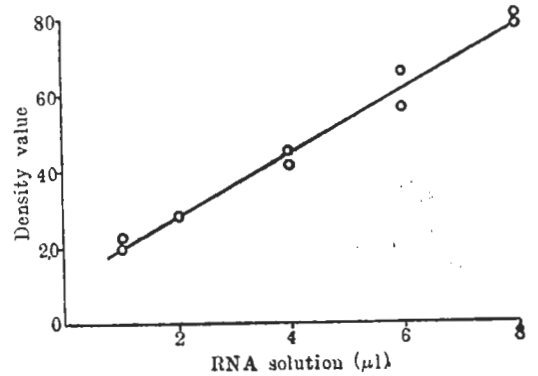


Fig 1. Reliability of dot-hybridization technique. RNA solution extracted from 2 × 10<sup>7</sup> HL-60 cells (in 30 μl) hybridized *c-myc* probe. Autoradiography were directly proportional to the volume of RNA solution.

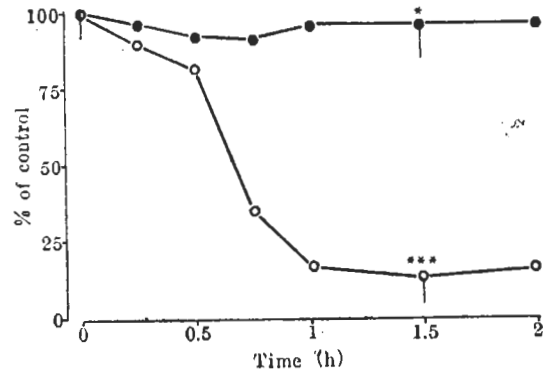


Fig 2. Effect of homoharringtonine 40 nmol/L on the content of *c-myc* RNA in cytoplasm (○) or nuclei (●) of HL-60 cells. n = 4,  $\bar{x} \pm SD$ . \*p > 0.05, \*\*\*p < 0.01 vs 0 h.

量的 NaOH 1 mol/L, 在 100°C 处理 10 min 后点杂交, 无杂交斑点出现, 说明用点杂交法定量特定的 RNA 完全可行。

**高三尖杉酯碱对 *myc* RNA 在细胞质和核内含量的影响** HHRT 40 nmol/L 处理 HL-60 细胞可使胞质内 *myc* RNA 出现明显的下降趋势, 但核内 *myc* RNA 含量基本不变。药物处理 1.5 h 胞质内 *myc* RNA 降至对照的 18 ± 5%。而核内未见显著变化。说明 HHRT 作用的主要环节在于胞质内 mRNA 代谢, 而不影响核内的转录和转录后的加工作用。

**高三尖杉酯碱作用的浓度效应** 以不同浓度的 HHRT 作用于  $10^5$  个/ml HL-60 细胞, 0.5 或 1 h 后, 胞质内 *myc* RNA 的含量开始时随着药物浓度的增加迅速降低。在 10 nmol/L 时 *myc* RNA 降至对照的 60% (0.5 h) 或 27% (1 h), 以后药物浓度增加 *myc* RNA 水平保持不变, 如图 3。

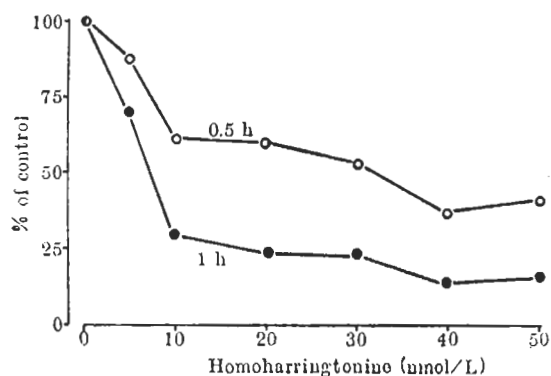


Fig 3. Effect of homoharringtonine on the content of *c-myc* mRNA in cytoplasm of HL-60 cells after 0.5 or 1 h treatment.

固定 HHRT 的浓度为 40 nmol/L, 作用时间为 1 h, 改变细胞密度, 发现药物作用效果与细胞密度有关, 如图 4。

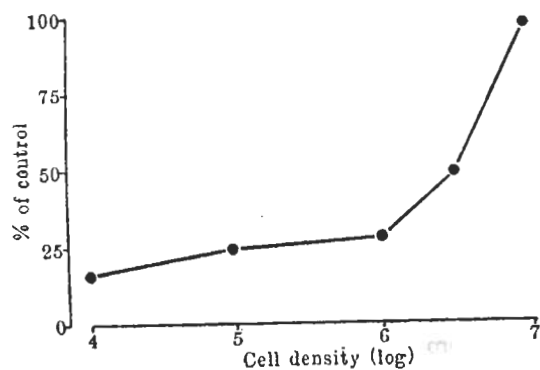


Fig 4. Effect of homoharringtonine 40 nmol/L on the content of *c-myc* mRNA in cytoplasm of HL-60 cells treated at different densities for 1 h.

作用 2 h 后洗去药物, *myc* mRNA 含量迅速回复, 说明 HHRT 对 *myc* mRNA 的作用是可逆的。

**高三尖杉酯碱对不同基因 mRNA 含量的**

**影响** HHRT 40 nmol/L 处理 HL-60 细胞, 细胞内高表达的癌基因 *c-myc*, *N-ras* 和正常基因  $\beta_2$  的 mRNA 含量随着药物作用时间的延长呈不同程度的下降趋势。作用 1 h 后, 其含量分别降至对照的  $18 \pm 9$ 、 $70 \pm 3$  和  $96 \pm 3\%$ 。低表达的 *fos* 和 *erb B* 基因的 mRNA 在药物作用前后都检测不出。HHRT 作用 1 或 2 h 后胞质内总 RNA 含量未见显著变化 ( $p > 0.05$ )。因为 rRNA 占胞质总 RNA 的 80% 以上, 因此可以认为 rRNA 含量不受 HHRT 影响。说明不同基因的 mRNA 对 HHRT 作用的敏感性不同, 依次为 *c-myc*, *N-ras*,  $\beta_2$ , rDNA (图 5)。

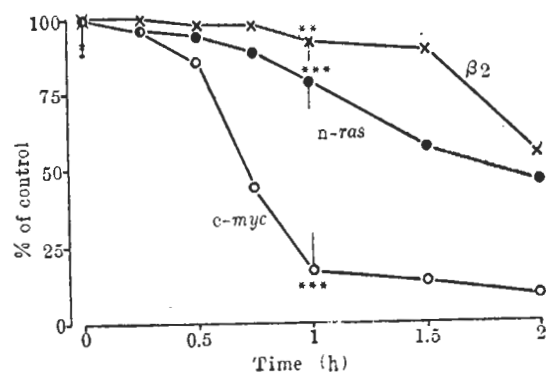


Fig 5. Effects of homoharringtonine 40 nmol/L on the content *c-myc*, *N-ras* and  $\beta_2$  mRNA in cytoplasm HL-60 cells.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  vs 0 h.

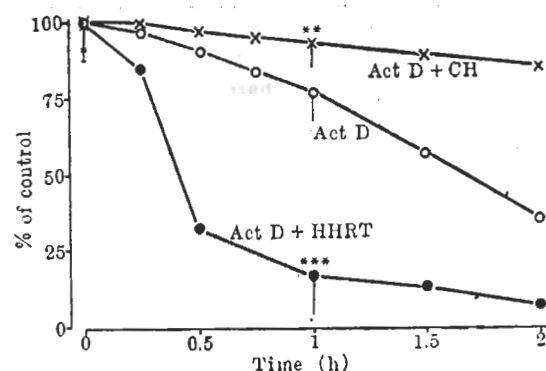


Fig 6. Stability of *c-myc* mRNA in cytoplasm of HL-60 cells. Actinomycin D (Act D)  $1.0 \mu\text{mol/L}$  plus saline or plus homoharringtonine 40 nmol/L or plus cycloheximide (CH)  $1.0 \mu\text{g/ml}$ .  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  vs Act D group.

**高三尖杉酯碱对 myc mRNA 稳定性和核质转运的影响** HHRT 降低 myc mRNA 的稳定性而放线菌酮作用与之相反。HHRT 40 nmol/L 处理, 1 h 后, myc mRNA 含量降低 80 ± 6%, 放线菌酮 1.0 μg/ml 使 myc mRNA 含量降低 15 ± 8%, 对照组(只加放线菌素D)降低 28 ± 4%。说明 HHRT 抑制蛋白质生物合成的机理不同于放线菌酮。

HHRT 40 nmol/L 处理 HL-60 细胞 2h, 分离出细胞核, 测其 mRNA 核质转运能力, 结果表明 HHRT 对 myc mRNA 核质转运无显著影响(p>0.05)。

#### 高三尖杉酯碱对大分子合成的影响

HHRT 40 nmol/L 处理 HL-60 细胞不同时间, 分别测定细胞内 [<sup>3</sup>H]TdR 和 [<sup>3</sup>H]Leu 的参入量, 同时用点杂交法测 myc mRNA 的含量, 结果表明, myc mRNA 的变化早于蛋白质合成和 DNA 合成的变化。

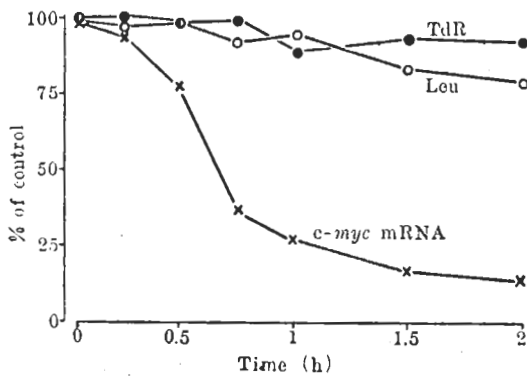


Fig 7. Effects of homoharringtonine 40 nmol/L on incorporation of [<sup>3</sup>H]TdR or [<sup>3</sup>H]Leu and content of c-myc mRNA in cytoplasm of HL-60 cells.

**形态学观察** HHRT 40 nmol/L 处理 HL-60 细胞 2 h 后进行形态学观察。光镜、扫描电镜、透射电镜和细胞化学染色观察均未见明显损伤。说明 myc mRNA 的变化先于形态学变化, 是 HHRT 作用的早期事件。

#### 讨 论

本工作系统地研究了抗癌植物药高三尖杉

酯碱对癌基因表达的影响, 发现 HHRT 对 c-myc 基因有一定的选择性, 药物作用的主要环节是 mRNA 降解。产生选择性的原因尚未弄清, 推测这与 c-myc 表达受转录后调控的特点有关。有人认为 c-myc 表达下降是造血细胞分化的关键<sup>(7)</sup>。本实验中尽管有广泛的 c-myc mRNA 水平降低, 细胞分化效应并不明显, 说明 c-myc 表达下降并不足以使细胞分化。

β<sub>2</sub> 微球蛋白是一种结构蛋白, 它代表着细胞内大部分基因的表达状态<sup>(8)</sup>。在本实验中, 尽管其变化明显弱于 c-myc 和 N-ras, 但其下降的趋势是肯定的。说明 HHRT 可降低各种蛋白的 mRNA 在胞质内的含量。

高三尖杉酯碱在结构和作用上类似于三尖杉酯碱, 文献报道二者的作用机理为抑制蛋白质和 DNA 的生物合成, 但具体的分子机理和药物的原发效应一直众说纷纭<sup>(9-11)</sup>。本实验发现, HHRT 可加速 mRNA 降解, 降低胞质内翻译模板, 从而抑制蛋白质合成。结合放射性核素前体参入实验和形态学观察发现, 这是 HHRT 作用的原发效应。

**致谢** 本工作曾得到陈瑞婷副研究员指导, 戴志强、俞月桂和袁幸菊等同志的大力协助。

#### 参 考 文 献

- Xu B. Pharmacology of some natural products of China. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2 : 271
- 陈瑞婷, 花 泽, 胥 彬. 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的药理研究. *科学通报* 1980; 26 : 859
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J, eds. *Molecular cloning*. 1st ed. NY : CSH, 1982 : 52-105
- Favaloro J, Freisman R, Kaman R. Transcription maps of polyoma virus-specific RNA. *Methods Enzymol* 1980; 65 : 718
- Perbal B. *A practical guide to molecular cloning*. 1st ed. NY ; Wiley, 1984 : 385-419
- Marzluff WF, Huang CC. Transcription of RNA in isolated nuclei. In: Hames BD, Higgins SJ, eds. *Transcription and translation*. Oxford : IRL, 1984 : 123
- Mitchell RL, Zokas L, Schreiber RD, Verma IM. Rapid induction of the expression of

- proto-oncogene *fos* during human monocytic differentiation. *Cell* 1985, 40 : 209
- 8 Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P. Cell-specific regulation of *c-myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 1983, 35 :603
- 9 Huang MT, Harringtonine, an inhibitor of initiation of protein biosynthesis. *Mol Pharmacol* 1975, 11 : 511
- 10 Fresno M, Jiménez A, Vázquez D. Inhibition of translation in eukaryotic system by har-ringtonine. *Eur J Biochem* 1977, 72 : 323
- 11 吴冠芸、方福德、左 瑾。三尖杉酯碱抑制蛋白质生物合成机制的初步研究。药学报 1984, 19 : 167

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 Nov, 9 (6) : 565-569

## Effects of homoharringtonine on several oncogene mRNAs in HL-60 cells

LIU Jie, YANG Sheng-Li, XU Bin

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** The effects of homoharringtonine (HHRT) on several oncogene mRNAs in HL-60 cells were investigated by molecular hybridization technique. The results showed that HHRT decreased the content of *c-myc* RNA in the cytoplasm but not in the nuclei. When the cells were exposed to HHRT at 40 nmol/L for 1 h, the contents of *c-myc*, *N-ras*,  $\beta 2$  microglobulin mRNAs and rRNA declined by 82, 30, 3.5 and 0%, respectively. The effects of HHRT were related not only to its concentration, but also to its cell density. Fur-

ther analysis indicated that HHRT accelerated the degradation of oncogene mRNA in the cytoplasm, but did not alter *c-myc* mRNA transportation. The change of *c-myc* mRNA occurred earlier than that of morphology or DNA protein biosyntheses. It is considered to be the primary effect of HHRT.

**KEY WORDS** homoharringtonine; oncogenes; nucleic acid hybridization; messenger RNA stability; messenger RNA transportation