

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: B200326017

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

人参皂甙Rg1组合诱导人成骨肉瘤MG-63细胞
分化过程中核基质蛋白的变化研究

**Study on the changes of nuclear matrix proteins during the
differentiation of the osteosarcoma MG-63 cells induced by
effective ingredients from Chinese materia medica**

石 松 林

指导教师姓名: 李祺福 教授 博士生导师

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007-4-12

论文答辩时间: 2007-5-30

学位授予日期:

答辩委员会主席: 郑志竝

评 阅 人: _____

2007 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

中文摘要.....	6
ABSTRACT	8
前 言	11
1. 中药作用机理现代生物学研究的科学意义及其重要研究方向	11
2. 肿瘤细胞诱导分化研究的理论与实践意义及发展方向	13
3. 中药有效成分诱导肿瘤细胞分化研究	18
4. 核基质与核基质蛋白的研究	22
5. 细胞核基质异常与细胞癌变	25
6. 人成骨肉瘤细胞的生物学特性与肿瘤细胞终末分化诱导研究	27
7. 本论文具体研究工作及其科学意义	31
材 料 与 方 法	34
1. 肿瘤细胞培养	34
2. 诱导分化处理	34
3. 光学显微镜样品的制备与观察	35
4. 电子显微镜样品的制备与观察	35
5. 生长曲线测定	35
6. 细胞周期测定	35
7. 骨结节形成观察样品制备	36
8. I 型胶原表达观察样品制备	36
9. 骨钙蛋白 (Osteocalcin) 与骨粘素 (Osteonectin) 表达观察样品制备	36
10. 人成骨肉瘤 MG-63 细胞癌基因 c-fos、c-myc 产物表达观察样品制备	37
11. 人成骨肉瘤 MG-63 细胞抑癌基因 Rb、p27 产物表达观察样品制备	37
12. 核基质-中间纤维系统观察样品制备	38
13. 诱导分化前后人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质蛋白样品选择性抽提	38
14. 核基质蛋白双向凝胶电泳分离与凝胶图像分析	39
(1) . 2-DE	39
(2) . 凝胶染色	39
(3) . 图像分析	40
15. 诱导分化前后差异核基质蛋白的胶内酶解	40
16. 诱导分化前后差异核基质蛋白的质谱鉴定	41
17. Western blotting 分析	41
18. 特异核基质蛋白的激光共聚焦显微镜样品制备与观察	41
实 验 结 果	43
1. 人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合对人成骨肉瘤 MG-63 细胞终末分化的诱导作用结果	43
1.1. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞增殖抑制作用	43
1.1.1. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞生长影响	43
1.1.2. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞周期的影响	44
1.2. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞形态与超微结构的影响	45
1.2.1. 光学显微镜观察	45
1.2.2. 透射电子显微镜观察	46
1.3. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞相关癌基因、抑癌基因表达的影响	46

1.3.1. 癌基因 c-fos 表达产物的变化.....	46
1.3.2. 癌基因 c-myc 表达产物的变化.....	47
1.3.3. 抑癌基因 Rb 表达产物的变化.....	47
1.3.4. 抑癌基因 p27 表达产物的变化.....	48
1.4. 终末分化指标的观察.....	48
1.4.1. 骨钙蛋白的表达观察.....	48
1.4.2. 骨粘素的表达观察.....	48
1.4.3. 骨结节形成观察.....	49
1.4.4. 钙化糖原颗粒的形成观察.....	49
2. 人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合对人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统构型的影响观察.....	50
2.1. 光学显微镜观察.....	50
2.2. 透射电子显微镜观察.....	50
3. 人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合诱导 MG-63 细胞分化过程中核基质蛋白表达的变化.....	52
3.1. 双向凝胶电泳与图像分析.....	52
3.2. MALDI-TOF 质谱分析与数据库检索结果.....	54
4. 人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合诱导 MG-63 细胞分化过程中差异表达核基质蛋白的验证.....	59
4.1. 差异表达核基质蛋白的 Western blot 验证结果.....	59
4.2. 荧光显微镜对差异核基质蛋白表达的定位与确认.....	60
4.2.1. Actin 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统的定位和表达.....	60
4.2.2. Vimentin 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统的定位和表达.....	61
4.2.3. Prohibitin 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统的定位和表达.....	61
4.2.4. NPM 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统的定位和表达.....	61
4.2.5. HnRNP 在 MG-63 细胞核基质-中间纤维系统的定位和表达.....	62
5. 人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合诱导 MG-63 细胞分化过程中特异核基质蛋白与相关癌基因、抑癌基因的共定位观察.....	62
5.1. NPM 和 c-Fos 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	62
5.2. NPM 和 c-Myc 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	63
5.3. NPM 和 Rb 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	64
5.4. NPM 和 MTP53 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	65
5.5. Prohibitin 和 c-Fos 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	65
5.6. Prohibitin 和 c-Myc 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	66
5.7. Prohibitin 和 Rb 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	67
5.8. Prohibitin 和 mt p53 在人成骨肉瘤 MG-63 细胞内的共定位观察.....	68
讨 论.....	69
1. 人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合对人成骨肉瘤 MG-63 细胞终末分化的诱导效果.....	69
1.1. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞增殖抑制作用与细胞周期调控效果.....	69
1.2. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞形态与超微结构恶性表型特征的影响.....	70
1.3. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞癌基因和抑癌基因表达的影响.....	71
1.4. 中药有效成分组合(RCT)对 MG-63 细胞终末分化指标的表达的影响.....	73
2. 人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞分化过程中对核基质构型变化的影响.....	74

3.差异表达核基质蛋白与人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞分化的关系.....	76
3.1. 人成骨肉瘤 MG-63 细胞分化过程中差异表达的核基质蛋白	77
3.2. 结构性核基质蛋白的差异表达与 MG-63 细胞诱导分化的关系	80
3.2.1. Vimentin 和 Actin 差异表达	80
3.2.2. LaminA/C 和 LaminB.....	81
3.3. 功能性蛋白的差异表达与 MG-63 细胞诱导分化的关系	83
3.3.1.特异性核基质蛋白 Prohibitin 在 RCT 诱导 MG-63 细胞分化中的作用.....	83
3.3.1.1. Prohibitin(PHB)	83
3.3.1.2. Prohibitin 与原癌基因 c-fos、c-myc	84
3.3.1.3. Prohibitin 与抑癌基因 p53.....	86
3.3.1.4. Prohibitin 与抑癌基因 Rb	87
3.3.1.5. Prohibitin 小结:	88
3.3.2. 特异性核基质蛋白 Nucleophosmin (NPM)在人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖分化中的作用.....	89
3.3.2.1. Nucleophosmin (NPM)	89
3.3.2.2. Nucleophosmin 与原癌基因 c-fos、c-myc	90
3.3.2.3. Nucleophosmin 与抑癌基因 Rb.....	91
3.3.2.4. Nucleophosmin 与抑癌基因 p53.....	92
3.3.2.5. Nucleophosmin 小结	93
3.3.3. MSH3 (DNA 错配修复蛋白).....	94
3.3.4. Annexin A1	95
3.3.5. Mago nashi 同源蛋白	96
3.3.6. TRIP-1 (TGF- β receptor interacting protein)	97
3.3.7. hnRNP A2/B1.....	98
3.3.8. Mitosin/CENP-F	99
3.3.9. 其它的蛋白.....	100
4.人参皂甙 Rg1 等中药有效成分组合诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞终末分化的调控机制	101
结 论	106
论 文 创 新 点.....	107
参 考 文 献.....	109
图 版 及 说 明:	132
缩 略 语	160
致 谢	161

作者姓名：石松林

论文题目：人参皂甙Rg1组合诱导人成骨肉瘤MG-63细胞分化过程中核
基质蛋白的变化研究

作者简介：石松林，男，1974年2月出生，2001年9月师从于厦门大学李祺福教授。

中文摘要

本研究以人参皂甙 Rg1、肉桂酸、丹参酮 II A 等中药有效成分组合 (RCT) 处理人成骨肉瘤 MG-63 细胞, 鉴定中药有效成分对人成骨肉瘤细胞终末分化的诱导效果。在此基础上, 综合应用亚细胞蛋白质组学及免疫细胞化学分析等技术, 对 MG-63 细胞诱导分化过程中的核基质蛋白变化进行了系统研究。分析鉴定和确证与肿瘤细胞增殖分化相关的特异核基质蛋白, 并研究特异核基质蛋白与人成骨肉瘤细胞相关癌基因、抑癌基因在细胞内的共定位关系与变化, 探索它们在肿瘤细胞诱导分化过程中的调控作用。以期能够在较为整体水平上阐明中药有效成分诱导肿瘤细胞分化的作用机制并进一步认识细胞癌变与逆转调控机理。

实验结果显示, 33 μ g/mL 人参皂甙 Rg1+2mmol/L 肉桂酸+0.3 μ g/mL 丹参酮 II A 的组合能有效抑制人成骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖活动, 细胞增殖抑制率达 72.37%, G0/G1 期的细胞比例由 47.5% 上升为 72.5%, S 期细胞比例由 20% 下降为 7.3%, 细胞周期被阻滞于 G0/G1 期; 光镜和透射电镜观察结果显示, 经 RCT 诱导处理后的 MG-63 细胞出现了细胞形态规则、核质比例减小、细胞核形状规则、核内异染色质减少、常染色质增多、线粒体和粗糙型内质网增多、高尔基体结构较为典型、细胞表面微绒毛减少等变化; 人成骨肉瘤细胞终末分化标志物 I 型胶原、骨钙蛋白、钙化糖原颗粒增多并形成典型的骨节结结构; 免疫细胞化学检测结果显示, 癌基因 c-fos 和 c-myc 表达产物减少, 抑癌基因 Rb 和 p27 的表达产物增多。选择性抽提整装光镜和电镜观察显示, 经 RCT 组合处理的 MG-63 细胞的核基质纤维和中间纤维丰富, 分布均匀, 单丝成份增多, 并分别与核纤层密切连系, 形成贯穿核质区域的

较为规则的网络结构。双向凝胶电泳及 MALDI-TOF 质谱分析共鉴定出 17 个在 MG-63 细胞分化前后存在差异表达的核基质蛋白, 其中表达上调的主要有 Msh3、Annexin A1、Vimentin、Cep290 等 7 种蛋白, 表达下调的有 Prohibitin、Nucleophosmin、hnRNP A2/B1、Actin、TRIP-1、Lamin-B1、Lamin-A/C、Mitosisin 等 10 种蛋白。蛋白印迹杂交与免疫荧光显微镜观察确证了 Vimentin、Actin、hnRNP、Nucleophosmin 和 Prohibitin 等在 MG-63 细胞分化过程中的表达变化。免疫荧光激光共聚焦显微镜观察结果显示 Prohibitin、Nucleophosmin 与癌基因 c-myc、c-fos 和抑癌基因 p53、Rb 表达产物有共定位关系, 它们的表达水平和细胞定位在诱导分化前后发生了变化。

研究表明, RCT 组合能有效抑制人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖活动, 改变 MG-63 细胞形态与超微结构特征, 下调癌基因 c-fos、c-myc 和上调抑癌基因 p27 和 Rb 等的表达, 并增强 I 型胶原、骨钙蛋白、骨粘素的表达和钙化糖原颗粒及典型骨结节的形成, 从而对人成骨肉瘤细胞的终末分化具有显著诱导作用。在 RCT 组合诱导 MG-63 细胞分化过程中, 其核基质-中间纤维系统构型特征产生了恢复性改变, 并出现了多种核基质蛋白表达水平的显著变化。其中 Nucleophosmin、Prohibitin、hnRNP、Vimentin 和 Actin 为 MG-63 细胞分化的共同差异核基质蛋白。而 Prohibitin 和 Nucleophosmin 分别与 c-fos、c-myc、p53、Rb 均存在共定位关系并在 MG-63 细胞分化过程中出现分布和位移变化现象。由此证实了 RCT 组合能够干预 MG-63 细胞相关癌基因、抑癌基因的活性, 改变一些与细胞 DNA 复制、RNA 转录加工与运输、基因表达和信号转导相关的重要核基质蛋白的表达, 进而阻滞细胞周期, 促使人成骨肉瘤细胞分化。从而为在较为整体的水平上深入研究中药有效成分诱导肿瘤分化过程中相关癌基因和抑癌基因表达、细胞信号转导和细胞周期调控及其相互作用等一系列细胞生命活动过程的相互关系提供了科学依据与探索研究的新方向, 并为肿瘤的病理诊断和抗癌药物研究等提供新的靶向性蛋白。

关键词: 中药有效成分; 成骨肉瘤; 终末分化; 核基质;

Study on the changes of nuclear matrix proteins during the differentiation of the osteosarcoma MG-63 cells induced by effective ingredients from Chinese materia medica

Shi Songlin

ABSTRACT

In this study, the combination of effective ingredients from Chinese materia medica (33 μ g/mL ginsenoside Rg1, 2mmol/L cinnamic acid and 0.3 μ g/mL tanshinone II A, shortened form RCT in this paper) was used to induce the osteosarcoma MG-63 cells into terminal differentiation, and its effects were investigated by cellular biology and immunocytochemistry. The differentially expressed nuclear matrix proteins were analyzed by subcellular proteomics methods and laser confocal scanning microscope in order to find out a new way to explore the molecular mechanisms of carcinogenesis and malignant phenotypic reversion in a systematic level.

The results revealed that the proliferation of MG-63 cells were inhibited, as the percentage of cells increased from 47.5% to 72.5% in G0/G1 phase while decreased from 20.0% to 7.3% in S phase. The malignant morphological and ultrastructural characteristics were reversed towards the normal related cells, e.g., the morphology of the cells were regular and inclined to the same volume, the nucleo-cytoplasm ratio lessened, the heterochromatin decreased while euchromatin increased, the organelle increased and their structure appeared well-developed, typical and polarized, microvilli were rare on the cellular surface. The expression level of the phenotype markers of osteoblast such as collagen, osteocalcin and osteonectin, was upregulated and the typical mineralized bone nodules could be observed under light microscopy in the treated cells. Immunocytochemistry assay revealed that the expression level of oncogene including c-myc, c-fos was downregulated, while the expression level of tumor suppressor genes

including p27, Rb was upregulated. The configuration of nuclear matrix-intermediate filament was altered towards the normal related cells as the filament was more abundant, the distribution was regular and the filaments of nuclear matrix, nuclear lamina and intermediate filament connected tightly into a compact meshwork. Nuclear matrix proteins, selectively extracted from MG-63 cells treated with or without RCT, were subjected to proteomic analysis. Seventeen differentially expressed proteins were identified, including up-regulated proteins Msh3, Annexin A1, Vimentin, mago nashi homolog, Cep290 and Pseudouridylate synthase 7 homolog ; down-regulated proteins Prohibitin, Nucleophosmin, hnRNP A2/B1, Actin, TRIP-1, Lamin-B1, Lamin-A/C and Mitosin. Most of them are related to DNA replication and repair, cell cycle regulation, gene expression and regulation. Some proteins were confirmed by western blot and immunofluorescence analysis. Prohibitin and nucleophosmin, two of the specific nuclear matrix proteins, were colocalized with oncogene c-fos and c-myc products, as well as tumor suppressor gene p53 and Rb products. The expression level and location of them were changed following the proliferation and differentiation of MG-63 cells.

Our study showed that the osteosarcoma MG-63 cells were induced into terminal differentiation after treatment with RCT, as the proliferation of MG-63 cells were inhibited, the cell cycle were arrested in G0/G1, the malignant morphological and ultrastructural characteristics were reversed, the configuration of nuclear matrix-intermediate filament was altered, the expression of the osteoblast-like phenotype markers were highly increased. Some nuclear matrix proteins which play an important role in DNA replication and repair, cell cycle regulation, gene expression and regulation, have changed in expression level and location during the differentiation. The colocalization of prohibitin and nucleophosmin with products of osteosarcoma associated oncogenes c-myc, c-fos and tumor suppressor genes Rb, p53, suggested the pathway and mechanisms in which specific nuclear matrix proteins regulated the proliferation and differentiation of the human osteosarcoma MG-63 cells. These results indicated that RCT can induce MG-63 cells into terminal differentiation by regulating the activities of some oncogenes and antioncogenes, altering the expression of some key nuclear matrix proteins, arresting cell cycle, and facilitating the expression of osteoblast-like phenotype

markers. Our study provides the proofs and a new way to explore the mechanisms and the relationships of a series of life activities during the differentiation in tumor cells induced by effective ingredients from Chinese materia medica, e.g., the expression of oncogenes and tumor suppressor genes, signal transduction, and cell cycle regulation. Besides, this study provides several potential target proteins for cancer diagnosis and cancer therapy.

Keyword : effective ingredients from Chinese materia medica ;
osteosarcoma; terminal differentiation; nuclear matrix

厦门大学博硕士学位论文摘要

前 言

1. 中药作用机理现代生物学研究的科学意义及其重要研究方向

中药作用机理研究是中药发展与现代化的关键。中医中药在我国具有悠久的历史，是我国人民在医学领域所积累的宝贵财富，其有效的实践和丰富的知识中蕴涵着深厚的科学内涵。如何应用现代科学理论与技术，进一步挖掘开发这一祖国医学宝库，是当代生命科学与医学领域所面临的重要课题。中药存在着作用机理不明晰等许多亟待解决的问题，这已经成为中医药学能否在新的历史时期得到发展的束缚。因此，要使中药继续发展并走向世界，出路只有现代化。中药现代化的核心内容就是在中医药理论的指导下，用现代生物学技术阐明中药的作用机理，并研制出用于临床治疗且机理明确的药物。其主要内涵之一就是阐明中药学中的机制与规律问题，更加准确有效的发挥中药的作用，简而言之就是阐明中药作用机理的现代生物学研究。中药作用机理研究的突破与否正是制约整个中药现代化进程的主要关键问题，也是当前中药现代化研究的主要方向^[1]之一。我国为促进中医药发展而制定的相关发展规划^[2,3]中也明确指出，在中药现代化发展的重要任务中，要加强多学科交叉配合，深入进行中药药效物质基础、作用机理、方剂配伍规律等研究，积极开展中药基因组学、蛋白组学等的研究。

中药药效的物质基础和作用机理研究是中药科学化和现代化的关键，目前对于中药药物特异作用及药物作用机理进行的研究，现已发展到细胞、亚细胞和分子水平。通过综合运用细胞、生化、分子生物学、蛋白质组学等细胞和分子生物学研究技术手段，对中药有效成分的作用机理进行深入研究，以期揭示复杂的中药作用体系中的有效成分及其对机体的作用机制，这不仅对于新药开发及中药走向现代化具有重要的理论与实践意义，而且对于揭示各种疾病的病理变化过程，和寻找新的治疗理论与方法提供了基础。

在目前的中药作用机理研究方面，虽然已经做了一些工作，但是仍远未取得关键性进展。中药的作用机理是多靶点、多环节地调节疾病过程中的病理生理变化而起到治疗作用，但目前进行的中药有效成分作用机理研究，存在较大的局限性和片面性：如药物选择单味药及单一有效成分较多，缺乏对中药多种药效成分相互协同

作用的研究；药效作用往往沿袭了生命科学中对单一的基因、酶、信号转导通路表达变化的影响研究，缺乏从整体的角度，从细胞生物学的水平上系统多方位的研究中药有效成分对细胞的各种作用，割裂了中药整体作用机理研究的核心理论体系，从而无法从细胞或机体的整体水平上深入揭示中药的作用机理问题。为解决目前中药作用机理研究存在的问题，必须引入系统生物学的研究方法，在较为整体的水平上进行中药作用机理研究。

系统生物学 (systems biology) 是研究一个生物系统中所有组成成分的构成，以及在特定条件下这些组分间的相互关系，从而揭示生命系统的基本规律的学科^[4,5]。系统生物学的核心是整体观，把研究对象作为整体加以研究，而中药这一复杂体系也强调其作用的整体性，因而系统生物学方法对于中药作用机理的研究具有非常重要的意义。从系统生物学的角度出发，在细胞分子生物学水平上，运用细胞、生化、分子生物学、蛋白质组学、基因组学等多种现代生物学技术手段，全面系统地研究中药有效成分对细胞增殖分化、信号转导、基因调控网络代谢途径等多方面生理活动的影响，从而在较为整体的水平上阐明中药有效成分的作用机理问题，为新药开发和细胞生命活动的调控提供理论基础，并为中药作用机理研究指出一个新的方向。

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的一类常见疾病，据世界卫生组织统计，全世界每年癌症发病约 1000 万人，死亡约 700 万人，已成为仅次于心血管病的人类第二杀手。中药是祖国医学用来防治疾病的有力武器，早已被用于肿瘤的治疗。人们发现中药治疗恶性肿瘤，无论是在减轻临床症状，提高生存质量，防止复发转移，延长生存期，还是在与放化疗配合，增效减毒等方面都有很好的效果。近几年研究发现，中药及其有效成分防治肿瘤是通过多靶点、多途径、多环节来实现的，其抗肿瘤的作用机理主要包括调节机体免疫功能、抑制肿瘤血管生长、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化、逆转肿瘤细胞多重耐药性、调节肿瘤细胞信号传导、抑制端粒酶活性和细胞毒作用等^[6]，而对正常细胞几乎无损伤，药物不良反应小，这引起了国内外学者对中药的浓厚兴趣，许多研究工作从不同方面揭示了各种中药的抗肿瘤作用。

蛋白质是生命活动的物质基础，细胞内各种生理功能最终都是通过对各种蛋白的表达与功能的调控来实现的，因而蛋白质组学是系统生物学研究的核心领域。蛋白质组学在蛋白质水平上定量、动态、整体性地研究生物体在特定生理状态下蛋白

质的表达模式及功能模式，最终揭示蛋白质所参与的生命活动的具体过程。肿瘤蛋白组学的研究通过分析肿瘤细胞特定状态下的蛋白质组成，促进了对肿瘤发生发展以及中药抗肿瘤分子机制的认识。从当代的系统生物学角度出发，运用蛋白质组学、免疫分子生物学、细胞生物学技术等现代生物学技术手段，以中药抗肿瘤机理研究为切入点，深入研究肿瘤细胞经抗肿瘤中药处理前后的蛋白质组的变化，阐明肿瘤细胞增殖分化、信号转导、基因调控网络的变化，为在较为整体的水平上深入系统地揭示中药抗肿瘤作用机理提供了一条新的途径和重要研究方向，并可望在中药作用机理研究方面取得突破。

2. 肿瘤细胞诱导分化研究的理论与实践意义及发展方向

2.1. 肿瘤细胞诱导分化研究的理论与实践意义

随着细胞生物学与分子生物学研究的深入发展，国内外现有研究已经充分证明细胞癌变是一种与基因表达紊乱、细胞分化异常密切相关联的疾病^[7,8,9]。肿瘤发生是一个多基因、多阶段、多步骤的过程，涉及到多种癌基因的激活和抑癌基因的失活。细胞增殖信号过强、分化信号传导受到阻抑，从而使细胞增殖分化两者之间的平衡调节失控，导致细胞分化紊乱。肿瘤细胞最显著的生物学特性是无限制增殖和分化异常，因此从发育生物学的角度，癌症可看作是一类细胞增殖失控和分化机制失控异常的疾病。肿瘤细胞起源于一些未分化或微分化的干细胞，本身具有分化潜能又具有分化异常的特性，这为肿瘤治疗提供了新的思路和方法。针对肿瘤细胞增殖分化异常，利用外源性的诱导分化物干预和调节肿瘤细胞相关基因的表达，使肿瘤细胞恶性表型逆转，促使其朝正常细胞方向分化的思路正是肿瘤细胞诱导分化研究基础。诱导分化是指恶性肿瘤在体内外分化诱导剂存在下，恶性肿瘤细胞被诱导重新向正常细胞的方向演变分化的现象，表现为生物学特性包括基因表达方面的诸多表型标志均向正常细胞趋近，甚至完全转变为正常细胞，这种现象称为重分化或再分化(redifferentiation)也即逆转(reversion)^[10]。

恶性肿瘤是严重危害人类健康及生命的一类疾病，目前对于肿瘤的临床治疗主要为手术切除和放射治疗与化学药物治疗相结合，但是这几种传统治疗方法都具有副作用大，治疗效果差，容易复发的问題。寻找更有效的抗癌药物和方法，是

世界医学面临的重要课题。诱导分化作为肿瘤治疗的新型方法，其基本特点在于可不杀伤肿瘤细胞，而是诱导肿瘤细胞分化为正常或接近于正常的细胞。肿瘤细胞诱导分化治疗方法的出现，对于癌症的治疗提供了一种全新的治疗理论与方法，克服了目前肿瘤治疗中的困难和不足之处，是肿瘤临床治疗的根本解决途径。因此，以肿瘤细胞为模型、以逆转肿瘤细胞恶性表型为目的的体外诱导分化研究如能取得突破，不仅可加深对肿瘤发生机理的认识，而且在探索和开辟肿瘤生物治疗的抗癌新途径以及肿瘤细胞诱导分化药物的筛选等方面具有十分重要的实践意义。

对细胞增殖分化的基本规律及其调控机制的揭示是我们理解生物生长和发育等基本生命活动的基础，同时也是当代生命科学基础理论研究的核心内容，对细胞癌变及其逆转机理的研究是揭示细胞增殖分化基本规律的重要途径。肿瘤细胞的诱导分化研究主要通过干预和调控癌细胞的基因表达，促使癌细胞走向分化从而逆转其恶性表型。随着对诱导分化机理研究的深入，发现分化诱导物作用于细胞生长的各个环节，是多步骤、多靶点的复杂过程。这个过程涉及细胞增殖分化、基因表达调控、信号转导和细胞周期调控机制等问题，其调控过程是通过一个非常复杂精密的调控网络实现的，是一系列基因的表达与各种调控因子协同作用的复杂过程。不同种类的分化诱导物对不同的癌细胞诱导分化机制也有所不同。因此，深入的进行肿瘤细胞的诱导分化研究不仅对于我们深入揭示肿瘤细胞发生、发展与恶性表型逆转的机理具有重要意义，而且对于阐明细胞增殖与分化的关系及其调控机制具有重要理论意义。肿瘤细胞的诱导分化研究不仅是当前细胞生物学与肿瘤细胞分子生物学研究的核心问题之一，也是当代生命科学研究中最重要、最引人注目的前沿领域。

2.2. 肿瘤细胞诱导分化研究的发展方向

肿瘤细胞诱导分化的研究开始于上世纪七十年代，早在 1960 年 Pirece^[7]就已证实小鼠睾丸畸胎瘤可自发的分化成良性瘤，随后 Firend 在 1971 年报道二甲基亚砷（DMSO）诱导小鼠的红白血病细胞合成血红蛋白，几乎同期几位学者有关化学物质的诱导分化实验也广泛证实肿瘤细胞可再分化现象。迄今人们对细胞癌变机理有了比较全面的认识，诱导分化研究的重点与方向也逐渐从体外培养肿瘤细胞诱导分

化的现象观察逐渐深入到对分化诱导物作用机理的探讨、肿瘤细胞终末诱导分化和联合诱导分化研究以及更具潜在临床应用价值的新型诱导分化物的找寻等方面。

肿瘤细胞诱导分化机理研究是今后肿瘤细胞诱导分化研究的重要内容。尽管详尽的诱导分化作用机理现在并不清楚,但我们知道肿瘤细胞诱导分化并非是肿瘤细胞恶性转化的一个完全相反过程。诱导肿瘤细胞终末分化是一个涉及多环节、多步骤、多靶点的复杂过程,不同种类的诱导分化物对同一种肿瘤细胞以及同一种诱导分化物对不同肿瘤细胞的诱导分化机制也有所不同,其确切的作用机理尚待深入探索。从分子生物学的角度出发,诱导分化物作用的机制主要可以归纳为几个方面:(1)通过对肿瘤细胞相关癌基因、抑癌基因(如 p21、p16、p53、Rb、c-myc 等参与细胞周期调控网络调节增殖与分化相关的基因)的干预,调控细胞周期的进程,即外源的诱导分化物阻止细胞的 G1-S 期的进程,细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。典型的分化诱导物,如 RA、dBcAMP 和丁酸钠 TPA 等在诱导肿瘤细胞分化过程中都发现细胞周期阻滞、c-myc、c-fos、c-jun 等癌基因和突变的抑癌基因 p53 下调以及 p16、p21 和 Rb 等抑癌基因上调的变化^[11-16];(2)对细胞信号系统的调节作用。细胞信号转导是细胞增殖与分化过程的基本调节方式,细胞通过细胞内各种信号转导通路对不同信号做出应答,精确地表达各种基因,对正常细胞的增殖和分化进行调控。调控细胞增殖分化的 cAMP 信号途径、PKC 途径、Ras-Raf-MAPK 途径、磷脂酰肌醇信号途径等信号转导通路与诱导分化关系密切。研究发现 1,25 二羟维生素 D₃ 诱导 HL60 细胞分化过程中 AKT 途径、PI3K 途径激活^[17], RA 诱导人白血细胞分化中 MAPK、cAMP、JNK/MAPK 途径激活^[17-20], 而诱导乳腺癌 MCF-7 细胞分化中则通过激活 PI3K/AKT 途径发挥作用, DAG-PKC 途径也与肿瘤细胞诱导分化密切相关^[21]。除了对细胞信号系统的蛋白激酶有调节作用之外,信号转导通路中间分子效应物的转录活性也受到不同程度的调节。

(3) 诱导分化物对细胞膜表面的膜抗原,膜的生化特性、膜的电位等也有一定的影响,如维甲酸、DMSO 等在癌细胞分化诱导的早期,都能改变膜脂和蛋白的组成,使抗原以及膜受体发生改变。

当前对肿瘤细胞诱导分化机理的研究主要集中在两个方面,其一是诱导分化物对肿瘤细胞基因表达的调控,其二是诱导分化物对信号转导通路的调控。对基因表达调控、细胞信号转导通路及两者间关系的研究是从分子水平深入探索肿瘤细胞诱导分化机理的重要方向。只有从基因表达调控和信号转导通路入手,才能从分子水平真正地

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库