论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1198-03

全反式维甲酸联合三羟异黄酮对肺癌细胞增殖及凋亡的影响

周人杰[1],廖卫公[2],杨镇洲[3],戴纪纲[1],肖颖彬[4] (第三军医大学:[1]新桥医院胸外科,[4]新桥医院心血管外科,重庆 400037;[2]高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038,[3]大坪医院野战外科研究所肿瘤科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)联合三羟异黄酮(Genistein)抑制肺癌细胞的增殖和促进其凋亡的作用。**方法** 采用不同剂量ATRA、Genistein及两者联合处理人肺腺癌细胞株A549,观察A549细胞生长情况并运用MTT法检测其生长抑制情况,流式细胞仪进行细胞周期分析及凋亡率检测。**结果** A549肺癌细胞经ATRA、Genistein及两者联合处理后,细胞增殖能力明显下降,更多的细胞被阻滞于G_2/M期,细胞凋亡明显增加,其中以两者联合用药最为显著。**结论** ATRA联合Genistein能协同抑制肺癌A549细胞的恶性增殖并促进其凋亡。

关键词: ATRA;Genistein;肺癌细胞;增殖;凋亡

中图法分类号: R730.23; R734.2; R979.1 **文献标识码:** A

Effect of ATRA and/or Genistein on proliferation and apoptosis of human lung carcinoma cell line A549

ZHOU Ren-jie[1], LIAO Wei-gong[2], YANG Zhen-zhou[3], DAI Ji-gang[1], XIAO Ying-bin[4] ([1]Department of Thoracic Surgery, [4]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Chongqing 400038, [3]Department of Cancer, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) and/or Genistein on the proliferation and apoptosis of human pulmonary carcinoma cell line A549 *in vitro*. **Methods** The A549 cells were treated with ATRA at the dose of $(5, 10, 50)\times10^{-6}$ mol/L, and/or Genistein at the dose of $(10, 20, 40)\times10^{-6}$ mol/L for 1 – 7 d. The proliferation of A549 was assessed by MTT and cytometry, and the rate of apoptosis was analyzed by flow cytometry. **Results** ATRA and Genistein combination could obviously inhibit the growth of A549 cells, arrested the cells in G_2/M phase and induced more cell apoptosis. **Conclusion** Genistein could enhance the effect of ATRA on proliferative suppression and apoptosis induction of A549 cells.

Key words: all-trans retinoic acid; Genistein; lung cancer; proliferation; apoptosis

肿瘤的诱导分化及凋亡治疗是当今的研究热点之一。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是目前比较理想的诱导分化剂。1988年王振义等将其成功地应用于治疗急性早幼粒细胞白血病,初治完全缓解率可达88%。其对肺癌的防治作用也越来越受到广大学者的青睐。但单用ATRA也有缺陷,一方面其毒副作用大、易产生继发性耐药;另一方面国外最近用ATRA前体——β-胡萝卜素保护肺癌高风险人群的2个大样本实验结果已提示:高剂量的β-胡萝卜素摄入,非但不能保护吸烟及接触石棉的人群,反而增加了肺癌发生的风险[1];三羟异黄酮(Genistein)是大豆中的重要非营养素成分,是一种天然的酪氨酸蛋白激酶抑制剂。目前有关其生物学效应的研究越来越多。Genistein既能抑制肿瘤细胞增殖,又有促进其凋亡、抑制血管生成的作用[2,3]。故从理论上推测Genistein作为肺癌化疗药物可能具有广泛的应用前景。为探讨ATRA与Genistein在抑制肺癌细胞增殖及促进其凋亡过程中是否有协同机制,我们采用不同剂量ATRA、Genistein及两者联合处理人肺腺癌细胞A549,研究两者对肺癌细胞的增殖及凋亡的影响。

基金项目: 第三军医大学科研基金资助项目(2004D113)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2004D113)

作者简介: 周人杰(1971 –),男,浙江省慈溪市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事生物学治疗方面的研究,电话:(023)68774724,E-mail: zhou_rj@yahoo.com.cn

通讯作者: 肖颖彬,电话:(023)68755607,E-mail: xiaoyb@vip.sina.com

收稿日期: 2006-02-27;**修回日期:** 2006-04-06

1　材料与方法

1.1　材料

人肺腺癌细胞株 A549（由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所廖伟博士惠赠），于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中，37 ℃，5% CO_2 条件下常规培养、传代。实验材料包括：RPMI1640 培养基、胎牛血清均为美国 Gibco 公司产品，ATRA、Genistein 为美国 Sigma 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　ATRA、三羟异黄酮配制　ATRA 溶于无水乙醇配成 10 mmol/L，－30 ℃避光保存，临用前用 RPMI1640 培养液稀释，处理细胞浓度设 5、10、50 μmol/L 3 个浓度。Genistein 溶于无水乙醇配成 10 mmol/L，充氮气后储存，临用前用 RPMI1640 培养液稀释，处理细胞浓度设 10、20、40 μmol/L 3 个浓度。

1.2.2　实验分组　ATRA 处理组：将 ATRA 加入细胞培养液中至终浓度为 5、10、50 μmol/L（分别设为 A1 － A3 组）；Genistein 处理组：将 Genistein 加入细胞培养液中至终浓度 10、20、40 μmol/L（分别设为 G1 － G3 组）；ATRA + Genistein 处理组：分别为 5 μmol/L ATRA + 10 μmol/L Genistein、10 μmol/L ATRA + 20 μmol/L Genistein、50 μmol/L ATRA + 40 μmol/L Genistein、5 μmol/L ATRA + 40 μmol/L Genistein、50 μmol/L ATRA + 10 μmol/L Genistein、10 μmol/L ATRA + 40 μmol/L Genistein、50 μmol/L ATRA + 20 μmol/L Genistein（分别设为 C1 － C7 组）；无水乙醇对照组：加入无水乙醇 1.8 μl/孔。各组无水乙醇的总量均为 1.8 μl/孔。

1.2.3　MTT 法测定细胞增殖抑制率　将培养的 A549 细胞调成浓度为 3.6×10^5/ml 的悬液，接种于 96 孔板培养（共 7 块，每组 6 孔/块），每孔加 0.1 ml，培养 24 h 后加入各处理药物，避光 37 ℃培养，每 24 h 换液 1 次，共培养 7 d。每日各取 1 块，每孔加入 1.5 mg/ml MTT，37 ℃培养 4 h 弃上清，加入 200 μl/孔 DMSO 震荡 10 min 使结晶物充分溶解，550 nm 酶联免疫检测仪测吸光度［D(550)］值，取其平均值，计算生长抑制率。生长抑制率 = ｜对照组［D(550)］－药物组［D(550)］｜/对照组［D(550)］×100%。

1.2.4　细胞周期分析及凋亡检测　经 50 μmol/L ATRA 或/和 40 μmol/L Genistein 处理 24 h 后获取细胞，磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤，加入 70% 冷乙醇固定后重新收集细胞，PBS 洗去固定液，加入 RNA 酶反应过夜，与碘化丙锭（PI）染液混匀后用 FACStar plus 流式细胞仪对 DNA 进行定量分析，计算各期细胞所占比例。DNA 含量低于 G_1 期的细胞为凋亡细胞。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件行 t 检验。

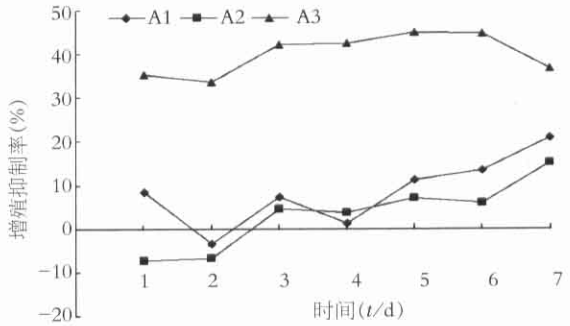
2　结果

2.1　形态学观察

ATRA 5、10、50 μmol/L 单药组、Genistein 10、20、40 μmol/L 单药组及不同浓度两药联合作用 72 h 后，A549 细胞的堆叠性生长状态逐渐消失，细胞质内出现较多空泡和颗粒样堆积物，分裂状态细胞数量减少；HE 染色可见部分细胞核质比回复接近正常，提示细胞逐渐出现增殖抑制和一定的分化倾向。

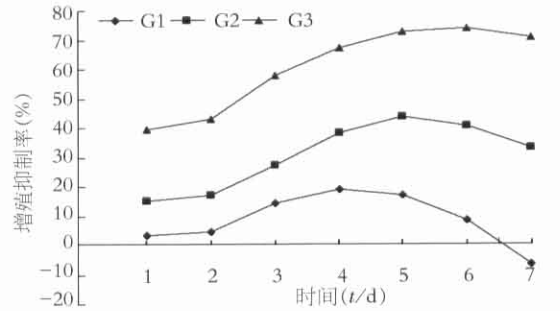
2.2　ATRA 联合 Genistein 对 A549 细胞的生长抑制作用

与对照组相比各处理组 A549 细胞的增殖均有不同程度的抑制，且各组随剂量增加，抑制效果有增强趋势。联合用药组较单药组抑制更明显（图 1 － 3）。由此提示 ATRA 联合 Genistein 具有协同抑制 A549 细胞增殖的作用。



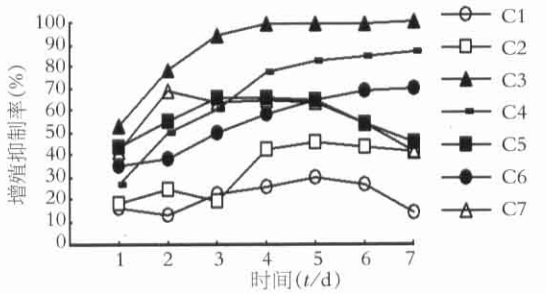
A1：5 μmol/L ATRA 处理组；A2：10 μmol/L ATRA 处理组；A3：50 μmol/L ATRA 处理组

图 1　不同浓度 ATRA 处理组 A549 细胞生长抑制率



G1：10 μmol/L Genistein 处理组；G2：20 μmol/L Genistein 处理组；G3：40 μmol/L Genistein 处理组

图 2　不同浓度 Genistein 处理组 A549 细胞生长抑制率



C1：5 μmol/L ATRA + 10 μmol/L Genistein 处理组；C2：10 μmol/L ATRA + 20 μmol/L Genistein 处理组；C3：50 μmol/L ATRA + 40 μmol/L Genistein 处理组；C4：5 μmol/L ATRA + 40 μmol/L Genistein 处理组；C5：50 μmol/L ATRA + 10 μmol/L Genistein 处理组；C6：10 μmol/L ATRA + 40 μmol/L Genistein 处理组；C7：50 μmol/L ATRA + 20 μmol/L Genistein 处理组

图 3　不同浓度 ATRA + Genistein 处理后，A549 细胞生长抑制率

2.3　ATRA 联合 Genistein 对 A549 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果分析，单用 50 μmol/L ATRA 或 40 μmol/L Genistein 均可使 A549 细胞的 G_0/G_1 期减少，细胞阻滞于 G_2/M 期，并且经 Genistein 处理后这种作用可能更明显；而经两者联合处理的 A549 细胞停滞于 G_2/M 期的比例显著增高，显示

ATRA 与 Genistein 有协同抑制肿瘤细胞分裂的作用(表1)。

表1 各组细胞的细胞周期分布(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	75.94 ±4.75	23.76 ±7.49	0.30 ±0.19
50 μmol/L ATRA 处理组	70.45 ±5.90[a]	27.41 ±13.22	1.25 ±0.74
40 μmol/L Genistein 处理组	60.38 ±6.78[a]	25.31 ±2.18	14.31 ±2.52[a]
ATRA + Genistein 处理组	58.84 ±0.51[ab]	26.12 ±0.36	15.04 ±0.74[ab]

a: $P<0.01$,与对照组比较; b: $P<0.01$,与 50 μmol/L ATRA 处理组比较

2.4 ATRA 联合 Genistein 对 A549 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果提示:当 ATRA 或 Genistein 单药处理 A549 细胞后,细胞凋亡比例[分别为(2.40 ±0.21)%,(2.08 ±0.06)%]较正常组[(1.86 ±0.16)%]有增高趋势,当两者联合应用时凋亡率[(2.71 ±0.12)%]明显高于对照组($P<0.05$)。由此可见,ATRA 联合 Genistein 对 A549 细胞凋亡具有协同促进作用。

3 讨论

肺癌是最常见恶性肿瘤之一,在我国其发病率有逐年增高的趋势。肺癌常规化疗效果不甚理想,基于细胞毒作用的传统抗癌药难以避免选择性差、毒副作用强等缺点,而分化诱导剂的研究具有良好的发展前景,其中一些天然物质及其衍生物对肿瘤的诱导分化作用越来越受到重视[4]。全反式维甲酸(ATRA)是维生素 A 代谢产物之一,可以诱导多种肿瘤细胞分化、逆转多种肿瘤细胞的恶性表型,也是最早应用于临床并取得较好疗效的诱导分化剂之一。本实验证实:ATRA 不但可以抑制 A549 细胞的快速增殖、并能诱导其凋亡,显示 ATRA 应用于肺癌的临床化学治疗可能具有一定的发展前景。但 ATRA 目前应用于临床的治疗剂量毒副反应较大,易导致肝功能异常、口唇干裂等不良反应的发生,这就限制了其临床应用[5]。因此,探索低剂量多药联合应用,是肿瘤药物研究的一个重要方向[6]。

Genistein 是大豆中的重要非营养素成分,是一种天然的酪氨酸蛋白激酶抑制剂。目前有关 Genistein 生物学效应的研究越来越多。流行病学调查显示 Genistein 摄入量与某些实体瘤(如乳腺癌和前列腺癌等)和一些慢性疾病(如骨质疏松症和心血管疾病)的发病率呈显著负相关[7,8]。Genistein 能否作为化学治疗药物用于肺癌,也吸引了不少学者的极大兴趣。Verma 等[2]研究发现 Genistein 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖影响具有双相效应,0.01 ~ 10 μmol/L 的 Genistein 对 MCF-7 细胞有促生长作用;大于 10 μmol/L的 Genistein 抑制 MCF-7 细胞的增殖,并具有剂量依赖关系,其半数最大抑制效应浓度(IC50)为 25 ~ 33 μmol/L。后来的研究证实 Genistein 抑制 H460 非小细胞肺癌增殖亦呈剂量依赖关系,使细胞受阻于 G_2/M 期,同时发现 30 μmol/L 的 Genistein 可通过使细胞 $p21^{WAF1}$ 基因上调,导致 DNA 形成典型的凋亡梯度。我们的实验也证实:Genistein 可以使 A549 细胞的 G_1/G_0 期减少,细胞阻滞于 G_2/M 期检测点,不能进入 M 期进行有丝分裂,使其在退出细胞周期过程中逐渐发生凋亡。G_2/M 期细胞增多,G_0/G_1 期细胞减少,表明 ATRA 和 Genistein 可能并不影响细胞开始时的 DNA 合成,而是通过推进细胞周期向前,并使细胞被阻断于 G_2/M 期,使大部分细胞失去进入有丝分裂的能力。

肺癌治疗中 Genistein 是否有效,以及能否联合应用 ATRA 和 Genistein 2 种药物,达到减小治疗剂量、降低毒副反应、提高疗效的目的,值得进一步研究。我们根据已有的报道和预试验,合理选择了 Genistein 和 ATRA 的分组浓度,以期达到观察有效浓度范围、是否具有浓度依赖性以及联合用药是否具有协同增效作用等目的。综合分析形态学、细胞周期以及细胞生长抑制率等试验结果,提示 Genistein 在一定浓度范围内具有和 ATRA 相近的作用,可使人肺腺癌 A549 细胞出现增殖抑制和诱导分化、促进凋亡的倾向;当 Genistein 和 ATRA 联合应用时,对 A549 细胞的增殖抑制作用强于等浓度甚至较高浓度的 ATRA 、Genistein 单药作用,协同增效作用明显。提示 Genistein 和 ATRA 的联合应用,可以降低 ATRA 的剂量,以减少减轻其毒副反应,为 ATRA 和 Genistein 在肺癌治疗中的联合应用提供了依据。

参考文献:

[1] RUSSELL R M. The enigma of beta-carotene in carcinogenesis: what can be learned from animal studies[J]. J Nutr, 2004, 134(1): 262S-268S.

[2] VERMA S P, GOLDIN B R. Effect of soy-derived isoflavonoids on the induced growth of MCF-7 cells by estrogenic environmental chemicals [J]. Nutr Cancer, 1998, 30(3): 232-239.

[3] WIETRZYK J, BORATYNSKI J, GRYNKIEWICZ G, *et al*. Antiangiogenic and antitumour effects *in vivo* of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide [J]. Anticancer Res, 2001, 21(6A): 3893-3896.

[4] RASKATOVAS D. Chemoprevention possibilities of lung cancer[J]. Medicina (Kaunas), 2004, 40(12): 1151-1157.

[5] HIRSCH F R, LIPPMAN S M. Advances in the biology of lung cancer chemoprevention[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(14): 3186-3197.

[6] POMERANTZ J, SCHREIBER-AGUS N, LIEGEOIS N J, *et al*. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53[J]. Cell, 1998, 92(6): 713-723.

[7] ALLRED C D, JU Y H, ALLRED K F, *et al*. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(10): 1667-1673.

[8] CLARKSON T B. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease [J], J Nutr, 2002, 132(3): 566S-569S.

(编辑 薛国文)