文章编号:1000-5404(2007)14-1399-03

论著

ATRA对A549人肺腺癌细胞株增殖、细胞周期的影响及其机制研究

周人杰[1],廖卫公[2],杨镇洲[3],闵家新[1],肖颖彬[4] (第三军医大学:[1]新桥医院胸外科,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中心,重庆 400042,[4]新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对A549人肺腺癌细胞株增殖、细胞周期的影响及其可能的分子机制。**方法** ATRA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,Western blot检测CDK4、Rb、p-ERK1/2蛋白的表达,荧光定量PCR法检测CyclinD1 mRNA水平。**结果** ATRA具有抑制A549细胞增殖、使细胞周期阻滞于G_0/G_1期,并下调p-ERK1/2蛋白表达及CyclinD1 mRNA水平的作用。**结论** ATRA可能通过下调A549细胞p-ERK1/2蛋白表达及CyclinD1 mRNA水平,使细胞周期阻滞于G_0/G_1期,从而影响其DNA的合成,抑制其恶性增殖。

关键词: ATRA;肺癌细胞;增殖;细胞周期
中图法分类号: R329.28;R734.2;R979.12 **文献标识码:** A

Effects and mechanisms of ATRA on proliferation, cell cycle of lung carcinoma cell line A549

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

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of all-trans retinoic acid (ATRA) on the proliferation and cell cycle of lung carcinoma cell line A549. **Methods** The A549 cells were treated with ATRA at the dosages of 5, 10, 50 μmol/L for 1-7 d. The proliferation of A549 was assessed by MTT method and cell cycle was analyzed by flow cytometry. The expressions of CDK4, Rb and p-ERK1/2 were assessed by Western blotting. CyclinD1 mRNA was analyzed by SYBR-PCR amplification. **Results** ATRA obviously inhibited the proliferation of A549 cells, and the cell cycle was arrested in G_0/G_1 phase. The expression of p-ERK1/2 protein and CyclinD1 mRNA on A549 cells were decreased. **Conclusion** ATRA might inhibit the proliferation of A549 cells through down-regulating p-ERK1/2 protein and CyclinD1 mRNA.

Key words: all-trans retinoic acid; lung cancer; proliferation; cell cycle

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,所以一些天然物质及其衍生物的抗肿瘤效应越来越受到人们的重视。维甲酸类(retinoic acid, RA)化合物是一大类天然或合成的具有维生素A的结构或活性的化合物。1925年Wolbach及Howe注意到RA类化合物与肿瘤的关系。1979年Merriman及Bertram证明RA类化合物可可逆性地抑制3-甲基胆蒽引起的细胞恶变,指出RA类化合物的原发作用是抑制恶变的促癌期。RA是动物生长,生命维持,特别是上皮细胞保持正常不可或缺的成份[1,2],可预防实验动物癌的发生,促进发育过程中未成熟的细胞(未分化的血细胞,神经、皮肤及骨组织等的干细胞)分化成具有特殊功能的成熟细胞。我们以往的研究表明,全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)可以抑制肺癌细胞的快速增殖,并能降低肺癌细胞的体外侵袭能力[3]。最近Suzuki等[4]证实:用阳离子脂质小体包裹的ATRA来

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB5102)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5102)
作者简介:周人杰(1971-),男,浙江省慈溪市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肺癌基础与临床方面的研究,发表论文10篇。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:2007-03-19;修回日期:2007-06-05

处理荷瘤小鼠，可有效治疗肺癌转移。为探讨 ATRA 对肺癌细胞增殖及细胞周期影响的可能分子机制，我们采用不同剂量 ATRA 处理人肺腺癌细胞 A549，研究其对肺癌细胞的周期相关分子表达的影响。

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 为美国 Sigma 公司产品；兔抗人 Rb（C-15）、CDK4（C-22）、β-actin 多克隆抗体及鼠抗人 p-ERK（E-4）单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司；SYBR Green Ⅰ为深圳达科为公司产品；逆转录酶、*Taq* 酶、dNTP、RNA 酶抑制剂、10 × PCR 缓冲液、Oligo（dT）15、100 bp DNA Ladder 等均为鼎国生物公司产品；引物合成由上海生工生物技术公司完成。

PCR 引物设计：CyclinD1 上游引物 5′-CGCCCCACCCCTCCAG-3′（16 bp），下游引物 5′-CCGCCCAGACCCTCAGACT-3′（19 bp），PCR 产物 221 bp；β-actin 上游引物 5′-CCATCATGAAGTGTGACGTGG-3′，下游引物 5′-GTCCGCCTAGAAGCATTTGCG-3′，PCR 产物 293 bp。

1.2 方法

1.2.1 ATRA 配制及细胞处理 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，处理细胞终浓度 5、10、50 μmol/L。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。各组均处理细胞 24 h。

1.2.2 细胞周期分析 经 50 μmol/L ATRA 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。

1.2.3 Western blot 分析 细胞总蛋白提取后定量（Bradford 比色法），灌制分离胶、积层胶，按顺序加样，加预染的蛋白质标准，20 mA 电泳，至染料抵达分离胶与积层胶交界；120 V，电泳，至溴酚蓝距离底线 1 cm 左右，取下凝胶，切去积层胶和含溴酚蓝部分，并标记、制作“三明治”夹心，按 0.65 mA/cm^2，电转 1 h 30 min，将蛋白电转移到 PVDF 膜上，TNT 缓冲液平衡 3 次，每次 15 min，封闭液 4 ℃封闭过夜；TNT 缓冲液洗膜 3 次；加入一抗室温反应 1 h，TNT 缓冲液洗膜 3 次，每次 5 min；加入二抗，室温反应 1 h，TNT 缓冲液洗膜 3 次，每次 5 min，混合等体积 Luminol Reagent A 和 B 液与 PVDF 膜共孵育 1 min，放射自显影，图像分析系统测定各条带灰度值。以同一管中的目的蛋白和 β-actin 条带积分光密度值之比作数据分析，反映目的蛋白的表达程度。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 CyclinD1 mRNA 表达 细胞总 RNA 的提取后，行逆转录及 PCR，PCR 产物的鉴定及回收，DNA 定量、PCR 产物标引，应用 SYBR Green Ⅰ对浓度梯度 DNA 做荧光与拷贝数的标准曲线，分别以 MUC1、β-actin 的循环阈值（Ct）对相应的浓度的对数作图，得到两条标准曲线。分别为 $y = -0.46x + 15.23$ 和 $y = -0.40x + 14.11$；相关系数分别为 0.964 和 0.973。

结果计算：检测每组样本的 Ct 值，根据标准曲线，计算出各样本的浓度（拷贝/μl），用下列公式计算 MUC1 mRNA 的相对表达量为：相对表达量 = 目的基因浓度/β-actin 浓度。

1.3 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，所得实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件作 t 检验。

2 结果

2.1 ATRA 对 A549 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果分析提示：经 50 μmol/L ATRA 处理 24 h 后，可使 A549 细胞的 G_2/M 期减少（$t = 2.718$，$P < 0.05$），S 期无明显变化，细胞阻滞于 G_0/G_1 期（$t = 2.015$，$P < 0.01$）（表 1）。

表 1 细胞周期分布（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	G_0/G_1期	S 期	G_2/M 期
对照组	62.75 ± 5.05	31.76 ± 9.60	5.50 ± 3.62
ATRA 处理组	68.62 ± 4.10[a]	29.13 ± 4.86	2.27 ± 1.34[b]

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与对照组比较

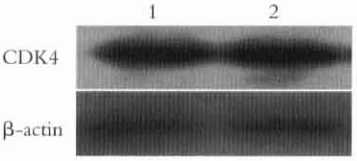
2.2 ATRA 对 A549 细胞 CDK4、Rb、p-ERK1/2 蛋白表达的影响

与对照组相比，经 50 μmol/L ATRA 处理 24 h 后，CDK4、Rb 蛋白表达无明显变化（$t = 1.706$、2.015，$P > 0.05$）；而 p-ERK1/2 水平明显下降（$t = 4.587$，$P < 0.01$）（表 2，图 1～3）。

表 2 CDK4、Rb、p-ERK1/2 蛋白表达情况（$n = 6$，$\bar{x} \pm s$）

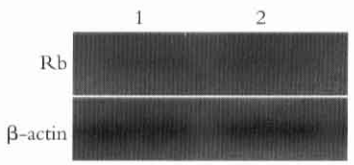
组别	CDK4	Rb	p-ERK1/2
对照组	1.199 ± 0.256	0.321 ± 0.166	5.430 ± 0.908
ATRA 处理组	1.062 ± 0.022	0.376 ± 0.034	3.860 ± 0.876[a]

a：$P < 0.01$，与对照组比较



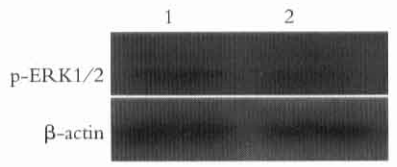
1：对照组；2：ATRA 处理组

图 1 Western blot 检测 CDK4 在 A549 细胞中的表达



1：对照组；2：ATRA 处理组

图 2 Western blot 检测 Rb 在 A549 细胞中的表达



1：对照组；2：ATRA 处理组

图 3　Western blot 检测 p-ERK1/2 在 A549 细胞中的表达

2.3　ATRA 对 A549 细胞 CyclinD1 mRNA 水平的影响　在 A549 细胞中 CyclinD1 mRNA 水平较高[相对表达量为(1.399 ± 0.011)]，而经 ATRA 处理后，CyclinD1 mRNA 水平明显下降，相对表达量为(0.925 ± 0.092)，与对照组比较，差异显著($t = 3.079$，$P < 0.05$)。

3　讨论

细胞周期受细胞周期素(Cyclin)及周期素依赖激酶(CDK)和细胞周期依赖激酶抑制蛋白(CKI)的精密调控。由于 CyclinD1 是细胞增殖周期中的启动因子，是 G_1 期细胞增殖信号的关键蛋白，是各种周期素中唯一的原癌基因[5]，故在细胞周期调控的研究中 CyclinD1 的地位是不可或缺的。

大多数肿瘤细胞存在 CyclinD1 的高表达或基因结构异常(包括 DNA 缺失、转位、扩增等)，我们以往研究发现 ATRA 对 A549 细胞增殖具有抑制作用[6]。在本研究中我们观察到在 A549 细胞中 CyclinD1 mRNA 水平较高，经 ATRA 处理后，CyclinD1 mRNA 水平明显下降；有研究证实 CyclinD1 在肿瘤细胞的增殖过程中具有相当重要的作用，其作用于 G_1/S 期转换过程，促使细胞从 G_1 期进入 S 期[7]，结合细胞周期的检测结果，即 ATRA 处理后，A549 细胞 G_0/G_1 期的阻滞，我们有理由相信 ATRA 对 A549 细胞周期影响的一个重要原因是抑制了 CyclinD1 基因的表达。

ATRA 可以抑制 Rb 蛋白的磷酸化，而磷酸化的 pRb 是细胞进入 S 期所必需的[8]。虽然我们在本实验中未观察到 ATRA 处理后 Rb 蛋白量的变化，这可能是因为 Rb 蛋白的活性并不单纯体现在量的变化，可能更为关键的是其磷酸化状态，结合细胞周期的检测结果来分析，ATRA 造成 G_0/G_1 期阻滞的其中一个主要原因，可能与 Rb 蛋白的磷酸化的抑制有关。

已有研究表明，p-ERK1/2 在细胞浆和细胞核均有其作用底物。p-ERK1/2 转位入核受到多个因素的调节，其中癌基因 Ras 的功能[9]和合成新的核内锚着蛋白是必需的。Blackhall 等[10]认为细胞质内 p-ERK1/2 的表达增高可使 p-ERK1/2 核转位的动力学发生改变，导致细胞增殖率降低。Hauck 等[11]以 PD98059 抑制肺腺癌细胞 A549 中 ERK1/2 活性后，可明显抑制生长因子 EGF 介导的细胞迁移。ERK1/2 是 CyclinD1 表达的上游分子，其磷酸化及转位入核可诱导 CyclinD1 基因的转录表达。本研究结果显示，经 ATRA 处理后，p-ERK1/2 水平较对照组明显下降。这种变化趋势与 CyclinD1 表达情况一致，说明 ERK1/2 通路在调节 CyclinD1 表达中起重要作用，其机制可能是 ERK 转位入核激活的一系列转录因子，进而与 CyclinD1 启动子上的相应位点结合而启动其转录，从而促进肿瘤细胞增殖。

综上所述，ATRA 可能通过下调 p-ERK1/2 蛋白表达及 CyclinD1 mRNA 水平，使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期，影响细胞 DNA 的合成，从而抑制 A549 细胞的增殖。

参考文献：

[1] Lippman S M, Kessler J K, Meyskins F L. Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents (Part I)[J]. Cancer Treat Rep, 1987, 71 (4): 391 - 404.

[2] Schroeder M, Zouboulis C C. All-trans-retinoic acid and 13-cis -retinoic acid: pharmacokinetics and biological activity in different cell culture models of human keratinocytes[J]. Horm Metab Res, 2007, 39(2): 136 - 140.

[3] 周人杰，肖颖彬，张国强. 全反维甲酸对人肺癌细胞株 A549 细胞间黏附分子-1 表达及体外侵袭力的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2004，11(4)：291 - 292.

[4] Suzuki S, Kawakami S, Chansri N, *et al*. Inhibition of pulmonary metastasis in mice by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposomes[J]. J Control Release, 2006, 116(1): 58 - 63.

[5] Kiyokawa H, kineman R D, Manova-Todorova K O, *et al*. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1)[J]. Cell, 1996, 85(5): 721 - 732.

[6] 周人杰，廖卫公，杨镇洲，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2006，28(11)：1198 - 1200.

[7] Koroleva O A, Tomlinson M, Parinyapong P, *et al*. CycD1, a putative G_1 cyclin from Antirrhinum majus, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G_1/S entry and progression through S and G_2 phases[J]. Plant Cell, 2004, 16(9): 2364 - 2379.

[8] Naderi S, Blomhoff H K. Retinoic acid prevents phosphorylation of pRB in normal human B lymphocytes: regulation of cyclin E, cyclin A, and p21(Cip1)[J]. Blood, 1999, 94 (4): 1348 - 1358.

[9] Miura S, Matsuo Y, Saku K. Simvastatin suppresses coronary artery endothelial tube formation by disrupting Ras/Raf/ERK signaling[J]. Atherosclerosis, 2004, 175(2): 235 - 243.

[10] Blackhall F H, Pintilie M, Michael M, *et al*. Expression and prognostic significance of kit, protein kinase B, and mitogen-activated protein kinase in patients with small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 2241 - 2247.

[11] Hauck C R, Sieg D J, Hsia D A, *et al*. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor -stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7079 - 7090.

(编辑　郭建秀)