论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1406-05

三氧化二砷联合非诺贝特对人肺癌A549细胞上皮间质转化及E-cadherin/Snail转化因子的影响

王绩英,王 涛,曾锦荣,刘春妮,莫碧文,陈梅唏,陈 峰,林武洲 (541001 广西 桂林,桂林医学院附属医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 观察三氧化二砷和非诺贝特单独及联合运用对人肺癌A549细胞上皮间质转化及相关因子E-cadherin、Snail的影响。**方法** 体外培养人肺癌A549细胞,根据处理因素不同分为4组,A组:阴性对照组(只含有DMEM培养液);B组:1 μmol/L三氧化二砷单药处理组;C组:100 μmol/L非诺贝特单药处理组;D组:1 μmol/L三氧化二砷+100 μmol/L非诺贝特联合处理组。干预A549细胞48 h后,分别运用MTT法检测对A549细胞的抑制作用,流式细胞术检测对A549细胞周期的影响,小室侵袭实验检测对A549细胞侵袭能力的影响,半定量RT-PCR检测对E-cadherin、Snail mRNA表达的影响,Western blot检测对E-cadherin、Snail蛋白表达的影响。**结果** 与阴性对照组及单药组相比,三氧化二砷联合非诺贝特可以明显抑制A549细胞的活性,其中三氧化二砷组的抑制率为(17.62±0.51)%,非诺贝特组的抑制率为(28.30±0.27)%,而联合组的抑制率为(35.19±0.04)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。两者联合还可以干扰A549细胞的细胞周期,减弱A549细胞的侵袭能力,3组的侵袭抑制率分别为:三氧化二砷组(50.3±0.15)%,非诺贝特组(56.7±0.57)%,联合组(68.1±0.21)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。RT-PCR和Western blot检测结果显示,联合组较阴性组及单药组明显上调E-cadherin mRNA及蛋白的表达,下调Snail mRNA及蛋白的表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 三氧化二砷联合非诺贝特有明显的增效作用,两者联合可以增加影响人肺癌A549细胞的上皮间质转化的效果,其机制可能与E-cadherin及Snail相关。

[关键词] 三氧化二砷;非诺贝特;肺肿瘤;上皮-间质转化;E-cadherin;Snail
[中图法分类号] R734.2;R966;R979.1 [文献标志码] A

Effect of combined arsenic trioxide and fenofibrate on epithelial-interstitial transformation and E-cadherin/Snail transformation factor in human pulmonary carcinoma A549 cells

Wang Jiying, Wang Tao, Zeng Jinrong, Liu Chunni, Mo Biwen, Chen Meixi, Chen Feng, Lin Wuzhou (Department of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 541001, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of combined arsenic trioxide and fenofibrate on epithelial-interstitial transformation and E-cadherin/Snail transformation factor in human pulmonary carcinoma A549 cells. **Methods** Human pulmonary carcinoma A549 cells, cultured *in vitro*, were divided into group A (control group) containing only DMEM culture fluid, group B (1 μmol/L arsenic trioxide treatment group), group C (100 μmol/L fenofibrate treatment group), and group D (1 μmol/L arsenic trioxide plus 100 μmol/L fenofibrate treatment group). After the A549 cells were exposed to arsenic trioxide, fenofibrate, arsenic trioxide, and fenofibrate, respectively, for 48 h *in vitro*, their inhibitory effect on proliferation, cell cycle, invasive ability of A549 cells, and expression of E-cadherin/Snail mRNA and protein in A549 cells were detected by MTT assay, flow cytometry, RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** The activity of A549 cells was significantly lower in group D than in groups A to C. The inhibition rate of the activity of A549 cells was (17.62±0.51)%, (28.30±0.27)% and (35.19±0.04)%, respectively, in group B, group C and group D ($P<0.05$). Combined arsenic trioxide and fenofibrate could interference with the cell cycle and reduce the invasive ability of A549 cells with an invasive inhibition rate of (50.3±0.15)%, (56.7±0.57)% and (68.1±

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅重点科研课题(重2010046)
[通信作者] 曾锦荣,E-mail: Lingwu222@sohu.com

0.21)%, respectively, in group B, group C and group D ($P<0.05$). RT-PCR and Western blotting showed that the expression level of E-cadherin was significantly higher while the expression level of snail was significantly lower in group D than in groups A to C ($P<0.05$). **Conclusion** Combined arsenic trioxide and fenofibrate exerts a significant effect on epithelial-interstitial transformation of A549 cells, which may be related with the expression of E-cadherin and Snail.

[**Key words**] arsenic trioxide; fenofibrate; lung neoplasm; epithelial-interstitial transformation; E-cadherin; Snail

Supported by the Key Project of Science Research of Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2010046). Corresponding author: Zeng Jinrong, E-mail: Lingwu222@sohu.com

关于上皮间质转化的研究是目前国内外肿瘤研究领域的热点之一,上皮间质转化(epithelial- mesenchymal transition,EMT)与肿瘤细胞的侵袭转移能力有密切的关系。在上皮间质转化过程中,上皮细胞的细胞极性可以丧失,导致细胞间粘附分子和连接蛋白缺失,细胞骨架重排,从而增加了细胞迁移运动的能力[1]。肿瘤上皮细胞通过上皮间质转化获得侵袭转移的机会,进而可以发生早期的血运转移,这也是肿瘤治疗的难点之一。E-钙粘蛋白(E-cadherin)是分布在正常上皮组织中的钙依赖性跨膜蛋白,它参与细胞间连接,介导细胞间的粘附作用,在许多恶性肿瘤中经常存在E-钙粘蛋白表达下调或缺失的现象,这说明E-钙粘蛋白在肿瘤上皮间质转化过程中发挥重要作用,是上皮间质转化的标志性蛋白。Snail是含有锌指结构的一类核转录因子,它可以直接调控E-钙粘蛋白的表达水平,成为能够对E-钙粘蛋白表达转录起到直接抑制作用的转录因子[2]。三氧化二砷近年来已经被改良成亚砷酸注射液广泛用于各类肿瘤治疗的研究并取得了一定的成果。我们团队早前研究[3]也发现三氧化二砷对肺癌A549细胞有杀伤抑制作用,抑制效果呈现出剂量-时间效应。非诺贝特是过氧化物酶体增殖因子激活受体α的常见激动剂,临床上用于降血脂的治疗。国外有研究[4-5]表明非诺贝特可以抑制肿瘤细胞的生长。我们研究团队前期研究[6]也证明了非诺贝特可以抑制肺癌A549细胞的生长,诱导其发生凋亡。本实验旨在我们前期研究的基础上探讨三氧化二砷联合非诺贝特对人肺癌A549细胞上皮间质转化的作用,及对上皮间质转化相关因子E-cadherin/Snail表达的影响。为肺癌的临床治疗探索出一种新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肺癌A549细胞引自中科院上海细胞库,高糖DMEM培养基购自Gibco公司,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物,非诺贝特、MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)、二甲亚砜(DMSO)购自Sigma公司,三氧化二砷即亚砷酸氯化钠注射液购自哈尔滨伊达药业公司,Transwell小室购自康宁公司,基质胶Matrigel购于美国BD公司,Trizol、RT-PCR System购自大连宝生物公司,*Taq*酶购自北京天根生物公司,E-cadherin、Snail、β-actin mRNA引物购自上海英骏生物公司,E-cadherin鼠抗人单克隆抗体购自美国ProMab公司,Snail兔抗人多克隆抗体购自美国Proteintech公司,辣根酶标记抗鼠IgG二抗及辣根酶标记抗兔IgG二抗购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 三氧化二砷及非诺贝特的配制及分组 三氧化二砷即亚砷酸氯化钠注射液用PBS溶液配制成1 mmol/L的贮存液,4 ℃避光保存,使用前用DEME培养液稀释到所需浓度。非诺贝特用无水乙醇溶解配制成100 mmol/L的贮存液,4 ℃避光保存,使用前用DMEM培养液稀释到所需浓度。三氧化二砷及非诺贝特的药物实验浓度根据本实验团队前期研究的基础确定为三氧化二砷1 μmol/L,非诺贝特100 μmol/L[5]。并分为4组,阴性对照组,三氧化二砷组,非诺贝特组,三氧化二砷联合非诺贝特组。

1.2.2 细胞培养 肺癌A549细胞在含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的高糖DMEM的培养液中培养,并放置在37 ℃、5%浓度的二氧化碳培养箱中。A549细胞经过消化传代,取对数生长期细胞待用。

1.2.3 MTT法检测药物干预48 h后A549细胞增殖的影响 取对数生长期的A549细胞并以1×10^4细胞接种于96孔培养板中。设立4个浓度组,用DMEM培养基将三氧化二砷稀释到1 μmol/L,非诺贝特稀释到100 μmol/L,联合组浓度为三氧化二砷1 μmol/L加非诺贝特100 μmol/L,阴性对照孔加入不含药物的DMEM培养基,每个浓度设5个平行空,放置于二氧化碳培养箱培养48 h,终止培养前4 h加入MTT(5 g/L,PBS),每孔20 μl,培养终止后弃上清加入二甲亚砜(DMSO)每孔100 μl,震荡10 min待结晶完全溶解后于酶标仪570 nm处检测各个浓度的光密度值,并按下列公式计算细胞的抑制率。

细胞的抑制率=[对照组D(570)值-给药组D(570)值]/对照组D(570)值×100%。

1.2.4 流式细胞仪PI染色检测药物干预48 h后对A549细胞周期的影响 取对数生长期细胞接种于6孔板中,每孔4×10^4细胞,培养12 h待细胞贴壁后,用含0.5%胎牛血清DMEM培养液继续培养24 h,使细胞周期同步化。分别加入上述4组药物,每浓度设5个平行孔,继续培养48 h后收集细胞,制成单细胞。用70%冷乙醇固定,4 ℃过夜,检测前用PBS洗去固定

液,加入20 μl RNase A,37 ℃孵育30 min,暗处加PI染液,冰浴30 min,以300目筛网过滤。调整细胞浓度为1×10^6/ml后以流式细胞仪检测,激发光源为氩离子,激发波长488 nm,用Multicycle DNA分析软件进行细胞周期分析测定。

1.2.5 小室侵袭实验检测药物干预48 h后对肺癌A549细胞侵袭能力的影响 将Matrigel胶用无血清的DMEM培养基1:8稀释后,加入Transwell小室内均匀的包被小室基底膜的上室面,Transwell小室内每孔加稀释后Matrigel胶100 μl。向24孔培养板中每孔加入600 μl含10%胎牛血清的DMEM培养液,然后将铺好Matrigel胶的Transwell小室侵入培养板中。取对数生长期A549细胞先用无血清的DMEM培养基饥饿培养24 h后,消化离心收集,再用上述4组含不同药物的DMEM培养基分别制备成4组单细胞悬液,加入Transwell小室中,每个浓度设3个Transwell小室平行孔,放置于37 ℃、5%浓度的二氧化碳培养箱中培养48 h。48 h后取出Transwell小室,用4%的多聚甲醛固定,结晶紫染色,并用棉签擦出Transwell小室上室内的细胞,在倒置显微镜下观察拍照,随机取5个视野,统计视野内的细胞数,计算平均值。按下式计算药物对肿瘤细胞侵袭的抑制率,抑制率=(对照组平均侵袭细胞数-给药组平均侵袭细胞数)/对照组平均侵袭细胞数×100%。

1.2.6 RT-PCR检测药物干预48 h后对A549细胞中E-cadherin及Snail mRNA表达的影响 分别收集上述4组药物干预48 h后的A549细胞,用Trizol提取4组细胞的总RNA,鉴定完RNA纯度和完整性后,分别取1 μg总RNA用逆转录试剂盒逆转录成cDNA备用。分别取4组相同量的cDNA在PCR扩增仪上进行扩增检测E-cadherin mRNA及Snail mRNA的表达差异。PCR产物用2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统分析拍照并对凝胶条带的信号强度进行半定量分析,以E-cadherin/β-actin和Snail mRNA/β-actin的比值作为E-cadherin mRNA和Snail mRNA的相对表达强度。E-cadherin引物为:正义链5′-CGAGAGCTACACGTTCACGG-3′,反义链5′-GGCCTTTTGACTGTAATCACACC-3′,产物长度162 bp。Snail引物为:正义链5′-CGAAAGGCCTTCAACTGCAAATAC-3′,反义链5′-TACTTCTTGACATCTGAGTGGGT-3′,产物长度257 bp。人β-actin引物为:正义链:5′-ACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATC-3′,反义链:5′-TGGGTCATCTTCTCGCGGTTGG-3′,产物长度417 bp。

1.2.7 Western blot检测药物干预48 h后对A549细胞中E-cadherin及Snail蛋白表达的影响 用上述4组药物干预A549细胞48 h后,分组收集细胞,加入适当的细胞裂解液,冰浴30 min,离心后取上清并采用BCA法测定蛋白量,再分别取50 μg样品进行SDS-PAGE电泳,然后电转移至PVDF膜上,5%的脱脂奶粉封闭1 h后,TBST洗膜后分别加入E-cadherin抗体,Snail抗体,4 ℃孵育过夜,再分别用相应的二抗37 ℃孵育1 h。ECL荧光显色后在暗室中进行X片曝光。抗体剥脱液剥脱抗体后,按同样的方法与β-actin抗体孵育,最后将结果用凝胶成像系统分析拍照并对凝胶条带的信号强度进行半定量分析,以E-cadherin/β-actin的比值作为E-cadherin蛋白的相对表达强度,以Snail/β-actin的比值作为Snail蛋白的相对表达强度。

1.2.8 统计学方法 用SPSS 17.0软件进行数据处理。以上所有实验均重复3次。所有数据用$\bar{x}\pm s$表示,多个样本比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验,检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 三氧化二砷、非诺贝特及联合用药对肺癌A549细胞增殖的影响

药物作用48 h后,与阴性对照组相比,三氧化二砷和非诺贝特对肺癌A549细胞均有抑制作用,而三氧化二砷联合非诺贝特组的抑制作用更明显。3组的抑制率分别为:三氧化二砷组(17.62±0.51)%,非诺贝特组(28.30±0.27)%,联合组(35.19±0.04)%,联合组与三氧化二砷组及非诺贝特组相比,对A549细胞的抑制作用有明显差异($P<0.05$)。表明三氧化二砷联合非诺贝特对肺癌A549细胞有较强的协同抑制作用。

2.2 三氧化二砷、非诺贝特及联合用药对肺癌A549细胞周期的影响

药物作用48 h后,根据流式细胞仪检测结果分析,与阴性对照组相比,单用三氧化二砷或者非诺贝特均可以使G_0/G_1期A549细胞数目减少,细胞阻滞于G_2/M期。而三氧化二砷联合非诺贝特组这种趋势更明显,联合组中A549细胞阻滞于G_2/M期的比例更高,提示三氧化二砷联合非诺贝特有协同抑制A549细胞分裂的作用(表1)。

表1 各组A549细胞的细胞周期分布(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
阴性对照组	72.80±2.39	10.31±1.62	16.88±1.02
三氧化二砷组	60.20±1.16[a]	12.50±1.12	27.30±1.20[a]
非诺贝特组	60.13±2.31[a]	11.15±0.65	28.72±2.67[a]
联合组	44.87±5.63[ab]	14.57±6.53	40.56±3.18[ab]

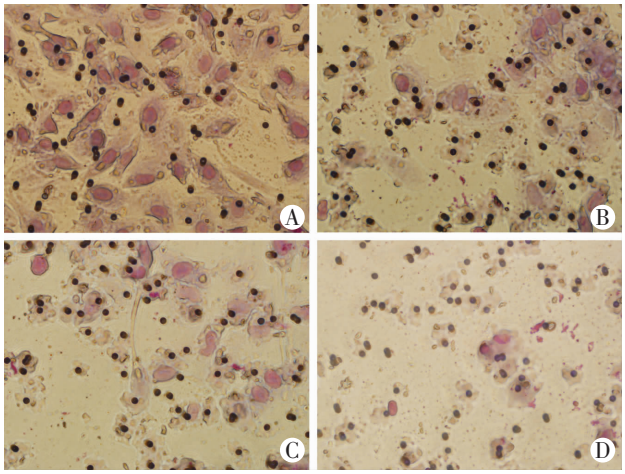
a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与单独用药组比较

2.3 三氧化二砷、非诺贝特及联合用药对肺癌A549细胞侵袭能力的影响

药物干预48 h后,与阴性对照组相比,三氧化二砷组和非诺贝特组穿过Matrigel胶滤膜的A549细胞数出现降低变化,而联合组较其他3组穿过Matrigel胶滤膜的A549细胞数更少。3组的侵袭抑制率分别为:三氧化二砷组(50.3±0.15)%,非诺贝特组(56.7±0.57)%,联合组(68.1±0.21)%。联合组与单药组相比有显著差异($P<0.05$)。表明三氧化二砷联合非诺贝特降低对肺癌A549细胞侵袭运动能力较单独用药组明显(图1)。

2.4 三氧化二砷、非诺贝特及联合用药对肺癌A549细胞E-cadherin mRNA及Snail mRNA表达的影响

半定量RT-PCR法结果显示,E-cadherin mRNA在肺癌A549细胞表达较少,通过药物干预后可以升高E-cadherin mRNA表达,3组药物干预48 h后联合组上调E-cadherin mRNA表达的效果较三氧化二砷组及非诺贝特组明显($P<0.05$)。而结果显示Snail mRNA在肺癌A549细胞存在高表达的现象,通过药物干预后降低了Snail mRNA表达,3组药物干预48 h后联合组下调Snail mRNA表达的效果较三氧化二砷组及非诺贝特组明显($P<0.05$)。提示三氧化二砷联合非诺贝特可能通过增加E-cadherin基因的表达同时抑制Snail基因的表达来阻止肺癌A549细胞发生上皮间质转化,减弱肺癌A549细胞侵袭运动能力(表2,图2)。



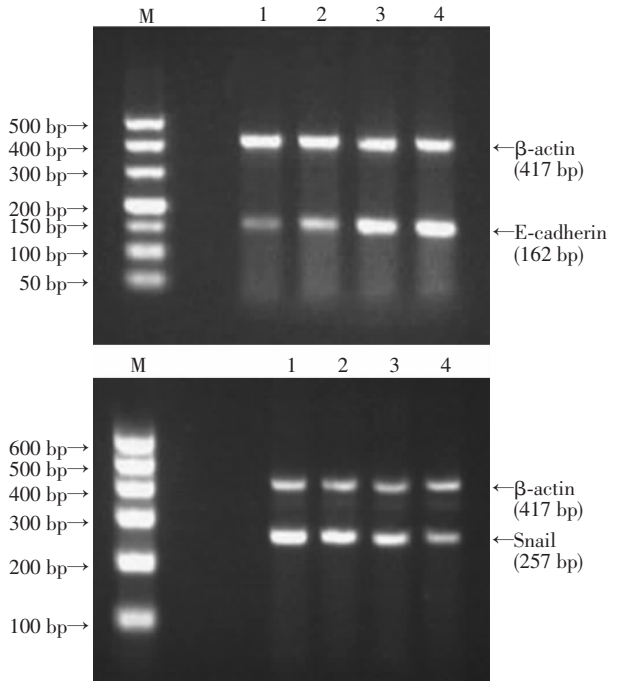
A:阴性对照组; B: 三氧化二砷组; C: 非诺贝特组; D:联合组

图 1　三氧化二砷、非诺贝特及两者联合对肺癌 A549 细胞侵袭运动能力的影响　(结晶紫 ×400)

表 2　三氧化二砷、非诺贝特及联合用药对肺癌 A549 细胞 E-cadherin、Snail mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin mRNA	Snail mRNA
阴性对照组	0.19 ± 0.11	0.81 ± 0.41
三氧化二砷组	0.44 ± 0.32[a]	0.72 ± 0.31[a]
非诺贝特组	0.76 ± 0.17[a]	0.39 ± 0.02[a]
联合组	0.89 ± 0.61[ab]	0.21 ± 0.37[ab]

a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与单独用药组比较



M:标准;1:阴性对照组;2:三氧化二砷组;3:非诺贝特组;4:联合组

图 2　RT-PCR 检测三氧化二砷、非诺贝特及两者联合对 A549 细胞 E-cadherin 及 Snail mRNA 表达的影响

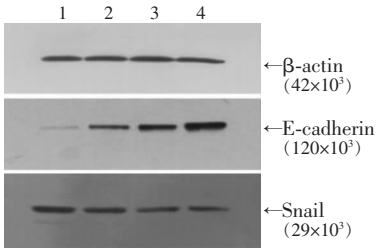
2.5　三氧化二砷、非诺贝特及联合用药对肺癌 A549 细胞 E-cadherin 及 Snail 蛋白表达的影响

E-cadherin 蛋白相对分子质量大小约为 120×10^3,Snail 蛋白相对分子质量大小约为 29×10^3。E-cadherin 蛋白在肺癌 A549 细胞也存在较少表达,通过药物干预后可以升高 E-cadherin 蛋白表达,干预 48 h 后,联合组上调 E-cadherin 蛋白表达的效果较三氧化二砷组及非诺贝特组明显($P<0.05$)。而 Snail 蛋白在肺癌 A549 细胞存在高表达的现象,通过药物干预后降低了 Snail 蛋白表达,干预 48 h 后联合组下调 Snail 蛋白表达的效果较三氧化二砷组及非诺贝特组明显($P<0.05$),提示三氧化二砷联合非诺贝特可能通过增加 E-cadherin 蛋白的表达同时抑制 Snail 蛋白的表达来阻止肺癌 A549 细胞发生上皮间质转化,减弱肺癌 A549 细胞侵袭运动能力(表 3,图 3)。

表 3　三氧化二砷、非诺贝特及联合用药对肺癌 A549 细胞 E-cadherin, Snail 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin	Snail
阴性对照组	0.24 ± 0.31	2.01 ± 0.56
三氧化二砷组	1.10 ± 0.14[a]	1.21 ± 0.22[a]
非诺贝特组	1.59 ± 0.81[a]	0.88 ± 0.51[a]
联合组	2.34 ± 0.72[ab]	0.43 ± 0.26[ab]

a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与单独用药组比较



1:阴性对照组;2:三氧化二砷组;3:非诺贝特组;4:联合组

图 3　Western blot 检测三氧化二砷、非诺贝特及两者联合对 A549 细胞 E-cadherin 及 Snail 蛋白表达的影响

3　讨论

2011 年 5 – 8 月我们研究小组[6]曾经运用三氧化二砷联合非诺贝特对肺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响用进行了前期的研究。研究结果显示,与单独用药组相比,三氧化二砷联合非诺贝特对肺癌 A549 细胞增殖抑制作用及促凋亡能力明显增强。其机制可能与上调 caspase-3 促凋亡因子的表达和下调 survivin 抗凋亡因子的表达相关。本研究我们在前期研究的基础上,从一个新的角度,探讨三氧化二砷联合非诺贝特是否可以抑制肺癌细胞的上皮间质转化及可能机制。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)在肿瘤细胞的侵袭转移过程中起的作用逐渐成为近年来肿瘤研究的热点问题。肿瘤细胞可以通过上皮间质转化这个过程发生去分化并获得较强的侵袭转移能力,从而导致全身广泛性转移[7]。E-钙粘蛋白(E-cadherin)主要参入细胞间的连接,它的表达下调可以开启上皮间质转化过程,可能导致发生肿瘤的侵袭和转移。E-钙粘蛋白的表达与肿瘤的侵袭转移能力呈负相关。Snail 蛋白也是调节肿瘤上皮间质转化及侵袭转移的一个重要因子。Snail 蛋白高表达与肿瘤的上皮间质转化及侵袭转移能力密切相关。有研究[8]表明 E-cad-

herin 基因是 Snail 直接作用的靶基因，Snail 可以直接结合编码 E-cadherin 基因的上游启动子区域，通过干扰和减少 E-钙粘蛋白的表达水平，能够间接促进肿瘤的上皮间质转化及增强肿瘤的侵袭转移能力。Olmeda 等[9]为了明确 Snail 在乳腺癌细胞中的作用，运用短发夹 RNA（shRNA）技术干扰 Snail 基因在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的表达，结果发现干预后的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 E-cadherin 基因的表达出现了上调，同时发现乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力却出现了下降，并对化疗药物的敏感性提高。三氧化二砷是中药砒霜的主要成分，近年来被广泛运用于治疗实体肿瘤的研究。宁燕等[10]发现三氧化二砷可以诱导人卵巢癌细胞发生凋亡，其机制可能与影响端粒酶的活性相关。我们课题组前期已经运用三氧化二砷的改良制剂亚砷酸对肺癌 A549 细胞进行研究，发现三氧化二砷可以抑制肺癌 A549 细胞的生长。我们课题组成员曾锦荣等[11]发现三氧化二砷联合维生素 C 对肺癌 A549 细胞有协同杀伤作用。赵雪强等[12]发现三氧化二砷可以增强重组人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（TRAIL）对肺癌 A549 细胞的杀伤作用。非诺贝特是过氧化物酶体增殖因子激活受体 α 的常见激动剂，作为降血脂药物已经广泛用于临床治疗，其安全性已得到大量临床数据的支持。国外学者 Grabacka 等[13]对非诺贝特抗肿瘤迁移的能力进行了相关研究，他们选用小鼠黑色素瘤 B16F16 细胞系及人黑色素瘤细胞 SK-MEL 188 细胞系作为研究对象，并用 Transwell 小室观察非诺贝特作用于 2 种细胞 40 h 后其侵袭能力的变化。结果显示与阴性对照相比，非诺贝特可以减弱 B16F16 细胞及 SK-MEL 188 细胞的迁移侵袭能力，他们进一步运用过氧化物酶体增殖因子激活受体拮抗剂 GW9662 与非诺贝特共同作用于两种细胞，结果显示与单用非诺贝特相比，加入过氧化物酶体增殖因子激活受体拮抗剂 GW9662 后对 2 种细胞的迁移侵袭能力减弱。

我们在本课题组前期研究的基础上探讨三氧化二砷联合非诺贝特对肺癌 A549 细胞上皮间质转化的影响，并研究 E-cadherin、Snail 这 2 种主要的上皮间质转化相关因子的变化情况。首先我们运用三氧化二砷联合非诺贝特观察对 A549 细胞增殖及细胞周期的影响，结果显示三氧化二砷及非诺贝特分别都可以抑制 A549 细胞增殖和影响 A549 细胞的分裂周期，而三氧化二砷联合非诺贝特对细胞增殖和周期的影响效果更加明显。接下来我们运用 Transwell 小室加 Matrigel 胶构建体外细胞基底膜生物模型来检测三氧化二砷联合非诺贝特对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响，其中的 Matrigel 胶来源于从小鼠 EHS 肉瘤，其主要成分包括层粘连蛋白、Ⅳ型胶原蛋白、纤维原蛋白生长因子等。从 Transwell 照片分析，阴性组中穿过基底膜的细胞数目较多，在三氧化二砷组和非诺贝特组中可以观察到穿过基底膜的细胞数相对减少了，而联合组中穿过基底膜的细胞数目更少。结果提示三氧化二砷联合非诺贝特可以明显减弱 A549 细胞的侵袭能力。最后我们运用 RT-PCR 及 Western blot 技术分析三氧化二砷联合非诺贝特对 E-cadherin 和 Snail 两种因子 mRNA 和蛋白的影响，RT-PCR 及 Western blot 结果均显示联合组比单药组明显上调 E-cadherin mRNA 和蛋白的表达，同时下调 Snail mRNA 和蛋白的表达。提示三氧化二砷联合非诺贝特抑制肺癌 A549 细胞上皮间质转化可能与上调 E-cadherin 的表达，同时下调 Snail 的表达相关。

参考文献：

[1] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871－890.

[2] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(6): 415－428.

[3] 王绩英，赵雪强，王昌明，等. 三氧化二砷联合 TRAIL 抑制肺癌 A549 细胞增殖及诱导凋亡的研究[J]. 时珍国医国药，2011，22(7)：1618－1619.

[4] Zak Z, Gelebart P, Lai R. Fenofibrate induces effective apoptosis in mantle cell lymphoma by inhibiting the TNFalpha/NF-kappaB signaling axis[J]. Leukemia, 2010, 24(8): 1476－1486.

[5] Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, *et al*. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(3): 985－990.

[6] 王绩英，王涛，曾锦荣，等. 三氧化二砷联合非诺贝特对人肺癌 A549 细胞抑制和凋亡的实验研究[J]. 时珍国医国药，2011，22(12)：2894－2896.

[7] Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(12): 2153－2160.

[8] Zeisberg M, Neilson E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429－1437.

[9] Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores J M, *et al*. SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells[J]. Cancer Res, 2007 , 67(24): 11721－11731.

[10] 宁燕，米粲. 三氧化二砷诱导人卵巢癌细胞凋亡对端粒酶活性的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(1)：62－64.

[11] 曾锦荣，谭宁，翟鹏勇，等. 维生素 C 对 AS_2O_3 抑制肺癌 A549 细胞增殖、诱导细胞凋亡作用的影响及机制[J]. 山东医药，2010，50(3)：7－9.

[12] 赵雪强，王绩英，王昌明，等. 三氧化二砷增强 TRAIL 杀伤人 A549 细胞的作用及机制研究[J]. 中国药理学通报，2011，27(3)：415－417.

[13] Grabacka M, Placha W, Plonka P M, *et al*. Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate[J]. Arch Dermatol Res, 2004, 296(2): 54－58.

（**收稿**：2011-12-28；**修回**：2012-03-06）

（编辑　邓强庭）