

9 顺维 A 酸对人肺腺癌细胞 A2 增殖及凋亡影响的实验研究

鄢 渊¹, 茆 勇², 游庆军², 徐静静^{*2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 附属医院, 江苏 无锡 214062)

摘要: 研究 9 顺维 A 酸(9-cis RA)抑制肺腺癌细胞 A2 增殖及诱导凋亡的作用并初步探讨其作用机制。体外培养 A2 细胞,随机分为 4 组,实验组加 9-cis RA 使其终浓度为 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$,对照组加入二甲亚砜使其终质量分数为 0.1%,采用 MTT 法检测各组 A2 细胞增殖情况;使用流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析药物作用后各组细胞的凋亡率;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组细胞 bax、fas、bcl-2 基因的变化。9 顺维 A 酸对人肺癌细胞株 A2 增殖均有明显的抑制作用($P<0.01$),实验组中细胞凋亡发生率显著增高($P<0.05$),且随着浓度的升高抑制作用和凋亡率也随之提高。实验组 bax mRNA、fas mRNA 表达显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);实验组 bcl-2 mRNA 表达显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。结论 9-cis RA 具有明显的抗肺腺癌细胞 A2 增殖的作用,其机制可能通过上调 bax、fas 基因和下调 bcl-2 基因表达、诱导细胞凋亡有关。

关键词: 9-顺维 A 酸;肺癌;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号: R 734.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)07—0779—05

Effects of 9-Cis-Retinoic Acid on the Proliferation and Apoptosis of Human Lung Cancer Cell Line A2

FENG Yuan¹, MAO Yong², YOU Qinjun², XU Jingjing^{*2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Affiliated Hospital, Jiangnan University, Wuxi 214062, China)

Abstract: The study aimed to explore the mechanism of 9-cis-retinoic acid (9-cis RA) inhibiting proliferation and inducing apoptosis in human lung cancer cell line A2. Cultured A2 cells were randomly divided into four groups, the experimental group received 9-cis RA to a final concentration of 1, 5 or 10 $\mu\text{mol/L}$, and the control group was added dimethyl sulfoxide to a final concentration of 0.1%. The MTT method was used for the determination of cell proliferation, flow cytometry (FCM) for the analysis of apoptosis, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the expression changes of bax, fas and bcl-2 genes. Results showed that 9-cis RA significantly inhibited the cell proliferation ($P<0.01$) and the incidences of apoptosis in the experimental groups were

收稿日期: 2014-08-20

基金项目: 无锡市医院管理中心重大项目(YGZX1210)。

* 通信作者: 徐静静(1983—),女,江苏泰州人,助理研究员,主要从事抗肿瘤药物机理研究。E-mail: wxsytsg@126.com

significantly higher ($P<0.05$), which depended on the concentration of 9-cis RA. The mRNA expressions of bax and fas genes in the experimental groups were significantly higher ($P<0.01$) whereas the bcl-2 mRNA expression was significantly lower than the control group ($P<0.01$). Therefore, 9-cis RA significantly inhibits the proliferation of human lung cancer cell line A2, which may be related to the increased expressions of bax and fas genes and the decreased expression of bcl-2 gene, and then induced apoptosis.

Keywords: 9-cis-retinoic acid, lung cancer, cell proliferation, apoptosis

维 A 酸广泛存在于鱼肝油、动物肝脏、奶油、深色蔬菜以及橘色蔬菜水果之中。已证实维 A 酸类化合物能调控细胞生长、分化、凋亡等生命活动^[1-2],最近的研究表明维甲酸类化合物通过与核维甲酸受体(RARs)及核维甲酸类 X 受体(RXR α s)结合发挥其生物学效应,在已知的维甲酸类化合物中,9-顺维甲酸(9-cis RA)唯一能与这两类核受体结合,因为其生物学活性强于其他维甲酸类化合物而倍受瞩目^[3-4]。作者旨在观察 9-cis RA 诱导肺癌细胞株凋亡与 bax、fas 和 bcl-2 基因表达的关系,为 9-cis RA 临床治疗肺癌提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

9-cis RA, 纯度 98%, 购自美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养液; 购自中科院上海细胞所; 胎牛血清; 购自美国 Sigma 公司; M-MLV 逆转录酶试剂盒; 购自美国 Bio Basic 公司; PCR MasterMix 试剂; 购自美国 Fermentas 公司; 凝胶电泳用琼脂糖; 购自美国 Bio Basic 公司; PCR 相关试剂及引物合成; 购自上海生工生物技术有限公司; 人肺腺癌细胞株 A2; 北京中日友好医院提供。

1.2 实验方法

A2 细胞在 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 培养液 RPMI 含体积分数 10% 灭活小牛血清及青、链霉素各 100 U/mL, 所有用于实验的细胞均处于对数生长期。用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液配成 1×10^5 /mL 细胞悬液, 接种细胞于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L, 置 37℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养 24 h 后, 加入 9-cis RA, 使实验组 9-cis RA 终浓度依次为 1、5、10 μ mol/L, 阴性对照组不含 9-cis RA。

每浓度设 3 个复孔, 各组分别培养 48 h 后, 按 MTT 细胞增殖检测试剂盒操作步骤进行操作。

以上 4 组细胞分别培养 48 h 后, 用不含 EDTA 的质量分数 0.25% 胰酶消化, 然后分别按以下两步骤操作: ①用 PBS 洗涤细胞两次 (2 000 r/min 离心, 5 min) 收集细胞, 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 混匀后, 再加入 5 μ L 的 Propidium Iodide 混匀, 室温、避光、反应 5~15 min 后, 在 1 h 内用流式细胞仪定量分析细胞凋亡水平。实验重复 3 次; ②按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 引物序列使用 Primer Premier 5.0 软件设计并在 NCBI 上进行 BLAST 对比, 引物均由上海生工生物技术公司合成, 通过逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测各组 bax、fas、bcl-2 mRNA 表达变化。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间分析采用单向方差分析 (One-Way-ANOVA) 多重比较进行检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 9-cis RA 对 A2 细胞增殖的抑制作用

9-cis RA 对人肺癌细胞株 A2 增殖均有明显的抑制作用 ($P<0.01$), 且随着浓度的提高抑制率也随之提高, 结果见表 1。

2.2 9-cis RA 对 A2 细胞作用 48h 后, 对 A2 细胞凋亡率的影响

不同浓度 9-cis RA 作用于肺癌细胞 A2 48 h 后, 经流式细胞分析仪检测。结果显示: 对照组凋亡率为 $(6.28 \pm 0.23)\%$; 9-cis RA (1 μ mol/L) 组凋亡率为 $(10.07 \pm 0.53)\%$; 9-cis RA (5 μ mol/L) 组凋亡率为

(10.63 ± 0.14)%; 9-cis RA ($10 \mu\text{mol/l}$) 组凋亡率为 (15.45 ± 0.41)%。经随机区组设计的单因素 ANOVA 统计软件分析结果显示: 与对照组的细胞凋亡率相比, 不同浓度 9-cis RA 组均有所增加, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 但 9-cis RA ($1 \mu\text{mol/l}$) 组与 9-cis RA ($5 \mu\text{mol/l}$) 组凋亡率差异不明显 ($P > 0.05$)。

表 1 各组光密度值和细胞抑制率比较

Table 1 Comparison of optical density values and cell inhibition rates in each group

组别	光密度($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
对照组	0.5175 ± 0.0269	0.00
9-cis RA ($1 \mu\text{mol/l}$)	$0.4223 \pm 0.0180^*$	$15.59 \pm 0.0862^*$
9-cis RA ($5 \mu\text{mol/l}$)	$0.3527 \pm 0.1096^*$	$28.63 \pm 0.0577^*$
9-cis RA ($10 \mu\text{mol/l}$)	$0.2663 \pm 0.0872^*$	$45.20 \pm 0.0381^*$

与对照组比较: $*P < 0.01$ 。

2.3 各组 bax mRNA、fas mRNA、bcl-2 mRNA 表达变化

与对照组相比, 实验组 bax mRNA、fas mRNA 表达显著高于对照组, bcl-2 mRNA 表达显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。RT-PCR 检测目的基因的变化结果见图 1~3。

表 2 各组作用 A2 细胞 48 h 后, 目的基因和 β -actin mRNA 灰度比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 mRNA gray ratio of target genes to beta-actin in A2 cells after 48 h ($\bar{x} \pm s$)

分组	fas/ β -actin	bax/ β -actin	bcl-2/ β -actin
对照组	0.297 ± 0.010	0.183 ± 0.017	0.815 ± 0.034
9-cis RA ($1 \mu\text{mol/l}$)	$0.531 \pm 0.027^*$	$0.358 \pm 0.024^*$	$0.622 \pm 0.049^*$
9-cis RA ($5 \mu\text{mol/l}$)	$0.644 \pm 0.025^*$	$0.515 \pm 0.062^*$	$0.474 \pm 0.009^*$
9-cis RA ($10 \mu\text{mol/l}$)	$0.916 \pm 0.034^*$	$1.128 \pm 0.057^*$	$0.169 \pm 0.012^*$

与对照组比较: $*P < 0.05$ 。

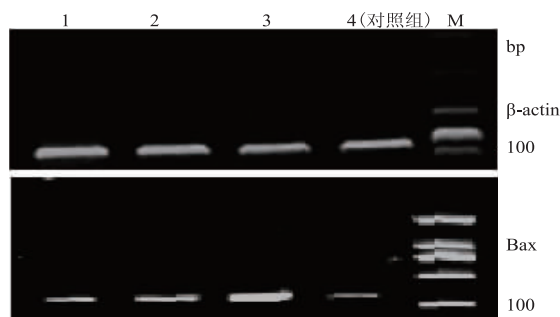


图 1 RT-PCR 检测各组 bax 基因 mRNA 表达

Fig. 1 Expression of bax mRNA by RT-PCR

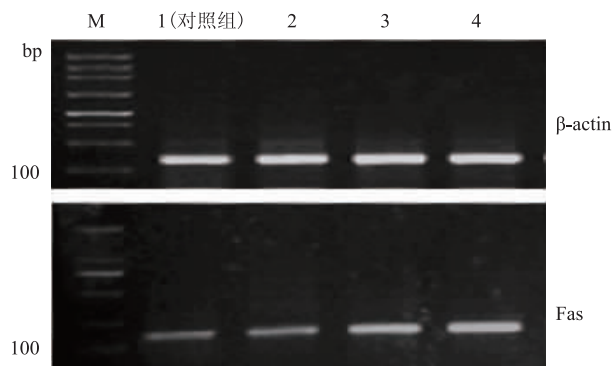


图 2 RT-PCR 检测各组 fas 基因 mRNA 表达

Fig. 2 Expression of fas mRNA by RT-PCR

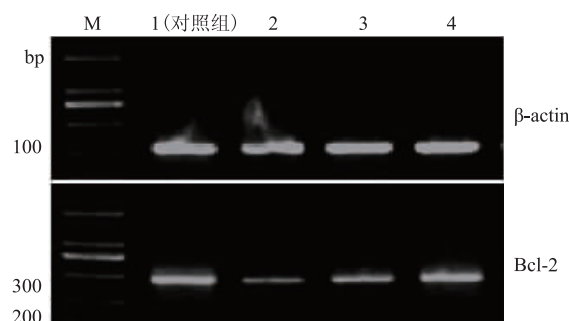


图 3 RT-PCR 检测各组 bcl-2 基因 mRNA 表达

Fig. 3 Expression of bcl-2 mRNA by RT-PCR

3 讨论

已知细胞内的维甲酸受体有两种形式: 即核维甲酸受体 (RARs) 和核维甲酸类 X 受体 (RXRs), 9-cis RA 进入细胞后可与这两类受体结合。目前认为, RARs-RXRs 复合体是 9-cis RA 发挥作用的真正受体形式, 9-cis RA 与受体复合物结合后, 激活 DNA 上特异的维甲酸识别元件, 进而影响转录机制, 抑制相关原癌基因和 (或) 诱导抑癌基因表达, 发挥其抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡作用。国外研究发现 9-cis RA 在低浓度时作用较弱, 而在较高浓度 ($>10^{-6} \text{ mmol/L}$) 对神经母细胞瘤的增殖具有明显抑制作用, 并能诱导神经母细胞瘤的凋亡^[5]。作者研究发现, 实验组中凋亡发生率显著高于对照组, 而且 $10 \mu\text{mol/L}$ 9-cisRA 抑制肺癌细胞 A2 增殖和诱导凋亡作用显著高于 $1 \mu\text{mol/L}$ 组和 $5 \mu\text{mol/L}$ 组, 也呈现浓度依赖性, 与国外的相关研究成果一致。

研究证实 9-cisRA 诱导肺癌细胞凋亡的机制可能有: 通过 Rb 基因表达增加和 cyclinD1 基因表达减少途径诱导肺癌细胞凋亡; 通过凋亡抑制基因

bcl-2 家族对肿瘤细胞的凋亡实施调控。游庆军^[6-7]等人研究认为 9-cisRA 可能引起抑癌基因 Rb 表达增加和原癌基因 cyclinD1 表达减少,结合转录因子 E2F,使癌细胞阻滞在 G1 期,阻止分化期中的细胞增殖,直接诱导肺癌细胞凋亡或通过影响 P53、c-myc、E1A 等基因的表达启动细胞凋亡途径。更多的研究显示肿瘤细胞凋亡的调控可能与死亡受体信息转导通路中 Fas/FasL 基因的异常表达有关。研究表明 9-cisRA 通过上调肺癌细胞中 fas 基因的表达来实现对 Fas/FasL 信号系统的调控,同时通过降低 bcl-2 mRNA 和提高 bax mRNA 表达促进细胞凋亡。

Fas 属于肿瘤坏死因子受体(也称死亡受体)家族,是细胞膜上的糖基化穿膜蛋白,在细胞凋亡过程中发挥着传递细胞凋亡信号作用。细胞表面表达的 Fas 与 FasL 交联后,形成能传达信号的活性三聚体(死亡结构域 DD),Fas 与死亡结构域相关蛋白(FADD)形成二聚体,将凋亡信号传导至凋亡蛋白酶 caspase-8,进而引起一系列酶联反应,激发下游 caspase-3、6、7,最终导致细胞凋亡^[8]。作者用 RT-PCR 检测的结果显示实验组 fas 表达明显高于对照组。Bcl-2 属膜蛋白,主要存在于线粒体内膜、细胞

膜内表面、内质网膜、溶酶体膜、核膜等处。Bcl-2 具有恢复线粒体内膜的跨膜电位和关闭线粒体膜通透性转换孔的作用,可使线粒体膜通透性降低,阻止凋亡启动因子释放,切断细胞凋亡级联反应中关键环节,如抑制促进凋亡的蛋白 Bax 的毒性作用、抑制 caspase 激活、维持细胞内钙的稳定等,具有很强的抗凋亡作用;Bax 主要促进细胞凋亡。当 Bcl-2 过表达时,与 Bax 形成异二聚体抑制细胞凋亡;相反,Bax 过表达时,Bax 形成同源二聚体促进细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 对细胞凋亡的调控不仅取决于自身表达水平高低,还与两者的比例有关,当 Bcl-2/Bax 比例减少时,细胞趋于凋亡^[9-10]。实验结果显示,实验组 bcl-2 表达明显低于对照组、bax 表达明显高于对照组,细胞凋亡增加。9 顺维甲酸诱导肺癌细胞 A2 凋亡可能与 fas、bax 表达增加,bcl-2 表达减少有关,是通过死亡受体途径及线粒体途径引起细胞凋亡,从而抑制细胞增殖。

综上所述,9 顺维甲酸具有抑制肺腺癌细胞增殖、促进肺癌细胞凋亡的作用,其机制可能是通过阻滞细胞周期、提高 bax、fas 基因的表达,降低 bcl-2 基因的表达实现的,为提高肺癌的治疗效果提供一种新的途径。

参考文献:

- [1] 姚义好,丁艳霞,张晋东,等. 全反式维甲酸对人食管鳞癌 EC1 细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响[J]. 肿瘤,2013,33(8):690-694.
YAO Yihao,DING Yanxia,ZHANG Jindong,et al. Effects of all trans retinoic acid on proliferation,cell cycle and apoptosis of human esophageal squamous cell carcinoma EC1 cell line[J]. *Tumor*,2013,33(8):690-694.(in Chinese)
- [2] Siddikuzzaman I,Guruvayoorappan C,Berlin Grace VM. All trans retinoic acid and cancer [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*,2011,33(2):241-249.
- [3] 游庆军,沈振亚,金小寅,等. 9-顺维 A 酸对人肺腺癌细胞 PG 株的细胞周期影响和诱导凋亡作用[J]. 中华结核与呼吸杂志,2003,26(1):53-54.
YOU Qingjun,SHEN Zhenya,JIN Xiaoyin,et al. Effects of 9-cis retinoic acid on cell cycle and apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line PG[J]. *Chinese Journal of tuberculosis and respiratory diseases*,2003,26(1):53-54.(in Chinese)
- [4] Tanaka T1,Suh KS,Lo AM,et al. p21WAF1/CIP1 is a common transcriptional target of retinoid receptors:pleiotropic regulatory mechanism through retinoic acid receptor(RAR)/retinoid X receptor(RXR) heterodimer and RXR/RXR homodimer[J]. *J Biol Chem*,2007,282(41):29987-29997.
- [5] Lovat PE,Lowis SP,Pearson ADJ,et al. Concentration dependent effects of 9-cis retinoic acid on neuroblastoma cell differentiation and proliferation in vitro[J]. *Neurosci Lett*,1994,182(1):29-32.
- [6] 游庆军,沈振亚,金小寅,等. 9-顺-维 A 酸诱导肺鳞、腺癌细胞株凋亡与 CyclinD1 和 Rb 基因表达的关系[J]. 中华实验外科杂志,2003,20(1):77-78.
YOU Qingjun,SHEN Zhenya,JIN Xiaoyin,et al. The relationship between apoptosis and CyclinD1 and Rb gene expression in lung cancer cell lines induced by 9-cis retinoic acid[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*,2003,20(1):77-78.(in Chinese)

- [7] 游庆军, 蒋锡初, 李晓林, 等. 顺维甲酸体外诱导肺腺癌细胞 A549 凋亡的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(16): 1233-1234.
- YOU Qingjun, JIANG Xichu, LI Xiaolin, et al. Research of lung adenocarcinoma cell A549 apoptosis induced by retinoic acid in vitro[J]. **Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment**, 2008, 15(16): 1233-1234. (in Chinese)
- [8] 姚峰, 陈倩, 陶琳, 等. Caspase-3 基因在肺癌中的表达及其与 bcl-2 和 Bax 蛋白表达的关系[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(1): 4-6.
- YAO Feng, CHEN Qian, TAO lin, et al. Relationship between the expression of Caspase-3 gene and protein expression of Bcl-2 and Bax in lung cancer[J]. **Journal of Cancer Prevention and Treatment**, 2004, 11(1): 4-6 (in Chinese)
- [9] 王鲁建, 孙丽梅, 孙利敏, 等. 凋亡和相关蛋白 bcl-2 在肺癌组织中的表达及对预后的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(4): 290-293.
- WANG Lujian, SUN Limei, SUN Limin, et al. Expression of apoptosis and related protein Bcl-2 in lung cancer tissues and its effect on prognosis[J]. **Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment**, 2006, 13(4): 290-293. (in Chinese)
- [10] 沈晓咏, 吕帆真, 武韞, 等. bcl-2, bax 和 p53 在小细胞肺癌中的表达及对细胞凋亡的影响[J]. 四川医学 2013, 34(7): 915-917.
- SHEN Xiaoyong, LV Fanzhen, WU Yun, et al. The expression of Bcl-2, Bax and P53 in small cell lung cancer and its effect on apoptosis[J]. **Sichuan Medicine**, 2013, 34(7): 915-917. (in Chinese)

科技信息

日本解析生成茶香贮藏成分生物酶基因

静冈大学学术院和三得利国际开发中心与三得利生命科学财团、山口大学、神户大学共同研究,首次解析了茶树中生成樱草糖苷(Primeveroside)的两种生物酶基因。樱草糖苷为二糖配糖体,起茶香成分稳定地储藏在细胞内的作用。

该研究成果与提取茶香的新技术的开发、不同香味茶品种的培育以及茶制品的开发息息相关。

[信息来源] 食品伙伴网. 日本解析生成茶香贮藏成分生物酶基因 [EB/OL]. (2015-6-9). <http://news.foodmate.net/2015/06/312874.html>

欧盟批准维生素 H 作为饲料添加剂

据欧盟网站消息,2015 年 5 月 6 日欧盟发布(EU)2015/723 号法规,批准维生素 H 作为动物饲料添加剂。该法规自公布二十日起生效。

生物素在添加剂分类当中属于“营养添加剂”,在功能分组当中属于“维生素、维生素原以及有类似效应化学性质定义良好物质”,被批准作为动物营养添加剂。

维生素 H 的测定方法如下:

饲料添加剂中 D-(+)-维生素 H 的测定:电位滴定法测定和光学旋转测定(欧盟药典 6.0 方法 01/2008:1073);预混合物和饲料中 D-(+)-维生素 H 的测定:反相高效液相色谱法结合质谱法(RP-HPLC-MS/MS);水中 D-(+)-维生素 H 的测定:微生物测定法(美国法典 21,方法(88) 1986)。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准维生素 H 作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2015-5-21). <http://news.foodmate.net/2015/05/310328.html>