

全反式维甲酸对人胃腺癌细胞株 BGC-823 迁移的影响

杨艳艳¹, 胡安拉^{1,2}, 张素梅¹, 周青¹, 汪渊¹

摘要 目的 研究全反式维甲酸(ATRA)对人胃腺癌细胞株 BGC-823 细胞迁移能力的影响及其可能机制。方法 不同浓度 ATRA 处理 BGC-823 后, MTT 法检测 ATRA 对细胞增殖的影响并计算半数抑制率(IC₅₀), 倒置显微镜下观察细胞形态学变化, 划痕法检测其对细胞迁移能力的作用, 平板克隆法观察其对细胞体外克隆形成能力的影响, Western blot 法检测可能与迁移相关蛋白的表达。结果 ATRA 对 BGC-

823 细胞增殖具有明显的抑制作用, 呈浓度依赖性, IC₅₀ 为 42.402 5 μmol/L; ATRA 可抑制细胞生长速度, 使细胞形态拉长; ATRA 可抑制 BGC-823 细胞的迁移; ATRA 可明显降低细胞克隆形成数($P < 0.05$); Western blot 结果显示 ATRA 显著降低肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的表达和肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化。结论 ATRA 对人胃腺癌细胞株 BGC-823 细胞的迁移具有抑制作用, 可能与降低 MLCK 表达和 MLC 磷酸化水平有关。

关键词 ATRA; 胃癌; 迁移; 肌球蛋白轻链激酶; 肌球蛋白轻链

中图分类号 R 735; R 966; R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0867-05

2014-02-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272399); 安徽省自然科学基金(编号: 090413116)

作者单位: ¹ 安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室, 合肥 230032

² 安徽医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 合肥 230032

作者简介: 杨艳艳, 女, 硕士研究生;

汪渊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangyuan@ahmu.edu.cn

2008 年, 全球大约共新增 989 600 例胃癌患者和 738 000 例癌症死亡患者, 占全球除皮肤癌以外的癌症总发病率的 8% 以及新增癌症死亡人数的 10%^[1], 进展期胃癌的淋巴转移率高达约 70%。肿瘤细胞迁移与肿瘤转移的基础, 其过程十分复杂, 与

[11] Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, et al. Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis[J]. Int J Oncol, 2012, 41(6): 2029-37.

[12] Inoue T, Suzuki-Karasaki Y. Mitochondrial superoxide mediates

mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions in TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61C: 273-84.

[13] 谢加力. ERS 与 TRAIL 在大鼠肝星状细胞凋亡中的相互关系探讨[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.

Effects of TRAIL on the hepatic stellate cells apoptosis in hepatic stellate cells and relevant mechanism

Li Xiaohui^{1,2}, Li Jun^{1,2}, Huang Yan^{1,2}, et al

(¹School of Pharmacy, ²Institute for Liver Diseases, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To detect the effect of ER stress and TRAIL in rat hepatic stellate cell lines (HSC-T6) and to explore the possible apoptosis pathway. **Methods** Hepatic stellate cell (HSC) apoptosis was measured by Hoechst staining apoptosis detection kit and flow cytometric analysis. CHOP, GRP78, C-Caspase-12 and -3 protein expression were analyzed by Western blot; Bax mRNA expression was evaluated by RT-PCR. **Results** It showed that PDGF-induced HSC as control. The increased of HSC apoptosis was measured by Hoechst 33258 and flow cytometry. In addition, TRAIL increased the expression of Bax and C-Caspase-3 in activated HSC. TRAIL also increased C-Caspase-12, CHOP and GRP78 in activated HSC. These results suggested that TRAIL induced apoptosis through ERS-mediated pathways in HSC. **Conclusion** These results demonstrate that TRAIL induces apoptosis through ERS-mediated pathways in HSC.

Key words TNF-related apoptosis inducing-ligand; hepatic stellate cell; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; Caspase-12

多种细胞骨架成分和功能的变化密切相关^[2]。全反式维甲酸(all-*trans*-retinoic acid, ATRA) 是肿瘤细胞的分化诱导剂, 国内率先应用 ATRA 对急性早幼粒细胞白血病患者进行分化诱导治疗, 取得巨大成功^[3]。同时 ATRA 具有癌症的化学预防作用, 阻止肿瘤血管生成等作用。研究^[4-5]表明, ATRA 可明显抑制人分化胃腺癌细胞株 SGC7901 的增殖; 在人肺腺癌细胞株 A549 中, ATRA 可以通过抑制肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK) 的表达抑制其迁移。但是 ATRA 是否能够抑制人低分化胃腺癌细胞株 BGC-823 的迁移以及是否与 MLCK 有关, 尚需进一步研究。该研究拟观察 ATRA 对 BGC-823 细胞增殖和迁移能力的影响, 并检测其作用 BGC-823 细胞后相关迁移蛋白表达的变化, 探讨 ATRA 抑制 BGC-823 细胞迁移的可能机制, 为 ATRA 更好的用于临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞 BGC-823 购自中国科学院上海细胞库, 于本实验室保存; RPMI-1640 培养基购于 Gibco 公司(美国); ATRA 购于 Sigma 公司(美国), 使用二甲基亚砜(DMSO) 作为溶剂配成终浓度为 10 mmol/L 的储备液备用, 避光保存于 -20 °C 冰箱; 胎牛血清购于杭州四季青生物工程有限公司; MTT 购于 Sigma 公司(美国), 于 -20 °C 避光保存; 鼠抗人 β -actin、MLCK、磷酸化肌球蛋白轻链(phosphorylation of myosin light chain, p-MLC)、肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC) 均购自 Santa Cruz 公司(美国); 羊抗鼠 IgG、SuperSignal West Pico Trial Kit(ECL 显色试剂盒) 和 BCA 定量试剂盒均购自 Pierce 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃腺癌细胞株 BGC-823 培养条件为含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI-1640 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的温箱中。当细胞密度为 80% ~ 90% 时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞进行传代。

1.2.2 细胞增殖实验 采用 MTT 法, 将处于对数生长期的 BGC-823 细胞调整密度至 5×10^4 个/L 接种于 96 孔细胞培养板中, 200 μ l/孔, 待贴壁后弃去原液, 分别加入含终浓度为 10、20、30、40、50、60、70 μ mol/L ATRA 的完全培养液, 同时设 DMSO 溶剂对照组和调零组, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中孵育 1 d 后, 每孔加入 20 μ l MTT(5 g/L) 37

°C 孵育 2 ~ 4 h 后, 倾去培养液, 加入 DMSO 溶解结晶物(100 μ l/孔), 振荡 20 min 后, 使用酶标仪测定 570 nm 吸光度(optical density, OD) 值。每个浓度的药物均设置 4 个复孔, 每组取 3 次实验平均值, 根据各组中 OD₅₇₀ 平均值, 按照如下公式计算细胞生长抑制率: 抑制率(%) = $[1 - (\text{实验孔 OD}_{570} - \text{调零孔 OD}_{570}) / (\text{对照孔 OD}_{570} - \text{调零孔 OD}_{570})] \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞形态学观察 使用不同浓度 ATRA(10、40 μ mol/L) 作用细胞 2 d 后, 置于倒置显微镜下(LEICA DMI3000B 德国 LEICA 公司) 观测细胞形态变化, 并进行拍照。

1.2.4 细胞划痕实验 将处于对数生长期的 BGC-823 细胞, 使用胰蛋白酶进行消化后, 反复吹打成单细胞悬液并进行细胞计数, 将细胞密度调至 5×10^6 个/L 接种于 24 孔无菌培养板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 待细胞完全长满后弃去培养液, 用白色无菌枪头在 24 孔板底部轻轻划出“十”字造成“伤口”, 用 PBS 清洗 3 遍, 洗去悬浮的细胞, 加入配制好的含 ATRA(10、40 μ mol/L) 的培养基, 在显微镜(LEICA DMI3000B, 德国 LEICA 公司) 下拍照(0 h)。于培养箱中培养 24 h 和 48 h 后再次拍照。利用 Quantity One 软件测量划痕间距, 并进行统计学分析。

1.2.5 平板克隆形成实验 取对数生长期的 BGC-823 细胞, 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液。用吸管反复吹打细胞悬液, 使细胞充分分散成单细胞, 用细胞计数板调整细胞密度为 10^3 个/孔接种至 6 孔板中, 十字摇匀。每隔 3 ~ 4 d 换新鲜培养液 1 次, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养, 每隔一天观察一次, 当细胞培养板中出现肉眼可见的单个克隆时(约 10 d) 终止培养。弃去培养液, 用无菌 PBS 小心冲洗 2 次后, 加入 4% 多聚甲醛进行固定, 约 15 min 后弃去固定液, 加 1% 结晶紫染色液, 10 ~ 30 min 后用流水缓慢冲去染液, 置于室温干燥。在显微镜下计数 > 50 个细胞的克隆数目, 最后计算平均克隆的形成数目。

1.2.6 Western blot 法检测蛋白表达 待 BGC-823 细胞长至密度为 50% 时, 加入不同浓度 ATRA(10、40 μ mol/L) 处理细胞 2 d, 并设 DMSO 溶剂对照组, 用无菌 PBS 浸洗 2 遍, 在滤纸上沥干 PBS 后, 每瓶加入 200 μ l 蛋白提取缓冲液(Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 5 g/L Leupeptin), 置于冰上 20 min,

用细胞刮刮取细胞并将其吸入 1.5 ml EP 管中,反复冻融 3 次(-80 °C /4 °C),以 14 000 r/min 超速冷冻离心机中离心 20 min 后,吸出上清液至干净的 EP 管中,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量后,放入 -80 °C 保存备用。用进样针吸取约 40 μl 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后使用电转移至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,分别加入一抗 MLCK (1 : 500)、β-actin (1 : 1 000)、MLC (1 : 1 000) 和 p-MLC (1 : 500),置于 4 °C 冰箱孵育过夜,次日使用 TBST 洗涤 3 遍后加入适量 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h,再用 TBST 洗涤 3 遍后,在暗室中加入 ECL 试剂盒的 A 和 B 混合液,以 1 : 1 比例混合后均匀涂于 PVDF 膜表面,覆盖上底片,在暗室中进行曝光、显影、定影。实验重复 3 次,采用 Quantity One 分析条带灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,所有定量实验资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间的比较采用方差分析,两两比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 ATRA 对胃腺癌细胞株 BGC-823 增殖的影响

MTT 结果显示 ATRA 能抑制 BGC-823 细胞体外增殖,且随着用药浓度的增加,抑制率呈上升趋势 ($F = 72.845$),其半数抑制率 [half maximal (50%) inhibitory concentration (IC) of a substance, IC_{50}] 值为 42.402 5 μmol/L,见表 1。

表 1 不同浓度 ATRA 对 BGC-823 细胞增殖的影响 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (μmol/L)	OD 值	抑制率 (%)	IC_{50} (μmol/L)
溶剂对照	-	0.72 ± 0.04	-	
ATRA	10	0.70 ± 0.02	4.19	42.402 5
	20	0.66 ± 0.05	9.66	
	30	0.61 ± 0.03	18.03*	
	40	0.59 ± 0.07	21.17*	
	50	0.54 ± 0.08	28.89*	
	60	0.30 ± 0.07	67.93*	
	70	0.12 ± 0.00	98.03*	

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 ATRA 对 BGC-823 细胞形态的影响

溶剂对照组的 BGC-823 细胞生长速度快,形态饱满,呈椭圆形,而 ATRA (10 μmol/L) 组细胞相比于溶剂对照组,细胞拉长,由椭圆形变梭形,细胞间隙变大,细胞数量减少。ATRA (40 μmol/L) 组细胞生长速度变慢,形态变得更加狭长,由梭形变成不规则形,细胞

数目减少明显。见图 1。

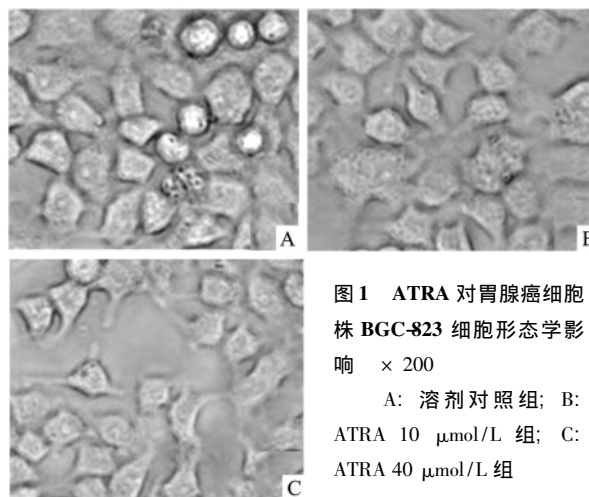


图 1 ATRA 对胃腺癌细胞株 BGC-823 细胞形态学影响 × 200
A: 溶剂对照组; B: ATRA 10 μmol/L 组; C: ATRA 40 μmol/L 组

2.3 ATRA 对 BGC-823 细胞迁移的影响

ATRA 组作用 BGC-823 细胞 2 d, ATRA 组与溶剂对照组比较,细胞的迁移率降低。同时随着用药浓度的增加,抑制效果更加明显 ($F = 1163.483$),见图 2。

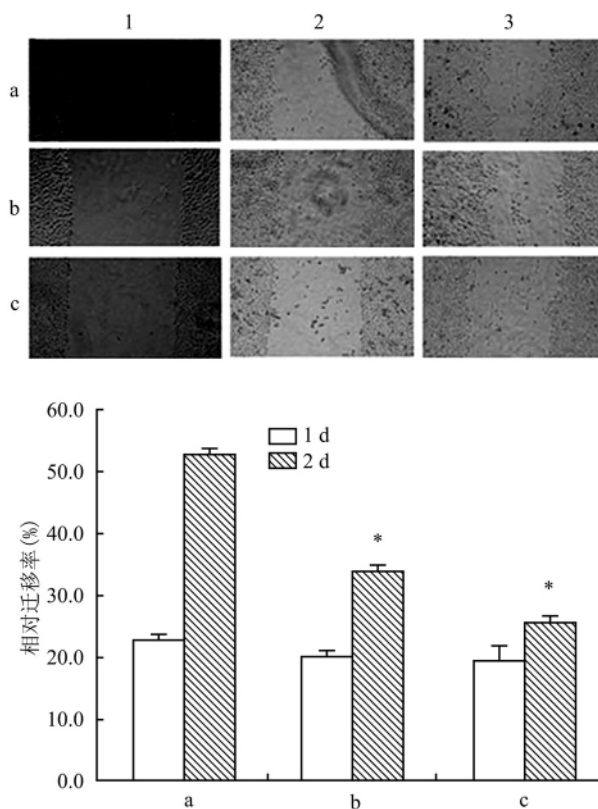


图 2 ATRA 对胃腺癌细胞株 BGC-823 细胞迁移的影响 × 100
a: 溶剂对照组; b: ATRA 10 μmol/L 组; c: ATRA 40 μmol/L 组; 1: 0 d; 2: 1 d; 3: 2 d; 与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 ATRA 对细胞克隆形成能力的影响

ATRA

作用 BGC-823 细胞 2 d 后 ,ATRA (10 $\mu\text{mol/L}$) 组、ATRA (25 $\mu\text{mol/L}$) 组相比于溶剂对照组 ,细胞克隆数明显减少且每个克隆的细胞数减少 ($F = 96.836$) 。见图 3。

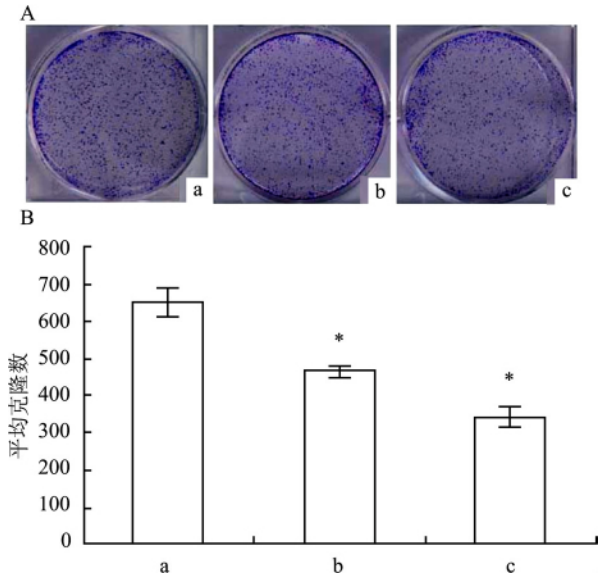


图3 ATRA 对胃腺癌细胞株 BGC-823 细胞克隆形成能力的影响 A: 克隆图; a: 溶剂对照组; b: ATRA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; c: ATRA 25 $\mu\text{mol/L}$ 组; B: 平均克隆形成数目分析图; 与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 ATRA 对相关迁移蛋白表达的影响 ATRA 作用 BGC-823 细胞 2 d 后 ,与溶剂对照组相比 ,ATRA 组 MLCK 表达和 MLC 磷酸化水平都明显降低 ($F = 42.699$) ,ATRA 40 $\mu\text{mol/L}$ 组 MLC 磷酸化水平也显著降低 ($F = 68.371$) 。见图 4。

3 讨论

ATRA 是维生素 A 的活性代谢物 ,在许多生理功能中 ,如视觉、细胞增殖和分化、胎儿发育等 ,ATRA 起着至关重要的作用^[6]。有研究^[7-8]表明 ATRA 可以抑制多种类型肿瘤细胞的增殖和诱导肿瘤细胞分化 ,包括乳腺癌和肺癌等。本研究结果通过镜下细胞形态观察及 MTT 实验显示 ,ATRA 能明显抑制人胃腺癌细胞株 BGC-823 的增殖 ,且抑制率呈浓度依赖性。

肿瘤细胞的运动能力是肿瘤侵袭周围组织 ,发生远处转移的首要条件。肿瘤细胞从原发肿瘤部位脱离后 ,侵袭周围组织 ,或者经血管和淋巴管转移到远处组织 ,而转移的肿瘤细胞只有形成一个克隆后才能形成转移瘤。所以肿瘤细胞的迁移和克隆形

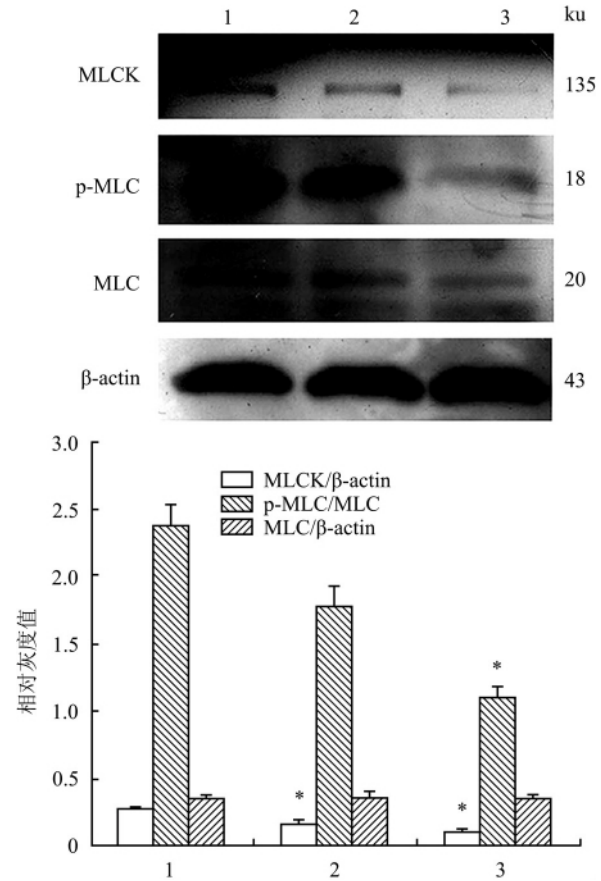


图4 ATRA 处理 BGC-823 细胞 2 d 后迁移相关蛋白表达 1: 溶剂对照组; 2: ATRA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: ATRA 40 $\mu\text{mol/L}$ 组; 与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

成能力在肿瘤细胞侵袭和转移中扮演着重要角色。本研究中 ,平板克隆实验显示 ,与溶剂对照组相比 ,ATRA 组处理 2 d 后的 BGC-823 细胞克隆形成能力明显下降 ,主要表现为形成的克隆数目相对减少并且每个克隆的平均细胞数目有所降低。

MLCK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶 ,可由 Ca^{2+} / CaM 激活 ,使 MLC 磷酸化^[9-10]。而 MLC 磷酸化的调节与细胞骨架收缩活动密切相关^[11] ,MLC 磷酸化后又可以调节肌球蛋白的收缩 ,并参与细胞黏附、平滑肌收缩和迁移等细胞运动过程。本研究通过划痕实验显示 2 d 内 ATRA 组细胞迁移距离明显缩短 ,与溶剂对照组相比差异有统计学意义 ,说明 ATRA 可以降低胃癌细胞的迁移能力。进一步通过 Western blot 检测 ,结果表明 ,与溶剂对照组相比 ,ATRA 组 MLCK 表达和 MLC 磷酸化水平明显降低 ,并且随着用药浓度的增加而逐渐下降。这与本研究中的划痕实验以及平板克隆实验的结果也是相吻合的 ,由此表明 MLCK 表达和 MLC 磷酸化水平均与肿瘤细

胞迁移相关,且 ATRA 能抑制 BGC-823 细胞迁移和克隆形成能力。这些研究结果表明 ATRA 可以发挥抑制低分化胃腺癌 BGC-823 细胞的迁移和胃癌细胞的克隆形成能力的作用,因此可以抑制胃癌的转移。

综上所述,ATRA 可能通过下调 MLCK 和降低 MLC 磷酸化来抑制 BGC-823 细胞的迁移。然而肿瘤细胞的迁移是一个极其复杂的过程,涉及多步骤、多因子参与,ATRA 抑制肿瘤细胞迁移的完整机制仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, et al. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts [J]. J Cell Biol, 2004, 164(3): 427-39.
- [3] Huang M E, Ye Y C, Chen S R, et al. Use of all-*trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia [J]. Blood, 1988, 72(2): 567-72.
- [4] 施锐,张素梅,桂淑玉,等.全反式维甲酸对人胃癌细胞株 caveolin-1 表达和定位的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(3): 249-52.
- [5] 桂淑玉,王银凤,程英,等.全反式维甲酸抑制人肺腺癌 A549 细胞迁移的机制探讨 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(1): 33-6.
- [6] Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace V M. All *trans* retinoic acid and cancer [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2011, 33(2): 241-9.
- [7] Bushue N, Wan Y J Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(13): 1285-98.
- [8] Ye X F, Wu Q, Liu X F, et al. Distinct role and functional mode of TR3 and RARalpha in mediating ATRA-induced signalling pathway in breast and gastric cancer cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(1): 98-113.
- [9] Gallagher P J, Herring B P, Stull J T. Myosin light chain kinases [J]. J Muscle Res Cell Motil, 1997, 18(1): 1-16.
- [10] Tan I, Leung T. Myosin light chain kinases: division of work in cell migration [J]. Cell Adh Migr, 2009, 3(3): 256-8.
- [11] Hadeed J G, Bond J E, Selim M A, et al. Calcium-dependent signaling in Dupuytren's disease [J]. Hand (NY), 2011, 6(2): 159-64.

Effect of all-*trans* retinoic acid on the migration of human gastric cancer BGC-823 cells

Yang Yanyan¹, Hu Anla^{1,2}, Zhang Sumei¹, et al

(¹Laboratory of Molecular Biology, Dept of Biochemistry, Anhui Medical University;

Key Laboratory of Gene Resource Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032;

²Dept of Food and Nutrition Hygiene, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect of all-*trans* retinoic acid (ATRA) on the migration of human gastric cancer BGC-823 cells and its probable mechanism. **Methods** MTT assay was performed to measure the proliferation of BGC-823 cells treated with different concentrations of ATRA and calculated the IC₅₀. Light microscope was used to observe morphologic changes. The effect of ATRA on the migration of BGC-823 cells was analyzed by wound healing assay. The effect of ATRA on the colony formation rate of BGC-823 cells was measured by plate colony formation assay. The expression of proteins involved in migration was detected by Western blot. **Results** ATRA could inhibit the proliferation of cell line BGC-823 significantly. With the increase of concentration, the inhibition rate was more obvious and the IC₅₀ was 42.402 5 μmol/L. ATRA could inhibit cell growth and made them elongated. ATRA could decrease the distances of migration of BGC-823. ATRA could decrease the colony formation of BGC-823 significantly, compared with DMSO control ($P < 0.05$). ATRA could inhibit the expression of MLCK and phosphorylation of MLC protein which was detected by Western blot. **Conclusion** ATRA can inhibit the migration of human gastric carcinoma cell line BGC-823, which may be related to the down regulation of expression of MLCK and phosphorylation of MLC protein.

Key words ATRA; gastric cancer; migration; MLCK; MLC