

◇ 基础医学研究 ◇

N-(4-羟基苯基) 维生素甲酰胺抑制 人肺腺癌 A549 细胞体外迁移机制

张玲¹, 黄道斌², 吕俊¹, 汪渊³

摘要 目的 研究 N-(4-羟基苯基) 维生素甲酰胺(4-HPR) 对人肺腺癌细胞 A549 体外迁移能力的影响及其作用机制。方法 1 μmol/L 全反式维甲酸(ATRA) 和 4-HPR 处理肺腺癌 A549 细胞 24 h 后, 细胞划痕实验检测其对 A549 细胞体外迁移能力的影响; Western blot 法检测骨桥蛋白(OPN)、肌球蛋白轻链激酶(MLCK) 的表达和肌球蛋白轻链(MLC) 磷酸化程度; 细胞划痕实验观察 MLCK 抑制剂 ML-7 对 A549 细胞迁移能力的影响。结果 1 μmol/L 4-HPR 处理的 A549 细胞与细胞对照以及溶剂对照细胞相比, 迁移距离明显降低 ($P < 0.05$); Western blot 分析结果表明 1 μmol/L 4-HPR 可明显降低 A549 细胞 MLCK 的表达和 MLC 磷酸化 ($P < 0.05$), 而对 OPN 表达无显著影响; ML-7 可明显减少 A549 细胞迁移距离 ($P < 0.05$)。结论 4-HPR 可能通过减少 MLCK 的表达和 MLC 磷酸化, 抑制 A549 细胞的体外迁移。
关键词 4-HPR; 人肺腺癌 A549; 迁移; 肌球蛋白轻链激酶; 细胞划痕实验

中图分类号 R 734.2; R 329.24; R 73-37; R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0137-04

肺癌在世界上居男女癌症致死之首, 严重危害人类健康。肺癌的侵袭转移是导致治疗失败和患者死亡的主要原因之一, 探寻有效的肺癌治疗药物控制疾病的发展、促进转归具有重要意义。N-(4-羟基苯基) 维生素甲酰胺(4-HPR) 是全反式维甲酸(ATRA) 的衍生物之一, 近年文献^[1-3] 报道显示 4-HPR 可抑制前列腺癌细胞株 PC3 和 DU145 迁移和侵袭, 并且可抑制动物体内前列腺肿瘤的增长和转移; ATRA 另一衍生物 N-(3-三氟甲基苯基) 维甲酰胺随药物浓度增加而明显抑制肺腺癌 A549 细胞的迁移。这些研究结果提示 4-HPR 可能存在对 A549 细

胞体外迁移的抑制作用。该研究利用 4-HPR 处理肺腺癌 A549 细胞, 观察其对细胞体外迁移的影响, 并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 肺癌细胞株 A549 购自美国模式培养物集存库(ATCC); ATRA 和肌球蛋白轻链激酶(MLCK) 抑制剂 ML-7、4-HPR、DMSO、鼠源抗人 MLCK 抗体购自 Sigma 公司; 细胞和前两种制剂由安徽医科大学分子生物学实验室惠赠; DMEM 购自 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季青生物公司; 鼠源抗人骨桥蛋白(OPN) 和 β-actin 抗体、羊源抗人肌球蛋白轻链(MLC) 和磷酸化肌球蛋白轻链(pMLC) 抗体购自 Santa Cruz 公司; HRP 标记的山羊来源抗鼠、兔来源抗羊 IgG 抗体和 ECL 显色试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺癌细胞株 A549 采用 DMEM 培养, 加入 10% 胎牛血清和 1% 青、链霉素, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中, 当细胞密度为 80% ~ 90% 时, 用 0.25% (含 0.53 mmol/L 的 EDTA) 的胰酶消化传代。

1.2.2 细胞划痕实验检测 A549 细胞的迁移情况

取处于对数生长期的 A549 细胞, 胰酶消化吹打重悬为单细胞悬液, 计数板计数, 以 5×10^6 /L 密度种入 12 孔细胞培养板, 培养箱中过夜培养。待细胞长成单层即弃去培养液, 用细胞刮在 12 孔板每孔中央划出一划痕, 洗去死细胞后显微镜下拍照。按实验设计分细胞对照组、溶剂对照组、1 μmol/L ATRA 组、1 μmol/L 4-HPR 组, 处理 24 h 后, 在同一观察点处显微镜拍照记录细胞生长情况, 实验重复 3 次。设立 MLCK 抑制剂 ML-7 (15 μmol/L) 组。利用 Image Pro Plus 6.0 软件测量每孔多个点划痕间距, 取均值, 并用处理前的距离减去处理后的距离即为 24 h 细胞迁移距离, 数据用统计软件分析。

1.2.3 Western blot 检测 A549 细胞 OPN 和 MLCK 表达水平 收集药物处理的细胞, 分细胞对照组、溶

2013-07-11 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学基金(编号: KJ2010B245)

作者单位: 皖南医学院¹ 生化教研室、² 计算机教研室 芜湖 241002

³ 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

作者简介: 张玲, 女, 讲师;

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

剂对照组、1 μmol/L ATRA 组、1 μmol/L 4-HPR 组，加入 RIPA 缓冲液(Tris-HCl ,pH 7.4; 150 mmol/L NaCl ,1 mmol/L EDTA ,1% Triton ,0.1% SDS ,5 mg/L Leupeptin ,1 mmol/L PMSF) 提取蛋白 ,BCA 法蛋白定量。取 50 μg/孔蛋白上样行 SDS-PAGE 电泳 ,电转至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h ,加鼠源抗人、羊源抗人抗体 4 ℃ 孵育过夜 ,经 PBST 洗涤后再加入相应浓度的山羊来源抗鼠、兔来源抗羊 IgG 抗体室温孵育 2 h ,洗涤后用 ECL 试剂盒检测 ,用胶片曝光 ,显影显示结果 ,以 Image Pro Plus 6.0 软件进行灰度扫描 ,分析各条带的灰度值 ,分别以 MLCK/β-actin、OPN/β-actin、pMLC/MLC 进行比值计算作半定量分析。实验重复 3 次 ,取其均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间计量资料比较采用单因素方差分析和两独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 4-HPR 抑制 A549 细胞的迁移 1 μmol/L 4-HPR 处理 24 h 的 A549 细胞和细胞对照、溶剂对照组相比 ,细胞迁移距离减少 ($F = 121.8 ,P < 0.05$) ,同浓度的前身药物 ATRA 处理细胞的迁移距离无明显变化 ,提示 4-HPR 处理后 A549 细胞的迁移能力明显减弱。见图 1。

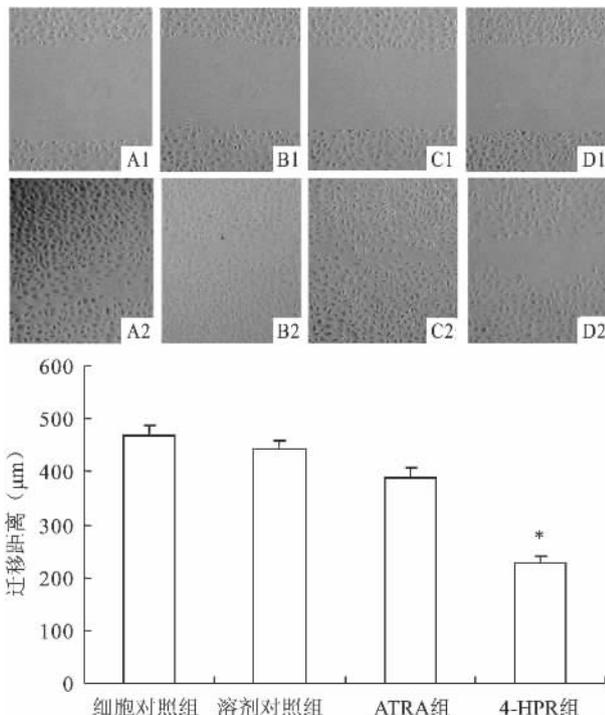


图1 细胞划痕实验检测 4-HPR 处理后 A549 细胞的迁移 ×100
A: 细胞对照组; B: 溶剂对照组; C: ATRA 组; D: 4-HPR 组; 1: 0 h; 2: 24 h; 与细胞对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 4-HPR 下调 A549 细胞的 MLCK 表达

Western blot 结果分析表明 1 μmol/L 4-HPR 可明显降低 A549 细胞 MLCK 的表达和 MLC 的磷酸化 ,对 OPN 的表达无显著影响 ,同浓度的前身药物 ATRA 对 MLCK 和 MLC 的磷酸化、OPN 的表达均无明显影响 ($F_{MLCK/\beta-actin} = 112.9 ,F_{pMLC/MLC} = 90.1 ,P < 0.05$; $F_{OPN/\beta-actin} = 3.2 ,P > 0.05$) ,见图 2。

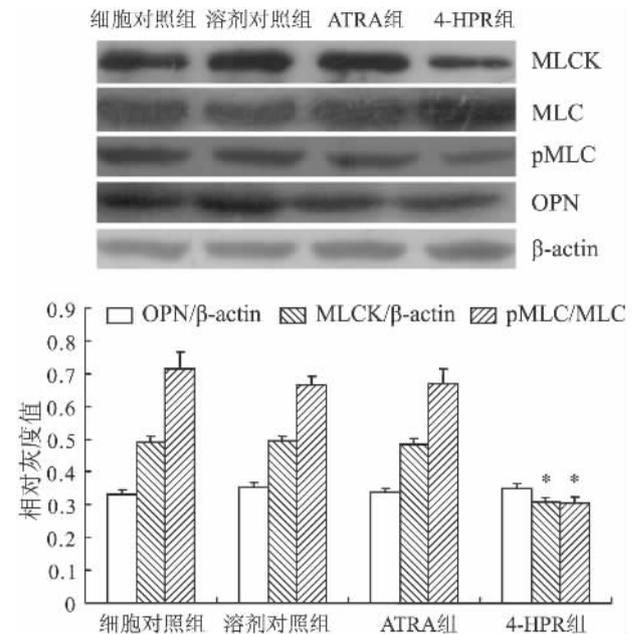


图2 4-HPR 对 A549 细胞内 MLCK、MLC 磷酸化和 OPN 表达水平的影响
与细胞对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 MLCK 抑制剂 ML-7 抑制 A549 细胞的迁移

ML-7 可明显抑制 A549 细胞迁移 ($P < 0.05$) ,提示 4-HPR 可能通过降低 MLCK 的表达和 MLC 的磷酸化抑制 A549 细胞的运动 ,致使细胞迁移率降低。见图 3。

3 讨论

维甲酸类化合物(retinoic acid ,RA) 是近年来研究较多的肿瘤化学预防药物。在前期研究^[4]中显示 4-HPR 可明显抑制人肺腺癌细胞株 A549 的增殖、促进其凋亡。有文献^[5]报道显示 4-HPR 可抑制乳腺癌、神经母细胞瘤、恶性胶质瘤的转移。肿瘤细胞的迁移是肿瘤侵袭转移的必要条件。本研究中通过细胞划痕实验观察到 1 μmol/L 4-HPR 能明显抑制肺腺癌 A549 细胞的体外迁移 ,其前身药物 ATRA 同浓度组并没有效应。说明 4-HPR 相比其前身药物而言 ,具备更好的肺癌治疗效果。

肿瘤细胞侵袭和转移相关的生物学特性包括生

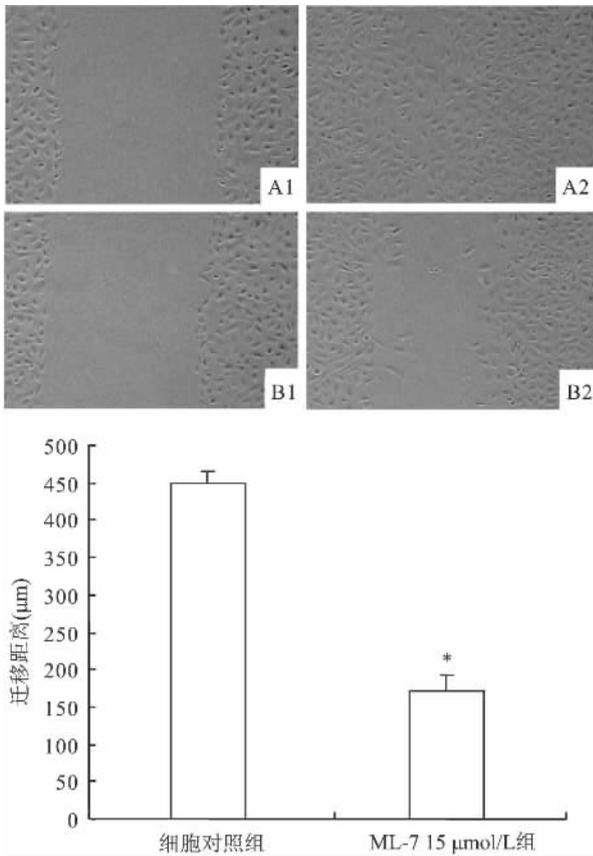


图3 细胞划痕实验检测 MLCK 抑制剂 ML-7

处理后 A549 细胞的迁移 ×100

A: 细胞对照组; B: ML-7 15 μmol/L 组; 1: 0 h; 2: 24 h; 与细胞对照组比较: * $P < 0.05$

长调控机制的缺失,细胞凋亡减少,细胞骨架改变,运动能力的改变等^[6]。OPN 是由单基因编码的一种分子量为 70 ku 的酸性糖蛋白,是一种细胞骨架蛋白。研究^[7]显示肿瘤的侵袭转移可能与 OPN 的表达增加有关,它可通过与细胞外间质和细胞表面受体(整合素、CD44)结合来刺激细胞的黏附,增加细胞外间质的信号转导过程而发挥作用。亦有报道沉默 opn 基因表达,可抑制 A549 细胞的增殖与迁移^[8]。MLCK 是一种 Ca^{2+} /CaM 依赖性的蛋白激酶,当细胞内钙离子浓度升高时,可激活 MLCK,进一步使 MLC 磷酸化,从而利于肌球蛋白与肌动蛋白微丝的相互作用,促进细胞的移行。它的表达增加和激活是细胞运动的启动因素之一,而细胞运动与肿瘤细胞的侵袭转移也有着紧密关联。近年研究^[9]报道 MLCK 的表达增加是促发肿瘤细胞运动转移的因素之一。在本实验中,Western blot 结果分析表明 1 μmol/L 4-HPR 可明显降低 A549 细胞内运动相关蛋白 MLCK 的表达和 MLC 的磷酸化,但对细胞骨架蛋白 OPN 表达无明显影响。有文献^[7]报道 OPN 存在不同的剪接方式产物和翻译后修饰形式,

它们在不同类型细胞中的表达量和功能各不同,本文所检测的只是其中一种形式,OPN 其他结构形式是否会在药物作用后有表达量的改变,需要进一步实验证实。为明确实验中 MLCK 的表达和 MLC 的磷酸化减少是否与 A549 细胞迁移减弱有关,实验采用 MLCK 抑制剂 ML-7 抑制 MLCK 的表达来验证。ML-7 是一种选择性的 MLCK 抑制剂^[10],研究^[11]表明,它通过阻断 MLCK 的表达可抑制乳腺癌细胞迁移,有显著抗癌作用。本研究观察到 ML-7 可明显抑制 A549 细胞迁移,表明 4-HPR 可能通过减少细胞中 MLCK 的表达和 MLC 的磷酸化来阻碍 A549 细胞迁移。这些结果为进一步阐明维甲酸衍生物 4-HPR 防治肿瘤转移的分子机制以及 4-HPR 和 MLCK 抑制剂在肺癌治疗中的应用提供实验依据。

参考文献

- [1] Benelli R, Monteghirfo S, Venè R, et al. The chemopreventive retinoid 4HPR impairs prostate cancer cell migration and invasion by interfering with FAK/AKT/GSK3β pathway and β-catenin stability [J]. Mol Cancer 2010 9: 142–55.
- [2] Takahashi N, Watanabe Y, Maitani Y, et al. p-Dodecylaminophenol derived from the synthetic retinoid, fenretinide: antitumor efficacy *in vitro* and *in vivo* against human prostate cancer and mechanism of action [J]. Int J Cancer, 2008, 122(3): 689–98.
- [3] 王银凤,程英,桂淑玉,等. N-(3-三氟甲基苯基) 维甲酸对人肺腺癌 A549 细胞迁移能力的影响及其可能机制 [J]. 安徽医科大学学报 2010 46(5): 439–42.
- [4] 张玲,桂淑玉,李庆,等. 4-HPR 体外诱导 A549 细胞凋亡与 Bel-2 家族蛋白相关性研究 [J]. 安徽医科大学学报 2007, 42(6): 616–9.
- [5] Sogno I, Venè R, Sapienza C, et al. Anti-angiogenic properties of chemopreventive drugs: fenretinide as a prototype [J]. Recent Results Cancer Res 2009 181: 71–6.
- [6] 朱怀荣,侯建军,魏文科,等. 医用分子细胞生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社 2000: 109–76.
- [7] Shevde L A, Das S, Clark D W, et al. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis [J]. Curr Mol Med 2010, 10(1): 71–81.
- [8] Zhao B, Sun T, Meng F, et al. Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol 2011, 137(7): 1061–70.
- [9] Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation [J]. Ann N Y Acad Sci 2012, 125(8): 9–18.
- [10] Krarup T, Jakobsen L D, Jensen B S, et al. Na^+ - K^+ - Cl^- cotransport in Ehrlich cells: regulation by protein phosphatases and kinases [J]. Am J Physiol 1998, 275(1 Pt 1): C239–50.
- [11] Zhou X, Liu Y, You J, et al. Myosin light-chain kinase contributes to the proliferation and migration of breast cancer cells through cross-talk with activated ERK1/2 [J]. Cancer Lett 2008, 270(2): 312–27.

TRAIL 真核表达载体联合顺铂对胃癌细胞 MDR1/P-gp 的影响

崔喻芳 张开光 喻龙姗 朱邢超

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 联合应用顺铂对胃癌多药耐药 (MDR) 细胞 SGC7901/VCR 的杀伤作用及作用机制。方法 采用人可溶性 TRAIL (sTRAIL) 重组表达质粒 pAVV-sTRAIL 转染 SGC7901/VCR 细胞, 利用其自身分泌表达的 sTRAIL 蛋白联合亚毒性剂量 (0.535 g/L) 顺铂, 联合作用于 SGC7901/VCR 细胞。采用 MTT 和流式细胞术分别检测细胞存活率及凋亡率, RT-PCR 及 ELISA 分别检测细胞内 MDR1 基因和 P-糖蛋白 (P-gp) 的表达。结果 MTT 结果显示: 联合组的细胞存活率较对照组、TRAIL 组及顺铂组明显减低 ($P < 0.01$); 流式细胞术结果表明: 对照组、TRAIL 组、顺铂组及联合组的细胞晚期凋亡率分别为 0.74%、7.68%、18.52% 和 24.41%, 与其他 3 组相比, 联合组细胞凋亡率明显升高; RT-PCR 及 ELISA 结果表明: 联合组 MDR1/P-gp 的表达也较对照组、

TRAIL 组及顺铂组明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 sTRAIL 与顺铂联合可协同杀伤 SGC7901/VCR 细胞, 可逆转胃癌细胞的 MDR, 其机制可能是通过下调 MDR 基因 MDR1/P-gp 的表达有关。

关键词 胃肿瘤; 多药耐药; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; MDR1; P-糖蛋白

中图分类号 R 735.2; R 573.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0140-05

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 并占癌症相关死因的第 2 位^[1-2]。在东亚地区尤其是中国, 胃癌的发病率和病死率占首位^[3]。目前, 胃癌治疗仍以术后化疗为主, 但肿瘤细胞在化疗过程中对药物产生的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 往往导致治疗失败。MDR 是指对一种药物具有耐药性的同时, 对其他结构不同、作用靶点不同的抗肿瘤药物也具有耐药性, 包括原发性耐药和继发性耐药。经典的 MDR 主要与细胞内药物蓄积减少和泵出药物增加有关, 主要由 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 介

2013-08-26 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085MH167)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

作者简介: 崔喻芳, 女, 硕士研究生;

张开光, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zkg@medmail.com.cn

Mechanism of N-(4-hydroxyphenyl) retinoide in inhibiting the migration of human lung adenocarcinoma of A549 cells

Zhang Ling¹, Huang Daobin², Lv Jun¹, et al

(¹Dept of Biochemistry, ²Dept of Computer, Wannan Medical College, Wuhu 241002)

Abstract Objective To investigate the influences of N-(4-hydroxyphenyl) retinoide (4-HPR) on the migration of human lung adenocarcinoma cells and its mechanism. **Methods** Cell scarification test was performed to measure the migration of A549 cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ 4-HPR. The expression level of osteopontin (OPN), myosin light chain kinase (MLCK) and phosphorylation of myosin light chain (MLC) in A549 cells treated by 4-HPR was detected by Western blot, respectively. The effect of ML-7, a selective inhibitor of MLCK, on the migration of A549 cells was analyzed by cell scarification test. **Results** Compared with cell and solvent control group, the migration distance of A549 cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ 4-HPR was obviously decreased ($P < 0.05$). The Western blot analysis showed that 1 $\mu\text{mol/L}$ 4-HPR could significantly reduce the expression of MLCK and phosphorylation of MLC protein ($P < 0.05$), while had no influence on the expression of OPN. ML-7 could decrease the distances of migration of A549 cells notably ($P < 0.05$). **Conclusion** 4-HPR may inhibit the migration of A549 cells through decreasing the expression of MLCK and phosphorylation of MLC protein.

Key words 4-HPR; human lung adenocarcinoma A549 cell; migration; myosin light-chain kinase; scarification test