

低浓度丝裂霉素对肺腺癌 A549 细胞增殖及调控的影响*

赵俊刚, 鲁继斌, 门万夫, 张 磊

(中国医科大学附属盛京医院 胸外科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的: 探讨低浓度丝裂霉素对肺腺癌 A549 细胞增殖及调控的影响。方法: 应用 Western-blot 及 RT-PCR 方法检测低浓度丝裂霉素处理后的肺腺癌 A549 细胞中 caspases-3、p21、RAR α 、nm23、bcl-2、cyclinD3 表达, MTT 法检测细胞的增殖抑制情况。结果: 低浓度丝裂霉素处理后的肺腺癌 A549 细胞中 caspases-3、p21、nm23 表达增强, RAR α 、bcl-2、cyclinD3 表达减弱, 处理后的细胞出现明显的增殖抑制。结论: 低浓度丝裂霉素能够使肺腺癌 A549 细胞增殖抑制, 癌基因表达水平下调, 抑癌基因表达上调, 多基因表达水平的改变可能参与了肿瘤细胞的分化调节。

[关键词] 丝裂霉素; 肺; 腺癌; 细胞分化

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)06-0601-04

Effect of Low Concentration of Mitomycin on the Proliferation and Cell Cycle Regulation of A549 Lung Cancer Cell

ZHAO Jungang, LU Jibin, MEN Wanfu, ZHANG Lei

(Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 10004, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the impact of low concentration of mitomycin on proliferation and regulation of human lung adenocarcinoma cells A549. **Methods:** Western-blot and RT-PCR methods were used to detect the expression changes of caspases-3, p21, RAR α , nm23, bcl-2 and cyclinD3 in lung adenocarcinoma cells A549 after treating with low concentration of mitomycin. **Results:** The expression Caspases-3, p21 and nm23 increased in the lung adenocarcinoma cells A549 after low concentrations of mitomycin handling, while RAR α , bcl-2 and cyclinD3 decreased. **Conclusions:** The low concentration of mitomycin enables the proliferation and expression of lung adenocarcinoma cells A549 to change. It leads to cell proliferation inhibition, low expression of oncogenes and increased expression of tumor suppressor genes, and the changes in the expression level of polygenes participate in differentiation regulation of tumor cells in general.

[Key words] mitomycin; lung; adenocarcinoma; cell differentiation

在恶性肿瘤的发生发展过程中, 攻破基底膜后, 就会有少量的肿瘤细胞进入血液^[1]。肿瘤化疗的传统着眼点是杀伤癌细胞, 因此通过细胞毒而发挥作用的抗癌药难以避免选择性差、毒副作用多等缺点。诱导分化在治疗人类急性早幼粒细胞白血病方面所取得的巨大成功, 使诱导分化疗法作为

配合手术治疗的新疗法成为可能^[2]。药物对肿瘤细胞的细胞周期阻滞作用、增殖抑制的研究是诱导分化研究的基础。本研究于 2012 年 6 月通过低浓度丝裂霉素对肺腺癌 A549 细胞增殖及某些基因表达的影响, 探讨诱导分化治疗应用于肺腺癌治疗的机制。

* [基金项目] 辽宁省博士科研启动基金资助(20091108)。

1 材料与方法

1.1 细胞系及细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞株购自中国医科大学肿瘤研究所。A549 细胞接种于含 10% 胎牛血清、PH 值 7.0~7.2 的 RPMI1640 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,反复传代、培养至实验所需数量。实验分为丝裂霉素组(浓度为 9.3 μmol/L),对照组采用等体积的生理盐水处理。

1.2 方法

1.2.1 caspases-3、p21、RARα 基因蛋白表达

9.3 μmol/L 丝裂霉素处理 A549 细胞 24 h,离心收集后用生理盐水冲净,加入 6 倍体积的细胞裂解液 A 置冰上匀浆 15 min,加入 11 μl 细胞裂解液 B,4 °C、17 500 r/min 离心 1.5~2 h,取上清。沉淀(细胞核的成分)加入 100 μl 细胞裂解液 C 在冰水中匀浆,超声粉碎 20 s,间隔 20 s,2~3 次,4 °C 过夜后,4 °C 17 500 r/min 离心 1.5 h,取上清。Lorry 法进行蛋白定量后,按照 Western Blot 方法常规操作,显色后的结果采用 GIS-2020 凝胶图像分析系统扫描分析。

1.2.2 Bcl-2、cyclinD3、nm23 的 mRNA 表达

丝裂霉素 9.3 μmol/L A549 细胞 24 h,消化离心收集后用 PBS 冲净,-80 °C 冰箱中冻存。总 RNA 提取:按 RNAout 说明书操作,取少量总 RNA 用紫外分光光度计测 260 nm 及 280 nm 的吸光度值,检测提取 RNA 的质量及产量。将 RNA 稀释成 1 g/L 浓度,-80 °C 保存备用。反转录合成 cDNA 及 PCR 扩增:加入体系中的各种底物,按照说明书操作进行;PCR 反应条件 94 °C 2 min,94 s°C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 45 s,30 个循环,72 °C 7 min。引物序列如下: Bcl-2 上游引物为 5' ATGTGTGTG-GAGAGCGTCAA3',下游引物为 5' CTCAGC-CCAGACTCACATCA3',产物片段大小 151 bp; cyclinD3 上游引物为 5' TGTTTCCTGTCCTGTTAGG 3',下游引物为 5' CCCTCCCATTTA AGGTGGTT 3',产物片段大小 230 bp; nm23 上游引物为 5' CATTGCGATCAAAC CAGATG3',下游引物为 5' GGCCCTGAGTGCATGTATT3',产物大小 192 bp; β-actin 上游引物为 5' GTGGGGCGCCCCAGGCAC-CA 3',下游引物为 5' CTCCTTAATGTCACG-CACGATTC3',产物大小 513 bp。扩增产物分析 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观

察结果。数据分析用 GIS-2020 凝胶扫描成像分析系统扫描各扩增产物,以 β-actin 吸光度值标准化目的产物吸光度值,得到目的产物的相对含量。

1.2.3 MTT 方法检测细胞增殖

培养细胞经过常规胰酶消化后,接种于 96 孔培养板中,5 × 10⁴ 个/孔,每孔 200 μl,于实验结束前 4 h 加入 5 g/L MTT 10 ul/孔,继续培养 4 h,弃上清液,加入 DMOS 200 μl/孔,待 MTT 代谢产物 Fomrazan 完全溶解后,在酶标比色仪波长 490 nm 下测定各孔 OD 值,每组重复孔 4~6 个。MTT OD 值与癌细胞接种数目之间有良好的线性关系,同时也能反映细胞的代谢活力,并以此反映体外试验中化疗药物对细胞的杀伤效果。细胞抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值)/对照组 OD 值 × 100%。

1.3 数据处理

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用多因素方差分析、单因素方差分析及 LSD 法、Student-Newman-Keuls 法(*q* 检验)做多重比较。统计学方法以 SPSS 11.5 软件处理数据。

2 结果

2.1 Western blot 检测基因蛋白表达

9.3 μmol/L 丝裂霉素处理肺癌 A549 细胞 24 h后,经 GIS-2020 凝胶图像分析系统扫描分析, caspase3 和 p21 在处理组中较对照表达不同程度增强,RARα 在丝裂霉素组中较对照表达降低,有统计学差异(图 1, *P* < 0.05)。

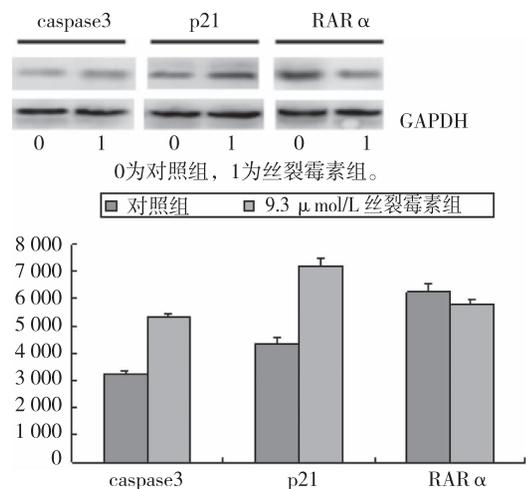


图 1 caspase3、p21 和 RARα 蛋白水平的表达

Fig. 1 Protein expression of the caspase3、p21 and RARα

2.2 mRNA 的改变

bcl-2、cyclinD3 在所有丝裂霉素组中均较对照组表达减弱,而丝裂霉素组的 nm23 表达较对照组

增强,对照组与各药物组之间有显著性差异,药物独立作用对 mRNA 相对含量改变有显著性影响(图 2, $P < 0.05$)。

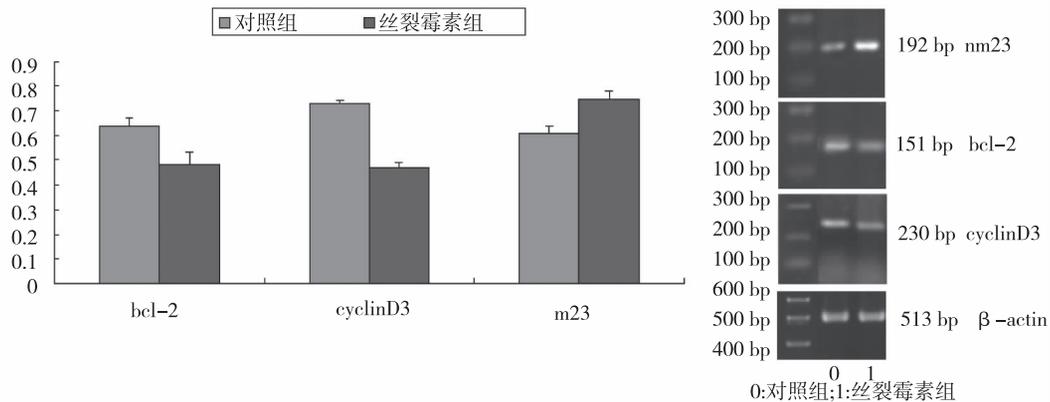


图 2 bcl-2、cyclinD3 和 nm23 的 mRNA 表达(Rt-PCR)

Fig. 2 mRNA expression of bcl-2, cyclinD3 and nm23

2.3 低浓度丝裂霉素对肺腺癌 A549 细胞增殖的影响

经丝裂霉素作用 24 h 后,吸光度值较对照组减少,丝裂霉素组与对照组有显著性差异,A549 细胞出现明显的增殖抑制(表 1, $P < 0.05$)。

表 1 肺腺癌 A549 细胞吸光度及抑制率的变化

Tab.1 The change of absorbance and proliferation inhibition of A549 cells

组别	OD ₄₉₀ 值	增殖抑制率(%)
对照组	1.304 7 ± 0.093 1	
9.3 μmol/L 丝裂霉素组	0.849 0 ± 0.034 9	34.85 ± 2.57

3 讨论

长期以来,“一旦成为癌细胞,永远是癌细胞”的观念一直影响着肿瘤学领域。1988 年,上海维甲酸协作组首先使用全反式维甲酸(ATRA)诱导分化治疗人急性早幼粒细胞白血病获得显著疗效,从而为抗肿瘤研究开辟了新的途径。许多实验证明,某些药物在低浓度时能诱导肿瘤细胞的分化,浓度高时则引起凋亡或坏死。丝裂霉素是临床上常用的细胞毒性药物,低浓度下对肺癌的增殖抑制作用尚无明确报导。本实验应用 MTT 法检测低浓度丝裂霉素处理 A549 肺腺癌细胞后吸光度和抑制率的变化,证实了低浓度的丝裂霉素具有抑制肺癌细胞生长的作用。结果表明低浓度丝裂霉素通

过诱导 A549 细胞周期阻滞,可以使整个细胞周期延长,抑制 A549 细胞增殖而发挥抗肿瘤作用。

由于基因发生突变、错配、修复等现象,引起许多癌基因、抑癌基因的改变并直接参与细胞周期的调控。因此针对性的考查了低浓度丝裂霉素处理 A549 肺腺癌细胞后,部分癌基因和抑癌基因表达发生变化。其中,细胞周期的程序控制主要是通过各种细胞周期蛋白(cyclin)和依赖细胞周期蛋白的蛋白激酶(CDK)有序地磷酸化和去磷酸化,从而控制 cyclin-CDK 复合物的活性来实现的。细胞周期蛋白 D(CyclinD)是 G1/S 期转换的重要正性调控因子,包括:CyclinD1、CyclinD2 和 CyclinD3 三个亚型。CyclinD3 是 G1/S 转换过程的限速因子,作为 G1 期细胞周期相关蛋白、G1/S 期的起始调控分子之一,其基因和编码蛋白的异常,以及与多种肿瘤相关基因的协同作用可促使细胞恶性转化,在肿瘤的发生发展中扮演着重要角色。cyclinD3 过分表达则使 G1 期缩短,阻滞其表达使细胞不能从 G1 期进入 S 期^[3]。Bcl-2 为拮抗细胞凋亡的基因,细胞凋亡对于维持组织的自身稳定具有重要的意义,Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡,从而促进了肿瘤的发生^[4]。p21 基因是 1993 年发现并克隆的 CDKI 的家族成员,它参与细胞的多种功能活动,广泛的抑制各种 Cyclin-CDK 复合物,抑制细胞的无限增殖^[5]。caspase3 是执行细胞凋亡的关键酶之一^[6],PML-RAR α 基因的表达是维甲酸诱导分化的前提条件^[7]。nm23 基因是目前研究较多的转移抑制基因,nm23 编码的产物具有抑制肿瘤转移的功能^[8]。

低浓度丝裂霉素处理肺腺癌 A549 细胞后, caspase3、p21 和 nm23 的表达较对照组升高, 而 RAR α 、bcl-2 和 cyclinD3 表达降低, 表明药物处理后, 抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡、诱导分化、转移抑制等生物学特征的基因表达水平被不同程度的改变。细胞增殖和细胞周期的调控是多个基因共同作用的结果^[9], 上述基因表达的改变表明了该化疗药物不同程度的引起肿瘤细胞增殖、周期分布、凋亡、转移、血管生成等方面的改变, 导致细胞增殖抑制, 癌基因表达水平下调, 抑癌基因表达上调, 多基因表达水平的改变参与了肿瘤细胞的分化调节, 使肿瘤细胞总体上向良性转化。

4 参考文献

- [1] Gezgen G, Roach EC, Kizilarlanoglu MC, et al. Metabolic syndrome and breast cancer: an overview [J]. J Buon, 2012(2):223-229.
- [2] Naujok O, Lenzen S. Pluripotent stem cells for cell replacement therapy of diabetes [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2012(20):1062-1066.
- [3] Elsner J, Michalski M, Kwiatkowska D. Spatiotemporal variation of leaf epidermal cell growth; a quantitative analysis of Arabidopsis thaliana wild-type and triple cyclinD3 mutant plants [J]. Ann Bot, 2012(5):897-910.
- [4] Winfield LL, Payton-Stewart F. Celecoxib and Bcl-2: emerging possibilities for anticancer drug design [J]. Future Med Chem, 2012(3):361-383.
- [5] Mitrea DM, Yoon MK, Ou L, et al. Disorder-function relationships for the cell cycle regulatory proteins p21 and p27 [J]. Biol Chem, 2012(4):259-274.
- [6] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy [J]. Oncogene, 2012(23):2805-2808.
- [7] Zhang L, Cao Z, Zou Y, et al. Quantification of PML/RAR α transcript after induction predicts outcome in children with acute promyelocytic leukemia [J]. Int J Hematol, 2012(5):500-508.
- [8] Quintero-Reyes IE, Garcia-Orozco KD, Sugich-Miranda R, et al. Shrimp oncoprotein nm23 is a functional nucleoside diphosphate kinase [J]. J Bioenerg Biomembr, 2012(3):325-331.
- [9] Hindley C, Philpott A. Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system [J]. Biochem J, 2012(3):375-382.

(2012-09-14 收稿, 2012-10-10 修回)

编辑:周凌

(上接第 600 页)

- [19] Motoshige H, Oyama K, Takahashi K, et al. Involvement of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Gemcitabine-Induced Apoptosis-Like Cell Death in Insulinoma Cell Line INS-1 [J]. Biol Pharm Bull, 2012(11):1932-1940.
- [20] Hsu J, Peters AT. Pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyp [J]. Am J Rhinol Allergy, 2011(5):285-290.

(2012-10-17 收稿, 2012-11-12 修回)

编辑:潘娅

$\alpha 7$ 尼古丁受体 mRNA 表达抑制对 SH-SY5Y 细胞氧化应激水平的影响

欧阳凯, 齐晓岚, 官志忠

(贵阳医学院分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨通过 RNA 干扰技术抑制神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y 细胞) 中 $\alpha 7$ 尼古丁乙酰胆碱受体 (nAChR) 基因表达后细胞氧化应激水平的变化, 以了解该受体的神经保护作用。方法 SH-SY5Y 细胞转染针对 $\alpha 7$ nAChR 的小分子干扰 RNA, Real-time PCR 法检测转染细胞中 $\alpha 7$ nAChR mRNA 水平蛋白质印迹方法检测蛋白表达水平; 并用 $A\beta_{1-42}$ 处理培养细胞, 比色法测定细胞脂质过氧化产物水平、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性。结果 转染 siRNA 后, $\alpha 7$ nAChR mRNA 水平和蛋白表达水平分别降低了 81.7% 和 76.9%; 细胞脂质过氧化水平升高 38.4%; SOD 和 GSH-PX 活性分别降低 30.3% 和 21.1%。用 $A\beta_{1-42}$ 处理细胞后氧化应激水平升高, 且转染 siRNA 后能增强 $A\beta$ 的神经毒性作用。结论 $\alpha 7$ nAChR 基因表达抑制后能增强细胞氧化应激水平, 同时增强 $A\beta$ 的神经毒性作用。

摘自《中国老年学杂志》2012(18):3941.