

## 探索发现

# ATRA 促进 DDP 对肺腺癌细胞 A549 凋亡作用机制的研究

宁云娜 张维东\* 张月英 贾青 王兆朋

(山东省现代医用药物与技术重点实验室, 山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

**摘要** 探讨全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对顺铂(cisplatin, DDP)抑制肺腺癌细胞株(A549)增殖的影响及其机制。采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)以及流式细胞术检测 DDP、ATRA 处理前后 A549 凋亡率及维甲酸受体- $\beta$  (retinoic acid receptor  $\beta$ , RAR $\beta$ ) mRNA、凋亡抑制蛋白 Survivin mRNA 的转录情况。结果表明 DDP 对 A549 有抑制作用, 且呈剂量依赖性。ATRA 小于 0.4 mmol/L 抑制作用不明显, ATRA 达到 0.4 mmol/L 及更高浓度时, 抑制作用显著, 且呈剂量依赖性。qRT-PCR 结果显示 DDP 组 RAR $\beta$  mRNA 及 Survivin mRNA 均降低。ATRA 组 RAR $\beta$  mRNA 增加, 而 Survivin mRNA 降低; 联合用药组较空白组 RAR $\beta$  mRNA 降低, 较 DDP 组 RAR $\beta$  mRNA 提高, 而 Survivin mRNA 均降低。流式结果显示联合用药组较单独用药组凋亡率明显增高。ATRA 上调 RAR $\beta$  并下调 Survivin, 提高 A549 化疗敏感性, 强化 DDP 化疗作用。

**关键词** 全反式维甲酸; 顺铂; 非小细胞肺癌; RAR $\beta$ ; Survivin

近年来许多学者报道维甲酸类物质如 ATRA 可以诱导多种肿瘤细胞的分化和凋亡<sup>[1,2]</sup>, 特别是 ATRA 和 DNA 损伤性化疗药物的联合应用, 使癌细胞对化疗药物的敏感性大为增加。其中, DDP 是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)治疗中 DNA 损伤性化疗药物之一, 其能破坏 DNA 功能, 阻止 DNA 复制, 导致癌细胞死亡。本实验选用肺腺癌细胞株 A549 为研究对象, 观察不同浓度的 ATRA 对 A549 细胞增殖的影响, 并观察 ATRA 在辅助 DDP 诱导 A549 细胞凋亡中的作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 胎牛血清(FBS)为四季青公司产品; 胰酶为 Hyclone 公司产品; ATRA(100 mmol/L, 用灭菌 DMSO 配制)、DDP、RPMI-1640 培养基、平衡盐 PBS, 均为美国 Gibco 公司产品; 左旋谷氨酰胺, 为 Amresco 公司产品; 青霉素、链霉素, 为山东鲁抗医药股份有限公司产品; DMSO、MTT(5 mg/L, 用 pH 7.2 的 PBS 配制), 为 Sigma 公司产品; 总 RNA 提取试剂 RNAiso Reagent, RT-PCR 试剂盒, 为 TaKaRa 公司产品; Annexin V-FITC/PI 试剂盒, 为美国 BD 公

司产品。

1.1.2 细胞培养与引物设计合成 人肺腺癌 A549 细胞系由山东省医学科学院基础研究所冻存, 培养在含 10% FBS 的 RPMI-1640(含 L-谷氨酰胺 0.272 g/L, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ml)培养液, 置于 37℃、50 ml/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养, 并用含 2.5 g/L 胰蛋白酶消化、传代、扩增、取对数生长期的细胞用于实验。Survivin mRNA、RAR $\beta$  mRNA 引物由上海博尚公司设计合成, 引物序列见表 1。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测不同药物浓度对 A549 细胞增殖的抑制情况 取对数期生长期细胞制成细胞悬液 1×10<sup>5</sup> 个/ml, 种在 96 孔板中, 每孔加细胞 1×10<sup>4</sup> 个。设空白对照组、DMSO 对照组、ATRA 组(0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.6 mmol/L、3.2 mmol/L、6.4 mmol/L、12.8 mmol/L)、DDP

收稿日期: 2010-07-14 接受日期: 2010-09-03

国家自然科学基金(No.30873408), 山东省自然科学基金(No. ZR2009CL030, No.Y2007C094, No.Y2008C176)和山东省科技攻关项目(No.2008GG300020670)

\* 通讯作者。Tel: 0531-82919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com

Table 1 The sequences of primers

	Sense primers	Anti-sense primers
Survivin	AGA CAT CTG GAG GCT CAT TGC	CTG GAG GTT CTG GAG GGT TTC
RAR $\beta$	CCA TCG CAG ACC AAA TTA CCC	TGT GTC ATC CAT TTC CAA AGG C
$\beta$ actin	CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC	AGG TCT TTG CGG ATG TCC AC

组(0.5mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、4.0mg/L、8.0 mg/L、16.0mg/L、32.0mg/L、64.0mg/L)及联合用药组(ATRA 0.8 mmol/L, DDP 8.0 mg/L),每组 6 复孔,于 37℃、50 ml/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养。培养 24 h 后加 MTT(5 mg/ml)20  $\mu$ l,继续培养 4 h 后弃上清,加 DMSO 溶解液 150  $\mu$ l 并在振荡器上振荡 5 min,待结晶物质充分溶解后,用酶标仪在 490 nm 波长测定吸光值 A(将空白孔调零),生长抑制率(%)=1-(实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.2.2 SYBR green 实时荧光定量 PCR 检测 Survivin mRNA、RAR $\beta$  mRNA 表达水平 取对数生长期细胞消化后以 1×10<sup>5</sup> 个/ml 的密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,每瓶接种量为 5 ml。细胞贴壁后,实验组分别加入 ATRA、DDP 和 ATRA+DDP,使 ATRA 终浓度为(0.1  $\mu$ mol/L、0.4  $\mu$ mol/L、1.6  $\mu$ mol/L、6.4  $\mu$ mol/L); DDP 终浓度为(0.5 mg/L、2.0 mg/L、8.0 mg/L、32.0 mg/L);联合用药组终浓度为(ATRA 0.8  $\mu$ mol/L, DDP 8.0 mg/L)。空白对照组不加任何试剂, DMSO 对照组只加等量 DMSO 溶剂。于 24 h 后消化、PBS 冲洗,用于细胞总 RNA 的提取。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取及质量浓度测定 按操作说明分别提取对照组与实验组细胞的总 RNA, -70℃ 保存待用。取适量 RNA 稀释后用紫外分光光度仪测定 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub> 的吸光度比值,检测 RNA 质量,并按公式 RNA 浓度( $\mu$ g/ $\mu$ l)=(A<sub>260</sub>×40×稀释倍数)/1 000,计算 RNA 的浓度。

1.2.4 逆转录 分别取对照组与实验组细胞的总 RNA 1  $\mu$ g,使用 TaKaRa DRR037A 反转录试剂盒,按照操作说明进行反转录反应。反应体系为: Total RNA 1  $\mu$ g, 5×PrimeScript Buffer 4  $\mu$ l, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ l, Oligo dT Primer 1  $\mu$ l, RNase Free dH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ l。反应参数为: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s。产物 cDNA 分装后 -20℃ 保存待用。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分别取对照组与实验组细胞的 cDNA 模板 2  $\mu$ l,使用 TaKaRa DRR041A 实时定量试剂盒,按照操作说明进行 PCR 反应。反应体系为: DNA 模板 2  $\mu$ l, SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu$ l, PCR Forward Primer 0.4  $\mu$ l, PCR Reverse Primer 0.4  $\mu$ l, ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ l, 灭菌蒸馏水补至

20  $\mu$ l。反应参数为: 预变性 95℃ 30 s, PCR 反应 95℃ 5 s, 60℃ 31 s, 共 40 个循环。以不加模板的 PCR 反应管作为阴性对照 I,以不加引物的 PCR 反应管作为阴性对照 II。

1.2.6 FITC-Annexin V/PI 法检测 A549 细胞凋亡率 取对数生长期细胞消化后以 1×10<sup>5</sup> 个/ml 的密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,每瓶接种量为 5 ml。细胞贴壁后,实验组分别加入 ATRA、DDP 和 ATRA+DDP,其中 ATRA 终浓度为 1.6  $\mu$ mol/L; DDP 终浓度为 8.0 mg/L;联合用药组中 ATRA 终浓度为 0.8  $\mu$ mol/L、DDP 终浓度为 4.0 mg/L。空白对照组不加任何试剂、DMSO 对照组只加等量 DMSO 溶剂,继续培养 12 h。然后先用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单个细胞悬液,调整待测细胞的密度为 5×10<sup>5</sup>~1×10<sup>6</sup> 个/ml。取 1 ml 细胞用 PBS 离心洗涤, 1 000 r/min, 4℃ 离心 10 min 共 2 次,弃上清液。将细胞重悬浮于 500  $\mu$ l 结合缓冲液。加入 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,立即上流式细胞仪检测,每个样品 10 000 个细胞。双染 Annexin V-FITC/PI 法可直接测得每个样本 10 000 个细胞中正常细胞、早期凋亡、晚期凋亡、死亡细胞所占的比例。

### 1.3 统计学处理

采用统计软件 SPSS16.0 分析。实验数据均以  $\bar{x}\pm s$  表示。数据采用单因素方差分析以及 Pearson 相关性分析方法分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DDP 对 A549 细胞生长抑制的作用

与空白对照组相比, DDP 以 0.5~64.0 mg/L 浓度处理 A549 细胞 24 h, 均有抑制 A549 细胞增殖作用, 并呈剂量依赖性  $r=0.963$ ,  $P<0.01$ 。联合用药组处理 A549 细胞 24 h, 其抑制率与 DDP 高浓度组 16.0 mg/L 浓度组抑制率相当( $P=0.815$ ); DMSO 对照组与空白对照组无显著性差异( $P=0.774$ )。

### 2.2 ATRA 对 A549 细胞生长抑制的作用

与空白对照组相比, ATRA 以 0.1~0.4  $\mu$ mol/L 浓度处理 A549 细胞 24 h, 抑制增殖作用较低, 但当 ATRA 浓度上升到 0.8~12.8  $\mu$ mol/L 时, 抑制增殖作

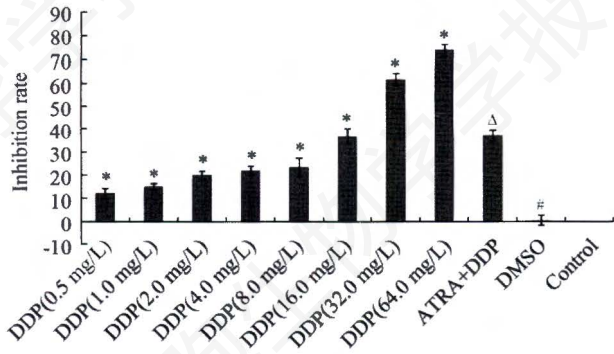


Fig.1 Inhibition rate of DDP to A549 cells

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P = 0.815$  vs DDP(16.0 mg/L) group;  $\#P = 0.774$  vs control group.

用明显增强, 总体呈剂量依赖性  $r = 0.876$ ,  $P = 0.004$ 。联合用药组处理 A549 细胞 24 h, 其抑制率与 ATRA 高浓度组 12.8  $\mu\text{mol/L}$  浓度组抑制率相当( $P = 0.332$ ), DMSO 对照组与空白对照组无显著性差异( $P = 0.650$ )。

### 2.3 RAR $\beta$ mRNA 表达水平变化

与空白对照组相比 DDP 0.5 mg/L 组以及 DDP 2.0 mg/L 处理 A549 细胞 24 h 后, RAR $\beta$  mRNA 转录量无明显变化( $P = 0.804$ ,  $P = 0.114$ ), 而 DDP 8.0 mg/L 组以及 DDP 32.0 mg/L 处理 A549 细胞 24 h 后, RAR $\beta$

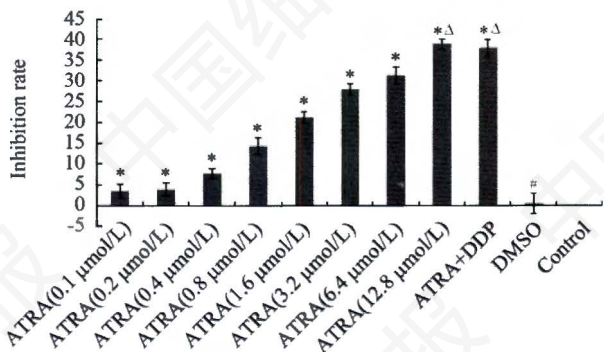


Fig.2 Inhibition rate of ATRA to A549 cells

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P = 0.332$ ;  $\#P = 0.650$  vs control group.

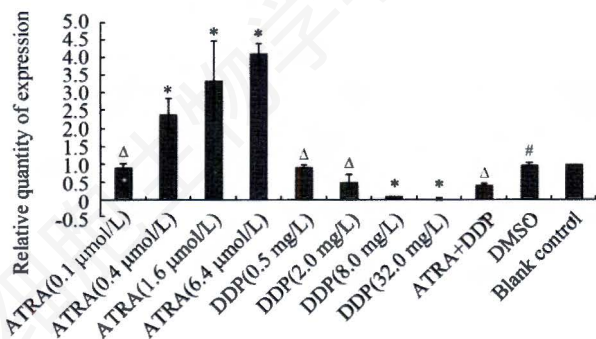


Fig.3 Relative quantity of RAR $\beta$  mRNA expression

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P > 0.05$  vs control group;  $\#P = 0.955$  vs control group.

mRNA 转录量显著降低, 仅为空白对照组 RAR $\beta$  mRNA 转录量的 1/10 以下( $P = 0.008$ ,  $P = 0.004$ ); 与空白对照组相比 ATRA 0.1  $\mu\text{mol/L}$  组处理 A549 细胞 24 h 后, RAR $\beta$  mRNA 转录量无明显变化( $P = 0.792$ ), 而 ATRA 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 、1.6  $\mu\text{mol/L}$ 、6.4  $\mu\text{mol/L}$  组 RAR $\beta$  mRNA 转录量明显上升, 最高可达空白对照组的 4 倍以上; 联合用药组较 DDP 8.0 mg/L 组 RAR $\beta$  mRNA 转录量提高 4 倍以上( $P < 0.05$ ), 虽然低于空白对照组 RAR $\beta$  mRNA 转录量, 但已无显著性差异( $P = 0.068$ )。DMSO 对照组与空白对照组无显著性差异( $P = 0.955$ )。

### 2.4 Survivin mRNA 表达水平变化

与空白对照组相比 DDP 0.5 mg/L 组处理 A549 细胞 24 h 后, Survivin mRNA 转录量无明显变化( $P = 0.388$ ), 而 DDP 2.0 mg/L 组、DDP 8.0 mg/L 组以及 DDP 32.0 mg/L 处理 A549 细胞 24 h 后, Survivin mRNA 转录量显著降低( $P < 0.05$ ); 与空白对照组相比 ATRA 0.1  $\mu\text{mol/L}$  组处理 A549 细胞 24 h 后, Survivin mRNA 转录量轻微升高( $P = 0.018$ ), ATRA 0.4  $\mu\text{mol/L}$  组处理 A549 细胞 24 h 后, Survivin mRNA 转录量无明显变化( $P = 0.363$ ), 而 ATRA 1.6  $\mu\text{mol/L}$ 、6.4  $\mu\text{mol/L}$  组 Survivin mRNA 转录量明显下降( $P < 0.05$ ); 联合用药组 Survivin mRNA 较其他组显著下降( $P < 0.05$ ), 并且其抑制作用与 DDP 32.0 mg/L 组水平无显著差异( $P = 0.780$ )。DMSO 对照组与空白对照组无显著性差异( $P = 0.426$ )。

### 2.5 流式细胞术检测 A549 细胞晚期凋亡率

ATRA、DDP 及联合用药组处理 A549 细胞 12 h 后, 流式测定显示联合用药组较单独用药组晚期凋亡率明显增高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

早期 NSCLC 以手术切除为主, 但晚期或不能切

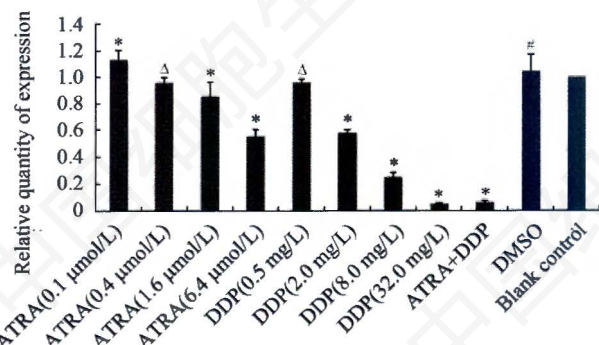


Fig.4 Relative quantity of Survivin mRNA expression

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P > 0.05$  vs control group;  $\#P = 0.426$  vs control group.

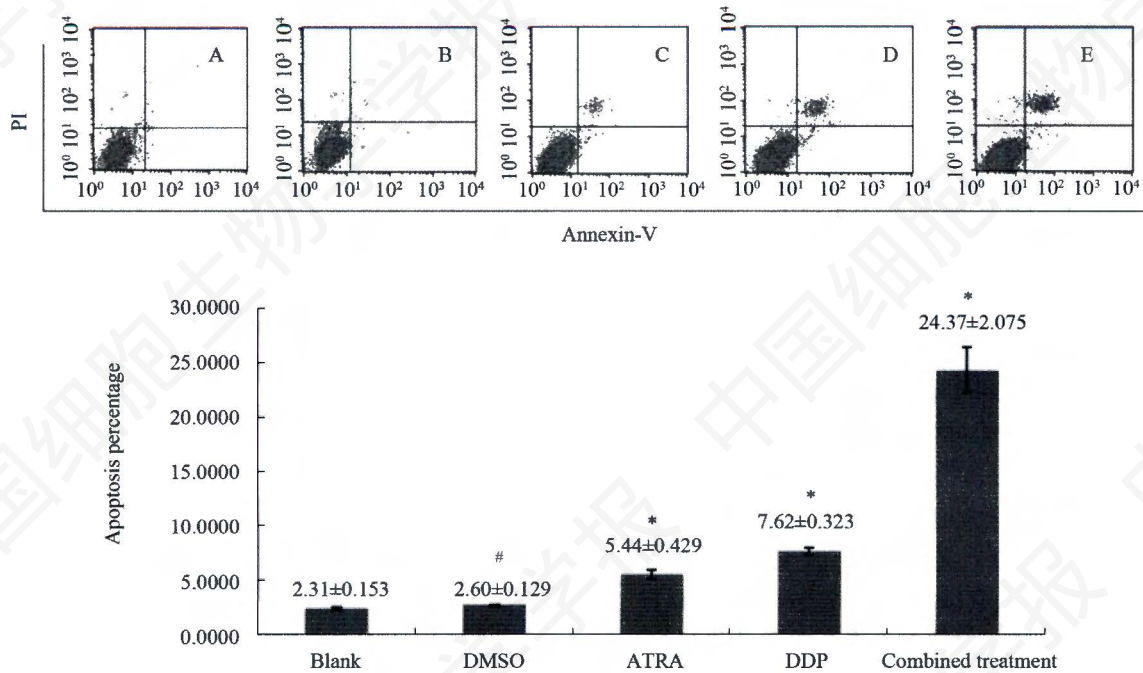


Fig.5 Flow cytometry

A: control group; B: DMSO control group; C: ATRA group; D: DDP group; E: combined treatment group. \* $P < 0.05$  vs control group; # $P = 0.426$  vs control group.

除的NSCLC则以联合化疗为主的综合治疗为主要手段。而约80%的NSCLC患者确诊时已属晚期,丧失手术机会,联合化疗是最重要的治疗方法<sup>[3]</sup>。DDP是目前肺癌化疗联合用药的关键药物。已有研究证实,DDP为细胞周期非特异药物,它可阻止DNA再复制,从而导致细胞死亡,DDP的抗肿瘤活性与其诱导细胞凋亡有关。但其对正常组织的毒性又常导致患者不能长期坚持用药,故寻找高效低毒的化疗联合用药方案,在一定程度上可延长患者的生存期,提高生活质量一直是肿瘤临床界关注的课题之一。

维甲类化合物包括维生素甲酸的天然及人工合成的衍生物,在调节细胞的增殖分化方面具有广泛的生物学活性。有研究表明,ATRA对某些肿瘤细胞具有增殖抑制作用<sup>[1]</sup>,可使肿瘤细胞终末分化,并能诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[2]</sup>。ATRA对于肺癌的研究,国外早前有文献报道指出,在较低浓度ATRA处理肺腺癌A549细胞没有任何抑制效应,但可抑制对于ATRA敏感的细胞系的增殖。推测A549可能对ATRA不敏感<sup>[4]</sup>。我们的实验结果也证明了这一点。

Survivin属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, I-AP)家族是新近发现的功能最强的凋亡抑制因子,是结构独特的IAPs成员。Survivin具有抑制细胞凋亡,促进细胞增生,参与调节细胞有丝分裂及促进血管生成等多种生物学功能。该基因正常

表达于胚胎和发育的胎儿组织,在终末分化的成人组织中不表达(胸腺除外),但几乎在所有的人类肿瘤组织中均有不同水平的表达<sup>[5]</sup>。Survivin基因具有肿瘤特异性表达的特点,其表达与细胞周期密切相关,是G<sub>2</sub>/M期的调节基因,参与细胞周期调控、有丝分裂及肿瘤的恶性转化,并与肿瘤的发生发展和预后密切相关。本研究中ATRA 1.6 μmol/L、6.4 μmol/L组Survivin mRNA转录量明显下降( $P < 0.05$ ),显示ATRA可能通过抑制凋亡抑制基因Survivin的表达,从而促进细胞的凋亡,抑制了细胞的生长,从而使细胞增殖受到一定的抑制。

相关研究发现,ATRA和其他分化诱导剂或抗肿瘤药物合用能明显增加其抗肿瘤的作用,但是ATRA促进DNA损伤的肿瘤细胞凋亡的机制目前尚不清楚,可能与其调节某些癌基因和维甲酸受体基因的表达有关<sup>[6,7]</sup>。本研究发现小剂量ATRA 24 h内对A549细胞的抑制作用不明显,并且当ATRA浓度为0.1 μmol/L时竟有促进Survivin表达的作用,具体机制不详。但当ATRA浓度达到0.4 μmol/L及更高浓度时,便开始对A549细胞株产生明显的抑制作用,且呈剂量依赖性,并且当ATRA和DDP联合应用时,A549细胞凋亡率显著提高,产生明显的协同增敏效应,其机制可能正是因为A549细胞在ATRA作用下发生分化,使细胞内抑癌基因RARβ表达上调并同时

使癌基因 Survivin 表达下调, 进而使 A549 细胞对抗肿瘤药物敏感性增高, 从而强化了 DDP 对 A549 细胞的杀伤作用。因此本研究认为 ATRA 单独用于 NSCLC 的治疗作用不明显, 但 ATRA 和 DNA 损伤性化疗药物(DDP)联合使用, 却能够显著增加 NSCLC 对 DDP 类化疗药的敏感性。综上所述, 本研究认为诱导分化剂 ATRA 联合细胞毒类药物 DDP 不仅可以减低 DDP 单药应用剂量, 减少 DDP 毒副作用, 也可提高 A549 细胞对 DDP 化疗的敏感性, 为两药联合应用治疗 NSCLC 提供实验依据。

### 参考文献(References)

- 1 Lu J, Zhang F, Zhao D, Hong L, Min J, Zhang L, *et al.* ATRA-inhibited proliferation in glioma cells is associated with subcellular redistribution of beta-catenin via up-regulation of Axin. *J Neurooncol* 2008; 87(3): 271-7.
- 2 Karmakar S, Banik NL, Ray SK. Combination of all-trans retinoic acid and paclitaxel-induced differentiation and apoptosis in human glioblastoma U87MG xenografts in nude mice. *Cancer* 2008; 112(3): 596-607.
- 3 Erridge SC, Møller H, Price A, Brewster D. International comparisons of survival from lung cancer: pitfalls and warnings. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4(10): 570-7.
- 4 Higuchi E, Chandraratna RA, Hong WK, Lotan R. Induction of TIG3, a putative class II tumor suppressor gene, by retinoic acid in head and neck and lung carcinoma cells and its association with suppression of the transformed phenotype. *Oncogene* 2003; 22(30): 4627-35.
- 5 Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, Nabeta Y, Kamiguchi K, Sato T, *et al.* An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res* 2002; 8(6): 1731-9.
- 6 Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, *et al.* Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001; 32(1): 119-25.
- 7 Dietze EC, Caldwell LE, Marcom K, Collins SJ, Yee L, Swisshelm K, *et al.* Retinoids and retinoic acid receptors regulate growth arrest and apoptosis in human mammary epithelial cells and modulate expression of CBP/p300. *Microsc Res Tech* 2002; 59(1): 23-40.

## Study on the Mechanism about ATRA to Promote the Apoptosis of DDP on Lung Adenocarcinoma A549

Yun-Na Ning, Wei-Dong Zhang\*, Yue-Ying Zhang, Qing Jia, Zhao-Peng Wang

(Key Laboratory for Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Institute of Basic Medicine Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

**Abstract** To discuss the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the cisplatin (DDP) induced lung adenocarcinoma cell line (A549) apoptosis and its mechanism. Using methyl thiazolyl tetrazolium salt assay (MTT), real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and flow cytometry to detect the A549 apoptosis rate, the transcription level of retinoic acid receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ) mRNA and the transcription level of inhibitor of apoptosis protein Survivin mRNA. The results showed that DDP had inhibition effect on A549 in a dose-dependent way. When ATRA was less than 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , the inhibition effect was not obvious, but when it up to 0.4  $\mu\text{mol/L}$  or higher concentrations, the inhibition effect was significantly in a dose-dependent way. The qRT-PCR results showed that the expression of RAR $\beta$  mRNA and Survivin mRNA all decreased in the DDP groups. In ATRA groups the expression of RAR $\beta$  mRNA increased, while the expression of Survivin mRNA decreased. In Combined treatment groups, the expression of RAR $\beta$  mRNA was lower than that in the Control groups but higher than that in the DDP groups. And when it comes to Survivin mRNA, it decreased both in Control groups and DDP groups. The flow cytometry results showed that the apoptosis rate in combined treatment groups were higher than that in single drug groups. In conclusion, the ATRA could promote the expression of RAR $\beta$  while inhibited the expression of Survivin. Through such means, ATRA could increase the chemosensitivity of A549 and strengthen the role of DDP chemotherapy.

**Key words** all-trans retinoic acid; cisplatin; non small cell lung; RAR $\beta$ ; Survivin

Received: July 14, 2010 Accepted: September 3, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundations of China(No.30873408), the National Natural Science Foundations of Shandong Province(No.ZR2009CL030, No.Y2007C094, No.Y2008C176) and the Scientific and Technological Project of Shandong Province (No.2008GG300020670)

\*Corresponding author. Tel: 86-531-82919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com