

## 全反式维甲酸对人肺腺癌 A549 体外增殖的影响及其机制探讨

梁宇佳<sup>1</sup>, 杨小琼<sup>1</sup>, 兰四友<sup>1</sup>, 秦艳<sup>2</sup>, 邓述恺<sup>1△</sup>

(1. 泸州医学院附属医院呼吸内一科, 四川泸州 646000; 2. 成都龙泉驿区医院呼吸内科, 成都 610100)

**摘要:**目的 观察全反式维甲酸(ATRA)对人肺腺癌细胞 A549 增殖的影响, 并对其机制进行初步的探讨。方法 以肺腺癌 A549 细胞株为研究对象, 用噻唑蓝(MTT)法检测试验组和对照组细胞, 计算细胞的生长抑制率; 用透射电镜观察细胞细微结构变化情况; 用酶联免疫吸附试验测定细胞上清液中环氧合酶-2(COX-2)的水平变化。结果 不同试验浓度的 ATRA 处理肺腺癌 A549 细胞, 均能对 A549 细胞产生不同程度的抑制作用, 且经过 72 h 后, 各试验浓度组均可见 COX-2 在细胞质中的表达明显下降, 并与浓度呈正相关, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 同时, 检测( $1 \times 10^{-5}$  mol/L、 $1 \times 10^{-4}$  mol/L)试验组中肿瘤坏死因子相关凋亡配体(TRAIL)表达水平, 发现经 ATRA 处理后, A549 细胞上清液中 TRAIL 表达升高。结论 ATRA 对肺癌细胞 A549 具有显著抑瘤效应, 此效应呈浓度与时间依赖性; 在肺癌组织中 ATRA 可能通过诱导凋亡发挥抑瘤效应, 可为肺癌治疗提供理论依据。

**关键词:** 肺肿瘤; 环氧合酶 2; TNF 相关凋亡诱导配体; 全反式维甲酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.07.013

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)07-0805-04

## Influence of ATRA on in-vitro proliferation of human lung adenocarcinoma cell line A549 and its mechanisms

Liang Yujia<sup>1</sup>, Yang Xiaoqiong<sup>1</sup>, Lan Siyou<sup>1</sup>, Qin Yan<sup>2</sup>, Deng Shukai<sup>1△</sup>

(1. First Department of Respiration, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Respiration, Longquanyi District People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610100, China)

**Abstract: Objective** To explore the influence of all-trans retinoic acid(ATRA) on in-vitro proliferation of human lung adenocarcinoma cell line A549 and to preliminarily study its mechanism. **Methods** The human lung adenocarcinoma cell line A549 was taken as the experimental group. The cells in the experimental group and the control group were detected by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay for calculating the cell growth inhibition rate; the microstructure of the cultured cells was observed by the transmission electron microscope technique; the expression of cyclooxygenase-2(COX-2) in the cell supernate was detected by the enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The different concentrations of ATRA for treating A549 cells could produce the inhibiting effect on A549 cells to some different degrees, furthermore, after 72 h, the expression of COX-2 in cytoplasm among the various concentrations groups was significantly decreased, which was positively correlated with the concentration, the difference showing statistical significance( $P < 0.05$ ); at the same time, by detecting TRAIL expression level in the experimental group( $1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $1 \times 10^{-4}$  mol/L), the expression of TRAIL in the A549 cell supernate after ATRA treatment was increased. **Conclusion** ATRA has the significant anti-tumor effect on the lung adenocarcinoma cell line A549 with the concentration-time dependence; ATRA in lung cancer tissue may play its anti-tumor effect by inducing apoptosis, which can provide the theoretical basis for the treatment of lung cancer.

**Key words:** lung neoplasms; epoxy compounds 2; TNF-related apoptosis-inducing ligand; all-trans retinoic acid

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素 A 的天然代谢产物, 在正常或癌变细胞的增殖、生长、分化过程中发挥极其重要的作用。有研究证实, ATRA 对多种肿瘤包括肺癌具有抗癌活性, ATRA 治疗白血病的机制是诱导癌变细胞向成熟细胞方向分化, 然而对肺癌等其他恶性肿瘤的抑瘤机制有待进一步研究<sup>[1-2]</sup>。环氧合酶(COX)是前列腺素生物合成过程中的重要限速酶, 目前已发现 2 种同工酶: COX-1 和 COX-2。研究表明, COX-2 在肿瘤组织中高表达<sup>[3]</sup>, 表达水平与肿瘤浸润和转移呈正相关<sup>[4-5]</sup>。本研究旨在观察 ATRA 对人肺腺癌 A549 的增殖及其对 COX-2 表达的影响, 并对其机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料 人肺腺癌 A549 细胞株由泸州医学院中心实验室

惠赠; ATRA 购自美国 Sigma 公司; RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS)购自成都哈里公司; 青霉素、链霉素购自华北制药有限公司; 噻唑蓝(MTT)购自碧云天公司; 多聚赖氨酸, DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司; 兔抗人 COX-2 单克隆抗体购自北京中杉金桥公司; SP9000 免疫组织化学染色 SP 试剂盒购自北京中杉金桥公司; 胰蛋白酶购自 OXODI 公司; COX-2 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 ADL 公司; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 MTT 试验** 按 ATRA 作用于肺腺癌 A549 细胞的时间分为作用 24、48、72 h 3 个时间段, 每个时间段分 1 个对照组(不加药物)和 4 个试验组, 试验组再按 ATRA 的药物浓度分为 0.1  $\mu$ mol/L 组(第 1 组), 1.0  $\mu$ mol/L 组(第 2 组), 10.0

$\mu\text{mol/L}$  组(第 3 组),  $100.0 \mu\text{mol/L}$  组(第 4 组), 每组 10 个孔。待各试验浓度的药物作用细胞于各试验时间段后, 进行 MTT 测定, 分别检测各组细胞的吸光度(A)值, 并计算各时间段各试验浓度药物对细胞的生长抑制率。

**1.2.2 光镜观察细胞密度改变及透射电镜观察其超微结构变化** 不同浓度(0.1、1、10、 $100 \mu\text{mol/L}$ )的 ATRA 作用肺腺癌 A549 细胞 72 h 后, 光镜下观察细胞密度变化, 进一步用透射电镜观察细胞细微结构变化情况。

**1.2.3 ELISA 检测** 不同浓度(0.1、1.0、10.0、 $100.0 \mu\text{mol/L}$ )的 ATRA 作用肺腺癌 A549 细胞 72 h 后, 用 ELISA 法测定细胞上清液中 COX-2 水平, 比较各试验组与对照组中 COX-2 水平。

**1.2.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测** 检测 ATRA 作用 72 h 后的不同浓度组( $10.0$ 、 $100.0 \mu\text{mol/L}$ )肺腺癌 A549 细胞质中肿瘤坏死因子相关凋亡配体(TRAIL)mRNA 的水平变化。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD 法和 SNK- $q$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 ATRA 对肺腺癌 A549 细胞增殖的影响** (1) ATRA 作用于肺腺癌 A549 细胞 24 h 时各组细胞的 A 值比较: 第 1 组、第 2 组分别与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 第 3 组、第 4 组分别与对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且随着 ATRA 浓度升高对细胞产生抑制作用增强。(2) ATRA 作用于肺腺癌 A549 细胞 48 h 时各组细胞的 A 值比较: 第 1 组与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 第 2、3、4 组分别与对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 相邻各试验组之间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 随着 ATRA 作用时间的延长, 低浓度 ATRA 亦可出现抑制作用。(3) ATRA 作用于肺腺癌 A549 细胞 72 h 时各组细胞的 A 值比较: 各试验组分别与对照组比较, 差异有统计学意义( $F = 15\ 668.803$ ,

$P < 0.01$ ); 相邻各试验组之间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 随着 ATRA 作用时间进一步延长, 抑制作用的浓度依赖性更为明显。各时段不同浓度 ATRA 对肺腺癌 A549 抑制作用, 见表 1, 图 1、2。

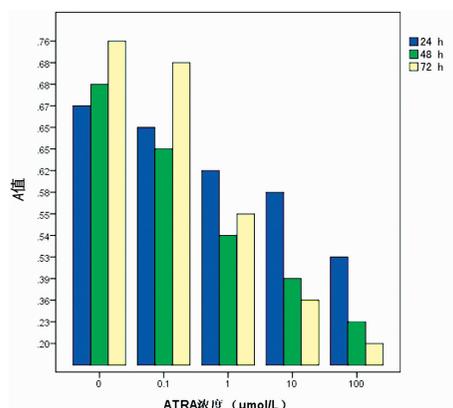


图 1 不同浓度 ATRA 作用肺癌 A549 细胞的抑制作用比较

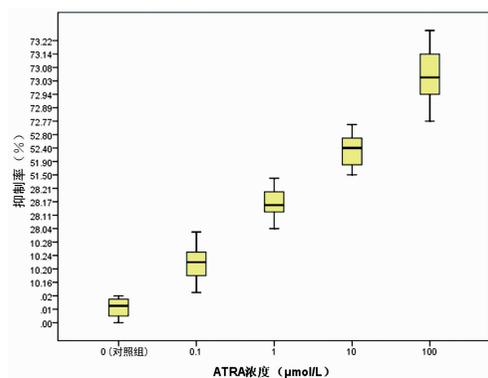
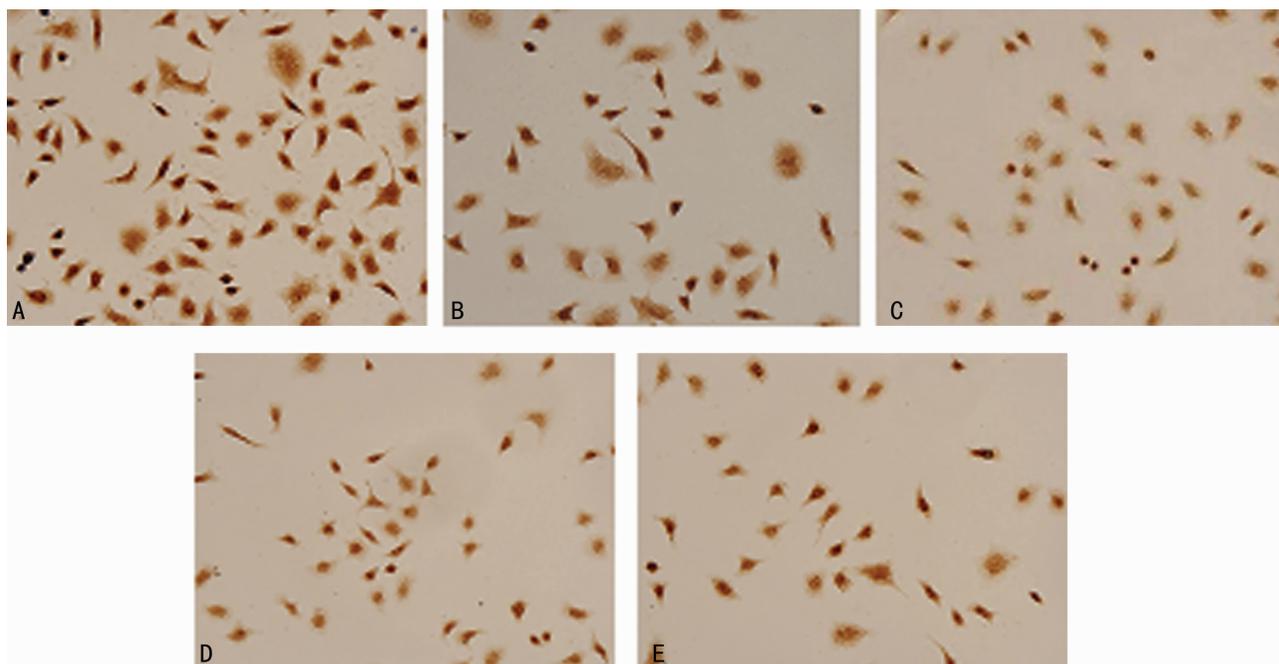


图 2 ATRA 作用肺腺癌 A549 细胞 72 h 各组细胞抑制作用比较



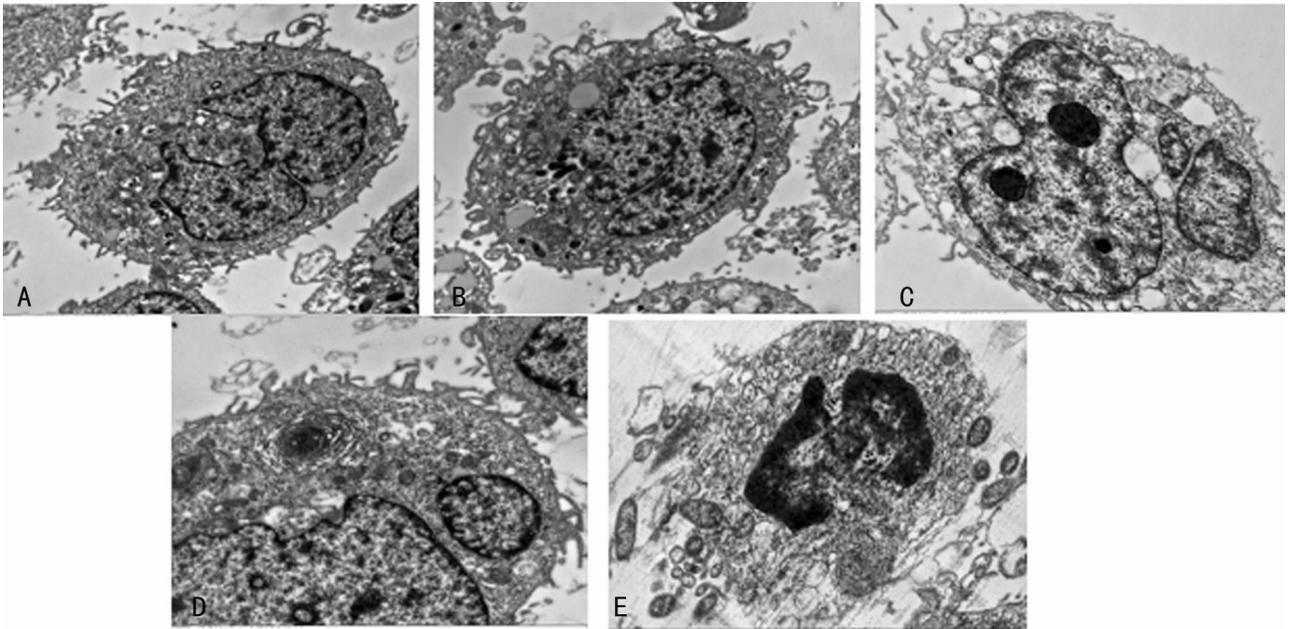
A: 对照组; B: 第 1 组; C: 第 2 组; D: 第 3 组; E: 第 4 组。

图 3 各组肺腺癌 A549 细胞光镜下细胞密度变化( $\times 400$ )

表 1 各时段不同浓度 ATRA 对肺腺癌 A549 的抑制作用

组别	作用 24 h		作用 48 h		作用 72 h	
	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
对照组	0.669±0.015	—	0.680±0.046	—	0.763±0.022	—
第 1 组	0.653±0.021	1.70	0.648±0.025	4.72	0.681±0.021 <sup>b</sup>	10.23
第 2 组	0.620±0.016	5.41	0.541±0.036 <sup>a</sup>	20.67	0.545±0.023 <sup>bc</sup>	28.16
第 3 组	0.575±0.030 <sup>a</sup>	12.77	0.389±0.043 <sup>ad</sup>	43.61	0.361±0.035 <sup>bc</sup>	52.30
第 4 组	0.530±0.026 <sup>a</sup>	18.80	0.228±0.039 <sup>af</sup>	66.20	0.203±0.012 <sup>bg</sup>	73.09

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.01$ , 与第 1 组同时段比较; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>e</sup>:  $P < 0.01$ , 与第 2 组同时段比较; <sup>f</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>g</sup>:  $P < 0.01$ , 与第 3 组同时段比较; —: 此项无数据。



A: 对照组; B: 第 1 组; C: 第 2 组; D: 第 3 组; E: 第 4 组。

图 4 各组肺腺癌 A549 细胞透射电镜下细胞形态改变 (×8 000)

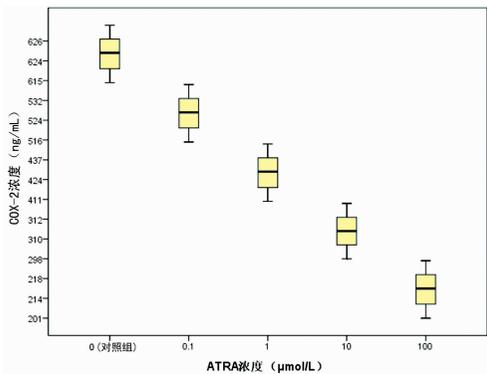
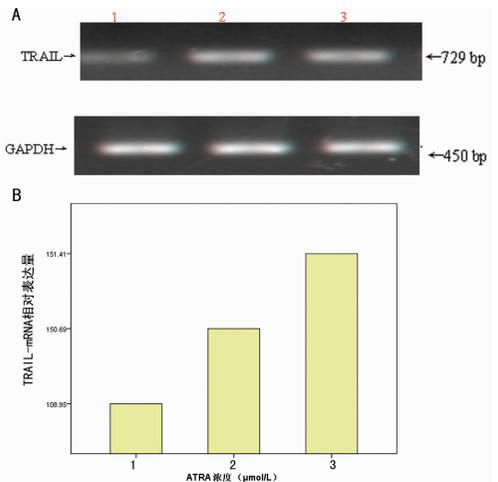


图 5 各组肺腺癌 A549 细胞 72 h 后上清液 COX-2 水平比较

2.2 ATRA 处理后肺腺癌 A549 细胞的形态变化 ATRA 作用于肺腺癌 A549 细胞 72 h 后, 观察光镜下细胞密度及透射电镜结构改变发现各试验组细胞密度明显减低; 进一步在透射电镜下观察细胞呈现凋亡改变, 见图 3, 4。

2.3 ELISA 法检测 ATRA 作用 72 h 后的肺腺癌 A549 细胞质中 COX-2 水平 不同浓度的 ATRA 作用于肺腺癌 A549 细胞 72 h 后, 各试验组均可见 A549 细胞上清液中 COX-2 水平下降, 并随着 ATRA 组浓度的升高, COX-2 水平下降更明显。第 1、2、3、4 组 COX-2 水平分别为 (528.74 ± 33.95) ng/mL、

(433.43 ± 78.67) ng/mL、(310.16 ± 35.62) ng/mL、(215.71 ± 15.36) ng/mL, 与对照组 (624.51 ± 16.43) ng/mL 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 相邻各试验组之间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。



A: PCR 产物电泳图; B: 电泳分析图; 1: 对照组; 2: 第 3 组; 3: 第 4 组。

图 6 对照组与第 3、4 组肺腺癌 A549 细胞上清液 TRAIL mRNA 表达水平比较

**2.4** ATRA 作用 72 h 后的肺腺癌 A549 细胞质中 TRAIL 水平比较 RT-PCR 检测对照组、第 3 组、第 4 组 72 h 后的肺腺癌 A549 细胞质中 TRAIL mRNA 水平,与对照组比较,第 3、4 组肺腺癌 A549 细胞质中 TRAIL mRNA 水平明显提高,见图 6。

### 3 讨 论

ATRA 属于维生素甲类化合物家族,由维甲酸变更末端极性基团而得到。ATRA 不仅能参与正常调节上皮细胞的生长和分化,还能诱导肿瘤细胞分化和促进凋亡,抑制其增殖,早期用于血液系统疾病,取得显著效果。近年来,人们利用 ATRA 对其他组织来源的肿瘤的抑瘤效应进行研究,发现 ATRA 具有诱导分化与凋亡的作用<sup>[6-8]</sup>。而肺癌组织中,ATRA 如何发挥抑瘤效应,能否与细胞毒性药物<sup>[9]</sup>发挥协同作用成为亟待解决的问题。

COX 是前列腺素生物合成过程中的重要限速酶。其中,COX-2 在大多数组织中呈诱导性表达,在正常组织几乎检测不到,而在炎症或肿瘤组织表达的细胞因子、生长因子、白细胞介素刺激下可使 COX-2 诱导性表达,称为诱导型环氧化酶。研究表明,COX-2 在肺癌组织中表达明显上调,以肺腺癌最为显著<sup>[10]</sup>,而在小细胞肺癌几乎未见表达,鳞状细胞癌仅有低水平表达<sup>[11]</sup>。不仅如此,研究证实,COX-2 表达水平可以独立预测非小细胞肺癌患者预后<sup>[12-13]</sup>。进一步研究发现,除了肿瘤细胞本身外,肿瘤微环境中的基质细胞和附近组织的血管内皮均能表达 COX-2。另有研究证实,抑制 COX-2 促进肿瘤细胞凋亡可能与上调 TRAIL 表达有关<sup>[14-15]</sup>。

本研究结果显示,ATRA 对 A549 抑制作用具有明显浓度和时间依赖性;在透射电镜下进一步证实,随着 ATRA 浓度的升高,细胞形态异常越明显,包括细胞及细胞核形态不规则,核膜不清楚,核周隙不规则,染色质聚集成斑块状,细胞质中细胞器逐渐减少,细胞改变呈现凋亡的特征。相应地,COX-2 在细胞质中的表达水平下降,与 ATRA 浓度呈正相关。进一步通过 RT-PCR 检测发现 TRAIL 表达量上调。因此,本研究推测 ATRA 发挥促肿瘤细胞凋亡效应可能与下调 COX-2,上调 TRAIL 表达水平有关,在肺癌组织中,可能 ATRA 通过诱导凋亡发挥抑瘤效应。

### 参考文献:

- [1] Siddikuzzaman, Grace VM. Inhibition of metastatic lung cancer in C57BL/6 mice by liposome encapsulated all trans retinoic acid (ATRA) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 570-579.
- [2] Jeong YI, Chung KD, Kim da H, et al. All-trans retinoic acid-incorporated nano-particles of deoxycholic acid-conjugated dextran for treatment of CT26 colorectal carcinoma cells[J]. *Int J Nanomed*, 2013, (8): 485-493.
- [3] Lu J, Li XF, Kong LX, et al. Expression and significance of cyclooxygenase-2 mRNA in benign and malignant ascites[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(40): 6883-6887.
- [4] Lin PC, Lin YJ, Lee CT, et al. Cyclooxygenase-2 expres-

sion in the tumor environment is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(3): 733-739.

- [5] Tabriz HM, Olfati G, Ahmadi SA, et al. Cyclooxygenase-2 expression in urinary bladder transitional cell carcinoma and its association with clinicopathological characteristics [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(8): 4539-4543.
- [6] Tabata C, Tabata R, Hirayama N, et al. All-trans-retinoic acid inhibits tumour growth of malignant pleural mesothelioma in mice[J]. *Eur Respir J*, 2009, 34(5): 1159-1167.
- [7] Bengtsson AM, Jansson G, Magnusson C, et al. The cysteinyl leukotriene 2 receptor contributes to all-trans retinoic acid-induced differentiation of colon cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 336.
- [8] De Genaro P, Simón MV, Rotstein NP, et al. Retinoic acid promotes apoptosis and differentiation in photoreceptors by activating the P38 MAP kinase pathway [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(5): 3143-3156.
- [9] Ribeiro MP, Silva FS, Paixo J, et al. The combination of the antiestrogen endoxifen with all-trans-retinoic acid has anti-proliferative and anti-migration effects on melanoma cells without inducing significant toxicity in non-neoplastic cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715(1/3): 354-362.
- [10] Zhan P, Qian Q, Yu LK. Prognostic value of COX-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5(1): 40-47.
- [11] Jiang H, Wang J, Zhao W. Cox-2 in non-small cell lung cancer: A meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, (419): 26-32.
- [12] Zhan P, Qian Q, Yu LK. Prognostic value of COX-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5(1): 40-47.
- [13] Hattar K, Savai R, Subtil FS, et al. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo; role of COX-2 and EGFR activation [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(2): 309-320.
- [14] Inoue T, Anai S, Onishi S, et al. Inhibition of COX-2 expression by topical diclofenac enhanced radiation sensitivity via enhancement of TRAIL in human prostate adenocarcinoma xenograft model [J]. *BMC Urol*, 2013, (13): 1.
- [15] Ivanov VN, Partridge MA, Huang SX, et al. Suppression of the proinflammatory response of metastatic melanoma cells increases TRAIL-induced apoptosis [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(2): 463-475.