

全反式维甲酸及其衍生物对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 凋亡的影响

周佳丽 颜蕴文 江巧玲 吴 燕 周 青 汪 渊

摘要 目的 研究全反式维甲酸(ATRA)及其衍生物4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(ATPR)对人乳腺癌细胞MDA-MB-231体外凋亡的影响。方法 不同浓度ATRA及其衍生物ATPR分别处理MDA-MB-231细胞48 h后,Hoechst染色及流式细胞术检测细胞凋亡的变化,RT-PCR检测凋亡蛋白Caspase-3 mRNA水平的变化,Western blot法检测相关凋亡蛋白表达水平的变化。结果 与ATRA相比,相同浓度的ATPR能明显促进MDA-MB-231细胞的凋亡,随着浓度的增加,凋亡作用越加显著($P < 0.05$)。RT-PCR显示ATPR作用后Caspase-3 mRNA水平显著上调($P < 0.05$)。Western blot法显示ATPR能下调抗凋亡蛋白Bcl-2、NF- κ B、survivin的表达($P < 0.05$),上调促凋亡蛋白Bax、Grim-19、Caspase-3的表达($P < 0.05$)。结论 ATPR比ATRA更明显地促进人乳腺癌细胞MDA-MB-231的凋亡。

关键词 乳腺癌;MDA-MB-231;ATPR;凋亡

中图分类号 R 739.5; R 966; R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0154-05

全反式维甲酸(all-*trans* retinoic acid, ATRA)是维生素A(视黄醇、视黄醛、视黄酸)的活性代谢物^[1],对维持机体正常生长发育以及生理活动是必不可少的,同时也具有重要的临床应用价值。ATRA现已用于治疗各种肿瘤如急性粒细胞白血病、卡波氏肉瘤、卵巢癌、神经母细胞瘤等,此外还具有抗血管生成和抗炎作用^[2]。但是ATRA在治疗中也会产生一定的副作用,如皮肤损伤、血脂异常、甲减、头痛、维甲酸综合征等^[3]。因此研发高效低毒的维甲酸衍生物已成为当今的研究热点。4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(4-amino-2-trifluoromethyl-

phenyl ester, ATPR)是本校新合成的维甲酸衍生物,研究^[4]已表明ATPR能有效抑制乳腺癌细胞株MDA-MB-231增殖和迁移。该研究旨在探究ATPR对乳腺癌细胞株MDA-MB-231凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 ATRA购于美国Sigma公司,ATPR由安徽医科大学药学院提供,均用DMSO配制成40 mmol/L的母液,分装后避光保存于-20℃冰箱;高糖DMEM购于美国Gibco公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;Hoechst凋亡试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC试剂盒购于美国eBioscience公司;RT-PCR试剂盒购于美国Fermentas公司;引物及内参由上海生工生物工程公司合成;鼠抗人Bax、Grim-19、Bcl-2、Caspase-3、 β -actin、兔抗人NF- κ B、羊抗人survivin均购于美国Santa Cruz公司;其余二抗均购于北京中杉金桥生物技术有限公司;BCA定量试剂盒和ECL显色试剂盒均购于美国Pierce公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞MDA-MB-231购于美国ATCC公司,由本实验室保存。MDA-MB-231用含有10%胎牛血清、100 U/ml链霉素、100 μ g/ml青霉素的高糖DMEM培养在37℃含5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中,当细胞密度为90%~95%并处于对数生长期时,用0.25%的胰酶消化传代。

1.2.2 Hoechst染色 将处于对数生长期的MDA-MB-231接种于含有灭菌盖玻片的6孔板内,细胞密度调整为 4×10^4 个/孔,次日用20、40 μ mol/L的ATRA和ATPR处理细胞,并设细胞对照组,37℃培养48 h后小心取出盖玻片于载玻片上,加固液固定20 min, PBS洗3遍,加入Hoechst染色液染色5 min,再用PBS洗3遍,荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察细胞核形态并拍照。

1.2.3 流式细胞术检测 收集处于对数生长期的

2014-10-23 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: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:周佳丽,女,硕士研究生;

汪 渊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: aydesm-1@163.com

MDA-MB-231 接种于细胞培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。待细胞贴壁后弃去培养液,用 20、40 μmol/L ATRA 和 ATPR 处理细胞,并设细胞对照组,处理 48 h 后常规消化收集各组细胞于 1.5 ml 的 EP 管中。2 000 r/min 离心 5 min,预冷 PBS 洗 3 次后 100 μl Binding buffer 充分吹打重悬,调整细胞数量为 1 × 10⁵ 个,取 5 μl AnnexinV-FITC 加入细胞悬液中,混匀,避光放置 15 min 后每管加入 400 μl Binding buffer 和 5 μl PI 混匀后流式细胞仪检测,FCS express 软件分析结果。

1.2.4 RT-PCR 检测 提取细胞总 RNA 并逆转录成 cDNA,进行 PCR 扩增。Caspase-3 上游引物:5'-AAATGGACCTGTTGACCTGAA-3',下游引物:5'-CAAAGCGACTGGATGAAC-3',片段大小为 272 bp;β-actin 上游引物:5'-CGGGAAATCGTGCCTGAC-3',下游引物:5'-TGGAAGGTGGACAGCGAGG-3',片段大小为 434 bp。PCR 扩增条件:Caspase-3 为 94 °C 预变性 4 min 94 °C 变性 30 s 51 °C 退火 30 s 72 °C 延伸 20 s,共循环 35 次;β-actin 为 94 °C 预变性 4 min 94 °C 变性 30 s 55 °C 退火 30 s 72 °C 延伸 20 s,共循环 30 次。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后小心取出凝胶于紫外灯下观察并拍照。

1.2.5 Western blot 法检测 将 MDA-MB-231 均匀接种于细胞培养瓶中,次日用 20、40 μmol/L ATRA 和 ATPR 处理细胞,并设细胞对照组。处理 48 h 后 PBS 洗涤 3 次,每瓶加入 200 μl RIPA 蛋白提取液(Tris-HCl, pH = 7.14; 150 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; 5 mg/ml Leupeptin; 1 mmol/L PMSF),冰上放置 30 min,刮取细胞,移入 1.5 ml 的预冷 EP 管中,反复冻融 3 次(-80 °C、4 °C),超速离心机 14 000 r/min 离心 30 min 将上清液吸入另一个 1.5 ml EP 管中。BCA 法测定总蛋白浓度并将所有样本调整成相同浓度,加入 4 × 蛋白上样缓冲液,混匀后煮沸变性,-80 °C 保存备

用。配制 12.5% SDS-PAGE,加入等量样本后电泳,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗(β-actin、BCL-2、Bax、NF-κB、Grim-19、survivin, Caspase-3) 4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤,二抗室温孵育 2 h,洗涤后在暗室内加 ECL,覆盖上 X 线片、显影、定影。底片扫描后采用 Quantity One 分析灰度值。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料使用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 ATRA 和 ATPR 对细胞核形态的影响 荧光显微镜下,细胞对照组细胞核为均一卵圆形,呈均匀蓝色荧光;ATPR 处理组细胞核大小不一、形态不规则、固缩、致密浓染、部分碎裂成凋亡小体,折光性增强。随着浓度的增高,ATPR 处理组凋亡小体明显增多,ATRA 处理组也有少许凋亡小体。见图 1。

2.2 ATRA 和 ATPR 对细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示,细胞对照组 20、40 μmol/L 的 ATRA 和 ATPR 处理组的早期凋亡率(第四象限)和晚期凋亡率(第一象限)之和分别为 12.29%、14.59%、16.41%、21.54%、25.02%。表明随着药物浓度的增加,细胞凋亡率呈上升趋势,且 ATPR 诱导凋亡的作用比 ATRA 显著,见图 2。

2.3 ATRA 和 ATPR 对 Caspase-3 mRNA 水平的影响 与细胞对照组相比,ATPR 处理后 Caspase-3 mRNA 转录明显增加($F = 20.8, P < 0.05$)。但 ATRA 组与细胞对照组比较差异无统计学意义。见图 3。

2.4 ATRA 和 ATPR 对凋亡相关蛋白表达的影响 与细胞对照组比较,ATPR 组抗凋亡蛋白 Bcl-2、NF-κB、survivin 表达量降低($P < 0.05$),促凋亡蛋白 Bax、Grim-19、Caspase-3 表达量上升($P < 0.05$)。ATPR 组比 ATRA 组促凋亡作用更显著,且 ATPR 组

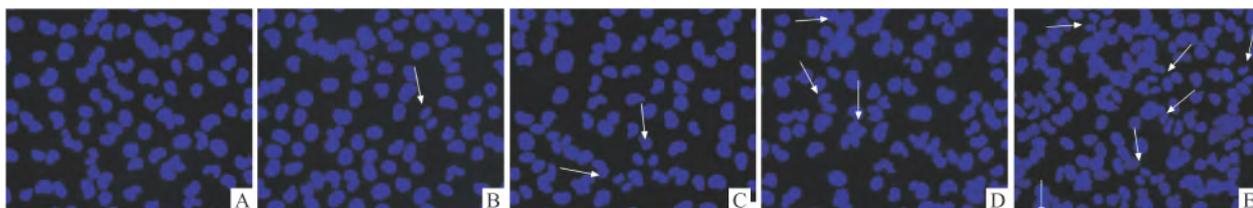


图1 ATRA 和 ATPR 对 MDA-MB-231 凋亡的影响 ×200

A: 细胞对照组; B: ATRA 20 μmol/L; C: ATRA 40 μmol/L; D: ATPR 20 μmol/L; E: ATPR 40 μmol/L

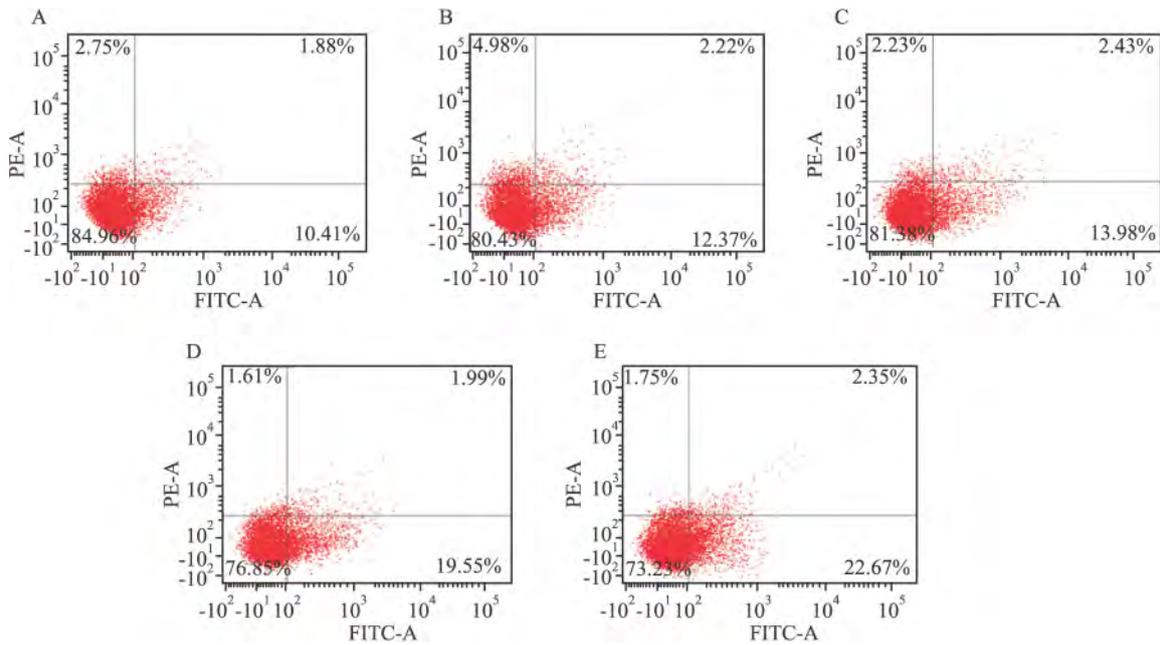


图2 ATRA 和 ATPR 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

A: 细胞对照组; B: ATRA 20 μmol/L; C: ATRA 40 μmol/L; D: ATPR 20 μmol/L; E: ATPR 40 μmol/L

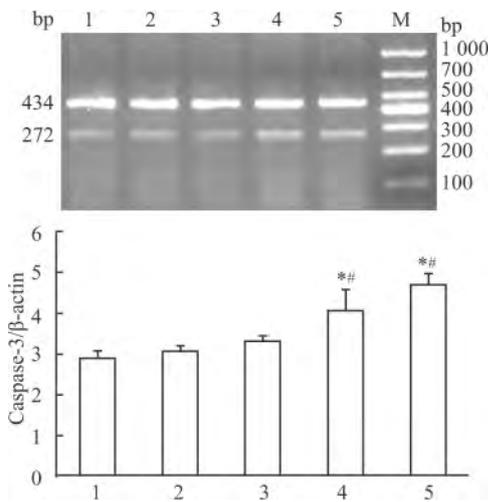


图3 ATRA 和 ATPR 对 MDA-MB-231 Caspase-3 基因表达的影响

1: 细胞对照组; 2: ATRA 20 μmol/L; 3: ATRA 40 μmol/L; 4: ATPR 20 μmol/L; 5: ATPR 40 μmol/L; 与细胞对照组比较: * $P < 0.05$; 与相同浓度的 ATRA 组比较: # $P < 0.05$

随着浓度升高,促凋亡作用增加($F_{Bcl-2} = 233.7$ 、 $F_{Bax} = 101.4$ 、 $F_{Grim-19} = 88.2$ 、 $F_{NF-κB} = 483.5$ 、 $F_{survivin} = 414.0$ 、 $F_{Caspase-3} = 74.1$ $P < 0.05$) ,见图4。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,全球每年发病率正在以2%~3%的速度递增^[5],且发病年龄呈年轻化趋势。虽然ATRA在治疗恶性肿瘤方面

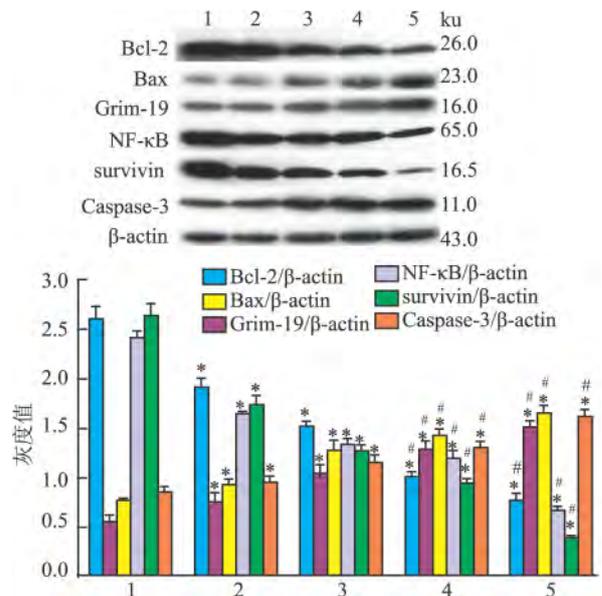


图4 ATRA 和 ATPR 对 MDA-MB-231 凋亡相关蛋白的影响

1: 细胞对照组; 2: ATRA 20 μmol/L; 3: ATRA 40 μmol/L; 4: ATPR 20 μmol/L; 5: ATPR 40 μmol/L; 与细胞对照组比较: * $P < 0.05$; 与相同浓度的 ATRA 组比较: # $P < 0.05$

发挥重要作用,但对乳腺癌的治疗仍处于临床前研究阶段。研究^[6]表明维甲酸与控制乳腺癌细胞增殖、生存和侵袭行为的细胞外因子以及细胞内信号通路存在相互作用,但其临床应用效果不尽如人意。ATPR 是 ATRA 的新型衍生物,由本校药学院改造合成,较 ATRA 具有更好的稳定性和可溶性。本实

实验室历年研究表明,ATPR 可以抑制肺癌、胃癌、结肠癌以及乳腺癌细胞在体外的增殖和迁移,且效果优于 ATRA。

Hoechst 染色结果显示 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATPR 处理细胞即可出现明显的凋亡小体,且随着浓度升高凋亡小体占总细胞比例显著增高,而 ATRA 组凋亡小体明显少于 ATPR 组。流式细胞术检测结果同样显示 ATPR 诱导乳腺癌细胞凋亡作用高于 ATRA,与 Hoechst 染色结果相符。

细胞凋亡亦称细胞程序性死亡,是一种主动死亡过程,受多种细胞内基因及细胞外因子调控。Bcl-2 蛋白家族是重要的细胞凋亡调节因子,其中抗凋亡蛋白有 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w 等,促凋亡蛋白有 Bax、Bak、Bok 等^[7]。当细胞受到凋亡信号刺激,Bax/Bak 聚合物易位至线粒体膜,能在线粒体上形成孔道,使一些线粒体内膜间隙蛋白如细胞色素 C 释放,进而启动 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡^[8]。而 Bcl-2 能封闭 Bax 形成的孔道,使一些小分子不能自由通透,从而保护细胞凋亡。Grim-19 是 Grims 家族成员之一,目前认为 Grim-19 的表达促进细胞凋亡,其对维持线粒体的跨膜电位至关重要,而完整的跨膜电位可以保护细胞免于细胞凋亡^[9]。NF- κ B 作为一种核因子,其发生磷酸化后,能进入细胞核内,调节抗凋亡基因的转录。研究^[10-11]证明 ATRA 能通过抑制 NF- κ B 的转录活性诱导人外周血白血病 T 细胞和恶性胶质瘤细胞凋亡。survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白家族中的最小成员,可能主要通过两条途径来抑制细胞凋亡:一是直接抑制 Caspase-3、Caspase-7 的活性,阻断凋亡信号转导通路;二是与细胞周期蛋白激酶 CDK4 结合,导致 CDK2/cyclinE 激活和核糖体磷酸化,核糖体磷酸化后启动细胞周期,加快 G₁/S 期的转换,抑制细胞凋亡^[12]。Caspase 家族是半胱氨酸依赖性细胞死亡蛋白酶。作为凋亡终末效应器,Caspase-3 可以剪切 PARP,其结果是导致细胞不能进行 DNA 修复,从而启动 DNA 的降解,引起细胞凋亡。该实验 Western blot 法结果显示 ATPR 处理组 Bcl-2 表达量降低而 Bax 上升,抗凋亡蛋白 NF- κ B、survivin 下降,促凋亡蛋白 Grim-19、Caspase-3 的表达上升。而 ATRA 处理组凋亡蛋白的表达与 ATPR 组趋势相同但不如 ATPR 显著。

综上所述,ATRA 与 ATPR 均能促进乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡。但与 ATRA 相比,ATPR 促进细胞凋亡的效果更加显著,其可能通过调控相关凋亡蛋白的表达诱导乳腺癌细胞凋亡。细胞凋亡是一个极其复杂且受严格调控的过程,由多种细胞因子及信号通路参与调控,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王爱丽,徐爱晖. 维甲酸及其衍生物抗肺肿瘤作用的研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(1): 85-6.
- [2] Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace V M. All *trans* retinoic acid and cancer [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2011, 33(2): 241-9.
- [3] Su Y C, Dunn P, Shih L Y, et al. Retinoic acid syndrome in patients following the treatment of acute promyelocytic leukemia with all-*trans* retinoic acid [J]. Chang Gung Med J, 2009, 32(5): 535-42.
- [4] Wang B, Yan Y, Zhou J, et al. A novel all-*trans* retinoid acid derivatives inhibits the migration of breast cancer cell lines MDA-MB-231 *via* myosin light chain kinase involving p38-MAPK pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67(5): 357-62.
- [5] 冯小伟,叶兆祥. 乳腺癌筛查的现状与进展 [J]. 国际医学放射学杂志, 2012, 35(2): 131-4.
- [6] Garattini E, Bolis M, Garattini S K, et al. Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(6): 739-49.
- [7] Gómez-Fernández J C. Functions of the C-terminal domains of apoptosis-related proteins of the Bcl-2 family [J]. Chem Phys Lipids, 2014, 183: 77-90.
- [8] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 49-63.
- [9] 张照果,李静. 细胞死亡调节因子 GRIM-19 的研究进展 [J]. 辽宁医学院学报, 2010, 31(3): 274-7.
- [10] Zhang R, Banik N L, Ray S K. Combination of all-*trans* retinoic acid and interferon- γ suppressed PI3K/Akt survival pathway in glioblastoma T98G cells whereas NF- κ B survival signaling in glioblastoma U87MG cells for induction of apoptosis [J]. Neurochem Res, 2007, 32(12): 2194-202.
- [11] Nawata H, Maeda Y, Sumimoto Y, et al. A mechanism of apoptosis induced by all-*trans* retinoic acid on adult T-cell leukemia cells: a possible involvement of the Tax/NF- κ B signaling pathway [J]. Leuk Res, 2001, 25(4): 323-31.
- [12] 徐丽丽,高世勇,季宇彬. 细胞凋亡相关蛋白的研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(11): 1361-2.

CD105/CD133 筛选鉴定 SMMC-7721 株 干细胞表面标志物的实验研究

吴立胜¹, 鲁旭¹, 耿小平², 卢寅¹, 张俊松¹

摘要 目的 观察人肝癌细胞株 SMMC-7721 中膜抗原 CD133、CD105 的表达情况并对不同亚群的生物学性状进行体内实验研究。方法 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 对 SMMC-7721 株细胞培养; 采用流式细胞仪方法分选检测 CD133、CD105 在 SMMC-7721 中表达情况并分选出 CD133⁺/CD105⁺、CD133⁺/CD105⁻、CD133⁻/CD105⁺、CD133⁻/CD105⁻ 4 个亚群; CCK-8 和 Transwell 侵袭实验分别检测 4 个亚群和未分选细胞组的增殖及侵袭能力 琼脂克隆实验检测 5 组细胞成球能力; 裸鼠成瘤实验了解 CD133⁺/CD105⁺、

CD133⁻/CD105⁻ 亚群和未分选组的成瘤能力。结果 流式细胞仪分选的 CD133⁺/CD105⁺、CD133⁺/CD105⁻、CD133⁻/CD105⁺、CD133⁻/CD105⁻ 4 种细胞亚群的比例分别为 1.61%、0.01%、97.88% 和 0.50%。CD133⁺ 亚群的增殖和成球能力较 CD133⁻ 亚群及未分选细胞组强, 而 CD105⁺ 亚群侵袭能力较 CD105⁻ 亚群及未分选细胞组强。CD133⁺/CD105⁺ 组与 CD133⁻/CD105⁻ 组及未分选细胞组相比成瘤所需的时间短、所需细胞数少、成瘤的体积大。结论 CD133 在人肝癌细胞株 SMMC-7721 中的表达与其增殖成球能力有关, CD105 与其侵袭能力有关, CD133⁺/CD105⁺ 具有体内高度的成瘤能力。CD133⁺/CD105⁺ 亚群在人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 中具有肿瘤干细胞特性。

关键词 CD133; CD105; 原发性肝癌; 干细胞

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0158-06

2014-11-04 接收

基金项目: 安徽省科技攻关计划(编号: 1301zc04065); 合肥市科技局[编号: 2013(26)]

作者单位: ¹安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院) 微创外科, 合肥 230061

²安徽医科大学第一附属医院肝脏外科, 合肥 230022

作者简介: 吴立胜, 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师;
耿小平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xp-geng@163.net

肿瘤干细胞也称作肿瘤起始细胞, 目前尚无确切的定义, 一般认为是一种罕见的具有自我更新、分

The influence of ATRA and its derivative on the cell apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231

Zhou Jiali, Yan Yunwen, Jiang Qiaoling, et al

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

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

Abstract Objective To investigate the influence of all-trans retinoic acid (ATRA) and its derivative 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl ester (ATPR) on the apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** MDA-MB-231 was treated with different concentrations of ATRA and ATPR for 48 h. Hoechst staining and flow cytometry were used to observe cell apoptosis. The mRNA level of apoptosis-related protein Caspase-3 was analyzed by RT-PCR. Western blot was performed to detect the expression of apoptosis-related proteins. **Results** Compared with ATRA, the same concentrations of ATPR promoted the apoptosis of MDA-MB-231 more obviously ($P < 0.05$), and the effect was dose-dependent. RT-PCR showed ATPR significantly raised the mRNA level of Caspase-3 ($P < 0.05$). Western blot displayed that ATPR decreased the expression of anti-apoptotic protein such as Bcl-2, NF- κ B, survivin ($P < 0.05$) and increased the expression of pro-apoptotic protein Bax, Grim-19, Caspase-3 ($P < 0.05$). **Conclusion** Contrasted to ATRA, ATPR is able to promote the cell apoptosis of MDA-MB-231 more markedly.

Key words breast cancer; MDA-MB-231; ATPR; apoptosis