

## RAR $\beta$ 在胃癌细胞生长调节中的作用\*

吴 乔 陈正明 刘 苏 陈玉强<sup>1)</sup> 苏文金

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

**摘要** 为探讨RAR $\beta$ 受体介导全反式视黄酸(A TRA)抑制胃癌细胞生长的作用机理, 用Northern印迹测定RAR $\beta$ mRNA 表达水平, 脂质体介导的转染方法将含有RAR $\beta$ 基因的表达载体转染MKN-45细胞并稳定表达, MTT 和软琼脂集落形成等实验测定细胞生长速率和生长状态, 氯霉素乙酰转移酶活性(CAT)测定视黄酸应答元件 $\beta$ RARE 的转录活性以及AP-1(activator protein-1)活性 RAR $\beta$ 在A TRA 敏感细胞株MGC80-3, BGC-823和SGC-7901中表达, 而在A TRA 抗性细胞株MKN-45中不表达. 当RAR $\beta$ 基因转染MKN-45细胞时, 细胞变为A TRA 敏感, 由此导致A TRA 抑制MKN-45细胞生长和软琼脂集落形成. A TRA 可以加强诱导MGC80-3, BGC-823和SGC-7901细胞 $\beta$ RARE 的转录活性, 但对MKN-45细胞影响不大, 不能抑制细胞AP-1活性. 当RAR $\beta$ 基因转染MKN-45细胞后, A TRA 则能够诱导细胞 $\beta$ RARE 的转录活性, 并抑制细胞的AP-1活性. RAR $\beta$ 表达与A TRA 抑制胃癌细胞生长密切相关. A TRA 诱导 $\beta$ RARE 转录活性和抑制AP-1活性可能是其调控胃癌细胞生长的机制之一.

**关键词** 视黄酸受体, 生长抑制, 全反式视黄酸, 胃癌细胞

**中图分类号** Q 291, Q 786

## Effect of Retinoic Acid Receptor $\beta$ in Growth Regulation of Gastric Cancer Cells\*

WU Qiao, CHEN Zheng-ming, LIU Su, CHEN Yu-qiang<sup>1)</sup>, SU Wen-jin

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,  
The School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** The effect of all-*trans* retinoic acid (A TRA) is mainly mediated by its receptors, RARs and RXRs. The role of RAR $\beta$  in growth inhibition by A TRA and the underlying mechanism in human gastric cancer cells were investigated. Expression level of RAR $\beta$ mRNA was detected by Northern blot. The expression vector containing a RAR $\beta$ gene was transfected into MKN-45 cells which did not express RAR $\beta$ mRNA by CellFECTIN<sup>™</sup>. Growth inhibition and statue of cells were detected by MTT assay and the method of colony formation of cells in soft agar, respectively. To explore the mechanism of RAR $\beta$  in mediating effect of A TRA, a CAT reporter containing an  $\beta$ RARE (retinoic acid response element) was transiently transfected into cells and CAT assay was carried out. AP-1 activity was also detected by CAT assay. RAR $\beta$  expressed in MGC80-3, BGC-823 and SGC-7901 cell lines, which were sensitive to A TRA, but not in MKN-45 cells resistant to A TRA. When the RAR $\beta$  gene was introduced and expressed stably in MKN-45

\* 国家自然科学基金(39880015)和国家杰出青年科学基金(B)类(39825502)资助

\*\* 联系人: 吴乔, 女, 1959年生, 博士, 副研究员

TeL: (0592) 2185361, Fax: (0592) 2086630

E-mail: XGWU@XMU.EDU.DN

<sup>1)</sup>现工作单位: 中国人民解放军第174医院, 厦门

收稿日期: 1999-12-24, 修回日期: 2000-03-30

cells, the cells restored their ATRA sensitivity, which led to growth inhibition of MKN-45 cells and the inhibition of colony formation of cells in soft agar by ATRA. A stronger induction of CAT activity in response to ATRA was observed in MGC80-3, BGC-823 and SGC-7901 cells. In contrast, only a slighter induction of CAT activity was seen in MKN-45 cells. However, ATRA could induce the CAT activity of MKN-45 cells transfected with RAR $\beta$  gene, whose trend was similar to those of MGC80-3, BGC-823 and SGC-7901 cells. In addition, ATRA could not inhibit AP-1 activity in MKN-45 cells. However, AP-1 activity of MKN-45 cells was inhibited obviously after cells were transfected with RAR $\beta$  gene. These results demonstrate that expression of RAR $\beta$  can contribute to growth inhibition of gastric cancer cells by ATRA. The induction of  $\beta$ RARE transcriptional activity and the inhibition of AP-1 activity may present one of mechanisms of ATRA in controlling the proliferation of gastric cancer cells.

**Key words** Retinoic acid receptor  $\beta$  Growth inhibition, All-trans retinoic acid, Gastric cancer cell

视黄酸(retinoic acid, RA)对细胞生长、分化和凋亡具有重要作用,并在临床上治疗一些癌症,如急性早幼粒细胞白血病。视黄酸的作用主要受其受体RARs(retinoic acid receptors)和RXRs(retinoid X receptors)介导,这些受体属于类固醇/甲状腺激素受体超家族成员,由三种不同基因 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 编码,形成了结构类似而功能不同的受体亚类<sup>[1]</sup>。RARs和RXRs可以形成二聚体而结合到视黄酸应答元件RARE(retinoic acid response element)上,由此调节靶基因的表达。一些靶基因就是RARs本身,如RAR $\beta$ 基因。在RAR $\beta$ 启动子上存在着一个 $\beta$ RARE序列,它介导了视黄酸诱导的RAR $\beta$ 表达<sup>[2]</sup>。因此,RAR $\beta$ 基因的自动调节在扩增视黄酸应答中起着关键性作用。

我们先前的研究已表明,视黄酸抑制细胞生长可以通过以下途径:1)调控细胞周期,诱导细胞滞留在G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>期;2)诱导癌细胞分化;3)诱导癌细胞凋亡<sup>[3-5]</sup>。但是在胃癌细胞中,视黄酸受体RAR $\beta$ 介导的作用机理仍不清楚。本文通过RAR $\beta$ 基因转染,证实RAR $\beta$ 表达介导了视黄酸对胃癌细胞的生长抑制,视黄酸对RARE转录活性的诱导和对AP-1活性的抑制可能是其抑制胃癌细胞生长的分子机制之一。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株和药物处理

胃癌细胞株MGC80-3(本校抗癌中心提供)、BGC-823、SGC-7901和MKN-45(上海细胞所细胞库提供)均用RPMI-1640培养液培养。细胞接种24 h后,用10<sup>-6</sup> mol/L全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA, Sigma)处理细胞24 h,供实验用。

### 1.2 RNA提取和Northern印迹

方法参见已发表的论文<sup>[6]</sup>。

### 1.3 基因转染

脂质体介导转染法(Cellfectin<sup>™</sup>, Gibco/BR I公司产品)将含有RAR $\beta$ 基因的表达载体转染到MKN-45细胞、G418筛选细胞、Northern印迹测定RAR $\beta$ 基因在细胞中的表达。

### 1.4 DNA瞬时转染和CAT活性测定

将报告基因和 $\beta$ 半乳糖苷酶表达质粒(Pharmacia)等通过脂质体介导转染法转染到细胞中瞬时表达,24 h后用ATRA处理细胞,按文献<sup>[7]</sup>方法测定 $\beta$ 半乳糖苷酶活性和CAT(chloramphenicol acetyltransferase)活性。

测定AP-1活性的报告基因(-73 CoI-CAT)是CAT基因连接的胶原酶(collagenase)启动子,其上存在一个AP-1结合位点,位于-63和-73残基之间。此报告基因通常被用以测定AP-1活性<sup>[8]</sup>。

测定 $\beta$ RARE转录活性的CAT报告基因是含有视黄酸应答元件 $\beta$ RARE,并与<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子(tk)连接的 $\beta$ RARE-tk-CAT。

### 1.5 细胞生长测定

方法参见已发表的论文<sup>[6]</sup>。

### 1.6 软琼脂集落形成实验

将琼脂溶解在RPMI-1640培养液中,使琼脂的终浓度分别为0.5%和0.3%。在培养皿( $\Phi$ 35 mm)中加入1 ml 0.5%琼脂作为底层,在0.3%琼脂中加入细胞,使细胞终浓度为每ml 10万(实验组同时加入ATRA),混匀后取1 ml铺展在上面,待琼脂凝固后置培养箱中培养,3周后随机统计集落数(直径大于80  $\mu$ m的集落为阳性),结果行T检验。

## 2 结果

### 2.1 ATRA对胃癌细胞RAR $\beta$ mRNA表达的影响

Northern印迹结果显示,RAR $\alpha$ 和RXR $\alpha$ 在4株癌细胞中均表达,但表达水平差别较大,ATRA

可以诱导MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞RAR $\alpha$ 表达,不能诱导MKN-45细胞RAR $\alpha$ 表达。RAR $\beta$ 只在MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞中表达,在MKN细胞中不表达。ATRA既不能诱导RAR $\beta$ 表达,也不能诱导RXR $\alpha$ 表达(Fig. 1)。

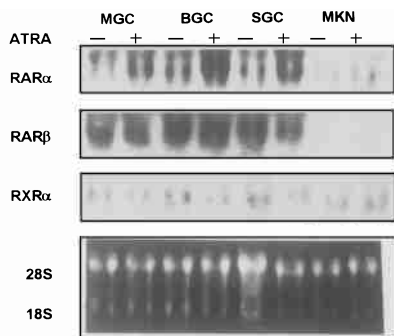


Fig. 1 Effect of ATRA on expressions of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RXR $\alpha$  mRNA in gastric cancer cells shown by Northern blot

### 2.2 RAR $\beta$ 基因在MKN-45细胞中的稳定表达

由于在MKN-45细胞中检测不到RAR $\beta$  mRNA表达,因此将含有RAR $\beta$ 基因的表达载体转染MKN-45细胞, G418筛选后获得稳定转染子MKN/RAR $\beta$ 2。Northern印迹测定表明, MKN/RAR $\beta$ 2表达RAR $\beta$ 但ATRA不能诱导其表达水平,结果与ATRA对MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞RAR $\beta$ 的影响一致(Fig. 2)。

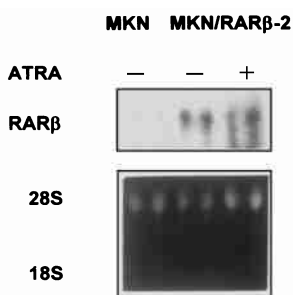


Fig. 2 Effect of ATRA on expression of RAR $\beta$  mRNA in MKN-45 cells transfected with RAR $\beta$  gene shown by Northern blot

### 2.3 ATRA对MKN/RAR $\beta$ 2细胞生长和软琼脂集落形成的抑制

先前实验已经证实, ATRA可以有效地抑制MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞生长及软琼脂集落形成,生长抑制率为53.2%、61.03%和33.5%<sup>[3]</sup>,但不能抑制MKN-45细胞生长,生长抑制率仅为3.87%。当RAR $\beta$ 基因转染MKN-45细胞

后, ATRA可以显著抑制MKN/RAR $\beta$ 2细胞生长和软琼脂集落形成。结果如Table 1和Fig. 3。

Table 1 Effect of ATRA on cell growth and colony formation in soft agar

	Growth inhibition of cells(%)	Inhibition of colony formation in soft agar(%)
MKN-45	3.78	23.25
MKN/RAR $\beta$ 2	35.57	92.10

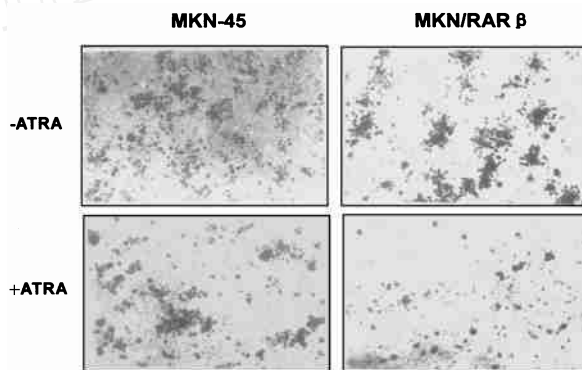


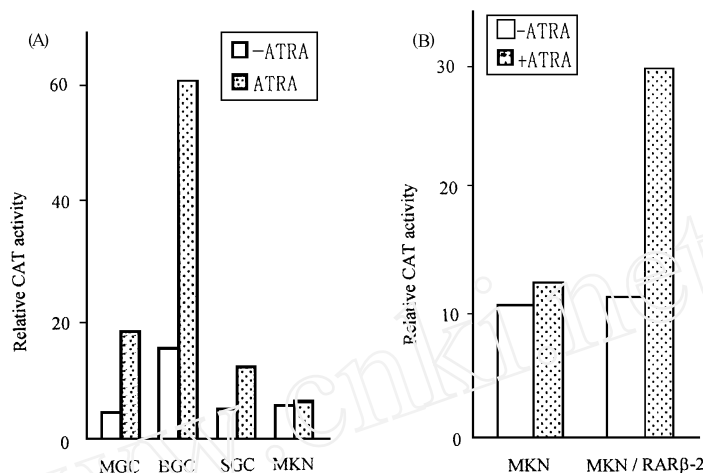
Fig. 3 Inhibitory effect of ATRA on colony formation of MKN-45 and MKN/RAR $\beta$  cells in soft agar observed by light microscope

### 2.4 ATRA对MKN/RAR $\beta$ 2细胞 $\beta$ RARE活性的影响

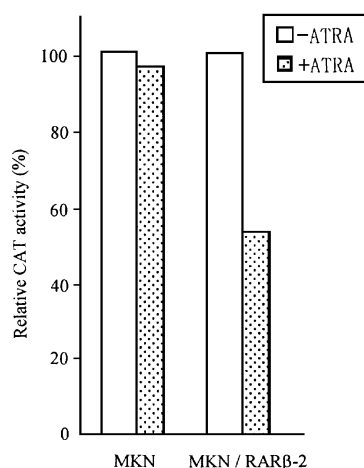
将含有视黄酸应答元件 $\beta$ RARE的报告基因通过脂质体介导的转染方法转染到细胞中瞬时表达, CAT测定表明, ATRA能够诱导MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞 $\beta$ RARE转录活性(即CAT活性),而不能诱导MKN-45细胞 $\beta$ RARE转录活性(Fig. 4A);当RAR $\beta$ 基因转染MKN-45细胞后, ATRA可以诱导MKN/RAR $\beta$ 2细胞 $\beta$ RARE活性,二者差异显著(Fig. 4B)。

### 2.5 ATRA对MKN-45/RAR $\beta$ 2细胞AP-1活性的抑制

先期研究已表明, ATRA可以有效地抑制MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞AP-1活性,但不能抑制MKN-45细胞AP-1活性<sup>[8]</sup>。当RAR $\beta$ 基因转染MKN-45后, ATRA则可以抑制MKN/RAR $\beta$ 2细胞的AP-1活性,与ATRA抑制MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞AP-1活性的结果类似(Fig. 5)。



**Fig 4** The result of CAT assay indicated the effect of ATRA on transcriptional activity of  $\beta$ RARE in gastric cancer cells  
(A) Four cell lines: MGC80-3, BGC-823, SGC-7901 and MKN-45;  
(B) MKN-45 cells and MKN/RAR $\beta$ -2 cells transfected with RAR $\beta$  gene



**Fig 5** The result of CAT assay indicated the effect of ATRA on AP-1 activity in MKN-45 cells and MKN/RAR $\beta$ -2 cells transfected with RAR $\beta$  gene

### 3 讨 论

本文观察了视黄酸受体 RAR $\beta$  的表达对视黄酸抑制胃癌细胞生长的影响, 结果表明, RAR $\beta$  表达与 ATRA 诱导的胃癌细胞生长抑制密切相关, 并可以诱导 MKN-45 细胞由 ATRA 抗性变为 ATRA 敏感, 提示 RAR $\beta$  是介导视黄酸抗胃癌细胞生长的必要条件之一. 在一些乳腺癌细胞和肺癌细胞中, 如果视黄酸不能诱导 RAR $\beta$  表达, 那么癌细胞将逃避正常的生长调控和凋亡诱导, 导致肿瘤的恶性发展<sup>[5,9]</sup>. 因此, RAR $\beta$  在一些类型的癌细胞中可能作

为一种肿瘤抑制基因调控肿瘤细胞的发生和发展.

在细胞生长与分化过程中, 视黄酸受体功能的变化将导致细胞分化的异常和抑制细胞生长作用(如抑制 AP-1 活性)的丧失. AP-1 是一种转录因子, 主要组成成分为 c-Jun 和 c-Fos 蛋白. 一些促有丝分裂剂, 如佛波酯 TPA 等通过诱导 AP-1 活性而刺激细胞生长, 导致细胞转化, 因此, AP-1 活性的诱导与肿瘤细胞恶性生长密切相关. 本文结果表明, 在 MKN-45 细胞中, ATRA 不能抑制 AP-1 活性, 当 RAR $\beta$  基因转染细胞表达后, ATRA 可以有效地抑制 AP-1 活性, 而且细胞生长和软琼脂集落形成受到显著抑制, 表明 ATRA 抑制 AP-1 活性是其抑制胃癌细胞生长的机制之一.

RAR $\beta$  表达是通过 RAR $\beta$  启动子上的  $\beta$ RARE 介导, RAR $\beta$  基因是 RA 的应答基因.  $\beta$ RARE 作为第一个被发现的视黄酸应答元件, 与其它 RARE 一样, 都含有 AGGTCA 或类似的基元序列(motif)<sup>[12]</sup>. RXRs 和 RARs 可以形成同源二聚体(RXR/RXR)或异源二聚体(RAR/RXR)而结合到 RARE 上, 由此调节靶基因的转录与表达<sup>[11]</sup>. 在乳腺癌细胞中, 视黄酸可以上调其敏感细胞株 ZR75-1 的  $\beta$ RARE 转录活性<sup>[5]</sup>, 同样, 在胃癌细胞株中, 当 RAR $\beta$  基因转染 MKN-45 细胞后, 细胞由 ATRA 抗性变为 ATRA 敏感细胞后, ATRA 就可以诱导其  $\beta$ RARE 转录活性, 诱导趋势与其它 ATRA 敏感细胞株类似. 结果不仅表明 ATRA 诱导的  $\beta$ RARE 转录活性提高可能是其作用胃癌细胞的机理之一, 而且提示 MKN-45 细胞对 ATRA 抗性可能是由于  $\beta$ RARE 转

录异常,导致RAR $\beta$ 不表达而产生的。

RAR $\beta$ 介导的抗细胞生长作用具有细胞特异性。如在人支气管上皮细胞癌中,ATRA 可以诱导RAR $\beta$ 表达,但不能抑制细胞生长,提示还有其它因子参与调控。COUP-TF 是一种孤儿受体(orphan receptor),只有当它表达时,才通过RAR $\beta$ 介导对肺癌细胞生长的抑制<sup>[9]</sup>。我们也注意到,RAR $\alpha$ 在MKN-45细胞中低水平表达,ATRA 可以诱导MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞RAR $\alpha$ 表达,而不作用MKN-45细胞,提示RAR $\alpha$ 可以也是ATRA 直接作用的靶基因<sup>[8]</sup>。那么,RAR $\beta$ 表达对RAR $\alpha$ 的作用如何,是协同作用还是拮抗作用?显然对这个问题的研究将有助于阐明受体之间的相关性。尽管本文在基因和细胞水平上证实RAR $\beta$ 基因介导了视黄酸抗胃癌细胞生长的过程,但在整体上是否有效还有待于进一步验证。

致谢: 本文所用的探针、报告基因等由张晓坤博士(美国加州Burnham 研究所)惠赠,特此致谢。

#### 参考文献(References)

- Zhang X K, Pfahl M. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 1993, **4**: 156~ 162
- De The H, Vivanco-Ruiz M D M, Tiollais P, Stunnenberg H, Dejean A. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor  $\beta$  gene. *Nature* (London), 1990, **343**: 177~ 180
- 陈正明, 吴乔, 陈玉强, 苏文金. 视黄酸对胃癌细胞周期的调控. 实验生物学报(Chen Zheng-ming, Wu Qiao, Chen Yu-qiang, Su Wen-jin, Regulation of cell cycle by retinoic acid in gastric cancer cells. *Acta Biol Exp Sin*), 1999, **32**: 135~ 140
- 陈玉强, 陈正明, 吴乔, 苏文金. 视黄酸对胃癌细胞的诱导分化及其相关酶活性的影响. 肿瘤防治研究(Chen Yu-qiang, Chen Zheng-ming, Wu Qiao, Su Wen-jin, Effect of retinoic acid on gastric cancer cells' differentiation and relevant enzyme activity. *Cancer Res Prevention Treatment*), 1999, **26**: 252~ 258
- Wu Qiao, Marcia ID, Yun Z, Peter D H, Anissa A, Long J, Yin L, Ru L, Zhang X K. Inhibition of *trans*-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 6598~ 6608
- 陈正明, 吴乔, 苏文金. CDKs 和 CKIs 在胃癌细胞周期调控中的相关性. 中国生物化学与分子生物学报(Chen Zheng-ming, Wu Qiao, Su Wen-jin. Relationship between CDKs and CKIs in regulation of cell cycle progression of human gastric cancer cells. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2000, **16**(1): 128~ 132
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 804- 808
- 吴乔, 陈正明, 苏文金. 胃癌细胞中AP-1活性与RAR $\alpha$ 介导的相关性. 中国生物化学与分子生物学报(Wu Qiao, Chen Zheng-ming, Su Wen-jin. Relationship between AP-1 activity and RAR $\alpha$  involvement in gastric cancer cells. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2000, **16**(5): 684~ 688
- Wu Qiao, Yin L, Ru L, Anissa A, Yi L, Zhang X K. Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J*, 1997, **16**: 1656~ 1667