

# 血清对全反式视黄酸抑制肺癌细胞生长的影响

吴 乔

(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** 研究不同浓度的血清对全反式视黄酸(ATRA)抑制肺癌细胞生长的影响. 当细胞培养在10%血清中, ATRA不能抑制肺癌细胞生长, 但是当细胞培养在1%血清中, ATRA能够有效地抑制肺癌细胞生长. 视黄酸受体RAR介导视黄酸的抗癌作用. Northern印迹分析表明, 在高浓度血清中ATRA不能诱导RAR表达, 但在低浓度血清中ATRA可以诱导RAR表达, 并且瞬时转染和CAT测定证实是通过激活RAR启动子转录活性而诱导RAR表达的. 孤儿受体Nur77受到血清生长因子刺激后会大量表达, 具有抗视黄酸活性的作用. 肺癌细胞培养在低浓度血清中, Nur77 mRNA低水平表达和Nur77蛋白不表达. 然而在高浓度血清中, Nur77 mRNA和蛋白高水平表达. 另外, 在无血清条件下, EGF也可以诱导Nur77表达. 结果提示, 血清中的生长因子可能拮抗ATRA抑制肺癌细胞生长的作用, 其作用途径可能是通过刺激细胞中Nur77表达, 或者通过下调RAR启动子的转录活性而抑制RAR的表达.

**关键词** 血清, 全反式视黄酸, 视黄酸受体, Nur77受体, 肺癌细胞

**中图分类号** Q279, R73-36

## Effect of Serum on the Growth Inhibition of Lung Cancer Cells by All-trans Retinoic Acid

WU Qiao

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

**Abstract** The effects of serum concentration on growth inhibition of lung cancer cells by all-trans retinoic acid (ATRA) were investigated. It was found that lung cancer cells, H292 and H460, were resistant to ATRA effect on their growth inhibitions when cells were cultured in 10% serum medium. However, the growth of cells was inhibited by ATRA while the cells were cultured in 1% serum medium. Northern blot showed that RAR (retinoic acid receptor), which is associated with anti-cancer of ATRA, was induced by ATRA at low serum concentration through activation of transcriptional activities of RAR promoter and RARE (retinoic acid response element), revealed by transient transfection and CAT assay, but was not induced at high serum concentration. Orphan receptor Nur77, which is rapidly induced by serum growth factors and is involved in retinoic acid resistance, was expressed in mRNA and protein levels at high serum concentration, detected by Northern blot and Western blot, but not expressed in protein level and expressed at low level of mRNA at low serum concentration in lung cancer cells. In addition, EGF also induced Nur77 expression in lung cancer cells under the condition of serum-free. Taken together, the data indicated that some of growth factors presented in serum might antagonize the effect of ATRA on growth inhibition of lung cancer cells. The pathway for serum action is likely to stimulate expression of Nur77 by some growth factors in serum, or suppress expression of RAR through down-regulation of transcriptional activity of RAR promoter.

**Key words** serum, all-trans retinoic acid, retinoic acid receptor (RAR), Nur77 receptor, lung cancer cells

收稿日期: 2000-10-19; 接受日期: 2000-12-29

国家杰出青年科学基金(B类, No. 39825502)和国家自然科学基金(No. 39880015)资助

吴乔, 女, 1959年生, 博士, 副研究员. Tel: (0592) 2182542, Fax: (0592) 2086630, E-mail: XGWU@XMU.EDU.CN

Received: October 19, 2000; Accepted: December 29, 2000

Supported by National Outstanding Youth Science Foundation (B type, No. 39825502) and National Natural Science Foundation of China (No. 39880015)

全反式视黄酸可以抑制许多类型癌细胞,包括乳腺癌细胞、肺癌细胞和胃癌细胞的恶性生长<sup>[1-3]</sup>。视黄酸主要通过其受体 RARs (retinoic acid receptors) 和 RXRs (retinoid X receptors) 发挥作用,其中 RAR 在介导视黄酸的抗肺癌细胞生长过程中起着重要作用<sup>[1,4]</sup>。孤儿受体 (orphan receptor) Nur77 属于核受体超家族成员,已确定在 RAR 启动子中含有 Nur77 的结合位点<sup>[1,2,5]</sup>。尽管 Nur77 的特异性配体尚未确定,但它可以通过调节 RAR 启动子的转录活性而参与视黄酸对 RAR 表达和对肺癌细胞生长的调控<sup>[1,2,5]</sup>。

研究中发现,血清浓度对视黄酸抑制肺癌细胞生长影响很大。血清中的主要成分是牛血清白蛋白 (BSA),提供营养。此外,血清中还含有许多生长因子,包括表皮生长因子、血小板衍生物生长因子、转化生长因子、等<sup>[6]</sup>。但是,血清中的这些成分通过何种途径、发挥什么作用至今仍不清楚。本文试图通过分析一些相关基因表达的变化,了解血清拮抗视黄酸抑制肺癌细胞生长的关键点,为阐明血清的功能作用提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养和全反式视黄酸药物处理

肺癌细胞株 H292 和 H460 均用 DMEM 培养液培养。根据实验需要,全反式视黄酸 (all-*trans* retinoic acid, ATRA,  $10^{-6}$  mol/L, Sigma) 处理细胞 (24 h) 时培养液中的血清浓度分别为 10% 和 1%; EGF (表皮生长因子, 200 ng/ml) 或 BSA (牛血清白蛋白, 2 mg/ml) 处理细胞 (24 h) 时用无血清培养液。细胞株来源于美国 ATCC (American Type Culture Collection)。

### 1.2 细胞生长测定

以 1 000 细胞/孔的接种量将细胞接种于 96 孔培养板中,用不同浓度的 ATRA 连续处理细胞,每隔 1 d 更换含 ATRA 的新鲜培养液。9 d 后,以 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 染色细胞 3~4 h,酶标法测定细胞生长率<sup>[3]</sup>。

### 1.3 RNA 的提取和 Northern 印迹

硫氰酸胍-氯化铯离心法提取总 RNA,每一样品取 30  $\mu$ g 总 RNA 进行电泳,转膜,并与 <sup>32</sup>P-dATP 和 <sup>32</sup>P-dCTP (北京亚辉生物公司) 标记的探针 (RAR 和 Nur77) 杂交。肌动蛋白标记为 O 的电泳带作为各样品 RNA 用量的参照<sup>[3,7]</sup>。

### 1.4 蛋白提取和 Western 印迹

常规方法提取蛋白,SDS-PAGE,蛋白转膜后与抗体 (Nur77, Santa Cruz) 温育,ECL 试剂盒 (Amersham) 显色,-tubulin 作为各样品蛋白用量的参照<sup>[3,7]</sup>。

### 1.5 瞬时转染和氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 测定

细胞培养在 6 孔板中,采用磷酸钙和 DNA 共沉淀的转染方法,主要步骤为:将 100 ng 报告基因,400 ng  $\beta$ -半乳糖苷酶表达质粒 (Pharmacia) 等瞬时转染到细胞中,以 <sup>3</sup>H-乙酰辅酶 A 作为底物测定 CAT 活性 (CPM 值),以  $\beta$ -半乳糖苷酶活性定量转染的效率<sup>[1,2]</sup>。

所用的报告基因是将视黄酸应答元件 (包括 RAR 启动子和 RARE (retinoic acid response element) 等) 连接到含有胸腺嘧啶脱氧核苷激酶的 CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 启动子上,表达载体为 pBluescript-CAT vector (Pharmacia)<sup>[2]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 血清对视黄酸抑制肺癌细胞生长的影响

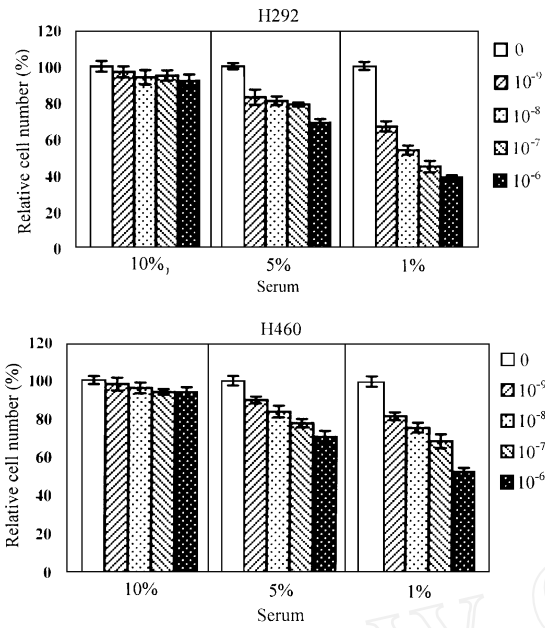
当肺癌细胞 H292 和 H460 培养在含 10% 血清的培养液中,ATRA 几乎不能抑制细胞生长;但是,当细胞培养在含 5% 血清的培养液中,ATRA 可以抑制细胞生长,并且随血清浓度的降低,ATRA 的抑制作用增强,当血清浓度为 1% 时,ATRA 的抑制作用达到 50% 以上 (Fig. 1)。

### 2.2 血清对 RAR mRNA 表达水平的影响

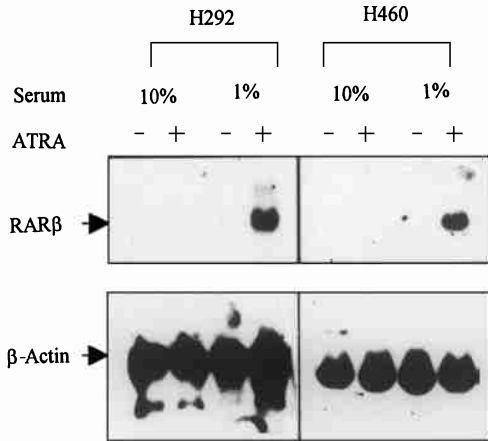
ATRA 通过其受体 RAR 的介导而抑制肺癌细胞生长<sup>[2]</sup>。Northern 印迹检测 RAR mRNA 表达水平的结果表明,无论在高浓度 (10%) 或低浓度 (1%) 血清中,H292 和 H460 细胞均不表达 RAR;然而,当血清浓度为 1% 时,ATRA 可以诱导 RAR 表达,而当血清浓度为 10% 时,ATRA 则不能诱导 RAR 表达 (Fig. 2)。

### 2.3 血清对 RAR 启动子转录活性的影响

ATRA 通过其受体介导可以调节视黄酸应答元件 (如 RAR 启动子、RARE) 的转录活性,由此调控靶基因 (如 RAR 自身) 的转录和表达<sup>[1-2]</sup>。将报告基因 RAR 启动子瞬时转染到 H292 和 H460 细胞中表达,通过 CAT 活性测定 RAR 启动子的转录活性表明,在 10% 血清中,ATRA 几乎不能诱导 RAR 启动子的转录活性,而在 1% 血清中,ATRA 可以诱导 RAR 启动子的转录活性 (Fig. 3)。



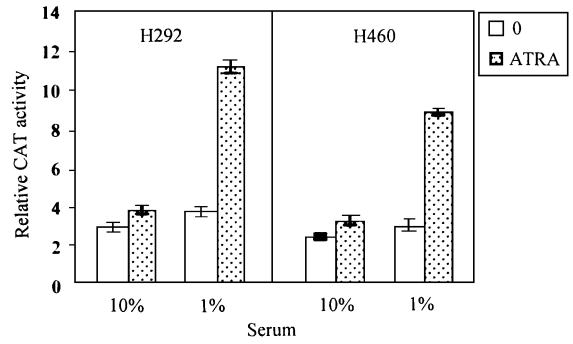
**Fig. 1** Effect of various concentrations of serum indicated on growth inhibition of lung cancer cells by ATRA (mol/L). The mean of cell number in three independent experiments is shown ( $\bar{x} \pm s$ )



**Fig. 2** Expression of RAR induced by ATRA (10<sup>-6</sup> mol/L) at various concentrations of serum

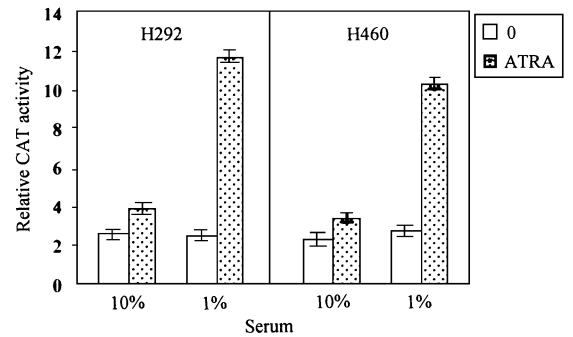
**2.4 血清对 RARE 转录活性的影响**

RARE( retinoic acid response element) 存在于 RAR 启动子中,是具有较强作用的视黄酸应答元件之一<sup>[1-2]</sup>.当 RARE 报告基因瞬时转染到 H292 和 H460 细胞中表达时,所测的 RARE 转录活性的结果(CAT activity)与 RAR 启动子的转录结果相符(Fig. 4),不同之处仅在于它们之间相对的转录活性,即 RARE 的倍数诱导率(fold induction),ATRA

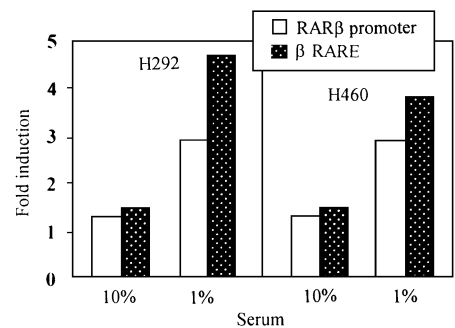


**Fig. 3** Activation of transcriptional activity of RAR promoter by ATRA (10<sup>-6</sup> mol/L) at various concentrations of serum. Data shown represent the mean of duplicate experiment ( $\bar{x} \pm s$ )

诱导报告基因的转录活性( )/报告基因的基础转录活性( )高于 RAR 启动子的倍数诱导率(Fig. 5),提示 RARE 序列可能是视黄酸受体直接结合和作用的位点.



**Fig. 4** Activation of transcriptional activity of RARE by ATRA (10<sup>-6</sup> mol/L) at various concentrations of serum. Data shown represent the mean of duplicate experiment ( $\bar{x} \pm s$ )



**Fig. 5** Relative fold induction in transcriptional activities of RAR promoter and RARE

**2.5 血清对 Nur77 mRNA 和蛋白表达水平的影响**  
Nur77 是一种立即早期基因,当生长因子刺激

细胞时,Nur77 就大量表达,而 Nur77 的表达与肺癌细胞的抗 ATRA 活性密切相关<sup>[1-2]</sup>. Northern 印迹结果显示,当 H292 和 H460 细胞分别培养在 1% 和 10% 血清的培养液中,Nur77 mRNA 的表达水平明显不同,前者(1%)的表达水平明显低于后者(10%)的表达水平.但是,ATRA 不能提高或降低细胞中 nur77 mRNA 的表达水平(Fig. 6). Western 印迹结果则表明,在 1% 血清中检测不到 Nur77 蛋白的表达,而在 10% 血清中 Nur77 高水平表达.同样,ATRA 不能改变细胞中 Nur77 蛋白的表达水平(Fig. 7).

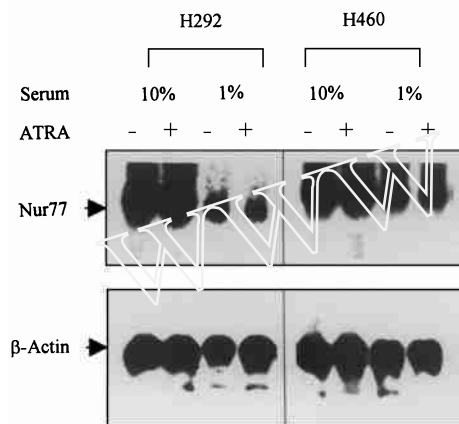


Fig. 6 Expression level of Nur77 mRNA in lung cancer cells detected by Northern blot

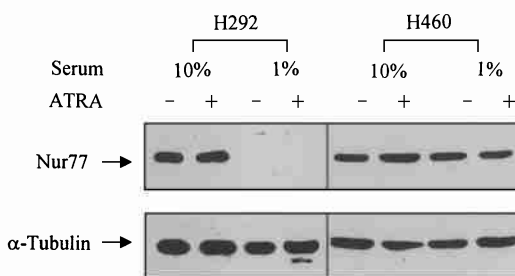


Fig. 7 Expression level of Nur77 protein in lung cancer cells detected by Western blot

## 2.6 血清、BSA 和 EGF 对 Nur77 mRNA 的诱导作用

为了进一步分析 Nur77 的诱导与血清中各种成分,如牛血清白蛋白和表皮生长因子等的相关性,在无血清条件下用 EGF(表皮生长因子)、BSA(牛血清白蛋白)分别处理细胞,并以 10% 血清作为阳性对照,以观察 Nur77 mRNA 表达水平的变化.结果如

Fig. 8 所示,肺癌细胞在无血清培养液中生长时不表达 Nur77,EGF 同 10% 血清一样都可以诱导 Nur77 表达,而 BSA 则不能诱导 Nur77 表达.由此提示,血清对 Nur77 的诱导可能是血清中的生长因子而不是牛血清白蛋白诱导的结果.

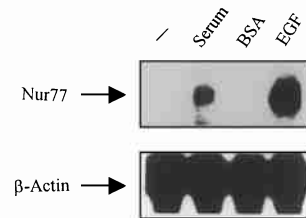


Fig. 8 Effects of serum(10%),EGF(200 ng/ml) and BSA(2 mg/ml) on expression of Nur77 mRNA shown by Northern blot

## 3 讨论

为了探讨血清的作用,本文分析了不同浓度的血清对全反式视黄酸(ATRA)抑制肺癌细胞生长的影响.随着血清浓度的下降,ATRA 抑制肺癌细胞生长的能力提高(Fig. 1),表明血清中的某些因子可能拮抗 ATRA 的作用,从而减弱 ATRA 对肺癌细胞生长的抑制作用. ATRA 的作用由其受体 RARs 和 RXRs 介导,我们先期研究已表明,ATRA 对肺癌细胞生长抑制与其诱导 RAR 表达密切相关<sup>[2]</sup>,RAR 不表达可能导致细胞的恶性转化与增殖<sup>[1,8]</sup>. 本文实验显示,在高浓度血清中,ATRA 不能诱导 RAR 表达,而在低浓度血清中,ATRA 可以诱导 RAR 表达(Fig. 2),这一结果与 ATRA 在不同浓度的血清中抑制肺癌细胞生长的结果(Fig. 1)相吻合,不仅佐证了 RAR 表达是介导 ATRA 抑制肺癌细胞生长的必要条件之一,而且证实了血清中的某些因子可以通过抑制 RAR 的表达而拮抗 ATRA 的作用.

相关研究表明,在无血清条件下,13-*cis*RA 可以抑制人小细胞肺癌细胞的生长,但是当加入血清时,13-*cis*RA 不能抑制这些癌细胞的生长<sup>[6]</sup>. 蛋白激酶 C 的激活因子佛波酯(TPA)在无血清培养液中可以激活肺癌细胞生长,但 1% 血清则拮抗 TPA 的激活作用<sup>[9]</sup>. 可见血清具有正向和反向调节细胞生长的作用,至于血清中何种因子在拮抗 ATRA 抑制肺癌细胞生长方面起着主导作用至今仍不清楚. Haisu Wan 等人认为是血清中的某些生长因子而不是牛血清白蛋白起关键作用<sup>[9]</sup>. 血清中的生长因子可以诱导细胞中的一些立即早期基因(immediate-early gene)表达<sup>[10]</sup>. Nur77 是一种立即早期基因,当血清生长因

子和神经生长因子等诱导细胞时,Nur77 就大量表达,由此刺激细胞生长<sup>[11]</sup>. Nur77 作为转录因子,在介导细胞对外界刺激信号的应答过程中,通过与特异序列位点上的 DNA 相互作用来发挥其功能作用<sup>[12]</sup>. 结合本文结果,我们分析认为,在低浓度血清中,Nur77 蛋白不表达或者 Nur77 mRNA 低水平表达时(Fig. 6,7), ATRA 就可以直接通过调节 RARE 乃至 RAR 启动子的转录活性(Fig. 3,4)来诱导 RAR 表达(Fig. 2),从而抑制肺癌细胞的生长(Fig. 1). 而在高浓度血清中,细胞受到血清中生长因子刺激后,Nur77 大量表达,此时 ATRA 无法进一步下调 Nur77 mRNA 和蛋白的表达水平(Fig. 6,7);另外,在高浓度血清中,RARE 和 RAR 启动子的转录活性也相对较低,与对照组相比差别不明显(Fig. 3,4,5),从而导致 ATRA 不能诱导肺癌细胞 RAR 的表达(Fig. 2). 因此,在高浓度血清条件下,无论是 Nur77 大量表达还是 RAR 不表达都可能直接影响 ATRA 不能有效地抑制肺癌细胞生长(Fig. 1). 当然,要确定这两种现象的因果关系仍需进一步的实验来证实.

本文结果还提示血清中的生长因子而不是牛血清白蛋白能够上调 Nur77 基因表达(Fig. 8),影响 ATRA 抑制肺癌细胞生长的作用. 但是也有文章指出,在生理状态下,ATRA 会结合到血浆中的血清白蛋白上,而对于培养细胞来说,这种结合限制了 ATRA 的生理作用<sup>[6]</sup>,阻止 ATRA 代谢并导致失活,这是一种从介质到细胞的可调控的释放过程<sup>[13]</sup>. 因此,血清中究竟是生长因子还是牛血清白蛋白起主要作用可能必须根据不同的微环境(如培养细胞或者体内生理状态)、不同的研究对象(如不同的细胞和不同的基因)加以区别.

致谢: 本文所用的探针由张晓坤博士(美国 Burnhamd 研究所)提供,特此感谢.

### 参考文献 (References)

- 1 Wu Qiao (吴乔), Marcia I D, Zheng Y, Peter D H, Agadir A, Long L, Li Y, Liu R, 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
- 2 Wu Qiao (吴乔), Li Y, Liu R, Agadir A, Lee M-O, Liu Y, 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 ~ 1669
- 3 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
- 4 吴乔, 陈正明, 刘苏, 陈玉强, 苏文金. RAR 在胃癌细胞生长调节中的作用. 中国生物化学与分子生物学报 (Wu Qiao, Chen Zheng-ming, Liu Su, Chen Yu-qiang, Su Wen-jin. Effect of retinoic acid receptor in growth regulation of gastric cancer cells. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2000, **16**(6): 689 ~ 693
- 5 吴乔, 张晓坤. 孤儿受体的相互作用对视黄酸应答元件的影响. 中国生物化学与分子生物学报 (Wu Qiao, Zhang Xiao-kun. Interaction of orphan receptors and their effect on retinoic acid receptor elements. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1999, **15**(1): 134 ~ 141
- 6 Avis I, Mathias A, Unsworth EJ, Miller MJ, Cutitta F, Mulshine J L, Jankowlow S B. Analysis of small cell lung cancer cell growth inhibition by 13-*cis* retinoic acid: importance of bioavailability. *Cell Growth Differ*, 1995, **6**: 485 ~ 492
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 Swisshelm K, Rgan K, Lee X, Tsou H C, Beacocks M, Sager R. Down-regulation of retinoic acid receptor in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ*, 1994, **5**: 133 ~ 141
- 9 Wan H S, Dawson M I, Hong W K, Lotan R. Enhancement of Calu-1 human lung carcinoma cell growth in serum-free medium by retinoids: dependence on AP-1 activation, but not on retinoid response element activation. *Oncogene*, 1997, **15**: 2109 ~ 2118
- 10 Lamph W W, Wamsley P, Sassone CP, Verma . Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature*, 1988, **334**: 629 ~ 631
- 11 Hazel T G, Nathans D, Lau L F. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **85**: 8444 ~ 8448
- 12 Woronic J D, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature*, 1994, **367**: 277 ~ 280
- 13 Hodam J R, Creek K E. Uptake and metabolism of <sup>3</sup>H retinoic acid delivered to human foreskin keratinocytes either bound to serum albumin or added directly to the culture medium. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1311**: 102 ~ 110