

视黄酸对胃癌细胞周期的调控*

陈正明 吴 乔** 陈玉强*** 苏文全

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005)

视黄酸 (retinoic acid, RA) 能够抑制许多类型癌细胞的生长, 并已用于临床治疗一些肿瘤。RA 的作用主要由其受体 RARs (retinoic acid receptors) 和 RXRs (retinoid X receptors) 介导^[1], 它们属于类固醇/甲状腺激素受体超家族成员, 由 α 、 β 和 γ 三种不同基因编码^[2]。这些受体的功能作用不同, 如果表达异常或不表达将影响 RA 对肿瘤形成和发展的抑制作用。

视黄酸可以通过多种途径抑制癌细胞生长, 包括诱导分化、细胞凋亡和细胞周期调控等^[3,4]。我国学者率先以全反式视黄酸 (ATRA) 作为诱导剂, 成功地诱导急性早幼粒白血病细胞向粒细胞方向分化^[5]。ATRA 在体外诱导人肝癌细胞后, 还可以使癌细胞恶性表型向正常方向分化^[6]。但是, ATRA 抑制胃癌细胞生长的分子机理在国内外报道甚少。本文以 ATRA 诱导胃癌细胞, 在分析其抑制胃癌细胞生长与细胞周期调控的相关性和分子机理的基础上, 进一步探讨 RARs 介导的作用, 为将视黄酸用于治疗胃癌提供依据。

材 料 和 方 法

一、细胞培养和药物处理

四株胃癌细胞均用 RPMI-1640 培养液培养。细胞接种 24h 后加入全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 处理。MGC80-3 细胞 (简称 MGC) 由厦门大学抗癌中心提供, BGC-823、SGC-7901 和 MKN-45 (分别简称 BGC、SGC 和 MKN) 细胞购于上海细胞所细胞库。

二、细胞生长速率测定^[7]

细胞用不同浓度的 ATRA 连续处理 9 天后, 以 MTT (3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma 产品) 染色细胞, 在酶标仪上测定细胞反应液的 OD 值 (570nm)。

三、细胞周期分布测定^[8]

细胞经 70% 乙醇固定后, 加入无 DNase 的 RNase (0. 1mg/ml) 处理细胞, 碘化丙啶 (Sigma 产品) 染色细胞, 以流式细胞仪分析细胞在各周期的分布。

四、³H-TdR 标记和测定^[9]

细胞用 ³H-TdR (100 μ Ci/ml, 购于北京亚辉生物工程公司) 标记 6h 后, 将细胞收集在玻璃纤维滤膜上, 通过液闪计数器测定 CPM 值。

五、细胞凋亡测定^[7]

3. 7% 多聚甲醛固定细胞后, 用荧光染料 DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindole, 0. 1 μ g/ml, Sigma 产品) 染色细胞, 观察凋亡细胞, 随机统计 1000 个细胞中的凋亡率。

六、RNA 提取和 Northern blot^[10]

硫氰酸胍-氯化铯超速离心法提取总 RNA。以 α -³²P-dATP 和 α -³²P-dCTP (购于北京亚辉生物工程公司) 标记 DNA 探针。RAR α 和 RAR β 探针由张晓坤博士 (美国加州 Burnham 研究所) 惠赠, 其余探针购于北京天象人公司。

七、蛋白提取和 Western blot^[10]

常规方法制备细胞裂解液, 在 SDS-PAGE 上电

本文 1998 年 8 月 20 日收到。1999 年 1 月 8 日接受。

* 国家自然科学基金 (39880015) 和福建省自然科学基金 (C96002) 资助。

** 联系人。

*** 现工作单位: 中国人民解放军第 174 医院。

泳,蛋白转膜后与抗体(Santa Cruz 产品)温育,以ECL试剂盒(Amersham 产品)显示蛋白。

结 果

一、ATRA 对胃癌细胞生长的抑制

四株胃癌细胞分别用不同浓度的 ATRA 处理 9 天后, MGC、BGC 和 SGC 细胞生长受到显著抑制(图 1), 且与 ATRA 浓度和处理时间(结果未显示)正相关, 在最高浓度 10^{-6} mol/L ATRA 作用下, 未见细胞毒现象; 但 ATRA 对 MKN 细胞生长没有抑制作用。结果表明, 不同的胃癌细胞株对 ATRA 敏感性不同, MGC、BGC 和 SGC 为 RA 敏感细胞, MKN 为 RA 抗性细胞。

二、ATRA 对胃癌细胞周期分布的影响

流式细胞术分析表明, ATRA 处理 RA 敏感细胞后, G_0/G_1 期细胞显著增加, S 期细胞

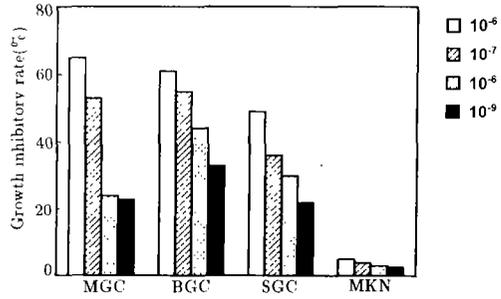


图 1 ATRA 对胃癌细胞生长抑制的影响(视黄酸浓度为 10^{-9} mol/L)

Fig. 1 Effect of ATRA on growth inhibition of gastric cancer cells

显著减少; 但 ATRA 处理前后 RA 抗性细胞的 G_0/G_1 期和 S 期细胞数量基本不变(表 1)。结果表明, ATRA 能够诱导 RA 敏感细胞滞留在 G_0/G_1 期。

表 1 ATRA 对胃癌细胞周期分布的影响(%)

Table 1 Effect of ATRA on cell cycle distribution in gastric cancer cell lines(%)

ATRA:	MGC			BGC			SGC			MKN		
	0	3天	6天	0	3天	6天	0	3天	6天	0	3天	6天
G_0/G_1	46	68	65	45	78	77	57	63	74	47	49	53
S	44	22	26	45	15	18	32	30	23	39	34	38
G_2/M	10	10	9	10	7	5	11	7	3	14	17	11
P 值	<0.01		<0.05	<0.01		<0.01	<0.05		<0.05	>0.05		

3H -TdR 标记细胞可以反映细胞的 DNA 合成速率。ATRA 显著抑制 RA 敏感细胞 3H -TdR 的掺入, 但对 RA 抗性细胞 3H -TdR 的掺入影响很小(表 2), 结果与细胞周期分布的变化一致。

表 2 ATRA 对胃癌细胞 3H -TdR 掺入的抑制(%)

Table 2 Inhibition of 3H -TdR incorporation by ATRA in gastric cancer cell lines(%)

ATRA 处理	MGC	BGC	SGC	MKN
3天	31.12**	21.53**	12.86**	0.50
6天	52.33**	41.43**	29.78**	0.96

** : $P < 0.01$ 。

三、ATRA 对胃癌细胞凋亡的诱导

表 3 显示 ATRA 诱导四株胃癌细胞凋亡

率很低, 无统计学意义。电泳实验也未显示凋亡特有的 DNA Ladder (结果未显示), 表明 ATRA 不能诱导胃癌细胞凋亡。Western blot 检测 bcl-2 和 bax 蛋白表明, bcl-2 和 bax 在 RA 敏感细胞中表达, 且与 ATRA 调节无关; 在 RA 抗性细胞中 bcl-2 蛋白表达, bax 蛋白不表达(图 2)。

表 3 ATRA 对胃癌细胞凋亡的诱导(%)

Table 3 Induction of apoptosis by ATRA in gastric cancer cell lines

	MGC	BGC	SGC	MKN
3天	3.4	7.5	3.5	2.8
6天	7.3	8.4	6.5	4.2

注: P 值均大于 0.05。

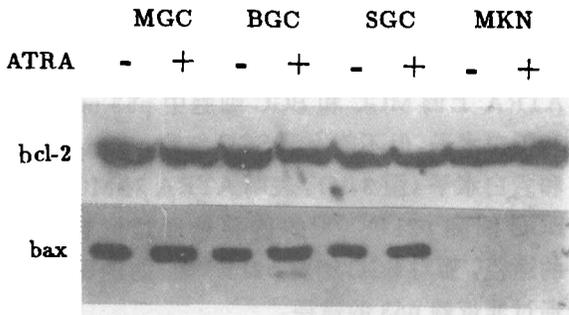


图 2 ATRA 对 bcl-2 和 bax 蛋白的调节作用

Fig. 2 Regulation of ATRA on bcl-2 and bax proteins

四、ATRA 对细胞生长和周期相关基因和蛋白的调节

以 Northern blot 和 Western blot 方法检测与细胞生长和周期调控相关基因和蛋白水平的变化, 包括 c-myc、p53、cyclinD₁、CDK₄、p21^{WAF1/CIP1} 和 Rb。结果表明 ATRA 能够下调 c-myc mRNA 和蛋白水平, 上调 RA 敏感细胞的 p53 mRNA 和蛋白 (SGC 除外) 以及 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白水平, 但不能诱导 RA 抗性细胞的 p53 和 p21^{WAF1/CIP1} 表达; ATRA 不能调节 cyclinD₁ 和 CDK₄ mRNA 和蛋白水平, 只能轻微调节 MKN 细胞的 CDK₄ mRNA 和蛋白水平。ATRA 诱导后 RA 敏感细胞 Rb 蛋白发生磷酸化, 磷酸化的 Rb (ppRb) 水平下降, 去磷酸化的 Rb (pRb) 积累, 而 RA 抗性细胞中 Rb 蛋白不表达 (图 3, 4)。

五、ATRA 对视黄酸受体表达的调节

Northern blot 结果显示, ATRA 能够上调 RA 敏感细胞 RAR α mRNA 水平, 但不能调节 RA 抗性细胞的 RAR α 水平; 在 RA 敏感细胞中检测到 RAR β mRNA, 但与 ATRA 调节无关, 而在 RA 抗性细胞中 RAR β 不表达 (图 5); RXR α mRNA 表达水平在所有细胞中一致 (结果未显示)。

讨 论

在胃癌细胞中, ATRA 能够阻止 RA 敏感

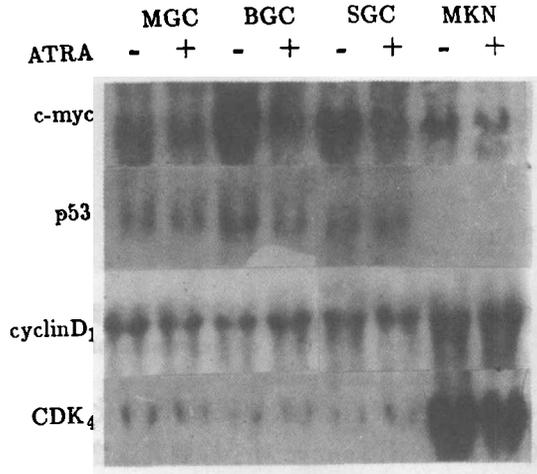


图 3 Northern blot 示相关基因的表达水平

Fig. 3 Expression of related genes by Northern blot

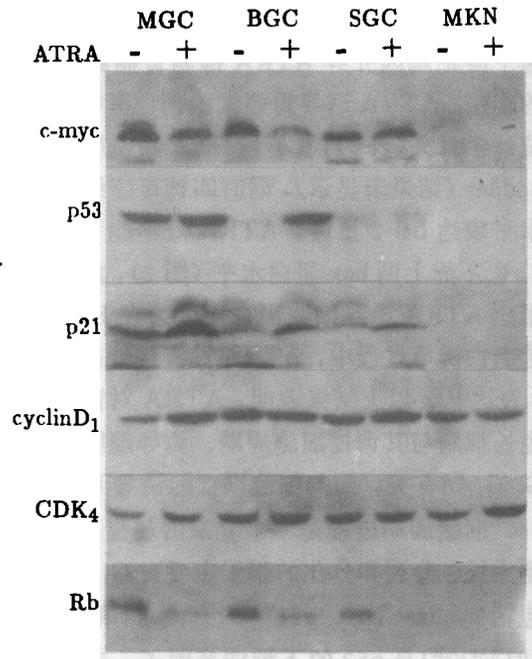


图 4 Western blot 示相关蛋白的水平

Fig. 4 Expression of related proteins by Western blot

细胞的 DNA 合成, 诱导细胞滞留在 G₀/G₁ 期, 从而抑制细胞生长。但 ATRA 不能阻止 RA 抗性细胞的 DNA 合成, 不能诱导细胞滞留在 G₀/G₁ 期 (表 1, 2, 图 1), 因而不能抑制细胞生长。

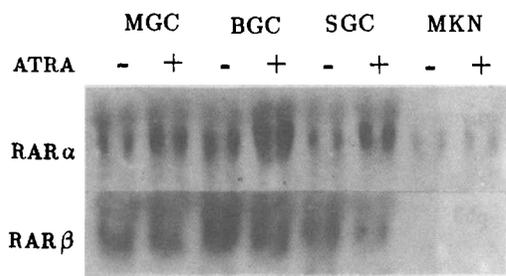


图 5 ATRA 对 RAR α 、RAR β 基因表达的影响

Fig. 5 Effect of ATRA on expression of RAR α and RAR β genes

c-myc 与加强细胞增殖、抑制细胞分化密切相关, ATRA 下调 c-myc 对于抑制乳腺癌细胞生长是必需的^[11], 但在一些肝癌细胞中, ATRA 上调 c-myc 水平与其诱导细胞凋亡密切相关^[12], 由此提示 ATRA 对不同细胞的 c-myc 有不同的调控作用。我们发现 ATRA 下调胃癌细胞 c-myc 水平(图 3, 4), 表明 c-myc 可能作为下游靶基因介导 ATRA 抑制胃癌细胞生长的作用。ATRA 诱导胃癌细胞凋亡率很低, 无统计学意义(表 3), 看不到 DNA 断裂后形成的 Ladder (结果未显示), 同时四株胃癌细胞都高水平表达 bcl-2 蛋白, ATRA 既不能下调 bcl-2, 也不能上调 bax 蛋白水平(图 2), 由此可能阻止 ATRA 诱导细胞凋亡, 因为在 HL-60 细胞凋亡诱导过程中, ATRA 选择性地抑制 bcl-2 表达^[13]。以上结果表明, ATRA 对胃癌细胞生长抑制与其调控细胞周期、诱导细胞滞留在 G₀/G₁ 期有关, 而与细胞凋亡的诱导无关。

细胞周期进程是一个复杂的过程, 决定细胞生长、分裂和分化的因子主要在 G₁ 期启动, 包括 cyclin-CDK、p21^{WAF1/CIP1}、p53 和 Rb 等。p21^{WAF1/CIP1} 是 p53 的下游调节因子, 通过抑制 cyclin-CDK 的作用而介导细胞生长抑制^[14], p21^{WAF1/CIP1} 还是 RA 应答靶基因, 在肝癌细胞、乳腺癌细胞和肺癌细胞中可以被 ATRA 所诱导^[15]。在胃癌细胞中, ATRA 上调 RA 敏感细胞 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白水平, 但不能诱导 RA 抗性细胞 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达(图 4), 表明 ATRA

对 p21^{WAF1/CIP1} 的诱导可能与其诱导胃癌细胞滞留在 G₀/G₁ 期有关。p21^{WAF1/CIP1} 的诱导可以通过依赖 p53 和非依赖 p53 的两条不同途径^[14], ATRA 上调 MGC 和 BGC 细胞中 p53 mRNA 和蛋白水平, 但不能上调 SGC 细胞 p53 mRNA 和蛋白水平(图 3, 4), 表明 ATRA 对 MGC 和 BGC 细胞 p21^{WAF1/CIP1} 的诱导是通过依赖 p53 的途径, 而对 SGC 细胞 p21^{WAF1/CIP1} 的诱导则是通过非依赖 p53 的途径。

TGF- β 1 诱导 p21^{WAF1/CIP1} 表达后, 能够抑制 cyclin-CDK 活性和降低 Rb 的磷酸化^[14]。我们注意到 ATRA 能够上调胃癌细胞的 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白水平, 但不能调节 cyclinD₁ 和 CDK₄ 的 mRNA 和蛋白水平(图 3, 4), 提示 ATRA 可能调节 cyclin-CDK 的活性。P21^{WAF1/CIP1} 可以抑制 CDKs 活性, 使 cyclin-CDKs 不能磷酸化 Rb, 阻止 E2F 的释放和 DNA 合成相关基因的表达, 使细胞滞留在 G₀/G₁ 期; 反之, 当 cyclin-CDK 被激活, 就会使一些“靶子”磷酸化, 包括 Rb 蛋白^[16]。因此, 在 RA 敏感细胞中, ATRA 下调磷酸化的 Rb 水平(图 4) 不仅映证了 ATRA 对 cyclinD₁ 和 CDK₄ 活性抑制的可能性, 同时也表明 RA 通过依赖 Rb 的途径调节细胞周期。

视黄酸的作用主要由其受体 RARs 和 RXRs 介导^[1]。在肺癌和乳腺癌细胞中 RAR β 是 RA 作用的靶基因, RAR β 的表达与 RA 介导的细胞生长抑制直接相关^[17, 18]。在胃癌细胞中, ATRA 上调 RA 敏感细胞的 RAR α mRNA 水平, 但不能调节 RA 抗性细胞的 RAR α mRNA 水平(图 5), 表明 RAR α 可能是 ATRA 作用胃癌细胞的上游靶基因, 并且足够量的 RAR α 对介导 ATRA 的抗胃癌细胞生长作用是必需的。另外, 在 RA 敏感细胞中 RAR β mRNA 表达, 但 ATRA 不能调节其表达水平, 表明 RAR β 不是 ATRA 作用的直接靶基因, 这与乳腺癌细胞^[18]、肺癌细胞^[17]中 RAR β 的作用机制不同。而 MKN 细胞不表达 RAR β 基因, 是否与 RA 抗性也有关系仍不清楚, 有待进一步

研究。

摘 要

视黄酸 (RA) 能够抑制许多类型癌细胞生长、诱导细胞凋亡和调节细胞周期。本文研究了全反式视黄酸 (ATRA) 对人胃癌细胞的作用机理。结果表明, ATRA 通过诱导细胞滞留在 G_0/G_1 期而显著抑制胃癌细胞生长, 但 ATRA 不能诱导胃癌细胞凋亡; ATRA 调控细胞周期与 c-myc、磷酸化 Rb 水平的下调和 p21^{WAF1/CIP1}、p53 水平的上调有关, 而 cyclinD₁ 和 CDK₄ 水平没有明显变化。在 RA 抗性细胞中, ATRA 不能调节这些基因表达。结果证实, ATRA 对胃癌细胞生长抑制与其诱导细胞滞留在 G_0/G_1 期有关, 而与细胞凋亡的诱导无关, 许多重要的、与周期相关的分子, 包括 c-myc、p21^{WAF1/CIP1}、p53 和 Rb 等参与细胞周期的调控。

关键词: 全反式视黄酸 胃癌细胞 细胞周期
生长抑制

参 考 文 献

- [1] Zhang, X-K, B. Hoffmann, P. Tran, G. Graupner and M. Pfahl, 1992, Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* (London), **355**: 441-446.
- [2] Evans, R. M., 1988, The steroid and thyroid hormone receptor family. *Science*, **240**: 889-895.
- [3] Lui, Y., M. O. Lee, H. G. Wang, Y. Li, Y. Hashimoto, M. Klaus, J. Reed and X. K. Zhang, 1996, RAR β mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.*, **16**: 1138-1149.
- [4] Nicholas, R. S. W., B. Sarcevic, A. M. Elizabeth and L. S. Robert, 1996, Differential effects of retinoids and anti-estrogens on cell cycle progression and cell cycle regulatory genes in human breast cancer cells. *Cell Growth & Differ.*, **7**: 65-74.
- [5] Huang, M-E, Y-C Ye, S-R Chen, 1988, Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **72**: 567-572.
- [6] 周岚、杨小平、陈惠黎, 1996, 维甲酸对亚硝胺诱发大鼠肝癌的阻断作用. *生物化学杂志*, **12**: 104-108.
- [7] 吴乔、郑耘、张晓坤, 1998, 全反式视黄酸对癌细胞凋亡的诱导. *癌症*, **17**: 167-170.
- [8] 谭立军、汤雪明、沈忠英、许锦阶, 1998, 二甲基亚砷诱导人食管癌细胞分化的实验研究. *实验生物学报*, **31**: 353-359.
- [9] Zhong B-S, D-L Yin, X-H Ren, L-Z Jiang, Z-J Wu, Q-R Gao and G Pei., 1997, Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer*, **19**: 1944-1950.
- [10] 萨姆布鲁克, J., E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯, 1993, 分子克隆实验指南, 第一版, 北京, 科学出版社, 352, 888.
- [11] Seewaldt, V. L., B. S. Johnson, M. B. Parker, S. J. Colling and K. Swisshelm, 1995, Expression of retinoic acid receptor β mediated retinoid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth & Differ.*, **6**: 1077-1088.
- [12] Richard, A. S., F. Barbara, I. Augustine, G. Chriatel, A. L. Dan and E. E. Motawa, 1994, Induction of p21 (WAF1/CIP1) during differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 2352-2360.
- [13] Park, J. R., K. Robertson, D. D. Hickstein, S. Tsai, D. M. Hockenbery and S. J. Collins, 1994, Dysregulated bcl-2 expression inhibits apoptosis but not differentiation of retinoic acid-induced HL-60 granulocytes. *Blood*, **84**: 440-445.
- [14] Zhang, W., G. Luigi, D. Craig, McClain, M. Anne, Gambel, C. Ying, T. Salvatore, B. D. Albert and W. E. Mercer, 1995, p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Research*, **55**: 668-674.
- [15] Lui, M., L. Antonio and P. F. Leonard, 1996, Transcriptional activation of the human p21^{waf1/cip1} gene by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.*, **271**: 31723-31728.
- [16] Akagi, M., W. Yasui, Y. Akama, H. Yokozaki, H. Tahara, K. Haruma, G. Ka-

jiyama and E. Tahara, 1996, Inhibition of cell growth by transforming growth factor β is associated with p53-independent induction of p21 in gastric carcinoma cells. *Jap. J. Cancer Research*, **87**: 377–384.

[17] Li, Y., I. D. Marcia, A. Anissa, M. O. Lee, J. Long, D. H. Peter and X. K. Zhang, 1998, Regulation of RAR β expression by RAR- and RXR-selective retinoids in human lung cancer cell lines; effect on

growth inhibition and apoptosis induction. *Int. J. Cancer*, **75**: 88–95.

[18] Wu, Qiao, I. D. Marcia, Z. Yun, D. H. Peter, A. Anissa, J. Long, L. Yin, L. Ru, B. Z. Lin and X. K. Zhang, 1997, Inhibition of trans-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids. *Mol. Cell Biol.*, **17**: 6598–6608.

REGULATION OF CELL CYCLE BY RETINOIC ACID IN GASTRIC CANCER CELLS

CHEN Zheng Ming WU Qiao CHEN Yu Qiang SU Wen Jin

(The State Lab. for Tumor Cell Engineering, Xiamen Univ., Xiamen 361005)

ABSTRACT

Retinoic acid can induce growth inhibition and apoptosis, and regulate cell cycle in many types of cancer cell lines. In this study, we investigated the role of all-*trans* retinoic acid (ATRA) and its mechanism of action in human gastric cancer cell lines. Our results demonstrated that ATRA effectively inhibited growth in three of four gastric cancer cell lines by induction of G₀/G₁ arrest, and did not induce apoptosis in four gastric cancer cell lines. In RA-sensitive cell lines, ATRA-induced G₀/G₁ arrest is associated with down regulation of c-myc and hyperphos-

phorylated Rb expression, and up regulation of p21^{WAF1/CIP1} and p53 expression. There were no significant changes in cyclin D₁ or CDK₄ expression induced by ATRA. Furthermore, expression of these genes were not regulated by ATRA in ATRA-resistant gastric cancer cell line. These results indicate that growth inhibition, rather than apoptosis, is correlated with G₀/G₁ arrest of these cell lines, more important molecules related cell cycle, including c-myc, p21^{WAF1/CIP1}, p53 and Rb, are involved in regulation of cell cycle in gastric cancer cells.

Key words: All-*trans* retinoic acid. Gastric cancer cell lines. Cell cycle. Growth inhibition