

# 视黄酸对胃癌细胞生长和 p53 及 e-myc 基因表达的影响

陈正明<sup>1</sup> 吴 乔<sup>1△</sup> 陈玉强<sup>2</sup> 苏文金<sup>1</sup>

**摘要** 目的: 探讨视黄酸对胃癌细胞生长和基因表达的影响。方法: 以 MTT 法测定细胞生长, 软琼脂集落形成实验测定癌细胞恶性程度, Northern blot 测定 p53 及 e-myc 基因表达水平。结果:  $10^{-6}$  mol/L 全反式视黄酸(ATRA) 能够有效地抑制 MGc80-3 和 BGG-823 细胞生长, 但不能抑制 MKN45 细胞生长; ATRA 还能够降低 3 株胃癌细胞形成集落的能力。MGc80-3 和 BGG-823 细胞经 ATRA 诱导后, p53 基因的表达水平提高, e-myc 基因的表达水平下降, 但 MKN45 细胞中 p53 基因和 e-myc 基因表达与 ATRA 诱导无关。视黄酸受体 RAR $\alpha$  基因在 3 株细胞中呈低水平表达, 经 ATRA 诱导后, 在 MGc80-3 和 BGG-823 细胞中表达水平提高, 但在 MKN45 细胞中表达水平不变。结论: ATRA 诱导 RAR $\alpha$  高水平表达可能与视黄酸抑制胃癌细胞生长和调节 p53 和 e-myc 基因表达有关。

**关键词:** 全反式视黄酸; 胃癌细胞; 基因表达; 生长抑制

中图分类号: Q753; Q228

## The effect of retinoic acid on growth inhibition and p53、e-myc expression in gastric carcinoma cells

Chen Zhengming Wu Qiao Chen Yuqiang, et al

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

**Abstract Objective:** To evaluate the effect of retinoic acid on growth inhibition and gene expression in gastric carcinoma cell lines. **Methods:** Growth inhibition, cell malignant degree and gene expression were studied using MTT assay, colony formation in soft agar and Northern blot methods. **Results:** All-trans retinoic acid (ATRA) effectively inhibited the growth of MGc80-3 and BGG-823 gastric carcinoma cells, whereas it had little effect on MKN45 gastric carcinoma cell. ATRA also decreased the colony formation ability of three gastric carcinoma cell lines. In MGc80-3 and BGG-823 cells, p53 expression level (wild type) was increased, and e-myc expression level was decreased after induced by ATRA. In contrast, in MKN45 cell, p53 expression and e-myc expression level was not affected by ATRA. Retinoic acid receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) expression level was low in three gastric carcinoma cell lines, it was increased obviously in MGc80-3 and BGG-823 cells, but not in MKN45 cell after induction of ATRA. **Conclusion:** The high level of RAR  $\alpha$  expression induced by ATRA may correlate with growth inhibition and regulation of p53 and e-myc expression by ATRA in gastric carcinoma cell lines.

**Key Words:** All-trans retinoic acid; Gastric carcinoma cell; Gene expression; Growth inhibition

视黄酸(retinoic acid) 对于细胞生长和分化具有重要作用, 是一种有效的防癌、治癌药物, 能够抑制

许多类型癌细胞的恶性生长。视黄酸的作用主要由其受体——RAR(retinoic acid receptor) 和 RXR (retinoid X receptor) 介导, 由于编码基因的不同, RAR 和 RXR 又可分为许多亚型, 如 RAR  $\alpha$ <sup>[1]</sup>。不同的受体在应答视黄酸的过程中行使不同的功能, 由此调节不同靶基因的转录和表达<sup>[2]</sup>, 因此, 当某个受体表达异常时, 视黄酸则不能有效抑制癌细胞的生

国家教委留学回国人员科研启动基金和福建省自然科学基金(C96002)资助

作者单位: 1. 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, (福建, 361005) 2. 中国人民解放军第 174 医院

第一作者: 男, 1969 年 2 月生, 博士研究生

$\Delta$  通讯作者

长<sup>[1,3,4]</sup>。视黄酸抑制胃癌细胞的作用机理仍未阐明, 本文就全反式视黄酸 (ATRA) 对胃癌细胞的生长以及视黄酸受体与癌基因的关系进行研究, 为阐明其作用机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养和全反式视黄酸处理

胃癌 MGC803 细胞 (本校抗癌中心提供)、BGG-823 细胞和 MKN45 细胞 (上海细胞所细胞库提供) 均用加 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。细胞接种 24 h 后, 换含有  $10^{-6}$  mol/L 全反式视黄酸 (ATRA) 的培养液处理细胞, 供实验用。

### 1.2 探针和试剂

DNA 探针: p53 (野生型) 和 e-myc 购于北京天象人公司, RAR  $\alpha$  由张晓坤博士 (美国, 加州 The Burnham Institute) 惠赠。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购于北京亚辉生物工程公司, 随机引物标记试剂盒为 Boehringer Mannheim Biochemica 公司产品, MTT 试剂盒为 Promega 产品, ATRA 为 Sigma 产品。

### 1.3 细胞生长测定 (MTT 法)

参照文献 [4] 方法进行。

### 1.4 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 含 0.5% 琼脂的培养液作为垫层。在含 0.3% 琼脂的培养液中加入细胞, 使细胞终浓度为 10 万/ml (实验组则在培养液中同时加入 ATRA), 混匀后取 1 ml 铺展在垫层上面, 每组 3 个重复, 凝固后于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 两周后观察, 计算集落数 (直径大于 80  $\mu$ m 的集落为阳性, 随机计算 20 个视野)。结果行 *t* 检验。

### 1.5 RNA 提取和 Northern blot

参照文献<sup>[5]</sup>方法进行, 以 28S 和 18S 作为总 RNA 的定量参照。

## 2 结果

### 2.1 全反式视黄酸对胃癌细胞生长的影响

MTT 测定结果 (图 1) 表明, ATRA 对不同的胃癌细胞生长的抑制作用不同,  $10^{-6}$  mol/L ATRA 能够有效地抑制 MGC803 和 BGG-823 细胞的恶性生长, 生长抑制率高达 53.2% 和 61.03%, 但不能抑制 MKN45 细胞恶性生长, 生长抑制率仅为 3.87%, 表明不同的胃癌细胞株对 ATRA 的敏感性不同。

### 2.2 全反式视黄酸对胃癌细胞集落形成能力的影响

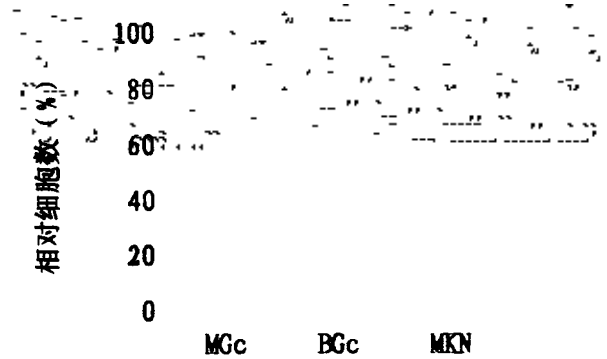


图 1 ATRA 对胃癌细胞的生长抑制作用

0 对照组; 1- 5 实验组, ATRA 浓度依次为  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  (mol/L)

统计结果如附表所示。观察集落形态, 3 株胃癌细胞均能在软琼脂培养基上形成较大的集落, 集落数较多, 当加入 ATRA 后, 形成的集落较小、较少, 表明 ATRA 能够降低胃癌细胞软琼脂集落形成的能力。

附表 ATRA 对胃癌细胞软琼脂集落形成的影响

细胞株	集落形成数 ( $\bar{x} \pm s$ )		抑制率 (%)
	对照	ATRA ( $10^{-6}$ mol/L)	
MGC	10.2 $\pm$ 0.17	6.24 $\pm$ 0.22	38.8
BGC	8.68 $\pm$ 0.50	5.62 $\pm$ 0.37	35.3
MKN	12.75 $\pm$ 0.53	9.83 $\pm$ 0.39	22.9

$P < 0.01$

### 2.3 全反式视黄酸对 RAR $\alpha$ 、e-myc 和 p53 基因表达的影响

Northern blot 结果显示 (图 2), 在 3 株胃癌细胞中, e-myc 基因均有表达, 且表达水平较高, 经 ATRA 诱导后, 在 MGC803 和 BGG-823 细胞中, e-myc 基因表达水平下降, 但 MKN45 细胞中的 e-myc 基因表达水平基本不变。在 3 株细胞中, p53 基因基本不表达, 经 ATRA 诱导后, 在 MGC803 和 BGG-823 细胞中, p53 基因的表达水平提高, 而 MKN45 细胞在 ATRA 诱导前后均基本不表达 p53 基因。在 3 株胃癌细胞中, RAR  $\alpha$  基因表达水平很低, 经 ATRA 诱导后, 在 MGC803 和 BGG-823 细胞中, RAR  $\alpha$  基因表达水平提高, 但在 MKN45 细胞中, RAR  $\alpha$  基因表达水平与 ATRA 的诱导无关。

## 3 讨论

实验表明, ATRA 能够有效抑制 MGC803 和 BGG-823 细胞生长, 但不能抑制 MKN45 细胞生长 (图 1), ATRA 也能够有效抑制 3 株胃癌细胞形成集

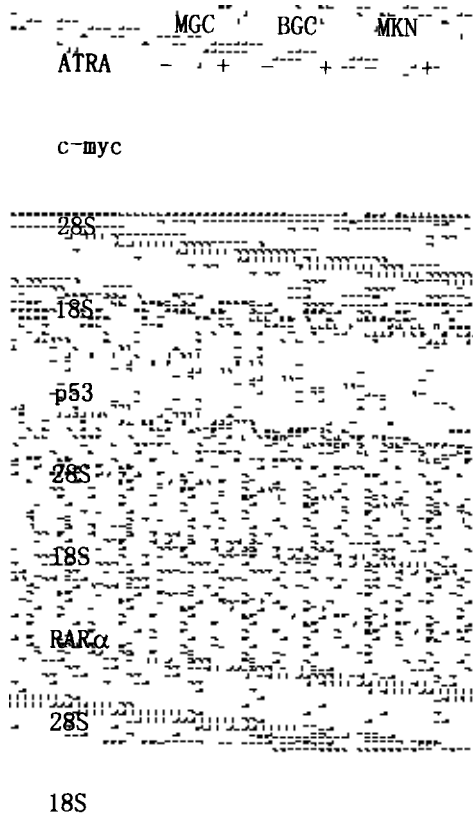


图2 ATRA对胃癌细胞基因表达的影响  
“-”表示药物处理前，“+”表示药物处理后。

落的能力，其中对MGc803和BGC823细胞的抑制率较高，对MKN45细胞的抑制率最低(附表)，反映了MKN45细胞的恶性程度较高。结果表明，不同的胃癌细胞株对ATRA的敏感性不同，ATRA对不同的胃癌细胞株的作用能力也不同，这可能与癌细胞株的恶性程度有关，因为在乳腺癌细胞和肺癌细胞中也存在类似的情况<sup>[4,6]</sup>。

视黄酸抑制癌细胞生长、诱导癌细胞分化与某些癌基因的抑制、失活、或者某些抑癌基因的活化有关<sup>[7]</sup>。实验表明，在3株胃癌细胞中，*c-myc*基因均有表达，经ATRA诱导后，MGc803和BGC823细胞的*c-myc*基因表达水平显著下降，但MKN45细胞的*c-myc*基因表达水平与ATRA的诱导无关(图2)。MGc803和BGC823细胞基本不表达*p53*基因，经ATRA诱导后，表达水平有所提高，而MKN45细胞在ATRA诱导前后均基本不表达*p53*基因(图2)。结果表明，ATRA能够直接调节RA敏感的胃癌细胞的*c-myc*和*p53*基因表达，但不能调节RA不敏感的胃癌细胞的*c-myc*和*p53*基因表达。Vousden等人报道，野生型*p53*能够抑制*c-myc*、腺病毒E1A的癌基因的转化活性<sup>[8]</sup>，Chenevix等也发现，野生型

*p53*基因可能影响启动子TATA结合蛋白TBP以及转录因子TF $\ominus$ A和TATA盒结合的稳定性，抑制转录的起始，从而抑制*c-myc*基因的转录<sup>[9]</sup>，可见，*p53*与*c-myc*之间关系密切。由于*c-myc*基因是一种与加强细胞增殖、抑制细胞分化有关的癌基因，在肿瘤中经常发生扩增现象，野生型*p53*则是细胞生长负调节因子，参与G1期细胞的调节和控制癌基因的扩增，因此，ATRA对*p53*基因表达的诱导，可能在某种程度上与对*c-myc*基因表达的抑制有直接或间接关系，*p53*基因表达增强，促使癌细胞分化，*c-myc*基因表达的减弱，也抑制了癌细胞的恶性分裂，其结果必将与ATRA对胃癌细胞的生长抑制(图1)相吻合，而ATRA不能诱导MKN45细胞的*p53*基因表达和抑制*c-myc*基因表达的结果则进一步表明，ATRA抑制胃癌细胞恶性生长的分子机制之一可能是通过调控*p53*和*c-myc*基因的表达而进行的。

视黄酸的作用主要由其受体RARs和RXRs介导<sup>[2]</sup>，ATRA能够加强诱导MGc803和BGC823细胞中RAR $\alpha$ 的表达水平，但不能诱导MKN45细胞中RAR $\alpha$ 的表达水平(图2)，这一结果与上面ATRA对3株胃癌细胞生长的抑制结果(图1)存在相关性，但与Shun等人对胃癌细胞的研究结果<sup>[10]</sup>不同，这可能是所用细胞株不同的缘故，同时也表明，细胞类型不同，介导ATRA作用的视黄素受体也不同。由于ATRA能够以较高的亲和力结合到RAR/RXR异源二聚体上，并且激活RAR而发挥作用<sup>[2]</sup>，所以，结果提示ARTA对RA敏感的胃癌细胞和RA不敏感的胃癌细胞的生长抑制作用不同可能取决于ATRA对RAR $\alpha$ 表达水平的诱导，RAR $\alpha$ 高水平表达可能介导ATRA对*p53*和*c-myc*基因的调控，文献已报道，当RAR表达，就能与RXR形成二聚体而结合到视黄酸应答元件(RARE)上，由此调节基因的转录与表达；如果RAR表达水平低或者不表达，就不与RXR形成二聚体<sup>[2]</sup>，可见，RAR $\alpha$ 表达水平的高低与ATRA的作用途径密切相关，只有当RAR/RXR二聚体形成时，ATRA才能通过激活RAR发挥作用，所以，RAR $\alpha$ 在介导ATRA作用的过程中具有信号传导开关的作用。

## 参 考 文 献

- 1 Sheikh M S, Shao ZM, Li XS, et al. Retinoid-resistant estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells transfected with retinoic acid receptor- $\alpha$  acquired sensitivity to growth inhibition by retinoids. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 21440.

- 2 Zhang XK, Pfahl M. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 1993, 4: 156.
- 3 Marcia ID, Chao WR, Polly P, et al. Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor  $\alpha$  with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor-positive MCF7 mammary. *Cancer Res.* 1995, 55: 4446.
- 4 吴乔, 曾定, 苏文金, 等. 视黄酸受体转录水平的改变与癌细胞生长的关系. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 1997, 36: 787
- 5 萨姆布鲁克等. *分子克隆实验指南(第二版)*, 科学出版社, 北京, 1993: 363.
- 6 Qiao Wu, Yin L, Ru L, et al. Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP TF and their heterodimerization, *The EMBO J.* 1997, 16: 1656.
- 7 Bowden G T, Brandt S, Rick D, et al. Oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation during multi-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res. (suppl)*, 1994, 54: 1882.
- 8 Vousden K H, Vojtesek B, Fisher C, et al. HPV-16 E7 or adenovirus E1A can overcome the growth arrest of cells immortalized with a temperature-sensitive p53. *Oncogene*, 1993, 8: 1697.
- 9 Chenevix TG, Martin NG, Ellem KAO. Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation *in vitro* by interfering with the binding of basal transcription factor to the TATA motif. *Oncogene*, 1993, 8: 1187.
- 10 Shun YJ, Shyu RY, Chen HY, et al. *In vitro* and *in vivo* growth inhibition of SG-m1 gastric cancer cells by retinoic acid. *Oncology*, 1996, 53: 334.

(收稿: 1998-03-12 修回: 1998-05-11)

## • 短篇报道 •

# 鼻咽癌放疗辅加纤支镜局部化疗的近期临床分析

刘 华<sup>1</sup> 胡伟汉<sup>2</sup> 王思阳<sup>1△</sup>  
周季英<sup>1</sup> 商 谊<sup>1△</sup> 庄淑华<sup>1</sup> 马冰洁<sup>1</sup>

关键词: 鼻咽肿瘤; 放射疗法; 化学疗法; 佐剂  
中图分类号: R730.5

鼻咽癌的首选治疗方法为放射治疗, 但鼻咽癌根治性外照射后, 鼻咽原发肿瘤残留和复发是治疗失败的主要原因之一<sup>[1]</sup>。为探讨控制鼻咽原发病灶残留和放疗后鼻咽局部病灶复发的治疗途径, 采用放疗辅加纤支镜局部注射化疗药物 (以下简称局部化疗) 治疗 53 例鼻咽癌患者, 以期提高鼻咽局部肿瘤的控制率, 获得治疗鼻咽癌新模式。现将近期疗效报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例资料

试验 A 组: 28 例初治鼻咽癌患者, 男 23 例, 女 5 例, 年龄 31~69 岁, 中位年龄 48 岁。其中低分化鳞癌 27 例, 泡状核细胞癌 1 例。

试验 B 组: 11 例放疗后鼻咽局部病灶复发的患者, 男 9 例, 女 2 例, 年龄 27~67 岁, 中位年龄 52 岁。均为低分化鳞癌。

试验 C 组: 14 例根治性外照射后鼻咽局部残留的鼻咽癌患者, 男 10 例, 女 4 例, 年龄 31~57 岁, 中位年龄 46 岁。均为低分化鳞癌。

随机选择例数及 T、N、M 分期与试验 A 组、B 组基本相同的鼻咽癌患者作为对照组。对照 A 组: 28 例初治鼻咽癌患者, 男 22 例, 女 6 例, 年龄 26~70 岁, 中位年龄 47 岁。其中低分化鳞癌 27 例, 未分化癌 1 例。

对照组 B 组, 11 例放疗后复发的鼻咽癌患者, 男 9 例, 女 2 例, 年龄 42~58 岁, 中位年龄 49 岁。均为低分化鳞癌。

### 1.2 治疗方法

外照射采用 6 MVX 或 8 MVX 直线加速器, 照射野采用面颈联合野和双侧耳前野。鼻咽原发灶靶区每次 2 Gy, 每周 5 次, 总量 70 Gy, 连续放疗, 7 周内完成。颈部治疗量 60 Gy, 预防量 50 Gy。

所有接受纤支镜局部化疗的病人, 术前 30 分钟给以强镇痛 100 mg 肌注镇痛, 用 2% 利多卡因溶液喷雾作鼻腔粘膜表面麻醉, 再用 1% 麻液收敛鼻腔粘膜, 扩张鼻道。

试验 A、B 组 39 例在外照射的同时经纤支镜局部化疗: 根据鼻咽病灶大小, 5 Fu 100~200 mg (4~8 ml), 通过纤支镜注射针分 8~16 点 (每点 0.5 ml 药液) 注射于鼻咽病灶中, 每周治疗一次, 6 次为一个疗程。试验 C 组 14 例经纤支镜局部 PF (DDP+ 5 Fu) 方案化疗: 根据鼻咽残留病灶大小, 首先注射 5 Fu 62.5~125 mg (2.5~5 ml), 注射方法同前, 然后 DDP 10~20 mg (生理盐水 2.5~5 ml 溶解), (下转第 458 页)

作者单位: 1. 广州铁路中心医院干保科 (广州, 510080);  $\Delta$  肿瘤科; 呼吸科

2. 中山医科大学肿瘤医院放疗科 (广州, 510060)

第一作者: 男, 1963 年 1 月出生, 主治医师, 学士