

9-顺-维甲酸对人肺癌细胞株 CD44、CD54 表达的影响

张振江¹, 张蕊², 张世国³, 陈景寒¹

Effects of 9-cis Retinoic Acid on the Expression of CD44 and CD54 in Lung Cancer Cell Lines

ZHANG Zhen-jiang¹, ZHANG Rui², ZHANG Shi-guo³, CHEN Jing-han¹

1. Clinical Department of Shandong University, Ji 'nan 250021, China; 2. Anesthesia Department of Weifang Medical College; 3. Clinical Laboratory of Ji 'nan Military Area General Hospital

Abstract: **Objective** To study the effect of 9-cis-retinoic acid (9-cis-RA) on the expression of both CD44 and CD54 in lung cancer cells. **Methods** 9-cis-RA (1 μ mol/L) was used to treat lung cancer cells; Flow cytometry (FCM) was used to detect the positive marked rate of both CD44 and CD54 of three groups including blank control, DMSO control and 9-cis-RA groups. **Results** In PG cells, the marked rate of CD44 was significantly lower and the marked rate of CD54 was higher than that of the control groups; In A549 cells, similar effect on CD54 was seen. However, 9-cis-RA had no effect on the marked rate of CD44. **Conclusion** These findings suggests that 9-cis-RA exert its anti-metastatic function by virtue of either the induction of CD54 expression or the suppression of CD44 expression

Key words: Anti-tumor drug; 9-cis-retinoic acid; Adhesion molecule CD44, CD54; Lung cancer cell; Metastasis

摘要: **目的** 探讨 9-顺式维甲酸对肺癌细胞中粘附分子 CD44、CD54 表达的影响。 **方法** 应用流式细胞仪检测 1 μ mol/L 9-cis-RA 作用于肺癌细胞 24、48、72 h 后 CD44、CD54 阳性标记率的变化。 **结果** PG 细胞株中 CD44 阳性标记率显著下降, CD54 显著上升, 这种影响 9-cis-RA 作用 24 小时后即显现, 72 小时仍存在。 A549 细胞株中 CD54 变化与 PG 细胞株类似, 但 CD44 阳性标记率在各时相无明显变化。 **结论** 9-cis-RA 可显著诱导肺癌细胞 CD54 或抑制 CD44 的表达。但在不同细胞, 作用机制可能不尽相同。

关键词: 抗肿瘤药物; 9-顺-维甲酸; 粘附分子 CD44、CD54; 肺癌细胞; 肿瘤转移

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2006)04-0225-03

0 引言

近年来, 维甲酸(RA)类化合物用于预防和治疗实体肿瘤的转移, 日益受到重视。9-顺-维甲酸(9-cis-RA)是 20 世纪 90 年代新合成的一种 RA 类化合物。动物实验和临床实践均表明, 它具有抑制肿瘤转移和扩散的作用^[1,2], 但作用机制尚不清楚。

CD44 和 CD54 是与肿瘤转移密切相关的两种粘附分子。本实验以人肺癌两种细胞株 (PG 和 A549) 为研究对象, 应用流式细胞仪观察 9-cis-RA 处理后这两种粘附分子阳性标记率的变化, 以进一步阐明 9-cis-RA 抗肿瘤转移的作用机制。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

9-cis-RA 购自 Sigma 公司, 用 0.1% 二甲基双砜(DMSO)溶解至 5 $\times 10^{-3}$ mol/L, 储存在液氮中。处理细胞时, 调节终浓度为 1 μ mol/L; 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠单克隆抗体 CD44-FITC、CD54-FITC 由美国 B. D 公司生产; 胎牛血清购自大连生物制品厂; RPMI1640 培养基购自 GIBCO BRL 公司; 其他试剂为进口分装或国产分析纯。流式细胞仪属济南军区总医院, 为美国 B. D 公司生产的 FACScan 型。

1.2 方法

1.2.1 细胞株的培养与处理 PG、A549 细胞株引自北京中日友好临床医学研究所生化与分子生物学研究室, 生长特性为贴壁生长。细胞培养于 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液中。培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 饱和湿度, 每隔 2 ~ 3d 用 0.25% 胰

收稿日期: 2005-03-09; 修回日期: 2005-06-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770730)

作者单位: 1. 250021 济南, 山东大学山东省立医院胸外科; 2. 潍坊医学院麻醉药理学研究室; 3. 济南军区总医院检验科

作者简介: 张振江 (1975-), 男, 博士在读, 主治医师, 主要从事肺癌的临床和基础研究

酶/0.02% EDTA 消化,以 1:2 传代一次。

1.2.2 细胞实验与分组 实验时取对数生长期细胞($5.4 \times 10^5/5\text{ml}$),常规接种。培养 24h 后,随机分为 3 组:空白对照组(不加 9-cis-RA 和 DMSO)、阴性对照组(加 DMSO,终浓度 0.1%)、用药组(加 9-cis-RA,终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$)。继续培养。每组均设 3 个平行培养瓶。

1.2.3 细胞收集 分别收集各组在 0 时相(加药时刻)、加药后 24、48、72h 的细胞,经 PBS 缓冲液洗两次后,均制成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液。

1.2.4 流式细胞仪检测 各取 100 μl 细胞悬液,置于预先已加入 10 μl CD44-FITC 或 10 μl CD54-FITC 的 12mm \times 75mm 的塑料管中,混匀并在室温下避光反应 30min,加 PBS 震荡清洗,离心弃上清,每管加 0.2ml 1% 的付甲醛固定,上机检测标本。并用随机软件定量分析各管中 CD44、CD54 阳性标记率,以百分率表示。每组在各时相的阳性标记率

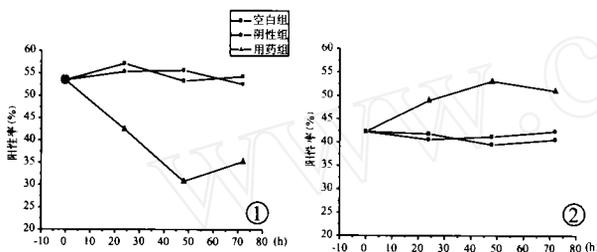


图 1 9-cis-RA 对 PG 细胞株 CD44 的作用

图 2 9-cis-RA 对 PG 细胞株 CD54 的作用

均重复测定 3 次,取平均值。

1.2.5 统计学处理 采用 χ^2 检验作为显著性检验方法。

2 结果

2.1 9-cis-RA 对 PG 细胞株 CD44、CD54 表达的影响

与对照组相比,用药组在 24、48、72h 的 CD44 阳性标记率均明显降低, $P < 0.01$,其中以 48h 作用最为显著。CD54 阳性标记率则有明显升高, $P < 0.01$,也以 48h 作用最为显著,见图 1、2。

2.2 9-cis-RA 对 A549 细胞株 CD44、CD54 表达的影响

与对照组相比,用药组在 24、48、72h 对 CD54 阳性标记率均有升高, $P < 0.01$,有统计学意义,其中以 48h 作用最为显著。CD44 阳性标记率在各时相无差异性变化, $P > 0.05$,见图 3、4。

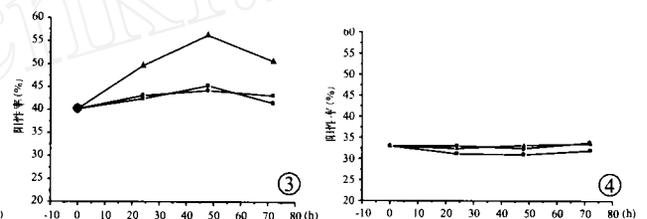


图 3 9-cis-RA 对 A549 细胞株 CD54 的作用

图 4 9-cis-RA 对 A549 细胞株 CD44 的作用

2.3 空白对照组与阴性对照组之间,阳性标记率变化均无差异性变化, $P > 0.05$ 。

3 讨论

RA 类化合物防癌抗癌的研究已有数十年历史。它与传统化疗药物不同之处在于,它并不直接杀死癌细胞,而是在一定程度上降低或逆转细胞的恶性表型,使其成为正常或接近正常的细胞。因此,它比传统化疗药物具有更大的优越性。目前 RA 类化合物用于临床试验,在辅助化疗药物治疗进展期和播散性肿瘤(如:肺癌、肾癌、卵巢癌)方面,疗效令人满意^[2-4]。而 RA 类化合物遏制恶性肿瘤侵袭和转移机制的研究正引起人们极大的关注。

CD44 和 CD54 作为细胞表面的粘附分子,均能介导肿瘤细胞与胞外介质或周围细胞的结合,但它们在肿瘤转移过程中的作用明显。近年来研究表明,CD44 分子肿瘤发展过程中的作用主要有如下方面:与透明质酸、粘连蛋白等配体结合,促进肿瘤细胞迁移;结合并激活基质金属蛋白酶,加速周围基质的降解;激活邻近的生长因子受体 C-Met,促进转

移细胞在宿主组织中的生长和存活;上调抗凋亡基因 bcl-2 的表达,抑制转移细胞发生凋亡^[5,6]。CD44 分子已是反映多种肿瘤转移潜能的重要标志。众所周知,逃脱宿主的免疫监测,是肿瘤转移的必要条件之一。而 CD54 分子通过与淋巴细胞膜上的 LFA-1 相结合,介导机体对肿瘤细胞的免疫杀伤,从而增加了转移细胞的免疫原性^[7,8]。故 CD54 分子在肿瘤转移中发挥了重要的负向调控作用。

我们在以前工作中,已观察到浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 9-cis-RA 在作用 24~48h 后,对 PG 和 A549 细胞株具有抑制增殖和诱导凋亡的作用^[9]。所以,本实验选用 1 $\mu\text{mol/L}$ 9-cis-RA 作用的细胞为实验对象。实验显示,9-cis-RA 对两种粘附分子阳性标记率的影响均以 48h 最为显著,72h 作用已减弱,这可能与长时间后药物药效下降有关。

本实验发现,9-cis-RA 对 PG 细胞株中 CD44、CD54 表达的影响截然相反:诱导 CD54 的表达,而降低 CD44 的表达。这提示 9-cis-RA 可以从多方面来逆转肿瘤细胞的转移表型:既降低肿瘤细胞的转移潜能,又增加其免疫原性。而在 A549 细胞株中,

9-cis-RA 只诱导 CD54 的表达,对 CD44 表达无明显影响。这提示 9-cis-RA 对不同细胞株的作用机制可能存在差异。

一般认为,维甲类化合物发挥生物学作用是通过激活维甲酸受体(RARs)、维甲类受体(RXR)形成 RAR/RXR 异二聚体或 RXR/RXR 同二聚体,二聚体再与靶基因启动子区域的应答元件——RAREs 相结合,从而调节靶基因的转录表达。目前已证实,在 CD54 基因相应区域存在 RAREs 序列。这可能是 9-cis-RA 诱导 CD54 的表达分子生物学基础。在 CD44 基因启动子区域尚未发现 RAREs 序列,但存在反式作用因子 AP-1 结合位点,而 RAR 与 AP-1 存在相互拮抗作用。我们在前期工作中已发现,9-cis-RA 有激活 RAR 基因转录的作用^[10]。故 9-cis-RA 有可能通过 RAR 间接抑制 CD44 的表达。

目前,9-cis-RA 对其他相关细胞粘附分子(如钙依赖粘附素、整合素、选择素等)表达的影响尚不清楚。我们认为,研究 9-cis-RA 对细胞粘附分子表达的影响,不仅有助于揭示 9-cis-RA 抗肿瘤转移的作用机制,而且还会为将来的基因治疗提供确实有效的靶点。

参考文献:

[1] 李占飞,邹声泉,裘法祖,等. 联合应用 9-顺式维甲酸和化疗

药物对人胆管癌细胞系 QBC939 的作用[J]. 中华肝胆外科杂志,2003,9(12):748-750.
 [2] Camacho L.H. Clinical applications of retinoids in cancer medicine[Review]. J Biol Regul Homeost Agents,2003,17(1):98-114.
 [3] Recchia F,Sica G,DeFilippis S,et al. Cisplatin, vindesine, mitomycin-C and 13-cis retinoic acid in the treatment of advanced non small cell lung cancer, A phase pilot study[J]. Anticancer Res,2000,20(3B):1985-1990.
 [4] Goldberg JS,Vargas M,Rosmarin AS,et al. Phase trial of interferon alpha2b and liposome-encapsulated all-trans retinoic acid in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma[J]. Cancer,2002,95(6):1220-1227.
 [5] R Marhaba,M Zoller. CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation[Review]. J Mol Histology, 2004,35(3):211-231.
 [6] 樊再雯,万毅新,安真光,等. bcl-2、CD44 在肺癌组织中的表达意义[J]. 肿瘤防治研究,2002,29(5):373-375.
 [7] Tanaka H, Yashiro M, Sunami T, et al. Lipid-mediated gene transfection of intercellular adhesion molecule-1 suppresses the peritoneal metastasis of gastric carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2002,10(5):613-617.
 [8] Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck[J]. Laryngoscope, 2003, 113(11):1955-1960.
 [9] 张世国,于雪艳,孔立新,等. 9-顺维甲酸对肺鳞癌细胞周期及细胞分化的生物学作用[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(10):635-636.
 [10] 张世国,于雪艳,王虎. 9-顺维甲酸对肺鳞癌细胞维 A 酸受体转录的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(11):697-698.

[编辑:周永红]

· 动态 · 简讯 ·

《循证医学》杂志征稿、征订通知

《循证医学》是经国家新闻出版署批准,广东省卫生厅主管,由广东省循证医学研究中心、广东省人民医院和中山大学附属第三医院主办的医学学术期刊。2003 年被评为“CNKI 中国期刊全文数据库(CJFD)”、“万方数据-数字化期刊群”全文收录期刊,“中国学术期刊综合评价数据库”统计学源期刊(CAJCED)、《中国科学引文数据库》(CSCD)、《中国生物医学文献数据库》(CBMdisc)、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》(CMCC)、《中文科技期刊数据库》来源期刊;2004 年 3 月被中国科学技术信息研究所评定为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”;2005 年 5 月荣获首届《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊奖。

主编吴一龙(广东省人民医院副院长、广东省人民医院肿瘤中心主任、广东省肺癌研究所所长、广东省循证医学研究中心主任,中山大学肿瘤学教授,博士生导师)。本刊以广大医药卫生技术人员和医疗、教学、科研管理工作者为读者对象,立足临床医学,介绍循证医学(evidence-based medicine, EBM)的理念、方法及相关知识,探讨符合中国国情的循证医学实践,促进国内外医学学术交流和医学科学发展。

本刊以临床实践指导性为特色,设置的主要栏目有:快讯、述评、循证评价、论著(包括诊断性研究、疗效研究、病因学研究、疾病的预后研究等)、Cochrane 研究方案、证据的寻求与评价、循证医学中的医学统计学问题、循证医学理论方法研究、综述与讲座、教育与争鸣、循证医学在线、临床指引与共识等。诚挚欢迎投稿。

本刊国际连续出版物标准刊号 ISSN 1671-5144,国内统一刊号 CN44-1548/R。《循证医学》杂志为双月刊、大 16 开本、64 页,国内定价每期 10 元,全年定价 60 元。欲订阅者请从全国各地邮局订购,邮发代号 46-326,也可直接从本刊编辑部邮购。

地址:广州市中山二路 106 号 广东省人民医院内《循证医学》编辑部 (510080)。

电话:020-83844620,020-83827812-51482

传真:020-83844620

网址:www.jebm.cn

E-mail: xzyxzz@163.net

