

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.10.004

莱菔硫烷对 A549 细胞株 CYR61 基因表达的影响

杨国俊¹, 张 军¹, 崔玲玲², 赵玉霞³, 李文杰²

Effects of SFN on Expression of CYR61 in A549 Cell Lines

YANG Guo-jun¹, ZHANG Jun¹, CUI Ling-ling², ZHAO Yu-xia³, LI Wen-jie²

1. Department of Prevention and medical nutrition, Henan Medical College for Staff and Workers, Zhengzhou 451191, China; 2. Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Public Health, Zhengzhou University; 3. Department of Clinical Medicine, Henan Province Xinyang Vocational and Technical College

Corresponding Author: LI Wen-jie, E-mail: lwj@zzu.cn

Abstract: Objective To study the effects of SFN on A549 cell lines through analyzing inhibitory rate and the CYR61 expression of A549 cell. **Methods** The inhibition of SFN on A549 was detected by MTT and CYR61 expression level intervened by SFN was identified by real-time PCR. **Results** MTT results indicated that SFN had a restrain effect in a dose-dependent manner when the concentration exceeded 40 μM . For the inhibitory ratio, it was in a time-dependent among the dose groups of 40 μM , 80 μM , 100 μM , and 160 μM . A549 cells treated with SFN for 32 hour shown crimped under the microscope and high re-fraction quantity cell configuration at 25 μM ; the amount of crimped cells was increased at 50 μM ; part of the cells were floating and became to fragments at 75 μM . The expression of CYR61 was higher in the group of 25 μM and 50 μM . There was no significant difference between 25 μM and 50 μM group. The expression of CYR61 was lower in 75 μM group than that in 50 μM group. **Conclusion** SFN inhibited growth of A549 cells in a dose-dependent manner and promoted the expression of CYR61. So distilled SFN may be a preventive factor for lung cancer development.

Key words: Sulforaphane; A549; CYR61; Real-time PCR

摘要:目的 探讨莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)对 A549 细胞株 CYR61 基因表达的影响。**方法** 用 MTT 法检测 SFN 对 A549 细胞的抑制效应。用 real-time PCR 检测 SFN 干预的 A549 肺癌细胞株 CYR61 表达水平。**结果** MTT 结果显示:SFN 从 40 μM 的浓度起开始出现细胞抑制效应,随着浓度的升高呈现剂量依赖效应,浓度越高抑制率越大;且 40 μM 、80 μM 、100 μM 和 160 μM SFN 等较大剂量在不同作用时间点具有时间效应关系,干预时间越长,抑制率越大。光镜下细胞形态:细胞在培养 32 h 后,25 μM 的 SFN 处理组部分 A549 细胞皱缩、变圆,折光性上升;50 μM 的 SFN 处理组皱缩细胞数目增多;75 μM 的 SFN 处理组细胞皱缩数目进一步增多,部分细胞漂浮,并可见细胞碎片。25 μM 和 50 μM 浓度 SFN 干预组的 CYR61 基因表达量较高,25 μM SFN 组与 50 μM SFN 组之间差异没有统计学意义,25 μM SFN 组与 50 μM SFN 组与其他各组相比,差异有统计学意义。**结论** SFN 在一定浓度下对 A549 细胞株起抑制作用,并对 A549 肺癌细胞株 CYR61 基因的表达有促进作用,可为食用十字花科类蔬菜预防肺癌提供依据。

关键词: 莱菔硫烷; A549; CYR61; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R730.1; R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)10-0821-04

0 引言

肺癌已成为世界上主要的肿瘤死因之一。人肺癌细胞株和肺癌组织研究已证实, CYR61 是非小细胞肺癌细胞的生长抑制因子,抑制肺癌细胞的转移和浸润^[1-2]。莱菔硫烷(SFN)是十字花科植物中含有的一种异硫氰酸盐,在绿花椰菜中含量最多^[3]。目前认为, SFN 不仅在肿瘤发生的多个阶段发挥抑

收稿日期:2008-08-08;修回日期:2008-12-02

作者单位:1. 451191 郑州,河南职工医学院预防与医学营养教研室;2. 郑州大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室;3 河南省信阳职业技术学院医学系

通信作者:李文杰, E-mail: lwj@zzu.cn

作者简介:杨国俊(1968-),男,硕士,讲师,主要从事营养与疾病的研究

癌作用,而且它还是潜在的肿瘤治疗药物^[4]。SFN 与肿瘤的关系研究正成为肿瘤学和营养学研究的热点。本次实验,通过 MTT 和 real-time PCR 分析 SFN 干预对 A549 细胞株 CYR61 表达的影响,探讨 SFN 对 A549 细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

SFN 来源于中国农科院,纯度为 85%。A549 细胞适宜培养液为含 10%胎牛血清的 1640 培养液,培养条件为 37℃,5%CO₂,饱和湿度。由于实验的最终目的是观察 SFN 干预后肺癌细胞株 CYR61 的表达量的变化,经预试验后选择 CYR61 中等表达水平的 A549 肺癌细胞株(中科院上海细胞库)。

1.2 主要仪器和试剂

荧光定量 PCR 仪(Genetimes Technology, Inc.);A-5082 型酶标仪(SUNRISE 系列)(奥地利 Tecan 公司);MTT 裂解液(德国 Sigma 公司);RP-MI1640 培养粉(美国 Gibco 公司);CYR61 和 β-actin 引物(上海生物工程技术有限公司)^[2]。

1.3 MTT 实验

1.3.1 分组 在查阅现有文献并结合预实验的基础上,我们将受试物用无水乙醇溶解后加入 A549 培养液中,建立如下分组方案并设立终浓度:空白对照、阴性对照(含 10%小牛血清的 1640 培养液)、溶剂对照(含 0.1%乙醇和 10%小牛血清的 1640 培养液)、1 μM SFN、4 μM SFN、20 μM SFN、40 μM SFN、80 μM SFN、100 μM SFN、160 μM SFN。

1.3.2 操作步骤 将待试细胞悬液以 1.0×10⁸/L 密度(5×10³个/孔)接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,未接种待试细胞悬液的空白孔作为空白对照,37℃、5%CO₂培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后,吸弃原培养液加入不同浓度的受试物(总体积为每孔 200 μl):阴性对照、溶剂对照、1 μM SFN、4 μM SFN、20 μM SFN、40 μM SFN、80 μM SFN、100 μM SFN、160 μM SFN,每一剂量组设 6 个复孔。37℃、5%CO₂培养箱中培养 8 h、16 h、24 h、32 h 后,每孔加入 MTT(5g/L)20 μl,孵育 4 h,吸弃含 MTT 的培养液,加入二甲基亚砷 150 μl/孔,振荡 10 min,紫色结晶完全溶解后,立刻用酶标仪检测各组细胞在 492 nm 波长的吸光值。并以阴性对照的细胞存活率作为 100%,即抑制率为 0;空白对照细胞存活率作为 0,即抑制率(%)=100%。抑制率(%)=(阴性对照孔 OD 值 - 试验孔 OD 均值)/阴性对照孔 OD 均值×100%,一般情况下,抑制率≥30%判定为药敏阳性,反之为阴性^[5-6]。

1.4 根据 MTT 结果,以 50%抑制率确定 real-timePCR 实验所用的 SFN 作用时间和浓度。采用倒置显微镜观测不同浓度受试物作用一定时间后的细胞株的形态学变化。并收集细胞,提取 RNA 合成 cDNA,运用 real-time PCR 检测细胞中 CYR61 的表达情况^[2]。

1.4.1 β-actin 和 CYR61 引物设计及合成 用 PRIMER3 软件设计 β-actin 和 CYR61 基因的特异引物,见表 1,由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 β-actin 和 CYR61 基因的引物

Table 1 The sequences of β-actin and CYR61 primers

Genes	Nucleotides	Sequences	Base pairs (bp)
β-actin	Sense	5-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3'	101
	Antisense	5-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'	
CYR61	Sense	5-GAGTGGGTCTGTGACGAGGAT-3'	190
	Antisense	5-GGTTGTATAGGATGCGAGGCT -3'	

1.4.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成 使用 Trizol 试剂提取 RNA,采用琼脂糖凝胶电泳法和溴化乙锭染色法对 RNA 定量,在紫外光下可见 5 S、18 S 和 28 S RNA 条带。使用 AMV 逆转录试剂盒合成 cDNA。

1.4.3 PCR 扩增 反应体积为 15 μl:10×buffer 1.5 μl, 2.5 mM 的 dNTP 混合物 1.13 μl, 20 μM MgCl₂ 0.9 μl, Eva Green(20×)0.75 μl, Fluorescein (1000×)0.09 μl, Sense primer、Anti-sense primer (3mM)各 0.6 μl, Taq DNA polymerase(2.5 u/μl) 0.15 μl,模板(1:40)5μl,加水至 15 μl;所有的反应均重复 3 次。β-actin 和 CYR61 反应条件为:95℃ 3 min, 95℃ 20 s,57℃ 20 s,然后 72℃ 延伸 30 s, 85℃(β-actin)/89℃(CYR61)15 s 采集荧光,40 个循环,最后在 72℃ 温度下延伸 7 min。用溶解曲线和 2%琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果,看是否产生特定的 PCR 产物。

1.5 统计学方法

试验结果输入 SPSS12.0 软件数据库,采用方差分析和 t 检验进行统计分析,以 α=0.05 作为检验水准。

2 结果

2.1 不同浓度的 SFN 对 A549 细胞干预后的 MTT 结果

SFN 干预 8、16、24、32 h 后,40 μM 以上干预组出现细胞抑制效应,且随着 SFN 浓度的增大,抑制率增大,SFN 在 20、40、80、100、160 μM 干预范围

内存在明显的剂量效应关系。并且 40、80、100 和 160 μM SFN 各干预组在 8、16、24 和 32 h 等不同作用时间点存在时间效应关系,干预时间越长,抑制率越大,见图 1。经计算干预 16 h 和 24 h 的 50%抑制率对应的 SFN 浓度均 $>100 \mu\text{M}$,干预 32 h 的 50%抑制率对应的 SFN 浓度为 $71 \mu\text{M}$,考虑选用 32 h 作用时间作为细胞干预条件,进行细胞培养和干预较为合适。故将其分为:阴性对照、溶剂对照、12.5、25、50 和 $75 \mu\text{M}$ SFN 六个组进行下一步试验。

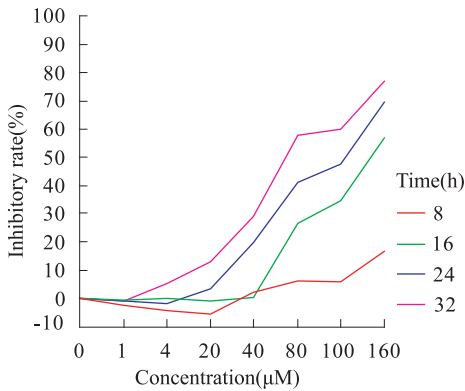


图 1 SFN 对 A549 细胞抑制的剂量效应曲线
Figure 1 The dose-response curve of A549 cells inhibited by SFN

2.2 光镜下观察 SFN 对 A549 细胞形态的影响

A549 细胞在培养 32 h 后,在溶剂对照、阴性对照及 $12.5 \mu\text{M}$ 的 SFN 处理组未观察到细胞形态的明显变化; $25 \mu\text{M}$ 的 SFN 处理组部分细胞皱缩、变圆,折光性上升; $50 \mu\text{M}$ 的 SFN 处理组皱缩细胞数目增多; $75 \mu\text{M}$ 的 SFN 处理组细胞皱缩数目进一步增多,部分细胞漂浮,并可见细胞碎片。

2.3 SFN 干预后 CYR61 基因的定量 PCR 结果

单因素方差分析两两比较结果显示,除溶剂对照与 $12.5 \mu\text{M}$ SFN 组,溶剂对照与 $25 \mu\text{M}$ SFN 组, $12.5 \mu\text{M}$ SFN 组与 $75 \mu\text{M}$ SFN 组, $25 \mu\text{M}$ SFN 组与 $50 \mu\text{M}$ SFN 组间差异不具有统计学意义外($P > 0.05$),其他各组间差异具有统计学意义。 $25 \mu\text{M}$ 和 $50 \mu\text{M}$ 浓度 SFN 干预组的 CYR61 表达较高,与其他组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$), $75 \mu\text{M}$ 浓度 SFN 干预组的 CYR61 表达显著低于 $50 \mu\text{M}$ 浓度 SFN 干预组($P < 0.01$),见表 2、3。

3 讨论

SFN 是一个有效的保护酶诱导物,是十字花科植物提取物中抗癌活性最强的,能够防护致癌化合物引起的伤害。动物实验表明,SFN 可阻断化学物诱发肿瘤的起始阶段,能完全抑制 I 相酶(如细胞色

表 2 A549 细胞株 CYR61 的 real-time PCR Ct ($Ct_{\beta\text{-actin}} - Ct_{\text{CYR61}}$) 值

Table 2 value of Real-time PCR Ct of CYR61 in A549 cells

Time	Solvent control	12.5 μM SFN	25 μM SFN	50 μM SFN	75 μM SFN
First	5.8	4.5	9.1	8.3	5.0
Secont	5.0	4.8	9.8	8.9	4.6
Third	5.3	5.0	8.1	7.5	4.5
\bar{x}	5.3667	4.7667	9.0000	8.2333	5.0333

表 3 Ct 均数值两两比较的 LSD-t 检验

Table 3 LSD-t test of value of Ct

Group	t	P
Solvent control vs. 12.5 μM SFN	1.2780	0.230
Solvent control vs. 25 μM SFN	-7.7378	0.000
Solvent control vs. 50 μM SFN	-6.1059	0.000
Solvent control vs. 75 μM SFN	0.7099	0.494
12.5 μM SFN vs. 25 μM SFN	-9.0166	0.000
12.5 μM SFN vs. 50 μM SFN	-7.3838	0.000
12.5 μM SFN vs. 75 μM SFN	-0.5681	0.583
25 μM SFN vs. 50 μM SFN	1.6330	0.134
25 μM SFN vs. 75 μM SFN	8.4488	0.000
50 μM SFN vs. 75 μM SFN	6.8158	0.000

素 P450)^[7],并且诱导 II 相解毒酶(如谷胱甘肽硫转移酶、苯醌还原酶、环氧化物水解酶和 UDP2 葡萄糖醛酰转移酶^[8])的表达。SFN 不直接与自由基或活性氧物质发生反应,而是在诱导 II 相酶后发挥它的抗氧化作用。SFN 是最有潜力的 II 相酶诱导物,它诱导的 II 相酶基因,如 GST 和 NQO1 也依赖于 Nrf2^[9]。给 Nrf2 缺失型鼠和野生型鼠 SFN 后,用 DNA 矩阵方法检测鼠小肠中 Nrf2 依赖基因的表达,结果发现了大量 Nrf2 调节的解毒酶、抗氧化蛋白和降低毒物毒性的细胞保护蛋白^[10]。动物实验发现,SFN 和它的一些同系物能快速在细胞内聚集,使细胞内的 SFN 浓度可以达到毫摩尔水平。SFN 自由进入细胞,然后几乎全部与谷胱甘肽(glutathione, GSH)相连,细胞内 GSH 是 SFN 聚集的动力来源。SFN 诱导许多相酶的活性与它在细胞内的富集有关^[11]。SFN 处理后的细胞内还原性谷胱甘肽增加,使细胞还原能力增加,诱导 II 相酶而提高对致癌物的防御力^[4]。但最吸引人的还是菜菔硫烷化合物及其类似物的抑制癌变细胞增生作用^[11]。SFN 与肺癌的关系研究还很少,由于 CYR61 被认为是肺癌的抑癌基因,在肺癌组织中低表达,若能通过对 A549 肺癌细胞株的 SFN 干预引起 CYR61 基因表达量的变化,可从一定角度说明 SFN 对肺癌细胞的作用机制是否与引起 CYR61 基因表达量的改

变有关。

用 MTT 法检测 SFN 对 A549 细胞的抑制率,结果显示:SFN 从 40 μM 的浓度起开始出现细胞抑制效应,且随着浓度的上升呈现剂量依赖效应。40、80、100 和 160 μM 不同浓度 SFN 干预组在 8、16、24 和 32 h 作用时间点,CYR61 的表达差异有统计学意义且具有时间效应关系,干预时间越长,抑制率越大。形态学观察显示,SFN 具有促进 A549 细胞凋亡的作用。实验结果说明 SFN 对体外培养的 A549 细胞株有明显的抑制作用,本次实验结果与 SFN 是潜在的肿瘤治疗药物的观点^[4]相一致。

选用 32 h 作为干预时间是因为 32 h 的 50%抑制率对应的 SFN 浓度为 71 μM ,溶剂酒精的浓度 < 0.1%;16h 和 24 h 50%抑制率的 SFN 浓度 > 100 μM ,酒精浓度 > 0.1%,一般要求以酒精作为溶剂对细胞进行处理时,酒精浓度应 \leq 0.1%。根据 SFN 的 50%抑制率,并参考相关文献^[13]选用 12.5、25、50、75 μM SFN 浓度组及干预 32 h 作为定量 Real-time PCR 的细胞干预条件,进行细胞培养和干预。12.5、25、50、75 μM SFN 浓度组干预 A549 细胞 32 h 的 CYR61 基因 real-time PCR 结果显示,25、50 μM SFN 浓度组作用 32 h 的 CYR61 基因的表达显著高于其他组。但是 75 μM SFN 浓度组作用 32 h 的 CYR61 基因的表达开始回落,其原因可能与 SFN 高浓度造成细胞损伤,活细胞数目减少有关,SFN 具有促进 A549 细胞凋亡的作用。

Real-time PCR 结果显示,SFN 对 A549 肺癌细胞株 CYR61 基因的表达有促进作用,SFN 对癌细胞的抑制作用是否与其促进 CYR61 基因的表达有关还有待进一步的深入研究。本研究旨在探讨食用十字花科类蔬菜预防肺癌的可能性。能找出预防肺癌的有效药物或者食物预防策略将对肺癌的防治起到事半功倍的效果。

参考文献:

[1] Tong X, O'Kelly J, Xie D, et al. CYR61 suppresses the

growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway[J]. *Oncogene*, 2004, 23(28):4847-4855.

- [2] 崔玲玲,孙锦峰,谢东. 肺癌组织中 CYR61 基因表达及临床意义[J]. *肿瘤*, 2007, 27(4):1-4.
- [3] Zhang Y, Talalay P, Cho CG, et al. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(6): 2399-2403.
- [4] 舒然,夏薇,吴坤. 莱菔硫烷与肿瘤 [J]. *疾病控制杂志*, 2004, 8(5):452-455.
- [5] 古祥,孙国娣,潘芳芳,等. 营养素联合化疗药物对胃癌细胞株生长的影响 [J]. *外科理论与实践*, 2002, 7(1):70-72.
- [6] 张海燕,马鸿儒,潘李珍. TNF- α 对人肺癌细胞系的生长抑制作用和对细胞周期的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1998, 5(4):280-282.
- [7] Zhang Y, Talalay P. Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic Phase 2 enzymes [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(20): 4632-4639.
- [8] Basten GP, Bao Y, Williamson G. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(8): 1399-1404.
- [9] McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al. The Cap n' Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3299-3307.
- [10] Thimmappa RK, Mai KH, Srisuma S, et al. Identification of Nrf-2 regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(18): 5196-5203.
- [11] Ye L, Zhang Y. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxication enzymes [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(12): 1987-1992.
- [12] Johnston N. Sulforaphane halts breast cancer cell growth [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(21): 908.
- [13] Hecht SS, Kenney PM, Wang, et al. Benzyl isothiocyanate: an effective inhibitor of polycyclic aromatic hydrocarbon tumorigenesis in A/J mouse lung [J]. *Cancer Lett*, 2002, 187(1-2): 87-94.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]