

[文章编号] 1671-587X(2011)06-0994-04

全反式维甲酸对大肠癌细胞间隙连接蛋白 Cx32 与 Cx43 表达及增殖和迁移能力的影响

孟令俊¹, 卢振霞¹, 孙步彤¹, 白鹭鹭², 石张镇¹, 代恩勇¹

(1. 吉林大学中日联谊医院肿瘤·血液科, 吉林 长春 130033; 2. 吉林大学第一医院儿科, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 检测全反式维甲酸(ATRA)对大肠癌细胞 Caco-2 及 SW480 增殖、迁移及间隙连接蛋白 Cx32 与 Cx43 胞膜表达的影响, 分析其对大肠癌效应作用机制。方法: 取对数生长期大肠癌细胞分为 ATRA 处理组及阴性对照组, 以 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 及 1×10^{-4} mol · L⁻¹ ATRA 处理 Caco-2 及 SW480 细胞, 应用 MTT 法测定其生长抑制率; 以 1×10^{-5} 及 1×10^{-4} mol · L⁻¹ ATRA 处理 SW480 细胞, 应用划痕法测定其迁移率, 流式细胞术测定 Cx32 及 Cx43 胞膜阳性率。结果: 与阴性对照组比较, ATRA 处理组 Caco-2 及 SW480 细胞经 1×10^{-4} mol · L⁻¹ ATRA 作用 24、48 及 72 h 后, 生长抑制率明显提高 ($P < 0.01$); ATRA 处理组 SW480 细胞经 1×10^{-5} mol · L⁻¹ ATRA 作用 24 和 48 h 后, 平均迁移率明显低于阴性对照组 ($P < 0.05$)。ATRA 处理组 SW480 细胞经 1×10^{-5} 及 1×10^{-4} mol · L⁻¹ ATRA 作用 24 和 48 h 后, 胞膜 Cx32 及 Cx43 表达阳性率明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$)。结论: ATRA 可增加大肠癌细胞 Cx43 及 Cx32 膜表达, 并抑制其增殖及迁移能力, 其效应机制可能涉及间隙连接蛋白的胞内蛋白相互作用及细胞间通讯联系功能改变。

[关键词] 大肠癌细胞; 全反式维甲酸; 间隙连接蛋白 Cx32; 间隙连接蛋白 Cx43

[中图分类号] R735.3 **[文献标志码]** A

Effects of ATRA on Cx32 and Cx43 expressions and proliferation and migration abilities of colorectal cancer cells

MENG Ling-jun¹, LU Zhen-xia¹, SUN Bu-tong¹, BAI Lu-lu², SHI Zhang-zhen¹, DAI En-yong¹

(1. Department of Tumor and Hematology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China; 2. Department of Pediatrics, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ATRA on the proliferation and migration abilities and membranous distribution of Cx32 and Cx43 of colorectal cancer cells Caco-2 and SW480 and to elucidate the potential mechanism. **Methods** The colorectal cancer cell lines Caco-2 and SW480 were divided into ATRA treatment groups and control groups. The Caco-2 and SW480 cells were treated with 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} and 1×10^{-4} mol · L⁻¹ ATRA, and MTT assay was applied to detect the inhibitory rates of growth of Caco-2 and SW480 cells. After the SW480 cells were treated with the 1×10^{-5} and 1×10^{-4} mol · L⁻¹ ATRA, the wound healing

[收稿日期] 2011-08-15

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目资助课题(30870355); 吉林省科技厅科技发展计划项目资助课题(200705286); 吉林省长春市科委基金资助课题(2008077)

[作者简介] 孟令俊(1985—), 男, 河南省濮阳市人, 医学硕士, 医师, 主要从事大肠癌治疗研究。

[通信作者] 代恩勇(Tel: 0431-84995870, E-mail: daiey@jlu.edu.cn)

DOI: CNKI: 22-1342/R. 20111101. 0909. 002

网络出版时间: 2011-11-01 09: 09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1342.R.20111101.0909.002.html>

assay was employed to determine the cell migration ability and flow cytometry was used to analyze membranous distribution of Cx 32 and Cx 43 in SW480 cells. **Results** Compared with control group, the growth inhibitory rates of Caco-2 and SW480 cells in ATRA groups after treated with $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24, 48 and 72 h were significantly increased ($P < 0.01$); the migration abilities of SW480 cells were dramatically decreased after treated with $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA for 24 and 48 h ($P < 0.05$); the membranous distribution of Cx 32 and Cx 43 of SW480 cells was remarkably increased after treated with 1×10^{-5} and $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA for 24 and 48 h ($P < 0.05$). **Conclusion** ATRA could increase the membranous distribution of Cx32 and Cx43 of colorectal cancer cells and inhibit the proliferation and migration abilities, which may be involved in the interaction between connexins and cytoplasmic proteins, as well as alteration of gap junctional intercellular communication.

Key words: colorectal cancer cells; all-trans retinoic acid; connexin 32; connexin 43

大肠癌是人类常见高发肿瘤之一^[1], 转移及复发是大肠癌致死的重要原因^[2]。细胞缝隙连接异常与大肠癌转移及浸润关系密切, 而细胞间隙连接蛋白 (connexins, Cx) 是缝隙连接 (gap junction, GJ) 的基本组成单位, 肿瘤组织中 Cx 的表达及分布发生紊乱, 可影响肿瘤的生物学行为^[3]。

全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 是类维生素 A 家族中维生素 A 的活性代谢产物, 目前在急性早幼粒细胞白血病的治疗方面效果显著^[4]。有研究表明: ATRA 可影响实体瘤细胞增殖及 Cx 表达^[11-14]。为明确其对大肠癌细胞的作用及对间隙连接蛋白 Cx32、Cx43 表达的影响, 本研究通过检测 ATRA 作用后的大肠癌细胞系的生长、迁移及相关蛋白表达改变情况, 明确 ATRA 在大肠癌治疗的作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂 Caco-2 细胞及 SW480 细胞购自于中国医学科学院肿瘤医院细胞库; MEM 细胞培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶、MTT 及 DMSO 购自 Sigma 公司; 非必需氨基酸 (NEA) 购自美国 invitrogen 公司; ATRA 购自郑州荔诺公司, 应用 DMSO 作溶剂, 配制成 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA 作为母液, 以细胞培养基稀释至所需浓度; FITC 标记 CX43 及 Cx32 单抗购自上海信然公司。

1.2 细胞培养 用含 10% FBS、 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素 MEM 培养基 (Caco-2 细胞需加 1% 非必需氨基酸) 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞融合度达 80%~90% 后, 用 0.2% 含 EDTA 胰酶消化, 1:3 传代培养, 每 3~4 d 传代 1 次。

1.3 MTT 法检测细胞生长抑制效应 取对数生长期的 Caco-2 及 SW480 细胞, 胰酶消化并收集计

数后, 调整细胞密度至 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板中, 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液 (约 5×10^3 个细胞)。每组设 3 个复孔。细胞贴壁后吸出培养液, 置 37°C 、5% CO_2 条件下培养。24 h 后, 吸出各孔内培养基, 加入含不同浓度 ATRA 培养基, 浓度分别为 0 (阴性对照组)、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 及 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 溶剂对照组加入含相应量 DMSO 的培养基, 空白对照组无细胞, 仅加入含相应浓度 ATRA 的培养基, 各组均设 3 个复孔。继续培养 24、48 及 72 h 后, 加入 MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, $10 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 继续孵育 4 h 后, 小心吸弃各孔内的培养上清液, 加入 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DMSO, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 在水平摇床上振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上于 492 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值, 取平行对照孔均值。将吸光度值代入公式计算细胞增殖抑制率, 细胞增殖抑制率 = $[1 - (\text{实验组平均 A 值} - \text{空白对照平均 A 值}) / (\text{对照组平均 A 值} - \text{空白对照平均 A 值})] \times 100\%$ 。

1.4 细胞划痕法检测 SW480 细胞迁移能力 取对数生长期的 SW480 细胞, 胰酶消化并收集计数, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔板, 37°C 、5% CO_2 条件下培养。待细胞生长至单层融合, 用 $200 \mu\text{L}$ 移液器枪头在培养板上轻轻划 “一” 字, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 轻柔洗涤, 除去悬浮细胞, 加入含不同浓度 ATRA 无血清培养基, 浓度分别为 0 (阴性对照组)、 1×10^{-5} 、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 溶剂对照组加入含相应量 DMSO 的无血清培养基, 各组均设 3 个复孔。倒置显微镜观察并照相, 原条件继续培养, 分别于划痕后 24 及 48 h 再次观察并于相同位置照相。在原图上测量划痕区宽度, 原始宽度为 A, 处理后不同时间测量宽度为 A_x , 细胞相对迁移率 = $(\text{平均 A 值} - \text{平均 } A_x \text{ 值}) / \text{平均 A 值} \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测 SW480 胞膜 Cx32 及 Cx43 表达 细胞生长至对数期, 0.2% 胰酶消化至单细胞悬液, 计数细胞, 按每孔 2 mL (约 5×10^5 个细胞) 将细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 弃去原培养基, 加入含不同浓度 ATRA 的培养基, 浓度分别为 0 (阴性对照组)、 1×10^{-5} 、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 溶剂对照组加入含相应量 DMSO 的培养基, 各组均设 3 个复孔。于药物处理 48 h 后, 刮除细胞并收集; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤细胞 2 次 ($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min); 分别加入 1:100 FITC-Cx32 稀释液 100 μL ; 4°C 避光孵育 1 h 后加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 300 μL , 混匀, 流式细胞仪检测。Cx43 检测过程同上。Cx32 及 Cx43 表达情况以二者胞膜表达阳性率表示。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学处理, 细胞生长抑制率、平均迁移率及胞膜 Cx32 及 Cx43 表达水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较应用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组 Caco-2 和 SW480 细胞的生长抑制率与阴性对照组比较, 当 ATRA 浓度达 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞生长抑制率明显升高。阴性对照组生长抑制率为 0%, ATRA 处理组 Caco-2 细胞经 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA 作用 24、48 及 72 h 后, 生长抑制率分别为 $54.90\% \pm 6.98\%$ 、

$84.19\% \pm 4.14\%$ 及 $87.58\% \pm 8.03\%$ ($P < 0.01$); SW480 细胞分别为 $56.72\% \pm 6.65\%$ 、 $76.71\% \pm 3.86\%$ 及 $83.71\% \pm 10.30\%$ ($P < 0.01$); ATRA 对 Caco-2 及 SW480 细胞增殖抑制作用随作用时间延长而增加, 表明 ATRA 对细胞增殖的抑制作用具有时间依赖性。

2.2 各组 SW480 细胞的平均迁移率 划痕后 0、24 及 48 h 将各组细胞同一位置置于倒置显微镜下观察 SW480 细胞的迁移情况并照相, 结果显示: 由于 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA 的细胞毒作用较大, 该组细胞大量死亡, 未能检测细胞迁移情况; $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA 可明显抑制 SW480 的迁移能力, ATRA 处理组 SW480 细胞经 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA 作用 24 和 48 h 后, 平均迁移率 ($8.97\% \pm 4.36\%$ 及 $21.85\% \pm 5.75\%$) 明显低于阴性对照组 ($41.90\% \pm 5.24\%$ 及 $67.25\% \pm 6.60\%$) ($P < 0.05$)。

2.3 SW480 胞膜 CX32 及 CX43 表达情况 ATRA 处理组 SW480 细胞经 1×10^{-5} 及 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA 作用 48 h 后, 胞膜 Cx32 阳性率 ($72.31\% \pm 4.02\%$ 、 $78.88\% \pm 3.00\%$) 明显高于阴性对照组 ($59.89\% \pm 0.78\%$ 、 $58.79\% \pm 0.58\%$) ($P < 0.05$); 胞膜 Cx43 阳性率 ($64.03\% \pm 1.59\%$ 、 $66.33\% \pm 2.77\%$) 明显高于阴性对照组 ($40.55\% \pm 9.70\%$ 、 $41.15\% \pm 8.70\%$) ($P < 0.05$) (图 1)。

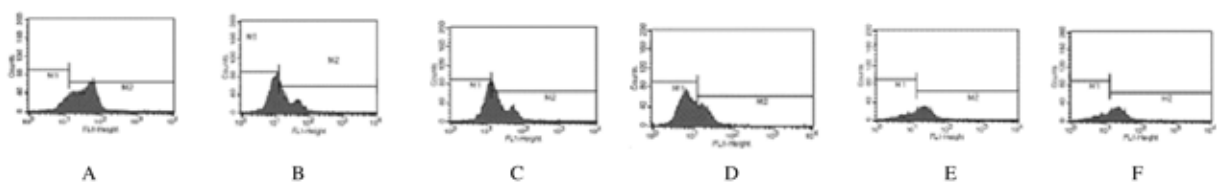


图 1 流式细胞术检测 SW480 细胞胞膜 Cx32 及 Cx43 表达

Fig. 1 Membranous expressions of Cx32 and Cx43 in SW480 cells detected by flow cytometry

A-C; Cx32; D-F; Cx43; A, D; $0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA group; B, E; $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA group; C, F; $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATRA group.

3 讨论

GJ 是 4 种细胞间连接 (桥粒连接、粘附连接、紧密连接及缝隙连接) 之一^[6], 细胞缝隙连接异常与大肠癌转移及浸润关系密切, 而 Cx 是缝隙连接的基本组成单位, 肿瘤组织中 Cx 的表达及分布往往发生紊乱, 从而影响肿瘤的生物行为^[3,5]。

Cx 的生理作用^[3,6-7]主要有以下 3 方面: ①依

赖细胞间通道的功能, 即缝隙连接介导的细胞间通讯 (gap junctional intercellular communication, GJIC), 是小分子物质, 如离子、代谢产物在细胞间传递的关键通道, 可使组织中细胞群的代谢和生长具有一定的均衡性和协调性。②半通道介导的细胞间通讯, 半通道可调节一些小分子物质的释放, 如 ATP、 NAD^+ 等, 亦是细胞间死亡及生存信号传导的重要方式。③不依赖细胞间通道的功能, 除

了间隙连接及半通道外, Cx 可独立于这些通道而发挥作用。

Cx 的胞内蛋白相互作用包括多方面, 机制之一为通过 Cx 反应元件 (Cx-responsive elements, CxRE) 调节基因表达, Li 等^[8]将 Cx43 cDNA 转入人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435 而使其过表达, 结果表明: Cx43 的过表达并未增加乳腺癌细胞的 GJIC 功能, 但却有效抑制了 MDA-MB-435 细胞的生长, 减少了肺转移的可能性。Cx 的胞内部分可与细胞内蛋白交联影响细胞内信号转导, 如 β -catenin、Cx43 与 β -catenin 结合后可减少 β -catenin 的核内聚集, 抑制细胞增殖^[9-10]。

Cx 与大肠癌关系密切, 其中 Cx43 以及 Cx32 是目前研究较多的 2 种连接蛋白。Cx43 在大肠癌细胞膜上分布减少, 并在胞浆内积聚, 这种改变在腺瘤阶段已经发生, 在大肠癌阶段更加明显^[5]。Cx32 在大肠癌细胞膜上分布减少, 胞浆积聚增加, 这种改变在腺瘤阶段已经发生, 在大肠癌阶段更加明显。Cx32 与大肠癌细胞分级有关, 高表达 Cx32 者预示着更好的细胞分化状态, Cx32 表达阳性的病例中细胞分级为 G2 的占 84.09%; 而阴性病例中占 64.49% ($P=0.016$)^[5], 表明 Cx32 在调节细胞生长与分化方面可能发挥起一定作用。另外, Cx32 与 Cx43 表达之间存在相关性, 尤其在淋巴结阳性、细胞分化相对较差 (G2 或 G3) 以及腺癌病例中^[5], 表明 Cx32 和 Cx43 在大肠癌中具有协同作用。

ATRA 是治疗急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的重要药物, 体外实验表明: ATRA 亦对实体瘤细胞, 如食管癌^[11]、宫颈癌^[12]、胃癌^[13]、中枢神经系统肿瘤^[14]等有一定作用。本研究发现: 较高浓度 ATRA 可明显抑制大肠癌细胞 Caco-2 及 SW480 细胞增殖, 并呈一定的时间依赖性。高浓度 ATRA 因生长抑制作用, 无法检测其迁移改变情况, 低浓度 ATRA 可使 SW480 细胞的体外迁徙能力降低近 30%。

ATRA 对大肠癌增殖抑制及迁移抑制的具体机制尚不十分明确。本研究结果显示: ATRA 可增加 Cx43 及 Cx32 膜表达, 并抑制大肠癌细胞的增殖及迁移能力, 分析发现 Cx 可能通过与细胞内 Cx 反应元件及细胞内蛋白交联影响细胞内信号转导作用, 有可能为 ATRA 抑制大肠癌细胞生长的机制之一, 同时还可能存在着除 Cx43、

Cx32 外的增殖抑制机制; 另外, Cx43 及 Cx32 膜表达上升, 重建了 GJIC 功能, 使细胞间制约作用增加, ATRA 对大肠癌细胞的迁移抑制作用可能与此相关。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer Statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60 (4): 277-300.
- [2] Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2010, 375 (9719): 1030-1047.
- [3] Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10 (6): 435-441.
- [4] Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable [J]. *Blood*, 2008, 111 (5): 2505-2515.
- [5] Kanczuga-Koda L, Koda M, Sulkowski S, et al. Gradual loss of functional gap junction within progression of colorectal cancer—a shift from membranous Cx32 and Cx43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis [J]. *In Vivo*, 2010, 24 (1): 101-107.
- [6] Franke WW. Discovering the molecular components of intercellular junctions — a historical view [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1 (3): 341-344.
- [7] Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome [J]. *Biol Chem*, 2002, 383 (5): 725-737.
- [8] Li Z, Zhou Z, Welch DR, et al. Expressing connexin 43 in breast cancer cells reduces their metastasis to lungs [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25 (8): 893-901.
- [9] Ge X, Wang X. Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies [J]. *J Hematol Oncol*, 2010, 3 (1): 33-36.
- [10] Kardami E, Dang X, Iacobas DA, et al. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007, 94 (1/2): 245-264.
- [11] Muller A, Nakagawa H, Rustgi AK. Retinoic acid and N-(4-hydroxy-phenyl) retinamide suppress growth of esophageal squamous carcinoma cell lines [J]. *Cancer Lett*, 1997, 113 (1/2): 95-101.
- [12] Guo JM, Xiao BX, Kang GZ, et al. Suppression of telomerase activity and arrest at G1 phase in human cervical cancer HeLa cells by all-trans retinoic acid [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16 (1): 341-346.
- [13] Zhang JP, Chen XY, Li JS. Effects of all-trans-retinoic on human gastric cancer cells BGC-823 [J]. *J Dig Dis*, 2007, 8 (1): 29-34.
- [14] Futami H, Sakai R. All-trans retinoic acid downregulates ALK in cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK [J]. *Cancer Lett*, 2010, 297 (2): 220-225.