

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0291-02

全反维甲酸对人肺癌细胞株 A549 细胞间黏附分子-1 表达及体外侵袭力的影响

周人杰, 肖颖彬, 张国强 (第三军医大学新桥医院胸心外科, 重庆 400037)

细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)的表达在肿瘤的诊断、判断病程进展、转移潜能与预后方面有很大的潜在价值,受到众多学者关注。ICAM-1 高表达的肿瘤细胞可能更易于脱离瘤体,随淋巴细胞游走而发生转移^[1]。流行病学、动物实验及临床研究均已证实全反式维甲酸(ATRA)类可用于肺癌的化学预防及治疗^[2]。我们研究了 ATRA 对肺癌细胞株 A549 体外增殖、侵袭力及 ICAM-1、sICAM-1 表达水平的影响,旨在阐明 ATRA 对肿瘤转移潜能的影响及 ICAM-1 分子在肿瘤侵袭中的作用,探讨 ATRA 对肿瘤的化学防治作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及其处理方法

A549 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养,适时更换培养液及传代,逐渐降低培养液中小牛血清浓度直至无血清培养。细胞分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA, 1 000 U/ml IFN- α , 200 U/ml IL-1 (北京中山公司) 终浓度的培养液,对照组为相应的培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,用于实验。

1.2 体外侵袭实验

先将 200 μl 的 NIH 3T3 细胞培养上清液作为趋化物加入 Boyden 小室(Millipore 公司) 的下室,上下室之间由直径 12 mm、孔径 12 μm 的多孔聚碳膜分隔,再在膜上铺 50 μl 基质胶 Matrigel(BD 公司),胶干后,将不同处理的 A549 细胞 400 μl (含 2×10^5 细胞) 分别加入上室。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育 6 h 后取出膜,擦去膜上面未穿过的细胞及基质胶,甲醇固定,HE 染色后,在显微镜下将多聚碳膜分成 9 等格,分别计数 9 格内的细胞数,取其平均值,即为每格内侵袭的细胞数。每组设 2 个样本,重复 3 次。

1.3 体外增殖检测

采用 Gilles 等^[3]建立的改良龙胆紫吸收比色计数法。将待计数的细胞接种于 24 孔细胞培养板中,置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵育 7 h,使细胞充分贴壁,以 1% 戊二醛-Hank's 液固定 15 min 后,以 0.1% 无离子龙胆紫溶液 1

ml 染色 30 min;将培养板置于 1 L 的大烧杯中,在其底部以连续缓流的无离子水(0.5 ml/min)脱染 15 min,于空气中自然干燥,以 0.2% TritonX-100 溶液溶解细胞,在室温 25 $^{\circ}\text{C}$,波长为 590 nm 分光光度仪上检测光密度(OD)值。以已计数的 A549 细胞 0.75, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 10.0, 12.5 $\times 10^4$ /ml 接种于 24 孔培养板,按上法操作,建立细胞数与光密度关系的标准曲线。以 4.0 $\times 10^4$ /ml 细胞接种于 24 孔培养板中,分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA, 1 000 U/ml IFN- α , 200 U/ml IL-1 的培养液,对照为相应培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h,按上法检测各孔 OD 值,根据标准曲线求出细胞数,每例设 6 个复孔。

1.4 细胞表面 ICAM-1 表达水平的检测

取不同处理的 A549 细胞,加入鼠抗人 ICAM-1 (CD54) 单抗(ZYMED 公司),阴性对照以 PBS 代替一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次,加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(北京中山公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次后,用 FACstar 流式细胞仪(Becton dickinson) 检测荧光强度,每个标本检测 10 000 个细胞。

1.5 细胞培养上清液 sICAM-1 含量检测

取不同处理的 A549 细胞培养上清液,以人 sICAM-1 ELISA 试剂盒(Ancell 公司) 进行检测,操作步骤按说明书进行。

2 结果与讨论

2.1 ATRA 对 A549 细胞体外增殖能力的影响

IL-1 (200 U/ml) 对 A549 细胞体外增殖无明显影响($P > 0.05$), 而用 ATRA (5 $\mu\text{mol/L}$) 处理后,较对照组细胞增殖明显受抑制($8.11 \pm 0.22 \times 10^4$ /ml vs $10.15 \pm 0.56 \times 10^4$ /ml, $P < 0.01$)。

2.2 ATRA 对 A549 细胞 ICAM-1, sICAM-1 表达水平的影响

A549 细胞的 ICAM-1 阳性率为 36.5%, 经 IL-1 处理后表达水平明显增强(阳性率为 63.5%, $P < 0.05$), 而经 ATRA 处理后则下降(阳性率为 21.2%, $P < 0.05$)。A549 细胞培养上清液无法检测出 sICAM-1

表达(<0.625 ng/ml),经 ATRA 处理后,亦不增加 sICAM-1 水平(<0.625 ng/ml),但经 IL-1 处理后, sICAM-1 含量明显增高(3.01 ± 0.75 ng/ml, $P < 0.05$)。

2.3 ATRA 对 A549 细胞体外侵袭力的影响

根据细胞穿过 Matrigel 胶的能力,检测不同处理的 A549 细胞体外侵袭力的变化。结果显示:ATRA 处理组的侵袭细胞数(每格 101.2 ± 27.8)明显低于对照组细胞(每格 185.1 ± 28.1 , $P < 0.05$),而 IL-1 处理组的侵袭细胞数(272.6 ± 72.3 /格)有高于对照组趋势,但差异不显著($P > 0.05$)。

全反维甲酸(ATRA)是体内具有重要生理活性的维生素 A 代谢产物之一,国内外报道表明,RA 类化合物具有抑制细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化及程序性死亡、抗肿瘤血管生成、抑制细胞分裂等特性^[2,4]。我们检测了 ATRA、IL-1 处理的 A549 细胞体外增殖能力,结果显示,ATRA 处理的 A549 细胞体外增殖明显受抑制,而 IL-1 处理的细胞体外增殖无明显变化。

黏附是肿瘤细胞侵袭转移过程中的重要环节。Natali 等^[1]研究发现 ICAM-1 表达水平与黑色素瘤瘤体厚度及临床病程有很高的相关性,ICAM-1 高表达的肿瘤细胞侵袭转移能力高。我们的实验结果显示:ATRA 处理 A549 细胞后,细胞表面 ICAM-1 表达下降,而 IL-1 处理组 ICAM-1 表达增强。其他学者对黑色素瘤、乳腺癌等的研究,亦发现了相似的结果。这一结果显示,由于 IL-1 和 ATRA 对肿瘤细胞 ICAM-1 表达的不同作用可能导致肿瘤细胞侵袭转移行为有所不同,IL-1 由于上调肿瘤细胞 ICAM-1 的表达而增加其侵袭转移的潜能^[5],而 ATRA 下调 ICAM-1 的表达而抑制其侵袭转移潜能。

在肿瘤宿主血清或细胞培养上清液中,还存在可溶性 ICAM-1 分子(sICAM-1)。sICAM-1 的存在可以阻

断 LFA-1(淋巴细胞功能相关抗原-1)/ICAM-1 介导的淋巴细胞对肿瘤细胞识别,从而抑制机体抗肿瘤免疫,促进转移发生。从实验结果看:ATRA 处理后 A549 细胞 sICAM-1 含量不增高,而 IL-1 处理细胞后 sICAM-1 含量明显增高,表明 ATRA 处理使细胞 ICAM-1 表达降低和 sICAM-1 含量不增高,两者对抑制肿瘤侵袭转移潜能的作用是一致的。

本研究表明,ATRA,IL-1 对 A549 细胞体外增殖及 ICAM-1, sICAM-1 表达有不同的调节作用,而对其转移潜能具有不同调变作用。ATRA 对肿瘤的化学预防作用可能是通过抑制细胞增殖、调节两种形式 ICAM-1 表达进而抑制其转移潜能实现的。

[关键词] 全反维甲酸; 肺癌细胞株; 体外侵袭力; ICAM-1
[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, *et al.* Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(8): 1554-1560.
- [2] van Zandwijk N, Pastorino U. Chemoprevention of lung cancer: soon daily practice? [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2003, 3(1): 91-98.
- [3] Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures[J]. *Anal Biochem*, 1986, 159(1): 109-113.
- [4] 孙关林. 癌肿白血病的分化治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(3): 172-173.
- [5] Yano S, Nokihara H, Yamamoto A, *et al.* Multifunctional interleukin-1beta promotes metastasis of human lung cancer cells in SCID mice via enhanced expression of adhesion-, invasion- and angiogenesis-related molecules[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(3): 244-252.

[收稿日期] 2004 -01 -06 [修回日期] 2004 -05 -10

《临床肿瘤学杂志》征订启事

《临床肿瘤学杂志》为国家新闻出版总署和解放军总政治部批准创办的国家级专业学术刊物,属中国生物医学核心期刊和中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并同时被多家专刊为网站收录。本刊侧重于肿瘤临床,并结合基础研究,以肿瘤专业工作者及其他医药卫生人员为主要对象。重点刊登肿瘤防治新成果、新进展和新经验,具有内容丰富、资料新颖、编辑规范等,已逐步实现了编辑手段和期刊载体的现代化,纸质媒体、光盘版及网络版同步发展。国内标准刊号: CN32 - 1577/R, 国际标准刊号: ISSN1009 - 0460。本刊为 16 开、双月刊,每期 112 页、激光照排胶印,进口铜板纸,国内外公开发售,邮发代号 28 - 267。定价每期 10.00 元(包括邮资费),全年 60.00 元。2005 年将以更丰富的内容和崭新的面貌与读者见面。欢迎投稿和订购。读者可从全国各地邮局订购,漏订者直接汇款到南京市杨公井 34 标 34 号《临床肿瘤学杂志》编辑部补订。邮编: 210002, 电话: 025 - 84400143