

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.006

白藜芦醇对肺腺癌 A549 细胞增殖、黏附与侵袭的影响

陈海霞¹, 杨耀琴¹, 陶惠红¹, 朱颖超¹, 周爽¹, 王和勇²[▲](1. 同济大学医学院肿瘤研究所, 上海 200092; 2. 同济大学附属肺科医院中心实验室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对肺腺癌 A549 细胞增殖、黏附及侵袭的影响。**方法:**用不同剂量的 Res 作用于 A549 细胞, MTT 法测定 A549 细胞的增殖水平(成纤维 3T3 细胞为对照), 流式细胞仪检测 A549 细胞的细胞周期和凋亡, 体外黏附实验测定 A549 细胞的黏附能力, Transwell 实验测定 A549 细胞的侵袭能力, 荧光免疫细胞化学方法测定 A549 细胞中 MMP-2 和 TIMP-2 蛋白的表达。**结果:**Res 以剂量(20~80 μmol/L)和时间(0~72 h)依赖方式抑制 A549 细胞的增殖, 同样条件对 3T3 细胞增殖无影响。10、20、40、80 μmol/L Res 作用后, A549 细胞的凋亡率分别为(34.9±0.91)%、(41.33±0.13)%、(45.47±0.87)%和(59.46±0.59)%。经 20 μmol/L Res 处理 48 h 后, S 期 A549 细胞比例为(56.41±1.67)%, 细胞周期阻滞在 S 期。20 μmol/L 以上的 Res 可引起 A549 细胞的黏附力下降、侵袭力降低($P < 0.05$); 同时, A549 细胞内 MMP-2 蛋白表达下调, 而 TIMP-2 蛋白表达增加。**结论:**Res 抑制肺腺癌 A549 细胞的增殖、黏附和侵袭, 其机制可能涉及对 MMP-2 和 TIMP-2 表达的双向调控。

[关键词] 白藜芦醇; 肺癌; 增殖; 凋亡; 黏附; 侵袭; MMP-2; TIMP-2

[中图分类号] R734.2; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0138-05

Effects of resveratrol on proliferation, adhesion and invasion of A549 lung adenocarcinoma cells

CHEN Hai-xia¹, YANG Yao-qin¹, TAO Hui-hong¹, ZHU Ying-chao¹, ZHOU Shuang¹, WANG He-yong²(1. Cancer Institute, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Central Laboratory, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of resveratrol (Res) on proliferation, adhesion and invasion of A549 lung adenocarcinoma cells. **Methods:** A549 cells were treated with different doses of Res. The cell proliferation, cell cycle and apoptosis, adhesive ability, and invasion of A549 cells were examined by methyl thiazolyltetrazolium (MTT) assay, flow cytometry, Boyden chamber assay and Transwell assay respectively (3T3 cells as a normal cell control). The expressions of MMP-2 and TIMP-2 proteins in A549 cells were assayed by immunofluorescent cytochemistry. **Results:** Res inhibited the proliferation of A549 cells in a dose (20–80 μmol/L) and time (0–72 h) dependent manner. No significant inhibitory effect on 3T3 cell proliferation was observed at the same dose. Res induced the apoptosis of A549 cells with the apoptotic rates of (34.9±0.91)%, (41.33±0.13)%, (45.47±0.87)% and (59.46±0.59)% respectively when Res being 10, 20, 40, 80 μmol/L. A549 cells were arrested at the S phase of cell cycle, and the cell proportion in the S phase was (56.41±1.67)% when treated with 20 μmol/L Res, the adhesion and invasion ability of A549 cells was effectively decreased after treatment with 20 μmol/L–80 μmol/L Res ($P < 0.05$), accompanied by a significant down-regulation of MMP-2 expressions and up-regulation of TIMP-2 expressions. **Conclusion:** Res can inhibit the proliferation, adhesion and invasion of A549 lung adenocarcinoma cells, which may be related with the bilateral regulation on MMP-2 and TIMP-2 expressions.

[Key words] resveratrol; lung carcinoma; proliferation; apoptosis; adhesion; invasion; MMP-2; TIMP-2

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 138-142]

[基金项目] 上海市科委科技支撑计划医学引导项目(No. 09411964800)。Project supported by the Foundation for Medical Guide Program of Shanghai Science and Technology Commission (No. 09411964800)

[作者简介] 陈海霞(1985–), 女, 山东省单县人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤治疗的基础研究。E-mail: chenhaixia2030@163.com

[通信作者] 杨耀琴(YANG Yao-qin, corresponding author), E-mail: yaoqiny@163.com; 王和勇(WANG He-yong, co-corresponding author), E-mail: heyongwang@hotmail.com。[▲]为共同通信作者

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120328.1559.005.html>

白藜芦醇(resveratrol, Res)化学名为3,4,5-三羟基-1,2-二苯乙烯,存在于葡萄、果类、虎杖等多种食用和药用植物中,是植物在恶劣环境下或遭遇病原体侵害时产生的防御性物质。研究^[1-2]发现,Res具有显著的抗炎、抗突变、抗氧化、抗肿瘤以及抑制血小板聚集的作用,可预防动脉粥样硬化,防治冠心病;对肝癌、白血病、前列腺癌等多种肿瘤也有明显的抑制作用^[3]。Res还可诱导喉癌Hep2细胞^[4]、胆囊癌GBC细胞^[5]、乳腺癌MCF-7细胞^[6]和人鼻咽癌低分化上皮细胞CNE-2Z^[7]等的凋亡。我国肺癌发生率高于世界平均水平,并有不断增长的趋势,其中肺癌发病率最高,化疗、放疗效果较差,成为一个日益严重的问题。本研究主要观察Res对A549肺腺癌细胞增殖和侵袭能力的抑制效应,探讨Res作为抗癌新药的潜能和可能的作用环节。

1 材料与方法

1.1 实验材料与细胞株

人肺腺癌A549细胞、成纤维3T3细胞购自上海细胞生物研究所。Res购自Sigma公司,纯度99%;RPMI 1640培养基购自Gibco公司,MTT、DM-SO购自上海生工生物工程公司,新生小牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司,Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒、细胞周期试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、金属蛋白酶组织抑制剂-2(tissue inhibitors of metalloproteinase-2, TIMP-2)购自Sant Cruz公司,Matrigel胶购自美国BD公司。

1.2 MTT法检测Res对A549细胞增殖的影响

取对数生长期A549细胞和3T3细胞,制成 5×10^4 /ml的细胞悬液,每孔200 μ l接种于96孔板,次日加入不同剂量的Res(终浓度分别为0、5、10、20、40、80 μ mol/L),每组设5个平行孔,37 $^{\circ}$ C培养箱培养24、48、72 h。以MTT法检测细胞增殖水平。按公式计算Res对肿瘤细胞增殖的抑制率:抑制率(%)=(对照组 D_{490} 值-Res组 D_{490} 值)/对照组 D_{490} 值 $\times 100\%$ 。

1.3 流式细胞术检测Res对A549细胞凋亡与细胞周期的影响

A549细胞分别经0、10、20、40、80 μ mol/L的Res处理48 h后,用冷PBS洗2次,调整细胞密度至 1×10^6 /ml。按照Annexin V-FITC细胞凋亡和细胞周期试剂盒说明操作,以FACS Calibur流式细胞仪进行测定。

1.4 Matrigel胶检测Res对A549细胞黏附的影响

在96孔板中铺一层matrigel胶,4 $^{\circ}$ C过夜,每孔加20 ml含2% BSA的1640无血清培养基,37 $^{\circ}$ C封阻1 h,PBS洗2遍备用。按照Res浓度不同分为0、10、20、40、80 μ mol/L等5组。A549细胞经不同浓度的Res处理24 h后,制备 5×10^5 /ml细胞悬液,每孔100 μ l接种于上述96孔板中,培养1 h,弃培养液,每孔加20 ml MTT继续培养4 h,酶标仪490 nm测光密度值(D)。按以下公式计算:细胞黏附率(%)=实验组 D_{490} 值/对照组 D_{490} 值 $\times 100\%$ 。

1.5 Transwell检测Res对A549细胞侵袭的影响

Transwell小室铺30 μ l matrigel胶,4 $^{\circ}$ C过夜凝固,含0.1% BSA的1640无血清培养液37 $^{\circ}$ C平衡30 min。各组A549细胞经处理后,每Transwell小室接种 5×10^4 细胞,加200 μ l 0.1% BSA 1640无血清培养液培养,下层加500 μ l 10%胎牛血清培养基,37 $^{\circ}$ C培养24 h。取出小室,用棉签拭去小室内层细胞,PBS洗2次,4%甲醛固定15 min,结晶紫染色,倒置显微镜下随机计数5个视野膜下面的细胞数,计算细胞侵袭率。细胞侵袭率(%)=实验组膜下细胞数/对照组膜下细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 荧光免疫细胞化学法检测A549细胞中MMP-2、TIMP-2的表达水平

制备A549细胞爬片,各细胞组经Res处理48 h,PBS冲洗3次,按免疫荧光化学反应步骤操作:第一抗体MMP-2和TIMP-2均为1:200稀释,CY3标记的山羊抗兔二抗稀释度为1:300,各步骤间均用PBS充分浸洗,30%甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS17.0统计学软件,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Res抑制A549细胞的增殖

实验结果(图1、2)表明,低浓度(5~10 μ mol/L)Res对A549细胞增殖无显著影响($P > 0.05$)。当浓度大于20 μ mol/L时,能明显抑制A549细胞的增殖,并呈显时间、剂量依赖性。但Res对3T3细胞增殖无显著抑制作用($P > 0.05$)。

2.2 Res诱导A549细胞的凋亡

A549细胞经10、20、40、80 μ mol/L的Res处理48 h后,A549细胞凋亡率分别为(34.9 \pm 0.91)%、(41.33 \pm 0.13)%、(45.47 \pm 0.87)%和(59.46 \pm 0.59)% ,对照组细胞仅为(0.03 \pm 0.42)% ($P < 0.01$)。

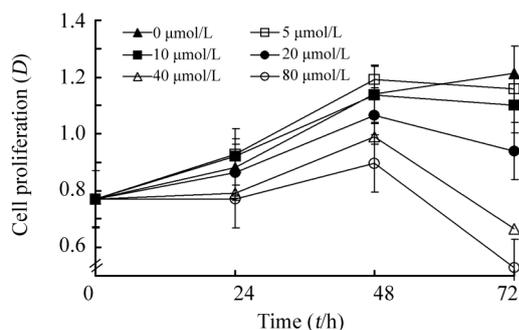


图 1 Res 对 A549 细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of Res on proliferation of A549 cells

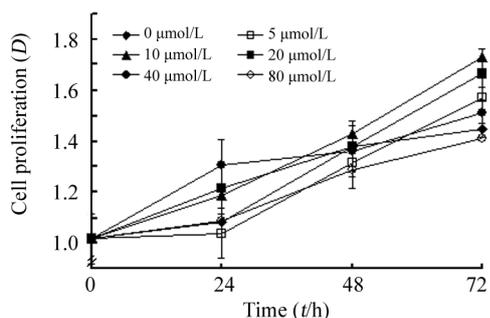


图 2 Res 不影响 3T3 细胞的增殖

Fig. 2 Res did not affect proliferation of 3T3 cells

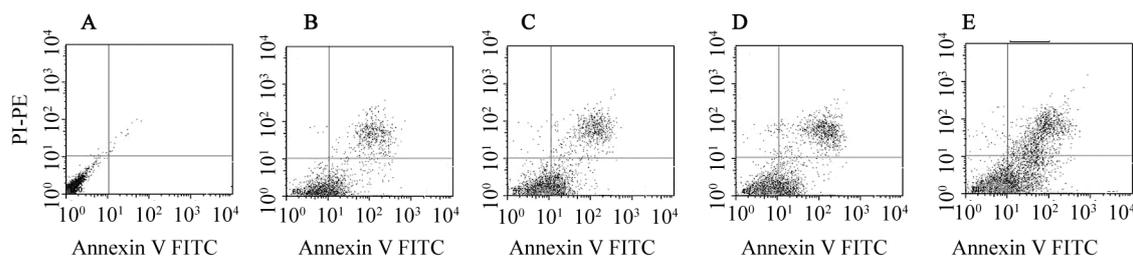


图 3 不同浓度的 Res 诱导(48 h)A549 细胞凋亡

Fig. 3 Apoptosis of A549 cells induced by different doses of Res (48 h)

A: Ctrl; B: 10 μmol/L Res; C: 20 μmol/L Res; D: 40 μmol/L Res; E: 80 μmol/L Res

Res 浓度升高而下降,40 μmol/L 及以上浓度 Res 的抑制作用尤为明显。TIMP-2 蛋白的表达模式则相反,随着 Res 浓度升高其表达量增加,Res 浓度为 20 μmol/L 时 TIMP-2 蛋白的表达明显升高。由此可见,Res 能够降低 MMP-2 蛋白的表达水平、升高 TIMP-2 蛋白的表达水平,并与其浓度相关。

3 讨论

Res 是一种非黄酮类多酚化合物,可通过诱导细胞凋亡、p53 过表达、阻滞细胞周期、抑制 DNA 的

2.3 Res 对 549 细胞周期的影响

A549 细胞经 Res 处理 48 h 后,S 期细胞增加,20 μmol/L Res 时,S 期细胞比例达到高峰;当 40 和 80 μmol/L 时,G₂/M 细胞显著减少,分别为(6.36 ± 0.43)% 和(4.56 ± 0.62)%,并可见细胞凋亡峰出现(图 4)。由此可见,Res 处理后 A549 细胞呈现 S 期阻滞。

2.4 Res 抑制 A549 细胞的黏附力

如图 5 所示,随着 Res 浓度的增加,A549 细胞在 matrigel 胶上的黏附率逐渐下降,20、40 和 80 μmol/L 的 Res 处理后黏附率分别下降了(12.1 ± 0.021)%、(27.9 ± 0.032)% 和(31.6 ± 0.036)%。Res 抑制 A549 细胞的黏附力,并呈剂量依赖性。

2.5 Res 抑制 A549 细胞的侵袭力

A549 细胞经不同浓度 Res 处理 24 h 后,A549 细胞的侵袭力呈现不同程度的下降(P < 0.01),Res ≥ 40 μmol/L 时侵袭力下降尤为明显,各组间均有明显差别(P < 0.01,图 6)。由此可见,Res 能够抑制 A549 细胞的侵袭力,并呈浓度依赖性。

2.6 Res 对 A549 细胞 MMP-2、TIMP-2 蛋白表达的影响

荧光免疫细胞化学染色结果(图 7)显示,A549 细胞经 Res 处理 24 h 后,MMP-2 蛋白表达水平随

合成以及干扰相关信号转导通路等多种机制,抑制肿瘤细胞的增殖^[8-12]。本研究结果显示,较低浓度的 Res(< 10 μmol/L)和较短作用时间(< 48 h)对 A549 细胞增殖活性无明显影响(P > 0.05),当浓度升高至 20 μmol/L 以上,A549 细胞增殖逐渐受到抑制(P < 0.05);但 Res 即使在高浓度(80 μmol/L)对 3T3 细胞增殖活性亦无明显影响。Res 对细胞增殖的抑制作用呈现剂量、时间依赖性和细胞差异性,这一特点与 Res 对白血病、乳腺癌、肝癌等肿瘤细胞的抑制作用相吻合^[13-15]。

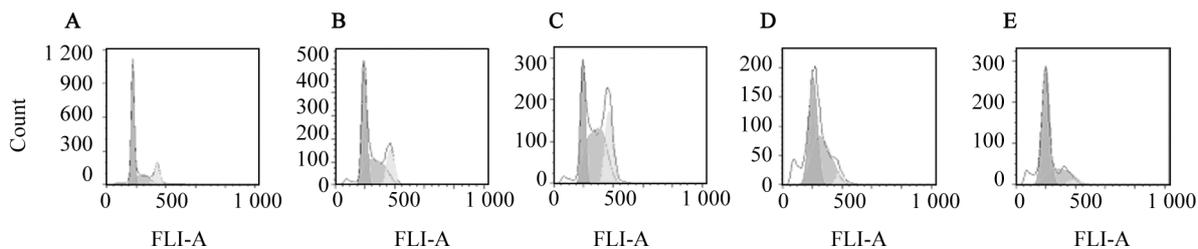


图 4 不同浓度 Res 对 A549 细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of different doses of Res on cell cycles of A549 cells

A: Ctrl; B: 10 mmol/L Res; C: 20 mmol/L Res; D: 40 mmol/L Res; E: 80 mmol/L Res

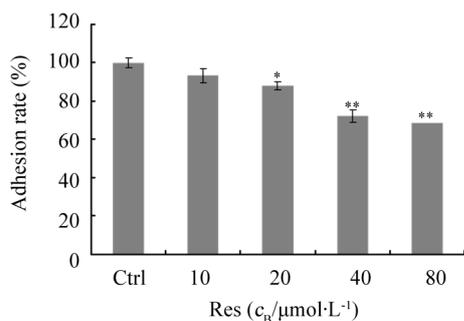


图 5 不同浓度 Res 对 A549 细胞黏附的抑制效应

Fig. 5 Inhibitory effect of different doses of Res on adhesion of A549 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group

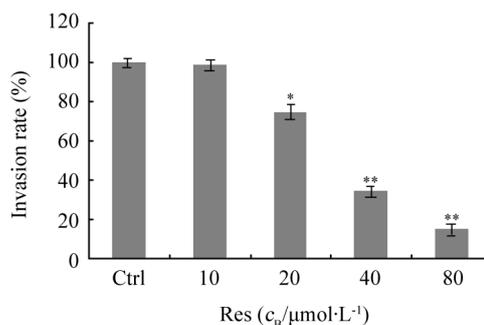


图 6 Res 对 A549 细胞侵袭的抑制作用(24 h)

Fig. 6 Inhibitory effects of Res on invasion of A549 cells (24 h)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group

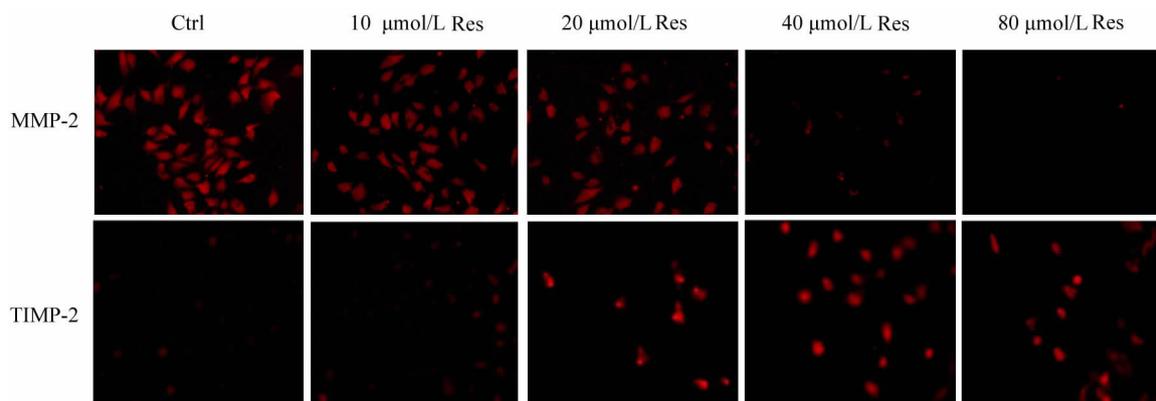


图 7 Res 对 A549 细胞 MMP-2 和 TIMP-2 蛋白表达的影响(×200)

Fig. 7 Effect of Res on expressions of MMP-2 and TIMP-2 proteins in A549 cells (×200)

流式细胞术测定结果则显示, Res 能诱导 A549 细胞凋亡, 细胞凋亡率随 Res 剂量的升高显著增加, 表现为 S 期细胞比例显著增加, G₂/M 期细胞比例减少, A549 细胞呈现 S 期阻滞。有研究^[15-17]指出, Res 抗肿瘤增殖效应与其上调细胞周期蛋白 p21WAF1 和 p27KIP1 表达、下调 cyclin D/E、CDK

2/4/6 的表达有关, 可使细胞阻滞于 G₁/S、S 期或 G₂/M 期。

肿瘤转移是肿瘤致死因素之一, 黏附是肿瘤细胞侵袭转移的起始步骤, 肿瘤细胞与基底膜的异质性黏附能力可反映其侵袭能力; 降解和破坏基底膜或细胞外基质, 是肿瘤浸润到其他器官和组织的前

提。本研究观察到 Res 作用 A549 细胞 24 h 后, 对 A549 细胞增殖影响较小, 但已能显著抑制 A549 细胞对基膜的黏附和侵袭。人工基底膜 matrigel 是从小鼠 EHS 肉瘤中提取的基质成分, 含有生理浓度的 LN、FN 和 IV 型胶原蛋白, 与基底膜成分极为相似。20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 能显著抑制 A549 细胞对 matrigel 的黏附和侵袭, 并呈现剂量依赖性。

MMP 是一类锌离子依赖的细胞外基质水解酶, 其中 MMP-2 能降解基膜的主要成分 IV 型胶原, 在肿瘤细胞的侵袭转移中起着极其重要的作用^[18-21], MMP 及其抑制剂 TIMP 与肿瘤的侵袭及转移关系密切。本研究显示, A549 肺癌细胞高表达 MMP-2、低表达 TIMP-2, Res 能够显著抑制 A549 细胞中 MMP-2 的表达, 同时上调 TIMP-2 的表达, 使 MMP-2/TIMP-2 比值明显降低。由此可见, Res 通过对 MMP-2/TIMP-2 表达的双重调控, 抑制 A549 细胞对基膜的黏附和基膜的降解, 降低 A549 细胞的侵袭力, 从而抑制肿瘤细胞的转移活性。Res 对肿瘤侵袭、转移的抑制效应可能为肿瘤治疗提供新的选择^[22-23], 但其作用机制有待进一步研究明确。

[参 考 文 献]

- [1] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 337-342.
- [2] Hao HD, He LR. Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol [J]. *J Med Food*, 2004, 7(3): 290-298.
- [3] Delmas D, Lancon A, Colin D, et al. Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(4): 423-442.
- [4] 李云川, 季文越. 白藜芦醇抑制喉癌 Hep2 细胞体外生长的初步研究 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(9): 844-845.
- [5] 胜利, 安利峰, 何焯. 白藜芦醇抑制胆囊癌细胞生长与诱导细胞凋亡的实验研究 [J]. *中草药*, 2005, 28(6): 489-491.
- [6] Nakaqawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, et al. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(4): 258-264.
- [7] 唐旭东, 周尧元, 赵南. 白藜芦醇对鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 增殖和凋亡的影响 [J]. *中草药*, 2004, 35(3): 287-290.
- [8] Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, et al. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? [J]. *Mutat Res*, 2008, 658(1/2): 68-94.
- [9] Weng CJ, Yang YT, Ho CT, et al. Mechanisms of apoptotic effects induced by resveratrol, dibenzoylmethane, and their analogues on human lung carcinoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(12): 235-5243.
- [10] Zhou R, Fukui M, Choi HJ, et al. Induction of a reversible, non-

cytotoxic S-phase delay by resveratrol: Implications for a mechanism of lifespan prolongation and cancer protection [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(2): 462-474.

- [11] Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, et al. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 238.
- [12] Hudson TS, Hartle DK, Hursting SD, et al. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8396-8405.
- [13] Li T, Fan G, Wang W, et al. Resveratrol induces apoptosis, influences IL-6 and exerts immunomodulatory effect on mouse lymphocytic leukemia both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(9): 1221-1231.
- [14] Delmas D, Jannin B, Cherkaoui Malki M, et al. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(4): 847-852.
- [15] Kim YA, Choi BT, Lee YT, et al. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells [J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(2): 441-446.
- [16] Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, et al. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells [J]. *Blood*, 2003, 102(3): 987-995.
- [17] Liao PC, Ng LT, Lin LT, et al. Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells [J]. *J Med Food*, 2010, 13(6): 1415-1423.
- [18] Cockett MI, Murphy G, Birch ML, et al. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer [J]. *Biochem Soc Symp*, 1998, 63: 295-313.
- [19] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinase: Regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.
- [20] Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(1): 52-60.
- [21] Bourboulia D, Steller-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion [J]. *Semin Cancer Bio*, 2010, 20(3): 161-168.
- [22] Weng CJ, Wu CF, Huang HW, et al. Evaluation of anti-invasion effect of resveratrol and related methoxy analogues on human hepatocarcinoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(5): 2886-2894.
- [23] Atha M, Back JH, Kopelovich L, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 486(2): 95-102.

[收稿日期] 2011 - 12 - 10

[修回日期] 2012 - 01 - 25

[本文编辑] 王莹