

# 多西紫杉醇对人非小细胞肺癌细胞株 A549 生长的影响及机制的体外研究

★ 张艳霞<sup>1</sup> 丁伟荣<sup>2</sup> 肖祖克<sup>2\*</sup> (1. 南昌大学医学院 2006 级硕士研究生 南昌 330031; 江西省人民医院呼吸科 南昌 330006)

**摘要:**目的:探讨多西紫杉醇诱导肺癌细胞株 A549 细胞的生长抑制作用及其对凋亡相关基因表达的影响。方法:采用 MTT 法测定细胞增殖抑制率,在显微镜下观察细胞凋亡的形态特点,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法测定整合素  $\alpha_5\beta_1$ , bcl-2, bax 等凋亡相关基因 mRNA 的表达。结果:(1)多西紫杉醇在 1.33 ~ 108  $\mu\text{g/ml}$  浓度范围内可抑制 A549 细胞增殖,且此作用与药物浓度、作用时间呈明显相关关系( $r = 0.947, 0.979, P = 0.014, 0.004$ )。(2)4 ~ 36  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇作用 12 ~ 48 h, A549 细胞可见典型的凋亡形态学改变,且 A549 细胞凋亡率随药物浓度增加而升高,呈浓度依赖性( $r = 0.999, P = 0.034$ )。(3)RT-PCR 结果显示,多西紫杉醇可明显抑制 A549 细胞中表达  $\alpha_5$  整合素亚基基因,使其 bcl2/bax 比值明显降低,差异均有统计意义( $t = 10.147, 4.583, P = 0.01, 0.044$ )。但多西紫杉醇对 A549 细胞表达 VEGF、bFGF、 $\beta_1$  整合素亚基基因无明显影响( $P > 0.05$ )。结论:多西紫杉醇可抑制 A549 细胞增殖,诱导 A549 细胞凋亡,其机制是通过抑制 Bcl-2/Bax 表达比例诱导其凋亡,并可能抑制整合素  $\alpha_5\beta_1$  表达而影响 A549 细胞的增殖、黏附,以及转移能力。

**关键词:** A549 细胞株; 凋亡; 多西紫杉醇;  $\alpha_5\beta_1$  整合素; Bcl-2; Bax

中图分类号: R 734.2 文献标识码: A

## The Inhibitory effect of Docetaxel on the proliferation of human lung cancer cell A549 cells in vitro

ZHANG Yan-xia<sup>1</sup>, DING Wei-rong<sup>2</sup>, XIAO Zu-ke<sup>2</sup>

1. Nanchang University Medical College 2006 Grade Master, Nanchang 330031;

2. Jiangxi People's Hospital, Nanchang 330006

**Abstract:** Objective: To investigate the inhibition effect of Docetaxel on the proliferation of non-small cell lung cancer A549 cell and the corresponding mechanism. Methods: MTT assay was used to determine the proliferation inhibition by Docetaxel to A549 cell. Annexin-V kit was used to test the early apoptosis of A549 cells induced by Docetaxel. The late apoptotic cells were assessed by propidium iodide (PI) staining. Semi-quantitative RT-PCR was employed to measure the expression of VEGF, bFGF,  $\alpha_5$  intergrin submit,  $\beta_1$  intergrin submit, Bcl-2 and Bax. Results: The proliferation of A549 cells was inhibited significantly by Docetaxel in a concentration-dependent manner and in a time-dependent manner. Docetaxel apoptosis of A549 cells in a concentration-dependent manner ( $r = 0.999, P = 0.034$ ). The related level of Bcl-2/Bax and  $\alpha_5$  intergrin submit mRNA expression was markedly decreased in A549 cells treated with 12  $\mu\text{g/ml}$  Docetaxel for 24 hours than that in untreated cells ( $P < 0.05$ ), whereas the related expression levels of VEGF, bFGF and  $\beta_1$  intergrin submit mRNA was not significant between two groups ( $P > 0.05$ ). Conclusions: Docetaxel has the inhibition effect to the proliferation of non-small cell lung cancer A549 cell, and induce apoptosis. the suppressed expression of Bcl-2/Bax may be the mechanisms of apoptosis induction, and the suppressed expression of  $\alpha_5\beta_1$  intergrin submit may be influence the proliferation, adhesion and metastasis of non-small cell lung cancer.

**Key words:** Docetaxel; inhibitory action; human lung cancer cell A549;  $\alpha_5\beta_1$  intergrin; Bcl-2 Bax

肺癌是一种严重影响人类生命健康的疾病之一,目前已成为世上发病率和死亡率最高的恶性肿

瘤。近年来,随着我们大力治理环境,宣传禁烟,取得了一定的成效,但是,就世界范围而言,肺癌的发

\* 通讯作者:肖祖克(1963-),男,教授、主任医师,研究方向:呼吸系肿瘤介入治疗;E-mail:xiaozuke@126.com; Tel: 0791-6895975

病率正以每年 0.5% 的速度增长,我国的肺癌发病率也在持续增长。21 世纪,肺癌仍是全世界恶性肿瘤患者死亡的主要原因。近年来,多西紫杉醇已成为临床上治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的主要药物之一,并在耐药细胞的治疗中显示出巨大潜力。国外报道多西紫杉醇单药治疗 NSCLC 的有效率为 21%~33%,中位生存时间 9.2 个月<sup>[1]</sup>。本研究针对多西紫杉醇治疗肺癌的作用机理进行研究,为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1) 主要试剂:高糖 DMEM 培养液(GIBCO 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所),0.25% 胰酶(上海实生物细胞生物技术有限公司),二甲基亚砷(DMSO)(Promega 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT)(Solarbio 公司),艾素(多西紫杉醇)(湖北宏中药业有限公司),RNAiso plus(Takara 公司),逆转录试剂盒(RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit)(Fermentas 公司),Tap 酶(Takara 公司),100bp DNA Marker(Takara 公司),Tris 碱(上海实生物细胞生物技术有限公司),琼脂糖(基因技术有限公司),EDTA(乙二胺四乙酸二钠)(上海化学试剂有限公司),溴乙锭(EB,上海天成科技有限公司)。瑞特-姬姆萨染液(江西省人民医院骨髓室提供)。细胞凋亡试剂盒(BD 公司)。(2) 人肺癌 A549 细胞株购于南京凯基生物公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用常规培养,在含体积分数为 10% FCS 的高糖 DMEM 培养液、37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养,3~4 d 换液传代一次。取对数生长期细胞为实验对象。

1.2.2 A549 细胞增殖抑制率检测(MTT) 取对数生长期 A549 细胞,新鲜培养液洗涤后,种于含体积分数为 10% FCS 的高糖 DMEM 培养液中,以 1×10<sup>4</sup> 个细胞/ml 的终浓度接种于 96 孔培养板,然后加入不同浓度多西紫杉醇(对照组不加任何药物),每孔总体积 0.24 ml,分别处理 24、48、72 h,加 MTT 工作液 20 μl/孔(终浓度 0.5 mg/ml),置 37℃,体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h,小心吸去上清,加入二甲基亚砷 0.2 ml/孔,平板振荡器振荡 5 min。在酶标仪上测定 570 nm 波长处读取吸光度值(A)。实验重复 3 次,设复孔 5 个,取复孔平均值为相应的 A 值。细胞增殖抑制率=(对照孔 A 值-实验孔 A 值)/对照孔 A 值×100%。

1.2.3 细胞形态学观察 取经药物处理后的适量细胞,涂片凉干,瑞特-姬姆萨染色,光学显微镜油镜下观察并拍照。室温染色 5 min,用水轻轻洗去染

液,室温晾干。二甲苯浸泡 3 min 以除去杂质,使载玻片透明,最后用树脂封片;光学显微镜下观察细胞核形态。

1.2.4 细胞凋亡率测定 实验分多西紫杉醇组(含 4~36 μg/ml 多西紫杉醇的培养液)和空白对照组(不含多西紫杉醇的等量培养液,下同)。取生长旺盛细胞,先用 0.25% 胰蛋白酶消化,经吹打、收集、离心、制成 5×10<sup>5</sup>/ml 浓度细胞悬液。接种 24 孔板,5×10<sup>5</sup>/ml/孔,每组设 6 复孔;在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养细胞 24 h。吸弃原培养液,加入药物后,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养细胞 48 h。再用 0.25% 胰蛋白酶消化,经吹打、收集、离心,冷 PBS 洗细胞 2 次后,用 1 倍结合缓冲液重悬细胞(细胞浓度:1×10<sup>6</sup> 细胞/ml)。取 100 μl 重悬液(1×10<sup>5</sup> 细胞)到 5 ml 试管内;加 5 μl Annexin V 和 5 μl PI,轻轻混匀细胞,室温(25℃)暗室孵育 15 min。每管加 400 μl 1 倍结合缓冲液,1 h 内上流式细胞仪,检测细胞凋亡率。

1.2.5 RT-PCR 方法检测 A549 细胞凋亡相关基因、促血管新生基因及整合素 mRNA 表达水平 收集 1×10<sup>6</sup> 细胞,RNAiso plus 试剂盒一步法抽提细胞总 RNA,以紫外分光光度仪检测其浓度和纯度,A260/A280 比值均大于 1.8,经甲醛变性凝胶电泳证实为完整 RNA。取 2.0 μg RNA 经逆转录合成 cDNA。反应在 DNA 扩增仪进行。根据预实验的结果,内参照 GAPDH 循环参数为:95℃ 预变性 5 min,95℃、60℃ 和 72℃ 各 30 s,循环 25 次后,72℃ 延伸 10 min。甘油醛 3-磷酸脱氢酶基因(GAPDH)、血管内皮生长因子(VEGF)及 α<sub>5</sub> 整合素亚基、Bcl-2 的循环参数为:95℃ 预变性 5 min,95℃、60℃ 和 72℃ 各 30 s,循环 30 次(其中 GAPDH 循环 25 次,Bcl-2 循环 40 次)后,72℃ 延伸 10 min。检测碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、Bax、β<sub>1</sub> 整合素亚基时,循环参数为 94℃ 预变性 5 min,94℃、58℃ 和 72℃ 各 30 s,循环 30 次(其中 Bax 循环 38 次)后,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳。计算机扫描分析条带密度,根据目的基因与内参照 GAPDH 条带灰度比值计算 mRNA 的相对表达量。上述检测均重复 3 次。引物序列分别为:VEGF(280 bp):上游引物:5'-TTGCCTTGCTGCTCTACCTC-3';下游引物:5'-TGCATGGTGATGTTGGACTC-3'。bFGF(267bp)上游引物:5'-GCGACCCTCACATCAAGCTA-3';下游引物:5'-CTTTCTGCCAGGTCCTGTT-3'。β<sub>1</sub> 整合素亚基(209bp)上游引物:5'-CATCTGCGAGTGTGGTGTCT-3'下游引物:5'-GGGGTAATTTGTCCCGACTT-3'。α<sub>5</sub> 整合素亚基(225bp)上游引物:5'-GTGGGCC AACAAAGAACACT-3';下游引物:

5'-TGGAGCAGGCCCAAATATAG-3'。Bcl-2 (490bp) 上游:CTTTTGCTGTGGGGTTTTGT 下游:GTCATTCTGGCCTCTCTTGC。Bax(246bp) 上游引物:TTTGCTTCAGGGTTTCATCC 下游引物:CAGTTGAAGTTGC-CGTCAGA。GAPDH:(379bp) 上游引物:5'-ATG-GCACCGTCAAGGCTGAG-3' 下游引物:5'-GCAGT-GATGGCATGGACTGT -3'。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,常规进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。均数间比较采用 *t* 检验。相关分析采用 spearman 法。以  $P < 0.05$  为差别有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 多西紫杉醇对 A549 细胞增殖的影响

经不同浓度多西紫杉醇作用 48 h, A549 细胞生长抑制程度不同,呈浓度依赖关系( $r = 0.947, P = 0.014$ )。见图 1。12  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇作用 24、36、48、60、72 h 后, A549 细胞生长抑制率随着时间的延长而升高,多西紫杉醇对 A549 细胞增殖的抑制作用呈时间依赖性( $r = 0.979, P = 0.004$ )。见图 2。

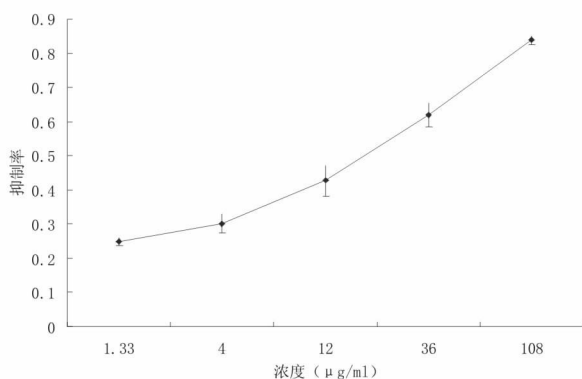


图 1 不同浓度多西紫杉醇对 A549 细胞增殖的影响

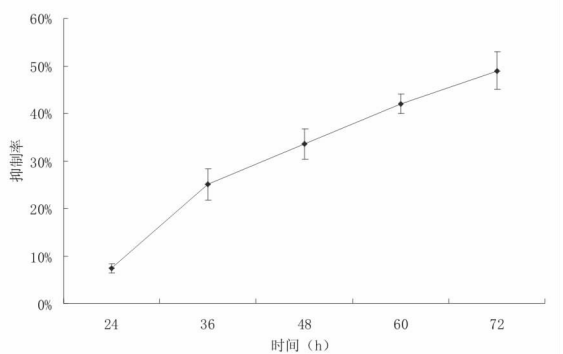


图 2 12  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇

随着作用时间的延长对 A549 细胞的影响

### 2.2 多西紫杉醇对 A549 细胞形态学的影响

将 4 ~ 36  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇与 A549 细胞共育

12 ~ 48 h, 可见凋亡细胞的典型形态学特征:早期表现为胞浆空泡化,继而细胞体积缩小,核染色质固缩,核边聚,染色质断裂,出芽,凋亡小体形成等;与细胞体积胀大、细胞膜破坏、有时可见呈网状的染色质结构的坏死细胞不同。

### 2.3 流式细胞仪检测多西紫杉醇对 A549 细胞致凋亡作用

4、12、36  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇作用 24 h 后, A549 细胞总凋亡率与对照组相比,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且 A549 细胞总凋亡率随药物浓度增加而升高,呈浓度依赖性( $r = 0.999, P = 0.034$ )。

表 1 多西紫杉醇对 A549 细胞凋亡的影响

	早期凋亡率(%)	晚期凋亡率(%)	总凋亡率(%)
对照组	1.66 ± 0.22	4.48 ± 1.10	6.13 ± 1.13
多西紫杉醇(4 $\mu\text{g/ml}$ )	3.40 ± 0.25	14.34 ± 1.06	17.74 ± 0.83
多西紫杉醇(12 $\mu\text{g/ml}$ )	2.23 ± 0.20	17.30 ± 2.03	19.52 ± 2.22
多西紫杉醇(36 $\mu\text{g/ml}$ )	3.14 ± 0.12	24.43 ± 2.17	26.66 ± 2.37

### 2.4 多西紫杉醇对 $\alpha_5$ 、 $\beta_1$ 整合素亚基、VEGF、bFGF、bcl-2 和 bax mRNA 表达的影响

与对照组相比,12  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇作用于 A549 细胞 24 h 后,  $\alpha_5$  整合素亚基、bcl2/bax 基因表达明显降低,差异有统计意义( $t = 10.147, 4.583, P = 0.01, 0.044$ )。但 VEGF、bFGF、 $\beta_1$  整合素亚基基因的 mRNA 与对照组相比表达无明显下降,差异无统计意义( $P > 0.05$ )。

表 2 多西紫杉醇对 A549 细胞整合素亚基基因 mRNA 表达的影响( $n = 3$ )

组别	药物	整合素亚基 mRNA 相对表达量平均值 ( $\bar{x} \pm sD$ )	
		$\alpha_5$ 整合素亚基	bcl2/bax
对照组	RPMI 1640	1.04 ± 0.14	1.07 ± 0.13
实验组	多西紫杉醇(4 $\mu\text{g/ml}$ )	0.74 ± 0.08	0.94 ± 0.12
实验组	多西紫杉醇(12 $\mu\text{g/ml}$ )	0.42 ± 0.09*	0.63 ± 0.04*
实验组	多西紫杉醇(36 $\mu\text{g/ml}$ )	0.28 ± 0.08*	0.54 ± 0.08*

注: \* 与相应对照组相比,  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

多西紫杉醇(Docetaxel, 商品名 Taxotere) 是以微管为靶点的抗肿瘤药物,它的前体是从欧洲紫杉的针叶中提取,经半合成而获得,属于细胞周期特异性药,作用于 M 期,能促进微管异常聚合并保持其稳定,从而抑制细胞有丝分裂时纺锤体形成以及微管的其他功能,导致肿瘤细胞死亡,具有较高的抗肿瘤活性。目前已广泛的应用于临床上肺癌,前列腺癌,乳腺癌,胃癌,结肠癌,卵巢癌,膀胱癌等癌症的治疗,其独特的抗癌作用机制引起了诸多领域的关注。临床研究发现,多西紫杉醇适用于使用以顺铂为主的化疗失败的晚期或转移性非小细胞肺癌的治疗,显著延长了患者的中位生存期,使疾病得到了缓解,且对铂类耐药者其有效率仍达 16% ~ 22% [2-3]。基础研究提示 [4], 该药还具有抗肿瘤血

管形成和诱导凋亡作用,但具体机制尚不明确。因此,研究多西紫杉醇通过何种机制发挥抗肿瘤细胞作用具有积极的意义。

研究显示,多西紫杉醇在 1.33 ~ 108  $\mu\text{g/ml}$  对非小细胞肺癌 A549 细胞的生长起抑制作用,随着药物浓度的增高,抑制作用越强,抑制率与药物浓度之间成量效关系,且随着时间的延长,多西紫杉醇对 A549 细胞的抑制率增高,故多西紫杉醇对 A549 肺癌细胞增殖的抑制作用呈时间依赖性。

细胞凋亡是由基因调控的主动死亡过程,是维持器官组织细胞数量稳定和内环境稳定的重要机制<sup>[5]</sup>。细胞凋亡调控失调是肿瘤组织过度生长的重要原因,促进细胞凋亡则有助于彻底治愈肿瘤<sup>[6~7]</sup>。4 ~ 36  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇与 A549 细胞共孵育 12 ~ 48 h,可见凋亡细胞的典型形态学特征:早期表现为胞浆空泡化,继而体积缩小,核染色质固缩,核边聚,染色质断裂,出芽,凋亡小体形成等。同时流式结果表明,随着多西紫杉醇药物浓度的增加,其凋亡率逐渐增高,呈浓度依赖性。上述研究结果提示,多西紫杉醇可能通过诱导细胞凋亡而抑制肺癌细胞增殖。

Bcl-2 家族的成员包括: Bcl-2/Bax, Bcl-xl/Bcl-xs, Bak 等,它们相互作用,参与细胞凋亡的调控,其中以 Bcl-2/Bax 的作用尤为重要<sup>[8]</sup>。Bcl-2 蛋白是抗凋亡的因素,它能抑制许多因素引起的细胞凋亡,而 Bax 过量表达则抑制 Bcl-2 功能而促进细胞凋亡<sup>[9~10]</sup>。体内 Bcl-2 和 Bax 以二聚体形式发挥作用,若 Bcl-2 同聚体形成则细胞存活,而当 Bcl-2 与 Bax 形成异二聚体时则抑制 Bcl-2 的抗凋亡功能。因此 Bax 与 Bcl-2 作为细胞凋亡通路上的两种重要基因,二者在细胞内的表达比例是决定细胞在体内受到某种刺激后是否发生凋亡的重要因素。联合检测二者的表达是判定非小细胞肺癌预后的重要因素。本研究表明 12  $\mu\text{g/ml}$  多西紫杉醇作用于 A549 细胞 24 h 后, Bcl-2/Bax 比值与对照组相比表达明显降低,差异有统计意义。提示,多西紫杉醇可能通过调控 Bcl-2/Bax 的比值诱导非小细胞肺癌 A549 细胞的凋亡。

整合素是广泛存在于细胞表面的一类细胞黏附分子,由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基单位形成跨膜异二聚体, $\alpha$  亚基的胞内域参与调节整合素与配体的特异性结合, $\beta$  亚基则与黏着斑的形成与信号转导有关<sup>[11]</sup>。整合素通过黏着斑激酶、整合素连接蛋白激酶和磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶信号转导通路,介导肿瘤细胞的信号转导、增殖、黏附、转移以及肿瘤血管的形成。Adachi 等<sup>[12]</sup> 研究表明,整合素  $\alpha_5\beta_1$  亚基在肺癌细胞中高度表达,与非小细胞肺癌的转移、浸润、低分

化趋向、肿瘤分级、患者的生存期密切相关,是非小细胞肺癌患者预后不良的危险因素。Oshita 等<sup>[13]</sup> 发现,在非小细胞肺癌组织中,整合素  $\alpha_5\beta_1$  是影响预后的最主要危险因素。本研究结果表明,多西紫杉醇抑制了肺癌 A549 细胞中整合素亚基  $\alpha_5$  的表达,而对整合素  $\beta_1$  亚基无影响。提示,多西紫杉醇可能通过抑制 A549 细胞表达整合素亚基  $\alpha_5$  而抑制 A549 细胞表达整合素  $\alpha_5\beta_1$ ,从而影响 A549 细胞的增殖、黏附,以及转移能力。

上述研究表明,多西紫杉醇可抑制非小细胞肺癌细胞株 A549 细胞增殖,其机制是通过抑制 Bcl-2/Bax 表达比例诱导其凋亡,并可能抑制整合素  $\alpha_5\beta_1$  表达而影响 A549 细胞的增殖、黏附,以及转移能力。但多西紫杉醇是否还有其他抗肿瘤作用机制,还需要我们进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] Van Oosterom A T. Docetaxel (taxotere) and gemcitabine phase I and early phase II studies: results to date and an overview of ongoing studies[J]. Semin Oncol, 1999, 26(3 Suppl10): 8-11.
- [2] Armand J P. Docetaxel (taxotere) in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) is there a role for a new chemotherapy program [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2000, 27(Suppl2): 223-230.
- [3] Robinet G, Thomas P, Perol M, et al. Phase II study of docetaxel in inoperable advanced non-small cell lung cancer [J]. Bull Cancer, 2000, 87(3): 253-258.
- [4] Gligorov J, Lotz J P. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences [J]. Oncologist, 2004, 9(Suppl2): 3-8.
- [5] Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B, et al. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies [J]. Adv Cancer Res, 2005, 94: 143-196.
- [6] Tsuruo T, Naito M, Tomida A, et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal [J]. Cancer Sci, 2003, 94(1): 15-21.
- [7] 王岳勇, 陈志涛, 何勇. 肾细胞癌中 survivin 基因的表达及其与细胞凋亡的关系 [J]. 实用医学杂志, 2006, 22(5): 489-490.
- [8] 钟声, 徐永健, 张珍祥. CC10 在苦参碱诱导的肺腺癌细胞凋亡中的表达 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2006, 35(1): 124-127.
- [9] Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281: 1322-1323.
- [10] Dinsdale D, Lee JC, Dewson G, et al. Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis [J]. Am J Pathol, 2004, 164: 395-407.
- [11] Boudreau NJ, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come [J]. Biochem J, 1999, 339(Pt3): 481-488.
- [12] Adachi M, Taki T, Higashiyama M, et al. Significance of integrin  $\alpha_5$  gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 96-101.
- [13] Oshita F, Kameda Y, Hamanaka N, et al. High expression of integrin  $\beta_1$  and p53 is a greater poor prognostic factor than clinical stage in small-cell lung cancer [J]. Am J Clin Oncol, 2004, 27: 215-219.

(收稿日期: 2008-11-04)