

• 论 著 •

三氧化二砷及紫杉醇对人结肠癌细胞 MTA1 mRNA 表达水平影响研究*

梁有卓, 陈灿锋

(广东省深圳市宝安区中心医院 518102)

摘要:目的 探讨三氧化二砷、紫杉醇对人结肠癌细胞 Caco-2 细胞株肿瘤转移相关基因 1(MTA1)mRNA 表达水平的影响。方法 采用噻唑兰(MTT)法检测不同浓度三氧化二砷、紫杉醇对 Caco-2 细胞生长的抑制率,采用逆转录实时定量聚合酶链反应检测 Caco-2 细胞 MTA1 mRNA 表达水平。结果 随着药物浓度升高,三氧化二砷、紫杉醇对 Caco-2 细胞生长的抑制率逐渐升高,MTA1 mRNA 表达水平则逐渐降低;药物对 Caco-2 细胞生长的抑制率与 MTA1 mRNA 表达水平呈负相关($r = -0.636, P < 0.05$)。结论 三氧化二砷、紫杉醇对 Caco-2 细胞生长的抑制作用,以及对 MTA1 mRNA 表达水平的调控作用具有浓度依赖性,对 Caco-2 细胞生长的抑制作用与 MTA1 mRNA 表达水平呈负相关。三氧化二砷、紫杉醇对 Caco-2 细胞生长的抑制作用可能与降低 MTA1 mRNA 表达水平有关。

关键词:三氧化二砷; 紫杉醇; 结肠癌; Caco-2 细胞; 转移相关基因 1

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1461-04

Effects of arsenic trioxide and paclitaxel on the expression level of MTA1 in Caco-2 cells*

LIANG Youzhuo, CHEN Canfeng

(Center Hospital of Baoan District, Shenzhen, Guangdong 518102, China)

Abstract:Objective To explore the effects of arsenic trioxide and paclitaxel on the expression level of metastasis-associated gene 1(MTA1) mRNA in Caco-2 cells. **Methods** Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay was performed to detect the inhibition rate of different concentrations of arsenic trioxide and paclitaxel on the growth of Caco-2 cells, reverse transcription real-time polymerase chain reaction was performed to detect the expression level of MTA1 mRNA. **Results** With the increasing of the concentrations of arsenic trioxide and paclitaxel, the inhibition rate increased, while the expression level of MTA1 mRNA decreased. The inhibition rate was negatively correlated with the expression level of MTA1 mRNA ($r = -0.636, P < 0.05$). **Conclusion** The effects of arsenic trioxide and paclitaxel on the growth of Caco-2 cells and the expression level of MTA1 mRNA could be with dosage-dependence, and the inhibition effects might be negatively correlated with the expression level of MTA1 mRNA.

Key words:arsenic trioxide; paclitaxel; colon cancer; Caco-2 cells; MTA1

结肠癌是常见恶性肿瘤之一,也是致死率较高的消化道肿瘤,患者 5 年生存率约为 75.1%^[1]。化疗、放疗、手术治疗结肠癌取得了很大的进步,但仍存在治疗后疾病复发及转移等问题,因此治愈率仍不理想。预防结肠癌肿瘤细胞远处转移是提高手术成功率和患者生存率的关键。体外研究显示,三氧化二砷与紫杉醇对结肠癌肿瘤细胞有明显的细胞毒作用^[2-3]。本研究分析了三氧化二砷与紫杉醇对结肠癌肿瘤细胞 Caco-2 细胞株转移相关基因 1(MTA1)mRNA 表达水平的影响,探讨二者对结肠癌细胞生长及增殖的抑制作用。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 三氧化二砷购自白云山制药厂。紫杉醇购自美国 Bristol-Myers Squibb 公司。Caco-2 细胞株购自中山大学医学实验室。DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、Trizol 试剂购自美国 Life Technology 公司。聚合酶链反应(PCR)引物与探针由中山大学达安基因有限公司合成。实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)分析仪购自美国 MJR 公司,荧光显微镜购自南京江南永新光学有限公司、全自动酶标仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及培养液制备 采用含 10% 胎牛血清、双抗生素(青霉素和链霉素)的 DMEM 培养基,5% CO₂、37℃ 条件下培养 Caco-2 细胞,每 2 天更换 1 次培养液,细胞覆盖培养皿底 70%~80% 时进行传代。制备 25、50、100、150、200、300、400 mg/mL 三氧化二砷培养液,分别命名为 A1、B1、C1、D1、E1、F1、G1 组培养液;制备 25、50、100、150、200、300、400 mg/mL 紫杉醇培养液,分别命名为 A2、B2、C2、D2、E2、F2、G2 组培养液。

1.2.2 噻唑兰(MTT)检测 将对数生长期 Caco-2 细胞按 0.5×10^6 个/孔接种于 96 孔板,培养 12 h 至细胞完全贴壁;分别加入不同的培养液:(1)A1、B1、C1、D1、E1、F1、G1 组培养液和二甲基亚砷(DMSO);(2)A2、B2、C2、D2、E2、F2、G2 组培养液和 DMSO。(3)加入同量 DMEM 培养基的细胞培养孔作为对照组。每个组别设 5 个重复试验孔。继续培养 24 h;加入 MTT,培养 4 h 后终止培养,充分溶解结晶。采用全自动酶标仪,570 nm 处检测各孔吸光度(A)值,测量 3 次,计算平均值及抑制率。抑制率 = $1 - (\text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ ^[4]。

1.2.3 MTA1 mRNA 表达水平检测 将对数生长期 Caco-2 细胞按 0.5×10^6 个/孔接种于 96 孔板,培养 12 h 至完全贴壁;分别加入不同的培养液:(1)A1、B1、C1、D1、E1、F1、G1 培养

* 基金项目:广东省深圳市宝安区社会公益项目(2015118)。

作者简介:梁有卓,男,主管技师,主要从事临床检验医学研究。

液；(2) A2、B2、C2、D2、E2、F2、G2 培养液。(3) 加入同量 DMEM 培养基的细胞培养孔作为对照组。每个组别设 5 个重复试验孔。培养 24 h 后,提取细胞 RNA,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增目的基因,采用 FQ-PCR 分析仪检测 Ct 值。MTA1

mRNA 表达水平按 2-Ct 计算,Ct=CtT-CtP,CtT 为实验组平均 Ct,CtP 为 β-肌动蛋白(β-actin)内参平均 Ct。β-actin 及 MTA1 扩增引物序列见表 1^[5-6]。

表 1 β-actin 及 MTA1 扩增引物序列

靶序列	上游引物	下游引物
β-actin	5'-TGG CAC CCA CAA TGA A-3'	5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'
MTA1	5'-CGG CAT CCA TGC TGC TCT TA-3'	5'-ACT GGT CGA TCT GCT TGT CTG TG-3'

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Lsd-*t* 检验。相关性分析采用 Spearman 相关分析,计算相关系数(*r*)。P<0.05 为比较差异或分析参数有统计学意义。

2 结 果

2.1 Caco-2 细胞抑制率 随着三氧化二砷、紫杉醇培养液浓度增加,对 Caco-2 细胞的抑制率不断升高。多组间比较结果显示,不同浓度三氧化二砷培养液对 Caco-2 细胞的抑制率比较差异有统计学意义($F=26.491, P<0.05$);两两比较结果显示,25 mg/mL 与 50 mg/mL、50 mg/mL 与 100 mg/mL 三氧化二砷培养液对 Caco-2 细胞的抑制率比较差异无统计学意义($P>0.05$),其余浓度组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。多组间比较结果显示,不同浓度紫杉醇培养液对 Caco-2 细胞的抑制率比较差异有统计学意义($F=31.419, P<0.05$);两两比较结果亦证实不同浓度紫杉醇培养液对 Caco-2 细胞的抑制率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。不同浓度三氧化二砷、紫杉醇培养液对 Caco-2 细胞的抑制率见表 2。

表 2 不同浓度三氧化二砷、紫杉醇培养液组 Caco-2 细胞抑制率

组别	浓度(mg/mL)	抑制率(%)
对照组	0	0
三氧化二砷组	25	27.5±2.4
	50	30.9±3.9
	100	35.8±4.1
	150	40.7±3.6
	200	46.8±3.9
紫杉醇组	300	52.9±4.3
	400	63.7±5.2
	25	19.7±2.9
	50	30.6±3.7a
	100	39.9±4.3
	150	50.8±4.9
	200	71.6±5.1
	300	79.3±6.2
	400	86.5±6.4

2.2 MTA1 mRNA 表达水平 随着三氧化二砷、紫杉醇浓度升高,MTA1 mRNA 表达水平逐渐降低。多组间比较结果显示,不同浓度三氧化二砷培养液组 MTA1 mRNA 表达水平比

较差异有统计学意义($F=14.491, P<0.05$);两两比较结果显示,25 mg/mL 与 50 mg/mL、25 mg/mL 与 100 mg/mL、50 mg/mL 与 100 mg/mL、100 mg/mL 与 150 mg/mL、50 mg/mL 与 150 mg/mL、150 mg/mL 与 200 mg/mL、200 mg/mL 与 300 mg/mL、300 mg/mL 与 400 mg/mL 浓度组比较差异无统计学意义($P>0.05$),其余浓度组两两比较比较有统计学意义($P<0.05$)。多组间比较结果显示,不同浓度紫杉醇培养液组 MTA1 mRNA 表达水平比较差异有统计学意义($F=18.419, P<0.05$);两两比较结果显示,25 mg/mL 与 50 mg/mL、25 mg/mL 与 100 mg/mL、50 mg/mL 与 100 mg/mL、50 mg/mL 与 150 mg/mL、100 mg/mL 与 150 mg/mL、100 mg/mL 与 200 mg/mL、150 mg/mL 与 200 mg/mL、200 mg/mL 与 300 mg/mL、300 mg/mL 与 400 mg/mL 浓度组比较差异无统计学意义($P>0.05$),其余浓度组两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。不同浓度三氧化二砷、紫杉醇培养液组 MTA1 mRNA 表达水平见表 3。

表 3 不同浓度三氧化二砷、紫杉醇培养液组 MTA1 mRNA 表达水平

组别	浓度(mg/mL)	MTA1 mRNA 表达水平
对照组	0	0.53±0.04
三氧化二砷	25	0.46±0.14
	50	0.41±0.17
	100	0.38±0.13
	150	0.33±0.09
	200	0.26±0.10
	300	0.21±0.08
	400	0.16±0.07
紫杉醇	25	0.49±0.15
	50	0.42±0.13
	100	0.35±0.14
	150	0.29±0.10
	200	0.22±0.09
	300	0.17±0.05
	400	0.12±0.04

2.3 Caco-2 细胞抑制率与 MTA1 mRNA 表达水平相关性 以对照组及三氧化二砷、紫杉醇不同浓度组 Caco-2 细胞抑制率为横坐标,以相应的 MTA1 mRNA 表达水平作为纵坐标,绘制散点图(见图 1),计算回归曲线方程及 *r*,结果显示 Caco-2 细胞抑制率与 MTA1 mRNA 表达水平呈负相关($r=-0.636$,

$P < 0.05$)。

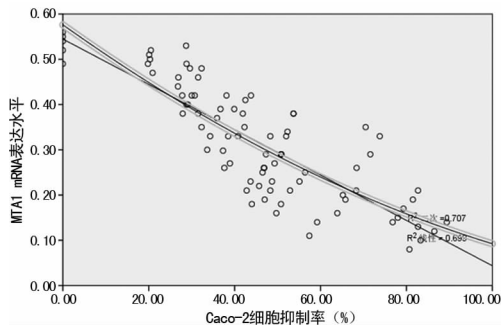


图 1 Caco-2 细胞抑制率与 MTA1 mRNA 表达水平相关性

3 讨 论

虽然化疗、放疗、手术治疗结肠癌的疗效取得很大进步,但受到肿瘤细胞远处转移的影响,治愈率仍较低。因此,预防结肠癌肿瘤细胞远处转移是提高治愈率和患者生存率的关键。

体内及体外研究均证实,三氧化二砷可抑制多种肿瘤细胞的生长,对肺癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌等具有良好的治疗效果^[6-9]。三氧化二砷作用机制在于阻滞细胞周期,抑制细胞生长,最终导致细胞凋亡。紫杉醇主要成分为二萜类生物碱,可诱导肿瘤细胞自噬,因此具有较佳的肿瘤治疗效果,广泛应用于肺癌、卵巢癌、消化道肿瘤等疾病治疗。但紫杉醇对正常细胞也具有一定的毒性作用,可导致不同程度的不良反应,因此有必要在研究如何提高其疗效的同时降低其毒性作用^[10-11]。

本研究结果显示,三氧化二砷、紫杉醇对 Caco-2 细胞生长具有良好的抑制作用,且随着药物浓度增加,对细胞的抑制率逐渐升高。有研究显示,三氧化二砷、紫杉醇通过下调 MTA1 基因表达,发挥对结直肠癌细胞周期的调控作用和生长抑制作用,从而抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡。MTA1 是肿瘤转移相关基因之一,表达水平与乳腺癌、肝癌、肺癌、子宫内膜癌、大肠癌和结肠癌等的浸润、转移密切相关。多数恶性肿瘤组织均可检出 MTA1 高表达,如乳腺癌、胰腺癌、肝癌、大肠癌和结肠癌等。MTA1 基因编码蛋白的相对分子质量为 82×10^3 ,由 715 个氨基酸组成,包括多个酪氨酸激酶、蛋白激酶 C 磷酸化位点,因此可通过影响信号转导途径发挥功能。MTA1 蛋白促进细胞恶性转化及转移的分子机制可能与组蛋白去乙酰化转录调控有关。组蛋白在细胞生长、增殖和分化过程具有基因“开关”作用,错误开启或关闭某些基因的表达将导致细胞恶性转化;在肿瘤细胞转移过程中,组蛋白对细胞间黏附力,黏附分子、细胞骨架蛋白表达,以及新生血管、淋巴管形成等具有肿瘤调控作用^[12-13]。饶玉梅等^[14]的研究证实,MTA1 基因过表达可促进人宫颈癌细胞 HeLa 细胞转移、侵袭和黏附,上调 β -链蛋白(β -catenin)、基质金属蛋白酶(MMP)-9 表达水平。杨春等^[15]的研究证实,MTA1 及 MMP-2 高表达与肝癌细胞生长及浸润转移有关,在肝细胞癌发生、发展及术后复发等方面具有重要作用。程建国等^[16]的体外研究证实,转染 MTA1 特异性 siRNA 质粒可抑制肝癌细胞 MTA1 的表达及肝癌细胞的生长,并促进其凋亡。本研究中的相关性分析结果显示,三氧化二砷及紫杉醇对 Caco-2 细胞生长的抑制率与 MTA1 mRNA 表达水平呈负相关,提示 MTA1 mRNA 表达水平越高,药物对 Caco-2 细胞生长的抑制效果越弱,MTA1 mRNA 表达水平越低,抑制效果越强。然而,目前对 MTA1 与肿瘤细胞转移、分化、浸润的相关性研究多为基础研究,尚缺乏临床研究证实抑制 MTA1 表达的基因疗法可用于癌症的一线治疗。

综上所述,三氧化二砷、紫杉醇对结肠癌 Caco-2 细胞生长具有良好的抑制作用,药物浓度越高,抑制效果越明显。三氧化二砷、紫杉醇对 Caco-2 细胞生长的抑制作用可能与调节 MTA1 mRNA 表达水平有关。三氧化二砷、紫杉醇抑制 MTA1 表达的具体机制尚未明确,有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] 杨林,王金万,张弘刚,等. 196 例结肠癌术后辅助化疗疗效和预后因素分析[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(7): 368-371.
- [2] 王丹,朱开梅,顾生玖. 联合应用三氧化二砷与紫杉醇诱导小鼠结肠癌 CT26 细胞凋亡及其机制研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2013, 47(4): 324-328.
- [3] 钟玲,李思齐,杨蔚,等. 转铁蛋白受体介导紫杉醇纳米粒对结肠癌细胞的靶向性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 24(5): 23-25, 29.
- [4] 王丽,杨宾烈,郝星,等. 紫杉醇对卵巢癌细胞作用的浓度依赖性及其机制探讨[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2008, 37(2): 236-238, 250.
- [5] 高冬玲,陈奎生,赵志华,等. 食管鳞状细胞癌组织中 MTA1 和 E-cadherin 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2007, 42(6): 1028-1030.
- [6] Chiu HW, Chen YA, Ho SY, et al. Arsenic trioxide enhances the radiation sensitivity of androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31579.
- [7] Thomas-Schoemann A, Batteux F, Mongaret C, et al. Arsenic trioxide exerts antitumor activity through regulatory T cell depletion mediated by oxidative stress in a murine model of colon cancer[J]. J Immunol, 2012, 189(11): 5171-5177.
- [8] Chen G, Wang K, Yang BY, et al. Synergistic antitumor activity of oridonin and Arsenic trioxide on hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2012, 40(1): 139-147.
- [9] Gupta SC, Hevia D, Patchva S, et al. Upsides and downsides of reactive Oxygen species for cancer: the roles of reactive Oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy[J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 16(11): 1295-1322.
- [10] Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemonaive non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations(NEJ002)[J]. Ann Oncol, 2013, 24(1): 54-59.
- [11] Parhi P, Mohanty C, Sahoo SK. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(17/18): 1044-1052.
- [12] 蔡胜艳,许文雷,刘孝琴. 乳腺癌 64 排 CT 表现与 cerbB-2 表达的关系[J]. 医疗卫生装备, 2012, 33(8): 78-79.
- [13] Nicolson GL, Nawa A, Toh Y, et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(1): 19-24.

- cal testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(16): 2784-2795.
- [5] Naiara GB, Elena B, Borja C, et al. Luminal B breast cancer subtype displays a dicotomic epigenetic pattern[J]. Springer Plus, 2016, 5(1): 1-10.
- [6] Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, et al. Prognostic significance of Ki-67 index value at the primary breast tumor in recurrent breast cancer[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(6): 1062-1068.
- [7] Wolff AC, Hammond M, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer; American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(31): 3997-4002.
- [8] Nishimura R, Osako T, Okumura Y, et al. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer[J]. Exp Ther Med, 2010, 1(5): 747-754.
- [9] Ohara M, Matsuura K, Akimoto E, et al. Prognostic value of Ki67 and p53 in patients with estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer; validation of the cut-off value of the Ki67 labeling index as a predictive factor[J]. Mol Clin Oncol, 2016, 4(4): 648-654.
- [10] Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients[J]. Breast, 2009, 18(2): 135-141.
- [11] Li H, Han X, Liu Y, et al. Ki67 as a predictor of poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer[J]. Oncol Lett, 2015, 9(1): 149-152.
- [12] Brown M, Tsodikov A, Bauer KR, et al. The role of human epidermal growth factor receptor 2 in the survival of women with estrogen and progesterone receptor-negative, invasive breast cancer; the California Cancer Registry, 1999-2004[J]. Cancer, 2008, 112(4): 737-747.
- [13] Bauer KR, Brown M, Cress RD, et al. Descriptive analysis of estrogen receptor(ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry [J]. Cancer, 2007, 109(9): 1721-1728.
- [14] Siziopikou KP, Cobteigh M. The basal subtype of breast carcinomas May represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies [J]. Breast, 2007, 16(1): 104-107.
- [15] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer; clinical features and patterns of recurrence [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(15): 4429-4434.
- [16] Crisostomo J, Matafome P, Santos-Silva D, et al. Hyperresistinemia and metabolic dysregulation; a risky crosstalk in obese breast cancer [J]. Endocrine, 2016, 53(2): 433-442.
- [17] Chen MJ, Wu WY, Yen AM, et al. Body mass index and breast cancer; analysis of a nation-wide population-based prospective cohort study on 1393985 Taiwanese women [J]. Int J Obes (Lond), 2016, 40(3): 524-530.
- [18] Bandala C, Garza-Montano LP, Cortes-Algara A, et al. Association of histopathological markers with clinicopathological factors in Mexican women with breast cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(18): 8397-8403.
- [19] Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 [J]. Ann Oncol, 2013, 24(9): 2206-2223.
- [20] Nielsen TO, Cheang MC, Chia SK, et al. Re: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(24): 1730-1734.
- [21] Klauschen F, Wiener TS, Schmitt WD, et al. Standardized Ki67 diagnostics using automated Scoring-Clinical validation in the GeparTrio breast cancer study [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(16): 3651-3657.
- [22] Jackisch C, Harbeck N, Jens H, et al. 14th St Gallen International Breast Cancer Conference [J]. Breast Cancer, 2015, 10(3): 211-219.
- [23] Haroon S, Hashmi AA, Khurshid A, et al. Ki67 index in breast cancer; correlation with other prognostic markers and potential in Pakistani patients [J]. Asian Pacific J Cancer Prevent, 2013, 14(7): 4353-4358.

(收稿日期: 2017-01-22 修回日期: 2017-03-18)

(上接第 1463 页)

- [14] 饶玉梅, 王鸿雁, 范良生, 等. MTA1 通过 β -catenin、MMP-9 调节 HeLa 细胞粘附、侵袭、转移[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2011, 40(1): 32-36.
- [15] 杨春, 张立洁, 吴飞翔, 等. 肝细胞癌组织 MTA1 和 MMP-2 表达及其相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(1): 55-57.
- [16] 程建国, 霞明, 文峰. MTA1 靶向 RNA 干扰对人肝癌 HepG2 细胞生物学行为影响的研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1824-1826.

(收稿日期: 2017-01-05 修回日期: 2017-03-12)