

· 论著 ·

Wentilactone A 抑制小细胞肺癌系 NCI-H1688 细胞的迁移研究

姜文丽, 黄才国 (第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 探讨小分子化合物 Wentilactone A (WA)抑制小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC)细胞系 NCI-H1688 细胞迁移的机制。**方法** 采用划痕实验、噻唑蓝 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 实验检测小分子化合物 WA 对细胞迁移和增殖能力的影响。免疫荧光实验检测化合物 WA 作用后 SCLC 细胞系 NCI-H1688 细胞中 ATF3 蛋白的表达。Western blot 验证 ATF3/Nrf2/AKR1C1 信号通路的关键蛋白。**结果** 小分子化合物 WA 抑制 SCLC 细胞系 NCI-H1688 细胞的迁移和增殖,加入化合物 WA 24 h 组与 48 h 组的 IC₅₀ 分别为 (1.03±0.30)和 (0.46±0.18) μmol/L。WA 作用组 NCI-H1688 细胞的相对迁移距离为 (8.73±1.06) mm,低于对照组的 (15.63±3.11) mm,过表达 AKR1C1 基因后 NCI-H1688 细胞迁移距离为 (24.37±0.90) mm,过表达 AKR1C1 基因并且 WA 作用后 NCI-H1688 细胞的迁移距离为 (14.17±1.31) mm,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。ATF3 是 AKR1C1 基因的负性调节因子,化合物 WA 作用后,ATF3 蛋白表达水平升高,抑制 Nrf2 与 ARE 结合,从而抑制 AKR1C1 蛋白的表达。**结论** WA 通过 ATF3/Nrf2/AKR1C1 信号通路抑制 SCLC 细胞系 NCI-H1688 细胞的迁移和增殖。

[关键词] Wentilactone A; 小细胞肺癌; 迁移; 增殖

[中图分类号] R965;R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)03-0219-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.007

Wentilactone A inhibition of migration of small cell lung carcinoma NCI-H1688 cell line

JIANG Wenli, HUANG Caiguo (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Basic Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate mechanism of Wentilactone A (WA) inhibition of small cell lung cancer (SCLC) cell line NCI-H1688 migration. **Methods** The migration and proliferation were analyzed by wounding-healing assay and MTT assay [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]. Immunofluorescence was used to confirm the expression of ATF3 protein after WA treatment. Western blot was used to examine the expression of key proteins in ATF3/Nrf2/AKR1C1 signal pathway. **Results** WA inhibits the proliferation and migration of SCLC. MTT analysis showed WA inhibits the proliferation of NCI-H1688 cell line in a time-dependent manner. The number of migrated cells in WA treatment group was (8.73±1.06) mm, which was lower than that of control group (15.63±3.11) mm, The number of migrated cells in AKR1C1 expression group was (24.37±0.90) mm, the number of migrated cells in AKR1C1 expression and WA treatment group was (14.17±1.31) mm, with significant difference ($P<0.05$). WA enhances the nuclear expression of ATF3, and then reduces the expression of p-Nrf2 and AKR1C1. **Conclusion** WA inhibits the proliferation and migration of SCLC through ATF3/Nrf2/AKR1C1 signal pathway.

[Key words] Wentilactone A; SCLC; migration; proliferation

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,已成为我国恶性肿瘤死亡的首要原因,肺癌发病率逐年增加,已占全身各种恶性肿瘤的 20%,病死率为

24%^[1],且呈逐年上升趋势,其发生与人口老龄化、环境污染、城市工业化及不良生活方式有关^[2]。临床-病理分型将肺癌分为小细胞肺癌 (small cell lung carcinoma, SCLC) 和非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC)。其中,NSCLC 包括肺鳞癌、肺腺癌、大细胞肺癌等,占肺癌患者总数的 80%~85%,与 SCLC 相比,NSCLC 细胞生长分裂较慢,扩散转移相对较晚,5 年生存率约为 20%; SCLC 占肺癌患者的 15%~20%,进程快,生物学行

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (41576160,81473239)

[作者简介] 姜文丽,硕士研究生。Tel:13122039761;E-mail:jwlsally@163.com

[通讯作者] 黄才国,教授。研究方向:海洋药物。Tel:13003158543;E-mail:huangcaig@hotmai.com

为恶劣,恶性程度高,具有侵袭性、高复发性及生长迅速的特点,确诊时多为中晚期,5 年生存率 < 10%^[3]。

NSCLC 患者数量多,治愈率相对较高,相比手术、放疗、化疗等传统的治疗方式,分子靶向治疗及免疫治疗具有疗效好、不良反应少的优点,是目前国内外研究的热点;对于 SCLC,由于其进程快、恶性程度高、转移早、难以手术治疗等原因,临床和基础研究相对较少。目前治疗 SCLC 通常以放疗和化疗为主,但相应的化疗药物少、毒副作用大,生存率低,新的靶向药物对 SCLC 的疗效也不尽理想^[4-7]。综上所述,研发疗效好、毒副作用小的 SCLC 化疗药物,特别是分子靶向治疗药物意义重大。本研究采用划痕实验、MTT 实验、Western blot、免疫荧光实验研究化合物 WA 通过抑制 AKR1C1 基因,从而抑制 SCLC 细胞系 NCI-H1688 细胞迁移和增殖的机制。

1 材料

1.1 仪器 CKX41 倒置相差显微镜购自 Olympus 公司;CF15RX 台式离心机购自日本 Himac 公司;HERACELL 150i 细胞培养箱购自 Thermo 公司。

1.2 细胞及试剂 人 SCLC 细胞株 NCI-H1688 购自中国科学院上海分院,于含双抗、10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基与 5% 饱和湿度、37 °C 的培养箱中培养。细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天公司。AKR1C1 多克隆抗体、ATF3 多克隆抗体、Nrf2 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测化合物的 IC₅₀ 值 将 H1688 细胞接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,依次加入 0、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L WA,分别于 24、48 h 后加入 10 μl MTT 工作液,避光 37 °C 孵育 4 h,移去孔中的培养基,加入 150 μl DMSO,于平衡脱色摇床上震荡 10 min,酶标仪(570 nm 波段)测量各孔吸光度(A),计算细胞存活率。细胞存活率=(化合物组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值),实验重复 3 次。

2.2 慢病毒转染 ①NCI-H1688 细胞分别转染含有 AKR1C1 shRNA 和阴性对照 shRNA 的慢病毒组,含有 AKR1C1 cDNA 过表达载体和阴性对照的慢病毒组,实验分为 AKR1C1 干扰组、AKR1C1 过表达组、阴性对照组和空白对照组。②慢病毒转染:选取对数生长期的 NCI-H1688 细胞,用 RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清)稀释制备 10×10⁴ 个/ml 的

细胞悬液;加入 24 孔板,每孔 500 μl;24 h 后更换培养基,加入 60 μl 病毒,混匀,继续培养以得到稳转株。

2.3 划痕实验 选取对数生长期的 NCI-H1688 细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基制备 10×10⁴ 个/ml 的细胞悬液;6 孔板上,每孔 2 ml 细胞悬液,24 h 后用 200 μl 规格的枪头划痕,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养 48 h,于显微镜下拍照,随机选用 3 个视野;测量细胞迁移的距离,重复 3 次实验,取平均值。

2.4 Western blot 检测蛋白表达用含磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液提取细胞的总蛋白,用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,取 8 μl 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC)上,再用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,加入相应的一抗工作液(GAPDH 1:1 000, ATF3 1:1 000, Nrf2 1:1 000, AKR1C1 1:1 000),4 °C 摇床孵育,过夜,孵育二抗 1.5 h,加发光液显色,伯乐凝胶成像仪显色观察。

2.5 免疫荧光检测目的蛋白表达 将细胞接种到放有灭菌的盖玻片的培养皿中,细胞融合度达到 80% 后取出盖玻片,在 PBS 中洗 2 次,用多聚甲醛固定细胞,封闭液封闭 30 min,用一抗 4 °C 孵育过夜,室温避光孵育二抗 1 h,用封片剂封片,荧光显微镜下观察。

2.6 统计学方法 实验数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件处理,用 ANOVA 方差分析进行差异的显著性检验。

3 结果

3.1 化合物 WA 抑制 SCLC 细胞系 NCI-H1688 细胞的增殖和迁移 MTT 实验显示,WA 作用 24 h 组与 48 h 组的 IC₅₀ 值分别是(1.03±0.30)和(0.46±0.18) μmol/L,见图 1;Western blot 实验验证慢病毒转染结果,见图 2;划痕实验显示,化合

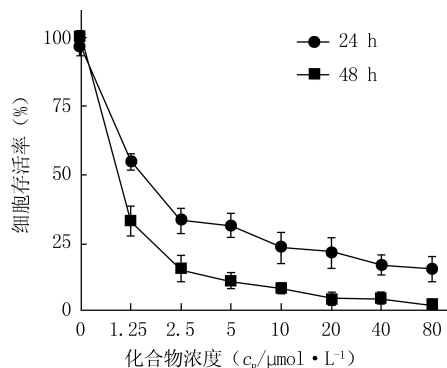


图 1 WA 对细胞增殖的影响

物 WA 能有效抑制 NCI-H1688 细胞的迁移, WA 作用组 NCI-H1688 细胞迁移相对距离为 (8.73 ± 1.06) mm, 低于对照组的 (15.63 ± 3.11) mm; 过表达 AKR1C1 基因后, NCI-H1688 细胞迁移相对距离为 (24.37 ± 0.90) mm, 过表达 AKR1C1 基因并且 WA 作用后, NCI-H1688 迁移的相对距离为 (14.17 ± 1.31) mm; 干扰 AKR1C1 基因后, NCI-H1688 细胞迁移的相对距离为 (7.17 ± 0.84) mm, 干扰 AKR1C1 基因后, WA 作用, NCI-H1688 细胞

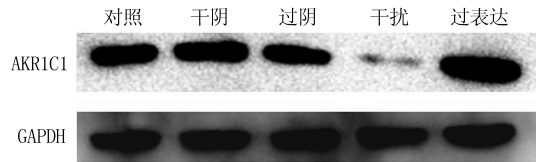


图2 慢病毒转染效率

迁移的相对距离为 (3.5 ± 1.07) mm, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图3。

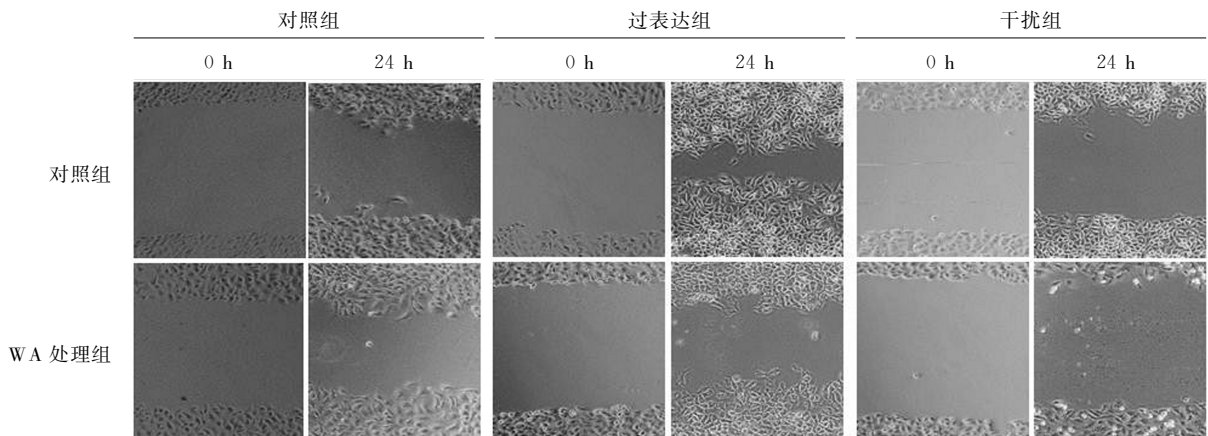


图3 WA对细胞迁移的影响

3.2 化合物 WA 激活 ATF3/Nrf2/AKR1C1 信号通路 Western blot 结果显示, 加入化合物 WA 后, ATF3 蛋白表达水平明显上升, p-Nrf2 和 AKR1C1 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$), 见图4。

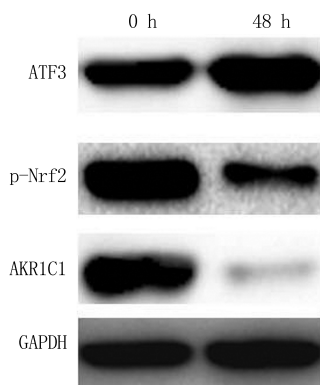


图4 WA作用后蛋白表达的 Western blot 检测

3.3 化合物 WA 促进 ATF3 蛋白表达和入核 免疫荧光实验结果显示, 化合物 WA 作用后 ATF3 蛋白核内表达量增加 ($P < 0.05$), 见图5。

4 讨论

醛酮还原酶家族 (aldo-keto reductase, AKRs) 是一个超级家族, 它们参与氧化还原反应。其中, 家

族1 (AKR1Cs) 有4个亚型, 分别是 AKR1C1、AKR1C2、AKR1C3、AKR1C4, 它们是活性和非活性形式之间转换的甾体激素酶, 以这种方式参与类固醇激素的代谢^[8-10]。因此, 它们是激素依赖性癌症如: 前列腺癌、乳腺癌和子宫内膜癌等疾病的重要新兴药物靶点^[11-13]。近年来, AKR1Cs 与肿瘤的发生、发展、预后及耐药的关系成为新的研究热点。特别是 AKR1C1, 由于其在肠癌、肺癌、胃癌及肝癌中的异常高表达早已得到证实, 因此具有很高的研究价值^[4,9,14,15]。Nrf2 是转录因子 NF-E2 相关因子 2, 它与 AKR1Cs 之间的联系也早已证实^[16]。Nrf2 沉默的癌细胞中, AKR1Cs 的蛋白表达水平显著降低; Nrf2 激动剂处理, 细胞 AKR1C1、AKR1C2、AKR1C3 的蛋白表达水平显著升高; Nrf2 激活后, 其核转移增加, 导致 AKR1Cs 过表达, 若相反, 则 AKR1Cs 表达下降^[17-19]。Brown 等报道, 激活转录因子 3 (ATF3) 是一种 Nrf2-ARE 的阻碍物, ATF3 与 Nrf2 形成异二聚体, 可减弱 CBP 与 ARE 及 Nrf2 的相互作用^[20]。由于 CBP 是 CREB-结合蛋白, 能与 Nrf2 的 2 个转录激活域相互作用, 具有激活 Nrf2 转录活性的功能, 所以 CBP 与 ARE 及 Nrf2 的相互作用减弱, 导致 Nrf2 转录活性降低, 从

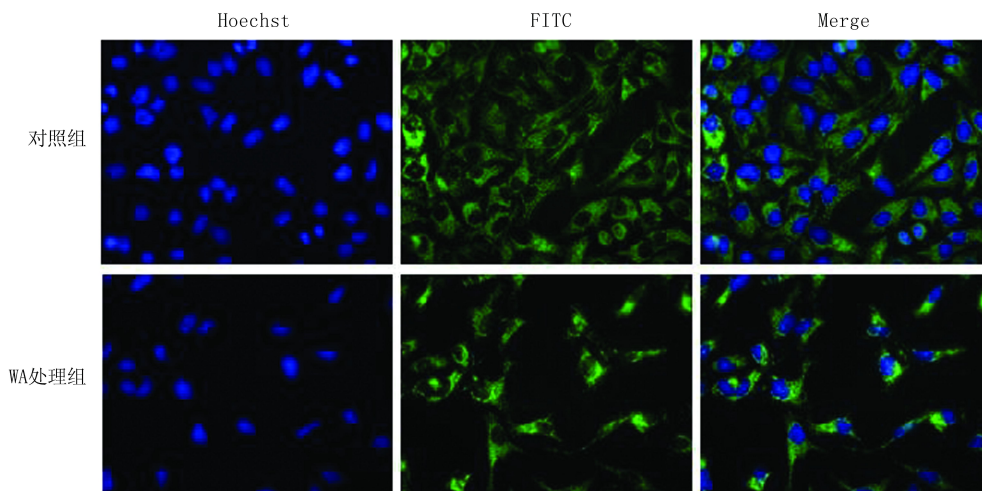


图5 WA作用后ATF3蛋白表达的免疫荧光检测

而导致受其调控的下游相关抗氧化酶基因表达降低,抑制癌细胞增殖^[20]。因此,ATF3在肿瘤形成过程中发挥关键作用。

肿瘤的发生、发展与癌细胞的增殖和侵袭能力增强有关,前期研究结果显示,AKR1C1在NSCLC中高表达,并且促进NSCLC的迁移和侵袭能力^[21]。本研究中首次发现,小分子化合物WA能抑制SCLC中AKR1C1基因的表达,为了研究AKR1C1在SCLC细胞系NCI-H1688细胞中的具体功能,我们利用慢病毒转染技术使NCI-H1688细胞中AKR1C1蛋白的表达水平改变,观察AKR1C1蛋白表达水平改变后,NCI-H1688细胞的增殖和迁移能力是否发生变化,进一步研究加入WA后,SCLC细胞系NCI-H1688细胞的增殖和迁移能力是否改变。在划痕实验中,与对照组相比,AKR1C1基因过表达组的相对迁移距离增加,AKR1C1基因干扰组的相对迁移距离减少,化合物WA作用能减少过表达组和干扰组的迁移距离。MTT实验结果显示,WA能抑制NCI-H1688细胞的增殖。免疫荧光实验结果显示,WA作用后ATF3蛋白表达水平升高,并且核内表达量也升高;Western blot结果显示,化合物WA激活了ATF3蛋白的表达,同时抑制了活化的Nrf2和AKR1C1蛋白的表达。以上结果均表明:化合物WA能抑制AKR1C1基因表达,AKR1C1基因被干扰后,肿瘤细胞的迁移能力明显减弱,即AKR1C1是一个促进SCLC细胞系NCI-H1688迁移的蛋白。

肿瘤细胞的转移是SCLC治疗失败并最终导致患者死亡的主要原因。对SCLC分子靶向治疗的研究,最终目的是找到可以抑制肿瘤转移的靶点,放

疗、化疗是SCLC治疗的重要手段,但常规双药含铂的治疗方案容易出现耐药现象。AKR1C1是二相药物代谢酶,与化疗药物耐受有关,包括阿霉素、柔红霉素和顺铂等。本研究结果表明,小分子化合物WA能够抑制AKR1C1基因表达,可以在抑制SCLC转移能力的同时,增加SCLC患者对常规化疗药物的敏感性,推迟疾病进展,这为临床上SCLC的治疗提供了新的方向。

综上所述,WA通过ATF3/Nrf2/AKR1C1信号通路抑制SCLC细胞的迁移和增殖。WA可能是新型、有效的以AKR1C1为靶点的SCLC靶向药物。

【参考文献】

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [2] Chen W, Zheng R, Zhang S, *et al.* Report of cancer incidence and mortality in China, 2010[J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(7): 61.
- [3] Ulahannan SV, Brahmer JR. Antiangiogenic agents in combination with chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Invest*, 2011, 29(4): 325-337.
- [4] Modesto JL, Hull A, Angstadt AY, *et al.* NNK reduction pathway gene polymorphisms and risk of lung cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(Suppl 1):E94-E102.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [6] Stinchcombe TE, Gore EM. Limited-stage small cell lung cancer: current chemoradiotherapy treatment paradigms[J]. *Oncologist*, 2010, 15(2):187-195.
- [7] Johnson BE. Management of small cell lung cancer[J]. *Clin Chest Med*, 2002, 23(1): 225-239.

- [2] ASHP Therapeutic Guidelines on Stress Ulcer Prophylaxis. ASHP Commission on Therapeutics and approved by the ASHP Board of Directors on November 14, 1998 [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 1999, 56(4): 347-379.
- [3] Bardou M, Barkun AN. Stress Ulcer Prophylaxis in the ICU: Who, When and How [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(3): 906-907.
- [4] 郭 宁. 外科治疗在甲状腺疾病中的应用研究 [J]. *中国当代医学*, 2013, 20(5): 18-19.
- [5] Bez C, Perrotet N, Zingg T, *et al.* Stress ulcer prophylaxis in non-critically ill patients: a prospective evaluation of current practice in a general surgery department [J]. *J Eval Clin Pract*, 2013, 19(2): 374-378.
- [6] Heidelbaugh JJ, Inadomi JM. Magnitude and economic impact of inappropriate use of stress ulcer prophylaxis in non-ICU hospitalized patients [J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(10): 2200-2205.
- [7] 王 辉. 276 例外科手术使用 PPIs 预防应激性溃疡的用药分析 [J]. *海峡药学*, 2014, 26(4): 97-99.
- [8] Barkun A, Bardou M, Marshall JK. Consensus recommendations for managing patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding [J]. *Ann Intern Med*, 2003, 139: 843-857.
- [9] 李兆申. 重视应激性溃疡的规范化防治 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(22): 2637-2639.
- [10] Barletta JF. Does histamine-2-receptor-antagonist administration lead to more gastrointestinal bleeding when used for stress ulcer prophylaxis in patients with severe sepsis or septic shock? [J]. *Ann Pharmacother*, 2014, 48(10): 1276-1281.
- [11] Barletta JF, Sclar DA. Use of proton pump inhibitors for the provision of stress ulcer prophylaxis: clinical and economic consequences [J]. *Pharmacoeconomics*, 2014, 32(1): 5-13.
- [12] 熊碧芳, 刘小红, 戴水田, 等. 泰胃美剂对烧伤病人细胞免疫的调节作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 1999, 9(8): 24-25.
- [13] 陈继民, 彭淑清. 雷尼替丁与腹部手术后细胞免疫功能的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 1996, 13(5): 277.
- [14] 晓 峰, 姚健凤, 顾同进, 等. 奥美拉唑不同途径、剂量给药抑制胃酸效果 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2001, 20(4): 302-303.
- [15] 黄艳兰. 应激性溃疡危险因素预防循证指南 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2009, 12(11): 1825-1826.
- [16] 金仙妹, 王海燕, 兰美娟, 等. 危重病患者早期肠内营养预防应激性溃疡的观察与护理 [J]. *中华护理杂志*, 2002, 37(7): 485-487.

[收稿日期] 2015-04-10 [修回日期] 2015-11-02

[本文编辑] 顾文华

(上接第 222 页)

- [8] Traven K, Sinreih M, Stojan J, *et al.* Ruthenium complexes as inhibitors of the aldo-keto reductases AKR1C1-1C3 [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 234: 349-359.
- [9] Stefane B, Brozic P, Vehovc M, *et al.* New cyclopentane derivatives as inhibitors of steroid metabolizing enzymes AKR1C1 and AKR1C3 [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44(6): 2563-2571.
- [10] Penning TM. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 234: 236-246.
- [11] Rizner TL, Penning TM. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism [J]. *Steroids*, 2014, 79: 49-63.
- [12] Haddad SA, Lunetta KL, Ruiz-Narváez EA, *et al.* Hormone-related pathways and risk of breast cancer subtypes in African American women [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 154(1): 145-154.
- [13] Naumann JM, Messinger J, Bureik M. Human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1)-dependent biotransformation with recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *J Biotechnol*, 2010, 150(1): 161-170.
- [14] Byrns MC, Jin Y, Penning TM. Inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 125(1-2): 95-104.
- [15] Matsunaga T, Hojo A, Yamane Y, *et al.* Pathophysiological roles of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 202(1-3): 234-242.
- [16] Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(10): 1199-1207.
- [17] Nishinaka T, Miura T, Okumura M, *et al.* Regulation of aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2 [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1-3): 185-191.
- [18] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2; INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(9): 1304-1309.
- [19] Cheng X, Ku CH, Siow RC. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 64: 4-11.
- [20] Brown SL, Sekhar KR, Rachakonda G, *et al.* Activating transcription factor 3 is a novel repressor of the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)-regulated stress pathway [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 364-368.
- [21] 田 鹤, 姜文丽, 楼国良, 等. AKR1C1 在非小细胞肺癌的表达及功能分析 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 20(6): 487-491.

[收稿日期] 2016-01-27 [修回日期] 2016-03-31

[本文编辑] 李睿晔