

# 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 对肺腺癌细胞株生长及凋亡的影响

姜淑娟<sup>1</sup>, 王英田<sup>2</sup>, 白雪丽<sup>1</sup>, 李怀臣<sup>1</sup>, 陈方方<sup>1</sup>

1. 山东省立医院(呼吸内科:姜淑娟,李怀臣,陈方方;检验科:白雪丽), 山东 济南 250012

2. 山东省千佛山医院呼吸内科, 山东 济南 250014

Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>VitD<sub>3</sub> on growth and apoptosis of lung adenocarcinoma cell line A549

JIANG Shu-juan<sup>1</sup>, WANG Ying-tian<sup>2</sup>, BAI Xue-li<sup>1</sup>, LI Huai-chen<sup>1</sup>, CHEN Fang-fang<sup>1</sup>

1. Shandong Provincial Hospital, Jinan 250012, P. R. China

2. Department of Respiratory Diseases, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, P. R. China

**【摘要】** 目的:研究 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> [1,25 (OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub>]对肺腺癌细胞株 A549 生长及凋亡的影响。方法:应用流式细胞仪、免疫组织化学和 RT-PCR 等方法观察 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 对人肺腺癌 A549 细胞株生长、细胞周期、调控细胞周期基因和调控凋亡基因表达水平的影响。结果:1 μmol/L 的 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 对 A549 细胞的生长有抑制作用,1 μmol/L 的 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 作用后 A549 细胞 G<sub>1</sub> 期比例由 59.7% 增加至 73.2%, P=0.001;S 期比例由 26.4% 降至 21.1%, P=0.018;细胞凋亡率由 2.6% 增至 7.2%, P=0.015;可明显上调 Fas/FasL 的表达量,下调 bcl-2 表达量;可抑制细胞周期蛋白 D<sub>1</sub> 的表达量由 0.762 减至 0.207, P=0.001;同时抑制细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 4 的表达量由 0.642 减至 0.129, P=0.002。但较低浓度的 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 上述作用不明显。结论:1 μmol/L 的 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 可通过多种途径发挥抗肺腺癌作用。

肿瘤防治杂志,2005,12(20):1542-1545

**【ABSTRACT】** **OBJECTIVE:** To study the effect of 1,25 (OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> on growth and apoptosis of lung adenocarcinoma cell line A549. **METHODS:** Immunohistochemical method, flow cytometry and RT-PCR were applied to observe the effects induced by 1,25 (OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> on lung adenocarcinoma cells. **RESULTS:** One μmol/L 1,25 (OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> strongly inhibited the growth of A549, and increased the percentage of G<sub>1</sub> phase cells from 59.7% to 73.2% (P=0.001), decreased the percentage of S phase cells from 26.4% to 21.1% (P=0.018), increased the apoptosis rate from 2.6% to 7.2% (P=0.015); and increased Fas expression and decreased the expression of bcl-2 significantly, decreased the expression of gene cyclin D1 from 0.762 to 0.207 (P=0.001), decreased the expression of gene CDK4 from 0.642 to 0.129 (P=0.001). However the effect of the lower concentration of 1,25 (OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> was not significantly efficient. **CONCLUSION:** One μmol/L 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> is efficient for anti lung adenocarcinoma by multi-mechanism.

Chin J Cancer Prev Treat, 2005, 12(20): 1542-1545

**【关键词】** 骨化二醇;肺肿瘤;细胞凋亡;细胞周期蛋白 D<sub>1</sub>;细胞周期蛋白依赖激酶类

**【KEYWORDS】** calcitriol; lung neoplasms; apoptosis; cyclin D1; cyclin-dependent kinases

**【中图分类号】** R734.2

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1009-4571(2005)20-1542-04

1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 除了调节机体的钙磷代谢外,还可对多种肿瘤细胞有抑制生长和促进分化、凋亡的作用<sup>[1-3]</sup>,但其抗肿瘤的确切作用机制尚未完全阐明。为此,我们观察了 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 对肺腺癌细胞株 A549 的生长和细胞周期的作用,及其对 A549 细胞株凋亡基因 Fas、抗凋亡基因 bcl-2 和细胞周期调节相关基因表达水平的影响,旨在探讨其调控

肺腺癌细胞周期和凋亡的作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

人肺腺癌 A549 细胞株购于北京大学肿瘤医院;1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 购于美国 Sigma 公司;RMPI1640 购自美国 GIBCO 公司;Fas 和 bcl-2 免疫组化试剂盒购于武汉博士德公司;细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 4(cyclin dependent kinase 4, CDK4)引物由上海博亚生物技术有限公司合成。引物序列 cyclin D1 上游引物:5'-ctgtcgtcctggagcccgtgaaaaag-

**【通讯作者简介】** 姜淑娟,女,山东龙口人,教授,硕士生导师,主要从事肺癌防治的基础与临床的研究工作。

Tel:86-531-86881026 E-mail:jinjsj@sina.com

3'; 下游引物: 5'-gaagttgttggggctcctcaggtt-3'; 产物长度 405 bp. CDK4 上游引物: 5'-acgggtgtaagtccatctg-3'; 下游引物: 5'-tgggtcgggtgcctatggga-3'; 产物长度 486 bp.  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-gtggggcgccccaggcacca-3'; 下游引物: 5'-ctccttaatgtcacgcacgatt-3'; 产物长度 540 bp.

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞生长 实验分为 0.01、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  组及对照组. 取  $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  生长期的 A549 细胞悬液 1 mL 接种于 6 孔板上, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱培养 12 h 后, 观察细胞贴壁良好者, 分别加入 1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  至终浓度为 0.01、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$ , 对照组加入不含药物的 RPMI 1640, 收集不同时间点的细胞涂片, 用 HE 染色观察细胞形态; 收集不同时间点的细胞计数, 绘制生长曲线.

1.2.2 细胞周期和凋亡 收集经 0.01、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  作用 48 h 后的 A549 细胞及对照组细胞, 用 70% 乙醇固定 24 h, 加入 RNA 酶及碘化丙啶, 用流式细胞仪(美国 Bechman-Coulter 公司, Epics-XL 型)进行细胞周期和细胞凋亡的检测.

1.2.3 Fas 和 bcl-2 的表达 用 SABC 法对 A549 细胞行免疫组织化学染色, 观察经 0.01、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  作用 48 h 后的 A549 细胞及对照组细胞表达 Fas、bcl-2 的情况.

1.2.4 cyclin D1 和 CDK4 mRNA 的表达 采用 Trizol 一步法提取经 1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  处理的肺腺癌 A549 细胞的 RNA, 变性电泳法检测所提取的 RNA 量, 常规进行 RT-PCR. PCR 反应条件均为:  $94^\circ\text{C}$  预变性 10 min 后,  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $55^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  45 s, 共计 30 个循环,  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min. 产物比较均用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳.

以上实验均重复 4 次.

### 1.3 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 10.0 软件处理, 多组间比较用方差分析, 组间两两比较用  $q$  检验.

## 2 结果

### 2.1 A549 细胞形态和生长

A549 细胞在 1  $\mu\text{mol/L}$  浓度 1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  作用下培养 2 d 后, 部分细胞形态皱缩, 核浓缩成逗点状、梭状等, 胞质浓缩, 甚至出现空泡, 成泡沫状. 提示细胞为凋亡细胞, 且随培养时间的延长, 其凋亡细胞所占比例升高; 而在 0.01 和 0.1  $\mu\text{mol/L}$  浓度 1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  作用下培养 4~5 d 后方见凋亡细胞率略有升高. A549 细胞在 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  的作用下, 于 2 d 后可见其生长受到明显抑制, 且随时间的延长其抑制作用也更加明显, 5 d 后用药干预组与对照组 A549 细胞基本铺满培养板, 其计数差别逐渐不明显; 而在 0.01 和

0.1  $\mu\text{mol/L}$  浓度下 1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  对其生长的抑制作用不明显(图 1, Fig. 1).

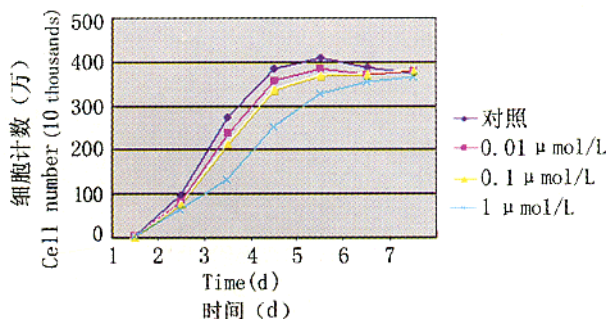


图 1 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对 A549 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>VitD<sub>3</sub> on growth of lung adenocarcinoma cell line A549

### 2.2 A549 细胞周期与凋亡

A549 细胞分别经过不同浓度的 1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  作用 48 h 后, 均可见  $\text{G}_1$  期细胞增多, S 期和  $\text{G}_2/\text{M}$  期细胞减少, 且在  $\text{G}_1$  峰前均可见到代表凋亡的亚  $\text{G}_1$  峰细胞, 且上述改变在浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  时最为明显(表 1, Tab. 1).

### 2.3 Fas 和 bcl-2 的表达

对照组 A549 细胞胞质中有少量 Fas 表达, 呈较淡的棕黄色着色, 而 1  $\mu\text{mol/L}$  组, Fas 的表达有明显加强, 其胞质和细胞膜均棕黄色着色明显, 而低浓度组则无明显改变. 对照组 A549 细胞 bcl-2 表达明显, 其胞质有较多深棕色着色颗粒, 细胞膜轻度着色, 而 1  $\mu\text{mol/L}$  组则 bcl-2 表达明显减弱, 仅胞质中有少量着色, 低浓度组则无明显改变(图 2, Fig. 2; 图 3, Fig. 3).

### 2.4 cyclin D1 和 CDK4 mRNA 的表达

A549 细胞分别经过不同浓度的 1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  作用 48 h 后, 均可见 cyclin D1 和 CDK4 mRNA 表达下降, 其中以浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  时作用最为明显. 经图象分析仪辉度扫描后, 计算待测基因条带与  $\beta$ -actin 基因条带密度比值, 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> 作用 48 h 可以明显降低上述基因的表达量,  $P < 0.05$ (图 4, Fig. 4; 图 5, Fig. 5; 表 1, Tab. 1).

## 3 讨论

$\text{G}_1/\text{S}$  和  $\text{G}_2/\text{M}$  期转换为细胞周期调控的重要调节点, 肿瘤细胞可顺利通过这两个调节点, 造成细胞周期失控, 细胞群体处于 DNA 合成活跃的 S 期, 而分化正常的细胞群体则主要处于 DNA 合成静止的  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期<sup>[4]</sup>. 在我们的实验中, 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25 二羟基维生素  $\text{D}_3$  作用下, 肺腺癌 A549 细胞的生长 2 d 后即有明显抑制, 细胞被阻滞于  $\text{G}_1$  期, S 期细胞数明显减少, 从而造成  $\text{G}_0 \sim \text{G}_1$  期细胞堆积, 促进细胞分化或凋亡.

表 1 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 对肺腺癌 A549 细胞周期及凋亡的影响(  $\bar{x} \pm s$  )

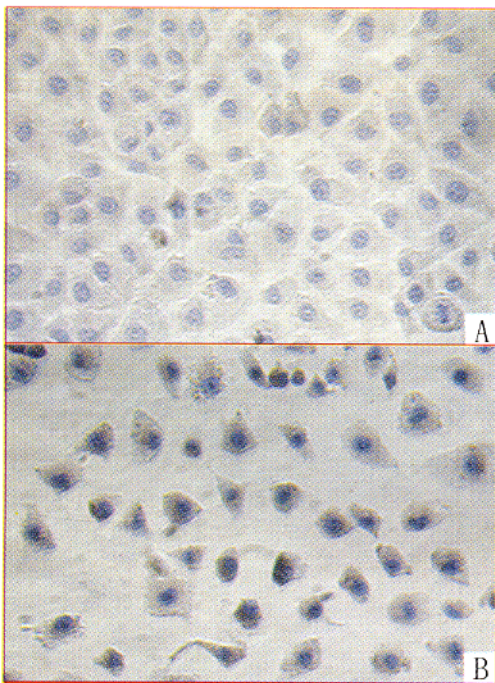
项目	对照组	1,25 二羟基维生素 D <sub>3</sub> 组					
		0.01 $\mu\text{mol/L}$	<i>P</i> 值	0.1 $\mu\text{mol/L}$	<i>P</i> 值	1 $\mu\text{mol/L}$	<i>P</i> 值
G <sub>1</sub> 期(%)	59.7±2.4	62.3±1.7	0.127	64.7±2.1	0.020	73.2±3.0	0.001
S 期(%)	26.4±2.1	24.7±1.8	0.265	23.9±1.3	0.090	21.1±1.7	0.018
G <sub>2</sub> /M 期(%)	14.1±1.2	12.9±1.1	0.191	11.4±1.8	0.047	5.7±1.3	0.001
凋亡率(%)	2.6±1.1	3.7±1.3	0.244	4.8±1.2	0.085	7.2±1.8	0.015
Cyclin D1	0.762±0.137	0.684±0.213	0.561	0.632±0.184	0.300	0.207±0.082	0.001
CDK4	0.642±0.187	0.576±0.153	0.605	0.543±0.127	0.415	0.129±0.052	0.002

注:*P* 值为 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 组与对照组比较。

Tab. 1 Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> on growth and apoptosis of lung adenocarcinoma cell line A549 (  $\bar{x} \pm s$  )

Item	Control	1,25(OH) <sub>2</sub> VitD <sub>3</sub> group					
		0.01 $\mu\text{mol/L}$	<i>P</i> value	0.1 $\mu\text{mol/L}$	<i>P</i> value	1 $\mu\text{mol/L}$	<i>P</i> value
G <sub>1</sub> phase (%)	59.7±2.4	62.3±1.7	0.127	64.7±2.1	0.020	73.2±3.0	0.001
S phase (%)	26.4±2.1	24.7±1.8	0.265	23.9±1.3	0.090	21.1±1.7	0.018
G <sub>2</sub> /M phase (%)	14.1±1.2	12.9±1.1	0.191	11.4±1.8	0.047	5.7±1.3	0.001
Apoptosisrate (%)	2.6±1.1	3.7±1.3	0.244	4.8±1.2	0.085	7.2±1.8	0.015
CyclinD1	0.762±0.137	0.684±0.213	0.561	0.632±0.184	0.300	0.207±0.082	0.001
CDK4	0.642±0.187	0.576±0.153	0.605	0.543±0.127	0.415	0.129±0.052	0.002

Note: The *P* value indicates the difference between the 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> group and the control group.

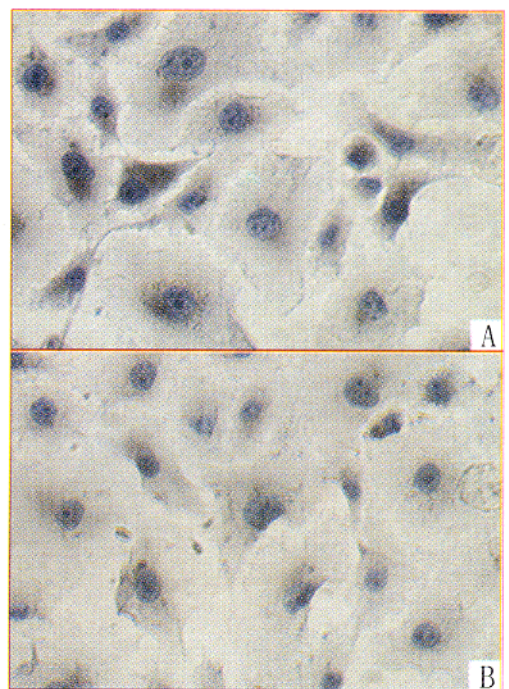


A: 对照组 A549 细胞 Fas 阴性表达; B: 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 组 A549 细胞 Fas 阳性表达。

图 2 对照组及 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 干预组 A549 细胞 Fas 的表达( SABC×400 )

A: Negative expression of Fas in control group A549 cells; B: Positive expression of Fas in 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> group A549 cells.

Fig. 2 Expression of Fas in A549 cells between the control group and 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> group ( SABC×400 )  
万方数据

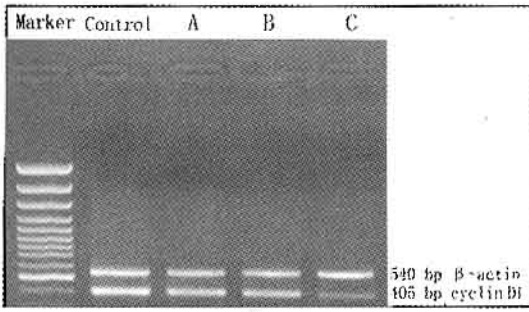


A: 对照组 A549 细胞 bcl-2 强阳性表达; B: 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 组 A549 细胞 bcl-2 弱阳性表达。

图 3 对照组及 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 干预组 A549 细胞 bcl-2 的表达( SABC×400 )

A: Strongly positive expression of bcl-2 in control group A549 cells; B: Low-grade positive expression of bcl-2 in 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> group A549 cells.

Fig. 3 Expression of bcl-2 in A549 cells between the control group and 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> group ( SABC×400 )

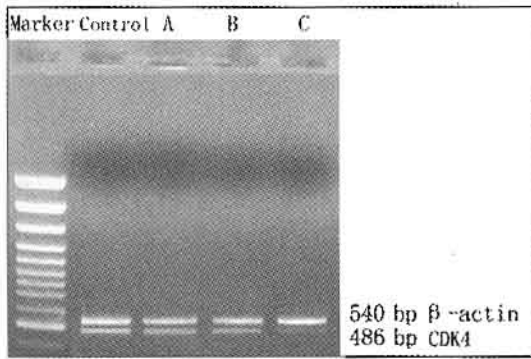


A: 0.01  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> 干预组; B: 0.1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> 干预组; C: 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> 干预组。

图 4 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 作用下 A549 细胞 cyclin D1 基因表达量

A: Group after treatment of 0.01  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub>; B: Group after treatment of 0.1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub>; C: Group after treatment of 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub>.

Fig. 4 Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> on the expression of cyclin D1 gene of A549 cells



A: 0.01  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> 干预组; B: 0.1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> 干预组; C: 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> 干预组。

图 5 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 作用下 A549 细胞 CDK4 基因表达量

A: Group after treatment of 0.01  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub>; B: Group after treatment of 0.1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub>; C: Group after treatment of 1  $\mu\text{mol/L}$  1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub>.

Fig. 5 Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub> VitD<sub>3</sub> on the expression of CDK4 gene of A549 cells

cyclin D1·CDK4 复合物在细胞 G<sub>1</sub>~S 期转换过程中发挥重要作用;可使磷蛋白 pRb 的 Ser601 和 Ser773 发生磷酸化而释放其结合的转录因子 E2F,从而促进相关基因的转录,推动细胞周期由 G<sub>1</sub> 进入 S 期<sup>[5]</sup>。我们通过 RT-PCR 证实,1  $\mu\text{mol/L}$  1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 干预可明显下调肺腺癌 A549 细胞的 cyclin D1、CDK4 表达量,使细胞阻滞于 G<sub>0</sub> 期。而 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 下调 cyclin D1、CDK4 表达量的机制尚不清楚。有学者报道,与维生素 D 能够诱导 CDK 的抑制蛋白 p16、p21 和 p27 升高有关<sup>[6]</sup>。

1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 可促进细胞凋亡<sup>[1]</sup>。我们通过 HE 染色观察到,部分 A549 细胞出现胞质凝缩、

核固缩及染色质凝集表现,同时利用流式细胞仪检测到代表凋亡的亚 G<sub>1</sub> 峰的细胞,且其促凋亡作用随 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 浓度升高而加强,1  $\mu\text{mol/L}$  浓度时其促凋亡作用最为明显。

目前认为,哺乳动物的细胞凋亡主要由两条通路构成。一条通路称为死亡受体通路,由死亡配体(如 FasL)与对应的死亡受体(如 Fas)结合后启动,导致其受体三聚化,激活胞内大量 caspase 酶,放大死亡信号,造成细胞凋亡<sup>[3]</sup>。肿瘤细胞 Fas 低表达,使其凋亡受到抑制。在我们的实验中,A549 细胞 Fas 低表达,在 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 作用 48 h 后 Fas 表达量明显增加,可能为其促进凋亡的机制之一。另一通路称为线粒体通路,bcl-2 蛋白家族在其中起了主要作用。bcl-2 主要功能就是直接抑制线粒体膜的渗透性,从而减少促凋亡因子的释放,进而发挥抗凋亡作用<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞 bcl-2 异常表达使其凋亡受到抑制,A549 细胞也观察到 bcl-2 的表达,且 1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 的作用使 bcl-2 的表达明显减弱,从而增加了线粒体膜的渗透性,促凋亡因子大量释放,促进细胞的凋亡。

由此可见,1,25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> 能抑制肺腺癌 A549 细胞增生,调控细胞周期,促进细胞凋亡,可望在临床抗肺腺癌治疗中发挥重要作用。

### 【参考文献】

[1] Chen T C, Holick M F, Lokeshwar B L, et al. Evaluation of vitamin D analogs as therapeutic agents for prostate cancer[J]. Recent Results Cancer Res, 2003, 164: 273-288.

[2] Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, et al. Metastatic growth of lung cancer cells is extremely reduced in Vitamin D receptor knockout mice [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1-5): 545-547.

[3] Duque G, El Abdaimi K, Henderson J E, et al. Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways[J]. Bone, 2004, 35(1): 57-64.

[4] Zinser G M, McEleney K, Welsh J. Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and Vitamin D<sub>3</sub> receptor knockout mice[J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 200(1-2): 67-80.

[5] Jensen S S, Madsen M W, Lukas J, et al. Inhibitory effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery[J]. Mol Endocrinol, 2001, 15(8): 1370-1380.

[6] van den Bemd G J, Pols H A, van Leeuwen J P, et al. Antitumor effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and vitamin D analogs[J]. Curr Pharm Des, 2000, 6(7): 717-732.

[7] Wagner N, Wagner K D, Schley G, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of bcl-2 and bax[J]. Exp Eye Res, 2003, 77(1): 1-9.

收稿日期:2005-01-24 修回日期:2005-05-09

(编辑:李辉)