

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.005

双丁酰环腺苷酸抑制甲状腺癌细胞株 FTC-133 增殖*

王玉林¹, 王 辉², 巴 颖^{3△}

(大连医科大学附属第一医院:1. 普外科;2. 超声科;3. 内分泌科, 大连 116011)

[摘要] **目的** 探讨双丁酰环腺苷酸(dbcAMP)对甲状腺癌细胞株 FTC-133 增殖的影响。**方法** 将 FTC-133 细胞进行常规培养,分为对照组,处理组(dbcAMP 0.5、1.0、2.0 mmol/L)共 4 组。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、生长曲线法观察 0.5、1.0、2.0 mmol/L dbcAMP 经 24 h、48 h 对甲状腺癌细胞株 FTC-133 细胞增殖能力的影响,流式细胞术检测细胞周期的变化情况,使用反转录定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹实验(Western Blotting)方法检测 Raf1 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,不同浓度 dbcAMP 和时间处理的 FTC-133 细胞增殖均受抑制,并表现出时间-剂量依赖性;S 期细胞显著减少,G₂/M 期细胞显著增加;Raf1 mRNA 和蛋白水平明显减低。**结论** dbcAMP 显著降低甲状腺癌细胞株 FTC-133 的增殖能力,促进凋亡,可能与激活 ERK MAPK 通路有关。

[关键词] 甲状腺肿瘤;细胞增殖;cAMP;dbcAMP;Raf1**[中图分类号]** R736.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3325-03

DbcAMP inhibited the proliferation of FTC-133 cell*

Wang Yulin¹, Wang Hui², Ba Ying^{3△}

(1. Department of Surgery; 2. Department of Ultrasonography; 3. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of dualdi butyryl cyclic AMP (dbcAMP) on the proliferation of FTC-133 cell line. **Methods** FTC-133 cells were normally cultured and divided into control group, dbcAMP treatment group (0.5, 1.0, 2.0 mmol/L). After FTC-133 cells were treated with dbcAMP (0.5, 1.0, 2.0 mmol/L) for 24 h or 48 h, the growth activity and growth curve was detected by MTT. Changes of the cell cycle were detected by flow cytometry. The mRNA and protein expression of Raf1 were measured by RT-qPCR and Western blotting. **Results** Compared with control group, the growth activity of FTC-133 cells was reduced by different levels of dbcAMP in a dose-time dependence manner. The number of FTC-133 cells was decreased in the S phase and increased in the G₂/M phase. The mRNA and protein expression of Raf1 of treatment group were both reduced compared with control group. **Conclusion** dbcAMP significantly reduced FTC-133 cells proliferation and promoted apoptosis, and which might be involved by ERK MAPK signalling.

[Key words] thyroid neoplasms; cell proliferation; cyclic AMP; dbcAMP; Raf1

甲状腺癌是内分泌系统的常见恶性肿瘤之一^[1],占全身肿瘤疾病的 1%。近年来,随着生活方式的改变、饮食习惯变化,甲状腺癌的发病率逐年上升,吸引人们的关注和重视^[2]。陈竟文等^[3]回顾分析复旦大学附属中山医院的病例资料发现,甲状腺癌的发病率近年有明显升高的趋势。因此,努力开发抑制甲状腺癌细胞生长作用的新药,并进一步探讨其内在的作用机制是当前医学研究的重要任务。环磷酸腺苷(cAMP)是细胞内重要的信号转导因子,在细胞增殖和分化的调控中起重要作用。研究发现 cAMP 可抑制或促进肿瘤细胞增殖、诱导分化^[4],其对甲状腺癌的影响及机制尚不明确^[5]。本研究利用 cAMP 类似物,双丁酰环腺苷酸(dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, dbcAMP),观察 cAMP 对甲状腺癌细胞株 FTC-133 增殖能力的影响,探讨其潜在机制。

1 材料与方

1.1 材料 DMSO, dbcAMP, 胰岛素(Sigma), β-actin 抗体(Sigma), Raf1 抗体(Cell signaling technology), 二抗(HRP)偶联的山羊抗兔 IgG(北京鼎国生物试剂公司), 预染蛋白 marker(北京鼎国生物试剂公司), DMEM-F12 培养液, 胎牛血清(GIBICO 公司)、100 U/mL 青霉素(GIBICO 公司)和 100 mg/L 链霉素(GIBICO 公司), 谷氨酰胺(GIBICO 公司), 四甲

基偶氮唑蓝(MTT, Sigma), 牛促甲状腺激素(TSH), Thermo CO₂ 培养箱(USA), iMark 酶标仪(Bio-Rad, USA), 流式细胞仪(BD FACSCOM), 荧光定量 PCR 仪(ABI 7500HT), 甲状腺癌 FTC-133 细胞株购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 FTC-133 细胞接种于含 10 U/L 的 TSH、10 mg/L 的胰岛素、15% 的胎牛血清、2 mmol/L 的谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM-F12 (1:1)培养基中,培养基 pH 值调到 7.2~7.4。在 37 °C、5% CO₂ 条件下细胞培养箱进行培养。FTC-133 细胞在 60 mm 培养皿中呈单层贴壁生长,细胞呈梭形,极不规则,细胞之间有明显的粘连,有少量细胞突起。随着培养的时间增加,细胞数量增长,有时会出现复层生长,有细胞聚集现象。

1.2.2 MTT 比色法检测 FTC-133 细胞生长抑制率 调整对数生长期的 FTC-133 细胞密度为 5×10⁴ 个/mL,每孔 100 μL 接种到 96 孔板内,细胞培养箱中培养 12 h 后,处理组分别加入 0.5、1.0、2.0 mmol/L dbcAMP,对照组不加任何试剂。给药 24 h 和 48 h 后使用 MTT 法检测吸光度值(A 值),设定波长为 490 nm,每组包括 6 个孔,实验重复 3 次。增殖抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

* 基金项目:辽宁省科技厅科学技术计划项目课题(2012225020)。 通讯作者:△ E-mail: baying126@126.com。

作者简介:王玉林(1970—),副主任医师,硕士,主要从事甲状腺肿瘤

1.2.3 生长曲线的绘制 取对数生长期的 FTC-133 细胞,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,接种到 24 个 25 mL 培养瓶,每瓶 100 μ L,细胞培养箱中培养 12 h 后,将 0.5、1.0、2.0 mmol/L dbcAMP 加入上述培养瓶,每个浓度 6 瓶,剩余作为对照,继续培养,每 24 小时每组取 1 瓶,消化计数,以时间为横坐标、细胞数为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期 dbcAMP 处理共同培养 24 h 的 FTC-133 细胞,加入 0.25% 胰酶进行消化,吹打细胞,当细胞脱落后,加入含血清培养基,中和胰酶作用,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液并收集细胞沉淀,用 PBS 清洗,加入 75% 的乙醇 1 mL 进行细胞固定,4 $^{\circ}$ C 过夜。将 FTC-133 细胞的浓度调整为 5×10^5 个/mL,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次后,加入 500 μ L PBS 含 50 μ g/mL 溴化乙锭(EB),100 μ g/mL RNase A,0.2% Triton X-100,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,用流式细胞仪进行检测。用 FACSCoM 软件分析实验结果,统计 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期细胞的百分比。实验重复 4 次,计算平均值和标准差。

1.2.5 通过反转录的定量 PCR(RT-qPCR)、蛋白免疫印迹实验(Western Blotting)方法检测 FTC-133 细胞中 Raf1 水平 FTC-133 细胞处于对数生长期时,经过酶消化后,计数 6×10^5 个/mL 的浓度为 2 组,包括实验组(加入 0.5 mmol/L 的 dbcAMP)和对照组(不加 dbcAMP),培养 24 h。抽提细胞的总 RNA,逆转录呈 cDNA 后,采用 sybr green 法进行 PCR 扩增,通过湘桂定量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值代表基因的相对表达强度。抽提细胞总蛋白,采用蛋白质定量试剂盒(BCA 法)进行蛋白浓度测定,然后进行电泳、转膜,用 Raf1 抗体(1:500)、 β -actin 抗体(1:2 000)进行免疫杂交,最后显影和定影,经 Biorad 凝胶成像分析系统扫描成像,蛋白相对表达强度采用 Quantity One 软件进行定量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间均值比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 处理组及时间对 FTC-133 细胞生长抑制率的影响 随着浓度增加、时间延长,FTC-133 细胞株 A 值越低,dbcAMP 对细胞增殖的抑制作用越明显,呈时间-剂量依赖性,见表 1、图 1。

表 1 处理组及时间对 FTC-133 细胞吸光度的影响

组别	浓度(mmol/L)	A 值($\bar{x} \pm s$)	F	P
24 h	对照组	0.504 ± 0.013	361.681	< 0.01
	处理组	0.445 ± 0.007		
		0.381 ± 0.006		
		0.329 ± 0.012		
48 h	对照组	0.700 ± 0.007	1 685.272	< 0.01
	处理组	0.574 ± 0.017		
		0.461 ± 0.014		
		0.236 ± 0.004		

2.2 FTC-133 细胞生长曲线绘制 由生长曲线可知,对照组 FTC-133 细胞在试验的第 2 天即表现出良好增殖趋势,第 3 天时细胞数已显著多于各浓度 dbcAMP 组。处理组中,随着时间的延长及浓度的增加,dbcAMP 对 FTC-133 细胞生长的抑制作用越明显。

2.3 细胞周期检测结果 对照组的 FTC-133 细胞的 G_0/G_1 期为 $(60.75 \pm 1.52)\%$,S 期细胞数量为 $(30.19 \pm 0.98)\%$, G_2/M 期细胞的数量为 $(8.85 \pm 0.48)\%$ 。处理组中,使用 0.5

mmol/L 的 dbcAMP 处理 FTC-133 细胞后,FTC-133 细胞的 G_0/G_1 期 $[(62.25 \pm 1.21)\%]$ 没有显著的变化,但是 FTC-133 细胞的 S 期 $[(10.25 \pm 0.42)\%]$ 细胞数量明显减少, G_2/M 期 $[(27.45 \pm 0.75)\%]$ 细胞的数量显著增加($P < 0.01$),见图 2。

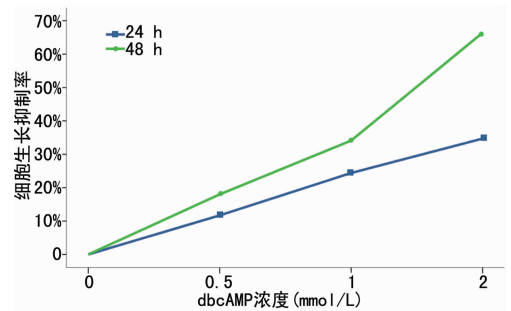


图 1 处理组及时间对 FTC-133 细胞增殖抑制率的影响

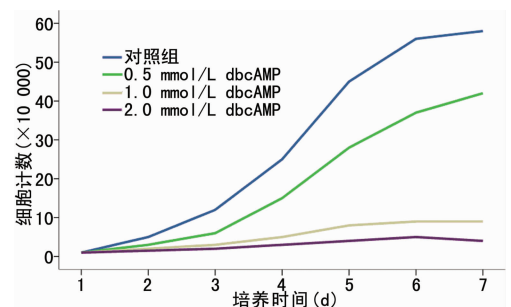
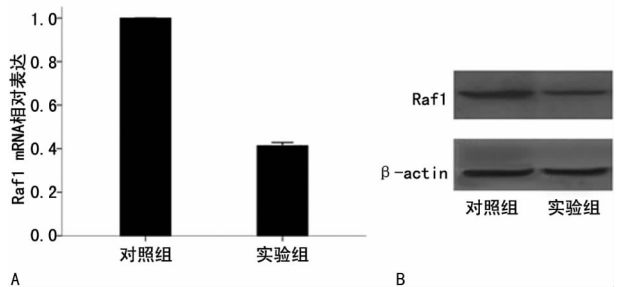


图 2 不同浓度 dbcAMP 下 FTC-133 细胞生长曲线

2.4 dbcAMP 对 FTC-133 细胞中 Raf1 表达的影响 相对于对照组,实验组 Raf1 mRNA 相对表达水平为 0.413 ± 0.071 ;其蛋白相对表达 0.813 ± 0.074 ,明显低于对照组的 1.104 ± 0.133 ,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。



A: Raf1 mRNA 表达; B: Raf1 蛋白表达。

图 3 dbcAMP 显著抑制 Raf1 mRNA 和蛋白的表达

3 讨论

cAMP 是细胞内重要的第二信使,具有调节细胞增殖、分化等广泛的生物学功能。cAMP 及其衍生物 dbcAMP 能够使细胞的形态、行为发生逆转性改变,有效抑制恶性肿瘤生长,对多种体外培养的癌细胞有一定的诱导分化作用。因此设法提高肿瘤细胞内腺嘌呤核糖核苷酸(AMP)水平,抑制增殖、诱导分化,成为大多数研究使用的手段^[6-7]。dbcAMP 是 cAMP 衍生物,能有效提高细胞内 AMP 水平,它是通过化学方法对环磷腺苷的结构进行改造,在其分子中加入 2 个丁酰基制备而成的,因其具有高亲脂性,且对酸碱环境比较稳定,可被口服吸收,穿过细胞膜进入细胞内,经腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC),转换为环磷腺苷。Chrenek 等^[8]发现,dbcAMP 能显著抑制兔输卵管上皮细胞增殖。本实验通过 MTT 试验、曲线生长试验和细胞周期检查,发现 dbcAMP 可显著抑制甲状腺癌细胞株 FTC-133 的增殖能力,并促进其凋亡,抑制增殖的能力与时间、浓度呈正相关。

ERK/MAPK(extracellular signal-regulated kinase, mitogen-activated protein kinase)是一条高度保守的,由 3 组苏氨酸-精氨酸蛋白激酶模块构成的信号通路,它通过 Raf 蛋白(A-raf,B-Raf 和 Raf1)、MEK1/2 蛋白、ERK1/2 蛋白先后磷酸化级联,将分子信号从细胞膜向细胞核传递并放大,参与调节包括细胞增殖、迁移、凋亡等在内的多种重要细胞进程^[9-10]。有研究发现蛋白酶体抑制剂抗凋亡的机制是通过 p38MAPK 途径激活 Nrf2 的细胞核移位,进而导致 GCLC 的诱导作用和谷胱甘肽生成的连锁反应^[11]。研究发现,过表达 cAMP 可通过激活 Ras 抑制 Raf-1 的活化,从而负性调节^[12]。通过 RT-PCR、Western Blotting,检测到 dbcAMP 显著抑制了 Raf1 mRNA 及蛋白水平的表达,提示 dbcAMP 抑制 FTC-133 细胞增殖能力的途径之一是抑制 ERK/MAPK 通路。也有研究认为甲状腺癌细胞的增殖抑制与有丝分裂促成因子(MPF)活性降低直接相关^[13]。

综上所述,本文发现 dbcAMP 能够通过 Raf1 抑制 ERK/MAPK 通路,干扰甲状腺癌细胞株 FTC-133 的增殖能力、促进其凋亡,为今后深入研究 dbcAMP 的抑癌机制和开发肿瘤治疗药物提供理论基础。

参考文献

- [1] 关海霞,滕卫平.分化型甲状腺癌的研究新进展[J].中华内科杂志,2012,51(1):61-63.
- [2] 吴艺捷.甲状腺癌已成为严重的公共健康问题[J].中华内分泌代谢杂志,2015,31(1):1-3.
- [3] 陈竟文,宋陆军.甲状腺癌的流行病学新特点[J].中国临床医学,2009,16(5):812-813.
- [4] Li F,Xu W,Zhao S. Regulatory roles of metabolites in cell signaling networks[J]. J Genet Genomics,2013,40(7):367-374.
- [5] Malaguarnera R,Chen KY, Kim TY, et al. Switch in signaling control of mTORC1 activity after oncoprotein ex-

pression in thyroid cancer cell lines[J]. J Clin Endocrinol Metab,2014,99(10):E1976-1987.

- [6] 王莹莹,朱琦. cAMP 信号通路与多发性骨髓瘤[J]. 国际肿瘤学杂志,2014,41(5):368-370.
- [7] 杭海芳,王莹莹,朱琦. 环腺苷酸拟似物 8-CPT-cAMP 诱导骨髓瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 中国癌症杂志,2014,24(10):755-760.
- [8] Chrenek P, Makarevich AV, Balazi A, et al. The effect of the cAMP analogue, dbcAMP, on proliferation and apoptosis of rabbit oviductal cells[J]. Folia Biol (Krakow), 2013,61(3/4):247-252.
- [9] Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells[J]. Int J Biochem Cell Biol,2008,40(12):2707-2719.
- [10] Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time[J]. Trends Biochem Sci,2006,31(5):268-275.
- [11] 张海燕,都镇先,孟欣,等. 蛋白酶体抑制剂诱导甲状腺癌细胞凋亡机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2012,19(8):583-587.
- [12] Dumaz N, Marais R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels[J]. FEBS J,2005,272(14):3491-3504.
- [13] 高月,肖建英,赵颂,等. 双丁酰环腺苷酸对甲状腺鳞癌 SW579 细胞株增殖的影响[J]. 天津医药,2012,40(6):537-539.

(收稿日期:2015-02-18 修回日期:2015-08-15)

(上接第 3324 页)

产物还可激活核修复多聚酶,抑制 DNA 合成,间接激活蛋白酶激活受体,引起无效修复,最终导致生物能量耗竭,致使细胞死亡^[17]。综上所述,枸杞黄酮对 H₂O₂ 损伤的血管内皮细胞 NO 及 NOS 作用的研究的作用还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Pan KY, Shen MP, Ye ZH, et al. Inhibitive effects of antioxidative vitamins on mannitol-induced apoptosis of vascular endothelial cells[J]. J Zhejiang Univ Sci B,2006,7(10):825-829.
- [2] 周颖,陈虹. 血管内皮细胞功能紊乱与心血管疾病关系的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2006,6(8):63-65.
- [3] 张自萍,廖国玲,史晓文. HPLC 法测定不同产地宁夏枸杞中芦丁和绿原酸含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(7):1586-1587.
- [4] 鲁晓翔. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(3):220-224.
- [5] 郑国琦,胡正海. 宁夏枸杞的生物学和化学成分的研究进展[J]. 中草药,2008,39(5):796.
- [6] 曹志超,顾翔,苏佩清. 黄酮类化合物抗氧化及其作用机制的研究进展[J]. 实用临床医药杂志,2009,13(13):110-112.
- [7] 廖国玲,王伟. 枸杞黄酮类化合物色谱分析条件的优化[J]. 宁夏医学杂志,2013,35(7):614-615.

[8] 廖国玲,王伟. 反相高效液相色谱法测定枸杞活性成分[J]. 医学信息,2013,26(2):68.

- [9] Nakayama M, Nakamura J, Hamada Y, et al. Aldose reductase inhibition ameliorates pupillary light reflex and f-wave latency in patients with mild diabetic neuropathy[J]. Diabetes Care,2001,24(6):1093-1098.
- [10] 李上标,裴淑艳,蒋超,等. MTT 比色法研究应用进展[J]. 西北民族大学学报:自然科学版,2013,34(3):68-73,91.
- [11] 杨学礼. 一氧化氮的生物效应及其作用机制的研究[J]. 生理科学进展,2008,39(1):91-95.
- [12] 乌兰格日乐,白海泉,翁慧. 黄酮的抗氧化活性研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报,2008,23(3):277-280.
- [13] 李洋,马文平,倪志婧. 宁夏枸杞体外抗氧化机理研究[J]. 食品科学,2014,35(1):79-84.
- [14] 贾刚,谢丽阳,张迪,等. 黄酮对 AAPH 诱导的 HepG2 细胞氧化应激的作用[J]. 食品科技,2011,36(9):23-26.
- [15] 龚金炎,洪辉,吴晓琴,等. 黄酮类化合物的促氧化作用及其细胞毒性研究进展[J]. 中草药,2008,39(12):1905-1909.
- [16] Myatt YM, Cui X. oxidative stress in the placenta[J]. Histochem Cell Biol,2004,122(4):369-382.
- [17] 但素萍. 诱导型一氧化氮合酶在心肌梗死进程中的研究进展[D]. 重庆:重庆医科大学,2014.

(收稿日期:2015-02-15 修回日期:2015-08-10)