分类号： 密级：

U C D ： 编号：

博士学位论文

ATRA 及其衍Th物对结肠癌 RKO 细胞Th物学行为的影响及其机制的研究

The effect of ATRA and ATPR on colorectal cancer cell and its possible molecular mechanisms

**左** 莉

指导教师姓名 汪 渊 教授 安徽医科大学临床药理研究所

安徽医科大学分子生物学中心实验室 魏 伟 教授 安徽医科大学临床药理研究所

申请学位级别 博 士 专 业 名 称 药 理 学

提交论文日期 2014/3/15 论文答辩日期 2014/5/15

学位授予单位和日期 安 徽 医 科 大 学

答辩委员会主席 章孝荣 教 授

评 阅 人 李少林 教授等

2014 年 2 月

1

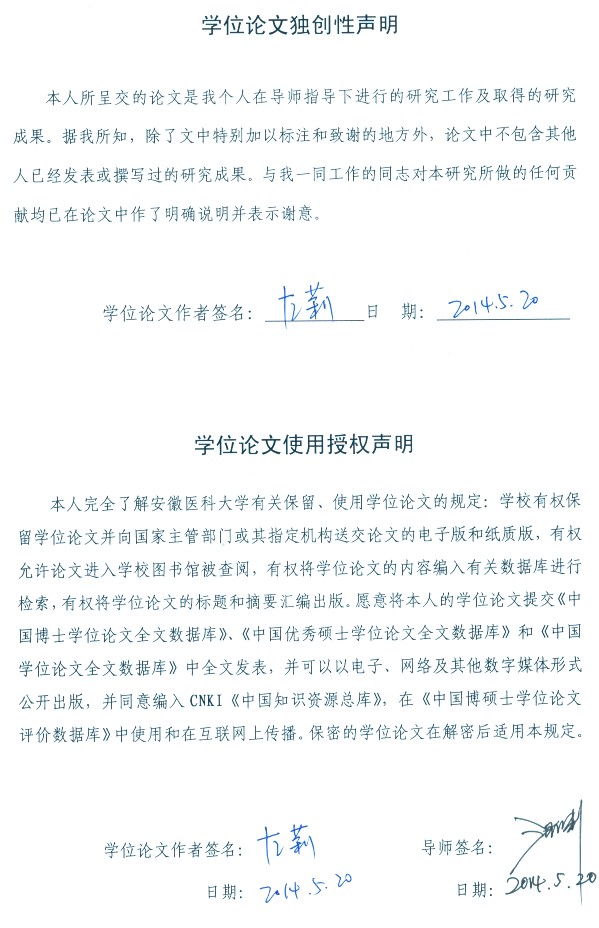
博士学位论文

**论文题目** ATRA 及其衍Th物对结肠癌RKO 细胞Th物学行为的影响及其机制的研究

The effect of ATRA and ATPR on colorectal cancer cell and its possible molecular mechanisms

|  |  |
| --- | --- |
| **作者姓名** | **左** 莉 |
| **指导老师** | **汪** 渊 教 授 |
|  | **魏** 伟 教 授 |
| **学科专业** | **药理学** |
| **研究方向** | **肿瘤分子药理学** |
| **论文工作时间** | **2009 年 9 月-2014 年 5 月** |

2014年2 月



目 录

[**英文缩略词对照表（ABBREVIATION） 1**](#_bookmark0)

[**中文摘要 3**](#_bookmark1)

[**英文摘要 7**](#_bookmark2)

[**第一部分 ATRA 及衍生物 ATPR 对结肠癌细胞 RKO 生 物学行为的影响 10**](#_bookmark3)

[1.前言 11](#_bookmark4)

[2 材料和方法 12](#_bookmark5)

[*2.1* 主要仪器与设备 *12*](#_bookmark6)

[*2.2* 药物 *13*](#_bookmark7)

[*2.3 细胞株及其培养 13*](#_bookmark8)

[*2.4 细胞复苏和冻存 13*](#_bookmark9)

[*2.5 MTT* 法检测 *ATRA* 及 *ATPR* 对 *RKO* 细胞增殖的影响 *14*](#_bookmark10)

[*2.6 流式细胞术检测细胞周期 15*](#_bookmark11)

[*2.7 Hoechst* 染色检测细胞凋亡 *15*](#_bookmark12)

[*2.8 细胞划痕实验检测细胞迁移 16*](#_bookmark13)

[*2.9 Soft agar* 检测细胞软琼脂克隆形成能力 *16*](#_bookmark14)

[*2.10* 统计学处理 *17*](#_bookmark15)

[3 结果 17](#_bookmark16)

[*3.1 ATRA* 及 *ATPR* 抑制 *RKO* 细胞增殖 *17*](#_bookmark17)

[*3.2 ATRA* 及 *ATPR* 使 *RKO* 细胞细胞周期阻滞在 *G0/G1* 期 *18*](#_bookmark18)

[*3.3 ATRA* 及 *ATPR* 对 *RKO* 细胞凋亡的作用不同 *19*](#_bookmark19)

[*3.4 ATRA* 及 *ATPR* 明显抑制 *RKO* 细胞迁移 *20*](#_bookmark20)

[*3.5 ATRA* 及 *ATPR* 抑制 *RKO* 细胞软克隆形成 *21*](#_bookmark21)

[*3.6 ATRA* 和 *ATPR* 的作用比较 *21*](#_bookmark22)

[4 讨论 22](#_bookmark23)

[5 结论 25](#_bookmark24)

[参考文献目录 25](#_bookmark25)

[**第二部分 ATRA 及 ATPR 抑制 RKO 细胞增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力及诱导凋亡等作用机制的初步探讨 30**](#_bookmark26)

[1.前言 32](#_bookmark27)

[2.方法 33](#_bookmark28)

[*2.1 Western blot* 检测维甲酸受体、*MAPK* 信号通路分子、*MLCK*、紧密连接蛋白的表达及其磷酸化酸化 *33*](#_bookmark29)

[*2.2 Real time PCR* 检测 *occludin*、*ZO-1* 和周期相关基因 *mRNA* 表达水平 *37*](#_bookmark30)

[*2.3* 免疫荧光法检测 *occludin* 和 *ZO-1* 的表达及定位 *38*](#_bookmark31)

[*2.4 Erk* 的过表达慢病毒载体的构建及包装 *39*](#_bookmark32)

[*2.5 Erk* 干扰的 *shRNA* 慢病毒载体的构建及包装 *44*](#_bookmark33)

[2.6 *Real time PCR* 和 *western blot* 方法检测 *Erk* 过表达和干扰对](#_bookmark34)

[*MLCK* 表达的影响 *45*](#_bookmark34)

[*2.7 MLCK* 干扰的慢病毒载体构建、稳定转染和检测 *45*](#_bookmark35)

[*2.8* 流式细胞术、细胞划痕、*soft agar* 检测 *SiMLCK* 对 *RKO* 细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力的影响 *46*](#_bookmark36)

[3 结果 46](#_bookmark37)

[*3.1 ATRA* 及 *ATPR* 诱导维甲酸受体的表达 *46*](#_bookmark38)

[*3.2 ATRA* 及 *ATPR* 调节 *cyclin D1*、*p21 mRNA* 水平调控细胞周期*50*](#_bookmark39)

[*3.3 ATRA* 及 *ATPR* 抑制 *MLCK*、*MLC* 的表达及活性 *51*](#_bookmark40)

[*3.4 MLCK* 的抑制剂 *ML-7* 对 *RKO* 细胞迁移的影响 *52*](#_bookmark41)

[*3.5 ATRA* 及 *ATPR* 抑制 *ERK/MAPK* 信号通路 *53*](#_bookmark42)

[*3.6 ERK/MAPK* 信号通路对 *RKO* 细胞迁移的影响 *54*](#_bookmark43)

[3.7 *ATRA* 及 *ATPR* 增加 *occludin* 和 *ZO-1* 的表达及向细胞膜的转运](#_bookmark44)

[*............................................................................................................... 55*](#_bookmark44)

[*3.8* 构建 *ERK* 的过表达和干扰的慢病毒载体并稳定转染入 *RKO* 细胞 *58*](#_bookmark45)

[*3.9 ERK* 的过表达和敲除对 *RKO* 细胞 *MLCK* 表达的影响 *59*](#_bookmark46)

### [*3.10* *MLCK*干扰的慢病毒细胞株的构建并稳定转染入*RKO*细胞*60*](#_bookmark47)

### [*3.11* *SiMLCK*对*RKO*细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力的影响](#_bookmark48)

[*............................................................................................................... 61*](#_bookmark48)

### [*3.12* *ATRA* 及 *ATPR* 对凋亡和自噬相关蛋白表达的影响 *62*](#_bookmark49)

[4. 讨论 64](#_bookmark50)

### [*4.1* *ATRA*及*ATPR*通过上调*p21*表达和降低*cyclin D1*表达抑制*RKO*](#_bookmark51)

[细胞增殖，使细胞周期阻滞在*G1*期。*64*](#_bookmark51)

### [*4.2* *ATRA* 及 *ATPR* 抑制 *RKO* 细胞迁移的机制 *65*](#_bookmark52)

### [*4.3* *ATRA* 及 *ATPR* 对凋亡的作用机制 *68*](#_bookmark53)

[5．结论 70](#_bookmark54)

[参考文献目录 70](#_bookmark55)

[**综述77**](#_bookmark56)

英文缩略词对照表（Abbreviation）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全名 | 中文全名 |
| A | absorbance | 吸光度 |
| AP | Ammonium persulfate | 过硫酸铵 |
| APL | Acute Promyelocytic Leukemia | 急性早幼粒细胞白血病 |
| ATRA | All-trans retinoic acid | 全反式维甲酸 |
| RARE | Retinoic acid response element | 维甲酸应答元件 |
| ATPR | 4-Amino-2-Triﬂuoromethyl-Phenyl Retinate | 4-氨基-2-三氟甲基苯酯 |
| RAR | Retinoic acid receptor | 维甲酸受体 |
| MLCK | Myosin light chain kinase | 肌球蛋白轻链激酶 |
| ZO-1 | Zonula occludens-1 | 紧密连接蛋白 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 二乙基焦磷酸胺 |
| DMEM | Dulbecco‟s modified Eagle‟s medium | DMEM培养液 |
| MLCP | Myosin light chain phosphatase | 肌球蛋白轻链磷酸酶 |
| PMA | Phorbol ester | 佛波酯 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲亚砜 |
| ECL | Enhanced chemiluminescence | 增强化学发光 |
| EDTA | Ethylenediaminetetra-acetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase | 胞外信号调节激酶 |
| IMDM | Iscove's Modified Dulbecco's Medium | IMDM培养基 |
| CDK | Cyclin-dependent kinase | 细胞周期依赖性激酶 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化酶 |
| HDACs | Histone deacetylases | 组蛋白去乙酰化酶 |
| RB | Retinal Blastoma | 视网膜母细胞瘤 |
| PPAR | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor | 过氧化物酶体增殖激活物 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | 受体 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases | 丝裂原激活的蛋白激酶 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PBS | Phosphate buffer saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 氟化聚偏乙烯 |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel Electrophoresis | 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺  凝胶电泳 |
| TEMED | N‟N‟N‟N‟-tetramethylethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| Tris | Hydroxymethyl-aminomethane | 三甲羟基氨基甲烷 |
| CYP26 | cytochrome-P450-isoform-26 | 细胞色素 p450 异构体 26 |
| ATGs | Autophagy associated gene | 自噬相关基因 |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin | 雷帕霉素靶蛋白 |

**中文摘要**

ATRA及其衍Th物对结肠癌RKO细胞Th物学行为的影响及机制研究

研究生左 莉

导师 汪渊教授 魏伟教授

（临床药理研究所，分子生物学中心实验室，合肥230032）

**研究背景**结直肠癌是常见的恶性肿瘤，在男性中己位居所有肿瘤的第三位，女性中居第二位。2008年新增结肠癌病例有120万，死亡病例有608, 700例。随着对结肠癌发生发展机制的认识不断深入，治疗方法的不断创新，经手术切除、化疗、放疗等积极治疗后，改善了患者的生活质量，但5年生存率仍无明显提高，结直肠癌术后仍可复发和转移，最终导致治疗失败甚至患者死亡。结直肠癌细胞的侵袭和转移若能被抑制，对肿瘤治疗将有很大促进。全反式维甲酸（all-trans retinoic acid, ATRA）已被用于治疗急性早幼粒细胞性白血病，并且获得完全缓解的疗效。近年临床应用证实，ATRA可显著提高白血病患者5年生存率，降低复发。

ATRA能否降低结直肠癌的远处转移？尚不清楚。

ATRA为维生素A的衍生物，是常用的诱导分化剂，可与细胞内维甲酸受体

（retinoic acid receptor, RAR）和维甲酸类X受体（retinoic acid X receptor, RXR）结合。这些受体被激活后与靶基因中的维甲酸应答元件（retinoic acid response

element，RARE）结合，以时间、剂量依赖的方式调节靶基因的表达，从而抑制增殖、诱导分化和凋亡。近年研究发现除应用于白血病的治疗外，体内外实验还证实ATRA及其衍生物还可促进多种实体瘤细胞的分化，明显抑制肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌细胞的侵袭和转移，结果表明分化诱导对肿瘤细胞的侵袭、转移具有治疗和预防作用。但ATRA可产生较强的维甲酸综合症。为降低ATRA的毒副作用，本校药学院在ATRA 的基础上合成了其衍生物：4-氨基-2-三氟甲基苯酯

（4-Amino-2-Triﬂuoromethyl-Phenyl Retinate, ATPR），目前已证实ATPR可以抑制胃癌、肺癌和乳腺癌细胞的增殖和迁移。

肿瘤的转移与其粘附性降低和运动性增强有关，肌球蛋白轻链激酶（myosin

light chain kinase，MLCK）的表达增加和活化是非肌肉细胞运动的重要启动因素。ZO-1和occludin是最常见的紧密连接蛋白，其在细胞膜的定位决定了细胞间紧密连接状态。低分化的肿瘤细胞同质粘附能力降低，异质粘附能力增强，侵袭和迁移能力增强，因而具有高的转移潜能，而诱导分化后的癌细胞则反之，然后诱导分化是否能抑制肿瘤细胞的侵袭和转移？ATRA抑制肿瘤细胞的侵袭、转移，其作用机制是否通过降低细胞运动和增加细胞粘附性而发挥？尚不清楚。

目前，ATRA及ATPR在结肠癌组织和细胞中的作用及其相关机制报道极少。本课题旨在探讨ATRA及ATPR对结肠癌RKO细胞生物学行为的影响，ATRA及其ATPR是否能降低结肠癌细胞的迁移及这种作用是否与MLCK和紧密连接蛋白的表达有关。为ATRA及ATPR更好的用于结肠癌的临床治疗奠定理论基础。

**目的**研究ATRA及ATPR对结肠癌细胞系RKO的增殖、凋亡、软琼脂克隆形成能力和迁移的影响，并初步探讨其可能的作用机制。

**方法**用不同浓度的ATRA和ATPR分别处理结肠癌细胞株RKO细胞，MTT和细胞周期检测试剂盒检测药物刺激后细胞的增殖能力；Real time PCR 的方法检测

ATRA和ATPR对RKO细胞增殖关键调控因子p21、cyclinD1 mRNA的水平。用

Hoechst染色检测ATRA和ATPR对RKO细胞凋亡的影响；Soft agar检测RKO细胞软琼脂软琼脂克隆形成能力。细胞划痕实验检测两种药物对RKO细胞的迁移能力影响。为进一步研究ATRA和ATPR影响RKO细胞迁移的作用机制，real time

PCR和免疫荧光法分析ATRA和ATPR对RKO细胞紧密连接蛋白ZO-1和occludin表达和定位；Western blot检测ZO-1、occludin、MLCK、MLC、MLCP、MAPK信号通路蛋白、凋亡和自噬相关蛋白、维甲酸受体和维甲酸X受体的表达。RKO细胞中分别和组合加入ATRA，ATPR，PD98059, PMA和ML-7，采用细胞划痕实验观察细胞迁移变化。进一步验证ATRA与ATPR是通过何种机制影响MLCK等分子的表达和活性，构建ERK过表达和敲除的慢病毒载体，转染入RKO细胞中，检测ERK通路对MLCK表达的影响。构建MLCK敲除慢病毒载体并转染入

RKO细胞，分别用流式细胞术、细胞划痕和soft agar检测MLCK敲除对RKO细胞增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力的影响。

**结果**ATRA和ATPR均能抑制RKO细胞的增殖，使RKO细胞周期阻滞在G1/S期，这一作用与其上调p21和下调cyclinD1 mRNA水平有关。ATRA对RKO细胞的凋亡作用不明显，进一步分析显示ATRA处理后RKO细胞自噬标志性蛋白beclin-1和LC3β的表达均明显升高，抗凋亡蛋白的表达也提升。提示RKO细胞可能通过增加自噬而抵抗了ATRA诱导的凋亡作用。其衍生物ATPR在低浓度下即能有效诱导RKO细胞凋亡。Western结果显示ATPR对自噬相关蛋白的表达影响不大。ATRA和ATPR均能明显抑制RKO细胞迁移和软琼脂克隆形成能力，主要与降低细胞运动和增加细胞间紧密连接有关。结果证实ATRA 和ATPR 抑制

MLCK、MLC表达和MLC磷酸化，但是对MLCP表达没有影响，最终使MLC磷酸化降低，细胞运动能力降低。ATRA和ATPR上调occludin的表达并提高其在细胞膜的定位，对胞浆ZO-1的表达无明显影响，但是膜蛋白中可检测到两种药物处理后ZO-1的表达明显增加，免疫荧光的结果也证实ATRA和ATPR可增加occludin和ZO-1在细胞膜的定位。为了进一步明确ATRA和ATPR如何调控MLCK等分子的表达，我们检测了维甲酸受体的表达，结果发现结肠癌RKO细胞中RARγ和RXRβ的表达很低，但是RARα、RARβ、RXRα、RXRγ均有很强的表达。ATRA刺激RXRβ和RXRγ表达，ATPR对RARα、RARβ、RXRβ、RXRγ的表达有明显诱导作用。同时，在信号通路上，ATRA和ATPR可以抑制ERK/MAPK通路。我们加入了该通路的抑制剂和刺激剂，结果发现PD98059与ATRA或者ATPR联用可增加其抑制迁移的作用，相反PMA逆转了两种药物迁移抑制作用。为了明确

ATRA和ATPR是否通过ERK通路下调MLCK的表达，构建了ERK过表达和敲除的慢病毒载体并转染入RKO细胞，结果发现ERK1的敲除明显抑制了MLCK

mRNA和蛋白的表达。进一步观察ATRA和ATPR是否通过降低MLCK来减少细胞的迁移，敲除RKO细胞中MLCK的内源性表达，结果发现RKO细胞的迁移和软琼脂克隆形成能力明显受到抑制。

**结论**ATPR具有与ATRA相同的抑制增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力作用，但是ATPR对RKO细胞的凋亡诱导作用明显强于ATRA. ATRA及ATPR通过与维甲酸受体结合，下调cyclinD1和上调p21表达抑制RKO细胞的增殖；与相应受体

结合后，ATRA和ATPR可抑制ERK/MAPK信号通路，下调MLCK的表达和活性，增加细胞间紧密连接蛋白的表达和定位，最终降低细胞运动性增加细胞间粘附而抑制RKO细胞迁移。

关键词：ATRA ATPR； 结直肠癌； 敲除； 迁移

英文摘要

The effect ATRA and ATPR on colorectal cancer cell line RKO and its possible molecular mechanisms

PH. D candidate: Zuo Li Preceptor: Prof. Wang Yuan, Prof. Wei Wei

Institute of Clinical Pharmacology and Laboratory of Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032

Colorectal cancer is the third most commonly diagnosed cancer in males and the second in females, with over 1.2 million new cancer cases and 608,700 deaths estimated to have occurred in 2008. The patient‟s life was improved after surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, 5-years survival rate was still no obvious improvement. Recurrence and metastasis are major characteristic of the malignant tumors including colorectal cancer. Therefore, inhibition of migration and metastasis would be beneficial for patients with colorectal cancer. ATRA (all-trans retinoic acid) was used to treat acute promyelocytic leukemia and had a complete remission. Clinical trail showed that ATRA could improve 5-years survival rate and reduce recurrence of acute promyelocytic leukemia. It is interesting to explicit whether ATRA and it‟s derivative could inhibit the migration and metastasis?

ATRA is an active metabolite of vitamin A under the family retinoid. Retinoids, through their cognate nuclear receptors, exert potent effects on cell growth, differentiation and apoptosis, and have significant promise for cancer therapy and chemoprevention. ATRA has become the first choice drug in the treatment of acute promyelocytic leukemia. ATRA is being increasingly included in anti-tumour therapeutical schemes for the treatment of various tumoral diseases such as Kaposi‟s sarcoma, head and neck squamous cell carcinoma, ovarian carcinoma, bladder cancer, neuroblastoma and has shown antiangiogenic effects in several systems, inhibiting proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and anti-inflammatory in Rheumatoid arthritis. ATPR( 4-Amino-2-Triﬂuoromethyl-Phenyl

Retinate) is ATRA derivative which was synthetized and presented by pharmacy college of Anhui medical university. Previously reports showed that ATPR could inhibit proliferation and migration of gastric cancer and breast cancer cell. Cell migration is associated with focal adhere reduction and motility enhancement. MLCK expression and activation are important for cell motility. Tight junction was decided by the cell membrane location of ZO-1 and occludin which are the common tight junction proteins. The intercellular adhesion was reduced while the invasiveness and migration was increased in poorly differentiated cancer cell. On the contrary, Differentiation induction of cancer cell increases intercellular adhesion and reduces cell motility. Why differentiation induction can inhibit cancer cell invasiveness and migrationWhetherdifferentiationinductionbyATRAcaninhibitcellinvasivenessandmigrationandit‟spossiblemolecularmechanismarenotclearnow.

Therefore, in this project we investigated the effects of ATRA and ATPR on colorectal cancer cell line RKO and its possible mechanism in order to establish the theoretic base for clinical use of ATRA and ATPR on colorectal cancer therapy.

**Aim** To investigate the effects of ATRA and ATPR on colorectal cancer cell line RKO cell apoptosis, proliferation, invasion and migration and its possible molecular mechanisms. **Methods** RKO cells were treated with ATRA and ATPR, then MTT and flow cytometry was used to detect RKO proliferation and cell cycle. Real time PCR was used to detect cycle associated gene cyclin D1 and p21 mRNA level. Hoechst staining and soft agar were used to detect RKO apoptosis and colony formation, respectively. Real time PCR and immunofluorescence was used to analyse tight junction protein occludin and ZO-1 expression and location in ATRA and ATPR treated RKO cells. Western blot was

Performed to detect ZO-1、occludin、MLCK、MLC、MLCP、MAPK signal molecular

Expression. RKO was treated with ATRA and ATPR respectively or associated with PD98059, PMA or ML-7, the migration ability was detected by wound healing assay. Moreover, ERK was knockdown and over-expressed in RKO cells to detect MLCK

Expression. We knock-down MLCK by shRNA to detect the effect of MLCK on RKO proliferation, migration and colony formation. **Results** ATRA and ATPR could inhibit RKO proliferation and arrest cells on G0/G1 phase. These effects were associated with the up-regulation of p21 and down-regulation of cyclin D1 mRNA by ATRA and ATPR. ATRA increased autophagy associated protein expressoion and had no obvious effect on RKO apoptosis, but ATPR could induce RKO cell apoptosis. Both ATRA and ATPR significantly inhibited RKO migration and colony formation which correlated with reduced

Motorablity and increased tight junction. There was a high concentration RARα、RARβ、

RXRα、RXRγbut low concentration RARγand RXRβin RKO cells. ATRA increased

RXRα、RXRβand RXRγexpression, while ATPR induced RARα、RARβ、RXRβ、RXRγexpression. Western blot results showed that ATRA and ATPR inhibited MLCK expression and MLC phosphorylation but had no effect on MLCP expression. Both ATRA and ATPR increased occludin and ZO-1expression and location on cell membrane, inhibited ERK acticvation. Combined PD98059 with ATRA or ATPR inhibited RKO migration, however PMA restored this effect. Knockdown of ERK inhibited MLCK mRNA and protein

Expression. Furthermore, knockdown of MLCK inhibited RKO migration and colony formation. **Conclusions** ATRA and ATPR exert anti-cancer effect by inhibiting proliferation, decreasing invasion and migration and promoting tight junction in RKO cells. ATPR had more effective induction on RKO cell apoptosis than ATRA. ATRA and ATPR combined with receptor, regulated MLCK and tight junction to decreased cell movement and increased cell conglutination, eventually inhibited RKO migration and colony formation.

**Key words:** ATRA/ATPR/colorectal cancer /knockdown/ migration

## 第一部分

ATRA及衍Th物ATPR对结肠癌细胞RKO Th物学行为的影响

摘 要

目的探讨ATRA及ATPR对RKO细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力和凋亡的影响。方法MTT和流式细胞术检测细胞增殖和细胞周期，Hoechst 33258染色、soft agar 和细胞划痕实验分别检测细胞凋亡、软克隆形成和迁移情况。结果

ATRA及ATPR可抑制RKO细胞增殖，使RKO细胞周期阻滞在G0/G1期。ATRA和ATPR 处理后RKO细胞的迁移和软软琼脂克隆形成能力明显下降。ATRA 对

RKO凋亡水平没有明显影响，但是ATPR具有很强的凋亡诱导作用。比较ATRA和ATPR的作用，结果发现50μM的ATPR与80μM的ATRA具有相同的抑制增殖迁移和软琼脂克隆形成能力作用效果。结论 ATPR 具有比ATRA 更强的抑制

RKO细胞增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力的作用，ATRA对RKO凋亡的作用不明显，但是ATPR可诱导RKO细胞凋亡。

关键词：ATRA ATPR RKO； 增殖； 迁移

The effect of ATRA and ATPR on RKO cell proliferation, migration, apoptosis and colony formation

Abstract

**Aim** To investigate the effect of ATRA and ATPR on RKO cell proliferation, migration, colony formation and apoptosis. **Methods** Flow cytometry and MTT were used to detect cell proliferation and cycle. Hoechst 33258 staining, soft agar and wound healing assay were performed to detect cell apoptosis, colony formation and migration. **Results** ATRA and ATPR inhibited RKO proliferation, arrested cell cycle at G0/G1 phase. After

Treated with ATRA or ATPR, the migration and colony formation of RKO cell were inhibited significantly. ATRA had effect on RKO apoptosis. However, ATPR could induce RKO apoptosis. **Conclusions** ATRA and ATPR could inhibit RKO proliferation, migration and colony formation. Compared with ATRA, ATPR has stronger inhibition effects on RKO proliferation, migration and colony formation. Moreover, ATPR could induce RKO apoptosis.

**Key words:** ATRA/ATPR/RKO/proliferation/migration

#### 1. 前言

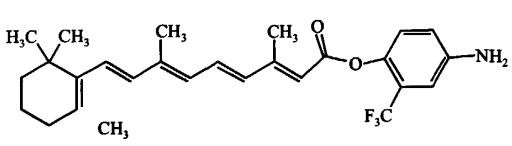
结直肠癌是一种常见的恶性肿瘤，全球发病率统计表明男性为第三位，女性为第二位[1]。随着饮食结构的改变，我国结直肠癌的发病率也逐年升高，目前其发病率己位居所有肿瘤的第四位，其死亡率居肿瘤死亡的第五位[2]。随着结肠镜等技术的应用，对结肠癌进行早期排查和诊断，结肠癌的发病率在西方国家有下降趋势，患者经手术切除、化疗、放疗等积极治疗后，改善了生活质量，但5年生存率仍无明显提高，复发和转移是结直肠癌治疗失败和患者死亡的重要原因[3,4]。大约一半的病人会经外科手术切除原发肿瘤后治愈，而另一半的病人则发生结肠癌转移。最常见的转移部位是肝脏，10-20%的转移位于肺，其他位于腹膜、卵巢、肾上腺、骨骼和脑部。发生转移的患者预后差，5年生存率大约在10%[5]。因此，肿瘤细胞的转移和侵袭若能被抑制，将提升肿瘤治疗的效果。全反式维甲酸

（all-trans retinoic acid, ATRA）已被广泛用于急性早幼粒细胞性白血病的治疗，并且得到完全缓解的效果[6]。多年临床实践证明，ATRA可显著提高白血病患者的生存率降低复发率[7]。ATRA能否降低结直肠肿瘤的侵袭和转移？倍受关注。

全反式维甲酸属于维甲酸家族，是维生素A的活性代谢物。维甲酸通过其核受体在细胞生长、分化和凋亡中发挥潜在作用，在肿瘤治疗和化学预防中具有重要意义。在早幼粒细胞白血病的治疗中，维甲酸的诱导分化疗法已经成为首选[8-10]。

全反式维甲酸已被列于很多肿瘤治疗规程，如卡波氏肉瘤、头颈鳞状细胞癌、卵巢癌、膀胱癌和成神经细胞瘤[11-15]，具有抗血管生成作用、抑制血管平滑肌细胞增殖和风湿性关节炎的抗炎症作用[16-18]。然全反式维甲酸除具有较强的毒副作用外，长期的临床应用也会产生维甲酸抵抗，对于用维甲酸治疗后复发的病人，再次使用维甲酸治疗将不能获得缓解，因此本校药学院试图获得毒性低、药效强的衍生物，通过改变ATRA（左图）母环外基团，获得了一系列的衍生物，其中4-氨基-2-三氟甲基苯酯（4-Amino-2-Triﬂuoromethyl-Phenyl Retinate, ATPR）（右图）符合设计要求[19]，目前已证实ATPR可抑制胃癌和乳腺癌等细胞增殖和迁移[20-21]。然而，ATRA及其衍生物ATPR在结肠癌组织和细胞中的作用及其相关机制目前报道极少。

本研究第一部分旨在探明ATRA及ATPR对结肠癌细胞RKO的增殖、迁移、凋亡、软琼脂克隆形成能力的影响。



2材料和方法

### 2.1 主要仪器与设备

低速自动平衡LDZ5-2型离心机（北京医用离心机厂），无菌超净工作台（苏净集团安泰公司），倒置显微镜（Nikon T300, 日本），液氮罐（YDS-35-125，成都液氮容器厂），-80℃超低温冰箱（Advantage, 美国），TGL-16H离心机（珠海黑马医学仪器有限公司），SK-1型37℃水浴箱（北京医疗设备厂），CO2培养箱（BINDER），AF100制冰机（SCOTSMAN），反渗透去离子水机：RO DI DIGITAL

（上海和泰），电子天平：JY10001，JY2002，精密pH计PHS-3C型（上海雷磁仪器厂），79-1 磁力加热搅拌器（杰瑞尔电器有限公司），电热三用水箱（北京

医疗设备厂），FA2004（上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂），国华SHZ-8Z恒温振荡器（常州国华仪器有限公司），梯度PCR仪：MASTER CYCLER（德国艾本德股份公司），扫描仪（Acer ScanPrisa 1240UT），Epics XL型流式细胞仪（美国Beckman Coulter公司），Tgradient48实时定量PCR仪（Biometra公司），荧光显微镜（Nikon Eclipse E800）。

### 2.2 药物

ATRA和ATPR均由陈飞虎教授友情提供。用DMSO溶解，配制成10mM浓度储存液，-20°C储存，使用时用完全培养基稀释至使用浓度。

### 2.3 细胞株及其培养

结肠癌细胞株RKO购自美国ATCC公司，来源于人结肠癌上皮组织。用含

10%胎牛血清的IMDM培养基培养，培养条件为5% CO2, 37°C 。

### 2.4 细胞复苏和冻存

#### 2.4.1 试剂

2.4.1.1 IMDM液体培养基：美国Gibco公司，4°C 储存备用，用前加入100 U·m l-1

链霉素、100 U·ml -1青霉素。

2.4.1.2胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司，-20°C保存，用前4°C融化，无需灭活。

2.4.1.3 PBS（无Ca2+、Mg2+）：称取Na2HPO4•12H2O 2.9g、KCl 0.2g、KH2PO4 0.2g、NaCl 8.0g溶解于800ml双蒸水中，定容至1000ml，110℃灭菌20min，置于4℃冰箱。

2.4.1.4含有0.53mmol/L EDTA的0.25%胰酶：0.25g胰酶，溶解于100ml蒸馏水中，并加入终浓度为0.53mmol/L EDTA，0.22µm滤器过滤后分装于无菌EP管中。

2.4.1.5二甲基亚砜（DMSO）购自Sigma公司。

#### 2.4.2 实验方法

2.4.2.1细胞复苏：将RKO细胞从液氮中取出，迅速放于37℃溶解。用移液器将

细胞吸入预先准备好的无菌培养瓶中，加入8ml IMDM培养基，混匀置于5% CO2

的培养箱，37℃培养。

2.4.2.1细胞传代：待细胞复苏24h后，轻轻弃去培养液，用无Ca2+、Mg2+ PBS洗细胞3遍，加入1ml胰酶消化3min，加入1ml IMDM完全培养基终止消化。反复吹打细胞至单细胞悬液，分入3瓶无菌培养瓶中继续培养。

2.4.2.2细胞冻存：待RKO细胞长至指数生长期，密度大概80～90%时，弃去培养液，PBS洗3遍，加入1ml胰酶37℃消化3min，加入1ml完全IMDM培养基终止消化；反复吹打数次至单个细胞悬液，将细胞悬液吸入10ml离心管，1200 r/min离心6min；弃去上清液，加入新鲜配制的冻存液（90%小牛血清和10% DMSO）重悬细胞，将细胞装入冻存管，放入含有异丙醇的冻存盒子，-80℃冰箱放置24h，然后放入液氮中长久保存。

### 2.5 MTT法检测ATRA及ATPR对RKO细胞增殖的影响

#### 2.5.1 试剂

培养细胞常规试剂（参照2.4）。四甲基偶氮唑蓝（MTT）：购于Sigma公司，称取MTT50mg，溶于10ml PBS中，配成5mg/ml使用浓度，过滤分装，避光保存于-20°C 。

#### 2.5.2 实验方法

待RKO细胞密度长到80～90%时（对数生长期），弃去培养液，用PBS洗3遍，加入1ml胰酶，37℃消化3min，加入1ml完全IMDM培养基终止消化，反复吹打细胞液至单个细胞悬液。细胞计数，调整细胞密度为5×10 7/L，种于96孔，每孔200μl。次日贴壁后弃去培养液，加入含有ATRA和ATPR的培养液，实验设置细胞对照组、溶剂对照组（DMSO），ATRA（10μM、20μM、40μM、60μM、80μM、100

μM、150μM、200μM），ATPR（10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、

100μM、150μM、200μM）孵育48h。每孔加入20μl MTT，37℃孵育4h，小心弃去上清液。每孔加入100μl DMSO，37℃摇床10min，酶标仪检测570nm波长OD值。每个浓度设置6个孔，做3次实验，取平均值，按以下公式计算生长抑制率：抑制

率%=（对照组OD570-试验组OD570）/对照孔OD570×100 %。

### 2.6 流式细胞术检测细胞周期

#### 2.6.1 试剂

Coulter DNA检测试剂盒购于美国Beckman Coulter公司。

#### 2.6.2 实验方法

RKO细胞生长至对数生长期，调整细胞密度为1×10 7／L，接种于六孔板，继续培养，细胞贴壁后换成无血清培养基饥饿24h，使细胞同步化，然后重新更换为完全用30μM和50μM ATRA和ATPR处理细胞，2天后常规消化，收集各组细胞，反复吹打成单细胞悬液，预冷PBS洗2次后，用100μl PBS重悬。按Coulter DNA检测试剂盒说明书操作，首先加入固定破膜剂50µl，反应20秒后迅速加入500µl PI染液，室温避光反应30 min后上机检测，每个标本检测10 000个细胞，重复计数

3次，资料由Analysis软件分析G0-G1、S、G2-M期细胞比例。

3.5 Hoechst染色检测细胞凋亡

#### 3.5.1 试剂

##### 3.5.1.1 细胞凋亡Hoechst染色试剂盒：购自Beyotime公司。

##### 3.5.1.2 10XPBS（pH 7.4）：将KCl 2g 、NaCl 80g、Na2HPO4•12H2O 18.2g、KH2PO4

2g溶解于双蒸水中，定容至1000ml，室温放置，用时双蒸水稀释10倍。

#### **2.7.2** 实验方法

常规洗涤盖玻片后，用重铬酸钾-浓硫酸洗液浸泡过夜，自来水清洗10遍，蒸馏水洗5遍，放入70%乙醇中浸泡24h，紫外灯下照射，无菌超净台内晾干。将无菌处理的盖玻片置于12孔板内，将RKO细胞种入，密度为4×10 4/孔，细胞贴壁后用ATRA（80μM）和ATPR（50μM）处理细胞，2天后取出固定染色。具体步骤如下：吸尽培养液，用PBS洗3遍，加入200μl固定液，固定20min；去除固定液，PBS清洗3遍，每次5min，吸弃液体，加入0.2μl Hoechst 33258染色液，染色5min，用PBS洗3遍，每次3min；滴加抗荧光淬灭封片液于载玻片上，将盖

玻片细胞面朝下盖在涂有封片液的载玻片上，尽量避免气泡，使细胞生长面接触封片液。荧光显微镜下观察细胞核形态，细胞核浓染致密或碎块状凋亡细胞。激

350nm为激发波长，460nm为发射波长。

### 2.8 细胞划痕实验检测细胞迁移

收集对数期RKO细胞接种于24孔板中，当细胞张至100%，准备划痕。划痕前，根据实验要求，配制含不同浓度药物的IMDM培养基各1ml。用10μl枪头细胞板上轻柔的划线，造成“伤口”，每孔可以划2条平行的划痕，或者划成“井”字。吸弃培养基，用PBS轻柔的洗三遍，在划痕的各孔中，加入上述配制的IMDM培养基，培养48h。弃去培养基，用无PBS轻柔洗三遍后，加4%多聚甲醛固定细胞

1h。用PBS洗三遍后，用0.02%考马斯亮蓝溶液染色30min，吸去染色液，用自来水冲洗后，拍照。利用Image pro plus软件测量划痕间距，隔相同距离测量（大约

200～300μm测量一次），并统计分析。

### 2.9 Soft agar检测细胞软琼脂克隆形成能力

#### 2.9.1 试剂

软琼脂：购自Invitrogen公司。配制方法：称取1.2g软琼脂，加入100ml蒸馏水中，110℃灭菌15min，4℃无菌放置备用。

5% MTT染液：配制方法同上。

2×DMEM细胞培养基：用500ml蒸馏水溶解DMEM培养基一袋，同时加入80万IU青霉素、链霉素40万IU、4mM谷氨酰胺、7.4g碳酸氢钠和0.44g丙酮酸钠，用灭菌后的0.22µm滤膜过滤后4°C 储存备用。

#### 2.9.2 实验方法

0.6%下层软琼脂：软琼脂放于65～75℃水浴箱中，避免沸腾。培养基放置至室温，迅速混和4ml 1.2%的琼脂（70℃）和4ml 2×DMEM培养基，将混合液加入

6孔板内，每孔1ml，不能产生气泡，铺满板底。六孔板置于湿盒内，室温放30min。

RKO细胞，长至大约50%密度时，分别加入50μM ATRA和50μM ATPR处理细

胞48h，倒掉培养基，PBS洗三遍，加入1ml胰酶，37℃消化3min，加1ml完全培养基终止消化，反复吹打，细胞计数，并将细胞稀释到2000细胞/ml。上层琼脂：首先吸取1ml 2×DMEM培养基，加入1ml 1.2%软琼脂（70℃），混匀后，迅速加入2ml细胞悬液，充分混匀，按每孔1.5ml加入六孔细胞培养板中，置于湿盒内室温30min。然后在细胞培养箱中孵育两到三周后，MTT染色，观察结果。

### 2.10 统计学处理

所得实验数据用均数±标准差方式表示，并用SPSS14.0统计软件进行分析。组内多样本计量资料用单因素方差分析；各组间计量资料用t检验；*p*＜0.05被认为有显著意义。

3结果

### 3.1 ATRA及ATPR抑制RKO细胞增殖

RKO细胞培养液加入不同浓度的ATRA处理48h后，MTT分析结果显示ATRA能显著抑制RKO细胞的增殖。在10μM～200μM浓度范围内，ATRA对RKO细胞的生长抑制率为19.03%到80%以上（图1A）。各个浓度的抑制率分别为：10μM，19.03%；20μM，21.86%；40μM，37.8%；60μM，49.65%；80μM，58.64%；

100μM，67.69%；150μM，75.42%；200μM，80.53%. ATRA的半数抑制率在

60μM左右。并且时间上显示在48h后有明显抑制。因此实验选择10-80μM ATRA

作为药物刺激浓度，处理时间为48h。

同时，RKO细胞培养液中加入不同浓度的ATPR处理48h后，MTT染色。结果显示ATPR也能显著抑制RKO细胞的增殖，其抑制效果比ATRA更明显。在10μM～200μM浓度范围内，ATPR对RKO细胞的生长抑制率为18.02%到96%以上（图1B）。各个浓度的抑制率分别为：10μM，18.02%；20μM，25.68%；30μM，45.8%；40μM，56.32%；50μM，65.46%；100μM，90.62%；150μM，

95.41%；200μM，96.33%. ATPR半数抑制率浓度在30μM左右。并且时间上

显示在48h后有明显抑制。因此实验选择10-50μM ATPR作为药物刺激浓度，处理时间同样为48h。



图1 ATRA及ATPR对RKO细胞增殖作用A: ATRA抑制RKO细胞增殖，半数抑制率浓度约60μM；B: ATPR抑制RKO细胞增殖，其半数抑制率浓度为30μM左右

Fig1 Inhibition effect of ATRA and ATPR on RKO proliferation A: ATRA inhibited RKO proliferation, the 50% inhibitory rate concentration was about 60μM; B: ATPR inhibited RKO proliferation, the 50% inhibitory rate concentration was about 30μM

### 3.2 ATRA及ATPR使RKO细胞周期阻滞在G0/G1 期

RKO细胞传代培养，在加药前一天饥饿24h使其同步化，然后加药继续培养

48h。用细胞周期检测试剂盒染色细胞检测周期变化，结果显示30μM和50μM ATRA（图2A）和ATPR（图2B）均能显著抑制RKO细胞增殖，使G0/G1期细胞的比例明显增加，提示两者均能使RKO细胞周期阻滞在G0/G1期。



图2 ATRA及ATPR对RKO细胞周期的影响

ATRA和ATPR使RKO细胞阻滞在G0/G1 期

Fig 2 The effect of ATRA and ATPR on RKO cell cycle RKO cell is arrested by ATRA and ATPR at G0/G1 phase

### 3.3 ATRA及ATPR对RKO细胞凋亡的作用不同

Hoechst染色结果显示10～100μM ATRA刺激后的细胞，极少见到明显凋亡形态特点，包括细胞浆凝缩、细胞核固缩或者碎裂、细胞膜轮廓不清等。但是20μM以上浓度ATPR刺激后可观察到明显的凋亡（图3）。



图3 ATRA和ATPR对RKO细胞凋亡的作用：10～100μM ATRA处理后极少见明显凋亡形态；20～100μM ATPR处理后可见细胞明显凋亡

Fig 3 The effect of ATRA and ATPR on RKO cells apoptosis: ATRA (10～100μM) had no effect on RKO apoptosis; ATPR（＞20μM）could induce RKO apoptosis

### 3.4 ATRA及ATPR明显抑制RKO细胞迁移

细胞划痕实验显示ATRA可抑制RKO细胞的迁移。正常对照组RKO细胞48h的迁移距离为32.19±3.12。加入ATRA处理48h后，不同浓度ATRA处理的RKO细胞的迁移距离分别为：10μM，31.77±3.6; 20μM，29.93±4.01; 40μM，24.43

±1.98; 16.44±2.78; 11.45±2.20; 9.04±3.66。统计学结果显示80μM和100μ

M ATRA可显著抑制RKO细胞迁移(F=27.952, p﹤0.05)（图4A）

不同浓度ATPR处理的RKO细胞迁移距离分别为：10μM，11.89±0.99; 20μM,9.37±2.84，30μM, 6.35±1.36; 40μM,8.90±1.40; 50μM，4.39±0.51。统计

结果显示50μM ATPR可显著抑制RKO细胞的迁移(F=28.184，p﹤0.05。（图4B）

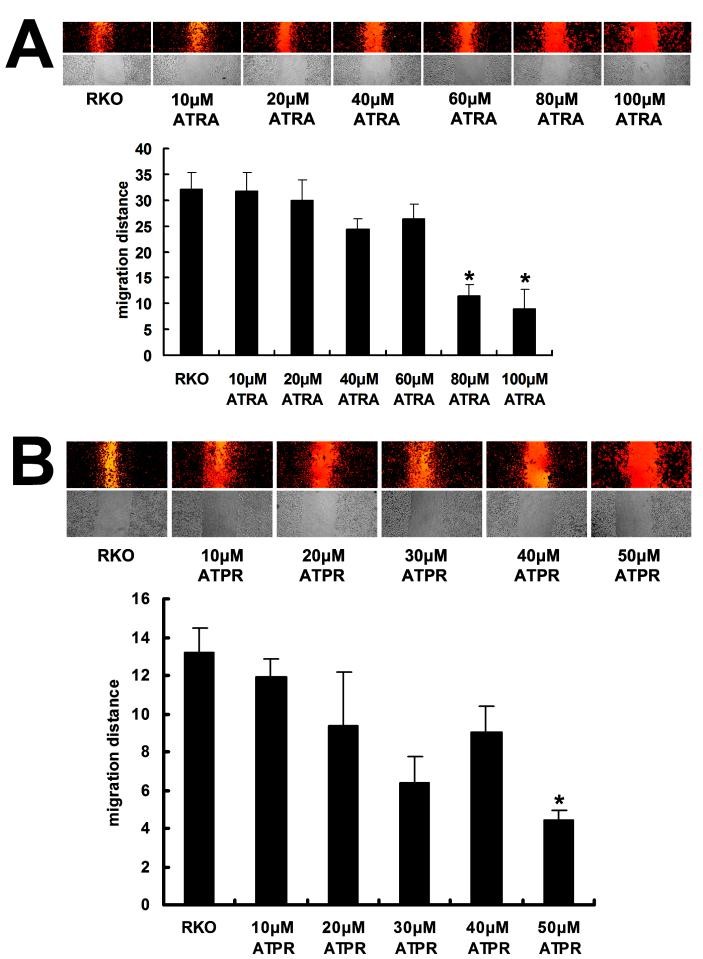


图4 ATRA和ATPR对RKO细胞迁移的影响A:80μM和100μM ATRA可显著抑制RKO细胞的迁移，同对照组比较，p＜0.05；B：50μM ATPR显著抑制RKO细胞迁移，与对照组比较，p＜0.05

Fig 4 The effect of ATRA and ATPR on RKO cell migration

A: ATRA(80μM and 100μM) significantly inhibit RKO migration, compared with control, p＜0.05；B: ATPR(50μM) significantly inhibit RKO migration, compared with control, p＜0.05

### 3.5 ATRA及ATPR抑制RKO细胞软克隆形成

细胞用60μM ATRA和30μM ATPR处理后，种植于6孔细胞培养板的软琼脂中，置于湿盒中，室温下放置30min后放入37℃细胞培养箱孵育两到三周，MTT染色，观察结果并拍照。结果显示，与对照组比较，ATRA和ATPR处理后的RKO细胞在软琼脂中形成的克隆数目明显减少，而且克隆体积变小。提示ATRA 和

ATPR均能显著抑制RKO细胞软琼脂克隆形成能力（图5）。



图5 ATRA和ATPR对RKO细胞软克隆形成的影响

ATRA 和ATPR处理后，RKO细胞克隆数减少，体积变小

Fig 5 The effect of ATRA and ATPR on colony formation ability of RKO cells

After treated with ATRA and ATPR, the quantity and volume decreased compared with control

### 3.6 ATRA和ATPR的作用比较

ATRA和ATPR均能抑制RKO细胞增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力。下图是两种药物的作用效果比较。划痕实验结果显示，40μM ATPR比80μM ATRA的对RKO细胞的迁移抑制作用效果更好。MTT结果显示40μM ATPR可以达到80μM ATRA对RKO细胞的生长抑制效果，其抑制率分别为56%和58%. Soft agar结果显示30μM ATPR与60μM ATRA的抑制软琼脂克隆形成能力的效果一致。

因此，较低浓度的ATPR可获得高浓度ATRA对RKO细胞增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力的抑制效果，可能会降低高剂量药物的毒副作用。同样是40μM的浓度，ATRA刺激后未见明显的细胞凋亡，但是ATPR刺激后可见细胞发生典型的凋亡形态。



图6 ATRA与ATPR的作用比较A: ATRA和ATPR对RKO细胞迁移作用的比较；B: ATRA和ATPR对RKO细胞增殖作用的比较；C: ATRA和ATPR对RKO细胞软软琼脂克隆形成能力的作用比较；D: ATRA和ATPR对RKO细胞凋亡作用比较；

Fig 6 comparative effects of ATRA and ATPR A: The comparative effects of ATRA and ATPR on RKO migration; B: The comparative effects of ATRA and ATPR on RKO proliferation; C: The comparative effects of ATRA and ATPR on RKO colony formation; D: The comparative effects of ATRA and ATPR on RKO apoptosis

##### 4 讨论

全反式维甲酸的作用涉及肿瘤、生长发育、神经系统、免疫系统、能量平衡

和肥胖等各个领域。在肿瘤和生长发育方面，维甲酸通过与其核受体结合，调节细胞生长、分化和凋亡，对肿瘤治疗和化学预防具有显著意义。ATRA的抗肿瘤作用除了对急性早幼粒细胞白血病有效以外，在实体肿瘤中也有很多报道。在肝癌中，全反式维甲酸通过诱导分化加强顺铂对肝癌的治疗效果[22]。ATRA可以诱导乳腺癌细胞分化、抑制其增殖[23]。0.1-10μM ATRA可以抑制胃癌细胞BGC-823的生长，而且其作用具有时间和剂量依赖性[24]。ATRA也可诱导卵巢癌和恶性黑色素瘤细胞分化[25-26]. ATRA抑制宫颈癌细胞的增殖有效预防宫颈癌[27]。

目前，ATRA在结肠癌中的作用也有少量报道。如抑制结肠癌细胞的侵袭和转移[28]。Astrid M Bengtsson提出ATRA上调半胱氨酰白三烯-2受体的表达，诱导结肠癌细胞分化[29]。我们的实验结果同样证实ATRA可抑制结肠癌RKO细胞的增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力，但是其对RKO细胞的凋亡作用不明显。

维甲酸治疗的最大问题是毒副作用大而且容易产生抵抗。尽管目前已采取一些措施如限制维甲酸用量、间歇用药、加强体育锻炼等，但仍然不能避免维甲酸抵抗，尤其是对一些复发的病人，几乎都会产生抵抗。目前认为维甲酸抵抗的作用机制包含以下几种：其一，药物浓度降低。而引起药物浓度降低的因素有三种：

（1）分解代谢加强：ATRA在细胞内的作用与其转运蛋白和代谢密切相关，在细胞内，与ATRA结合的蛋白有三种，CRABPⅠ、CRABPⅡ和FABP5. CRABPⅡ介导ATRA与RAR结合，发挥ATRA抗增殖、诱导分化和凋亡作用。FABP5介导ATRA与PPARβ/δ结合，最终使细胞走向相反方向：存活、增殖和肿瘤生长。因此ATRA对细胞的作用与FABP5/ CRABPⅡ的比值密切相关。CRABPⅠ与细胞色素P450 氧化系统共同参与 ATRA 降解代谢，其中 CYP26 (cytochrome-P450-isoform-26)起主要作用。在维甲酸抵抗的白血病患者中发现

CRABPⅠ表达上调。此外，ATRA 长期食用后还可与葡萄糖醛酸结合形成4-氧

-ATRA-葡萄糖醛酸使排泄增加。最终使ATRA血浆清除率增加，血药浓度下降。同时CRABPⅠ的表达增加，使ATRA与CRABPⅡ的结合减少，到达细胞核的ATRA减少，白血病对ATRA的敏感性降低[30]。（2）P糖蛋白（P-gp）的异常表达：该蛋白由多药耐药基因-1（MDR-1）编码，是一种依赖能量的跨膜流出泵，将嗜脂性

化合物泵出细胞。ATRA治疗后，P-gp的表达增加，该传输系统使ATRA不能积聚在细胞内，从而降低了细胞内ATRA的浓度[31]。其二，与PML-RARα融合蛋白有关。目前已有研究证实RARα基因存在的模式对急性早幼粒细胞白血病(Acute Promyelocytic Leukemia, APL)的生理过程很重要，决定了APL对维甲酸的敏感性[36-38]。无配体时，维甲酸受体招募组蛋白去乙酰化酶沉默调节子N-CoR，抑制下游靶基因的表达。在APL细胞内，由于RARα受体的突变导致异常招募（Histone deacetylases, HDACs），促进了髓样分化阻滞和细胞转化[32]。PML-RARα是白血病的致病因子，同时也是ATRA的治疗靶点。ATRA抵抗患者不能完整表达PML-RARα，导致该融合蛋白迅速降低，而使得ATRA不能发挥作用。其三，RARα的基因突变。其基因411号的碱基由C突变成T，使该受体羧基端缺52个氨基酸，导致其与ATRA的亲和力下降。其四，RARβ沉默也会导致维甲酸抵抗[33-36]。其五，ATRA会诱导白血病细胞产生自噬，并使白血病细胞通过自噬获得营养而逃避了细胞凋亡，从而导致ATRA治疗抵抗[37]。

为了解决维甲酸抵抗问题，一些报道指出将其他药物与ATRA联合使用可增加细胞对ATRA的敏感性。如塞来昔布增加人结肠癌细胞HT-29和SW480对全反式维甲酸的敏感性[38]。HDACs抑制子与ATRA联合使用可以诱导ATRA抵抗细胞株分化。如Kitamura指出ATRA和曲古抑菌素联合使用，体外处理从PLFZ/RARα易位的病人体内分离的APL细胞，可诱导分化作用。他们还证实HDACs抑制子和维甲酸联合使用抑制增殖、诱导凋亡，提升了维甲酸对APL细胞分化和生长的抑制作用。而且，在转基因小鼠中，早幼粒细胞含有PLZF/RAR-Α融合基因对维甲酸治疗抵抗，而联合使用的效果显示可以提升存活率[39-40]。

还有报道显示ATRA和苯基丁酸联合ATRA抵抗的小儿白血病患者进行治疗，可以诱导暂时的完全缓解。现已证明，ATRA与HDACs抑制子联合使用可以克服由于PLZF/RAR-α或STAT5b/RAR-α基因融合产生的维甲酸抵抗。而且，两种药物的协同作用在复发的PML/RAR-α阳性病人，而且是获得性对维甲酸持久抵抗的病人也很有用[41]。然而，临床联合使用HDACs抑制子和ATRA还很有限。

而我们致力于寻找低毒性高药效的ATRA衍生物，以求解决维甲酸治疗抵抗问

题。我校药学院对ATRA改造后获得了一系列的衍生物，其中ATPR相对于ATRA来说，具有更有效的抑制增殖、迁移和软琼脂克隆形成的作用，ATPR只需要半量浓度就可以达到甚至超过ATRA的作用效果，提示用ATPR代替ATRA进行治疗可能会降低药物的毒副作用，当然要确定其毒副作用，还需要进一步研究验证。同时10～100μM ATRA不能明显的诱导RKO凋亡，但是低浓度ATPR（20μM）就可有效诱导RKO凋亡。因此我们可以尝试用ATPR代替ATRA对白血病细胞或者实体肿瘤细胞进行诱导分化，可解决维甲酸治疗中的抵抗问题。

##### 5 结论

1. ATRA及ATPR可以抑制RKO细胞增殖、迁移和软克隆形成。

2.与ATRA比较，ATPR具有更有效的抑制RKO增殖、迁移和克隆形成作用。

3. ATRA对RKO凋亡作用不明显，但是ATPR可有效诱导RKO凋亡。

参考文献目录

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer Statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. Ca Cancer J Clin. 2011;61(4):212-36.

2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893-917.

3. Jemal A, [Siegel R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Siegel%20R%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) Xu J, Ward E, et al. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010; 60 (5):277-300.

[4. Chambers AF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Chambers%20AF%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) [Groom AC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Groom%20AC%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [MacDonald IC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22MacDonald%20IC%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) et al. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer. 2002;2(8):563-72.

5. Bartlett DL, Chu E. Can Metastatic Colorectal Cancer Be CuredOncology(WillistonPark). 2012;26(3):266-75.

6. Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic Leukemia. Blood. 1988;72(2):567-72.

[7. Kantarjian H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Kantarjian%20H%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) [O'Brien S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22O%27Brien%20S%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Cortes J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Cortes%20J%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), et al. Therapeutic advances in leukemia and myelodysplastic syndrome over the past 40 years. Cancer. 2008;113(7 Suppl): 1933-52.

8. Lotan R. Retinoids as modulators of tumor cells invasion and metastasis. Semin Cancer Biol 1991; 2: 197–208.

9. Hofmann SL. Retinoids–„‟differentiation agents‟‟for cancer treatment and prevention. Am J Med Sci 1992; 304: 202–13.

10. Mi JQ, Li JM, Shen ZX, et al. How to manage acute promyelocytic leukemia. Leukemia. 2012;26(8):1743-51.

11. Saiag P, Pavlovic M, Clerici T, et al. Treatment of early AIDS-related Kaposi's sarcoma with oral all-trans-retinoic acid: results of a sequential non-randomized phase II trial. Agence Nationale de Recherches sur le SIDA. AIDS. 1998;12(16):2169-76.

12. Fabricius EM, Kruse-Boitschenko U, Schneeweiss U, et al. Model examination of chemoprevention with retinoids in squamous cell carcinomas of the head and neck region and suitable biomarkers for chemoprevention. Int J Oncol. 2011;39(5):1083-97.

13. Purev E, Soprano DR, Soprano KJ. PP2A interaction with Rb2/p130 mediates translocation of Rb2/p130 into the nucleus in all-trans retinoic acid-treated ovarian carcinoma cells. J Cell Physiol. 2011;226(4):1027-34.

14. Zou C, Ramakumar S, Qian L, et al. Effect of retinoic acid and interferon alpha-2a on transitional cell carcinoma of bladder. J Urol. 2005;173(1):247-51.

15. Chang Q, Chen Z, You J, et al. All-trans-retinoic acid induces cell growth arrest in a human medulloblastoma cell line. J Neurooncol. 2007;84(3):263-7.

16. Liang C, Guo S, Yang L. All-trans retinoic acid upregulates VEGF expression in

Glioma cells in vitro. J Biomed Res. 2013;27(1):51-5.

17. Kosaka C, Sasaguri T, Komiyama Y, Takahashi H. All-trans retinoic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation targeting multiple genes for cyclins and cyclin-dependent kinases. Hypertens Res. 2001;24(5):579-88.

18. Cao W, Chen W, Liang X, et al. All-Trans-Retinoic Acid Ameliorates the Inflammation by Inducing Transforming Growth Factor Beta 1 and Interleukin 10 in Mouse Epididymitis. Am J Reprod Immunol. 2014 Jan 10.

19. Tang J, Wang X, Wang T, et al. In vivo pharmacokinetics, biodistribution and antitumor effect of amphiphilic ploy(L-amino acids) micelles loaded with a novel all-trans retinoic acid derivative. Eur J pharm Sci. 2014;51:157-64.

20. Wang B, Yan YW, Zhou JL, et al. A novel all-trans retinoid acid derivatives inhibits the migration of breast cancer cell lines MDA-MB-231 via myosin light chain kinase involving p38-MAPK pathway. Biomed Pharmacother. 2013;67(5):357-62.

[21. Wang N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23807003) [Ge JF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ge%20JF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23807003) [Pan CX](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pan%20CX%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23807003), et al. Anti-tumor effect of 4-Amino-2-Trifluoromethyl-Phenyl Retinate on human breast cancer MCF-7 cells via up-regulation of retinoid receptor-induced gene-1. Biomed Pharmacother. 2013;67(8):687-92.

22. Zhang Y, Guan DX, Shi J, et al. All-trans retinoic acid potentiates the chemotherapeutic effect of cisplatin by inducing differentiation of tumor initiating cells in liver cancer. J Hepatol. 2013;59(6):1255-63.

23. Garattini E, Bolis M, Garattini SK, et al. Retinoids and breast cancer: From basic studies to the clinic and back again. Cancer Treat Rev. 2014 Jan 18.

24. Zhang JP, Chen XY, Li JS e[t al. Effects of all-trans-retinoic on human gastric cancer cells BGC-823.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261132) J Dig Dis. 2007;8(1):29-34.

25. Wu S, Donigan A, Platsoucas CD, et al. All-trans retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G-1. Exp Cell Res

1997;232(2): 277–86.

26. Edward M, Gold JA, Mackie RM. Different susceptibilities of melanoma cells to retinoic acid-induced changes in melanotic expression. Biochem Biophys Res Commun 1988; 155(2): 773–8.

27. Feng D, Wu J, Tian Y, et al. Targeting of histone deacetylases to reactivate tumour suppressor genes and its therapeutic potential in a human cervical cancer xenograft model. PLoS One. 2013;8(11):e80657.

28. Woo YJ, Jang KL. All-trans retinoic acid activates E-cadherin expression via promoter hypomethylation in the human colon carcinoma HCT116 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012;425(4):944-9.

29. Bengtsson AM, Jönsson G, Magnusson C, et al. The cysteinyl leukotriene 2 receptor contributes to all-trans retinoic acid-induced differentiation of colon cancer cells. BMC Cancer 2013;13:336.

30. Michalik L, Wahli W. Guiding ligands to nuclear receptors. Cell. 2007; 129(4):649-51.

31. Takeshita A, Shinjo K, Naito K, et al. Role of P-glycoprotein in all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in acute promyelocytic leukaemia cells: analysis of intracellular concentration of ATRA. Br J Haematol. 2000;108(1):90-2.

32. Kitamura K, Hoshi S, Koike M, et al. Histone deacetylase inhibitor but not arsenic trioxide differentiates acute promyelocytic leukaemia cells with t(11;17) in combination with all-trans retinoic acid. Br J Haematol. 2000;108(4):696-702.

33. Liu JP, Wei HB, Zheng ZH, et al. Celecoxib increases retinoid sensitivity in human colon cancer cell lines. Cell Mol Biol Lett. 2010;15(3):440-50.

34. Ozpolat B, Mehta K, Tari AM, et al. All-trans-Retinoic acid-induced expression and regulation of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) in human promyelocytic leukemia. Am J Hematol 2002;70(1):39–47.

35. Sonneveld E, van den Brink CE, van der Leede BM, et al. Human retinoic acid (RA)

4-hydroxylase (CYP26) is highly speciﬁc for all-trans-RA and can be induced through RA receptors in human breast and colon carcinoma cells. Cell Growth Differ 1998;9(8):629–37.

36. Sirchia SM, Ferguson AT, Sironi E, et al. Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. Oncogene 2000;19(12):1556–63.

37. Sirchia SM, Ren M, Pili R, et al. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. Breast Cancer Res 2002;62(9):2455–61.

38. Liu JP, Wei HB, Zheng ZH, et al. Celecoxib increases retinoid sensitivity in human colon cancer cell lines. Cell Mol Biol Lett. 2010;15(3):440-50.

39. Kosugi H, Towatari M, Hatano S, et al. Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy. Leukemia. 1999;13(9):1316-24.

40. Kitamura K, Hoshi S, Koike M, et al. Histone deacetylase inhibitor but not arsenic

Trioxide differentiates acute promyelocytic leukaemia cells with t(11;17) in combination with all-trans retinoic acid. Br J Haematol. 2000;108(4):696-702.

41. Cunha De Santis G, Tamarozzi MB, Sousa RB, et al. Adhesion molecules and Differentiation Syndrome: phenotypic and functional analysis of the effect of ATRA, As2O3, phenylbutyrate, and G-CSF in acute promyelocytic leukemia. Haematologica. 2007;92(12):1615-22.

## 第二部分

ATRA及ATPR抑制RKO细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力及诱导凋亡等作用机制的初步探讨

摘 要

**目的**初步探讨ATRA及ATPR通过何种机制抑制RKO细胞增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力及诱导RKO凋亡。**方法** 分别采用Western blot检测维甲酸受体、

MAPK信号通路分子、MLCK、MLC、紧密连接蛋白、凋亡和自噬蛋白的表达及其磷酸化；Real time PCR检测occludin、ZO-1及细胞周期相关基因mRNA表达水平；免疫荧光法检测occludin和ZO-1的表达及定位；构建ERK和MLCK的过表达和干扰慢病毒载体，转染入RKO细胞获得稳定转染的细胞株，并采用western

blot和real time PCR方法检测目的基因的表达情况。Real time PCR和western blot方法检测ERK过表达和干扰对MLCK表达的影响；流式细胞术、细胞划痕、soft agar检测MLCK干扰后对RKO细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力的影响。**结果**结肠癌RKO细胞中RARγ和RXRβ的表达很低，但是RARα、RARβ、RXRα、

RXRγ均有很强的表达。ATRA增加RXRβ和RXRγ表达，ATPR对RARα、RAR

β、RXRβ、RXRγ的表达有明显诱导作用。ATRA及ATPR刺激后均能降低MLCK的表达和MLC的磷酸化；增加occludin的表达，增加occludin和ZO-1的表达和细胞膜定位，抑制ERK的磷酸化。获得稳定转染的含有ERK过表达和干扰的RKO细胞株，并检测到在ERK1敲除的细胞株中MLCK的mRNA和蛋白的表达明显降低。进一步将MLCK敲除后，发现RKO细胞的增殖水平无明显影响，但是其软琼脂克隆形成能力和迁移能力均明显降低。对凋亡和自噬蛋白的检测发现ATRA刺激后自噬蛋白水平明显增加，抗凋亡蛋白也增加，但是ATPR对自噬蛋白表达的影响明显小于ATRA。**结论**ATRA和ATPR分别作用于不同的受体，通过降低

MLCK的表达和增加紧密连接蛋白的表达和膜定位，降低细胞运动能力增加细胞间的粘附，最终抑制RKO细胞的迁移和软琼脂克隆形成能力；ATRA和ATPR增加p21的表达抑制cyclin D1的表达，使RKO细胞阻滞在G1期；ATRA可能通过

诱导自噬降低其诱导凋亡水平，ATPR自噬水平低而诱导凋亡作用较强。

关键词：MLCK occludin ZO-1 MAPK RNA 干扰

The effects of ATRA and ATPR on RKO cell proliferation, migration, colony formation, apoptosis induction and briefly discussion on the possible mechanisms

**Aim** To study the mechanisms of ATRA and ATPR on RKO cell proliferation, migration, colony formation and apoptosis. **Methods** Western blot was used to detect protein expression in RKO, including: RARs, RXRs, MAPK signal molecular, MLCK, MLC, occludin, ZO-1, apoptosis and autophagy associated proteins. Real time PCR was performed to detect occludin, ZO-1 and cycle associated gene mRNA expression. Immunofluorescence was performed to detect the expression and location of occludin

And ZO-1. Construction and infection of ERK and MLCK knockdown and overexpression vector in RKO cells. Real time PCR and western blot were performed to detect MLCK expression in ERK knockdown and over-expression RKO cells. Flow cytometry, soft agar and wound healing assay were performed to detect RKO proliferation, colony formation and migration. **Results** There had a high concentration

RARα、RARβ、RXRα、RXRγbut low concentration RARγand RXRβin RKO cells.

ATRA increased RXRα、RXRβand RXRγexpression, while ATPR induced RARα 、

RARβ、RXRβ、RXRγexpression. ATRA and ATPR (30μM and 60μM) significantly inhibited cyclin D1 mRNA expression and increased p21 mRNA expression. Both ATRA and ATPR inhibited MLCK expression and activation, increased occludin and ZO-1expression and location on cell membrane, inhibited ERK acticvation. Knockdown of ERK inhibited MLCK mRNA and protein expression. Furthermore, knockdown of MLCK inhibited RKO migration and colony formation. Furthermore, ATRA increased autophagy and anti-apoptosis protein expression while ATPR had slight effects on

Autophagy molecular expression. **Conclusions** ATRA and ATPR combined with

Receptor respectively, regulated MLCK and tight junction to decreased cell movement and increased cell conglutination, eventually inhibited RKO migration and colony formation. ATRA and ATPR arrested RKO cells at G1 phase by up-regulating p21 expression and down-regulating cyclin D1 expression.

**Keyword** MLCK: /occludin/ZO-1/MAPK/knockdown

#### 1. 前言

现有报道表明ATRA处理后可明显抑制肿瘤的侵袭、转移、增殖和诱导细胞凋亡，包括乳腺癌、前列腺癌和结肠癌等[1-4]，调控机制十分复杂，参与的信号转导通路众多，与许多基因上调或下调，涉及细胞凋亡、运动、周期、骨架、分化、代谢等多个方面有关，其作用结果是最终的综合效应，它影响p27、p53、p21、

integrin、MMPs(matrix Metalloproteinases)、p16甚至导致线粒体功能紊乱等[5-10]。人们通过大量研究已了解肿瘤转移的基本过程，包括肿瘤细胞间的粘附性降

低，从原发灶脱落并释放入血；在循环中存活；到达新的器官；渗入周围组织中；启动增殖并持续生长形成转移灶；转移灶因新生血管形成而不断生长形成继发肿瘤等[11]。肿瘤转移时，肿瘤细胞首先需从肿瘤组织中游离出来，此过程与细胞间的粘附有关，细胞间的粘附能力与细胞间紧密连接等蛋白的结构与功能密切相关；游离出的肿瘤细胞需运动才能迁移、侵袭和转移。非肌肉细胞运动的启动因素之一是MLCK的表达增加和激活。因此，肿瘤细胞运动能力增加和细胞间粘附能力下降是侵袭和转移的重要因素。低分化的肿瘤细胞同质粘附能力降低，异质粘附能力增强，侵袭和迁移能力增强，因而具有高的转移潜能，而诱导分化后的癌细胞则反之，这是共识性理论。本研究第一部分的结果显示ATRA及ATPR可以抑制细胞增殖、迁移，调节细胞凋亡，但是确切机制尚不明确。那么诱导分化后为何肿瘤细胞的侵袭、转移能力降低？其作用是否通过增加细胞粘附性和降低细胞运动能力而发挥？同时ATRA及ATPR通过何种机制调控RKO细胞周期？为何

ATPR可以诱导RKO凋亡但ATRA诱导凋亡的作用不明显？尚不清楚。

本课题第二部分旨在探讨（1）ATRA及ATPR是否通过改变细胞的运动性和紧密连接，影响RKO细胞的迁移；以及ATRA和ATPR通过何种机制调节RKO细胞运动性紧密连接状态。（2）ATRA和ATPR通过何种机制抑制RKO细胞增殖。（3）为何ATRA诱导凋亡的作用不明显而其衍生物ATPR却可明显诱导细胞凋亡。

#### 2. 方法

### 2.1 Western blot检测维甲酸受体、MAPK信号通路分子、MLCK、紧密连接蛋白的表达及其磷酸化酸化

#### 2.1.1 各组RKO细胞总蛋白的提取

##### 2.1.1.1 试剂

蛋白裂解缓冲液（RIPA pH 7.6）：10mM磷酸氢钠、1% Triton X-100、12mM脱氧胆酸钠、50mM亮肽素、1M磷酸二氢钠、0.2%叠氮钠、0.95mM氟化钠、154mM氯化钠、50mg/ml抑肽酶，配制成5倍浓度液，储存于4°C，备用，用前蒸馏水稀释

5倍，并且每ml加入1μl蛋白酶抑制剂PMSF。

##### 2.1.1.2 实验方法

将RKO细胞在6孔细胞培养板中培养，待细胞长至50%～60%密度，加入ATRA（10-80μM）和ATPR（10-50μM）处理细胞48h，每天更换新鲜培养液。然后用PBS洗涤细胞2~3遍，每孔加入150µl RIPA蛋白裂解液（含2mmol/L PMSF和亮肽素）裂解细胞，冰上放置5分钟后，用细胞刮子将细胞刮下，放入EP管中，冰上静置30分钟，然后于-80℃冰箱反复冻融三次，使细胞裂解充分，4°C 下14, 000

rpm离心30分钟，吸取上清放入另一洁净EP管中，BCA法对各管细胞蛋白总浓度进行定量

#### 2.1.2 RKO细胞膜蛋白的提取

##### 2.1.2.1 试剂

膜蛋白提取试剂盒购于上海生工生物工程有限公司。

2.1.2.2实验方法

RKO细胞培养，加药。用细胞刮子刮下细胞，再用预冷的双蒸水稀释的一倍浓度的洗涤液洗涤细胞三次（每次3000 rpm离心5 min）。加入1mL提取Buffer

（使用前，每mL 提取Buffer加入1ul 蛋白酶抑制剂和1ul DTT），超声破碎细胞，每次30 S，3～4次，每次间隔1 min，置于冰上冷却。装入1.5毫升的预冷的离心管中，冰上放置10分钟左右，期间取出剧烈震荡2-3次，于4℃，14 000 rpm离心10 min，弃沉淀，上清转至新管中。上清置于37℃水浴10min。再室温，13 000rpm离心5min，样品分成上层和下层（含膜蛋白）。

#### 2.1.3 BCA法测蛋白浓度

##### 2.1.3.1 试剂

BCA试剂盒：试剂A：1％BCA，试剂B：4％硫酸铜，标准蛋白：0.5mg/ml，购于美国perice公司。

##### 2.1.3.2 实验方法

根据具体实验要求，将试剂A和B按50:1混合成BCA工作液，不同的标本进行不同的稀释，培养细胞稀释5倍。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 测定 | 标准 | 空白 |
| 标准蛋白（0.5µl/1µl ） 样品  0.9%NaCL  工作液（50：1） | 0  10  10  200 | 10  0  10  200 | 0  0  20  200 |
| 轻轻混匀，37℃振摇 30 分钟，570nm 波长下比色。 | | | |

样品蛋白浓度计算：C测定=A测定÷A标准×0.5×10÷10×稀释倍数＝A测定/A标准/2×稀释倍数（µg/µl）。

#### 2.1.4 蛋白样品的稀释和变性

##### 2.1.4.1 试剂

2.1.4.1.2 RIPA蛋白裂解缓冲液。

2.1.4.1.3 4×蛋白上样缓冲液：取40ml甘油，4mg溴酚蓝，100ml浓缩胶缓冲液，

8g SDS，以及20ml巯基乙醇，溶解并充分混匀，双蒸水定容至100ml，放置于室

温备用。

##### 2.1.4.2 实验方法

以最低浓度的样品为标准，所有标准都按照最低浓度计算稀释，补充相应的蛋白裂解液，充分混和，80～100°C煮3～5分钟，用于实验或者-80°C冰箱储存备用。

#### 2.1.5 免疫印迹实验（Western blot）

##### 2.1.5.1 试剂

2.1.5.1.1蛋白质分子量标准（预染Marker）：购自Fermentas公司。

2.1.5.1.2 10×PBS（pH 7.4）,购于碧云天，一袋溶于1000ml，用时再用蒸馏水稀释

10倍。

2.1.5.1.3 10×电泳缓冲液：将10g SDS、144g甘氨酸、30g Tris溶于800ml双蒸水中，最后定容至1000ml，室温放置待用，使用前用双蒸水稀释10倍。

2.1.5.1.4浓缩胶缓冲液：取6.05g Tris溶解于40ml双蒸去离子水中，用1.0N HCl 调

pH至6.8，用双蒸水定容至100ml，4℃保存。

2.1.5.1.5凝胶贮备液：称取30g丙烯酰胺溶解于60ml微热去离子水中，加入0.8 g N，N-亚甲双丙烯酰胺（Bis），最后用双蒸水定容至100ml，用滤纸过滤，于4℃避光保存在棕色瓶中。

2.1.5.1.6分离胶缓冲液：将18.21g Tris溶解于40ml双蒸去离子水中，用1.0N HCl

调pH至8.8，用双蒸水定容到100ml，于4℃保存。

2.1.5.1.7 10%过硫酸铵（AP）：将1克过硫酸铵溶于10ml双蒸去离子水中，充分溶解，4℃保存备用。

2.1.5.1.8 10% SDS：将10g SDS溶于100 ml双蒸水中，分装后4℃储存待用，用前先放37℃水浴充分融解。

2.1.5.1.9四甲基乙二胺（TEMED）

2.1.5.1.10 SDS-PAGE凝胶制备如下表：

不同浓度SDS-聚丙烯酰胺凝胶

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分离胶（%）(10ml) | | | |  | 5%浓缩胶(6ml) |
|  | 8 | 10 | 12.5 | 15 |
| 双蒸水 | 6.9 | 4 | 3.1 | 2.3 | 4.13 |
| 丙烯酰胺-Bis (ml) | 4.0 | 3.3 | 4.2 | 5.0 | 1.00 |
| 分离/浓缩胶缓冲液(ml) | 3.8 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 0.75 |
| 10%SDS (ml) | 0.15 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.06 |
| 10%AP (ml) | 0.15 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.06 |
| 0.5M TEMED (μl) | 10 | 10 | 10 | 10 | 5.00 |

2.1.5.1.11转移膜（PVDF膜）

2.1.5.1.12转移缓冲液：取甘氨酸14.4g、Tris 3.0g，溶于400ml双蒸水中，加入200ml

甲醇，然后用双蒸水定容到1000ml，4℃保存待用。

2.1.5.1.13 PBST（0.05%）：吸取0.5ml Tween-20溶于1000ml PH 7.4 PBS中，需现配现用。

2.1.5.1.14 5%脱脂奶粉/PBST: 5g脱脂奶粉溶于100ml PBST（pH 7.4）中，现配现用。

2.1.5.1.15抗体MLCK、MLC、pMLC、ZO-1、occludin、RARα、RARβ、RARγ、

RXRα、RXRβ、RXRγ、ERK、p-ERK、β-actin等购于美国Santa Cruz，用一抗稀释液稀释至适当浓度。

2.1.5.1.16二抗：羊抗鼠、羊抗兔IgG HRP，购自中杉金桥生物公司，用二抗稀释液稀释至合适浓度。

2.1.5.1.17显色试剂：ECL显色试剂盒购于PIERCE公司。

##### 2.1.5.2 实验方法：

按照常规方法配制聚丙烯酰胺凝胶，首先配制下层胶，其浓度根据所要分离的蛋白质大小选择，有10%-15%。配制好后加入异丙醇使胶面平整并且避免空气进入。然后配制上层浓缩胶，浓度为5%，倒入胶板前先将异丙醇弃去并用滤纸吸干，插入不同大小的梳子。倒入浓缩胶后半小时可使用。将配置好的凝胶及电泳

架子放入电泳槽，外层倒入使用过的电泳液，槽内必须是新鲜配制的电泳缓冲液。轻轻拔掉梳子，将电泳板放入电泳槽，加入蛋白样品大概30～80μg，预染的

蛋白标准加5µl；50v电压电泳大概30min，使样品全部移动到分离胶后换成100v

电压继续电泳，直到最小标准移动到胶板底部。

电泳结束后，取滤纸和PVDF膜浸泡于转移缓冲液中；取支架分别依次平铺放入海绵，三层滤纸，PVDF膜、凝胶、三层滤纸、海绵，PVDF膜放在正极；100毫安转移4小时，或者干转2h。具体时间根据待检测蛋白分子大小做相应调整。转移结束后根据蛋白标准的转移情况观察是否成功转移。

用5%脱脂奶粉/PBST室温封闭2小时；用一抗稀释液稀释MLCK、MLC、

pMLC、ZO-1、occludin、RARα、RARβ、RARγ、RXRα、RXRβ、RXRγ、ERK、p-ERK、β-actin等一抗4℃过夜；用含0.05% Tween-20的PBS洗3遍，每次10分钟；加入相应浓度的羊抗鼠或者羊抗兔IgG HRP二抗室温孵育2小时；用含Tween-20的PBS洗3遍，每次10分钟，最后用不含Tween-20的PBS洗1遍，10分钟；ECL试剂盒于暗室显色。

### 2.2 Real time PCR检测occludin、ZO-1和周期相关基因mRNA表达水平

#### 2.2.1 试剂

Trozl试剂购于Invitrogen公司；逆转录和实时定量PCR试剂盒购于Takara公司。

#### 2.2.2 实验方法

总RNA的提取：RKO细胞长至密度近80%时，用PBS洗三遍，分别加含有

30μM和60μM ATRA和ATPR培养基，刺激48h后用pH 7.4 PBS洗三遍，加入

1 ml Trozl，用细胞刮刮下，将细胞吸入EP管中，冰上放置5min。加0.2ml氯仿，震荡混匀，静置3min.12, 000g离心4℃15min。取上层水相，移至另一离心管，加0.5ml异丙醇，充分混匀，室温放10min.12, 000g，4℃离心10min。弃上清，加1ml 75%乙醇充分洗涤沉淀。4℃，7500g离心5min。弃上清，真空干燥10min。沉淀重悬于无RNA酶的水中，-80℃保存。取5µl RNA溶于495µl的水中，充分混匀，测定260和280nm的吸光度值（A），RNA含量=A260×4（g/l）。

**mRNA逆转录成cDNA:** 采用Takara试剂盒说明书操作。具体如下：（1）去除基因组DNA: 加入2μl 5×gDNA Eraser Buffer, gDNA Eraser，1μg总RNA，补无RNA酶的水至10μl.42℃,2 min. （2）向第一步中的10μl反应液中加入10μl master mix；37℃,15min；85℃,5s. 获得的cDNA储存于-20℃。

**Real time PCR：根据试剂盒说明书操作，具体如下：（1）加入SYBR 12.5**μl，双向引物各0.25μl，cDNA模板**2**μl，灭菌水10ul。将配好的反应液加入96孔板，每个样品加3个复孔，每孔10μl，用膜封住96孔板。（2）96孔板在迷你离心机中短暂离心，置于实时定量PCR仪，反应程序为：95℃，30sec；40个循环，每个循环步骤为95℃，5sec；60℃，30sec。

细胞周期相关基因的引物如下：

P21: prime F-CTGCCCAAGCTCTACCTTCC; prime R- CCACATGGTCTTCCTCTGCT。

Cyclin D1: prime F- AACGCAAACCCAACAGGTAG; prime R- CGGGAGTCGAGGAATTAGAA。

内参为人18s rRNA：

Prime F- CAGCCACCCGAGATTGACA; prime R- TAGTAGCGACGGGCGGTGTG。

ZO-1: primer F- CTCTCAACAGGTGTATAGAAAGGATCC; primer R- CTACGTATGGGAGTTGGGGTTC。

Occludin: primer F- AGAACTCTCCCGTTTGGATAAAGA; primer R- TTTGTAATCTGCAGATCCCTTCAC。

### 2.3 免疫荧光法检测occludin和ZO-1的表达及定位

#### 2.3.1 试剂

##### 2.3.1.1 4%多聚甲醛：称取4g多聚甲醛，放于80ml PBS中，边搅拌边加入500µl 1N

NaOH, 持续搅拌直至完全溶解，用PBS定容至100ml，4℃储存备用。

2.3.1.3 ZO-1和occludin抗体购自Santa Cruz公司，用含有吐温的PBS稀释奶粉到

5%浓度，再用这一缓冲液稀释两种抗体至合适浓度。

##### 2.3.1.4 FITC标记的驴抗羊IgG购自中杉金桥生物公司，用PBS稀释至合适浓度。

##### 2.3.1.5 无色mounting购自北京西美杰科技有限公司。

#### 2.3.2 实验方法

载玻片处理见凋亡实验方法。将处理后的无菌盖玻片放到12孔细胞培养板中。取对数生长期的细胞，胰酶消化后吹打成单细胞悬液，细胞计数，稀释至5x104细胞/ml，接种至放置有无菌盖玻片的12孔细胞培养板中，待细胞长成单层时，分别加入50μM ATRA或ATPR处理细胞48h，用PBS洗涤细胞3遍，4%多聚甲醛室温固定20分钟，PBS洗3遍，每次10分钟；用5%脱脂牛奶/PBS室温封闭2小时；加入occludin和ZO-1抗体（1:50稀释于5%脱脂牛奶/PBS），4°C 孵育过夜；

PBS洗3遍，每次10分钟，然后加入FITC标记IgG二抗（1:100稀释于PBS），室温孵育2小时；PBS洗3遍，每次10分钟，然后用无色mounting封片，无色指甲油固定，20分钟后荧光显微镜下观察结果并拍照。

### 2.4 Erk的过表达慢病毒载体的构建及包装

#### 2.4.1 过表达慢病毒载体的制备

##### 2.4.1.1 慢病毒载体信息

用于过表达的慢病毒载体为pMagi-IRES-GFP系列，具有如下特点：

a. 结构为CMV promoter-MCS-IRES-GFP；

b. 通过限制性内切酶EcoRI (GAATTC)和BamHI (GGATCC)或者NheI(GCTAGC)

和MluI (ACGCGT)使pMagi-IRES-GFP 载体线性化，将EcoRI/BamHI 或者

NheI/MluI双酶切后的目的基因DNA连接入线性化的pMagi-IRES-GFP载体，构建为带有目的基因序列的慢病毒载体。

##### 2.4.1.2 主要试剂

2.4.1.2.1 TransStart FastPfu DNA Polymerase: 购于北京全式金生物技术有限公司

（AP221-01）；

2.4.1.2.2 High Pure dNTPs (2.5 mM): 购于北京全式金生物技术有限公司

（AD101-01）；

2.4.1.2.3 Trans2K DNA Marker: 购于北京全式金生物技术有限公司（BM101-01）；

2.4.1.2.4 EcoR(FD0274)、BamHI(FD0054)、NheI(FD0973)、MluI（FD0564）均购于Fermentas公司；

2.4.1.2.5琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒V3.0：购于道普生物科技（北京）有限公司（15021-Ⅲ）；

2.4.1.2.6 T4 DNA ligase: 购于NEB（M0202L）；

2.4.1.2.7 Trans5α感受态细胞：北京全式金生物技术有限公司（CD201）；

2.4.1.2.8 2×Taq PCR StarMix with Loading Dye: 北京康润诚业生物科技有限公司

（A112-101）；

2.4.1.2.9高纯度质粒小提中量试剂盒（离心柱型）：天根生化科技（北京）有限公司（DP107-2）。

##### 2.4.1.3 实验方法

2.4.1.3.1引物设计针对目的基因的开放阅读框区域，设计特异性引物进入后续实验流程。用于引物设计和序列比对的软件为DNAMAN。引物序列为ERK2: Forward- CTAGCTAGCGCCACCATGGCGGCGGCGGCGGCGGC; Reverse ；

CGACGCGTTTAAGATCTGTATCCTGGCTGGAATC。

2.4.1.3.2钓取目的基因以HEK293细胞的cDNA为模板，通过PCR钓取目的基因，PCR反应体系如下：5×FastPfu buffer，10µl；High Pure dNTPs (2.5 mM)，4µl；TransStart FastPfu DNA Polymerase，1µl；Primer-F，1µl；Primer-R，1µl；HEK293 cDNA，1µl；dd H2O，32µl. 反应程序为：95℃,5min；35个循环，每个循环步骤为95℃,30sec；55℃，30sec；72℃，30sec；72℃，5min。

2.4.1.3.3目的基因与慢病毒载体双酶切回收PCR产物，用限制性核酸内切酶将载体和目的基因分别酶切。反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 (20 µl) |
| PCR 回收产物/pMagi-IRES-GFP 载体 (400 ng) | 2 |
| EcoRI ( 或 NheI) | 1 |
| BamHI ( 或 MluI) | 1 |
| 10×buffer | 2 |
| Dd H2O | 14 |

37℃酶切2h。

2.4.1.3.4载体与目的基因连接将双酶切后的目的基因DNA 与线性化的

pMagi-IRES-GFP载体回收后进行连接，连接反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 (10 µl) |
| 线性化的 pMagi-IRES-GFP 载体 (10 ng/µl) | 2 |
| 双酶切后的目的基因 DNA (100 ng/µl) | 1 |
| 10× T4 DNA 连接酶缓冲液 | 1 |
| 10× T4 DNA 连接酶 | 1 |
| Dd H2O | 5 |

16ºC连接过夜。

2.4.1.3.5连接产物转化

2.4.1.3.6菌液PCR鉴定阳性克隆分别挑取4个单克隆菌落，在LB培养基中扩大培养后，进行PCR鉴定。PCR反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 (20 µl) |
| 2×Taq Mix | 10 |
| 菌液 | 1 |
| Primer-F | 1 |
| Primer-R | 1 |
| dd H2O | 7 |

PCR反应条件：95℃，5min；20循环，每个循环包括3个步骤：95℃，30sec；

55℃，30sec；72℃，1min.72℃，10min。

2.4.1.3.6测序鉴定阳性克隆挑取一个菌液PCR阳性的克隆送Invitrogen公司测序。

#### 2.4.2 过表达慢病毒包装与滴度检测

##### 2.4.2.1 慢病毒包装辅助质粒信息用于慢病毒包装的辅助质粒为VSV-G、PMDL

和REV，详细信息参考：

[http: //web. mit. edu/jacks-lab/protocols/lentiviruses. html](http://web.mit.edu/jacks-lab/protocols/lentiviruses.html)

##### 2.4.2.2 主要试剂: DMEM培养基：购于Hyclone（SH30243.01B）;优级胎牛血清：购于Life Technologies（16000-044）; 0.25%胰蛋白酶：购于Life Technologies

（25200-072）;细胞培养用双抗：购于Life Technologies ( 15140-122); Lipofectamine 2000: 购于Life Technologies(11668-019); Opti-MEM: 购于Life Technologies(31985-070)

##### 2.4.2.3 慢病毒包装

2.4.2.3.1转染前24 h，用胰酶消化293T细胞，接种于细胞培养皿，放入5% CO2培养箱内37ºC培养。待细胞密度达70%~80%时可用于转染实验。需要保证良好的细胞状态和较少的传代次数，以确保更好的包装效果。

2.4.2.3.2转染前2 h将细胞培养基更换为低血清Opti-MEM培养基。

2.4.2.3.3在两个无菌的2 ml EP管中分别加入950μLOpti-MEM. 其中一个加入25µg质粒DNA (慢病毒骨架质粒10μg；pVSV-G 5μg；pMD2. G 5μg；REV 5μg)，另一个加入50μl Lipofectamine 2000，单独混匀后室温放置约5min后，将两管溶液混合，室温放置15 min。

2.4.2.3.4将DNA与Lipofectamine 2000充分混合，然后加入293T细胞中，轻轻混匀，于5% CO2培养箱中37ºC培养。

2.4.2.3.5培养6 h 后更换为新鲜的完全培养基，于5% CO2培养箱37ºC继续培养

48小时。

##### 2.4.2.4 慢病毒浓缩

2.4.2.4.1收集转染后48 h和72 h的293T细胞上清液（转染记为0 h）。

2.4.2.4.2用0.45µm的针孔滤器过滤细胞上清至15 ml超滤管中。

2.4.2.4.3 4000 rpm离心至终体积约250μl，通常需要45分钟。

##### 2.4.2.5 慢病毒滴度测定

2.4.2.5.1有限稀释法测定滴度测定前一天，传代293T细胞至12孔板，每孔加入

2×105个细胞，体积为500μl。根据病毒的预计滴度，准备6个无菌的EP管。每个管中加入90μl的无血清培养基。然后倍比稀释到6个孔。选取所需的细胞孔，去除100μl培养基。加入100 μl稀释好的病毒溶液。放入培养箱培养。24小时后，更换为新鲜的完全培养基。操作过程中切勿将细胞吹起。

2.4.2.5.2注释病毒滴度测定结果依赖于本身实验系统，如293T细胞传代次数、细胞状态、荧光显微镜品质、相关实验试剂质量及实验人员的操作技能，因此不同实验室测得滴度数值会有所差异（1-5 倍），但基本不会影响正常实验流程。滴度计算：根据GFP荧光的百分比，估算病毒滴度。比如，0.1μl病毒原液能使50%的细胞（总细胞数大约2×105个）被感染，则该病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量，本例中病毒的滴度为50%×2×105/0.1=1×10 6，单位为TU/μl，也即1×109 TU/ml。

#### 2.4.3 目的基因过表达混合克隆细胞株制备

2.4.3.1预感染实验感染前16 h，用胰酶消化对数生长期的目的细胞，接种于24孔细胞培养板中，于5%CO2培养箱内37ºC培养。待细胞密度达30%～40%时即可用于感染。感染前更换为新鲜培养基，并加入终浓度为8µg/ml的Polybrene。分别取0.5、1、2、4、10、20µl病毒原液加入目的细胞中，轻柔混匀。病毒感染6-12

h后更换为新鲜的完全培养基，于5% CO2培养箱37ºC中继续培养48-72小时。倒置荧光显微镜下观察被感染细胞的数量和荧光强度，选取目的细胞全被感染的最小病毒感染量作为正式实验的参考剂量。

2.4.3.2正式感染实验感染前16 h，用胰酶消化对数生长期的目的细胞，接种于

6孔板中，5%CO2培养箱内37ºC培养。待细胞密度达30%～40%时即可用于感染。感染前将细胞培养基更换为新鲜培养基，并加入终浓度为8µg/ml的Polybrene。以预感染实验中确定的病毒量为参考，根据细胞培养容器底面积大小，

相应增加病毒量进行正式感染实验。病毒感染6-12 h后更换为新鲜的完全培养基，于37ºC, 5% CO2培养箱中继续培养48-72小时。倒置荧光显微镜下拍照。将细胞扩大培养后，留取部分细胞检测目的基因表达，其余细胞扩大培养后冻存。

#### 2.4.4 目的基因过表达的检测

采用western blot 和Real time PCR的方法（同上）。

### 2.5 Erk干扰的shRNA慢病毒载体的构建及包装

#### 2.5.1 慢病毒载体信息

本实验用于RNA干扰的慢病毒载体为pMagi系列，载体图谱如下



pMagi-GFP慢病毒载体具有如下特点：a. 结构为mU6 promoter-polylinker-CMV promoter-GFP；b. 通过限制性内切酶HpaI (GTTAAC)和XhoI (CTCGAG)使pMagi-GFP载体线性化，将含有目的基因RNAi靶点的oligo DNA连接入pMagi-GFP载体，构建为带有目的基因RNAi靶点序列的慢病毒载体。

#### 2.5.2 主要试剂

Hpa I（FD1034）和Xho I（FD0694）均购于Fermentas公司。

#### 2.5.3 实验方法

2.5.3.1 siRNA靶点设计针对目的基因序列，依据RNA干扰序列设计原则，设计多个RNA干扰靶点，选择最佳的动力学参数靶点经过blast后进入后续实验流程。设计序列如下：NT: CAACAAGATGAAGAGCACCAA; Erk1: GACCGGATGTTAACCTTTA

（922）；Erk2: GAGGATTGAAGTAGAACAG(900)

2.5.3.2单链oligo DNA合成根据pMagi-GFP慢病毒载体oligo DNA的设计原则

[(http: //web. mit. edu/jacks](http://web.mit.edu/jacks-lab/protocols/pll37.htm))-[lab/protocols/pll37. htm）](http://web.mit.edu/jacks-lab/protocols/pll37.htm))，合成针对不同靶点的单链oligo

DNA。双链oligo DNA合成将合成后成对的单链oligo DNA溶于退火缓冲液中，

95ºC 水浴10min，自然冷却至室温，以NT 为例理论配对结果如下：

5-TGCAACAAGATGAAGAGCACCAATTCAAGAGATTGGTGCTCTTCATCTTGT TGTTTTTC-3;3-ACGTTGTTCTACTTCTCGTGGTTAAGTTCTCTAACCACGAGA

AGTAGAACAACAAAAAGAGCT-5. 备注：TTTTT是终止信号。酶切位点说明：



2.5.3.2克隆构建与鉴定方法同过表达载体的构建

#### 2.5.4 慢病毒包装和浓缩（同上）

#### 2.5.5 混合克隆细胞株制备和有效靶点筛选方法同上

### 2.6 Real time PCR和western blot方法检测Erk过表达和干扰对MLCK表达的影响

培养ERK过表达和敲除的RKO细胞株，提取总蛋白和RNA，利用Real time PCR和western blot检测MLCK的表达情况。具体操作方法同上，MLCK的引物序列如下：Forward: GGACTTTCAGCCTTGTGATTC; Reverse: CGCAAAACTTCCTTCTACTGTC。

### 2.7 MLCK干扰的慢病毒载体构建、稳定转染和检测

该步骤重复2.5操作，其中MLCK的三个干扰序列及位点如下：NT: CAACAAGATGAAGAGCACCAA;1#: GACGGGAACTGCTCTTTAA(5866);2#: GCGGGAAGGATTCTTCAAA(94);3#: GCGGGAAGGATTCTTCAAA(7672)

### 2.8 流式细胞术、细胞划痕、soft agar检测SiMLCK对RKO细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力的影响

培养MLCK敲除的RKO细胞株，观察与野生型RKO相比，MLCK敲除后细胞生物学行为的变化。分别采用流式细胞术、细胞划痕和soft agar检测各株细胞的增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力的变化。所用方法同方法一。

3结果

### 3.1 ATRA及ATPR诱导维甲酸受体的表达

RKO细胞经ATRA（10～80μM）及ATPR（10～50μM）刺激后收集蛋白，采用western blot的方法检测维甲酸受体和维甲酸X受体的表达水平。结果显示在结肠癌RKO细胞中RARγ和RXRβ的表达很低，但是RARα、RARβ、RXR

α、RXRγ均有很强的表达。ATRA刺激48h后，RARα和RARβ的表达没有明显变化（图7A和图7B）；RARγ在RKO细胞的丰度很低，低浓度ATRA可以轻微增加RARγ的表达(p=0.005)（图7C）；10μM ATRA可以增加RXRα的表达(p=0.000)，ATRA浓度增加时，RXRα的表达跟正常对照组比较反而没有变化（图7D）；ATRA以剂量依赖的方式增加RXRβ和RXRγ的表达(p=0.000)（图

7E和图7F)。

ATPR与ATRA的作用不同，当刺激48h后，30μM以上ATPR可增加RARα的表达(p=0.000)；RARβ的表达在30μM和40μM时升高，50μM时反而降低（图8A和图8B）(p=0.000)；RARγ在RKO细胞中，以及ATPR处理的RKO细胞中几乎都没有表达(图8C). ATPR对RXRα的表达无明显改变(p=0.061)（图8D）；ATPR(10～30μM)显著增加RXRβ的表达(p=0.000)，40～50μM ATRA微弱增加RXRβ的表达（图8E）。ATPR(10～40μM)对RXRγ的表达没有影响，但浓度达到50μM 时，ATRA显著增加RXRγ的表达(p=0.000)（图8F）。



图 7 ATRA对RARs和RXRs表达的影响：A: ATRA对RARα的表达无明显改变；B: ATRA

对RARβ的表达无明显改变；C: ATRA轻微增加RARγ的表达D：低浓度ATRA增加RXR

α的表达，\*p＜0.05；E: ATRA剂量依赖方式增加RXRβ的表达，（\*p﹤0.05, \*\*p﹤0.01）；

F: ATRA剂量依赖方式增加RXRγ的表达

Fig 7 The effect of ATRA on RARs and RXRs protein expression: A: ATRA had on effect on RARαexpression; B: ATRA had on effect on RARβexpression; C: ATRA mildly increased RARγexpression; D: ATRA(10μM) increased RXRαexpression, \*p﹤0.05); E: ATRA increased RXRβexpression in a does-dependent manner (\*p﹤0.05，\*\*p﹤0.01); F: ATRA increased RXRγexpression in a does-dependent manner (\*p﹤0.05，\*\*p﹤0.01)

图 8 (下页) ATPR对RARs和RXRs表达的影响：A: ATPR剂量依赖的增加RARα的表达, \*p

﹤0.05；B: ATPR(30μM和40μM)显著增加RARβ的表达，但50μM时表达明显降低，\*p

﹤0.05，\*\*p﹤0.01；C: RARγ的表达在有无ATPR时均很低；D: ATPR对RXRα的表达无明显改变；E: ATPR(10～30μM)显著增加RXRβ的表达，40～50μM ATRA微弱增加RXR

β的表达，\*p﹤0.05，\*\*p﹤0.01；F: ATPR(10～40μM)对RXRγ的表达没有影响，但浓度达到

50μM 时，ATRA显著增加RXRγ的表达\*p﹤0.05

Fig 8 The effect of ATPR on RARs and RXRs protein expression: A: ATPR increased RARαexpression in a dose-dependent manner, \*p﹤0.05; B: ATPR(30μM and 40μM) increased RARβexpression but 50μM ATPR significantly inhibited RARβexpression, \*p﹤0.05，\*\*p﹤0.01; C: RARγexpression was low in RKO cells with or without ATPR; D: ATPR had on effect on RXRαexpression; E: ATPR (10～30μM) significantly increased RXRβexpression, however, the effect was attenuated at 40 and 50Μm, \*p﹤0.05，\*\*p﹤0.01; F: ATPR (50μM) significantly increased RXRγexpression, \*p﹤0.05



### 3.2 ATRA及ATPR调节cyclin D1、p21 mRNA水平调控细胞周期

RKO细胞在30μM 和60μM ATRA及ATPR刺激后，提取RNA，利用real time

PCR分析cyclin D1、p21 mRNA水平。结果发现30μM和60μM ATRA显著抑制RKO细胞cyclin D1的转录水平（图9A），p＜0.05.30μM ATRA对p21的表达没有影响，但是60μM ATRA可增加p21的转录水平，p＜0.05（图9C）。

同时，30μM和60μM ATPR显著抑制RKO细胞cyclin D1的转录水平，p＜0.05（图9B）。同样30μM ATPR对p21的表达也没有影响，当浓度升高到60μM会显著增加p21 mRNA表达，p＜0.05（图9D）。



图9 ATRA和ATPR对cyclin D1和p21 mRNA表达的影响

**A:** 30μM和60μM ATRA能降低cyclin D1 mRNA的表达，p＜0.05；**B:** 30μM ATRA对p21的表达没有影响，但是60μM ATRA可增加p21的转录水平，p＜0.05；**C:** 30μM和60μM ATPR抑制RKO细胞cyclin D1的转录水平，p＜0.05；**D:** 30μM ATPR对p21的表达也没有影响，当浓度升高到60μM会显著增加p21 mRNA表达，＜0.05.

Fig 9 The effect of ATRA and ATPR on cyclin D1 and p21 mRNA expression: A: ATRA (30μM and 60μM) significantly inhibited cyclin D1 mRNA expression, p＜0.05; B: ATPR(60μM) significantly inhibited cyclin D1 mRNA expression, p＜0.05; C: ATRA(60μM) significantly increased p21 mRNA expression, p＜0.05; D: ATPR(60μM) increased p21 mRNA expression, p＜0.05

### 3.3 ATRA及ATPR抑制MLCK、MLC的表达及活性

Western blot结果显示ATRA和ATPR均能改变基因的表达，包括降低MLCK

的表达，而MLCP的表达不变。MLCK的表达降低会降低MLC的磷酸化，同时

MLCP的表达不变，最终结果使得MLC的磷酸化降低。其中，ATRA刺激细胞

48h后，检测MLCK、MLC的表达水平及其活性，结果发现，10～60μM ATRA

对MLCK的作用不明显，当增加到80μM后(p=0.002)，MLCK的表达明显减少

（图10A）。各种浓度的ATRA 对MLCP 的表达没有明显影响(p=0.072)（图

10B）。因此，MLC的磷酸化减少。通过pMLC的抗体检测也发现pMLC的水平明显减少(p=0.000)。此外，ATRA除了通过降低MLCK的表达来影响MLC的磷酸化外，还可直接减少MLC的蛋白表达（图10C）。



图10 ATRA对MLCK、MLCP表达及其活性的影响

**A:** ATRA(80μM)降低MLCK的表达, \*p﹤0.05; B: ATRA对MLCP的表达无影响；C:

ATRA(20～80μM)降低MLC的表达及其磷酸化水平，\*p﹤0.05 Fig 10 The effect of ATRA on MLCK and MLCP expression and activation

A: ATRA(80μM) inhibited MLCK expression, \*p﹤0.05; B: ATRA had no effect on MLCP expression; C: ATRA(20～80μM) inhibited MLC expression and activation, \*p﹤0.05

同时，细胞用ATPR同样刺激48h后，检测这几种蛋白的表达及其活性。结果也显示ATPR能降低MLCK的表达及其活性(p=0.000)（图11A），但是对MLCP的表达也没有显著影响(p=0.976)（图11B），最终降低MLC的磷酸化(p=0.000)（图11C）



图11 ATPR对MLCK、MLCP表达及活性影响：A: ATPR(40～50μM)降低MLCK的表达，

\*p﹤0.05; B: ATPR对MLCP的表达无影响；C: ATPR (20～40μM)降低MLC的表达及其磷酸化水平, \*p﹤0.05

Fig 11 The effect of ATPR on MLCK and MLCP expression and activation: A: ATPR(40～50μM) inhibited MLCK expression, \*p﹤0.05；B: ATPR had no effect on MLCP expression; C: ATPR (20～40μM) inhibited MLC expression and activation, \*p﹤0.05

### 3.4 MLCK的抑制剂ML-7对RKO细胞迁移的影响

RKO细胞中加入ML-7, 48h后考马斯亮蓝染色，观察结果并拍照。如图12，结果显示ML-7 能显著抑制RKO 细胞的迁移，两组之间采用t 检验统计，

t=12.746, p=0.000.



图12 ML-7对RKO细胞迁移的影响: ML-7能显著抑制RKO细胞的迁移能力，\*p﹤0.05 Fig 12 The effect of ML-7 on RKO migration:

ML-7 significantly inhibited RKO migration, \*p﹤0.05

### 3.5 ATRA及ATPR抑制ERK/MAPK信号通路

RKO细胞中加入不同浓度的ATRA和ATPR刺激，观察MAPK信号通路分子的表达水平。结果发现两者对p38和JNK信号通路的影响很小，但是能显著抑制

ERK/MAPK信号通路。结果如图13，ATRA和ATPR不改变ERK的表达，但是均能抑制ERK的磷酸化，从而抑制ERK/MAPK信号通路。



图13 ATRA和ATPR对ERK表达及活性的影响

**A:** ATRA不改变ERK的表达，但是却抑制ERK的磷酸化；B: ATPR也不改变ERK的表达而抑制ERK的磷酸化

Fig 13 The effect of ATRA and ATPR on ERK expression and activation A: ATRA inhibited ERK activation; B: ATPR inhibited ERK activation

### 3.6 ERK/MAPK信号通路对RKO细胞迁移的影响

RKO细胞培养到12孔板内，待长满后用10μl 枪头划痕，加入ATRA 及

PD98059和PMA继续培养，48h后考马斯亮蓝染色，拍照。结果显示50μM ATRA可抑制RKO细胞迁移(p=0.000)，当ATRA与ERK通路的抑制剂联合使用时可更加明显的抑制RKO细胞的迁移(p=0.036)。而加入MAPK的激动剂后，即使是在

ATRA存在的情况下，迁移也很迅速(与ATRA组比较，p=0.000) (14A). PD和PMA对ATPR诱导的迁移抑制作用与ATPR类似。如图14B，50μM ATPR可抑制RKO细胞迁移，同样，当ATPR与PD98059联合使用其抑制效果更加明显(p=0.000)，

PMA可以逆转ATRA诱导的迁移抑制作用（与ATPR组比较，p=0.000）。



图14 PD与PMA对ATRA和ATPR处理RKO细胞迁移的影响

A: ATRA可以抑制RKO细胞迁移，与对照组相比，\*p﹤0.05；PD可以增加ATRA对RKO

细胞迁移抑制的作用；PMA可以逆转ATRA的迁移抑制，与ATRA组相比，# p﹤0.05。B: ATPR可以抑制RKO细胞迁移，与对照组相比，\*p﹤0.05；PD可以增加ATPR对RKO细胞迁移抑制的作用；PMA可以逆转ATPR的迁移抑制，与ATRA组相比，# p﹤0.05。

Fig 14 The effect of PD and PMA on cell migration

A: ATRA inhibited RKO migration, compared with control, \*p﹤0.05, this effect was enhanced by PD but reversed by PMA, compared with ATRA treated cells, # p﹤0.05. B: ATPR inhibited RKO migration, compared with control, \*p﹤0.05, this effect was enhanced by PD but reversed by PMA, compared with ATPR treated cells, # p﹤0.05.

### 3.7 ATRA及ATPR增加occludin和ZO-1的表达及向细胞膜的转运

RKO细胞加入ATRA和ATPR刺激后，收集RNA，分析occludin和ZO-1的转录水平，结果发现80μM ATRA与50μM ATPR均能增加occludin的转录水平

（图15A和图15B）。80μM ATRA能增加ZO-1的转录（图15C），ATPR对ZO-1

的转录没有明显影响（图15D）。



图15 ATRA和ATPR对ZO-1和occludin转录的影响

A: 80μM ATRA可增加occludin的转录；B: 50μM ATPR可显著增加occludin的转录C: 80

μM ATRA可增加ZO-1的转录；D: ATPR对ZO-1的转录没有作用

Fig 15 The effect of ATRA and ATPR on ZO-1 and occludin transcription

A: ATRA (80μM) increased occludin transcription; B: ATPR(50μM) increased occludin transcription; C: ATRA (80μM) increased ZO-1 transcription; D: ATPR(50μM) had no effect on ZO-1 transcription

Western blot 的结果显示ATRA可增加occludin的蛋白表达（图16A），但是

对ZO-1的表达没有明显影响（图16B）。同样，ATPR对ZO-1的蛋白表达也没有明显影响（图16C）。但是提取膜蛋白，进行western blot检测发现，ATRA和ATPR刺激后，膜蛋白中occludin和ZO-1的含量明显高于正常对照组。



图16 ATRA和ATPR对occludin和ZO-1蛋白表达的影响

A: ATRA可增加细胞中occludin表达；B: ATRA对细胞中ZO-1的表达没有明显影响；

C: ATPR对细胞中ZO-1的表达也没有影响；D: ATRA和ATPR均能增加胞膜蛋白中ZO-1

的含量，\*p﹤0.05

Fig 16 The effect of ATRA and ATPR on occludin and ZO-1 expression

A: ATRA increased occludin expression; B: ATRA had no effect on ZO-1 expression; C: ATPR had no effect on ZO-1 expression; D: ATRA and ATPR increased ZO-1 in cell membrance, \*p﹤0.05.

RKO细胞种入含有玻片的12孔板，待长至30%时加药刺激48h，取出进行免

疫荧光染色。结果显示，50μM ATRA处理48h后，胞膜occludin和ZO-1的表达均明显增加。同样，50μM ATPR处理48h后，胞膜occludin和ZO-1的表达也明

显增加（图17）。结合western blot的结果提示，ATRA增加了细胞总occludin的表达及细胞膜occludin的表达，并不能增加ZO-1总蛋白表达，但是可增加其在细胞膜的定位。



图17 免疫荧光检测ATRA及ATPR对RKO细胞occludin和ZO-1的表达和定位

A：与对照组相比，ATRA和ATPR刺激后，细胞膜上occludin的含量明显增加；B：与对照组相比，ATRA和ATPR刺激后，细胞膜上ZO-1含量明显增加；

Fig17 The effect of ATRA and ATPR on occludin and ZO-1 expression and location

A: ATRA and ATPR increased the location of occludin on cell membrane; B: ATRA and ATPR increased the location of ZO-1 on cell membrane

### 3.8 构建ERK的过表达和干扰的慢病毒载体并稳定转染入RKO细胞

为了进一步明确丁酸是否通过MAPK信号通路调控MLCK、MLCP等蛋白的表达，我们构建了干扰和过表达的慢病毒细胞株，并将慢病毒载体转染入RKO细胞，获得稳定转染的细胞株。选取3个RNA干扰的位点，进行干扰其转染的滴度报告如表1和图18A。成功构建ERK过表达的慢病毒载体，并成功转染入RKO细胞，获得稳定转染株。其滴度报告如表2和图18A。对稳定转染的细胞株培养后提取蛋白，用western blot检测ERK蛋白表达水平，来鉴定转染效果。结果发现ERK1和ERK2分别干扰的细胞内ERK1和ERK2没有表达，过表达ERK细胞株中ERK表达明显增加，提示已成功获得稳定转染的ERK1/2干扰和ERK2过表达的RKO细胞株。



图18 ERK干扰和过表达慢病毒载体构建转染的效果检测 A: GFP在慢病毒载体感染的RKO细胞中的表达NT和NC：慢病毒载体对照；ERK1/2 RNAi：慢病毒介导的RKO细胞的ERK的敲除；ERK2 OE: ERK2过表达慢病毒载体的构建和转染。B: ERK1/2蛋白的表达水平

Fig 18 Construction and infection of knockdown and over-expression of ERK lentivirus vector

A: The GFP expression in RKO cells infected with lentivirus vector with shRNA or over-expression of ERK2. NT and NC: lentivirus vector control); ERK2 RNAi: lentivirus mediated shRNA of ERK2 in RKO cells; ERK2 OE: lentivirus mediated over-expression of ERK2 in RKO cells. B: Western blot was used to detect the expression of ERK2 in RKO cells. WT(wide type RKO cells); NT and

NC(lentivirus vector control); ERK2 RNAi: lentivirus mediated shRNA of ERK2 in RKO cells; ERK OE: lentivirus mediated over-expression of ERK2 in RKO cells.

表1 ERK干扰的慢病毒载体转染的滴度报告

| 病毒名称 | 滴度结果(TU/mL) |
| --- | --- |
| RNAi-LV NT | 5E+8 |
| Erk1-RNAi-LV | 1E+9 |
| Erk2-RNAi-LV | 1E+9 |

表2 ERK过表达的慢病毒载体转染的滴度报告

| 病毒名称 | 滴度结果 (TU/mL) |
| --- | --- |
| NC-OE-LV | 2E+8 |
| Erk2-OE-LV | 1E+8 |

### 3.9 ERK的过表达和敲除对RKO细胞MLCK表达的影响

获得稳定转染过表达和干扰的慢病毒载体的RKO细胞株后，传代培养，待长满后提取总RNA，检测mRNA的表达，结果发现ERK2敲除后，MLCK的转录没有太大改变，但是ERK1敲除的细胞MLCK的转录水平明显降低。提示ERK1通路影响MLCK的表达。继续培养细胞提取总蛋白，western blot方法检测MLCK蛋白的含量，结果发现ERK1敲除后MLCK 蛋白的表达水平也明显减少。提示

ERK1/MAPK信号通路调节MLCK的表达，其活性抑制会从转录和翻译水平降低

MLCK的表达。



图19 ERK1敲除后对MLCK mRNA和蛋白水平的影响

A: ERK1敲除后会降低MLCK mRNA水平；B: ERK1敲除后会降低MLCK蛋白的水平

Fig 19 The effect of ERK1 knockdown on MCLK mRNA and protein level

A: The level of MLCK mRNA was decreased in RKO cells with ERK1 knockdown; B: The level of MLCK protein was decreased in RKO cells with ERK1 knockdown

### 3.10 MLCK干扰的慢病毒细胞株的构建并稳定转染入RKO细胞

为了进一步验证MLCK对RKO细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力等生物学行为的影响，本实验室构建了MLCK干扰的慢病毒载体，并将其成功的转染入RKO细胞中，筛选后获得稳定的MLCK干扰的细胞株。其感染的滴度如表3和图20A。从结果图可发现GFP在三株MLCK干扰的细胞株中均有表达，提示三株细胞均感染成功。最后提取各株细胞的RNA，检测MLCK mRNA的水平，结果发现三株干扰细胞中，MCLK的表达均明显降低（图20B）。

表3 MLCK干扰慢病毒载体感染的滴度检测

| 病毒名称 | 滴度结果(TU/mL) |
| --- | --- |
| RNAi-LV NT | 5E+8 |
| MLCK-RNAi-LV 1# | 5E+8 |
| MLCK-RNAi-LV 2# | 5E+8 |
| MLCK-RNAi-LV 3# | 1E+9 |



图20 MLCK干扰的慢病毒载体构建、感染及检测

A: GFP在各株细胞中均有表达；B：三株MLCK干扰的细胞株中，

MLCK mRNA水平明显降低

Fig 20 Construction and infection of knockdown and over-expression of ERK lentivirus vector A: GFP were detected in three MLCK knockdown RKO cells; B: MLCK mRNA levels were

Decreased in these three cell lines.

### 3.11 SiMLCK对RKO细胞增殖、迁移、软琼脂克隆形成能力的影响

在三株MLCK敲除的细胞株中，SiMLCK#3的敲除效果最好，因此以此株细胞为研究对象，分别采用流式细胞术、细胞划痕和soft agar来研究MLCK敲除后对RKO细胞增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力的影响。结果发现RKO细胞周期在MLCK敲除后没有显著影响。提示MLCK在RKO细胞增殖中作用不大（图

21A）。但是在迁移和软琼脂克隆形成能力实验中却发现，MLCK 敲除后RKO 细胞的迁移明显减慢，如图21B。同时soft agar结果也证实MLCK敲除后RKO细胞在软琼脂中长成克隆的的数目和体积明显减少（图21C），提示MLCK也参与RKO细胞肿瘤的生长和迁移，对细胞周期没有影响。



图21 MLCK敲除对RKO细胞增殖、软琼脂克隆形成能力和迁移的影响

A: MLCK敲除对RKO细胞增殖无明显影响；B: MLCK敲除可显著抑制RKO细胞克隆形能力；C: MLCK敲除明显抑制RKO细胞的迁移

Fig 21 The effect of MLCK knockdown on RKO proliferation、colony formation and migration A: MLCK knockdown had no effect on RKO proliferation; B: MLCK knockdown inhibited RKO

Colony formation; C: MLCK knockdown inhibited RKO migration

### 3.12 ATRA及ATPR对凋亡和自噬相关蛋白表达的影响

利用10～80μM ATRA处理RKO细胞48h后，提取蛋白进行免疫印迹检测。结果发现，ATRA显著增加LC3β、beclin-1和Bcl-2的表达（图22）

用10～50μM ATPR同样处理RKO细胞48h，结果发现ATPR刺激后，低浓度下LC3β的表达有微弱增加，但是随着浓度升高，其表达量逐渐降低。10μM

ATPR可以增加beclin-1的表达，而20μM及更高浓度刺激下，beclin-1的表达明显降低。10～20μM ATPR均能增加Bcl-2的表达水平，但浓度大于2020μM

ATPR抑制Bcl-2的表达（图23）



图22 ATRA对凋亡和自噬相关分子表达的影响：ATRA增加LC3β、beclin-1和Bcl-2的表达，Fig 22 The effects of ATRA on expression of apoptosis and autophagy associated molecular: ATRA increased protein expression including LC3β, beclin-1 and Bcl-2



图23 ATPR对凋亡和自噬相关分子表达的影响：低浓度ATPR增加LC3β、beclin-1和Bcl-2

的表达，高浓度降低其表达

Fig 23 The effects of ATPR on expression of apoptosis and autophagy associated molecular: The expression of LC3β, beclin-1 and Bcl-2 were up-regulated by 10～20μM ATPR but

Down-regulated by 30～50μM ATPR.

4. 讨论

### 4.1 ATRA及ATPR通过上调p21表达和降低cyclin D1表达抑制RKO细胞增殖，使细胞周期阻滞在G1期。

Real time PCR结果显示ATRA和ATPR可以通过增加p21的表达和降低cyclin

D1的表达，使RKO细胞周期阻滞在G1期。

P21具有调节细胞周期的功能，在不同阶段与不同的cyclin/cdk结合发挥不同作用。P21一方面是正常细胞G1/S期转变的必需蛋白，一方面它是导致G1/S期阻滞的关键蛋白[12-16]. G1/S期的转变的大概机制可表述如下：G1期的细胞被有丝分裂信号诱导表达cyclin D，后者紧接着与Cdk4或6结合。Cyclin D/Cdk复合物进入细胞核内进行磷酸化。磷酸化的复合物可进一步磷酸化Rb，而相继cyclin E/Cdk2以及cyclinA、B依赖的Cdk进一步磷酸化Rb。

Rb具有抑制细胞生长的功能，是G1期Cyclin/CDK的重要靶蛋白。Rb蛋白被

Cyclin/CDK磷酸化后解除了对转录蛋白的抑制，尤其是E2F家族转录因子。E2F又诱导许多其他蛋白的表达。在G1早期到晚期这一时间段，Rb成为高磷酸化状态并释放出E2F，随后一系列基因得到表达，从而推动着细胞周期进入S期[17]。

CyclinD/Cdk复合物对于细胞G1/S期转变至关重要。P21蛋白在cyclin D/Cdk复合物的形成中起重要作用。研究表明，在G1/S早期，p21蛋白可促进cyclin D/cdk复合物的组装。在p21和p27双敲除的小鼠胚胎成纤维母细胞中，cyclinD1/D2/Cdk的复合体组装受损，而且cyclin D1即使过表达也只能滞留于细胞质，不能入核[18-19]。在G1/S中晚期，p21作用于cyclin/Cdk复合物抑制细胞周期转变。在细胞周期转变中，需要Rb大量和持续磷酸化，仅仅依赖cyclin D/Cdk复合物不能完成，还需要随后cyclin E/Cdk以及cyclin A、B依赖的Cdk发挥进一步作用，继续磷酸化RB，从而开始细胞内一系列与G1/S转变相关基因的转录。但cyclin D/Cdk复合物与p21 结合而耗竭细胞内p21，使p21 无法与细胞周期转变下游中cyclin

E/Cdk2以及cyclinA、B依赖的Cdk复合物结合，发挥其抑制细胞周期转变的作用。p21是否能抑制细胞周期的转变，取决于p21蛋白是否会被细胞周期转变初始

阶段形成的cyclin D/Cdk复合物耗竭，实际上取决于最终cyclin D/Cdk复合物与

p21蛋白相对量的多少。

在正常细胞周期转化过程中，cyclin D/Cdk复合物足以耗竭p21分子，从而使

p21无法与下游的其他cyclin/Cdk复合物结合而发挥抑制作用。而当细胞在分化过程中接受到其他抑制细胞周期的信号时，p21以p53依赖或非依赖的反式转录上调，从而使p21与cyclin D/Cdk复合物的相对量发生改变。cyclin D/Cdk复合物不足以耗竭p21, p21就与下游的cyclin/Cdk复合物结合发挥细胞周期抑制作用。

具体而言，在细胞周期G1/S转变过程中，首先有cyclinD(D1、D2、D3)与Cdk4、

6分子形成复合物，复合物进入细胞核内磷酸化，磷酸化后的cyclinD依赖性激酶可以磷酸化Rb，该步骤大致发生在G1中期。但仅仅依赖cyclin D依赖性激酶对

Rb的磷酸化是不够的，随后会有cyclin E/Cdk2活化，进而对RB其他位点进行磷酸化。另外在G1向S期转变过程中，还需要cyclin A/B依赖性激酶活化以维持

RB磷酸化状态。在G1后期，磷酸化后的RB与E2F家族成员结合力下降，进而使E2F完成一序列G1/S转变相关的DNA合成有关的一系列基因的转录。由此可知，在整个G1/S期，尤其是在G1/S后期，维持RB磷酸化至关重要，而这就需要cyclin E、A、B等依赖性激酶活化。但如果在这个时期存在过量活化的p21蛋白分子时，p21分子可与这些cyclin/Cdk复合物结合，p21与这些cyclin/Cdk复合物结合的结果是导致p21对这些复合物中Cdk的抑制，进而细胞不能维持RB磷酸化并完成Cdk的一系列生物学活性。因此细胞无法完成与细胞周期转变相关的一系列基因的转录，从而导致细胞周期的阻滞。

我们的实验研究证实ATRA和ATPR均能增加p21的表达，降低cyclin D1的表达。如前所述，两者的比例对细胞周期的调控至关重要。CyclinD1/p21是决定细胞能否越过G1/S期继续增殖的关键。而两种药物处理后均发现cyclinD1/p21比值下调，最终使细胞阻滞在G1/S期，抑制了细胞的增殖。

### 4.2 ATRA及ATPR抑制RKO细胞迁移的机制

细胞间连接主要包括紧密连接（tight junctions, TJ）、粘附连接（adherence

junctions，AJ）等连接蛋白。大多数细胞具有发育良好的连接系统，包括具有跨膜结构的occludin、claudin、与肌动球蛋白连接的ZO-1等紧密连接和具有跨膜结构E-cadherin的粘附连接等，维持这些细胞骨架蛋白的正常结构和功能对维系细胞间粘附能力具有十分重要的作用[20, 21]。

近年研究发现，恶性程度较高的低分化乳腺癌细胞ZO-1的表达明显降低，ZO-1的表达与转移呈明显负相关[22]；Occludin表达缺失与乳腺癌的发生发展相关[23]，表明肿瘤细胞紧密连接功能的缺失与肿瘤的发生发展及其转移有关[24-26]。我们的研究结果发现ATRA和ATPR处理后，结肠癌RKO细胞occludin和ZO-1的转录水平增加，occludin蛋白表达增加，ZO-1总的蛋白表达水平不变，但是occludin和ZO-1在细胞膜上的含量均明显增加。这些结果显示ATRA和ATPR均能增加RKO细胞的紧密连接功能。

细胞运动与MLCK的表达和活性密切相关。MLCK催化肌球蛋白轻链（myosin light chain, MLC）丝氨酸残基磷酸化，MLC磷酸化触发肌动球蛋白间的滑行而导致细胞的运动[27]。Minamiya等用real time RT-PCR分析39例非小细胞肺癌标本，结果表明MLCK mRNA的表达明显升高，升高幅度与复发和转移呈明显正相关[28]。有研究报道MLCK抑制剂ML-7可显著抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和转移[29-30]. Kidera等用氟伐地汀抑制Rho信号转导通路和MLC磷酸化，可明显降低黑色素瘤模型小鼠肿瘤细胞肺转移[31]。提示MLCK表达和活性升高可能与增加肿瘤细胞运动而发生转移有关。

我们的实验结果发现ATRA及ATPR处理后RKO细胞的迁移明显减慢，为了验证这种迁移抑制作用是否与MLCK的表达有关，我们采用western blot的方法检测发现ATRA和ATPR处理后RKO细胞的MLCK的表达明显降低，MLC的磷酸化减少。进一步验证MLCK是否与结肠癌细胞的迁移有关，我们加入MLCK的抑制剂ML-7，结果发现相比较对照组，ML-7能明显抑制RKO细胞的迁移能力。提示MLCK参与结肠癌细胞的迁移。为了进一步研究MLCK对RKO生物学行为的影响。我们利用RNA干扰技术，设计三个序列对MLCK敲除，结果发现与野生型RKO相比，MLCK敲除细胞株增殖没有太大变化，但是其软琼脂克隆形成能

力的能力明显降低，而且最重要的是敲除MLCK的RKO细胞的迁移明显降低。虽对ATPR的研究结果报道甚少，但也发现ATPR可以显著抑制胃癌和乳腺癌细胞的迁移。

ATRA及ATPR通过何种调控机制引起肿瘤细胞MLCK表达降低和紧密连接蛋白结构和功能的变化？资料显示ATRA通过其受体，调节肿瘤细胞的生长分化。目前已发现两种维甲酸受体家族，RARs和RXRs家族，分别都有α、β、γ3个亚型，另外ATRA也可以与过氧化物酶体增殖激活物受体δ/β(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, PPARδ/β)结合发挥作用[32-35]。在人体组织维甲酸受体和维甲酸X受体的表达具有严格的组织和细胞特异性，RARα的mRNA在大部分组织表达；RAR-β主要表达于神经组织，但是在皮肤中无表达；RAR-γ主要在皮肤组织表达。RXR-β表达于所有组织；RXR-α大量表达于肝脏、肾脏、脾脏和皮肤；RXR-γ主要表达于肌肉和脑组织[36-41]。第二部分实验首先对ATRA及ATPR处理RKO细胞中维甲酸受体和维甲酸X受体的表达进行检测。结果发现结肠癌RKO细胞中RARγ和RXRβ的表达很低，但是RARα、RARβ、RXRα、RXRγ均有很强的表达。ATRA刺激RXRα、RXRβ和RXRγ表达，ATPR对RARα、RARβ、RXRβ、RXRγ的表达有明显诱导作用。

同时，已有一些研究显示ATRA与其受体结合后会影响MAPK信号通路。Tatebe等报道ATRA的衍生物9-*cis*-RA可明显降低肝细胞癌ERK和STAT3的磷酸化[42]。Zohrabian等报道Rho/ROCK信号转导通路在恶性胶质瘤的迁移/增殖过程中起到十分重要的作用，且与MAPK/ERK信号转导通路密切相连[43]。我们课题组其他成员的研究结果表明ATRA可明显降低A549细胞ERK的磷酸化，ERK磷酸化的下降可降低MLCK的表达；PMA明显增加A549细胞迁移，而PD98059则明显降低A549细胞迁移能力。

为了进一步验证ATRA及ATPR是否通过MAPK信号通路影响RKO细胞生物学行为和MLCK蛋白表达，我们加入PMA和PD98059与ATRA同时刺激细胞，结果发现ATRA可抑制RKO细胞迁移，与PD98059同时刺激抑制率会增加，而且为负值，考虑是因为PD98059不仅可以抑制迁移，还能抑制细胞增殖，而在PBS

清洗过程中会洗掉一些老化的细胞，因此呈现迁移率为负值。但是加入PMA刺激后，即使是在ATRA存在的情况下，其迁移率也明显增加。提示MAPK信号通路参与细胞的迁移过程。因此，我们接着用western blot的方法检测MAPK信号通路想关蛋白的表达及活性，结果发现ATRA及ATPR对p38和JNK信号通路的影响不大，但是可以显著抑制ERK通路。为了进一步确认ERK通路是否调控MLCK的表达，我们采用RNA干扰的技术对ERK1和ERK2分别敲除，获得了稳定的

RKO细胞株。并同时构建ERK过表达的RKO细胞株，但是我们只成功的构建了

ERK2过表达的细胞株，ERK1过表达细胞株转染失败。随后对这些细胞株进行检测，发现ERK1敲除的细胞中MLCK mRNA和蛋白的表达均明显降低。而ERK2敲除对RKO MLCK的表达没有显著影响。提示ATRA及ATPR通过ERK1/MAPK信号通路调节MLCK的表达。

### 4.3 ATRA及ATPR对凋亡的作用机制

我们的实验结果表明ATRA对RKO细胞的凋亡作用不是很明显，只在高浓度下有少量细胞凋亡，western的结果显示ATRA可显著增加自噬标志性分子LC3β和beclin-1的表达，提示ATRA刺激细胞后，细胞的自噬水平明显增加。

自噬是体内的代谢过程，大多数细胞利用自噬来降解细胞成分，自噬也是细胞器更新的唯一途径。大范围的自噬常见于细胞应激，比如饥饿，缺氧，DNA损伤或者内质网应激。自噬具有细胞保护作用，可以帮助细胞对付营养缺乏，蛋白质和细胞器的大范围损伤以及毒物入侵。自噬体形成的分子机制与自噬相关基因

（autophagy associated gene, ATGs）有关，这些基因受到严密的调控。最显著的调控自噬的途径是雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）信号通路，位于AKT的下游。一般来说，高营养状态或者生长因子刺激会导致mTOR激活，mTOR 可以通过磷酸化自噬复合物包含两个激酶ULK1 或者ULK2还有

ATG1从而抑制自噬。通过生理途径或者药理途径抑制AKT或者mTOR信号通路使ULK1或者ULK2及其下游beclin1复合物去阻抑来激活自噬，beclin1也可以由其他途径激活[44-50]。

自噬也可以导致细胞死亡，被称为Ⅱ型程序性细胞死亡。自噬使细胞消化过度

就会导致死亡。这一观点过于简单化，因为细胞可以耐受很长时间的饥饿，自噬导致细胞存活而不是死亡。或者说，自噬可以消化一些细胞的重要组分，像线粒体，因此导致细胞死亡。在实验条件下，线粒体自噬可以移除损伤线粒体起到保护作用，但是当大量的线粒体被移除后会诱导细胞死亡。在生理条件下，确实存在一些实例证实自噬伴随着死亡，自噬的抑制子减轻了细胞死亡，尤其体现在果蝇的唾液腺，而且当抑制凋亡后，细胞依赖自噬最终死亡。

自噬在许多肿瘤细胞中高度激活，自噬抑制子可以使细胞或者死亡或者存活，这主要依赖于组织类型、肿瘤分级和治疗途径[51-53]。自噬与凋亡之间有着广泛而复杂的联系。Beclin1和ATG3可以各自结合抗凋亡蛋白BCL-2和FLIP。相反地，

caspases可以裂解beclin1，产生C端片段，促进了线粒体介导的凋亡[54-58]。近年的研究发现自噬在肿瘤细胞中主要起促进肿瘤细胞存活的作用。比如在其他药物如短链脂肪酸诱导的细胞凋亡过程中也检测到大量的自噬现象。而封闭自噬对细胞生长具有毒害作用。提示自噬在抗细胞死亡程序中起重要的控制作用[59]。

有研究报道ATRA诱导的粒细胞分化中，自噬、细胞死亡和分化之间存在联系。

APL导致粒细胞不能分化，阻断在早幼粒细胞阶段。研究证实ATRA处理的NB4细胞自噬体增加，自噬标志蛋白beclin-1表达增加。自噬的诱导与Bcl-2和mTOR的抑制有关。利用小干扰RNA敲除beclin-1表达增加了ATRA诱导的NB4的凋亡，但是并不影响分化过程。这些研究证实ATRA诱导的beclin1的表达上调提供抗凋亡信号，维持成熟APL细胞的活性，但是对粒细胞分化没有影响。这一机制参与

ATRA抵抗[60]。同时有报道证实beclin-1在维生素D3诱导HL-60细胞分化过程中具有抗凋亡作用，主要通过阻碍前凋亡蛋白Bad结合到Bcl-XL上。类似，也有人证实beclin-1和Bcl-2的相互作用可以调节凋亡。一些结果提示BH-3结构域蛋白质beclin-1可以竞争性的破坏Bad和Bcl-2和Bcl-XL的结合，避免凋亡的产生[61-63]。

我们的实验结果同样证实在RKO 细胞中，自噬蛋白的表达很低，但是当用

ATRA诱导细胞分化时，beclin-1和LC3β的表达明显增加，提示ATRA可诱导细胞自噬增加。同时我们观察到ATRA对结肠癌RKO细胞的促凋亡作用并不明显，因次，我们推测ATRA刺激后，RKO细胞通过增加自噬抵抗ATRA诱导凋亡的作用。当用ATRA衍生物ATPR诱导时，RKO细胞明显产生凋亡，western结果显示，

在低浓度ATPR处理的细胞中，beclin-1和LC3β的表达增加，而随着药物浓度升高，这两种自噬标志分子的表达很快降低，提示经改造后，ATPR可以减弱ATRA诱导的自噬作用，增加细胞凋亡作用，有效消除了ATRA抵抗。但是至于ATRA与ATPR对自噬的调节的具体作用机制尚需进一步研究。

5．结论

1. ATRA及ATPR下调cyclinD1/p21比值抑制RKO增殖。

2. MLCK敲除可显著抑制RKO细胞迁移和软琼脂克隆形成能力。

3. ATRA及ATPR通过与其受体结合，抑制ERK/MAPK信号通路，下调MLCK蛋白的表达降低细胞运动性，增加细胞间的紧密连接，抑制RKO细胞的迁移。

4. ATPR可以降低RKO自噬增加细胞凋亡作用。

参考文献目录

[1. Liu H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12779083) [Zang C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zang%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12779083) [Fenner MH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fenner%20MH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12779083) et al. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. [Breast Cancer Res Treat.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12779083) 2003;79(1):63-74.

2. Nwankwo JO. Anti-metastatic activities of all-trans retinoic acid, indole-3-carbinol and (+) -catechin in Dunning rat invasive prostate adenocarcinoma cells. Anticancer Res. 2002;22(6C):4129-35

[3. Adachi Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Adachi%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11399950) [Itoh F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Itoh%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11399950) [Yamamoto H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yamamoto%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11399950), et al. Retinoic acids reduce matrilysin (matrix metalloproteinase 7) and inhibit tumor cell invasion in human colon cancer [Tumour Biol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399950) 2001;22(4):247-53.

[4. Oldridge EE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Oldridge%20EE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23588494) [Walker HF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Walker%20HF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23588494) [Stower MJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Stower%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23588494), et al. Retinoic acid represses invasion and stem cell phenotype by induction of the metastasis suppressors RARRES1 and LXN. [Oncogenesis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588494) 2013;2: e45.

[5. Park SH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Park%20SH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21803488) [Lim JS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lim%20JS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21803488), [Jang KL.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jang%20KL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21803488) All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27. [Cancer Lett.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803488) 2011;310(2):232-9.

[6. Su B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Su%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22344541), Chen X, [Zhong C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhong%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22344541), et al. All-trans retinoic acid inhibits mesangial cell proliferation by up-regulating p21Waf1/Cip1 and p27Kip1 and down-regulating Skp2. J Nephrol. 2012;25(6):1031-40.

[7. Lu J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23588680), [Zhang F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23588680) [Yuan Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yuan%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23588680) et al. All-trans retinoic acid upregulates the expression of p53 via Axin and inhibits the proliferation of glioma cells. [Oncol Rep.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588680) 2013;29(6):2269-74.

[8. Dutta A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dutta%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20421725) [Sen T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sen%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20421725) [Chatterjee A.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chatterjee%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20421725) All-trans retinoic acid (ATRA) downregulates MMP-9 by modulating its regulatory molecules. [Cell Adh Migr.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421725) 2010;4(3):409-18.

[9. Dutta A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dutta%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19636436) [Sen T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sen%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19636436) [Banerji A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Banerji%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19636436) et al. Studies on Multifunctional Effect of All-Trans Retinoic Acid (ATRA) on Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and Its Regulatory Molecules in Human Breast Cancer Cells (MCF-7). [J Oncol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19636436) 2009;2009:627840.

10. Chattopadhyay N, Ray S, Biswas N, et al. Effect of all-trans-retinoic acid on integrin receptors of human cervical cancer (SiHa) cells. Gynecol Oncol. 1999;75(2):215-21.

[11. Chambers AF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Chambers%20AF%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) [Groom AC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Groom%20AC%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [MacDonald IC.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22MacDonald%20IC%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer. 2002;2(8):563-572.

[12. Abbas T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abbas%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19440234) [Dutta A.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dutta%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19440234) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. [Nat Rev Cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=p21%2Bin%2Bcancer%2Breview%2Band%2B2009%2Band%2BAbbas) 2009;9(6):400-14.

13. Gartel AL. [p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19449443)Biofactors. 2009;35(2):161-4.

14. Gartel AL. [P21(WAF1/CIP1) may be a tumor suppressor after all.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726367) Cancer Biol Ther. 2007;6(8):1171-2.

15. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. [p21--negative regulator of the cell cycle.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931660) Proc Soc Exp Biol Med. 1996;213(2):138-49.

16. Liu G, Lozano G. p21 stability: linking chaperones to a cell cycle checkpoint.

Cancer Cell. 2005;7(2):113-4.

[17. Piva R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Piva%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24496330). [Cell Cycle.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24496330) RB orchestrates fat cell and cell fate. 2014;13(4):508.

[18. Abukhdeir AM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abukhdeir%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18590585) [Park BH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Park%20BH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18590585). P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. [Expert Rev Mol Med.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590585) 2008;10: e19.

19. Blagosklonny MV. [Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548011)CellCycle. 2002;1(6):391-3.

[20. HervéJC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Herv%C3%A9%20JC%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Bourmeyster N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Bourmeyster%20N%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) [Sarrouilhe D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Sarrouilhe%20D%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), et al. Gap junctional complexes: from partners to functions. Prog Biophys Mol Biol. 2007;94(1-2):29-65.

21. Laird DW. The gap junction proteome and its relationship to disease. Trends Cell Biol. 2010;20(2):92-101.

22. Martin TA, Watkins G, Mansel RE, et al. Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. Eur J Cancer. 2004;40(18):2717-25.

23. Martin TA, Mansel RE, Jiang WG. Loss of occludin leads to the progression of human breast cancer. Int J Mol Med. 2010;26(5):723-734.

24. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. Biochim Biophys acta.2009;1788(4):872-891.

25. Martin TA, Mason MD, Jiang WG. Tight junctions in cancer metastasis. Front Biosci. 2011;16:898-936.

26. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, et al. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. Clin Exp Metastasis. 2011;28(1):55-63.

[27. Vicente-Manzanares M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Vicente-Manzanares%20M%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract) [Ma X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Ma%20X%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Adelstein RS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Adelstein%20RS%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), et al. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009; 10(11):778-790.

28. Minamiya Y, Nakagawa T, et al. Increased expression of myosin light chain kinase mRNA is related to metastasis in non-small cell lung cancer. Tumor Biol. 2005;

26(3):153-7.

29. Zhou X, Liu Y, You J, et al. [Myosin light-chain kinase contributes to the proliferation and migration of breast cancer cells through cross-talk with activated ERK1/2.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710790) Cancer Lett. 2008;270(2):312-27.

30. Cui WJ, Liu Y, Zhou XL, et al. [Myosin light chain kinase is responsible for high proliferative ability of breast cancer cells via anti-apoptosis involving p38 pathway.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453870) Acta Pharmacol Sin. 2010;31(6):725-32.

31. Kidera Y, Tsubaki M, Yamazoe Y, et al. Reduction of lung metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse melanoma by statin-induced blockade of the Rho/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase pathway. J Exp Clin Cancer Res. 2010;29 (1):127.

32. Maire Al, Alvarez S, Shankaranarayanan P, et al. [Retinoid receptors and therapeutic applications of RAR/RXR modulators.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22242853) Curr Top Med Chem. 2012;12(6):505-27.

33. Das BC, Thapa P, Karki R, et al. [Retinoic acid signaling pathways in development and diseases.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393720) Bioorg Med Chem. 2014;22(2):673-83.

34. Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM. All Trans Retinoic Acid and Cancer. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2011;33(2):241-9.

[35. Tabe Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tabe%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22685453) [Konopleva M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Konopleva%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22685453) [Andreeff M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Andreeff%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22685453) et al. Effects of PPARγLigands on Leukemia. [PPAR Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685453) 2012;2012:483656.

[36. Duong V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Duong%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20970498) [Rochette-Egly C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rochette-Egly%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20970498). The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. [Biochim Biophys Acta.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20970498) 2011;1812(8):1023-31.

37. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. FASEB J 1996;10:940–954.

38. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 1995; 83:835–839.

[39. Das BC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Das%20BC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24393720) [Thapa P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Thapa%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24393720), [Karki R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Karki%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24393720), et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. [Bioorg Med Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393720) 2014;22(2):673-83.

[40. Linney E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Linney%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21767634) [Donerly S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Donerly%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21767634) [Mackey L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mackey%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21767634) [et](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dobbs-McAuliffe%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21767634) al. The negative side of retinoic acid receptors. [Neurotoxicol Teratol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767634) 2011;33(6):631-40.

41. Maire Al, Alvarez S, Shankaranarayanan P, et al. Retinoid receptors and therapeutic applications of RAR/RXR modulators. Curr Top Med Chem. 2012;12(6):505-27.

42. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, et al. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human heptocellular carcinoma cells. Clin Cancer Res. 2008;14(9):2806-12.

43. Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, et al. Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. Anticancer Res. 2009;29(1):119-23

44. Li F, Vierstra RD. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. Trends Plant Sci. 2012;17(9):526-37

45. Zou M, Lu N, Hu C, et al. Beclin 1-mediated autophagy in hepatocellular carcinoma cells: Implication in anticancer efﬁciency of oroxylin A via inhibition of mTOR signaling[. Cell Signal.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Beclin%2B1-mediated%2Bautophagy%2Bin%2Bhepatocellular%2Bcarcinoma%2Bcells%3A%2BImplication%2Bin%2Banticancer%2Bef%EF%AC%81ciency%2Bof%2Boroxylin%2BA%2Bvia%2Binhibition%2Bof%2BmTOR%2Bsignaling) 2012;24(8):1722-32.

46. Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues[. Cancer Lett.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Autophagy%2Band%2Bcancer%3A%2BDynamism%2Bof%2Bthe%2Bmetabolism%2Bof%2Btumor%2Bcells%2Band%2Btissues) 2009;278(2):130-8.

47. Pallauf K, Rimbach G. Autophagy, polyphenols and healthy ageing. Ageing Res Rev. 2013;12(1):237-52.

48. Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. Genes Dev. 2010;24(23):2592-602.

49. Nezis IP. Selective autophagy in Drosophila. Int J Cell Biol. 2012;2012:146767.

50. Marquez RT, Xu L. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. Am J Cancer Res. 2012;2(2):214-21.

51. Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M, et al. Autophagic cell death and cancer. Int J Mol Sci. 2014;15(2):3145-53.

52. Gewirtz DA. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. Cancer

Res. 2014;74(3):647-51.

53. Zhang L, Yu J. Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. Curr Colorectal Cancer Rep. 2013;9(4).

54. Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart. J Mol Cell Cardiol. 2013; S0022-2828(13) 00313-1.

55. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meetApoptosis. 2014;19(4):555-66.

56. Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. Cell Signal. 2014;26(3):549-55.

57. Bincoletto C, Bechara A, Pereira GJ, et al. Interplay between apoptosis and autophagy, a challenging puzzle: new perspectives on antitumor chemotherapies. Chem Biol Interact. 2013;206(2):279-88.

58. Yu L, Liu S. Autophagy contributes to modulating the cytotoxicities of Bcl-2 homology domain-3 mimetics. Semin Cancer Biol. 2013;23(6 Pt B):553-60.

59. Tang Y, Chen Y, Jiang H, et al. Short -chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. Cell Death Differ. 2011;18(4):602-18.

60. Trocoli A, Mathieu J, Priault M, et al. ATRA-induced upregulation of Beclin1 prolongs the life span of differentiated acute promyelocytic leukemia cells. Autophagy. 2011;7(10):1108-14.

61. Wang J, Lian H, Zhao Y, et al. Vitamin D3 induces autophagy of human myeloid leukemia cells. J Biol Chem 2008;283:25596-605;

62. Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. Oncogene 2010; 29:1717-9.

63. Vázquez CL, Colombo MI. Coxiella burnetii modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. Cell Death Differ 2010; 17:421-38.

本论文的创新点

1.首次探讨了ATRA及ATPR对结肠癌RKO细胞的作用，研究发现两者均可抑制增殖、迁移和软琼脂克隆形成能力，ATRA对凋亡的作用不明显，但是ATPR可以明显诱导RKO细胞凋亡。

2. 首次探讨了ATRA及ATPR对结肠癌RKO细胞紧密连接形成的影响，发现两者均增加细胞间紧密连接而抑制细胞迁移。

3. 首次探讨了ATRA及ATPR抑制结肠癌RKO细胞增殖的可能机制，发现两者可上调细胞周期相关蛋白p21和下调cyclin D1的表达抑制细胞增殖。

4. 首次探讨了ATRA及ATPR抑制结肠癌RKO细胞迁移的可能的信号通路，研究证明在RKO细胞中，ATRA及ATPR可以与维甲酸受体结合抑制ERK/MAPK信号通路，降低MLCK的表达及活性，最终抑制RKO细胞迁移。

对课题的进一步设想

1. 继续深入探讨ATPR及ATRA作用于结肠癌RKO细胞的信号通路，采用RNA干扰技术敲除各种维甲酸受体，观察ATRA及ATPR的作用是否受到影响。

2. 探讨ATPR及ATRA对结肠癌RKO细胞成瘤能力的影响。用两种药物处理RKO细胞后行裸鼠荷瘤实验，分析ATRA及ATPR对RKO细胞成瘤能力的影响。

3. 继续探讨ATPR及ATRA对RKO细胞凋亡和自噬的影响及其相应的调控机制。

个人简历

姓名：左莉性别：女出Th年月：1981年11月民族：汉

入学时间：2009年9月学历：博士研究生籍贯：安徽省淮北市健康状况：健康

通讯地址：安徽合肥市梅ft路81 号安徽医科大学分子生物学中心实验室

邮编：230032

**Tel:** 0551-5161140(O), 18919623542 **E-mail:** [lizuo1981@163. com](mailto:lizuo1981@163.com)

**教育背景**

1.1996年9月-1999年7月安徽省濉溪中学

### 2.19 99年9月-2003年7月安徽医科大学生物技术专业理学学士学位

3.2003年9月-2006年7月安徽医科大学生化及分子生物学专业硕士学位

4.2006年7月至今安徽医科大学生化及分子生物学教研室讲师

5.2009年9月至今安徽医科大学临床药理研究所博士研究生

攻读博士期间发表论文

1. **Zuo L**, Lu M, Zhou Q, et al. [Butyrate suppresses proliferation and migration of RKO colon cancer cells though regulating endocan expression by MAPK signaling pathway.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416777) Food Chem Toxicol. 2013 Dec;62:892-900

2. **Li Zuo,** Yong Du, Man Lu, Junling Gao, Ruolei Hua, Sumei Zhang, Yi Wang, Huaqing Zhu, Qing Zhou, Wei Wei, Yuan Wang. Atorvastatin inhibits hyperglycemia-induced expression of osteopontin in the diabetic rat kidney via the p38 MAPK pathway. Mol Bio Rep(online [http: //link. springer. com/article/10.1007/s11033-014-3113-x)](http://link.springer.com/article/10.1007/s11033-014-3113-x))

3. Zhang SM, **Zuo L**, Gui SY, Zhou Q, Wei W & Wang Y. Induction of cell differentiation

and promotion of endocan gene expression in stomach cancer by melatonin. Mol Biol Rep. 2012,39:2843-2849. (并列第一作者)

4. Zhang Sumei, **Zuo Li**, Zhou Qing, Gui Shuyu, Shi Rui, Wu Qiang, Wei Wei & Wang Yuan.

Expression and distribution of endocan in human tissues. Biotechnic & Histochemistry. 2012; 87(3):172-8

攻读博士期间参与的课题：国家自然科学基金（编号: 81272399）

致 谢

刚接到博士录取通知书时，有过迷茫也有过困惑，但我仍下定决心要按时毕业。然而人生总有意外，我在一年级第一学期就生病住院，紧接着怀孕生子，这一耽搁就是两年半。转眼间五年已经过去，在这五年的博士生涯中，流失的是岁月，收获的是成长。如今除了即将成为一名博士以外，我还是3岁孩子的母亲。面临毕业，我的心情有些喜悦，有些紧张，更多的是忐忑不安。作为学生，我惭愧自己没有将更多的精力放于科研上，而作为母亲，我总觉得亏欠孩子太多。

在此，我首先要感谢恩师汪渊教授的宽容与谅解，对恩师致以最崇高的敬意和深深的歉意！我的论文是在汪老师的悉心指导下完成的。本课题从选题立题、实验方案到具体实验过程、结果分析直至文章撰写和论文修改都凝结了导师的心血和智慧。汪老师学识渊博、思维缜密、作风严谨，无论是学术还是品行都是我学习的楷模！特别感谢汪老师及师母桂淑玉老师和周青老师在生活中给予的无微不至的关怀和帮助！

感谢我的良师益友周青老师在实验和生活中给予的指导和帮助！

感谢临床药理研究所的魏伟教授在我读博期间给予的帮助、理解和支持！感谢吴成义老师、严尚学老师在工作上给予的指导和帮助。感谢临床药理研究所的所有老师的指导和帮助！

特别感谢卢曼在实验中给予的大力帮助，省立医院中心实验室的李庆老师在流式细胞术检测中给予的指教和大力帮助，唐松涛在统计学方法上给予帮助。

感谢分子生物学实验室的兄弟姐妹：朱华庆、胡若磊、张素梅、王怡、胡安拉、高峻岭、杜勇、邹多兵、杨艳艳、江巧玲、吴燕、周佳丽等在课题完成过程中给予的大力帮助。感谢生物化学教研室的各位老师的理解和帮助。

感谢家人的理解和支持！

综述

**全反式维甲酸代谢与肿瘤**

全反式维甲酸属于维甲酸家族，是维生素A的活性代谢物。ATRA的作用涉及肿瘤和生长发育、神经系统、免疫系统、能量平衡和肥胖等。在肿瘤和生长发育方面，维甲酸通过其核受体，在细胞生长、分化凋亡中发挥潜在作用[1-2]，对肿瘤治疗和化学预防具有重要意义。目前其关注度已超过了传统的类维生素A。在早幼粒细胞白血病的治疗中，维甲酸的诱导分化疗法已经成为首选[3]。在实体肿瘤的治疗中，全反式维甲酸已被列于很多肿瘤治疗规程，如卡波氏肉瘤[4]、头颈鳞状细胞癌[5]、卵巢癌[6]、膀胱癌[7]和成神经细胞瘤[8]。此外，ATRA还具有抗血管生成[9]、抑制血管平滑肌细胞增殖[10]和抗炎作用[11]。目前已发现两种维甲酸受体家族，RARs和RXRs家族，分别都有α、β、γ3个亚型，另外ATRA也可以与PPARδ/β结合发挥作用[12-13]. ATRA的合成及代谢过程对其功能具有重要的调节作用，

ATRA合成障碍会使维甲酸信号产生障碍。ATRA可以由13-顺式维甲酸和9-顺式维甲酸迅速转变生成[14]，其合成过程受到维甲酸结合蛋白和维甲酸代谢酶的调节

[15]. 本综述旨在总结ATRA的代谢及其在肿瘤中的作用，为肿瘤的治疗和预防寻找新的方案。

1.维甲酸的摄入及其代谢

1）饮食摄入

维甲酸是维生素A的活性代谢物，机体需要少量的维甲酸来维持功能和保持健康。ATRA由维生素A合成，帮助细胞生长发育，尤其是胚胎的发育。膳食营养协会推荐的每日摄取量为25岁男性在900mg或者3000IU每天。β-胡萝卜素向维生素A的转变从最早的6: 1纠正为12: 1，最近在发展中国家又纠正为21: 1[16]。2）全反式维甲酸的合成

①13-顺维甲酸和9-顺维甲酸向全反式维甲酸的转化

类维生素A是潜在的肿瘤治疗分子，已报道其发挥抗肿瘤活性，包括诱导肿瘤细胞凋亡和分化。9-顺式维甲酸和13顺式维甲酸是ATRA天然异构体，而4-羟苯基维甲酸和4-氨基-2-三氟甲基苯酯是合成的维甲酸。



图1 全反式维甲酸结构

13-顺式维甲酸是潜在的人致畸物，但是其结合到维甲酸X受体的能力非常弱

[17]. 实验证实13-顺式维甲酸向反式维甲酸的转变是致畸作用的先决条件。反式维甲酸与RARs具有高亲和力[17-18]。研究显示9-顺式维甲酸与维甲酸X受体具有高亲和力，可以直接发挥致畸作用[19-22].9-顺式维甲酸除了可以通过其前体类胡萝卜素产生外，还可以通过其反式向顺式的异构化产生[23]。因此，顺反之间的相互转变对于调节分化组织中内源性配体的水平具有显著意义，而且这种维甲酸空间结构的变化在体内和体外都已观察到[24-29]。平衡状态下，t-RA是主要的异构体，约占总维甲酸含量60-70%[30,31]。异构化可以被很多低分子量的硫醇复合物催化，也被认为是硫醇依赖的非酶异构化反应[30-33]。这些非酶催化反应的生理意义存在以下问题：（1）并不是所有硫醇复合物都能够有效催化反应。例如，尽管L-Cys包含一个自由的硫醇基，但是其对13-顺维甲酸向9-顺维甲酸的转变没有催化活性。（2）一些硫醇化合物含有很高的催化活性，如巯基乙醇，但是其在内源性组织中不存在。③GSH是非常重要的内源性硫醇化合物，对于两种异构体的转变具有有效的催化活性，但在体内浓度很低，约在0.05-0.15mM之间。而在这一浓度范围内，

GSH催化维甲酸异构的效率很低。因此，维甲酸配体的相互转变完全由非酶促反应来调节是很难实现的。事实上，13-顺式和9-顺式视黄醛的氧化转变产生t-RA，由胞液和微粒体酶催化[34]。13顺式和9顺式视黄醛来源于前体并迅速转变为热力学稳定的反式维甲酸，而且这一过程部分是由异构酶来完成的。

②以视黄醇为原料合成全反式维甲酸

维生素A不能由任何一种动物自身合成，而只能从食物中吸收，包括视黄醇、视黄酯和β-胡萝卜素。动物来源包括肝脏和蛋类中含有的视黄酯，而植物来源包括胡萝卜、菠菜等含有的前维生素A和类胡萝卜素。摄取的维生素A以视黄酯的形式储存在肝脏星形细胞。细胞内视黄酯向全反式维甲酸的转变分为三个步骤：

（1）视黄酯在视黄酯水解酶（REH, retinyl ester hydrolase）的作用下，生成视黄醇，很快与CRBP1结合。这一过程可以被软磷脂视黄醇乙酰基转移酶（LRAT, lecithin: retinol acyltransferase）逆转。（2）在视黄醇脱氢酶（RDH1、RDH10和DHRS9）的作用下脱氢变成与CRBP1结合的视黄醛。这一过程也可以被视黄醛水解酶（RRD, retinal reductase）逆转。（3）由视黄醛脱氢酶RALDH（包括RALDH1、2、3）完成快速和不可逆的脱氢作用产生ATRA[15]。(图2)

生成的ATRA进一步在肝脏被细胞色素P450酶（主要是cyp26）氧化。



Fig. 2. An integrated model of atRA homeostasis. This model accounts for the fact that the very high-afﬁnity retinol binding-protein, holo-CRBP1, represents the major physiological form of intracellular retinol, and apo-CRBP1 interacts with enzymes to signal the intracellular concentration of retinol. The model presents the major enzymes that catalyze theﬁrst retinol dehydrogenation, and the irreversible step, retinal dehydrogenation. These enzymes all have been validated biochemically, physiologi-cally, and genetically, as contributing to atRA biosynthesis under physiological conditions. The model also postulates functions for the atRA binding proteins, CRABP1, CRABP2, and FABP5 in delivering atRA to distinct nuclear receptors or for catabolism. Finally, two of the autoregulatory nodes activated by atRA are shown, induction of CYP and LRAT to lower atRA and retinol concentrations, respectively.

***Napoli JL. Biochim Biophys Acta. 2012;1821(1):152-67.***

3）全反式维甲酸的代谢

全反式维甲酸的代谢目前还没有完全清楚。但是现在已知其可以被细胞色素P450氧化成不同的代谢物，包括4-羟基维甲酸，18-羟基维甲酸，5, 6-环氧维甲酸和4-氧维甲酸，最后转化为与尿苷二磷酸葡萄糖（uridine diphosphate glucose, UDPG）结合的形式[35-36]。代谢过程开始于环己烯基环的C4位羟基化最终形成4-羟基-维甲酸。催化全反式维甲酸代谢的酶主要包括细胞色素P450s: CYP3A4/5/7、CYP2C8/9、CYP1A1和CYP4A11. CYP3A是P450里活性最大的亚家族，催化产生4-羟基-维甲酸，4-氧-维甲酸和18-羟基-维甲酸[37]。唯一的受ATRA诱导的P450是CYP26，其作用为特异性代谢ATRA，用来调节内源性ATRA平衡。由于负反馈的调节方式，维甲酸的水平通过自调节的方式控制，因此目前认为CYP26是引起连续性ATRA治疗后产生抵抗的一个重要原因[38, 39]。

在爪蟾早期发育中，全反式维甲酸和类维生素A前体的代谢和致畸研究显示，胚胎可以通过不同的异构化、葡糖苷化和氧化，最终使全反式维甲酸形成13-顺式维甲酸，全反式视黄醇β葡糖苷酸，4-氧-全反式维甲酸和4-氧-13顺维甲酸[40-42]。这些类维生素A和9-顺式维甲酸、5, 6-环氧维甲酸和4-羟基维甲酸以及3, 4-脱氢维

甲酸都是哺乳动物和啮齿类动物内全反式维甲酸的代谢物。进一步探究这些代谢物在胚胎形成的作用。结果发现全反式维甲酸代谢物具有轻微的致畸作用，可能呈现全反式维甲酸通路的钝化作用。类似的，4-氧-13顺式维甲酸和13-顺式维甲酸致畸能力均比反式要弱，考虑其可以使全反式维甲酸失活。4-氧全反维甲酸和全反式维甲酸可以特异性结合和激活胚胎 RARs 受体[43]。2.维甲酸受体、结合蛋白

类维生素A的作用受核受体的调节，属于类固醇/甲状腺/维甲酸激素受体家族

[44]. 维甲酸受体为配体诱导的转录因子，通过与维甲酸反应元件结合，增加目的

基因的转录。维甲酸受体可以分为A到E六大区域。C端是Cys富含区，包括两个锌指结构。E区包含维甲酸结合区域和与其他受体形成二聚体化的区域。C区和E区的氨基酸序列在所有的维甲酸受体中都高度保守，而A，B和F区在不同的受体中间序列不同，但是在不同种属的同一受体中高度保守[45,46]。已报道有两大维甲酸受体家族：RARs和RXRs. RARs结合天然存在的ATRA并具有高亲和力，但是RXRs不结合ATRA.9-顺维甲酸是天然存在的具有生物学活性的全反式维甲酸的受体，可以结合并反式激活RXRs和RARs。在人体组织中，RARα的mRNA在大部分组织表达；RAR-β主要表达于神经组织，但是在皮肤中无表达；RAR-γ主要在皮肤组织表达。RXR-β表达于所有组织；RXR-α大量表达于肝脏、肾脏、脾脏和皮肤；RXR-γ主要表达于肌肉和脑组织[12-13]。

在正常生理条件下，全反式维甲酸和其他的类维生素A的浓度受到严密控制。生理胞浆浓度接近5.0nM。尽管血液中的维甲酸进入细胞是通过被动扩散，但是在生理浓度下细胞内全反式维甲酸的水平不依赖于循环提供，而主要是由于细胞内对视黄醇代谢产生的视黄醛的氧化。与ATRA结合的蛋白有三种，CRABPⅠ、CRABPⅡ和FABP5. CRABPⅠ与细胞色素P450氧化系统共同参与ATRA降解代谢，其中CYP26 (cytochrome-P450-isoform-26)起主要作用。CRABPⅡ介导ATRA与RAR结合，发挥ATRA抗增殖、诱导分化和凋亡作用。FABP5介导ATRA与PPARβ/δ结合，最终使细胞走向相反方向：存活、增殖和肿瘤生长。因此ATRA对细胞的作用与FABP5/ CRABPⅡ的比值密切相关。CRABP I和CRABP II在进

化上高度保守并且可以调节结合到维甲酸受体上的维甲酸数量。ATRA结合到CRABPⅠ可以帮助细胞内ATRA代谢成非活性代谢物4-羟基维甲酸[15]。（图1）3.全反式维甲酸在急性淋巴细胞白血病的作用及其机制

1）全反式维甲酸在急性淋巴细胞白血病的作用

全反式维甲酸的使用显著促进急性淋巴细胞白血病的分化治疗。然而这种缓解的作用并不持久，容易复发，而且在大多数复发病人体内单独使用维甲酸将不能再次得到缓解。全反式维甲酸可以诱导早幼粒细胞性白血病细胞向粒细胞终末分化，而不引起骨髓发育不全和化疗引起的出血症。因此，全反式维甲酸诱导的早幼粒细胞的分化可以作为体外研究粒细胞分化的模型。尽管这种治疗会很快产生抵抗，但是当与化疗药物结合使用后会增加化疗效果，显著提高病人的生存率[47]。

2）全反式维甲酸的细胞机制

ATRA驱动未成熟的肿瘤细胞分化成成熟的粒细胞。现在认为ATRA对骨髓细胞的成熟作用于两个阶段：早幼粒细胞和早期肿瘤祖细胞，两者都具备自我更新的能力，但是都属于骨髓系统。ATRA刺激后这些细胞发生不可逆的分化，最终走向程序性死亡。精确的细胞生物学作用的研究是以两种细胞为模型的：对ATRA敏感的APL细胞株NB4和ATRA抵抗的NB4亚克隆NB4-R1[48,49]。对两个模型

APL细胞诱导分化。结果提示在APL成熟的过程中有两个独立的步骤：一个是维甲酸依赖的，用于维持增殖，细胞在这一环境下成熟。还有一个是cAMP依赖的触发维甲酸敏感细胞走向终末分化。进一步研究揭示即使是生理浓度（10-8-10-9M）

ATRA也能够在cAMP存在的情况下诱导细胞终末分化。最近研究结果显示ATRA诱导细胞内cAMP浓度急剧增加最终在药物诱导下激活PKA，这种作用会被PKA拮抗剂消除，提示RA 核信号和细胞膜偶联cAMP/PKA 信号协调调节[50]。3）全反式维甲酸的基因机制

现有证据证明ATRA对APL的治疗与诱导未成熟的粒细胞向成熟的粒细胞分化，维持正常细胞的稳态有关[51]。i）APL病人用维甲酸处理期间并没有经历骨髓发育不全。ii）在诱导过程中发现免疫表型相互作用细胞同时表达未成熟（CD33）和成熟（CD15）的细胞表面抗原[52] 。iii）原位杂交显示存在成熟细胞基因的移

位。APL病人基因的特点是在长臂15和17之间发生相互移位[53-56]。1987年，编码维甲酸受体RARα的基因定位于染色体17q21。之后证实APL病人中染色体17的断裂点包括RARα受体的编码基因[57]。15号染色体的断裂点包括一个未报到的基因，起初叫MYL，很快被更名为PML. RARα和PML基因在染色体15和17的融合产生了两个相互作用的转录本PML/RARα，在迄今为止的所有APL病人中表达；RARα/PML转录本，在将近2/3的病人表达。PML/RARα融合蛋白作用于维甲酸依赖的转录因子，可以干扰维甲酸转录调节。在白血病细胞中，PML/RAR

α过表达封闭细胞的成熟分化，破坏APL体内RARα，与白血病生成有关，这种破坏可以被高于生理浓度的ATRA克服[58-64]。

4）全反式维甲酸的分子机制

ATRA是维生素A的代谢物，可以结合维甲酸受体和维甲酸X受体，调节造血细胞的生长、分化和平衡。RARα是RARs家族成员，主要在造血细胞表达。通过与RXR结合形成异源二聚体RAR/RXR，作为配体诱导的转录因子，可以与维甲酸反应元件相互作用，后者位于靶基因的启动子区[65]。RA 缺乏情况下，

RAR/RXR异源二聚体结合到核共抑制因子（N-CoR）导致共抑制复合体形成，组蛋白脱乙酰化和转录抑制。生理浓度的维甲酸（0.01μM）存在，会使RAR/RXR与核共激活因子相互作用，导致共激活复合体的活化，组蛋白乙酰化，染色体解聚，诱导转录[66]。

在APL细胞，由于RARα重排，维甲酸信号通路发生改变，骨髓细胞被阻滞在早幼粒细胞。PML/RAR-α融合蛋白负性调控维甲酸信号通路[67]。它可以与RXR形成同源[68]或者异源二聚体[69]。无论哪种二聚体，PML/RAR-α都会增加RAR和N-CoR结合的强度。因此，RARα失去了对生理浓度ATRA的反应，而持续抑制转录，封闭了早幼粒细胞的分化[70]。PML/RAR-α也可抑制骨髓细胞分化关键因子

PU.1的功能，从而封闭分化。而且，PML/RAR-α的重排也改变了PML的功能。

PML为核蛋白，含有原癌结构域（POD）[71]。POD调节几种转录因子的表达，在生长阻滞和凋亡诱导中起重要作用。PML/RAR-α与野生型PML形成异源二聚体，破坏了PML和POD的定位，导致APL细胞生长、凋亡抵抗和分化阻滞[72]。

然而，在APL中，生理浓度的ATRA并不能导致核阻遏蛋白和HDAC复合物从PML-RARα融合受体上解聚而导致分化封闭。在APL，这一复合体的解聚只能在药理浓度ATRA (10−7-10−6 M)，最终解除抑制，使分化基因表达。药理浓度ATRA可以使N-CoR从PML/RAR-α解聚，招募核激活因子。诱导下游基因的转录激活和恢复早幼粒细胞的分化。而且，ATRA结合到RARs使得PML/RAR-α通过泛素蛋白酶体和caspase途径降解。因此，RXR可以重新与RARα形成异源二聚体导致维甲酸信号恢复，解除对分化的封闭。而且，PML/RAR-α的裂解也恢复了PML和POD的功能，使细胞生长阻滞和凋亡[73, 74]。（图3）

除了解除转录抑制，ATRA在骨髓细胞分化的作用中还包括调节不同种类基因的表达，包括诱导p21细胞周期依赖激酶抑制子的表达[75]，上调C/EBP-γ，β，ε[76]，干扰素调节因子-1 (IRF-1)[77]和调节早幼粒细胞性白血病蛋白（PML）致癌结构域的定位（PODs）[78]。在从病人体内分离出来的APL细胞中，ATRA上调RARα

mRNA 和蛋白的表达[79, 80]，但是引起PML-RARα 的降解。因此，RAR/RXR 与

PML-RARα的比率增加，克服了PML–RARα的负性作用[81, 82]。



Figure 3. Molecular mechanism of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. (A) In the absence of RA, the RAR/RXR heterodimer binds the N-CoR and leads to the recruitment of CoR, the deacetylation of histones and transcription repression. (B) ATRA is able to dissociate

N-CoR from PML/RAR-αand to recruit N-CoA, inducing the transcriptional expression of downstream genes and the restoration of the differentiation of promyelocytes. ATRA: All-trans retinoic acid; CoR: Corepressor complex; N-CoA: Nuclear coactivator; N-CoR: Nuclear corepressor factor; PML: Promyelocytic leukemia; RXR: Retinoid X receptor.

***Riccardo Masetti et al. Expert Rev. Anticancer Ther. 2012; 1191–1204***

4.全反式维甲酸对实体肿瘤的治疗作用

ATRA的抗肿瘤作用除了对急性早幼粒细胞白血病有效以外，在实体肿瘤中也有很多报道。目前已用于治疗卡波氏肉瘤，头颈鳞状细胞癌，卵巢癌，膀胱癌和成神经细胞瘤[4-8]。在肝癌中，全反式维甲酸通过诱导分化加强顺铂对肝癌的治疗效果[83]。ATRA可以诱导乳腺癌细胞分化抑制其增殖[84]。[17q12-21](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20100636)位点可以作为乳腺癌中ATRA治疗的靶点[85]。0.1-10μM ATRA可以抑制胃癌细胞BGC-823的生长，而且其作用具有时间和剂量依赖性[86]。ATRA也可通过诱导分化抑制不同转化细胞的生长，如HL-60早幼粒细胞性白血病细胞，F9畸胎瘤细胞和恶性黑色素瘤细胞[87-88]。维甲酸治疗也可减少DNA合成，诱导形态转变，延长细胞倍增时间和减少soft agar分析中克隆形成的大小和密度。类维生素A抑制细胞生长不包括肿瘤细胞死亡但是可以使细胞循环阻滞在G1期[89]。

鳞状细胞癌是维甲酸理想的治疗靶组织，因为它们来源于内皮，其生长和分化都受维甲酸调节[89]。更多的资料显示类维生素A成功的用于体内阻止口腔支气管、头颈损伤导致恶性肿瘤。维生素A和类维生素A类调节宫颈细胞的生长，抑制宫颈癌细胞的增殖，可作为宫颈癌的化学预防[90]。

全反式维甲酸与结肠癌的关系

目前，ATRA在结肠癌中的作用也有一些报道。如Woo等证实ATRA通过使

E-钙粘素启动子低甲基化激活E-钙粘素表达，从而抑制结肠癌细胞的侵袭和转移

[91]. 在结肠癌细胞株中，HT-29高表达COX-2, SW480低表达COX-2。在这两株细胞中，LIU等报道COX-2抑制子塞来昔布增加人结肠癌细胞HT-29和SW480对全反式维甲酸的敏感性[92]。相反，Sun等人证实鞘氨醇-1-磷酸盐通过降低RAR

β的表达，拮抗ATRA对结肠癌细胞的作用[93]。Astrid M Bengtsson提出ATRA 上

调半胱氨酰白三烯-2受体的表达，诱导结肠癌细胞分化[94]。我们的实验证实在结肠癌RKO细胞中，ATRA及其衍生物ATPR可以显著抑制RKO细胞的增殖、软琼脂克隆形成能力和迁移，诱导其分化。ATRA和ATPR可以通过增加p21的表达和降低cyclin D1的表达，使RKO细胞周期阻滞在G1期。ATRA抑制RKO迁移的作用通过两个方面实现，一是增加细胞间的紧密连接和粘附性，减少细胞从组织脱离进入循环；另一方面是降低细胞的运动性，减少其迁移。结果证实ATRA和ATPR可以增加occludin mRNA和蛋白的表达，以及增加occludin和ZO-1向细胞膜的转运，最终增加RKO细胞间的紧密连接，增加粘附作用。同时，ATRA 和

ATPR还能降低与运动密切相关的蛋白MCLK的表达及其活性，使MLC的磷酸化降低，后者参与细胞运动。当用MLCK的抑制剂ML-7或者MLCK敲除后，均发现RKO 细胞的迁移明显减慢。进一步的研究还证实ATRA 及ATPR 是通过

ERK1/MAPK信号通路调控MLCK的表达影响RKO细胞的软琼脂克隆形成能力和迁移。

5.维甲酸过量

对于一个25岁的成年男性，可容忍的类维生素A最大剂量是3000μg每天，大约10000单位。太多的维生素A以类维生素形式存在时是有害的甚至是致命的，可以引起高维生素A综合征。机体会根据需要将胡萝卜素转换成维生素A，因此高水平的胡萝卜素相比较其酯型是无毒的。动物肝脏尤其是那些适应极端环境的动物的肝脏，往往含有大量的维生素A，对人体有毒。第一例因维生素A死亡的病人是瑞士科学家，其在南极探险时食用了大量的狗的肝脏导致的。

毒性可以分为两类：急性和慢性。急性发生于意外或者不当治疗导致食用大量维生素A（＞30万IU）后的数小时到数天。慢性毒性是指长期食用1500IU/KG。中毒的症状包括恶心、视力模糊、疲劳、体重减少和月经紊乱等。过多的维生素A也可以导致骨质疏松。这对那些诱导急性损伤需要更低的剂量[14]。

6．全反式维甲酸抵抗及与其他药物联合使用

目前尽管有些病人采用身体锻炼结合维甲酸化疗，限制维甲酸用量及间歇用药，但仍会产生维甲酸抵抗。最重要的是，肿瘤的治疗不是单一的药物治疗，而

是采用多种抗瘤药物的联合化疗和附随的其他的支持药物。因此，可能存在附随药物诱导其他通路调节全反式维甲酸代谢而产生其他异型的全反式维甲酸抵抗。

RARα基因存在的模式对APL的生理过程很重要，决定了APL对维甲酸的敏感性，维甲酸抵抗与PLZF或者STAT5b有关。无配体时，维甲酸受体招募组蛋白去乙酰化酶沉默调节子N-CoR，抑制下游靶基因的表达。在APL细胞内，由于RARα受体的突变导致异常招募HDACs，促进了髓样分化阻滞和细胞转化。

考虑到HDACs异常在促进白细胞转化中的作用，有专家提出将HDACs抑制剂与ATRA联合使用可以诱导ATRA抵抗细胞株分化。这些结果已经被Kitamura证实，他们指出ATRA和曲古抑菌素联合使用，体外处理从PLFZ/RARα易位的病人体内分离的APL细胞，可诱导分化作用。他们证实HDACs抑制剂和维甲酸联合使用抑制增殖，诱导凋亡，提升了维甲酸对PML/RAR-α阳性APL细胞分化和生长的抑制作用。而且，在转基因小鼠中，早幼粒细胞含有PLZF/RAR-Α融合基因对维甲酸治疗抵抗，而联合使用的效果显示可以提升存活率诱导CR。

临床联合使用HDACs抑制子和ATRA还很有限。然而，Warrell等报道用ATRA和苯基丁酸治疗，在对ATRA抵抗的小儿白血病患者中，可以诱导暂时的完全的缓解。现已证明，ATRA与HDAC抑制子联合使用可以克服由于PLZF/RAR-α或STAT5b/RAR-α基因融合产生的维甲酸抵抗。而且，两种药物的协同作用在复发的PML/RAR-α阳性病人，而是是获得性对维甲酸持久抵抗的病人也很有用，尽管这种抵抗是如何发生的目前还不清楚[15]。目前的研究认为高水平CYP26 (cytochrome-P450-isoform-26)引起的ATRA失活，与ATRA抵抗有关；同时RARβ沉默也会导致维甲酸抵抗[95-99]。

总 结

ATRA在许多生理过程中发挥重要作用，包括视力形成、代谢、骨发育、细胞增殖、分化、凋亡、内稳态、繁殖和胎儿发育。在化疗上对APL的完全缓解起重要作用，在其他实体肿瘤的治疗中也倍受关注。ATRA与其他药物联合使用以减少其抵抗将成为未来治疗白血病及实体肿瘤的新的策略。

参考文献

[1]. Lotan R. Retinoids as modulators of tumor cells invasion and metastasis. Semin Cancer Biol 1991; 2(3): 197–208.

[2]. Hofmann SL. Retinoids–„differentiation agents‟‟for cancer treatment and prevention. Am J Med Sci 1992; 304(3): 202–13.

[3]. Mi JQ, Li JM, Shen ZX, et al. How to manage acute promyelocytic leukemia. Leukemia. 2012; 26(8): 1743-51.

[4]. Saiag P, Pavlovic M, Clerici T, et al. Treatment of early AIDS-related Kaposi's sarcoma with oral all-trans-retinoic acid: results of a sequential non-randomized phase II trial. Kaposi's Sarcoma ANRS Study Group. Agence Nationale de Recherches sur le SIDA. AIDS. 1998; 12(16): 2169-76.

[5]. Fabricius EM, Kruse-Boitschenko U, Schneeweiss U, et al. Model examination of chemoprevention with retinoids in squamous cell carcinomas of the head and neck region and suitable biomarkers for chemoprevention. Int J Oncol. 2011; 39(5): 1083-97.

[6]. Purev E, Soprano DR, Soprano KJ. PP2A interaction with Rb2/p130 mediates translocation of Rb2/p130 into the nucleus in all-trans retinoic acid-treated ovarian carcinoma cells. J Cell Physiol. 2011; 226(4): 1027-34.

[7]. Zou C, Ramakumar S, Qian L, et al. Effect of retinoic acid and interferon alpha-2a on transitional cell carcinoma of bladder. J Urol. 2005; 173(1): 247-51.

[8]. Chang Q, Chen Z, You J, et al. All-trans-retinoic acid induces cell growth arrest in a human medulloblastoma cell line. J Neurooncol. 2007; 84(3): 263-7.

[9]. Liang C, Guo S, Yang L. All-trans retinoic acid upregulates VEGF expression in glioma cells in vitro. J Biomed Res. 2013; 27(1): 51-5.

[10]. Kosaka C, Sasaguri T, Komiyama Y, et al. All-trans retinoic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation targeting multiple genes for cyclins and cyclin-dependent kinases. Hypertens Res. 2001; 24(5): 579-88.

[11]. Cao W, Chen W, Liang X, et al. [All-Trans-Retinoic Acid Ameliorates the Inflammation by Inducing Transforming Growth Factor Beta 1 and Interleukin 10 in Mouse Epididymitis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24410928) Am J Reprod Immunol. 2014 Jan 10.

[12]. Maire Al, Alvarez S, Shankaranarayanan P, et al. [Retinoid receptors and therapeutic applications of RAR/RXR modulators.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22242853) Curr Top Med Chem. 2012; 12(6): 505-27.

[13]. Das BC, Thapa P, Karki R, et al. [Retinoic acid signaling pathways in development and diseases.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393720) Bioorg Med Chem. 2014; 22(2): 673-83.

[14]. Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM. All Trans Retinoic Acid and Cancer. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2011; 33(2): 241-9.

[15]. Joseph L, Napoli. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1821 (1): 152–167.

[16]. Sommer A. Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview. J Nutr 2008; 138(10): 1835–1839.

[17]. Levin AA. Receptors as tools for understanding the toxicity of retinoids. Toxicol Lett 1995; 82/83: 91–97.

[18]. Kim YW, Sharma RP, Li JK. Characterization of heterologously expressed recombinant retinoic acid receptors with natural or synthetic retinoids. J Biochem Toxicol. 1994; 9(5): 225–34.

[19]. Repa JJ, Hanson KK, Clagett-Dame M. All-trans-retinol is a ligand for the retinoic acid receptors. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(15): 7293–7.

[20]. Levin AA, Bosakowski T, Kazmer S, et al. 13-cis-Retinoic acid does not bind to the retinoic acid receptors alpha, beta, and gamma. Toxicologist 1992; 12: 181.

[21]. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, et al. 9-cis-Retinoic acid is a high-affinity ligand for retinoid X receptor. Cell 1992; 68(2): 397–406.

[22]. Creech KJ, Juchau MR. 9-cis-Retinoic acid: a direct-acting dysmorphogen. Biochem Pharmacol 1993; 46(4): 709–16.

[23]. Creech KJ, Schuh T, Juchau MR, et al. The retinoid X receptor ligand,

9-cis-retinoic acid, as an apparent regulator of early Xenopus development. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(8): 3067–3071.

[24]. Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. FASEB J. 1996; 10(9): 993–1001.

[25]. Zile MH, Emerick RJ, DeLuca HF. Identification of 13-cis-retinoic acid in tissue extracts and its biological activity in rats. Biochim Biophys Acta 1967; 141(3): 639–641.

[26]. Zile MH, Inhorn RC, DeLuca HF. Metabolism in vivo of all-trans-retinoic acid: biosynthesis of 13-cis-retinoic acid and all-trans- and 13-cis-retinoyl glucuronides in the intestinal mucosa of rat. J Biol Chem. 1982; 257(7): 3544–3550.

[27]. Kalin JR, Starling ME, Hill DL. Disposition of all-trans-retinoic acid in mice following oral doses. Drug Metab Dispos. 1981; 9(3): 196–201.

[28]. Sundaresan PR, Bhat PV. Ion-pair high-pressure liquid chromatography of cis-trans isomers of retinoic acid in tissues of vitamin A-sufficient rats. J Lipid Res. 1982; 23(3): 448–455.

[29]. Kojima R, Fujimori T, Kiyota N, et al. In vitro isomerization of retinoic acids: rapid isomer exchange and gene expression. J Biol Chem. 1994; 269(51): 32700–7.

[30]. Shih TW, Shealy YF, Strother DL, et al. Nonenzymatic isomerization of all-transand 13-cis-retinoids catalyzed by sulfhydryl groups. Drug Metab Dispos. 1986; 14(6): 698–702.

[31]. Urbach J, Rando RR. Isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. Biochem J. 1994; 299(pt2): 459–65.

[32]. Shih TW, Lin T-H, Shealy YF, et al. Nonenzymatic isomerization of 9-cis-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds. Drug Metab Dispos. 1997; 25(1): 27–32.

[33]. Urbach J, Rando RR. Thiol dependent isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. FEBS Lett. 1994; 351(3): 429–432.

[34]. Chen H, Juchau MR. Biotransformation of all-trans-retinal, 13-cis-retinal, and

9-cisretinal catalyzed by conceptal cytosol and microsomes. Biochem Pharmacol. 1997;53(6):877–885.

[35]. Napoli JL. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1999; 63: 139–88.

[36]. Samokyszyn VM, Gall WE, Zawada G, et al. 4-hydroxyretinoic acid, a novel substrate for human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase(s) and recombinant UGT2B7. J Biol Chem. 2000; 275(10): 6908–14.

[37]. Marill J, Cresteil T, Lanotte M, et al. Identification of human cytochrome P450s involved in the formation of all-trans-retinoic acid principal metabolites. Mol Pharmacol. 2000; 58(6): 1341–8.

[38]. Ray WJ, Bain G, Yao M, et al. CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. J Biol Chem. 1997; 272(30): 18702–8.

[39]. White JA, Beckett-Jones B, Guo YD, et al. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. J Biol Chem. 1997; 272(30): 18538–41.

[40]. Creech KJ, Juchau MR. Xenopus laevis: A model system for the study of embryonic retinoid metabolism: III. Isomerization and metabolism of all-trans-retinoic acid and 9-cis retinoic acid and their dysmorphogenic effects in embryos during neurulation. Drug Metab Dispos. 1995; 23(10): 1058–1071.

[41]. Creech KJ, Kimelman D, Juchau MR. Xenopus laevis: A model system for the study of embryonic retinoid metabolism: I. Embryonic metabolism of 9-cis- and all-trans-retinals and retinols to their corresponding acid forms. Drug Metab Dispos 1995a; 23(1): 72–82.

[42]. Creech KJ, Kimelman D, Juchau MR. Xenopus laevis: A model system for the study of embryonic retinoid metabolism: II. Embry-onic metabolism of all-trans-3, 4-didehydroretinol to all-trans-3, 4-didehydroretinoic acid. Drug Metab

Dispos. 1995;23(1):83–9.

[43]. Pijnappel WWM, Hendriks HFJ, Folkers GE, et al. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. Nature 1993; 366(6453): 340–4.

[44]. Gudas LJ. Retinoids and vertebrate development. J Biol Chem. 1994; 269(22): 15399–402.

[45]. Tate BF, Levin AA, Grippo JF. The discovery of 9-cis retinoic acid: a hormone that binds the retinoid-X receptor. Trends Endocrinol. Metab 1994; 5(5): 189–94.

[46]. Uz B, Eliaçık E, Işık A, et al. Co-expression of t(15; 17) and t(8; 21) in a Case of Acute Promyelocytic Leukemia: Review of the Literature. Turk J Haematol. 2013; 30(4): 400-4.

[47]. Masetti R, Vendemini F, Zama D, et al. All-trans retinoic acid in the treatment of pediatric acute promyelocytic leukemia. Expert Rev. Anticancer Ther. 2012; 12(9): 1191–204.

[48]. Ruchaud S, Duprez E, Gendron MC, et al. Two distinctly regulated events, priming and triggering, during retinoid-induced maturation and resistance of NB4 promyelocytic leukemia cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(18): 8428–32.

[49]. Zhu J, Lallemand-Breitenbach V, de The H. Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARa catabolism: role of oncogene degradation in disease remission. Oncogene 2001; 20(49): 7257–65.

[50]. Zhu Q, Zhang JW, Zhu HQ, et al. Synergic effects of arsenic trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. Blood 2002; 99(3): 1014–22.

[51]. Warrell RJ, de ThéH, Wang ZY, et al. Acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med 1993; 329: 177–89.

[52]. Sanz MA, Iacoboni G, Montesinos P. Acute promyelocytic leukemia: do we have a new front-line standard of treatmentCurrOncolRep. 2013; 15(5): 445-9.

[53]. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. Blood 1990; 76(9): 1704–9.

[54]. Warrell RJ, Frankel SR, Miller WJ et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). N Engl J Med 1991; 324(20): 1385–93.

[55]. Golomb HM, Rowley J, Vardiman J et al. Partial deletion of long arm of chromosome 17: a specific abnormality in acute pro-myelocytic leukemiaArchInternMed. 1976; 136(7): 825–828.

[56]. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia (letter). Lancet 1977; 1(80): 549–50.

[57]. Mattei MG, Petkovich M, Mattei JF, et al. Mapping of the human retinoic acid receptor to the q21 band of chromosome 17. Hum Genet 1988; 80(2): 186–8.

[58]. Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N et al. The retinoic acid receptor alpha gene is rearranged in retinoic acid-sensitive promyelocytic leukemias. Leukemia 1990; 4(12): 802–7.

[59]. de ThéH, Chomienne C, Lanotte M et al. The t(15; 17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. Nature 1990; 347(6293): 558–561.

[60]. Borrow J, Goddard AD, Sheer D, et al. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. Science 1990; 249(4976): 1577–80.

[61]. Goddard AD, Borrow J, Freemont PS et al. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15; 17) in acute promyelocytic leukemia. Science 1991; 254(5036): 1371–4.

[62]. Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, Warrell RP Jr, Frankel SR, Murty VV,

Dmitrovsky E, Evans RM. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell 1991;66(4):663–74.

[63]. Early E, Dmitrovsky E. Acute promyelocytic leukemia: retinoic acid response and resistance. J Invest Med. 1995; 43(4): 337–44.

[64]. Rousselot P, Hardas B, Patel A et al. The PML-RAR alpha gene product of the t(15; 17) translocation inhibits retinoic acid-induced granulocytic differentiation and mediated transactivation in human myeloid cells. Oncogene 1994; 9(2): 545–51.

[65]. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. FASEB J. 1996; 10(9): 940–54.

[66]. Zhang JW, Wang JY, Chen SJ, et al. Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. J Biosci. 2000; 25(3): 275–284.

[67]. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Blood 1999; 93(10): 3167–215.

[68]. Minucci S, Maccarana M, Cioce M et al. Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. Mol Cell. 2000; 5(5): 811–820.

[69]. Perez A, Kastner P, Sethi S, et al. PMLRAR homodimers: distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. EMBO J. 1993; 12(8): 3171–82.

[70]. Saeed S, Logie C, Stunnenberg HG, et al. Genome-wide functions of PML-RARa in acute promyelocytic leukaemia. Br J Cancer. 2011; 104(4): 554–558.

[71]. Mueller BU, Pabst T, Fos J, et al. ATRA resolves the differentiation block in t(15; 17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. Blood 2006; 107(8): 3330–8.

[72]. Brown NJ, Ramalho M, Pedersen EW, et al. PML nuclear bodies in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: active players or innocent

BystandersFrontBiosci. 2009;14:1684–1707.

[73]. Nervi C, Ferrara FF, Fanelli M, et al. Caspases mediate retinoic acid-induceddegradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion prote. Blood 1998; 92(7): 2244–51.

[74]. Zhu J, Gianni M, Kopf E, et al. Retinoicacid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alp(RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. Proc Natl Acad Sci. 1999; US96(26): 14807–14812.

[75]. Casini T, Pelicci PG. A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest. Oncogene 1999; 18(21): 3235–43.

[76]. Morosetti R, Park DJ, Chumakov AM, et al. A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. Blood 1997; 90(7): 2591–600.

[77]. Pelicano L, Li F, Schindler C, Chelbi-Alix MK. Retinoic acid enhances the expression of interferon-induced proteins: Evidence for multiple mechanisms of action. Oncogene 1997; 15(19): 2349–59.

[78]. Weis K, Rambaud S, Lavau C, et al. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. Cell 1994; 76(2): 345–56.

[79]. Agadir A, Cornic M, Jerome M, et al. Characterization of nuclear retinoic acid binding activity in sensitive leukemic cell lines: cell specific uptake of ATRA and RAR alpha protein modulation. Biochem Biophys Res Commun 1995; 213(1): 112–22.

[80]. Chomienne C, Balitrand N, Ballerini P, et al. All-trans retinoic acid modulates the retinoic acid receptor-alpha in promyelocytic cells. J Clin Invest. 1991; 88(6): 2150–4.

[81]. Raelson JV, Nervi C, Rosenauer A, et al. The PML/RAR alpha oncoprotein is a

Direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. Blood 1996;88(8):2826–32.

[82]. Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, et al. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-transretinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. Cancer Res. 1996; 56(13): 2945–8.

[83]. Zhang Y, Guan DX, Shi J, et al. [All-trans retinoic acid potentiates the chemotherapeutic effect of cisplatin by inducing differentiation of tumor initiating cells in liver cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867314) J Hepatol. 2013; 59(6): 1255-63.

[84]. Garattini E, Bolis M, Garattini SK, et a[l. Retinoids and breast cancer: From basic studies to the clinic and back again.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480385) Cancer Treat Rev. 2014 Jan 18.

[85]. Glynn RW, Miller N, Kerin MJ[. 17q12-21 the pursuit of targeted therapy in breast cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20100636) Cancer Treat Rev. 2010; 36(3): 224-9.

[86]. Zhang JP, Chen XY, Li JS. [Effects of all-trans-retinoic on human gastric cancer cells BGC-823.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261132) J Dig Dis. 2007; 8(1): 29-34.

[87]. Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. Proc Natl Acad Sci USA. 1980; 77(5): 2936–40.

[88]. Edward M, Gold JA, Mackie RM. Different susceptibilities of melanoma cells to retinoic acid-induced changes in melanotic expression. Biochem Biophys Res Commun 1988; 155(2): 773–8.

[89]. Wu S, Donigan A, Platsoucas CD, et al. All-trans retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G-1. Exp Cell Res 1997; 232(2): 277–86.

[90]. Feng D, Wu J, Tian Y, et a[l. Targeting of histone deacetylases to reactivate tumour suppressor genes and its therapeutic potential in a human cervical cancer xenograft model.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24260446) PLoS One. 2013; 8(11): e80657.

[91]. Woo YJ, Jang KL. [All-trans retinoic acid activates E-cadherin expression via promoter hypomethylation in the human colon carcinoma HCT116 cells.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910408) Biochem Biophys Res Commun. 2012; 425(4): 944-9

[92]. Liu JP, Wei HB, Zheng ZH, et al. [Celecoxib increases retinoid sensitivity in human colon cancer cell lines.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20496179) Cell Mol Biol Lett. 2010; 15(3): 440-50.

[93]. Sun DF, Gao ZH, Liu HP, et al. Sphingosine 1-phosphate antagonizes the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) in a human colon cancer cell line by modulation of RARb expression. Cancer Letters 2012; 319 (2): 182–9.

[94]. Bengtsson AM, Jönsson G, Magnusson C, et al. The cysteinyl leukotriene 2 receptor contributes to all-trans retinoic acid-induced differentiation of colon cancer cells Bengtsson et al. BMC Cancer 2013; 13: 336.

[95]. Nelson CH, Buttrick BR, Isoherranen N. Therapeutic potential of the inhibition of the retinoic acid hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by xenobiotics. Curr Top Med Chem 2013; 13(12): 1402–28.

[96]. Ozpolat B, Mehta K, Tari AM, et al. All-trans-Retinoic acid-induced expression and regulation of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) in human promyelocytic leukemia. Am J Hematol 2002; 70(1): 39–47.

[97]. Sonneveld E, van den Brink CE, van der Leede BM, et al. Human retinoic acid (RA) 4-hydroxylase (CYP26) is highly speciﬁc for all-trans-RA and can be induced through RA receptors in human breast and colon carcinoma cells. Cell Growth Differ 1998; 9(8): 629–37.

[98]. Sirchia SM, Ferguson AT, Sironi E, et al. Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. Oncogene 2000; 19(12): 1556–63.

[99]. Sirchia SM, Ren M, Pili R, et al. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. Breast Cancer Res 2002; 62(9): 2455–61.