

谷氨酰胺对肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移及 TNF- α 和 NF- κ B 表达的影响

赖彦¹, 邓述恺²

(1.西南医科大学, 四川 泸州 646000; 2.西南医科大学附属第一医院, 四川 泸州 646000)

摘要: [目的] 探讨谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 对肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移及 TNF- α 、NF- κ B 表达的影响。[方法] 体外培养肺腺癌 A549 细胞株, CCK-8 法检测不同浓度 Gln (2、4、8、16、32、64 mmol/L) 对 A549 细胞的增殖影响, 筛选适宜浓度。Transwell 实验检测细胞迁移能力, ELISA 法和 Western Bolt 法分别检测 TNF- α 、NF- κ B p65 蛋白表达。[结果] (1) Gln 对 A549 细胞的作用与干预浓度有关, 缺乏 Gln 时细胞生长受限; 低浓度 Gln (2、4、8 mmol/L) 对细胞增殖无明显抑制作用; 高浓度 Gln (16、32、64 mmol/L) 作用下抑制作用明显 ($P < 0.01$) 并呈时间依赖性, 且 32 mmol/L 和 64 mmol/L 两组作用无明显差异 ($P > 0.05$)。 (2) 与对照组相比, Gln 组明显降低 A549 细胞迁移数; 高浓度 Gln 组明显降低 TNF- α 、NF- κ B p65 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 但 32 mmol/L 和 64 mmol/L 组之间无统计学差异 (TNF- α 分别为 14.671 ± 0.842 pg/ml、 14.867 ± 1.21 pg/ml, NF- κ B p65 分别为 0.548 ± 0.042 、 0.474 ± 0.077) ($P > 0.05$)。[结论] Gln 对肺腺癌 A549 细胞的作用与浓度有关, 32 mmol/L 可能为最适抑制浓度。Gln 可能通过下调 TNF- α 和 NF- κ B p65 蛋白表达并抑制 A549 细胞的迁移发挥抗肺腺癌作用。

关键词: 谷氨酰胺; A549 细胞; Transwell; TNF- α ; NF- κ B

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2018) 03-0213-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.03.B007

Effects of Glutamine on Proliferation, Migration and Expression of TNF- α and NF- κ B in Lung Adenocarcinoma A549 Cells

LAI Yan¹, DENG Shu-kai²

(1. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. First Affiliated Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of glutamine on proliferation, migration and expression of TNF- α and NF- κ B in human lung adenocarcinoma A549 cells. [Methods] The cultured lung adenocarcinoma A549 cells were treated with glutamine (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mmol/L). The cell growth inhibition rate was measured with CCK-8 method; the migration ability of A549 cells was determined by Transwell assay; the expression of TNF- α was detected by ELISA method and NF- κ B p65 protein was detected by Western Blot. [Results] The inhibition rates of A549 cells in glutamine 16, 32 and 64 mmol/L groups were significantly higher than those in control group and glutamine 2, 4, 8 mmol/L groups ($P < 0.01$), while there was no significant difference between 32 mmol/L and 64 mmol/L groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, the migration ability of A549 cells in glutamine 32 mmol/L group was significantly reduced; and the expressions of TNF- α and NF- κ B p65 protein in glutamine 16, 32 and 64 mmol/L groups were significantly decreased ($P < 0.01$), but there was no significant difference between 32 mmol/L and 64 mmol/L groups ($P > 0.05$). [Conclusion] The effect of glutamine on lung adenocarcinoma A549 cells is concentration-dependent, and the optimal inhibitory concentration is 32 mmol/L. The effect of glutamine on lung adenocarcinoma cells may be related to down-regulation of TNF- α and NF- κ B p65 in A549 cells.

Subject words: glutamine; A549 cells; transwell; TNF- α ; NF- κ B

近年研究发现谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 具有增

强免疫、抗炎、抗肿瘤等作用, 且毒副作用小。TNF- α 、NF- κ B 与肿瘤的增殖、侵袭、转移等密切相关, 在肺癌中高表达, 与肺癌分期、转移及预后相关。本实验拟通过观察 Gln 对肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移

通讯作者: 邓述恺, 主任医师, 硕士生导师, 硕士; 西南医科大学附属第一医院呼吸内科, 四川省泸州市江阳区太平街 25 号 (646000); E-mail: dsk_lan@163.com

收稿日期: 2017-06-06; **修回日期:** 2017-08-16

及 TNF- α 、NF- κ B 表达的影响,探讨其在肺癌中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器和材料

肺腺癌细胞株 A549 (西南医科大学中心实验室)。谷氨酰胺、胎牛血清、胰酶、CCK-8 试剂盒(碧云天公司)。DMEM/F-12 培养基(HyClone)。Transwell 细胞培养小室(滤膜孔径 8 μ m)、TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience)。兔抗人 NF- κ B 和 GAPDH 一抗(Abcam),山羊抗兔二抗(KPL 公司)。CO₂ 恒温孵育箱 (Sanyo mco-18AIC 日本),酶标仪 (Denleydragon wellscan MK3 芬兰),洗板机(Well wash 4 MK2 芬兰)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组

人肺腺癌 A549 细胞用 DMEM/F-12 培养基在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养。设置空白对照组(组 1,无药物干预)、实验组(组 2~7,各组 Gln 终浓度分别为 2、4、8、16、32、64mmol/L),分别培养 24、48、72h 进行实验。

1.2.2 CCK-8 法检测 A549 细胞增殖

取对数生长期细胞,按 1 $\times$ 10⁴ 个细胞接种于 96 孔板。实验组细胞依次在含相应质量浓度的 Gln 培养基中孵育,同时设对照组。每个浓度样本设 5 个重复。每孔加 10 μ l CCK-8 溶液,孵育 4h。酶标仪测定 450nm 光吸收值,计算细胞增殖抑制率。

1.2.3 Transwell 实验检测细胞迁移能力

将细胞制成 1 $\times$ 10⁵ 个/ml 悬液,取 200 μ l 细胞悬液放入 Transwell 小室。24 孔板中加入 500 μ l 含 10% FBS 的完全培养基,将小室放入板中,常规培养 48h。结晶紫染色。显微镜下拍照并计数滤膜下室面的细胞数。

1.2.4 ELISA 法检测 TNF- α 表达

收集正常对照组和 Gln 组干预 72h 后细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作。酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度值(OD 值),根据标准曲线计算样品中 TNF- α 含量。

1.2.5 Western 印迹法检测 NF- κ B p65 蛋白的表达

收集正常对照组和 Gln 组干预 72h 后的细胞提取总蛋白。测定浓度后各取 40 μ g 蛋白样本进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5%脱脂奶封闭 1h,一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后加入二抗常温孵育 30min,显色,拍照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间及组内比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gln 对 A549 细胞增殖的影响

Gln 对肺腺癌 A549 细胞的增殖具有抑制作用,且与作用浓度及时间相关。第 3 组抑制率为 0,选取为对照组进行分析;第 1 组与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$),提示缺乏 Gln 时细胞生长受限;第 2、4 组在 24h 对细胞抑制作用不明显,但随作用时间的延长,抑制率有所增加;第 5~7 组与对照组相比有明显差异($P < 0.01$),并呈时间依赖性;但第 6 组和第 7 组在相同时间点抑制率无统计学差异($P > 0.05$),考虑当 Gln 浓度达 32mmol/L 时对 A549 细胞的抑制作用进入平台期,不会随 Gln 浓度的增加而增强(Table 1, Figure 1)。

Table 1 Effects of different concentrations of Gln on proliferation of A549 cell($\bar{x} \pm s$, %)

Groups	Gln concentration (mmol/L)	24h	48h	72h
1	0	7.866 $\pm$ 0.631 ^②	31.908 $\pm$ 0.974 ^②	52.441 $\pm$ 1.116 ^②
2	2	2.137 $\pm$ 1.392 ^{②*}	9.771 $\pm$ 0.527 ^{②*}	17.785 $\pm$ 1.376 ^②
3	4	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000
4	8	0.316 $\pm$ 1.831 ^{①*}	8.212 $\pm$ 0.580 ^{②*}	11.127 $\pm$ 0.455 ^②
5	16	16.890 $\pm$ 2.547 ^②	26.096 $\pm$ 0.568 ^②	43.064 $\pm$ 0.589 ^②
6	32	28.388 $\pm$ 0.236 ^{②Δ}	49.549 $\pm$ 0.612 ^{②Δ}	68.108 $\pm$ 1.724 ^{②Δ}
7	64	30.570 $\pm$ 1.121 ^{③Δ}	48.271 $\pm$ 3.206 ^{③Δ}	69.007 $\pm$ 1.039 ^{③Δ}

Compared with group 3, ①: $P > 0.05$, ②: $P < 0.05$. Compared between different concentration groups: *, $P > 0.05$, Δ: $P > 0.05$.

2.2 Transwell 实验检测 Gln 对 A549 细胞迁移的影响

选取 32mmol/L 组 Gln 处理 A549 细胞并进行细胞迁移实验,与正常对照组(114.00 $\pm$ 12.17)相比,Gln 组细胞迁移数目(51.00 $\pm$ 14.73)明显减少($P < 0.05$)

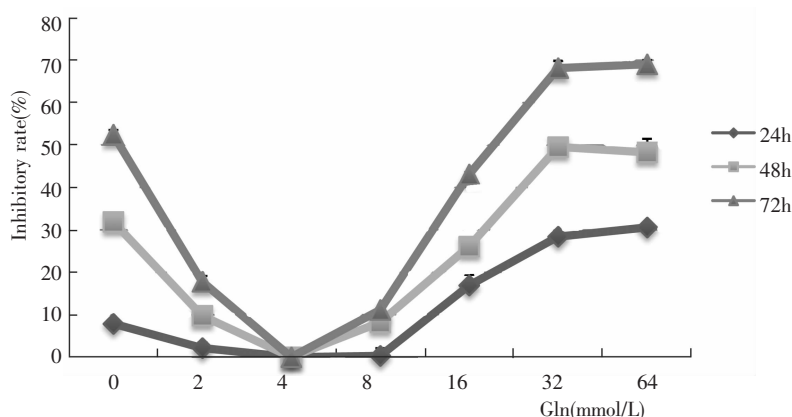
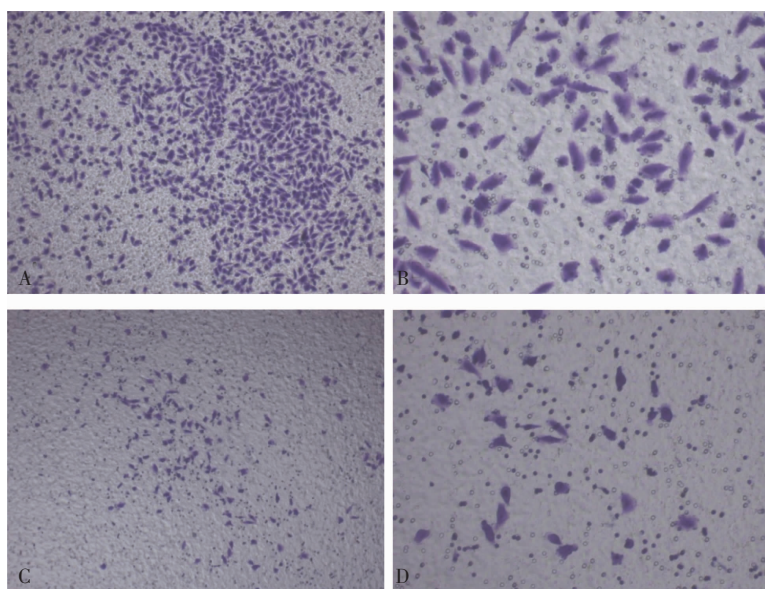
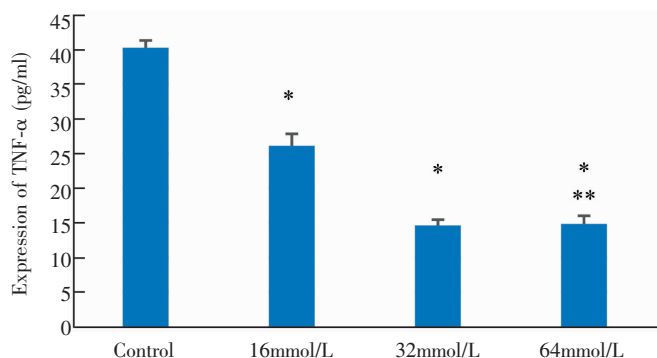


Figure 1 Inhibition of different concentration and duration of Gln on A549 cells' proliferation



A: Control group($\times 40$); B: Control group($\times 100$); C: Gln group($\times 40$); D: Gln group($\times 100$)

Figure 2 Effect of Gln on migration of A549 cells



Compare with control group, *: $P < 0.05$; Compare with 32mmol/L group, **: $P > 0.05$

Figure 3 Expression of TNF-α protein in A549 cells' supernatant

(Figure 2)。

2.3 ELISA 法检测 TNF-α 表达

与正常对照组相比,高浓度 Gln 组对 A549 细胞干预 72h 后 TNF-α 蛋白水平明显降低 ($P < 0.01$),且 32mmol/L 组 ($14.671 \pm 0.842 \text{ pg/ml}$) 和 64mmol/L 组 ($14.867 \pm 1.210 \text{ pg/ml}$) 之间无统计学差异 ($P > 0.05$) (Figure 3)。

2.4 Western 印迹法 NF-κB p65 蛋白的表达

与正常对照组相比,高浓度 Gln 组对 A549 细胞干预 72h 后 NF-κB p65 蛋白水平明显降低 ($P < 0.01$),且 32mmol/L 组 (0.548 ± 0.042) 和 64mmol/L 组 (0.474 ± 0.077) 之间无统计学差异 ($P > 0.05$) (Figure 4)。

3 讨论

谷氨酰胺(Gln)是血循环中含量最高的氨基酸,也是机体含量最高的游离氨基酸^[1]。过去已有报道补充 Gln 可抑制肿瘤细胞生长,缩小肿瘤体积;Gln 剥夺可诱导促血管生成,促转移和肿瘤运动因子如 VEGF、IL-8 等促进肿瘤细胞存活。Martins HA 等^[2]对 Walker-256 荷瘤大鼠补充 Gln

后发现肿瘤细胞生长受抑制,且恶病质明显减轻,这在 Fracaro L^[3]的研究中得到证实;亦有研究发现在胰腺导管腺癌细胞中补充谷氨酰胺可以抑制肿瘤细胞生长^[4]。另外,口服 Gln 可减少肿瘤细胞 IGF-1 生成,从而抑制 IGF-1 相关的 PI3K 信号转导系统,且肿瘤组 Bcl-2 水平较非肿瘤组低^[5]。Kim 等^[6]发现 Gln 能抑制 MAPK 使 PAF 介导的 ERK/JNK/p38 磷酸化失活,进而诱导血管生成及肿瘤转移。因此,外源性补充 Gln 不仅不会促进肿瘤细胞生长,相反可以起抑制作用。本实验结果显示 Gln 在 2~64mmol/L 浓度之间对

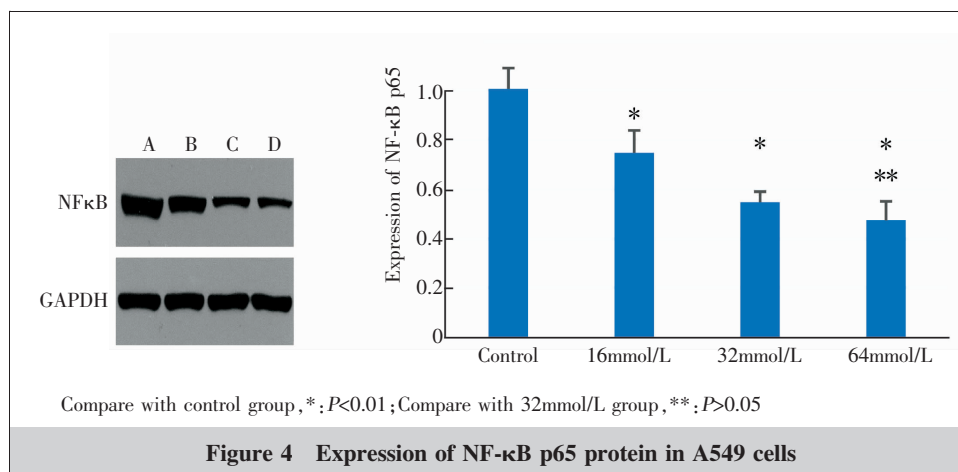


Figure 4 Expression of NF-κB p65 protein in A549 cells

肺腺癌 A549 细胞生长无明显刺激作用,且在适宜浓度下(16、32、64 mmol/L)能够明显抑制 A549 细胞增殖,并且随作用时间的延长而更加显著,与上述研究结论类似。Gln 在 32mmol/L 和 64mmol/L 两个浓度的抑制作用无统计学差异,可以认为由此进入作用平台期,因此,选取 32mmol/L 为 Transwell 实验的质量浓度。

本研究发现肺腺癌 A549 细胞在适宜浓度 Gln 作用下 TNF- α 、NF- κ B p65 蛋白表达水平明显降低,且下降趋势一致,表明 Gln 可抑制肺腺癌 A549 细胞 TNF- α 、NF- κ B 的表达,可能为抑制 TNF- α /NF- κ B 信号通路,从而抑制肺腺癌细胞的增殖;另外,Transwell 实验中 Gln 作用后 A549 细胞的迁移数目明显下降,表明细胞迁移能力受抑制。研究发现 TNF- α 和 NF- κ B 在癌症中高表达,对肿瘤细胞增殖、血管生成、侵袭和转移有促进作用,与肿瘤的分期、进展及预后密切相关^[7,8]。顾星等^[9]发现肝细胞恶性转化时 TNF- α /NF- κ B 信号通路中的关键分子 TNF- α 和 NF- κ B 进行性升高,通过 TNF- α 抗体或 p65siRNA 干预该通路活化,导致 TNF- α 和 NF- κ B 表达下调,进而通过促凋亡和细胞周期阻滞抑制肝癌细胞增殖。Al-Halabi 等^[10]研究显示 NF- κ B 显著性降低人结肠癌中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 α 的微血管密度和 mR-NA 表达水平,以及 VEGF-A 的蛋白水平,证实了 NF- κ B 在血管生成及肿瘤进展中的作用。肺癌细胞可以分泌 TNF- α ,并通过激活 TNF- α -ATM-ERK/p38-NF- κ B 信号通路上调 MMP-3/MMP-13 的表达^[11],同时能促进 MMP-9 表达并增强其活性^[12],进而促进肿瘤细胞侵袭和迁移。一项关于肺腺癌 A549 细胞的实验发现 NF- κ B 信号通路失活及下游 TNF- α 、IL-

6、IL-1 β 和 IL-18 等细胞因子的下调,可以明显减轻肿瘤的体积和重量,抑制肺癌细胞的增殖和侵袭^[13]。朱广发等用 NF- κ B 的抑制剂处理 A549 和 H358 细胞后, NF- κ B 活性和细胞体外运动性降低, MMP-2/9 的表达下降,结果表明抑制 IKK- β /NF- κ B 信号通路可以抑制人

NSCLC 细胞的迁移^[14]。因此,实验中细胞迁移能力下降可能与 Gln 抑制 TNF- α 、NF- κ B 表达,从而下调基质金属蛋白酶(如 MMP-9)^[15]、VEGF 等^[16]与侵袭、迁移及肿瘤血管形成有关的细胞因子相关,其机制有待于进一步研究证实。

总之,本实验结果显示 Gln 具有抑制肺腺癌 A549 细胞增殖的作用,并与 Gln 浓度相关,同时能抑制 A549 细胞的迁移能力,其抗肺腺癌的作用机制可能与下调 TNF- α 、NF- κ B p65 蛋白的表达抑制 NF- κ B 信号通路有关。

参考文献:

- [1] DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer [J]. *Oncogene*, 2010, 29(3): 313-324.
- [2] Martins HA, Sehaber CC, Hermes-Uliana C, et al. Supplementation with L-glutamine prevents tumor growth and cancer-induced cachexia as well as restores cell proliferation of intestinal mucosa of Walker-256 tumor-bearing rats [J]. *Amino Acids*, 2016, 48(12): 2773-2784.
- [3] Fracaro L, Frez FCV, Silva BC, et al. Walker 256 tumor-bearing rats demonstrate altered interstitial cells of Cajal. Effects on ICC in the Walker 256 tumor model [J]. *Neurogastroenterology Motility*, 2016, 28(1): 101-115.
- [4] Jeong SM, Hwang S, Park K, et al. Enhanced mitochondrial glutamine anaplerosis suppresses pancreatic cancer growth through autophagy inhibition [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30767.
- [5] Todomva VK, Harms SA, Luo S, et al. Oral glutamine (AES-14) supplementation inhibits PI-3k/Akt signaling in experimental breast cancer [J]. *JPEN*, 2003, 27(6): 404-410.

- [6] Kim HA, Kim KJ, Yoon SY, et al. Glutamine inhibits platelet-activating factor-mediated pulmonary tumour metastasis[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(11): 1730–1738.
- [7] Wu D, Wu P, Zhao L, et al. NF- κ B expression and outcomes in solid tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine(Baltimore), 2015, 94(40): e1687.
- [8] Hu JH, Zhang YQ, Zhu B, et al. Correlation analysis of expression of VEGF, TNF- α and IL-6 in breast cancer patients with prognosis[J]. Modern Journal of Clinical Medicine, 2015, 23(5): 639–641. [胡金华, 张耀晴, 朱斌, 等. 乳腺癌患者血清 VEGF、TNF- α 和 IL-6 的表达与预后的相关分析[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(5): 639–641.]
- [9] Gu X, Yao M, Wang SY, et al. Inhibitory effects of intervention of the TNF α /NF- κ B signaling pathway activation on hepatoma cell proliferation[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2014, 22(6): 434–439. [顾星, 姚敏, 王司晔, 等. 肿瘤坏死因子- α /核因子- κ B 信号通路活化干预对肝癌细胞增殖的抑制作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(6): 434–439.]
- [10] Al-Halabi R, Bou Chedid M, Abou Merhi R, et al. Gallotanin inhibits NF- κ B signaling and growth of human colon cancer xenografts[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(1): 59–68.
- [11] Yan HQ, Zhang D, Shi YY, et al. Ataxia-telangiectasia mutated activation mediates tumor necrosis factor- α induced MMP-13 up-regulation and metastasis in lung cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(38): 62070–62083.
- [12] Shin SY, Kim CG, Jung YJ, et al. The UPR inducer DPP23 inhibits the metastatic potential of MDA-MB-231 human breast cancer cells by targeting the Akt-IKK-NF- κ B-MMP-9 axis[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 34134.
- [13] Lü P. Inhibitory effects of hyperoside on lung cancer by inducing apoptosis and suppressing inflammatory response via caspase-3 and NF- κ B signaling pathway[J]. Biomedicine Pharmacother, 2016, 82: 216–225.
- [14] Zhu GF, Huang Y, Wu CT, et al. Activation of G-protein-coupled estrogen receptor inhibits the migration of human non small cell lung cancer cells via IKK- β /NF- κ B signals [J]. DNA and Cell Biology, 2016, 35(8): 434–442.
- [15] Zhang YH, Yan HQ, Wang F, et al. TIPE2 inhibits TNF- α -induced hepatocellular carcinoma cell metastasis via Erk1/2 downregulation and NF- κ B activation[J]. Int J Oncol, 2015, 46(1): 254–264.
- [16] El Hasasna H, Saleh A, Samri HA, et al. Rhus coriaria suppresses angiogenesis, metastasis and tumor growth of breast cancer through inhibition of STAT3, NF κ B and nitric oxide pathways[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21144.

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。
2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。
3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。
4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。
5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。
6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。
7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。