论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0124-04

细胞黏附对干扰素、5-氟尿嘧啶诱导细胞凋亡的影响

胡文艳[1],高 建[1],李 璇[1],田 绿[1],彭湃澜[1],王 峰[2],高昌益[2],任 红[3],唐开福[3] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:消化内科[1],肝炎研究所[3];638650 四川 华蓥,四川省华蓥市人民医院普外科[2])

【摘要】 目的 探讨细胞黏附作用对干扰素、5-氟尿嘧啶(5-Fu)诱导细胞凋亡的影响。**方法** 采用 $HepG_2$、HEK293细胞株,常规96孔板培养细胞,分为空白不加药(A组)、多聚赖氨酸包被预处理+贴壁后加药(B组)、贴壁后加药(C组)、未贴壁就加药(D组)、未贴壁就加药和Fn抗体(E组)。选用干扰素、5-Fu分别作用各组细胞,MTT法测定各组增殖抑制率和DNA Fragmentation ELISA测定凋亡率,Western blot检测干扰素诱导各组PKR蛋白水平的表达。**结果** 经多聚赖氨酸包被预处理后,细胞对药物的敏感性减弱,MTT法显示抑制率:干扰素作用 G_2 细胞,B、C组抑制率分别为(27.24±31.77)%、(39.04±14.88)%($P<0.05$);5-Fu作用 G_2 细胞,B、C组抑制率分别为(30.61±11.26)%、(32.94±20.93)%($P<0.05$);干扰素作用293细胞,B、C组抑制率分别为(32.02±23.48)%、(46.22±25.20)%($P<0.05$);5-Fu作用293细胞,B、C组抑制率分别为(14.07±21.91)%、(31.61±31.49)%($P<0.05$)。DNA Fragmentation ELISA示凋亡率:干扰素作用 G_2 细胞,B、C组凋亡率分别为(0.425±0.038)、(0.535±0.039)($P<0.05$);5-Fu作用 G_2 细胞,B、C组凋亡率分别为(0.337±0.016)、(0.417±0.075)($P<0.05$);干扰素作用293细胞,B、C组凋亡率分别为(0.394±0.033)、(0.499±0.018)($P<0.05$);5-Fu作用293细胞,B、C组凋亡率分别为(0.406±0.024)、(0.504±0.069)($P<0.05$)。而阻断纤维黏连蛋白(Fn),细胞对药物的敏感性增强,MTT法显示抑制率:干扰素作用 G_2 细胞,D、E组抑制率分别为(49.90±11.90)%、(66.86±24.66)%($P<0.05$);5-Fu作用 G_2 细胞,D、E组抑制率分别为(45.96±21.27)%、(68.76±31.41)%($P<0.05$);干扰素作用293细胞,D、E组抑制率分别为(58.98±32.96)%、(76.72±21.69)%($P<0.05$);5-Fu作用293细胞,D、E组抑制率分别为(47.02±26.84)%、(62.60±29.79)%($P<0.05$)。DNA Fragmentation ELISA示凋亡率:干扰素作用 G_2 细胞,D、E组凋亡率分别为(0.699±0.023)、(0.801±0.040)($P<0.05$);5-Fu作用 G_2 细胞,D、E组凋亡率分别为(0.581±0.023)、(0.721±0.027)($P<0.05$);干扰素作用293细胞,D、E组凋亡率分别为(0.555±0.011)、(0.686±0.040)($P<0.05$);5-Fu作用293细胞,D、E组凋亡率分别为(0.590±0.062)、(0.704±0.011)($P<0.05$)。干扰素诱导各组PKR蛋白表达水平中,空白对照组分别较其他组显著下调($P<0.05$),而B、C、D、E组间表达差异无显著性($P>0.05$)。**结论** 干扰细胞-基质的黏附作用可以增强干扰素、5-Fu的敏感性,从而使细胞增殖受抑,凋亡增加;干扰素可增强PKR磷酸化水平,但并不受黏附作用的影响。

【关键词】 细胞黏附;细胞凋亡;细胞增殖;药物敏感

【中图法分类号】 R329.2;R394.2;R73-354 **【文献标志码】** A

Effects of cell adhesion on interferon and 5-fluorouracil induced cell apoptosis *in vitro*

Hu Wenyan[1], Gao Jian[1], Li Xuan[1], Tian Lu[1], Peng Pailan[1], Wang Feng[2], Gao Changyi[2], Ren Hong[3], Tang Kaifu[3] ([1]Department of Gastroenterology, [3]Institute for Viral Hepatitis, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Huaying People's Hospital, Huaying, Sichuan Province, 638650, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of cell adhesion on interferon (IFN) and 5-fluorouracil (FU) induced cell apoptosis. Methods $HepG_2$ and HEK293 cells were classified into the 5 groups. Cells in group A were seeded into blank plates and not treated. Cells in group B were seeded into polylysine precoated plates followed by 5-Fu (250 μg/ml 4.2 μl) or IFN (500 U/ml 1.7 μl) treatment in 6 h after seeding. Cells in group C were seeded into blank plates and treated with 5-Fu or IFN in 6 h after seeding. Cells in group D were seeded into blank plates and treated with 5-Fu or IFN immediately after seeding. Cells in group E were seeded into blank plates and treated with anti-fibronectin antibody (500 μg/ml, 1 μl) immediately after seeding, and then treated with 5-Fu or IFN in 6 h after seeding. Cell proliferation was detected by MTT assay, and cell apoptosis was detected by DNA fragmentation ELISA assay. Western blotting was used to detected PKR

【基金项目】 国家自然科学基金(30700708,30971612);重庆市医学科技重点项目(2009-1-17)

【通信作者】 高 建,E-mail:g6j6@sohu.com

content in IFN-induced groups. **Results** Polylysine precoating plates decreased the drug sensitivity of cells. MTT assay showed that IFN on $HepG_2$ cells, the proliferation of B and C groups was inhibited by (27.24 ± 31.77)% and (39.04 ± 14.88)% respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on $HepG_2$ cells, the proliferation of B and C groups was inhibited by (30.61 ± 11.26)% and (32.94 ± 20.93)% respectively ($P < 0.05$); IFN on 293 cells, the proliferation of B and C groups was inhibited by (32.02 ± 23.48)% and (46.22 ± 25.20)% respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on 293 cells, the proliferation of B and C groups was inhibited by (14.07 ± 21.91)% and (31.61 ± 31.49)% respectively ($P < 0.05$). DNA fragmentation ELISA indicated IFN on $HepG_2$ cells, the apoptosis of B and C groups was (0.425 ± 0.038) and (0.535 ± 0.039) respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on $HepG_2$ cells, the apoptosis of B and C groups was (0.337 ± 0.016) and (0.417 ± 0.075) respectively ($P < 0.05$); IFN on 293 cells, the apoptosis of B and C groups was (0.394 ± 0.033) and (0.499 ± 0.018) respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on 293 cells, the apoptosis of B and C groups was (0.406 ± 0.024) and (0.504 ± 0.069) respectively ($P < 0.05$). However, blocking the anti-fibronectin antibody (Fn) enhanced the drug sensitivity to cells. MTT assay showed that IFN on $HepG_2$ cells, the proliferation of D and E groups was inhibited by (49.90 ± 11.90)% and (66.86 ± 24.66)% respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on $HepG_2$ cells, the proliferation of D and E groups was inhibited by (45.96 ± 21.27)% and (68.76 ± 31.41)% respectively ($P < 0.05$); IFN on 293 cells, the proliferation of D and E groups was inhibited by (58.98 ± 32.96)% and (76.72 ± 21.69)% respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on 293 cells, the proliferation of D and E groups was inhibited by (47.02 ± 26.84)% and (62.60 ± 29.79)% respectively ($P < 0.05$). DNA fragmentation ELISA indicated IFN on $HepG_2$ cells, the apoptosis of D and E groups was (0.699 ± 0.023) and (0.801 ± 0.040) respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on $HepG_2$ cells, the proliferation of D and E groups was (0.581 ± 0.023) and (0.721 ± 0.027) respectively ($P < 0.05$); IFN on 293 cells, the proliferation of D and E groups was (0.555 ± 0.011) and (0.686 ± 0.040) respectively ($P < 0.05$); 5-Fu on 293 cells, the proliferation of D and E groups was (0.590 ± 0.062) and (0.704 ± 0.011) respectively ($P < 0.05$). Western blot analysis showed PKR was decreased in blank group compared with the other groups respectively ($P < 0.05$), however, there was no significant difference among B, C, D and E groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Repression of cell adhesion enhances the sensitivity of cells to IFN and 5-Fu treatment. IFN enhances the phosphorylation of PKR, but has no relationship with cell adhesion.

[Key words] cell adhesion; cell apoptosis; cell proliferation; drug sensitivity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700708, 30971612) and the Key Program of Medical Science of Chongqing (2009-1-17).
Corresponding author: Gao Jian, E-mail: g6j6@sohu.com

细胞的黏附是由细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs)作为执行者来发挥作用的。CAMs是一类介导细胞-细胞、细胞-细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间相互接触和作用的膜表面糖蛋白分子的统称,它参与了胚胎的形成,正常组织结构的维持,免疫和炎症反应等[1]。细胞群集时药物敏感性的降低并非由药物不易进入所致,而可能主要是由于细胞黏附作用增强了细胞的抗凋亡能力[2]。本研究用干扰素、5-氟尿嘧啶(5-Fu)分别诱导正常细胞和肿瘤细胞的凋亡,观察细胞黏附作用对药物诱导细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞($HepG_2$)、人胚肾细胞(HEK293)购于中科院上海细胞所,由本院病毒性肝病研究所保存提供。

1.1.2 试剂 多聚赖氨酸(polylysine)(美国Sigma公司),纤维黏连蛋白抗体(Fn抗体)(英国Abcam公司),DNA Fragmentation ELISA试剂盒(Roche公司),MTT试剂盒(凯基生物),双链RNA依赖的蛋白激酶(double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR)鼠抗体(中杉生物)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 分别将$HepG_2$,HEK293细胞按常规方法培养于RPMI1640培养基中(含10%灭活胎牛血清,100 U/ml青霉素,100 U/ml链霉素),置于5% CO_2,37.5 ℃,相对湿度90%的二氧化碳培养箱中培养。

1.2.2 干扰素和5-Fu分别诱导细胞的凋亡 2种细胞分别按1×10^5/ml接种于96孔板中,100 μl/孔,分为A组:空白不加药,不做任何处理;B组:以1%多聚赖氨酸包被预处理,待6 h细胞贴壁后加入相应量的干扰素/5-Fu;C组:6 h细胞贴壁

后加入相应量的干扰素/5-Fu；D组：未贴壁就加入干扰素(500 U/ml，1.7 μl)/5-Fu(250 μg/ml，4.2 μl)；E组：未贴壁就加入相应量干扰素/5-Fu，及Fn抗体(500 μg/ml，1 μl)以阻断细胞外基质中的纤维黏连蛋白Fn。

1.2.3 MTT法检测处理后各组对干扰素/5-Fu的增殖抑制率

如前述处理细胞，孵育48 h，按凯基生物MTT试剂说明书，每孔加入5 mg/ml的MTT 20 μl，继续孵育4 h，弃上清，加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl，振荡10 min。酶联免疫检测仪于490 nm处测各孔光密度值[D(490)]，D(490)值越高，细胞增值越多，各实验组设5复孔，按公式计算抑制率。

抑制率=[1－药物组D(490)值/对照组D(490)值]×100%

1.2.4 细胞凋亡的测定 按照Roche公司Cellular DNA Fragmentation ELISA试剂盒，用BrdU labeling reagent标记细胞12 h后，将BrdU-labeled细胞按照1×10^5/ml接种于96孔板，按1.2.2分组，48 h后用裂解液裂解细胞，离心取上清于anti-DNA包被的酶标板中，500 W微波炉照射5 min，以断裂上清中的双链DNA，再与辣根过氧化物酶标记的抗BrdU结合物反应，与底物显色后，在370 nm处测各孔光密度值[D(370)]，凋亡越多，D(370)值越高。各实验组设5复孔。

1.2.5 干扰素对细胞PKR磷酸化水平的影响的检测 将各组细胞种植于6孔板中，加入干扰素(500 U/ml，35 μl)，培养48 h后收集细胞，提取蛋白，并用BCA法测定样品蛋白浓度，变性后经8% SDS-PAGE后，转移至PVDF膜上，5%脱脂奶(TBST配制)室温封闭1 h；PBS洗膜，PKR鼠抗(中杉，1∶1 000)，β-actin鼠抗(中杉，1∶1 000)，室温孵育4 h；TBST洗膜3次，每次10 min，二抗山羊抗小鼠IgG(中杉，1∶2 000)，室温孵育1 h；TBST洗膜3次，每次10 min，采用DAB试剂盒(中杉金桥)显色。

1.3 统计学分析

数据用$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件，两样本均数间比较采用t检验。

2 结果

2.1 MTT实验

以干扰素和5-Fu分别诱导G_2细胞、HEK293细胞凋亡后，测定其抑制率。经多聚赖氨酸包被预处理组，细胞贴壁更紧密，药物对细胞的增殖抑制作用弱于贴壁后加药组($P<0.05$)；而不贴壁+Fn抗体组，阻断了ECM中的重要成分纤维黏连蛋白参与的细胞黏附，与不贴壁加药组相比，对药物的敏感性更高($P<0.05$)。见表1、2。

表1 MTT法测定干扰素/5-Fu诱导各组$HepG_2$细胞后的抑制率(%，$\bar{x}\pm s$)

干扰素组	抑制率	5-Fu组	抑制率
多聚赖氨酸处理贴壁组	27.24±31.77	多聚赖氨酸处理贴壁组	30.61±11.26
贴壁组	39.04±14.88[a]	贴壁组	32.94±20.93[a]
不贴壁组	49.90±11.91	不贴壁组	45.96±21.27
不贴壁+Fn抗体组	66.86±24.66[b]	不贴壁+Fn抗体组	68.76±31.41[b]

a：$P<0.05$，与多聚赖氨酸处理贴壁组比较；b：$P<0.05$，与不贴壁组比较

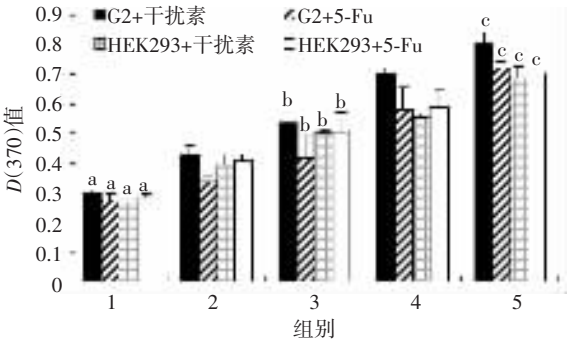
表2 MTT法测定干扰素/5-Fu诱导各组HEK293细胞后的抑制率(%，$\bar{x}\pm s$)

干扰素组	抑制率	5-Fu组	抑制率
多聚赖氨酸处理贴壁组	32.02±23.48	多聚赖氨酸处理贴壁组	14.07±21.91
贴壁组	46.22±25.20[a]	贴壁组	31.61±31.49[a]
不贴壁组	58.98±32.96	不贴壁组	47.02±26.84
不贴壁+Fn抗体组	76.72±21.69[b]	不贴壁+Fn抗体组	62.60±29.79[b]

a：$P<0.05$，与多聚赖氨酸处理贴壁组比较；b：$P<0.05$，与不贴壁组比较

2.2 细胞凋亡检测

经两样本间t检验显示凋亡率均存在差异($P<0.05$)，即凋亡率为B组<C组，D组<E组，各组分别与A组比较均显示凋亡率存在差异($P<0.05$)。见图1。

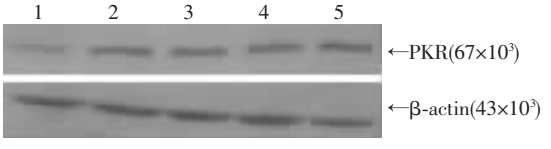


1：空白对照组 2：多聚赖氨酸处理贴壁组 3：贴壁组 4：不贴壁组；5：不贴壁+Fn抗体组 a：$P<0.05$，与2、3、4、5比较；b：$P<0.05$，与2比较；c：$P<0.05$，与4比较

图1 DNA Fragmentation ELISA测定干扰素/5-Fu诱导$HepG_2$/HEK293细胞的凋亡

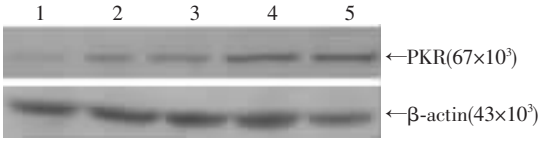
2.3 干扰素对双链RNA依赖的磷酸化水平的影响

Western blot检测干扰素诱导$HepG_2$细胞凋亡的PKR蛋白表达水平表达量[A组(0.349±0.03)、B组(0.406±0.04)、C组(0.382±0.03)、D组(0.677±0.05)、E组(1.017±0.04)]，其中空白对照A组蛋白表达分别与其他组相比显著下调($P<0.05$)，而B、C、D、E组间表达差异无显著性($P>0.05$)；干扰素诱导HEK293细胞凋亡的PKR蛋白表达水平分别为A组(0.402±0.02)、B组(0.666±0.05)、C组(0.836±0.04)、D组(0.919±0.03)、E组(0.517±0.04)，其中空白对照A组蛋白表达分别与其他组相比显著下调($P<0.05$)，而B、C、D、E组间表达差异无显著性($P>0.05$)。表明干扰素可增强PKR磷酸化水平，但并不受黏附作用的影响。见图2、3。



1：空白对照组 2：多聚赖氨酸处理贴壁组 3：贴壁组 4：不贴壁组；5：不贴壁+Fn抗体组

图2 Western blot检测干扰素诱导$HepG_2$细胞各组PKR蛋白水平的表达



1：空白对照组；2：多聚赖氨酸处理贴壁组；3：贴壁组；4：不贴壁组；5：不贴壁＋Fn 抗体组

图 3　Western blot 检测干扰素诱导 HEK293 细胞各组 PKR 蛋白水平的表达

3　讨论

细胞-细胞、细胞-细胞外基质的黏附作用可传递一种“生存信号”，以避免细胞凋亡，表现为对药物的敏感性降低[3]。细胞在贴壁过程中，分泌细胞外基质，增强细胞的黏附作用。CAMs 作为细胞黏附能力的执行者包括了选择素家族、CD44 家族、整合素家族、钙黏素家族等，其中，整合素家族介导细胞-基质的黏附作用，钙黏素家族介导细胞-细胞的黏附作用[4-5]。Green 等[6]研究发现用单克隆抗体阻断 E-钙黏素介导的细胞-细胞间的黏附作用后，可使结肠癌 HT29 细胞对 5-Fu、紫杉醇的药物敏感性增强，促进凋亡。与这些结果相一致，本研究发现：培养板用多聚赖氨酸包被后，细胞贴壁更紧密，故黏附能力强于贴壁组，对药物的敏感性降低（即 MTT 示 B 组＜C 组，DNA Fragmentation ELISA 示 B 组＜C 组）；而纤维黏连蛋白（Fn）是细胞外基质的主要成分之一，在细胞贴壁前加入 Fn 抗体，进一步阻断了细胞-细胞外基质的黏附作用，与不贴壁组相比，细胞对药物的敏感性增强（即 MTT 示 D 组＜E 组，DNA Fragmentation ELISA 示 D 组＜E 组）。此外，虽然干扰素、5-Fu 对细胞增殖的抑制率为 B 组＜C 组＜D 组＜E 组；DNA Fragment ELISA 测定各组凋亡率为 A 组＜B 组＜C 组＜D 组＜E 组；但是，由于 B、C 组和 D、E 组之间在药物处理时间上相差 6 h，因此，B、C 组和 D、E 组之间无可比性。

PKR 是抗病毒感染的关键分子[7]，干扰素能够诱导 PKR 磷酸化，抑制蛋白质合成，从而诱导细胞凋亡[8-10]。5-Fu 通过抑制 DNA 复制引起 DNA 损失而诱导凋亡[11]，还可以通过诱导内源性的凋亡机制发挥其细胞毒性作用[12-14]。本实验结果表明，与空白组相比，各实验组的 PKR 磷酸化水平均升高，但是各组比较无显著性差异，说明细胞黏附作用并不影响 PKR 磷酸化水平的变化。因此，黏附作用减弱而致细胞凋亡增加的机制，并非由 PKR 的磷酸化所致。另外，本实验表明：肿瘤细胞和正常细胞都对干扰素和 5-Fu 敏感，这是一个临床治疗过程值得注意的问题。

参考文献：

[1] Gulubova M V. Expression of cell adhesion molecules, their ligands and tumour necrosis factor alpha in the liver of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas [J]. Histochem J, 2002, 34 (1/2): 66-77.

[2] 梁后杰，黄海辉. 细胞黏附与肿瘤多细胞耐药[J]. 第三军医大学学报，2002，24(11)：1257-1258.

[3] 陈玉英，杨黎，潘凤，等. HT29 细胞黏着斑激酶表达与其对 5-氟尿嘧啶敏感性的关系研究[J]. 解放军医学杂志，2008，33(4)：421-424.

[4] Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, *et al*. Overexpression of truncated I kappa B alpha potentiates TNF-alpha-induced apoptosis in mesangial cells[J]. Kidney Int, 2000, 57(3): 959-968.

[5] 郑晨宏，梁后杰，周琪. 黏附分子在肿瘤多细胞耐药中的研究进展[J]. 肿瘤，2008，28(7)：626-629.

[6] Green S K, Francia G, Isidoro C, *et al*. Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy *in vitro*[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(2): 149-159.

[7] 石华，宋方洲. 双链 RNA 依赖性蛋白激酶的结构与作用[J]. 生命的化学，2006，26(1)：38-41.

[8] Dimitrove D I, Yang X, Reichenbach N L, *et al*. Lentivirus-mediated transduction of PKR into CD34(+) hematopoietic stem cells inhibits HIV-1 replication in differentiated T cell progeny[J]. J Interferon Cytokine Res, 2005, 25(6): 345-360.

[9] Gomez C E, Vandermeeren A M, Garcia M A, *et al*. Involvement of PKR and RNase L in translational control and induction of apoptosis after Hepatitis C polyprotein expression from a Vaccinia virus recombinant[J]. Virol J, 2005, 2: 81.

[10] Donze O, Deng J, Curran J, *et al*. The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs[J]. EMBO J, 2004, 23(3): 564-571.

[11] Wang B D, Kline C L, Pastor D M, *et al*. Prostate apoptosis response protein 4 sensitizes human colon cancer cells to chemotherapeutic 5-FU through mediation of an NF kappaB and microRNA network[J]. Mol Cancer, 2010, 9(1): 98.

[12] 裴莉，边志衡，江恒，等. RNA 干扰 BNIP3 表达对 LoVo 细胞 5-氟脲嘧啶化疗敏感性的影响[J]. 肿瘤预防与治疗，2009，22(4)：367-370.

[13] 邓碧，叶琳，王驰，等. 5-氟尿嘧啶核苷前药脂质体对人喉癌 HEP-2 细胞株增殖与凋亡作用的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(17)：1679-1681.

[14] 吴国英，李黔生，聂志林，等. 5-氟尿嘧啶诱导肾癌细胞凋亡对 Fas/FasL 途径依赖性的研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(13)：1254-1257.

（收稿 2010-08-11 修回 2010-09-19）
（编辑　王　红）