文章编号:1000-5404(2012)08-0723-03

论著

IBP促进人涎腺腺样囊性癌细胞对紫杉醇耐药

熊 剑[1,2],常慧君[1,3],李 鹏[4],范 舒[4],申 涛[1],简从相[1],周继祥[1],胡川闽[4] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院口腔科[1],医学检验系临床生物化学教研室[4];437100 湖北 咸宁,咸宁学院口腔系[2];610041 成都,四川省军区门诊部口腔科[3])

[摘要] **目的** 探讨IBP对SACC细胞抗紫杉醇凋亡能力的影响及其机制。**方法** 将ACC2转染IBP组和空白对照组各自根据不同紫杉醇浓度分成5组,紫杉醇作用72 h后,MTT法检测在紫杉醇作用下IBP对SACC细胞增殖的影响;通过微管蛋白Tubulin免疫荧光染色,观察紫杉醇作用前后ACC2细胞微管的变化及IBP与微管的关系。**结果** IBP使ACC2细胞对紫杉醇产生一定程度的耐药,在5 μg/ml的紫杉醇浓度下最为明显;紫杉醇开始作用后,ACC2-C1细胞的微管点状聚集成团,而ACC2-C1/IBP细胞的微管则出现明显的紊乱、断裂,IBP能促进微管的解聚;IBP所发的绿色荧光与微管的红色荧光糅合在一起呈黄色,IBP与微管存在一定程度的共定位。**结论** IBP促进SACC细胞对紫杉醇耐药。

[关键词] IBP;紫杉醇;免疫荧光染色;Tubulin
[中图法分类号] R341;R739.87;R966 [文献标志码] A

IRF-4 binding protein promotes resistance of human salivary adenoid cystic carcinoma cells to taxol

Xiong Jian[1,2], Chang Huijun[1,3], Li Peng[4], Fan Shu[4], Shen Tao[1], Jian Congxiang[1], Zhou Jixiang[1], Hu Chuanmin[4] ([1]Department of Stomatology, Southwest Hospital, [4]Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Stomatology, Xianning University, Xianning, Hubei Province, 437100; [3]Clinic of Stomatology, Department of Outpatients, Sichuan Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of IRF-4 binding protein (IBP) on resistance of salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) cells to taxol and its mechanism. **Methods** ACC2 cells transfected with IBP and blank control cells (ACC2-C1 cells) were divided into 5 groups according to their taxol concentration. Effect of IBP on proliferation of SACC cells was detected by MTT assay 72 h after taxol was used. Occurrence of changes in microtubules of SACC cells and its relation with IBP were observed with tubulin immunofluorescence staining before and after taxol was used. **Results** IBP increased the resistance of ACC2 cells to taxol, especially at the concentration of 5 μg/ml. The point-like microtubules of ACC2-C1 cells aggregated into a clump while the microtubules of ACC2-C1/ IBP cells were arranged in disorder and fractured, indicating that IBP can promote depolymerization of microtubules. Green fluorescence of IBP and red fluorescence of microtubules were merged as a yellow color, showing that IBP and microtubules are located at the same site. **Conclusion** IBP promotes resistance of SACC cells to taxol.

[**Key words**] IRF-4 binding protein; taxol; immune immunofluorescence staining; tubulin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901458) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5027). Corresponding author: Hu Chuanmin, Tel:86-23-68753761, E-mail: chuminhu@163.com

涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma,SACC)是涎腺常见的恶性肿瘤,在手术治疗的同时,应用化疗药物对提高治疗效果及防止远处转移具有重要意义。紫杉醇是从太平洋紫杉树的树皮与针叶中分离出的一种抗癌物质,属细胞毒类化合物,是一类化学结构新颖、作用机制独特的新型抗肿瘤药[1]。IBP(IRF-4 binding protein)是新近发现的和免疫反应相关的一个分子,近来已将其引入到肿瘤的研究中来。我们前期的工作已证实IBP的高表达能显著抑制涎腺

[基金项目] 国家自然科学基金(30901458);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5027)
[通信作者] 胡川闽,电话:(023)68753761,E-mail: chuminhu@163.com

腺样囊性癌细胞的增殖[2]。本研究探讨IBP联合紫杉醇对涎腺腺样囊性癌细胞增殖的影响及其机制，为临床治疗涎腺腺样囊性癌提供基础实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

Maxin-Bio内源性过氧化物酶阻断剂；免疫染色一抗稀释液(Beyotime公司)；免疫荧光染色二抗稀释液(Beyotime公司)；抗荧光淬灭封片液(Beyotime公司)；免疫染色封闭液(Beyotime公司)；tubulin抗体[Beyotime(AT819)]；山羊抗小鼠IgG/TRITC(北京中杉金桥zf-0313)；DMSO(Sigma公司)；MTT(上海捷瑞生物工程有限公司)；紫杉醇(北京华素制药股份有限公司)；Bio-Rad酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测在紫杉醇作用下IBP对SACC细胞增殖的影响 消化处于对数生长期的ACC2-C1/IBP、ACC2-C1细胞，制造细胞悬液，计数备用。分别取2 000/孔的ACC2-C1细胞和ACC2-C1/IBP细胞悬液接种于同一块96孔培养板，各铺30孔，补足完全培养基；在细胞孔周围设一圈空白孔(只加PBS)。待细胞贴壁后，去除原培养基，在ACC2-C1和ACC2-C1/IBP细胞孔中分别加入终浓度分别为0、1、2、5、10 μg/ml的200 μl/孔紫杉醇工作液，2种细胞每浓度均设6个复孔，混匀后放入CO_2孵箱中培养3 d。3 d后取出96孔板，在待测样品中加入MTT溶液(5 mg/ml)20 μl，在细胞培养箱内孵育4 h后中止培养，吸去孔内培养上清，每孔加入150 μl DMSO，振荡10 min充分溶解结晶；分光光度酶标仪测定光密度值(滤波器波长570 nm，参考波长600 nm)，计算出紫杉醇对各细胞增殖与活性的影响。

1.2.2 免疫荧光染色观察紫杉醇作用前后SACC细胞微管的变化及IBP与微管的关系 ACC2-C1/IBP、ACC2-C1细胞爬片在5 μg/ml紫杉醇工作液作用前和作用3 d后，分别用4%多聚甲醛固定，以PBS洗涤3次×5 min，含0.5% Triton X-100的PBS浸泡15 min，PBS洗涤3次×5 min，Maxio-bio内源性过氧化物酶阻断剂室温阻断15 min，阻断内源性过氧化物酶活性，PBS洗涤3次×5 min，免疫染色封闭液(Beyotime)37 ℃封闭1 h，滴加用免疫染色一抗稀释液(Beyotime)按1∶100稀释后的鼠抗人Tubin一抗(Beyotime)，4 ℃孵育过夜；PBS洗涤3次×5 min，滴加用免疫荧光染色二抗稀释液(Beyotime)按1∶100稀释后的以罗丹明标记山羊抗小鼠IgG/TRITC(Beyotime)，湿盒中37 ℃孵育1 h，PBS洗涤3次×5 min，10 μl/ml Hoesh-est33258室温孵育15 min，PBS洗涤3次×5 min，抗荧光淬灭封片剂(Beyotime)封片。

2 结果

2.1 IBP组SACC细胞对紫杉醇的反应性下降

ACC2-C1/IBP和ACC2-C1细胞因为IBP表达状况的不同而对紫杉醇的反应性发生明显差异(图1)。不同浓度的紫杉醇作用细胞72 h后，发现在0 μg/ml紫杉醇浓度下，IBP阴性表达细胞的光密度值较IBP阳性表达细胞高，比后者高出将近1.3倍，即IBP抑制SACC细胞的增殖；在10 μg/ml紫杉醇浓度下，2组细胞的光密度值相等且极低，可能因为紫杉醇浓度过高，2组细胞均已大量死亡。在1、2 μg/ml紫杉醇浓度下，2组细胞的光密度值差别不大，因为ACC2-C1的增殖速率比ACC2-C1/IBP高，相较而言，ACC2-C1细胞对紫杉醇的反应更大；而在5 μg/ml的紫杉醇浓度下，ACC2-C1/IBP的光密度值远远大于ACC2-C1，比后者高出将近2.5倍，充分说明IBP使ACC2细胞对紫杉醇产生一定程度的耐药，在5 μg/ml的紫杉醇浓度下最为明显。

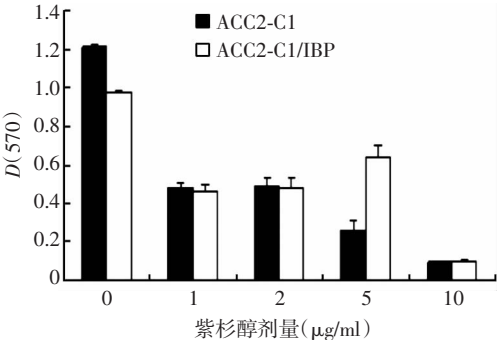


图1 IBP影响ACC2细胞对紫杉醇的反应

2.2 紫杉醇作用前后SACC细胞微管的变化

由于过表达IBP的ACC2-C1/IBP细胞及其空白对照ACC2-C1细胞具有EGFP绿色荧光，故将ACC2-C1/IBP细胞和ACC2-C1细胞爬片在5 μg/ml紫杉醇作用前后，进行微管Tubulin免疫荧光染色，通过激光共聚焦显微镜观察IBP与微管的关系以及5 μg/ml紫杉醇作用前后微管的变化(图2)。紫杉醇开始作用后，ACC2-C1细胞的微管开始点状聚集成团，最后在局部形成一个个的小团块。而ACC2-C1/IBP细胞的微管则出现明显的紊乱，微管像一根根断裂开来，并且可以发现，IBP所发的绿色荧光与微管的红色荧光糅合在一起呈黄色，表明IBP与微管存在一定程度的共定位。

3 讨论

腺样囊性癌是唾液腺恶性肿瘤中发病率最高的肿瘤之一，占唾液腺恶性肿瘤的27%[3]。腺样囊性癌发病隐匿，具有局部浸润性生长和沿神经血管束扩散的特性，目前的治疗方法以扩大切除手术为主，术后辅以放化疗，但复发、转移仍难以控制。

紫杉醇是一种全新的二萜类抗癌药物，它可以与N端微管蛋白的β亚基产生浓度依赖性的、可逆性的结合，诱导和促使微管蛋白聚合成微管，破坏微管和微管蛋白之间的动态平衡，并且抑制微管蛋白解聚，起到稳定微管的作用，将细胞阻滞在G_2/M期，从而抑制细胞分裂和增殖[4]。林李嵩等[5]通过用紫杉醇对ACC2体外、体内的抗癌作用的研究发现紫杉醇对ACC2抑制率随药物浓度增加而增大，可诱导ACC2细胞发生凋亡[6]，使ACC2细胞发生明显G_2/M期阻滞。

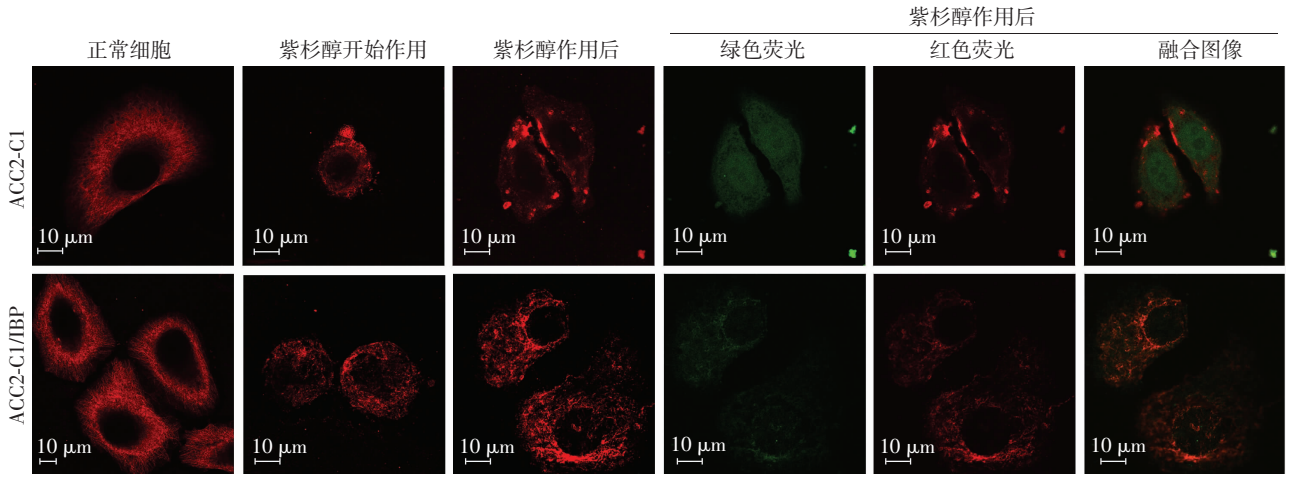


图 2　免疫荧光染色观察紫杉醇作用前后 SACC 细胞微管的变化

IBP 是 Gupta 等[7]最近通过酵母双杂交技术从人淋巴结 cDNA 文库中筛选出的一个与 IRF-4 具有结合作用的蛋白,它与钙离子信号转导通路有关,参与细胞骨架重建和免疫突触的形成,并转位于核内参与基因表达的调控。Li 等[8]研究确认 IBP 促进乳腺癌的增殖与侵袭。Zhang 等[9]研究认为 IBP 与直肠癌的发生发展相关。我们前期的工作已确认:IBP 在正常涎腺组织中高表达在涎腺腺样囊性癌中低表达甚至不表达,而且 IBP 的高表达能显著抑制腺样囊性癌细胞的增殖[2]。

为有效提高涎腺腺样囊性癌的治疗效果,本课题研究 IBP 联合紫杉醇对涎腺腺样囊性癌细胞增殖的影响。我们采用临床上治疗 SACC 的常用化疗药物紫杉醇对 IBP 过表达和阴性表达的 ACC2 细胞进行处理。本实验发现,过表达 IBP 的 ACC2 细胞对紫杉醇在一定程度上产生耐药,这说明 IBP 具有促进微管解聚的作用。在做细胞内摄作用的研究中 McGee 等[10]发现,过表达 Rac、Cdc42、RhoG 或 RhoA 等可以在一定程度上逆转药物阻止细胞微管解聚的影响,而 Vav2(一种 GEF 分子)的过表达也可以完全阻止药物对微管解聚的作用,由此我们认定 IBP 也具有相似的作用。

为了进一步研究紫杉醇作用前后 IBP 对 ACC2 细胞微管变化的影响,我们将过表达 IBP 的 ACC2-C1/IBP 细胞及其空白对照 ACC2-C1 细胞爬片,在 5 μg/ml 的紫杉醇工作液作用前后进行微管蛋白 Tubulin 免疫荧光染色,然后利用激光共聚焦显微镜观察。我们发现紫杉醇开始作用后,ACC2-C1 细胞的微管开始点状聚集成团,最后在局部形成一个个的小团块。而 ACC2-C1/IBP 细胞的微管则出现明显的紊乱,微管像一根根断裂开来。我们还发现,IBP 与微管存在一定程度的共定位。这也许可以从另外一个方面解释过表达 IBP 的 ACC2 细胞对紫杉醇耐药:即 IBP 占据了紫杉醇的作用位点,降低了紫杉醇的作用效力。

本研究观察基因治疗联合化学治疗对涎腺腺样囊性癌细胞生长的影响,结果发现紫杉醇联合 IBP 对涎腺腺样囊性癌细胞的生长抑制反而减弱。本研究结果对临床化疗用药的选择提供了实验依据。

参考文献:

[1] Jordan M A, Wendell K, Cardiner S, *et al*. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death[J]. Cancer Res, 1996, 56(4): 816-825.

[2] 熊剑, 简从相, 李鹏, 等. IRF-4 结合蛋白对人涎腺腺样囊性癌细胞增殖的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(6): 554-557.

[3] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 346-348.

[4] Rao S, Krauss N E, Heerding J M, *et al*. 3'-(p-azidobenzamido) taxol photolabels the N-terminal 31 amino acids of beta-tubulin [J]. J Biol Chem, 1994, 269(5): 3132-3134.

[5] 林李嵩, 林国础, 陈万涛, 等. 紫杉醇对腺样囊性癌抗瘤作用及对细胞周期的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2001, 36(6): 416.

[6] 林李嵩, 林国础, 陈万涛, 等. 紫杉醇诱导 ACC 细胞凋亡及与G_2/M 期阻滞关系研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(2): 94-96.

[7] Gupta S, Lee A, Hu C, *et al*. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system[J]. Hum Immunol, 2003, 64(4): 389-401.

[8] Li P, Zhang Z, Wang Q, *et al*. The ectopic expression of IFN regulatory factor 4-binding protein is correlated with the malignant behavior of human breast cancer cells[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(7/8): 1002-1009.

[9] Zhang Z, Wang Q, Li P, *et al*. Overexpression of the Interferon regulatory factor 4-binding protein in human colorectal cancer and its clinical significance[J]. Cancer Epidemiol, 2009, 33(2): 130-136.

[10] McGee K, Holmfeldt P, Fallman M. Microtubule-dependent regulation of Rho GTPases during internalisation of Yersinia pseudotuberculosis[J]. FEBS Lett, 2003, 533(1/3): 35-41.

(**收稿**:2011-11-30;**修回**:2012-01-09)

(编辑　张　维)