肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001315

Connexin 43 对非小细胞肺癌细胞吉非替尼原发性耐药的影响

罗燕妹，骆　敏，滕翠芳，黄国林，覃贵慧，阳　洁
（广西医科大学药学院药理学教研室，南宁 530021）

【摘　要】**目的**：探讨缝隙连接蛋白 43（connexin 43，Cx43）对非小细胞肺癌（non-small-cell lung cancer，NSCLC）吉非替尼原发性耐药的影响。**方法**：MTT 法测定吉非替尼对 3 株非突变型 EGFR（WT-EGFR）NSCLC 细胞系 A549、H1299、Calu3 细胞的半数抑制浓度（IC_{50}）；Western blot 观察 Cx43、磷酸化 Akt（phospho-Akt，p-Akt）蛋白在上述细胞系中的表达水平；“Parachute”法检测细胞缝隙连接功能（gap junction intercellular communication，GJIC）；免疫荧光法检测 Cx43 蛋白在细胞中的定位。**结果**：吉非替尼作用于 Calu3、A549、H1299 细胞的 IC50 分别为（0.064 ± 0.011）μmol/L、（13.64 ± 0.015）μmol/L、（20.054 ± 0.012）μmol/L，即 A549、H1299 细胞对吉非替尼原发性耐药；A549、H1299 细胞中 Cx43、p-Akt 蛋白水平显著高于 Calu3 细胞（$P<0.01$）；A549、H1299 细胞有荧光传递现象，且 Cx43 蛋白定位在 A549、H1299 细胞膜上，而 Calu3 细胞无荧光传递现象，且 Cx43 主要表达于细胞质上。**结论**：NSCLC 细胞膜上调的 Cx43 及其组成的 GJIC 可促进细胞对吉非替尼的原发性耐药，其机制可能与其激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

【关键词】缝隙连接蛋白 43；非小细胞肺癌；PI3K/Akt；吉非替尼；原发性耐药
【中图分类号】R96　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-09-03

Effect of connexin 43 on the primary resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancer cells

Luo Yanmei, Luo Min, Teng Cuifang, Huang Guolin, Qin Guihui, Yang Jie
(*Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Guangxi Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate relationship between connexin 43 (Cx43) expression and non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells with primary resistance to gefitinib. ***Methods***: Gefitinib efficacy in A549, H1299 cells and Calu3 cells was detected by MTT assay. The protein expression of Cx43 and phospho-Akt(p-Akt) was detected by Western blot. The functional gap junction intercellular communication(GJIC) was measured by 'parachute' assay. The cellular localization of Cx43 protein was evaluated by immunofluorescence staining. ***Results***: MTT assay showed that gefitinib cytotoxicity in Calu3 cells is significantly more than that in A549 and H1299 cells with IC_{50} of (0.064 ± 0.011) μmol/L versus (13.64 ± 0.015) μmol/L and (20.054 ± 0.012) μmol/L, indicating that A549 and H1299 cells were primary resistance to gefitinib. Expression of Cx43 in Calu3 cells was significantly lower than that in A549 and H1299 cells ($P<0.01$). Moreover, p-Akt protein in Calu3 cells was obviously lower than that in A549 and H1299 cells ($P<0.01$). Furthermore, functional GJIC was found in A549 and H1299 with or without RA (a well-defined GJIC enhancer) treatment, but not in Calu3 cells. Immunofluorescence staining clearly showed that Cx43 protein deferentially accumulates at the plasma membrane of A549 cells, the plasma membrane and cytoplasm of H1299 cells while the cytoplasm of Calu3 cells. ***Conclusion***: Up-regulation of Cx43 at the plasma membrane and their derived GJIC in A549 and H1299 cells may contribute to the primary resistance to gefitinib by activation of PI3K/Akt signaling pathway.

【Key words】connexin43; non-small-cell lung cancer; PI3K/Akt signaling pathway; gefitinib; primary resistance

作者介绍：罗燕妹，Email：215164727@qq.com，
研究方向：肿瘤转移和耐药。
通信作者：阳　洁，Email：yanglz2005@126.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81260324）；教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助项目（编号：20124503120008）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170622.1114.014.html（2017-06-22）

肺癌是世界上发病率、死亡率均居首位的癌症，其中有 80%为非小细胞肺癌（non-small-cell lung cancer，NSCLC）。吉非替尼是目前临床最常用的一种选择性表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKIs），由于 EGFR 非突变患者对 EGFR-TKIs 的治疗存在原发性耐药，因而吉非替尼的治疗仅限于具有 EGFR 突变的患者[1]，目前其原发性耐药的机制尚不明确。

缝隙连接蛋白（Connexin，Cx）是一个多基因家族表达的保守蛋白，目前人体组织中共发现 21 种 Cx 及相关基因。Cx 分布有一定组织特异性，在肺组织主要表达 Cx26、Cx43[2]。近年来的研究发现，Cx 表达及其形成的缝隙连接通道（gap junction，GJ）异常与肿瘤的发生发展和化疗耐药密切相关。马向东等报道，Cx32、Cx43 蛋白在肝癌细胞中的表达水平及细胞缝隙连接功能（gap junction intercellular communication，GJIC）的显著降低可能与肝癌的发生密切相关[3]；Munoz 等报道，Cx43 的上调及其形成的 GJIC 能够使胶质母细胞瘤细胞 U87 和 T98G 对替莫唑胺产生原发性耐药性[4]。本课题拟在细胞水平上探索 Cx43 及其组成的 GJIC 对 NSCLC 吉非替尼原发性耐药的影响及可能的分子机制，以期了解 Cx43 及其组成的 GJIC 在肿瘤分子靶向药物耐药中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

NSCLC 细胞系 Calu3、A549、H1299 购自美国 ATCC；RPMI-1640 培养基、MEM 培养基、胎牛血清（FBS）、胰酶购自美国 Gibco 公司；MTT、细胞裂解液 RIPA buffer、苯甲基磺酰氟（PMSF）购自美国 Sigma 公司；BCA 蛋白定量试剂盒购自中国天根生化科技有限公司；兔抗人 Cx43 多克隆抗体、兔抗人 β-actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔二抗、IgG H&L（Alexa Fluor® 555）标记的驴抗兔荧光二抗均购自英国 Abcam 公司；兔抗人 Cx43 单克隆抗体（免疫荧光用）购自美国 Santa Cruz 公司；兔抗人 p-Akt（Ser473）、Akt 单克隆抗体购自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 人肺癌 Calu3、A549、H1299 细胞系培养 A549、H1299 细胞和 Calu3 细胞分别用含 10%（V/V）胎牛血清、100KU/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基和 MEM 培养基于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规培养、传代。

1.2.2 MTT 法检测吉非替尼对 NSCLC 细胞的 IC_{50} 取对数生长期的细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板，每孔 100 μL，实验分组为空白组（仅有溶剂对照）、对照组（不加药）、加药组，每组设 3 个复孔，吉非替尼以 0、0.001、0.01、0.1、1.0、10、100 μmol/L 7 个不同浓度作用于细胞，细胞培养 96 h 后，每孔加入 5 mg/L 的噻唑蓝 20 μL，4 h 后吸弃培养液，每孔加入 150 μL DMSO，置摇床振荡 10 min 后，用酶标仪在 570 nm 波长处检测各孔吸光度（absorbance，A）值后计算每个时间点的生存率，以吉非替尼浓度为横坐标、生存率为纵坐标绘制曲线，求出 IC_{50}。

1.2.3 Western blot 检测细胞系中 Cx43 和磷酸化 p-Akt 的表达水平 根据本课题组之前报道的方法[5]，将各组细胞接种在 6 孔板中，待细胞融合度增长至 80%，每孔加入 100 μL 预冷的 RIPA 裂解液（含 PMSF）冰上裂解 5 min，于 4 ℃、12 000 g 条件下离心 30 min 后，取蛋白上清经 BCA 试剂盒测定各组细胞株蛋白样品浓度后，将蛋白样品 30 μg 经 10% SDS-PAGE 凝胶分离后转印到硝酸纤维素（NC）膜上，用 5%脱脂牛奶（TBST 配制）室温封闭 1 h 后，分别加入一抗[兔抗人 Cx43 多克隆抗体 1:500 稀释、兔抗人 p-Akt（Ser473）、Akt 单克隆抗体 1:1 000 稀释，4℃过夜；兔抗人 β-actin（1:10 000 稀释，室温孵育 1 h）]，TBST 洗涤后，分别加入 HRP 标记的羊抗兔二抗（1:500~1:10 000 稀释），TBST 洗涤后，用 ECL 试剂盒暗室发光、显影、定影，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像，并以 β-actin 为内参对各细胞株 Cx43 及以 Akt 为内参对 p-Akt 条带进行灰度分析。

1.2.4 “parachute”荧光示踪法检测 GJIC 根据本实验室已报道的方法[6]，将各组细胞分别与荧光指示剂 calcein AM 共同孵育，使 calcein AM 进入细胞成为“供体细胞（donor cells）”。再将供体细胞接种到已生长融合的相应组 A549、H1299 和 Calu3 细胞（接受细胞，receiver cells），培养 4 h。加入 GJIC 增强剂 RA 10 μmol/L 处理相应组 A549、H1299 和 Calu3 细胞 24 h 后，用 PBS 洗涤 3 次，将细胞分别与荧光指示剂 calcein AM 共同孵育并接种到相应的接受细胞上。待形成稳定的 GJ 后，小分子的 calcein AM（发绿色荧光）就能通过 GJ 进入相邻的供体细胞。用荧光显微镜观察、计数一个供体细胞周围含有 calcein AM 的供体细胞数目，作为 GJIC 的指标。

1.2.5 免疫荧光法检测 Cx43 在细胞中的蛋白定位 根据报道方法[7]，将细胞接种在盖玻片上 24 h 后，用 4 ℃预冷的甲醇固定 10 min，2%牛血清白蛋白室温封闭 30 min，经兔抗人 Cx43 多克隆抗体（1:50，PBS 稀释）4℃孵育过夜后，用驴抗兔二抗（1:200，PBS 稀释）于室温孵育 1 h，接着用 4’，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）复染。激光共聚焦扫描荧光显微镜（Nikon A1，Tokyo，Japan）采集成像，并用 NIS-Elements 软件进行分析。

1.2.6 RT-PCR 检测细胞系中 Cx43 的表达情况 按照试剂说明书，从 A549、H1299 和 Calu3 细胞提取总 RNA 并反转录成 cDNA，RT-PCR 检测 Cx43 的 mRNA 表达水平。扩增 Cx43 及 GAPDH 的上游引物和下游引物分别为：5’-AGGAGTT-CAATCACTTGGCG-3’（正义链）和 5’-GCAGGATTCGGAAA-ATGAAA-3’（反义链）、5’-AGCCACATCGCTCAGACA-3’（正义链）和 5’-GCCCAATACGACCAAATCC-3’（反义链）；反应条件为：95 ℃ 5 min；94 ℃ 45 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，30 个循环；72 ℃ 5 min。用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法计算各组的 mRNA 相对表达量。

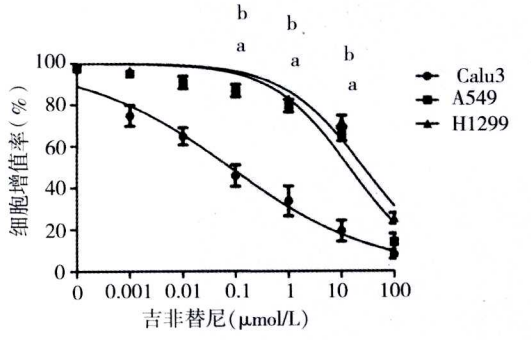
1.3 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理，组间差异比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 A549、H1299、Calu3 细胞对吉非替尼的敏感性

本实验通过 MTT 法检测 NSCLC 细胞对吉非替尼的敏感性。结果如图 1 所示，吉非替尼作用于 Calu3 细胞的 IC_{50} 为（0.064 ± 0.011）μmol/L（<1.0 μmol/L），作用于 A549、H1299 细胞的 IC_{50} 分别为（13.640 ± 0.015）μmol/L、（20.054 ± 0.012）μmol/L。根据文献[8]报道，吉非替尼作用于细胞的 IC_{50}≥10 μmol/L 为原发性耐药，因此，Calu3 细胞为吉非替尼敏感株，A549、H1299 细胞吉非替尼原发性耐药株。



a：A549 与 Calu3 比较，P<0.01；b：H1299 与 Calu3 比较，P<0.01

图 1 吉非替尼对 Calu3 和 A549、H1299 细胞的 IC_{50}（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.1 Gefitinib efficacy for Calu3, A549 and H1299 cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)

2.2 A549、H1299、Calu3 细胞中 Cx43 及 p-Akt 的蛋白表达情况

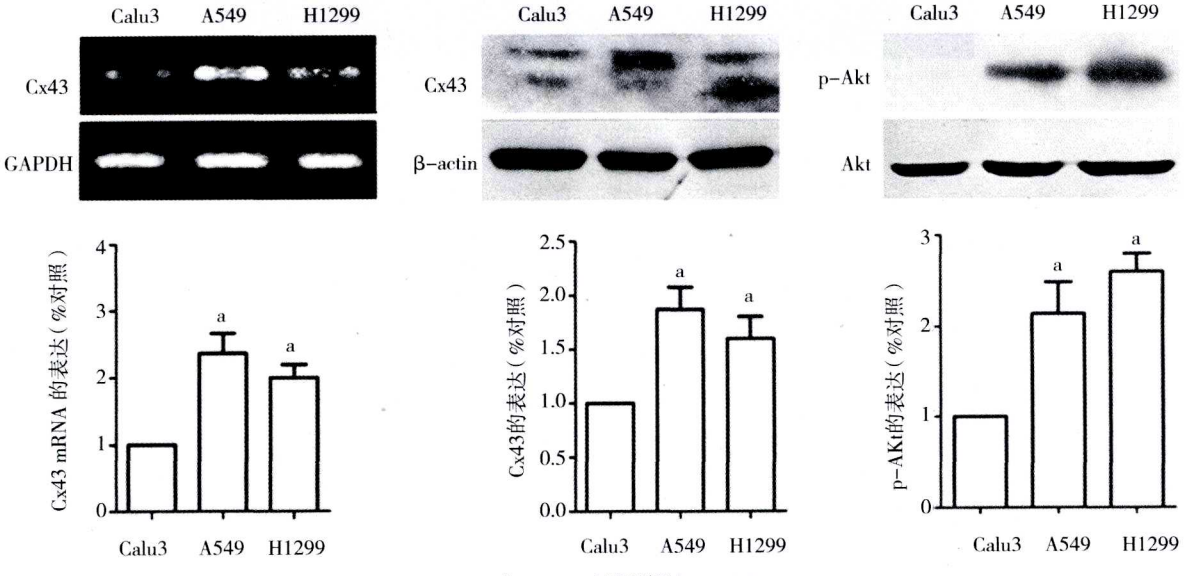
为研究 Cx43、p-Akt 蛋白与吉非替尼原发性耐药的关系，采用 Western blot 法检测不同吉非替尼敏感性细胞株中的 Cx43 及 p-Akt 蛋白表达水平，结果如图 2 所示。Cx43 及 p-Akt 在 A549、H1299 细胞中的表达量均明显高于 Calu3 细胞的表达（P<0.01），说明吉非替尼原发性耐药的 A549、H1299 细胞 Cx43 的高表达可能与 PI3K/Akt 信号通路的激活有关。

2.3 “parachute”法检测细胞的 GJIC

为研究 Cx43 组成的 GJIC 是否参与 NSCLC 细胞吉非替尼原发性耐药，采用 parachute 法检测 A549、H1299、Calu3 的 GJIC。结果如图 3 所示，A549、H1299 细胞中检测到荧光传递，而 Calu3 细胞中未检测到荧光传递。为排除有难以检测到的 GJIC 的存在，进一步用 GJIC 增强剂 RA 处理（10 μmol/L，24 h）上述细胞，A549、H1299 细胞中检测到荧光传递增强，Calu3 细胞仍未检测到荧光传递，表明 A549、H1299 细胞中存在 GJIC，但 Calu3 细胞中 GJIC 缺失，GJIC 有可能参与 A549、H1299 细胞对吉非替尼的原发性耐药。

2.4 免疫荧光法检测 Cx43 蛋白定位

为检测 Cx43 在细胞中的定位，采用免疫荧光法对 Cx43 在细胞中的表达定位进行检测，结果如图 4 所示。绿色荧光为 Cx43 蛋白，蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核，Cx43 在A549 中主要表达在细胞膜上，在 H1299 中主要表达在细胞膜和细胞质上，在 Calu3 中则主要表达在细胞质上，说明 A549、H1299 细胞中膜定位的 Cx43 是其 GJIC 存在的原因。



a：与 Calu3 对照组相比，P<0.01

图 2 Cx43、p-Akt 在 A549、H1299、Calu3 细胞中的表达水平（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.2 mRNA and protein expression level of Cx43 and p-Akt in A549, H1299 and Calu3 cells were detected by Western blot ($\bar{x} \pm s$, n=3)

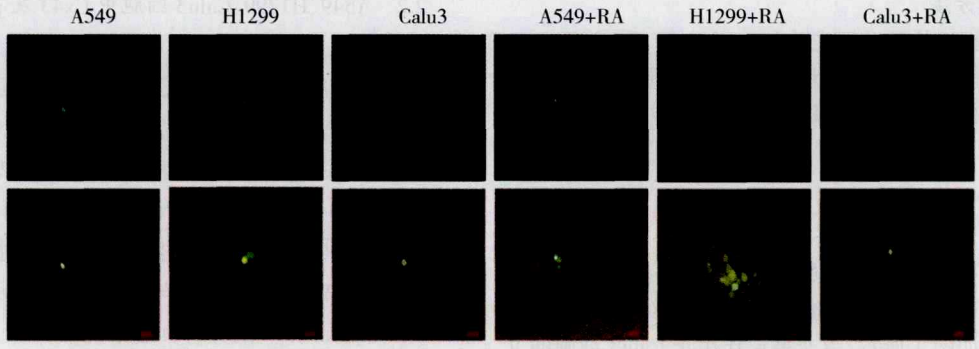


图 3 A549、H1299、Calu3 及加 GJIC 增强剂 RA（10 μmol/L，24 h）的 GJ 功能检测（n=3，200×）

Fig.3 Functional detection of GJIC by parachute assay（n=3，200×）

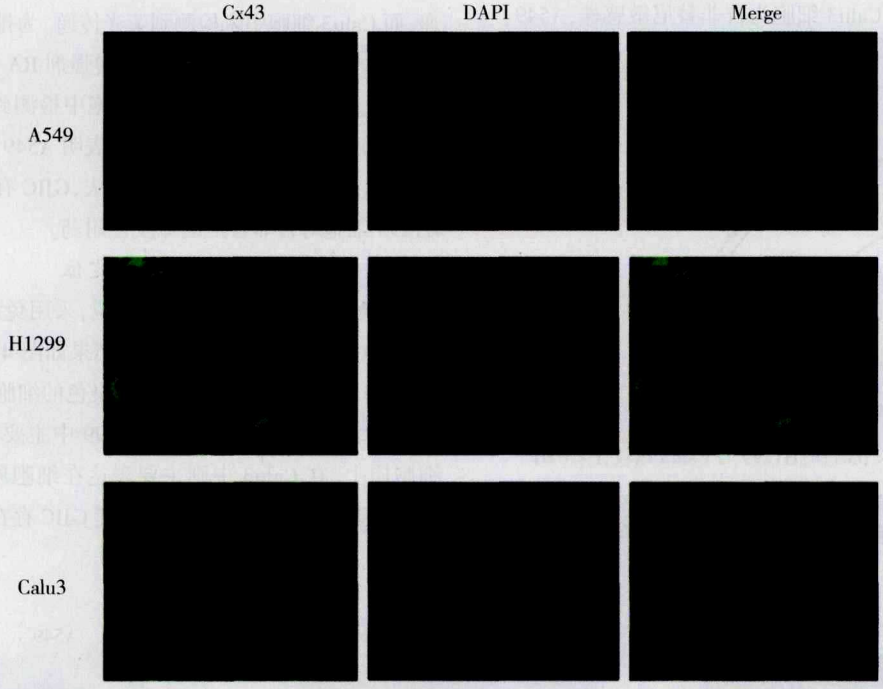


图 4 A549、H1299、Calu3 的 Cx43 蛋白定位

Fig.4 Immunofluorescence staining of the cellular localization of Cx43

3 讨 论

随着分子靶向治疗药物的发展，以吉非替尼和厄洛替尼为代表的 EGFR-TKIs 在治疗非小细胞肺癌中发挥了重要作用，然而在临床前和临床研究中发现许多患者对此类药物存在原发性耐药，即肿瘤在治疗初期就对 TKIs 治疗无明显反应，应用该药物治疗后病情未得到缓解，临床未明显获益[9]。目前对 EGFR-TKIs 原发性耐药的机制研究较少，主要集中在突变机制：如 EGFR 20 外显子插入突变[10]、KRAS 突变[11]、EML4-AKT 基因重排[12]等。值得注意的是，EGFR-TKIs 原发性耐药也可能与非突变机制有关，例如，Engelman 等[13]研究发现，EGFR-TKIs 原发性耐药与 Met 激活，进而激活 HER-3 并活化其下游的 PI3K/AKT/mTOR 途径有关。然而，到目前为止，EGFR-TKIs 原发性耐药的机制仍未阐明。

许多研究发现，Cx 及其组成的 GJIC 异常与肿瘤的不良预后和化疗耐药有关。Carystinos 等[14]报道，Cx43 的表达及其 GJIC 的上调增强了神经母细胞瘤 IMR-32 细胞对化疗药物阿霉素、美法仑和卡氮芥的敏感性。但 Gielen 等[15]报道，Cx43 可独立于 GJIC 通过诱导线粒体凋亡导致人脑胶质瘤细胞对替莫唑胺的耐药。最近的研究发现，不依赖于 GJIC，Cx26本身可与 PI3K/Akt 相互激活从而诱导 EMT 促进NSCLC 对吉非替尼的耐药[7]。本研究中，吉非替尼原发性耐

药细胞株 A549、H1299 中 Cx43 蛋白水平明显增高，并且在这 2 种细胞株中存在较强的 GJIC，而在吉非替尼敏感细胞株 Calu3 中 Cx43 表达下调且 GJIC 缺失。免疫荧光定位发现 Cx43 蛋白在A549 中主要在细胞膜上表达，在 H1299 中主要在细胞膜和细胞质中表达，在 Calu3 中则主要在细胞质中表达。这些结果提示，A549、H1299 细胞膜上 Cx43 表达的上调及其介导的 GJIC 可能促进 NSCLC 对吉非替尼的原发性耐药。

PI3K/Akt 通路是表皮生长因子受体信号传导中重要的一个通路，该通路的异常激活是化疗药耐药的原因之一[16]。而在人类的大多数肿瘤中，多种蛋白质表达的失衡会导致 PI3K/Akt 通路的失调[17]。Ishikawa 报道，在心肌细胞中 Cx43 蛋白可能作为激活 PI3K/Akt 信号通路的辅助因子[18]。也有研究表明[19]，多发性骨髓瘤干细胞中诱导微环境重塑可能是与 Cx43 形成的 GJIC 激活 MAPK/ERK 信号通路有关。Maseki 等[20]报道，头颈部鳞状细胞癌对吉非替尼的耐药性依赖于 PI3K/Akt 通路的激活。本研究中发现，在吉非替尼原发性耐药细胞 A549、H1299 中，活化的 p-Akt 蛋白表达量显著增加。该实验结果提示，Cx43 和其介导的 GJIC 可能激活了 PI3K/Akt 信号通路，从而促进 NSCLC 细胞对吉非替尼的原发性耐药。

综上所述，Cx43 和其组成的 GJIC 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路从而促进 NSCLC 细胞对吉非替尼的原发性耐药。这一发现揭示了 Cx43 在肿瘤分子靶向药物原发性耐药中的新角色，但 Cx43 及 GJIC 激活 PI3K/Akt 信号通路的具体机制还需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Yoshida K, Yatabe Y, Park JY, et al. Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2007, 2(1): 22-28.

[2] Leithe E, Sirnes S, Omori Y, et al. Downregulation of gap junctions in cancer cells[J]. Crit Rev Oncog, 2006, 12(3-4): 225-256.

[3] 马向东，马 兴，隋延仿，等. 肝癌细胞中 connexin32，connexin43 的表达及其与间隙连接通讯功能的相关性[J]. 临床与实验病理学杂志，2002，18(2)：189-192.

[4] Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Greco SJ, et al. Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(3): e1145.

[5] 阳 洁，覃贵慧，陈军泽. 慢病毒靶向干扰 Cx26 抑制人高转移性肝癌 HCCLM3 细胞增殖及迁移[J]. 中国药理学通报，2014，30(7)：937-941.

[6] 郑素平，洪晓婷，王 琴，等. 以 siRNA 表达载体稳定抑制缝隙连接蛋白 43 表达的睾丸间质细胞和睾丸支持细胞系的建立[J]. 中国药理学通报，2010，26(10)：1285-1289.

[7] Yang J, Qin G, Luo M, et al. Reciprocal positive regulation between Cx26 and PI3K/Akt pathway confers acquired gefitinib resistance in NSCLC cells via GJIC-independent induction of EMT[J]. Cell death & disease, 2015, 6(7): e1829.

[8] Li H, Schmid-Bindert G, Wang D, et al. Blocking the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways can overcome gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines[J]. Advances in medical sciences, 2011, 56(2): 275-284.

[9] 李 媛，宋丽华. 非小细胞肺癌分子靶向治疗中 EGFR-TKI 的耐药机制研究进展[J]. 中国肺癌杂志，2012，15(2)：106-111.

[10] Greulich H, Chen TH, Feng W, et al. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and-resistant EGFR mutants[J]. PLoS Med, 2005, 2(11): e313.

[11] Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, et al. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2009, 6(6): 352-366.

[12] Pallis A, Briasoulis E, Linardou H, et al. Mechanisms of resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small-cell lung cancer: clinical and molecular considerations[J]. Current Medicinal Chemistry, 2011, 18(11): 1613-1628.

[13] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. Science, 2007, 316(5827): 1039-1043.

[14] Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA, Phipps J, et al. Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2001, 47(2): 126-132.

[15] Gielen PR, Aftab Q, Ma N, et al. Connexin43 confers Temozolomide resistance in human glioma cells by modulating the mitochondrial apoptosis pathway[J]. Neuropharmacology, 2013, 75: 539-548.

[16] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-4751.

[17] Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme[J]. Oncogene, 2008, 27(41): 5497-5510.

[18] Ishikawa S, Kuno A, Tanno M, et al. Role of connexin-43 in protective PI3K-Akt-GSK-3β signaling in cardiomyocytes[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2012, 302(12): H2536-H2544.

[19] 王子妍. Cx43 及其组成的 GJIC 在多发性骨髓瘤干细胞与微环境相互影响中的作用及机制研究[D]. 苏州：苏州大学，2014.

[20] Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, et al. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3β/snail signalling pathway[J]. British Journal of Cancer, 2012, 106(6): 1196-1204.

（责任编辑：张辉洁）