DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.004
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2185-03

论著

不同培养方式中肺腺癌细胞系A549表达E-钙粘素的差异及其意义

黄海辉,胡绍毅,边志衡,何建明,梁后杰 (第三军医大学西南医院肿瘤科,重庆 400038)

提 要:目的 初步探讨E-钙粘素在肿瘤群集耐药中的可能机制。方法 采用旋转培养瓶结合台式水浴恒温振荡器旋转培养的方法,进行肺腺癌细胞A549体外立体培养,同时进行普通平面培养,通过流式细胞技术、Western blot、原位细胞凋亡检测试剂盒、四唑盐(MTT)比色法及血球计数器计数法检测细胞周期,E-钙粘素的表达,细胞凋亡率及对阿霉素(ADM)敏感性。结果 ①立体培养细胞存在E-钙粘素的高表达;②同平面培养比较,立体培养细胞出现细胞周期G_1期阻滞、细胞凋亡率低、对ADM敏感性低等表现,给予E-钙粘素阻滞剂SHE78-7后,两者差异明显缩小。结论 E-钙粘素介导的细胞-细胞粘附作用可通过调控细胞周期以及细胞凋亡,影响肺腺癌A549细胞对ADM的敏感性,在肿瘤群集耐药中发挥作用。

关键词:肺腺癌细胞系A549;E-钙粘素;细胞周期;细胞凋亡;群集耐药
中图法分类号:R329.25;R730.2;R734.2 文献标识码:A

Differences in E-cadherin expression of lung adenocarcinoma cell line A549 under different culture conditions and the related significance

HUANG Hai-hui, HU Shao-yi, BIAN Zhi-heng, HE Jian-ming, LIANG Hou-jie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of E-cadherin on multicellular resistance of lung adenocarcinoma cell line A549. Methods Three dimensional culture of A549 cells was achieved using rotatable culture bottle and desk-top water bath shake. Flow cytometry, Western blot, *in situ* cell apoptosis detecting kit, MTT, and blood cell counter were employed to detect the expression of E-cadherin, cell apoptosis, and susceptibility to ADM of A549 cells under different culture conditions. Results Compared with cells of two dimensional culture system (2D system), higher E-cadherin expression was observed in cells of three dimensional culture system (3D system), and G_1 phase arrest, lower cell apoptosis rate, and decreased susceptibility to ADM were found in cells of 3D system. The differences diminished significantly after using SHE78-7 as the blocker of E-cadherin. Conclusion E-cadherin-mediated enhancement of intercellular adherence can function in multicellular resistance of lung adenocarcinoma A549 cells through influencing cell cycle, apoptosis, and susceptibility to ADM.

Key words: lung adenocarcinoma cell line A549; E-cadherin; cell cycle; cell apoptosis; multicellular resistance

尽管许多年前人们已经观察到细胞与细胞的相互接触可导致细胞生物学行为明显改变和对治疗反应的显著不同[1],但直到近年来细胞-细胞相互作用与耐药的关系才引起人们的重视。20世纪90年代人们发现体内耐药的实体性肿瘤细胞,在体外经普通平面培养后失去其耐药表型,表现为对药物敏感,将其进行立体培养后仍表现出耐药特性,这种耐药现象被称之为"多细胞耐药"(multicellular resistance, MR)或"群集耐药"[2]。这种耐药性的产生有赖于实体瘤三维立体的空间结构,存在着大量的细胞-细胞相互作用。E-钙粘素(E-cad)主要介导同型细胞间的粘附作用,应该在其中发挥重要作用。目前国内少见有关肿瘤群集耐药的相关研究,有必要对E-钙粘素介导的细胞粘附对肿瘤群集耐药的影响及其可能机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

所采用肺腺癌A549细胞株引自第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171067)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30171067)
作者简介:黄海辉(1971-),男,福建省龙岩市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤放化疗方面的研究。电话:(023)68765194, E-mail: hhhcc@mail.tmmu.com.cn
通信作者:梁后杰,电话:(023)68754128
收稿日期:2004-03-19;修回日期:2004-11-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

主要仪器及试剂：Spinner flask（Bellcoglass）；Cultispher-s（球型载体）（Hyclone）；E-钙粘素兔抗人多克隆抗体、生物素化小鼠抗兔-IgG（Santa cruze）；E-钙粘素阻滞剂 SHE78-7（Calbiochem）；原位细胞凋亡检测试剂盒（北京中山生物技术有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 共分4组：平面培养组（2D system，2D），立体培养组（3D system，3D），平面培养＋SHE78-7组（2D＋SHE），立体培养＋SHE78-7组（3D＋SHE）。

1.2.2 细胞培养模型的建立

肺腺癌A549细胞平面培养（2D）采用普通贴壁细胞培养方法。肺腺癌A549细胞立体培养（3D）采用旋转培养瓶结合台式水浴恒温振荡器旋转培养的方法[3]。

1.2.3 细胞周期检测 采用流式细胞技术。

1.2.4 细胞凋亡检测 参照原位细胞凋亡试剂盒说明书（在分组前进行细胞计数，以保证每组细胞数基本一致）。凋亡率＝凋亡细胞数/同视野细胞总数×100%。

1.2.5 E-钙粘素表达 采用Western blot技术，蛋白含量以条带的OD值×面积（Int×mm^2）表示。

1.2.6 ADM敏感性检测 ①平面培养细胞采用MTT法，以ADM浓度为横轴，细胞存活率为纵轴绘制生长曲线，并求出IC_{50}值（细胞存活率＝不同浓度ADM组光吸收值/未加ADM组光吸收值×100%）。②立体培养细胞采用血球计数器计数法。立体细胞培养模型建立后，加入不同浓度ADM（0、0.001、0.01、0.1、1、10 μg/ml），继续培养2 d后，进行消化处理，制备成单细胞悬液，置于离心管中，室温，1 000 r/min离心4 min后弃上清，加入0.01 mol/L PBS 1 ml，吹打成单细胞悬液，用微量移液器吸取7 μl单细胞悬液于血球计数器上，镜下进行细胞计数，以ADM浓度为横轴，细胞存活率为纵轴绘制生长曲线，取不同阿霉素浓度下的细胞存活百分数的均值，用Excel作浓度-存活百分数的分布拟合曲线，根据分布拟合曲线计算出在细胞存活百分数为50%的条件下的药物浓度，即为其对ADM IC_{50}值。细胞存活率＝不同浓度ADM组存活细胞数/未加ADM组存活细胞数×100%。

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用SPSS10.0软件处理，用 t 检验比较两组均数间相差的显著性，单因素方差分析比较多组均数间的差异。

2 结果

2.1 E-cad的表达

在体外立体培养条件下，同平面培养比较，存在着E-cad的高表达，平面培养组和立体培养组的蛋白表达量分别为（3 783.282±124.461）Int×mm^2及（5 222.592±183.353）Int×mm^2，两者存在非常显著的差异（$P<0.01$）（图1）。



1：Expression in 2D；2：Expression in 3D

图1 E-cad在不同培养条件下的表达情况

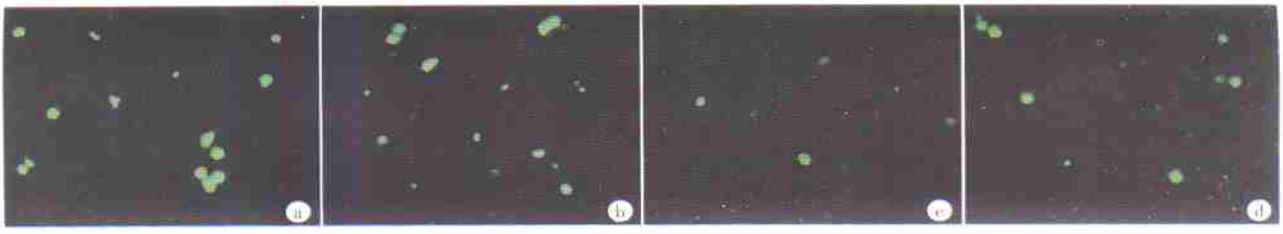
Fig 1 Expressions of E-cadherin under different culture conditions

2.2 细胞周期

平面培养组与平面培养＋SHE78-7组的细胞周期均未出现明显阻滞现象，G_1期细胞百分比分别为（45.72±2.75）%和（44.20±3.48）%，两者无显著差异（$P>0.05$）；立体培养组可见明显的G_1期阻滞现象[G_1期细胞百分比为（75.74±6.68）%]，立体培养＋SHE78-7组的G_1期阻滞现象明显改善[G_1期细胞百分比为（61.72±2.86）%]，两者间存在非常显著差异（$P<0.01$）；平面培养组与立体培养组的G_1期细胞百分比差异非常显著（$P<0.01$），在加入SHE78-7后，立体培养与平面培养G_1期细胞百分比差异明显缩小。

2.3 细胞凋亡

平面培养组与平面培养＋SHE78-7组的细胞凋亡率分别为（18.78±2.47）%和（19.14±2.37）%，两者无显著差异（$P>0.05$）；立体培养组的凋亡率为（7.84±1.65）%，明显低于平面培养组，两者差异非常显著（$P<0.01$）；立体培养＋SHE78-7组的凋亡率为（13.59±1.13）%，明显高于立体培养组（$P<0.01$），与平面培养组的差异缩小（图2）。



a：2D group；b：2D＋SHE group；c：3D group；d：3D＋SHE group

图2 不同培养条件下细胞凋亡情况 （荧光显微镜×200）

Fig 2 Cell apoptosis under different culture conditions (fluorescence microscope×200)

2.4 药物敏感性检测

各组细胞的生长曲线见图3，平面培养组、平面培养＋SHE78-7组、立体培养组及立体培养＋SHE78-7组的IC_{50}值分别为：0.09、0.08、0.19 μg/ml及0.12 μg/ml。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

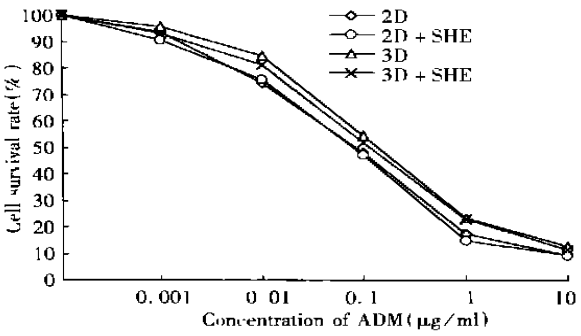


图 3　不同培养条件下的细胞生长曲线

Fig 3　Cell growth curves under different culture conditions

以最接近 IC_{50} 值的 ADM 浓度(0.1 μg/ml)为基准, 比较各组间药物敏感性的差异, 细胞存活率越高表示药物敏感性越低。结果显示平面培养组与平面培养+SHE78-7 组的细胞存活率分别为(47.97±1.45)%和(47.03±1.32)%, 两者间无显著差异($P>0.05$); 立体培养组与立体培养+SHE78-7 组的细胞存活率分别为(54.53±1.50)%和(51.99±1.37)%, 两者间存在非常显著的差异($P<0.01$); 立体培养组与平面培养组的细胞存活率同样存在非常显著的差异($P<0.01$)。表明立体培养细胞的药物敏感性明显降低于平面培养细胞, 在给予 SHE78-7 后, 细胞存活率下降, 药物敏感性提高($P<0.01$)。

3　讨论

目前已有研究表明, 这种群集耐药现象不是获得性耐药, 而是其本身所具有的[4], 主要与实体瘤三维立体结构中细胞-细胞或细胞-基质的相互作用所致的整个细胞群体的耐药表型改变有关[5], 这种三维立体的球型结构有利于细胞生存[6]。

E-cad 是粘附分子中钙粘素家族的重要成员, 主要介导同型细胞间的相互粘附。E-cad 是一种钙依赖性的跨膜糖蛋白, 主要表达于细胞膜上, 由细胞外肽段、跨膜区和相对较小的细胞内肽段组成, 细胞外肽段通过 HAV 序列识别和介导细胞间的相互粘附, 细胞内肽段通过连结蛋白(catenin)与细胞骨架连结。E-cad 的结构表明其在维持细胞间的粘附作用及维系细胞自身结构与功能方面具有重要作用。E-cad 还可参与一些信号转导途径, 如 NF-κB、MAPK 等, 调节细胞的生物学特性[7]。

实体瘤的结构为: 外部 3~5 层细胞处于正常增殖状态, 内部大部分细胞处于增殖阻滞或静止状态, 其中心为坏死的细胞。当大量细胞处于增殖阻滞状态时, 不但造成化疗药物失去大部分作用靶点, 而且使细胞有充裕的时间来修复因化疗药物作用造成的 DNA 损伤。表明细胞周期阻滞现象与肿瘤细胞的耐药性有密切关系[8]。

凋亡是一个细胞的主动死亡过程, 在正常情况下, 机体可通过诱导凋亡来清除受损或无生理意义的细胞, 有利于机体环境的稳定, 而在肿瘤中, 肿瘤细胞却可通过抑制凋亡来实现自我保护, 以利于生存。ADM 等化疗药物除直接杀伤肿瘤细胞外, 还可通过诱导肿瘤细胞进入凋亡程序, 以达到消灭肿瘤细胞的目的, 因此细胞凋亡能力可直接影响化疗药物的效应[9,10]。肿瘤细胞可通过抑制进入凋亡程序, 从而表现出对化疗药物的耐受性, 是肿瘤细胞所具有的自我保护功能之一。

由于平面培养细胞为贴壁生长而立体培养细胞为有载体支撑悬浮生长, 因此在比较两者药物敏感性时分别采用 MTT 法及血球计数器计数法, 在保证两种培养条件下各组间细胞数基本一致, 根据各组存活细胞百分比均值所绘制的两条生长曲线具有可比性。本研究通过建立体外三维立体细胞培养模型, 模拟实体瘤的体内情况, 发现立体培养细胞存在 E-cad 的高表达, 细胞周期的 G_1 期阻滞现象, 细胞凋亡率低以及对化疗药物 ADM 的敏感性低等特征, 经抗粘附处理后, 上述现象可发生明显改变, 与平面培养细胞的差异性明显缩小, 药物敏感性恢复。表明粘附分子(E-cad)可通过调控细胞周期及细胞凋亡来影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 可能是实体瘤产生群集耐药的机制之一。

参考文献:

[1] Han E K, Tahir S K, Cherian S P, *et al*. Modulation of paclitaxel resistance by annexin Ⅳ in human cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 2000, 83(1): 83-88.

[2] Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance[J]? Crit Rev Oncol Hematol, 2000, 36(2-3): 193-207.

[3] 何建明, 梁后杰, 边志衡, 等. 肺腺癌细胞株体外三维培养模型的建立及其药物敏感性的观察[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(8): 704-706.

[4] Frankel A, Man S, Elliott P, *et al*. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(9): 3719-3728.

[5] Taylor S T, Hickman J A, Dive C. Epigenetic determinants of resistance of etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(1): 18-23.

[6] Bates R C, Edwards N S, Yates J D. Spheroids and cell survival[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2000, 36(2-3): 61-74.

[7] Mayo M W, Baldwin A S. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1470(2): M55-62.

[8] Mueller S, Cadenas E, Schonthal AH. p21WAF1 regulates anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression[J]. Cancer Res, 2000, 60(1): 156-163.

[9] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 第 2 版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000. 461.

[10] Ogiso Y, Tomida A, Lei S, *et al*. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase Ⅱ-directed drugs[J]. Cancer Res, 2000, 60(9): 2429-2434.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net