DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.003
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2182 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)24-2182-03

细胞间粘附在肺腺癌细胞株A549群集耐药中作用探讨

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

提 要:目的 检测肺腺癌细胞株A549单层培养与三维培养时对阿霉素(adriamycin, ADM)药物敏感性的差异,并探讨细胞间粘附在肺腺癌群集耐药(multicellular drug resistance)中可能的作用机制。方法 以多细胞球(multicellular spheroids, MCSs)为模型,比较MCSs与单层细胞(monolayer cells, MCs)对ADM药物敏感性的差异。透射电镜观察细胞超微结构。间接免疫荧光法流式细胞术检测Bcl-2, Bcl-xl, Bax的表达。结果 MCSs由多层细胞组成,细胞间粘附广泛而紧密;可见镶嵌连接。与MCs相比,MCSs的药物敏感性显著减弱。MCSs的Bcl-2, Bcl-xL表达量显著高于MCs, ADM处理后表达显著升高。结论 MCSs能够较好地模拟体内实体瘤的细胞间粘附,具有群集耐药性;其机制可能与Bcl-xL, Bcl-2高表达相关。

关键词:肿瘤;耐药
中图法分类号:R73-354; R734.2; R915 文献标识码:A

Mechanisms of cell-cell adhesion dependent multicellular drug resistance of pulmonary adenocarcinoma cell line A549

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

Abstract: Objective To study the mechanism of multicellular drug resistance of pulmonary adenocarcinoma cell line A549 mediated by cell-cell adhesion. Methods We compared the sensitivity of monolayer cells (MCs) to adriamycin (ADM) with that of multicellular spheroids (MCSs) which was employed as a three dimensional cell culture model. Transmission electron microscopy was applied to observe the cellular ultrastructure. Bcl-2, Bcl-xL, and Bax expression levels were detected by flow cytometry and indirect immunofluorescent staining. Results Compared with MCs, MCSs had more than two layers of cells, more extensive and compact cell adhesion, and inlay junctions were found within them. MCSs were more resistant to ADM. At the same time, Bcl-2 and Bcl-xL expressions in MCSs were much higher. After treatment with ADM, expressions Bcl-2 and Bcl-xL increased markedly in MCSs. Conclusion MCSs could simulate the solid tumors *in vivo* and has multicellular drug resistance mediated by cell-cell adhesion. The possible mechanisms may be associated with the upregulation of Bcl-2 and Bcl-xL.

Key words: neoplasm; drug resistance

肿瘤耐药是影响化疗疗效的主要原因之一。既往对化疗药物及肿瘤耐药的研究,多采用单层培养的肿瘤细胞模型,由此得到的结果与临床常有很大的差距。究其原因,可能与体内实体瘤是一个三维结构的细胞群体,细胞间相互接触、粘附,从而具有因细胞间直接作用而产生的特异性信息传递的性质相关。实验证明,从小鼠体内得到的具有多药耐药性的肿瘤细胞在体外单层培养时,多药耐药性消失,而在三维细胞培养时又恢复多药耐药性。这种单层细胞所不能模拟的耐药现象,被称为群集耐药[1]。在对体内实体瘤的研究中发现,用透明质酸酶使肿瘤细胞间粘附松散,可以显著抑制肿瘤的群集耐药[2],证明细胞间粘附是体内实体瘤群集耐药的重要结构基础。本实验检测肺腺癌细胞株A549多细胞球群集耐药性,并初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞株A549(第三军医大学新桥医院全军呼吸内

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:何建明(1976-),男,安徽省安庆市人,博士研究生,医师,主要从事肿瘤耐药方面的研究。电话:(023)65399027, E-mail: hejm76@hotmail.com
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

科研究所提供); 精制小牛血清、RPMI1640、CultiSpher, HyClone 公司; Spinner flask、低速磁力搅拌器, Bellcoglass 公司; MTT、DMSO, Sigma 公司; Bcl-2 rabbit IgG、Bcl-xL rabbit IgG、Bax rabbit IgG、Goat anti rabbit IgG-FITC, 博士德公司。

1.2　细胞培养

单层细胞(monolayer cells, MCs)以含 1×10^5 U/L 青霉素、1×10^5 U/L 链霉素、100 ml/L 精制小牛血清的 RPMI1640 为培养液, 在 37 ℃, 5% CO_2, 饱和湿度条件下培养。多细胞球(multicellular spheroids, MCSs)培养则先将载体 CultiSpher 用 PBS 浸泡后高压蒸汽灭菌, PBS 再次浸泡, 培养液浸泡 2 次。Spinner flask 高压蒸汽灭菌, 20 g/L 琼脂糖铺底。然后按照细胞数∶CultiSpher(mg)∶培养液(ml)为(3×10^6)∶10∶5 将三者放入 spinner flask 中, 间断搅拌培养。24 h 后, 弃去大部分培养液, 加培养液至培养液(ml)∶CultiSpher(mg)为 1∶1。持续搅拌培养。

1.3　细胞超微结构的检测

MCs: 将细胞培养至盖玻片上, 2.5% 戊二醛固定, 原位包埋, 制片, TECNAI10 透射电镜观察。MCSs: 取培养 6 d 的 MCSs, 2.5% 戊二醛固定, 常规制片后, TECNAI10 透射电镜观察。

1.4　药物敏感性的检测

MCs: 待 96 孔板中细胞铺满培养板底的 60% 左右, 按梯度浓度(1, 0.1, 0.01, 0.001, 0 mg/L)加入阿霉素(adriamycin, ADM)。继续培养 24 h。MTT 法检测生长分数, 绘制药物浓度与生长分数曲线。MCSs: 药物处理同 MCs; 细胞计数法检测生长分数, 绘制药物浓度与生长分数曲线。

1.5　相关蛋白的检测

分为 A 组(MCs 空白对照组); B 组(MCs 药物处理组); C 组(MCSs 空白对照组); D 组(MCSs 药物处理组)。待 MCs 长满 60%～70%、MCSs 培养至第 5 天, 在 B 组、D 组加入 ADM(终浓度为 0.08 mg/L), 继续培养 24 h。2.5 g/L 胰酶、0.2 g/L EDTA 的消化液收获细胞。40 g/L 多聚甲醛固定 20 min, 1 ml/L Triton X-100/PBS(内含 1 g/L BSA) 4 ℃作用 7 min。一抗 37 ℃, 30 min。FITC 标记的二抗 37 ℃, 30 min。FACS Calibur 流式细胞仪检测并分析 Bcl-xL、Bcl-2 和 Bax 结果。

1.6　统计学处理

以 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析, 比较同一浓度下不同组之间的生存分数。

2　结果

2.1　MCSs 光镜及扫描电镜下的观察

光镜下可见 MCSs 由数层细胞构成, 表面细胞呈球形, 透明, 折光性好。扫描电镜下可见 MCSs 表面存在大量细胞, 细胞相互粘附, 聚集成球形(图 1)。

2.2　MCSs 与 MCs 透射电镜下的观察

MCSs: 细胞间有广泛的细胞粘附, 接触部可见细胞膜增厚; 部分可见镶嵌连接, 连接部胞膜增厚, 局部有点状突起, 形成数个纽扣样结构; 内质网、线粒体丰富(图 2)。MCs: 大部分细胞呈单个分布, 与周边的细胞无明显的粘附, 偶见有细胞间粘附者, 其接触部位未见细胞膜增厚和明确的细胞连接, 内质网、线粒体少。



图 1　MCSs 6 d (相差显微镜× 200)

Fig 1　MCSs at 6 d (phase contrast× 200)



A: Inlay junction of MCSs (Arrow) (TEM × 10 000);
B: Rich organells of MCSs (TEM × 4 000)

图 2　MCSs 超微结构

Fig 2　Microstucture of MCSs

2.3　MCSs 与 MCs 药物敏感性的检测

MCSs 药物敏感性显著下降, 半数抑制浓度(IC_{50})由 MCs 的 0.10 mg/L 上升至 0.18 mg/L; 二者在 0.1 mg/L 浓度下生存分数有显著性差异($P<0.01$), MCSs 的生存分数由 MCs 的 0.502 0±0.062 上升至 0.626 6±0.066。

2.4　Bcl-xL、Bcl-2 和 Bax 的表达

Bcl-2、Bcl-xL 在 MCSs 中的表达明显高于 MCs; 药物处理后, Bcl-2、Bcl-xL 表达升高, 尤以 MCSs 显著。Bax 在 MCSs 中的表达高于 MCs; 药物处理后, 其表达有所升高(表 1)。

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

表1 Bcl-2, Bcl-xL和Bax的表达(%)

Tab 1 Expressions of Bcl-2, Bcl-xL and Bax (%)

	MCs controlled	MCs treated with ADM	MCSs controlled	MCSs treated with ADM
BCL-2	31.68	60.53	37.5	89.93
Bcl-xL	73.44	80.14	84.67	94.74
Bax	87.78	90.33	86.83	94.98

3 讨论

体内实体瘤与三维培养的肿瘤细胞具有群集耐药性,与单层培养的肿瘤细胞有显著差异。本实验以MCSs为模型,模拟体内实体瘤,比较了其与MCs药物敏感性的差异。MCSs是由多层细胞构成的细胞球。扫描电镜下MCSs表面存在大量细胞,细胞与细胞之间粘附紧密。在耐药性方面,MCSs的药物敏感性比MCs显著下降,IC_{50}由MCs的0.10 mg/L上升至0.18 mg/L;在0.1 mg/L浓度下,MCSs的生存分数为0.626 6±0.066,而MCs仅为0.502 0±0.062,二者有显著性差异($P<0.01$)。提示MCSs对化疗药物的敏感性比MCs显著下降,具有群集耐药性。

为了探讨MCSs群集耐药的结构基础,我们利用透射电镜对MCSs与MCs的超微结构进行了观察并比较。MCSs的细胞绝大部分与周边的细胞有广泛而紧密的粘附,粘附部位可见胞膜增厚;部分细胞间可见镶嵌连接,连接部分的细胞膜增厚,局部有点状突起,形成纽扣样结构。而单层培养的细胞大部分单个存在,很少见细胞间粘附,粘附部位也未见胞膜增厚;未见明确的细胞连接。同时还发现,MCSs的细胞含线粒体、内质网(尤其是粗面内质网)显著比MCs丰富。有证据证明,细胞间粘附是体内实体瘤群集耐药的结构基础。Croix等[2]在对体内实体瘤的研究中发现,用透明质酸酶使肿瘤细胞间粘附松散,可显著提高肿瘤的药物敏感性。而介导细胞间粘附的细胞粘附分子对细胞功能、分化等都至关重要,特别是凋亡;其机制与调节信号转导通路关系密切[3~5]。抑制凋亡直接影响到化疗敏感性[6]。因而提示,细胞间粘附是MCSs群集耐药性的重要结构基础,机制可能与凋亡相关。

鉴于抗凋亡可能是MCSs群集耐药的机制,我们检测了与凋亡相关的Bcl-2、Bcl-xL和Bax表达。Bcl-2、Bcl-xL和Bax皆属于Bcl-2家族,Bcl-2、Bcl-xL是功能相似的凋亡抑制蛋白,促进细胞生存;而Bax具有促进细胞凋亡的作用[7]。而且,Bcl-2、Bcl-xL都受到细胞粘附分子的上调作用[8,9]。我们发现,Bcl-2、Bcl-xL在MCSs中的表达明显高于MCs,药物处理后,Bcl-2、Bcl-xL表达明显升高,尤以MCSs显著。Bax在MCSs中的表达高于MCs,药物处理后,其表达有所升高。而在这三者中,Bcl-2的变化最为显著。既然抑制凋亡直接影响到化疗敏感性,而Bcl-2、Bcl-xL又是作用肯定的凋亡抑制蛋白。因此推测,Bcl-2、Bcl-xL表达增高,介导抗凋亡是MCSs粘附相关的群集耐药的可能机制。而Bax在MCSs中表达高的作用还不清楚,可能与Bcl-2和Bax形成异二聚体抗凋亡有关。Bcl-2、Bcl-xL和Bax主要分布于线粒体与内质网中,常需要定位于线粒体才能发挥其调节凋亡的作用[7~9]。在电镜下,MCSs的细胞含丰富的线粒体、内质网,这就为Bcl-2家族在肿瘤群集耐药中发挥作用提供了结构基础。

参考文献:

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

[2] Croix B S, Rak J W, Kapitain S, *et al*. Reversal by hyaluronidase of adhesion-dependent multicellular drug resistance in mammary carcinoma cells [J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(18): 1285-1296.

[3] Cardo Vila M, Arap W, Pasqualini R. Alpha v beta 5 integrin-dependent programmed cell death triggered by a peptide mimic of annexin V[J]. Mol Cell, 2003, 11(5): 1151-1162.

[4] Thannickal V J, Lee D Y, White E S, *et al*. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling *via* focal adhesion kinase[J]. J Biol Chem, 2003, 278(14): 12384-12389.

[5] Wang W J, Kuo J C, Yao C C, *et al*. DAP-kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals[J]. J Cell Biol, 2002, 159(1): 169-179.

[6] Ng C P, Bonavida B. A new challenge for successful immunotherapy by tumors that are resistant to apoptosis: two complementary signals to overcome cross-resistance[J]. Adv Cancer Res, 2002, 85: 145-174.

[7] Nimmanapalli R, O'Bryan E, Kuhn D, *et al*. Regulation of 17-AAG-induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax downstream of 17-AAG-mediated down-regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases[J]. Blood, 2003, 102(1): 269-275.

[8] de la Fuente M T, Casanova B, Moyano J V, *et al*. Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces *in vitro* resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine[J]. J Leukoc Biol, 2002, 71(3): 495-502.

[9] Tiberio R, Marconi A, Fila C, *et al*. Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis *via* an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner[J]. FEBS Lett, 2002, 524(1-3): 139-144.

(编辑 陈聪连)

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