DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.003
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
756 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)09-0756-03

磷脂酰肌醇3激酶信号通路影响细胞凋亡在肺腺癌A549细胞群集耐药中的作用

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

提 要:目的 探讨PI3K信号通路在肿瘤群集耐药中的作用。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A549细胞体外立体培养,通过Western blot、原位细胞凋亡检测、四唑盐(MTT)比色法及血球计数器计数法检测Akt、Bcl-2、Bad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Akt的高表达;②同平面培养比较,立体培养细胞存在Bcl-2高表达,Bad低表达,细胞凋亡率低,对ADM敏感性低的特征,阻断PI3K信号通路后,两者差异明显缩小。结论 PI3K信号通路可通过抑制细胞凋亡在肺腺癌A549细胞群集耐药中发挥作用,阻断PI3K信号通路可能逆转该耐药现象。

关键词:肺腺癌A549细胞;三维立体细胞培养;PI3K信号通路;细胞凋亡;药物敏感性;群集耐药
中图法分类号:R329.24;R73-351;R915 文献标识码:A

Effects of PI3K pathway on multicellular resistance of lung adenocarcinoma A549 cells *via* affecting cell apoptosis

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

Abstract: Objective To investigate the roles of PI3K pathway in multicellular resistance of lung adenocarcinoma A549 cells. Methods Three-dimensional culture of A549 cells was conducted using rotatable culture bottle and desk-top water bath shaker. Western blot, *in situ* cell apoptosis detection, MTT, and blood cell counter were employed to detect the expressions of Akt, Bcl-2, and Bad, the apoptotic rate, and the susceptibility of apoptosis to adriamycin (ADM) of A549 cells under different culture conditions. Results Compared with cells cultured in two-dimensional culture system (2-D system), higher Akt and Bcl-2 expressions, lower Bad expression and apoptotic rate, and decreased susceptibility to ADM were found in cells cultured in three-dimensional culture system (3-D system). The differences diminished significantly after blocking the PI3K pathway. Conclusion PI3K pathway has effect on the multicellular resistance of lung adenocarcinoma A549 cells *via* inhibiting cell apoptosis. Blocking this pathway may revert the resistance.

Key words: lung adenocarcinoma A549 cells; three-dimensional cell culture; PI3K pathway; cell apoptosis; drug susceptibility; multicellular resistance

1990年Teicher等[1]发现小鼠体内对烷化剂耐药的肿瘤细胞,当在体外以单层培养检测时即失去其耐药表型,但将这些肿瘤细胞进行立体培养时仍表现出耐药特性,这种耐药现象被称之为"多细胞耐药"(multicellular resistance, MR)或"群集耐药"。磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)信号通路,具有调节细胞的增殖、生存和分化等功能,可对细胞凋亡产生影响,而抑制细胞凋亡是肿瘤产生耐药的重要原因,因此推测PI3K通路可能在群集耐药中发挥作用。本实验观察立体培养与平面培养细胞PI3K通路下游丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)的表达差异及立体培养细胞在给予PI3K阻滞剂LY294002后,观察药物敏感性、细胞凋亡率及相关蛋白(Bcl-xl、Bad)表达等方面的变化,以探讨PI3K信号转导通路在肿瘤群集耐药中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

肺腺癌A549细胞株由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所提供。

主要仪器及试剂:Spinner flask(Bellcoglass);Cultispher-s(球

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)65459990, E-mail:hhhcc@mail.tmmu.com.cn
通信作者:梁后杰,电话:(023)68754128
收稿日期:2003-10-28;修回日期:2004-03-01

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

型载体)(Hyclone); Bcl-xl 兔抗人多克隆抗体、Bad 兔抗人多克隆抗体、生物素化小鼠抗兔-IgG(Santa cruze); Akt(磷酸化)兔抗人多克隆抗体(Cell Signaling); PI3K 阻滞剂 LY294002(Sigma); 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　方法

1.2.1　实验分组　　共分 3 组, 平面培养组(2D system), 立体培养组(3D system), 立体培养+LY294002 组(3D system+LY)。

1.2.2　细胞培养模型的建立　　肺腺癌 A549 细胞二维平面培养(2D system)方法参照文献[2]; 肺腺癌 A549 细胞三维立体培养(3D system)方法[3]:

①Cultispher-s 的准备: 将 Cultispher-s 浸泡于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中 1.5 h 后进行压力蒸汽消毒, 更换 PBS 两次, 每次均浸泡 1 h, 吸去 PBS, 以含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液浸泡 1 h 后更换培养液, 于室温下浸泡过夜, 第 2 天使用。

②将准备好的 Cultispher-s、肺腺癌 A549 单细胞悬液及含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液加入以 1.5%琼脂糖铺底的 Spinner flask 内进行培养。

③第 1 个 24 h 中, 前 2 h 每小时旋转转子 1 次, 其后每 2 小时 1 次, 每次均为 3~4 min, 转速均为 40~50 r/min, 其余时间均置于 CO_2 孵箱内孵育。

④24 h 后, 为便于分组实验, 将 Cultispher-s 吸入以 1.5%琼脂糖铺底的 6 孔或 12 孔培养板中, 更换培养液, 每 4 小时置于台式水浴恒温振荡器内水平振荡 1 次, 每次 3~4 min, 振荡频率为 20~30 r/min, 其余时间均置于 CO_2 孵箱内孵育, 每天更换培养液, 再连续培养 3~4 d 后进行实验研究。

1.2.3　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%。

1.2.4　细胞凋亡相关蛋白表达　　采用 Westem blot 技术, 蛋白含量以条带的 OD 值× 面积表示。

1.2.5　ADM 敏感性检测

1.2.5.1　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%。

1.2.5.2　平面培养细胞　　采用 MTT 法[2], 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%)。

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, 行方差分析及组间多重比较。

2　结果

2.1　不同培养条件对细胞凋亡的影响

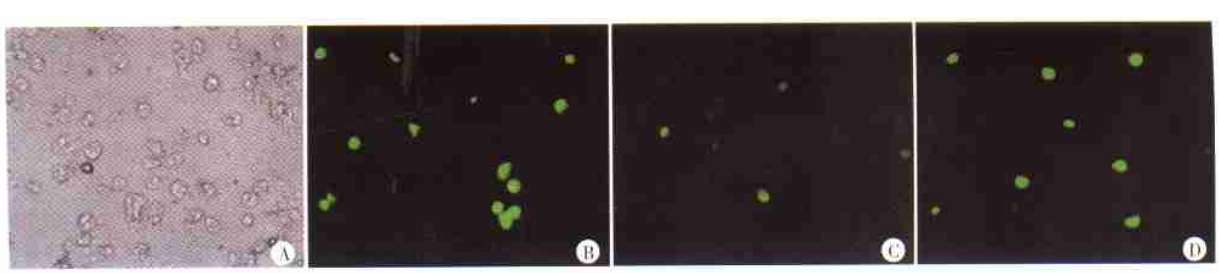
肺腺癌 A549 细胞平面培养组的凋亡率为(18.78±2.47)%, 高于立体培养组的凋亡率(7.84±1.65)%, 两者相差非常显著($P<0.01$); 立体培养细胞加入 LY294002 后凋亡率上升为(10.71±1.29)%, 与立体培养组比较差异显著($P<0.05$), 而同平面培养组的差异性缩小(图 1)。

2.2　相关蛋白的表达情况

2.2.1　Akt 的表达　　平面培养组的 Akt 表达量为(4 243.649±114.045)Int× mm^2, 低于立体培养组的 Akt 表达量(5 303.912±128.661)Int× mm^2, 两者差异性非常显著($P<0.01$)。

2.2.2　抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达　　平面培养组的 Bcl-2 表达量为(4 012 909±180.547) Int× mm^2, 低于立体培养组的 Bcl-2 表达量(4 990.402±161.717)Int× mm^2, 两者相关非常显著($P<0.01$); 立体培养细胞加入显著($P<0.01$), 而同平面培养组的差异性缩小。

2.2.3　前凋亡蛋白 Bad 的表达　　平面培养组的 Bad 表达量为(4 501.392±169.431)Int× mm^2, 高于立体培养组的 Bad 表达量(3 611 178±112 477)Int× mm^2, 两者相差非常显著($P<0.01$); 立体培养细胞加入 LY294002 后 Bad 表达量上升为(3 987.807±167.191)Int× mm^2, 与立体培养组比较差异非常显著($P<0.01$), 而同平面培养组的差异性缩小。



A: Digested adenocarcinoma A549 cells (× 200); B: Cell apoptosis in 2D system (fluorescence microscope × 200); C: Cell apoptosis in 3D system (fluorescence microscope × 200); D: Cell apoptosis in 3D system after adding LY294002 to culture medium (fluorescence microscope × 200)

图 1　肺腺癌 A549 细胞在不同培养条件下细胞凋亡情况

Fig 1　Apoptosis of adenocarcinoma A549 cells under different culture conditions

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

2.3 药物敏感性检测

2.3.1 平面培养及加入LY294002前后立体培养细胞的生长曲线 见图2，平面培养组、立体培养组及立体培养+LY294002组的IC_{50}值分别为：0.09、0.19、0.14 μg/ml。

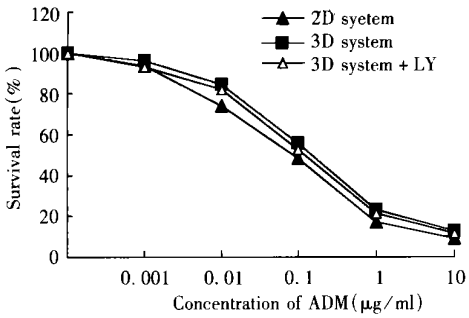


图2 不同培养条件下A549细胞的生长曲线

Fig 2 The growth curve of A549 cells under different culture conditions

2.3.2 平面培养及加入LY294002前后立体培养细胞对ADM敏感性的比较 以最接近IC_{50}值的ADM浓度(0.1 μg/ml)为基准，比较三者间药物敏感性的差异，细胞存活率越高表示对药物的敏感性越低。平面培养组的细胞存活率为(47.97±1.45)%，低于立体培养组的细胞存活率(54.53±1.50)%，两者相差非常显著($P<0.01$)；立体培养细胞加入LY294002后细胞存活率下降为(52.62±1.14)%，与立体培养组比较差异非常显著($P<0.01$)，而同平面培养组的差异性缩小。显著立体培养组对ADM的敏感性明显低于平面培养组，在加入LY294002后立体培养细胞的药物敏感性上升。

3 讨论

在Teiches等发现肿瘤细胞存在群集耐药现象后，Taylor等[4]进一步研究发现，这种耐药现象可能主要与肿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。PI3K是磷脂酰肌醇(Ptdlns)依赖激酶家族成员，可特异催化Ptdln(4,5)P_2和Ptdln4P的3-OH磷酸化，分别生成Ptdln(3,4,5)P_3和Ptdln(3,4)P_2两种多磷脂酰肌醇衍生物作为信使分子，参与一系列细胞功能的调节，包括增殖、生存、分化、细胞骨架构筑等。Akt是PI3K最主要的靶酶，与多种细胞活动、物质代谢调节，尤其是与抑制细胞凋亡、促进细胞生存有密切关系[5]。在PI3K途径中，当上游信号刺激细胞膜表面时，穿膜受体酪氨酸激酶自磷酸化或磷酸化其他底物后，可在细胞膜内表面产生PI3K结合位点，PI3K结合后可产生一些磷脂，激活其下游的Akt，活化的Akt可介导各种类型的细胞生长、生存和分化[6]，同时还可上调抗凋亡基因的表达，抑制由c-myc诱导的细胞凋亡，或活化细胞内其他信号转导通路，调节细胞的适应性生存[7]。

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，由此推论，细胞凋亡能力可直接影响化疗药物的效应[8,9]。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。本研究证实同平面培养相比立体培养的肺腺癌A549细胞表现为Akt的高表达，细胞凋亡率低，抗凋亡蛋白Bcl-2高表达，前凋亡蛋白Bad低表达，同时对ADM的敏感性低，在给予PI3K阻滞剂LY294002后，两者上述指标的差异性明显缩小。表明PI3K通路可通过抑制肿瘤细胞凋亡在肺腺癌A549细胞群集耐药中发挥作用。

参考文献：

[1] Teicher B A, Herman T S, Holden S A, *et al*. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only *in vivo*[J]. Science, 1990, 247(4949 Pt 1): 1457—1461.

[2] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版社，1996. 73—75, 186—187.

[3] Muckenschnabel I, Bernhardt G, Spruss T, *et al*. Pharmacokinetics and tissue distribution of bovine testicular hyaluronidase and vinblastine in mice: an attempt to optimize the mode of adjuvant hyaluronidase administration in cancer chemotherapy[J]. Cancer Lett, 1998, 131(1): 71—84.

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

[5] Stephens L, Anderson K, Stokoe D, *et al*. Protein kinase B kinase that mediate phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B[J]. Science, 1998, 279(5351): 710—714.

[6] Wang J M, Chao J R, Chen W, *et al*. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through atranscription factor complex containing CREB[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(9): 6195—6206.

[7] Altomare D A, Lyons G E, Mitsuunchi Y, *et al*. Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin[J]. Oncogene, 1998, 16(18): 2407—2411.

[8] 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.

[9] 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 薛国文)

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