DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.004

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1262-02

整合素β-1对实体瘤细胞耐药的影响研究

李德明,梁 后杰,张艳玲,邹 岚,阮志华 (第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038)

提 要:目的 初步探讨粘附分子β-1整合素对肿瘤耐药的影响。方法 采用人肺腺癌细胞株A549,分别以不同浓度阿霉素诱导建立耐药细胞株,采用MTT法检测肿瘤细胞结合纤维粘连蛋白(FN)及阻断β-1整合素后对肿瘤细胞耐药的影响。结果 经致死剂量的阿霉素作用,MTT法检测药物敏感的肿瘤细胞抑制率为97.1%,耐药细胞株为45.2%;与纤维粘连蛋白结合后,药物敏感细胞株抑制率为68.5%,耐药细胞株为56.4%;阻断β-1整合素后与纤维粘连蛋白结合,药物敏感细胞株抑制率达到94%,耐药细胞株为49.4%。与纤维粘连蛋白结合后,肿瘤细胞抑制率明显下降($P<0.05$);阻断β-1整合素功能后,肿瘤细胞抑制率显著上升。结论 肿瘤细胞与细胞外基质作用是造成肿瘤耐药的原因之一,阻断肿瘤细胞与细胞外基质的作用可以逆转肿瘤耐药。

关键词:肿瘤;耐药;β-1整合素;MTT
中图法分类号:R392.11;R734.2;R915 文献标识码:A

Effect of integrin β-1 on drug-resistance of solid tumor cells

LI De-ming, LIANG Hou-jie, ZHANG Yan-lin, ZHOU Lan, RUAN Zhi-hua (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical Unviersity, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of the adhesion molecule β-1 integrin on the drug resistance of tumor. Methods The drug resistance model of human lung adenocarcinoma cell line was established with adriamycin of different concentrations. The impact of tumor cells after binding to fibronectin and blocking integrin β-1 on the drug resistance of tumor cells was monitored by MTT. Results The inhibition rate of the drug sensitive tumor cells and the rate of the drug resistance cell line were 97.1% and 45.2% after the use of adriamycin at the lethal dose, 68.5% and 56.4% after binding to fibronectin, and 94% and 49.4% after blocking the binding of β-1 integrin to fibronectin, respectively. After binding with fibronectin, the inhibition ratio of tumor cells decreased significantly ($P<0.05$), but after blocking the binding of β-1 integrin to fibronectin, the inhibition ratio increased significantly ($P<0.05$). Conclusions The action of cell via matrix is one of the causes for the tumor cells to develop drug resistance which may be reversed by blocking the action between cell and matrix

Key words: tumor; drug resistance; β-1 integrin; MTT

肿瘤细胞耐药是影响化疗疗效和患者预后的主要原因之一。为克服肿瘤耐药,多年来人们对肿瘤的耐药机制进行了大量研究,并在细胞乃至分子水平有了诸多进展,这其中包括某些耐药基因(如MDR)和细胞表面蛋白(如ρ-糖蛋白和多药耐药相关蛋白等)等介导的多药耐药。然而针对这些耐药机制所设计的治疗方法,尽管在体外研究中非常有效,但在临床上却难以奏效,特别对实体瘤的治疗更是令人失望[1]。这使我们设想肿瘤细胞存在其他的耐药机制。粘附分子作为一类介导细胞与细胞、细胞与基质之间相互作用的重要物质,对耐药有没有影响?基于此,我们设计了一套方案,采用MTT法来初步研究粘附分子β-1整合素对肿瘤耐药的影响,并进一步探讨逆转耐药途径。

1 材料和方法

1.1 细胞株

选用人肺腺癌细胞株(A549)耐药细胞株A549-ADR的培养:用小剂量阿霉素(ADR)诱导培养,逐渐加大阿霉素剂量,最后可以在3.0μg/ml ADR中稳定传代。

1.2 试剂

抗β-1整合素抗体(美国Chemicon),纤维粘连蛋白(美国Chemicon),PRMI1640培养基(美国Gibcobrl),小牛血清(美国Hyclone),四甲基氮唑蓝(MTT,Sigma),DMSO(Sigma)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 分别设:A549细胞株、A549耐阿霉素细胞株(A549-ADR)、A549+纤维粘连蛋白(FN)、A549-ADR组+FN、A549+抗β-1整合素抗体、A549-ADR+抗β-1整合素抗体、A549组+FN+抗β-1整合素抗体、A549-ADR组+FN+抗β-1整合素抗体等组,每实验组设6复孔,抗β-1整合素抗体工作浓度均为1∶50。

1.3.2 细胞悬液的制备及处理 取96孔培养板,在无菌条件下,在相应实验组加FN,3μg/孔,使之涂满孔底表面,4℃冰箱过夜按每孔1×10^6/ml接种细胞,浓度1×10^5/孔,每组设实验组和对照组37℃,5%CO_2恒温孵箱6 h,A549组及A549-ADR组分别给予致死剂量阿霉素(10μg/ml),同时在相应实验孔分别加入抗β-1整合素抗体,4μg/孔,孵育48 h对照组不加药物及抗体。

1.3.3 MTT比色分析 快速翻转培养板,去除培养液,每孔加入25μl MTT(浓度为5 mol/L)继续培养4 h,加入DMSO 100μl,震荡10 min,待紫蓝色颗粒完全溶解,既在κκ型酶联免疫检测仪上,以490nm为检测波长,测各孔的D_{490}值,根据下列公式计算抑制率:抑制率=(1-实验组D_{490}值/对照组D_{490}值)×100%。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171067)
作者简介:李德明(1968-),男,甘肃省兰州市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤化疗及免疫治疗方面的研究,发表论文6篇。电话:(0931)7669642
收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-09-10

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

1.4　统计学处理

所得数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

敏感细胞株 A549 与耐药细胞株 A549-ADR 相比较, 抑制率分别为 92.3% 和 46.01%, 两组之间有非常显著差异($P<0.01$), 说明 A549-ADR 细胞株达到中度耐药。敏感细胞株与 FN 结合后, 再给予致死剂量的阿霉素, 抑制率 58.32%, 与未结合 FN 的细胞株(抑制率 92.3%)相比, 两组之间有非常显著差异($P<0.01$)。耐药细胞株结合 FN 后, 其抑制率显著下降(10.27%), 与未结合 FN 的耐药株(46.01%)相比, 两组之间有非常显著差异($P<0.01$)。用抗β-1 整合素抗体阻断耐药细胞株β-1 整合素, 但不与 FN 结合, 其抑制率为 47.04%, 与未阻断β-1 整合素的耐药株(抑制率 46.01%)相比没有显著差异($P>0.05$)。将抗β-1 整合素抗体阻断与 FN 结合的耐药细胞株β-1 整合素, 抑制率为 40.86%, 与未阻断β-1 整合素, 但与 FN 结合的的耐药株(抑制率 10.27%)相比, 有非常显著差异($P<0.01$), 见表 1。

表 1　A549 及 A549-ADR D_{490} 值及抑制率

Tab 1　D_{490} value and inhibitory ratio for A549 and A549-ADR cell line

Group	$D_{490}(\bar{x}\pm s)$	Inhibitory ratio (%)
Control	0.974±0.00	
A549	0.075±0.02	92.32
A549-ADR	0.526±0.10##	46.01
A549+FN	0.406±0.03##	58.32
A549-ADR+FN	0.874±0.10**	10.27
A549+anti-β1integrin	0.078±0.05	92.05
A549-ADR+anti-β1integrin	0.517±0.041	47.04
A549+FN+anti-β1integrin	0.184±0.09	91.11
A549-ADR+FN+anti-1integrin	0.576±0.045××	40.86

##: $P<0.01$ *vs* A549; **: $P<0.01$ *vs* A549+FN; ××: $P<0.01$ *vs* A549-ADR+FN

3　讨论

整合素由α和β亚基组成的异二聚体, 是一种穿膜糖蛋白, 一般认为, 整合素与肿瘤的关系主要表现在肿瘤的生长与转移方面, 在肿瘤发生早期, 整合素表达降低可导致瘤细胞与 ECM 的粘附作用减弱, 从而有利于肿瘤在局部生长和扩散, 瘤细胞进入血循环后, 整合素表达增多有利于瘤细胞粘附于血管内皮, 继而发生转移等。近期尽管也注意到整合素/FN、或 LM 等复合体参与了细胞信号转导和调节, 如酪氨酸激酶依赖的磷脂酰肌醇 3′-激酶, 以及丝分裂素-活性蛋白激酶依赖的信号转导途径等[1], 但却很少有人注意到整合素与耐药的关系。

本研究采用 MTT 法来研究整合素, 特别是其与 ECM 之一的 FN 结合后发现, 敏感细胞株在结合 FN 前后, 其抑制率有非常显著差异($P<0.01$), 后者抑制率明显低于前者, 说明细胞与 FN 结合后获得了耐药特性, 而耐药的肿瘤细胞与 FN 结合前后其抑制率也有非常显著差异($P<0.01$), 说明耐药细胞与 FN 结合后强化了对阿霉素的抵抗作用, 当用抗β1integrin 抗体阻断耐药细胞以及敏感细胞与 FN 的作用后, 发现其抑制率明显高于未阻断者($P<0.01$), 说明阻断细胞与 FN 的作用后, 不论是敏感细胞, 还是耐药细胞, 都恢复了对阿霉素的敏感性也就是说, 不论敏感细胞还是耐药细胞, 与 FN 的结合可以获得耐药特性, 而阻断其结合后细胞就会失去这种耐药特性。

关于整合素对肿瘤细胞耐药影响的机制目前还不清楚, 但已经知道, 正常上皮细胞的生存与稳定和整合素与 ECM 的相互作用有关, 即所谓锚定依赖现象(Anoikis)[2], 细胞如果缺乏与基质之间的相互作用, 凋亡率就会提高。肿瘤细胞也有这样的特性, 其与基质之间的作用可以调控细胞凋亡而有利于肿瘤细胞生存[2~4], 因此推测瘤细胞可能由于整合素与 ECM 作用而获得耐药表型, 通过调控细胞凋亡而产生耐药。在实验中我们发现敏感细胞与 FN 结合后产生了耐药, 耐药细胞强化了其耐药特性, 其机理可能就是因为整合素与 ECM 作用强化了肿瘤细胞的锚定依赖作用, 使细胞环境更稳定, 凋亡率降低, 有利于抵抗化疗药物的破坏作用, 提高了瘤细胞在化疗环境中的生存率。

当然, 整合素与 ECM 相互作用导致瘤细胞耐药除了有调控凋亡的原因外, 也有可能通过参与调节细胞信号转导而产生耐药。前面已经提到, 整合素/FN、或 LM 等复合体参与了细胞信号转导和调节, 如酪氨酸激酶依赖的磷脂酰肌醇 3′-激酶, 以及丝分裂素-活性蛋白激酶依赖的信号转导途径, 这些信号途径可以调节细胞周期蛋白如 p21、p27 等的表达, p27 的亚型 $p27^{Kip}$ 的高表达可以使细胞滞留在 G_1 期, 从而使细胞周期延缓, 有利于瘤细胞的生存[5,6]。

总之, 本研究证明了肿瘤细胞与细胞外基质作用是造成肿瘤耐药的重要原因之一, 阻断肿瘤细胞与细胞外基质的作用可以逆转肿瘤耐药, 为临床逆转肿瘤耐药提供了新的思路。

参考文献:

[1] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.123-135.

[2] Frisch S M, Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis[J]. J Cell Biol, 1994, 124(4): 619-626.

[3] Meredith J E, Fazeli B, Schwartz M A. The extracellular matrix as a cell survival factor[J]. Mol Biol Cell, 1993, 4(9): 953-961.

[4] Bates R C, Buret A, van-Helden D F, *et al*. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact[J]. J Cell Biol, 1994, 125(2): 403-405.

[5] Hannigan G E, Dedhar S. Protein kinase mediators of integrin signal transduction[J]. J Mol Med, 1997, 75(1): 35-44.

[6] Gong J, Ko T C, Brattain M G. Disruption of fibronectin binding to the alpha 5 beta 1 integrin stimulates the expression of cyclin-dependent kinases and DNA synthesis through activation of extracellular signal-regulated kinase [J]. J Biol Chem, 1998, 273(3): 1662-1669.

(编辑　张　宁)

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