DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.002
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1259-03

论著

耐药肿瘤细胞β-1整合素表达及对细胞凋亡的影响研究

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 探讨耐药肿瘤粘附分子β-1整合素的表达以及其对细胞凋亡的影响,并寻找逆转耐药的途径。方法 采用人肺腺癌细胞株A549及耐阿霉素细胞株A549-ADR,免疫组化方法检测耐药细胞β-1整合素的表达;TUNEL法检测其对细胞凋亡的影响。结果 耐药细胞β-1整合素表达水平高于敏感细胞($P<0.01$);敏感细胞及耐药细胞加FN后其凋亡率较未结合FN细胞明显降低($P<0.01$);用抗β-1整合素抗体阻断与FN结合耐药细胞株β-1整合素,其凋亡率与未阻断β-1整合素,但与FN结合的的耐药株相比,有显著差异($P<0.01$)。结论 耐药肿瘤细胞β-1整合素表达增加,成为耐药表型;其机制主要通过抑制细胞凋亡产生耐药;阻断其作用可以逆转肿瘤耐药。

关键词:肿瘤;耐药;β-1整合素;细胞凋亡
中图法分类号:R329.28;R392.11;R73-35 文献标识码:A

Effect of the expression of integrin β-1 on apoptosis of drug resistant 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 observe the expression of adhesion molecular integrin β-1 in drug resistant tumor cells and its influence on programmed cell death so as to find a possible way to invert drug resistance. Methods Human lung adenocarcinoma cell line A549, and A549-ADR resistant to adriamycin were used. Integrin β-1 in cells was detected by immunohistobiochemistry and programmed cell death by TUNEL. Results The expression of integrin β-1 in drug resistant tumor cells was found much higher than that in drug sensitive cells ($P<0.01$). When FN was given, the rate of apoptosis, both in sensitive and drug-resistant cells, was markedly lower than that without the combination of FN ($P<0.01$). There was significant difference between the rate of the cells treated with anti-β-1 integrin Ab to block its combination with FN and that of the cells to which Ab was not given ($P<0.01$). Conclusions Tumor cells can be converted into drug resistant phenotype by the increased expression of integrin β-1 due to the inhibition of apoptosis. Block of β-1 integrin can invert tumor cell drug resistance.

Key words: tumor; drug resistance; integrin β-1; programmed cell death (apoptosis)

本实验室采用MTT法研究显示肿瘤细胞整合素(Integrin)β-1与细胞外基质结合后产生了一定耐药性。为了进一步研究其产生耐药的机制,本研究采用免疫组化的方法检测了耐药肿瘤细胞β-1整合素的表达;以及用TUNEL法检测了肿瘤细胞结合纤维粘连蛋白(Fibronectin,FN)后对细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

细胞株:肺癌单克隆细胞株A549(由第三军医大学新桥医院肿瘤科惠赠),耐阿霉素细胞株(A549-ADR)由本实验室用小剂量阿霉素(ADR)诱导的方法获得。

主要试剂及仪器:鼠抗人β-1整合素抗体(anti-β-1整合素antibody)、纤维粘连蛋白(FN)(美国Chemicon公司),SABC免疫组化试剂盒、DAB显色盒(博士德)、原位细胞凋亡检测试剂盒(Santa Cruz公司),Tiger 920型真彩色图像分析系统(美国)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测粘附分子β-1整合素的表达

1.2.1.1 实验分组 设A549、A549-ADR、A549加FN、A549-ADR加FN、A549加抗体、A549-ADR加抗体、A549加FN加抗体、A549-ADR加FN加抗体;抗体工作浓度均为1∶50。

1.2.1.2 细胞悬液的制备及处理 取6孔培养板,在无菌条件下,在相应实验组加FN,30 μg/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 min,A549组及A549-ADR组分别给予致死剂量阿霉素(10 μg/ml),同时在相应实验孔分别加入抗β-1整合素抗体,20 μg/孔,孵育48 h对照组不加药物及抗体。

1.2.1.3 处理方法 将细胞按常规固定后PBS清洗,按SABC免疫组化试剂盒要求依次加入鼠抗人β-1整合素抗体(一抗1∶400)和试剂盒自带二抗1∶400,最后用DAB显色试剂盒显色,二甲苯透明,中性树胶封片,图像分析系统处理图像,摄影,数据统计学处理。

1.2.2 细胞分组及细胞处理 方法同1.2.1;按原位细胞凋亡检测试剂盒要求操作,在免疫荧光显微镜下检测阳性细胞数,计算出细胞凋亡率,然后DAB显色,摄影,数据统计学处理。

1.2.3 统计学处理 采用SPSS软件计算标准差,进行t检验及方差分析。

2 结果

2.1 免疫组化实验结果

耐药细胞β-1整合素总体表达水平与敏感细胞相比有显著

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:2002-09-27

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

差异($P<0.01$)；而细胞与 FN 结合与否，不论是耐药细胞还是敏感细胞，都不影响其表达($P>0.05$)。用抗体阻断β-1 整合素与 FN 的结合也不影响其表达($P>0.05$)，见表 1。

表 1 β-1 整合素表达阳性细胞平均光密度值(AOD，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Average optical density(AOD) of β-1 integrin(Int) expression positive cells($\bar{x}\pm s$)

Group	A549	A549-ADR
Control	1.438 6±0.02	1.562 4±0.03
＋FN	1.443 5±0.04	1.549 2±0.02**
＋anti-β-1 Int	1.457 8±0.01	1.572 3±0.07**
＋FN＋anti-β-1 Int	1.442 7±0.05	1.553 9±0.01**

**：$P<0.01$ *vs* A549

2.2 TUNEL 法检测细胞凋亡结果

敏感细胞加 FN 后凋亡率较加 FN 实验组低($P<0.01$)；耐药细胞株结合 FN 后凋亡率较未结合 FN 实验组明显降低($P<0.01$)；如果细胞不加 FN，仅加抗β-1 整合素，不论是耐药细胞，还是敏感细胞，其凋亡率均与相应细胞无显著差别($P>0.05$)；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，凋亡率 17.24%±1.75%，与未阻断β-1 整合素，但与 FN 结合的的耐药株(凋亡率 8.74%±1.01%)相比，有显著差异($P<0.01$)，见表 2。

表 2 A549 及 A549-ADR 细胞凋亡结果(免疫荧光显微镜下记数)

Tab 2 Result of apoptosis for A549 and A549-ADR(count with immunofluorescence microscope)

Group	Ratio of apoptosis(%，$\bar{x}\pm s$)
A549	35.75±1.24
A549-ADR	16.38±1.07
A549＋FN	28.06±0.78**
A549-ADR＋FN	8.74±1.01##
A549＋anti-β-1int	33.90±0.52
A549-ADR＋anti-β-1int	17.52±1.23
A549＋FN＋anti-β-1int	34.62±0.96
A549-ADR＋FN＋anti-β-1int	17.24±1.75××

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

3 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一，而肺癌的化疗也是其治疗的重要手段，但近年来针对肺癌的化疗越来越表现出耐药性，给治疗带来巨大的挑战。有关耐药机制的研究也日益深入，现在已经阐明，肿瘤细胞的耐药发生存在多机制，多途径，多环节。如 P-糖蛋白(P-GP)、多药耐药相关蛋白(MRP)、肺耐药相关蛋白(LRP)等。根据上述机制，目前已研制了多种耐药逆转剂，但这些逆转剂在体外实验中有效，而在临床使用中却不尽如人意。

其实很早就注意到，在球型培养模型条件下，肿瘤细胞改变了对药物和射线的敏感性，表明细胞群集可以获得耐药表型[1]，同时也发现，单层培养的肿瘤细胞与 FN 的结合同样有利于在 DNA 破坏类药物条件下生存。这说明细胞与基质之间的相互作用也可以获得耐药表型，这种情况已经在骨髓瘤细胞和小细胞肺癌当中得到证实[2,3]，但对于细胞与基质之间的相互作用究竟如何获得耐药表型则研究较少。

整合素家族是介导细胞与基质之间作用的最重要的一类粘附分子，由α和β亚基组成，通过非共价键连接成异二聚体，是一种穿膜糖蛋白。根据分子中 a 亚基的不同，可将整合素分为 8 个亚家族，其中 VLA 亚家族(β-1 亚家族)对肿瘤的耐药关系密切。其配体主要是某些细胞基质成分(ECM)，如纤维粘连蛋白(FN)、纤维蛋白原(FN)等。整合素主要介导细胞和基质(ECM)之间的相互作用。

已经有研究发现耐药的肿瘤细胞某些粘附分子表达异常，如耐药的肾癌细胞中 VLA-2 表达异常；多药耐药的 Burkitt 淋巴瘤 VLA-3 (CD49c/CD29)的失表达；以及乳腺癌耐药细胞中的 VLA-6 表达增加等[4~6]。这说明肿瘤耐药细胞与免疫粘附分子关系密切。但以上研究主要针对β-1 整合素的亚型而言，对于总的在实体瘤中的表达水平，尤其是肺癌，则鲜有报道。为了研究β-1 整合素在细胞耐药中扮演的角色，我们用免疫组化方法检测了肿瘤细胞β-1 整合素的表达。在单层培养环境中，细胞失去与 ECM 作用的机会，但结果却发现耐药细胞株β-1 整合素总体表达水平高于敏感细胞组($P<0.01$)。而且阻断β-1 整合素的作用后这种表达水平并没有减弱。可见其表达水平并不依赖与 ECM 的结合，而是耐药细胞本身就有的特性，也许这种特性正是细胞获得的耐药表型。

正常上皮细胞在缺乏细胞与基质之间的相互作用后凋亡率提高，近 10 年来逐渐意识到细胞与细胞、细胞与基质之间的作用可以调控细胞凋亡而有利于细胞生存[7~9]。如上调上皮细胞 VLA-2 上游基因的表达，可以使细胞对表皮生长因子诱导的细胞凋亡产生耐受[10]。通过细胞凋亡途径，机体可以消除失效细胞。肿瘤细胞和正常细胞一样，存在细胞凋亡，许多抗癌药物都是通过癌细胞凋亡来杀灭癌细胞，缺乏这种能力或强化这种能力都会直接影响药物疗效[11,12]。

本实验采用 TUNEL 法证明了肺癌细胞 A549 与 ECM 相互作用通过抑制细胞凋亡产生耐药。敏感细胞加 FN 后其凋亡率较未加 FN 的细胞低($P<0.01$)，耐药细胞株结合 FN 后，其凋亡率较未结合 FN 细胞明显降低($P<0.01$)，如果细胞不加 FN，仅加抗β-1 整合素，不论是耐药细胞，还是敏感细胞，其凋亡率均与相应细胞无显著差别($P>0.05$)。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，凋亡率与未阻断β-1 整合素，但与 FN 结合的的耐药株相比有显著差异($P<0.01$)，证实了耐药细胞与细胞外基质作用后，耐药细胞抗凋亡能力进一步提高，而且发现β-1 整合素只有在与细胞外基质的作用下才产生对凋亡的影响。前面已经提到，大多数的抗癌药物都是通过促进细胞凋亡来杀灭细胞，肿瘤细胞与细胞外基质作用后

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

抗凋亡能力增强,可能是细胞适应化疗药物作用环境的一种获得性结果。

关于β-1 整合素与 ECM 的相互作用究竟如何影响细胞凋亡,现在还不清楚,可能的机制是通过调节凋亡基因蛋白如 Bcl-2、Bax 等的表达来获得耐药表型。最近核转录因子(NF-κB)在耐药中扮演的角色逐渐受到重视。NF-κB 是一类具有和某些基因启动子区的固定核甘酸序列结合而启动基因转录的功能。作为可诱发的转录调节因子,NF-κB 结合位点可接受多种刺激(包括细胞粘附)。NF-κB 的激活可上调某些抗凋亡基因如 Bcl-2 等的表达而抑制细胞凋亡[13]。因此推测 NF-κB 可能在肿瘤细胞因与 ECM 作用而获得的耐药表型与靶基因之间起到桥梁的作用,介导耐药信号传导。

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(4 949 Pt1): 1 457—1 461.

[2] Kammerer R, van-Kleist S. The influences of the local enviroment on tissue architecture of colorectal carcinoma(CRC) cell aggregates and its consequence for tumor attack by lymphocytes *in vitro* and *in vivo*[J]. Eur J Cancer, 1995, 31A(13-14): 2 324—2 329.

[3] Glinsky G V. Anti-adhesion cancer therapy[J]. Cancer Mestatasis Rev, 1998, 17(2): 177—185.

[4] Meyer N, Duensing S, Anastassiou G. Altered expression of beta 1 integrins in renal carcinoma cell lines exposed to vinblastine[J]. Anticancer Res, 1999, 19(2c): 1 509—1 512.

[5] Duensing S. Loss of VLA-3 (CD49c/CD29)(belong to integrin family) expression in two multidrug resistant Burkitt's lymphoma cell lines[J]. Germany. Cancer Biother Radiopharm, 1998, 13(14): 369—375.

[6] Narita T, Kimura N, Sato M, *et al*. Altered expression of integrins in adriamycin-resistant human breast cancer cells[J]. Anticancer Res, 1998, 18(1A): 257—262.

[7] Meredeth JE, Fazeli B, Schwartz M A. The extracellular matrix as a cell survival factor[J]. Mol Biol Cell, 1993, 4(9): 953—961.

[8] Bates R C, Buret A, van-Heldon D F, *et al*. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact[J]. J Cell Biol, 1994, 125(2): 403—415.

[9] Frisch S M, Hunter F. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis[J]. J Cell Biol, 1994, 124(4): 619—626.

[10] Smida R S, Honore S, Rognoni J B, *et al*. Up-regulation of alpha 2 beta 1 integrin cell-surface expression protects A431 cells from epidermal growth factor-induced apoptosis[J]. Int J Cancer, 2000, 87(3): 360—367.

[11] Oltavai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with conserved holomog Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609—619.

[12] Whitacie C M, Berger N A. Factors affecting topotecan-induced programmed cell death: adhesion protects cells from apoptosis and impairs cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase[J]. Cancer Res, 1997, 57(11): 2 157—2 163.

[13] Ramp U. Deficient activation of CD_{95}(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2000, 82(11): 1 851—1 859.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2002)11-1261-01

个案与短篇

右锁骨下动脉变异 1 例

A case report of anomaly of right subclavian artery

刘 锋[1], 易 良[1], 李晓伟[1], 杨俊杰[1], 陈卫军[2], 朱楚洪[2], 孙建森[2] (第三军医大学: [1] 学员旅一队; [2] 基础医学部解剖学教研室, 重庆 400038)

右锁骨下动脉是头臂干的重要分支,我们在解剖一正常中年男尸时,发现其起点位于左锁骨下动脉后方,绕食管后方斜向上行。上述变异报道较少[1],现报告如下。

该变异右锁骨下动脉起于主动脉弓后壁,位于左锁骨下动脉起点左后方 1.5 cm 处,平对第三胸椎,经食管与椎前筋膜间斜向右上穿行,斜跨食管后方长达 3.3 cm。穿出点平对第二胸椎,位于右胸锁关节下,后方毗邻胸膜顶及肺尖。动脉穿出后,走行于右锁骨内端后方,紧贴臂丛上方横穿右斜角肌间隙后续为腋动脉。其主要分支走行均正常。纵观该变异动脉,管径呈现由粗到细的变化趋势:起点处管径为 1.06 cm,穿出点管径为 0.81 cm,锁骨中点处管径为 0.51 cm。行于食管后部的血管管壁较薄(未见瘤状扩张),且异常动脉起点部分沿顺时针方向扭曲约 15°,与其他血管之间有淋巴和结缔组织填充。此外,右侧无喉返神经钩绕锁骨下动脉,仅见位置较高的喉下神经。

原头臂干被右颈总动脉所取代。该动脉起于主动脉弓上壁,起点处管径为 0.94 cm,行程及分支均正常。左颈总动脉及锁骨下动脉起点、行程未见异常。

讨论

右锁骨下动脉变异与胚胎发生密切相关。正常情况下,右侧第六节间动脉和左右背主动脉联合囊之间的一段右侧背主动脉应该退化消失,右侧第四弓动脉及第六节间动脉和与其相连的背主动脉远端形成右锁骨下动脉。如果应该退化的一端背主动脉被保留,不该退化的右侧背主动脉远端退化消失,则右锁骨下动脉即由第六节间动脉和右背主动脉靠近联合点的

(下转 1266 页)

作者简介: 刘 锋(1982—),男,湖南省湘西自治州人,学员。电话: (023) 68752406

收稿日期: 2001-10-12; 修回日期: 2002-05-20

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