

# 细胞黏附对结肠癌细胞凋亡及化疗敏感性的影响

梁后杰, 李德明, 胡绍毅, 边志衡, 黄海辉, 何建明

梁后杰, 李德明, 胡绍毅, 边志衡, 黄海辉, 何建明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院肿瘤科 重庆市 400038  
国家自然科学基金资助项目, No. 30171067  
项目负责人: 梁后杰, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院肿瘤科. lianghoujie@sina.com  
电话: 023-68754128  
收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-13

## 摘要

**目的:** 研究结肠癌细胞株与基质黏附对肿瘤细胞凋亡及药物敏感性的影响。

**方法:** 应用MTT法研究细胞与基质成分纤维粘连蛋白(FN)结合对药物敏感性的影响; 采用TUNEL法检测细胞凋亡, 采用流式细胞术观察Bcl-2和Bax基因表达。

**结果:** HT29细胞与FN结合后, 其耐药性明显增加(抑制率为12.2%, 对照组为53.0%,  $P < 0.01$ ), 用抗 $\beta$ -1整合素抗体阻断其与FN结合, 其对药物的敏感性又恢复至对照水平(抑制率为50.6%, 与对照组比 $P < 0.05$ ); HT29细胞与FN结合后, Bcl-2基因蛋白表达上升(62.1%), Bax表达降低(12.86%), 凋亡率( $8.75 \pm 1.08\%$ )显著降低, 对照组为( $19.46 \pm 1.08\%$ ); 阻断其与FN结合, Bcl-2表达明显下降(22.68%), 而Bax表达上升(73.8%), 凋亡率也升至( $18.9 \pm 1.4\%$ )(与对照组比 $P < 0.05$ )。

**结论:** 肿瘤细胞与基质成分结合可上调Bax和下调Bcl-2基因表达, 增强肿瘤细胞的抗凋亡能力, 从而增加肿瘤耐药性。

梁后杰, 李德明, 胡绍毅, 边志衡, 黄海辉, 何建明. 细胞黏附对结肠癌细胞凋亡及化疗敏感性的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1943-1944  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1943.asp>

## 0 引言

结肠癌对化疗的耐药现象是影响其疗效和预后的重要因素。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, 既往的研究结果均有赖于体外二维单层培养的肿瘤细胞, 而人体内存在的是实体瘤, 是一个三维的细胞群集体。因此, 要克服耐药不仅要阐明肿瘤细胞个体的耐药特性, 更要考虑到黏附作用所介导的肿瘤细胞-细胞、细胞-细胞外基质间的相互作用<sup>[1]</sup>。我们采用结肠癌 HT29 细胞株观察肿瘤细胞与基质成分纤维粘连蛋白(FN)结合后肿瘤细胞凋亡及对药物敏感性的变化, 并观察阻断细胞与基质黏附对肿瘤耐药性的影响, 从而为结肠癌的耐药机制及逆转研究提供新的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 结肠癌细胞株 HT29 由我院实验中心提供。鼠抗人 $\beta$ -1整合素抗体(美国 Chemicon), 纤维粘连蛋白(美国 Chemicon 公司), 原位细胞凋亡检测试剂盒(Santa Cruz 公司), PRMI1640 培养基(美国 Gibco), 四甲基氮唑蓝(MTT)及 DMSO(Sigma)。

**1.2 方法** 分别设 A549 细胞组、A549 细胞 + FN、A549 细胞 +  $\beta$ -1 整合素抗体组、A549 细胞 + FN +  $\beta$ -1 整合素抗体组。每组设 6 复孔, 抗体工作浓度为 1:50。取 96 孔培养板, 无菌条件下在相应实验组加 FN, 3  $\mu$ g/孔, 使之涂满孔底表面, 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 37  $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 恒温孵箱 6 h, 分别给予 5-Fu 10  $\mu$ mol/L, 同时在相应实验孔加抗  $\beta$ -1 整合素抗体 4  $\mu$ g/孔, 孵育 48 h, 对照组不加药物及抗体。快速翻转培养板, 去除培养液, 每孔加入 25  $\mu$ L MTT(终浓度 5 mol/L)继续培养 4 h, 加入 DMSO 100  $\mu$ L, 震荡 10 min, 待紫蓝色颗粒完全溶解, 在酶联免疫检测仪以 490 nm 为检测波长, 测各孔的 A490 值, 根据下列公式计算抑制率: 抑制率 = (1 - 实验组 A490 值 / 对照组 A490 值)  $\times$  100%。TUNEL 法检测细胞凋亡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, 然后 DAB 显色, 摄影, 数据统计学处理。流式细胞仪检测凋亡基因 Bcl-2, Bax 的表达: 细胞消化后经离心、固定、再离心后加入 FACS 标记液, 按实验要求依次加入 Bcl-2, Bax 抗体, 孵育 30 min 后, 加入 FITC 标记 IgG 荧光(二抗), 避光, 离心, 上机待检。

**统计学处理** 全部资料数据均以 mean  $\pm$  SD 表示, 显著性检验用 *t* 检验。

## 2 结果

HT29 细胞与 FN 结合后, 其耐药性明显增加(抑制率为 12.2%, 对照组为 53.0% ( $P < 0.01$ )), 用抗  $\beta$ -1 整合素抗体阻断其与 FN 结合, 其对药物的敏感性又恢复至对照水平(抑制率为 50.6%, 与对照组比 $P < 0.05$ )。HT29 细胞株结合 FN 后凋亡率为  $8.8 \pm 1.1\%$ , 较未结合 FN 实验组( $19.5 \pm 1.1\%$ )显著降低。阻断其与 FN 结合, 凋亡率升至( $18.9 \pm 1.4\%$ )(与对照组比 $P < 0.05$ )。HT29 细胞通过  $\beta$ -1 整合素与 FN 结合后 Bcl-2 基因蛋白表达上升(62.1%), Bax 表达降低(12.9%), 阻断  $\beta$ -1 整合素后, Bcl-2 表达明显下降(22.7%), 而 Bax 表达上升(73.8%)。

## 3 讨论

细胞群集时药物敏感性的降低并非由于或并非仅仅由

于药物不易进入所致,而可能主要与细胞-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<sup>[2-5]</sup>.我们研究发现当肿瘤细胞与基质成分FN结合后,其耐药性较单层培养明显增加,进一步证实了细胞黏附在肿瘤耐药中的作用.细胞黏附由几个黏附分子家族所介导(包括选择素家族、CD44家族、整合素家族、钙粘素家族等),已证明这些黏附分子与细胞间和细胞内信号传导有关,并可通过对细胞周期和凋亡的调控,影响对治疗的反应.已知许多抗癌药物可通过诱导癌细胞凋亡而达到抗癌作用,所以细胞凋亡能力可直接影响抗癌药物的效应<sup>[6-7]</sup>.我们发现,HT29细胞与FN结合后,其Bax蛋白表达增加,而Bcl-2蛋白表达下降,细胞凋亡减少,提示肿瘤细胞与基质的结合,可能通过上调Bax和下调Bcl-2基因的表达,使致肿瘤细胞的抗凋亡能力增强,从而增加细胞的耐药性.

肿瘤本身作为一个整体具有与其单个癌细胞不同的特性.然而目前许多治疗药物的筛选和临床前研究仍采用的是单层培养系统(保持的基本上仍是单个细胞的特性),而忽略了细胞间的相互作用.要想成功治疗肿瘤(特别是实体瘤),肿瘤的这种特性必须予以重视.我们应用 $\beta$ -1整合素抗体阻断细胞与基质的结合,发现A

549-ADR细胞凋亡增加,同时也增加了肿瘤细胞对药物的敏感性.因此针对破坏细胞黏附的手段与化疗药联合应用,将可能成为化疗增敏或逆转耐药的一个新的策略.

#### 4 参考文献

- 1 梁后杰, 黄海辉. 细胞黏附与肿瘤多细胞耐药. 第三军医大学学报 2002;24:1257-1258
- 2 Rasey JS, Cornwell MM, Maurer BJ, Boyles DJ, Hofstrand P, Chin L, Cervený C. Growth and radiation response of cells grown in macroporous gelatin microcarriers (CultiSpher-G<sup>TM</sup>). *Br J Cancer* 1996;74(Suppl):S78-S81
- 3 Taylor ST, Hickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of bcl-X<sub>L</sub> and Bax by tumor microenvironmental factors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:18-25
- 4 Han EKH, Tahir SK, Cherian SP, Collins N, Ng SC. Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000;83:83-88
- 5 Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 2000;60:2497-2503
- 6 Ogiso Y, Tomida A, Lei S, Omura S, Tsuruo T. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res* 2000;60:2429-2437
- 7 Ramp U, Dejosez M, Mahotka C, Czarnotta B, Kalinski T, Wenzel M, Lorenz I, Muller M, Krammer P, Gabbert HE, Gerharz CD. Deficient activation of CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2000;82:1851-1859

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 河南抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者病毒前 C 区 1896 位点的突变及临床意义

汲振余, 陈茜, 陈洪涛, 朱金凤

汲振余, 陈茜, 陈洪涛, 朱金凤, 郑州大学医学院河南省医学科学研究所 河南省郑州市 450052  
项目负责人: 汲振余, 450052, 河南省郑州市大学路 40 号, 郑州大学医学院河南省医学科学研究所. jizhenyu@zzu.edu.cn  
电话: 0371-6912691 传真: 0371-6912679  
收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-13

### 摘要

目的: 了解抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者 HBV 前 C 区 1896 位点的突变状况.

方法: 应用 3' 碱基特异聚合酶链反应(3' BS-PCR)结合 PCR 产物直接测序法检测前 C 区热点突变.

结果: 72 例抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者 HBV 前 C 区 1896 位点突变检出率为 34.7%; 慢性肝炎重度患者 19 例检出 8 例单纯突变株感染, 其检出率显著高于慢性肝炎轻度组 ( $P < 0.05$ ); 慢性肝炎重度组总突变率(47.4%)亦显著高于慢性

肝炎轻度组(17.4%) ( $P < 0.05$ ); 16 例患者经测序发现有 1 例存在前 C 1899 位点 G → A 点突变.

结论: 河南地区抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者存在一定比例的病毒变异株; HBV 前 C 区 1896 位点的变异与慢性肝炎进展程度相关.

汲振余, 陈茜, 陈洪涛, 朱金凤. 河南抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者病毒前 C 区 1896 位点的突变及临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1944-1946  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1944.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的持续感染和复制与乙型肝炎慢性化、肝硬化和肝癌发生密切相关<sup>[1-2]</sup>. 在慢性 HBV 感染的患者中常有不少病例表现为 HBeAg 阴性、抗-HBe 阳性、而 HBV DNA 阳性, 表明病毒仍复制活跃, 此类