

细胞粘附在结肠癌细胞系 SW480 多药耐药表型中的作用

陆春雷¹, 吴国忠², 尹天泉¹, 同李平¹, 丰 帆¹, 郑琇山¹, 张洪伟¹

(1. 第四军医大学西京消化病医院消化一科, 陕西西安 710032; 2. 解放军第 101 医院普通外科, 江苏无锡 214044)

[摘 要] 目的 探讨细胞粘附在结肠癌细胞系 SW480 多药耐药表型中的作用。方法 通过细胞粘附实验、四甲基偶氮唑盐实验(MTT 法)、细胞内阿霉素的蓄积和滞留及 Annexin V/PI 染色法检测凋亡等检测粘附于层粘连蛋白(LN)的结肠癌细胞系 SW480 的多药耐药性的改变。结果 粘附于 LN 的 SW480 细胞对化疗药物敏感性显著下降, 化疗药物的 IC₅₀ 均显著升高, 化疗药物诱导的凋亡指数明显减少; 细胞内阿霉素的蓄积和滞留均明显减少, 药物泵出率显著增加($P < 0.05$)。结论 结肠癌细胞 SW480 与 LN 粘附后, 可能提高了对药物转运的能力, 导致化疗药物在肿瘤细胞内蓄积的减少; 通过提高抗凋亡的能力, 逃避化疗药物诱导的凋亡。

[关键词] 结肠癌; 层粘连蛋白; 细胞粘附介导耐药; 凋亡

中图分类号: R735.35 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)06-0485-04

Roles of cell adhesion in multidrug resistance phenotype of colon cancer cell line SW480

LU Chun-lei¹, WU Guo-zhong², YIN Tian-quan¹, TONG Li-ping¹, FENG Fan¹, ZHENG Xiu-shan¹, ZHANG Hong-wei¹ (1. Xijing Hospital of Digestive Diseases, the Forth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China; 2. Department of Surgery, the 101th Hospital of PLA, Wuxi 214044, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To explore the roles of cell adhesion in multidrug resistance (MDR) of colon cancer cell line SW480. **Methods** The cell adhesion assay, MTT assay, Adriamycin (ADR) accumulation and retention and Annexin V/PI staining were used to illuminate the drug resistance of colon cancer cell line SW480 after adhesion to laminin (LN). **Results** After adhesion to LN, SW480 cells exhibited a significantly higher IC₅₀, medicine pumping rate and a reduction of drug sensitivity, apoptosis index induced by chemotherapeutics and accumulation and retention of ADR ($P < 0.05$). **Conclusion** Adhesion to LN may promote MDR phenotype of colon cancer cells by two means: The adhesion of SW480 to LN may promote the drug transport ability and decreases the accumulation of chemotherapeutic drugs in tumor cells; The adhesion may elevate the capability of anti-apoptosis and inhibit the apoptosis induced by chemotherapeutic drugs.

[Key words] Colon cancer; Laminin; Cell adhesion-mediated drug resistance; Apoptosis

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 结肠癌多药耐药(multiple drug resistance, MDR)是临床治疗失败的重要原因。导致 MDR 的机制之一是细胞粘附介导的耐药(cell adhesion mediated drug resistance, CAM-DR)。研究发现^[1], 结肠癌细胞与细胞外基质成分层粘连蛋白(laminin, LN)的粘附与肿瘤的多种生物学行为密切相关。本研究以和 LN 粘附的结肠癌细胞为模型, 探索细胞粘附在结肠癌细胞系

SW480 多药耐药表型中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人结肠癌细胞系 SW480 引自军事医学科学院, RPMI 1640 及胰蛋白酶购自 Hyclone 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 人层粘连蛋白(LN)、小牛血清蛋白(BSA)和二硫苏糖醇(DTT)购自 Sigma-Aldrich 公司。

作者简介: 陆春雷(1976-), 男, 江苏无锡人, 本科, 主治医师, 从事胃肠肿瘤的治疗与研究。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌细胞系 SW480 于 37℃、5% CO₂、含 10% 热灭活胎牛血清中 RPMI 1640 培养液中培养。

1.2.2 细胞粘附试验 配制终浓度以包被面积为标准, LN 1 μg/cm² 和 BSA 0.4 μg/cm² 分别包被 96 孔板, 置于 4℃ 过夜; 以 2.5g/L 胰蛋白酶消化处于对数生长期细胞, 用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液制成单细胞悬液, 每孔加入 100 μl; 分别培养 0.5、1、2 和 4 h 后, 中止培养, 吸去培养孔中含有细胞悬液的培养液后, 高倍镜下随机选取 10 个视野进行计数, 以平均值作为粘附细胞数。

1.2.3 体外药物敏感性试验 ①参照两种化疗药物的血浆高峰浓度[5-氟尿嘧啶(5-Fu) 10 μg/ml, 顺铂(DDP) 3 μg/ml], 在粘附于 LN 及阴性对照 BSA 的细胞中分别加入 0.01 倍、0.1 倍、1 倍和 10 倍血浆高峰浓度的化疗药物。每一浓度设 4 个重复孔。②以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液制备成单细胞悬液, 以每孔 8 × 10³ 个细胞 200 μl 接种于已包被 LN 或 BSA 的 96 孔培养板中; 常规培养 12 h 后, 将两种化疗药物按不同浓度加入各孔细胞, 继续常规培养 48 h。③每孔加新鲜配制的 MTT 溶液(5 μg/μl) 20 μl, 继续培养 4 h 后, 中止培养, 小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 150 μl DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解; 选择 490 nm 波长, 在酶联仪上测定各孔光吸收 A 值, 取 4 个重复孔的 A 值的平均值。计算结肠癌细胞粘附于不同成分后, 在两种化疗药物不同浓度下的存活率[细胞存活率 = (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (阴性对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) × 100%]; 以细胞存活率为纵轴, 药物浓度对数为横轴作半对数图, 并按作图法求出 SW480 细胞粘附于不同成分后对两种药物的 IC₅₀ 值。

1.2.4 细胞内阿霉素(ADR)蓄积和滞留的检测 参照细胞粘附试验的方法包被 6 孔培养板后按照每孔 10⁵ 个细胞接种入 6 孔板中; 培养过夜后, 每孔加入 ADR 至终浓度为 5 mg/L, 继续培养 1 h; 收获细胞(ADR 蓄积的检测), 或换新鲜无药培养液继续培养 1h 后再收获细胞(ADR 滞留的检测); 以冷 PBS 洗涤细胞后, 上流式细胞仪检测细胞内的 ADR 荧光强度, 检测波长为 488 nm, 接收波长为 575 nm; 设置未接触药物的细胞为阴性对照; 流式细胞仪检测细胞内阿霉素的蓄积和滞留, 根据公式计算药物的泵出率[细胞药物泵出率 = (阿霉素的蓄积量 - 阿霉素的滞留量) / 阿霉素的蓄积量 × 100%]。

1.2.5 细胞凋亡的检测 收获对数生长期的 SW480 细胞, 接种于 LN 及阴性对照 BSA 包被的 6 孔板中; 细胞贴壁后加入 VCR, 剂量为 6 μg/ml, 37℃ 培养 36 ~ 72 h; 加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 于含 1.5 mol CaCl₂ 的细胞培养液中, 37℃ 孵育 10 min; 收集细胞前用含 1.5 mol CaCl₂ 的细胞培养液洗涤 2 次; 用橡皮细胞刮小心刮取并收集细胞, 加 490 μl 的结合缓冲液重悬细胞; 加入 5 μl 的 PI 染液, 轻轻混悬, 4℃ 孵育 10 min; 流式细胞仪分析, 按公式计算细胞的凋亡指数[细胞凋亡指数 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 总细胞数 × 100%]。

1.2.6 统计学处理 根据数据不同, 相应采用配对 *t* 检验、χ² 检验、Dunnett's 多均数比较等方法, 使用 SPSS10.0 统计软件完成数据处理, *P* < 0.05 有统计学差异。

2 结果

2.1 结肠癌细胞 SW480 粘附特征的检测 检测 SW480 细胞在不同的时间内(0.5、1、2、4 h)粘附于 LN(LN 组)及 BSA(BSA 组)的粘附细胞数。在单位时间内, LN 组中 SW480 细胞的粘附细胞数均明显高于 BSA 组(*P* < 0.05); LN 组和 BSA 组中的粘附细胞数均在 0 ~ 2 h 内显著增加, 而从 2 h 开始粘附细胞数的增加则缓慢进入平台期(见表 1)。

表 1 SW480 细胞对 LN 及 BSA 的粘附数($\bar{x} \pm s$, 个)

| 药物 | <i>n</i> | 0.5 h | 1 h | 2 h | 4 h |
|-----|----------|---------|----------|-----------|----------|
| BSA | 20 | 34 ± 4 | 58 ± 2 | 121 ± 9 | 129 ± 7 |
| LN | 20 | 73 ± 6* | 142 ± 7* | 197 ± 12* | 207 ± 5* |

注: 与 BSA 组比较, * *P* < 0.05

2.2 LN 对化疗药物敏感性的影响 通过 MTT 比色法检测粘附于 LN 及 BSA 的结肠癌细胞 SW480 对于化疗药物 5-Fu 和 DDP 的药物敏感性, 结果显示: 粘附于 LN 后, SW480 细胞对 5-Fu 和 DDP 的 IC₅₀ 值分别为(6.41 ± 1.03)、(9.57 ± 0.77), 与粘附于 BSA 的同种细胞相比, IC₅₀ 值均相应显著升高(*P* < 0.05), 提示粘附于 LN 后对化疗药物敏感性显著下降。

2.3 LN 对结肠癌细胞内阿霉素蓄积和滞留的影响 借助流式细胞仪(FCM)检测粘附于 LN 及 BSA 的结肠癌细胞 SW480 内阿霉素的蓄积和滞留, 并计算相应的药物泵出率, 结果显示(表 2): 与粘附于 BSA 的结肠癌细胞相比, 粘附于 LN 的结肠癌细胞内阿

霉素的蓄积和滞留均明显减少,药物泵出率显著增加。

表2 粘附于LN及BSA的SW480细胞的阿霉素蓄积滞留和药物泵出率($\bar{x} \pm s$, 荧光强度单位)

| 药物 | n | 平均荧光强度 | | 药物泵出率 |
|-----|----|--------------|--------------|--------------|
| | | 蓄积 | 滞留 | |
| BSA | 20 | 4.22 ± 0.09 | 2.97 ± 0.12 | 0.30 ± 0.04 |
| LN | 20 | 2.56 ± 0.04* | 1.07 ± 0.08* | 0.58 ± 0.05* |

注:与BSA组比较,* P<0.05

2.4 LN对化疗药物诱导结肠癌细胞凋亡的影响
通过Annexin V/PI染色法借助流式细胞仪,检测粘附于LN以及BSA的结肠癌细胞SW480在化疗药物诱导下的凋亡。结果:与粘附于BSA的SW480细胞凋亡指数(63.4 ± 4.9)相比,粘附于LN的SW480细胞的凋亡指数(29.6 ± 1.5)明显减少(P<0.05)。

3 讨论

目前已发现的MDR相关分子及其作用机制并不能圆满解释结肠癌的MDR现象,其主要原因之一可能是忽视了细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在结肠癌细胞对抗化疗药物过程中的作用。粘附于ECM的结肠癌细胞对于多种化疗药物的敏感性明显减弱,是结肠癌细胞MDR机制之一。根据在肿瘤细胞膜、细胞质及细胞核中发现的多种与MDR相关的基因或分子,由此推测出多种与耐药相关的机制^[2],但这些机制仍不能圆满解释肿瘤细胞MDR,并且针对这些机制设计的治疗方案对实体瘤的治疗效果不尽如人意。研究显示,细胞与基质、细胞与细胞之间的相互作用对肿瘤细胞的MDR具有重要的调节作用。所以,要想克服MDR不仅要阐明个体肿瘤细胞的耐药特性,还要考虑到细胞间的相互作用和相互协作,更要考虑肿瘤微环境对此过程的影响。因此,从肿瘤细胞与周围微环境相互作用的整体角度出发研究多药耐药机制,对于深入理解肿瘤多药耐药现象具有深远意义。

肿瘤的MDR并非是瘤细胞对抗化疗药物的独立反应,而是瘤细胞与微环境共同作用的结果^[3]。细胞外基质作为肿瘤微环境的重要组成部分与肿瘤细胞粘附分子(cell adhesion molecule, CAM)的相互作用对于维持肿瘤的恶性表型不可或缺。研究表明,肿瘤耐药发生过程中均存在细胞粘附分子及其介导的粘附行为的改变^[4]。Sethi等^[5]发现,肺癌细

胞都被广泛的ECM包裹着,小细胞肺癌细胞系SCLC通过β1整合素粘附于纤连蛋白、LN或IV型胶原后,其成瘤性明显增强,并能够抵抗足叶乙甙、顺铂和阿霉素等化疗药物的杀伤。Damiano等^[6]发现,当人多发性骨髓瘤细胞系8226生长在固定了纤连蛋白的培养基时,可以抵抗马法兰和阿霉素的杀伤。因此他们认为,细胞与ECM的粘附可以导致耐药,并将这种形式的耐药称为细胞粘附介导的耐药。与经典耐药机制相比,肿瘤细胞与基质粘附可能通过以下几种机制诱导肿瘤细胞形成CAM-DR:①影响细胞周期^[7]。②提供生存信号^[8]:诱导并激活抗凋亡蛋白(Bcl-2等),同时促使凋亡蛋白(Bax等)发生磷酸化、转位线粒体以外区域而失去功能。CAM-DR现象的实质是粘附分子介导肿瘤细胞与细胞外基质粘附后,细胞与基质之间的相互作用激活了细胞内某些信号途径,导致下游效应分子的表达改变,从而导致肿瘤细胞耐药表型的增强。

LN作为细胞外基质的重要组成部分通过与细胞表面的LN受体相结合产生了多种生物学功能^[9]。表达于结肠癌细胞膜表面的67LR层粘连蛋白受体所介导的与LN的粘附提供了结肠癌重要的肿瘤微环境,在结肠癌细胞的发生及进展的过程中发挥重要的作用。本研究发现:与LN粘附后,结肠癌细胞对于化疗药物5-Fu和DDP的抵抗性显著增强;结肠癌细胞阿霉素的蓄积和滞留均明显减少,药物泵出率显著增加。研究结果提示结肠癌细胞的耐药表型与其粘附状态相关。与细胞外基质成分粘附后,结肠癌细胞可能通过以下两种途径增强自身的多药耐药性:①可能通过提高肿瘤细胞对药物转运的能力,导致化疗药物在肿瘤细胞内蓄积的减少;②可能提高抗凋亡的能力,逃避化疗药物诱导的凋亡。

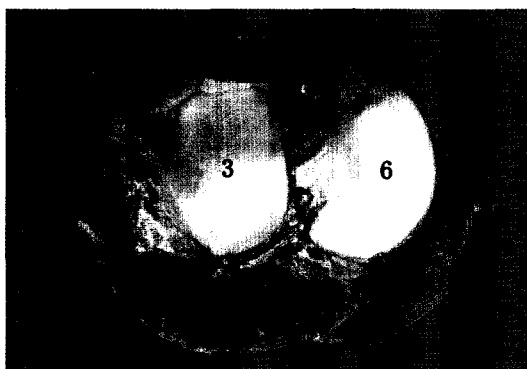
细胞粘附参与了结肠癌细胞的多药耐药,将为反粘附治疗肿瘤提供一条新的途径^[10]。

参考文献

[1] Nelson J, McFerran NV, Pivato G, et al. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. [J] Biosci Rep, 2008, 28(1):33-48.
[2] Fan D, Zhang X, Chen X, et al. Bird's-eye view on gastric cancer research of the past 25 years[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20(3):360-365.
[3] Kenneth H, Shain SD. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR[J]. Mol Cancer Ther, 2001, 11(1):69-78.

(下转第490页)

外侧髌上关节面中部区域,髌骨关节面内侧份置于后部。见图2。



1. 髌韧带;2. 膝下外侧动脉;3. 髌骨关节面;4. 髌骨尖;
5. 腓侧副韧带;6. 胫骨内侧髌上关节面

图2 髌骨移位至胫骨外侧髌

3.5 移位髌骨的支持和固定 胫骨外侧髌上关节面的严重缺损,常伴有不同程度的外侧髌的骨缺损,根据缺损大小,取不同形状或大小的髌骨或腓骨用以支持髌骨并填充缺损。髌骨、髌骨或腓骨均须与胫骨外侧髌固定,以防止负重后髌骨塌陷,关节间隙增宽。

3.6 髌骨移位修复胫骨外侧髌上关节面缺损的特点 ①髌骨关节面与胫骨外侧髌上关节面的形态大小不完全相同,但有相似之处能就近切取,有足够长

的血管蒂,可为胫骨外侧髌上关节面的修复提供材料。②带血管蒂髌骨移位修复胫骨外侧髌上关节面缺损,术后膝关节伸直时,没有了原有的髌骨“杠杆”作用,致使伸膝力量有所减弱,但膝关节的屈伸功能仍得以一定程度的保留。

参考文献

- [1] 陆裕朴,胥少汀,葛宝丰,等.实用骨科学[M].北京:人民军医出版社,1991:1451-1459.
- [2] Campanacci M, Cervellati C, Donati U. Auto genous patella as replacement for a resected femoral or tibial condyle [J]. J Bone Joint Surg Br, 1985, 67(4):557-558.
- [3] 陈秀清,陈振光,王 斌,等.带血管蒂髌骨移位修复胫骨内侧髌上关节面缺损的应用解剖[J].中国修复重建外科杂志, 1998, 12(3):153-155.
- [4] Scapinelli R. Blood supply of the human patella [J]. J Bone Joint Surg Br, 1967, 49(3):563-564.
- [5] 徐 斌,吕厚山,燕太强,等.国人正常髌骨厚度测量[J].中华骨科杂志,1998,18(9):522-524.
- [6] 陈秀清,陈振光,王以进.用髌骨重建胫骨平台关节面缺损的生物力学研究[J].中国临床解剖学杂志,2001,19(1):79-81.
- [7] 徐 斌,吕厚山,燕太强.正常髌骨的测量及临床意义探讨[J].中国临床解剖学杂志,2001,19(2):157-158.
- [8] 颜登鲁,李 健.正常髌骨厚度和高度测量及其临床意义[J].中国临床解剖学杂志,2005,23(5):504-506.

(收稿日期:2009-02-27;修回日期:2009-08-30)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)

(上接第487页)

- [4] Damiano JS. Integrins as novel drug targets for overcoming innate drug resistance[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2002, 2(1):37-43.
- [5] Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo[J]. Nature Med, 1999, 5(6):662-668.
- [6] Damiano JS, Halzheurst LA, Dalton WS. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation [J]. Leukemia, 2001, 15(8):1232-1239.
- [7] Stupack D, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: integrins, sig-

naling and cell survival [J]. J Cell Sci, 2002, 115(19):3729-3738.

- [8] Martin SS, Vuori K. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and apoptosis [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1692(2-3):145-147.
- [9] Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells [J]. Cancer Letters, 2005, 223(1):1-10.
- [10] Schmidmaier R, Baumann P. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(10):978-990.

(收稿日期:2009-05-27;修回日期:2009-08-19)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)