

丁酸钠逆转 H460/5-FU 肺癌细胞耐药性的研究

吴欣欣, 李晓艳, 武 虎, 刘海燕, 陈 侃

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘 要: 肺癌耐药是化疗成功的主要障碍,因此肺癌细胞的耐药逆转研究具有重要意义。实验通过流式细胞术检测到对 5-氟脲嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)耐受的细胞系 H460/5-FU 中的 SP 细胞含量较亲本细胞 H460 明显升高,经丁酸钠诱导分化后, H460/5-FU 对 5-FU 的敏感性增加,表现为细胞存活率降低,细胞凋亡率提高,而且这种改变随着丁酸钠浓度的增加而增强。结果提示丁酸钠具备逆转肺癌耐药细胞系 H460/5-FU 耐药的能力。

关键词: 肺癌; 丁酸钠; SP 细胞; 耐药逆转

中图分类号: Q733.7 **文献标识码:** A

0 引 言

肺癌是危害人类健康的严重疾患,且随着环境污染的加重而日趋增多,尽管新的药物和治疗方法不断出现,全世界每年还是有近百万患者死于该病^[1]。化疗是目前治疗肺癌必不可少的手段,肺癌耐药是造成化疗失败的主要原因,因此人们期待着寻找一种更加有效的治疗方法,来防止和逆转肺癌对各种药物的耐受。

1996 年 Goodell 等^[2]报道,经荧光染料 Hoechst33342 标记的小鼠骨髓细胞用流式细胞仪 407 nm 的紫外光源激发后,大部分细胞可同时发出两种不同的荧光(Hoechst Red 和 Hoechst Blue),此外还存在着一小群 Hoechst 33342 低染的细胞,它们被命名为 SP(side population)细胞,以区别于主群细胞(main population, MP)。后来的一些研究^[3-4]发现肿瘤细胞中也存在着 SP 细胞,它们带有多药耐药基因 ABCG₂ 和 ABCG₃,后者使得 SP 细胞具有可将外来的染料、毒性药物等排出胞外的功能,从而导致它们不易被 Hoechst 33342 着色,且对化疗药物耐受的特性,这些研究还证实了 SP 细胞具有自我更新和增殖

分化的能力。在以往对于肺癌的研究中,已经发现耐药肺癌细胞较亲本细胞含有更多的 SP 细胞^[5]。

丁酸钠是丁酸乙酯在体内水解生成的天然产物,它和化疗药物联合应用治疗胃癌、肠癌、食管癌和肝癌的研究已有报道^[6-8]。但通过添加丁酸钠逆转肺癌耐药的相关研究目前尚无报道,因此笔者用丁酸钠处理已建立的肺癌耐药细胞 H460/5-FU,检测其对化疗药物 5-FU 敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人肺癌耐药细胞系 H460/5-FU(RI 为 3.96)为本所建立并保存。细胞在 5% CO₂, 37℃(培养箱中)条件下培养,培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,内含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL、谷氨酰胺 2 mmol/L、Hepes 12.5 mmol/L,消化细胞用 0.25% 的胰蛋白酶(以上均购自 Gibco 公司)。HBSS 液、荧光染料 Hoechst 33342、碘化丙啶(Propidium iodide, PI)、二甲基亚砜(DMSO)、MTT 等试剂购自 Sigma 公司。化疗药物 5-氟脲嘧啶(5-Fluorouracil)购自齐鲁制药厂。

收稿日期: 2011-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(30801379);浙江理工大学科研启动基金(1016834-Y);浙江省重中之重学科开放基金项目(SWYX0812)

作者简介: 吴欣欣(1986-),女,山东德州人,硕士研究生,从事癌症的靶向基因病毒治疗的研究。

通讯作者: 陈 侃,电子邮箱: chenkan_xjtu@163.com

XDS-1B型倒置式生物显微镜(重庆光仪),HEPA CLASS100-THERMO型二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司),BCD-277(KK28F76TI)型冰箱,DK-8D型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),单人水平、SW-CJ-1FB垂直两用净化工作台(苏州净化设备有限公司),YC-260L冷藏柜(中科美菱),FACSaria型号的流式细胞仪购自BD公司,各规格移液枪购自Eppendorf等公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测耐药细胞中的 SP 细胞含量

取 1×10^6 个处于对数生长期的 H460/5-FU 细胞,0.25%胰蛋白酶消化制备成单细胞悬液,然后用 1 mL 已在 37℃ 预热过的含 2% 血清的 DMEM 培养液将细胞重悬,加入终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的染料 Hoechst 33342,放入密闭的 37℃ 的水浴中孵育 90 min,每隔 15 min 轻轻摇晃一次以防止细胞染色不均匀,染色结束后离心弃上清,并用 1 mL 含 2% 血清已预冷的 PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测前 5 min 加 PI(浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$)以区别死细胞,用 407 nm 的紫外光源激发待测细胞检测其 SP 细胞含量。

1.2.2 MTT 法检测细胞对化疗药物的敏感性

取对数生长期的 H460/5-FU 细胞,以 8×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔板中,37℃,5%CO₂ 条件下培养过夜。次日待细胞贴壁后加入不同浓度的丁酸钠溶液(0、2.5、5、10 mmol/L,每个浓度设 5 个平行孔)继续培养 24 h 和 48 h 后弃培养液,分别加入终浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU,再次放入培养箱培养,48 h 后弃上清,分别加入无血清培养液 180 μL 和 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL ,37℃ 孵育 4 h,弃上清,加入 DMSO

150 μL ,室温振荡 10 min 使其充分溶解,用酶标仪测 490 nm 处吸光值(OD 值)。用以下公式计算细胞存活率:细胞存活率=(加药组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 H460/5-FU 细胞,将其分为两组:5-FU 细胞组与丁酸钠诱导分化后再加 5-FU 细胞组。0.25%胰蛋白酶消化后接种于 12 孔板中,放入培养箱,37℃,5%CO₂ 条件下培养过夜。待细胞贴壁后取出,倒掉上清。用 PBS 将细胞洗两遍,将上清倒去。胰蛋白酶消化为单细胞悬液后,10%DMEM 对其终止消化,离心 1 000 r/min,弃上清,收集细胞。使用 Binding Buffer 对细胞进行重悬,洗一遍,弃上清。之后在每管内装 200 μL Binding Buffer,加 AnnexinV-FITC 2 μL ,室温下避光染色 15 min。将细胞分装入 EP 管中,加 5 $\mu\text{g/mL}$ PI 5 μL ,室温下放置 5 min,然后用流式细胞仪进行检测。

2 结果

2.1 流式细胞术检测肺癌细胞 H460 和 H460/5-FU 中 SP 细胞含量

H460 和 H460/5-FU 细胞经 Hoechst 33342 染色后进行流式细胞仪检测,染料 Hoechst 33342 经 407 nm 的紫外光源激发后可同时发出两种不同的荧光,因为 SP 细胞具备将进入细胞核的荧光染料排出胞外的功能,所以不被 Hoechst 33342 着色。实验结果显示(图 1),H460 细胞系中 SP 细胞所占比例为 23%,而 H460/5-FU 细胞系中 SP 细胞所占比例为 56%,肺癌耐药细胞中 SP 细胞的含量明显升高。

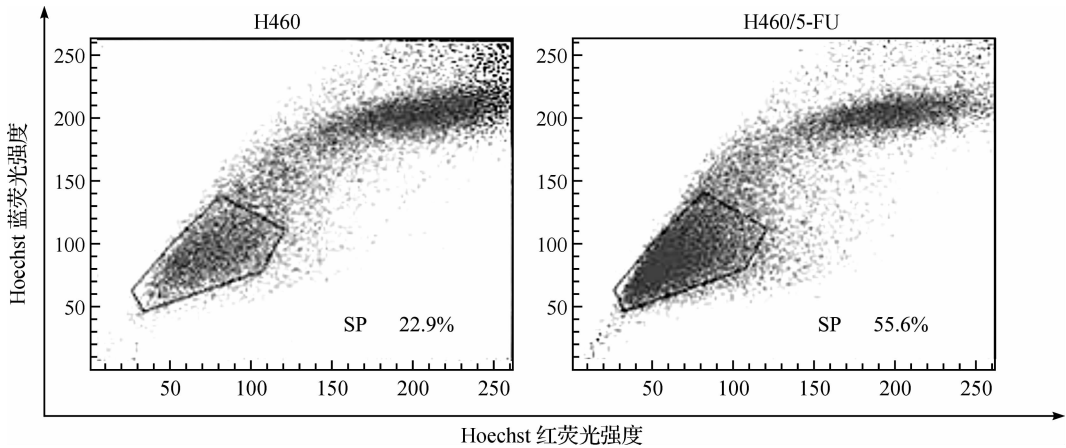


图1 H460 和 H460/5-FU 细胞中 SP 细胞所占的比例

2.2 丁酸钠对 H460/5-FU 细胞耐药性的影响

H460/5-FU 细胞在分别加入不同浓度的丁酸钠

诱导 24 h 和 48 h 后,再加入终浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU 处理 48 h,MTT 法检测细胞存活率。结果显示

丁酸钠诱导以后,H460/5-FU 细胞对 5-FU 的敏感性明显增加,细胞存活率降低,而且这种改变随着丁酸钠作用时间和作用浓度的增加而增强(如图 2 所示)。

2.3 丁酸钠提高 5-FU 诱导的 H460/5-FU 细胞凋亡

H460/5-FU 细胞中分别加入不同浓度的丁酸钠诱导不同的时间,5-FU 作用 48 h 后,流式细胞仪进行检测结果发现,经过丁酸钠诱导的细胞,再经 5-FU 作用后,细胞凋亡的数目占所取区域中细胞总数的百分比明显高于未经丁酸钠诱导的细胞组(如图 3 所示),而且这种改变随着丁酸钠作用时间和作用浓度的增加而增强。

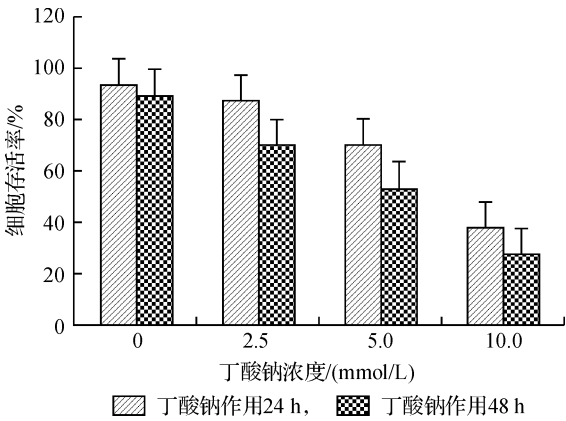


图 2 丁酸钠处理提高 H460/5-FU 细胞对 5-FU 的敏感性

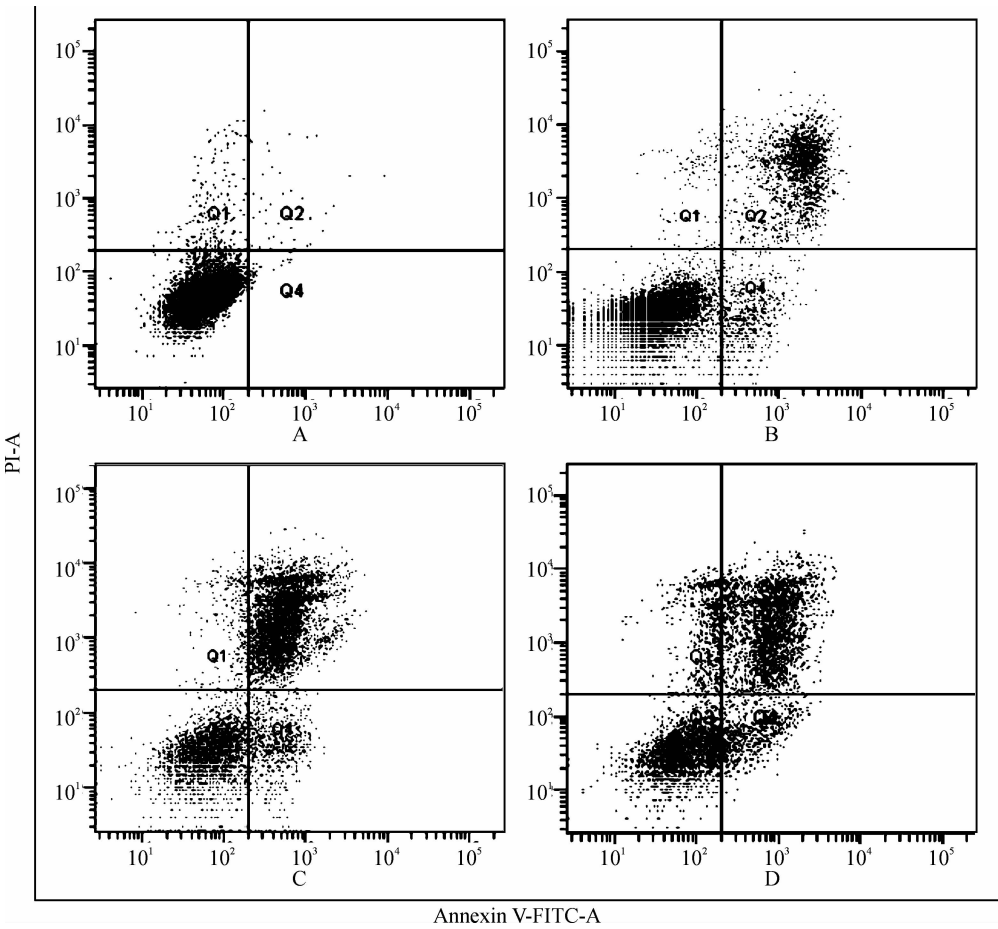


图 3 丁酸钠提高 5-FU 诱导的 H460/5-FU 细胞凋亡率

(A)H460/5-FU 细胞经 5-FU 作用 48 h 后细胞凋亡率;(B)5 mmol/L 丁酸钠诱导 24 h,再用 5-FU 作用 48 h 后的细胞凋亡率;(C)10 mmol/L 丁酸钠诱导 24 h,再用 5-FU 作用 48 h 后的细胞凋亡率;(D)5 mmol/L 丁酸钠诱导 48 h,再用 5-FU 作用 48 h 后的细胞凋亡率

3 讨论

2001 年,Zhou 等^[9]通过一系列研究发现不同组织来源的 SP 细胞均表达 ATP 结合转运蛋白 ABCG₂/BCRP1。ABCG₂ 首先在乳癌细胞中被发现,其功能是参与肿瘤细胞的多药耐药性^[10-11]。他

们用逆转录病毒将 ABCG₂/BCRP1 基因导入正常小鼠骨髓细胞,培养 12 d 以后,SP 细胞数量明显增加,约占细胞总数的 60%。而 ABCG₂/BCRP1 基因敲除的小鼠,骨髓和骨骼肌中的 SP 细胞都显著减少。利用抗 ABCG₂ 的单抗结合流式细胞技术分析表明,ABCG₂/BCRP1 的表达与 SP 细胞表型呈强

相关,是 SP 细胞能泵出 Hoechst 荧光染料的一个保守特性。通过本文对 SP 细胞含量的测定,发现,耐药细胞中的 SP 细胞含量远远高于亲本细胞。耐药细胞中的 SP 细胞通过其细胞膜上的蛋白泵 ABCG₂ 将进入膜内的化疗药物排出胞外,从而使得药物无法进入细胞并在细胞内发生作用^[4]。

Cruntsin 等^[12]报道丁酸钠会引起细胞核内多种变化,包括组蛋白的超乙酰化、DNA 的甲基化及非组蛋白的 HMG(high mobility group)修饰。其中以组蛋白的超乙酰化最为重要,与基因表达和抑制细胞生长有关。Schwartz 报道,丁酸钠能诱导 Rb 蛋白去磷酸化,p16 基因表达及大肠癌细胞生长抑制^[13]。丁酸钠作为去乙酰化酶的抑制剂,使组蛋白超乙酰化后,激活一些转录因子,使转录因子结合并激活某些基因^[12],最终可抑制细胞生长,又诱导细胞分化。丁酸钠诱导肿瘤干细胞分化为成熟细胞,使其表面失去高表达 ABCG₁、ABCG₂ 等泵耐药分子的能力,从而失去将细胞内的药物泵出的能力,提高细胞对药物的敏感性,使得肿瘤药物发挥最佳的效果^[7]。

本文研究结果显示,丁酸钠诱导后,耐药肺癌细胞 H460/5-FU 对 5-FU 的敏感性明显增加,细胞存活率降低,凋亡率明显提高,而且这种改变随着丁酸钠作用时间和作用浓度的增加而增强。这表明丁酸钠提高了耐药细胞对化疗药物的敏感性,为肿瘤细胞耐药逆转的研究提供了很好的依据,也为临床的肿瘤治疗带来了新的希望。

参考文献:

- [1] 白学春,张 新. 肺癌的治疗现状[J]. 中国结核和呼吸杂志, 2006, 29(3): 146-148.
- [2] Goodell M A, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo[J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1797-1806.
- [3] Hirschmann-Jax C, Foster A E, Wulf G G, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci

USA, 2004, 101(39): 14228-14233.

- [4] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(3): 781-786.
- [5] Chen K, Ding C F, Li D D, et al. Development and characterization of 5-fluorouracil resistant human lung cancer Cell line H460/5-FU[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2010, 27(1): 145-148.
- [6] 李 丰, 吴一迪, 王云庆, 等. 丁酸钠诱导的人大肠癌细胞成熟分化中变化[J]. 中国医科大学学报, 2000, 29(6): 404-407.
- [7] 何东苟, 陈尊器, 葛曰萍. 正丁酸钠诱导人肝癌细胞表型分化的观察[J]. 肿瘤防治研究, 1999, 26(5): 355-356.
- [8] Bartalena L, Bogazzi F, Danadel G, et al. The differentiation inducing agent sodinm butyrate produces divergent effects on albumin and thyroxine-binding globulin synthesis by human hepatoblastostoma derived (HepG2) cells[J]. Endocrinol Invest, 1990, 13(2): 917-919.
- [9] Zhou S, Schuetz J D, Bunting K D, et al. The ABC transporter Bcrpl/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype[J]. Nat Med, 2001, 7: 1028-1034.
- [10] Doyle L A, Yang W, Abruzzo L V, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 15665-15670.
- [11] Allikmets R, Schriml L M, Hutchinson A, et al. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance[J]. Cancer Res, 1998, 58: 5337-5339.
- [12] Cruntsin M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription[J]. Nature(London), 1997, 389(6649): 349-352.
- [13] Schwart B, Avivi-Green C, Polak-Charcon S, et al. Sodium butyrate induces retinoblastoma proteins dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 1998, 188(1/2): 21-30.

Study on the Drug Resistance Reversal of Lung Cancer Cells H460/5-FU by Sodium Butyrate

WU Xin-xin, LI Xiao-yan, WU Hu, LIU Hai-yan, CHEN Kan

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech
University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The drug resistance of lung cancer is a major obstacle to chemotherapy, so it's significant to study the drug resistance reversal of lung cancer cells. This experiment detected the content of SP cells in 5-FU-resistant cell line H460/5-FU through flow cytometry, results showed the content of SP cells in H460/5-FU was much more than that in its parental cell H460, after induction of differentiation by sodium butyrate, the cell sensitivity of H460/5-FU to 5-FU increased, the survival of cells decreased, the rate of cell apoptosis increased, and this change enhanced with the concentration increasing of sodium butyrate. These results prompted sodium butyrate had the ability to reverse the drug resistance of drug-resistant lung cancer cell lines H460/5-FU.

Key words: lung cancer; sodium butyrate; SP cells; drug resistance reversal

(责任编辑: 许惠儿)