

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.013

不同浓度阿霉素对 A549 细胞存活影响的机制研究 *

宋 杰 祝丽双 陈 佳 陆慧琦 韩焕兴[△]

(第二军医大学长征医院转化医学中心 上海 200433)

摘要 目的:探讨在不同浓度阿霉素作用下,肺癌细胞株 A549 存活率发生反向变化的可能机制。**方法:**在阿霉素作用于 A549 细胞 24 小时后,采用 MTT 法检测细胞存活情况的变化;用实时定量 RT-PCR 和蛋白印迹法测定 survivin 的 mRNA 和蛋白水平表达;免疫印迹检测 p21 蛋白表达水平,以及流式细胞术检测药物作用后细胞周期变化。进一步用羟基脲阻滞细胞分化于 G1 期,观察阿霉素对细胞的作用情况。**结果:**在不同浓度梯度的阿霉素作用下(由低至高),细胞存活率出现先下降后上升的反弹趋势($P<0.01$),并伴随 survivin 分子的高表达,同时,药物作用下细胞分化更倾向阻滞于 G1 期。**结论:**高浓度阿霉素作用下细胞分化多阻滞于 G1 期,并诱导出现 survivin 分子的高表达,从而增强了对细胞的保护作用,是细胞存活率反向升高的可能原因。

关键词:阿霉素;肺癌细胞株 A549;survivin;细胞周期

中图分类号:R734.2,R730.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2255-04

Mechanism of the Effect on Survival of A549 Cells by Different Concentrations of Adriamycin*

SONG Jie, ZHU Li-shuang, CHEN Jia, LU Hui-qi, HAN Huan-xing[△]

(Translational Medicine Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the potential mechanism of the survival rate of human lung cancer cell line A549 affected by adriamycin. **Methods:** Cells viability was detected by MTT after cells were cultured for 24 hours in presence of adriamycin. Survivin gene expression was detected by quantitative real-time PCR, and western blotting was used to observe protein expression of Survivin and p21, while cell cycle arrest was detected by flow cytometry analysis. Cells viability changes after cell cycle was blocked in G1 phase were observed by hydroxyurea. **Results:** After being cultured under different concentrations of adriamycin treatment (from low to high), cell viability decreased first and then increased ($P<0.01$), and accompanied with survivin overexpression. Flow cytometry analysis confirmed that cell differentiation was more likely to be arrested at G1 phase under treatment of adriamycin. **Conclusion:** High concentration of adriamycin arrested cell differentiation at G1 phase and induced survivin overexpression, which enhanced the protective effect of cells themselves. This may be the reason why cells viability increased instead under high concentration of adriamycin treatment.

Key words: Adriamycin; A549 cell line; Survivin; Cell cycle

Chinese Library Classification(CLC): R734.2,R730.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)12-2255-04

前言

目前,恶性肿瘤是对人类健康和生存构成的最大威胁,大多数明确诊断的肿瘤病人都需要化学药物治疗^[1-3]。而化疗过程中因考虑到化疗药物的副作用和病人的承受力,故选择合理的给药浓度将很大程度上影响疾病治疗的效果^[4-6]。鉴于肺癌近年来的高发、高致死率趋势,本文首选肺癌细胞株进行相关研究。阿霉素(adriamycin 又称 Doxorubicin hydrochloride),是一类蒽环类抗恶性肿瘤药,其抗癌谱广,用于治疗恶性淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、肺癌等疗效好,在临床上较为常用^[7-10]。本研究拟以肺癌细胞株 A549 为模型,以阿霉素为处理剂,探讨不同药物浓度处理细胞后影响细胞存活以及增殖的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

阿霉素购自美国 sigma 公司;A549 细胞株:本研究室已有;1640 培养基和胎牛血清购自 hyclone 公司;MTT 试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;ReverTra Ace qPCR RT Kit 以及 SYBR Green Realtime PCR Master MIX 购自日本 toyobo 公司;survivin 和 p21 兔抗人单抗购自 cell signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 细胞用 1640+10%FBS 血清共培养,80-90% 细胞密度传代,消化用胰酶 +0.25% EDTA,在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱静置培养。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81172805)

作者简介:宋杰,(1986-),男,硕士,主要研究方向为肿瘤耐药,E-mail:songjiethe@yahoo.com.cn

△ 通讯作者:韩焕兴,E-mail:hanhuanxing@sohu.com

(收稿日期:2013-11-21 接受日期:2013-12-20)

1.2.2 MTT 检测细胞存活率 取对数生长期 A549 细胞,接种于 96 孔板,每孔细胞数目为 1×10^4 , 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱静置培养 24 小时,加入不同浓度阿霉素进行处理,药物浓度分别为 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$),按照实验要求设立空白对照组并设立 5 复孔,处理时间为 24 小时后,加入 MTT 孵育 4 小时,去除上清液,加入 DMSO 振荡溶解蓝色结晶 10 min, 490 nm 出测定各孔吸光度值,观察药物对细胞生存的影响。

1.2.3 检测 survivin 表达水平 选择药物浓度 0.1, 0.5, 1, 5, 50 $\mu\text{g/ml}$ 五个药物浓度组,设定无药物组为空白对照;处理时间梯度依次为 4, 8, 16, 24 小时,对不同组和时间点的样本收集,采用 TRIZOL 法提取细胞 RNA,反转录 cDNA,荧光定量 PCR: 50°C 2 min, 95°C 5 min, 1 cycle; 95°C 15 s, 63°C 1 min, 40 cycles;以 GAPDH 为内参,观察 survivin 基因表达水平的变化情况(引物设计如表 1)。另外,采用 western blotting 检测五个药物浓度组处理 24 小时后 survivin 蛋白表达水平的变化。

表 1 survivin, GAPDH 引物序列
Table 1 Quantitative real-time PCR primers

基因	引物序列
survivin	Fwd: GGCTGAAGTCTGGCGTAAGA
	Rev: GGCTAGGGACGACGATGAA
GAPDH	Fwd: AATTCCATGGCACCCTCA
	Rev: TGGACTCCACGACGTACTCA

1.2.4 细胞周期检测 对上述五个浓度组,处理 24 小时后,采用流式细胞分析术对细胞所处周期情况进行观察;通过 western blotting 检测 p21 蛋白表达水平观察细胞周期阻滞情况;进一步选择 hydroxyurea 周期抑制剂将细胞阻滞于 G1 期后(浓度 2 mol/mL 作用 16h),继而观察药物对细胞作用变化情况。

1.2.5 统计学方法 实验所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据,3 组以上数据用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法。检验水平(α)为 0.05。

1.3 统计学方法

本实验所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,分析比较 B、C、D、E 组与对照组(A 组)之间 EPCs 数量、增殖、迁移与粘附能力的差异。采用 SPSS17.0 统计软件处理数据,以上各组检验标准取 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞药物浓度 - 生长曲线

MTT 实验发现不同浓度药物处理 A549 细胞后,细胞存活率出现一个先下降后上升的过程,在高浓度药物组,细胞存活率反弹上升,并且这种变化趋势明显,有统计学意义。具体结果如图 1 所示。

2.2 药物作用后 survivin 基因以及蛋白水平变化

基于在高浓度阿霉素处理后,癌细胞存活率反而出现反向升高的现象,本文对细胞存活有直接影响的 survivin 基因表达以及蛋白水平进行检测,RT-PCR 检测五个药物浓度在不同时

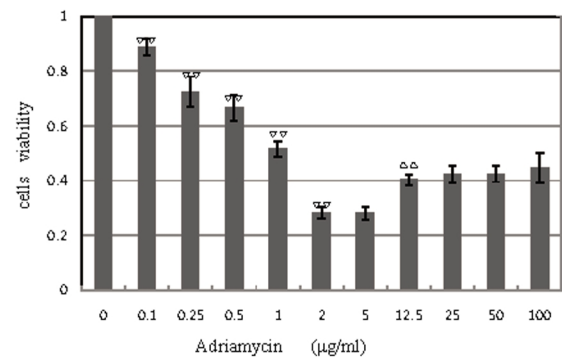


图 1 不同浓度阿霉素刺激 A549 细胞后存活率

Fig.1 Cells viability on different concentration of adriamycin

间点 survivin 基因表达水平变化情况如图 2 所示。survivin 作为促细胞生存基因,其表达量随着浓度的变化,在 4h 的时候,各个组间表达水平差异并不明显,然而在 8h 组表现出先降低,后上升的趋势,各组间差异明显($P < 0.05$);在 16h、24h 组与 8h 组情况类似,未列出。值得注意的是,在浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, survivin 分子基因水平显著上升。而且通过比较可以看到, survivin 分子的这个趋势与细胞生存率变化趋势具有一致性。

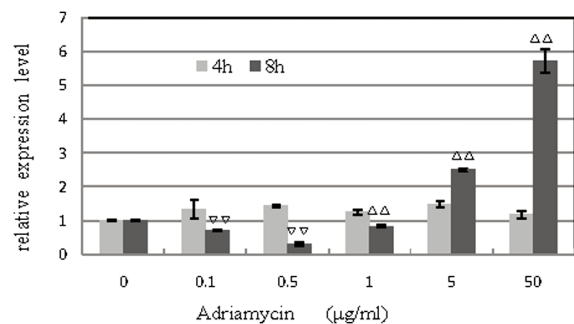


图 2 细胞 survivin 基因表达水平在阿霉素刺激后发生改变

Fig.2 The relative expression level of survivin gene changes after cells stimulated by Adriamycin

进一步采用蛋白印迹,观察五个处理组 24 小时 survivin 蛋白表达水平的变化情况。结果表明, survivin 各个处理组表达水平与基因表达水平趋势一致,也出现了一个先下降后升高的过程。其中,浓度 5, 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, survivin 蛋白表达量升高非常明显。如图 3 所示:

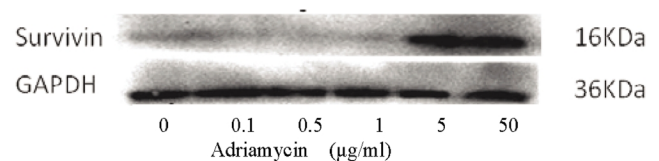


图 3 阿霉素处理细胞 24 小时后 survivin 蛋白表达水平变化情况

Fig.3 The expression of survivin protein changes after stimulating with adriamycin for 24 hours

2.3 药物作用对 A549 细胞周期的影响

对细胞周期结果进行分析:实验中发现,给予药物处理后,细胞多数处于 G0/G1/S 期,处于 G2/M 期细胞数目几乎为 0。处理组随着浓度由低至高,其 G1 期细胞相对比例出现一个先下

降后上升的过程,并且这个过程也是和 MTT 细胞生存率实验结果相似。

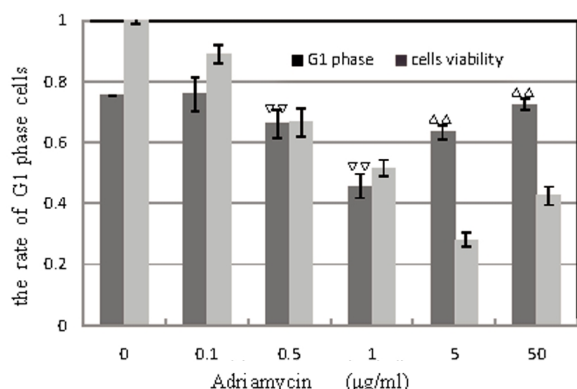


图4 G1 期细胞比例(对照细胞存活率)

Fig.4 The rate of G1 phase cells(compared with cell viability after adriamycin stimulating for 24 hours)

进一步对五个处理组 p21 蛋白表达情况进行观察,发现药物刺激后, p21 相对于未处理组,其表达水平显著升高,提示细胞发生了周期阻滞。结果如图 5 所示。

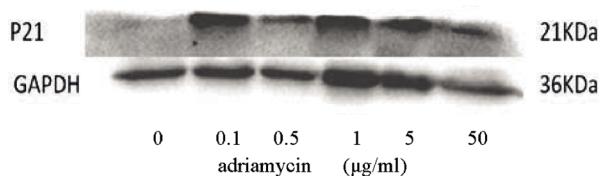


图5 不同浓度阿霉素处理 24 小时后,p21 蛋白表达水平

Fig.5 The expression of p21 protein after adriamycin stimulating for 24 hours

2.4 周期抑制对 A549 存活率的影响

用羟基脲周期抑制细胞至 G1 期,再用阿霉素处理,观察细胞存活率变化情况。图 6 结果显示,将 A549 细胞用羟基脲抑制在 G1 期后,再用阿霉素进行处理,发现阿霉素对细胞作用能力明显降低,说明细胞周期阻滞有助于细胞对阿霉素抗药作用。图 6 结果显示,将 A549 细胞用羟基脲抑制在 G1 期后,再用阿霉素进行处理,发现阿霉素对细胞作用能力明显降低,说明细胞周期阻滞有助于细胞对阿霉素抗药作用。

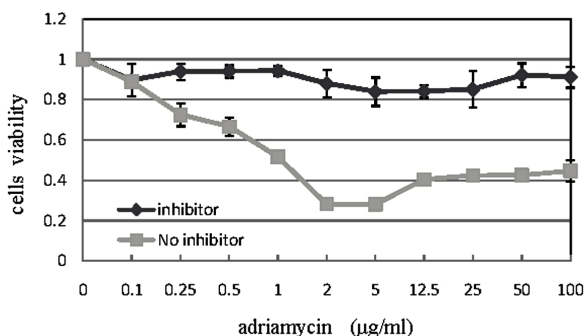


图6 羟基脲抑制细胞周期于 G1 期后,阿霉素对细胞存活率影响(与无抑制剂组对比)

Fig.6 Cells cycle were arrested in G1 phase by hydroxyurea first, then observed cell viability after adriamycin stimulating for 24 hours (compared with no inhibitor)

3 讨论

阿霉素作为一个抗肿瘤药物在临床普遍应用,研究阿霉素用药后产生的耐药机制研究,对于揭示该药本身与其他化疗耐药的某些耐药机制有普遍意义^[12,13]。从本研究中可以看到,不同浓度阿霉素对 A549 细胞抑制能力有差异,由低至高,细胞存活率出现了一个先降低后升高的反弹现象。导致这一现象的原因是什么原因尚不清楚。现有研究支持,在肿瘤细胞株中,细胞周期与肿瘤耐药性的产生关联密切^[14],survivin 是一个抑制细胞凋亡、促进细胞生存的蛋白,可以同时通过调控细胞周期,影响细胞有丝分裂过程,从而对细胞生存起到了保护的作用^[15],而抑制 survivin 分子的表达,可以增强药物的作用能力^[16-18]。

本文设想细胞周期以及 survivin 分子可能参与到这个现象之中。首先对不同浓度阿霉素作用下 survivin 分子表达情况进行观察,发现无论是基因还是蛋白水平,其表达与药物剂量存在相关性,随着药物浓度的持续升高,有一个先下降后上升的趋势;提示 survivin 的表达增加可能促进了细胞的保护作用。研究表明,survivin 与调节细胞周期相关,说明细胞周期调控可能参与到了这个过程^[19,20]。p21 蛋白印迹结果也显示,在阿霉素作用下,p21 蛋白表达量相对对照组明显升高,表明细胞周期阻滞确有发生,进一步流式结果也证实了在不同阿霉素浓度作用情况下,A549 细胞细胞周期停滞在 G1/S 期。按照浓度梯度分析,处于 G1 期细胞比例与 MTT 检测细胞存活率线性趋势一致,提示细胞周期阻滞于 G1 期的情况下,有助于细胞耐受阿霉素的作用,从而保护细胞生存。进而,本文用羟基脲将 A549 细胞阻滞于 G1 期^[21],再用阿霉素进行处理,显示阿霉素对周期阻滞后的细胞作用能力下降明显,细胞整体生存水平大幅上升,并且浓度差异性也不再明显,提示处于 G1 期的 A549 细胞对阿霉素不敏感。

本研究主要以 A549 细胞为模型,探讨了化疗药物阿霉素作用下浓度依赖的敏感性问题,结果提示高浓度阿霉素作用下,会引起细胞周期阻滞,反而降低了对细胞的杀伤作用。通过本研究结果可以对临床合理使用化疗药物剂量提供一定的参考。在后续的研究中,我们将从其它的模型以及化疗药物入手,作进一步的观察和机制研究,以便更深入了解肿瘤耐药性产生的原因。

参考文献(References)

- [1] Kinzler K W, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain [J]. Science, 1998, 280: 1036-1043
- [2] Bissell M J, Radisky D. Putting tumors in context[J]. Nat Rev Cancer, 2001, 1: 46-54
- [3] T.G. Bivona, H. Hieronymus, J. Parker, et al. FAS and NF-κ B signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR [J]. Nature, 2011, 471: 523-526
- [4] Hanagiri T, Sugio K, Baba T, et al. Results of surgical treatment for patients with small cell lung cancer [J]. Thorac Oncol, 2009, 4(8): 964-972
- [5] E Tsvetkova, G D Goss. Drug resistance and its significance for treatment decisions in non-small-cell lung cancer [J]. Curr Oncol, 2012, 19: 845-851

- [6] Ray-Coquard I, Le Cesne A. A role for maintenance therapy in managing sarcoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(5): 368-378
- [7] Lee H, Kim S, Choi B H. Hyperthermia improves therapeutic efficacy of doxorubicin carried by mesoporous silica nanocontainers in human lung cancer cells[J]. *Int J Hyperthermia*, 2011, 27: 698-707
- [8] Chevillard S, Vielh P, Bastian G. Adriamycin uptake and metabolism in organotypic culture of A549 human adenocarcinoma cells according to the exposure time [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1990, 116: 633-638
- [9] Waters SH, Gillibrand A, Berry H, et al. Dose-finding study of weekly docetaxel, epirubicin and capecitabine, as first-line treatment in advanced breast cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 64(2): 407-419
- [10] Schmittl A. Second-line therapy for small-cell lung cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(4): 631-638
- [11] Sartorius U A, Krammer P H. Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(5): 584-592
- [12] Chen W, Wang X, Bai L, et al. Blockage of NF-kappaB by IKK beta or RelA-siRNA rather than the NF-kappaB super-suppressor IkappaB alpha mutant potentiates adriamycin-induced cytotoxicity in lung cancer cells[J]. *Cell Biochem*, 2008, 105: 554-561
- [13] Biton S, Ashkenazi A. NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-alpha feed forward signaling[J]. *Cell*, 2011, 145: 92-103
- [14] Vasilij Koshkin, Sergey N. Correlation between Multi-Drug Resistance-Associated Membrane Transport in Clonal Cancer Cells and the Cell Cycle[J]. *Phase. PLoS ONE*, 2012, 7: 1368-1371
- [15] Mita A C, Mita M M, Nawrocki S T, et al. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 5000-5005
- [16] Chen X Q, Yang S, Li Z Y, et al. Effects and mechanism of downregulation of survivin expression by RNA interference on proliferation and apoptosis of lung cancer cells [J]. *Mol Med Report*, 2012, 5: 917-922
- [17] Liu J L, Wang Y, Jiang J, et al. Inhibition of survivin expression and mechanisms of reversing drug-resistance of human lung adenocarcinoma cells by siRNA[J]. *Chin Med J*, 2010, 123: 2901-2907
- [18] Altieri D C. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer[J]. *Prog Cell Cycle Res*, 2003, 5: 447-454
- [19] Sitko J C, Yeh B, Kim M, et al. SOCS3 regulates p21 expression and cell cycle arrest in response to DNA damage[J]. *Cell Signal*, 2008, 20: 2221-2230
- [20] Ragel B T, Gillespie D L, Kushnir V, et al. Calcium channel antagonists augment hydroxyurea- and ru486-induced inhibition of meningioma growth in vivo and in vitro [J]. *Neurosurgery*, 2006, 59: 1109-1120
- [21] C. Nakanishi, M. Toi. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, 5: 297-309

(上接第 2250 页)

- [15] Shimon Efrat. Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(2): 114-123
- [16] Rovira M, Scott SG, Liss AS, et al. Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas [J]. *PNAS*, 2010, 107(1): 75-80
- [17] Liang Jina, Tao Fenga, Hung Ping Shih, et al. Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel [J]. *PNAS*, 2013, 110(10): 3907-3912
- [18] Robert Lanza, Anthony Atala. *Essentials of Stem Cell Biology*[M]. Elsevier, 2009: 299-305
- [19] Dan Li, Shi-yun Peng, Zhen-wu Zhang, et al. Complete disassociation of adult pancreas into viable single cells through cold trypsin-EDTA digestion [J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2013, 14(7): 596-603
- [20] R. Ian Freshney. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*[M]. Wiley, 2005: 175-197
- [21] 李丹, 冯锐成, 张立新, 等. 通过 G418 处理离体纯化小鼠胰腺上皮细胞[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(12): 2242-2246
- Li Dan, Feng Rui-cheng, Zhang Li-xin, et al. Purification of pancreatic epithelial cells treated with G418 in vitro [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(12): 2242-2246