

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.16.008

高压电场对 A549 细胞中 ABCG2 和 V-ATPase 的表达 及其耐药性的影响 *

宋 涛 王居正 陈 召 狄守印 王武平 张继朋 卢 强[△]

(第四军医大学唐都医院胸外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨高压电场对 A549 细胞中 ABCG2 和 V-ATPase 表达量的影响;探讨高压电场对 A549 细胞耐药性的影响。**方法:**MTT 法测细胞生长曲线,明确能导致细胞可逆性电穿孔的最高电场强度。慢病毒构建 ABCG2 和 V-ATPase 低表达的 A549 细胞系,并用电场处理,用 q-RT-PCR 和 Western-blot 法检测处理前后 ABCG2 和 V-ATPase 的 mRNA 和蛋白表达量的变化。最适强度的高压电场处理各组细胞,在处理前后的细胞中分别加入阿霉素,用高效液相色谱法检测各组细胞中阿霉素浓度。**结果:**当电场强度为 1500 V/cm 时,肿瘤细胞增殖最慢;电场强度为 1500 V/cm 时,肿瘤细胞中 ABCG2 和 V-ATPase 的 mRNA 和蛋白的表达量分别降至对照组的 58%和 61%,具有统计学差异;1500 V/cm 强度的电场可以提高肿瘤细胞内阿霉素的浓度 3-4 倍。**结论:**高压电场可以显著降低肿瘤细胞中 V-ATPase 和 ABCG2 的 mRNA 和蛋白的表达量并降低肿瘤细胞的耐药性。

关键词: 高压电场;非小细胞肺癌;耐药性

中图分类号:R-33; R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)16-3031-04

Effects of High Voltage Electric Field on the Expression of ABCG2 and V-ATPase in A549 Cells and Drug Resistance of A549 Cells *

SONG Tao, WANG Ju-zheng, CHEN Zhao, DI Shou-yin, WANG Wu-ping, ZHANG Ji-peng, LU Qiang[△]

(Department of Thoracic Surgery, TangDu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of high voltage electric field on the expression of ABCG2 and V-ATPase in A549 cells, and to explore the effect of high voltage electric field on drug resistance of A549 cells. **Methods:** The cell growth curves was made by using MTT method to determine the highest electric field strength which can lead to reversible cell electroporation. A549 cell line was treated with virus to downregulation the expression of ABCG2 and V-ATPase. Then, treating each groups with high voltage electric field, the changes of the expression of mRNA and protein of ABCG2 and V-ATPase were detected by using q-RT-PCR and Western-blot methods before and after treatment. Cells were treated with the perfect strength high voltage electric field, adriamycin were added in cells before and after treatment, high performance liquid chromatography method was used to detect adriamycin concentration in each groups. **Results:** When the electric field intensity is 1500V/cm, the proliferation of tumor cells is the slowest and the expression levels of ABCG2 and V-ATPase mRNA in tumor cells decreased to 58% and 61% of the control group, there are statistically significant differences between groups. Then, electric field strength of 1500V/cm can significantly improve the concentration of adriamycin in tumor cells by three to four times. **Conclusion:** High voltage electric field can significantly reduce the expression of mRNA and protein of V-ATPase and ABCG2 in tumor cells and reduce the drug resistance of tumor cells.

Key words: High voltage electric field; Non small cell lung cancer; Drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)16-3031-04

前言

肺癌死亡率逐年上升,居恶性肿瘤之首,其中约 80%是非小细胞肺癌(NSCLC)^[1-3]。由于非小细胞肺癌的转移及侵袭等生物学特性,很多患者在手术后仍会出现局部复发或远处转移^[4-6]。因此化疗在肺癌治疗中占有重要地位,但由于肿瘤细胞的多药耐药(multidrug resistance,MDR),常常导致化疗失败^[7-9]。细胞内药物的外排在肿瘤多药耐药作用中具有十分重要的作用

^[10]。研究肿瘤细胞内化疗药物外排的机制和影响因素,有效阻断或抑制化疗药物的外排,最终可以达到提高化疗效果的目的。研究发现,ABCG2 具有维持细胞膜的稳定性、促进对细胞低氧的保护作用,最终可以引起细胞外排化疗药物^[11,12];V-ATPase 是细胞膜上 H⁺ 主动转运相关蛋白,能维持肿瘤细胞内 pH 的相对稳定,进而影响化疗药物的细胞内浓度^[13-15]。ABCG2 和 V-ATPase 主要是通过维持细胞膜及胞内 pH 稳定促进化疗药物外排,细胞膜蛋白的完整和膜蛋白的稳定是细胞内药物外排

* 基金项目:陕西省科技公关项目(2015SF028)

作者简介:宋涛(1977-),学士,主治医师,主要研究方向:肺癌治疗的相关研究,电话:13619287156,E-mail: taosongst@126.com

[△] 通讯作者:卢强,博士,副主任医师、副教授,主要从事食管癌及肺癌发病及治疗研究,E-mail: luqiang@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-11-21 接受日期:2016-12-16)

的关键环节。

高压电场(High voltage electric field)作用于肿瘤细胞,可以导致细胞膜发生可逆或不可逆的电穿孔作用(electroporation),造成细胞内外电解质平衡的紊乱^[16,17]。但对耐药相关蛋白 ABCG2 和 V-ATPase 的表达以及对肿瘤细胞耐药性有无影响并不清楚。阿霉素是最有效的蒽环类抗生素,也是广谱抗肿瘤药,所以本实验拟采用阿霉素作为检测肺癌细胞耐药性的药物,并用高效液相色谱法(HPLC)检测细胞内阿霉素浓度^[18]。本项目拟采用高压电场处理 ABCG2 和 V-ATPase 下调前后的 A549 肺癌细胞系,并检测 ABCG2 和 V-ATPase 表达量的变化以及细胞对阿霉素的耐药性,来揭示高压电场对 NSCLC 耐药性有无影响,最终为 NSCLC 临床治疗中物理、化学治疗的策略提供新思路。

1 材料与方法

1.1 不同强度高压电场处理细胞,MTT 法测细胞生长曲线,选能导致细胞可逆性电穿孔的最高电场强度

设置五组细胞,分别编号为 1、2、3、4、5,1 号为空白对照,2、3、4、5 组分别施加 500、1000、1500 和 2000 V/cm 的高压电场。每天取固定时间行 MTT 法检测,记录吸光度值。

① 接种细胞:用含 10%胎小牛血清得培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1000-10000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200 μ L。

② 呈色:每天取固定时间,每孔加 MTT 溶液(5 mg/mL 用 PBS 配制,pH=7.4)20 μ L,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。每孔加 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。

③ 比色:选择 490 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,并以空白对照孔调零,共检测 9 天,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

根据生长曲线确定用来处理细胞的最适电场强度。

1.2 慢病毒构建 ABCG2 和 V-ATPase 下调的 A549 细胞系

从吉凯公司订购下调 ABCG2 和 V-ATPase 的慢病毒,以 MOI 为 10 的滴度感染 A549 细胞,十个小时后换常规培养液,培养三至四天,构建 ABCG2 和 V-ATPase 稳定低表达的 A549 细胞系。

1.3 以最适强度电场处理 ABCG2 和 V-ATPase 下调前后的 A549 细胞

培养 ABCG2 和 V-ATPase 下调前后的 A549 细胞系,分别为:① A549 不做处理;② A549- 高压电场;③ A549-ABCG2 下调;④ A549-ABCG2 下调 - 高压电场;⑤ A549-V-ATPase 下调;⑥ A549-V-ATPase 下调 - 高压电场。在细胞生长至指数增长长期时,用最适强度的高压电场处理各组细胞,培养 24 小时后分别提取总 RNA 和总蛋白备用。

1.4 q-RT-PCR 法检测各组中 ABCG2 和 V-ATPase 的 mRNA 表达量

弃培养基,用 PBS 冲洗一遍。每瓶加 1 mL Trizol,静置 1 min,用细胞刮将细胞刮下,放入 1.5 mL LEP 管中,混匀、静置 5 min;随后根据 200 μ L 氯仿静置 3 min 后离心取上液、加等体积异丙醇,-20℃数小时,1 mL75% DEPC 乙醇并重复一次,风干 10 min,20 μ L DEPC 水。用紫外分光光度计测 RNA 浓度,按

反转录试剂盒步骤进行反转录,用反转录得到的 cDNA 以 20 μ L 体系行 q-RT-PCR 检测各组中 ABCG2 和 V-ATPase mRNA 的表达量,反应程序为按 95℃ 10 min、(95℃ 30 s、61℃ 30 s、72℃ 32 s)循环 40 次、95℃ 30 s、61℃ 30 s、95℃ 30 s 程序运行。

重复三次,取平均值,比较各组间有无差异。

1.5 Western-blot 法检测各组中 ABCG2 和 V-ATPase 的蛋白表达量

用上述方法收集细胞,每瓶细胞加入 150 mL 裂解液,裂解 30 min 后离心,取上清液加 1/4 体积的 5 $\times$ Loading buffer,65℃ 水浴 30 min,-80℃ 保存。蛋白定量后,每孔取 20 μ g 加样,80 mV 电泳 10 min、120 mV 电泳 30 min、60 mA 转膜 30 min、6% 脱脂奶粉封闭 2 h、1:1000 的一抗 4℃ 过夜、TBST 洗膜 5 次,5 min 一次、加 1:10000 二抗 37℃ 孵育 1 h、TBST 洗膜 5 次,5 min 一次、加显影剂发光,保存图像,分析灰度值。

1.6 HPLC 法检测高压电场对 A549 细胞耐药性的影响

各组细胞均加入等量的阿霉素处理,参照 Dongzhi Wei^[18]提供的高效液相色谱法(HPLC)操作步骤检测两组细胞内阿霉素浓度,并制作标准曲线,根据标准曲线计算两组待测样本中阿霉素的浓度,重复三次,取平均值。

1.7 统计学分析

应用 SPSS19.0 软件统计分析数据,计量资料数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 P 值<0.05 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 MTT 法绘制不同电场强度下细胞生长曲线

高压电场可以通过使细胞膜表面产生可逆性电穿孔进而影响细胞增殖,随着电场强度增加,细胞增殖减慢,当电场强度为 2000 V/cm 时,细胞发生不可逆性电穿孔死亡,电场强度为 1500 V/cm 时,细胞增殖最慢,故选取 1500 V/cm 电场强度刺激细胞(图 1)。

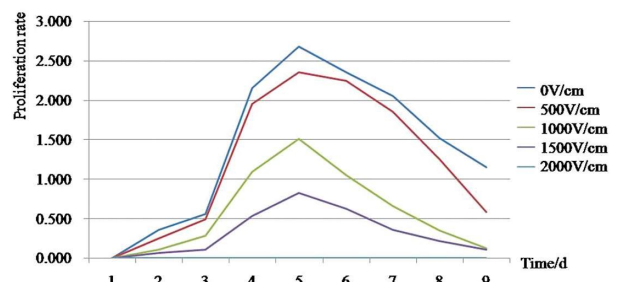


图 1 五组细胞生长曲线图

Fig.1 Cell growth curve of the five groups

2.2 高压电场对 A549 细胞中 mRNA 表达量的影响

分组为① A549 不做处理;② A549- 高压电场;③ A549-ABCG2 下调;④ A549-ABCG2 下调 - 高压电场。q-RT-PCR 结果显示:与第一组相比,第二组细胞经过 1500V/cm 电场处理后,ABCG2 的 mRNA 表达量下降至 58%,两组间有统计学差异;第三组经过慢病毒感染后,ABCG2 表达量下降至 33%;用电场处理 ABCG2 低表达的 A549 细胞系,ABCG2 表达量下降至 9%,显著低于对照组,且显著低于第二组。说明高压电场可以显著降低 A549 细胞中 ABCG2 mRNA

的表达量(图2)。

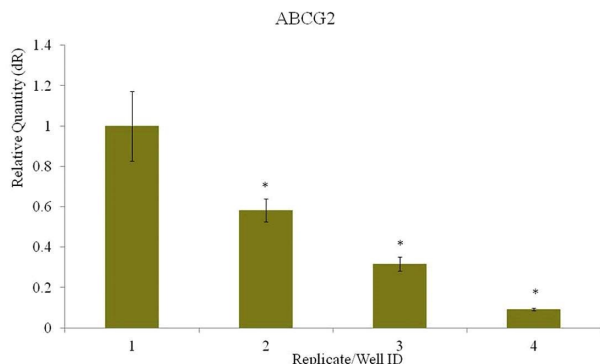


图2 高压电场对 ABCG2 下调前后 A549 细胞中蛋白表达量的影响
Fig.2 Effect of high voltage electric field on the mRNA expression of ABCG2 in A549 cells before and after reduction

2.3 高压电场对 A549 细胞中 mRNA 表达量的影响

分组为① A549 不做处理; ② A549- 高压电场; ③ A549-V-ATPase 下调; ④ A549-V-ATPase 下调 - 高压电场。与第一组相比, 第二组细胞经过 1500V/cm 电场处理后, V-ATPase 的 mRNA 表达量下降至 61%, 两组间有统计学差异; 第三组经过慢病毒感染后, V-ATPase 表达量下降至 29%; 用电场处理 V-ATPase 低表达的 A549 细胞系, V-ATPase 表达量下降至 7%, 显著低于对照组, 且显著低于第二组。说明高压电场可以显著降低 A549 细胞中 V-ATPase mRNA 的表达量(图3)。

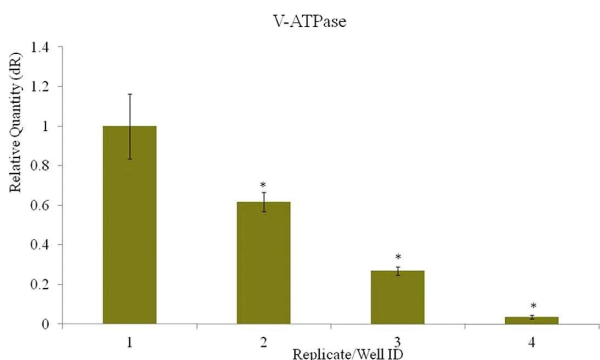


图3 高压电场对 V-ATPase 下调前后 A549 细胞中蛋白表达量的影响
Fig.3 Effect of high voltage electric field on the mRNA expression of V-ATPase in A549 cells before and after reduction

2.4 高压电场对 A549 细胞中 ABCG2 和 V-ATPase 蛋白表达量的影响

Western-blot 结果提示: 经过电场处理后, A549 细胞中 ABCG2 和 V-ATPase 的蛋白表达量显著下降, 且 ABCG2 和 V-ATPase 下调组的表达量显著低于对照组及未下调组, 与 q-RT-PCR 结果一致(图4)。

2.5 高压电场对 A549 细胞耐药性的影响

分组: ① A549 不处理, 为对照组; ② A549- 高压电场; ③ A549-ABCG2 下调; ④ A549-ABCG2 下调 - 高压电场; ⑤ A549-V-ATPase 下调; ⑥ A549-V-ATPase 下调 - 高压电场。高效液相色谱法 (HPLC) 检测结果提示: 高压电场处理后, A549 细胞中阿霉素含量高于对照组两倍, 组间有统计学差异;

ABCG2 下调的 A549 细胞中阿霉素含量高于对照组 1.3 倍, V-ATPase 下调的 A549 细胞中阿霉素含量高于对照组 1.6 倍, 组间有统计学差异; 高压电场处理之后, ABCG2 下调的 A549 细胞中阿霉素含量高于对照组 4 倍, V-ATPase 下调的 A549 细胞中阿霉素含量高于对照组 3.5 倍, 组间有统计学差异。说明高压电场可以通过下调 A549 细胞中 ABCG2 和 V-ATPase 的表达量, 降低了细胞膜稳定性和胞内 pH 稳定性, 进而抑制 A549 细胞对阿霉素的耐药性(图5)。

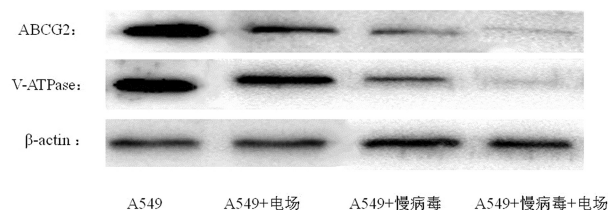


图4 高压电场对 ABCG2 和 V-ATPase 下调前后 A549 细胞中蛋白表达量的影响

Fig.4 Effect of high voltage electric field on the protein expression of ABCG2 and V-ATPase in A549 cells before and after reduction

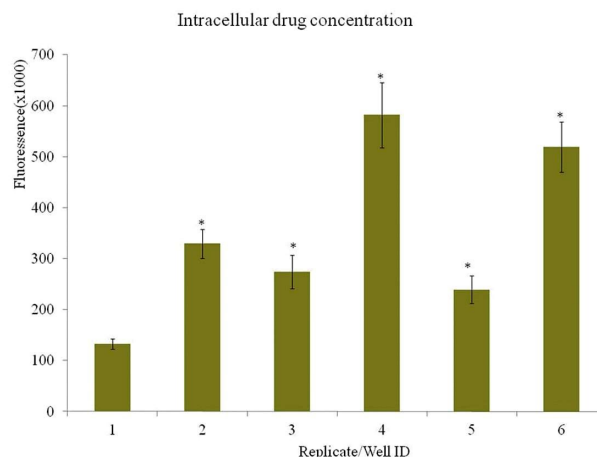


图5 高压电场对 ABCG2 和 V-ATPase 下调前后 A549 细胞耐药性的影响

Fig.5 Effect of high voltage electric field on A549 cell resistance before and after ABCG2 and V-ATPase down regulated

3 讨论

目前对于中晚期肺癌患者, 化疗和靶向治疗是临床应用的主要手段, 而对于没有发生基因突变的患者, 化疗成为了用于延长患者生命的主要手段^[19-21]。然而, 几乎所有患者在应用化疗药几个疗程之后都会出现不同程度的化疗药物耐药, 有部分患者在换药后会出现多药耐药, 这对于肺癌患者来说无疑是致命的^[7-9]。因而, 如何防止肺癌患者对化疗药物产生耐药或降低患者的耐药程度, 提高化疗药的疗效是临床研究的重点。针对化疗药物耐药所进行的科学研究不计其数, 有的研究认为, 通过辅助用药可以提高肿瘤细胞内化疗药物浓度^[22], 但是辅助用药既增加的病人的经济负担和身体负担, 又不能大幅度提高化疗效果, 所以在临床上应用并不广泛。也有研究表明^[11-15], V-ATPase 和 ABCG2 在肿瘤细胞耐药方面发挥重要作用, V-ATPase

可以通过影响肿瘤细胞周围的 pH 值而增加肿瘤细胞的耐药性;ABCG2 可以通过促进肿瘤细胞内的化疗药物外排而增加肿瘤细胞耐药性。对于肿瘤患者,如果能够降低这二者的表达量,将会在很大程度上降低患者的耐药性。

近几年国内外关于高压电场的研究近乎火热,根据研究报道^[23],高压电场在不同的电场强度下,可以对肿瘤细胞膜造成可逆性电穿孔或不可逆性电穿孔,可逆性电穿孔可以对肿瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭能力产生不同程度的影响,不可逆性电穿孔可直接导致肿瘤细胞死亡。本课题组在已有研究基础上进行大胆假设,既然一定强度的高压电场可以导致肿瘤细胞表面发生可逆性电穿孔,那么,能否利用这些穿孔促进肿瘤细胞对化疗药物的吸收呢?以及高压电场在破坏细胞膜的同时,能否影响 V-ATPase 和 ABCG2 的表达呢?基于此猜想,本课题组进行了一系列的实验,前期实验结果表明,当电场强度为 2000V/cm 时,肿瘤细胞死亡,说明 2000 V/cm 的电场强度可以导致肿瘤细胞膜发生不可逆性电穿孔,致使细胞死亡;当电场强度为 1500 V/cm 时,肿瘤细胞增殖最慢,说明该电场强度是能够导致肿瘤细胞发生可逆性电穿孔的最高强度,故选取 1500 V/cm 作为后续实验刺激细胞的电场强度。通过对比电场刺激前后肿瘤细胞中 V-ATPase 和 ABCG2 的 mRNA 和蛋白表达量变化可以发现,1500 V/cm 的电场强度可以显著降低肿瘤细胞中 V-ATPase 和 ABCG2 的 mRNA 和蛋白的表达量。另外,1500 V/cm 强度的电场可以显著提高肿瘤细胞内阿霉素的含量,这说明高压电场可以显著提高肿瘤细胞的耐药性,但是机制并不明确。由于高压电场可以造成细胞膜表面穿孔,同时可以降低 V-ATPase 和 ABCG2 的表达量,根据此研究结果猜测,高压电场可以通过两个途径降低肿瘤细胞耐药性:高压电场通过使细胞膜表面发生可逆性电穿孔增加化疗药物进入细胞内的量;高压电场降低了 V-ATPase 和 ABCG2 的表达量,影响了肿瘤细胞周围的 pH 值并降低了肿瘤细胞对化疗药物的外排作用,从而大幅度增加了肿瘤细胞内化疗药物的量,降低了肿瘤细胞的耐药性。

本实验创新性的将高压电场应用于肿瘤细胞耐药性的研究,并取得了可喜的成果,在后续的实验中,本课题组拟进行动物实验,在动物水平验证高压电场对肿瘤组织增殖以及耐药性的作用,争取为化疗耐药的肿瘤患者带来福音。

参考文献(References)

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. 2016, 66(1): 7-30
- [3] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 893: 1-19
- [4] Nascimento AV, Bousbaa H, Ferreira D, et al. Non-Small Cell Lung Carcinoma: An Overview on Targeted Therapy[J]. Curr Drug Targets, 2015, 16(13): 1448-1463
- [5] Beasley MB, Dembitzer FR, Flores RM. Surgical pathology of early stage non-small cell lung carcinoma[J]. Ann Transl Med, 2016, 4(12): 238
- [6] Sakashita S, Sakashita M, Sound Tsao M. Genes and pathology of non-small cell lung carcinoma[J]. Semin Oncol, 2014, 41(1): 28-39
- [7] Meneses JC, Avila Martí nez RJ, Ponce S, et al. Treatment of non-small cell lung carcinoma in early stages [J]. Cir Esp, 2013, 91 (10): 625-632
- [8] Burdett S, Pignon JP, Tierney J, et al. Adjuvant chemotherapy for resected early-stage non-small cell lung cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, (3): CD011430
- [9] Pilkington G, Boland A, Brown T, et al. A systematic review of the clinical effectiveness of first-line chemotherapy for adult patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer [J]. Thorax, 2015, 70(4): 359-367
- [10] Horsey AJ, Cox MH, Sarwat S, et al. The multidrug transporter? ABCG2: still more questions than answers [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(3): 824-830
- [11] Westover D, Li F. New trends for overcoming ABCG2/ BCRP-mediated resistance to cancer therapies [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34: 159
- [12] Ichida K. Recent progress and prospects for research on urate efflux transporter ABCG2[J]. Nihon Rinsho, 2014, 72(4): 757-765
- [13] Daniel C, Bell C, Burton C, et al. The role of proton dynamics in the development and maintenance of multidrug resistance in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(5): 606-617
- [14] Pé rez-Sayá ns M, Somoza-Martí n JM, Barros-Angueira F, et al. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases[J]. Cancer Lett, 2010, 295(2): 135-143
- [15] Pé rez-Sayá ns M, Somoza-Martí n JM, Barros-Angueira F, et al. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment [J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35(8): 707-713
- [16] Batista Napotnik T, Rebersek M, Vernier PT, et al. Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eukaryotic cells (in vitro): A systematic review[J]. Bioelectrochemistry, 2016, 110: 1-12
- [17] Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research[J]. Acta Physiol Scand, 2003, 177 (4): 437-447
- [18] Wei D, Mei Y, Liu J. Quantification of doxorubicin and validation of reversal effect of tea polyphenols on multidrug resistance in human carcinoma cells[J]. Biotechnol Lett, 2003, 25(4): 291-294
- [19] Hong QY, Wu GM, Qian GS, et al. Prevention and management of lung cancer in China[J]. Cancer, 2015, 121(Suppl 17): 3080-3088
- [20] Hou J, Wang H, Zhang G, et al. Diagnosis and Treatment of Multiple Primary Lung Cancer [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2015, 18 (12): 764-769
- [21] Rothschild SI. Advanced and Metastatic Lung Cancer-What is new in the Diagnosis and Therapy?[J]. Praxis (Bern 1994), 2015, 104(14): 745-750
- [22] 唐文. 灵芝酸 T 提高多药耐药性肿瘤细胞对阿霉素敏感性的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25: 1052-1055
Tang Wen. Ganoderic acid T improves sensitivity of multidrug resistant KB-A-1 /Dox cells to doxorubicin [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25: 1052-1055
- [23] 卢强, 黄立军, 韩勇, 等. 不同强度高压电场对 A549 肺癌细胞肿瘤生物学特性的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(14): 2669-2673
Lu Qiang, Huang Li-jun, Han Yong, et al. Different effects of high voltage electric field on the biological characteristics of A549 lung cancer cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13 (14): 2669-2673