

网络出版时间: 2021-05-14 15:16 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1448.006.html>

低氧降低肺癌 A549 细胞对培美曲塞的药物敏感性

葛若木¹, 魏翔², 孙晓梅¹, 周青¹, 汪渊¹, 张素梅¹

摘要 目的 研究低氧环境下非小细胞肺癌 A549 细胞对化疗药物培美曲塞 (Pe) 敏感性变化的影响。方法 将 A549 细胞分组培养, 分为常氧对照组、常氧溶剂组、常氧加药组、低氧细胞组、低氧溶剂组、低氧加药组。用 MTT 法检测 Pe 对 A549 细胞增殖能力的影响, 并筛选出 Pe 的适宜实验浓度; 用 Hoechst 染色观察 6 组细胞凋亡情况; 用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 p53 的表达情况。结果 MTT 结果显示, 与常氧对照组相比, 经 Pe 处理后的细胞抑制率逐渐升高 ($P < 0.05$), A549 细胞的抑制率与 Pe 作用时间和浓度呈正比。Hoechst 染色结果显示, 与常氧对照组相比, 常氧加药组的细胞凋亡率增高 ($P < 0.05$); 而与常氧加药组相比, 低氧加药组的细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。Western blot 实验显示, 与常氧对照组相比, 常氧加药组的 p53 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 低氧加药组的 p53 蛋白表达变化不明显, Bcl-2 蛋白表达减少 ($P < 0.05$); 与低氧对照组相比, 低氧加药组的 p53 蛋白表达变化不明显, 而 Bcl-2 蛋白表达减少 ($P < 0.05$)。结论 低氧环境降低了 Pe 对非小细胞肺癌 A549 细胞的凋亡作用, 从而降低了 A549 细胞对 Pe 的敏感性。

关键词 非小细胞肺癌; 培美曲塞; 低氧

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0866-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.006

肺癌严重危害人类的健康, 其发病率、病死率都位居世界首位^[1]。肺癌的分类有很多种, 其中按照组织病理学分类可分成非小细胞肺癌 (NSCLC) 和小细胞肺癌 (SCLC)。抗叶酸制剂培美曲塞 (pemetrexed, Pe) 是肺癌的常用化疗药物, 这种化疗药物结构上含有核心为吡咯嘧啶的基团, 作用是破坏细胞内叶酸依赖性的正常代谢过程, 抑制细胞 DNA 复制, 进而抑制肿瘤的生长。并且 Pe 在一定剂量范围内对肺癌细胞增殖有抑制作用且随药物浓度增加而增强^[2-3]。目前临床上 Pe 作为一线抗癌药物已经被广泛应用, 且化疗药物 Pe 对非小细胞肺癌的疗效十分显著, 而化疗药物用药过程中遇到的主要问题就是肿瘤细胞对化疗药物产生耐药。肿瘤微环境的常见情况是不同程度的低氧, 且低氧对 Pe 耐药有影响作用^[4]。该研究利用模拟物理低氧环境, 研究低氧环境下非小细胞肺癌 A549 细胞对化疗药物 Pe 耐药的影响机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 A549 细胞购自美国 ATCC 细胞库; RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青公司; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司; BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; 一抗 Bax、Caspase-3、Bcl-2、p53、NF- κ B 购自美国 Millipore 公司; 山羊抗鼠、

2021-03-22 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1708085MH212)

作者单位: ¹ 安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室, 合肥 230032

² 合肥市第二人民医院高压氧科, 合肥 230011

作者简介: 葛若木, 女, 硕士研究生;

张素梅, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 379236778@qq.com

immunohistochemistry technique, respectively. **Results** Compared with those in the control group, the serum levels of total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high density lipoprotein (HDL) in the model group significantly increased, and the level of leptin significantly reduced ($P < 0.01$). Results of HE staining showed that the neurons in the DG, CA3 and CA1 regions of model rats were irregular in shape, loosely arranged, and hyperchromatic in nuclei. Consistently, the neurons in DG, CA3 and CA1 regions of the model rats were also hyperchromatic via silver staining. Compared with that in the hippocampus of control rats, the mRNA and protein expression of Syn-1 in the model group was significantly lower. **Conclusion** High-fat diet can induce hyperlipidemia, hippocampal neuron damage, and decrease expression of synaptic binding protein Syn-1 in the hippocampus of rats.

Key words high-fat diet; dyslipidaemia; hyperlipidaemia; Synapsin-1

山羊抗兔、兔抗山羊二抗购自美国 Millipore 公司。

1.2 主要仪器 酶标仪(型号: Thermo Multiskan-GO, 美国 Thermo-Fisher 公司); 低温离心机(型号: Sorvall Legend Micro 21R, 美国 ThermoFisher Scientific 公司); 电泳仪(型号: DYY-41, 北京六一仪器厂); -80 °C 冰箱(型号: MDF-U73V, 日本 Sanyo 公司); CO₂ 细胞培养箱(型号: MCO-20AIC, 日本 Panasonic 公司); 超净工作台(型号: SW-CJ-4F 型, 苏州净化设备有限公司); 正置显微镜(型号: DM4000B, 德国 Leica 公司); 电子天平(型号: DC-120AS, 南京苏测计量仪器有限公司); 摇床(TS-1 型, 海门其林贝尔仪器制造有限公司); 全自动数码凝胶成像系统(型号: ChemiQ4600, 上海欧翔公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞的培养 从液氮中取出冻存的 A549 细胞, 在 37 °C 水浴中复苏, 用 RPMI 1640 培养基(10% FBS、1% 青链霉素混合液)于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 当细胞密度达到 80% 左右时, 用 0.25% 胰酶进行消化传代。

1.3.2 低氧处理 将低氧组细胞放置于 37 °C、5% CO₂、1% O₂ 恒温培养箱中培养 48 h。

1.3.3 细胞分组 将 A549 细胞分为 6 组: 常氧对照组, 细胞常规培养未做任何处理; 常氧溶剂组, A549 细胞培养基中加入 DMSO 后常氧培养; 常氧加药组, 在完全培养基中加入 Pe, 配制成 8 μmol/L Pe 溶液, 将 A549 细胞置于常氧中培养; 低氧细胞组, A549 常规培养, 置于低氧培养箱中; 低氧溶剂组, A549 细胞培养基中加入 DMSO 后低氧培养; 低氧加药组, 在完全培养基中加入 Pe, 配制成 8 μmol/L Pe 溶液, 并将 A549 细胞置于低氧培养箱中培养。

1.3.4 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法 用完全培养基培养 A549 细胞至对数生长期, 然后消化细胞。1 000 r/min 离心 7 min, 收集沉淀的细胞。用完全培养基重悬离心管中的细胞沉淀, 制备成单细胞悬液, 并计数。在 96 孔培养板中接种细胞, 每个孔大约 3 000 个, 共计种 3 块 96 孔培养板, 然后置于常氧培养箱中继续培养, 至细胞贴壁, 约 8 h。用完全培养基配置成不同药物浓度(1、2、4、8、16、32、64 μmol/L), 然后用这些不同药物浓度的培养基进行换液, 另外设置细胞对照组和溶剂对照组, 前者用不加药物的完全培养基进行换液, 后者用加入 DMSO 溶剂的完全培养基进行换液。3 块培养板分别置于常氧培养箱中继续培养 24、48、72 h, 然后每孔加入 20 μl MTT 试剂, 在细胞

培养箱内继续孵育 4 h。随后取出培养板, 将每孔中的培养基用枪头吸出, 然后每个孔再加入 100 μl DMSO, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定各孔吸光度。

1.3.5 Hoechst 染色 将洁净盖玻片高压灭菌后于 70% 乙醇中浸泡, 移入超净台内用酒精灯烘干。将盖玻片夹除放于 6 孔板内, 然后种入细胞, 大约 50% 的密度。再分别用完全培养基、加入 DMSO 和 Pe 的完全培养基换液培养 48 h, 将培养基吸出, 加 0.5 ml 固定液, 10 min 后弃去固定液, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗 3 min, 共 2 遍后吸出 PBS。PBS 洗涤时用摇床晃动。加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min。用摇床晃动数次, 弃去染色液, PBS 洗 3 min, 共 2 遍后吸出 PBS。洗涤时用摇床晃动。在载玻片上滴 1 滴抗荧光淬灭封片液, 细胞的一面盖向载玻片, 让细胞接触封片液, 注意不要有气泡产生。用荧光显微镜观察, 激发波长 350 nm 左右, 发射波长 460 nm 左右。

1.3.6 Western blot 检测 A549 细胞在 6 孔板内生长密度达 80% 后, PBS 洗 3 次, 将长满 A549 细胞的 6 孔板放在冰上, 加 100 μl 含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液, 裂解 30 min 后, 用细胞刮将贴壁的细胞刮下来, 收集细胞蛋白于 EP 管中, 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度。根据测出的蛋白浓度数值, 将不同分组的细胞, 用蛋白裂解液配成同体积同浓度液体, 再加上蛋白上样缓冲液, 混匀, 然后煮沸使蛋白变性, -80 °C 保存。配制 SDS-PAGE 凝胶, 蛋白上样进行电泳, 每组蛋白上样量保持一致, 然后转移到 PVDF 膜上。置于封闭液中在摇床上室温封闭 2 h, 封闭液为 5% 脱脂牛奶, 一抗 4 °C 摇床孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h 后进行显影。用 QuantityOne 软件分析各条带的灰度值, 并计算。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析, 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验适宜的 Pe 浓度筛选 用 MTT 比色法筛选 Pe 适宜实验使用浓度。8 μmol/L Pe 对 A549 细胞的增殖有抑制作用, 并与作用时间和作用浓度呈正比, 在 8 μmol/L 的药物浓度下作用 48 h 后, A549 细胞的抑制率达到 30% 左右, 因此选取此浓度作为实验的药物浓度。见图 1。

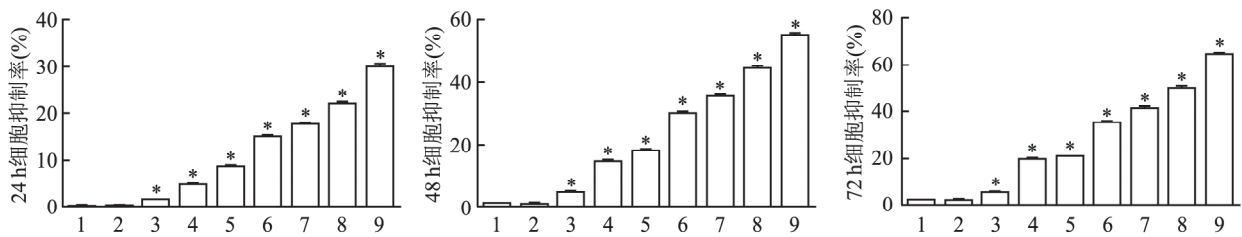
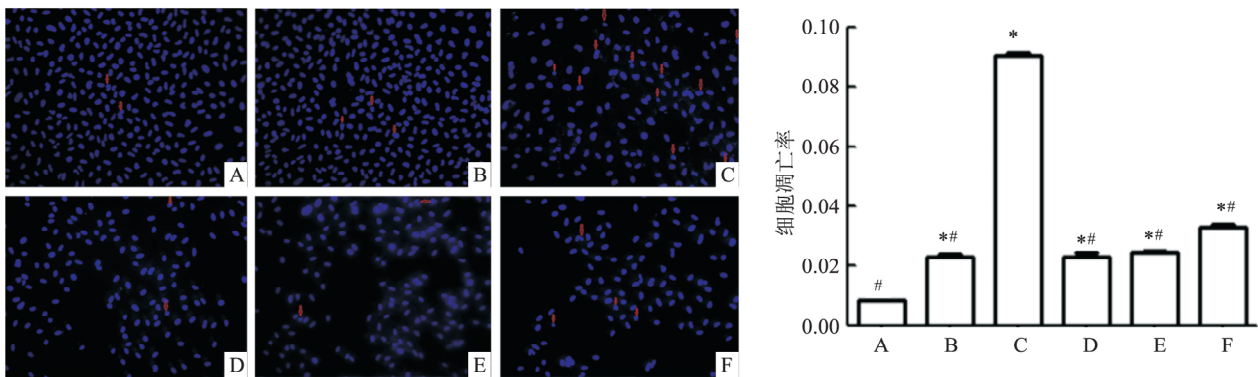


图1 Pe 分别作用 A549 细胞 24、48、72 h 后细胞的相对抑制率

1: 常氧对照组; 2: 常氧溶剂组; 3: 1 $\mu\text{mol/L}$ Pe 组; 4: 2 $\mu\text{mol/L}$ Pe 组; 5: 4 $\mu\text{mol/L}$ Pe 组; 6: 8 $\mu\text{mol/L}$ Pe 组; 7: 16 $\mu\text{mol/L}$ Pe 组; 8: 32 $\mu\text{mol/L}$ Pe 组; 9: 64 $\mu\text{mol/L}$ Pe 组; 与常氧对照组比较: * $P < 0.05$

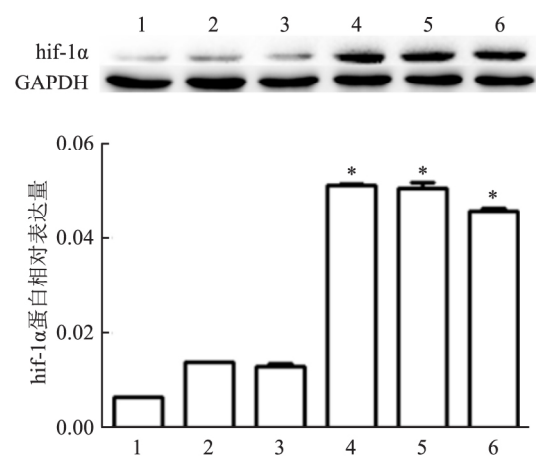
图2 A549 细胞作用于 Pe 后在常氧和低氧培养箱 48 h 后细胞的凋亡率 Hoechst 33258 染色 $\times 400$

A: 常氧对照组; B: 常氧溶剂组; C: 常氧加药组; D: 低氧对照组; E: 低氧溶剂组; F: 低氧加药组; 与常氧对照组比较: * $P < 0.05$; 与常氧加药组比较: # $P < 0.05$

2.2 A549 细胞于 Pe 作用后在低氧环境与常氧环境下细胞凋亡率比较 常氧环境下, 与常氧对照组相比, 常氧加药组 A549 细胞的凋亡率升高, 凋亡率约为 9%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而在低氧环境下, 低氧加药组 A549 细胞的凋亡率较常氧下降, 凋亡率约为 3%, 与常氧对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 A549 细胞在低氧培养箱培养 48 h 后低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , hif-1 α) 蛋白表达量表达 常氧组与低氧组的各 3 组细胞分别置于常氧培养箱和低氧培养箱中培养 48 h, 与常氧对照组比较: 低氧培养箱中的 3 组细胞 hif-1 α 的表达升高, 差异有统计学意义 ($F = 1150.932$, $P < 0.05$)。见图 3。

2.4 低氧环境中, 加入 Pe 后, A549 细胞中促凋亡蛋白 Bax、p53 表达量变化 在低氧环境下, 低氧加药组促凋亡蛋白 Bax 表达量较常氧加药组减少 ($F = 860.017$, $P = 0.018$)。在常氧环境下, 常氧加药组 Bax、p53 蛋白的表达量升高 ($F = 860.017$, 19601.811 , $P < 0.05$)。而低氧环境下, 低氧加药组的 p53 蛋白表达量远远低于常氧加药组 ($F = 19601.811$, $P < 0.05$)。见图 4A、B。

图3 低氧培养箱培养 48 h 后 hif-1 α 蛋白表达量

1: 常氧对照组; 2: 常氧溶剂组; 3: 常氧加药组; 4: 低氧对照组; 5: 低氧溶剂组; 6: 低氧加药组; 与常氧对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 低氧环境下, Pe 作用于 A549 细胞后, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量变化 常氧环境下, Pe 作用于 A549 细胞 48 h 后, 常氧加药组 Bcl-2 蛋白较常氧对照组表达减少, 差异有统计学意义 ($F = 485.856$, $P < 0.05$)。低氧环境下, 低氧加药组 Bcl-2 蛋白表达较常氧加药组差异无统计学意义, 但是低氧对照组的 Bcl-2 蛋白表达量较常氧对照组降低 ($F = 485.856$,

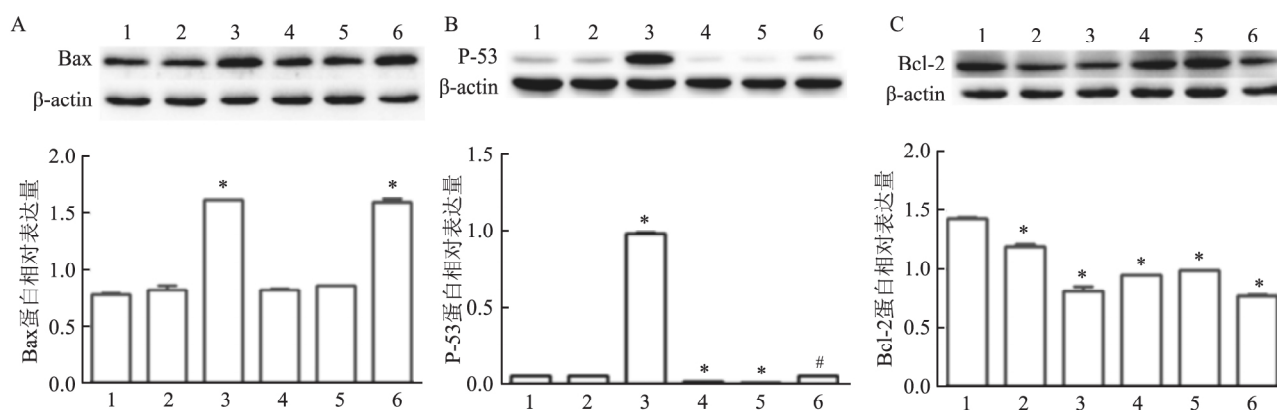


图4 Pe作用于A549细胞48 h后,在常氧和低氧环境下Bax、p53、Bcl-2蛋白表达量

A: Bax蛋白表达的相对灰度值; B: p53蛋白表达的相对灰度值; C: Bcl-2蛋白表达的相对灰度值; 1: 常氧对照组; 2: 常氧溶剂组; 3: 常氧加药组; 4: 低氧对照组; 5: 低氧溶剂组; 6: 低氧加药组; 与常氧对照组比较: * $P < 0.05$; 与常氧加药组比较: # $P < 0.05$

$P < 0.05$)。见图4C。提示低氧环境下,加药后Bcl-2蛋白表达降低幅度要小于常氧环境下。

3 讨论

非小细胞肺癌是最常见的肺癌类型,约占所有肺癌的80%。化疗药物Pe是一种新型抗叶酸制剂,常用于晚期非小细胞肺癌的治疗^[2]。肿瘤的内环境常处于低氧状态,低氧对肿瘤的生长、增殖、迁移和凋亡都有不同程度的影响。而hif-1 α 是低氧反应最关键的因子,调节肿瘤细胞的代谢、增殖和血管生成等^[5]。近年来,有研究^[6]表明在低氧环境下,叶酸抑制了核hif-1 α 的积累,且呈剂量依赖性。低氧条件下叶酸通过PI3K/AKT/hif-1 α 途径促进细胞自我保护,体内的低氧环境会对抗叶酸制剂的作用产生影响,所以对Pe耐药机制的研究必须考虑低氧环境对其影响。近年来,细胞凋亡与抗癌药物相互作用的研究越来越多,大量研究^[7]表明凋亡是化疗药物引发细胞死亡的主要方式,凋亡成为化疗药物研究和抗肿瘤研究的新焦点。凋亡是多方面因素控制的过程,有多个基因参与,如Bcl-2家族、抑癌基因p53等。在人类癌症中,约有50%以上的癌症具有抑癌基因p53突变,从而导致p53蛋白积聚并失去激活调节细胞周期和凋亡的靶基因的功能^[8]。低氧与p53蛋白活性之间存在相互影响的关系,并且p53蛋白与顺铂耐药和hif-1 α 之间也有联系^[9-10]。除此之外,Bcl-2家族也参与凋亡的形成和抑制。

本研究用低氧培养箱模拟物理低氧环境,观察常氧和低氧环境下肺癌细胞A549的增殖以及凋亡

情况。结果显示,常氧环境下,Pe对A549细胞的增殖起到抑制作用,并促进肺癌细胞A549凋亡。而在低氧环境下,Pe的这些作用受到抑制,说明低氧环境减弱了Pe的抗肿瘤作用,且这可能是造成肺癌细胞对Pe耐药的原因之一。该研究表明,常氧环境下,促凋亡蛋白Bax、p53在Pe作用下表达量升高,而抗凋亡Bcl-2蛋白表达减少($P < 0.05$),说明Pe对A549细胞有促凋亡的作用;而常氧环境下在Pe作用后,抗凋亡Bcl-2蛋白表达减少($P < 0.05$),也说明了Pe减少了A549细胞的抗凋亡作用。但是低氧加药组p53蛋白的表达量较常氧加药组的表达量降低,且与低氧对照组无差异,说明低氧环境使得Pe的促凋亡作用受到了抑制。常氧和低氧环境下,加入Pe后,抗凋亡Bcl-2蛋白的表达量均减少,但是在低氧环境中,Bcl-2蛋白表达量的减少程度小于常氧环境中,说明了在Pe作用后,低氧环境下的A549细胞的抗凋亡作用受到了抑制。这都说明了低氧环境可能减少A549细胞对Pe的敏感性。

综上所述,Pe对肺癌A549细胞的增殖具有抑制作用,并促进A549细胞凋亡,而低氧环境会减弱Pe对A549细胞的促凋亡作用。低氧环境对Pe的作用,很可能是通过降低其促凋亡作用来产生的。低氧诱导的凋亡抵抗可能使A549细胞对化疗药物Pe的敏感性降低。该研究只用了1种肺癌细胞A549,在后续的实验中,继续对其他的肺癌细胞株进行研究,以进一步论证低氧环境下肺癌细胞对Pe敏感性的影响。

参考文献

[1] 陈万青,李贺,孙可欣,等. 2014年中国恶性肿瘤发病和死

- 亡分析[J]. 中华肿瘤杂志 2018 40(1): 5-13.
- [2] Liu T Z, Jin L Z, Lu W J, et al. Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of icotinib and pemetrexed in human lung cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 148.
- [3] Tomasini P, Barlesi F, Mascaux C, et al. Pemetrexed for advanced stage nonsquamous non-small cell lung cancer: latest evidence about its extended use and outcomes [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2016, 8(3): 198-208.
- [4] Raz S, Sheban D, Gonen N, et al. Severe hypoxia induces complete antifolate resistance in carcinoma cells due to cell cycle arrest [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2): e1067.
- [5] Gilkes D M, Semenza G L, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(6): 430-9.
- [6] Huang X Y, He Z Y, Jiang X W, et al. Folic acid represses hypoxia-induced inflammation in THP-1 cells through inhibition of the PI3K/Akt/HIF-1 α pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151553.
- [7] 袁 卉, 郝吉庆. SAHA 联合厄洛替尼对 H1975 肺癌裸鼠移植瘤生长的影响及作用机制的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2019 54(4): 528-34.
- [8] Mir R, Masroor M, Javid J, et al. Clinical implications of cytosine deletion of exon 5 of p53 gene in non small cell lung cancer patients [J]. *South Asian J Cancer*, 2016, 5(1): 33-6.
- [9] Humpton T J, Vousden K H. Regulation of cellular metabolism and hypoxia by p53 [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(7): a026146.
- [10] Zhang X F, Qi Z H, Yin H J, et al. Interaction between p53 and Ras signaling controls cisplatin resistance *via* HDAC4- and HIF-1 α -mediated regulation of apoptosis and autophagy [J]. *Theranostics*, 2019 9(4): 1096-114.

The reduced sensitivity of pemetrexed on lung cancer cells A549 under hypoxic condition

Ge Ruomu¹, Wei Xiang², Sun Xiaomei¹, et al

(¹Laboratory of Molecular Biology and Dept of Biochemistry, Anhui Medical University, Key Lab of Genome Research of Anhui Province, Hefei 230032; ²Dept of Hyperbaric Oxygen, Hefei Second People's Hospital, Hefei 230011)

Abstract Objective To study the effect of non-small cell lung cancer (A549 cells) on the sensitivity of the chemotherapy drug pemetrexed (Pe) under hypoxia environment. **Methods** The A549 cell line was cultured in groups and divided into cell control group, normoxia solvent group, normoxia dosing group, hypoxia cell group, hypoxia solvent group and hypoxia dosing group. First, MTT was used to detect the effect of Pe on the proliferation of A549 cells, thereby screening out the suitable experimental concentration of Pe. Then Hoechst staining was used to observe the apoptosis of these six cell groups. Later, Western blot was applied to detect the expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, and p53. **Results** MTT results showed that compared with the normoxia control group, the cell inhibition rate after Pe treatment gradually increased ($P < 0.05$), and the inhibition rate of A549 cells was directly proportional to the action time and concentration of Pe. The results of Hoechst staining indicated that cell apoptosis rate increased in the normoxia-dosed group compared with the normoxia control group ($P < 0.05$). But compared with normoxia-dosed group, the cell apoptosis rate decreased under hypoxic environment ($P < 0.05$). Western Blot experiment showed an increase in p53 protein and a decrease in Bcl-2 protein expression in the normoxia dosing group compared to the normoxia control group ($P < 0.05$). There was no change of p53 protein expression identified in the hypoxia dosing group, but Bcl-2 protein expression decreased ($P < 0.05$); compared with the hypoxic cell group, Bcl-2 protein expression decreased ($P < 0.05$) in the hypoxia dosed group, while p53 protein expression was unchanged. **Conclusion** Hypoxia environment reduces the apoptotic effect of Pe on non-small cell lung cancer A549 cells, and thus reducing the sensitivity of A549 cells to pemetrexed.

Key words non-small cell lung cancer; pemetrexed; hypoxic