

硒化壳聚糖抑制耐多柔比星 K562 细胞增殖及对 PI-3K/Akt 信号通路的影响^Δ

邓守恒*, 王贤和, 袁选举, 李芳, 李林均, 陈萍[#](湖北医药学院附属人民医院肿瘤中心, 湖北十堰 442000)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2707-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.08

摘要 目的:研究硒化壳聚糖对慢性粒细胞白血病耐多柔比星细胞株(K562/DOX)增殖的影响,探讨其与磷脂酰肌醇-3激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(PI-3K/Akt)信号通路的关系。方法:将K562/DOX细胞分为阴性对照组、DOX组(50 μg/ml DOX)和25、50、100、200、400 μg/ml 硒化壳聚糖(50 μg/ml DOX+相应浓度的硒化壳聚糖)组,每组4个复孔,作用12、24、36 h后,应用MTT法和克隆形成法检测硒化壳聚糖对细胞增殖的影响并计算逆转倍数,应用免疫印迹法检测DOX组和100、200 μg/ml 硒化壳聚糖组作用24 h后细胞内磷酸化Akt(p-Akt)蛋白表达。结果:与DOX组比较,50、100、200、400 μg/ml 硒化壳聚糖组对细胞具有明显抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且与浓度、时间呈正相关;25、50、100、200、400 μg/ml 硒化壳聚糖组细胞的逆转倍数分别为1.11、1.57、1.68、2.09、2.51。硒化壳聚糖明显下调了细胞内p-Akt蛋白表达($P<0.01$)。结论:硒化壳聚糖可通过抑制PI-3K/Akt信号通路对K562/DOX细胞产生增殖抑制和多药耐药逆转作用。

关键词 硒化壳聚糖;K562/DOX细胞;增殖;磷脂酰肌醇-3激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶;多柔比星

Inhibitory Effects of Selenium Chiton on the Proliferation of Doxorubicin-resistant K562 Cells and Signal Pathway of PI-3K/Akt

DENG Shou-heng, WANG Xian-he, YUAN Xuan-ju, LI Fang, LI Lin-jun, CHEN Ping (Cancer Center, The Affiliated People's Hospital of Hubei University of Medicine, Hubei Shiyan 442000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of selenium chiton (Sc) on the proliferation of doxorubicin-resistant chronic myeloid leukemia cell line (K562/DOX), and to explore the relationship between this effect and phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt (PI-3K/Akt) signal pathway. **METHODS:** K562/DOX cells were divided into negative control group, DOX group (50 μg/ml DOX) and 25, 50, 100, 200, 400 μg/ml Sc groups (50 μg/ml DOX+relevant concentration of Sc) with each group of 4 bores. After treated for 12, 24 and 36 h, MTT method and clone formation test were used to determine the effects of Sc on the proliferation of cells and calculate reversal multiple. The protein expression of phosphorylation Akt (p-Akt) was detected in DOX group and 100, 200 μg/ml Sc groups for 24 h by western blot. **RESULTS:** Compared with DOX group, 50, 100, 200 and 400 μg/ml Sc inhibited the proliferation of cells significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), which was positively associated with concentration and time; the reversal multiple of cells in 25, 50, 100, 200 and 400 μg/ml Sc groups were 1.11, 1.57, 1.68, 2.09 and 2.51, respectively. The protein expression of p-Akt was down-regulated by Sc significantly ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Sc could inhibit the proliferation of K562/DOX cells and reverse multidrug resistance by inhibiting PI-3K/Akt signal pathway.

KEY WORDS Selenium chiton; K562/DOX cells; Proliferation; PI-3K/Akt; Doxorubicin

肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药是导致化疗失败的主要原因。近年来,人们围绕这一难题进行了大量的研究,主要采用的方法有化学药物干预和基因治疗等。维拉帕米和环孢霉素A是被研究最多的化学药物,但由于其毒副作用大、特异性差,实际应用中效果并不理想。而基因治疗也存在着易被DNA酶降解、治疗效果不能持久等问题,从而使其临床应用受限。硒化壳聚糖是将壳聚糖与亚硒酸在酸性条件下,以混合

Δ 基金项目:湖北省卫生厅基金资助项目(No.QJX2008-6);鄖阳医学院基金资助项目(No.2008QDJ1)

* 教授,博士。研究方向:肿瘤药理学。电话:0719-8637939。E-mail: dshblue@163.com

通信作者:主任医师,教授,硕士研究生导师。研究方向:肿瘤药理学。电话:0719-8637939。E-mail: yychenping@163.com

金属离子为催化剂,通过拼合原理制备成的有机硒,具有高效低毒的特性^[1]。硒和砷在化学周期表中属同族,研究^[2-3]证实砷剂能恢复部分耐药肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,推测硒剂也应具有相似的作用,本文对此进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

BMP型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);Mod 550型全自动酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

硒化壳聚糖(本院化学系合成,批号:100601-201016,硒含量:0.8%);多柔比星(Doxorubicin, DOX)注射用粉末(浙江海正药业股份有限公司,批号:090606,规格:每支10 mg);MTT、甲基纤维素(美国Sigma公司);磷酸化丝氨酸-苏氨酸蛋白激

酶(p-Akt)多克隆抗体及二抗(美国 Santa Cruz 公司)。

1.3 细胞

人慢性粒细胞白血病(CML)耐 DOX 细胞株(K562/DOX)购自中国医学科学院天津血液病研究所。

2 方法

2.1 细胞培养

K562/DOX 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 u/ml 链霉素和 2 u/ml 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基内,在培养体系中加入终质量浓度为 0.6 μg/ml 的 DOX 以维持其耐药性,于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养,每隔 3~4 d 传代 1 次。

2.2 MTT 法检测细胞抑制率

收集指数生长期的 K562/DOX 细胞以全培养液稀释成 5×10⁴ ml⁻¹ 的单细胞悬液,接种于 96 孔板,于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养 12 h,将细胞分为阴性对照组(RPMI 1640 培养基)、DOX 组(50 μg/ml DOX)和 25、50、100、200、400 μg/ml 硒化壳聚糖组(50 μg/ml DOX+相应浓度的硒化壳聚糖),每组 4 个复孔。各组加样后继续培养 12、24、36 h,每孔加入 MTT 10 μl,继续培养 4 h,弃上清,加入 200 μl 二甲基亚砜(DMSO),酶标仪检测 570 nm 波长处光密度(OD)值并计算细胞抑制率。试验重复 3 次,比较各组细胞抑制率的差异并计算逆转倍数。细胞抑制率(%)=(1-硒化壳聚糖组 OD 值/阴性对照组 OD 值)×100%;逆转倍数=硒化壳聚糖组半数抑制率/DOX 组半数抑制率。

2.3 克隆形成法检测细胞存活率

参照文献^[9]配制半固体培养基,收集“2.2”项下各组作用 12 h 的细胞,弃去培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗去药物,1 000 r/min 离心 3 min,用含 20% 胎牛血清的培养液稀释成 7.0×10³ ml⁻¹ 单细胞悬液,于预先每孔加入 1.2% 甲基纤维素培养基 1.0 ml 的 24 孔板中,加入单细胞悬液 50 μl,每个浓度设 4 个复孔。混匀后置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 12~14 d,于倒置相差显微镜下计数细胞克隆数,计算细胞存活率(DOX 组或硒化壳聚糖组平均克隆数/阴性对照组平均克隆数×100%)。试验重复 3 次,比较各组细胞存活率的差异。

2.4 免疫印迹法测定 p-Akt 蛋白的表达

细胞分组方法同“2.2”项,即分为 DOX 组(50 μg/ml DOX)和 100、200 μg/ml 硒化壳聚糖组(50 μg/ml DOX+相应浓度的硒化壳聚糖),作用 24 h 后收集各组细胞,PBS 洗 2 次,裂解,离心,收集上清,即为细胞总蛋白。进行蛋白定量,调节每份样品蛋白浓度,加等量蛋白于上样缓冲液中,煮沸,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转膜。依次加入 p-Akt 多克隆抗体及二抗,显色,拍照,Quanti Scan 软件进行密度扫描分析。以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参,比较各组细胞 p-Akt 蛋白条带灰度值与 β-actin 灰度值比值的差异。

2.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析。

3 结果

3.1 细胞抑制率和存活率检测结果

MTT 法检测结果显示,DOX 组对 K562/DOX 细胞的抑制作用有限,作用 12、24、36 h 的抑制率分别为 28.17%、36.72%、

40.14%,说明细胞对 DOX 确实存在耐药。25~400 μg/ml 硒化壳聚糖组对 K562/DOX 细胞的抑制作用明显高于 DOX 组,且与浓度、时间呈正相关。25、50、100、200、400 μg/ml 硒化壳聚糖组作用 12 h,对 K562/DOX 细胞的逆转倍数分别是 1.11、1.57、1.68、2.09、2.51,说明硒化壳聚糖能逆转 K562/DOX 细胞对 DOX 的耐药,对细胞增殖产生了明显的抑制作用。克隆形成法检测结果也显示,DOX 与硒化壳聚糖联用,对细胞克隆形成有明显的抑制作用,细胞存活率与 DOX 组比较明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并呈一定的量效关系。各组作用不同时间后细胞的抑制率见图 1;各组作用 12 h 后细胞的抑制率、逆转倍数、存活率比较见表 1。

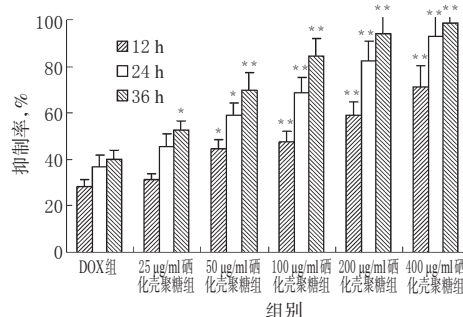


图 1 各组作用不同时间后 K562/DOX 细胞的抑制率与 DOX 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig 1 Proliferative inhibitory rate of K562/DOX cells effected for different time in each group vs. DOX group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 1 各组作用 12 h 后 K562/DOX 细胞的抑制率、逆转倍数、存活率比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 1 Proliferative inhibitory rate, reversal multiple, survival rate of K562/DOX cells effected for 12 h in each group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

| 组别 | 抑制率, % | 逆转倍数 | 存活率, % |
|------------------|----------------|------|----------------|
| DOX 组 | 28.17 ± 3.14 | | 73.21 ± 3.12 |
| 25 μg/ml 硒化壳聚糖组 | 31.14 ± 2.87 | 1.11 | 60.16 ± 4.14* |
| 50 μg/ml 硒化壳聚糖组 | 44.25 ± 4.18* | 1.57 | 49.23 ± 3.37** |
| 100 μg/ml 硒化壳聚糖组 | 47.52 ± 4.69** | 1.68 | 38.49 ± 4.35** |
| 200 μg/ml 硒化壳聚糖组 | 59.16 ± 5.43** | 2.09 | 25.62 ± 3.29** |
| 400 μg/ml 硒化壳聚糖组 | 70.97 ± 9.58** | 2.51 | 12.84 ± 1.83** |

与 DOX 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

vs. DOX group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.2 细胞内 p-Akt 蛋白表达情况

结果显示,DOX 组细胞内 p-Akt 蛋白呈高表达(灰度比值为 0.991 7 ± 0.29),细胞经 100、200 μg/ml 硒化壳聚糖作用 24 h 后,细胞内 p-Akt 蛋白表达的灰度比值分别为(0.498 2 ± 0.24)、(0.371 4 ± 0.33)。与 DOX 组比较,100、200 μg/ml 硒化壳聚糖组细胞内 p-Akt 蛋白表达明显降低($P<0.01$),即下调(42.76 ± 2.21)%、(62.17 ± 3.44)%。3 组细胞内 p-Akt 蛋白表达的电泳图见图 2。

4 讨论

CML 是以费城(Ph)染色体为特征的多潜能干细胞异常的血液系统恶性肿瘤。Ph 染色体是由位于 9 号染色体上的 c-abl 基因与位于 22 号染色体上的 bcr 基因相互异位,产生 bcr-abl 融

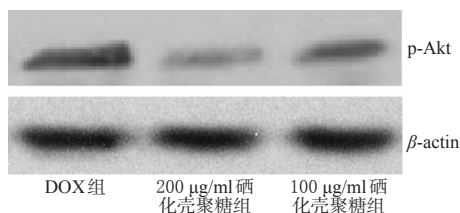


图2 3组K562/DOX细胞内p-Akt蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of the protein expression of p-Akt in K562/DOX cells in 3 groups

合基因,该基因编码的融合蛋白具有很强的酪氨酸激酶活性,可使融合蛋白自身及细胞内多种底物分子磷酸化,从而激活包括Ras/促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)在内的多条细胞信号传导通路,调控细胞的分裂与增殖,与CML的发病及耐药密切相关^[9]。故而降低CML细胞内融合蛋白含量、抑制其酪氨酸激酶活性、阻断其可能的细胞信号传导途径,已成为当前针对分子靶点进行治疗的策略之一。

笔者前期研究结果显示,硒化壳聚糖可通过下调NF-κB通路对体外培养的CML细胞株K562增殖产生抑制^[6],且可对细胞特征性的P210融合蛋白产生明显的下调作用^[7],提示硒化壳聚糖可能会对K562耐药细胞产生逆转作用。本文中,笔者以DOX诱导建立的K562/DOX为研究对象,采用经典的MTT法和克隆形成法检测了硒化壳聚糖对K562/DOX细胞体外增殖和存活的影响。结果显示,单纯DOX对细胞的抑制效果有限,而与不同浓度硒化壳聚糖联用后,DOX对细胞的抑制率明显高于DOX组,且呈现出一定的量效和时效关系,说明硒化壳聚糖具有逆转K562/DOX细胞耐DOX的作用。

磷脂酰肌醇-3激酶(PI-3K)是磷脂酰肌醇依赖激酶家族成员,参与细胞增殖、分化和细胞骨架构筑等的调控^[9];Akt是PI-3K最主要的靶酶,与多种细胞活动、物质代谢调节有关,尤其与抑制细胞凋亡、促进细胞生存有密切关系^[9]。已有研究^[10]表明,部分肿瘤细胞可以通过对负责细胞生长和凋亡的细胞信息传导通路(如Akt和NF-κB通路)进行调控,从而获得对化疗药物的耐药性。本文研究结果则进一步证实了在耐药的K562/DOX细胞内存在着PI-3K/Akt信号通路的异常激活,而

硒化壳聚糖则能通过下调p-Akt水平对PI-3K/Akt信号通路产生抑制进而逆转K562/DOX细胞对DOX的耐药。

参考文献

- [1] 孙兰萍,张胜义,许晖. 硒化壳聚糖的制备及理化性质的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 145.
- [2] 杨东光,张日,朱子玲. 三氧化二砷逆转甲磺酸伊马替尼对K562/MDR1耐药的实验研究[J]. 苏州大学学报:医学版, 2007, 27(2): 178.
- [3] 吴广洲,沈振亚,刘国锋,等. 三氧化二砷对人肺腺癌细胞A549/DDP裸鼠体内的多药耐药逆转作用[J]. 苏州大学学报:医学版, 2011, 31(1): 79.
- [4] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 284.
- [5] Tanaka MF, Kantarjian H, Cortes J, et al. Treatment options for chronic myeloid leukemia[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2012, 13(6): 815.
- [6] 邓守恒,孙各琴,朱名安,等. 硒化壳聚糖对K562细胞的作用及其与NF-κB信号分子的关系[J]. 陕西医学杂志, 2005, 34(12): 1472.
- [7] 邓守恒,李芳,李林均,等. 硒化壳聚糖对慢性粒细胞白血病K562细胞bcr/abl融合基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 106.
- [8] Kim D, Cheng GZ, Lindsley CW, et al. Targeting the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway for the treatment of cancer[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6(12): 1250.
- [9] Kim D, Dan HC, Park S, et al. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance[J]. *Front Biosci*, 2005(10): 975.
- [10] Poh TW, Pervaiz S. LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6264.

(收稿日期:2012-09-17 修回日期:2012-10-25)

国产治疗甲状腺亢进药物甲疏咪唑开始投放市场

本刊讯 2013年7月19日从北京市药品监督管理局获悉,北京市燕京药业有限公司已生产出首批1600万片甲疏咪唑,当日起向国内市场投放,以缓解甲状腺亢进治疗一药难求的形势。

自2013年4月起,国产甲状腺亢进治疗药物甲疏咪唑片逐渐脱销,6月底,全国供应紧张,市场销售的产品主要为进口品种——甲疏咪唑片(商品名:赛治,德国默克公司),且价格远高于国产品种。7月2日,国家卫生和计划生育委员会、国家发展和改革委员会、国家工业和信息化部、国家食品药品监督管理总局等部门协商决定,由北京市药品监督管理局牵头联系相关原料药生产企业和制剂生产企业落实生产,宣布预计

10日内向国内市场供应甲疏咪唑片(5毫克)1800万片,20日内供应6000万片。

北京市药品监督管理局称,北京市燕京药业有限公司生产出首批1600万片甲疏咪唑后,已联系多家医药公司,将复产信息发布出去。获知企业复产信息后,有记者第一时间联系了反映缺药情况的西安交通大学医学院第一附属医院副院长施秉银和河南省许昌市鄢陵县人民医院医务科科长葛建国,两人都表示将马上通知医院药剂科,尽快联系购药,以缓解临床缺药情况。

预计到本月底,北京市燕京药业有限公司将生产出6000万片甲疏咪唑,投放国内市场。