

地塞米松对顺铂诱导人肺腺癌细胞株凋亡的抑制作用及其机制^{*}

曹 菲, 张智慧[△], 吴 萍, 李 力, 黄建鸣

四川省肿瘤医院 肿瘤内科(成都 610041)

【摘要】 目的 研究地塞米松(Dex)对顺铂(CDDP)引起的人肺腺癌细胞株 SPCA/I 凋亡的抑制作用及其分子机制探讨。**方法** 体外培养 SPCA/I 细胞,分别加入不同浓度 Dex 培养 24 h 后,加入不同浓度 CDDP 继续培养 48 h,采用二甲基氧化四氮唑蓝(MTT)法检测细胞存活率;流式细胞仪检测细胞凋亡;用 1 $\mu\text{mol/L}$ Dex 刺激 SPCA/I 细胞,分别于 1 h、2 h、4 h、6 h、12 h 采用 RT-PCR 技术,检测 SPCA/I 细胞中糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1 基因(SGK-1)和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1(MKP-1)基因的表达;用生物素标记的抗糖皮质激素受体(GR)抗体对 SPCA/I 细胞中 GR 行细胞免疫组化检测。**结果** SPCA/I 细胞经 Dex 刺激后,对 CDDP 所致的抑制细胞生长和凋亡呈抵抗作用($P < 0.05$)。Dex 刺激后的 SPCA/I 细胞表达 SGK-1 上调,在 12 h 时表达达高峰,未检测到 MKP-1 表达;细胞免疫组化显示 SPCA/I 细胞经 Dex 刺激后 GR 表达上调,细胞内 GR 数目高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 体外实验结果表明,Dex 对 CDDP 引起的 SPCA/I 细胞凋亡有抑制作用。其分子机理可能是通过上调细胞内 GR 数目,增强通路下游 SGK1 的表达,从而产生抗凋亡作用。

【关键词】 地塞米松 肺癌 顺铂 凋亡

Preliminary Study of Apoptotic Inhibition and Its Molecular Mechanism of Dexamethasone on Cisplatin-induced Human Lung Adenocarcinoma Cell Line SPCA/I CAO Fei, ZHANG Zhi-hui[△], WU Ping, LI Li, HUANG Jiang-ming. Department of Medical Oncology, Sichuan Provincial Cancer Hospital and Institute, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: 13881889731@139.com

【Abstract】 Objective To study the apoptotic inhibition and its molecular mechanism of dexamethasone (Dex) on cisplatin (CDDP)-induced human lung adenocarcinoma cells. **Methods** The human lung adenocarcinoma cell line, SPCA/I, was pre-cultured *in vitro* for 24 hours with Dex in different concentration and then different concentration of CDDP was added. The cells were cultured for another 48 hours. The survival rate of the cells was determined by MTT colorimetry. The apoptotic rate of SPCA/I cells measured by flow cytometer. Using 1 $\mu\text{mol/L}$ Dex to stimulate the SPCA/I cells RNAs of the cells at different time points (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h) were extracted respectively. Semi-quantitative RT-PCR technology was used to detect the expression of the serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in SPCA/I cells. Simultaneously the glucocorticoid receptor (GR) of the SPCA/I cell line cells were measured by using biotin-labeled anti-glucocorticoid receptor antibody with immunohistochemistry assay. **Results** SPCA/I cells showed resistance to CDDP-induced apoptosis while pre-cultured with Dex and the resistance intensity was Dex concentration-dependent. After Dex stimulating the SPCA/I cells, SGK-1 expressed increased and reached the peak at 12 h. But the expression of MKP-1 was not detected. Immunohistochemistry results showed that up-regulated GR in SPCA/I cells after stimulation with Dex. The number of intracellular GR was significantly higher than that of control group. **Conclusion** The experimental results *in vitro* demonstrated that Dex inhibits apoptosis on CDDP-induced human lung adenocarcinoma cell line, SPCA/I. This anti-apoptosis effect might due to Dex increasing the expression of SGK-1, an anti-apoptotic protein, in its downstream signal pathway through the increasement of intracellular GR of SPCA/I cells.

【Key words】 Dexamethasone Lung cancer Cisplatin Apoptosis

地塞米松(Dexamethasone, Dex)是临床常用的糖皮质激素(glucocorticoid, GC)类药物。研究发

现,Dex 对卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌等多种实体肿瘤存在潜在的诱导化疗抵抗、抑制化疗药物引起的细胞凋亡现象^[1,2]。我们前期研究也发现 Dex 可以诱导人非小细胞肺癌离体细胞及人肺腺癌细胞株 SPCA/I 对顺铂(CDDP)化疗抵抗^[3],但其作用机

^{*} 四川省卫生厅课题(No. 090528)资助

[△] 通讯作者, E-mail: 13881889731@139.com

制并不完全清楚。Wu等^[4]在研究乳腺癌对Dex诱导的化疗凋亡抵抗的分子机制时发现,血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶1 (serum and glucocorticoid-inducible kinase 1,SGK1)及有丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-1,MKP-1)在抗凋亡信号转导通路中起着重要的作用。本研究以SPCA/I细胞为研究对象,通过体外实验,探讨Dex对CDDP诱导SPCA/I凋亡的影响及发生的可能机制,为今后临床CDDP化疗过程中正确认识和使用Dex提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CDDP(云南个旧生物药业有限公司产品);Dex(天津药业焦作有限公司产品);二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)、胰蛋白酶(Sigma公司产品);凋亡检测试剂盒(凯基生物)。总RNA抽提试剂TRizol(Invitrogen公司产品);RT-PCR试剂盒(北京天为时代科技有限公司产品);兔抗糖皮质激素受体(GR)抗体(Rabbit Anti-GR单克隆抗体)、DAB显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司产品)。

1.2 细胞株及细胞培养

SPCA/I细胞株购自上海细胞所,培养于含10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺的RPMI-1640培养基中,培养条件为37 $^{\circ}$ C,饱和湿度,5% CO₂ 孵箱内,肺癌细胞呈贴壁生长,2~3 d后用0.25%胰蛋白酶消化传代,实验时所用细胞均处于对数生长期。

1.3 不同浓度Dex刺激SPCA/I对CDDP诱导下细胞存活率的影响

采用MTT检测细胞存活率。收集呈对数生长期的SPCA/I细胞,用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液处理,制成单细胞悬液。取 5×10^4 /mL SPCA/I细胞悬液接种于96孔培养板内,每孔100 μ L,24 h贴壁后,分别加入不同浓度的Dex(0、0.1、1.0、10.0 μ mol/L)培养,24 h后加入不同浓度CDDP(8.5、17.0、34.0 μ mol/L)培养,各设4个复孔。于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱中继续培养48 h后,加入2.5 mg/mL MTT 20 μ L,于37 $^{\circ}$ C反应4 h,弃上清,加入150 μ L DMSO充分溶解,酶标仪测定 $\lambda_{570\text{ nm}}$ 的吸光值(A),并按下式计算细胞存活率。存活率(%)=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

1.4 Dex刺激SPCA/I对不同浓度CDDP诱导下细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测细胞凋亡率。用含10%小牛血清的1640培养基调整细胞浓度为 4×10^5 /孔,并铺于6孔板中,置5% CO₂、37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24 h后,将细胞分为阴性对照组、不同浓度顺铂(8.5、17、34 μ mol/L)组、不同浓度顺铂+地塞米松组(1 μ mol/L)组,每组设4复孔。其中阴性对照组不加药物,地塞米松组加药后作用24 h,加入各种浓度顺铂,培养24 h后收集贴壁细胞,制成单细胞悬液,PBS洗涤2次,使用凋亡检测试剂盒(凯基生物)进行染色,上流式细胞仪检测,BD FACS Diva分析软件测定细胞凋亡。

1.5 RT-PCR检测Dex对SPCA/I细胞SGK-1、MKP-1基因表达的影响

一般步骤按试剂盒说明书进行。反转录采用OligodT引物,在SPCA/I细胞培养液中加入1 μ mol/L Dex,设不含Dex作为阴性对照组。分别于1 h、2 h、4 h、6 h、12 h,提取总RNA。反转录反应条件为30 $^{\circ}$ C 5 min,46 $^{\circ}$ C 30 min,99 $^{\circ}$ C 5 min,5 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C保存;SGK-1基因引物5'-GGAGGATGGGTCTGAACGACTTTA-3',其反义链为5'-AGCGTTCCCTCTGGAGATGGTAGA-3',产物大小为486 bp。MKP-1基因引物5'-CCCGAGAACAGACAAAGAGCACCG-3',其反义链为5'-ATACGCACTGCCCAGGTACAGAAA-3',产物大小为620 bp。内参照物 β -actin引物5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3',其反义链为5'-GACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3',产物大小为421 bp。PCR反应条件为94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min;20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。SGK-1、MKP-1表达水平以目的基因条带与 β -actin条带光密度比值为相对表达量。用UVP GDS-8000蛋白凝胶色谱仪Labworks 4.5软件分析。

1.6 免疫组织化学法检测Dex对SPCA/I细胞GR表达的影响

接种细胞前先将96孔板预处理,200 μ L血清包被孔底部及四周。按 8×10^4 /mL将SPCA/I细胞悬液接种96孔板中,每孔100 μ L,加入1 μ mol/L Dex培养,24 h后除去培养液。加入95%酒精固定细胞15~20 min,除去酒精。加5%BSA封闭液,室温20 min,甩去多余液体不洗。设空白对照组(不加一抗,加PBS)及阴性对照组(不加Dex,加一抗,

二抗),按照公司试剂盒说明操作。将兔抗人 GR 抗体(一抗)按 1 : 200 用 PBS 稀释后,4 ℃ 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,加入 1 : 2 000 稀释的生物素标记的山羊抗兔 IgG (二抗),DAB 显色及苏木精复染。显微镜观察、采图,以 SPCA/ I 胞质及胞核内出现棕黄色颗粒为阳性,每孔分别观察 10 个高倍视野(400 倍),每个视野计数 200 个细胞,计算平均阳性细胞率。以上计数和阳性判断由 2 名病理医师双盲观察。判断标准分为:阳性率<5%为阴性,5%~25%为+,26%~50%为++,>50%为+++。

1.7 统计学方法

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较进行单因素方差分析,组间比较采用成对样品 *t* 检验,以 *P*<0. 05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Dex 对 CDDP 抑制 SPCA/ I 细胞生长的抵抗作用

由图 1 可见,Dex 单用时,Dex 各浓度组细胞存活率均高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0. 05),Dex 0. 1 μmol/L 组细胞存活率低于 Dex 1. 0、10. 0 μmol/L 组,差异有统计学意义(*P*<0. 05),后 2 组差异无统计学意义,因此,后续实验选用 Dex 1. 0 μmol/L;在 CDDP 一定浓度内(8. 5、17. 0 μmol/L),Dex 各浓度组均表现为对 CDDP 抑制 SPCA/ I 细胞生长呈抵抗作用(与对照组相比,*P* 均<0. 05),在 CDDP 浓度为 34. 0 μmol/L 时,Dex 各浓度组仍表现为对 CDDP 抑制 SPCA/ I 细胞生长呈抵抗作用,但与对照组相比,差异无统计学意义。

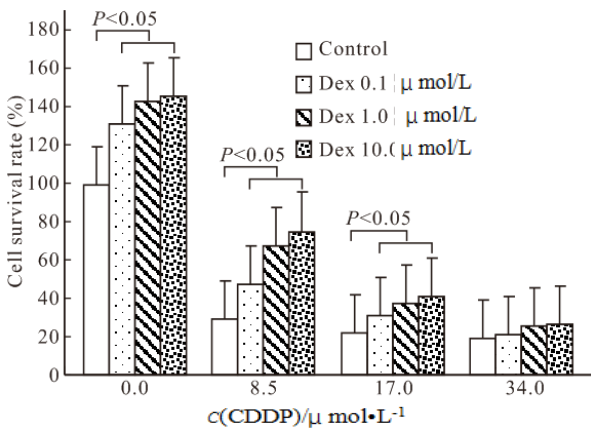


图 1 Dex 对 CDDP 诱导 SPCA/ I 细胞生长抑制的影响

Fig 1 Impact of Dex on CDDP-induced growth inhibition of SPCA/ I cells

2.2 Dex 对不同浓度 CDDP 诱导 SPCA/ I 细胞凋

亡的影响

由图 2 可见,CDDP 可诱导 SPCA/ I 细胞凋亡,CDDP 各浓度组细胞凋亡率均高于阴性对照组,差异有统计学意义(*P*<0. 05);Dex 处理后,CDDP 诱导 SPCA/ I 细胞凋亡率较 CDDP 各浓度组降低(*P*<0. 05),提示 Dex 具有抵抗 CDDP 诱导细胞凋亡的作用。

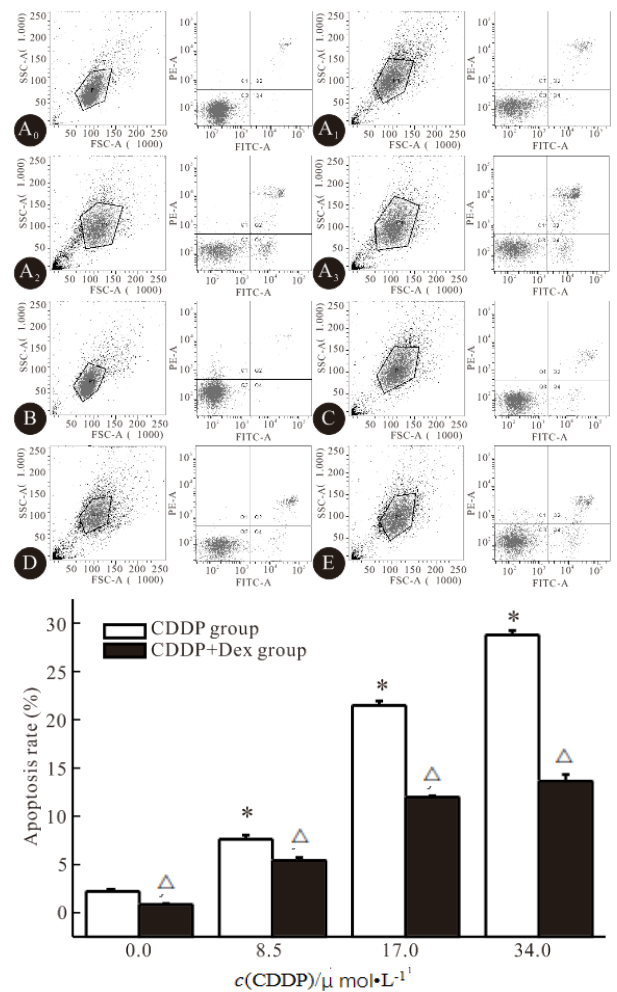


图 2 Dex 对 CDDP 诱导 SPCA/ I 细胞凋亡的影响

Fig 2 Impact of Dex on CDDP-induced apoptosis of SPCA/ I cells

A₀, A₁, A₂, A₃: CDDP 0, 8. 5, 17. 0, 34. 0 μmol/L; B: Dex 1 μmol/L; C: A₁+B; D: A₂+B; E: A₃+B. * *P*<0. 05, vs. 0 μmol/L CDDP group; Δ*P*<0. 05, vs. CDDP group at the same concentration of CDDP

2.3 Dex 对 SGK-1、MKP-1 基因表达的影响

SGK-1、MKP-1 及 β-actin PCR 产物琼脂糖电泳图 3。图中各组可见 SGK-1 及 β-actin 条带,未见 MKP-1 条带。SGK-1 基因的相对表达量分别为:阴性对照组(1. 145±0. 06)、加入 1 μmol/L Dex 1 h (1. 152±0. 08)、2 h (1. 152±0. 04)、4 h (1. 145±0. 05)、6 h (1. 156±0. 06)、12 h (1. 766±0. 04), SGK-1 基因在 12 h 表达与阴性对照组比较差异有

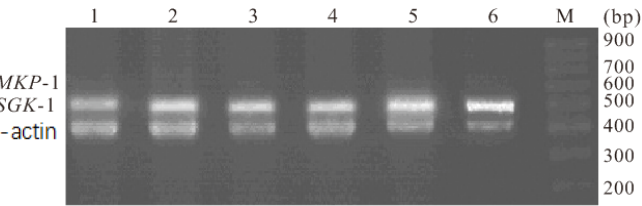


图 3 Dex 对 SPCA/ I 细胞中 SGK-1 和 MKP-1 基因表达的影响
Fig 3 Impact of Dex on SGK-1 and MKP-1 expression in SPCA/ I cells
M: Marker; 1: Control group; 2, 3, 4, 5 and 6: 1 μ mol/L Dex treated for 1, 2, 4, 6 and 12 h

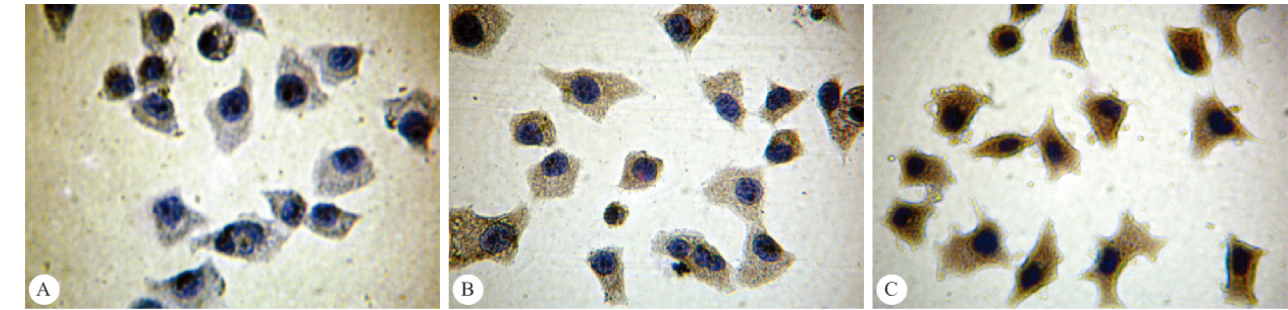


图 4 Dex 诱导 SPCA/ I 细胞 GR 表达的免疫组织化学染色。×400
Fig 4 Dex-induced expression of GR in SPCA/ I cells detected by immunocytochemical staining. ×400
A: Blank control; B: Negative control; C: Treated cells with 1 μ mol/L Dex

3 讨论

糖皮质激素是一种至关重要的皮质类固醇激素^[5]，糖皮质激素除了直接用于非实体性肿瘤如淋巴瘤的化疗以外，还用于处理肿瘤化疗相关的水肿、炎症、疼痛、电解质失衡以及恶心、呕吐等临床症状。虽然 Dex 对淋巴瘤和多发性骨髓瘤细胞是一种促凋亡剂^[6]，但对多种实体肿瘤细胞却具有抗凋亡作用^[1-4]。Dex 对化疗药物引起的实体性肿瘤细胞凋亡的抑制作用已经引起了国内外医学研究人员的关注。Zhang 等^[1,2]采用细胞株和肿瘤手术标本，对多种实体肿瘤进行了筛查，发现 Dex 可以诱导卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌等多种实体肿瘤对化疗药物抵抗。我们研究发现 Dex 对人非小细胞肺癌标本及 SPCA/ I 细胞存在显著的化疗抵抗，并存在性别差异^[3]。有研究显示，糖皮质激素可以通过调节转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、血管内皮生长因子 (VEGF)、白介素-8 (IL-8) 等的表达^[7-9]，从而抑制肿瘤增殖，发挥抗前列腺癌的作用。有研究显示乳腺癌对 Dex 诱导的化疗凋亡抵抗最为显著，并对其抗凋亡分子机制进行研究，Wu 等^[4]采用 mRNA 微阵列技术，对 Dex/紫杉醇联合处理前后乳腺肿瘤细胞株内 12 696 个基因表达变化的分析显示，SGK-1

统计学意义 ($P<0.05$)；MKP-1 基因各组细胞均未见表达。

2.4 Dex 诱导 SPCA/ I 细胞 GR 表达

免疫组织化学染色显示 (图 4)，阴性对照组可见少量 GR 阳性表达细胞，阳性细胞率为 (11.5 $\pm$ 1.21)%；1 μ mol/L Dex 处理的细胞，可见大量 GR 阳性表达细胞，细胞浆和细胞核内呈现深褐色颗粒，其阳性率高达 (78.3 $\pm$ 7.6)%，与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

和 MKP-1 是乳腺癌肿瘤细胞经 Dex 诱导后异常高表达的 2 个关键蛋白，对抑制化疗药物引起的细胞凋亡起决定性作用。而 Melhem 等^[10]的研究证实 Dex 可能通过上调 SGK1、MKP1 和双特异性磷酸 1 (DUSP1) 的表达从而抑制化疗诱导的卵巢癌细胞凋亡。目前认为，糖皮质激素通过与细胞内的 GR 结合，激活的 GR 通过一系列细胞内信号传递，活化或抑制基因的转录，从而发挥其促凋亡或抗凋亡的作用^[11]。糖皮质激素在参与细胞程序死亡的过程中有正负调节双重作用，且与细胞和组织学种类变化而不同^[12]。

本研究结果显示，Dex 可诱导人肺腺癌细胞株 SPCA/ I 对 CDDP 产生抵抗，其分子机制可能与 SGK-1 介导的抑制细胞凋亡有关。SPCA/ I 细胞经 Dex 诱导后，细胞内 GR 表达上调，使下游通路中的 SGK-1 基因高表达，从而诱导 SPCA/ I 细胞对 CDDP 产生药物抵抗。在时序上 Dex 作用以后 12 h (本研究中) SGK-1 基因表达达高峰。然而，与经 Dex 诱导后的乳腺癌细胞相比，抗凋亡基因 MKP-1 在人肺腺癌细胞株 SPCA/ I 并未表达，可能与 GR 的表达水平可以影响不同的信号传导和靶基因的激活^[13]有关。如研究显示，GR 介导的转录因子 FOXO3a 失活是乳腺上皮细胞生存的一个重

要机制, GR 活化经 GR-SGK-1-FOXO3a 信号传导通路而致 FOXO3a 择优磷酸化和失活^[14]。FOXO3 蛋白被认为是激活胞外配体的启动子, 包括启动死亡因子即 CD95-L、转录编码肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体、I-型肿瘤坏死因子受体结合蛋白、促 B 细胞淋巴瘤凋亡/白血病基因蛋白家族成员的 Bim 以及 Bcl-6^[15]。糖皮质激素诱导的 SGK-1 活化后 FOXO3a 蛋白质失活可能导致上述的促凋亡蛋白转录下调, 有助于 GR 介导细胞凋亡的抵抗^[16]。

由于 SPCA/I 细胞对 CDDP 显示出化疗药物抵抗, 预示 SGK-1 基因在 Dex 诱导 GR 阳性的人肺腺癌化疗抵抗中可能起着重要的作用。如果这种现象在临床治疗中也存在, 那么 Dex 的使用很可能会降低化疗药物的疗效, 甚至引起肿瘤细胞对化疗药物的抵抗。Dex 诱导实体肿瘤对化疗药物凋亡抵抗的机制可能存在多途径、多信号的调节, 并在不同的组织细胞其机制可能不尽相同。而且 Dex 对某些肿瘤也存在诱导化疗凋亡作用, Dex 的这种双向调节机制尚需要进一步的研究和阐明。

参 考 文 献

- Zhang C, Marme A, Wenger T, *et al.* Glucocorticoid-mediated inhibition of chemotherapy in ovarian carcinomas. *Int J Oncol*, 2006;28(2):551-558.
- Zhang C, Beckermann B, Kallifatidis G, *et al.* Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncol*, 2006;29(5):1295-1301.
- 张智慧, 黄建鸣, 查 晓等. 地塞米松诱导肺癌细胞的顺铂耐药及其性别差异. *中国医院用药评价与分析*, 2008;8(8):604-606.
- Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res*, 2004;64(5):1757-1764.
- Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, 2005;70(5-7):407-417.
- Dharminder C, Pramod P, Atsushi O, *et al.* Dexamethasone

- induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene*, 1997;7(15):837-843.
- Li Z, Chen Y, Cao D, *et al.* Glucocorticoid up-regulates transforming growth factor-beta (TGF-beta) type II receptor and enhances TGF-beta signaling in human prostate cancer PC-3 cells. *Endocrinology*, 2006;147(11):5259-5267.
- Yano A, Fujii Y, Iwai A, *et al.* Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2006;12(10):3003-3009.
- Yemelyanov A, Czwomog J, Gera L, *et al.* Novel steroid receptor phyto-modulator compound a inhibits growth and survival of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2008;68(12):4763-4773.
- Melhem A, Yamada SD, Fleming GF, *et al.* Administration of glucocorticoids to ovarian cancer patients is associated with expression of the anti-apoptotic genes SGK1 and MKP1/DUSP1 in ovarian tissues. *Clin Cancer Res*, 2009;15(9):3196-3204.
- Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006;102(1-5):11-21.
- Schmidt S, Rainer J, Ploner C, *et al.* Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ*, 2004;11(Suppl 1):S45-S55.
- Herr I, Gassler N, Friess H, *et al.* Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis*, 2007;12(2):271-291.
- Brunet A, Park J, Tran H, *et al.* Greenberg ME protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol*, 2001;21(3):952-965.
- Burgering BM, Medema RH. Decisions on life and death: FOXO forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol*, 2003;73(6):689-701.
- Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 2005;9(1):59-71.

(2013-03-26 收稿, 2013-07-03 修回)

编辑 沈 进