

缝隙连接蛋白43组成的缝隙连接对 依托泊苷抗肿瘤作用的影响

汪灵芝¹, 彭建新², 陶亮³, 黄焕森¹

1. 广州医科大学附属第二医院麻醉科, 广东 广州 510260;
2. 广东省中医院肝胆外科, 广东 广州 510120;
3. 中山大学中山医学院药理学, 广东 广州 510080

[摘要] **背景与目的:** 缝隙连接能够增强化疗药物的细胞毒性, 但缝隙连接蛋白43(connexin 43, Cx43)组成的缝隙连接对依托泊苷抗肿瘤作用的影响尚不清楚。因此, 本研究拟观察睾丸癌细胞中Cx43对依托泊苷抗肿瘤作用的影响。**方法:** 采用细胞接种荧光示踪实验检测睾丸癌细胞由Cx43形成的缝隙连接通讯功能, 同时检测不同的药物(18- α -甘草次酸及维甲酸)和Cx43干扰RNA对缝隙连接功能的影响; 采用标准细胞集落形成分析法检测睾丸癌细胞中由Cx43形成的缝隙连接通讯功能改变后, 对依托泊苷抑制肿瘤细胞生长作用的影响。**结果:** 荧光示踪实验显示18- α -甘草次酸可显著降低缝隙连接通讯功能, 而维甲酸则可增强缝隙连接功能; Cx43干扰RNA能够显著抑制缝隙连接功能。标准细胞集落形成实验结果表明, 在缝隙连接形成的睾丸癌细胞中, 18- α -甘草次酸显著降低依托泊苷对睾丸癌细胞生长的抑制作用, 而维甲酸则增强依托泊苷对睾丸癌细胞生长的抑制作用; 应用Cx43干扰RNA能够显著降低依托泊苷对睾丸癌细胞生长的抑制作用。**结论:** 睾丸癌细胞中Cx43形成的缝隙连接通讯功能降低能够减弱依托泊苷的抗肿瘤作用; 而缝隙连接通讯功能增强能够增强其抗肿瘤作用。

[关键词] 缝隙连接蛋白43; 依托泊苷; 缝隙连接

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.01.001

中图分类号: R737.21 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)01-0001-05

The role of gap junctions composed of connexin 43 on the anti-tumor effect induced by etoposide
WANG Lingzhi¹, PENG Jianxin², TAO Liang³, HUANG Huansen¹ (1.Department of Anesthesia, the Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong 510260, China; 2.Department of Hepatobiliary Surgery, Guangdong Province Traditional Chinese Medical Hospital, Guangzhou Guangdong 510120, China; 3.Department of Pharmacology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou Guangdong 510080, China)

Correspondence to: WANG Lingzhi E-mail: wlz4009@sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** Gap junctions(GJ) could enhance cytotoxicity induced by chemotherapeutic agents. However, whether or not GJ composed of connexin 43 (Cx43) could increase etoposide cytotoxicity remains unclear. The aim of this study was to explore the effect of GJ composed of Cx43 on etoposide cytotoxicity in testicular cancer cells. **Methods:** Eighteen-glycyrrhetic acid and siRNA were used to inhibit GJ function. Retinoid acid was used to enhance GJ function. "Parachute" dye-coupling assay was used to examine dye spread through GJ composed of Cx43 in MLTC-1 cells. "Standard colony-forming assay" was used to examine cell survivals of MLTC-1 cells treated with etoposide. **Results:** Assayed by "parachute" dye-coupling assay, the dye spread through GJ in MLTC-1 cells was significantly decreased by 18-glycyrrhetic acid however increased by retinoid acid. Cx43 expression and GJ function in MLTC-1 cells were inhibited by Cx43-siRNA. Results from "standard colony-forming assay" showed that etoposide cytotoxicity was decreased by 18-glycyrrhetic acid and siRNA, however enhanced by GJ function enhancer retinoid acid. **Conclusion:** The function inhibition of Cx43 composed GJ in MLTC-1 cells could decrease etoposide cytotoxicity. The

enhancement of GJ composed of Cx43 in MLTC-1 could increase etoposide cytotoxicity.

[Key words] Connexin 43; Etoposide; Gap junction

依托泊苷是一种细胞周期特异性抗肿瘤药物, 主要作用于细胞的S期和G₂期, 通过抑制细胞内DNA拓扑异构酶II的连接修复功能, 使得DNA拓扑异构酶II与已经断裂的DNA单链和双链形成具有破坏性的酶-DNA断裂复合物, 从而导致肿瘤细胞的凋亡或死亡。依托泊苷是广泛应用于白血病、淋巴瘤、睾丸癌及膀胱癌治疗的一线化疗药物^[1-2]。肿瘤患者常常需要进行长期的化疗, 但依托泊苷所带来的严重的骨髓抑制和消化道等不良反应大大限制了其临床应用^[3]。因此, 寻找能够增强依托泊苷抗肿瘤作用的方法或者策略将具有重要的意义。

细胞缝隙连接(gap junction, GJ)是直接沟通相邻细胞胞质的一种蛋白质连接通道。6个穿越细胞膜的缝隙连接蛋白(connexin, Cx)环绕在一起形成半通道, 位于相邻细胞膜上的2个半通道对接形成完整的GJ。相邻细胞通过GJ所介导的缝隙连接通讯进行能量物质以及信号分子的传递, 进而调控细胞的生长、增殖和分化。有研究^[4-5]表明, GJ可以增强X线照射以及顺铂等化疗药物的细胞毒性。但人体组织中表达最丰富的Cx43所组成的GJ是否影响依托泊苷的抗肿瘤作用仍鲜见报道。因此, 本研究拟通过药物和分子生物学手段改变睾丸癌细胞MLTC-1细胞上Cx43所组成的GJ功能, 观察其对依托泊苷细胞毒性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料与试剂

本研究所使用的MLTC细胞和Cx43-siRNA稳定转染细胞株由中山大学陶亮教授实验室提供。本研究中的主要试剂: 胎牛血清, 青-链霉素, 胰酶和MEM干粉等细胞培养试剂购自美国Gibco公司; 全反式维甲酸(retinoid acid, RA)和18- α -甘草次酸(glycyrrhetic acid, 18- α -GA)等试剂购自美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 实验方法

1.2.1 睾丸癌MLTC细胞的培养

培养于含10%胎牛血清和1%青霉素、链霉素的RPMI-1640培养液, 置于37℃、饱和湿度、CO₂体积分数为5%的细胞培养箱中培养。细胞常规培养于培养瓶中, 0.25%的胰蛋白酶消化法进行传代, 1周传代2~3次, 传代比例约为1:3。实验前将细胞培养24~48h, 使其表达形成有效的GJ。

1.2.2 细胞接种荧光示踪法^[6]检测MLTC-1细胞的GJ荧光传递功能

取对数生长期细胞, 以 1.0×10^5 /mL接种于6孔板。随机分为对照组、50 μ mol/L 18-GA处理组、20 μ mol/L RA处理组进行处理。将表达有Cx43的细胞与荧光指示剂calcein-AM和DiI-CM共同温育, 使calcein-AM和DiI-CM进入细胞, 该细胞称为“供体细胞”。将“供体细胞”接种到接受过18-GA(1h)和RA(24h)并已生长融合的睾丸癌细胞(“接受细胞”)上, 培养4h。待形成稳定的GJ后, 用显微荧光系统观察, 记录一个“供体细胞”周围含有calcein的“接受细胞”作为GJ功能指标。

1.2.3 标准细胞集落形成分析法^[7]测定依托泊苷的细胞毒性

采用标准细胞集落形成分析法, 以细胞集落形成率的降低作为依托泊苷的细胞毒性指标, 测定依托泊苷对天然表达Cx43的睾丸癌MLTC-1细胞集落形成的影响。在表达Cx43且有GJ形成的细胞加入6 μ mol/L依托泊苷, 作用1h后, PBS清洗细胞, 每组取500个细胞重新接种于培养板7d后测定细胞集落形成率, 通过计数细胞集落形成率比较依托泊苷毒性大小。细胞集落形成率=依托泊苷处理组的细胞集落数/未用依托泊苷的细胞集落数。在上述GJ形成细胞, 分别加入18-GA和RA提前预处理细胞1h和24h, 再联合依托泊苷处理细胞1h, 同样的方法计数细胞集落形成率以此观察药物改变Cx43

组成的GJ功能对依托泊苷细胞毒性的影响。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析。2组间计量资料比较采用 t 检验，多组间计量资料比较采用ANOVA分析，组间比较采用LSD法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义，统计图表采用Sigma Plot 10.0绘制。

2 结果

2.1 18-GA、维甲酸和Cx43干扰RNA对睾丸癌细胞荧光传递功能的影响

细胞接种荧光实验结果显示，50 $\mu\text{mol/L}$

L 18-GA作用MLTC-1细胞后，供体细胞周围的接受细胞数明显 $<$ 对照组，荧光传递功能约为对照组的 $(24 \pm 3)\%$ ($t=23.04$, $P < 0.01$)；而与之相对应的是，20 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸处理细胞24 h后，供体细胞周围的接受细胞数明显多于对照组，荧光传递功能约为对照组的 $(143 \pm 8)\%$ ($t=-4.74$, $P < 0.01$)。Cx43 siRNA稳定转染细胞与正常对照组细胞相比，供体细胞周围的接受细胞数明显减少，荧光传递功能为对照组的 $(15 \pm 2)\%$ ($t=42.15$, $P < 0.01$)。结果证明，18-GA和Cx43 siRNA可以降低由Cx43所组成的GJ荧光传递功能，而维甲酸能够增强Cx43组成的GJ功能(图1)。

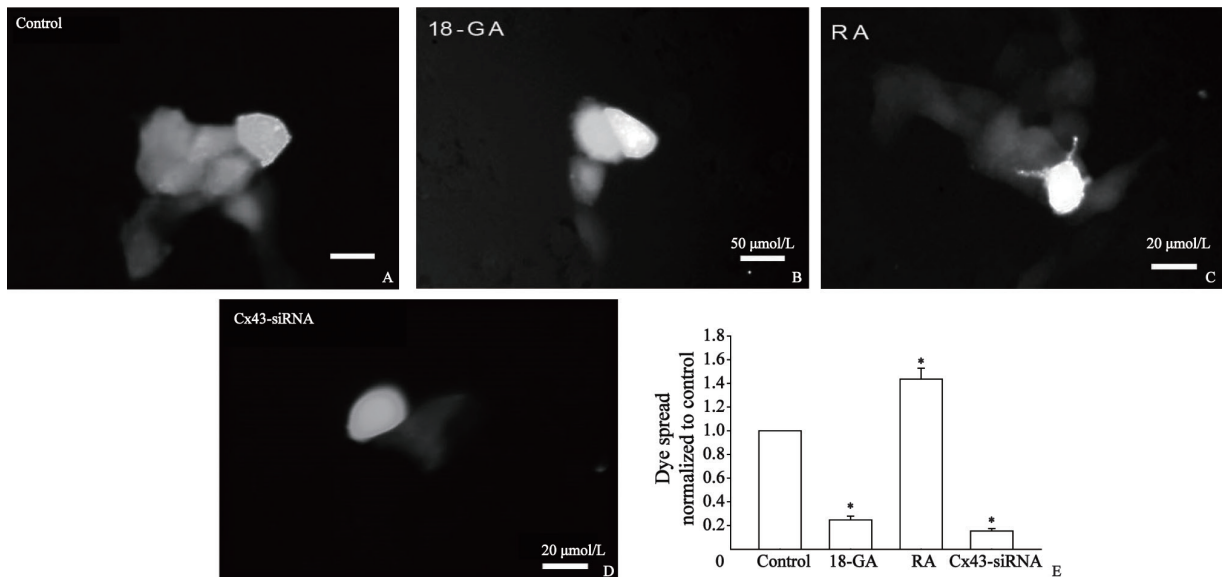


图1 不同药物和Cx43干扰RNA对睾丸癌细胞缝隙连接荧光传递功能的影响

Fig. 1 The effect of chemicals and siRNA on the dye spread of MLTC-1 cells assayed by parachute assay

A: Control group; B: 18-GA group; C: RA group; D: Cells transfected with Cx43 siRNA; E: Bar graphs were derived from A, B, C, D; *: Compared with control, $P < 0.05$.

2.2 18-GA和维甲酸对依托泊苷细胞毒性的影响

细胞集落形成实验结果显示，在表达Cx且形成GJ的MLTC-1细胞中，18-GA与依托泊苷联合应用组的细胞集落形成率高于单用6 $\mu\text{mol/L}$ 依托泊苷组($t=-4.88$, $P < 0.01$)。这表明，18-GA抑制GJ后，依托泊苷的细胞毒性明显降低。同时我们的结果还显示，维甲酸与依托泊苷联合应用组的细胞集落形成率低于单用依托泊苷组($t=7.14$, $P < 0.01$)，表明维甲酸增强GJ功能可增

加依托泊苷的细胞毒性(图2)。

2.3 Cx43干扰RNA对依托泊苷细胞毒性的影响

细胞集落形成实验结果显示，在稳定转染Cx43 siRNA的细胞中，加入6 $\mu\text{mol/L}$ 依托泊苷后，细胞集落形成率明显高于正常对照组细胞($t=-3.22$, $P < 0.05$)。结果证明Cx43 siRNA降低Cx43组成的GJ功能后依托泊苷的细胞毒性明显降低(图3)。

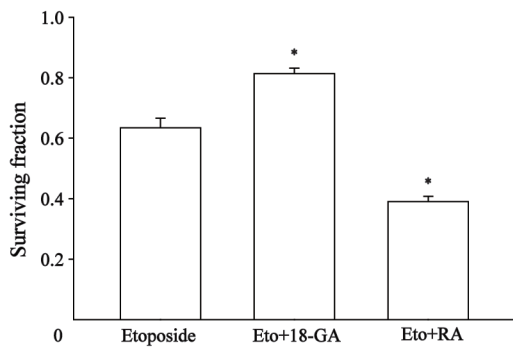


图2 18-GA和RA对依托泊苷抑制睾丸癌细胞增殖的影响

Fig. 2 The effect of 18-GA and RA on etoposide cytotoxicity in MLTC-1 cells expressing Cx43

Compared with etoposide, *: $P < 0.05$.

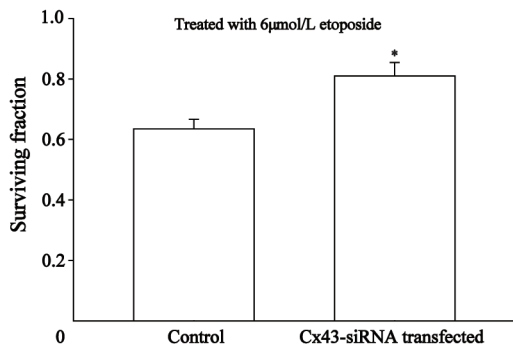


图3 转染或者未转染Cx43-siRNA对依托泊苷抑制睾丸癌细胞增殖的影响

Fig. 3 Etoposide cytotoxicity in MLTC-1 cells transfected with or without Cx43-siRNA

Compared with control, *: $P < 0.05$.

3 讨 论

本研究通过应用药物和分子生物学手段改变睾丸癌细胞GJ功能系统研究了依托泊苷抗肿瘤作用与Cx43所组成的GJ的关系,首次证实了Cx43组成的GJ介导了依托泊苷对睾丸MLTC-1癌细胞增殖的抑制作用。细胞集落结果显示,18-GA抑制Cx43组成的GJ功能,降低了依托泊苷细胞毒性;而维甲酸增强Cx43组成的GJ功能,增加依托泊苷细胞毒性。由此可见,调控GJ的功能,能够改变依托泊苷的抗肿瘤作用。本研究结果提示,利用分子生物学和化学药物提高细胞间间隙连接通讯功能能够显著提高睾丸癌细胞对依托泊苷的敏感性,并有望降低其

耐药性的产生。因此,睾丸癌细胞上针对Cx43为靶点的药物开发和治疗策略将对改善化疗疗效和安全性具有重要的意义。

人体组织中已经发现有21种Cx,其中Cx43在人体多种组织细胞中都有表达,是分布最广泛的一种GJ蛋白。在培养的肿瘤细胞,Cx43组成的GJ能够显著增强多种化疗药物的细胞毒性。研究者发现,由Cx43所组成的GJ能够显著增强顺铂对小鼠永生型成纤维干细胞(MEFs)的毒性,而细胞转染Cx43 RNAi后顺铂毒性明显下降^[7]。转染Cx43可以增强前列腺癌细胞的缝隙连接通讯,提高其对TNF- α 的敏感性^[8]。我们的实验结果证实依托泊苷对睾丸癌细胞增殖的抑制作用在Cx43组成的GJ存在的情况下明显增高,与前述的研究结果相吻合^[7]。

GJ增强化疗药物细胞毒性的机制与“旁观者效应”有关。旁观者效应最早是在自杀基因治疗肿瘤研究中发现,研究人员发现,有部分肿瘤细胞转染自杀基因后,可引起强大的抑制肿瘤生长的效应,包括被转染细胞以及周围未被转染细胞均被杀灭。转染Cx基因的肿瘤靶细胞中的HSV-TK/GCV的治疗要比未转染Cx基因的作用要强,这说明GJ提高了HSV-TK/GCV基因治疗的旁观者效应,实验者认为鸟嘌呤的三磷酸代谢物通过由于Cx43构成的GJ从有自杀基因的细胞扩散到周围无自杀基因的细胞,引起细胞死亡^[9]。同样地,类似的旁观者效应也出现在肿瘤的放疗和化疗领域^[10]。Jensen等^[7]研究人员发现顺铂在诱导细胞凋亡的同时也很可能产生了一种“死亡信号”,死亡信号通过相邻细胞间的GJ传递,导致单个细胞内死亡信号的放大从而增强了顺铂的细胞毒性。

与顺铂相似,依托泊苷也是通过干扰DNA的复制抑制肿瘤细胞的生长增殖。依托泊苷抑制细胞内DNA拓扑异构酶II的连接修复功能,使得DNA拓扑异构酶II与已经断裂的DNA单链和双链形成具有破坏性的酶-DNA断裂复合物,复合物激活细胞内包括ATM、ATR分子参与的修复系统及细胞周期调控系统,一旦损伤未修复或者错误修复,将会介导染色体的重排和周

期停滞, 最终导致细胞凋亡或者死亡。因此, 我们推测, 顺铂和依托泊苷这2种针对DNA复制的化疗药物在诱导细胞凋亡的过程中所激活的修复或者损伤通路有着某些相似之处。研究中依托泊苷作用细胞1 h, 极有可能会引起一些类似的细胞周期蛋白, 凋亡相关蛋白及其DNA损伤相关的蛋白或者死亡信号发生改变, 有研究认为可能是能通过GJ扩散的小分子细胞内信使物质如 IP_3 、 Ca^{2+} 等^[11-12]。我们前期针对MLTC-1细胞的相关研究也证实, DNA交联物在缝隙连接所介导的顺铂毒性中具有重要的作用^[13], 但其是否介导依托泊苷所诱导的死亡信号的传递还有待证实。

[参 考 文 献]

- [1] KIM T M, KIM D W, KANG Y K, et al. A phase II study of ifosfamide, methotrexate, etoposide, and prednisolone for previously untreated stage I/II extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type: A Multicenter Trial of the Korean Cancer Study Group [J]. *Oncologist*, 2014, 19(11):1129-1130.
- [2] NAJAR I A, JOHRI R K. Pharmaceutical and pharmacological approaches for bioavailability enhancement of etoposide [J]. *J Biosci*, 2014, 39(1): 139-144.
- [3] NECCHI A, NICOLAI N, MARIANI L, et al. Modified cisplatin, etoposide, and ifosfamide (PEI) salvage therapy for male germ cell tumors: long-term efficacy and safety outcomes [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(11): 2887-2892.
- [4] TONG X, DONG S, YU M, et al. Role of heteromeric gap junctions in the cytotoxicity of cisplatin [J]. *Toxicology*, 2013, 310: 53-60.
- [5] ZHAO Y, LIU B, WANG Q, et al. Propofol depresses the cytotoxicity of X-ray irradiation through inhibition of gap junctions [J]. *Anesth Analg*, 2011, 112(5): 1088-1095.
- [6] KOREEN I V, ELSAYED W A, LIU Y J, et al. Tetracycline-regulated expression enables purification and functional analysis of recombinant connexin channels from mammalian cells [J]. *Biochem J*, 2004, 383(Pt 1): 111-119.
- [7] JENSEN R, GLAZER P M. Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(16): 6134-6139.
- [8] WANG M, BERTHOUD V M, BEYER E C. Connexin43 increases the sensitivity of prostate cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 2): 320-329.
- [9] YAMASAKI H, OMORI Y, KRUTOVSKIKH V, et al. Connexins in tumour suppression and cancer therapy [J]. *Novartis Found Symp*, 1999, 219: 241-260.
- [10] HAMADA N, MATSUMOTO H, HARA T, et al. Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced by stander effects [J]. *J Radiat Res*, 2007, 48(2): 87-95.
- [11] WANG D, LIPPARD S J. Cellular processing of platinum anticancer drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(4): 307-320.
- [12] EVANS W H, DE VUYST E, LEYBAERT L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight [J]. *Biochem J*, 2006, 397(1): 1-14.
- [13] HONG X, WANG Q, YANG Y, et al. Gap junctions propagate opposite effects in normal and tumor testicular cells in response to cisplatin [J]. *Cancer Lett*, 2012, 317(2):165-171.

(收稿日期: 2014-10-13 修回日期: 2014-12-18)