

氯化钴对人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU 的线粒体损伤及其耐药性的影响

宋毕清, 时开网*, 杨士勇

(南京医科大学附属南京第一医院普通外科, 江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:氯化钴(CoCl_2)作用于人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU 致其化学性缺氧,观察其线粒体损伤及耐药性的影响。方法:采用梯度浓度 CoCl_2 (0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00 $\mu\text{mol/L}$)培养人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU,MTT 法测定 Patu8988/5-FU 细胞增殖活性和耐药性;JC-1 荧光染色流式细胞仪分析线粒体膜电位变化;RT-PCR 检测 HIF-1 α 及多药耐药基因 MDR1 的表达情况;罗丹明外排实验检测 Patu8988/5-FU 细胞膜上的 P-gp 泵功能。结果:随着 CoCl_2 浓度升高或以 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用时间延长,Patu8988/5-FU 增殖活性下降,线粒体膜电位去极化增加。常氧和缺氧时其对 5-氟脲嘧啶(5-Fu)的耐药指数分别达到 28.11 ± 3.19 、 52.08 ± 3.53 ($P < 0.01$);HIF-1 α 和 MDR1 mRNA 的表达亦明显高于常氧对照组($P < 0.05$)。罗丹明在缺氧细胞株内的积聚量低于常氧对照组($P < 0.01$)。结论:利用 CoCl_2 模拟 Patu8988/5-FU 化学性缺氧存在浓度和时间依赖性;缺氧使 Patu8988/5-FU 获得性耐药性增加可能是通过引起 HIF-1 α 表达增加和上调多药耐药基因 MDR1 的表达引起的。

[关键词] 缺氧;胰腺癌;多药耐药

[中图分类号] R735.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-811-05

Effects of cobalt chloride on mitochondrial damage and drug resistance of 5-FU-resistant human pancreatic cancer Patu8988/5-FU cell line

SONG Bi-qing, SHI Kai-wang*, YANG Shi-yong

(Department of General Surgery, the Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of mitochondrial damage and drug resistance of 5-FU-resistant human pancreatic cancer cell line Patu8988/5-FU cultured by cobalt chloride (CoCl_2). **Methods:** Patu8988/5-FU were cultured in medium containing different concentrations of CoCl_2 (0, 6.25 $\mu\text{mol/L}$, 12.50 $\mu\text{mol/L}$, 25.00 $\mu\text{mol/L}$, 50.00 $\mu\text{mol/L}$, 100.00 $\mu\text{mol/L}$, 200.00 $\mu\text{mol/L}$, 400.00 $\mu\text{mol/L}$). MTT assay was used to detect the cell proliferation activity and drug resistance of Patu8988/5-FU. JC-1 fluorescence staining with flow cytometry was used to analyze the mitochondria membrane potential. The mRNA expressions of HIF-1 α and MDR1 were detected by RT-PCR technique. P-gp pump function of Patu8988/5-FU cells' membrane was tested by Rh123. **Results:** With CoCl_2 concentration rising or 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 treatment time extension, the proliferation activity of Patu8988/5-FU cells was degressive, the depolarization of mitochondrial membrane potential was increased. Drug resistance index of Patu8988/5-FU to 5-FU in normoxia and hypoxia reaches to 28.11 ± 3.19 and 52.08 ± 3.53 , respectively ($P < 0.01$). The mRNA expressions of HIF-1 α and MDR1 in Patu8988/5-FU cells is higher in hypoxia than in normoxia ($P < 0.01$). The accumulation amount of Rh123 in cytoplasm of Patu8988/5-FU cells was significantly lower in hypoxia than in normoxia ($P < 0.01$). **Conclusion:** CoCl_2 induced chemistry hypoxia of Patu8988/5-FU cells in a time-and-dose dependent manner. CoCl_2 mimicing hypoxia dramatically increased resistance of Patu8988/5-FU cells to 5-FU, and maybe through upregulating the expression of HIF-1 α and MDR1.

[Key words] hypoxia; pancreatic cancer; multidrug resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 811-815]

[基金项目] 江苏省自然科学基金(H200945)

*通讯作者, E-mail: skw@163.com

胰腺癌细胞中普遍存在缺氧现象,缺氧是实体瘤微环境的特征之一,通常被认为与实体肿瘤放、化疗抗性有关^[1]。近来有研究发现缺氧可通过缺氧

诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)途径诱导胰腺癌的侵袭及转移^[2],缺氧时 HIF-1 α 亚基起关键作用,可诱发数十种下游基因的表达。然而其与多药耐药基因 MDR1 或转送运输蛋白 P-gp 的关系尚未明确。氯化钴(CoCl_2)作为缺氧模拟剂能够模拟缺氧反应得到广泛引用^[3-5]。本实验通过氯化钴作用于人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU 致其化学性缺氧,观察其对线粒体损伤及耐药性的影响,为研究胰腺癌获得性 MDR 产生的机制以及逆转获得性耐药途径提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人胰腺细胞株 Patu8988、人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU (南京凯基生物), CoCl_2 (SC-203004, Santa Cruz 公司, 美国), RPMI-1640 培养基(Gibco 公司, 美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),5-氟脲嘧啶(5-FU, 天津金耀氨基酸有限公司),噻唑蓝、碘化丙锭(Sigma 公司, 美国),流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton-Dickinson 公司, 美国),罗丹明 123 染色试剂盒(南京凯基生物)。兔抗人 HIF-1 α 抗体(SC-10790, Santa Cruz 公司, 美国),兔抗人 MDR1/P-gp 抗体(SC-8313, Santa Cruz 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人胰腺细胞株 Patu8988、人胰腺耐药细胞株 Patu8988/5-FU(耐药浓度 5-FU 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液 (80 U/ml 青霉素和 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下进行脱药培养 5 代, 并处于指数生长期的细胞用于研究。

1.2.2 CoCl_2 处理

人胰腺耐药细胞株 Patu8988/5-FU 消化、计数、配制成浓度为 5×10^4 个/ml 的细胞悬液, 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μl 细胞悬液 (每孔 5×10^3 个细胞), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养 24h, 细胞融合 70%~80% 时用 100 μl 完全培养基稀释 CoCl_2 至每孔所需浓度 (0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 同时设立阴性对照组(空白培养基), 阳性对照组(紫杉醇 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 96 孔细胞培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h。观察并根据量效反应选择 CoCl_2 浓度重新作用细胞, 观察时间 0、4、8、12 h。

1.2.3 MTT 法分析细胞增殖活性和耐药指数

取对数生长期的 Patu8988、Patu8988/5-FU 及 CoCl_2 作用下缺氧培养的 Patu8988/5-FU, 0.1% 的胰酶和 0.25% 的 EDTA 消化后, 以 5×10^4 个/ml 浓度的单细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μl , 培养 24 h 后加入用完全培养基稀释的不同浓度的氟尿嘧啶 (5-FU) 100 μl , 检测方法同参考文献 [6]。测波长 490 处吸光度值, 求得各组吸光度值的平均值, 计算抑制率、半数抑制浓度 (IC_{50}) 和细胞耐药指数 (RI)。

1.2.4 JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位 ($\Delta\psi\text{m}$) 时效反应

用 PBS 洗涤各时间点皿内细胞 2 次, 收集 1×10^5 个细胞; 取 500 μl 10 \times incubation Buffer 加 4.5 ml 灭菌去离子水稀释成 1 \times incubation Buffer, 混匀并预热至 37 $^{\circ}\text{C}$; 吸取 2.5 ml 1 \times incubation Buffer, 加入 5 μl JC-1, 涡旋混匀配成 JC-1 工作液; 取 500 μl JC-1 工作液将细胞均匀悬浮, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 ml/L CO_2 的培养箱中孵育 15~20 min; 室温离心 (2 000 r/min, 5 min) 后收集细胞, 用 1 \times incubation Buffer 洗 2 次; 吸取 500 μl 1 \times incubation Buffer 重新悬浮细胞; 流式细胞仪 ($\text{Ex}=488 \text{ nm}$; $\text{Em}=530 \text{ nm}$) 检测细胞线粒体膜电位去极化的情况, 用红色荧光降低的百分比表示 $\Delta\psi\text{m}$ 的降低。

1.2.5 RT-PCR 方法检测 HIF-1 α 、MDR1 基因表达

收集各组细胞约 1×10^6 个/ml, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 以 cDNA 为模板, 进行 PCR 反应, 扩增 HIF-1 α 、MDR1 片段。测定 PCR 产物 cDNA 条带和内参照 β -actin 条带的吸光度值的比值, 作为 HIF-1 α 、MDR1 mRNA 的相对表达量。PCR 反应的引物序列及产物大小见表 1。

1.2.6 罗丹明 123 外排法测定细胞 P-gp 泵功能

消化耐药细胞, 分为常氧对照组和 CoCl_2 处理组, 用 RPMI 1640 培养液漂洗 2 次; 细胞计数, 制成 2×10^6 个/ml 细胞悬液; 每管加入终浓度达 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的罗丹明 123, 具体方法同参考文献 [6], 流式细胞仪用 488 nm 的激发光, 测试细胞荧光强度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对原始数据进行方差齐性检验, 满足方差齐性要求的数据用单因素方差分析两两比较, 计量资料结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用配对样本 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。抑制率 = $(1 - \text{药物组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$,

表 1 引物序列和扩增长度

Table 1 The sequence of primers and the length of amplification fragments

引物	序列	扩增长度(bp)
HIF-1 α	上游:5'- GCCCTAACGTGTTATCTGTCG -3' 下游:5'- TTGCTCCATTCCATTCTGTTC -3'	245
MDR1	上游:5'-AACGGAAGCCAGAACATTCC -3' 下游:5'- AGGCTTCCTGTGGCAAAGAG -3'	180
β -actin	上游:5'- GCTCGTCGTCGACAACGGCTC -3' 下游:5'- CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC -3'	353

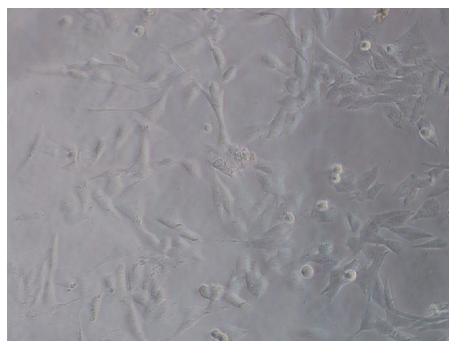
并用 Bliss 法推算药物作用的 50%抑制浓度(IC₅₀)。

细胞耐药指数=IC₅₀(Patu8988/5-FU)/IC₅₀(Patu8988)。

2 结果

2.1 CoCl₂ 处理细胞结果

细胞经 CoCl₂ 处理后,细胞形态发生了如下变化:细胞折光性增高,体积变小,细胞突起变钝(图 1)。随着 CoCl₂ 浓度增加,细胞生长抑制程度加大,且氯化钴浓度不变时随着作用时间延长,细胞生长抑制程度亦加大,如当 CoCl₂ 浓度达到 100 μ mol/L 作用 8 h 时 Patu8988/5-FU 细胞的生长抑制率达到 (38.11 \pm 2.19)% ($P < 0.01, n = 3$, 图 2)。



对照组($\times 200$)



CoCl₂ 100 μ mol/L 作用 8 h ($\times 200$)

图 1 Patu8988/5-FU 在 CoCl₂ 处理前后细胞形态变化

Figure 1 Morphologic changes of Patu8988/5-FU cells treated with CoCl₂

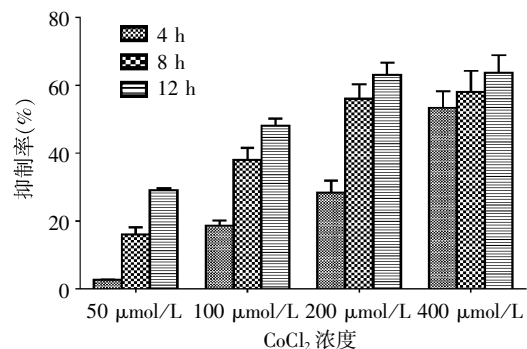


图 2 Patu8988/5-FU 在 CoCl₂ 作用下随着时间和浓度增加细胞的抑制率

Figure 2 Inhibition rates of Patu8988/5-FU cells treated with CoCl₂ of increasing time-and-dose

2.2 JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)时效反应

各时间点细胞 $\Delta\psi_m$ 降低幅度逐渐增大,分别是 0 h: (14.52 \pm 0.92)%、4 h: (24.56 \pm 2.28)% ($P < 0.01, n = 3$)、8 h: (45.86 \pm 3.38)% ($P < 0.01, n = 3$)、12 h: (39.4 \pm 2.25)% ($P < 0.01, n = 3$)。随着缺氧时间增加,线粒体膜电位发生去极化增加,到 8 h 时达高峰,12 h 时较 8 h 有所下降(图 3)。

2.3 MTT Patu8988/5-FU 耐药指数

Patu8988/5-FU 对 5-Fu 产生了较高的耐药性,耐药指数为 28.11,而缺氧状态下其耐药指数高达 52.08(表 2)。

2.4 HIF-1 α 、MDR1 mRNA 的表达分析结果

Patu8988/5-FU 细胞在常氧和缺氧时 HIF-1 α 、MDR1 mRNA 的表达情况见图 4。以待测基因与 β -actin 的 RT-PCR 产物的光密度比值表示,缺氧前后 Patu8988/5-Fu 中的 HIF-1 α mRNA 表达分别为: 0.52 \pm 0.10、0.98 \pm 0.02; MDR1 mRNA 的表达分别为: 0.50 \pm 0.07、1.19 \pm 0.03。CoCl₂ 处理后两种基因的 mRNA 表达均升高 (P 均 $< 0.01, n = 3$)。

2.5 罗丹明 123 分析 P-gp 泵功能评估结果

Patu8988/5-FU 细胞常氧培养组和 CoCl₂ 处理

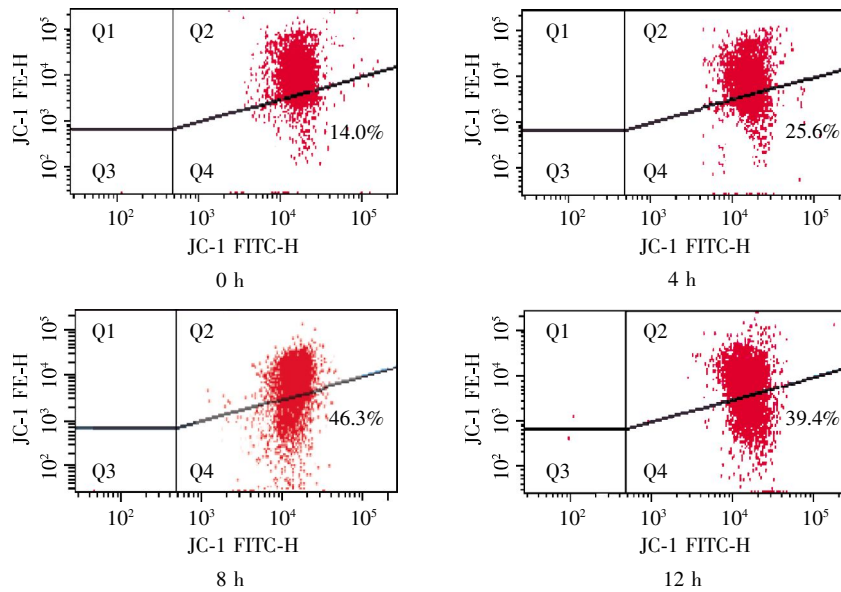


图 3 CoCl₂ 100 μmol/L 作用不同时间线粒体膜电位丢失的细胞比例

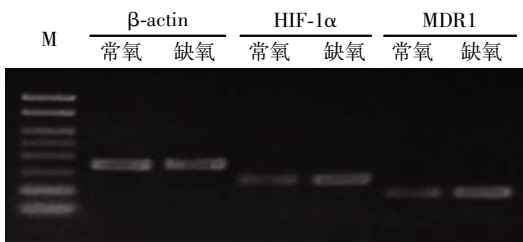
Figure 3 The proportion of cells with the mitochondrial membrane potential lose treated with 100 μmol/L CoCl₂ in different time

表 2 Patu8988/5-FU 耐药指数 (RI) 和 IC₅₀

Table 2 Drug resistance of human pancreatic cancer cells of Patu8988 and Patu8988/5-FU to 5-FU ($\bar{x} \pm s$)

	Patu8988	Patu8988/5-FU	
		常氧	缺氧
IC ₅₀ (μg/ml)	0.76 ± 0.08	21.36 ± 2.43**	39.58 ± 2.69**
RI	-	28.11 ± 3.19	52.08 ± 3.53**

与 Patu8988 相比, **P < 0.01, n = 3。



M: DNA marker。

图 4 Patu8988/5-FU 在常氧和缺氧时 HIF-1α、MDR1 mRNA RT-PCR 电泳结果

Figure 4 RT-PCR analysis of HIF-1α and MDR1 mRNA in Patu8988/5-FU cells cultivated in normoxia and hypoxia

组阳性细胞百分比分别为 (57.25 ± 3.34)%、(30.48 ± 2.65)%, Patu8988/5-FU 细胞株常氧培养组罗丹明 123 平均蓄积量约是 CoCl₂ 处理组的 1.88 倍(图 5), 两组差异有统计学意义(P < 0.01, n = 3)。

3 讨论

胰腺癌的 5 年生存率随着科技进步已由原来

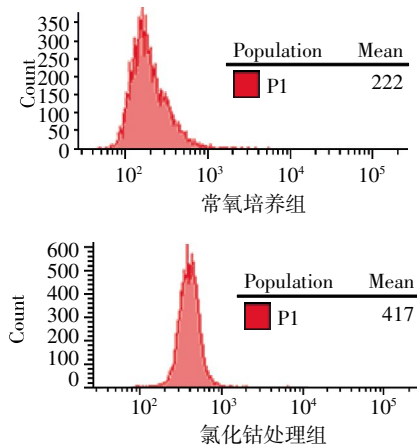


图 5 常氧培养组和氯化钴处理组 Patu8988/5-FU 细胞 Rh123 积聚量

Figure 5 Accumulation amount of Rh123 in Patu8988/5-FU cells in normoxia or hypoxia treated with cobalt chloride

的不足 5% 提高到 6%^[7], 但仍是消化道肿瘤中预后最差的肿瘤之一。化疗耐受仍是很大的治疗难题。参与并调节肿瘤细胞缺氧的一系列适应性反应中最重要的核转录因子是 HIF-1^[8], 它在缺氧条件下可启动包括 MDR1 在内的过百个下游靶基因的转录^[9], 这些基因涉及药物耐药, 肿瘤血管的形成与发展, 肿瘤细胞的凋亡、能量代谢、增殖与存活等多个细胞过程^[10], 使组织细胞对缺氧产生适应性调节。

缺氧环境可以被 CoCl₂ 等缺氧模拟剂模拟^[4-5]。CoCl₂ 可以通过直接或间接导致缺氧引起一系列缺氧反应。已有研究表明二价钴可以通过直接结合到

协调氧分子的亚铁离子、细胞色素酶 P450 导致缺氧^[11-12],可以抑制需氧酶直接导致缺氧^[13],如可以阻止氧分子结合到 HIF 脯氨酰羟化酶及随后的 HIF-1 α 羟基化和蛋白酶体降解来稳定 HIF-1 α 亚基从而引起一系列缺氧反应^[14-16]。CoCl₂ 还可以与 H₂O₂ 反应产生活性氧簇(ROS),从而激活 MAPKs 途径,引发一系列细胞损伤,如细胞毒性,细胞凋亡蛋白酶-3 的活化、凋亡及线粒体膜电位极性的丢失^[17]。线粒体膜电位的下降是细胞缺氧凋亡级联反应过程中最早表现。本实验采用梯度浓度 CoCl₂ 作用于人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU, 细胞的生长抑制率和 CoCl₂ 作用时间及浓度呈正相关,CoCl₂ 在浓度为 100 μ mol/L 作用时间为 8h 时人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU 的生长抑制率达到 25%左右,其线粒体膜电位去极化已达到高阈值。故选择此浓度和时间作为是研究 Patu8988/5-FU 细胞缺氧的最适研究浓度和时间。在此条件下模拟的化学性缺氧使得胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU 的 HIF-1 α 的 mRNA 表达增加,并伴随 MDR1 的上调,P-gp 的功能增强,且人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-FU 对 5-FU 的敏感性进一步下降,细胞的耐药倍数增加,均具有统计学意义。说明了细胞缺氧可以诱导细胞获得性耐药的增加。本实验虽成功诱导细胞中 HIF-1 α 的表达增加而引起下游表达基因 MDR1 的表达。但也存在一些不足,化学性缺氧所致实验结果只代表实验室检验结果,细胞反应并不能完全代表肿瘤细胞在体缺氧时的反应,还有待动物实验或实体瘤检验数据的进一步支持,这也是下一步研究方向。

[参考文献]

- [1] Ding ZY, Yang L, Xie XD, et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(11): 1697-1707
- [2] Hashimoto O, Shimizu K, Semba S, et al. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells [J]. *Pathobiology*, 2011, 78(4): 181-192
- [3] Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein [J]. *Science*, 1988, 242(4884): 1412-1415
- [4] Huang Y, Du KM, Xue ZH, et al. Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells; possible mediation of hypoxia-inducible factor-1 alpha [J]. *Leukemia*, 2003, 17(11): 2065-2073
- [5] Kim EJ, Yoo YG, Yang WK, et al. Transcriptional activation of HIF-1 by ROR alpha and its role in hypoxia signaling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(10): 1796-1802
- [6] 张厚斌, 时开网, 杨士勇. 人胰腺癌耐药细胞株 Patu8988/5-Fu 的建立及其耐药机制的初步探讨 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2011, 31 (4): 457-462
- [7] Ellison LF, Wilkins K. An update on cancer survival [J]. *Health Rep*, 2010, 21(3): 55-60
- [8] Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia [J]. *Acta Physiol Hung*, 2009, 96 (1): 19-28
- [9] Rankin E, Giaccia A. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2008, 15(4): 678-685
- [10] Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(2): 167-171
- [11] Sinclair P, Gibbs AH, Sinclair JF, et al. Formation of cobalt protoporphyrin in the liver of rats. A mechanism for the inhibition of liver haem biosynthesis by inorganic cobalt [J]. *Biochem J*, 1979, 178(3): 529-538
- [12] Sinclair PR, Sinclair JF, Bonkowsky HL, et al. Formation of cobalt protoporphyrin by chicken hepatocytes in culture. Relationship to decrease of 5-aminolaevulinate synthase caused by cobalt [J]. *Biochem Pharmacol*, 1982, 31 (6): 993-999
- [13] Hyeeseung Lee, Clara M Bien, Adam L, et al. Hughes, Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* [J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65 (4), 1018 - 1033
- [14] Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF [J]. *Science*, 2001, 294 (5545): 1337-1340
- [15] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation [J]. *Science*, 2001, 292 (5516): 468-472
- [16] Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level [J]. *Physiology*, 2004, 19 (4): 176-182
- [17] Lan AP, Liao XX, Mo LQ, et al. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-Activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e25921