

# 细胞缝隙连接对乳腺癌细胞紫杉醇敏感性的影响

李夏蔚, 朱颖\*, 原野, 许亚, 陈文林 (徐州市中心医院, 徐州 221000)

**摘要** 目的: 探讨细胞缝隙连接对乳腺癌细胞紫杉醇敏感性的影响。方法: 以乳腺癌 T47D 细胞为研究对象, 采用 CCK8 法检测细胞毒性。结果: 紫杉醇 (TAX) 的细胞毒性有细胞密度依赖性, 与低密度相比, 细胞在高密度时的毒性显著增加。这说明, 细胞在高密度有缝隙连接 (Gap Junction, GJ) 形成的情况下, TAX 的细胞毒性显著增加。此外, 细胞在高密度的情况下, 分别采用维甲酸 (RA) 和甘草次酸 (18- $\alpha$ -GA) 增强或抑制 GJ 功能, 结果发现, RA 组的 TAX 细胞毒性显著高于正常组, 相反, 给予 18- $\alpha$ -GA 抑制 GJ 功能后, TAX 的细胞毒性显著降低。结论: 增强 GJ 功能可显著提高乳腺癌细胞对 TAX 的敏感性。GJ 可能是提高 TAX 对乳腺癌疗效的新靶点。

**关键词:** 细胞缝隙连接; 紫杉醇; 细胞毒性

中图分类号: R979.1; R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)06-0753-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.06.010

## Effect of Gap Junction on the Sensitivity of Breast Cancer Cells to Paclitaxel

Li Xiawei, Zhu Ying\*, Yuan Ye, Xu Ya, Chen Wenlin (Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221000, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of gap junction on the sensitivity of breast cancer cells to Paclitaxel (TAX). **Methods:** Breast cancer T47D cells were used as objects and CCK8 assay was used to detect cytotoxicity. **Results:** The cytotoxicity of TAX was cell density dependent and the toxicity of cells at high densities has significantly increased compared to that at low density, indicating that the cell cytotoxicity of TAX significantly increased under the condition of high density and gap junction (GJ) formation. In addition, in the case of high density of cells, retinoic acid (RA) and glycyrrhetic acid (18- $\alpha$ -GA) were used to enhance or inhibit GJ function respectively. The results showed that TAX cytotoxicity of RA group was significantly higher than that of the normal group, while the TAX cytotoxicity of 18- $\alpha$ -GA group reduced significantly. **Conclusion:** Enhancing GJ function can significantly improve the sensitivity of breast cancer cells to TAX. GJ may be a novel target spot to improve the efficacy of TAX in breast cancer.

**Keywords:** gap junction; paclitaxel; cytotoxicity

乳腺癌是世界范围内最常见的危害女性健康的癌症<sup>[1]</sup>。目前, 乳腺癌的治疗包括手术、放疗、化学治疗 (化疗)、内分泌治疗、基因靶向治疗等<sup>[2]</sup>。在这些治疗方法中, 化疗仍是治疗乳腺癌的主要手段之一。紫杉醇 (Paclitaxel, TAX) 是从红

豆杉植物树皮中提取的代谢产物, 通过增加微管聚合、抑制微管解聚、抑制细胞进行有丝分裂诱导细胞死亡而发挥抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。由于 TAX 的抗肿瘤活性强, 对 G2 和 M 期细胞敏感, 因此, 常常和蒽环类药物联合应用以提高治疗效果。然而, TAX 在乳腺

癌治疗中耐药性的出现,大大降低了乳腺癌细胞对TAX的敏感性,从而影响了其在临床上的使用。因此,寻找提高乳腺癌对TAX敏感性的方法可为临床提高TAX治疗乳腺癌的疗效提供依据。

缝隙连接(Gap Junction, GJ)是相邻细胞间的跨膜通道,它由6个缝隙连接蛋白(Connexin, Cx)组成<sup>[4]</sup>。GJ沟通相邻细胞的胞浆,细胞浆中分子量<2kDa的离子、细胞信号分子和代谢物质等可通过GJ扩散、转运到与其毗邻的细胞浆,从而介导细胞内环境稳定、同步细胞的活动、控制细胞的生长发育和肿瘤形成等生物学事件<sup>[5-6]</sup>。研究发现,在多数肿瘤的形成过程中,常伴随GJ功能降低或消失,恢复肿瘤细胞的GJ,能抑制肿瘤细胞的生长分化<sup>[7]</sup>。在肿瘤治疗方面,GJ可增加多种抗肿瘤药的疗效<sup>[8]</sup>。乳腺癌组织的GJ主要由Cx43组成,Cx43组成的GJ能否提高TAX的敏感性尚未见文献报道。因此,本研究以乳腺癌T47D细胞为模型探讨GJ对乳腺癌TAX敏感性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、仪器及细胞株

TAX、甘草次酸(18- $\alpha$ -GA)和维甲酸(RA)均购自Sigma-Aldrich公司;DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶和青链霉素均购自Gibico公司;CCK8细胞毒性检测试剂盒购自日本Dojindo公司;酶标仪购自美国BioTek公司。其他试剂均为常用分析纯。乳腺癌T47D细胞购自ATCC公司。

### 1.2 细胞培养及给药

T47D细胞常规培养于含10% FBS和1%青链霉素的DMEM中,细胞按照高低密度接种于96孔

板,高密度接种后细胞发生融合,低密度接种细胞之间不接触。接种后,将TAX(终浓度为0.01、0.05、0.1、0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  18- $\alpha$ -GA加入细胞共同作用6 h。30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  RA则在与细胞作用18 h后,再加入上述浓度的TAX,共同作用6 h。

### 1.3 细胞毒性检测

采用CCK8细胞毒性试剂盒检测TAX对细胞的毒性作用。具体过程:TAX作用后,吸去培养液,每孔加入100  $\mu\text{L}$  CCK8溶液。将细胞放入37 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱孵育2 h后,用酶标仪在450 nm波长条件下测定吸光度,得到对应OD值。数据处理:

$$\text{细胞生存率} = \frac{\text{各组平均OD值} - \text{空白组平均OD值}}{\text{对照组平均OD值} - \text{空白组平均OD值}} \times 100\%$$

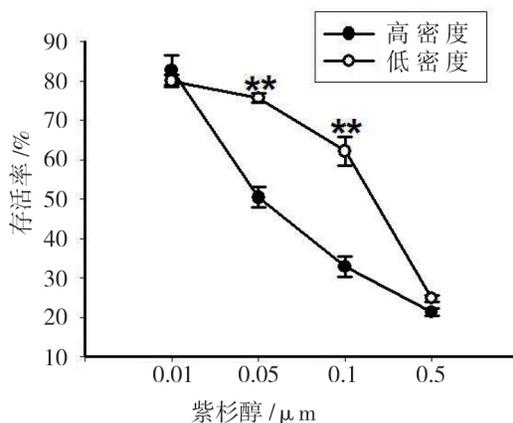
### 1.4 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,组间比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞密度对乳腺癌TAX敏感性的影响

在高密度接种情况下,细胞生长融合,细胞间紧密接触,有GJ形成;而在低密度接种的情况下,细胞之间没有接触,因此,GJ未形成。实验结果表明,TAX的细胞毒性在高密度和低密度的情况下均具有浓度依赖性;且在TAX浓度为0.05和0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,高密度接种的细胞生存率显著高于低密度接种的细胞(图1)。这说明当细胞接触有可能形成GJ的情况下,TAX的细胞毒性显著增加。



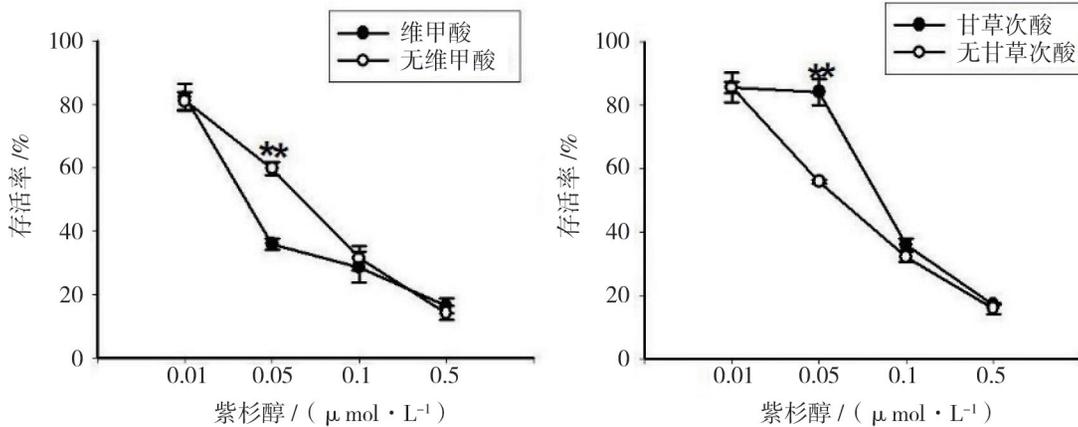
细胞采用高、低密度接种,与高密度组相比,\*\* $P < 0.01$ 。

图1 细胞密度对乳腺癌TAX敏感性的影响

### 2.2 GJ对TAX细胞毒性的影响

TAX细胞毒性具有浓度依赖性表明：Cx43组成的GJ可能对TAX细胞毒性产生影响。研究报道，RA可以通过影响Cx43蛋白表达而增强GJ的功能，而18- $\alpha$ -GA则可显著抑制GJ功能<sup>[9-10]</sup>。为了探讨Cx43组成的GJ对TAX细胞毒性的影响，在细胞高密度接种的情况下，分别采用GJ通道增强剂RA和GJ功能抑制剂18- $\alpha$ -GA来改变GJ功能。图2结果表明，当TAX的浓度为0.05  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，在给予GJ

通道增强剂RA后，TAX作用后细胞生存率与正常组相比显著降低，这说明增强GJ功能可显著增加TAX的细胞毒性；当给予GJ抑制剂18- $\alpha$ -GA后，TAX浓度在0.05  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，细胞生存率与正常组相比显著升高，这表明抑制GJ功能可显著降低TAX的细胞毒性。上述实验结果提示，细胞在高密度相互接触形成GJ后，提高Cx43组成GJ功能可显著提高乳腺癌对TAX的敏感性。



细胞用GJ功能增强剂维甲酸(RA)或GJ功能抑制剂甘草次酸(18- $\alpha$ -GA)作用后，采用CCK8细胞毒性试剂盒检测TAX的细胞毒性，与正常组相比，\*\* $P < 0.01$ 。

图2 GJ对TAX细胞毒性的影响

### 3 讨论

TAX耐药的出现大大限制了其临床使用<sup>[11-12]</sup>。因此，寻找提高TAX敏感性的方法，对提高TAX疗效、降低TAX治疗后肿瘤复发率具有重要意义。在本实验中，先采用细胞高、低密度接种的方法探讨细胞密度对TAX细胞毒性的影响。在高密度的情况下，细胞之间相互接触，有可能形成GJ；而细胞在低密度接种后，细胞之间没有直接接触，不可能形成GJ。结果发现，TAX在高密度时的细胞毒性显著高于低密度(图1)。这说明，在高密度的情况下，细胞之间的GJ可能提高TAX的乳腺癌细胞毒性。

研究发现，RA通过提高Cx43表达而显著提高GJ功能，是GJ功能常用的增强剂<sup>[13]</sup>。文献报道，100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  RA作用T47D细胞72 h不影响细胞活性<sup>[14]</sup>，因此，本研究采用30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  RA作用T47D细胞24 h并不影响细胞活性。研究表明，18-

$\alpha$ -GA可显著抑制不同Cx组成的GJ功能，是公认的GJ功能抑制剂<sup>[15]</sup>。因此，为了进一步探究GJ对TAX细胞毒性的影响，在细胞高密度接种有GJ形成的情况下，分别以RA和18- $\alpha$ -GA作用细胞增强或抑制GJ功能，结果发现，RA组的TAX细胞毒性显著高于正常组，相反，给予18- $\alpha$ -GA抑制GJ功能后，TAX的细胞毒性显著降低(图2)。这表明，增强GJ功能可显著提高乳腺癌细胞对TAX的敏感性。GJ可能是提高TAX对乳腺癌疗效的新靶点。

#### 参考文献：

- [1] 王竞伟, 邵先茹, 段秀庆. CyclinD1与乳腺癌的相关研究[J]. 医学综述, 2018, (4): 677-681.
- [2] 周婕. 晚期乳腺癌治疗的临床研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [3] 唐朝晖, 钟德珩. 紫杉醇抗肿瘤的分子机制[J]. 中国临床康复, 2006, 27: 125-127.

- [4] Zhou JZ, Jiang JX. Gap Junction and Hemichannel-independent Actions of Connexins on Cell and Tissue Functions: An Update[J]. FEBS Lett, 2014, 58 ( 8 ) : 1186-1192.
- [5] Jagger DJ, Forge A. Gap-junction-mediated Cell-to-cell Communication[J]. Cell Tissue Res, 2013, 352 ( 1 ) : 21-31.
- [6] Defamie N, Chepied A, Mesnil M. Connexins, Gap Junctions and Tissue Invasion[J]. FEBS Lett, 2014, 588 ( 8 ) : 1331-1338.
- [7] Kar R, Batra N, Riquelm M A, et al. Biological Role of Connexin Intercellular Channels and Hemichannels[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012, 524 ( 1 ) : 2-15.
- [8] Wang Q, You T, Yuan D, et al. Cisplatin and Oxaliplatin Inhibit Gap Junctional Communication by Direct Action and by Reduction of Connexin Expression, Thereby Counteracting Cytotoxic Efficacy[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 333 ( 3 ) : 903-911.
- [9] Kong H, Liu X, Yang L, et al. All-trans Retinoic Acid Enhances by Stander Effect of Suicide Gene Therapy in the Treatment of Breast Cancer[J]. Oncology Reports, 2015, 12 ( 29 ) : 1868-1874.
- [10] Wu DP, Lin TY, Bai LR, et al. Enhanced Phototoxicity of Photodynamic Treatment by Cx26-composed GJIC via ROS-, Calcium- and Lipid Peroxide-mediated Pathways[J]. J Biophotonics, 2017, 10 ( 12 ) : 1586-1596.
- [11] Schmidt M. Chemotherapy in Early Breast Cancer: When, How and Which One? [J]. Breast Care (Basel), 2014, 9 ( 3 ) : 154-160.
- [12] Wilks ST. Potential of Overcoming Resistance to HER2-targeted Therapies through the PI3K/Akt/mTOR Pathway [J]. Breast, 2015, 24 ( 5 ) : 548-555.
- [13] Carystinos GD1, Alaoui-Jamali MA, Phipps J, et al. Upregulation of Gap Junctional Intercellular Communication and Connexin 43 Expression by Cyclic-AMP and All-trans-retinoic Acid is Associated with Glutathione Depletion and Chemosensitivity in Neuroblastoma Cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 47 ( 2 ) : 126-132.
- [14] Flamini MI, Gauna GV, Sottile ML, et al. Retinoic Acid Reduces Migration of Human Breast Cancer Cells: Role of Retinoic Acid Receptor Beta[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18 ( 6 ) : 1113-1123.
- [15] Taylor HJ, Chaytor AT, Evans WH, et al. Inhibition of the Gap Junctional Component of Endothelium-dependent Relaxations in Rabbit Iliac Artery by 18-alpha Glycyrrhetic Acid [J]. Br J Pharmacol, 1998, 125 ( 1 ) : 1-3.

( 收稿日期 2017年11月21日 编辑 王雅雯 )