

气体信号分子硫化氢介导胃癌多药耐药性研究

陈伟毅¹, 胡柯¹, 刘雨¹, 彭靖², 李小成², 段绍毅¹, 陈立军¹, 杨骐彰¹

(1.湖南医药学院医学院, 湖南 怀化 418000;

2.湖南医药学院第一附属医院普外科, 湖南 怀化 418000)

摘要:目的 探讨硫化氢(H₂S)对胃癌多药耐药性(MDR)的影响。方法 采用逐步递增顺铂浓度法建立胃癌多药耐药细胞株MGC803/MDR, 显微镜观察细胞形态, CCK8法检测细胞对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的IC₅₀值, 亚甲基蓝分光光度计法检测H₂S含量, Western blot检测胱硫醚-β-合成酶(CBS)表达。结果 MGC803/MDR细胞在显微镜下排列松散, 胞体较小, 细胞形态呈梭形或不规则形。MGC803/MDR细胞对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的IC₅₀值显著高于MGC803细胞($P<0.01$); MGC803/MDR细胞H₂S、CBS表达显著高于MGC803细胞($P<0.01$); 采用氨基氧乙酸(AOAA)作用24 h后, MGC803/MDR细胞H₂S生成显著减少($P<0.01$), 对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的IC₅₀值显著降低($P<0.01$)。采用NaSH作用24 h后, MGC803细胞对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的IC₅₀值显著升高($P<0.01$)。结论 气体信号分子H₂S参与了胃癌多药耐药性的形成。

关键词: H₂S; 胃癌; 多药耐药性

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2023.19.016

文章编号: 1006-1959(2023)19-0080-04

Research on Gaseous Signaling Molecule Hydrogen Sulfide Mediating Multidrug Resistance in Gastric Cancer

CHEN Wei-yi¹, HU Ke¹, LIU Yu¹, PENG Jing², LI Xiao-cheng², DUAN Shao-yi¹, CHEN Li-jun¹, YANG Qi-zhang¹

(1.School of Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, Hunan, China;

2.Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of hydrogen sulfide (H₂S) on multidrug resistance of gastric cancer. **Methods** Multidrug resistant gastric cancer cell line MGC803/MDR were established by stepwise dose escalation with cisplatin. Cell morphology was observed under an optical microscope. Cell sensitivity to cisplatin, adriamycin and 5-fluorouracil was analyzed by computing IC₅₀ value which were determined by CCK8 assay. The methylene blue assay was used to detect H₂S. The protein level of cystathionine β synthase (CBS) was detected by Western blot analysis. **Results** MGC803/MDR cells were loosely arranged with small cell bodies and spindle or irregular cell morphology under microscope observation. The IC₅₀ values of cisplatin, adriamycin and 5-fluorouracil in MGC803/MDR cells were significantly higher than in MGC803 cells ($P<0.01$). The level of H₂S and the protein level of CBS in MGC803/MDR cells were significantly higher than in MGC803 cells ($P<0.01$). After 24 h treatment with aminoxycetic acid (AOAA), the production of H₂S in MGC803/MDR cells was significantly reduced, and the IC₅₀ values of cisplatin, adriamycin and 5-fluorouracil in MGC803/MDR cells were significantly decreased ($P<0.01$). After 24 h treatment with NaSH, the IC₅₀ values of cisplatin, adriamycin and 5-fluorouracil in MGC803 cells were significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** H₂S mediates multidrug resistance of gastric cancer.

Key words: H₂S; Gastric cancer; Multidrug resistance

胃癌(gastric cancer)是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 全国肿瘤中心数据显示, 胃癌发病人数和死亡人数均居所有恶性肿瘤第2位, 已严重危害我国居民健康^[1]。化疗是治疗胃癌的主要方法之一, 然而

胃癌对化疗并不敏感, 目前应用的多种药物以及多种给药方案的总体疗效评价很不理想^[2]。化疗失败主要是由于胃癌对化疗药物产生了多药耐药性(multidrug resistance, MDR)^[3]。胃癌多药耐药的产生严重影响了化疗在胃癌治疗中的效果, 如何逆转多药耐药已成为胃癌治疗中的一个关键问题。硫化氢(hydrogen sulphide, H₂S)是一种新的内源性气体信号分子, 具有多种生理、毒理和药理作用, 如调节离子通道的开放和关闭、抑制细胞增殖、抗氧化应激、舒张平滑肌、抗内质网应激等^[4]。研究表明^[5], H₂S可以促进肿瘤耐药性, 但H₂S对胃癌耐药性的影响目前尚未明确。本研究拟探讨H₂S与胃癌多药耐药的关系, 为逆转胃癌多药耐药提供新的靶点。

基金项目: 1. 湖南省卫生健康委科研课题基金资助项目(编号: 202104081483); 2. 湖南省自然科学基金资助项目(编号: 2022JJ50290); 3. 2022年度湖南省大学生创新创业训练计划资助项目(编号: 5021); 4. 2022年国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 202212214009); 5. 湖南医药学院2020年科研孵化库建设项目第二批基金资助项目(编号: 02)

作者简介: 陈伟毅(1986.1-), 男, 湖南衡阳人, 硕士, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤防治方面的研究

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 RPMI 1640、胎牛血清(美国 Gibco 公司),顺铂(齐鲁制药有限公司),阿霉素(深圳万乐药业有限公司),5-氟尿嘧啶(海南卓泰制药有限公司),CCK8 试剂盒(碧云天公司),BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),NaSH(美国 Sigma 公司),胱硫醚- β -合成酶(Cystathionine- β -synthase,CBS)抗体、 β -actin 抗体(美国 CST 公司)。

1.2 仪器 UV2450 型亚甲基蓝分光光度计(日本 SHIMADZU 公司),AE2000 型光学倒置显微镜(美国 Motic 公司),Mini-PROTEAN Tetra 型聚丙烯酰胺垂直电泳系统、ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞及培养 人胃癌 MGC803 细胞购于中科院上海细胞库,用含有 10%的胎牛血清的 RPMI 1640,培养于 37℃、5% CO₂ 孵箱中,每 48 h 用 0.25% 的胰酶消化传代进行后续实验。

1.4 方法

1.4.1 顺铂诱导多药耐药胃癌细胞株的建立 取对数生长期的胃癌 MGC803 细胞,用含 1 mg/L 顺铂的培养基培养 48 h 后更换为不含顺铂的培养基继续培养。待细胞恢复活力后,用含相同浓度顺铂的培养基继续培养,直至细胞能够在含 1 mg/L 顺铂的培养基里稳定生长。采用同样的方法将顺铂浓度逐步提高为 2、3、4、5 mg/L,最终建立耐 5 mg/L 顺铂的胃癌多药耐药细胞 MGC803/MDR,倒置显微镜观察细胞形态并拍照。

1.4.2 细胞分组及处理 将 MGC803/MDR 细胞随机分成对照组和氨基氧乙酸(AOAA)组,AOAA 组予以 1 mmol/L AOAA 处理 24 h,对照组予以等量的培养基处理 24 h。另取 MGC803 细胞随机分成对照组和 NaSH 组,NaSH 组予以 200 μ mol/L NaSH 处理 24 h,对照组予以等量的培养基处理 24 h。

1.4.3 CCK8 法计算 IC₅₀ 值 取对数生长期的胃癌 MGC803 或 MGC803/MDR 细胞以每孔 1×10⁵/ml,100 μ l/孔接种在 96 孔板中,常规培养细胞达到板底 80%,分别予以 0、1、2、3、4、6 mg/L 顺铂、5-氟尿嘧啶、0、0.5、1、1.5、2 mg/L 阿霉素处理 24 h 后,吸去培养液,每孔加入含 10 μ l CCK8 的培养液 110 μ l,同时在空白孔内加入含 10 μ l CCK8 的培养液 110 μ l 进行空白对照,继续孵育 1 h,酶标仪检测 450 nm 出吸光度 OD 值,计算细胞活力=(加药孔 OD 值-空白孔 OD 值)/(不加药孔 OD 值-空白孔 OD 值)×100%,采用改

良寇式法计算 IC₅₀ 值^[6]。

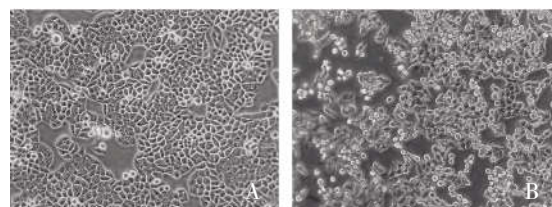
1.4.4 亚甲基蓝分光光度计法检测 H₂S 含量 取对数生长期的胃癌 MGC803 或 MGC803/MDR 细胞以每孔 1×10⁶/ml,500 μ l/孔接种在 24 孔板,收集细胞培养基于含 2%醋酸锌 30 μ l 离心管中,超声波裂解细胞后将其置于之前的离心管中,采用亚甲基蓝分光光度计法检测 H₂S 含量^[7]。

1.4.5 Western blot 检测蛋白表达 提取细胞蛋白,采用 BCA 法测量蛋白浓度,每组取 60 μ g 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将蛋白转移到 NC 膜上,封闭后加入一抗 4℃过夜,再加入二抗孵育 2 h,曝光显影,以 β -actin 作为内参,采用 Quantity one 软件分析蛋白表达量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,实验数据均以($\bar{x}\pm s$)表示,两两比较采用独立样本 *t* 检验,*P*<0.01 视为统计学意义显著。

2 结果

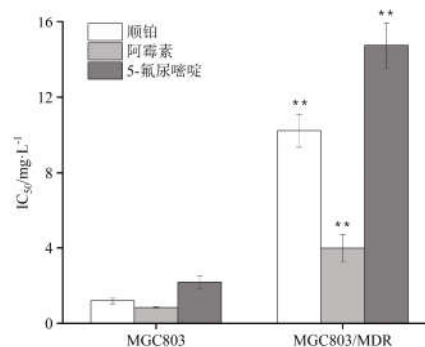
2.1 细胞形态学观察 采用倒置显微镜观察细胞形态:MGC803 细胞形态规则,呈多边形或三角形,胞体较大,细胞之间连接紧密,边界清晰。MGC803/MDR 细胞排列松散,细胞之间界限不清,胞体较小,细胞形态呈梭形或不规则形,见图 1。



注:A:MGC803 细胞;B:MGC803/MDR 细胞

图 1 胃癌细胞形态观察(×200)

2.2 两种胃癌细胞株 IC₅₀ 值 MGC803/MDR 细胞对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的 IC₅₀ 值高于 MGC803 细胞(*P*<0.01),见图 2。



注:与 MGC803 相比,***P*<0.01

图 2 两种胃癌细胞株 IC₅₀ 值

2.3 两种胃癌细胞株 H₂S、硫化氢生成酶 CBS 表达 MGC803/MDR 细胞 H₂S (91.8±4.36)、CBS (0.85±0.02) 表达高于 MGC803 细胞 (62.53±1.86)、(0.32±0.01) ($P<0.01$), 见图 3。

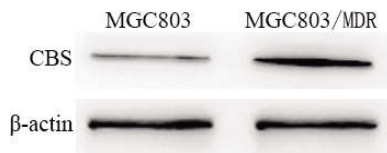
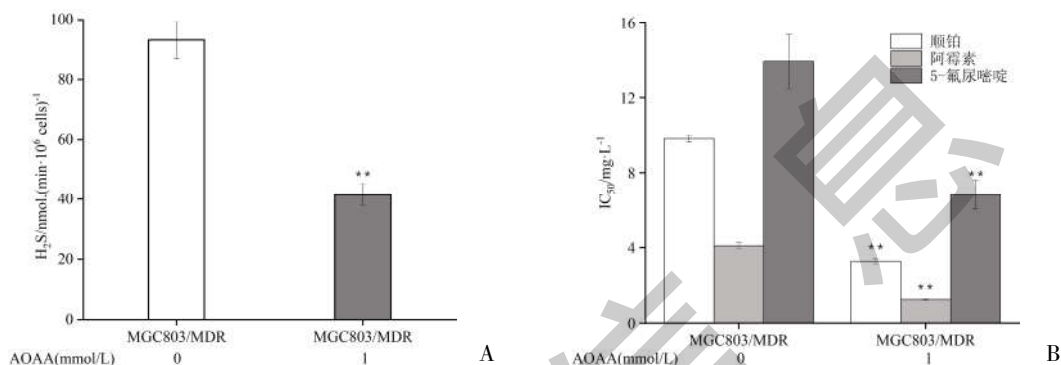
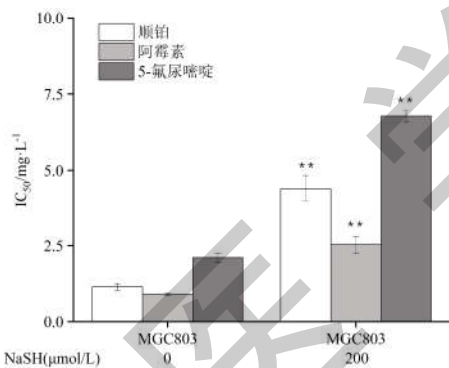


图3 两种胃癌细胞 CBS 表达



注:A:AOAA 降低 H₂S 表达;B:AOAA 降低 IC₅₀ 值;与 AOAA 0 mmol/L 相比,** $P<0.01$

图4 AOAA 对 H₂S 表达和 IC₅₀ 值的影响



注:与 NaSH 0 μmol/L 相比,** $P<0.01$

图5 NaSH 对 MGC803 细胞 IC₅₀ 值的影响

3 讨论

胃癌多药耐药的产生严重影响了化疗在胃癌治疗中的效果,并导致肿瘤复发和转移,引起胃癌治疗失败^[8,9]。如何逆转多药耐药已成为胃癌治疗中的关键问题^[10]。H₂S 是机体内一种新型气体信号分子,具有分子量小、扩散快、效应广等特点^[11,12]。研究表明,H₂S 与肿瘤耐药形成有关^[5],但其与胃癌多药耐药的关系目前尚未明确。本研究拟探讨 H₂S 与胃癌多药耐药的关系,为防治胃癌多药耐药提供新的思路。H₂S 是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)后第 3 种

2.4 AOAA 对 MGC803/MDR 细胞 H₂S 表达和 IC₅₀ 值的影响 采用 CBS 抑制剂 AOAA 作用于 MGC803/MDR 细胞 24 h 后,H₂S 生成显著减少,见图 4A;对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的 IC₅₀ 值显著降低,见图 4B。

2.5 NaSH 对 MGC803 细胞 IC₅₀ 值的影响 采用 NaSH (外源性 H₂S) 作用 MGC803 细胞 24 h 后,MGC803 细胞对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的 IC₅₀ 值显著升高,见图 5。

气体信号分子,广泛参与多种生理和病理过程^[13,14]。近来越来越多的文献报道 H₂S 与肿瘤耐药相关,如 Untereiner AA 等^[15]发现 H₂S 和 CBS 在 5-氟尿嘧啶耐药结肠癌细胞中显著上调,Bhattacharyya S 等^[16]报道 CBS 可以促进卵巢癌细胞对顺铂耐药,Wang L 等^[17]发现 CBS 过表达可引起肝癌细胞对多柔比星和舒尼替尼产生耐药。上述研究表明 H₂S 与多种肿瘤耐药密切相关,但 H₂S 与胃癌耐药的关系尚未明确。

本研究首先采用药物浓度递增法建立了胃癌多药耐药细胞株 MGC803/MDR。通过 CCK8 实验发现 MGC803/MDR 细胞对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的 IC₅₀ 值显著高于 MGC803 细胞,表明其具有多药耐药性。其次通过亚甲基蓝分光光度计法、Western blot 等实验发现 MGC803/MDR 细胞 H₂S 含量、H₂S 生成酶 CBS 表达高于 MGC803 细胞,表明 MGC803/MDR 细胞多药耐药性与 H₂S 生成增多有关。之后采用 CBS 抑制剂 AOAA 降低 MGC803/MDR 细胞 H₂S 后,发现 MGC803/MDR 细胞 H₂S 生成减少,同时对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的 IC₅₀ 值降低,表明抑制 H₂S 生成可以逆转 MGC803/MDR 细胞的多药耐药

性。为了进一步验证 H_2S 对胃癌多药耐药的影响,给予 MGC803 细胞 NaSH(外源性 H_2S)处理,发现在 NaSH 的作用下,MGC803 细胞对顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶的 IC_{50} 值升高,表明增加 H_2S 生成可以促进 MGC803 细胞多药耐药性。上述研究结果表明 H_2S 介导了胃癌细胞多药耐药性的形成。

有研究报道^[18],内源性 H_2S 可以促进人胃癌细胞增殖。另有文献报道^[19],抑制 H_2S 生成可以减少胃癌血管生成。此外,有资料发现^[20],降低 H_2S 生成可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移。本实验发现升高 H_2S 浓度可以促进胃癌多药耐药,降低 H_2S 浓度可以逆转胃癌多药耐药,表明 H_2S 介导了胃癌的多药耐药, H_2S 可能是防治胃癌多药耐药的一个新的靶点。

综上所述,本研究发现 H_2S 介导了胃癌的多药耐药的形,发掘了胃癌多药耐药形成的新机制,为防治胃癌多药耐药提供了新的思路。然而,本研究也有一些不足之处,比如只进行了体外细胞实验验证,没有进行体内动物实验验证,以及 H_2S 通过何种途径介导胃癌多药耐药,其机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1]Peng X,Zha L,Chen A,et al.HOXA5 is a tumor suppressor gene that is decreased in gastric cancer[J].Oncol Rep,2018,40(3):1317-1329.
- [2]Yao LW,Wu LL,Zhang LH,et al.MFAP2 is overexpressed in gastric cancer and promotes motility via the MFAP2/integrin $\alpha 5 \beta 1$ /FAK/ERK pathway[J].Oncogenesis,2020,13,9(2):17.
- [3]Kong FB,Deng QM,Deng HQ,et al.Siva-1 regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting MDR1 and MRP1 via the NF- κ B pathway [J].Mol Med Rep,2020,22(2):1558-1566.
- [4]Kweon Y,Park JY,Kim YJ,et al.Imaging Hydrogen Sulfide in Hypoxic Tissue with $[^{99m}Tc]Tc$ -Gluconate [J].Molecules,2020,28,26(1):96.
- [5]Ascenção K,Lheimeur B,Szabo C.Regulation of CyR61 expression and release by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in colon cancer cells[J].Redox Biol,2022,56:102466.
- [6]徐婷婷,白伟良,谭海燕,等.雷帕霉素对体外培养的鼻息肉细胞增殖的影响[J].中国医科大学学报,2019,48(11):978-982.
- [7]许岩,马娜,邓树泳,等.胱硫醚- β -合酶/硫化氢系统在鱼藤酮诱导 PC12 细胞损伤中的变化 [J].中国药理学通报,2014(10):1372-1376.
- [8]王慧,顾康生.叉头框家族 D3 和腺苷酸活化蛋白激酶 5 与胃癌顺铂耐药机制的研究 [J].中国临床药理学杂志,2022,38(7):657-660,666.
- [9]郑培明,李俊蒙,张鹏,等.巨噬细胞外泌体源 miR-223 促进胃癌细胞对奥沙利铂的耐药研究 [J].中国癌症杂志,2021,31(5):368-376.
- [10]Felipe AV,Oliveira J,Moraes AA,et al.Reversal of Multidrug Resistance in an Epirubicin-Resistant Gastric Cancer Cell Sub-line[J].Asian Pac J Cancer Prev,2018,19(5):1237-1242.
- [11]Teng Y,Xuan S,Jiang M,et al.Expression of H_2S in Gestational Diabetes Mellitus and Correlation Analysis with Inflammatory Markers IL-6 and TNF- α [J].J Diabetes Res,2020,2020:3085840.
- [12]Yu Y,Zhou X,Zhu Z,et al.Sodium Hydrosulfide Mitigates Cadmium Toxicity by Promoting Cadmium Retention and Inhibiting Its Translocation from Roots to Shoots in Brassica napus [J].J Agric Food Chem,2019,67(1):433-440.
- [13]De Cicco P,Ercolano G,Rubino V,et al.Modulation of the functions of myeloid-derived suppressor cells: a new strategy of hydrogen sulfide anti-cancer effects [J].Br J Pharmacol,2020,177(4):884-897.
- [14]Yang N,Liu Y,Li T,et al.Role of Hydrogen Sulfide in Chronic Diseases[J].DNA Cell Biol,2020,39(2):187-196.
- [15]Untereiner AA,Pavlidou A,Druzhyina N,et al Drug resistance induces the upregulation of H_2S -producing enzymes in HCT116 colon cancer cells [J].Biochemical Pharmacology,2018,149:174.
- [16]Bhattacharyya S,Saha S,Giri K,et al.Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance[J].PLoS One,2013,8(11):e79167.
- [17]Wang L,Han H,Liu Y,et al.Cystathionine- β -synthase Induces Multidrug Resistance and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma[J].Curr Mol Med,2018,18(7):496-506.
- [18]Sekiguchi F,Sekimoto T,Ogura A,et al.Endogenous Hydrogen Sulfide Enhances Cell Proliferation of Human Gastric Cancer AGS Cells[J].Biol Pharm Bull,2016,39(5):887-890.
- [19]Choi KS,Song H,Kim EH,et al.Inhibition of Hydrogen Sulfide-induced Angiogenesis and Inflammation in Vascular Endothelial Cells: Potential Mechanisms of Gastric Cancer Prevention by Korean Red Ginseng[J].J Ginseng Res,2012,36(2):135-145.
- [20]Ye F,Li X,Sun K,et al.Inhibition of endogenous hydrogen sulfide biosynthesis enhances the anti-cancer effect of 3,3'-diindolylmethane in human gastric cancer cells [J].Life Sci,2020,261:118348.

收稿日期:2023-01-19;修回日期:2023-02-21

编辑/肖婷婷