|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分类号 | **R963** | 密 级 |  | 学校代码 | **10367** |
| U D C | **615.1** | 编 号 |  | 学 号 | **20128631243** |

**Cx43 通过抑制 EMT 逆转人肺腺癌细胞 A549**

**对顺铂的获得性耐药**

**Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT**

**论文类别：学术研究型**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **作** 者 姓 名 | **李利** | **指导教师姓名** | **陶亮、童旭辉** |
| **申请学位级别** | **硕** 士 | **学位授予单位** | **蚌埠医学院** |
| **学** 科 专 业 | **药理学** | **研 究 方** 向 | **肿瘤药理** |
| **论文答辩时间** | **2015 年 5 月** | **学位授予日期** | **2015 年 6 月** |

|  |  |
| --- | --- |
| **答辩委员会主席：** |  |
| **论 文 评 阅 人：** |  |

**2015 年 5 月**



**硕 士 学 位 论 文**

|  |  |
| --- | --- |
| **论** 文 题 **目：** | **Cx43 通过抑制 EMT 逆转人肺腺癌细胞 A549 对**  **顺铂的获得性耐药** |
|  | **Cx43 reverses the resistance of A549 lung**  **adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT** |
| **研 究 生 姓 名 :** | **李利** |
| **指** 导 教 师 **:** | **陶亮教授、童旭辉副教授** |
| **学** 科 专 业 **:** | **药理学** |
| **研** 究 方 向 **:** | **肿瘤药理** |
| **论文工作时间 :** | **2013 年 3 月至 2015 年 5 月** |

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。本论文中除引文外，所有实验、数据和有关材料均是真实的。本论文中除引文和致谢的内容外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。其他同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了声明并表示了谢意。

学位论文作者签名： 日 期：

学位论文使用授权声明

研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属蚌埠医学院。学校有权保存本学位论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本学位论文的部分或全部内容，可以采用影印、复印等手段保存、汇编本学位论文。学校可以向国家有关机关或机构送交论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅。（保密论文在解密后遵守此规定）

保密论文注释：本学位论文属于保密论文，密级： 保密期限为 年。

学位论文作者签名： 导师签名：

日 期： 日 期：

目录

Cx43通过抑制EMT逆转人肺腺癌细胞A549对顺铂的

获得性耐药

# 中文摘要

**目的：**

观察Cx43对人肺腺癌细胞A549的获得性耐药的影响，以及与上皮间质转化

（epithelial-mesenchymal transition, EMT）的关系。

**方法：**

采用MTT法确定耐药株，用不同浓度的顺铂（0, 20, 40, 80, 160, 320µM）分别作用人肺腺癌敏感株（A549）和人肺腺癌耐顺铂耐药株（A549/CDDP）48 h后测定细胞存活率，确定耐药指数。

1. 采用Western blotting法检测A549和A549/CDDP中Cx43及EMT标志蛋白上皮钙粘附素（E-cadherin）、波形蛋白（Vimentin）、转录因子Snail, Slug的表达，及干扰和过表达Cx43后EMT相关蛋白的表达。

2. 采用SiRNA小干扰的方法下调Cx43的表达，用过表达方法上调Cx43的表达。

3. 采用Transwell法检测A549和A549/CDDP的侵袭能力，以及干扰或过表达

Cx43后细胞的侵袭能力。

4. 采用划痕实验来检测A549和A549/CDDP的转移能力，以及干扰或过表达

Cx43后细胞的转移能力。

5. 统计学方法：组间数据分析采用SPSS13.0软件进行t检验。

**结果：**

**1. 耐药株的鉴定**

M TT结果显示：A549/CDDP的IC50=311.2µM, A549的IC50=53.6µM，RI=5.8，

结果显示A549/CDDP对顺铂产生了获得性耐药。

**2. A549/CDDP细胞与A549细胞相比发生了EMT转化**

Western blotting的结果显示与A549相比A549/CDDP细胞中的上皮标志蛋白

E-cadherin的表达显著降低，而间质标志蛋白Vimentin的表达显著增强，转录因子

Snail、Slug的表达也显著增强。

**3. 与A549细胞相比A549/CDDP细胞的侵袭转移能力显著增强**

细胞侵袭转移能力的获得是EMT改变的重要标志，Transwell和划痕的实验结果表明，与A549相比A549/CDDP细胞的侵袭转移能力显著增强。

**4. 与A549细胞相比A549/CDDP细胞中Cx43的表达量显著降低**

Western blotting结果表明，与A549相比A549/CDDP细胞中的Cx43的表达量显著降低，此差异具有统计学意义。

**5.上调Cx43的表达可逆转A549/CDDP细胞的EMT转化**

采用过表达技术将含目的基因的质粒（pcDNA- Cx43）与空质粒（pcDNA）分别转染进入A549/CDDP细胞中，在显微镜下观察细胞形态发现与pcDNA相比pcDNA- Cx43组过表达Cx43后细胞的形态重新变得圆润，细胞间粘附增强；Western blotting结果显示：与pcDNA相比pcDNA- Cx43组过表达Cx43 后

E-cadherin的表达显著增强而间质标志蛋白Vimentin的表达显著降低，转录因子

Snail, Slug的表达也显著降低。

**6. 下调Cx43的表达可诱导A549细胞发生EMT转化**

采用基因敲除技术将含目的基因的小干扰片段（siRNA- Cx43）与空质粒（NC）分别转染进入A549细胞中在，在A549细胞中沉默Cx43的表达后，Western Blottin结果显示：与NC组相比siRNA- Cx43的E-cadherin的表达显著降低而间质标志蛋白Vimentin的表达显著增强，转录因子Snail, Slug的表达也显著增强。

**7. Cx43可调控人肺腺癌细胞的侵袭转移能力**

Transwell实验和划痕的实验结果表明在A549/CDDP细胞中过表达Cx43后，侵袭转移能力显著降低；Transwell实验和划痕的实验结果表明在A549/CDDP细胞中沉默Cx43的表达后，侵袭转移能力显著增强。

**8. Cx43可调控人肺腺癌细胞对顺铂的敏感性**

结果显示，在A549/CDDP细胞中过表达Cx43后，对CDDP的敏感性显著增强；在A549细胞中干扰Cx43后，对CDDP的敏感性显著降低。以上结果均表明

Cx43可调控人肺腺癌细胞对CDDP的敏感性。

**结论：**Cx43可调控人肺腺癌A549对顺铂的获得性耐药，可能与Cx43可抑制EMT

的作用有关。

**关键词：**顺铂；肺癌； Cx43； EMT

# 英文摘要

Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT

Abstract

**Objective：**

To determine the effect of Cx43 in promoting lung cancer progression and CDDP resistance by regulating EMT in *vitro*.

**Methods:**

1. MTT assay was used to examine cell viability. Cells were treated with increasing concentrations of CDDP (20-320µM) for 48 h, and the cell viability was assessed by MTT assay, then calculate resistance index (RI).

2. Western blotting assay was used to explore the expressions of E-cadherin, Vimentin, Snail, Slug and Cx43.

3. Overexpression of Cx43 and inhibition of Cx43 expression by siRNA transfection.

4. We measured the migratory activity of the cells by wound-healing assays.

5. Matrigel invasion assay was used to compare invasive activity of the cells.

6. Statistical analysis. Statistical analysis between groups was performed using an unpaired Student's t-test with SigmaPlot 10.0 software.

**Results：**

**1. The determination of resistant strains.**

The IC50 of A549/CDDP cell was 311.2µM and IC50 of A549 cell was 53.6µM, the A549/CDDP cell line demonstrated a 5.8-fold higher resis-tance to CDDP than the A549 cell line.

**2. Acquired resistance of A549/CDDP cells to CDDP induces the cells to undergo EMT.**

We observed the morphological and the expression of EMT markers changes in A549/CDDP cells. These results demonstrated that the acquired resistance to

CDDP induced A549/CDDP cells to undergo EMT.

**3. A549/CDDP cells display increased potential for migration and invasion.**

Cells that have undergone EMT display increased migratory and invasive behaviors. Thus, in the following experiment, we measured the invasive and migratory activity of the cells by Transwell and wound-healing assays. We found that the A549/CDDP cells displayed increased potential for migration and invasion.

**4. A549/CDDP cells show decreased expression of Cx43.**

Western blotting was used to detect the expression of Cx43 in A549 and A549/CDDP cells. Bar graphs derived from the densitometric scanning of the blots, significantly different from A549 cells.

**5. Overexpression of Cx43 reverses EMT in A549/CDDP cells.**

We overexpressed Cx43 by transfection of pcDNA-Cx43 in A549/CDDP cells. Western blotting was used to confirm this effect. Results shows that the pcDNA- transfected cells exhibited an elongated fibroblast- like morphology, whereas Cx43-A549/CDDP cells, which had a high Cx43 expression level, displayed epithelial morphology. Moreover, compared with the pcDNA-transfected cells, the expression level of EMT markers also demonstrate that upregulation of Cx43 by pcDNA-Cx43 converted EMT to mesenchymal-epithelial transition (MET) in the A549/CDDP cells.

**6. Knockdown of Cx43 expression induces EMT in A549 cells.**

We downregulated Cx43 expression in A549 cells which were sensitive to CDDP using siRNA. Compared with the NC control cells, the cells displayed a spindle-like fibroblastic phenotype, and the expression of EMT markers showed that A549 cells underwent EMT. These results suggest that Cx43 is involved in the regulation of CDDP-induced EMT in human lung cancer cells.

**7. Cx43 regulates invasive and migratory properties of cells.**

To further investigate the effect of Cx43 on EMT in human lung cancer, we investigated the invasive and migratory properties of the cells. The results revealed that when A549/CDDP cells were transfected with Cx43, the capability of these cells to migrate and invade were obviously reduced relative to the pcDNA-transfected cells. In contrast,

A549 cells transfected with Cx43 siRNA showed significant enhancement in their

Invasive and migratory properties. These results provide further evidence that Cx43 is involved in the regulation of CDDP-induced EMT in human lung cancer cells.

8. **Cx43 regulates CDDP-induced cytoxicity in human adeno-carcinoma cells.** To observe the effect of Cx43 on the cytotoxic effect of CDDP, we manipulated Cx43 expression in two ways: overexpression of Cx43 by transfection of pcDNA-Cx43 in

A549/CDDP cells and knockdown of Cx43 expression with siRNA-Cx43 in A549 cells. The results showed that compared with the pcDNA-transfected cells, overexpression of Cx43 in the A549/CDDP cell line significantly reversed resistance of the cells to CDDP. Conversely, knockdown of Cx43 expression with siRNA-Cx43 resulted in insensitivity of A549 cells to CDDP. These results suggest that downregulation of Cx43 which induces EMT may underlie the resistance of A549 cells to CDDP.

**Conclusion：**

Cx43 plays a critical role in promoting lung cancer progression and CDDP resistance by regulating EMT.

**Key words:** Cisplatin; Lung cancer; Cx43; Epithelial-mesenchymal transition

引 言

近年来肺癌的发病率和死亡率有显著增高的趋势，已成为发病率和致死率最高的恶性肿瘤。肺癌的病因至今尚不完全明确。肺癌的基本类型可大致分为小细胞肺癌（Small cell lung carcinoma, SCLC）和非小细胞肺癌（Non-small cell lung

carcinoma，NSCLC）两种，其中NSCLC约占80％~85％。迄今为止化疗仍是肺癌的主要治疗方法，90%以上的肺癌需要接受化学治疗。临床上对非小细胞肺癌的治疗也多采用以顺铂为基础化疗的联合化疗方式，一线化疗方案有：长春瑞宾+顺铂或卡铂、双氟胞苷+顺铂或卡铂、紫杉醇+顺铂或卡铂、多西紫杉醇+顺铂或卡铂，这些方案中都含有铂类，其化疗有效率为30%～40%。肺癌同其它实质肿瘤一样，在化疗过程中肺癌细胞耐药性的获得是导致其治疗失败的常见原因。近年来对于肺癌的治疗多采取以手术为主的多学科综合治疗方式，新的化疗药物及化疗方案不断涌现，但对肺癌的总体治疗效果却不尽如人意，耐药性的发生已成为肺癌治疗的瓶颈问题。深入研究肺癌耐药性发生的机制、寻找出有效的干预靶点是提高肺癌患者总体疗效的关键。

在肿瘤治疗过程中肿瘤细胞对抗肿瘤药物产生获得性耐药是导致肿瘤治疗失败的常见原因。然而，目前耐药性获得的具体机制仍不清楚，对于逆转耐药性的发生也缺乏有效的途径，肿瘤细胞的获得性耐药仍是影响肿瘤治疗效果的重要因素。有研究表明，肿瘤细胞在化疗药物的治疗过程中发生上皮间质转化

（epithelial-mesenchymal transition, EMT）与其耐药性的获得密切相关[1]。简单来说，上皮间质转化是指在特定的生理和病理情况下上皮细胞转化为间质细胞的生物学过程，主要表现为上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得。在细胞发生EMT的过程中，细胞会分泌基质金属蛋白酶来降解原有的细胞外基质并形成新的细胞基质粘附，导致上皮细胞失去了细胞极性等上皮细胞特征，进而获得了较高的迁移与侵袭能力等间质细胞特征[2]。EMT转化过程中，N-钙粘蛋白（N-cadherin）和波形蛋白（Vimentin）表达增加，β-连环蛋白（β-catenin）核定位，转录因子Snail、

Slug、Twist等水平增高，从而抑制上皮钙粘附素（E-cadherin）的表达。上皮标志蛋白E-cadherin表达的缺失是肿瘤细胞EMT转化的重要标志。在化疗药物治疗过程中，肿瘤细胞产生获得性耐药的过程中常出现间质化的特征，上皮间质转化已逐渐成为肿瘤细胞获得性耐药的一个重要机制[3]。有研究[4]发现结肠癌耐药细胞株

细胞表现为形态呈长梭形，细胞极性丧失，钙粘蛋白E-cadherin的表达降低而波形蛋白Vimentin表达增加等EMT转化特征。另外在乳腺癌耐药细胞株[5]、胰腺癌耐药细胞株[6, 7]、结肠癌的耐药细胞株中均观察到了上皮间质转化现象[8, 9]。上述研究结果均表明EMT在肿瘤细胞的获得性耐药过程中可能起到了关键性的作用，EMT有可能成为逆转获得性耐药的新靶点。

缝隙连接（gapjunction, GJ）是细胞间直接进行信息交换的重要通道，由其介导的通讯方式缝隙连接细胞间通讯（gapjunction intercellular communica- tion, GJIC）在细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程中发挥着关键的调节作用[10]。缝隙连接是由连接蛋白（connexin, Cx）组成的维持细胞间通讯的重要方 式。Cxs是由多基因家族编码的一类结构相似而相对分子质量不同的蛋白质。根据相对分子质量的不同可将Cxs分别命名为Cx26、Cx32、Cx37、Cx43、Cx56等。在肺腺癌组织中，主要表达的连接蛋白为Cx43。顺铂是临床治疗肺癌的基础药物，但是在顺铂应用过程中肿瘤细胞对顺铂产生耐药，是影响其治疗效果的关键性因素，然而关于顺铂耐药性产生的具体原因至今仍未阐明。研究发现在顺铂的治疗过程中常伴有缝隙连接细胞间通讯水平的降低[11, 12]，因此人们在GJIC与抗肿瘤药的细胞毒性方面进行了一些研究。研究表明通过改变GJIC的基本组成单位Cx43

可使顺铂诱导的细胞凋亡增加，进而增加顺铂的细胞毒性[13]。还有研究发现，肉瘤基因（sarcoma gene, Src）抑制剂可通过抑制缝隙连接蛋白的磷酸化来增强缝隙连接介导的细胞间通讯功能进而提高顺铂的细胞毒性[14]。这一发现可作为新的策略用于肿瘤治疗和逆转耐药。

抗肿瘤药物在治疗过程中使肿瘤细胞产生耐药致使疗效降低常常导致化疗失败。缝隙连接功能的异常或缝隙连接蛋白表达量的降低是肿瘤形成的一个重要原因，而在顺铂的治疗过程中也常伴有缝隙连接通讯功能水平的降低，且上皮间质转化已成为肿瘤耐药的重要机制，Cx和E-cadherin之间又存在一定的相互调控作用。因此可以设想以Cx和EMT作为药物的作用靶点来增强抗肿瘤药的治疗效果。要解决这一问题，首先我们要明确Cx或EMT的变化对抗肿瘤药物细胞毒性的影响，然后寻找能改变Cx或EMT药物来增效抗肿瘤药物的作用，为逆转肿瘤耐药提供新的可行途径。根据以上的研究，我们可以设想应用Cx表达增强剂或EMT逆转剂来使抗肿瘤药物的细胞毒性增强。

近年来的研究表明EMT与肿瘤细胞耐药性的发生密切相关且在化疗药应用的

过程中常伴有连接蛋白43（connexin 43, Cx43）的表达降低的现象，但至今尚无研究表明Cx43可调控EMT的直接证据。我们前期研究发现：在肺腺癌细胞A549的耐药株A549/DDP中发现了Cx43表达的降低及EMT现象的发生。据此我们提出“Cx43可通过抑制EMT来逆转人肺腺癌A549对顺铂的获得性耐药”这一研究假设。为证实该假设，本研究在上述基础上，在细胞水平深入探讨Cx43对A549细胞EMT转化及耐药性获得的影响，以期为耐药性的获得提供新的干预靶点。

# 材料与方法

目 录

[中文摘要](#_Toc686171498) 4

[英文摘要](#_Toc686171499) 5

[Abstract](#_Toc686171500) 5

[引 言](#_Toc686171501) 6

[材料与方法](#_Toc686171502) 6

[1 材料与仪器](#_Toc686171503) 6

[1.1 细胞系](#_Toc686171504) 6

[1.2 试剂与耗材](#_Toc686171505) 6

[1.3 主要仪器和设备](#_Toc686171506) 6

[2 实验方法](#_Toc686171507) 7

[2.1 细胞培养](#_Toc686171508) 7

[2.2 MTT法—检测细胞存活率](#_Toc686171509) 7

[2.3 免疫印迹（Western blotting）法检测蛋白的表达](#_Toc686171510) 7

[2.4 siRNA转染](#_Toc686171511) 8

[2.5 基因过表达](#_Toc686171512) 9

[2.6 Transwell法比较细胞的侵袭能力](#_Toc686171513) 9

[2.7 划痕实验比较细胞的转移能力](#_Toc686171514) 9

[3 统计学处理](#_Toc686171515) 9

[结果](#_Toc686171516) 10

[讨论](#_Toc686171517) 13

[结](#_Toc686171518)[论](#_Toc686171518) 14

[参考文献](#_Toc686171519) 14

[附录A 主要英文缩略词表](#_Toc686171520) 16

[附录B 常用试剂配制方法](#_Toc686171521) 17

[附录C个人简历及论文发表](#_Toc686171522) 19

[附录D综述](#_Toc686171523) 19

[参考文献](#_Toc686171524) 20

# 1 材料与仪器

## 1.1 细胞系

人肺腺癌细胞敏感株（A549）、耐顺铂的人肺腺癌细胞（A549/DDP）均购于上海拜力生物科技有限公司，并于蚌埠医学院科研楼五楼安徽省生化药物工程技术研究中心培养冻存。

## 1.2 试剂与耗材

1) RPMI1640培养基，胰蛋白酶：Gibco公司；胎牛血清：杭州四季青公司。2) 顺铂(cis-platinum)、Cx43一抗、β-actin、羊抗小鼠二抗、羊抗兔二抗、四甲基偶氮唑蓝（MTT）、二甲基亚砜（DMSO）、Tris-base、Glycine、SDS 均购自Sigma-Aldrich公司；E-cadherin、Vimentin、Snail、Slug均购自Cell Signaling

Technology（CST）公司。

3) BCA蛋白浓度测定试剂盒：Bio-Rad公司，蛋白预染Marker: Thermo Scientific

公司。

4) WBK LS0500底物显色试剂，PVDF膜：美国Millipore公司。

5) 小干扰RNA，过表达质粒：上海吉玛制药技术有限公司；Lipofectamine™2000: Invitrogen公司；Opti-MEM: Sigma公司。

6）6、12、24、96孔细胞培养板：Costar；一次性培养瓶：Sigma公司；3 ml

无菌巴氏吸管：NEST。

## 1.3 主要仪器和设备

1）SHELLLAB 3111型细胞培养箱：美国SHELLLAB公司。

2）SP-DJ系列垂直净化工作台：上海浦东物理光学仪器厂。

3）DG3022酶联免疫检测仪：国营华东电子管厂联合研制。

4）垂直电泳仪：DYC-Z4013；电转移槽：美国BIO-RAD公司。

5）倒置荧光显微镜、CK40倒置显微镜：日本OLYMPUS公司。

6）Milli-Q Biocel超纯水仪：美国Millipore公司。

7）FC204型电子分析天平：上海第二天平仪器厂。

8）4239R高速低温离心机：意大利ALC公司。

9）自动电热压力蒸汽灭菌器：日本三洋公司。

10）TS-1脱色摇床：海门其林医用仪器厂。

11）Revco超低温冰箱：日本SANYO公司 。

12）QZ X -9070 M B数显鼓风干燥箱烘：上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

13）AF100制冰机：日本Scotsman公司。

# 2 实验方法

## 2.1 细胞培养

### 2.1.1 细胞复苏

提前将培养液预热，将5 ml预热后的培养液加入75 ml无菌培养瓶中；将细胞从﹣80℃取出，立即放入37℃的温水中快速解冻；解冻完全的细胞置于超净台上用酒精棉球擦拭冻存管的外表面，去除封口膜，冻存管管口在酒精灯火焰处过火后；用将冻存管内的细胞悬液转移到含5 ml培养液的培养瓶中，置37℃、饱和湿度、5%CO2的恒温培养箱中培养；大约6 h待细胞完全贴壁后更换新鲜培养液。

### 2.1.2 细胞换液

提前将培养液、PBS预热，去除原培养液，加入2 ml PBS，漂洗2次，加入 5

ml新鲜培养液，37℃饱和湿度恒温培养箱中继续培养。

### 2.1.3 细胞传代

待孵育细胞长至铺满培养瓶底部80~90%时，对处于对数生长期生长状态良好的细胞进行细胞传代处理，弃去原培养液，用预热的PBS清洗两遍后弃尽PBS，加入1 ml预热的0.25%胰酶消化液，置于37℃恒温培养箱中继续消化细胞，约1 min后在显微镜下观察，此时可看到细胞间隙变大、细胞边缘变亮，加入3 ml预热的含10%胎牛血清的RPMI1640培养液，用来终止细胞消化，用无菌巴氏吸管吸取培养瓶内培养液轻柔的吹打细胞，尽量吹打培养瓶底的每个面并将含细胞的培养液移至4 ml的无菌离心管中，以900 r/min的转速离心4 min，弃上清加入培养液，分瓶，补足培养液，置于37℃恒温培养箱中继续培养。

### 2.1.4 细胞冻存

待孵育细胞长至铺满培养瓶底部80~90%时，选取处于对数生长期生长状态良好的细胞进行处理，弃去原培养液，用预热的PBS清洗两遍后弃尽PBS，加入1 ml预热的0.25%胰酶进行消化，置于37℃恒温培养箱中继续消化细胞，约1 min后在显微镜下观察到细胞间隙变大、边缘变亮变圆，加入3 ml预热的含10%胎牛血清的RPMI1640培养液，用来终止细胞消化，用无菌巴氏吸管吸取培养瓶内培养液轻柔的吹打细胞，尽量吹打培养瓶底的每个面并将含细胞的培养液移至4 ml的无

菌离心管中，以900 r/min的转速离心4 min，弃去上清液加入1 ml提前配制好的冻存液（90%的胎牛血清、10%的DMSO），吹打均匀后移入无菌冻存管中，封口标记后依次放置于4℃冰箱静置30 min，然后置于﹣20℃冰箱冻存2 h，放置于﹣

80℃冰箱24 h，放在液氮罐中保存。

注意事项：细胞培养要保持无菌操作，器皿的消毒应彻底；操作过程应戴无菌手套和口罩保护自身安全；处理细胞的时间应尽量短，保持细胞的良好状态；应注意使用传代20代以内的细胞，避免细胞的变异。

## 2.2 MTT法—检测细胞存活率

MTT比色法是广泛用于反映细胞增殖活力，进而间接反映细胞存活率一种方法。原理：外源性四甲基噻唑氮蓝（MTT）可被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原为不溶于水的甲瓉结晶（formazan）并沉淀在细胞中，而死细胞没有这种功能。甲瓒结晶的生成量与活细胞的数目和功能状态呈正相关，用DMSO将其溶解后，用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定其光吸收值，计算细胞存活率。本实验采用此方法检测细胞对不同浓度的顺铂敏感性的变化。

### 2.2.1 细胞接种

1）取对数生长期的细胞，用1 ml的0.25%胰酶消化后，加入培养液终止消化，移入4 ml的无菌离心管中。

2）以900 r/min的转速离心4 min后弃上清，加入新鲜培养液并用移液枪吹打成单细胞悬液，计数。

3）将细胞均匀的接种到96孔板上（细胞密度为5×104 cells/ml），每孔加200µl

的细胞悬浮液，且每组设置5个复孔。放置于37℃饱和湿度的培养箱中培养。

### 2.2.2 细胞培养

待细胞生长融合后（大约24 h）进行加药处理。对光敏感的药物需进行避光处理。CDDP用无菌的PBS配置成20mM（此浓度下CDDP最稳定）的贮存液，使用时首先将储存液用PBS稀释成5 mM（此浓度下CDDP能完全溶解），按实验设计方案进行加药，且每组浓度设置5个复孔，按照实验方案处理一定时间。

### 2.2.3 显色

分别于加药处理24 、48 h后，每孔加入5 mg/ml MTT 10µl，于37℃，5% CO2

的饱和湿度培养箱中继续孵育4 h.4 h后小心地移除培养液，避免移液枪接触到

96孔板的底部，每孔加入150µl DMSO，放置在37℃烘箱中孵育，30 min后进行

检测。

### 2.2.4 比色（测定）

孵育完成后，在酶联免疫检测仪上震荡10 min，以全空白组比色调零，在490

nm波长测定各孔的吸光度（A）值，根据下列公式计算细胞存活率。细胞存活率

（surviving fraction）=（实验组A值-调零组A值）/（对照组A值-调零组A值）

×100%。实验重复3次，取平均值进行计算。

注意事项：细胞接种时应状态良好；细胞接种应均匀；吸取96孔板内的液体及加入试剂时均应小心，避免接触底部。

## 2.3 免疫印迹（Western blotting）法检测蛋白的表达

### 2.3.1 细胞总蛋白的提取

取生长状态良好的细胞，PBS清洗胰酶消化后，加入含血清培养液，以2×105

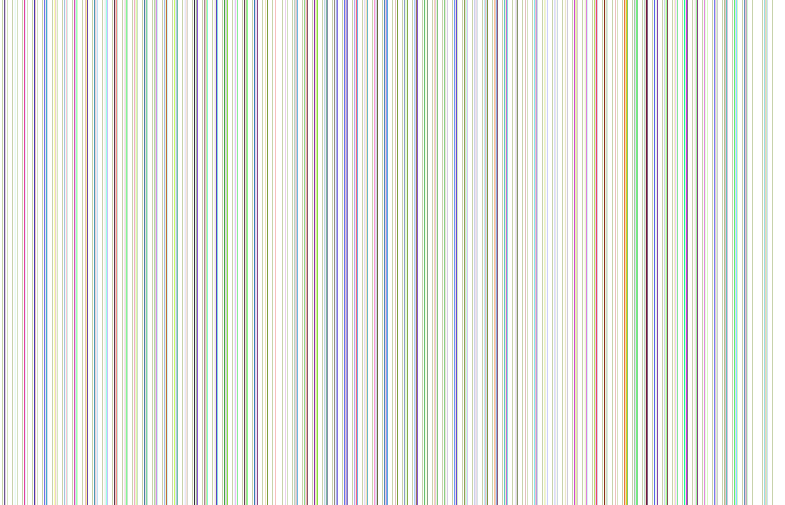
cells/ml的细胞浓度均匀的接种于6孔板上，每孔接种细胞4×105个。培养24 h后，按照实验设计方案给药，达到实验设计的作用时间后，用预冷的PBS（0.01 mol/L，

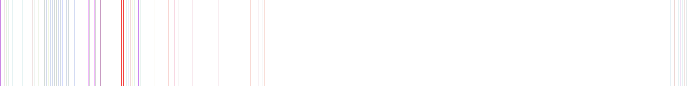
pH7.2）清洗细胞3次，每孔加500µl细胞裂解液裂解细胞，细胞变圆后加1ml培养液终止消化，将含有细胞的培养液移至4 ml的离心管中，以2500 r/min的转速离心10 min，弃去上清液，将离心管倒扣在吸水纸上并吸尽残留液体，每个离心管中加裂解液50µl并用枪头吹打机械破裂细胞，冰上裂解30 min。然后置于4℃离心机中，12000 r/min速度离心已裂解的细胞30 min，转移上清液至新的1.5 ml的EP管中并做好标记。准备蛋白定量或保存于-80℃冰箱待测。

### 2.3.2 二喹啉甲酸（BCA）法蛋白定量

#### 2.3.2.1 绘制标准曲线

A液：1% BCA, B液：4% Cu SO4，按照每个样品200µl计算所需工作液的总量，将A液与B液按50: 1的比例配制成所需的工作液；将标准蛋白（BSA）用1 %生理盐水稀释成0. 5 mg/m l的蛋白溶液。96孔板中每孔加入200µl的BCA工作液，将标准品按0，2.5，5，10，15，20µl依次分别加入各孔，再用0.9 %生理盐水补足体积，至每孔终体积为220µl。在595 nm波长处测定各孔的OD值，用excel软件分析得到标准曲线公式，y=0.0411x+0.1485, *R2*=0.9977其中标准曲线的拟合度*R2*应在0.99以上。





**蛋白质标准曲线**

T h e s t a n d a r d c u r v e o f p r o t e i n

#### 2.3.2.2 蛋白浓度的标定

根据待测样品的个数计算所需工作液的总量，将A液与B液按50: 1配制成所需的工作液，首先在各孔中加入200µl BCA工作液，再加入2µl的待测蛋白，最后加入18µl的0.9%生理盐水补足到220µl，于37℃烘箱中放置30 min，在酶联免疫检测仪上595 nm波长处测定各孔OD值。将各孔OD值带入标准曲线公式中计算蛋白浓度，再用裂解液配平使各组样本的蛋白终浓度一致。然后加入2×上样缓冲液混合，95~100℃煮蛋白5 min，-20℃保存备用。

### 2.3.3 SDS -聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

#### 2.3.3.1 凝胶的配制与上样

清洗玻璃板，垂直卡在配胶架上，注入双蒸水检漏，检漏15 min后倒出双蒸水并用吸水纸吸取多余的水滴，放置于水平处准备灌胶。按照目的蛋白的分子量用下表配制10~15%分离胶，加到适量高度并加入适量异丙醇溶液赶气泡压胶。待分离胶凝固好后将上层异丙醇倒出，接下来按照下表配制5%浓缩胶，灌满后立即插梳。室温放置3 h左右待浓缩胶凝固完全，将凝胶正确安装于电泳槽中，并加入适量电泳液，拔梳，加入各组样品（10~40µl）及预染的蛋白Marker，（2µl左右）。

#### 2.3.3.2 电泳

正确连接电泳装置，电泳电压70 V，电流400 mA，功率50 W，30 min后，调节电压为90 V，2 h后观察到溴酚蓝跑至玻璃板下端目的蛋白分离较好时即可终止电泳，进行转膜。

#### 2.3.3.3 蛋白质的凝胶电转移

从电泳装置上取下玻璃板，按照预染的蛋白Marker的指示去除目的蛋白及内参蛋白以外的凝胶部分，放入提前配制好的转移缓冲液中平衡15 min，按照三层滤纸、凝胶、PVDF膜、三层滤纸的顺序依次放入装置中，然后用海绵垫和筛孔板固定好，加入转移液，正确连接装置，在4℃条件下，50 V, 250 mA，50 W，转移2~3 h。操作过程中避免有气泡产生且PVDF膜需在甲醇中激活后使用，海绵和滤纸需提前放入转移缓冲液中润湿。

#### 2.3.3.4 封闭

转膜结束后，取出PVDF膜放置于含5%吐温的PBS（TPBS）中清洗三遍，用5%封闭液（TPBS+脱脂奶粉配制），在左右摇床上室温孵育2 h。

#### 2.3.3.5 抗体孵育

PVDF膜封闭结束后用TPBS清洗三遍，可根据实验设计孵育下列抗体，抗体配比如下：一抗Cx43抗体（1:4000）：8 ml Western一抗稀释液+ 2µl抗体、

E-cadherin抗体（1:1000）：6 ml Western一抗稀释液+6µl 抗体、Vimentin抗体

（1:1000）：6 ml Western一抗稀释液+6µl 抗体、Slug抗体（1:1000）：6 ml Western一抗稀释液+6µl抗体、Snail抗体（1:1000）：6 ml Western一抗稀释液+6µl抗体、β-actin 抗体（1:1000）：6 ml Western一抗稀释液+6µl 抗体。以上抗体的孵育除β-actin 抗体室温孵育2 h即可外，其余抗体均需置于4℃，孵育过夜。用TPBS洗膜三次每次5 min，根据一抗选择合适的二抗，兔抗或鼠抗（1:5000）：10 ml 5%脱脂牛奶+ 2µl二抗，室温，左右摇床上孵育2 h。用TPBS洗膜三次每次5 min，准备曝光。

#### 2.3.3.6 显影、曝光

按照MILLIPORE的Immobilon Western Chemiluminescent HRP Subsrate试剂盒说明书，在避光条件下将化学发光增强液A和B等体积混合后均匀，充分均匀的涂布于PVDF膜上，放置于曝光版上用凝胶图像分析系统获取图像。

统计学处理时用灰度值扫描软件进行扫描，得到平均光密度值进行统计。实

验重复三次。

## 2.4 siRNA转染

### 2.4.1 siRNA的序列设计

根据文献的查阅针对人肺腺癌细胞Cx43基因合成以下三条序列：

Cx-1218:

（正义链）：5ˊ-GGA AGCACCAUCUCUAACUTT -3ˊ

（反义链）：5ˊ-AGUUAGAGAUGGUGCUUCCTT-3ˊ

Cx-911:

（正义链）：5ˊ-GGCCUUGAAUAUCAUUGAATT -3ˊ

（反义链）：5ˊ-UUCAAUGAUAUUCAAGGCCTT -3ˊCx-1141:

（正义链）：5ˊ-GCCGC AAUUACAACAAGCATT -3ˊ

（反义链）：5ˊ-UGCUUGUUGUAAUUGCGGCTT -3ˊ

Negative control：

（正义链）：5ˊ-UUCUCCGAA CGUGUCACGUTT -3ˊ

（反义链）：5ˊ-ACGUGACACGUUCGGAGAATT -3ˊ

由上海吉玛基因设计合成

### 2.4.2 脂质体优化

#### 2.4.2.1 FAM-siRNA的溶解及保存

开盖前先离心，后再开盖加适量DEPC水，盖上管盖，震荡溶解，0.5 OD~62

µl，浓度为20µM，-20℃保存，稳定性可达6个月。

#### 2.4.2.2 转染

转染前24 h，将细胞以1×105 cells/ml的密度接种于24孔板上，使细胞在24 h内的融合度能达到70%~80%.24 h内待细胞融合度达到50%左右时在超净台内进行转染，按照说明书的推荐量设计为，FAM-siRNA（µl）︰Lipofectamine 2000（µl）为2︰1、2︰2、2︰3、2︰4、2︰5（µl︰µl），Lipofectamine 2000（µl）：FAM-siRNA

（µl）为2︰1、2︰2、2︰3、2︰4、2︰5（µl︰µl）。在避光条件下，首先将FAM-siRNA和Lipofectamine 2000 分别用Opti-MEM 稀释50倍，室温下放置5 min；然后将稀释后的FAM-siRNA与稀释后的Lipofectamine 2000轻柔的混合均匀，静置20 min；最后弃去24孔板内的原培养液，每孔加入上述混合液100µl，用Opti-MEM补足

到500µl，在37℃，5% CO2的饱和湿度培养箱中继续孵育4 ~6 h后将更换为正常培养液，用荧光显微镜检测细胞转染效率。

检测结果表明FAM-siRNA（µl）︰Lipofectamine 2000（µl）为2: 3时转染效率最高，选取此比例进行后续实验。

### 2.4.3 选取最佳的siRNA片段

A细胞铺板

在转染之前的18-24个小时，在6孔板每个孔的2 ml生长培养基中加入4×105

左右个细胞（确保转染时细胞密度在30-50％）。

B. 转染过程

细胞融合度达50%左右时，首先将siRNA（5µl每孔）和Lipofectamine 2000

（7.5µl每孔）分别用Opti-MEM稀释50倍，室温下放置5 min；然后将稀释后的siRNA与稀释后的Lipofectamine 2000轻柔的混合均匀，静置20 min；最后弃去

6孔板内的原培养液，每孔加入siRNA/lipofectamin2000复合物625µl，用Opti-MEM

补足到2000µl。将细胞置于37℃、5%的CO2培养箱中孵育6后更换正常培养基。

48-96 h内用Western blotting实验检测转染后的蛋白表达。整个操作过程需在无菌

Zkq 20151125

无酶条件下进行。

经本实验验证Cx-1218和Cx-1141干扰效率达60%以上，可用于后续实验。注意事项：转染时应确保细胞没有过度生长或处于休止期；若要基因沉默的

效果，推荐最低siRNA终浓度10 nM；若要在显微镜下从荧光强度看转染效率，因荧光信号被检测到需要一定发敏感度，推荐siRNA终浓度50 nM；若细胞对Lipofectamine 2000敏感，应适当降低Lipofectamine 2000的用量。

## 2.5 基因过表达

### 2.5.1 过表达质粒的配制

人肺腺癌Cx43的过表达质粒（pcDNA- Cx43）由上海吉玛基因设计合成，将合成后的50µg过表达质粒粉末离心后加入100 ul无菌双蒸水使终浓度为500 ng/ul。

### 2.5.2 转染过程

在转染之前的18-24个小时，在6孔板每个孔的2 ml生长培养基中加入4×105左右个细胞（确保转染时细胞密度在30-50％）。细胞融合度达50%左右时，将pcDNA- Cx43（10µl每孔）和Lipofectamine 2000（10µl每孔）分别用Opti-MEM稀释50倍，室温下放置5 min；然后将稀释后的pcDNA- Cx43与稀释后的

Lipofectamine 2000轻柔的混合均匀，静置20 min；最后弃去6孔板内的原培养液，每孔加入pcDNA- Cx43/lipofectamin2000复合物1000µl，用Opti-MEM补足到2000

µl。细胞在CO2培养箱中37℃孵育6后更换正常培养基。48-96 h内用Western

blotting实验检测转染后的蛋白表达。

## 2.6 Transwell法比较细胞的侵袭能力

1）在Transwell小室的内室铺上提前稀释好的（稀释比为1: 7）Matrigel胶50µl，放置于37℃培养箱中，半小时后待用。

2）选取对数生长期细胞，消化，离心，用无血清培养液稀释细胞，使成均匀的单细胞悬液。细胞计数，用无血清培养液稀释使细胞密度为2×105 cells/ml。

3）此时按实验设计加入药物使成细胞药物混合液。

4）待Matrigel胶凝为胶状时，在Transwell小室的内室加入200µl的细胞药物混合液，外室加入800µl含血清正常培养液，放入37℃，5%CO2细胞培养箱中继续培养。

5）一定时间后终止培养，弃去外室的培养液，用4%的多聚甲醛固定细胞约15 min，

0.1%的结晶紫常温染色30 min，弃去内室液体，用已被0.1%结晶紫润湿的棉签轻轻擦拭内室未侵袭细胞，放入z2k4q孔板20中15置1于12显5微镜下拍照。

注意事项：铺胶时应均匀且无气泡；Matrigel胶的浓度和厚度应根据具体细胞的侵袭能力做适当调整；细胞密度可根据首次实验结果做适当调整；擦拭小室内部时应轻柔避免破坏小室底部；避免接触小室的外室。

## 2.7 划痕实验比较细胞的转移能力

##### 1）种板：处理细胞，将细胞均匀的接种在6孔板内（细胞密度为2×105 cells/ml），

每孔4×105个细胞。

##### 2）待6孔板内的细胞融合（约60%）时，用无菌枪头在板内划出均匀笔直的划痕

（可用无菌直尺辅助进行）。

##### 3）弃去原培养液，小心的用PBS洗去悬浮的细胞，加入2 ml新鲜培养液继续培养。

##### 4）一定时间后置于显微镜下采集图像，根据划痕愈合的程度来观察细胞迁移能力的强弱。

注意事项：划痕的细胞密度应根据处理时间进行适当调整；划痕的宽度应适中；划痕应尽量均匀笔直；PBS洗去被划落的细胞时应轻柔避免破坏划痕印记。

# 3 统计学处理

实验数据采用SPSS13.0软件进行统计分析；数据资料采用均数±标准差的形式表示；两组计量资料之间的比较采用t检验，当*P*<0.05时认为组间差异有统计学意义；图表的绘制使用软件Sigma Plot 10.0。

Zkq 20151125

# 结果

##### **1.** **A549/CDDP**对**CDDP**产生耐药性

为研究人肺腺癌细胞A549、A549/CDDP对顺铂化疗的敏感性，本实验采用

MTT法检测不同浓度的CDDP（0, 20, 40, 80, 160, 320μM）作用于人肺腺癌细胞A549和A549/CDDP 24，48，72 h的增殖抑制作用，结果显示随着时间的延长CDDP对细胞的增殖抑制作用增强。综合敏感性和时间因素，本实验选择48 h进行耐药性检测，用不同浓度的顺铂（0, 20, 40, 80, 160, 320μM）分别作用A549和A549/CDDP 48 h后测定细胞存活率，用SPSS软件计算半数抑制率（half maximal inhibitory concentration, IC50）值，根据IC50值计算出耐药指数（resistance index, RI）），RI=耐药细胞系的IC50/亲代细胞系的IC50, RI>3则认为耐药细胞系的耐药性符合耐药株的要求。实验结果见图2。结果表明随着CDDP浓度的增加

CDDP在A549和A549/CDDP中的细胞毒性增强。20μM时A549的生存率为86%，

A549/CDDP的生存率为94.3%；40μM时A549的生存率为45%, A549/CDDP的生存率为85.7%；80μM时A549的生存率为34.2%，A549/CDDP的生存率为69.6%；

160μM时A549的生存率为

Zkq 20151125

24.7%, A549/CDDP

的生存率为58.4%; 320μM 时

A549的生存率为16%, A549/CDDP的生存率为55.6%. SPSS软件计算得

A549/CDDP的IC50=311.2µM, A549的IC50=53.6µM，RI=5.8，说明本实验使用

的A549/CDDP符合耐药株的要求。



图1 CDDP对A549、A549/CDDP细胞存活率的影响。用不同浓度（20-320µM）的顺铂作用于细胞48 h后采用MTT法检测细胞存活率，实验结果用均数±标准差的形式表示，\**P*＜0.05认为A549/CDDP的细胞存活率

与A549相比有统计学差异，n=5。

Fig.1 A CDDP-resistant A549 cell line was established. Cells were treated with increasing concentrations of CDDP (20-320µM) for 48 h, and the cell viability was assessed by MTT assay. Results represent the means± SEM of 5 independent experiments; bars, SEM. \**P*<0.05, significantly different from the A549 cells.

##### **2.** **A549/CDDP**与**A549**相比发生**EMT**转化

为探究A549/CDDP与A549中EMT表达程度上午差异，我们进行了以下实验。评判EMT发生的三个指标分别是：形态学改变、EMT标志蛋白及转录因子的变化、细胞行为学上的变化。形态学图片可看出与A549相比A549/CDDP的细胞形态较狭长，细胞间粘附减少，细胞分散排列，此结果表明A549/CDDP在细胞形态学上发生了EMT转化；EMT标志蛋白及转录因子的变化：Western blotting结果显示，与A549相比A549/CDDP细胞中的上皮标志蛋白E-cadherin的表达显著降低，降低程度达76%；而间质标志蛋白Vimentin的表达显著增强，增强了3.7倍；转录因子Snail, Slug的表达也显著增强，Slug的表达增强了1.97倍，Snail的表达增强了2.48倍；说明A549/CDDP的表面标志物发生了EMT转化；以上结

果均表明耐药株A549/CDDP与敏感株A549相比发生了EMT转化（见图2）。

Zkq 20151125



图2 CDDP对A549/CDDP、A549细胞EMT表达程度的影响。（A）A549/CDDP与A549细胞的形态的差异

比较（. B）Western blotting法检测A549/CDDP和A549中E-cadherin、Vimentin、Snail和Slug的表达。（C-F）

为灰度值扫描结果的柱状图。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；\**P*＜0.05认为A549/CDDP

与A549相比两者差异有统计学意义。

Fig.2 The A549/CDDP cells acquire an EMT phenotype. (A) Images of the morphological changes of A549 and A549/CDDP cells. (B) Western blotting was used to detect the expression of E -cadherin, vimentin, Slug and Snail in the A549 and A549/CDDP cells. (C-F) Bar graphs derived from the densitometric scanning of the blots. Columns, mean from three experiments; bars, SEM. \**P*<0.05, significantly different from the A549 cells.

##### **3.** 与**A549**相比**A549/CDDP**的侵袭转移能力显著增强

侵袭转移能力的获得是EMT发生的主要标志之一，为研究A549/CDDP 和

A549侵袭转移能力的差异，我们采用Transwell侵袭实验和划痕实验方法。

Transwell侵袭实验的实验结果表明，与A549相比A549/CDDP细胞的侵袭数目显著增多，由28增加到97，此结果表明与A549相比A549/CDDP的侵袭能力显著增强。划痕的实验结果表明，与A549相比A549/CDDP细胞的转移能力显著增强。

Zkq 20151125



图3 CDDP对A549/CDDP、A549细胞侵袭转移能力的影响。（A）Transwell侵袭实验比较A549/CDDP 和

A549的侵袭能力。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；\**P*＜0.05认为两组的差异有统计学意义。（B）划痕实验观察A549/CDDP和A549的转移能力。划痕的愈合程度表示转移能力的大小。

Fig.3 A549/CDDP cells display increased potential for migration and invasion. (A) The invasive ability of A549 and A549/CDDP cells was assessed by Matrigel invasion assay. Results represent the means±SEM of 3 independent

Experiments; \**P*<0.05, significantly different from the A549 cells. (B) The migratory ability of A549 and A549/CDDP cells was observed by wound-healing assay wherein cells were scratched with a pipette tip.

##### **4.** 与**A549**相比**A549/CDDP**中**Cx43**的表达量显著降低

为研究A549/CDDP和A549中Cx43表达的差异，我们采用Western blotting法进行蛋白表达量的检测。Western blotting结果表明，与A549相比A549/CDDP细胞中的Cx43的表达量显著降低，统计学分析结果表明此差异具有统计学意义。



图4 CDDP对A549/CDDP、A549细胞中Cx43的表达量的影响。Western blotting法检测A549/CDDP和A549

中Cx43的表达。灰度值扫描结果用柱状图表示。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；\**P*＜

0.05认为A549/CDDP与A549相比两者差异有统计学意义。

Fig.4 A549/CDDP cells show decreased expression of Cx43. Western blotting was used to detect the expression of Cx43 in A549 and A549/CDDP cells. Bar graphs derived from the densitometric scanning of the blots. Columns, mean from three experiments; bars, SEM. \**P*<0.05, significantly different from A549 cells.

##### **5.** 上调**Cx43**的表达可逆转**A549/CDDP**细胞的**EMT**转化

为研究Cx43对A549/CDDP细胞EMT转化的影响，我们采用过表达技术在

A549/CDDP中上调Cx43的表达并观察上调Cx43对A549/CDDP细胞EMT转化的影响。

###### 1） 检验过表达质粒的效果：采用过表达技术将含目的基因的质粒（pcDNA- Cx43）与空质粒（pcDNA）分别转染进入A549/CDDP细胞中，Western blotting法检测

A549/CDDP细胞中Cx43的表达，实验结果表明与pcDNA组相比pcDNA- Cx43

组中的Cx43的表达量显著升高，说明过表达质粒作用显著。

###### 2） 上调Cx43后细胞形态学改变：在A549/CDDP细胞中过表达Cx43后，形态学图片显示与pcDNA相比pcDNA- Cx43组的细胞形态变得相对饱满，细胞间粘附增强。此结果表明，过表达Cx43逆转了A549/CDDP细胞在形态学上的EMT转化。

###### 3） 上调Cx43后EMT标志物及转录因子的变化：在A549/CDDP细胞中过表达Cx43后，Western blotting法检测EMT表面标志蛋白及相关转录因子的变化，结果显示：与pcDNA相比pcDNA- Cx43组的E-cadherin的表达显著增强而间质标志蛋白

Vimentin的表达显著降低，转录因子Snail, Slug的表达也显著降低。此结果表明，过表达Cx43在蛋白水平及相关转录因子水平上逆转了A549/CDDP细胞的EMT转化。



图5 过表达Cx43对A549/CDDP细胞的EMT转化的影响。A）A549/CDDP和转染pcDNA- Cx43后A549/CDDP

细胞的形态学图片。（B）A549/CDDP和转染pcDNA- Cx43后A549/CDDP细胞的中E-cadherin、Vimentin、

Snail和Slug的表达量。（C-G）分别为Cx43、E-cadherin、Vimentin、Slug和Snail蛋白表达的灰度值扫描结果的柱状图。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；\**P*＜0.05认为pcDNA- Cx43与pcDNA相比两者的差异有统计学意义。

Fig.5 Overexpression of Cx43 reverses EMT in A549/CDDP cells. (A) Images of morphological changes of A549/CDDP cells following transfection by pcDNA-Cx43. ( B) The effect of Cx43 overexpression on the expression of E -cadherin, vimentin, Slug and Snail was determined by Western blotting in A549/CDDP cells. (C -G) Bar graphs derived from the densitometric scanning of the blots. Columns, mean from three experiments; bars, SEM. \**P*<0.05, significantly different from pcDNA-transfected group.

##### **6.** 下调**Cx43**的表达可诱导**A549**细胞发生**EMT**转化

为研究Cx43对A549细胞EMT转化的影响，我们采用小干扰siRNA技术在

A549中下调Cx43的表达并观察下调Cx43对A549细胞EMT转化的影响。

1）选择最佳的干扰片段：采用基因敲除技术将含目的基因的小干扰片段（siRNA-

Cx43）与空质粒分别转染进入A549细胞中，Western blotting法检测A549细胞中

Cx43的表达，与阴性对照组（NC）组相比siRNA - Cx43组中的Cx43的表达量显著降低，说明干扰片段作用显著。

2）下调Cx43后细胞形态学改变：在A549细胞中沉默Cx43的表达后，形态学图片显示与NC组相比siRNA- Cx43组的细胞形态变得相对狭长，细胞间粘附减少，细胞分散排列。此结果表明，沉默Cx43的表达可诱导A549细胞在形态学上发生EMT转化。

3）下调Cx43后EMT标志物及转录因子的变化：在A549细胞中沉默Cx43的表达后，Western blotting法检测EMT表面标志蛋白及相关转录因子的变化，结果显示：与NC组相比siRNA- Cx43的E-cadherin的表达显著降低而间质标志蛋白

Vimentin的表达显著增强，转录因子Snail, Slug的表达也显著增强。此结果表明，沉默Cx43的表达可在蛋白水平及相关转录因子水平上诱导A549细胞的EMT转化。



图6 沉默 Cx43 的表达对A549细胞的EMT转化的影响。（A）A549细胞中转染siRNA- Cx43后Cx43表达。

（B）为A图灰度值扫描结果的柱状图。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；\*P＜0.05认为

siRNA- Cx43与NC control相比，差异有统计学意义。（C）转染siRNA- Cx43后A549细胞的形态。(D) Western

blotting法检测沉默Cx43后A549细胞中E-cadherin、Vimentin、Slug和Snail的表达。E-H）分别为E-cadherin、

Vimentin、Slug和Snail的灰度值扫描结果的柱状图。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；

\**P*＜0.05认为siRNA- Cx43与NC相比，差异有统计学意义。

Fig.6 Knockdown of Cx43 expression induces EMT in A549 cells. ( A) Expression of Cx43 in A549 cells following treatment with siRNA-Cx43. (B) Bar graph derived from the densitometric scanning of the blots. Columns, mean from three experiments; bars, SEM. \*P<0.05, significantly different from NC control. (C) Images of morphological changes in the A549 cells following treatment with siRNA-Cx43. (D) The effect of Cx43 knockdown on the

Expression of E-cadherin, vimentin, Slug and Snail was determined by Western blotting in A549 cells. (E- H) Bar

Graphs derived from the densitometric scanning of the blots. Columns, mean from three experiments; bars, SEM.

\**P*<0.05, significantly different from NC control.

##### **7.** **Cx43**可调控人肺腺癌细胞的侵袭转移能力

为研究Cx43对A549/CDDP和A549细胞侵袭转移能力的影响，我们用

Transwell侵袭实验和划痕实验检测在A549/CDDP细胞中过表达Cx43及在A549

细胞中沉默Cx43的表达后侵袭转移能力的变化。

###### 1) 在A549/CDDP细胞中过表达Cx43后，Transwell实验结果表明与pcDNA相比

pcDNA- Cx43组的侵袭能力显著降低；划痕的实验结果表明与pcDNA相比pcDNA-

Cx43组的转移能力显著降低。

###### 2） 在A549细胞中沉默Cx43的表达后，Transwell实验结果表明与NC组相比

siRNA- Cx43组的侵袭能力显著增强；划痕的实验结果表明与NC组相比siRNA-

Cx43组的转移能力显著增强。

以上结果均表明Cx43可调控人肺腺癌细胞的侵袭转移能力。



图7调控Cx43对A549/CDD和A549细胞侵袭转移能力的影响。（A）转染pcDNA- Cx43后A549/CDDP细胞的侵袭能力。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；\**P*＜0.05认为pcDNA- Cx43与pcDNA相比差异有统计学意义。（B）划痕实验检测过表达Cx43对A549/CDDP细胞转移能力的影响。（C）转染siRNA-

Cx43后A549细胞的侵袭能力。实验重复三次，结果用平均数±标准差的形式表示；\**P*＜0.05认为siRNA- Cx43

与NC相比差异有统计学意义。（D）划痕实验检测沉默Cx43的表达对A549细胞转移能力的影响。

Fig.7 Cx43 regulates the capability of invasion and migration in human adenocarcinoma cells. (A) The invasive ability of A549/CDDP cells following transfection by pcDNA-Cx43. Results represent the means±SEM of 3 independent experiments; \**P*<0.05, significantly different from the pcDNA- transfected group. (B) The effect of Cx43 overexpression on the migratory ability of A549/CDDP cells by wound-healing assay. (C) The invasive ability of A549 cells following treatment with siRNA-Cx43. Results represent the means± SEM of 3 independent experiments; \**P*<0.05, significantly different from the NC control. (D) The effect of Cx43 knockdown on the migratory ability of A549 cells by wound-healing assay.

##### **8.** **Cx43**可调控人肺腺癌细胞对顺铂的敏感性

为研究Cx43对A549/CDDP和A549细胞中顺铂细胞毒性的影响，用不同浓度（20-320µM）的CDDP作用细胞48 h, MTT法结果表明，在A549/CDDP细胞中过表达Cx43后，与control组相比pcDNA- Cx43细胞对CDDP的敏感性显著增强；在A549细胞中干扰Cx43后，与control组相比siRNA- Cx43组对CDDP的敏感性显著降低。以上结果均表明Cx43可调控人肺腺癌细胞对CDDP的敏感性。



图8 调控Cx43对顺铂在A549/CDD和A549细胞中细胞毒性的影响。（A）过表达Cx43可降低A549/CDDP

细胞的耐药性。用MTT法检测过表达Cx43对A549/CDDP细胞中不同浓度（20-320µM）顺铂的细胞毒性的

影响。实验重复5次，结果用均数±标准差的形式表示，\**P*＜0.05认为与A549/CDDP组相比差异有统计学意义。（B）沉默Cx43的表达可降低A549细胞对顺铂的敏感性。用MTT法检测沉默Cx43的表达对A549细胞中不同浓度（20-320µM）顺铂的细胞毒性的影响。实验重复5次，结果用均数±标准差的形式表示，\**P*

＜0.05认为与A549组相比差异有统计学意义。

Fig.8 Cx43 regulates the cytotoxicity of CDDP in human adenocarcinoma cells. (A) Overexpression of Cx43 reduced cellular resistance to CDDP in the A549/CDDP cells. The effect of Cx43 overexpression on the cytotoxicity of CDDP (20-320µM) in the A549/CDDP cells was detected by MTT assay. Results represent the means±SEM of 5 independent experiments; bars, SEM. \*P<0.05, significantly different from the A549/CDDP cells. (B) Cx43 knockdown reduced CDDP sensitivity in the A549 cells. The effect of Cx43 knockdown on the cytotoxicity of CDDP (20-320µM) in the A549 cells was detected by MTT. Results represent the means± SEM of 5 independent experiments; bars, SEM. \**P*<0.05, significantly different from the A549 cells.

# 讨论

Cx43是一种组成缝隙连接的重要蛋白，由其介导的缝隙连接细胞间通讯对细胞的增殖、分化的调控及维持细胞间的协调稳定等都起着非常重要作用，相邻细胞通过缝隙连接介导的细胞间通讯（GJIC）可进行直接的电、化学及代谢物质的传递，并且可调控细胞活动、细胞的增殖与凋亡及器官发育等[15]。近年来的研究证实，缝隙连接蛋白对多种肿瘤的发生发展有重要的调控作用[16]。既往研究证实，在部分上皮细胞癌变过程中，Cx43基因的表达下调，而在Cx43表达缺失的肿瘤细胞系中转入Cx43基因后，细胞的恶性侵袭表型得到部分逆转，因此Cx43基因曾被看作抑癌基因[17]。有研究表明，肿瘤发生时常伴有缝隙连接通讯功能的下降，并且在顺铂治疗肿瘤的过程中也常引起肿瘤细胞缝隙连接介导的细胞间通讯水平下降[11, 18]，而通过改变缝隙连接的基本组成单位Cx43可使顺铂诱导的细胞凋亡增加，进而增加顺铂的细胞毒性[13]。还有研究发现，肉瘤基因（sarcoma gene, Src）抑制剂可通过抑制缝隙连接蛋白的磷酸化来增强缝隙连接介导的细胞间通讯功能进而提高顺铂的细胞毒性[14]，通过转染Cx43也能促进细胞间凋亡信号的传递进而促进肿瘤细胞的凋亡[19]。通过以上的研究事实我们知道Cx43可调控顺铂的细胞毒性，那么我们设想Cx43与顺铂治疗过程中肿瘤细胞的获得性耐药之间可能具有一定的关系。

为了证实以上假设，我们选取了临床上发病率与致死率最高的癌症—肺癌进行实验，检测耐顺铂耐药株A549/CDDP与敏感株A549中Cx43的表达情况，与设想一致，A549/CDDP与A549中Cx43的表达有显著差异，与A549相比

A549/CDDP中Cx43的表达量是显著降低的，这提示我们Cx43表达量的降低可能有助于A549/CDDP细胞耐药性的获得。

EMT是指上皮细胞转变为间质细胞的过程。EMT以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为重要特征，具体来说，EMT发生时细胞主要发生以下几方面的变化：首先是细胞形态学的改变，细胞发生EMT时，细胞会丧失细胞极性，转变为具有长梭形、分散排列的间质细胞的特性；相关表面标志物的变化，发生E M T的细胞，上皮细胞标志蛋白如E -钙黏蛋白（E-cadherin）和角蛋白等的表达下调，α-catenin从胞膜异位到胞核内；间质细胞标志蛋白如波形蛋白（Vimentin）、甲平滑肌抗原-SM A、纤维连接蛋白（Fibronectin）、神经钙粘蛋白等的表达上调，另外

EMT转录因子Snail、Slug、Twist等的表达增加；细胞生物行为学变化，发生EMT的上皮细胞会由静止状态转变为具有较强运动、迁移能力的细胞；同时相关蛋白质溶解酶的表达会增加，如：MMP2和MMP9等，可降解基膜使细胞侵入细胞外基质中，进而获得较强的侵袭能力。并非经历EMT的细胞均发生以上变化，其中E-cadherin下调或缺失及细胞迁移能力的增强是细胞发生上皮间质转化的重要标志[20-23]。大量研究表明，肿瘤细胞对化疗药物的获得性耐药与EMT表型的获得密切相关[24-28]。例如，吉西他滨耐药的胰腺癌细胞[27]，他莫昔芬耐药的乳腺癌细胞

MCF7[26]，奥沙利铂耐药的结直肠癌细胞[25]，紫杉醇耐药的卵巢癌细胞及吉非替尼耐药的肺癌细胞[24]均表现出EMT特征。EMT的标志蛋白E-cadherin在厄洛替尼耐药的非小细胞肺癌细胞株Calu6和H460中的表达显著降低，而在厄洛替尼敏感细胞株H292中则呈现高表达[29, 30]。与以上研究结果相似的是，吉非替尼耐药的肺癌细胞株A549、H157、H520、H1730细胞中的表达与敏感株H358、H322、H1648细胞相比E-cadherin的表达量也是显著降低的。间质细胞标志蛋白Vimentin的表达与E-cadherin的表达相反，吉非替尼耐药细胞株中间质细胞标志蛋白Vimentin的表达较敏感株相比显著增高[28, 31-33]。最近有研究表明EMT已成为一种重要的新的治疗靶点[34-37]. Tan等[34]的研究发现Par-4的下调可诱导PI3K/Akt通路介导的

EMT的发生；沉默miR-134/487b/655的表达可抑制肺腺癌细胞的EMT进程并可逆转TGF-β1诱导的肺腺癌细胞对吉非替尼的获得性耐药[35]；下调PDGF-D 通路可逆转吉西他滨耐药的肝癌细胞中EMT的现象[36]；及沉默Snail和Slug的表达可逆转卵巢癌细胞对顺铂的获得性耐药[37]。因此，调控EMT已成为一种可克服耐药从而使临床治疗取得更好效果的新途径。

与以上的研究结果一致，本实验所使用的耐药株在耐药性获得的过程中也观察到了EMT现象，耐药株A549/CDDP与敏感株A549相比有以下变化：形态学的变化，获得了间质细胞表型，细胞形态狭长，细胞间粘附减少等；上皮细胞标志蛋白E- cadherin的表达降低而间质标志蛋白Vimentin及转录因子Snail和Slug的表达均增多；侵袭转移能力显著增强。然而，顺铂诱导A549细胞发生EMT转化的机制尚不明确。

Cx43所编码的缝隙连接蛋白，是构成缝隙连接的基本结构和功能单位的主要成分之一，其表达与E-cadherin密切相关。研究发现[38]在结直肠癌细胞中转染Cx26基因后，能诱导E-cadherin的高表达及从细胞质细胞膜上的定位，有利于细胞间

黏附的形成及缝隙连接介导的细胞间通讯的重建。Bodenstine等[39]报道通过增加

Cx26和Cx43的表达可使乳腺癌细胞的上皮间质转化受到抑制，但机制不明。Ghosh

S等[40, 41]的研究结果表明，转染Cx43基因后，细胞的生长速度较转染前显著减慢，此研究表明高表达的Cx43可能参与了细胞周期的调控。有研究显示，肿瘤的发生过程中常伴随Cx43和E-cadherin表达的减少或缺失，以及Cx43介导的缝隙连接功能和E-cadherin介导的黏附连接功能的障碍，Cx43和E-cadherin在肺癌的发生发展、增殖凋亡、侵袭转移过程中起到了重要作用[42-47]。一项研究表明Cx43和E-cadherin的表达同时降低可能与肺癌的发生发展有关，Cx43 可能通过诱导

E-cadherin的表达从而抑制肺癌的增殖[44]。另外有研究表明转染Cx43可诱导

E-cadherin的过表达[45]。由于E-cadherin是重要的的EMT标志物，从以上这些报道可知Cx43可能通过调控EMT来参与肺癌的发生发展。

实际上我们也已经证实Cx43在耐药株A549/CDDP中的表达量与敏感株

A549相比确实是显著降低的，而且耐药株A549/CDDP与敏感株A549相比也发生了EMT。为了进一步研究Cx43在人肺腺癌细胞中对顺铂诱导的EMT的调控作用，首先我们在低表达Cx43的A549/CDDP细胞中上调Cx43的表达。我们发现在A549/CDDP细胞中过表达Cx43后出现了典型的上皮细胞的特征：如细胞形态变得圆润，细胞间粘附增加；上皮标志蛋白E-cadherin表达的增加，间质标志蛋白Vimentin及转录因子Snail和Slug的表达降低；侵袭转移能力显著降低。此研究结果表明过表达Cx43可逆转人肺腺癌细胞中顺铂诱导的EMT。接下来，我们在高表达Cx43的敏感株A549细胞中下调Cx43的表达。结果发现A549细胞发生了EMT改变：细胞形态变得狭长，细胞间粘附减少；上皮标志蛋白E-cadherin表达降低，间质标志蛋白Vimentin及转录因子Snail和Slug的表达增加；侵袭转移能力显著增强。本实验首次揭示了Cx43在顺铂诱导的人肺腺癌细胞EMT中具有重要的调控作用。

已有研究证实：通过上调Cx43的表达可增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性[13]；Src的抑制剂可通过抑制缝隙连接蛋白的磷酸化来增强缝隙连接介导的细胞间通讯功能进而提高顺铂的细胞毒作用[14]；转染Cx43能促进细胞间凋亡信号的传递进而促进肿瘤细胞的凋亡[19]；提高Cx32的表达来增强GJ功能可以提高顺铂的细胞毒性[48]；Cx43可能通过调控EMT来参与肺癌的发生发展[42-47]，本实验的结果也已表明Cx43在顺铂诱导的人肺腺癌细胞EMT中的起着重要调控作用，那么Cx43

是否可通过调控EMT来影响了顺铂对人肺腺癌的细胞毒性进而影响其获得性耐药的产生呢？

我们的实验结果发现：在低表达Cx43的A549/CDDP细胞中上调Cx43的表达后，A549/CDDP细胞对顺铂的敏感性显著增强，耐药性显著降低。此研究结果表明过表达Cx43可逆转人肺腺癌细胞对顺铂的获得性耐药。接下来，我们在对顺铂敏感的A549细胞中下调Cx43的表达，结果发现A549细胞对顺铂的敏感性显著降低，进一步验证了实验假设。本实验首次揭示了Cx43在顺铂的获得性耐药过程中具有重要调控作用，且此调控作用可能与Cx43可抑制EMT有关。

大量研究均表明Cx43可增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[49-53]。但其中的机制并不明确，由此我们可做以下推测：1）Cx43可增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性可能是由于其抑制了Src的活性[49]；2）Cx43可能促进了肿瘤细胞的凋亡进而增强多种抗肿瘤药物的细胞毒性[51]；3）Cx43通过增强了缝隙连接功能介导的旁观者效应增强了睾丸癌细胞对顺铂的敏感性[52]；4）Cx43可通过抑制EMT来调控耐药性的发生[53]。近年有研究证实EMT过程与肿瘤药物治疗耐受相关[54-60]，

EMT影响耐药性的发生主要通过以下几条途径：1）上调P糖蛋白的表达[61, 62]；2）影响DNA修复系统，与DNA修复系统在肿瘤产生多药耐药的过程中可能存在共同的调控机制[63, 64]；3）EMT转录因子可影响肿瘤耐药[65-68]；4）EMT与耐药性的发生有共同的信号通路，如：PI3K/Akt、JNK/线粒体、Notch-2等在肿瘤细胞对顺铂等抗肿瘤药物的耐药过程中通过EMT起到重要作用[69-74]。同时，研究证实Cx43可激活PI3K/Akt/GSK-3β信号通路[75]，因此我们猜想Cx43、EMT、获得性耐药三者之间有共同的信号通路PI3K/Akt。本实验首次为Cx43可通过调控EMT来增强人肺腺癌细胞对顺铂的敏感性提供了依据。

综上所述，我们的研究表明Cx43通过调控EMT在人肺腺癌细胞对顺铂耐药性的获得过程中起到了重要作用。在顺铂耐药的A549/CDDP细胞中过表达Cx43可逆转EMT并且能增强顺铂的细胞毒性。因此Cx43有可能成为克服肺癌对顺铂获得性耐药的新靶点。

结 **论**

1. Cx43可调控人肺腺癌A549对顺铂的获得性耐药。

2. Cx43可调控人肺腺癌细胞的EMT现象。

3. Cx43对人肺腺癌细胞获得性耐药的调控作用，可能与其抑制EMT作用有关。

致 **谢**

三年的时间过的很快，转眼间我们将面临毕业，回想起三年的点点滴滴有太多的不舍、太多的获得、太多的感激，感恩生活中的你们让我成长、让我感动、陪伴了我这么难忘的三年，在此表达我深深感激。

恩师篇：老师是成长路上的明灯，给我们指引了前进的方向。在这里感谢陶亮老师、祝晓光老师给予了我读研的机会教会了我许多人生的哲理；感谢童旭辉老师和董淑英老师对我课题的指导和生活上的关心爱护，因为你们我才能顺利的度过研究生生活；感谢余美玲老师在实验过程和学习生活上的指导、帮助、关心和鼓励及家人般的关爱；感谢刘浩老师给予的建议和鼓励，让我进步的同时也感觉到温暖；感谢实验室的陈超老师和赵素荣老师，在实验过程中也给他们带来了很多麻烦；感谢辅导员卢东兵老师和刘静老师的帮助；感谢并不认识我却给我提供了无私帮助的李柏青老师。只因你们的无私奉献，这三年是我收获最多也是成长最快的三年，不知怎么表达对你们的感激和那份感恩的心情，只能再次说声，谢谢您，您辛苦了。

小伙伴篇：我的同学、师姐师兄、师弟师妹是这三年来最亲密的伙伴，我们生活在一起的时间最多，那些年我们一起讨论课题，一起做实验，一起玩耍，一起洗过很多瓶子，一起跑过很多Western blotting，这些都将成为我的美好记忆。在这里特别感谢蔣国君师姐、余彬彬师姐、纪洁、于丽和师弟师妹们的帮助；感谢卢晓辉同学给予的无私援助；感谢小伙伴们关爱！小伙伴们（纪洁、于丽、陈磊、张文静、孙小锦、聂丽娟）感激你们在这三年里给予了我快乐的生活，感激你们愿意成为我的小伙伴一起哭、一起闹、一起笑、一起玩耍。

家人篇：感谢父母在我这么大年龄的时候依然养着我疼爱我，从没给过我压力，让我快乐的过着自己想要的生活；感谢管标同学这三年来家人般的关爱；感谢自己这三年来的努力、认真和乐观。

遇见你们是我的幸运，正是这份幸运给了我那么多超出我预期的收获，这份收获里有你们太多的付出和帮助，感恩生活让我遇到你们，感谢你们让我成为更好的自己。

参考文献

[1] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-51.

[2] Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways[J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7443-54.

[3] Meng F, Han Y, Staloch D, et al. The H4 histamine receptor agonist, clobenpropit, suppresses human cholangiocarcinoma progression by disruption of epithelial mesenchymal transition and tumor metastasis[J]. Hepatology, 2011, 54(5): 1718-28.

[4] Toden S, Okugawa Y, Jascur T, et al. Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracilthroughmiRNA-inducedsuppressionof epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(3): 355-67.

[5] Hiscox S, Jiang WG, Obermeier K, et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation[J]. Int J Cancer, 2006, 118(2): 290-301.

[6] Shah AN, Summy JM, Zhang J, et al. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(12): 3629-37.

[7] Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5820-8.

[8] Zhang W, Feng M, Zheng G, et al. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(2): 679-85.

[9] Hoshino H, Miyoshi N, Nagai K, et al. Epithelial-mesenchymal transition with expression of SNAI1-induced chemoresistance in colorectal cancer[J]. Biochem

Biophys Res Commun, 2009,390(3):1061-5.

[10] Ey B, Eyking A, Gerken G, et al. TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury[J]. J Biol Chem, 2009, 284(33): 22332-43.

[11] Shishido SN, Nguyen TA. Gap junction enhancer increases efficacy of cisplatin to attenuate mammary tumor growth[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44963.

[12] 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): 903-11.

[13] Sato H, Iwata H, Takano Y, et al. Enhanced effect of connexin 43 on cisplatin-induced cytotoxicity in mesothelioma cells[J]. J Pharmacol Sci, 2009, 110(4): 466-75.

[14] Peterson-Roth E, Brdlik CM, Glazer PM. Src-Induced cisplatin resistance mediated by cell-to-cell communication[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3619-24.

[15] Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex[J]. Nature, 2007, 448(7156): 901-7.

[16] Cronier L, Crespin S, Strale PO, et al. Gap junctions and cancer: new functions for an old story[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(2): 323-38.

[17] Kotini M, Mayor R. Connexins in migration during development and cancer[J]. Dev Biol, 2015, 401(1): 143-51.

[18] 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): 903-11.

[19] Kameritsch P, Khandoga N, Pohl U, et al. Gap junctional communication promotes apoptosis in a connexin-type-dependent manner[J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e584.

[20] Sleeman JP, Thiery JP. SnapShot: The epithelial-mesenchymal transition[J]. Cell, 2011, 145(1): 162. e1.

[21] Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, et al. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(23): 7003-11.

[22] Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition[J]. EMBO Rep, 2008, 9(4): 322-6.

[23] Chang JY, Wright JM, Svoboda KK. Signal transduction pathways involved in epithelial-mesenchymal transition in oral cancer compared with other cancers[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1-3): 40-7.

[24] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2007, 31(2): 277-83.

[25] Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14 Pt 1): 4147-53.

[26] Hiscox S, Jiang WG, Obermeier K, et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation[J]. Int J Cancer, 2006, 118(2): 290-301.

[27] Wang Z, Li Y, Kong D, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2400-7.

[28] Rho JK, Choi YJ, Lee JK, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line[J]. Lung Cancer, 2009, 63(2): 219-26.

[29] Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24 Pt 1): 8686-98.

[30] Suda K, Tomizawa K, Fujii M, et al. Epithelial to mesenchymal transition in an

Epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib[J]. J Thorac Oncol, 2011,6(7):1152-61.

[31] Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 944-50.

[32] Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, et al. Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(6): 1683-91.

[33] Thomson S, Buck E, Petti F, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9455-62.

[34] Tan J, You Y, Xu T, et al. Par-4 downregulation confers cisplatin resistance in pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway-dependent EMT[J]. Toxicol Lett, 2014, 224(1): 7-15.

[35] Kitamura K, Seike M, Okano T, et al. MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(2): 444-53.

[36] Wu Q, Wang R, Yang Q, et al. Chemoresistance to gemcitabine in hepatoma cells induces epithelial-mesenchymal transition and involves activation of PDGF-D pathway[J]. Oncotarget, 2013, 4(11): 1999-2009.

[37] Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 91.

[38] Kanczuga-Koda L, Wincewicz A, Fudala A, et al. E-cadherin and beta-catenin adhesion proteins correlate positively with connexins in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2014, 7(6): 1863-70.

[39] Bodenstine TM, Vaidya KS, Ismail A, et al. Homotypic gap junctional

Communication associated with metastasis suppression increases with PKA activity and is unaffected by PI3K inhibition[J]. Cancer Res, 2010,70(23):10002-11.

[40] Ghosh S, Kumar A, Chandna S. Connexin-43 downregulation in G2/M phase enriched tumour cells causes extensive low-dose hyper-radiosensitivity (HRS) associated with mitochondrial apoptotic events[J]. Cancer Lett, 2015, 363(1): 46-59.

[41] Grek CL, Rhett JM, Bruce JS, et al. Targeting connexin 43 with alpha-connexin carboxyl-terminal (ACT1) peptide enhances the activity of the targeted inhibitors, tamoxifen and lapatinib, in breast cancer: clinical implication for ACT1[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 296.

[42] Del RS, Moscato S, Bianchi F, et al. Altered expression of connexin 43 and related molecular partners in a pig model of left ventricular dysfunction with and without dipyrydamole therapy[J]. Pharmacol Res, 2015, 95-96C: 92-101.

[43] Zhao W, Han HB, Zhang ZQ. Suppression of lung cancer cell invasion and metastasis by connexin43 involves the secretion of follistatin-like 1 mediated via histone acetylation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(10): 1459-68.

[44] Xu HT, Li QC, Zhang YX, et al. Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(3): 315-21.

[45] Zhang YX, Xu HT, Qi FJ, et al. [Expression of connexin 43 in lung cancer and its correlation with E-cadherin] [J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2006, 35(6): 339-43.

[46] de Oliveira KD, Tedardi MV, Cogliati B, et al. Higher incidence of lung adenocarcinomas induced by DMBA in connexin 43 heterozygous knockout mice[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 618475.

[47] Zhang S, Wang Q, Liu L, et al. Gap Junctions Enhance the Antiproliferative Effect of MicroRNA-124-3p in Glioblastoma Cells[J]. J Cell Physiol, 2015.

[48] He B, Tong X, Wang L, et al. Tramadol and flurbiprofen depress the cytotoxicity

Of cisplatin via their effects on gap junctions[J]. Clin Cancer Res,

2009,15(18):5803-10.

[49] Sato H, Iwata H, Takano Y, et al. Enhanced effect of connexin 43 on cisplatin-induced cytotoxicity in mesothelioma cells[J]. J Pharmacol Sci, 2009, 110(4): 466-75.

[50] 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): 165-71.

[51] Kim YJ, Kim J, Tian C, et al. Prevention of cisplatin-induced ototoxicity by the inhibition of gap junctional intercellular communication in auditory cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(19): 3859-71.

[52] Sato H, Iwata H, Takano Y, et al. Enhanced effect of connexin 43 on cisplatin-induced cytotoxicity in mesothelioma cells[J]. J Pharmacol Sci, 2009, 110(4): 466-75.

[53] Yu M, Zhang C, Li L, et al. Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT[J]. Oncol Rep, 2014, 31(6): 2751-8.

[54] Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Cufi S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin)[J]. Cell Cycle, 2012, 11(21): 4020-32.

[55] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-90.

[56] Neel DS, Bivona TG. Secrets of drug resistance in NSCLC exposed by new molecular definition of EMT[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(1): 3-5.

[57] Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, et al. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3beta/snail signalling pathway[J]. Br J Cancer, 2012, 106(6): 1196-204.

[58] Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5820-8.

[59] Blick T, Hugo H, Widodo E, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi/) CD24 (lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 235-52.

[60] Adam L, Zhong M, Choi W, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5060-72.

[61] Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, et al. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma[J]. J Exp Med, 2009, 206(1): 221-32.

[62] Sun S, Ning X, Zhang Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Kidney Int, 2009, 75(12): 1278-87.

[63] Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 117(2): 273-80.

[64] Hayashi M, Yoo YY, Christensen J, et al. Requirement of evading apoptosis for HIF-1alpha-induced malignant progression in mouse cells[J]. Cell Cycle, 2011, 10(14): 2364-72.

[65] Smit MA, Geiger TR, Song JY, et al. A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(13): 3722-37.

[66] Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, et al. Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway[J]. Lung Cancer, 2008, 62(1): 8-14.

[67] 许春红, 郭慧敏, 王军, 等. amiRNA-Snai1 逆转人胃癌细胞 株SGC7901/DDP对顺铂的耐药性及其机制研究[J]. 胃肠病学, 2012, (03).

[68] Chang TH, Tsai MF, Su KY, et al. Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor[J]. Am J Respir Crit Care Med,

2011,183(8):1071-9.

[69] Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, et al. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3beta/snail signalling pathway[J]. Br J Cancer, 2012, 106(6): 1196-204.

[70] Bonavida B, Baritaki S. The novel role of Yin Yang 1 in the regulation of epithelial to mesenchymal transition in cancer via the dysregulated NF-kappaB/Snail/YY1/RKIP/PTEN Circuitry[J]. Crit Rev Oncog, 2011, 16(3-4): 211-26.

[71] Jiao M, Nan KJ. Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1alpha pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2012, 40(2): 461-8.

[72] Gungor C, Zander H, Effenberger KE, et al. Notch signaling activated by replication stress-induced expression of midkine drives epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(14): 5009-19.

[73] Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, et al. Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway[J]. Lung Cancer, 2008, 62(1): 8-14.

[74] Zhuo WL, Wang Y, Zhuo XL, et al. Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(4): 1098-102.

[75] Ishikawa S, Kuno A, Tanno M, et al. Role of connexin-43 in protective PI3K-Akt-GSK-3beta signaling in cardiomyocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302(12): H2536-44.

附录A 主要英文缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Cx | connexin | 连接蛋白 |
| EMT | Epithelial-mesenchymal transition | 上皮间质转化 |
| GJIC | Gap junction intercellular commulication | 缝隙连接细胞间通讯 |
| GJ | Gap junction | 缝隙连接 |
| CDDP | cisplatin | 顺铂 |
| OD | Optical density | 吸光度值 |
| DMSO | dimethylsulfoxide | 二甲基亚砜 |
| PMSF | Phenylmethanesulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| siRNA | Small interference ibonucleic acid | 小干扰核糖核酸 |
| SDS  Tris | Sodium dodecyl sulfate  Tris (hydroxymethyl) aminomethane | 十二烷基硫酸钠  三羟甲氨基甲烷 |
| TEMED | tetramethylethylenediamine | N，N，N，N-四甲基  乙二胺 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| MTT | Methyl thiazolyl tetrazolium | 噻唑蓝 |
| PVDF | Polyvinylidene difluoride | 聚偏氟乙烯 |

附录B 常用试剂配制方法

1. 10×磷酸盐缓冲液（0. 1M PBS）的配制：

氯化钠（NaCl） 137 mmol. L-1 80.06 g

氯化钾（KCl） 2.7 mmol. L-1 2.010 g

磷酸氢二钠（Na2HPO4） 10 mmol. L-1 14.40 g

磷酸二氢钾（KH2PO4） 2 mmol. L-1 2.40 g

加双蒸水搅拌，溶解充分，定容至1000 ml，室温保存待用。

2. 1×磷酸盐缓冲溶液（0.01M PBS）的配制 ：

取100 mL的10×PBS加双蒸水至1 L，搅拌、混匀。细胞清洗用PBS

需用0.22μm 的微孔过滤器过滤除菌后分装，置4℃保存备用。

3. TPBS溶液的配制：

1×磷酸盐缓冲液（0.01M PBS）1000 ml

吐温Tween-20 0.5 ml

搅拌溶解，分装，室温保存。

4. RPMI1640培养基的配制：

RPMI1640干粉一袋

碳酸氢钠（NaHCO3）2 g

青霉素（Penicillin）0.5 ml

链霉素（Streptomycine）0.5 ml

加双蒸水搅拌溶解定容至1000 ml，调整pH值于7.2~7.4之间，0.22μm微孔滤膜过滤灭菌，分装，4℃保存待用。

5. 0.25%胰蛋白酶溶液的配制：

胰蛋白酶粉剂（Trypsin）1.25 g

磷酸盐缓冲液PBS 500 ml

搅拌溶解后，调整pH值于7.2~7.4之间，0.22μm微孔滤膜过滤灭菌，分装，4℃保存待用。

6. MTT工作液的配制：

四甲基噻唑氮蓝MTT 0.25 mg

磷酸盐缓冲液PBS 50 ml

配制成浓度为5 mg/ml的工作液，过滤除菌，避光分装，-20℃避光保存。

7. 双抗的配制：

青霉素80万U+4 ml双蒸水

链霉素100万U+5 ml双蒸水

分装，保存于-20℃备用。

8. Western blotting中使用主要试剂的配制：

10%十二烷基硫酸钠SDS

5 g十二烷基硫酸钠SDS+50 ml H2O

1.5 M Tris·HCl ( pH 8.8)

18.17 g三羟甲氨基甲烷Tris溶解于双蒸水后，用HCl调pH至8.8，用容量瓶定容至100 ml

0.5 M Tris·HCl ( pH 6.8)

6.06 g Tris溶解于双蒸水后，用HCl调pH至6.8，用容量瓶定容至100 ml

30% Acr/Bic(37.5: 1)

丙烯酰胺Acrylamide 29.20 g

甲叉双丙烯酰胺Bis 0.80 g

加双蒸水溶解，定容至100 ml，4℃避光保存

10% AP (ammonium persufate)

AP 0.10 g

加0.1 ml双蒸水，溶解后4℃保存，现用现配

电泳缓冲液

三羟甲氨基甲烷Tris base 3.03 g

甘氨酸Glysine 18.77 g

十二烷基硫酸钠SDS 1.00 g

加双蒸水至1000 ml，搅拌，溶解，可重复使用2 次

转移缓冲液

三羟甲氨基甲烷Tris base 3.00 g

甘氨酸Glysine 14.40 g

甲醇200 ml

先将Tris base和Glysine用800 ml的双蒸水溶解完全，再加入200 ml 的

甲醇，现用现配

封闭液

脱脂奶粉5.00 g

TPBS 100 ml

搅拌溶解后4℃保存待用

10×丽春红染液

丽春红2.00 g

三氯乙酸30.00 g

磺基水杨酸30.00 g

加双蒸水定容至100 ml，使用时用双蒸水稀释10倍。

9. 4 %多聚甲醛配制：

精确称取4 g多聚甲醛粉末，用0. 01 M的PBS溶液溶解，搅拌定容至100 mL，

4℃保存备用 。

9. 药物的配制：

将25 mg的CDDP，溶解于4.164 ml的无菌PBS溶液中，配制成浓度为20 mM

的的储存液，分装，-20℃保存。

附录C个人简历及论文发表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 一、个人简历  学习经历： |  | |
| 2008.9-2012.7 | 蚌埠医学院 | 学士 |
| 2012.9-2015.7 | 蚌埠医学院 | 硕士 |
| 获奖情况： |  |  |

2008-2009学年获校级三等奖学金、“优秀青年志愿者”称号；

2010-2011学年获校级三等奖学金；

2012-2013学年获校级三等奖学金、“优秀学生”称号；

2013-2014学年获校级“优秀学生”、“优秀团员”称号

2014年安徽省药理学会“优秀青年论文”演讲比赛中荣获二等奖

**2014-2015学年荣获研究生国家奖学金；被评为“省级双优生”。**二、参与科研项目

负责研究生创新计划校级课题一项，题目为：NOX4调控非小细胞肺癌EMT

转化及侵袭转移的研究。三、发表论文

1. Li L, Wang Y, Qi B, Yuan D, Dong S, Guo D, Zhang C, Yu M. Suppression of PMA-induced tumor cell invasion and migration by ginsenoside Rg1 via the inhibition of NF-κB-dependent MMP-9 expression. Oncol Rep. 2014 Nov;32(5):1779-86.

2. Yu M#, Zhang C#, Li L#, Dong S, Zhang N, Tong X. Cx43 reverses the resistance

Of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT. Oncol Rep. 2014 Jun;31(6):2751-8. (#, co-first author)

附录D综述

缝隙连接和上皮间质转化与肿瘤细胞耐药性产生的相关性研究

**【摘要】：**肿瘤细胞对抗肿瘤药物产生耐药是导致治疗失败的常见原因。缝隙连接和上皮间质转化（epithelial-mesenchy mal transition, EMT）在肿瘤耐药方面的作用为解决该问题提供了可能。本文将围绕缝隙连接的基本特征及其在肿瘤耐药中的作用，EMT的基本特征及其在肿瘤耐药中的作用进行详细综述。

【关键词】：耐药性；缝隙连接； EMT

肿瘤细胞对抗肿瘤药物产生耐药是导致治疗失败的常见原因。然而，目前研究尚未发现确切的能逆转肿瘤耐药的有效途径，肿瘤耐药仍是困扰肿瘤治疗的关键性难题。近期研究发现，肿瘤细胞发生上皮间质转化在肿瘤耐药过程中起到关键性作用[1]，也有研究报道缝隙连接为逆转肿瘤耐药提供了新途径[2]。缝隙连接和

EMT为解决肿瘤细胞耐药提供了新的可能，现就三者之间的相关性作一综述对肿瘤细胞耐药性的逆转具有重要意义。

1、缝隙连接的概念及其与耐药性产生的关系

缝隙连接由特殊的通道蛋白—连接蛋白（connexin, Cx）组成。Cxs是由多基因家族编码的一类结构相似而相对分子质量不同的蛋白质。根据连接蛋白相对分子质量的不同可将Cxs分别命名，如Cx26、Cx32、Cx43等。在细胞膜上，6 个

Cxs环绕中央孔道排列聚集形成一个“半通道”，又称为连接子。2个位于各自细胞膜上的“半通道”可对接在一起形成蛋白质通道，即缝隙连接（gapjunction，

GJ）。缝隙连接的主要功能有沟通相邻细胞的细胞质，细胞质中的一些离子、代谢产物及第二信使（IP3、cGMP、cAMP、Ca2+和谷胱甘肽等）能通过GJ扩散、转运到与其毗邻的细胞。现已证明缝隙连接在同步细胞活动、维持细胞内环境稳定、调控细胞的生长发育等生命过程中起到了关键作用[3]。

缝隙连接是细胞间直接进行信息交换的重要通道，由其介导的通讯方式缝隙连接细胞间通讯（gapjunctionintercellular communication, GJIC）在细胞的新陈代谢、增殖和分化及维持细胞内环境稳定等生理过程中发挥着关键的调节作用[4]。顺铂是临床治疗肿瘤中广泛应用的化疗药物之一，但是肿瘤细胞对顺铂产生耐药是导致其治疗失败的常见原因，关于顺铂的耐药性产生的具体原因至今仍未阐明。研

究发现肿瘤细胞中常伴有GJIC功能下降，并且在顺铂治疗肿瘤的过程中也常引起肿瘤细胞缝隙连接介导的细胞间通讯水平下降[5, 6]，而通过改变缝隙连接介导的细胞间通讯的基本组成单位Cx43可使顺铂诱导的细胞凋亡增加，进而增加顺铂的细胞毒性，但此过程可能与缝隙连接细胞间通讯无关[7]。但是目前较多的研究显示细胞GJ以及GJIC功能的改变可以改变顺铂对肿瘤细胞的杀伤作用。首先GJ的形成可以增强顺铂的细胞毒性，在实验过程中人们发现有GJ形成的细胞集落与无

GJ形成组相比，顺铂的细胞毒性是显著增强的，此实验结果表明缝隙连接的形成可以增强顺铂的杀伤作用[8]；Hong等[9]发现，顺铂的细胞毒作用可通过GJ在细胞之间传递，从而放大了顺铂的细胞毒作用；研究发现改变GJ功能可以改变顺铂的作用效果，曲马多及氟比洛芬可以通过抑制GJ功能进而减弱顺铂的细胞毒性[10]；还有研究发现，肉瘤基因（sarcoma gene, Src）抑制剂可通过抑制缝隙连接蛋白的磷酸化来增强缝隙连接介导的细胞间通讯功能进而提高顺铂的细胞毒性[11]；有报道显示，用雌激素可有效恢复缝隙连接功能有助于肿瘤的治疗[12]。这一发现对于肿瘤的治疗及逆转肿瘤细胞对化疗药物的获得性耐药提供了新的可能性。

2、EMT的概念及其与耐药性产生的关系

EMT是Greenberg和Hay[13]在1982年提出的，他们发现晶状体上皮细胞在胶原凝胶中可以形成伪足，转变为间质细胞样的形态，具体是指在某些特殊的生理或病理条件下，具有极性的上皮细胞失去极性转化为具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间质细胞的过程。EMT以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为重要特征，具体来说，EMT发生时细胞主要发生以下几方面的变化：首先是细胞形态学的改变，细胞发生EMT时，细胞会丧失细胞极性，转变为具有长梭形、分散排列的间质细胞的特性；相关表面标志物的变化，发生E M T的细胞，上皮细胞标志蛋白如E -钙黏蛋白（E-cadherin）和角蛋白等的表达下调，α-catenin从胞膜异位到胞核内；间质细胞标志蛋白如波形蛋白（Vimentin）、甲平滑肌抗原-SM

A、纤维连接蛋白（Fibronectin）、神经钙粘蛋白等的表达上调，另外EMT转录因子Snail、Slug、Twist等的表达增加；细胞生物行为学变化，发生EMT的上皮细胞会由静止状态转变为具有较强运动、迁移能力的细胞；同时相关蛋白质溶解酶的表达会增加，如：MMP2和MMP9等，可降解基膜使细胞侵入细胞外基质中，进而获得较强的侵袭能力。并非经历EMT的细胞均发生以上变化，其中E-cadherin下调或缺失及细胞迁移能力的获得是细胞EMT的重要标志[14, 15]。EMT在肿瘤耐

药的研究中已受到越来越多的重视。最新研究[16]发现结肠癌细胞的耐药株细胞株形态呈长梭形，细胞极性丧失，E-cadherin的表达降低、Vimentin的表达增加等特征。还有研究[17]发现在卵巢癌耐药细胞株中，也表现出EMT相关转录因的表达上调，基质金属蛋白酶-2（MMP2）的表达均增加的现象，致瘤实验的结果表明耐药细胞与敏感的肿瘤细胞组相比腹膜播散转移的能力是显著增强。还有相似的研究在乳腺癌细胞中也发生EMT现象，人们还发现只有发生上皮间质转化的细胞才具有较强的侵袭转移能力以及多药耐药（multi-drug resistance, MDR）现象[18]。更多的研究在胰腺癌耐药细胞[19, 20]、乳腺癌耐药细胞[21]、肺腺癌耐药细胞以及结肠癌耐药细胞中均观察到了EMT现象[22, 23]。肺癌耐药细胞株H460和Calu6与敏感株

H292相比，上皮细胞标志蛋白的表达均降低[24, 25]。肺癌耐药细胞株与敏感株相比，上皮细胞标志蛋白、紧密连接体蛋白及上皮细胞粘附分子的表达量均降低，间质细胞标志蛋白的表达显著升高[26-28]。上述研究结果均说明了EMT有可能会作为新的可逆转耐药靶点为肿瘤细胞的治疗带来新的希望。

现有研究[29-34]表明，以下相关通路都可通过EMT来介导肿瘤细胞对顺铂、吉非替尼、吉西他滨等的获得性耐药，如：PI3K/Akt/GSK-3β/Snail、P I3K/Akt/HIF- 1α、Notch-2、NF-κB/Snail/Y Y1/R KIP/PTEN环路等。那么在众多调控EMT的因子和通路中，哪些途径可调控肺腺癌A549对顺铂的获得性耐药，其主要机制又是什么？以调控EMT逆转耐药的手段来逆转A549对顺铂的获得性能否能达到预期的效果？

3、缝隙连接与EMT的相关性

早期研究[35]认为细胞间粘附系统的形成可能早于缝隙连接通讯功能的形成。还有研究[36]发现通过在结肠癌癌细胞中转染Cx26基因可使上皮标志蛋白

E-cadherin的表达增高，且可促进上皮标志蛋白从细胞质到细胞膜的异位，进而重建缝隙连接介导的细胞间通讯。另外有研究[37, 38]发现转染Cx43基因后，未发现细胞间黏附的形成，细胞的生长速度受到了显著的抑制，这提示我们Cx43可能可以通过细胞周期调控来参与细胞凋亡过程。以上研究结果提示我们Cx与E-cadherin之间可能存在相互调节的关系但Cx43与E-cadherin哪个基因位于上游仍存在一定争议，且Cx43在肺癌中调控E-cadherin表达和细胞周期的具体机制有待进一步研究。

4、小结

抗肿瘤药物在治疗过程中，肿瘤细胞的获得性耐药的产生是导致肿瘤治疗效果不佳的常见原因。而缝隙连接介导的细胞间通讯功能的异常是导致肿瘤形成的常见因素，因此对缝隙连接及获得性耐药产生过程的研究将为肿瘤细胞耐药性的逆转及肿瘤细胞的治疗开辟新的途径。通过以上论述我们得知肿瘤细胞在产生获得性耐药的过程与EMT密切相关，且Cx与E-cadherin的表达之间可能存在相互调控机制。因此可以设想以缝隙连接的组成单位Cxs及其组成为切入点来调控EMT作为药物的靶点可改善抗肿瘤药的的疗效。但是其中的关键性问题就是首先要明确Cxs或EMT的变化对于抗肿瘤药物细胞毒性的影响，及Cxs的改变与EMT之间存在相关性的具体机制，明确作用机制以后可寻找作用于该靶点的药物，进而逆转肿瘤细胞的获得性耐药。根据以上的研究，我们可以设想使用可改变Cxs的表达或逆转EMT的药物来使抗肿瘤药物的毒性增强。深入了解Cxs及EMT对抗肿瘤药物增效的具体机制以期为逆转肿瘤的获得性耐药提供可行途径。

参考文献

[1] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-51.

[2] 吴冬, 欧俊, 惠宁. 铂类化疗药耐药机制的分子基础及新观点[J]. 国际肿瘤学杂志, 2006, (04): 256-8.

[3] Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, et al. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1719(1-2): 125-45.

[4] Chanson M, Derouette JP, Roth I, et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1711(2): 197-207.

[5] Shishido SN, Nguyen TA. Gap junction enhancer increases efficacy of cisplatin to attenuate mammary tumor growth[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44963.

[6] 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): 903-11.

[7] Sato H, Iwata H, Takano Y, et al. Enhanced effect of connexin 43 on cisplatin-induced cytotoxicity in mesothelioma cells[J]. J Pharmacol Sci, 2009, 110(4): 466-75.

[8] He B, Tong X, Wang L, et al. Tramadol and flurbiprofen depress the cytotoxicity of cisplatin via their effects on gap junctions[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(18): 5803-10.

[9] 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): 165-71.

[10] He B, Tong X, Wang L, et al. Tramadol and flurbiprofen depress the cytotoxicity of cisplatin via their effects on gap junctions[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(18): 5803-10.

[11] Peterson-Roth E, Brdlik CM, Glazer PM. Src-Induced cisplatin resistance mediated by cell-to-cell communication[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3619-24.

[12] Wang N, Sun LY, Zhang SC, et al. MicroRNA-23a participates in estrogen deficiency induced gap junction remodeling of rats by targeting GJA1[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(4): 390-403.

[13] Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. J Cell Biol, 1982, 95(1): 333-9.

[14] Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition[J]. EMBO Rep, 2008, 9(4): 322-6.

[15] Chang JY, Wright JM, Svoboda KK. Signal transduction pathways involved in epithelial-mesenchymal transition in oral cancer compared with other cancers[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1-3): 40-7.

[16] Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14 Pt 1): 4147-53.

[17] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2007, 31(2): 277-83.

[18] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(8): 2657-65.

[19] Shah AN, Summy JM, Zhang J, et al. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(12): 3629-37.

[20] Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5820-8.

[21] Hiscox S, Jiang WG, Obermeier K, et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells

Promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation[J]. Int J Cancer, 2006,118(2):290-301.

[22] Toden S, Okugawa Y, Jascur T, et al. Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracilthroughmiRNA-inducedsuppressionof epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(3): 355-67.

[23] Yu M, Zhang C, Li L, et al. Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT[J]. Oncol Rep, 2014, 31(6): 2751-8.

[24] Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24 Pt 1): 8686-98.

[25] Suda K, Tomizawa K, Fujii M, et al. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(7): 1152-61.

[26] Rho JK, Choi YJ, Lee JK, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line[J]. Lung Cancer, 2009, 63(2): 219-26.

[27] Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 944-50.

[28] Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, et al. Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(6): 1683-91.

[29] Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, et al. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3beta/snail signalling pathway[J]. Br J Cancer, 2012, 106(6): 1196-204.

[30] Bonavida B, Baritaki S. The novel role of Yin Yang 1 in the regulation of epithelial to mesenchymal transition in cancer via the dysregulated NF-kappaB/Snail/YY1/RKIP/PTEN Circuitry[J]. Crit Rev Oncog, 2011, 16(3-4): 211-26.

[31] Jiao M, Nan KJ. Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1alpha pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2012, 40(2): 461-8.

[32] Gungor C, Zander H, Effenberger KE, et al. Notch signaling activated by replication stress-induced expression of midkine drives epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(14): 5009-19.

[33] Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, et al. Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway[J]. Lung Cancer, 2008, 62(1): 8-14.

[34] Zhuo WL, Wang Y, Zhuo XL, et al. Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(4): 1098-102.

[35] Ito A, Ichiyanagi N, Ikeda Y, et al. Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet alpha-cells and prevents their excessive secretion of glucagon[J]. Islets, 2012, 4(1): 49-55.

[36] Kanczuga-Koda L, Wincewicz A, Fudala A, et al. E-cadherin and beta-catenin adhesion proteins correlate positively with connexins in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2014, 7(6): 1863-70.

[37] Ghosh S, Kumar A, Chandna S. Connexin-43 downregulation in G2/M phase enriched tumour cells causes extensive low-dose hyper-radiosensitivity (HRS) associated with mitochondrial apoptotic events[J]. Cancer Lett, 2015, 363(1): 46-59.

[38] Grek CL, Rhett JM, Bruce JS, et al. Targeting connexin 43 with alpha-connexin

Carboxyl-terminal (ACT1) peptide enhances the activity of the targeted

Inhibitors, tamoxifen and lapatinib, in breast cancer: clinical implication for ACT1[J]. BMC Cancer, 2015,15:296.