



## 硒-甲基硒代半胱氨酸通过增强缝隙连接蛋白26构成的同型缝隙连接提高依托泊苷的细胞毒性\*

吕振宇, 季文斌, 程倩倩, 周雪丽, 王 威, 杨 燕<sup>△</sup>

蚌埠医学院第一附属医院 肿瘤内科(蚌埠 233004)

**【摘要】目的** 探究硒-甲基硒代半胱氨酸(methylselenocysteine, MSC)对缝隙连接蛋白(connexin, Cx)26构成的同型缝隙连接(gap junction, GJ)功能的影响及其对化疗药物细胞毒性的调控。**方法** 以转染并稳定表达Cx26的Tet-on HeLa细胞为工具细胞, MTT法观察MSC对细胞生长的影响; 细胞接种荧光示踪法测定MSC对GJ功能的影响; Western blot检测MSC对Cx26蛋白表达的影响; 标准细胞集落形成分析法观察化疗药物的细胞毒性; 在此基础上, 分析MSC对化疗药物细胞毒性的影响及其与调控GJ的关系。**结果** 多西环素(doxycycline, Dox)可诱导Tet-on HeLa细胞Cx26表达并形成有功能的GJ。MSC在50 μmol/L内对细胞生长无明显影响, 无毒浓度的MSC可以浓度依赖性增强GJ, 并可在纳摩尔级发挥作用。该效应与其诱导Cx26蛋白的表达有关。在三种不同作用机制的常见化疗药物中, 依托泊苷(etoposide, Eto)在有GJ形成的情况下表现一定的细胞毒性差异。MSC与Eto联合应用对细胞集落形成的抑制作用强于Eto单药, 且该效应只有在有GJ形成的HeLa细胞中发生。**结论** MSC可以通过增强Cx26组成的GJ提高Eto的细胞毒性, 提示硒化物联合化疗在肿瘤治疗中具有一定的潜在价值。

**【关键词】** 硒-甲基硒代半胱氨酸 缝隙连接蛋白 缝隙连接 依托泊苷

**Methylselenocysteine Promotes Etoposide Cytotoxicity by Enhancing Homotypic Gap Junctions Composed of Connexin 26** LYU Zhen-yu, JI Wen-bin, CHENG Qian-qian, ZHOU Xue-li, WANG Wei, YANG Yan<sup>△</sup>. Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: qiannianhupo@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of methylselenocysteine (MSC) on the function of homotypic gap junction (GJ) composed of connexin (Cx) 26 and its regulation of chemotherapeutic drug cytotoxicity. **Methods** The Tet-on HeLa cells transfected with and stably expressing Cx26 were used as the tool cells. Effects of MSC on cell growth, GJ function, and Cx26 protein expression were examined by MTT method, parachute assay, and Western blot analysis, respectively. The cytotoxicity of chemotherapeutic drugs was determined by standard colony-forming assay, and the relationship between MSC's effect on cytotoxicity of these chemotherapeutic drugs and its regulation of GJ was further analyzed. **Results** In Tet-on HeLa cells, doxycycline (Dox) can induce the expression of Cx26, which could then form functional GJs. Within a concentration range of 50 μmol/L, MSC had no significant effect on HeLa cell growth. Non-toxic concentrations of MSC can enhance GJs in a concentration-dependent manner and exert its effect at the nanomolar level. This effect was associated with an induction of Cx26 protein expression by MSC. Among the three common chemotherapeutic agents with different mechanisms of action, etoposide (Eto) presented cytotoxicity differences between HeLa cells cultured at low density (nonconfluent, no GJ formed) and high density (confluent, GJ formed). What's more, the inhibitory effect of Eto combined with MSC on HeLa cell colony formation was stronger than that of Eto alone, and this effect occurred only in HeLa cells with GJ formation. **Conclusion** MSC can potentiate the cytotoxicity of Eto by enhancing the GJs composed of Cx26, indicating that combined strategy of selenide and chemotherapy shows potential value in the treatment of malignant tumors.

**【Key words】** Methylselenocysteine Connexin Gap junction Etoposide

缝隙连接(gap junction, GJ)是一种存在于相接细胞之间的由缝隙连接蛋白(connexin, Cx)构成的跨膜通道,

可以直接沟通细胞间通讯以促进细胞间的物质交换和信号分子的传递<sup>[1]</sup>。两个位于各自细胞膜上、由6个Cx环绕组成的连接子(connexon)对接形成一个完整的GJ。其中同型(homotypic)GJ由单一Cx组成的同聚体连接子构成, 异型(heterotypic)GJ由不同Cx组成的同聚体连接子构成, 异侧(heteromeric)GJ由几种Cx构成的异聚体连接子构成。不同的Cx形成具有不同性质的通道, 这种Cx的多

\* 安徽省自然科学基金面上项目(No. 2008085MH238)、安徽省卫健委卫生健康科研重点项目(No. AHWJ2022a010)、安徽省高校优秀青年人才支持计划项目(No. gxyq2022042)和蚌埠医学院“512人才培养计划”(No. by51202208)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: qiannianhupo@163.com

样性及其组合的复杂性提高了GJ的理论数量, 并可以导致GJ对不同信号分子的通透性差异和GJ额外功能诸如促进血管生成、侵袭和迁移等<sup>[2]</sup>。硒-甲基硒代半胱氨酸(methylselenocysteine, MSC)是一种天然的有机硒化合物, 在体内经 $\beta$ -裂解酶的转化生成甲基硒醇而发挥抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。我们既往研究发现MSC可以通过增强由异质性缝隙连接蛋白Cx26/Cx32组成的异侧GJ而提高某些化疗药物的敏感性<sup>[4]</sup>, 但其对同型GJ的影响尚不得知。

Cx表达减少和GJ下调甚至丧失与部分肿瘤的发生或发展有关<sup>[5]</sup>, 而在肿瘤细胞中上调Cx和恢复GJ可以通过介导化疗药物的某些中间产物或死亡信号在细胞间的传递达到增敏化疗药物效果的作用<sup>[6-7]</sup>。至于Cx26蛋白, 其异常表达已被证实存在多种肿瘤中存在, 与肿瘤的进展和预后不良密切相关<sup>[1,8]</sup>。其与化疗药物敏感性的研究结果也尚存争议。如GARCIA-RODRIGUEZ等<sup>[9]</sup>发现过表达Cx26可以增强胰腺癌细胞中吉西他滨的细胞毒性, 但也有报道称非小细胞肺癌细胞中Cx26的过表达可通过诱导上皮间质转化介导吉非替尼的获得性耐药<sup>[10]</sup>。有鉴于此, 本研究在前期工作基础上, 继续探究Cx26组成的同型GJ与化疗药物敏感性的关系, 以及MSC对其的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

MSC、依托泊苷(etoposide, Eto)、顺铂、5-氟尿嘧啶、抗HA抗体、ATRA和18- $\alpha$ -GA购自Sigma-Aldrich公司。G418、潮霉素B和多西环素(doxycycline, Dox)购自Calbiochem公司。DMEM培养基、胎牛血清、CM-DiI和Calcein-AM购自Invitrogen公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗购自Amersham公司。ECL-plus化学发光试剂盒和DC蛋白定量试剂盒购自Bio-rad公司。

### 1.2 实验细胞

HeLa细胞无内源性Cx表达<sup>[11]</sup>。转染并稳定表达Cx26的HeLa细胞由美国新泽西医学牙医学大学药理/生理学系 Andrew L. Harris教授惠赠。Cx26的表达由四环素诱导的双向启动子控制; 这种Tet-on HeLa细胞模型已被本课题组既往研究证实了有效性, 并作为工具细胞被使用和研究<sup>[4,12]</sup>。

### 1.3 稳定表达Cx26的HeLa细胞的培养传代

用加有10%胎牛血清、潮霉素B(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和G418硫酸盐(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的DMEM培养基培养HeLa细胞, 并置于恒温培养箱。根据实验需要, 可用Dox(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理48 h对Cx26诱导表达, 该质量浓度已在既往研究中被证实对HeLa细胞无显著影响<sup>[13]</sup>。

### 1.4 Western blot检测Cx26蛋白表达

利用DC试剂盒测定提取的HeLa细胞全蛋白的蛋白浓度。每孔上20~30  $\mu\text{g}$ 样品, 经电泳、转膜和封闭后, 将PVDF膜置于小盒中加入鼠抗HA抗体(1:2000)和抗 $\beta$ -actin抗体(1:10000)4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。第二日室温摇床孵育羊抗小鼠二抗40 min。用ECL-plus试剂盒曝光显影。将MSC溶于二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 制备成50 mmol/L的贮存液, 使用时用培养基稀释至处理组浓度。浓度效应实验中, 分为无Dox诱导组、对照(Control)组、溶质对照(DMSO)组、MSC处理(10、100、1000 nmol/L, 48 h)组、阳性对照(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ATRA, 48 h)组; 时间效应实验中, 分为无Dox诱导组、对照(Control)组、溶质对照(DMSO)组、MSC处理(100 nmol/L, 4 h、24 h和48 h)组。除无Dox诱导组使用完全培养基, 其余各组均为含Dox的完全培养基。对照组仅使用含Dox的完全培养基, 溶质对照组加入与最高浓度药物等体积的DMSO(体积分数 $\leq 0.2\%$ )作用48 h。通过Image J软件测定蛋白条带的灰度值, 目的蛋白的相对表达量=目的条带的灰度值/内参条带( $\beta$ -actin)的灰度值。

### 1.5 细胞接种荧光示踪法

用新鲜制备的2.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Calcein-AM和5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  CM-DiI溶液双标记HeLa细胞, 置于培养箱培育30 min。选择同时具有两种标记的HeLa细胞作“供体细胞”, 处于对数生长期的融合HeLa细胞作“受体细胞”。用待测药物处理“受体细胞”相应时间后, 在单层“受体细胞”上以150:1受体/供体比例接种“供体细胞”, 置于培养箱中4 h以形成GJ。最后在荧光显微镜下对每个“供体细胞”四周有绿色荧光的“受体细胞”进行计数, 以间接评估GJ功能。在此, 增强剂ATRA<sup>[14]</sup>(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 48 h)和GJ抑制剂18- $\alpha$ -GA<sup>[14]</sup>(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 48 h)作为GJ调节剂被使用。在MSC浓度效应实验中, MSC作用浓度0.001~1000 nmol/L, 作用时间4 h; 在MSC时间效应实验中, 分为对照组、溶质对照组和MSC不同作用时间组, MSC作用浓度100 nmol/L, 作用时间4 h、24 h和48 h, 对照组只使用含Dox的完全培养基, 溶质对照组在此基础上加入与100 nmol/L MSC等体积的DMSO(体积分数 $\leq 0.2\%$ )作用48 h。GJ增强率=(处理组荧光传递细胞数-对照组荧光传递细胞数)/对照组荧光传递细胞数。

### 1.6 MTT实验检测细胞活性

以每孔4000 HeLa细胞的密度接种到96孔板, 置于培养箱中过夜。分组处理细胞48 h, 具体包括对照组、溶质对照组和MSC不同浓度组(0.1、1、10、50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 对照组只使用含Dox的完全培养基, 溶质对照组在此基础上

加入与50  $\mu\text{mol/L}$  MSC等体积的DMSO(体积分数 $\leq 0.2\%$ )。每孔加入MTT(5 mg/mL)孵育4 h。去除含有MTT的培养基,加入DMSO(100  $\mu\text{L}$ ),低速振荡10 min。酶标仪读取每孔490 nm处光密度(OD)值。细胞活力= $(\text{OD}_{\text{MSC处理组}} - \text{OD}_{\text{溶剂对照组}}) / \text{OD}_{\text{溶剂对照组}}$ 。

### 1.7 标准细胞集落形成分析法

标准细胞集落形成分析法能通过测定高密度细胞接种(有GJ形成)和低密度细胞接种(无GJ形成)的集落形成率,评估药物细胞毒性的差异<sup>[7]</sup>。高密度接种是先将细胞以 $1.6 \times 10^6$ /孔的密度接种在6孔板中,待HeLa细胞生长融合后用待测药物避光处理1 h,再以1 000细胞/孔接种到6孔板中培养7~9 d。通过固定和结晶紫染色评估集落形成数目。低密度接种则是先将细胞以1 000细胞/孔的密度接种在6孔板中,待其贴壁生长后用待测药物以相同步骤处理。通过计数细胞集落形成率比较待测药物毒性大小。选择顺铂(2.5  $\mu\text{mol/L}$ 和5  $\mu\text{mol/L}$ )、5-氟尿嘧啶(0.25 mmol/L和0.5 mmol/L)以及Eto(2  $\mu\text{mol/L}$ 和4  $\mu\text{mol/L}$ )作为代表性化疗药物,以观察GJ对不同化疗药物细胞毒性的影响。在高、低细胞接种密度下,观察Eto单药组(0~8  $\mu\text{mol/L}$ )、Eto与MSC(100 nmol/L)联合组的作用。在Dox有、无诱导条件下,观察Eto单药组(2  $\mu\text{mol/L}$ 和4  $\mu\text{mol/L}$ )、Eto与MSC(100 nmol/L)联合组的作用。对于Eto和MSC联合使用相关实验,MSC预处理细胞3 h,其后Eto与MSC联合处理1 h。细胞集落形成率=待测药物处理组的细胞集落数/对照组的细胞集落数。

### 1.8 统计学方法

结果处理分析使用SigmaPlot软件(Jandel Scientific)进行。所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料多组间比较采用ANOVA分析,两组间比较采用 $t$ 检验, $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Tet-on HeLa细胞模型的鉴定

Western blot实验显示细胞经Dox诱导后可表达Cx26蛋白(图1A), Calcein也能在HeLa细胞间进行有效传递(图1B)。并且在上述细胞模型上,进一步观察到由Cx26组成的GJ功能可被GJ调节剂所调控(图1B)。以上结果表明转染并稳定表达Cx26的Tet-on HeLa细胞表达外源性Cx26蛋白并且可被诱导形成功能性GJ。

### 2.2 MSC对HeLa细胞生长的影响

结果显示MSC在小于50  $\mu\text{mol/L}$ 的情况下,其对HeLa细胞生长无显著影响(图2)。

### 2.3 MSC增强由Cx26组成的同型GJ功能

细胞接种荧光示踪实验显示, MSC可以在0.001至

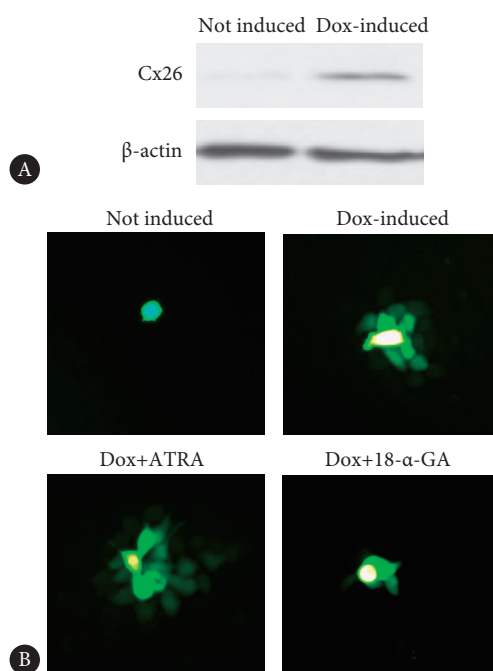


图1 Dox诱导Cx26蛋白表达和功能性GJ形成

Fig 1 Dox induced Cx26 protein expression and functional GJ formation

A: Expression of Cx26 protein in Tet-On HeLa cells can be induced by Dox as shown by Western blot assay. B: Fluorescence transmission between HeLa cells in different culture conditions detected by parachute assay. HeLa cells were cultured with or without Dox (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 h.  $n=4$ .

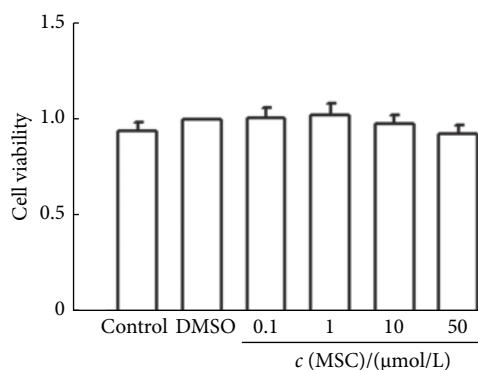


图2 MSC对转染并稳定表达Cx26的HeLa细胞生长的影响

Fig 2 Effect of MSC on the growth of HeLa cells transfected with and steadily expressing Cx26

The HeLa cells were pre-induced with Dox (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 h, and then treated with MSC for 48 h.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

100 nmol/L范围内,浓度依赖性地增强由Cx26组成的同型GJ功能,并且在浓度达到100 nmol/L时增强效应最大(表1)。随着MSC作用时间延长,GJ的增强效应差异未显示出统计学意义(表2),表明MSC处理较短的4 h即可发挥有效的增强GJ功能作用。MSC作用不同时间的代表性荧光传递图片见图3。

### 2.4 MSC促进HeLa细胞Cx26蛋白的表达

见图4。以不同浓度MSC处理细胞48 h, Cx26蛋白的

表1 不同浓度MSC作用4 h对Cx26组成的GJ功能(GJ增强率)的影响

Table 1 Effect of MSC for 4 h at different concentrations on the function of GJs composed of Cx26 (GJ enhancement rate)

MSC concentration/(nmol/L)	n	GJ enhancement rate ( $\bar{x} \pm s$ )
0.001	4	0.14±0.02
0.01	4	0.19±0.02
0.1	4	0.26±0.04
1	4	0.33±0.04
10	4	0.36±0.02
100	4	0.46±0.05
1 000	4	0.41±0.02

表2 100 nmol/L MSC作用不同时间对Cx26组成的GJ功能(荧光传递细胞数)的影响

Table 2 Effect of MSC treatment at 100 nmol/L for different periods of time on the function of GJs composed of Cx26 (number of fluorescent spread cells)

Control group	DMSO group	MSC treatment group ( $\bar{x} \pm s$ )		
		4 h	24 h	48 h
0.98±0.05	1	1.46±0.05*	1.52±0.04*	1.56±0.06*

Dye spread normalized to DMSO group. \*P<0.05, vs. DMSO group. n=4.

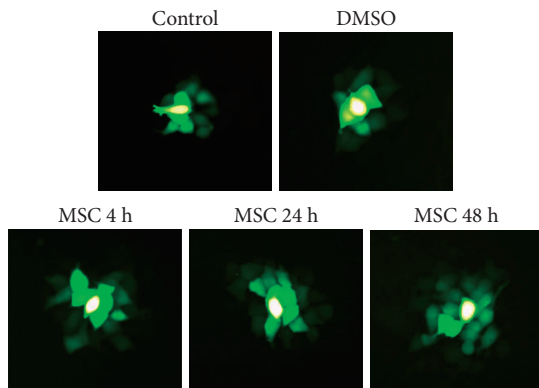


图3 MSC对转染并稳定表达Cx26的HeLa细胞GJ功能的影响

Fig 3 Effect of MSC on GJ function in the HeLa cell line transfected with and steadily expressing Cx26

Representative images of fluorescent dye diffusion from donor cells to adjacent and distant cells in each group. HeLa cells were all induced by Dox (1 μg/mL) for 48 h before the above treatment.

表达水平增加,并且在MSC浓度达到100 nmol/L时效应最强,该浓度增强GJ的效力高于GJ工具药ATRA(表3)。与此同时,以最大效应浓度的MSC处理细胞,24 h和48 h处理组与4 h处理组相比,Cx26蛋白的表达水平差异有统计学意义(表4)。结果提示,MSC增强模型HeLa细胞GJ功能可能与Cx26蛋白表达有关。

### 2.5 GJ对化疗药物细胞毒性的影响

在GJ形成有无的情况下,不同浓度下顺铂和5-氟尿嘧啶的细胞毒性均并无明显差异;相反,Eto的细胞毒性在有GJ形成的高密度接种组大于无GJ形成的低密度接种

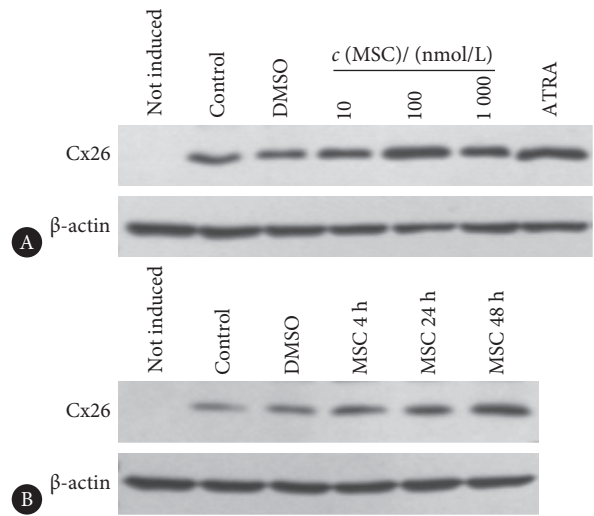


图4 MSC对HeLa细胞Cx26蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of MSC on Cx26 protein expression in HeLa cells

A: Cells were treated with MSC at varying concentrations for 48 h; B: cells were treated with 100 nmol/L MSC for varying periods of time. n=3.

表3 不同浓度MSC作用48 h对HeLa细胞Cx26蛋白表达的影响

Table 3 Effect of MSC treatment for 48 h at different concentrations on Cx26 protein expression in HeLa cells

Group	n	Cx26 protein expression ( $\bar{x} \pm s$ )
Not induced	3	0.12±0.03*
Control	3	0.95±0.05
DMSO	3	1.00
MSC (10 nmol/L)	3	1.38±0.01*
MSC (100 nmol/L)	3	3.11±0.18* <sup>#</sup>
MSC (1 000 nmol/L)	3	2.09±0.41*
ATRA	3	2.41±0.61*

Scanning density normalized to DMSO group. \*P<0.05, vs. DMSO group; <sup>#</sup>P<0.05, vs. MSC (10 nmol/L) group.

表4 100 nmol/L MSC作用不同时间对HeLa细胞Cx26蛋白表达的影响

Table 4 Effect of MSC treatment at 100 nmol/L for different periods of time on Cx26 protein expression in HeLa cells

Group	n	Cx26 protein expression ( $\bar{x} \pm s$ )
Not induced	3	0.12±0.03*
Control	3	0.95±0.05
DMSO	3	1.00
MSC 4 h	3	1.89±0.12*
MSC 24 h	3	2.65±0.19* <sup>#</sup>
MSC 48 h	3	3.11±0.18* <sup>#</sup>

Scanning density normalized to DMSO group. \*P<0.05, vs. DMSO group; <sup>#</sup>P<0.05, vs. MSC 4 h group.

组,尤其在浓度为4 μmol/L时差异有统计学意义(P<0.05)(表5)。

### 2.6 MSC通过GJ增强Eto的细胞毒性

在无GJ形成的HeLa细胞(低密度接种组),MSC与

表5 GJ的形成对转染并稳定表达Cx26的HeLa细胞中化疗药物细胞毒性(细胞集落形成率)的影响

Table 5 Effect of GJ formation on the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in HeLa cells transfected with and steadily expressing Cx26 (surviving fraction)

Cell culture group	Cisplatin		5-Fluorouracil		Etoposide	
	2.5 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	0.25 mmol/L	0.5 mmol/L	2 $\mu\text{mol/L}$	4 $\mu\text{mol/L}$
High-density	0.84 $\pm$ 0.05	0.67 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.11	0.76 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.04
Low-density	0.83 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.02*

All HeLa cells were treated with Dox (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 h to induce the expression of Cx26 protein. \* $P$ <0.05, vs. high-density culture group.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

Eto联合组较单用不同浓度Eto组细胞集落形成率无明显变化。而在表达Cx26并形成同型GJ的HeLa细胞(高密度接种组),与单用不同浓度Eto组相比,MSC与Eto合用时细胞集落形成率明显降低,在1~4  $\mu\text{mol/L}$ 间差异有统计学意义( $P$ <0.05),其中差异在Eto浓度为2  $\mu\text{mol/L}$ 和4  $\mu\text{mol/L}$ 较为显著(图5)。这些结果提示高低密度接种能够影响MSC对Eto细胞毒性的调控。

见表6。无论有无Dox诱导,各剂量的Eto单用或者

联合MSC使用均能抑制细胞集落形成,与MSC组相比,差异均有统计学意义。在无Cx26被Dox诱导表达的情况下,无论Eto是2  $\mu\text{mol/L}$ 还是4  $\mu\text{mol/L}$ ,与单用Eto相比,MSC联合Eto使用不影响Eto对细胞集落形成的抑制作用,相同剂量下,Eto+MSC组与Eto组差异无统计学意义;而在有Cx26蛋白被Dox诱导出特异性表达的情况下,MSC联合Eto对Cx26表达细胞的集落形成抑制率较Eto单药组明显增强( $P$ <0.05),该效应差异在Eto不同浓度组均存在。

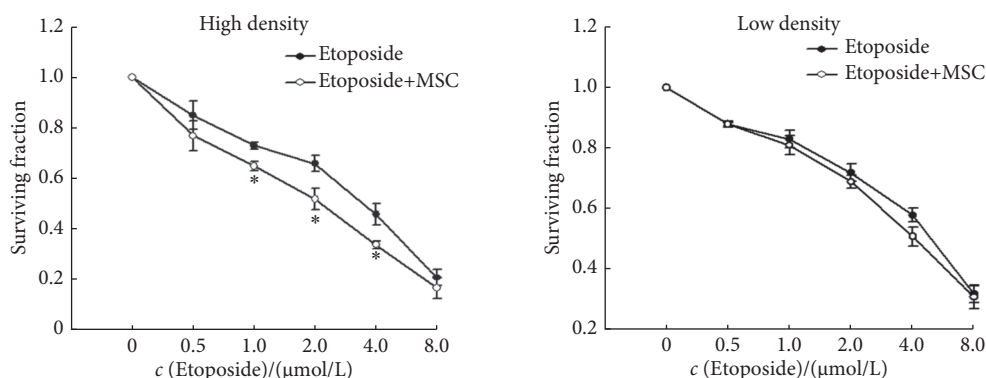


图5 MSC对HeLa细胞中Eto的细胞毒性(细胞集落形成率)的影响

Fig 5 Effect of MSC on the cytotoxicity of etoposide in HeLa cells (surviving fraction)

Effect of MSC (100 nmol/L) in combination with etoposide at different concentrations on the clonogenic survival of cells at either high or low cell density. HeLa cells were treated with Dox (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 h to induce the expression of Cx26 protein. \* $P$ <0.05, vs. Eto single-agent group.  $n=4$ .

表6 有无Dox诱导下MSC对HeLa细胞中Eto细胞毒性(细胞集落形成率)的影响

Table 6 Effect of MSC on the cytotoxicity of etoposide in HeLa cells with or without Dox induction (surviving fraction)

Dox	MSC	Eto 2 $\mu\text{mol/L}$		Eto 4 $\mu\text{mol/L}$		
		Eto	Eto+MSC	Eto	Eto+MSC	
+		0.97 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.03*	0.54 $\pm$ 0.03* <sup>#</sup>	0.47 $\pm$ 0.03*	0.34 $\pm$ 0.03* <sup>#</sup>
-		0.99 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.03*	0.72 $\pm$ 0.01*	0.62 $\pm$ 0.02*	0.63 $\pm$ 0.04*

Dox: doxycycline; MSC: methylselenocysteine; Eto: etoposide. \* $P$ <0.05, vs. MSC group; <sup>#</sup> $P$ <0.05, vs. Eto single-agent group.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

### 3 讨论

硒是一种重要的天然微量元素,作用广泛。诸多研究已经发现硒及硒化物对肿瘤具有治疗潜力<sup>[15-16]</sup>。其中

MSC是一种具有良好药代动力学特性的天然硒化物,具有抑制肿瘤生长、抗血管生成和增强肿瘤内药物递送作用<sup>[17]</sup>。在肺腺癌细胞中MSC与吉西他滨协同作用,能够增强吉西他滨抗肿瘤效果并减少其使用剂量<sup>[18]</sup>。本研究中,标准集落形成结果显示细胞生长密度对细胞毒性的影响是通过GJ产生的,MSC增强GJ功能这一作用介导了其对于Eto细胞毒性的增强作用。这提示MSC可以通过增强肿瘤细胞的GJ功能,进而增强了GJ介导的“旁观者效应”,使死亡信号或者细胞毒性产物通过GJ传递到相邻细胞,放大对肿瘤的杀伤作用<sup>[19]</sup>。但目前对MSC与GJ间的联系仍鲜有报道。

本课题组利用Tet-on HeLa细胞模型的独特之处,即用Dox控制Cx蛋白表达的有无,来特异性探讨药物或化合物对于Cx表达及其组成GJ功能的影响。本课题组前期

研究已经发现, MSC可以增强由Cx26/Cx32组成的异侧GJ功能, 并且与GSH依赖的转录后机制上调Cx蛋白表达有关<sup>[4]</sup>。本研究进一步揭示了MSC对由Cx26组成的同型GJ也有增强作用, 并且从特点上来看, MSC在较短的4 h作用时间内即可达到对Cx26组成的GJ功能效应的有效增强; 另外, MSC增强Cx26组成的同型GJ功能较Cx26/Cx32组成的异侧GJ功能效力更强, 因为一个在纳摩尔级而另一个在微摩尔级发挥作用。在此值得注意的是MSC对GJ功能的增强效应在1 000 nmol/L时稍有下降。究其原因, MSC在体内代谢过程中可产生超氧化物<sup>[20]</sup>; 而Cx蛋白是氧化还原敏感蛋白且具有高周转率和短半衰期的特点<sup>[21]</sup>。因此可以推测, 较高浓度的MSC在体内经代谢后, 可能在一定程度上影响Cx蛋白结构进而影响Cx26蛋白含量和GJ功能。这一点在检测不同浓度MSC对Cx26蛋白表达的实验中也可以得到佐证。综合来看, MSC对于GJ的增强作用可能不具有Cx亚型特殊性, 其有望成为继人参皂苷<sup>[22]</sup>、类胡萝卜素<sup>[23]</sup>、白藜芦醇<sup>[24]</sup>等之后的新型植物来源的GJ增强剂。

为探究由Cx26组成的同型GJ对化疗药物抗肿瘤作用的影响, 本研究选取了三种作用机制不同的临床常用化疗药进行研究。本研究中标准细胞集落形成分析结果显示, Cx26组成的GJ存在时增强了Eto的细胞毒性, 但并未对顺铂及5-氟尿嘧啶的抗肿瘤作用产生明显影响。这一结果提示, Cx26组成的GJ可以调节Eto的细胞毒性, 与本课题组既往在研究异侧Cx26/Cx32组成的GJ与Eto相关性时的结果相似<sup>[4]</sup>。笔者推测这一结果除了可能与化疗药物的作用机制不同有关外, 还可能与Cx26在细胞周期cAMP再分布中发挥的独特作用有关。cAMP/PKA信号通路的激活可能与肿瘤的发生有关<sup>[25]</sup>。Cx26特异性地允许cAMP在细胞间传递, 消除了细胞周期不同阶段间cAMP的差异, 导致G2/M期的抑制和G1期的停滞<sup>[26]</sup>, 与Eto产生协同作用。此外, 本研究中联合用药上使用的Eto浓度最高为4  $\mu\text{mol/L}$  (约2.35 mg/L), 低于Eto体内用药峰值血浆质量浓度3 ~ 5 mg/L<sup>[27]</sup>, 避免了该药更大的化疗毒性, 使其在临床的应用上具有更好的可行性。

综上所述, 由Cx26组成的同型GJ能够显著增强Eto的细胞毒性, MSC通过增加该GJ通道功能进而在Eto抗肿瘤效应上发挥增敏作用。结合本课题组的系列研究所发现的MSC对不同Cx及由其组成GJ功能的作用, MSC有望成为新型植物来源的GJ增强剂。由此, 硒联合化疗药物的增效策略在肿瘤治疗领域可能有着较好的应用前景, 尤其是基于硒类化合物上调GJ功能的药物诱导法将是一个具有高度临床实用性的途径和策略。

\* \* \*

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] NALEWAJSKA M, MARCHELEK-MYSLIWIEC M, OPARA-BAJEROWICZ M, *et al.* Connexins-therapeutic targets in cancers. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9119. doi: 10.3390/ijms21239119.
- [2] MULKEARNS-HUBERT E E, REIZES O, LATHIA J D. Connexins in cancer: Jekyll or Hyde? *Biomolecules*, 2020, 10(12): 1654. doi: 10.3390/biom10121654.
- [3] NOGUEIRA C W, BARBOSA N V, ROCHA J B T. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. *Arch Toxicol*, 2021, 95(4): 1179–1226. doi: 10.1007/s00204-021-03003-5.
- [4] ZHOU X, LI M, CHENG Q, *et al.* Methylselenocysteine potentiates etoposide-induced cytotoxicity by enhancing gap junction activity. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45(4): 467. doi: 10.1248/bpb.b21-00893.
- [5] BECKMANN A, HAINZ N, TSCHERNIG T, *et al.* Facets of communication: gap junction ultrastructure and function in cancer stem cells and tumor cells. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3): 288. doi: 10.3390/cancers11030288.
- [6] GRAHAM S V, JIANG J X, MESNIL M. Connexins and pannexins: important players in tumorigenesis, metastasis and potential therapeutics. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1645. doi: 10.3390/ijms19061645.
- [7] ARORA S, HEYZA J R, CHALFIN E C, *et al.* Gap junction intercellular communication positively regulates cisplatin toxicity by inducing DNA damage through bystander signaling. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(10): 368. doi: 10.3390/cancers10100368.
- [8] WU J I, WANG L H. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 8. doi: 10.1186/s12929-019-0497-x.
- [9] GARCIA-RODRIGUEZ L, PEREZ-TORRAS S, CARRIO M, *et al.* Connexin-26 is a key factor mediating gemcitabine bystander effect. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(3): 505–517. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0693.
- [10] YANG J, QIN G, LUO M, *et al.* Reciprocal positive regulation between Cx26 and PI3K/Akt pathway confers acquired gefitinib resistance in NSCLC cells via GJIC-independent induction of EMT. *Cell Death Dis*, 2015, 6(7): e1829. doi: 10.1038/cddis.2015.197.
- [11] GRAEBER S H, HULSER D F. Connexin transfection induces invasive properties in HeLa cells. *Exp Cell Res*, 1998, 243(1): 142–149. doi: 10.1006/excr.1998.4130.
- [12] KOREEN I V, ELSAYED W A, LIU Y J, *et al.* Tetracycline-regulated expression enables purification and functional analysis of recombinant connexin channels from mammalian cells. *Biochem J*, 2004, 383(Pt1): 111–119. doi: 10.1042/BJ20040806.
- [13] 杨燕, 吴穷, 郑荣生, 等. CX26/CX32缝隙连接蛋白的Tet-on HeLa细胞模型的建立及鉴定. *基础医学与临床*, 2013, 33(9): 1079–1084. doi: 10.16352/j.issn.1001-6325.2013.09.031.
- [14] AASEN T, LEITHE E, GRAHAM S V, *et al.* Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene*, 2019, 38(23): 4429–4451. doi: 10.1038/s41388-019-0741-6.

- [15] RAZAGHI A, POOREBRAHIM M, SARHAN D, *et al.* Selenium stimulates the antitumour immunity: insights to future research. *Eur J Cancer*, 2021, 155: 256–267. doi: 10.1016/j.ejca.2021.07.013.
- [16] ALI W, BENEDETTI R, HANDZLIK J, *et al.* The innovative potential of selenium-containing agents for fighting cancer and viral infections. *Drug Discov Today*, 2021, 26(1): 256–263. doi: 10.1016/j.drudis.2020.10.014.
- [17] TAN H W, MO H Y, LAU A T Y, *et al.* Selenium species: current status and potentials in cancer prevention and therapy. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): 75. doi: 10.3390/ijms20010075.
- [18] BEHERA C, SANDHA K K, BANJARE N, *et al.* Implication of methylselenocysteine in combination chemotherapy with gemcitabine for improved anticancer efficacy. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 176: 106238. doi: 10.1016/j.ejps.2022.106238.
- [19] JINDAL S, CHOCKALINGAM S, GHOSH S S, *et al.* Connexin and gap junctions: perspectives from biology to nanotechnology based therapeutics. *Transl Res*, 2021, 235: 144–167. doi: 10.1016/j.trsl.2021.02.008.
- [20] KIM S J, CHOI M C, PARK J M, *et al.* Antitumor effects of selenium. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11844. doi: 10.3390/ijms222111844.
- [21] MARTINS-MARQUES T, RIBEIRO-RODRIGUES T, BATISTA-ALMEIDA D, *et al.* Biological functions of connexin43 beyond intercellular communication. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(10): 835–847. doi: 10.1016/j.tcb.2019.07.001.
- [22] LIU H, YANG J, YANG W, *et al.* Focus on notoginsenoside R1 in metabolism and prevention against human diseases. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 551–565. doi: 10.2147/DDDT.S240511.
- [23] SAINI R K, KEUM Y S, DAGLIA M, *et al.* Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: a review of emerging evidence. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104830. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104830.
- [24] CHEN Y, LI H, ZHANG G, *et al.* Synergistic inhibitory effect of resveratrol and TK/GCV therapy on melanoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(6): 1489–1499. doi: 10.1007/s00432-020-03203-z.
- [25] 刘明心, 谢雪梅, 李强, 等. 慢性应激与肿瘤的发生与演进. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(1): 39–44. doi: 10.12182/20210160203.
- [26] CHEN C X, LUO K J, YANG J P, *et al.* Connexins and cAMP cross-talk in cancer progression and metastasis. *Cancers (Basel)*, 2020, 13(1): 58. doi: 10.3390/cancers13010058.
- [27] TOFFOLI G, CORONA G, BASSO B, *et al.* Pharmacokinetic optimisation of treatment with oral etoposide. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43(7): 441–466. doi: 10.2165/00003088-200443070-00002.

(2022-09-07收稿, 2023-02-28修回)

编辑 吕熙



## 本刊征稿启事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是由教育部主管、四川大学主办的综合性医药类学术刊物,以报道医学相关学科的科研成果为主。主要阅读对象为从事医药卫生工作的科研人员及高等医药院校的师生。2021年起,本刊设有专家笔谈、专家共识、指南解读、医学教育、论著、临床研究及新技术新方法等栏目。

创刊以来,本刊曾荣获各级部门颁发的数次荣誉称号,如全国优秀科技期刊一等奖、国家期刊奖提名奖、国家期刊奖百种重点期刊奖、教育部中国高校精品科技期刊、中国国际影响力优秀学术期刊、中国高校编辑出版质量优秀科技期刊、中国高校百佳科技期刊等。现已被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国科学引文数据库(CSCD)(核心版)、北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》、中国学术期刊网全文数据库(CNKI)、美国《医学索引》(IM/Medline)、美国生物医学全文数据库PubMed Central(PMC)、美国《生物学文摘》(BA)、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《文摘与引文数据库》(Scopus)、日本科学技术振兴机构数据库(JST)等检索系统收录。

凡属于国家重点研发计划、国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿或具有创新性、实用性等的来稿,编辑部将优先发表。欢迎积极投稿!

本刊在线投稿网址: <https://ykxb.scu.edu.cn>

地址: 四川省成都市人民南路三段17号《四川大学学报(医学版)》编辑部

邮政编码: 610041

联系电话: (028)85501320, (028)85500106

E-mail: [scuxbyxb@scu.edu.cn](mailto:scuxbyxb@scu.edu.cn)

《四川大学学报(医学版)》编辑部