论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1366-04

索拉菲尼诱导的肝癌耐药细胞株的建立及其生物学特性

姚 超[1],朱传琳[2],何 倩[1],李 果[3],夏 锋[3],钱 程[1,2] (310018 杭州,浙江理工大学生命科学学院新元医药研究所[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院:全军病理科[2],全军肝胆外科研究所[3])

[摘要] **目的** 建立索拉菲尼诱导的PLC/PRF/5和Huh7耐药细胞株,并研究其耐药细胞的生物学特性。**方法** 通过药物敏感性实验CCK8法测定索拉菲尼的半数抑制浓度IC_{50}值;采用体外间歇诱导法,使用PLC/PRF/5和Huh7各自IC_{50}值作为筛选浓度,建立索拉菲尼诱导的耐药细胞株模型;Real time-PCR检测5种耐药基因(GST-π、LRP、MDR1、MRP、Topo Ⅱ)在耐药组和对照组中的表达差异;Western blot检测MAPK信号通路中关键信号因子细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)ERK1/2在不同组别细胞中的磷酸化水平差异。**结果** 所筛选的PLC/PRF/5和Huh7耐药组细胞与对照组细胞相比较,其细胞生存率有显著性提高($P<0.05$);5种耐药基因中MDR1的表达有显著性上调($P<0.05$);索拉菲尼作用靶点的下游信号因子ERK1/2的磷酸化水平上调。**结论** 成功地在体外建立索拉菲尼诱导的PLC/PRF/5和Huh7耐药细胞株,其耐药机制可能与ERK1/2的磷酸化水平上调导致耐药基因MDR1高表达有关。

[关键词] 索拉菲尼; 肿瘤,抗药性; 肝细胞癌
[中图法分类号] R73-354;R730.23;R735.7 [文献标志码] A

Establishment and biological characteristics of sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cell lines

Yao Chao[1], Zhu Chuanlin[2], He Qian[1], Li Guo[3], Xia Feng[3], Qian Cheng[1,2] ([1]Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-tech University, Hangzhou, Zhejiang Province, 310018; [2]Institute of Pathology, [3]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To establish sorafenib-indeuced drug resistant hepatoma cell lines and investigate their biological characteristics. Methods CCK8 assay was used for drug sensitivity of hepatocellular carcinoma cell lines PLC/PRF/5 and Huh7 to sorafenib. By using intermittent induction *in vitro* and the obtained IC_{50} value as a screening concentration, we screened and established drug resistant cell lines. Expression of drug resistant genes, GST-π, LRP, MDR1, MRP and Topo Ⅱ, were examined by real time-PCR. Western blot analysis was applied to examine the phosphorylation level of extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2). Results Sorafenib-resistant PLC/PRF/5 and Huh7 cells had a longer survival rate compared with corresponding control cells ($P<0.05$). MDR1 was the only one from the 5 resistance genes who had significantly increased expression ($P<0.05$). Furthermore, sorafenib was found to induce the phosphorylation of ERK1/2. Conclusion Sorafenib resistant hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and Huh7 are successfully established. The underlying mechanism may be associated with sorafenib-induced ERK1/2 activation that leads to high expression of drug resistant gene MDR1.

[**Key words**] sorafenib; drug resistance, neoplasm; carcinoma, hepatocellular

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2004CB518804). Corresponding author: Qian Cheng, E-mail: cqian3184@yahoo.com.cn

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的发病机制是具有复杂性的,其癌细胞的发生、发展以及癌细胞的转移与细胞内的各种细胞信号传导通路以及生长因子等是密切相关的,其中细胞信号传导通路中存在的多个关键性基因或是信号分子,正是分子靶向治疗的重要潜在作用靶点[1]。然而,分子靶向治疗依然存在一些问题,需要探究[2]。索拉菲尼(sorafenib)是一种双芳基尿素类口服多激酶抑制剂,是目前世界上第一个被批准应用于临床的一个多靶点的分子靶向治疗药物。该化合物能够特异性阻断丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)信号通路[3]。文献[4]报道,通过调节肿瘤细胞中MAPK信号通路中重要激酶的表达有可能会致使肿瘤细胞的凋

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2004CB518804)
[通信作者] 钱 程,E-mail:cqian3184@yahoo.com.cn

亡同时有逆转肿瘤耐药的作用。即索拉菲尼可以克服以往化疗药物的耐药作用,但是临床上发现索拉菲尼对癌症患者的有效治愈率是十分有限的,其中的原因仍未探明。因此本研究采用间歇诱导法,体外使肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh7 在索拉菲尼的作用下诱导建立一种分子靶向药物的耐药模型,并且初步研究其耐药细胞的生物学特性与耐药机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

索拉菲尼[N-(3-三氟甲基-4-氯苯基)-N-(4-(2-全军甲基氨基甲酰嘧啶)苯氧基)尿素]由第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所赠予。先将索拉菲尼溶于100% DMSO(Sigma, St. Louis, MO),再用 DMEM 培养基稀释至所需浓度;人肝细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh7 由本实验室保存;DMEM、胎牛血清、胰酶及相关培养试剂购自 Gibco 公司;Cell Counting Kit-8 试剂盒(CCK-8 试剂盒)购自江苏碧云天生物技术研究所;用于 Western blot 实验的抗体购自 Millipore 公司。其他设备 BBG16uV151L 二氧化碳培养箱,IX71-22FL/PH 荧光倒置显微镜,酶标仪 TECAN DNA export 分别购自 Thermo, Olympus 和 Tecan 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh7 培养于10%胎牛血清的 DMEM(含青链霉素)中,在 37 ℃、5% CO_2 浓度的培养箱中孵育,待细胞成长度达到70% ~80%进行胰酶消化传代。本实验所用细胞为生长对数期长势良好的细胞。

1.2.2 CCK8 法检测索拉菲尼的 IC_{50} 值 取生长良好的对数期细胞按每孔 3×10^3 细胞 100 μl 接种于96孔板培养。实验组加入不同浓度的索拉菲尼,每次处理3个复孔,另设不加索拉菲尼的对照组以及不加细胞的空白组。37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,适时换液,待细胞覆盖率达到75%时加入药物索拉菲尼。加药后48 h换液,再分别每孔加入 CCK8 试剂(5 mg/ml)置于37 ℃,5% CO_2 培养箱内继续培养1 h后,酶联免疫分析仪检测490 nm处光密度值。按以下公式计算在索拉菲尼的作用下,肿瘤细胞的生存率。细胞生存率=[加药组 D(490)值-空白组 D(490)值]/[对照组 D(490)值-空白组 D(490)值],并计算出其 IC_{50} 值。

1.2.3 PLC/PRF/5 和 Huh7 耐药细胞株的建立 采用药物间歇诱导法筛选耐药细胞株。取对数生长期 PLC/PRF/5 和 Huh7 细胞接种至含索拉菲尼10% FBS 的 DMEM 培养液中,以 PLC/PRF/5 与 Huh7 各自的 IC_{50} 值药物浓度 8.71 μmol/L 和 10.90 μmol/L 作为筛选浓度,作用72 h后弃去含药培养液,加入新鲜的 DMEM 培养液,继续培养72 h后用 PBS 洗3遍,复用索拉菲尼处理72 h,弃去含药培养液,获得对索拉菲尼具有耐药性的细胞株,并将其维持培养在含索拉菲尼的完全培养液中。药物敏感性实验检测耐药组细胞与对照组细胞的生存率差异。

1.2.4 Real time-PCR 检测耐药相关基因的表达 RNA 提取和逆转录反应:将筛选的耐药细胞与对照组细胞分别培养于不同的培养皿中,倒弃培养液,用 PBS 洗3遍后,每孔加1 ml Trizol 试剂提取细胞总 RNA;紫外分光光度计检测 RNA 质量和浓度。在反应体积为20 μl 的逆转录管中42 ℃温育60 min,95 ℃ 5 min,终止反应。SYBR-Green 实时荧光定量 PCR 检测:5×SYBR Green buffer 10 μl、5.0 μl cDNA 模板、2.5 μl dNTPs、2.5 μl $MgCl_2$,引物各1 μl,*Taq* 聚合酶2 μl,用 ddH_2O 补足反应体系至25 μl。反应条件为:93 ℃ 2 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共40个循环,最终是72 ℃ 7 min 延伸。反应在实时检测扩增仪上进行。制作标准曲线。

1.2.5 Western blot 分析耐药的分子机制 用 Western blot 法观察细胞内 MAPK 信号通路中 ERK1/2 基因磷酸化水平的表达情况。耐药组为用索拉菲尼药物筛选的耐药细胞,与之对应的敏感组细胞为在加入索拉菲尼后,会逐渐变圆漂浮于培液中,收集培液离心以获取细胞。对照组为不加药物处理组。耐药细胞与对照细胞倒弃培养液,PBS 洗涤3次,分别加入100 μl 蛋白裂解液,将细胞裂解物进行 BCA 定量后使用。每孔加入20 μl 目的蛋白样品,SDS-PAGE 电泳后湿转法转移到 PVDF 膜上。BSA 孵育封闭2 h,加入一抗孵育过夜,TBST 洗涤3次,加入对应的含荧光标记的二抗孵育2 h,TBST 洗涤后进行显影拍照。

1.3 统计学处理

所有定量实验重复进行3次。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 索拉菲尼的 IC_{50} 值测定

如图1所示,随着药物浓度的增加,PLC/PRF/5 和 Huh7 的细胞生存率随之降低。计算得出在48 h内索拉菲尼对 PLC/PRF/5 的 IC_{50} 值为(8.71±0.03) μmol/L, Huh7 的 IC_{50} 值为(10.90±0.04) μmol/L。

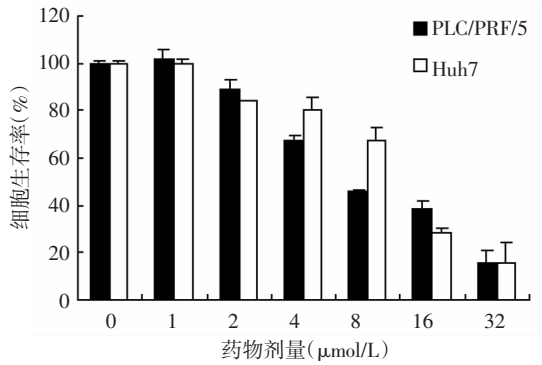
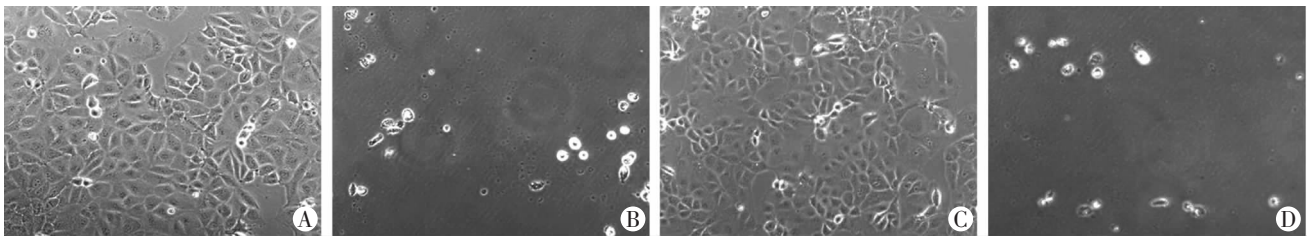


图1 CCK8 法检测索拉菲尼对 PLC/PRF/5 以及 Huh7 细胞增殖抑制作用

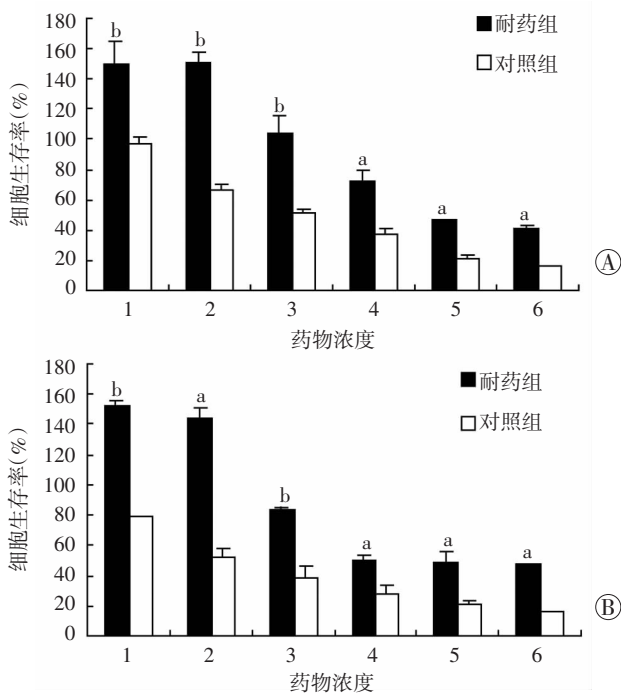
2.2 PLC/PRF/5 和 Huh7 耐药细胞株的建立

在筛选9 d后,利用普通倒置显微镜观察 PLC/PRF/5 和 Huh7 耐药细胞的形态学变化,并对对照组细胞和耐药组细胞进行拍照记录(图2)。在不同的药物浓度点(1、2、4、8、16、32 μmol/L),耐药组的细胞生存率较对照组差异均具有统计学意义($P<0.05$,图3),实验结果表明诱导的 PLC/PRF/5 和 Huh7 耐药细胞株均对索拉菲尼具有耐药性。



A:肝癌细胞系 PLC/PRF/5 对照组;B:肝癌细胞系 PLC/PRF/5 耐药组;C:肝癌细胞系 Huh7 对照组;D:肝癌细胞系 Huh7 耐药组

图2 倒置显微镜观察 PLC/PRF/5 和 Huh7 耐药细胞的形态学变化 (×100)

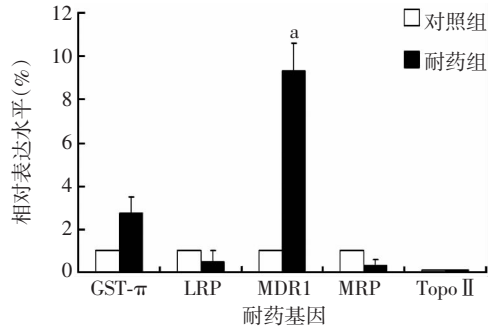


A:肝癌细胞系 PLC/PRF/5;B:肝癌细胞系 Huh7; 1~6:药物浓度分别为 1、2、4、8、16、32 μmol/L a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图3 PLC/PRF/5 和 Huh7 耐药细胞与对照细胞的药物敏感性差异

2.3 Real time-PCR 检测耐药相关基因的表达

从图4中可以看出与对照组细胞相比,耐药细胞中的耐药基因 MDR1 高表达,上调表达倍数为9.3倍,具有显著性差异($P<0.05$)。说明耐药性的出现与 MDR1 基因高表达有关。

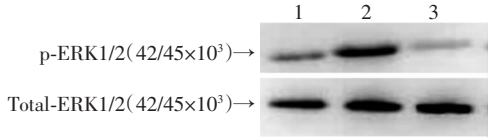


a:$P<0.05$,与对照组比较

图4 Real time-PCR 检测耐药基因的表达

2.4 Western blot 分析耐药的分子机制

本实验观察到与对照组细胞比较,敏感组细胞中 ERK1/2 的磷酸化水平是被抑制的,然而在耐药组细胞中 ERK1/2 的磷酸化水平是升高的。



1:对照组;2:耐药组;3:敏感组

图5 Western blot 检测耐药细胞中 ERK1/2 基因的磷酸化水平

3 讨论

肝癌细胞多药耐药的发生机制有以下几种情况:①多药耐药基因(multidrug resistance,MDR1),MDR1 基因编码 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达量的上调可将细胞内药物泵出胞外[5]。此外,P-gp 还可通过抑制肿瘤细胞凋亡通路的活化而诱导其对化疗药物产生耐受。②多药耐药相关蛋白基因(multidrug resistance protein, MRP), MRP 属 ABC 转运蛋白(ATP binding cassette,ABC)超家族成员之一。MRP 基因所编码的蛋白可以参与细胞内的囊泡运输从而使细胞内药物重新分布,进而导致核酶等重要靶点的药物作用量减少[6]。③谷胱苷肽转移酶(glatathion-s-transferase, GST),GST-π 是 GST 家族中的一员,其功能是能够提高化疗药物向细胞外的外流从而导致化疗药物在肿瘤细胞中作用浓度的降低[7]。④肺耐药相关蛋白(lung resistance protein, LRP),其作用机制在于可以抑制以细胞核为靶点的药物通过核孔到达细胞核内,即进入了细胞核内也会很快被 LRP 转运排出。⑤拓扑异构酶Ⅱ(topoisomerase Ⅱ, Topo Ⅱ),Topo Ⅱ是拓扑异构酶中的一种。癌细胞内拓扑异构酶的减少导致化疗药物靶点与 DNA 不易形成复合物进而使癌细胞对药物的敏感性随之降低[8]。本研究在用分子靶向治疗药物索拉菲尼体外筛选肝癌的耐药细胞后,发现

肿瘤细胞群体中存在对索拉菲尼不敏感的耐药细胞，所以检测 PLC/PRF/5 和 Huh7 耐药细胞中的耐药相关基因 GST-π、LRP、MDR1、MRP 以及 Topo Ⅱ的表达，发现 MDR1 有显著的高表达，而这种高表达又是与 MAPK 信号通路中 ERK1/2 的磷酸化水平呈正相关。

目前，大多数研究认为 ERK1/2 的激活参与了肿瘤多药耐药的发生，Katayama 等[9]以及 Chen 等[10]通过研究证实，乳腺癌细胞和胃癌细胞在受到化疗药物作用时，可能通过 MAPK 信号通路中的 ERK1/2 作用于 MDR1，产生耐药。MAPK 信号通路的级联反应顺序[11-13]：Ras→Raf→MEK→ERK 受体酪氨酸激酶被一些生长因子激活，然后激活 Ras 蛋白与 Raf 激酶相结合，形成一个膜锚定信号，接着活化的 Raf 激酶磷酸化一个双重特异性激酶 MEK，随即 MEK 将 ERK1/2 磷酸化使其活化，ERK1/2 接受上游的级联反应信号，转位进入细胞核，从而促进细胞的增殖。分子靶向药物索拉菲尼作用机制是抑制 Raf 激酶以及受体酪氨酸激酶 VEGFR-2 和 PDGFR[14]。即在耐药细胞中，索拉菲尼作用癌细胞时，它的作用靶点 Raf 的下游 ERK1/2 磷酸化水平上调了，磷酸化的 ERK1/2 又导致了多药耐药的发生。细胞的增殖、凋亡、分化和转化是受多信号通路调控的复杂过程，在 Villanueva 等[15]的研究中，信号通路的抑制剂在抑制一个信号通路时，细胞的调控机制有可能激活另外一个信号通路的进行，从而使细胞存活下来。在本研究中对索拉菲尼敏感的细胞中 ERK1/2 磷酸化水平被抑制，然而耐药的细胞群体中 ERK1/2 的磷酸化水平是上调的，是否是耐药的细胞中与 MAPK 信号通路并行的其他信号通路的激活尚需进一步研究。

参考文献：

[1] Connock M, Round J, Bayliss S, *et al*. Sorafenib for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma [J]. Health Technol Assess, 2010, 14(Suppl 1): 17-21.

[2] 陈正堂，孙建国. 肿瘤分子靶向治疗临床应用值得注意的几个问题[J]. 第三军医大学学报，2011，33(1)：1-3.

[3] Kim H, Lim H Y. Novel EGFR-TK inhibitor EKB-569 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by AKT and MAPK pathways[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(12): 1563-1568.

[4] Holt S V, Logie A, Davies B R, *et al*. Enhanced apoptosis and tumor growth suppression elicited by combination of MEK (selumetinib) and mTOR kinase inhibitors (AZD8055)[J]. Cancer Res, 2012, 72(7): 1804-1813.

[5] Li X, Zhao Y, Ji M, *et al*. Induction of actin disruption and downreg lation of P-glycoprotein expression by solamargine in mltidrug-resistant K562/A02 cells[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(13): 2038-2044.

[6] Chen X P, Wang Q, Guan J, *et al*. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(21): 3332-3337.

[7] Wang J H, Du J P, Li S J, *et al*. Octarepeat peptides of prion are essential for multidrug resistance in gastric cancer cells[J]. J Dig Dis, 2012, 13(3): 143-152.

[8] Turner J G, Dawson J, Sullivan D M. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(8): 1021-1032.

[9] Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, *et al*. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(7): 2092-2102.

[10] Chen B, Jin F, Lu P, *et al*. Effect of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway on multidrug resistance induced by vincristine in gastric cancer cell line MGC803[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(6): 795-799.

[11] Zhu C, Qi X, Chen Y, *et al*. PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(11): 1587-1594.

[12] Cuadrado A, Nebreda A R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling[J]. Biochem J, 2010, 429(3): 403-417.

[13] Mulholland D J, Kobayashi N, Ruscetti M, *et al*. Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells[J]. Cancer Res, 2012, 72(7): 1878-1889.

[14] Zhao Y, Yang M, Qi X, *et al*. Drug-related adverse events may predict efficacy in sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, [Epub ahead of print].

[15] Villanueva J, Vultur A, Lee J T, *et al*. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K[J]. Cancer Cell, 2010, 18(6): 683-695.

（**收稿**：2012-01-09；**修回**：2012-03-01）

（编辑　汪勤俭）