DOI:10.16016/j.2097-0927.202402065

EP 联合方案耐药小细胞肺癌细胞株的构建及机制探讨

刘明菩[1,2],王红梅[1,2,3],伍元丽[1,2],周端方[1,2,4],周维英[1,2] 400016 重庆,重庆医科大学:药学院药理学系[1],药物代谢研究重庆市重点实验室[2],附属第一医院药学部[3];401147 重庆,重庆市妇幼保健院药学部[4]

[摘要] **目的** 构建依托泊苷(etoposide,VP-16)联合顺铂(cisplatin,DDP)化疗方案(EP 联合方案)耐药的小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)细胞株 H446/EP,并进行耐药特性鉴定及机制探讨。**方法** 以药物浓度递增法,使用 VP-16 联合 DDP 处理 NCI-H446 细胞构建 H446/EP 细胞株。以 H446/EP 与 NCI-H446 细胞为研究对象,MTT 法检测细胞活力,计算 H446/EP 细胞耐药指数(resistance index,RI);细胞克隆实验、Incucyte 细胞增殖(无标记)法检测细胞增殖能力;转录组学测序后,对 2 种细胞差异表达基因进行富集分析;Western blot 检测细胞耐药、DNA 损伤修复(repair of DNA damage,DDR)、自噬标志分子的蛋白表达量。**结果** MTT 结果显示,H446/EP 细胞对 VP-16、DDP 与 DOX 的 RI 分别为 6.14、3.43 与 1.96;细胞克隆实验与 Incucyte 细胞增殖(无标记)法结果显示,H446/EP 细胞增殖能力显著高于 NCI-H446 细胞($P<0.01$);转录组学测序、通路富集分析显示差异表达基因在肿瘤化疗耐药、DDR、自噬相关通路富集;Western blot 结果显示,相比 NCI-H446 细胞,H446/EP 细胞 MRP1、BCRP、RAD51、γ-H2AX 及 LC3-II/LC3-I 蛋白表达量显著升高,p62 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。**结论** EP 联合方案耐药的 SCLC 细胞株 H446/EP 构建成功,增殖能力增强;细胞外排转运蛋白表达量增加、DDR 及自噬水平升高可能是 SCLC 对 EP 联合方案产生耐药的机制。

[关键词] 小细胞肺癌;多药耐药;顺铂;依托泊苷

[中图法分类号] R734.2; R915; R979.1 [文献标志码] A

Construction and mechanism of a small cell lung cancer cell line resistant to EP chemotherapy scheme

LIU Mingpu[1,2], WANG Hongmei[1,2,3], WU Yuanli[1,2], ZHOU Duanfang[1,2,4], ZHOU Weiying[1,2] [1]Faculty of Pharmacology, College of Pharmacy, [2]Chongqing Key Laboratory for Drug Metabolism, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [4]Department of Pharmacy, Chongqing Women and Children's Hospital, Chongqing, 401147, China

[**Abstract**] **Objective** To construct the etoposide (VP-16) combined with cisplatin (DDP) chemotherapy scheme (EP chemotherapy scheme) resistant small cell lung cancer (SCLC) cell line H446/EP and to identify the drug resistance characteristics and explore the mechanism. **Methods** NCI-H446 cells were treated with increasing concentrations of VP-16 and DDP to construct an H446/EP cell line. H446/EP and NCI-H446 cells were used as the research objects. The cell viability was detected by MTT assay, and the resistance index (RI) of H446/EP cells was calculated. Cell cloning assay and Incucyte cell proliferation (label-free) assay were used to detect cell proliferation ability. Transcriptome sequencing was performed to analyze the enrichment of differentially expressed genes (DEGs) in the 2 cell lines. Western blotting was

[基金项目] 国家自然科学基金(82373901);重庆市自然科学基金创新发展联合基金(2022NSCQ-LZX0068);重庆市高校创新研究群体项目(CXQT20012)

[通信作者] 周维英,E-mail: wyzhou0118@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

applied to detect the protein expression levels of drug resistance, DNA damage repair (DDR), and autophagy markers. **Results** MTT assay showed that the resistance index (RI) of H446/EP cells to VP-16, DDP, and DOX were 6.14, 3.43, and 1.96, respectively. The results of cell cloning assay and Incucyte cell proliferation assay indicated that the proliferation ability was significantly higher in the H446/EP cells than the NCI-H446 cells ($P<0.01$). Transcriptome sequencing and pathway enrichment analysis displayed that the DEGs between H446/EP and NCI-H446 cells were enriched in tumor chemoresistance, DDR, and autophagy pathways. Western blot results showed the expression levels of MRP1, BCRP, RAD51, γ-H2AX, and LC3-II/LC3-I were significantly increased, and that of p62 was obviously decreased in the H446/EP cells when compared with the NCI-H446 cells ($P<0.05$). **Conclusion** An EP chemotherapy-resistant H446/EP cell line is successfully constructed. Stronger proliferation ability, increased expression of efflux transporters, and enhanced DDR and autophagy may be the mechanisms of the resistance of SCLC to EP chemotherapy scheme.

[**Key words**] small cell lung cancer; multidrug resistance; etoposide; cisplatin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82373901), the Innovation and Development Joint Fund Chongqing Natural Science Foundation (2022NSCQ-LZX0068), and the Innovation Research Group Project in Colleges and Universities Program of Chongqing Education Commission (CXQT20012).
Corresponding author: ZHOU Weiying, E-mail: wyzhou0118@cqmu.edu.cn

肺癌在全球恶性肿瘤中的致死率居首位,且在2022年中国恶性肿瘤中,肺癌的发病率和死亡率均为第一[1-2]。小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)占肺癌的15%,其预后差,SCLC局限期患者的中位总生存期(overall survival,OS)为17个月,广泛期患者仅为10~12个月[3-4]。拓扑异构酶抑制剂联合铂类化合物的双药化疗方案是SCLC患者的一线化疗方案,如依托泊苷(etoposide,VP-16)联合顺铂(cisplatin,DDP)的化疗方案(EP联合方案)[1];但几乎所有SCLC广泛期患者在完成治疗后几个月内都会复发并产生化疗耐药[5-6],SCLC患者对其耐药的机制尚未阐明。

临床肿瘤化疗方案以多药联合化疗为主,SCLC一线化疗方案即为多药联合化疗。而当前肿瘤化疗耐药机制的报道多为肿瘤对单个药物耐药的机制研究[7-8],并不足以反映临床化疗耐药的实际情况,因此基于SCLC EP联合方案多药耐药机制的研究十分必要。

肿瘤耐药细胞株的构建是诱导肿瘤细胞对特定药物产生耐药性的过程,肿瘤细胞产生耐药性后,化疗药物对其药效大幅度下降。体外构建肿瘤耐药细胞株,模拟临床肿瘤化疗过程中的获得性耐药是研究化疗多药耐药机制的前提,可以为攻克临床肿瘤化疗耐药奠定基础[9]。药物浓度递增法是常用的肿瘤耐药细胞株构建方法[10],该方法中使用化疗药物的剂量循序增大,细胞培养环境逐渐改变,使得肿瘤细胞可以对化疗药物逐步产生耐受,模拟临床化疗过程中肿瘤逐步对化疗药物产生耐药性的过程,构建成的耐药细胞状态较好,但该方法的缺点是诱导过程耗时长。

本研究根据SCLC一线EP联合方案,联合使用VP-16与DDP,以药物浓度递增法历时13个月构建成EP联合方案耐药的SCLC细胞株H446/EP,并通过转录组学测序寻找可能与SCLC耐药有关的基因,初步探讨其耐药机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞 NCI-H446细胞购自ACTT细胞库。

1.1.2 主要试剂 顺铂(cisplatin,DDP),规格:100 mg,CAS号:15663-27-1,批号:115583;依托泊苷(etoposide,VP-16),规格:200 mg,CAS号:33419-42-0,批号:113741;多柔比星(doxorubicin,DOX),规格:50 mg,CAS号:25316-40-9,批号:156516,以上药物均购自美国MedChemExpress公司;RPMI Medium 1640 basic培养基购自Gibco公司;FBS血清购自武汉Procell公司;MTT购自碧云天生物技术有限公司;PBS、TBS均购自Biosharp公司;封闭专用脱脂奶粉购自北京普利莱基因技术有限公司;快速凝胶制备试剂盒购自上海雅酶生物医药公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;β-actin(鼠抗,货号:4790)、MRP1/ABCC1(MRP1,兔抗,货号:72202)、ABCG2(BCRP,兔抗,货号:42078)、RAD51(兔抗,货号:8875)、SQSTM1/p62(p62,兔抗,货号:5114)、LC3A/B(LC3,兔抗,货号:12741)单克隆抗体均购自美国Cell Signaling Technology;Anti-gama H2A.X抗体(γ-H2AX,兔抗,货号:ab81299)购自美国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(货号:ZB-2301)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(货号:ZB-2305)均购自中国中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NCI-H446及H446/EP细胞常规培养于含10% FBS的RPMI Medium 1640 basic完全培养基中,在37 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中进行培养。

1.2.2 药物浓度递增法构建H446/EP细胞株 采用浓度递增的VP-16、DDP构建耐药细胞株(两药浓度梯度依次均为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 μmol/L):在培养瓶中稳定培养NCI-H446细胞,当传至第3代,待细胞密度达到80%,使用终浓度0.2 μmol/L的VP-16联合DDP处理细胞24 h,后按1∶2比例正常传代,使用不含药完全培养基进行培养。待细胞再次生长至80%,使用下一个更高梯度浓度VP-16联合DDP处理细胞24 h,重复上述操作。每次正常传代后待细胞密度至80%,使用下一个更高梯度浓度VP-16联合DDP处理细胞24 h,再进行常规培养。构建周期为13个月。

1.2.3 MTT法检测细胞活力并计算耐药指数 取对数生长期的细胞,调整细胞密度为每毫升2×10^4个细胞,按每孔180 μL将单细胞悬液接种于96孔培养板中,过夜待细胞贴壁后,分别加入不同终浓度VP-16(0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μmol/L)、DDP(0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 μmol/L)及DOX(0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 μmol/L)处理细胞,每组设置3个复孔。48 h后每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL,继续培养4 h,吸出上清,每孔加入DMSO 150 μL,震荡10 min摇匀,使用酶标仪在波长570 nm下检测每孔光密度值。

细胞活力=(实验组光密度值-空白组光密度值)/(对照组光密度值-空白组光密度值)。

耐药指数(resistance index,RI)=H446/EP细胞药物IC_{50}值/NCI-H446细胞药物IC_{50}值。

耐药标准:2≤RI<5,细胞呈轻度耐药;5≤RI<15,细胞呈中度耐药;RI≥15,细胞呈高度耐药。

1.2.4 细胞克隆检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,按每孔1×10^3个将细胞接种于12孔细胞培养板中,细胞过夜贴壁后,加入终浓度为0.125、0.250、0.500 μmol/L的VP-16联合DDP处理细胞14 d,每2 d更换含有相应浓度药物的新鲜完全培养基。14 d后,弃上清,每孔用1 mL PBS清洗细胞2~3次后,加入1 mL 4%多聚甲醛固定细胞1 h后弃去多聚甲醛,PBS清洗2~3次,每孔加入1 mL结晶紫溶液染色1 h,弃去结晶紫溶液,使用纯水清洗12孔板2~3次,置于干燥处自然晾干后拍照。

1.2.5 Incucyte细胞增殖(无标记)法检测细胞增殖 调整细胞密度为每毫升2.5×10^4个细胞,按每孔180 μL将NCI-H446、H446/EP单细胞悬液接种于96孔培养板中,分别设置不加药组与加药组,每组设置3个复孔。过夜待细胞贴壁后,加药组使用终浓度0.5 μmol/L的VP-16联合DDP处理细胞,将细胞培养板放入Incucyte S3活细胞分析仪,设定程序,检测各组细胞120 h内增殖情况;同时设定Incucyte活细胞分析系统拍摄各组细胞不同时间点生长情况图片。

1.2.6 转录组学测序 收集对数生长期的H446/EP与NCI-H446细胞用于转录组学测序。使用TRIzol试剂盒,按照制造商说明从细胞中提取总RNA。RNA质量由5300生物分析仪(Agilent)测定,并使用ND-2000(NanoDrop Technologies)进行定量;RNA纯化、逆转录、文库构建和测序在上海华盈生物医药科技有限公司完成。

1.2.7 KEGG功能富集分析 转录组学测序结果以|log2FoldChang|>1,*P*-value值<0.05为具有显著差异的标准找到差异表达基因,对差异基因应用clusterProfiler超几何分布算法分析,进行KEGG通路富集分析,查看差异基因集显著富集通路。

1.2.8 Western blot检测蛋白表达 待细胞生长至对数生长期时,收集各组细胞;用预冷的PBS漂洗2次后弃干净上清,加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取细胞总蛋白,用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度,后依次进行SDS-PAGE电泳分离、转膜、室温2 h 5%脱脂奶粉封闭、4 ℃过夜一抗孵育、室温2 h二抗孵育及ELC化学发光显影操作,最后使用Image J软件分析MRP1、BCRP、RAD51、γ-H2AX、p62、LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ蛋白表达量(IntDen)。

1.3 统计学分析

使用GraphPad Prism 9.0与IBM SPSS Statistics 27.0软件进行绘图及数据分析,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,两组比较用*t*检验。

2 结果

2.1 EP联合方案耐药的SCLC细胞株H446/EP构建成功

分别使用不同浓度VP-16、DDP或DOX处理NCI-H446以及连续30 d不接触药物的H446/EP细胞48 h,MTT实验结果显示药物处理后H446/EP细胞的活力显著高于NCI-H446细胞($P<0.05$,$P<0.01$),见图1A~C。对于NCI-H446与H446/EP细胞,VP-16的IC_{50}值分别为6.77 μmol/L与41.56 μmol/L,DDP的IC_{50}分别为2.18 μmol/L与7.47 μmol/L,DOX的

IC_{50} 值分别为 5.94 μmol/L 与 11.64 μmol/L。计算得 H446/EP 细胞对 VP-16、DDP 与 DOX 的 RI 分别为 6.14、3.43 与 1.96,表明 H446/EP 细胞对 VP-16 呈中度耐药,对 DDP 呈轻度耐药,且在未接触过蒽环类药物 DOX 情况下对其敏感性也降低。提示 EP 联合方案耐药的 SCLC 细胞株构建成功,具有多药耐药性。

2.2 H446/EP 细胞增殖能力相比 NCI-H446 细胞显著增强

分别采用各 0.125、0.250、0.500 μmol/L 的 VP-16 联合 DDP 处理 NCI-H446 与 H446/EP 株细胞 14 d,细胞克隆实验检测药物对 NCI-H446 与 H446/EP 细胞增殖能力的影响,结果显示 VP-16 联合 DDP 作用下 H446/EP 比 NCI-H446 细胞增殖能力更强,具有多药耐药性,见图 2A。

活细胞分析系统检测结果显示,H446/EP 细胞增殖能力显著升高($P<0.01$),见图 2B。使用 VP-16、DDP 各 0.5 μmol/L 处理 NCI-H446 及 H446/EP 细胞 120 h,检测结果显示药物作用下 H446/EP 细胞增殖能力显著强于 NCI-H446 细胞($P<0.01$),见图 2C。未加药或加药组细胞 120 h 后生长情况图片显示:相比于未加药组,药物处理组所有 NCI-H446 细胞全部不再具有细胞形态,细胞核体积膨大,完全失去增殖能力;药物处理组 H446/EP 细胞部分体积膨大,仍有细胞具有细胞形态及增殖能力,见图 2D。表明 VP-16 联合 DDP 作用下 H446/EP 细胞增殖能力更强,具有多药耐药性。

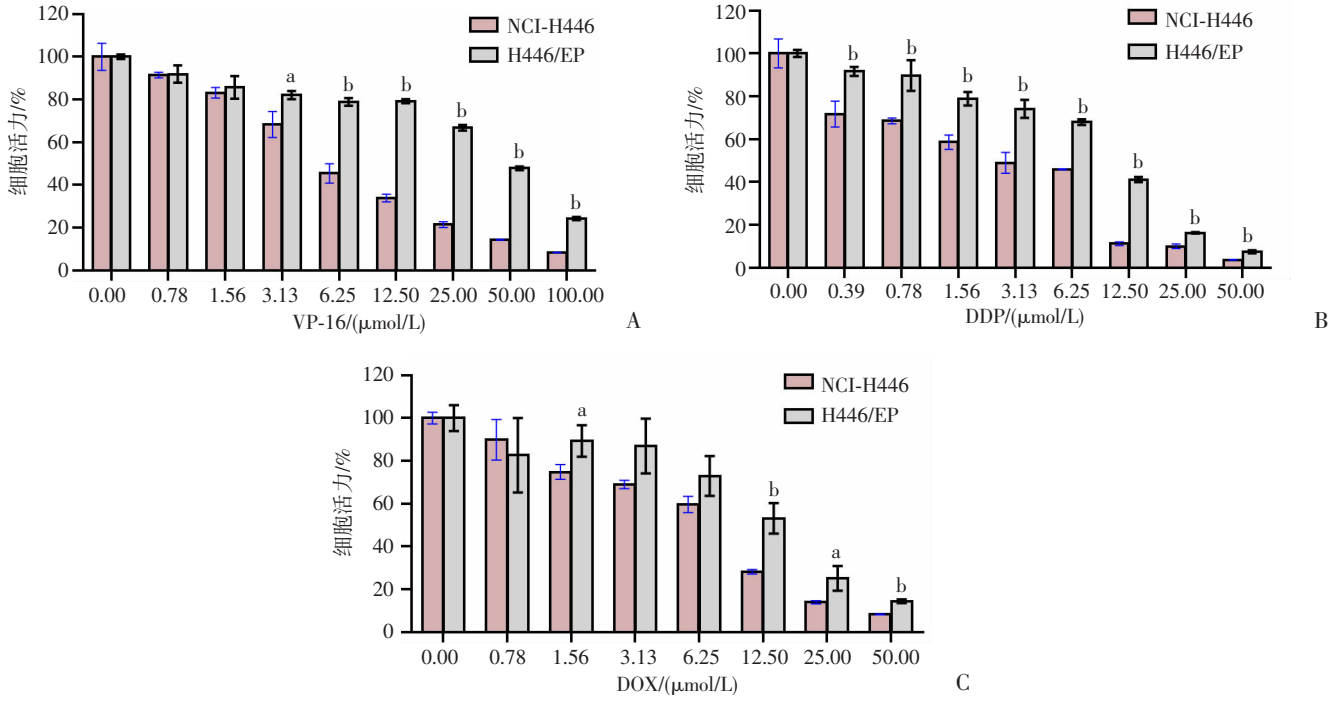
2.3 H446/EP 细胞转录组发生改变

将 H446/EP 及 NCI-H446 细胞进行转录组学测序,结果显示两种细胞共有 2 849 个差异表达基因。与 NCI-H446 细胞相比,H446/EP 细胞有 1 319 个基因显著上调,有 1 530 个基因显著下调,其中可能存在与 SCLC 对 EP 联合方案耐药相关基因,见图 3A。

KEGG 富集分析显示,差异表达基因富集在了肿瘤耐药、细胞自噬、DNA 损伤修复(DNA damage repair,DDR)相关通路,如铂类化合物耐药、自噬、范可尼贫血等通路,见图 3B。提示 DDR、细胞自噬等通路可能参与了 SCLC 的 EP 联合方案耐药。

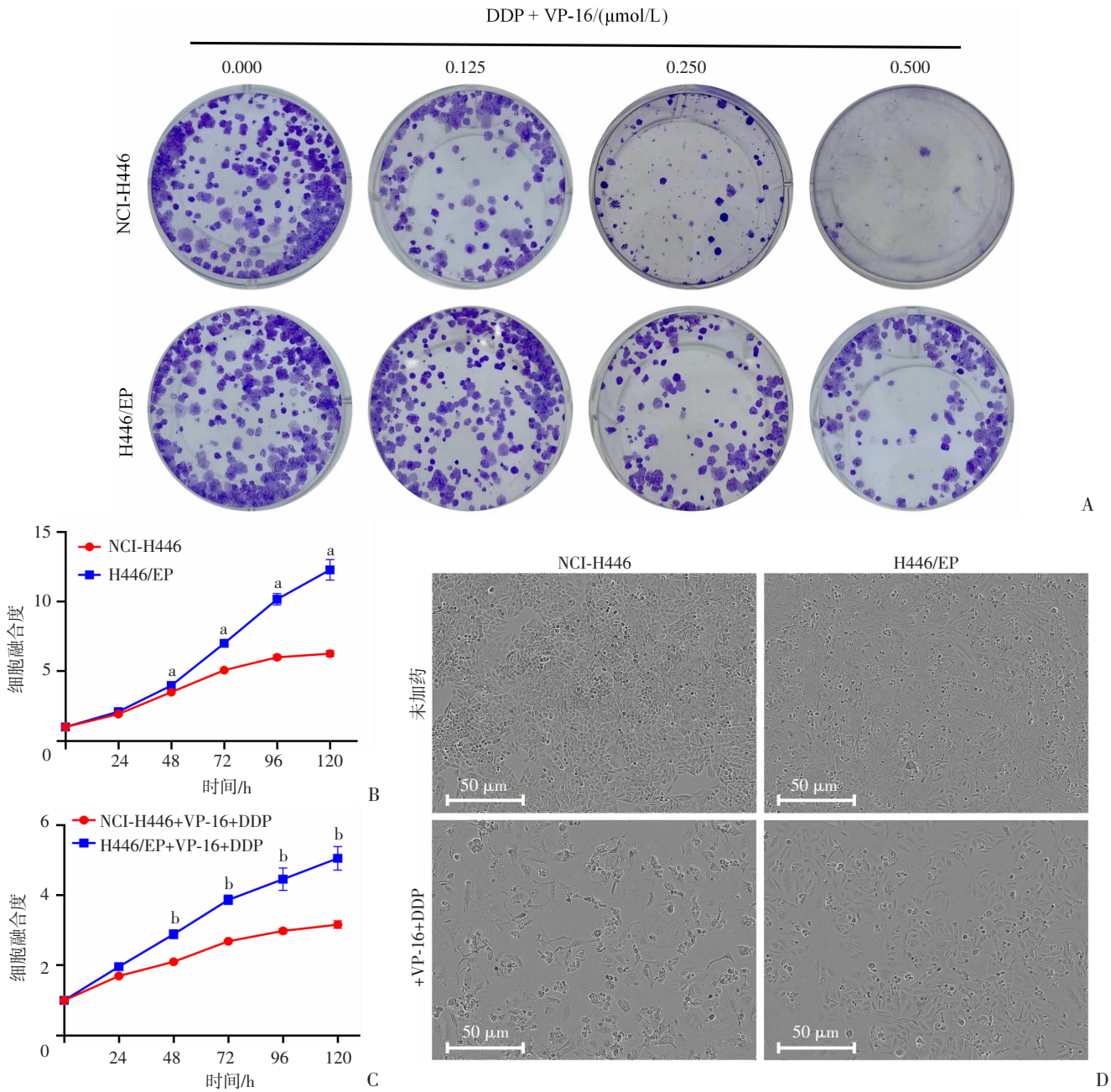
2.4 H446/EP 细胞中耐药标志蛋白的表达

Western blot 结果显示,H446/EP 细胞中耐药标志蛋白 MRP1、BCRP 蛋白表达量相比 NCI-H446 细胞显著升高($P<0.01$),见图 4A、B,进一步表明 EP 联合方案耐药 SCLC 细胞株 H446/EP 构建成功。Western blot 结果提示 SCLC 耐 EP 联合方案的机制可能与药物外排转运增加有关。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 NCI-H446 组比较

图 1 不同浓度 VP-16(A)、DDP(B)、DOX(C)对 NCI-H446 与 H446/EP 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



A:细胞克隆实验检测不同浓度 VP-16、DDP 干预对 NCI-H446、H446/EP 细胞增殖能力影响;B、C:Incucyte 活细胞分析系统检测使用或不使用 0.5 μmol/L VP-16 联合 DDP 干预下 NCI-H446 与 H446/EP 细胞增殖能力 a:$P<0.01$,与同一时间点 NCI-H446 组比较;b:$P<0.01$,与同一时间点 NCI-H446+VP-16+DDP 组比较;D:Incucyte 活细胞分析系统拍摄 120 h 加药与未加药组 NCI-H446 和 H446/EP 细胞生长情况

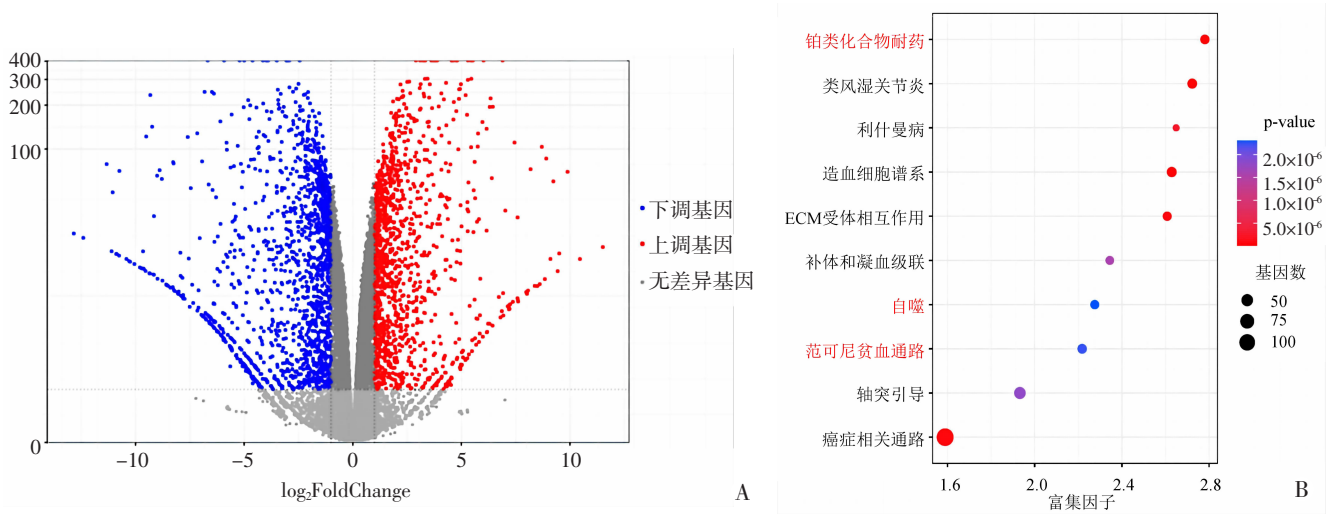
图 2 NCI-H446 与 H446/EP 细胞增殖情况 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.5 H446/EP 细胞中 DDR 相关蛋白的表达

KEGG 富集分析显示差异表达基因在 DDR 相关通路富集,见图 3 B。Western blot 结果显示 H446/EP 细胞中 DDR 标志分子 RAD51 与 γ-H2AX 蛋白表达量相比 NCI-H446 细胞显著升高($P<0.01$),见图 5。表明 H446/EP 细胞中 DDR 水平显著升高,提示 SCLC 耐 EP 联合方案的机制可能与 DDR 相关分子、通路的改变有关。

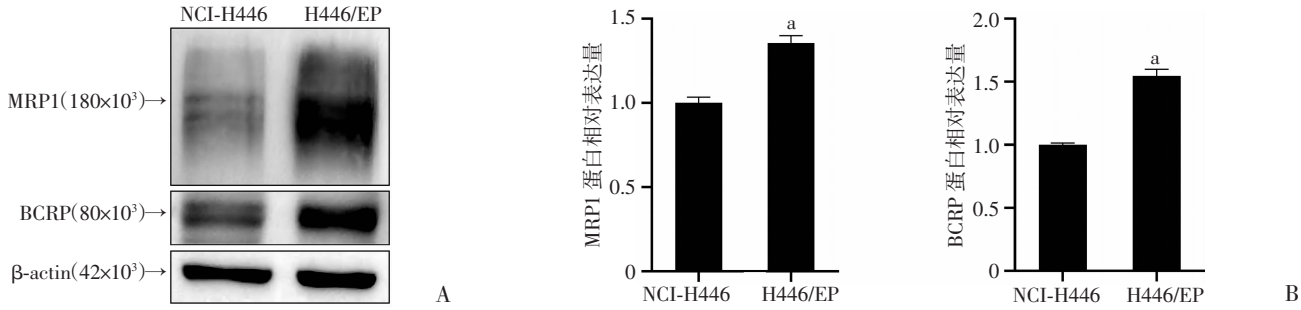
2.6 H446/EP 细胞中自噬相关蛋白的表达

KEGG 富集分析显示 H446/EP 细胞中自噬相关通路激活,见图 3B。Western blot 结果显示,与 NCI-H446 细胞相比,H446/EP 细胞的自噬标志分子 p62 蛋白表达量显著降低,LC3-II/LC3-I 蛋白表达量显著升高($P<0.01$),见图 6 A、B,表明 H446/EP 细胞中基础自噬水平升高,提示 SCLC 耐 EP 联合方案的机制可能与细胞自噬水平增加相关。



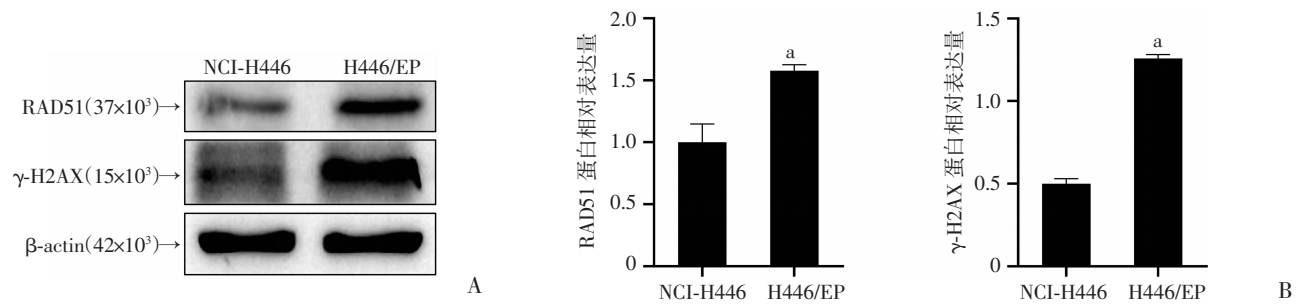
A:NCI-H446、H446/EP 细胞转录组学测序结果分析火山图;B:KEGG 富集分析气泡图

图 3 NCI-H446、H446/EP 细胞转录组学测序结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



A:Western blot 检测 NCI-H446、H446/EP 细胞耐药标志蛋白 MRP1 与 BCRP 的表达;B:MRP1 和 BCRP 的蛋白相对表达量 a:$P<0.01$,与 NCI-H446 比较

图 4 细胞中耐药标志蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

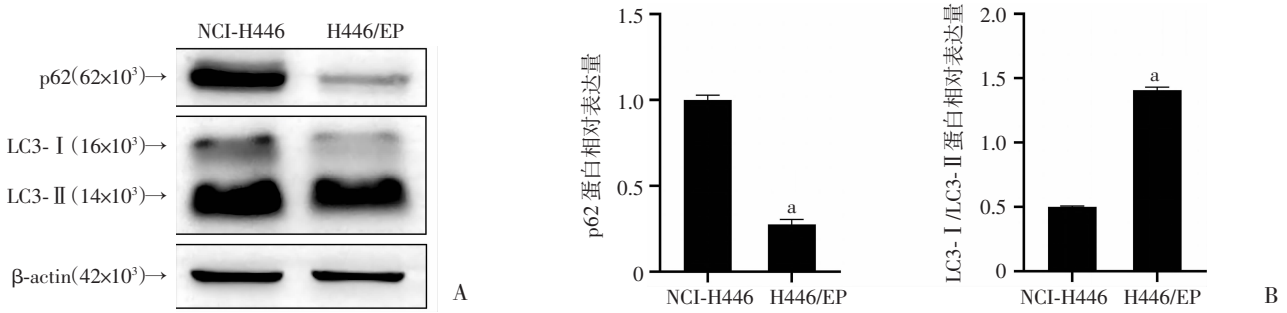


A:Western blot 检测 NCI-H446、H446/EP 细胞 DDR 相关蛋白 RAD51 与 γ-H2AX 的表达;B:RAD51 和 γ-H2AX 的蛋白相对表达量 a:$P<0.01$,与 NCI-H446 比较

图 5 细胞中 DDR 相关蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3 讨论

SCLC 对 EP 联合方案耐药性的产生大大降低了患者的临床获益[1,6],而临床 SCLC 患者多药耐药机制尚未阐明。本研究通过构建 EP 联合方案耐药的 SCLC 细胞株来探讨 SCLC 的化疗多药耐药机制。目前肿瘤耐药细胞株的构建方法主要有:基因转染法[11]、大剂量药物冲击法[12]、药物浓度递增法[10]等。基因转染法构建肿瘤耐药细胞株虽耗时短,但构建的细胞株所反映的耐药机制单一,不能很好模拟临床肿瘤化疗耐药产生的过程;大剂量药物冲击法在肿瘤耐药细胞株构建过程中使用的化疗药物浓度高,肿瘤细



A:Western blot 检测 NCI-H446、H446/EP 细胞自噬相关蛋白 p62、LC3-I、LC3-II 的表达;B:p62 和 LC3-II/LC3-I 的蛋白相对表达量 a:$P<0.01$,与 NCI-H446 比较

图 6 细胞中自噬相关蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

胞可能由于培养环境骤变而难以耐受,生长状态难以控制,耐药性不稳定。药物浓度递增法构建的耐药细胞株状态较好,可以模拟临床化疗过程中肿瘤逐步对化疗药物产生耐药性的过程,因此本研究同时使用 VP-16 与 DDP 处理 NCI-H446 细胞,以药物浓度递增法构建 EP 联合方案耐药的 SCLC 细胞株 H446/EP,通过 MTT 实验确证了细胞对 VP-16 呈中度耐药、对 DDP 呈轻度耐药,还确证了 H446/EP 细胞对未接触过的蒽环类药物 DOX 的敏感性也降低,表明 H446/EP 细胞产生了多药耐药性。

细胞克隆实验及 Incucyte 活细胞分析系统检测结果显示药物作用下 H446/EP 细胞增殖能力增强;VP-16 联合 DDP 连续作用 120 h 后,NCI-H446 细胞不再具有细胞形态,完全失去增殖能力,而 H446/EP 细胞仍具有细胞形态,有增殖能力。以上结果表明 H446/EP 细胞对 EP 联合方案产生了耐药性,120 h 细胞生长状态图片证实了上述结论。图片还显示药物连续作用 120 h 后 H446/EP 细胞生长变慢,形态同样略有膨大、变为长梭形,表明 VP-16 与 DDP 对耐药细胞仍具有一定杀伤作用。

转录组是指在特定环境或生理条件下的一个细胞或一个细胞群中 RNA 分子的集合,对 H446/EP 以及其亲本 NCI-H446 细胞进行转录组学测序可以找到 2 种细胞差异表达基因,其中可能存在与 SCLC 对 EP 联合方案耐药相关的基因。KEGG 富集分析结果显示,差异表达基因在肿瘤耐药相关通路富集,如铂类化合物耐药等,表明 H446/EP 细胞中获得性耐药基因发生了改变。KEGG 富集分析还显示差异表达基因富集在了 DDR 与细胞自噬相关通路,如范可尼贫血、自噬通路等。已有研究报道肿瘤耐药与 DDR 和自噬相关[13-14],表明 SCLC 对 EP 联合方案的耐药可能与 DDR 和细胞自噬通路的激活有关。因此,本研究检测了 H446/EP 和 NCI-H446 细胞中耐药、DDR 与细胞自噬标志分子的蛋白表达量。具体参与 SCLC EP 联合方案耐药的分子机制将在后续进行深入研究。

耐药标志蛋白的检测是肿瘤耐药细胞耐药特性鉴定方法之一。MRP1[15]、BCRP[16]是肿瘤耐药标志蛋白,它们属于 ABC 转运蛋白家族,可以促进肿瘤细胞中化疗药物的外排,而化疗药物外排的增加正是肿瘤耐药的关键因素[17-18];MRP1 还是 SCLC 的不良预后标志物[19]。目前已有许多研究发现通过调控 ABC 转运蛋白可以改善肿瘤耐药[20-21]。本研究发现,在耐 EP 联合方案的 SCLC 细胞 H446/EP 中 MRP1、BCRP 蛋白表达量升高,进一步表明耐药细胞株构建成功;SCLC 细胞对 EP 联合方案的耐药机制可能是细胞 ABC 转运蛋白水平升高,被细胞外排的药物增加,从而导致胞内化疗药物减少,药物疗效降低。

细胞内的 DNA 会因为内源或外源性攻击而受损,研究人员发现细胞可以通过复杂的信号传导系统来抵抗 DNA 损伤,这个过程被称为“DNA 损伤修复(DDR)”[22]。化疗或放疗时,抗肿瘤药物,如 VP-16、DDP,会对肿瘤细胞的 DNA 产生强烈的损伤,从而引起 DDR,DDR 水平增加可通过多种机制引起癌症化疗、放疗的耐药[14, 23]。γ-H2AX 是 DDR 通路的典型标志物,它对 DNA 双键断裂(DNA double-strand break,DDSB)后的 DNA 修复是必不可少的[24]:DDSB 发生后,会激活共济失调毛细血管扩张突变(ataxia-telangieclasia-mutated,ATM)激酶,ATM 激酶可以快速磷酸化 H2AX,从而产生 γ-H2AX,并激活下游 p53 来介导不同形式的 DDR[25-26]。RAD51 在 DDR 中也发挥了重要作用:DNA 损伤后,BRCA1 被募集到 DDSB 中,促进 DDSB 末端切除,并募集 PALB2 及 RAD51,从而启动 DDR 中的同源重组(homologous recombination,HR)修复[27];肿瘤中的 RAD51 过度表达会引起 HR 水平增加,降低肿瘤化疗敏感性[28-29]。在本研究中,H446/EP 细胞与 NCI-H446 细胞转录组差异表达基因

富集在 DDR 相关通路,同时 H446/EP 细胞中 γ-H2AX、RAD51 蛋白表达量升高,提示耐 EP 联合方案的 SCLC 细胞内 DDR 相关蛋白水平增加、DDR 通路激活,其耐药机制可能与 DDR 水平升高有关。

细胞自噬是一种对受损细胞器或错误折叠蛋白进行降解和循环利用的保守代谢过程,肿瘤发展的中、晚期,普遍的自噬水平增加促进了肿瘤细胞的存活并增加了肿瘤的恶性程度[30-31]。在自噬过程中,LC3 被具有蛋白内切酶活性的 Atg4 在羧基端剪切,生成胞浆型 LC3-Ⅰ,通过 Atg7 和 Atg3 参与的类泛素样反应,使磷脂酰乙醇胺偶联,胞浆型 LC3-Ⅰ生成 LC3-Ⅱ,它附着到自噬体的膜上,即自噬体膜型 LC3-Ⅱ;自噬体与溶酶体结合后,溶酶体降解自噬体会导致 p62 水平的降低,因此 LC3、p62 是自噬标志蛋白,LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ的转化以及 p62 的表达量是判断自噬流的重要标志[32-33]。有研究显示,肿瘤细胞自噬水平的增加与化疗耐药相关,可导致肿瘤的多药耐药[13];抗肿瘤药物联合自噬抑制剂,可以增加药物抗肿瘤疗效[34-35]。在本研究中,H446/EP 细胞与 NCI-H446 细胞转录组差异表达基因富集在了自噬相关通路;H446/EP 细胞中 p62 蛋白表达量显著下调,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白表达量明显升高,表明 H446/EP 细胞的基础自噬水平比亲本化疗敏感的 NCI-H446 细胞高,提示 SCLC 对 EP 联合方案产生耐药性可能是肿瘤细胞基础自噬水平升高所致。

综上,本研究成功构建了耐 EP 联合方案的 SCLC 细胞株 H446/EP,并发现其耐药机制可能与药物外排增加、DDR 及细胞自噬水平上调有关。本研究为临床逆转 SCLC 化疗耐药策略研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社. 中华医学会肺癌临床诊疗指南(2023 版)[J]. 中华医学杂志, 2023, 103(27): 2037-2074. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20230510-00767.
Oncology Branch of Chinese Medical Association, Editorial office of *Journal of Chinese Medical Association*. Chinese Medical Association guideline for clinical diagnosis and treatment of lung cancer (2023 edition)[J]. Natl Med J China, 2023, 103(27): 2037-2074. DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20230510-00767.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[3] PENG A M, LI G S, XIONG M T, *et al*. Role of surgery in patients with early stage small-cell lung cancer[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 7089-7101. DOI: 10.2147/CMAR.S202283.

[4] PAZ-ARES L, DVORKIN M, CHEN Y B, *et al*. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet, 2019, 394(10212): 1929-1939. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32222-6.

[5] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, *et al*. Lung cancer[J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.

[6] HERZOG B H, DEVARAKONDA S, GOVINDAN R. Overcoming chemotherapy resistance in SCLC[J]. J Thorac Oncol, 2021, 16(12): 2002-2015. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.07.018.

[7] WANG Y L, YAN Y L, ZHOU N J, *et al*. Mechanism of multidrug resistance of human small cell lung cancer cell line H446/VP[J]. Chin Med J, 2010, 123(22): 3299-3303.

[8] CHIKAMORI M, TAKIGAWA N, KIURA K, *et al*. Establishment of a 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin-resistant small cell lung cancer cell line[J]. Anticancer Res, 2004, 24(6): 3911-3916.

[9] AMARAL M V S, DE SOUSA PORTILHO A J, DA SILVA E L, *et al*. Establishment of drug-resistant cell lines as a model in experimental oncology: a review[J]. Anticancer Res, 2019, 39(12): 6443-6455. DOI: 10.21873/anticanres.13858.

[10] 俞毅麟, 肖艺, 赵娟娟, 等. 三阴性乳腺癌耐药细胞模型的构建及其生物学特性考察[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(22): 1901-1910. DOI: 10.11669/cpj.2022.22.006.
YU Y L, XIAO Y, ZHAO J J, *et al*. Establishment of doxorubicin hydrochloride resistant triple negative breast cancer cell model and inves-tigation of its biological characteristics[J]. Chin Pharm J, 2022, 57(22): 1901-1910. DOI: 10.11669/cpj.2022.22.006.

[11] 荣小丽. LIMK1 基因稳定转染骨肉瘤耐药细胞系的建立及其增殖侵袭能力的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
RONG X L. Establishment of drug-resistant osteosarcoma cell line stably transfected with LIMK1 gene and study on its proliferation and invasion ability[D]. Changchun: Jilin University, 2016.

[12] 延冰, 刘国勤, 姜永胜, 等. 高剂量法诱导胃癌铂类耐药细胞株的建立及其生物学特性[J]. 山东大学学报(医学版), 2014, 52(4): 49-52, 57. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2013.556.
YAN B, LIU G Q, JIANG Y S, *et al*. Establishment of cisplatin-resistant gastric cancer cell line and the biological characteristics[J]. J Shandong Univ Health Sci, 2014, 52(4): 49-52, 57. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.

2013.556.
[13] CHANG H C, ZOU Z Z. Targeting autophagy to overcome drug resistance: further developments[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 159. DOI: 10.1186/s13045-020-01000-2.
[14] GARCIA-MAYEA Y, MIR C, MASSON F, *et al*. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60: 166-180. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.07.022.
[15] LU J F, POKHAREL D, BEBAWY M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance[J]. Drug Metab Rev, 2015, 47(4): 406-419. DOI: 10.3109/03602532.2015.1105253.
[16] ZATTONI I F, DELABIO L C, DUTRA J P, *et al*. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators[J]. Eur J Med Chem, 2022, 237: 114346. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114346.
[17] HANSSEN K M, HABER M, FLETCHER J I. Targeting multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)-expressing cancers: Beyond pharmacological inhibition[J]. Drug Resist Updat, 2021, 59: 100795. DOI: 10.1016/j.drup.2021.100795.
[18] OMORI M, NORO R, SEIKE M, *et al*. Inhibitors of ABCB1 and ABCG2 overcame resistance to topoisomerase inhibitors in small cell lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2022, 13(15): 2142-2151. DOI: 10.1111/1759-7714.14527.
[19] KUO T H, LIU F Y, CHUANG C Y, *et al*. To predict response chemotherapy using technetium-99m tetrofosmin chest images in patients with untreated small cell lung cancer and compare with p-glycoprotein, multidrug resistance related protein-1, and lung resistance-related protein expression[J]. Nucl Med Biol, 2003, 30(6): 627-632. DOI: 10.1016/S0969-8051(03)00058-1.
[20] SOUZA I D, MONTEIRO L K S, GUEDES C B, *et al*. High levels of NRF2 sensitize temozolomide-resistant glioblastoma cells to ferroptosis via ABCC1/MRP1 upregulation[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(7): 591. DOI: 10.1038/s41419-022-05044-9.
[21] ZHANG J, HU J, LI W W, *et al*. Rapamycin antagonizes BCRP-Mediated drug resistance through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in mPRα-Positive breast cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 608570. DOI: 10.3389/fonc.2021.608570.
[22] GROELLY F J, FAWKES M, DAGG R A, *et al*. Targeting DNA damage response pathways in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(2): 78-94. DOI: 10.1038/s41568-022-00535-5.
[23] MCMULLEN M, KARAKASIS K, MADARIAGA A, *et al*. Overcoming platinum and PARP-inhibitor resistance in ovarian cancer[J]. Cancers, 2020, 12(6): 1607. DOI: 10.3390/cancers12061607.
[24] YUAN J S, ADAMSKI R, CHEN J J. Focus on histone variant H2AX: to be or not to be[J]. FEBS Lett, 2010, 584(17): 3717-3724. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.05.021.
[25] JIN M H, OH D Y. ATM in DNA repair in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2019, 203: 107391. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.07.002.
[26] STAGNI V, CIROTTI C, BARILÀ D. *Ataxia*-telangiectasia mutated kinase in the control of oxidative stress, mitochondria, and autophagy in cancer: a maestro with a large orchestra[J]. Front Oncol, 2018, 8: 73. DOI: 10.3389/fonc.2018.00073.
[27] FOO T K, XIA B. BRCA1-dependent and independent recruitment of PALB2-BRCA2-RAD51 in the DNA damage response and cancer[J]. Cancer Res, 2022, 82(18): 3191-3197. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-1535.
[28] LORD C J, ASHWORTH A. BRCAness revisited[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 110-120. DOI: 10.1038/nrc.2015.21.
[29] CRUZ C, CASTROVIEJO-BERMEJO M, GUTIÉRREZ-ENRÍQUEZ S, *et al*. RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer[J]. Ann Oncol, 2018, 29(5): 1203-1210. DOI: 10.1093/annonc/mdy099.
[30] POILLET-PEREZ L, WHITE E. Role of tumor and host autophagy in cancer metabolism[J]. Genes Dev, 2019, 33(11/12): 610-619. DOI: 10.1101/gad.325514.119.
[31] LI X H, HE S K, MA B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 12. DOI: 10.1186/s12943-020-1138-4.
[32] KLIONSKY D J, ABDEL-AZIZ A K, ABDELFATAH S, *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. Autophagy, 2021, 17(1): 1-382. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280.
[33] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. Essays Biochem, 2017, 61(6): 609-624. DOI: 10.1042/EBC20170035.
[34] ZHANG Y B, WANG J Q, HUI B N, *et al*. Pristimerin enhances the effect of cisplatin by inhibiting the miR-23a/Akt/GSK3β signaling pathway and suppressing autophagy in lung cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(3): 1382-1394. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4057.
[35] MA K Y, LI S X, HUO X Y, *et al*. Exploring the mechanism of cisplatin resistance by transcriptome sequencing and reversing the chemoresistance by autophagy inhibition in small cell lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533(3): 474-480. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.09.023.

(收稿:2024-02-22;修回:2024-04-16)
(编辑 张 维)