

耐吉非替尼人非小细胞肺癌细胞株的建立及其耐药机制

吴 敏¹ 袁 媛² 潘跃银³ 张 颖¹

摘要 目的 建立人非小细胞肺癌吉非替尼(Gefitinib)耐药的细胞株 PC9/Gefitinib, 并研究其可能的耐药机制。方法

采用体外浓度梯度递增的诱导方法建立 Gefitinib 获得性耐药细胞株 PC9/Gefitinib; MTT 法计算出 PC9 和 PC9/Gefitinib 的半数抑制浓度(IC_{50})和耐药指数(RI)及 PC9/Gefitinib 细胞对多西他赛、培美曲塞及吉西他滨的敏感性; 流式细胞仪检测其细胞周期分布; Western blot 法检测 p-AKT 和 Bcl-2 蛋白的表达。结果 建立了对 Gefitinib 耐药的 PC9/Gefitinib 细胞株, 其 RI 是亲代 PC9 的 106.95 倍, 且 PC9/Gefitinib 细胞株对化疗药物多西他赛的敏感性增加, 而对培美曲塞表现出轻度耐药。耐药前后 2 种细胞株的 G_0/G_1 期、S 期差异有统计学意义($P < 0.05$), G_2/M 期差异无统计学意义。与 PC9 细胞相比, PC9/Gefitinib 中 Bcl-2 蛋白表达升高, 而 p-AKT 表达水平下降。结论 成功建立一株耐 Gefitinib 的人非小细胞肺癌细胞株 PC9/Gefitinib, 推测其耐药机制与 Bcl-2 蛋白表达升高及 p-AKT 表达下降有关。

关键词 吉非替尼; 非小细胞肺癌; 耐药

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0160-04

肺癌是全球癌症相关性死亡的主要原因, 其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌中最常见的类型, 占有肺癌的 80% ~ 85%^[1]。化疗作为晚期 NSCLC 的主要治疗手段, 其疗效已达到了平台期, 很难进一步提高患者的生存率^[2-3]。随着肺癌分子靶向治疗的深入研究, 以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)为靶点的小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)吉非替尼(Gefitinib)在含有 EGFR 突变的晚期 NSCLC 患者的临床治疗中疗效显著^[4-5]。然而, 即使对 Gefitinib 初始治疗敏感的

NSCLC 患者, 在治疗 1 年后仍不可避免的出现获得性耐药, 最终导致肿瘤复发^[6]。该研究使用对 Gefitinib 高度敏感的肺腺癌细胞株 PC9, 通过体外诱导对 Gefitinib 产生获得性耐药, 建立 PC9/Gefitinib 耐药细胞株, 并研究其可能耐药机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 DMEM 培养液和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)和 MTT 购自美国 Sigma 公司; p-AKT、AKT 抗体购自美国 CST 公司; Bcl-2、 β -actin 抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 免疫印迹化学发光试剂 ECL 购自美国 Millipore 公司; 人 NSCLC PC9 细胞株由广东省医学科学院(广东省肺癌研究所)惠赠; Gefitinib 由英国阿斯利康公司惠赠; 盐酸吉西他滨由美国礼来公司惠赠; 多西他赛购自江苏恒瑞医药有限公司; 培美曲塞购自齐鲁制药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC9 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液, 培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的恒温培养箱中, 倒置显微镜下观察细胞形态及生长状态, 每 1~2 d 传代一次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 耐药细胞株 PC9/Gefitinib 的建立 采用体外逐步递增浓度方法诱导。取对数生长期的 PC9 细胞加入含 Gefitinib 的培养液, Gefitinib 从低浓度 10 nmol/L($1/2 IC_{50}$ 浓度)开始, 作用 24 h, 敏感细胞逐渐死亡, 弃去培养液, 用 PBS 缓冲液洗 3 遍, 换新鲜培养液, 耐药细胞在不含药物的培养液中继续培养至对数期, 逐渐提高 Gefitinib 的浓度, 如此反复诱导, 换液传代, 直至该细胞株能够在 1.0 μ mol/L Gefitinib 浓度下稳定生长。历时 6 个月, 最终得到耐受 Gefitinib 1.0 μ mol/L 的细胞株。

1.2.3 MTT 法检测 PC9/Gefitinib 耐药指数(resistance index, RI)及药物敏感性 取对数生长期的细胞, 用胰酶消化, 制成单细胞悬液, 并调整细胞浓度至 3.5×10^4 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔接种 100 μ l, 置于恒温培养箱中, 孵育过夜, 吸出原培养液, 加入用培养液稀释的不同浓度各种药物 200 μ l, 记为

2013-08-06 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2012A157)

作者单位: ¹安徽医科大学第三附属医院干部病房, 合肥 230061

²合肥市滨湖医院中心实验室, 合肥 230601

³安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 吴 敏, 女, 硕士研究生;

潘跃银, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yueyinpan1965@126.com;

张 颖, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangying19650108@163.com

实验组。每个药物浓度设置 6 个复孔,同时设置空白对照组(仅含培养基不含细胞)、细胞对照组(仅含细胞和培养基不含药物)。培养 72 h 后,加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μ l,置于培养箱中培养 4 h,用 1 ml 注射器小心吸出培养基,加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min 使结晶溶解,用酶标仪测定 490 nm 波长处吸光度值(OD),计算生长抑制率。生长抑制率 = [(细胞对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / (细胞对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值)] $\times$ 100%。根据生长抑制率,采用 SPSS 16.0 软件计算药物半数抑制浓度(IC₅₀)。RI = 耐药细胞 IC₅₀ / 亲本细胞 IC₅₀。实验至少重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪细胞周期测定 取对数生长期的 PC9 和 PC9/Gefitinib 细胞,调整细胞浓度为 1×10^4 个/ml,分别接种于 6 孔板中,待细胞生长至约 90% 时收集细胞,800 r/min 离心沉淀后用冷 PBS 洗 2 次,加入 75% 冰乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,次日 800 r/min 离心,弃上清液,冷 PBS 洗 2 次,加入 PI 染液,避光作用 30 min,上流式细胞仪检测,用 ModFit 软件分析细胞周期分布。

1.2.5 Western blot 检测 p-AKT、AKT 和 Bcl-2 蛋白表达 取对数生长期的细胞,以 1×10^5 个/ml 接种在 60 mm² 的培养皿内,待细胞长满后应用细胞裂解液分别裂解 PC9、PC9/Gefitinib 细胞,取上清液。BCA 法测量样品中总蛋白浓度。取蛋白样品(20 μ g/孔)加入 10% 聚丙烯酰胺凝胶,经电泳、转膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗(p-AKT、AKT 和 Bcl-2 按 1:1 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,加入相应二抗(1:5 000 稀释),常温孵育 1 h,最后转入暗室加 ECL 发光液, X 线片曝光。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组样本均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 形态学变化 诱导前细胞形态规则,生长良好,贴壁生长,见图 1A;在诱导耐药的过程中,细胞形态不规则,表现为体积变大,呈长梭形,胞质颗粒及空泡增多,见图 1B;随着培养时间延长,细胞稳定传代后,细胞形态渐渐恢复亲本细胞状态,见图 1C。

2.2 PC9/Gefitinib 的耐药程度及药物敏感性分析

MTT 法检测 PC9 和 PC9/Gefitinib 对 Gefitinib 的 IC₅₀ 分别为 (0.023 $\pm$ 0.003)、(2.46 $\pm$ 0.36) μ mol/L。PC9/Gefitinib 细胞对 Gefitinib 的 RI 为 106.95。

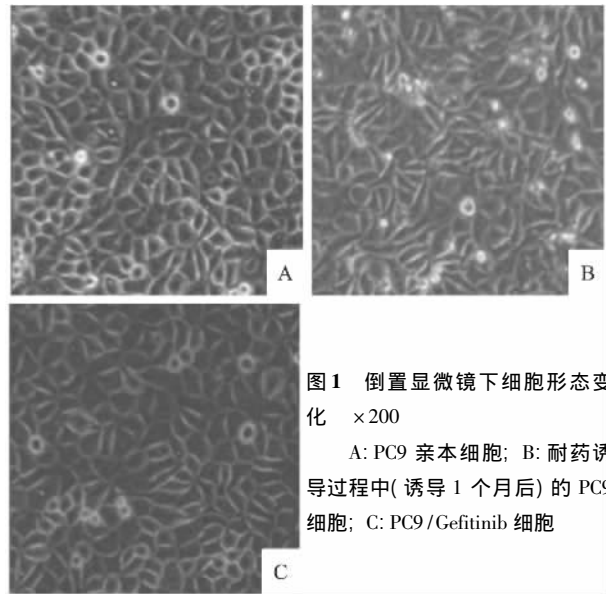


图 1 倒置显微镜下细胞形态变化 $\times 200$

A: PC9 亲本细胞; B: 耐药诱导过程中(诱导 1 个月后)的 PC9 细胞; C: PC9/Gefitinib 细胞

两种细胞株对其他 3 种化疗药物的敏感性,见表 1。耐药细胞 PC9/Gefitinib 对多西他赛的敏感性增加,对培美曲塞的敏感性降低,对吉西他滨的敏感性和亲本细胞无明显差别。

表 1 PC9 细胞和 PC9/Gefitinib 细胞的药物敏感性($n=3, \bar{x} \pm s$)

药物	IC ₅₀ (μ mol/L)		RI
	PC9	PC9/Gefitinib	
Gefitinib	0.023 $\pm$ 0.003	2.460 $\pm$ 0.360	106.950
多西他赛	0.002 2 $\pm$ 0.000 41	0.001 2 $\pm$ 0.000 10	0.530 00
培美曲塞	0.24 $\pm$ 0.016	0.72 $\pm$ 0.170	3.00
吉西他滨	13.43 $\pm$ 1.01	14.60 $\pm$ 0.54	1.08

2.3 流式细胞仪检测细胞周期 PC9 细胞的 G₀/G₁ 期为 (64.61 $\pm$ 3.01)%, S 期为 (23.29 $\pm$ 0.23)%, G₂/M 为 (12.09 $\pm$ 3.12)%; PC9/Gefitinib 细胞 G₀/G₁ 期为 (53.36 $\pm$ 1.41)%, S 期为 (40.66 $\pm$ 1.16)%, G₂/M 为 (5.97 $\pm$ 2.42)%, 见图 2。PC9/Gefitinib 较亲本细胞相比 S 期增加 ($F=3.584, t=25.263, P<0.01$), G₀/G₁ 期下降 ($F=2.610, t=5.852, P=0.004$), G₂/M 期改变差异无统计学意义 ($F=0.289, t=2.679, P=0.055$)。

2.4 Western blot 检测蛋白表达 与亲本细胞 PC9 相比, PC9/Gefitinib 细胞中 Bcl-2 蛋白表达量明显增加,而 p-AKT 的表达下降,耐药前后总 AKT 无显著变化,见图 3。

3 讨论

Gefitinib 被批准作为肺癌治疗的靶向药物,主要用于以铂类为基础的一线化疗失败的患者^[7]。

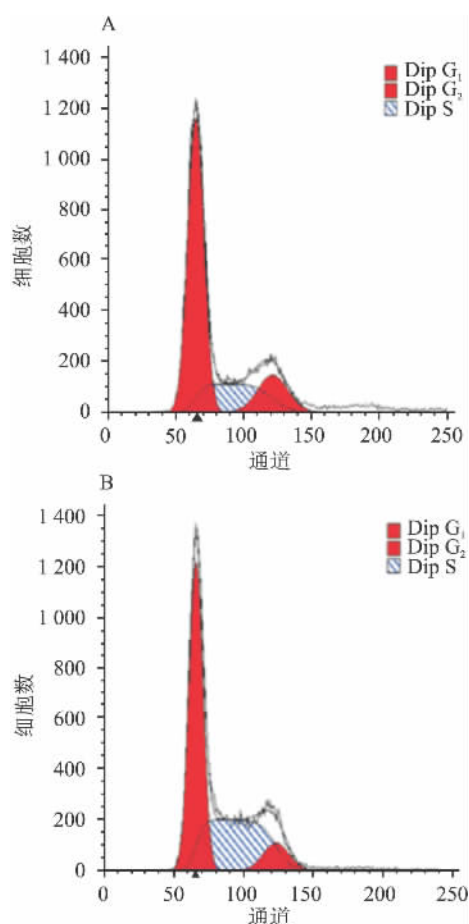


图2 流式细胞术检测 PC9 和 PC9/Gefitinib 的周期变化

A: PC9; B: PC9/Gefitinib

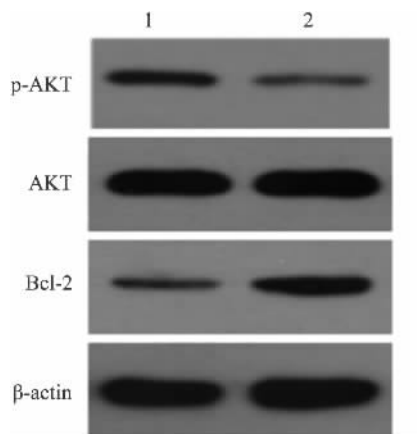


图3 PC9 和 PC9/Gefitinib 细胞中 p-AKT、AKT、Bcl-2 蛋白的表达

1: PC9; 2: PC9/Gefitinib

研究^[8]显示, NSCLC 患者对 Gefitinib 的敏感性与肿瘤是否含有 EGFR 基因激活突变密切相关, 含有 EGFR 基因突变的患者, 可明显获益于 Gefitinib 治疗。但是, 随着治疗时间的延长, 尽管对 Gefitinib 初期治疗敏感的 EGFR 激活突变的患者, 都不可避免的会出现获得性耐药^[9]。

本研究通过体外递增药物浓度的方法建立耐 Gefitinib 的人 NSCLC 细胞株 PC9/Gefitinib, 其对 Gefitinib 的 RI 为亲本细胞的 106.95 倍。耐药前后, 细胞的形态学无明显变化, 细胞周期分布发生改变, 耐药细胞处于增殖阶段(S 期)的细胞比例高于亲本细胞, 而静止期(G_0/G_1 期)细胞比例较亲代减少, 提示耐药细胞 DNA 合成增加, 细胞获得了更强的增殖活性。PC9/Gefitinib 细胞对不同化疗药物的敏感性表现出对多西他赛的敏感性升高, 而对培美曲塞的敏感性降低。笔者推测, 对 Gefitinib 初始治疗敏感患者在出现耐药后选用多西他赛作为二线化疗药物可能优于培美曲塞。

AKT 是 PI3K 信号通路下游的一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 具有抑制细胞凋亡和促进细胞增殖的作用^[10]。研究^[11]显示, 在多种肿瘤组织中都存在 AKT 的过度表达和活化, 并且肿瘤组织中 p-AKT 的表达水平与 Gefitinib 的治疗反应率及预后呈正相关。Bcl-2 是 Bcl-2 家族中最主要的抗凋亡蛋白, 在抵御外界凋亡诱导刺激中起直接作用。Bcl-2 与凋亡逃避和抗药性密切相关, 高表达 Bcl-2 的肿瘤细胞可通过抑制细胞凋亡而增强细胞的生存力^[12-13]。本研究中, 与亲本细胞相比, 耐药细胞的 Bcl-2 水平明显升高, 而 p-AKT 的表达水平明显下调, 从而推测所建 PC9/Gefitinib 细胞的耐药机制可能和 p-AKT 表达水平下调及 Bcl-2 蛋白的表达上调有关。本研究结果与 Koizumi et al^[14]建立的 Gefitinib 耐药细胞株 PC9/ZD 的发现相似。

NSCLC Gefitinib 获得性耐药的机制在分子水平上已经开展了广泛的研究, 目前几个潜在的机制主要包括: EGFR 基因二次突变学说(如 T790M 突变)、Met 受体酪氨酸激酶基因扩增以及其他受体酪氨酸激酶的过度表达等^[15]。本研究成功建立了耐 Gefitinib 人 NSCLC PC9/Gefitinib 细胞株, 初步探讨了其耐药机制, 但肿瘤细胞的耐药机制十分复杂, 要完全了解其耐药机制, 尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Schiller J H, Harrington D, Belani C P, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2002, 346(2): 92-8.
- [3] Smit E F, van Meerbeek J P, Lianes P, et al. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a Phase III trial of

- the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group-EORTC 08975 [J]. *J Clin Oncol* 2003 ,21 (21) : 3909 – 17.
- [4] Lynch T J , Bell D W , Sordella R , et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *N Engl J Med* 2004 , 350(21) : 2129 – 39.
- [5] Maemondo M , Inoue A , Kobayashi K , et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. *N Engl J Med* 2010 , 362(25) : 2380 – 8.
- [6] Jackman D , Pao W , Riely G J , et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol* , 2010 , 28(2) : 357 – 60.
- [7] Sanford M , Scott L J. Gefitinib: A review of its use in the treatment of locally advanced/metastatic non-small-cell lung cancer [J]. *Drugs* 2009 , 69(16) : 2303 – 28.
- [8] Paez J G , Janne P A , Lee J C , et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science* 2004 , 304(5676) : 1497 – 500.
- [9] Engelman J A , Janne P A. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res* 2008 , 14(10) : 2895 – 9.
- [10] Cross T G , Scheel-Toellner D , Henriquez N V , et al. Serine/threonine protein kinases and apoptosis [J]. *Exp Cell Res* 2000 , 256 (1) : 34 – 41.
- [11] Cappuzzo F , Magrini E , Ceresoli G L , et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst* 2004 , 96(5) : 1133 – 41.
- [12] Ruvo P P , Deng X , May W S. Phosphorylation of Bcl-2 and regulation of apoptosis [J]. *Leukemia* 2001 , 15(4) : 515 – 22.
- [13] 方德宝 , 余宏铸 , 许业传 , 等. 前列腺素 E1 对梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡及相关 Bax/Bcl-2 的影响 [J]. *安徽医科大学学报* , 2011 , 46(8) : 742 – 6.
- [14] Koizumi F , Shimoyama T , Taguchi F , et al. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib [J]. *Int J Cancer* 2005 , 116(1) : 36 – 44.
- [15] Xu Y , Liu H , Chen J , et al. Acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib [J]. *Cancer Biol Ther* 2010 , 9(8) : 572 – 82.

Establishment of a gefitinib-resistant human non-small cell lung cancer cell line and investigation of its resistance mechanism

Wu Min¹ , Yuan Yuan² , Pan Yueyin³ , et al

(¹ Dept of Cadres Ward , The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230061;

² The Central Laboratory of Binhu Hospital Hefei 230601; ³ Dept of Oncology ,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To establish PC9 cell line resistant to gefitinib and investigate its possible resistant mechanisms. **Methods** Human gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cell line PC9/Gefitinib was established by gradually increasing concentration of gefitinib from its parental cell line PC9 *in vitro*. The IC₅₀ value and resistance index(RI) of gefitinib were determined by MTT. MTT was also used to evaluate the sensitivity of docetaxel , pemetrexed and gemcitabine in PC9/Gefitinib cell line. Cell cycles were assayed by flow cytometry. Western blot analysis was used to investigate the expression of p-AKT and Bcl-2. **Results** Gefitinib-resistant human non-small cell lung cancer PC9/Gefitinib had been established successfully , with the RI being 106.95. Compared to PC9 cells , PC9/Gefitinib cells had an increased sensitivity to docetaxel and showed certain resistance to pemetrexed. The cell cycles of G₀/G₁ period and S period had a significant difference between these two cell lines(*P* < 0.05) , the G₂/M period change was not obvious. Compared with its parental PC9 cell line , the expression of Bcl-2 was significantly increased while the levels of p-AKT were obviously decreased in PC9/Gefitinib cell line. **Conclusion** Human gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cell line PC9/Gefitinib is established successfully , and we speculate that the activation of Bcl-2 and decrease of p-AKT expression appeared to be associated with resistance to gefitinib.

Key words gefitinib; non-small cell lung cancer; drug-resistant