

- 国误诊学杂志,2011,11(30):7357.
- [11] XU J, HUAI Y, MENG N, et al. L-3-n-Butylphthalide Activates Akt/mTOR Signaling, Inhibits Neuronal Apoptosis and Autophagy and Improves Cognitive Impairment in Mice with Repeated Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury [J]. Neurochemical Research, 2017,42(10):1-14.
- [12] 李国前,王杰华,杨小霞,等. 丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤后凋亡相关因子表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2011,27(9):682-685.
- [13] 廖梓亘,陈慧. 丁苯酞在大鼠脑缺血一再灌注损伤中的神经保护机制的研究[J]. 中南医学科学杂志,2016,44(3):275-278.
- [14] 袁晓勇. 丁苯酞的药理作用与药动学研究及临床评价[J]. 中国社区医师:医学专业,2011,13(15):6-6.
- [15] 杨丹,余德立,余资江. 视网膜缺血再灌注损伤的机制及药物治疗进展[J]. 局解手术学杂志,2012,2105:561-563.
- [16] 任玉伟,宿华威. Bcl-2 基因家族研究进展[J]. 大连医科大学学报,2015(2):202-205.
- [17] 杜华. p53 在调节细胞周期阻滞和细胞凋亡中的作用及其机制[J]. 国际放射医学核医学杂志,2002,26(2):79-83.
- (收稿日期:2017-12-30,修回日期:2018-02-11)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.07.009

◇ 药学研究 ◇

肺癌耐顺铂细胞 A549/CIS 产生肿瘤干细胞特性的分子机制研究

王昊^a,赵亮^a,王东升^b

作者单位:中国科学技术大学附属第一医院,^a检验科,^b呼吸科,安徽 合肥 230001

通信作者:王东升,男,副主任医师,研究方向为肺癌化疗耐药,E-mail:15605519676@163.com

基金项目:国家自然科学基金(81502599);安徽省自然科学基金(1608085QH217)

摘要:目的 研究人肺癌耐顺铂细胞 A549/CIS 获得肿瘤干细胞特性的分子机制。方法 微球形成实验比较 A549 和 A549/CIS 细胞肿瘤干细胞特性的差别,以及磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(PI3K/AKT)通路抑制剂 LY294002 对 A549/CIS 细胞微球形成能力的影响。Western blotting 检测 A549 和 A549/CIS 细胞中 AKT、p65 以及 MAPK-p38 信号通路的活化情况。CCK8 实验检测 A549 和 A549/CIS 细胞对顺铂的敏感性,以及 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 对 A549/CIS 细胞对顺铂敏感性的影响。结果 A549/CIS 细胞对顺铂的敏感性以及微球形成能力相对于 A549 明显增强,Western blotting 结果表明:A549/CIS 细胞中 AKT 通路明显被激活,而 p65 和 MAPK-p38 通路没有明显变化。LY294002 可以抑制 A549/CIS 细胞的肿瘤干细胞特性,并提高 A549/CIS 细胞对顺铂的敏感性。结论 相对于敏感株细胞 A549,耐药株 A549/CIS 细胞的肿瘤干细胞特性明显增强,而其机制涉及 PI3K/AKT 信号通路的激活。

关键词:肺癌; 肿瘤干细胞特性; 抗药性,肿瘤; 磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶

Molecular mechanism of acquisition of cancer stem cell like characteristic in human cisplatin-resistant lung cancer cell line A549/CIS

WANG Hao^a, ZHAO Liang^a, WANG Dongsheng^b

Author Affiliation:^aDepartment of Clinical Laboratory, ^bDepartment of Respiration, The First Affiliated

Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230001, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of acquisition of cancer stem cell feature of cisplatin resistant human lung cancer cell line A549/CIS. **Methods** The capability of cancer stem cell feature of A549 cells and A549/CIS cells and the effect of LY294002 on cancer stem cell feature of A549/CIS cells were detected by mammosphere formation assay. Western blotting was used to detect the activation of AKT, p65 and MAPK-p38 signaling pathway. The sensibility of A549 cells and A549/CIS to cisplatin and the effect of LY294002 on sensibility of A549/CIS to cisplatin was measured by CCK8 assay. **Results** Compared to A549 cells, the resistance of A549/CIS cells to cisplatin and the cancer stem cell feature were significantly enhanced. The results of western blotting demonstrated that AKT signaling pathway is activated, not p65 and MAPK-p38 signaling pathways. LY294002 suppressed cancer stem cell feature of A549/CIS cells and enhanced the sensibility of A549/CIS cells to cisplatin. **Conclusion** Acquisition of cancer stem cell phenotype of human lung cancer cell line A549/CIS is linked with activation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Lung cancer; Cancer stem cell; Drug resistance, neoplasm; Phosphatidylinositol 3'-OH kinase (PI3K)/Protein kinase B

肺癌是全球发病率和病死率较高的一种恶性肿瘤,晚期肺癌的5年生存率较差,主要原因是化疗耐药性的产生。化疗是治疗肺癌的重要方法,顺铂(cisplatin)是肺癌化疗的首选药物,顺铂与肿瘤细胞中DNA交叉连接,形成复合物,阻断肿瘤细胞DNA的复制,最终引起肿瘤细胞凋亡^[1]。肺癌病人经过初期顺铂化疗后,肿瘤进程得到控制,但经过一段时间的持续给药治疗后,就会对顺铂的敏感性降低,获得耐药性,最终达不到预期治疗效果。

肿瘤干细胞(cancer stem cell)是一类存在于肿瘤组织中的细胞,它们具有自我更新的能力,并且可以分化成为不同家族的肿瘤细胞构成整个肿瘤^[2]。肿瘤细胞具有肿瘤干细胞表型后可以获得更强的微球形成能力,分化成其他类型的肿瘤细胞,肿瘤干细胞表型的获得是恶性肿瘤重要的生物学特性,也是肿瘤复发的重要因素^[3]。近年来,有文献报道称肿瘤干细胞表型可以促进肿瘤化疗耐药性的产生,同样地,耐药细胞株也获得了更强的肿瘤干细胞特性,表明肿瘤干细胞表型与肿瘤化疗耐药密切相关^[3],然而,其中的分子机制并不明确。本研究2015年9月至2016年9月检测了肺癌耐药株和亲本株细胞的肿瘤干细胞表型,并对其中的分子机制进行了探讨,以期深入理解肿瘤化疗耐药和肿瘤干细胞表型的关系提供一些有益的实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 肺癌细胞A549和耐药株A549/CIS由本实验室培养。培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,置5%CO₂,37℃的培养箱中培养。

1.2 主要试剂 顺铂和LY294002购自Sigma-Aldrich公司;western蛋白裂解液购自碧云天;荧光定量-PCR试剂和CCK8试剂购自合肥飒英思生物技术公司;抗体pAKT、AKT、p65、p-p65、pMAPK-p38和MAPK-p38购自Cell Signaling Technology公司;抗体GAPDH购自武汉三鹰生物公司。

1.3 微球形成实验 A549和A549/CIS细胞以1 000/mL的密度接种于12孔低吸附细胞培养板,设置3个复孔,加入1 mL微球形成培养基(无血清的DMEM/F12培养基中添加1×B27试剂、终浓度为20 ng/mL的EGF、终浓度为20 ng/mL的bFGF、终浓度为5 g/mL的胰岛素、终浓度为1 g/mL的氢化可的松以及1%的双抗),每隔3天补加一定量新鲜的微球形成培养基,培养9 d后,在显微镜下观察微球形成情况,对每个培养孔中的微球(>20 μm)进行计数并拍照。

1.4 Western blotting 检测 A549和A549/CIS细胞经相应的处理后,用预冷PBS轻轻洗涤3次,冰上用Western蛋白裂解液裂解15 min,12 000 r/min离心20 min收集上清;用BCA方法对蛋白进行定量,每组用等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分离,200 mA恒定电流电转90 min将蛋白转印至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭孵育2 h,抗体均以1:1 000比例4℃孵育过夜,经PBST洗涤3次后,加入二抗以1:5 000室温孵育1.5 h,PBST洗涤3次,用ECL化学发光试剂在Western自动曝光仪中曝光。

1.5 CCK8 实验 A549和A549/CIS细胞经相应的处理后,以每孔 8×10^3 /mL接种于96孔细胞培养板,第2天贴壁生长后用不同浓度顺铂处理细胞,设5个复孔,同时设立DMSO作为LY294002的对照组。加药处理细胞24 h后,去除培养基,每孔加入100 mL新鲜培养基,同时每孔加入10 mL CCK8试剂,继续培养4 h,用酶标仪在450 nm激发光波长处检测OD值,去除每组中的最大值和最小值,以平均值来计算细胞存活率=(对照组OD值-实验组OD值)/对照组OD值,实验重复3次。

1.6 统计学方法 全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS10.0统计学软件处理。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549/CIS 细胞获得更强的肿瘤干细胞特性 利用微球形成实验比较A549和A549/CIS细胞的肿瘤干细胞特性,结果显示,在低吸附细胞培养板中生长9 d后,与A549细胞相比,A549/CIS细胞的分化生长能力更强,形成的微球数目明显增多(图1)。

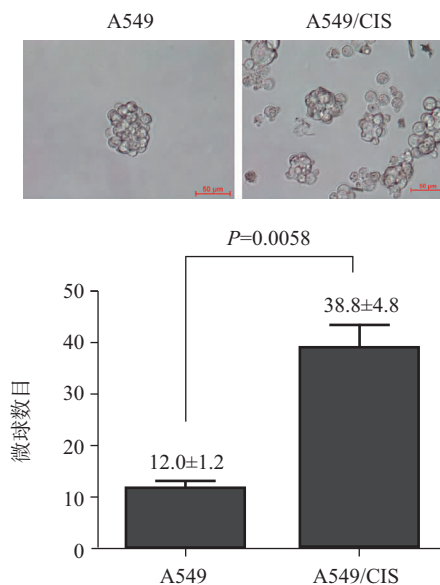


图1 微球形成实验比较A549和A549/CIS细胞的肿瘤干细胞特性(×200)

2.2 A549/CIS 细胞中 AKT 信号通路被激活 我们进一步研究了耐药细胞获得肿瘤干细胞特性的分子机制,检测了亲本株和耐药株细胞中与肿瘤干细胞表型相关信号通路 AKT、p65 和 MAPK-p38 的活化情况。Western blotting 结果显示(图 2):与 A549 细胞相比, A549/CIS 细胞中磷酸化 p65 和 MAPK-p38 的程度没有明显改变,而磷酸化 AKT 的程度明显增加,提示了 AKT 信号通路的激活可能在耐药细胞获得肿瘤干细胞表型的过程中发挥了一定的调控作用。

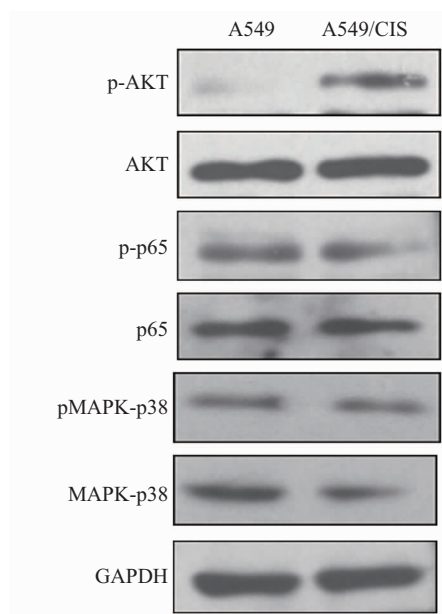


图2 A549/CIS 细胞中 AKT 信号通路被激活 Western blotting 实验比较 A549 和 A549/CIS 细胞中 AKT、p65 和 MAPK-p38 信号通路的磷酸化情况

2.3 LY294002 逆转了 A549/CIS 细胞的肿瘤干细胞表型 为了进一步研究 AKT 信号通路的激活在耐药细胞获得肿瘤干细胞表型过程中的作用,我们使用了 AKT 信号通路的抑制剂 LY294002 处理 A549/CIS 细胞,并检测对 AKT、p65 和 MAPK-p38 信号通路的影响,结果显示,LY294002 抑制了 AKT 信号通路的磷酸化,而对 p65 和 MAPK-p38 信号通

路的活化没有明显影响(图 3A)。随后我们检测了 LY294002 对 A549/CIS 细胞获得肿瘤干细胞表型的影响,微球形成实验结果显示,LY294002 处理减少了 A549/CIS 细胞的微球形成能力(图 3B)。这些结果共同表明,AKT 信号通路的活化在肺癌耐药细胞获得肿瘤干细胞表型过程中发挥了重要的调控作用。

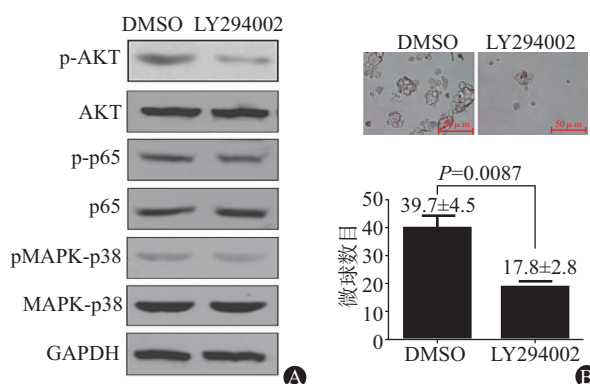


图3 LY294002 对 A549/CIS 细胞肿瘤干细胞特性的影响: A 为 Western blotting 实验检测 LY294002 对 A549/CIS 细胞中 AKT、p65 和 MAPK-p38 信号通路的影响; B 为微球形成实验检测 LY294002 对 A549/CIS 细胞肿瘤干细胞特性的影响(×200)

2.4 LY294002 降低了 A549/CIS 细胞对顺铂的耐受性 最后,我们研究了 AKT 信号通路的激活对于 A549/CIS 细胞获得顺铂耐药性的影响。用梯度浓度的顺铂联合 LY294002 处理 A549/CIS 细胞 48h, 结果显示,与对照组相比, LY294002 可以降低 A549/CIS 细胞对顺铂的耐受性(图 4)。

3 讨论

肺癌是全球范围内危害较大的肿瘤,化疗是目前治疗肺癌的主要方法之一,顺铂是目前治疗肺癌的重要化疗药物,而耐药性的产生最终导致了肺癌的治疗失败。近年来,肿瘤干细胞特性和化疗耐药之间的相关性被广泛研究。一些耐药的肿瘤细胞比不耐药的亲代细胞具有更强的肿瘤干细胞特性,比如,对顺铂耐药的肺非小细胞肺癌展示了肿瘤干

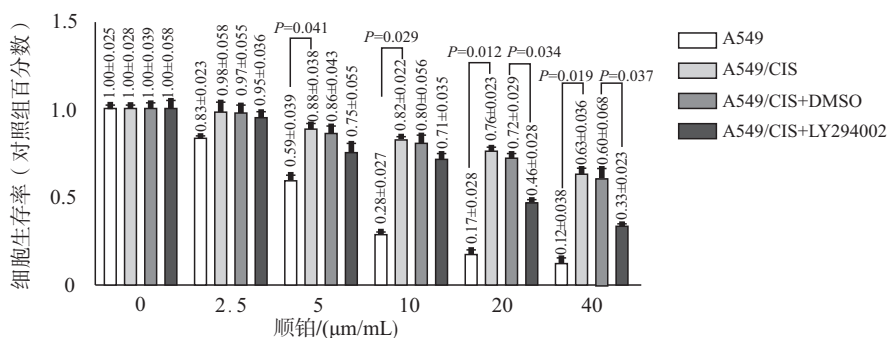


图4 LY294002 对 A549/CIS 细胞对顺铂耐受性的影响 ($F=9.135$)

细胞特性^[4];对抗凋亡的胰腺癌细胞获得了肿瘤干细胞特性和微球形成能力,表达肿瘤干细胞相关基因^[5]。而具有肿瘤干细胞特性的细胞会抵抗肿瘤化疗和放疗治疗^[6-8]。这些研究表明化疗耐药性和肿瘤干细胞特性之间存在密切关系。本研究检测了人肺癌耐顺铂细胞 A549/CIS 和亲本细胞 A549 的肿瘤干细胞特性变化,发现与亲本细胞相比,耐药细胞的微球形成能力明显增强,表明其获得了更强的肿瘤干细胞特性。

肿瘤干细胞特性的获得涉及复杂的机制,许多信号通路涉及肿瘤产生干细胞特性的过程中,为肿瘤细胞传递重要的信号信息,其中,PI3K/AKT、MAPK-p38 以及 NF- κ B 信号通路与肿瘤干细胞特性的获得密切相关^[9-11]。本研究检测了 A549 细胞和 A549/CIS 细胞中 AKT、p65 以及 MAPK-p38 信号通路的激活情况,发现与亲本细胞相比,耐药细胞 A549/CIS 中 AKT 通路明显被激活,而 p65 和 MAPK-p38 信号通路没有明显改变。近年来,不断有研究证明 PI3K/AKT 信号通路的异常激活贯穿了肿瘤发生发展的各个阶段并发挥重要调控作用。miR-106b-5p 通过激活 PI3K/AKT 信号通路,促进靶蛋白 PTEN 蛋白的表达,诱导肝癌细胞产生肿瘤干细胞特性^[9];PI3K/AKT/c-MYC 信号通路轴的激活调控了食管鳞状细胞癌获得肿瘤干细胞表型的过程^[12]。此外,PI3K/AKT 信号通路在调节细胞增殖、凋亡和分化等方面具有重要作用^[13]。结合研究的发现,我们推测 PI3K/AKT 信号通路在肺癌细胞对顺铂产生耐药性以及耐药细胞获得干细胞特性过程中发挥了重要作用。我们使用了 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002,发现它抑制了 A549/CIS 细胞的微球形成能力,减少其肿瘤干细胞特性,同时降低了 A549/CIS 细胞对顺铂的耐受性,这些结果共同表明 PI3K/AKT 信号通路的激活在肺癌耐药细胞获得肿瘤干细胞特性以及耐药性方面发挥了非常重要的调控作用。本研究的不足之处是未能更加深入的探讨 PI3K/AKT 信号通路是如何影响耐药细胞获得干细胞特性的,干细胞特性相关转录因子如 Nanog、Oct4、BMI-1 等在维持干细胞特性上发挥了重要作用,下一步的研究方向重点将探讨 PI3K/AKT 信号通路是否通过影响了这些转录因子的表达而调控了耐药细胞的干细胞特性。

总结来说,我们证明了人肺癌耐顺铂细胞株 A549/CIS 相对于亲本株获得更强的肿瘤干细胞特性,而 AKT 信号通路的激活在其中发挥了重要的调节作用,抑制 AKT 信号通路,可以减少 A549/CIS 细

胞的干细胞特性并降低其对顺铂的耐受性,这些研究为肺癌的临床治疗提供可供参考的作用靶点和潜在的临床应用价值。

参考文献

- [1] WANG H,ZHANG G,ZHANG H,et al. Acquisition of epithelial—mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway[J]. European Journal of Pharmacology,2014,723:156-166.
- [2] KONG DJ,LI YW,WANG ZW,et al. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells:Are They Cousins or Twins? [J]. Cancers (Basel),2011,3(1):716-729.
- [3] LI Y,ZHANG T,KORKAYA H,LIU S,LEE HF,SUN D. Sulforaphane,a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells [J]. Clinical Cancer Research,2010,16(9):2580-90.
- [4] BARR MP,GRAY SG,HOFFMANN AC,et al. Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like Signature[J]. PLoS One,2013,8(1):e54193. DOI:10.1371/journal.pone.0054193.
- [5] IZUMIYA M,KABASHIMA A,HIGUCHI H,et al. Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [J]. Anticancer Research,2012,32(9):3847-3853.
- [6] KORKAYA H,PAULSON A,CHARAFE-JAUFFRET E,et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ β -catenin signaling [J]. PLoS Biol,2009,7:e1000121. DOI:10.1371/journal.pbio.1000121.
- [7] SHAFEE N,SMITH CR,WEI S,et al. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors [J]. Cancer Res,2008,68:3243-3250.
- [8] HAMBARDZUMYAN D,SQUATRITO M,HOLLAND EC. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors [J]. Cancer Cell,2006,10:454-456.
- [9] SHI DM,BIAN XY,QIN CD,et al. miR-106b-5p promotes stem cell-like properties of hepatocellular carcinoma cells by targeting PTEN via PI3K/Akt pathway [J]. Oncotargets & Therapy,2018,11:571-585.
- [10] CHEN C,LUO F,YANG Q,et al. NF- κ B-regulated miR-155, via repression of QKI,contributes to the acquisition of CSC-like phenotype during the neoplastic transformation of hepatic cells induced by arsenite [J]. Mol Carcinog,2018,57(4):483-493.
- [11] XU M,REN Z,WANG X,et al. ErbB2 and p38 γ MAPK mediate alcohol-induced increase in breast cancer stem cells and metastasis [J]. Molecular Cancer,2016,15(1):52.
- [12] ZHANG H,WU C,et al. The PI3K/AKT/c-MYC Axis Promotes the Acquisition of Cancer Stem-Like Features in Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. Stem Cells,2016,34(8):2040-2051.
- [13] PORTA C,PAGLINO C,MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer [J]. Frontiers in Oncology,2014,4(4):64.

(收稿日期:2018-03-31,修回日期:2018-05-09)