

雷帕霉素逆转卵巢癌细胞系 SKOV3/DDP 顺铂耐药及其机制探讨

徐国才, 王东雁, 卢淮武, 林仲秋, 张丙忠
(中山大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究雷帕霉素对卵巢癌顺铂耐药细胞系 SKOV3/DDP 的逆转作用并探讨其相关分子机制。【方法】采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定卵巢癌顺铂耐药细胞系 SKOV3/DDP 的耐药倍数、雷帕霉素对其细胞毒性及逆转倍数; Western blot 法检测雷帕霉素对细胞内 Akt/mTOR 相关通路蛋白表达的影响。【结果】① MTT 法检测出雷帕霉素浓度分别为 25、50、100、500 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 对卵巢癌顺铂耐药细胞系 SKOV3/DDP 的抑制率分别为 4.48%、25.30%、35.86%、67.82% 和 81.43%。选择抑制率小于 5% 的最大雷帕霉素浓度即 25 $\mu\text{g/L}$ 作为逆转浓度; ② 卵巢癌顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 耐药指数 RI 为 2.21; ③ 25 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素对卵巢癌顺铂耐药细胞系 SKOV3/DDP 逆转倍数为 1.63; ④ Western blot 结果: 加用雷帕霉素后, 卵巢癌细胞 SKOV3 和卵巢癌顺铂耐药细胞 SKOV3/DDP 的 p-mTOR 及其下游的 p-p70s6k 表达均明显降低。同时, 雷帕霉素作用于 SKOV3 及 SKOV3/DDP 细胞后, 均出现 p-Akt 反馈性增高。【结论】雷帕霉素对卵巢癌顺铂耐药细胞系 SKOV3/DDP 具有耐药逆转作用, 其机制可能为通过抑制 Akt/mTOR 通路中 mTOR 及下游相关蛋白表达进而抑制耐药细胞的增殖并促进其凋亡进程。

关键词: 卵巢癌; 顺铂耐药; 雷帕霉素; 细胞凋亡

中图分类号: R737.31

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)01-0068-05

Resistance Reversion of Rapamycin on Ovarian Cancer Cell Line SKOV3/DDP and Its Molecular Mechanisms

XU Guo-cai, WANG Dong-yan, LU Huai-wu, LIN Zhong-qiu, ZHANG Bing-zhong

(Department of Gynecologic Oncology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Guangzhou 510120, China)

Corresponding to: ZHANG Bing-zhong; E-mail: 13925063030@163.com

Abstract:【Objective】To study the resistance reversion of rapamycin on ovarian cancer cell line SKOV3/DDP, and explore its underlying molecular mechanisms.【Methods】MTT method was used to detect the cell toxicity, drug-resistant multiple and reversing multiple of cisplatin-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/DDP; Western blot was used to detect the changes of Akt/mTOR Pathway induced by rapamycin.【Results】① MTT detected that when rapamycin concentration was 25, 50, 100, 500 and 1 000 $\mu\text{g/L}$, its inhibition rates on cisplatin-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/DDP were 4.48%, 25.30%, 35.86%, 67.82%, 81.43%. The concentration of 25 $\mu\text{g/L}$ was selected to be the reversal concentration, because its maximum rate was less than 5%. ② The resistant index (RI) of cisplatin-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/DDP was 2.21. ③ The reversal fold of 25 $\mu\text{g/L}$ rapamycin on cisplatin-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/DDP was 1.63. ④ Western blot results: After the addition of rapamycin, expression of p-mTOR and its downstream protein p-p70s6k in SKOV3 and SKOV3/DDP was significantly reduced. Meanwhile, there was a feedback increase in p-Akt.【Conclusions】Rapamycin has a reversal effect on cisplatin-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/DDP. Its reversal mechanism may be inhibiting the cell proliferation and promoting cell apoptosis by depressing the expression of p-mTOR and its downstream protein p-p70s6k in Akt/mTOR Pathway.

Key words: ovarian cancer; cisplatin-resistant; rapamycin; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2018, 39(1):68-72]

收稿日期: 2017-08-19

基金项目: 广东省药学会基金项目(2014D11)

作者简介: 徐国才, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 卵巢癌耐药及靶向治疗, E-mail: xuguocai1018@126.com; 张丙忠, 通信作者,

E-mail: 13925063030@163.com

卵巢癌是常见的三大妇科恶性肿瘤之一,因其发病隐匿,治疗效果欠佳,其死亡率居高不下。铂类为基础的化疗是卵巢癌术后的主要辅助治疗方法,但铂类耐药的形成严重影响了其疗效。近年来随着分子靶向药物在恶性肿瘤治疗中的应用,靶向治疗成为研究的热点。研究发现,雷帕霉素特异性阻断 mTOR 信号通路,可发挥抗肿瘤作用,与其他传统化疗药联合应用可明显提高化疗药物的促凋亡能力,进而增强肿瘤细胞对化疗的敏感性,具有逆转耐药细胞的化疗敏感性的作用^[1-2]。本实验采用卵巢癌顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP,通过检测雷帕霉素对其顺铂耐药性的影响及 Akt/mTOR 通路中相关蛋白表达的变化,研究雷帕霉素对卵巢癌细胞顺铂耐药细胞株的逆转作用及其可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

卵巢癌顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 由我院实验室构建并传代保存。RPMI 1640 培养基,胰蛋白酶、胎牛血清、二甲基亚砷、MTT 粉均购自美国 GIBICO 公司,顺铂粉剂购自山东齐鲁制药有限公司。P-Akt、P-mTOR、p70S6K 一抗均购自美国 cell signaling technology 公司。兔二抗购自武汉博士德生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 由本实验诱导构建^[3]。SKOV3 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱内,细胞呈贴壁生长,当细胞生长至 70%~80% 时胰酶消化、传代。SKOV3/DDP 条件同上,但细胞培养于含有 0.1 mg/L 顺铂的 RPMI1640 培养液(含体积分数 100 mL/L 胎牛血清),以利于耐药性的保存。

1.2.2 细胞增殖抑制率测定 选取对数生长期的 SKOV3/DDP 细胞,消化、计数,以 3 000 个/孔接种于 96 孔板,培养 24 h 待细胞贴壁。实验组分别加入不同浓度的雷帕霉素,即 0、25、50、100、500 和 1 000 μg/L。溶剂对照组为分别含与实验组相同浓度的 DMSO。继续培养 48 h,弃含药物 RPMI 1640 培养基,PBS 清洗 3 次,加入 200 μL RPMI 1640 培养基,同时每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20

μL,温箱内培养 4 h,弃培养液,加入 DMSO 150 μL/孔,摇床振荡 10 min,至紫色结晶充分溶解后,置酶标仪于 492 nm 波长处测定其吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率(%)=(1-A 实验组/A 溶剂对照组)×100%。每组均设 5 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.3 耐药指数测定 选对数生长期的 SKOV3 及 SKOV3/DDP 细胞,消化计数后以 3 000 个/孔接种于 96 孔板,两株细胞各设 3 个实验组及 1 个对照组,每组设 5 个复孔。24 h 待细胞贴壁以后,3 个实验组分别加入浓度为 1.25、2.5 及 5 mg/L 含顺铂培养基,对照组加入等体积不含顺铂的培养基,继续培养 48 h 后弃药物培养基,加入 200 μL 普通培养基,同时每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μL,温箱内培养 4 h,弃培养液,加入二甲基亚砷 150 μL/孔,摇床震荡 10 min,至紫色结晶充分溶解后,酶标仪上选择 492 nm 波长测其吸光度(A)值。分别计算出 SKOV3 及 SKOV3/DDP 在不同 DDP 浓度下的细胞生长抑制率以及用 LOGIT 法回归计算各自的 IC₅₀。耐药细胞 SKOV3/DDP 的耐药指数 RI=IC₅₀(SKOV3/DDP)/IC₅₀(SKOV3)。

1.2.4 耐药逆转实验 方法同 1.2.3,选对数生长期的 SKOV3/DDP 细胞,消化计数后以 3 000 个/孔接种于 96 孔板。实验组分别加入药物终浓度为 0、0.625、1.25 和 2.5 mg/L 的顺铂及 25 μg/L 雷帕霉素的含血清培养基;对照组无雷帕霉素,分别加入药物终浓度为 0、0.625、1.25 和 2.5 mg/L 的顺铂及 0.05% DMSO 的含血清培养基。分别计算出 SKOV3/DDP 在不同 DDP 浓度下的抑制率以及各自的 IC₅₀,最终算得雷帕霉素对顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 的逆转倍数 RI=IC₅₀(不加雷帕霉素组)/IC₅₀(加雷帕霉素组)。

1.2.5 Western blot 检测 选对数生长期的 SKOV3 及 SKOV3/DDP 细胞,消化后种于直径 60 mm 的中皿中。两株细胞各分 3 个实验组,分别为加入药物浓度为顺铂 5 mg/L,雷帕霉素 200 μg/L,顺铂 5 mg/L+雷帕霉素 200 μg/L 的培养基。对照组为含 0.05% DMSO 培养基。培养 24 h 后,分别加入 100 μL 细胞裂解液(RIPA 100 μL+PMSF 1 μL)提取细胞蛋白,BCA 法测蛋白浓度后取 30 μg 蛋白样品进行 8%SDS-PAGE 电泳,后转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,按目的蛋白分子量切膜,分别加入 P-Akt、P-mTOR、p70S6K 等抗体(1:1 000) 4°C 孵育过夜,TBST 洗涤 10 min ×3 次,后加入相应

的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育1 h, TBST洗涤10 min×3次, 最后加入新鲜配制的发光液于凝胶成像仪进行拍照记录并进行灰度分析。

1.3 统计学分析方法

所有数据均用SPSS16.0进行统计学分析与处理, 多组样本均数的比较应用单因素方差分析, 两样本均数的比较选择*t*检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 雷帕霉素对顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 生长增殖的影响

不同浓度雷帕霉素对顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 生长抑制作用如图1, 计算出25、50、100、500、和1 000 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素的细胞抑制率分别为4.48%、25.30%、35.86%、67.82%和81.43%。选择抑制率小于5%的最大雷帕霉素浓度即25 $\mu\text{g/L}$ 作为逆转浓度。

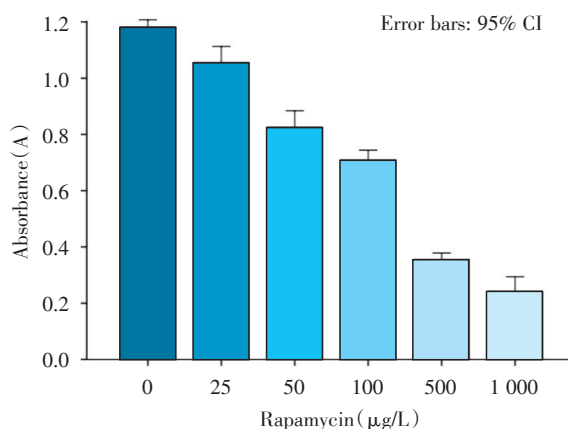


图1 不同浓度雷帕霉素对顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 生长抑制作用

Fig.1 The growth inhibition of cell line SKOV3/DDP with different concentrations of rapamycin

2.2 顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 耐药指数的测定

顺铂浓度为1.25、2.5和5 mg/L时, 对细胞株 SKOV3 的抑制率分别为(38.3±1.3)%、(52.8±2.5)%和(61.5±2.3)%, 对耐药细胞株 SKOV3/DDP 的抑制率分别为(30.1±3.4)%、(38.5±3.1)%和(49.6±3.4)%。两株细胞的 IC_{50} 分别为 SKOV3 为

2.377, SKOV3/DDP 为 5.242, 顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 耐药指数 RI 为 2.21。不同浓度顺铂对于 SKOV3 及 SKOV3/DDP 的抑制率见表1。统计方法为两样本均数的比较选择*t*检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表1 不同浓度顺铂对于 SKOV3 及 SKOV3/DDP 的抑制率
Table 1 The inhibition rates of SKOV3 and SKOV3/DDP to different concentrations of cisplatin (%)

Cell line	Cisplatin (mg/L)		
	1.25	2.5	5
SKOV3	38.3±1.3	52.8±2.5	61.5±2.3
SKOV3/DDP	30.1±3.4	38.5±3.1	49.6±3.4
<i>P</i>	0.016	0.004	0.007

2.3 雷帕霉素对顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 的耐药逆转作用

对照组无雷帕霉素作用, 顺铂浓度为0.625、1.25和2.5 mg/L时, 对于 SKOV3/DDP 的抑制率分别为(25.4±2.9)%、(31.8±3.2)%和(40.7±2.6)%。实验组25 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素作用后其相应的抑制率分别为(28.4±2.5)%、(38.2±2.4)%、(45.7±3.2)%。雷帕霉素作用后顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 的 IC_{50} 为3.29, 对照组 IC_{50} 为5.36。逆转倍数为1.63。25 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素作用前后不同浓度顺铂对于 SKOV3/DDP 的抑制率见表2。

表2 雷帕霉素作用后不同浓度顺铂对于 SKOV3/DDP 的抑制率 (%)

Table 2 The inhibition rates of SKOV3/DDP to different concentrations of cisplatin with rapamycin (%)

Rapa ($\mu\text{g/L}$)	Cisplatin (mg/L)		
	0.625	1.25	2.5
0 (control)	25.4±2.9	31.8±3.2	40.7±2.6
20	28.4±2.5	38.2±2.4	45.7±3.2

2.4 Western blot 检测 SKOV3 及 SKOV3/DDP 中 Akt/ mTOR 通路相关蛋白表达

加用雷帕霉素后, SKOV3 和耐药细胞 SKOV3/DDP 的 p-mTOR 及其下游的 p-p70s6k 表达均明显降低, SKOV3 细胞下降最明显。同时, 雷帕霉素作用于 SKOV3 及 SKOV3/DDP 细胞后, 均出现 p-

Akt 反馈性增高。统计采用两因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义(图2、图3)。

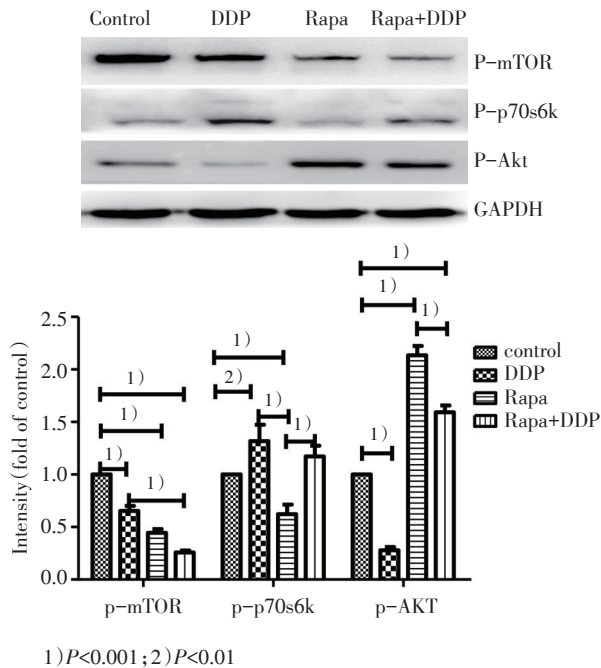


图2 SKOV3 予 200 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素、5 mg/L 顺铂单独或联合作用 24 h 后 Akt/ mTOR 通路相关蛋白水平的变化
Fig.2 The expressions of Akt/mTOR pathway proteins after 24 hours cultured with 5 mg/L cisplatin alone or combine with 200 $\mu\text{g/L}$ rapamycin in cell line SKOV3

3 讨论

3.1 雷帕霉素与逆转卵巢癌顺铂耐药

近些年研究发现, mTOR 信号通路与顺铂耐药形成密切相关^[4-5]。有学者发现, 雷帕霉素能逆转肺癌多药耐药细胞系的耐药性, 并且和 mTOR 介导的信号传导通路有关^[6]。雷帕霉素是 mTOR 特异性的抑制剂, 可特异性结合 FKBP, 引起 mTOR 蛋白的表达下调及蛋白活化, 阻止下游 S6K1 和 4E-BP1 磷酸化, 抑制并干扰细胞周期蛋白产物的表达和细胞周期依赖性激酶(CDK)的活性, 使细胞周期 G1 后期至 S 期被阻断, 同时 mTOR 信号通路也通过调节凋亡相关蛋白 p53、Bax、Bcl-2 等的表达调节细胞的生长增殖, 最终导致细胞周期停滞和细胞凋亡, 进而可以逆转耐药^[7]。另外, 也有研究发现, 在多药耐药 B 淋巴细胞系中, 雷帕霉素能使 P-gp 泵失活, 而 P-gp 泵能通过多种机制导致耐药^[8]。

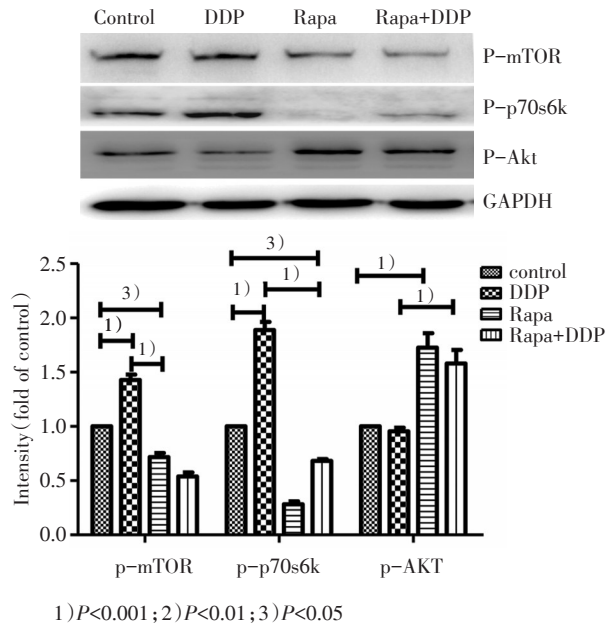


图3 SKOV3/DDP 予 200 $\mu\text{g/L}$ 雷帕霉素、5 mg/L 顺铂单独或联合作用 24 h 后 Akt/ mTOR 通路相关蛋白水平的变化
Fig.3 The expressions of Akt/mTOR pathway proteins after 24 hours cultured with 5 mg/L cisplatin alone or combine with 200 $\mu\text{g/L}$ rapamycin in cell line SKOV3/DDP

对于耐药的肿瘤细胞来说, 当一种药物或物质与抗肿瘤药物配伍应用, 抗肿瘤药物的使用剂量不变或降低时, 对肿瘤细胞的抑制效应增强, 可以认定为逆转效应。结合本实验结果, 我们将不产生细胞毒作用的 25 $\mu\text{g/L}$ 的雷帕霉素(选择抑制率小于 5% 的最大雷帕霉素浓度作为逆转浓度)作用于 SKOV3/DDP 细胞, 结果发现其 IC_{50} 从单独使用顺铂的 5.36 mg/L 降至 3.29 mg/L, 逆转倍数为 1.63(表 2)。这表明逆转剂量雷帕霉素对 SKOV3/DDP 细胞无明显抑制作用, 但与顺铂并用后能显著增加耐药细胞对顺铂的敏感性, 可部分逆转细胞的耐药性。

3.2 雷帕霉素逆转卵巢癌顺铂耐药的机制

在此前的研究中, 我们发现雷帕霉素联合顺铂作用于 SKOV3 细胞株较顺铂单独使用更易发生细胞增殖抑制及凋亡^[9]。本实验中, 加用雷帕霉素后, SKOV3 和耐药细胞 SKOV3/DDP 的 p-mTOR 及其下游的 p-p70s6k 表达均明显降低, 提示其逆转作用可能与下调肿瘤细胞 mTOR 的表达进而抑制细胞增殖诱导凋亡有关。已有研究表明^[10], 铂类耐药形成过程中存在 mTOR 信号通路

异常激活,磷酸化其下游的4E-BP1及p70s6k,可以导致周期蛋白、周期依赖性蛋白以及DNA损伤修复蛋白合成增加,从而促进细胞损伤修复和分裂增殖。故我们认为,雷帕霉素在非耐药细胞SKOV3中可以通过抑制mTOR及其下游的p-p70s6k表达,抑制细胞增殖及促进细胞凋亡,同时在耐药细胞SKOV3/DDP中也可以通过以上途径促进耐药细胞凋亡进而实现逆转耐药。

同时,从本实验结果(图2、3)看出,雷帕霉素作用于SKOV3及SKOV3/DDP细胞后,出现p-Akt

反馈性增高,表明抑制mTOR分子可以负反馈激活Akt,而Akt作为Akt/mTOR通路的上游分子,又可以调控多个与细胞凋亡相关分子,如caspase-9、P53和Bcl-2等^[11-12],如此可以间接促进细胞凋亡。故我们可以推测,雷帕霉素可以通过特异性抑制Akt/mTOR通路逆转卵巢癌顺铂耐药细胞株耐药性。但雷帕霉素逆转耐药的具体机制,及其如何负反馈激活Akt促进细胞凋亡进程相关分子机制尚不清楚,有待进一步实验探索。

参考文献:

- [1] Liu J, Zhang L, Zhang X, et al. Rapamycin enhanced the antitumor efficacy of oxaliplatin in cisplatin-resistant ovarian cancer cells A2780cis both in vitro and in vivo[J]. *J Chemother*, 2015, 27(6): 358-364.
- [2] Yellepeddi VK, Vangara KK, Kumar A, et al. Comparative evaluation of small-molecule chemosensitizers in reversal of cisplatin resistance in ovarian cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9): 3651-3658.
- [3] 徐国才,相媛媛,张莘,等. Akt/mTOR通路相关蛋白在卵巢癌顺铂耐药细胞株SKOV3/DDP中的表达研究. *现代妇产科进展*, 2013, 22(2): 102-105.
Xu GC, Xiang YY, Zhang X, et al. Establishment of cisplatin-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/cDDP and investigation of the expression of Akt/mTOR signaling pathway protein using this cell line[J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2013, 22(2): 102-105.
- [4] Mccubrey JA, Steelman LS, Kempf CR, et al. Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(11): 2762-2781.
- [5] Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment[J]. *Drug Resist Updat*, 2008, 11(3): 63-76.
- [6] Wu C, Wangpaichitr M, Feun L, et al. Overcoming cisplatin resistance by mTOR inhibitor in lung cancer[J]. *Molecular cancer*, 2005, 4(1): 25.
- [7] Wong SW, Tiong KH, Kong WY, et al. Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128(2): 301-313.
- [8] Pop IV, Pop LM, Ghetie MA, et al. Targeting mammalian target of rapamycin to both downregulate and disable the P-glycoprotein pump in multi-drug-resistant B-cell lymphoma cell lines[J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(7): 1155-1162.
- [9] 相媛媛,张莘,徐国才,等. 西罗莫司联合顺铂对卵巢上皮性癌细胞增殖的抑制作用及其分子机制. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(9): 686-688.
Xiang YY, Zhang X, Xu GC, et al. Effect of sirolimus combined with cisplatin on inhibition of proliferation and its molecular mechanism in ovarian cancer cell line SKOV3[J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2012, 47(9): 686-688.
- [10] Guangan He, Jian Kuang, et al. The impact of S- and G2 checkpoint on the fidelity of G1-arrest by cisplatin and its comparison to a non-cross-resistant platinum (IV) analog[J]. *Gynecologic Oncology*, 2011, 122(2): 402-409.
- [11] Xue M, Ji X, Xue C, et al. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3 β pathway in vivo and in vitro[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94(10): 898-908.
- [12] Yang X, Fraser M, Abedini MR, et al. Regulation of apoptosis-inducing factor-mediated, cisplatin-induced apoptosis by Akt[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(4): 803-808.

(编辑 余菁)