

吉非替尼对结肠癌细胞的生长抑制作用与 PTEN 表达的关系

杨黎 潘凤 陈玉英 梁后杰

【摘要】 目的 观察表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼对人结肠癌细胞的生长抑制作用,探讨这种作用与结肠癌细胞 PTEN 表达的关系。**方法** 应用体外药物敏感实验检测吉非替尼对 6 种人结肠癌细胞系的生长抑制作用;应用 RT-PCR 检测不同结肠癌细胞中 PTEN mRNA 水平;应用 Western blot 检测结肠癌细胞中 PTEN 蛋白表达水平。**结果** 吉非替尼在体外对 6 种结肠癌细胞系的生长抑制作用差异很大 ($F = 325.51, P < 0.05$)。吉非替尼作用浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, Lovo 细胞系抑制率达 34%, 对吉非替尼最为敏感, 其半量抑制浓度 (IC_{50}) $< 10 \mu\text{mol/L}$; HT29 和 SW480 为中度敏感 ($10 \mu\text{mol/L} < \text{IC}_{50} < 100 \mu\text{mol/L}$); 而 HCT116, LS174T 和 SW620 不敏感, 其 $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$ 。各个细胞系中 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白均有表达。**结论** 吉非替尼对结肠癌细胞的生长抑制作用与 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白表达水平无明显相关, 即 PTEN 表达状态还不能作为预测结肠癌对吉非替尼敏感性的可靠生物学指标。

【关键词】 结肠肿瘤; 细胞系; PTEN; 吉非替尼; 生长抑制

【中图分类号】 R735.3⁺5 **【文献标识码】** A

Relationship between PTEN expressions and inhibitory effects of Gefitinib on the growth of colon cancer cells YANG Li, PAN Feng, CHEN Yu-ying, LIANG Hou-jie. Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: LIANG Hou-jie, E-mail: lianghoujie@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the inhibitory effect of Gefitinib, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, on the growth of human colon cancer cells, and investigate the relationship between the sensitivity of colon cancer cells to Gefitinib and PTEN expressions. **Methods** The inhibitory effects of Gefitinib on 6 kinds of colon cancer cells (Lovo, HCT116, HT29, LS174T, SW480 and SW620), the levels of PTEN mRNA in different colon cancer cells, and PTEN protein expressions in colon cancer cells were detected by MTT assay, RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** The inhibitory effects of Gefitinib on the 6 colon cancer cells *in vitro* varied a lot. When the concentration of Gefitinib was $1 \mu\text{mol/L}$, Lovo cells had the most sensitivity to Gefitinib with an $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$; HT29 and SW480 had moderate sensitivity, and the IC_{50} ranged from $10 \mu\text{mol/L}$ to $100 \mu\text{mol/L}$; HCT116, LS174T and SW620 were insensitive to Gefitinib, and their $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$. All the colon cancer cell lines exhibited PTEN mRNA and protein expressions. **Conclusions** PTEN mRNA and protein expressions might not be associated with the inhibitory effects of Gefitinib on the growth of colon cancer cells. The expression of PTEN can not be taken as the indication of the sensitivity of colon cancer cells to Gefitinib.

【Key words】 Colon cancer; Cell line; PTEN; Gefitinib; Growth inhibition

吉非替尼 (Gefitinib, ZD1839, Iressa) 是目前备受关注的靶向治疗药物, 是一种具有口服活性的选择性表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂, 能阻断 EGFR 激活的多条信号通路。吉非替尼对不同的结肠癌细胞系均表现出不同程度的抗肿瘤活性^[1-2]。PTEN 是一种具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 当 PTEN 功能减弱或缺失, 可引起 EGFR 下游通路中的 Akt

过度活化, 降低细胞对凋亡的敏感性。本文将探讨结肠癌细胞对吉非替尼的敏感性与 PTEN 表达的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞系培养

人结肠癌细胞系 Lovo、HCT116、HT29 为本室传代保存, LS174T、SW480、SW620 购自中国科学院上海细胞生物研究所。SW620 用 Leibovitz L-15 培养液, 其余以 DMEM 高糖培养液培养, 其中含 10% 胎牛血清, 各 100 U/ml 的青霉素、链霉素, 用 0.25%

胰酶消化传代。取对数生长期的细胞用于各项实验。

1.2 药物和主要试剂

吉非替尼(阿斯利康制药有限公司)溶解于二甲基亚砒(DMSO)中,储存浓度为 200 mmol/L, -20 ℃ 保存,仅在每次实验前用新鲜培养液稀释至所需浓度,作用于细胞的 DMSO 浓度不超过 0.1%。

二甲基四氮唑蓝、DMSO 等购自美国 Sigma 公司;Tripure 为瑞士 Roche 公司产品;M-MLV 逆转录酶为美国 Promega 公司产品;混合 Taq 酶为北京天为时代科技有限公司产品;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;抗 PTEN 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;内参 β -肌动蛋白抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;化学发光试剂盒购自美国 Pierce Biotechnology 公司。

1.3 体外药物敏感实验

调整细胞浓度后取 100 μ l 以每孔含细胞数 5000 个接种于 96 孔培养板中,37 ℃ 孵育 24 h 后,每孔加入含不同药物浓度的完全培养液 100 μ l,对照组不含药物只加入等量的 DMSO,每组设 4 个复孔,继续孵育 72 h。每孔加 20 μ l 二甲基四氮唑蓝液(5 g/L),培养 4 h 后小心吸去培养液,每孔加入 200 μ l DMSO。用 Model 550 型酶标仪在 490 nm 下测吸光值(OD 值),计算药物的细胞生长抑制率:抑制率(%) = (1 - 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) \times 100%,并求出半量抑制浓度(IC₅₀),每个实验重复 3 次。

1.4 RT-PCR 检测

按 Tripure 试剂说明提取细胞总 RNA,取 2 μ g RNA 合成 cDNA。根据 Gene Bank 提供的 PTEN mRNA 序列设计合成引物。上游引物:5'-GGTTCACATC-CTACCCCTTTG-3',下游引物:5'-CATTCTTTGTTGA-TAGCCTCCA-3',产物长度 453 bp。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。以磷酸甘油醛脱氢酶为内参照,产物长度 715 bp。

1.5 Western blot 检测

以 RIPA 细胞裂解液提取各种细胞总蛋白。以 Bradford 法测定蛋白浓度。取各组 50 μ g 蛋白上样,经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(10% SDS-PAGE)电泳分离,电转移至 PVDF 膜。抗 PTEN 一抗(1:1000)4 ℃ 孵育过夜。HRP 标记的二抗(1:2000)室温孵育 1 h,避光显影检测杂交信号。

1.6 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌细胞系对吉非替尼的敏感性

吉非替尼在体外对 6 种结肠癌细胞系的生长抑制作用差异很大(图 1)。在吉非替尼作用浓度为 1 μ mol/L 时,LoVo 结肠癌细胞系的抑制率已达 34%,

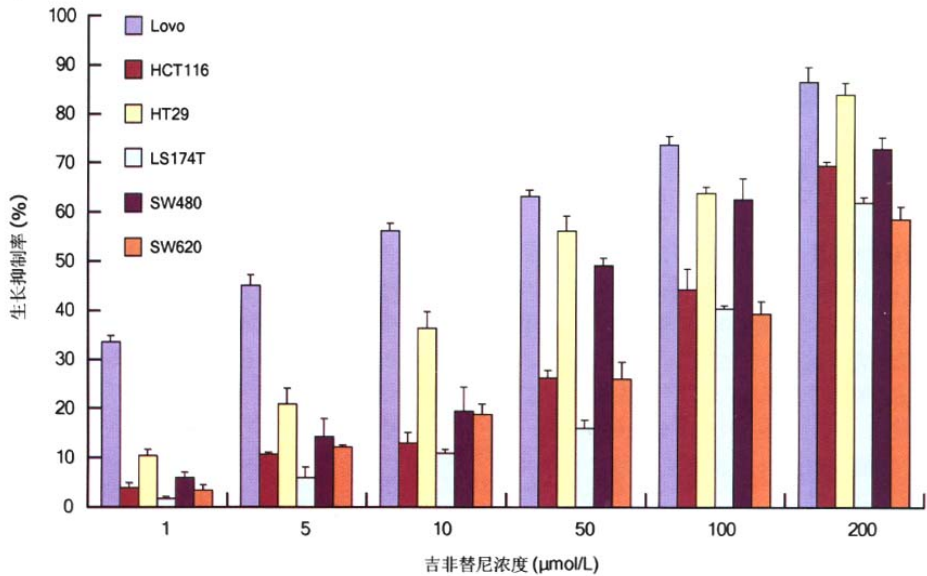


图 1 不同浓度吉非替尼在体外对结肠癌细胞系的生长抑制作用

远远高于其他 5 种结肠癌细胞系,差异有统计学意义($F = 325.51, P < 0.05$)。如图 2 所示, Lovo 对吉非替尼最为敏感, $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$; HT29 和 SW480 为中度敏感($10 \mu\text{mol/L} < IC_{50} < 100 \mu\text{mol/L}$); 而 HCT116、LS174T 和 SW620 不敏感, 其 $IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$, 与 Lovo 比较差异均有统计学意义($F = 156.09, P < 0.05$)。

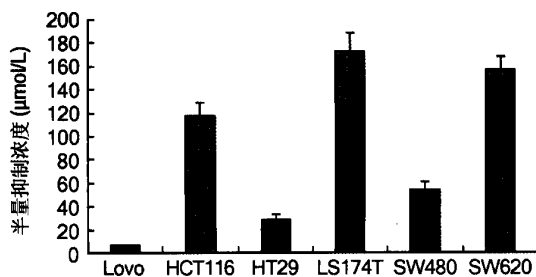
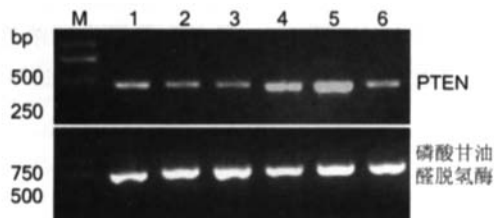


图2 吉非替尼在体外对结肠癌细胞系的生长抑制效应

2.2 结肠癌细胞系 PTEN mRNA 表达

RT-PCR 结果显示, Lovo、HCT116、HT29、LS174T、SW480 和 SW620 结肠癌细胞系均不同程度表达 PTEN mRNA(图 3)。其灰度值依次为 $1.31 \pm 0.04, 0.96 \pm 0.06, 0.97 \pm 0.11, 2.38 \pm 0.07, 1.36 \pm 0.05, 0.95 \pm 0.08$, 其中 LS174T 表达最强, 其他细胞系间无差异。



M: Marker; 1: Lovo; 2: HCT116; 3: HT29; 4: SW480; 5: LS174T; 6: SW620

图3 RT-PCR 扩增的结肠癌细胞系 PTEN mRNA 的表达

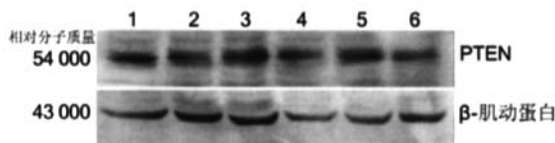
2.3 结肠癌细胞系 PTEN 蛋白表达

Western blot 检测结果可见, Lovo、HCT116、HT29、LS174T、SW480 和 SW620 结肠癌细胞系的 PTEN 蛋白均有表达, 但表达相差不大, 见图 4。其灰度值依次为 $1.05 \pm 0.11, 0.59 \pm 0.03, 1.12 \pm 0.15, 0.90 \pm 0.13, 1.10 \pm 0.16, 0.53 \pm 0.14$ 。

2.4 各结肠癌细胞系对吉非替尼的敏感性与相应 PTEN 表达水平的关系

Lovo 细胞系对吉非替尼最为敏感, LS174T、HCT116 和 SW620 的敏感性最差, 耐药倍数是 Lovo 的 20~30 倍, 而 PTEN 表达在 Lovo 与耐药细胞之

间的差异性却不明显。另外 HT29 和 SW480 属中度敏感, 但其 PTEN 表达与对吉非替尼最不敏感和最敏感的结肠癌细胞之间相差也不明显。



1: Lovo; 2: HCT116; 3: HT29; 4: SW480; 5: LS174T; 6: SW620

图4 Western blot 检测结肠癌细胞系 PTEN 蛋白的表达

3 讨论

目前, 吉非替尼对结肠癌细胞生长抑制作用的研究多集中于 EGFR 和磷酸化 EGFR 表达以及 EGFR 酪氨酸激酶域突变^[3]。然而越来越多的研究发现 EGFR 突变在结肠癌中并非一个常发事件, 并且 EGFR 活性也不能完全决定肿瘤细胞对吉非替尼的敏感性^[4]。EGFR 的下游信号通路并不为药物所阻断, 可能是细胞内的信号发生变异, 不依赖 EGFR 转导的信号而促进肿瘤细胞增殖^[5]。PI3K/Akt 通路是 EGFR 下游信号通路的关键组成部分, 在肿瘤细胞对吉非替尼产生耐药时 PI3K/Akt 通路活性也有所改变。当 PTEN 功能减弱或缺失, 在细胞膜上磷脂酰肌醇三磷酸盐积聚, 将引起 Akt 的异常活化。PTEN 在多数恶性肿瘤中表达降低或缺失, 在肿瘤发生、发展和转移中发挥重要作用, 而且在 PI3K/Akt 通路中最易发生活性改变^[6]。

本研究入组结肠癌细胞系以 RT-PCR 和 Western blot 检测 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白均有不同程度表达, 其中 mRNA 水平以 LS174T 表达最强, 而在蛋白水平 LS174T 和其他细胞系差异不明显。这可能与转录后的蛋白翻译和修饰有关。研究结果与国外文献报道相符^[7]。PTEN 表达缺失在结肠癌可能并不常见, 也许 PTEN 多表现为表达减弱或功能失活。

本研究观察了 6 种人结肠癌细胞系对吉非替尼的敏感性, 其结果与大多文献报道的结肠癌细胞对吉非替尼的敏感性基本相符^[2,8]。关于肿瘤细胞 PTEN 表达与吉非替尼敏感性的关系观点尚不一致。恶性胶质瘤 LN229 细胞系具有野生型 PTEN, 且功能完整, 磷酸化 Akt 处于低表达水平, 而该细胞系对吉非替尼的生长抑制作用并不敏感, 认为 PTEN 表达与耐药机制无关^[9]。临床研究以免疫组织化学染色法检测 93 例非小细胞肺癌患者 PTEN 的表达状况, 发现该基因表达缺失与磷酸化 Akt 表达水平和患者对吉非替尼的治疗反应性无明显相关,

推断 PTEN 不是预示非小细胞肺癌原发性耐药的生物学指标^[10]。

然而也有结论不一致的研究,认为 PTEN 的表达状态与吉非替尼耐药有关。吉非替尼诱导 MDA-468 乳腺癌细胞系产生继发性耐药后,PTEN 出现突变或表达缺失以及 PI3K/Akt 活性上调。以腺病毒转染野生型 PTEN 到 PTEN 表达缺失的耐药肿瘤细胞中,可观察到 PI3K/Akt 活性降低以及对吉非替尼反应性提高^[11]。PTEN 表达下降或缺失是引起非小细胞肺癌细胞系对吉非替尼原发性耐药的机制之一,下调 PI3K/Akt 活性可使治疗敏感性恢复或提高^[12]。对于以上不同的观点,分析原因除了药物敏感性与肿瘤组织类型、检测 PTEN 表达的手段有关以外,更重要的是肿瘤细胞信号转导的复杂性,这一特性使得很难由单一因素确定细胞对药物敏感性的高低。

总之,肿瘤细胞信号转导的复杂性和网络性决定了寻找反映吉非替尼敏感性指标的艰巨性。本研究通过观察吉非替尼对 6 种人结肠癌细胞系的生长抑制作用与 PTEN 表达的关系,认为 PTEN 表达状态还不能作为预测结肠癌对吉非替尼敏感性的可靠的生物学指标。

参考文献

- [1] Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, et al. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res*, 2002, 62(20): 5749-5754.
- [2] Koizumi F, Kanzawa F, Ueda Y, et al. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ("Iressa") and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer*, 2004, 108(3): 464-472.
- [3] Van Schaeybroeck S, Karaïskou-McCaul A, Kelly D, et al. Epi-

dermal growth factor receptor activity determines response of colorectal cancer cells to gefitinib alone and in combination with chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(20): 7480-7489.

- [4] Kimura T, Maesawa C, Ikeda K, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in gastrointestinal tract tumor cell lines. *Oncol Rep*, 2006, 15(5): 1205-1210.
- [5] Kassouf W, Dinney CP, Brown G, et al. Uncoupling between epidermal growth factor receptor and downstream signals defines resistance to the antiproliferative effect of gefitinib in bladder cancer cells. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10524-10535.
- [6] Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett*, 2006, 241(2): 184-196.
- [7] Khaleghpour K, Li Y, Banville D, et al. Involvement of the PI3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 2004, 25(2): 241-248.
- [8] Cunningham MP, Thomas H, Fan Z, et al. Responses of human colorectal tumor cells to treatment with the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ICR62 used alone and in combination with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7708-7715.
- [9] Li B, Chang CM, Yuan M, et al. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7443-7450.
- [10] Cappuzzo F, Toschi L, Tallini G, et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGFR-1) is significantly associated with longer survival in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol*, 2006, 17(7): 1120-1127.
- [11] She QB, Solit D, Basso A, et al. Resistance to gefitinib in pten-null her-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of pten function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(12): 4340-4346.
- [12] Kokubo Y, Gemma A, Noro R, et al. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*, 2005, 92(9): 1711-1719.

(收稿日期: 2007-11-27)

(本文编辑: 毛蜀)

第五届全军肝胆外科、第二届全军器官移植、第一届全军实验外科联合学术会议征文通知

经中国人民解放军肝胆外科专业委员会、器官移植学专业委员会和普外专业委员会实验外科学组共同商定,报请总部批准,第五届全军肝胆外科、第二届全军器官移植、第一届全军实验外科学术会议将于 2008 年 6 月 27-29 日在西安陕西宾馆召开。

征文内容:(1)肝脏肿瘤、外伤及其他疾病的诊治和相关基础研究;(2)胆道肿瘤、胆石病、胆管损伤、腔镜外科的诊疗经验;(3)胰腺炎及胰腺癌的影像、生化诊断、治疗以及基础与临床研究;(4)门静脉高压症的综合治疗;(5)门静脉高压症的免疫功能损害,特殊感染问题与营养支持以及实验研究;(6)各种器官、组织、细胞移植的基础与临床研究;(7)器官移植术后并发症的防治以及中长期管理的相关问题;(8)移植免疫学的相关基础与临床研究;(9)普通外科的实验研究、前瞻性临床研究;(10)外科各专业领域的新理论、新技术、新方法;(11)实验动物模型等。

征文要求:(1)投稿须为未公开发表的论文,请寄全文及 800 字以内摘要各一份,欢迎电子邮件投稿:gdwk@fmmu.edu.cn。(2)如无上网条件请附软盘(Word 格式),无电子版者恕不录入论文汇编;来稿请寄:西安市第四军医大学西京医院肝胆外科 刘正才 收,邮编:710032。请于信封左下角注明“会议征文”字样。(3)征文截稿日期:2008 年 5 月 10 日。

本次会议为国家级继续医学教育项目,参加者可获得国家 I 类继续医学教育学分,会议交流的论文颁发中华医学会论文证书。欢迎全军和地方的外科同道参加会议。联系人:宋振顺、刘正才;电话(传真):029-84773564。