

示前置胎盘中 Snail mRNA 表达水平不随 Snail 蛋白表达水平升高而升高, 由于 Snail 蛋白表达水平升高取决于两个方面: 一方面按照 Snail mRNA 上的遗传信息合成蛋白质增多, 另一方面是蛋白的降解作用减弱, mRNA 水平不升高, 而 Snail 蛋白表达水平升高。研究结果表明在前置胎盘中可能存在 Snail 蛋白降解途径受阻, 其具体发生机制有待进一步研究。

本研究结果显示, 胎盘植入入胎母体面 Snail 表达较正常升高, 表明 Snail 表达升高可通过促进 EMT 变化参与胎盘植入发病。该研究有助于进一步理解胎盘植入的发病机制, 并在临床上为胎盘植入的诊疗提供思路。

#### 参考文献

- [1] 杜培丽, 陈敦金. 胎盘植入诊治过程中应关注的问题. 中华产科急救电子杂志, 2014, 3: 4-7.
- [2] Mezencev R, Matyunina LV, Jabbari N, et al. Snail-induced epithelial-to-mesenchymal transition of MCF-7 breast cancer cells: systems analysis of molecular changes and their effect on radiation and drug sensitivity. BMC Cancer 2016, 16: 236.

- [3] Craene BD, Denecker G, Vermassen P, et al. Epidermal snail expression drives skin cancer initiation and progression through enhanced cytoprotection, epidermal stem/progenitor cell expansion and enhanced metastatic potential. Cell Death Differ, 2014, 21: 310-320.
- [4] Villarejo A, Cortés A, Molina P, et al. Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. J Biol Chem, 2014, 289: 930-941.
- [5] Tessier DR, Yockell-Lelièvre J, Gruslin A, et al. Uterine spiral artery remodeling: the role of uterine natural killer cells and extravillous trophoblasts in normal and high-risk human pregnancies. Am J Reprod Immunol, 2015, 74: 1-11.
- [6] Wehrum MJ, Buhimschi IA, Salafia C, et al. Accreta complicating complete placenta previa is characterized by reduced systemic levels of vascular endothelial growth factor and by epithelial-to-mesenchymal transition of the invasive trophoblast. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204: 411e1-411e11.
- [7] Rao KP, Belogolovkin V, Yankowitz J, et al. Abnormal placentation evidence-based diagnosis and management of placenta previa placenta accreta. Obstet Gynecol Surv, 2012, 67: 503-519.

(收稿日期: 2016-10-19)

## 低糖高乳酸环境下吉非替尼诱导 HeLa 细胞 EGFR-TKI 耐药的研究

李苹 李丽娜 李明珠 吕育纯 林丽蓉

**【摘要】** 目的 探讨低糖高乳酸微环境对表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 抑制 HeLa 细胞的影响和可能机制。方法 HeLa 细胞在常糖 (葡萄糖 10 mmol/L) 和低糖高乳酸 (葡萄糖 3 mmol/L + 乳酸 2.5 mmol/L) 环境下培养, 并分别给予 2.67  $\mu$ mol/L 吉非替尼干预。采用 CCK-8 法测定 HeLa 细胞生长抑制率, 流式细胞术检测细胞周期, 荧光定量 RT-PCR 检测 EGFR 和 mTOR mRNA 水平的表达。结果 与常糖组比较, 低糖乳酸组 24 h 和 72 h 细胞抑制率均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 48 h 细胞抑制率略高于常糖组。与吉非替尼阴性组比较, 常糖 + 吉非替尼组和低糖乳酸 + 吉非替尼组在 24、48、72 h 三个时点细胞抑制率均显著上升 ( $P < 0.01$ )。与常糖组相比, 低糖乳酸组 48 h 细胞诱导凋亡率显著上升 ( $P < 0.01$ ), 低糖乳酸 + 吉非替尼组细胞诱导凋亡率较低糖乳酸组显著降低 ( $P < 0.01$ )。与常糖组比较, 低糖乳酸组存活细胞的 EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平上调 ( $P < 0.05$ )。常糖 + 吉非替尼组的 EGFR 和 mTOR mRNA 水平均上调 ( $P < 0.05$ )。与低糖乳酸组比较, 低糖乳酸 + 吉非替尼组的 EGFR 和 mTOR mRNA 上调水平有显著差异 ( $P < 0.01$ )。结论 高乳酸低糖环境下吉非替尼可大幅度上调存活 HeLa 细胞 EGFR 和 mTOR 表达水平, 可能是诱导 HeLa 细胞抵抗 EGFR-TKI 的机制。

**【关键词】** HeLa 细胞; 葡萄糖; 乳酸; 表皮生长因子受体; 雷帕霉素受体

宫颈癌是严重危害女性健康的常见恶性肿瘤之一, 尽管其手术及放化疗治疗日趋成熟, 靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 的药物广泛应用<sup>[1]</sup>, 但目前部分病例在用药半年左右出现耐药。肿瘤细胞大部分处于低氧低糖高乳酸环境, 这种环境对抗肿瘤药物的效果是否有影响尚未见报道。本文通过比较表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI) 吉非替尼对低糖和高乳酸环境下宫颈癌细胞株 HeLa 细胞生存和周期

的影响, 以及相关基因表达水平的变化, 初步探讨低糖高乳酸微环境对 EGFR-TKI 抗肿瘤效果的影响和可能的机制。

#### 材料与方 法

1. 实验材料: 人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞购自北京协和细胞资源中心。RT-PCR 引物由 Invitrogen 公司化学合成。Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司。M-MLV 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司。qPCR mix 购自北京康为世纪科

doi: 10.13390/j.issn.1672-1861.2017.02.026

基金项目: 泉州市第一医院青年科研 (2014-QN-24); 泉州市科技计划项目 (2015241); 国家面上项目 (81672094)

作者单位: 362001 福建医科大学附属泉州市第一医院 (李苹、李明珠、吕育纯); 北京中医药大学 (李丽娜); 厦门大学 (林丽蓉)

通信作者: 吕育纯 Email: Lyuchun1986@163.com

技有限公司, CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究所, AnnexinV-FIT/PI 细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒均购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 兔抗人 EGFR 抗体, 兔抗人 mTOR 抗体均购自美国 SantaCruz 公司。吉非替尼购自广州市亿邦医药科技有限公司。

## 2. 实验方法

(1) 细胞培养与分组: HeLa 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中。取对数生长期贴壁细胞, 分为常糖组 (葡萄糖 10 mmol/L)、低糖乳酸组 (葡萄糖 3 mmol/L, 乳酸 2.5 mmol/L) 及常糖 + 吉非替尼组 (吉非替尼 2.67  $\mu$ mol/L) 和低糖乳酸 + 吉非替尼组。

(2) CCK-8 法检测细胞生长: 参考文献 [2] 方法, 检测细胞存活状况。取对数生长期细胞调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  个/ml, 接种于 96 孔板中, 100  $\mu$ l/孔, 每组 6 个复孔。接种 24 h 后上述方法分组, 继续培养, 24、48、72 h 后分别取细胞, 加入 CCK-8 液 5  $\mu$ l, 孵育 4 h, 450 nm 下测定各孔吸光值, 以常糖组为对照, 计算抑制率 [抑制率 = (1 - 实验组 / 对照组)  $\times$  100%], 绘制细胞生长曲线。

(3) 细胞周期的检测: 碘化丙啶染色结合流式细胞术检测细胞周期 [3]: 取对数生长期细胞调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  个/ml 接种。接种 24 h 后按上述方法分组, 继续培养 48 h 后以 PBS 洗涤 1 次以去除死细胞, 胰酶消化, PBS 洗涤细胞 1 次, 70% 冰乙醇 4  $\times$  固定 30 min。300 r/min 离心 5 min, 流式细胞仪检测 DNA 含量。

(4) 细胞凋亡的检测: 藻红蛋白标记的 annexin V 和碘化丙啶联合染色 (annexin V-PE/PI) 结合流式细胞术检测细胞凋亡 [4]。取对数生长期细胞调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  个/ml, 接种于 6 孔板中, 2 ml/孔, 每组 3 个复孔。接种 24 h 后按上述方法分组, 培养 46 h 后以 PBS 洗涤 1 次以去除死细胞, 更换无血清培养基, 继续培养 2 h 以诱导凋亡。以不含 EDTA 的胰酶消化, 收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 500  $\mu$ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5  $\mu$ l PI 溶液混匀, 室温避光 15 min。流式细胞仪检测。

(5) EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平的检测: 取对数生长期细胞调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  个/ml, 接种, 100  $\mu$ l/孔, 每组 6 个复孔。接种 24 h 后按上述方法分组, 继续培养, 48 h 后以 PBS 洗 1 次以去除死细胞, 然后用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。引物: EGFR F 5'-GCTTGATTCCAGTGGTTCT -3', EGFR R 5'-GACAGAGTGGCTTATCCTAC -3'; mTOR F 5'-GAA TGG CTG AGA CGG CTG AG -3', mTOR R 5'-GCG ATG TCT TGT GAG GTG AGG -3'; 内参引物 beta-actin F 5'-TTG CCG ACA GGA TGC AGA AGG -3', beta-actin R 5'-AGG TGG ACA GCG AGG CCA GGA T -3'。ABI7500 型荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。参考文献 [5] 采用  $2^{-CT}$  法计算目的基因相对于管家基因的定量。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据

分析, 细胞生长抑制率、细胞周期和细胞凋亡采用单因素方差分析, 组间比较采用 Dunnett T3 检验。qRT-PCR 结果采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis 单因素 ANOVA 分析。

## 结 果

1. 细胞生长状况的变化: 与常糖组比较, 低糖乳酸组 24 h 和 72 h 细胞抑制率均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 48 h 细胞抑制率略高于常糖组 ( $P > 0.05$ )。与吉非替尼阴性组比较, 无论是常糖 + 吉非替尼组还是低糖乳酸 + 吉非替尼组, 24、48、72 h 三个时点细胞抑制率均显著上升 ( $P < 0.01$ ), 但 48 h 细胞抑制率最低, 见表 1。

表1 吉非替尼对低糖和高乳酸环境中HeLa细胞抑制率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	24 h	48 h	72 h
常糖组	3	0.24 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.20	0.30 $\pm$ 0.12
常糖+吉非替尼组	3	7.78 $\pm$ 0.42	13.95 $\pm$ 3.23	9.34 $\pm$ 0.90
低糖乳酸组	3	6.69 $\pm$ 0.43	1.76 $\pm$ 0.11	21.44 $\pm$ 0.41
低糖乳酸+吉非替尼组	3	31.94 $\pm$ 0.98	21.57 $\pm$ 0.75	42.06 $\pm$ 1.15

2. 细胞诱导凋亡的变化: 与常糖组 [(34.94  $\pm$  1.51) %] 相比, 低糖乳酸组细胞诱导凋亡率 [(48.83  $\pm$  2.43) %] 显著上升 ( $P < 0.01$ ), 常糖 + 吉非替尼组细胞诱导凋亡率与常糖组接近, 低糖乳酸 + 吉非替尼组 [(7.02  $\pm$  2.96) %] 较低糖乳酸组显著降低 ( $P < 0.01$ )。

3. 细胞周期的变化: 与常糖组比较, 低糖乳酸组 G0/G1 期和 S 期细胞比例均上升 ( $P < 0.05$ ), 与低糖乳酸组比较, 低糖乳酸 + 吉非替尼组 G2/M 期细胞比例上升 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表2 吉非替尼对不同环境HeLa细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	G0/G1期	G2/M期	S期
常糖组	3	50.51 $\pm$ 3.69	5.77 $\pm$ 1.42	28.65 $\pm$ 5.02
常糖+吉非替尼组	3	57.18 $\pm$ 1.97	6.16 $\pm$ 0.90	36.66 $\pm$ 2.83
低糖乳酸组	3	65.50 $\pm$ 5.11	3.74 $\pm$ 1.81	31.42 $\pm$ 6.86
低糖乳酸+吉非替尼组	3	55.75 $\pm$ 2.18	8.68 $\pm$ 0.32	23.71 $\pm$ 5.58

4. EGFR 和 mTOR mRNA 表达的变化: 与常糖组比较, 低糖 + 乳酸组存活细胞的 EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平上调 ( $P < 0.05$ )。常糖 + 吉非替尼组的 EGFR 和 mTOR mRNA 水平均上调 (mTOR  $P < 0.05$ )。与低糖 + 乳酸组比较, 低糖 + 乳酸 + 吉非替尼组的 EGFR 和 mTOR mRNA 上调水平有非常显著差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。

表3 吉非替尼对不同环境HeLa细胞EGFR和mTOR mRNA表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, 2^{-CT}$ )

组别	例数	EGFR	mTOR
常糖组	3	1.01 $\pm$ 0.22	1.07 $\pm$ 0.29
常糖+吉非替尼组	3	1.52 $\pm$ 0.28	21.22 $\pm$ 5.88
低糖乳酸组	3	4.10 $\pm$ 1.06	7.33 $\pm$ 5.45
低糖乳酸+吉非替尼组	3	12.92 $\pm$ 1.33	180.00 $\pm$ 36.62

## 讨 论

与正常细胞一样,肿瘤的生长依赖于微环境中的能量物质。由于实体瘤生长迅速,且瘤体内部新生的血管系统存在大量畸形,使得实体肿瘤与血管之间的物质交换极其不完善<sup>[6]</sup>,因而瘤体内部的细胞处于低氧低葡萄糖高乳酸环境中,这种环境使得肿瘤细胞发生代谢程序重排,也使得药物的分布受到影响。不良环境中能够存活的是对该环境有耐受能力的细胞。常糖环境下吉非替尼存在与否对 48 h 时点细胞周期影响不大。低糖高乳酸环境使细胞更多地停留在 G1/G0 期和 S 期。而低糖高乳酸环境中吉非替尼的存在使细胞更多地停留在 G2/M 期。48 h 时点血清缺乏诱导的细胞凋亡结果显示,常糖环境下吉非替尼存在与否对细胞诱导凋亡的影响不大,低糖高乳酸环境下细胞诱导凋亡率显著升高,提示低糖高乳酸环境下细胞的存活依赖于培养基中的血清,吉非替尼与低糖高乳酸环境同时存在使得存活细胞诱导凋亡率大幅下降,提示该环境下可能诱导存活的细胞启动了某些抵抗凋亡机制。

宫颈癌 EGFR 突变报道不多,但临床标本中宫颈癌组织 EGFR 高表达<sup>[3,7-8]</sup>。有报道显示 EGFR-TKI 的耐药与 mTOR 有关<sup>[9]</sup>。本实验结果显示,常糖环境下,吉非替尼的存在使存活的 HeLa 细胞的 EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平上调,mTOR 上调水平显著。提示 HeLa 细胞耐受吉非替尼与 mTOR 表达水平上调有关。低糖高乳酸环境下 HeLa 细胞 EGFR 表达水平上调显著,低糖高乳酸与吉非替尼共存的环境中生存的 HeLa 细胞 EGFR 和 mTOR mRNA 表达水

平均显著上调,提示低糖高乳酸环境与吉非替尼协同促进了 HeLa 细胞出现 EGFR-TKI 耐药。这可能是导致临床治疗失败的一个原因。其具体机制有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 孙瑶. 宫颈癌的靶向药物治疗研究进展. 现代中西医结合杂志, 2016, 25: 1366-1368.
- [2] Tomimaga H, Ishiyama M, Ohseto F. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Anal Commun, 1999, 36: 47-50.
- [3] 郑凤霞, 傅芬, 蔡勇, 等. EGFR、蛋白激酶 B 在宫颈癌中表达及 EGFR 胞外区基因突变的研究. 现代妇产科进展, 2015, 24: 516-520.
- [4] 聂丹, 刘玲, 夏纪毅, 等. 血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 敲低抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖并促进其凋亡. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32: 488-492.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [6] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 401-410.
- [7] 周素英, 张品南, 潘丹, 等. 组织芯片宫颈癌中 EGFR 的表达及意义. 中华中医药学刊, 2013, 31: 2010-2013.
- [8] 薛琴琴, 张菊, 俞青苗, 等. 宫颈癌组织表皮生长因子受体对 TKI 敏感性相关的基因突变研究. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 3: 583-587.
- [9] Bianco R, Garofalo S, Rosa R, et al. Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. Br J Cancer, 2008, 98: 923-930.

(收稿日期: 2016-11-07)

## 子宫内膜异位症保留生育功能术后 GnRH-a 联合不同反向添加方案的临床分析

王方方 马楠

**【摘要】**目的 探究 ~ 期子宫内膜异位症 (EMT) 保守术后应用促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH-a) 联合戊酸雌二醇或替勃龙反向添加方案的临床效果。方法 回顾性分析腹腔镜保留生育功能手术后 ~ 期 EMT 且应用 GnRH-a 治疗的 88 例患者, 按照反向添加药物分为 GnRH-a+ 戊酸雌二醇组 (GnRH-a+E 组)、GnRH-a+ 替勃龙组 (GnRH-a+T 组) 和 GnRH-a 组 (对照组)。分析其效果、不良反应和术后 1 年复发率。结果 GnRH-a+E 组与 GnRH-a+T 组更年期生活质量评分表 (MRS) 评分均低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且雌二醇 ( $E_2$ ) 水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 两组潮热出汗的发生率明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 三组患者术后 1 年内复发率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); GnRH-a+E 组与 GnRH-a+T 组疼痛视觉模拟评分 (VAS) 评分、MRS 评分、 $E_2$  水平、不良反应和术后 1 年内复发率比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 ~ 期子宫内膜异位症保守术后应用 GnRH-a 联合戊酸雌二醇或替勃龙的反向添加方案不影响 GnRH-a 的治疗效果, 具有相似的临床效果及安全性。

**【关键词】** 子宫内膜异位症; 促性腺激素释放激素激动剂; 反向添加

doi: 10.13390/j.issn.1672-1861.2017.02.027

作者单位: 450014 郑州大学第二附属医院妇产科

通信作者: 马楠 Email: 1563639429@qq.com