

临床与基础桥接 研究

Clinical and Basic Bridging
Research

酪氨酸激酶抑制剂 GW2974 诱导乳腺癌 细胞 BT474 耐药的代谢机制研究

Metabolic mechanism of resistance of breast cancer strain BT474 cells induced by tyrosine kinase inhibitor GW2974

闫聪聪¹, 李志寒², 贺佳²,
马姝丽¹, 吴光华¹, 张森¹,
毛宇彬²

(1. 郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院/
郑州儿童医院 药学部, 郑州 450053; 2. 厦门大
学医学院, 福建 厦门 361102)

YAN Cong - cong¹, LI Zhi - han²,
HE Jia², MA Shu - li¹,
WU Guang - hua¹, ZHANG Miao¹,
MAO Yu - bin²

(1. Department of Pharmacy, Children's
Hospital Affiliated to Zhengzhou
University, Henan Children's Hospital,
Zhengzhou Children's Hospital,
Zhengzhou 450053, China; 2. School of
Medicine, Xiamen University, Xiamen
361102, Fujian Province, China)

收稿日期: 2019 - 05 - 25

定稿日期: 2019 - 06 - 24

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目
(2012J01417)

作者简介: 闫聪聪(1991 -), 女, 硕士研究生,
主要从事药物靶向治疗的相关研究

通信作者: 毛宇彬, 副教授, 硕士生导师

Tel: (0371) 85515791

E - mail: yancongzu@126.com

摘要: 目的 通过比较酪氨酸激酶抑制剂 GW2974 给药后母本细胞株 BT474 与耐药株 rBT474 之间代谢相关因子 mRNA 表达的差异, 探讨 rBT474 可能的耐药机制。方法 收集对数生长期 rBT474 和 BT474 细胞, 接种于 96 孔板, 加入含有 GW2974 的培养基, 分别于孵育 0, 12, 24 和 48 h 后, 通过噻唑蓝法检测 BT474 与 rBT474 细胞的增殖情况。用逆转录实时定量 - 聚合酶链反应检测 12 种相关代谢因子葡萄糖转运体 4 (GLUT4)、2, 6 - 二磷酸果糖激酶 (PFK - 2)、丙酮酸激酶 2 (PKM2)、乳酸脱氢酶 (LDHA)、丙酮酸羧化酶 (PC)、6 - 磷酸果糖激酶 (G - 6 - PD)、脂肪酸合成酶 (FASN)、脂酰肉碱转移酶 1 (CPT1A)、葡萄糖调节蛋白 75 (GRP75)、电压依赖性阴离子通道蛋白 1 (VDAC1)、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和钙网蛋白 (CALR) 的 mRNA 在 BT474 细胞和 rBT474 细胞中给药前后的表达水平。结果 给予 GW2974 后, 母本细胞 BT474 中糖脂代谢相关因子 GLUT4、PFK - 2、PKM2、LDHA、PC、G - 6 - PD、FASN 和 CPT1A 的 mRNA 表达水平均明显下调, 线粒体应激因子 GRP75、VDAC1 与内质网应激因子 CALR 表达水平均明显下调, 内质网应激因子 GRP78 表达明显上调。而在耐药株 rBT474 中给药后这 12 种代谢相关因子的 mRNA 表达水平均明显上调。结论 耐药株 rBT474 可能通过调控糖脂代谢以及细胞应激等过程使细胞耐受性增强。

关键词: GW2974; 乳腺癌; 代谢; 耐药; 酪氨酸激酶抑制剂

DOI: 10. 13699/j. cnki. 1001 - 6821. 2019. 15. 024

中图分类号: R979. 1 **文献标志码:** A

文章编号: 1001 - 6821(2019)15 - 1629 - 04

Abstract: Objective To investigate the possible resistance mechanisms of rBT474 by comparing the mRNA expression of metabolism - related factors between parental cell line BT474 and resistant strain rBT474 cells after GW2974 administration. **Methods** The logarithmic phase rBT474 and BT474 cells were collected and inoculated into 96 hole cell culture plate. Then supplemented the medium with GW2974 and incubated 0, 12, 24 and 48 h, respectively. The proliferation characteristics of BT474 and rBT474 cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium assay. The expressions of mRNA of twelve metabolism - related factors including glucose transporter 4 (GLUT4), 6 - phosphofructo - 2 - kinase (PFK - 2), pyruvate kinase M2 isoform (PKM2), lactate dehydrogenase A (LDHA), phosphatidyl cholines (PC), glucose 6 - phosphatede - hydrogenase (G - 6 - PD), fatty acid synthase (FASN), carnitine palmitoyltransferase - I (CPT1A), glucose - regulated protein 75 (GRP75), voltage - dependent anion channel (VDAC1), glucose -

regulated protein 78 (GRP78) and calreticulin (CALR) were detected by real - time quantitative polymerase chain reaction detecting system. **Results** After GW2974 administration, the mRNA of *GLUT4*, *PFK - 2*, *PKM2*, *LDHA*, *PC*, *G - 6 - PD*, *FASN* and *CPT1A*, related with glucose and lipid metabolism in BT474 cells were down - regulated, the mitochondrial stress factors *GRP75*, *VDAC1* and the endoplasmic reticulum stress factor *CALR* were down - regulated, the endoplasmic reticulum stress factor *GRP78* was up - regulated. While the mRNA of twelve factors were up - regulated in resistant strains rBT474 after administration. **Conclusion** The glucose and lipid metabolism as well as cellular stress tolerance and the up - regulation of other metabolic - related proteins make GW2974 - resistance in rBT474 cells. **Key words:** GW2974; breast cancer; metabolism; drug resistance; tyrosine kinase inhibitor

近年来,乳腺癌高居女性恶性肿瘤死亡率的首位,且其发病率呈逐年上升的趋势^[1-2]。人表皮生长因子受体-2(HER2)表达阳性的乳腺癌恶性程度高、侵袭性强、患者预后极差,患者中存在HER2的过表达高达20%~30%^[3]。小分子酪氨酸激酶抑制剂对HER2靶向作用明显,临床治疗效果突出,现已逐渐成为乳腺癌治疗中的一线用药^[4-5],但有部分患者应用后有获得性耐药现象产生^[6],其可能通过糖脂代谢途径耐药^[7]。GW2974是一种小分子的表皮生长因子受体(EGFR)/HER2酪氨酸激酶抑制剂。本文利用诱导建立的GW2974乳腺癌细胞耐药株rBT474,与母本BT474细胞株相比较,以期从代谢角度对GW2974诱导BT474耐药的机制进行探讨。

材料与方 法

1 材 料

细胞株 人乳腺导管癌细胞株BT474,购自中国科学院上海细胞库;rBT474,由本实验室筛选并保存。

药品与试剂 GW2974,规格:每支250 mg,批号:G0668,瑞士Sigma公司生产。Trizol,美国Invitrogen公司产品;RvertAid First Strand cDNA Synthesis kit,美国Thermo scientific公司产品;SYBR Premix Ex Taq,日本Takara公司生产;Protein Marker,加拿大Fermentas公司产品;噻唑蓝(MTT),美国Amresco公司生产。

仪器 普通聚合酶链反应(PCR)仪,购自德国Thermo cycler公司;Eclipse TE2000U倒置显微镜,购自日本Nikon公司;Step One Real time PCR System,购自美国AB公司产品;M-26核酸蛋白分析仪,购自英国UVP公司;Image Pro Plus V6.0图像分析软件,购自美国Media Cybernetics公司。

2 实 验 方 法

2.1 用 MTT 法检测药物对细胞增殖的影响

收集处于对数生长期的BT474与rBT474细胞,制成 2.5×10^4 cell \cdot mL⁻¹的单细胞悬液,然后接种于96孔板中,每孔200 μ L,当细胞贴壁后,弃去培养液

并加入含有 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GW2974的1640培养基。分别孵育0,12,24和48 h,弃去培养液,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤后,加入MTT液70 μ L,培养4 h,弃去上清液,加入150 μ L二甲亚砜(DMSO),终止反应,然后将96孔板振荡10 min,MTT还原产物溶解,用酶标仪于570 nm处测定每孔光密度,并以空白对照孔调零,计算相对抑制率,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,每组设5个平行,实验重复3次。

2.2 细胞总 RNA 抽提

收集细胞 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$,加入Trizol 1 mL,将细胞悬液吹打均匀,于冰上放置5 min。然后加入氯仿200 μ L并振荡15 s,在室温下放置3 min。于4 $^{\circ}\text{C}$ 下,以 1.2×10^4 r \cdot min⁻¹离心15 min(最上层的是RNA,在中间层的白色部分为DNA,最底层的红色部分为蛋白质)。将上层小心吸出,移至干净的离心管中,然后加入经过预冷的等量的异丙醇,在-20 $^{\circ}\text{C}$ 进行10 min静置。于4 $^{\circ}\text{C}$ 下,以 1.2×10^4 r \cdot min⁻¹离心10 min,移去上清液,向下层白色絮状沉淀中加入用DEPC水配制的75%乙醇1 mL,充分振荡然后洗涤沉淀,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下,以 1.2×10^4 r \cdot min⁻¹离心5 min。去除上清液,真空干燥,然后溶于双蒸水(无RNase)中,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 逆转录实时定量 PCR(RT-PCR) 反应

将提取好的RNA依据试剂盒逆转录合成cDNA,按以下条件进行逆转录:30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;42~55 $^{\circ}\text{C}$ 15~30 min;99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。将获得的cDNA按照荧光定量PCR扩增试剂盒进行扩增。预变性:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;PCR反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40个循环。融解曲线分析:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。扩增的荧光信号通过Step One Real time PCR System检测,以 β -actin为内参计算母本细胞BT474与耐药株rBT474中葡萄糖转运体4(GLUT4)、2,6-二磷酸果糖激酶(PFK-2)、丙酮酸激酶2(PKM2)、乳酸脱氢酶(LDHA)、丙酮酸羧化酶(PC)、6-磷酸果糖激酶(G-6-PD)、脂肪酸合成酶(FASN)、脂酰肉碱转移酶1(CPT1A)、葡萄糖调节蛋白75(GRP75)、电压依

赖性阴离子通道蛋白1(VDAC1)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)和钙网蛋白(CALR)基因的相对表达水平。引物序列由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

3 统计学处理

用SPSS 16.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较用配对 t 检验,组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 GW2974对rBT474、BT474的生长抑制率的影响

干预12,24和48h时,耐药细胞的存活率明显较高(均 $P < 0.05$),见表1。

2 检测GW2974对BT474、rBT474细胞代谢相关蛋白mRNA水平的影响

给予GW2974后,母本细胞BT474中8种糖脂代谢相关因子GLUT4、PFK-2、PKM2、LDHA、PC、G-6-PD、FASN和CPT1A的mRNA表达水平均明显下调,线粒体应激因子GRP75、VDAC1与内质网应

激因子CALR表达水平均明显下调,内质网应激因子GRP78表达上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在耐药株rBT474中,给予GW2974后糖脂代谢相关因子GLUT4、PFK-2、PKM2、LDHA、PC、G-6-PD、FASN、CPT1A与应激相关因子CALR、GRP78、GRP75、VDAC1的mRNA表达水平均明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表2。

Table 1 The proliferation inhibitory rate of 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GW2974 on BT474 and rBT474 cells($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Time	BT474 cell	rBT474 cell
0 h	0.98 ± 0.01	1.01 ± 0.02
12 h	0.48 ± 0.07**	1.02 ± 0.04##
24 h	0.39 ± 0.09**	0.87 ± 0.07*##
48 h	0.28 ± 0.12**	0.91 ± 0.10##

Compared with 0 h group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with BT474 cell group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Table 2 The expression of twelve metabolism-related factors mRNA in BT474 and rBT474 cells($\bar{x} \pm s$)

mRNA	BT474 cell			rBT474 cell		
	0 h	12 h	24 h	0 h	12 h	24 h
GLUT4	1.13 ± 0.10	0.73 ± 0.12*	0.26 ± 0.09**	13.27 ± 0.46	18.34 ± 0.52*	30.36 ± 3.72**
PFK-2	1.07 ± 0.04	0.62 ± 0.05**	0.71 ± 0.03**	1.78 ± 0.06	4.06 ± 0.11**	4.89 ± 0.27**
PKM2	0.98 ± 0.03	0.41 ± 0.05**	0.52 ± 0.08**	2.02 ± 0.31	4.97 ± 0.58**	3.66 ± 0.17**
LDHA	1.06 ± 0.03	0.48 ± 0.07**	0.93 ± 0.04	0.61 ± 0.05	1.42 ± 0.24**	1.33 ± 0.09**
PC	1.02 ± 0.02	0.63 ± 0.11*	0.36 ± 0.03**	0.72 ± 0.03	1.37 ± 0.10**	1.51 ± 0.05**
G-6-PD	0.97 ± 0.01	0.78 ± 0.04**	0.48 ± 0.02**	1.21 ± 0.02	1.78 ± 0.09**	1.93 ± 0.16**
FASN	1.02 ± 0.02	0.45 ± 0.06**	0.77 ± 0.08**	0.23 ± 0.02	0.37 ± 0.03**	0.58 ± 0.09**
CPT1A	0.98 ± 0.01	0.83 ± 0.02*	0.39 ± 0.02**	0.38 ± 0.07	0.72 ± 0.03**	0.71 ± 0.03**
GRP75	1.04 ± 0.01	0.49 ± 0.03**	0.64 ± 0.02**	0.41 ± 0.03	0.85 ± 0.02**	0.83 ± 0.03**
VDAC1	0.96 ± 0.02	0.68 ± 0.05**	0.95 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.69 ± 0.02**	1.04 ± 0.04**
GRP78	0.97 ± 0.02	1.91 ± 0.03**	1.34 ± 0.02**	0.69 ± 0.02	2.14 ± 0.05**	2.81 ± 0.16**
CALR	1.03 ± 0.03	0.86 ± 0.04**	0.97 ± 0.04	0.91 ± 0.06	2.47 ± 0.03**	3.64 ± 0.08**

GLUT4: Glucose transporter 4; PFK-2: 6-phosphofructo-2-kinase; PKM2: Pyruvate kinase M2 isoform; LDHA: Lactate dehydrogenase A; PC: Phosphatidyl cholines; G-6-PD: Glucose 6-phosphatedehydrogenase; FASN: Fatty acid synthase; CPT1A: Carnitine palmitoyltransferase-I; GRP75: Glucose-regulated protein 75; VDAC1: Voltage-dependent anion channel; GRP78: Glucose-regulated protein 78; CALR: Calreticulin; Compared with 0 h group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

WARBURG^[8]研究发现,相比人体正常的细胞,肿瘤细胞代谢糖的数量明显增多,据此提出了肿瘤代谢可能采用有氧糖酵解的这一假说。MTT法证明,耐药细胞比母本细胞对GW2974的耐受作用明显增强。mRNA检测结果发现,在母本细胞株中给予GW2974后糖酵解与磷酸戊糖途径被阻断,脂肪酸氧化合成降低,细胞能量耗竭而死;而在耐药株中细胞耐受性增强,糖酵解与磷酸戊糖途径反馈性增强,脂肪酸氧化

合成增强,提供细胞生长繁殖所需的能量与供体,因此细胞易于存活。

给予GW2974后,母本细胞株BT474中线粒体应激蛋白GRP75、VDAC1与内质网应激蛋白CALR的mRNA表达水平下调,而内质网应激蛋白GRP78表达上调。细胞的内质网稳态失衡将导致错误折叠蛋白积累,从而诱发内质网应激。当细胞处于内质网应激状态时,可以激活相关的降解途径,清除细胞内积累的错误折叠的蛋白,减弱细胞应激水平,如果内质网功能紊乱持续,将最终启动细胞凋亡程序^[9]。由此可

以推测,在 GW2974 给药后,肿瘤细胞 BT474 主要通过内质网应激对抗细胞损伤,最终因紊乱持续而引起细胞死亡。而在 GW2974 给药后,耐药株 rBT474 中 *GRP75*、*GRP78*、*VDAC1* 与 *CALR* 表达水平迅速上调,提示在耐药株中线粒体应激保护与内质网应激保护均得到加强,能够更好地抵抗损伤,从而导致细胞耐药。

因此,本课题组推断在母本细胞株 BT474 中 GW2974 抑制糖脂代谢相关因子的表达,导致糖酵解及磷酸戊糖途径均被阻断,肿瘤细胞能量供给不足,引发内质网应激而造成肿瘤细胞死亡。而在耐药株中代谢途径发生了改变,GW2974 诱导的 rBT474 细胞通过调控糖脂代谢以及细胞应激等过程使细胞耐受性增强。本课题通过研究小分子酪氨酸激酶抑制剂对乳腺癌细胞的耐药途径,以期为进一步寻找逆转 GW2974 耐药的方法提供新的视角。

参考文献:

- [1] 高砚春,陈竟,蔡燕. 甘草甜素对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 生长的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(13): 1210-1213.
 - [2] 资源,赵文键,程庆,等. 氧化槐果碱对人乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(2): 174-177.
 - [3] D'AMATO V, RAIMONDO L, FORMISANO L, et al. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2015,41(10): 877-883.
 - [4] 付桂英. 肾细胞癌治疗药—阿西替尼的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2014,30(4): 371-373
 - [5] 赵建龙,占辉,杨月,等. 索拉非尼的临床应用和药物相互作用[J]. 中国临床药理学杂志,2014,30(10): 958-961.
 - [6] LING M, ZHU W, QIANG W, et al. JWA down-regulates HER2 expression via c-Cbl and induces lapatinib resistance in human gastric cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016,7(44): 71790-71801.
 - [7] RUPRECHT B, ZAAL E A, ZECHA J, et al. Lapatinib resistance in breast cancer cells is accompanied by phosphorylation-mediated reprogramming of glycolysis [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(8): 1842-1853.
 - [8] WARBURG O. On the origin of cancer cell [J]. *Science*, 1956,123(3191): 309-314.
 - [9] LIU X L, ZHAO D, SUN D P, et al. Adenovirus-mediated delivery of CALR and MAGE-A3 inhibits invasion and angiogenesis of glioblastoma cell line U87 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012,31(1): 1-10.
- (本文编辑 戴荣源)
-
- (上接第 1595 页)
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2018, 18(3) 241-251.
 - [3] TUMBARELLO M, VIALE P, VISCOLI C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy [J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 55(7): 943-950.
 - [4] 董方,宋文琪,徐桦巍,等. 对碳青霉烯类抗生素不敏感肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶基因型研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(4): 270-274.
 - [5] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100 [M]. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 122.
 - [6] 王辉,俞文松,王明贵,等. 替加环素体外药敏试验操作规程专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(7): 584-587.
 - [7] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 119-123.
 - [8] DU J, LI P, LIU H, et al. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): 95181.
 - [9] DIANCOURT L, PASSET V, VERHOEF J, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8): 4178-4182.
 - [10] 宁长秀,胡龙华,汪红,等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌多位点序列分型研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(1): 17-20.
 - [11] SACHSE S, BRESAN S, ERHARD M, et al. Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 80(4): 267-271.
 - [12] 全国细菌耐药监测网. 2014 至 2017 年中国儿童及新生儿患者细菌耐药监测研究[J]. 中华医学杂志,2018,98(40): 3279-3287.
 - [13] CARMELI Y, AKOVA M G, DAIKOS G L, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(2): 102-111.
 - [14] JEONG S H, KIM H S, KIM J S, et al. Prevalence and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from five hospitals in Korea [J]. *Ann Lab Med*, 2016, 36(6): 529-535.
 - [15] VAN D D, COBER E, RICHTER S S, et al. Residence in skilled nursing facilities is associated with tigecycline nonsusceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2015, 36(8): 942-948.
 - [16] DESHPANDE L M, JONES R N, FRITSCHE T R, et al. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000-2004) [J]. *Microb Drug Resist*, 2006, 12(4): 223-230.
 - [17] 王盛书,孙金柱,苏文莉,等. 我国携带 NDM-1 基因耐药菌流行现状分析[J]. 军事医学, 2015, 39(11) 825-830.
 - [18] ZHANG X, CHEN D, XU G, et al. Molecular epidemiology and drug resistant mechanism in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): 194000.
 - [19] QI Y, WEI Z, JI S, et al. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(2): 307-312.
- (本文编辑 王超群)