

基础研究 · Basic Research

多药耐药对肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭活性、耐药机制及丝裂原活化蛋白激酶表达的影响

颜昕¹, 阮文雯¹, 王效民², 丁鑫³, 郝兰香³, 廖洪锋³, 潘超³

1. 厦门大学医学院临床医学系, 厦门 361003; 2. 厦门大学附属中山医院肝胆外科, 厦门 361004; 3. 厦门大学附属中山医院病理科, 厦门 361004

[摘要] 目的 通过化疗药物诱导建立多株人肝癌多药耐药细胞模型, 探讨多药耐药获得对细胞增殖、凋亡、侵袭能力的影响, 耐药机制及与丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路表达的相关性。方法 : 采用多柔比星 (adriamycin, ADM) 高浓度冲击和小剂量缓升 2 种方法诱导建立人肝癌细胞 (HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7402) 耐药模型。比较耐药细胞株与亲本细胞株间的差异, 主要包括采用生物发光法进行药物敏感实验并计算耐药指数; RT-PCR 法和免疫组织化学法检测相关耐药基因 (P-糖蛋白、多药耐药相关蛋白 1、肺癌耐药蛋白、乳腺癌耐药蛋白、蛋白激酶 C、谷胱甘肽-S-转移酶-和拓扑异构酶) mRNA 及相应蛋白的表达。免疫组织化学法检测与细胞增殖活性相关的 Ki-67 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达; FCM 法检测细胞周期、细胞凋亡率的改变; Transwell 小室法检测细胞体外侵袭能力的改变; 最后, 分别采用 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测 MAPK 信号通路中 ERK1、ERK2、ERK5、JNK1、JNK2 和 p38 α 基因及相应蛋白的表达。结果 : 共建立 6 株 ADM 耐药细胞株; 与亲本细胞株相比, 耐药细胞株耐药指数均 > 5, 并对多种化疗药耐受性增强, 多药耐药相关基因及蛋白的表达均上调 2 ~ 10 倍, 以高浓度冲击法诱导的细胞中蛋白表达上调明显。耐药细胞中 Ki-67 及 PCNA 蛋白的表达量均升高 20 倍以上, 细胞周期被阻滞在 S 期, 体外侵袭能力增强 1.3 ~ 2.5 倍; ADM 干预后, 细胞凋亡率减少 60% 以上。MAPK 信号通路中不同基因和蛋白表达量均有不同比例升高, 以 ERK1、ERK2 升高明显。结论 : ADM 能够诱导多株人肝癌细胞产生多药耐药, 导致细胞增殖活性升高、细胞周期改变、抗凋亡能力及侵袭能力增强。MAPK 信号通路中相关蛋白表达的上调与细胞多药耐药有一定关系。

[关键词] 肝肿瘤; 多药耐药相关蛋白类; 丝裂原活化蛋白激酶类

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1000-7431 (2012) 07-0507-09

The effects of multidrug resistance on cell proliferation, apoptosis and invasion activity and the expression of mitogen-activated protein kinase in human hepatocellular cancer cells

YAN Xin¹, RUAN Wen-wen¹, WANG Xiao-min², DING Xin³, HAO Lan-xiang³, LIAO Hong-feng³, PAN Chao³

1. Department of Clinical Medicine, Xiamen University School of Medicine, Xiamen 361003, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, China; 3. Department of Pathology, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, China

[ABSTRACT] Objective: To establish multiple human hepatocellular carcinoma (HCC) multidrug-resistant cell lines induced by chemotherapeutic drugs, and to investigate the effects of multidrug-resistance on cell proliferation, apoptosis and invasion activity and the relationship between the multidrug-resistance and the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Methods: Three different human HCC cell strains HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 were established by using pulse treatment with high concentration of adriamycin (ADM) or treatment with ADM of low concentration gradually increased. The difference between the resistant cells and the parental cells was evaluated. The drug sensitivity was tested by ATP bioluminescence to calculate the resistance index (RI). The expressions of multidrug resistance-related genes including P-glycoprotein (*P-gp*), multidrug resistance-associated protein 1 (*MRP1*), lung cancer resistance protein 1 (*LRP1*), breast cancer resistance protein (*BCRP*), glutathione-S-transferase- π (*GST- π*), topoisomerase β (*ToPo β*) and protein kinase C (*PKC*) and their proteins were detected by RT-PCR and immunohistochemistry (IHC), respectively. The expressions of cell proliferative

Correspondence to: PAN Chao (潘超)

E-mail: btlixiaofeng@126.com

Received 2012-02-28 Accepted 2012-06-08

activity-related Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were detected by IHC. The cell cycle and apoptosis rate were detected by flow cytometry (FCM), and the change of cell invasion ability was detected by Transwell assay. The expressions of *ERK1*, *ERK2*, *ERK5*, *JNK1*, *JNK2* and *p38a* genes and their proteins in MAPK pathway were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. Results: Six ADM-resistant cell strains were established. Compared to parental cells, the RIs of all resistant cells were over 5 with increased resistance to multiple chemotherapeutic drugs. The expressions of *MDR* genes and their proteins were increased 2-10 times, especially for the cells induced by pulse treatment with high concentration of ADM. The expressions of Ki-67 and PCNA proteins were increased over 20 times in the resistant cells. The cell cycles were arrested at phase S, and the invasive activities *in vitro* were increased 1.3-2.5 times. The apoptosis rates were decreased by over 60% after ADM intervention. The expressions of MAPK pathway-related genes and proteins were increased in varying degrees, especially for ERK1 and ERK2. Conclusion: ADM can induce the multidrug-resistance in multiple HCC cell strains and increase the cell proliferation activity, alter the cell cycle distribution, strengthen the anti-apoptosis effect and enhance the invasive ability of the HCC cells. The multidrug-resistance maybe associated with the up-regulation of MAPK pathway.

[KEY WORDS] Liver neoplasms; Multidrug resistance-associated proteins; Mitogen-activated protein kinases

[TUMOR, 2012, 32 (07): 507-515]

肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 是化疗失败的重要原因。多药耐药肿瘤细胞不仅对接触过的化疗药物发生耐药, 而且对多种未接触过的、结构和作用机制不同的药物也发生耐药。虽然目前已发现多药耐药的产生与肿瘤细胞的增殖、分化及凋亡密切相关, 涉及到细胞代谢调控和信号转导等多个环节, 但其具体机制的研究尚无突破。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导途径是多种药物直接、间接作用的靶点, 国外已有多种与该途径有关的新药进入临床试验。MAPK 作为细胞外信号引起细胞核反应的细胞信息传递的共同通路, 在多药耐药性形成过程中的意义仍不明确。本研究采用多柔比星 (adriamycin, ADM) 高浓度冲击诱导和小剂量缓慢诱导的方法, 旨在建立稳定的人肝癌多药耐药细胞模型, 通过比较多药耐药细胞与亲本细胞在生物学特性上的异同, 检测 MAPK 信号转导通路在亲本细胞与耐药细胞中的转录与表达差别, 探索 MAPK 信号转导通路在肝癌多药耐药中的作用, 为进一步探索耐药细胞逆转, 提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7402 均引自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。HepG2 用 DMEM/高糖完全培养液, SMMC-7721、BEL-7402 用 RPMI 1640 完全培养液常规培养 (DMEM/高糖完全培养液与 RPMI 1640 完全培

养液均购自美国 Hyclone 公司)。

1.2 主要试剂和仪器 Cell Invasion Assay Kit 购自美国 Chemicon 公司, TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自立陶宛 Fermentas 公司, ECMatrix 550 购自美国 Millipore 公司, ApoSENSOR Cell Viability Assay Kit 购自美国 Biovision 公司, 蛋白酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司, BCA 定量试剂盒和羊抗鼠二抗购自 Pierce 公司, 电化学发光检测底物购自美国 Millipore 公司, 一抗鼠抗人 Ki-67、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)、P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、肺癌耐药蛋白 (lung cancer resistance protein, LRP)、谷胱甘肽-S-转移酶- π (glutathione-S-transferase- π , GST- π) 和拓扑异构酶 (topoisomerase, ToPo) 单克隆抗体以及羊抗鼠、羊抗兔二抗均购自福建迈新生物技术开发有限公司, 一抗兔抗人多克隆乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 及兔抗人单克隆蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 购自武汉博士德生物工程有限公司, ADM 超纯级购自生工生物工程 (上海) 有限公司, 化疗药物表柔比星 (epirubicin, EPI)、长春新碱 (vincristine, VCR)、丝裂霉素 (mitomycin, MMC) 购自浙江海正药业有限公司, 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX)、依托泊苷 (etoposide, VP-16) 和甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 购自江苏恒瑞医药股份有限公司, 顺铂 (cisplatin, cDDP) 购自南京制药厂有限公司, 紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 购自上海华谊制药厂, 5-

氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 购自上海旭东海普药业有限公司。PCR 引物设计采用 Primer Express 3.0 软件, 引物序列见表 1。所有引物均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

荧光定量 PCR 仪 (7500 型) 为美国 ABI Prism 公司产品, 流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司产品, 凝胶成像系统为 Quantity One 4.6.7。

1.3 多药耐药细胞株的诱导

1.3.1 大剂量冲击诱导法 将对数生长期的肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7402 接种于 250 mL 培养瓶中, 待细胞增殖至 70% ~ 80% 融合时, 加入 ADM 至终质量浓度为 5 μg/mL, 作用 2 h 后弃含药培养液, 收集活细胞, 接种于新的培养瓶中。待细胞生长恢复并长至 70% ~ 80% 融合时, 再重复上述实验步骤, 直至在 ADM 质量浓度为 0.4 ~ 0.5 μg/mL 的条件下细胞死亡率 < 5%。将获得的耐药细胞株分别命名为 HepG2/ADM-H、SMMC-7721/ADM-H 和 BEL-7402/ADM-H。

1.3.2 小剂量缓慢诱导法 将对数生长期肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721、BEL-7402 接种于 250 mL 培养瓶中, 待细胞增殖至 70% ~ 80% 融合时, 加入 ADM 至终质量浓度为 0.01 μg/mL, 作用 12 h, 恢复常规培养。随后逐渐提高 ADM 的质量浓度至 0.64 μg/mL 细胞在 ADM 0.2 ~ 0.3 μg/mL 的质量浓度下细胞死亡率 < 5%。将获得的耐药细胞株依次命名为 HepG2/ADM-L、SMMC-7721/ADM-L 和 BEL-7402/ADM-L。

1.4 细胞对化疗药物敏感性的检测 在做各项

检测及冻存前将耐药细胞株脱药培养 2 周, 取生长状态良好、处于对数生长期细胞, 制备单细胞悬液, 进行下一步实验。按 ApoSensor Cell Viability Assay Kit 使用说明书, 采用生物发光法计算细胞对化疗药物的半数抑制浓度 (half inhibition concentration, IC₅₀) 及耐药指数 (resistance index, RI)。将试剂盒提供的 ATP 标准品倍比稀释, 用 GloMax Multi 多功能检测仪 (Promega 公司产品) 检测各孔的吸光度 (D) 值 (波峰 420 nm, 光谱范围 350 ~ 650 nm), 采用双对数夹心法绘制标准曲线。亲本细胞株与耐药株细胞按 ADM 理论血液峰值浓度 (peak concentration) 的近似值计算中位药物浓度, 设置 5 个 ADM 药物浓度, 按上述法检测, 计算不同浓度下 ATP 值。线性拟合法计算获得 IC₅₀ 值, RI = 耐药细胞 IC₅₀ 值 / 亲本细胞 IC₅₀ 值。细胞对其他化疗药物敏感性的检测均参照此方法。

1.5 MDR 相关基因及蛋白表达的检测

1.5.1 RT-PCR 检测 MDR 相关基因的表达 取对数生长期肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721、BEL-7402 亲本细胞及对应耐药细胞分别接种于 250 mL 培养瓶中, 待细胞增殖至 70% ~ 80% 融合时, 收集细胞。耐药细胞同样于实验前脱药培养 2 周。按 TRIzol 试剂盒使用说明提取细胞总 RNA, 并反转录为 cDNA, 反转录反应采用 20 μL 反应体系中加入 1 μL 的总 RNA 及 1 μL 的 RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μL)。PCR 扩增采用 25 μL 反应体系中加入 3 μL cDNA 模板, 上、下游引物各 0.4 μL (引物

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

Gene	Primer sequence	Product length/bp
β-actin (NM_001101.3)	5'-TGTCCACCTTCAGCAGATGT-3', 5'-AAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA-3'	97
P-gp (AF016535.1)	5'-AGCAGAGGATCGCCATTGC-3', 5'-CTGAACCACTGCTTCGCTTTC-3'	105
MRP1 (AB208970.1)	5'-CATTGGTGTGGTGAGTCAGGAA-3', 5'-TCTCAATCTCATCCATGGTGACA-3'	98
LRP1 (NM_017458.2)	5'-ACTGGCACTTTGAGGTGAATGAC-3', 5'-GATGGCTTTGCAGGCATCA-3'	95
BCRP (AF098951.2)	5'-AAGCAGGGACGAACAATCATCT-3', 5'-CCAATAAGGTGAGGCTATCAAACA-3'	82
PKC (NM_002737.2)	5'-CCCAAACATTGACAAATCCTAACCC-3', 5'-CAACCAAGGAGGGTACCAGATG-3'	111
GST-π (NM_000852.3)	5'-CAGGGAGGCAAGACCTTCATT-3', 5'-GGGCTAGGACCTCATGGATCA-3'	91
Topo β (NM_001068.2)	5'-GAAACGGAATCCTTGGTCAGAT-3', 5'-TTTCGGCTGCTGCTCTCCTA-3'	110
p38 (NM_139012.2)	5'-AGATGAGTGAAAAAGCCTGACCTA-3', 5'-AGGACTCCATCTCTTCTTGGTCAA-3'	80
JNK1 (L26318.1)	5'-GCAGGAACGAGTTTTATGATGAC-3', 5'-GTAGCCCATGCCAAGGATGA-3'	81
JNK2 (NM_139068.2)	5'-CTCTGCGTCACCCATACATCA-3', 5'-CCAAGTGGGCATCATAAATTTG-3'	94
ERK1 (NM_002746.2)	5'-GCTGGACCGGATGTTAACCTT-3', 5'-TCATCCGTCGGGTCATAGTACTG-3'	99
ERK2 (NM_002745.4)	5'-TATTTGTTCTGCCACTGTGTACT-3', 5'-AGGCAAATTTCTACCACAGA-3'	105
ERK5 (NM_139033.2)	5'-CTGGCTACGGTGTGGCTTT-3', 5'-AATCTGCCTGGCCATCCT-3'	93

P-gp: P-glycoprotein; MRP1: Multidrug resistance-associated protein 1; LRP1: Lung cancer resistance protein 1; BCRP: Breast cancer resistance protein; PKC: Protein kinase C; GST-π: Glutathione-S-transferase-π; Topo β: Topoisomerase β; JNK: C-Jun N-terminal kinase; ERK: Extracellular signal-regulated kinase.

见表 1)。凝胶电泳观察, 图像分析采用 Image-Pro Plus 6.0, 根据目的基因灰度值/ β -actin 灰度值计算目的基因的标化含量(%)。目的基因测序验证。

1.5.2 免疫组织化学法检测 MDR 相关蛋白的表达 上述细胞分别接种于 6 孔培养板中, 培养板内预先放置洗净、消毒的载玻片, 待载玻片上细胞长至 70% ~ 80% 融合时, 取出载玻片。PBS 洗涤细胞, 用 5% 的乙醇溶液固定细胞 10 min。ElivisionTM plus 免疫组织化学法染色, 一抗分别为抗 P-gp、MRP1、LRP、BCRP、PKC、GST- π 和 Topo 抗体(均 1:40 稀释), 随后根据一抗类型滴加羊抗鼠或羊抗兔二抗(均为 1:200 稀释), DAB 显色后, 光学显微镜下($\times 100$)观察各组细胞中蛋白的染色情况。

1.6 细胞增殖相关蛋白的检测 免疫组织化学法检测细胞增殖相关蛋白 PCNA 和 Ki-67 表达(实验步骤同 1.6.2 节)。PCNA 阳性指数 = (PCNA 阳性细胞数 / 肿瘤细胞总数) \times 100%。Ki-67 阳性指数 = (Ki-67 阳性细胞数 / 肿瘤细胞总数) \times 100%。

1.7 细胞周期分布的检测 收集对数生长期 HepG2、SMMC-7721、BEL-7402 亲本细胞及对应的耐药细胞, 90 \times g 离心 5 min, 弃培养液, PBS 洗涤细胞, 预冷的 70% 乙醇溶液重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 固定细胞过夜。流式细胞仪检测前, 加入碘化丙啶(propidium iodide, PI), PI 终质量浓度为 50 μ g/mL, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min。采用流式细胞仪观察其细胞周期分布变化, 检测数据用 WinMDI Version 2.9 软件进行分析, 增殖指数(proliferation index, PI) = (S + G₂/M 期细胞数) / (G₀/G₁ + S + G₂/M 期细胞数) \times 100%。

1.8 细胞抗凋亡能力的检测 HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7402 亲本细胞及对应耐药细胞经 ADM (5 μ g/mL) 作用 24 h 后, 收集、洗涤并重悬细胞, 调整细胞密度为 1 \times 10⁵ 个/mL, 加入 Annexin-V-FITC (终质量浓度 0.5 μ g/mL) 和 PI (终质量浓度 5 μ g/mL), 在 4 $^{\circ}$ C 暗处处理 40 min 后, 采用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

1.9 细胞体外侵袭能力的测定 将 Transwell 小室复温、再水化, 细胞去血清饥饿培养 12 h 后, 采用无血清培养液重悬细胞, 调整细胞密度为 5 \times 10⁵ 个/mL, Transwell 小室上室每孔加入细胞悬液 300 μ L, 下室加入完全培养液 500 μ L, 常规培养至细胞穿膜, 收集上室 Transwell 膜下细胞, 用 1% 结晶紫染色后, 光学显微镜下检测并计细胞数(直接法); 随后将细胞置于 10% 乙酸溶液中溶解结晶紫, 在酶标仪上波长 560 nm 处检测溶解

液的 D 值(间接法)。耐药株相对亲本株穿过膜的细胞数 = (耐药株膜溶解液 D 值 - 空白孔 D 值) / (亲本株膜溶解液 D 值 - 空白孔 D 值)。

1.10 MAPK 信号通路相关基因及蛋白表达的检测

采用实时荧光定量-PCR (real-time fluorogenic quantitative-PCR, RFQ-PCR) 检测 MAPK 信号通路相关基因[细胞外信号调节激酶 1 (extracellular signal-regulated kinase 1, ERK1)、ERK2、ERK5、c-Jun 氨基末端激酶 1 (c-Jun N-terminal kinase 1, JNK1)、JNK2 和 p38 α] 的表达。20 μ L 扩增反应体系中加入 cDNA 模板 3.4 μ L (稀释比例为 1:10), 上、下游引物各 0.3 μ L (引物见表 1)。耐药细胞株目的基因的表达相对于亲本细胞株的变化倍数 = 2^{-Ct} [(Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照}]。同时采用蛋白质印迹法检测上述蛋白的表达, 并用半定量法计算耐药细胞株中 MAK 信号通路相关蛋白表达的变化。

1.11 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析。实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料 2 组间比较采用 *t* 检验, 各组间比较采用单因素方差分析, 进一步比较采用 SNK, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组耐药细胞的 RI 生物发光法计算诱导获得的各组耐药细胞对 ADM 的 RI, 结果显示, HepG2/ADM-H 为 19.21, HepG2/ADM-L 为 15.32, SMMC-7721/ADM-H 为 21.46, SMMC-7721/ADM-L 为 9.51, BEL-7402/ADM-H 为 26.12, BEL-7402/ADM-L 为 11.95, 6 株细胞的 RI 均 > 5, 符合中度耐药的标^[1], 其中大剂量冲击诱导组细胞的 RI 均 > 15, 符合高度耐药的标^[1]。脱药培养 2 周及冻存 2 个月^[1]后复苏, 继续培养 2 周后再检测, 其 RI 基本稳定。同时各耐药株对其他化疗药物也有不同程度多药耐药(表 2), 其中 VCR、CTX 和 EPI 等较显著。因小剂量缓慢诱导组耐药趋势与大剂量冲击诱导组基本一致, 因此文中不再重复列出数据。

2.2 MDR 相关基因的 mRNA 表达 RT-PCR 检测发现, 各耐药细胞株中 MDR 相关基因 (P-gp、MRP1、LRP1、BCRP、GST- π 、Topo β 和 PKC) 表达量均较亲本株有不同程度增加, 差异均有统计学意义 (*t* > 2.447 *P* < 0.05), 其中 P-gp、MRP1、BCRP 及 PKC 增加 1 倍以上(表 3)。

2.3 MDR 相关蛋白的表达 免疫组织化学检测亲本细胞株及耐药细胞株中 MDR 相关蛋白的表

表 2 人肝癌亲本细胞株及其相应耐药细胞株对不同化疗药物敏感性的比较 (线性作图法)

Table 2 Comparison of sensitivities to different chemotherapeutic drugs between human hepatocellular carcinoma (HCC) parental cells and the resistant cells

[n=6, $\bar{x} \pm s, \rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$]

Drug	IC ₅₀			IC ₅₀			IC ₅₀		
	HepG2	HepG2/ ADM-H	RI	SMMC-7721	SMMC-7721/ ADM-H	RI	BEL-7402	BEL-7402/ ADM-H	RI
EPI	121.0±12.0	1430.0±63.0	11.82	79.4±6.8	1020.0±98.0	12.85	103.0±9.5	1140.0±98.0	11.07
VCR	5.2±0.2	122.0±9.4	23.42	0.2±0.0	4.0±0.3	20.10	2.0±0.1	35.6±3.1	17.98
CTX	383.0±11.0	620.0±22.0	12.06	221.0±22.0	3120.0±310.0	14.12	179.0±14.0	3210.0±310.0	17.93
VP-16	21.9±0.4	82.5±12.0	3.77	6.0±0.4	86.4±6.6	14.33	19.7±1.5	91.5±7.9	4.64
MMC	70.4±8.1	383.0±39.0	5.44	50.2±4.8	313.0±2.8	6.24	58.6±5.3	236.0±21.0	4.03
cDDP	2.8±0.3	27.8±2.9	9.82	1.0±0.1	12.1±1.1	11.63	2.0±0.1	28.6±2.5	14.52
PTX	3.2±0.3	6.1±0.8	1.90	2.0±0.1	5.1±0.4	2.52	3.9±0.3	10.7±0.9	2.75
5-FU	60.1±6.5	448.0±39.0	7.45	39.7±3.8	338.0±3.1	8.51	53.7±5.0	815.0±6.3	15.18
MTX	312.0±20.0	944.0±32.0	3.03	258.0±21.0	647.0±5.6	2.51	248.0±21.0	535.0±4.7	2.16

IC₅₀: Half inhibition concentration; RI: Resistance index; EPI: Epirubicin; VCR: Vincristine; CTX: Cyclophosphamide; VP-16: Etoposide; MMC: Mitomycin; cDDP: Cisplatin; PTX: Paclitaxel; 5-FU: 5-Fluorouracil; MTX: Methotrexate.

表 3 人肝癌亲本细胞株与其相应的 ADM 耐药细胞株中耐药基因 mRNA 表达量的比较

Table 3 Comparison of mRNA expressions of resistance-related genes between human HCC parental cells and the resistant cells

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Cell strain	<i>P-gp</i>	<i>MRP1</i>	<i>LRP1</i>	<i>BCRP</i>	<i>GST-π</i>	<i>Topo β</i>	<i>PKC</i>
HepG2	0.127±0.007	0.232±0.014	0.262±0.010	0.105±0.010	0.317±0.008	0.253±0.010	0.265±0.018
HepG2/ADM-H	0.952±0.061	0.552±0.035	0.443±0.029	0.477±0.021	0.368±0.011	0.836±0.024	0.282±0.014
HepG2/ADM-L	0.864±0.047	0.473±0.026	0.368±0.015	0.461±0.018	0.354±0.010	0.769±0.020	0.278±0.022
SMMC-7721	0.102±0.007	0.130±0.011	0.259±0.006	0.197±0.008	0.154±0.013	0.158±0.006	0.240±0.014
SMMC-7721/ADM-H	0.708±0.016	0.383±0.034	0.295±0.014	0.346±0.007	0.201±0.012	0.677±0.021	0.284±0.007
SMMC-7721/ADM-L	0.599±0.014	0.209±0.016	0.296±0.012	0.435±0.019	0.197±0.011	0.584±0.014	0.266±0.013
BEL-7402	0.108±0.008	0.157±0.013	0.286±0.009	0.206±0.016	0.173±0.005	0.205±0.007	0.223±0.017
BEL-7402/ADM-H	0.821±0.020	0.417±0.027	0.425±0.016	0.386±0.013	0.234±0.010	0.773±0.018	0.258±0.014
BEL-7402/ADM-L	0.665±0.012	0.289±0.020	0.416±0.018	0.365±0.011	0.236±0.011	0.681±0.022	0.244±0.022

达, 结果显示, *P-gp* (图 1A)、*MRP1* 和 *BCRP* 蛋白主要表达于细胞膜 (细胞质) 中, *LRP1* 和 *GST-π* 主要表达于细胞质中, 而 *Topo β* 和 *PKC* 则主要表达于细胞核上。统计结果显示, 耐药株蛋白表达量均较亲本株有不同程度增加, 差异具有统计学意义 ($t > 2.447, P < 0.05$), 其中各组耐药蛋白均增加 1 倍以上 (表 4)。

2.4 细胞增殖相关蛋白的表达 免疫组织化学检测结果提示, 在 HepG2 细胞组中 PCNA 和 Ki-67 在亲本株和耐药株的细胞核表达均呈散在均匀分布 (图 1A)。3 株细胞的免疫组织化学结果经统计学分析, PCNA 和 Ki-67 蛋白在耐药株中免疫组织化学阳性指数高于亲本株 10 倍以上, 差异具有统计学意义 ($t > 2.447, P < 0.05$, 图 1B)。

2.5 细胞周期的分布 FCM 检测结果提示, 各耐药株细胞与原亲本株细胞相比, 其周期分布均发生如下改变: S 期比例增高, G₀/G₁ 期和 G₂/M 期比例下降, 耐药细胞株的 PI 较亲本株明显下降, 差异有统计学意义 ($t > 2.447, P < 0.05$, 表 5)。

2.6 细胞存活及凋亡情况 Annexin -FITC/PI 双染法检测亲本株和耐药株加药后凋亡情况。HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7402 亲本细胞株及其相应的耐药细胞株, 分别加入 ADM 处理后, 亲本株存活率均在 15% 以下, 耐药株均在 40% 以上; 亲本细胞株的凋亡率均在 80% 以上, 而耐药细胞株的凋亡率均在 40% 以下。其中高浓度诱导获得的耐药细胞凋亡率最低, 存活率最高, 而亲本细胞凋亡率最高, 存活率最低。与亲本株相比, 耐药细胞株对于大剂量化疗药物的耐受性明显增强, 存活率提高 3 倍以上, 差异有统计学意义 ($t > 2.447, P < 0.05$) (图 2, 以 HepG2 细胞组为例)。

2.7 细胞体外侵袭能力 Transwell 小室体外侵袭实验检测结果显示, 与亲本细胞株相比, 耐药株穿膜细胞数增加 1.4 ~ 2.6 倍, 以 HepG2/ADM-H 增加最明显, 各组细胞经比较差异具有统计学意义 ($t > 2.447, P < 0.05$), 直接法与间接法高度相关 ($r > 0.98$, 表 6), 提示耐药细

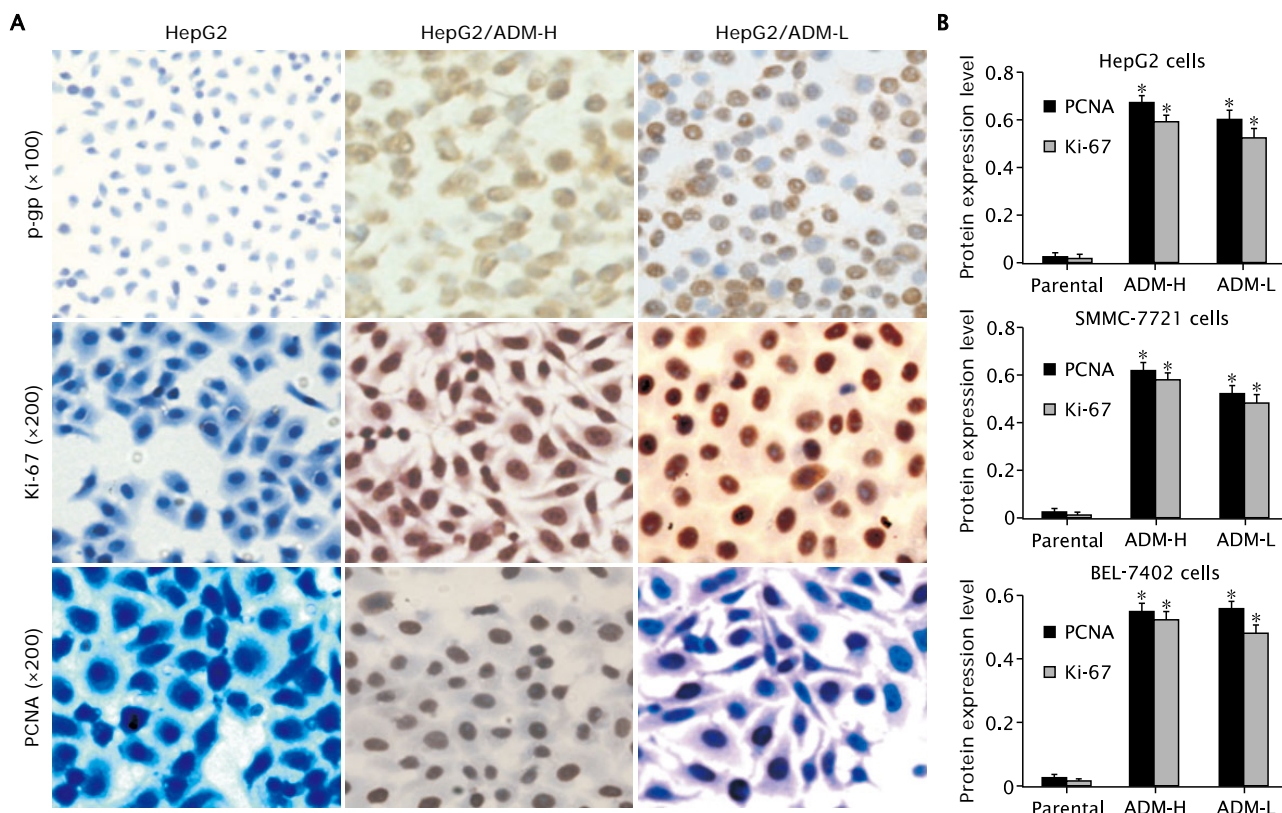


Fig.1 The expressions of P-gp protein, Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins in HCC parental HepG2 cells and the resistant cells (HepG2/ADM-H and HepG2/ADM-H cells) were detected by immunohistochemistry (Fig. 1A: DAB staining). Fig. 1B showed the corresponding histograms of the results of immunohistochemistry.

图 1 免疫组织化学检测人肝癌亲本细胞株及其 ADM 耐药细胞株中 P-gp、Ki-67 和 PCNA 蛋白的表达 (DAB 染色)

表 4 人肝癌亲本细胞株与其相应的耐药细胞株中多药耐药相关蛋白表达量的比较

Table 4 Comparison of the expression levels of resistance-related proteins between human HCC parental cells and the resistant cells

Cell strain	[Absorbance (D) value, n=6, $\bar{x} \pm s$]							
	P-gp	MRP1	LRP1	BCRP	GST- π	Topo β	PKC	
HepG2	1.23 \pm 0.06	1.46 \pm 0.07	1.89 \pm 0.12	1.34 \pm 0.11	1.14 \pm 0.13	1.45 \pm 0.18	1.25 \pm 0.19	
HepG2/ADM-H	13.26 \pm 0.61	12.07 \pm 0.31	2.34 \pm 0.21	3.85 \pm 0.14	2.82 \pm 0.18	4.04 \pm 0.43	13.45 \pm 0.34	
HepG2/ADM-L	12.37 \pm 0.42	9.82 \pm 0.24	2.11 \pm 0.19	3.22 \pm 0.13	2.55 \pm 0.16	3.86 \pm 0.38	11.85 \pm 0.28	
SMMC-7721	1.16 \pm 0.12	1.39 \pm 0.09	1.76 \pm 0.15	1.12 \pm 0.08	1.88 \pm 0.14	1.62 \pm 0.17	1.38 \pm 0.17	
SMMC-7721/ADM-H	10.62 \pm 0.24	8.93 \pm 0.32	2.45 \pm 0.23	2.98 \pm 0.09	2.67 \pm 0.19	4.26 \pm 0.32	14.72 \pm 0.53	
SMMC-7721/ADM-L	9.83 \pm 0.31	8.77 \pm 0.34	2.27 \pm 0.18	3.01 \pm 0.14	2.45 \pm 0.18	3.96 \pm 0.28	14.35 \pm 0.49	
BEL-7402	1.08 \pm 0.07	1.27 \pm 0.09	1.52 \pm 0.21	1.26 \pm 0.13	1.76 \pm 0.12	1.83 \pm 0.21	1.59 \pm 0.09	
BEL-7402/ADM-H	12.36 \pm 0.32	12.88 \pm 0.23	2.03 \pm 0.19	3.56 \pm 0.11	2.96 \pm 0.21	4.56 \pm 0.41	14.23 \pm 0.54	
BEL-7402/ADM-L	10.76 \pm 0.24	8.572 \pm 0.19	1.95 \pm 0.22	3.29 \pm 0.17	2.85 \pm 0.19	3.79 \pm 0.38	13.82 \pm 0.46	

表 5 人肝癌亲本细胞株及 ADM 耐药细胞株细胞周期分布的比较

Table 5 Comparison of cell cycle distribution induced by ADM between human HCC parental cells and the resistant cells (n=6, $\bar{x} \pm s$, %)

Cell strain	Cell cycle			Proliferation index
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
HepG2	64.95 \pm 2.87	14.51 \pm 0.47	20.54 \pm 0.96	35.05
HepG2/ADM-H	55.31 \pm 2.94	23.77 \pm 1.63	21.92 \pm 2.14	45.69
HepG2/ADM-L	59.14 \pm 3.06	26.36 \pm 1.82	14.50 \pm 1.58	40.86
SMMC-7721	55.73 \pm 2.53	27.04 \pm 1.37	18.23 \pm 1.95	45.27
SMMC-7721/ADM-H	36.37 \pm 2.37	41.58 \pm 1.52	22.05 \pm 1.27	63.63
SMMC-7721/ADM-L	40.51 \pm 2.78	39.21 \pm 2.19	20.28 \pm 1.46	59.49
BEL-7402	59.26 \pm 2.64	22.47 \pm 1.26	18.27 \pm 1.63	40.74
BEL-7402/ADM-H	48.12 \pm 2.36	31.63 \pm 1.41	20.25 \pm 2.25	51.88
BEL-7402/ADM-L	52.83 \pm 2.49	29.58 \pm 2.01	17.61 \pm 1.16	47.17

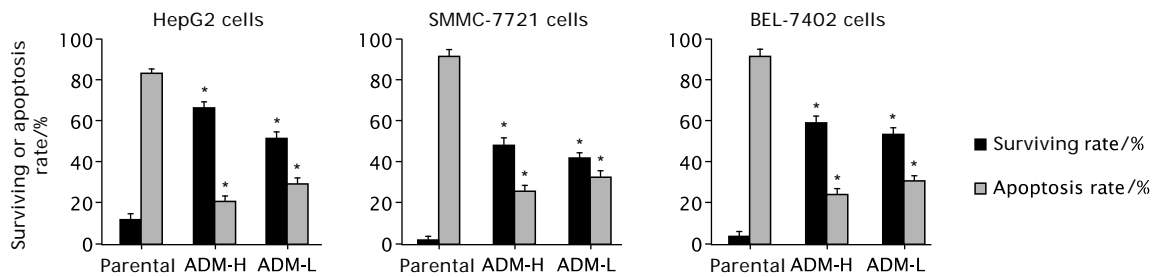


Fig.2 The apoptosis and surviving rates of human HCC parental cells and the resistant cells were detected by flow cytometry (FCM). $P < 0.05$, vs the parental cells.

图 2 FCM 法检测人肝癌亲本细胞株及其 ADM 耐药细胞株的凋亡率及存活率

表 6 人肝癌 ADM 耐药细胞株相对亲本细胞株穿过基质膜数量 (侵袭指数) 的比较

Table 6 Comparison of the invasion index (number of the cells infiltrating the basement membrane) between human HCC parental cells and the resistant cells

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Cell strain	Direct method	Indirect method
HepG2/ADM-H	2.50 ± 0.16	2.61 ± 0.31
HepG2/ADM-L	1.88 ± 0.13	1.98 ± 0.26
SMMC-7721/ADM-H	1.82 ± 0.12	2.01 ± 0.28
SMMC-7721/ADM-L	1.36 ± 0.11	1.55 ± 0.23
BEL-7402/ADM-H	1.93 ± 0.15	1.85 ± 0.24
BEL-7402/ADM-L	1.57 ± 0.12	1.54 ± 0.21

胞株较亲本细胞株具有更强的侵袭能力。

2.8 MAPK 相关基因及蛋白的表达 RFQ-PCR 检测结果显示, 3 种肝癌 ADM 耐药细胞株中 MAPK 相关基因 (p38α、JNK1、JNK2、ERK1、ERK2 和 ERK5) 的表达量相对亲本细胞株的表达量均明显增加, 差异有统计学意义 ($t > 3.182$, $P < 0.05$, 表 7)。

蛋白质印迹法检测结果显示, 3 种肝癌 ADM 耐药株中 ERK1 和 ERK2 蛋白的表达量均较亲本株增加, 差异有统计学意义 ($t > 3.182$, $P < 0.05$, 图 3)。

表 7 人肝癌 ADM 耐药细胞株相对亲本细胞株 MAPK 信号通路中相关基因 mRNA 相对表达量的比较

Table 7 Comparison of the relative expression levels of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway-related genes between human HCC parental cell lines and the resistant cell lines

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Cell strain	ERK1	ERK2	ERK5	JNK1	JNK2	p38α
HepG2/ADM-H	3.13 ± 0.04	35.03 ± 0.38	4.29 ± 0.05	1.37 ± 0.01	128.10 ± 1.56	32.67 ± 0.36
HepG2/ADM-L	40.03 ± 0.16	71.47 ± 0.52	48.20 ± 0.42	8.31 ± 0.09	604.31 ± 6.14	138.57 ± 1.52
SMMC-7721/ADM-H	1.36 ± 0.01	8.29 ± 0.04	25.47 ± 0.23	1.29 ± 0.02	103.21 ± 1.21	4.95 ± 0.05
SMMC-7721/ADM-L	2.64 ± 0.02	17.28 ± 0.10	5.73 ± 0.06	15.61 ± 0.16	419.46 ± 4.65	46.56 ± 0.53
BEL-7402/ADM-H	4.28 ± 0.04	34.91 ± 0.18	38.31 ± 0.16	11.43 ± 0.13	190.20 ± 2.03	37.16 ± 0.39
BEL-7402/ADM-L	1.90 ± 0.00	18.60 ± 0.11	36.23 ± 0.14	2.34 ± 0.03	258.60 ± 2.67	17.21 ± 0.21

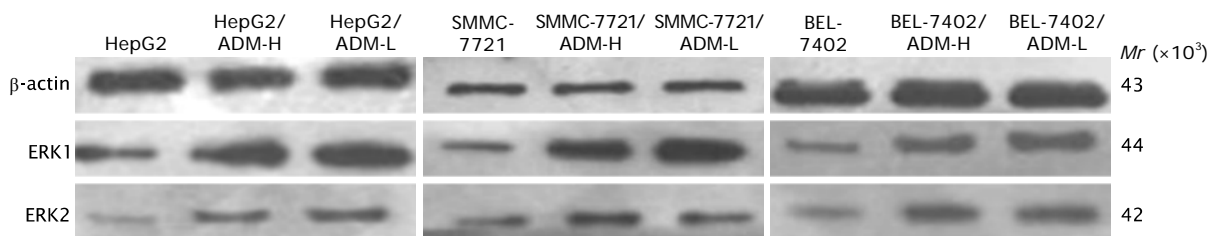


Fig.3 The expressions of ERK1 and ERK2 proteins in HCC parental HepG2, SMCC7721 and BEL-7402 cells and their resistant cells (HepG2/ADM-H, HepG2/ADM-L, SMCC7721/ADM-H, SMCC7721/ADM-L, BEL-7402/ADM-H and BEL-7402/ADM-L cells) were detected by Western blotting.

图 3 蛋白质印迹法检测人肝癌亲本细胞株及其 ADM 耐药细胞株中 ERK1 和 ERK2 蛋白的相对表达量

3 讨论

化疗药物体外诱导肿瘤细胞耐药性, 是目前最常用的诱导方法。其中大剂量间歇冲击诱导与

临床短疗程、大剂量化疗用药方式相似。本研究采用 2 种方法体外诱导 3 种不同分化、各具特点的肝癌细胞株, RI 检测结果显示, 大剂量间歇冲击诱导组符合高度耐药 ($RI > 15$), 小剂量平缓

升高诱导达到中度耐药 (RI 在 5 ~ 15) [1], 耐药株对其他多种结构、机制不同的化疗药物具备不同程度耐药, 证实多药耐药株建立成功。

目前已知的与 MDR 机制相关的蛋白主要有 P-gp、MRP、BCRP 和 LRP, 以及代谢相关酶类的过度表达。其中对 P-gp 的研究最多, P-gp 表达程度高低与化疗效果和肿瘤预后紧密相关, P-gp 表达阳性率高的患者, 其生存期短、缓解率低、复发率高 [3]。MRP 也有相类似的结论。长期应用 ADM 后, 细胞 MDR 相关蛋白的表达水平均有不同程度的提高 [4, 5]。本实验发现, 在耐药细胞株中上述 4 种耐药基因均有不同程度的升高, 并以 P-gp、MRP1 及 BCRP 升高最明显, 其编码的蛋白均明显升高, 并可能在引起耐药的多个途径上发生了改变 [6-8]。代谢相关酶类不同程度的升高可能是上述耐药蛋白及相关通路活化综合作用的结果, mRNA 与蛋白表达上的不一致可能与 mRNA 活性增加或转录后激活水平增加有关, 具体机制尚待研究。

比较与细胞增殖活性相关的蛋白表达, 提示耐药细胞增殖活性较亲本细胞明显增高; 而细胞周期检测结果显示耐药细胞 G₀/G₁ 期细胞所占比例减低, 增殖指数增加, 提示细胞进入增殖周期细胞增多, 细胞增殖旺盛, 这可能与耐药细胞分化更低、恶性程度更高有关, 并且恶性程度高的细胞更多发生细胞信号转导和细胞代谢上的紊乱。

ADM 属细胞周期非特异性药物, 其对 S 期的细胞最为敏感。与亲本细胞株相比, 耐药株 S 期细胞比例增加了提示出现 S 期阻滞。S 期阻滞为 DNA 修复提供足够的时间, 修复成功的细胞进入下一细胞周期, S 期阻滞时间越长, 细胞对各种不良因素的耐受性越强, 最终因修复失败而凋亡的细胞越少。FCM 法检测结果显示, 化疗药物处理后的亲本细胞凋亡率明显高于耐药细胞, 证实耐药株更能抵抗凋亡。诱导细胞凋亡是众多化疗药物杀伤肿瘤细胞的共同通路, 凋亡受抑可能就是肿瘤细胞产生耐药的机制之一, 这比其他关于多药耐药性发生的机制更具普遍意义, 也更能解释为什么当肿瘤细胞对某一化疗药物产生耐药性后, 对另一些从未接触过的、结构功能完全不同的化疗药物同时产生了耐药性。

侵袭是肿瘤转移的第一步, 基膜是阻碍肿瘤细胞侵袭的重要屏障, 而肿瘤细胞穿透基膜则意味着肿瘤发生转移。转移灶比原发灶具有更高耐药性 [9]。侵袭实验表明, 耐药细胞较亲本细胞侵袭、转移能力增加, 而这可能是通过调控侵袭相关因子或者是化疗药物诱导能富集高转移潜能的

亚克隆实现的 [10]。在不少肿瘤侵袭转移过程中均检测到 MAPK 信号转导通路的活化, 并且抑制 MAPK 通路可以抑制细胞侵袭。

肿瘤耐药的产生和维持可能与包括药物外排增加、解毒系统活化、药物靶点改变、凋亡通路受阻和 DNA 损伤修复增强在内的多种机制有关, 由此可以看出多药耐药基因与细胞代谢调控和信号转导有着密切的联系。MAPK 信号通路是调节细胞生长、增殖、分化、凋亡、黏附和迁移的细胞内信号转导的重要通路, 化疗药物可以引起 MAPK 通路的激活 [4, 11]。MAPK 各通路的活化与人类直肠癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌和乳腺癌等多种肿瘤耐药性的产生有关 [12]。本实验也发现, 耐药细胞模型中 MAPK 信号通路在转录和转录后翻译上都较亲本细胞增强。应用 MAPK 抑制剂后稳定耐药细胞的 MDR 表达得以下调 [13, 14]。可见肿瘤细胞耐药性与细胞内 MAPK 激酶系统的激活存在着密切关系。其中 ERKs 通路主要促进细胞增殖和生长, 而 JNKs 及 p38 则诱导细胞的凋亡 [15, 16]。本实验中 3 条通路表达都有增加, 提示耐药细胞在增殖和凋亡方面都得到活化。从耐药细胞增殖活性增高这一结果提示, 耐药细胞对 MAPK 激酶系统的影响可能主要是导致 ERK1/2 的表达上调, 而 JNKs 和 p38 这 2 条通路通过负反馈机制代偿性表达升高, 即亚通路间存在着动态平衡, 在受到持续刺激后可能出现“阈值”的增减。由于 ERKs 信号通路可以调节 P-gp 的表达 [17]。JNKs 和 p38 这 2 条通路可以通过增加下游基因 AP-1 的转录活性等方式介导 P-gp 的表达 [18, 19], 证明 MAPK 信号通路可以作用于 P-gp。但是, 通过调节耐药细胞中 AP-1 水平还可以明显改变 MAPK 的表达水平 [20-21], 因此也不排除 P-gp 可以作用于 MAPK。MAPK 与 P-gp 之间可能存在其他更多联系, 具体涉及哪些通路, 这些通路如何被激活, 都还需要进一步研究。亲本细胞及不同程度耐药的细胞是用于基因水平和蛋白水平的差异表达研究的极好材料。

综上所述, 建立人肝癌多药耐药模型是进行肝癌多药耐药研究模型的基础, 耐药细胞在增殖、周期、凋亡、侵袭等方面与亲本细胞存在差异, MAPK 信号通路与肝癌耐药及某些生物学行为存在一定联系, 具体联系及其相关机制尚待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] SNOW K, JUDD W. Characterisation of adriamycin-

- and amsacrine-resistant human leukaemic T cell lines[J]. *Br J Cancer*, 1991, 63(1):17-28.
- [2] RAO CHV, LI X, MANNA S K, *et al.* Human chorionic gonadotropin decreases proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(24):25503-25510.
- [3] 陈慧君, 吴绪峰, 陈惠祯. 卵巢癌 ToPo α , GST- π , p-gp 表达与化疗反应性及预后的关系 [J]. *肿瘤*, 2006, 26(4):380-384.
- [4] SHENA H, XU W, LUO W, *et al.* Upregulation of *mdr1* gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma[J]. *Exp Hematol*, 2011, 39 (5):558-569.
- [5] ZHAO Y, SHEN S, GUO J, *et al.* Mitogen-activated protein kinases and chemoresistance in pancreatic cancer cells[J]. *J Surg Res*, 2006, 136(2):325-35.
- [6] MCILWAIN C C, TOWNSEND D M, TEW K D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy[J]. *Oncogene*, 2006, 25(11):1639-1648.
- [7] SUN F, WANG N, LI G, *et al.* The effect of matrine on the expression of P170 LRP and TOPO of obtained multi-drug resistance of mouse S180's tumour cell[J]. *Zhong Yao Cai*, 2004, 27(11):838-840.
- [8] NABHA S M, GLAROS S, HONG M, *et al.* Upregulation of PKC- δ contributes to antiestrogen resistance in mammary tumor cells[J]. *Oncogene*, 2005, 24(19):3166-3176.
- [9] MENDENHALL W M, AMDUR R J, HINERMAN R W, *et al.* Head and neck mucosal melanoma[J]. *Am J Clin Oncol*, 2005, 28(6):626-630.
- [10] LI H, CHEN X, CALHOUN-DAVIS T, *et al.* PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(6):1820-1825.
- [11] LO P K, HUANG S Z, CHEN H C, *et al.* The prosurvival activity of p53 protects cells from UV-induced apoptosis by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase activity and mitochondrial death signaling[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(23):8736-8745.
- [12] MANSOUR S J, MATTEN W T, HERMANN A S, *et al.* Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase[J]. *Science*, 1994, 265(5174):966-970.
- [13] GUAN J, CHEN X P, ZHU H, *et al.* Involvement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway in multidrug resistance induced by HBx in hepatoma cell line[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(23):3522-3527.
- [14] FUJITA T, WASHIO K, TAKABATAKE D, *et al.* Proteasome inhibitors can alter the signaling pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(4):670-682.
- [15] JIAO J W, WEN F. Tanshinone IIA acts via p38 MAPK to induce apoptosis and the down-regulation of ERCC1 and lung-resistance protein in cisplatin-resistant ovarian cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25 (3):781-788.
- [16] FANG J Y, RICHARDSON B C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(5):322-327.
- [17] JIN F, FAN H, CHEN B, *et al.* Ability of a specific ERK signal-pathway inhibitor to reverse P-glycoprotein-mediated vincristine resistance in colon cancer cell lines[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2004, 1(4):295-300.
- [18] HAZZALIN CA, CANO E, CUENDA A, *et al.* p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient[J]. *Curr Biol*, 1996, 6(8):1028-1031.
- [19] HSU T C, YOUNG M R, CMARIK J, *et al.* Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor κ B (NF- κ B)-dependent transcriptional events in carcinogenesis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(9):1338-1348.
- [20] HAYAKAWA J, DEPATIE C, OHMACHI M, *et al.* The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(23):20582-20592.
- [21] WU Y, HIWASA T, ISOGAI E. Activation of MAP kinases by 5-fluorouracil in a 5-fluorouracil-resistant variant human cell line derived from a KT breast cancer cell line[J]. *Int J Oncol*, 1998, 13(6):1241-1245.

[本文编辑] 林 琳