

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：24520111153426

UDC_____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

腫瘤微環境誘導胃癌化療耐藥的機制研究

Tumour Micro-environment induced chemotherapy

resistance of Gastric Cancer Cells

指 導 教 師：宋秀宇 教授

專 業 名 稱：微 生 物 學

論 文 提 交 日 期：2014 年 4 月

論 文 答 辯 時 間：2014 年 5 月

學 位 授 予 日 期：2014 年 月

答 辯 委 員 會 主 席：_____

評 閱 人：_____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

缩略语索引

| 缩略语 | 英文全名 | 中文全名 |
|--------------------|---|---------------------------------------|
| MDR | Multidrug resistance | 多重耐药 |
| IL-6 | Interleukin-6 | 白细胞介素-6 |
| PM | Plain medium | 普通培养基 |
| CM | Condition medium | 条件培养基 |
| DDP | Cisplatin | 顺铂 |
| SGC-7901 cells | Human small cell lung cancer cell | 人胃腺癌 |
| ABCG2 | ATP-binding cassette superfamily G number 2 | ATP 结合转运蛋白 G 家族 2 |
| MRP2 | Multidrug resistance protein 2 | 多重耐药蛋白 2 |
| ATM | ataxia telangiectasia mutated | 共济失调突变 |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase | 细胞外信号调节激酶 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases | 丝裂原活化蛋白激酶 |
| NF- κ B | nuclear factor- κ B | 细胞核因子 κ B |
| P-gp | P-glycoprotein, | P-糖蛋白 |
| MRP | Multi-drug resistance related protein | 多药相关蛋白 |
| LRP | Lung resistance protein | 肺癌耐药蛋白 |
| IKK α/β | Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase α/β | 核因子- κ B 抑制因子激酶 α/β |
| CCK-8 | Cell Counting Kit-8 Assay | 细胞计数试剂盒 |
| FCM | flow cytometry | 流式细胞术 |
| FBS | fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| h | Hour | 小时 |
| min | Minute | 分钟 |
| BSA | Bovine Serum albumin | 小牛血清白蛋白 |
| Tris | Trihydroxymethyl aminomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |

续表

| 缩略语 | 英文全名 | 中文全名 |
|------|---------------------------------|----------|
| Arc | Acrylamide | 丙烯酰胺 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| TBS | Tris Buffered Saline | Tris 缓冲液 |
| PBS | phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| EDTA | Ethylenediamine tracetetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| APS | Ammonium persulfate | 过硫酸铵 |
| TMB | Tetramethylbenzidine | 四甲基联苯胺 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 聚(偏二氟乙烯) |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |

①注：以上排列按下文出现先后排序。

摘要

【背景和目的】 化疗是临床治疗胃癌的重要手段，但在临床上胃癌常对化疗表现出耐药，甚至多重耐药（Multidrug resistance, MDR）。研究发现，很多化疗药物在体外试验中对胃癌细胞有较好的杀伤效果，而在临床治疗中，其对胃癌的治疗效果却不理想。肿瘤微环境是胃癌的化疗效果在体内和体外产生差异的重要原因；已证实肿瘤微环境中的IL-6、IL-8、氧分压等因素对胃癌耐药有一定影响，但肿瘤微环境整体对胃癌耐药的影响及内在机制仍不清楚。为此，本实验在体外模拟肿瘤微环境，来研究肿瘤微环境对胃癌化疗耐药的影响及其内在机制。

【方法】 本实验利用普通培养基（Plain Medium, PM）作为体外培养环境，利用条件培养基（Conditioned Medium, CM）在体外模拟肿瘤微环境。首先，采用细胞克隆形成实验、CCK-8等实验研究在体外环境下，DDP（2 μ g/ml）对SGC-7901细胞的杀伤效果，以及在体外模拟的肿瘤微环境条件下，CM对DDP引起SGC-7901细胞凋亡的影响。其次，以Western blot检测CM对SGC-7901细胞中耐药相关蛋白ABCG2、MRP2和抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1表达的影响。再次，以Western blot检测CM对SGC-7901细胞中ATM、ERK、p38、IKK α/β 、p65等蛋白的磷酸化水平的影响，来探讨CM对胃癌细胞中ATM、MAPK、NF- κ B信号通路的激活情况。最后，结合ATM通路抑制剂CGK733、ERK通路抑制剂U0126和NF- κ B通路抑制剂BAY11-708抑制相关激酶的活性，以Western blot检测，CM对SGC-7901细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1调节的变化，来探究CM调节SGC-7901细胞中抗凋亡蛋白的内在分子机制。

【结果】 1、在PM条件下，CCK-8实验结果显示，2 μ g/ml的DDP在48h引起SGC-7901细胞活力下降79.3%，细胞克隆形成实验结果显示，2 μ g/ml DDP可以引起SGC-7901细胞凋亡，完全抑制细胞克隆的形成。2、在不同比例的CM条件下，CCK-8实验结果发现，CM可以扭转2 μ g/ml的DDP引起的SGC-7901细胞活力的下降，并且细胞活力随培养基中CM比例的上升而提高；细胞克隆形成实验结果发现，CM可以逆转DDP引起SGC-7901细胞的完全凋亡的情况，形成细胞克隆，并且细胞克隆数随培养基中CM比例的上升而增加。3、CM在8h可以上调SGC-7901

细胞中耐药相关蛋白ABCG2、MRP2和抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1表达,并且表达量随CM比例上升而增加。4、CM上调ATM磷酸化水平,在1h,达到最高水平;同时,CM上调ERK磷酸化水平,随时间而增加;并且,CM上调IKK α/β 和p65磷酸化水平,随时间而增加。5、ATM、ERK和NF- κ B抑制剂CGK733、U0126和BAY可以抑制由CM引起的抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1表达。

【结论】以上实验结果提示:肿瘤微环境可以上调耐药相关蛋白和抗凋亡蛋白,引起化疗耐药,并且肿瘤微环境可以激活胃癌细胞中的ATM、ERK、NF- κ B通路,在调节抗凋亡蛋白表达上发挥一定作用,提示在胃癌化疗中,ATM、ERK和NF- κ B可作为克服MDR的潜在分子靶点,以改善胃癌化疗效果。本课题揭示微环境是胃癌化疗耐药的重要原因,为进一步研究化疗耐药提供新的理论基础。

关键词: 肿瘤微环境 MDR ATM ERK NF- κ B

Abstract

In clinical, chemotherapy plays an important role in the comprehensive treatment of gastric cancer. Many chemotherapy drugs hold enormous promise for cancer treatment in vitro, however, complete clinical response were rare, suggesting that mechanisms existed to render a substantial proportion of tumour cell resistance to treatment. The tumour micro-environment was an important cause of drug resistance. it was reported that many factors in tumor micro-environment can affect gastric cancer chemosensitivity, including IL-6、 IL-8 and hypoxia etc. but, the exact roles of the tumor micro-environment as a whole in chemotherapy resistance was still unclear.

In this study, we used plain medium(PM) and conditioned medium(CM) to simulate the environment in vitro and in vivo. Firstly, the killing effect of DDP on SGC-7901 in PM and in CM were determined by colony formation assay and CCK-8; then SGC-7901 cells were exposed to different concentration CM for 8h, and the expression of ABCG2,MRP2 and Bcl-xl, Bcl-2, Mcl-1 were determined by Western blot. Thirdly, SGC-7901 cells were exposed to 50%CM for different time periods(1,3, 8h), and ATM,MAPK and NF- κ B activation were determined by Western blot. Finally, we used kinase inhibitor to further investigate the roles of ATM, MAPK, NF- κ B activation on the up-regulation expression of Bcl-xl,Bcl-2 and Mcl-1.

Our data showed that: Firstly, in PM, DDP could induced SGC-7901 decline of Cell viability and apoptosis, but in CM, decline of Cell viability and apoptosis were reversed by different concentration CM; Secondly, different concentration CM could up-regulate the expression of ABCG2, MRP2 and Bcl-xl, Bcl-2, Mcl-1; Thirdly, CM could induce the activation of ATM, ERK and NF- κ B by up-regulating ATM, ERK and IKK α/β , p65 phosphorylation; Finally, ATM inhibitor CGK-733, ERK inhibitor U0126 and NF- κ B inhibitor BAY11-708 could down-regulate the expression of bcl-xl,bcl-2 and mcl-1.

In conclusion, our results indicated that tumor microenvironment could up-regulate the expression of multidrug resistance protein ABCG2, MRP2 and anti-apoptotic protein Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, which all contribute to chemotherapy drug resistance, meanwhile, ATM, ERK and NF- κ B activation participate in the progression, and indicating that ATM, ERK and NF- κ B as potential molecules to overcome resistance formation in gastric cancer chemotherapy. The tumour micro-environment might be potential cause of chemotherapy drug resistance.

Key words: The tumour micro-environment; MDR; ATM; ERK; NF- κ B

目 录

| | |
|---|-----|
| 缩略语索引 | I |
| 中文摘要..... | III |
| 英文摘要..... | V |
| 前言..... | 1 |
| 实验材料和方法 | 6 |
| 一. 实验材料 | 6 |
| 二. 实验方法 | 11 |
| 实验结果..... | 23 |
| 1、顺铂在 PM 培养条件下可诱导 SGC-7901 细胞凋亡 | 23 |
| 2、CM 诱导 SGC-7901 细胞对顺铂耐药 | 24 |
| 3、CM 上调 SGC-7901 细胞 ABCG2, MRP2 和抗凋亡蛋白表达..... | 24 |
| 4、CM 激活 ATM、MAPK、NF- κ B 信号通路..... | 27 |
| 5、CM 激活 ATM、ERK、NF- κ B 上调 bcl-x1、mcl-1、bcl-2 表达 | 28 |
| 讨论..... | 30 |
| 结论..... | 35 |
| 参 考 文 献 | 36 |
| 致 谢..... | 43 |

Table of Contents

| | |
|---|------------|
| Abbreviations | I |
| Abstract in Chinese..... | III |
| Abstract in English | V |
| Introduction..... | 1 |
| Materials and Methods..... | 6 |
| 1. Materials..... | 6 |
| 2. Methods | 11 |
| Results | 23 |
| 1. Cisplatin could induce SGC-7901 cell apoptosis in PM | 23 |
| 2. CM could elicit SGC-7901 anticancer drug-resistance to Cisplatin..... | 24 |
| 3. CM could up-regulate the expression of ABCG2,MRP2 and antiapoptotic proteins..... | 24 |
| 4. CM could activate the ATM、 Erk and NF-κB pathways..... | 27 |
| 5. The activation of ATM、 Erk and NF-κB pathways by CM is correlated with the expression of Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1..... | 28 |
| Discussion..... | 30 |
| Conclusion | 35 |
| References | 36 |
| Acknowledgement..... | 43 |

前言

在全球范围内,恶性肿瘤的发病率和死亡率持续升高,据 GLOBOCAN 评估,2008 年,全球约有 1270 万例恶性肿瘤患者,造成 760 万人死亡,约占全球总死亡人数的 13%^[1];其中,56%患者和 64%死亡者发生在经济发展中国家,中国作为发展中国家,恶性肿瘤问题更加严峻^[2],《2012 中国肿瘤登记年报》报道,每年约有 312 万恶性肿瘤新发病例,每年因恶性肿瘤死亡人数高达 270 万例;近 20 年来,我国恶性肿瘤的发病率和死亡率不断升高,并且呈现出年轻化的趋势;恶性肿瘤已成为全人类的公共卫生问题,严重威胁人类健康。

1 胃癌与化疗

胃癌是一种常见恶性肿瘤,2008 年全球有 989600 新发病例,738000 患者死亡,占恶性肿瘤新发病例和死亡比例的 8%和 10%,胃癌的发病率和致死率占恶性肿瘤的第三位和第五位^[1];值得注意的是,在胃癌患者中,男性约是女性的两倍^[3];全球范围内,东亚、东欧、和南美洲是胃癌的高发地区^[2];中国位于胃癌发病率最高的东亚地区,在 1973-1975 年和 1990-1992 年期间,胃癌死亡率位居各种恶性肿瘤死亡率的首位,虽然目前已下降到肺癌和肝癌的之后的第三位,但仍是我国常见的恶性肿瘤之一^[4];2008 年,中国约有 46.3 万胃癌新发病例,占世界胃癌新发病例的 46.8%,35.2 万患者死于胃癌,占全球胃癌死亡人数的 47.8%^[4];所以,中国胃癌现状十分严峻,如何预防和治疗胃癌是中国的一个艰巨任务。

目前,胃癌的治疗手段主要有三种:外科手术、化疗和放疗。外科手术是早中期胃癌治疗主要方法,在临床上,如果能够越早发现胃癌组织,并通过手术切除胃癌组织及其周围组织,则治疗的效果越好。所以,胃癌尽早发现对胃癌治疗非常关键;但由于胃癌早期的临床症状不显著,没有特异性,常被忽视为胃炎或胃溃疡,不易被发现,大多数胃癌在被确诊时,已经是进展期胃癌,胃癌细胞已经扩散,虽然仍可手术治疗,但单纯手术已经无法完全控制胃癌的发展,所以,必须利用放疗和化疗结合手术的方式来进行综合治疗;化疗是中晚期胃癌的主要治疗手段^[5]。

顺铂，顺式-二氨二氯合铂（II），（Cisplatin, DDP）于 1967 年被美国密执安州立大学教授 Rosenberg 等人发现具有抗癌作用，是最早被发现具有抗肿瘤作用的铂类化疗药，属于第一代铂类抗癌药物。它是一类非细胞周期特异性抗癌药物，进入胃癌细胞后会水解成水合物，该水合物进一步去质子化生成羟基化的配位离子，这些离子比较活泼，可与 DNA 大沟内相邻的两个鸟嘌呤 7 位 N 之间，或鸟嘌呤与腺嘌呤 7 位 N 之间，或相隔一个碱基的两个鸟嘌呤 7 位 N 之间以配位键合形成链内交联，扰乱 DNA 的正常双螺旋结构，使 DNA 局部变性失活而丧失复制能力，导致肿瘤细胞凋亡，从而达到抗癌效果^[6]；顺铂作为一种细胞毒性药物，常被用于非小细胞肺癌、食道癌、肠癌、宫颈癌、喉癌、口腔癌等实体肿瘤的治疗，具有疗效显著、价格便宜等优点，在临床上的应用十分广泛；顺铂常与 5-氟脲嘧啶联合使用来治疗晚期胃癌，可以使化疗达到更好效果。

2 化疗耐药

虽然胃癌治疗在化疗方面取得一定进展，特别是一些新化疗药物的问世给胃癌治疗前景方面带来美好憧憬，但在临床上，化疗药物治疗胃癌的效果并不理想，胃癌患者死亡率还是很高，胃癌仍是导致癌症患者死亡的主要原因之一^[7]，其主要原因就是肿瘤化疗耐药，特别是多重耐药，在很大程度上阻碍了化疗药物对胃癌化疗的效果。研究显示，多重耐药又包括固有耐药和获得性耐药，都是限制化疗药物对肠胃恶性肿瘤化疗效果的主要原因^[8-10]。在临床上，化疗耐药已成为包括胃癌在内的众多肿瘤化疗治疗的一个瓶颈^[11-13]，因此，寻找胃癌化疗耐药的原因，弄清耐药的机制，已成为清除胃癌耐药对化疗阻碍，改善化疗对胃癌治疗效果的关键。

胃癌耐药机制的研究一直是国内外研究的热点；很多胃癌耐药的研究把重点放在胃癌细胞自身变化导致的化疗耐药上；目前，研究的主要耐药机制有：（1）化疗药物外排机制；细胞膜上存在一类 ABC 超家族蛋白，在正常细胞下，他们负责细胞膜内外物质的运输，保护细胞正常的生理功能，而在胃癌细胞中，这些蛋白会过表达，把化疗药物排出细胞外，或用囊泡的形式来改变药物在细胞内的分布，从而降低细胞内药物浓度水平或改变细胞内药物的分布，使胃癌产生耐药；与化疗药物外排相关的蛋白，主要包括 P-糖蛋白（P-glycoprotein, P-gp）、多药

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫