

文章编号 1006-8147(2019)06-0556-04

论著

肾癌舒尼替尼耐药细胞株 ACSUR 的建立及其生物学特性研究

任 静,朱仲玲,阎 昭

(天津医科大学肿瘤医院临床药理研究室,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060)

摘要 目的:探讨肾癌舒尼替尼耐药细胞株 ACSUR 的建立及其生物学特性。方法:以肾透明细胞癌 ACHN 细胞为亲本细胞,采用逐步递增药物浓度法诱导建立肾癌舒尼替尼耐药细胞株 ACSUR。倒置显微镜下观察 ACSUR 细胞形态,MTT 法检测细胞增殖,计算耐药指数。流式细胞仪检测细胞凋亡率,二维克隆法和划痕实验分别检测细胞的克隆形成能力和迁移能力。结果:ACSUR 耐药指数为 6.21,细胞多呈分散生长。与亲本细胞相比,ACSUR 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),而克隆形成及迁移能力明显增强($P<0.05$)。结论:ACSUR 具备耐药细胞的生物学特性,可为深入探索肾癌舒尼替尼耐药机制以及逆转耐药策略提供研究模型。

关键词 肾癌;舒尼替尼;耐药

中图分类号 R737.11

文献标志码 A

Establishment of sunitinib-resistant renal carcinoma cell line ACSUR and its biological characteristics

REN Jing, ZHU Zhong-ling, YAN Zhao

(Department of Clinical Pharmacology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To produce sunitinib-resistant cell line ACSUR and explore its biological characteristics. **Methods:** ACHN renal cancer cells as parental cells were incubated with stepwise increasing concentration of sunitinib to produce ACSUR cells. Morphology of ACSUR cells was observed by an inverted microscope. Cell proliferation was measured by MTT assay and drug resistance index was calculated. Apoptosis rate was detected by flow cytometry. The abilities of colony formation and migration were determined by colony formation and wound healing assay respectively. **Results:** ACSUR resistance index was 6.21 and cells grew dispersely. Apoptosis rate was reduced significantly, while abilities of colony formation and migration were enhanced obviously in ACSUR cells ($P<0.05$). **Conclusion:** ACSUR cells possess the biological characteristics of resistant cells, which can provide a research model for exploring the mechanism of resistance to sunitinib and reversal of drug resistance.

Key words kidney cancer; sunitinib; drug resistance

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)又称肾癌,是常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,发病率在全世界范围内逐年上升^[1]。大约 20%患者在初次诊断时即为转移性 RCC (mRCC),30%左右患者在肿瘤切除后仍会发生复发和转移^[2]。肾透明细胞癌(clear cell RCC, ccRCC)是 RCC 最为常见的病理亚型,约占 75%~80%。ccRCC 转移率高,且对常规放疗不敏感^[3]。

多靶点酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼具有抗肿瘤血管生成和抑制肿瘤细胞增殖双重作用,作为 mRCC 的一线治疗药物,舒尼替尼能够明显提高 mRCC 患者的无进展生存期^[4]。然而,接受舒尼替尼

治疗的患者通常在 6~15 个月即发生耐药^[5],其耐药机制尚未完全阐明。本次研究中,我们采用逐步递增药物浓度法诱导建立人肾透明细胞癌细胞 ACHN 的舒尼替尼耐药细胞株-ACSUR,并研究 ACSUR 的生物学特性,旨在为阐明肾癌舒尼替尼耐药机制以及逆转耐药策略提供研究模型。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人肾癌细胞株 ACHN 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。舒尼替尼购自美国 TargetMol 公司,MTT、结晶紫购自索莱宝,细胞凋亡试剂盒购自罗氏公司。胎牛血清购自 Bioind 公司, MEM 培养液购自 Corning 公司,双抗(青链霉素混合液)购自 Cellgro 公司,胰蛋白酶购自 Gibco 公司。

基金项目 科技部“十三五”重大新药创制科技重大专项课题(2018ZX09201-015)

作者简介 任静(1995-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤药理学;通信作者:阎昭, E-mail: yanzhaopaper@163.com。

1.2 细胞培养 ACHN 细胞采用 MEM 培养液(含 10%胎牛血清,1%双抗),置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。待培养皿中细胞覆盖 80%左右时,采用 0.1%胰蛋白酶消化细胞,并进行传代培养,选取对数生长期细胞进行实验。

1.3 ACSUR 耐药细胞株的建立 采用逐步递增舒尼替尼药物浓度的方法,以初始浓度为 0.5 μmol/L 的舒尼替尼对 ACHN 细胞进行诱导,按 ACHN 细胞培养方法换液传代。待细胞状态稳定后,每次 0.5 μmol/L 逐步递增舒尼替尼浓度,以此重复,最终建立耐受 12 μmol/L 舒尼替尼的耐药细胞株 ACSUR。

1.4 MTT 法检测细胞增殖,计算耐药指数 取对数生长期细胞,调整密度为 8×10^4 个/mL,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,培养过夜。待细胞贴壁后,加梯度浓度的舒尼替尼(0、0.625、1.25、2.5、5、10 及 20 μmol/L),每个浓度设置 5 个复孔,并设置空白对照孔。培养 48 h 后,每孔加入 20 μL 的 MTT(5 mg/mL),继续孵育 4 h 后弃去培养液。每孔加入 150 μL DMSO,摇床低速震荡 10 min 使紫色结晶充分溶解,于酶标仪 570 nm 处检测吸光度(optical density, OD)。细胞增殖抑制率(inhibition rate, IC)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)。耐药指数(resistance index, RI)=耐药细胞半数抑制率(IC₅₀)/亲本细胞 IC₅₀。

1.5 二维克隆形成实验 取对数生长期细胞,调整密度为 8×10^2 个/mL,以每孔 1 mL 接种于 12 孔板中,培养过夜。待细胞贴壁后,加梯度浓度的舒尼替尼(0、0.5、1、2、4 及 8 μmol/L),每个浓度设置两个复孔。培养 1 周(中间换 1 次培养液)后,弃去培养液, PBS 清洗两遍,每孔加 1 mL 甲醇,置于 -20℃ 固定 10 min。弃去甲醇, PBS 清洗两遍,每孔加 1%结晶紫 1 mL,室温下染色 20 min。弃去结晶紫, PBS 洗两遍,待晾干后灯光下拍照。

1.6 划痕实验 取对数生长期细胞,调整密度为 1×10^5 个/mL,以每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,培养过夜。待细胞贴壁且铺满培养皿后,采用黄枪头于培养皿底部划痕。弃去培养液,用 PBS 清洗两遍,加入无血清培养液,同时加梯度浓度舒尼替尼(0、0.5、1、2、4 及 8 μmol/L),分别于 0 h 和 24 h 于 40 倍显微镜下拍照。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期细胞,调整密度为 1×10^6 个/mL,以每皿 4 mL 接种于 6 cm 培养皿中,培养过夜。待细胞贴壁后,加梯度浓度舒尼替尼(0、0.5、1、2、4 及 8 μmol/L)。培养 48 h 后,消化离心收集细胞, PBS 洗 2 遍,加入 1×Binding Buffer 300 μL 悬浮细胞,转移到对应流式管。设置 4 管

对照组,分别加入空白、5 μL Annexin V、5 μL Propidium Iodide、5 μL Annexin V 和 5 μL Propidium Iodide。实验组每管加入 5 μL Annexin V 混匀后,再加入 5 μL Propidium Iodide。所有样品混匀后,室温避光反应 15 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.8 统计学分析 实验数据采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组比较用单因素方差分析。计数资料采用百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACSUR 细胞形态变化 光镜下两种细胞均贴壁生长,亲本细胞大小均匀且抱团生长,细胞呈椭圆形梭形。ACSUR 细胞形态不一,多呈分散生长(图 1)。

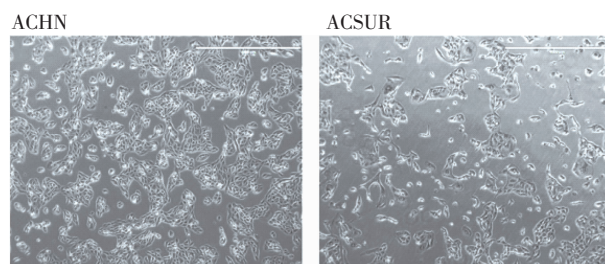


图1 ACHN 和 ACSUR 细胞形态(40×)

Fig 1 ACHN and ACSUR cell morphology(40×)

2.2 ACSUR 细胞耐药指数 MTT 法检测结果显示,ACSUR 和亲本细胞 IC₅₀ 分别为(28.34±6.99)和(4.56±1.58) μmol/L(图 2),ACSUR 耐药指数为 6.21。

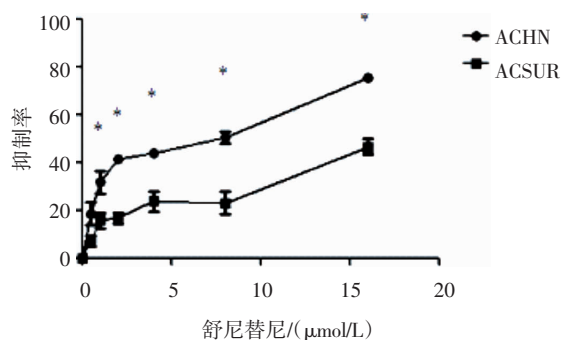


图2 舒尼替尼对 ACHN 及 ACSUR 细胞增殖的影响

Fig 2 Effects of sunitinib on the proliferation of ACHN and ACSUR cells

2.3 ACSUR 细胞克隆形成能力明显增强 二维克隆形成实验结果显示,舒尼替尼作用下,ACSUR 克隆形成能力明显强于亲本细胞(图 3)。

2.4 ACSUR 细胞凋亡率显著降低 流式细胞仪检测结果显示,舒尼替尼浓度为 1、2、4 及 8 μmol/L 时,ACSUR 细胞凋亡率明显低于亲本细胞,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)(图 4)。

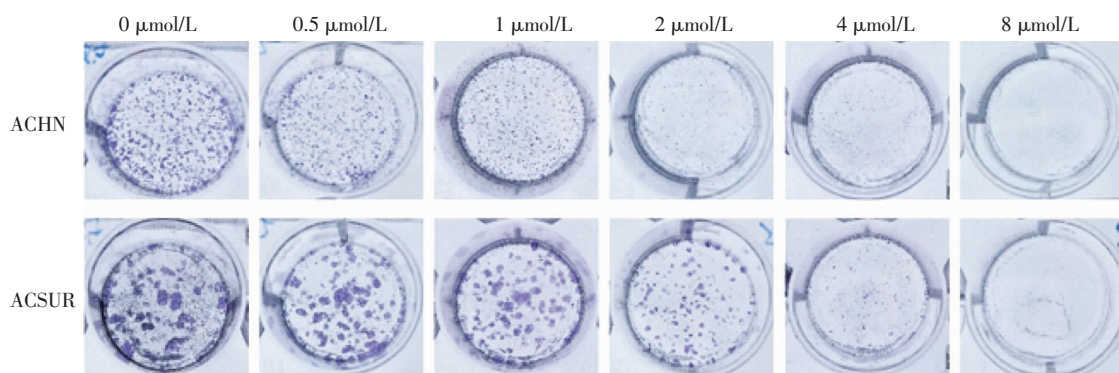


图 3 舒尼替尼对 ACHN 及 ACSUR 细胞二维克隆形成的影响

Fig 3 Effects of sunitinib on the formation of two-dimensional clones of ACHN and ACSUR cells

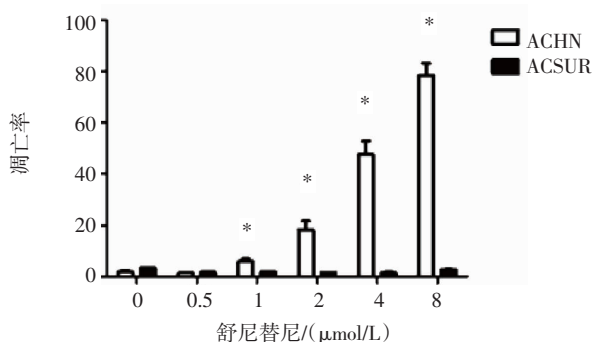


图 4 舒尼替尼对 ACHN 及 ACSUR 细胞凋亡的影响

Fig 4 Effects of sunitinib on the apoptosis of ACHN and ACSUR cells

2.5 ACSUR 细胞迁移能力显著增强 细胞划痕实验结果显示,舒尼替尼浓度为 2、4 及 8 $\mu\text{mol/L}$ 时,ACSUR 细胞的迁移能力明显高于亲本细胞,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 5)。

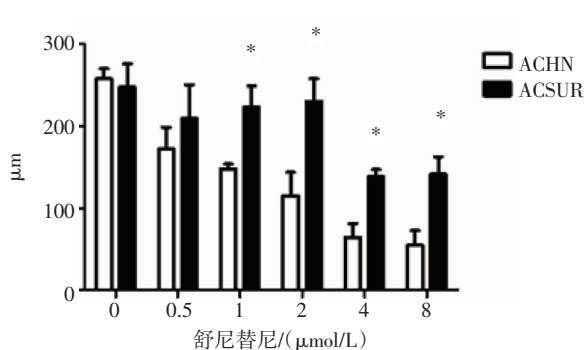


图 5 舒尼替尼对 ACHN 和 ACSUR 细胞迁移能力的影响

Fig 5 Effects of sunitinib on the migration ability of ACHN and ACSUR cells

3 讨论

本文通过逐步药物浓度递增法建立了肾癌细胞舒尼替尼耐药细胞株 ACSUR,耐药指数为 5.38。与亲本细胞相比,ACSUR 细胞体型增大、形状不规则,多呈分散生长。舒尼替尼作用下,ACSUR 细胞凋亡率显著降低,而克隆形成及迁移能力明显增强。以上结果表明,ACSUR 具备耐药细胞的生物学特性,可作为探索舒尼替尼耐药机制的体外研究模型。

既往研究报道,曲乐等^[6]采用临床常规剂量舒尼替尼处理 ACHN 荷瘤裸鼠,通过药物压力筛选、体内连续传代的方法,最终分离培养获得耐药细胞系。其建立的耐药细胞系体型稍大,形态不规则,呈长伪足的多角形。体内实验方法评价耐药指数为 10,体外培养可耐受 10 $\mu\text{mol/L}$ 舒尼替尼。本文采用体外培养方法建立肾癌舒尼替尼耐药细胞株 ACSUR 可耐受 12 $\mu\text{mol/L}$ 舒尼替尼,虽避免多次体内成瘤、体外培养的繁复过程,然而其体内耐药性尚需进一步评价确证。

mRCC 患者对舒尼替尼的初始反应率介于 30%和 40%之间^[11],然而大部分患者在 6~15 个月时即发生继发性耐药。大量研究表明,舒尼替尼耐药机制^[12]可能与血管生成信号通路上调^[13]、骨髓来源细胞募集、肿瘤缺氧^[14]、肿瘤微环境改变、替代信号通路激活^[15]等有关,然而具体的耐药机制仍不完全清楚。本文所建立的肾癌舒尼替尼耐药细胞模型,可为深入探索舒尼替尼耐药机制及逆转耐药治疗策略提供可靠的体外研究平台。

参考文献:

- [1] Qu L, Ding J, Chen C, et al. Exosome-transmitted lncARSR promotes sunitinib resistance in renal cancer by acting as a competing endogenous RNA[J]. Cancer Cell, 2016, 29(5): 653
- [2] Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer[J]. Lancet, 2016, 387(10021): 894
- [3] Tavazoie S F, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Nature, 2008, 451(7175): 147
- [4] Molina A M, Lin X, Korytowsky B, et al. Sunitinib objective response in metastatic renal cell carcinoma: analysis of 1059 patients treated on clinical trials[J]. Eur J Cancer, 2014, 50(2): 351
- [5] Zhang L, Bhasin M, Schor-Bardach R, et al. Resistance of renal cell carcinoma to sorafenib is mediated by potentially reversible gene expression[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19144
- [6] 曲乐, 王林辉, 刘冰, 等. 肾癌舒尼替尼耐药细胞系及其构建方法[P]. 中国专利. CN104988122A. 2015-10-21

(下转第 576 页)

- Hypertens,2016,25(5):396
- [6] Yang R, Fang W, Liang J, et al. Apelin/APJ axis improves angiotensin II-induced endothelial cell senescence through AMPK/SIRT1 signaling pathway[J]. Arch Med Sci, 2018, 14(4):725
- [7] Zhou Y, Wang Y, Qiao S B. Apelin a potential marker of coronary artery stenosis and atherosclerotic plaque stability in ACS patients [J]. Int Heart J, 2014, 55(3):204
- [8] Chun H J, Ali Z A, Kojima Y, et al. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis[J]. J Clin Invest, 2008, 118(10):3343
- [9] Fraga-silva R A, Seeman H, Montecucco F, et al. Apelin treatment enhances the stability of atherosclerotic plaques[J]. Eur J Clin Invest, 2018, 48(3): doi:10.1111/eci. 12891. Epub 2018 Feb 5.
- [10] Mao X H, Tao S, Hui Z X, et al. Apelin-13 promotes monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cell mediated by phosphatidylinositol 3-Kinase signaling pathway[J]. Progr Biochem Biophys, 2011, 38(12):1162
- [11] Hashimoto T, Kihara M, Imai N, et al. Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 171(5):1705
- (2019-01-16 收稿)

(上接第 558 页)

- [7] Faivre S, Demetri G, Sargent W, et al. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(9):734
- [8] Takeuchi K, Ito F. EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors[J]. FEBS J, 2010, 277(2): 316
- [9] Sato H, Yamamoto H, Sakaguchi M, et al. Combined inhibition of MEK and PI3K pathways overcomes acquired resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2018, 109(10): 3183
- [10] Randrup Hansen C, Grimm D, Bauer J, et al. Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): pii:E461. doi:10.3390/ijms18020461.
- [11] Molina A M, Lin X, Korytowsky B, et al. Sunitinib objective response in metastatic renal cell carcinoma: analysis of 1059 patients treated on clinical trials[J]. Eur J Cancer, 2014, 50(2): 351
- [12] Shibasaki N, Yamasaki T, Kanno T, et al. Role of IL13RA2 in sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130980
- [13] Park K, Lee J L, Park I, et al. Comparative efficacy of vascular endothelial growth factor (VEGF) tyrosine kinase inhibitor (TKI) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor as second-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma after the failure of first-line VEGF TKI[J]. Med Oncol, 2012, 29(5): 3291
- [14] Diaz R I, Nguema P A. Sunitinib reduces tumor hypoxia and angiogenesis, and radiosensitizes prostate cancer stem-like cells [J]. Prostate, 2015, 75(11):1137
- [15] Joosten S C, Hamming L. Resistance to sunitinib in renal cell carcinoma: from molecular mechanisms to predictive markers and future perspectives[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1855(1):1
- (2018-12-12 收稿)