

# 营养胁迫条件与耐药乳腺癌细胞 生长优势的相关性研究

蔡燕飞 马鑫 张鹏 陈蕴 金坚\*

(江南大学药学院, 药物设计与分子药理学实验室, 无锡 214122)

**摘要** 与正常组织相比, 实体瘤生长的微环境更加恶劣。那么, 为何在如此恶劣的生长环境下, 肿瘤细胞仍能顽强生存, 更有胜者转化成耐药肿瘤细胞, 造成临床难以治疗的困难局面。该文拟以低营养模拟肿瘤的内部环境, 研究野生型与耐药型细胞生长状态和生长需求存在的差异, 进而解析其具体原因。该文以人乳腺癌MCF-7细胞的野生型和耐阿霉素型细胞为研究对象, 通过对细胞增殖能力、细胞迁移和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)分泌等实验分析发现, 在低营养条件下, 耐药型细胞的增殖能力和迁移能力远高于野生型细胞, 而且耐药型细胞能分泌更多的VEGF。该研究结果表明, 在营养胁迫条件下, 耐药型细胞的生存能力更强, VEGF的高分泌可能是促进其快速生长的重要原因。

**关键词** 营养胁迫; 耐药; 肿瘤; VEGF

## The Study in Correlation between Nutrient Stress and Growth Advantage of Drug Resistance Cancer Cells

Cai Yanfei, Ma Xin, Zhang Peng, Chen Yun, Jin Jian\*

(The Laboratory of Drug Design and Molecular Pharmacology, School of Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract** The microenvironment of solid tumor is worse than the normal tissue. But why the tumor cells can still survive and transform into drug resistant tumor cells which causing difficulties on clinical treatment is not clear. This study proposed low nutrition as simulation environment in solid tumor, and investigated the growth status and growth demand of wild type and drug resistant cells, then parsed the specific reason. The wild type and drug resistant breast cancer MCF-7 cells were used to detect cell proliferation, cell migration and the expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF). It is found that under the low nutrition condition, the proliferation and migration abilities of drug resistant cells are stronger than that of the wild type cells. What's more, the VEGF also secrete more in drug resistant cells. These results suggest that the survival ability of drug resistant cells is stronger under nutritional stress, maybe the high expression of VEGF is the main reason.

**Keywords** nutrotrion stress; drug resistance; tumor; VEGF

迄今为止, 肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)仍是临床上肿瘤化疗失败的主要原因。MDR是指肿瘤细胞对一种药物产生耐药性后, 对其他

结构和作用机制不同的药物也产生耐药性的现象<sup>[1-2]</sup>。在大部分耐药的肿瘤细胞中均发现有P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的过量表达, 其编码基因

收稿日期: 2017-03-03 接受日期: 2017-07-07

国家自然科学基金(批准号: 81572940)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13706196319, E-mail: jinjian31@163.com

Received: March 3, 2017 Accepted: July 7, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81572940)

\*Corresponding author. Tel: +86-13706196319, E-mail: jinjian31@163.com

网络出版时间: 2017-08-16 16:49:07

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170816.1649.014.html>

为MDR1。研究发现, P-gp可作为药物的外排泵将化疗药物泵出胞外, 从而降低药物对细胞的毒性。因此, P-gp被认为是发现最早也是最为重要的耐药相关蛋白质<sup>[3-4]</sup>。近年来, 本研究室也发现, 传统型瞬时受体电位通道5(transient receptor potential channels 5, TRPC5)与肿瘤耐药关系密切, 具体的研究成果已于2015年发表在美国国家科学院院刊(PNAS)上<sup>[5]</sup>。随后, 更多的关于TRPC5与肿瘤耐药的相关研究也陆续开展。经研究发现, TRPC5通道可调节钙离子内流, 从而调控钙离子依赖性转录因子活化T细胞核因子c3(nuclear factor of activated T cells 3, NFATc3)对P-gp的转录, 该研究结果进一步阐明了肿瘤耐药的分子机制。

然而, 人们对于多药耐药机理的研究已相对较多, 而且大部分研究都围绕寻找耐药相关蛋白质展开, 虽然找到了一些与耐药相关的药物靶点, 但真正能适用于临床的少之又少。总体来说, 到目前为止并没有找到合适的方法来解决多药耐药难题, 因此寻找新的研究思路对于改善此局面至关重要<sup>[6]</sup>。本研究注重对耐药乳腺癌细胞的生长状态、生长特点、与野生型细胞的差异以及生长方式改变的原因进行研究, 以期抗耐药肿瘤治疗开辟一条新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌野生型细胞株MCF-7/WT购自ATCC细胞库。人乳腺癌耐阿霉素细胞株MCF-7/ADM由本实验室构建保存<sup>[7]</sup>。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基购自Gibco公司; 胎牛血清购自Gibco公司; CellTiter-Blue Cell Viability Assay(G8081)购自美国Promega公司; 抗体MDR1(D-11)(sc-55510)购自美国Santa Cruz公司; 抗体TRPC5(ab63151)购自美国Abcam公司; 抗体 $\beta$ -tubulin(SC-9104)购自美国Santa Cruz公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(A0208)和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(A0216)均购自上海碧云天生物科技有限公司; VEGF(vascular endothelial growth factor)的ELISA检测试剂盒(ab100663)购自美国Abcam公司; 其他试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT法检测MCF-7/ADM细胞的耐药指数 分别收集MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞, 按7 000/孔接

种96孔板, 培养过夜后加阿霉素, 每个药物浓度设置4个复孔。药物作用48 h后, 换成不含药物的新鲜培养液200  $\mu$ L/孔, 每孔再加入20  $\mu$ L(5 mg/mL)的MTT, 置培养箱孵育4 h, 弃去培养液, 每孔加150  $\mu$ L DMSO, 待结晶完全溶解后于490 nm波长处测吸光度。以Log(药物浓度)为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.2 Western blot检测P-gp在两株细胞中的表达情况 收集 $1.0 \times 10^6$ 细胞, 用全细胞裂解液裂解后进行SDS-PAGE, 经过转膜封闭后, 用P-gp的一抗于室温孵育1 h, TBST清洗后用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h, TBST清洗后通过ECL显色。

1.2.3 生长曲线检测 分别收获对数生长中期、生长状态良好的野生型MCF-7/WT和耐药型MCF-7/ADM细胞, 96孔板每孔接种 $7.0 \times 10^3$ 细胞, 24 h后每种细胞分别换用含10%和2% FBS的培养基培养。之后每天采用CellTiter-Blue Cell Viability Assay试剂盒分别测定细胞生长情况。具体方法为每孔加入5  $\mu$ L CellTiter-Blue Cell Viability Assay试剂, 37  $^{\circ}$ C培养箱培养1~4 h, 于激发光为560 nm、接收光为590 nm下检测吸光度。以时间为横坐标, 细胞增殖率为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.4 Transwell细胞迁移实验 细胞用含2% FBS的培养基饥饿培养24 h, 消化后用PBS洗涤1~2次, 用含0.1% FBS的培养基重悬并将细胞密度调至 $2.5 \times 10^5$ /mL, 取200  $\mu$ L加入Transwell上室。在24孔板下室加含2% FBS的培养基。常规培养48 h后通过结晶紫染色进行呈像, 分别对4个不同视野的细胞进行计数并统计。

1.2.5 ELISA 细胞消化后按照 $1.0 \times 10^5$ /mL铺6孔板, 分别用含10%和2% FBS的培养基培养分别在24 h和48 h后取上清, 按照试剂盒操作说明检测VEGF的表达情况。以细胞种类为横坐标, VEGF相对水平为纵坐标绘图。

1.2.6 数据统计 采用Graph Pad软件进行组间t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞株的耐药性鉴定

通过MTT法检测ADM对MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞的IC<sub>50</sub>, 结果表明, MCF-7/ADM的耐药性远远高于MCF-7/WT(图1A)。采用Western blot

分别检测MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞中P-gp和TRPC5的表达情况。结果发现, 在MCF-7/WT细胞中P-gp和TRPC5未见蛋白质条带, 而在MCF-7/ADM细胞中两种蛋白质均有表达(图1B和图1C)。3个实验结果同时证明了本研究所运用的MCF-7/ADM细胞为耐药细胞株, MCF-7/WT细胞为野生型细胞株。

### 2.2 不同营养条件下耐药乳腺癌细胞生长水平的比较

在分别含10%和2% FBS的培养基中培养细胞, 检测其生长曲线, 结果如图2所示。在含10% FBS的培养基中, MCF-7/WT细胞和MCF-7/ADM细胞的生长曲线基本重合。而在含2% FBS的培养基中, MCF-7/WT细胞停滞生长, 但MCF-7/ADM细胞生长基本不受低血清的影响, 生长趋势与在含10% FBS的培养基中的生长趋势基本相同。

同时, 我们通过Transwell细胞迁移实验检测在低营养条件下两种细胞的迁移能力。结果显示, 在低营养条件下, MCF-7/ADM细胞的迁移能力明显高

于MCF-7/WT细胞(图3)。

因此, 以上两个实验均表明, 耐药型乳腺癌细胞的生长不受低营养条件的限制, 与野生型细胞相比有明显的生长优势。

### 2.3 在两种细胞中VEGF分泌水平的比较

运用VEGF的ELISA检测试剂盒检测在不同的营养条件下两种细胞分泌VEGF的量。结果如图4所示, 10% FBS的营养条件下, 24 h后MCF-7/ADM细胞分泌的VEGF明显低于MCF-7/WT细胞。但在2% FBS的低营养条件下, MCF-7/ADM细胞分泌的VEGF量迅速升高, 而MCF-7/WT细胞无明显变化。在2% FBS的低营养条件下, 48 h后MCF-7/ADM细胞分泌的VEGF量持续升高, 而MCF-7/WT细胞反而有少量下降。该实验结果表明, 在正常营养条件下, 耐药型细胞只需要少量的VEGF就能维持其正常生长。在低营养条件下, 耐药型细胞会通过提高VEGF分泌水平来维持生存。

结果表明, 在营养胁迫条件下, 耐药细胞的生

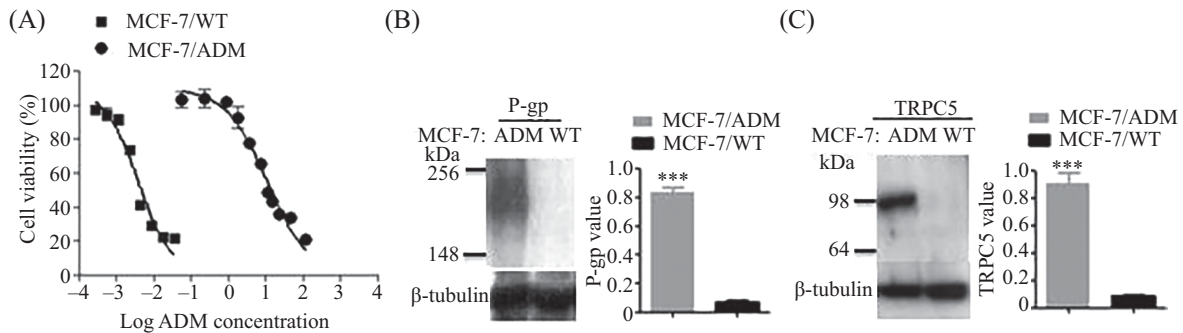


图1 细胞株的耐药性鉴定  
 Fig.1 Drug resistance identification of the cell line  
 A: MTT法检测存活率; B: Western blot法检测P-gp水平; C: Western blot法检测TRPC5水平; \*\*\* $P < 0.001$ , 与MCF-7/WT组比较。  
 A: viability of MCF-7/WT and MCF-7/ADM cells detected by MTT assay; B: P-gp levels detected by Western blot; C: TRPC5 levels detected by Western blot; \*\*\* $P < 0.001$  vs MCF-7/WT group.

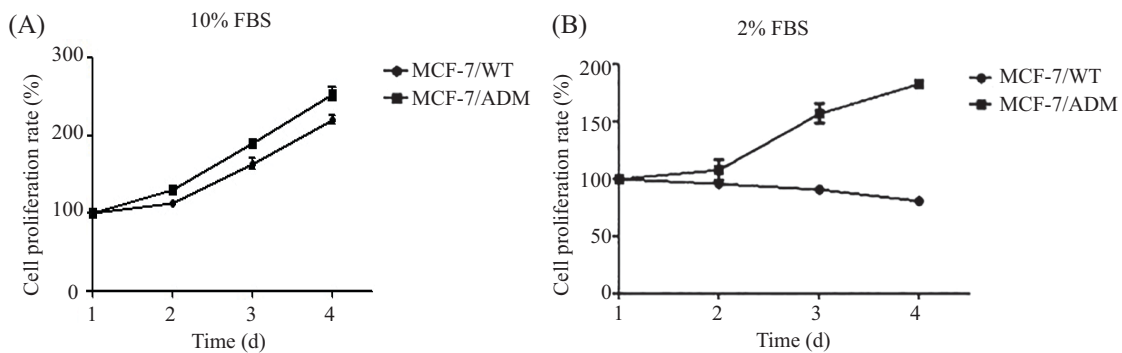
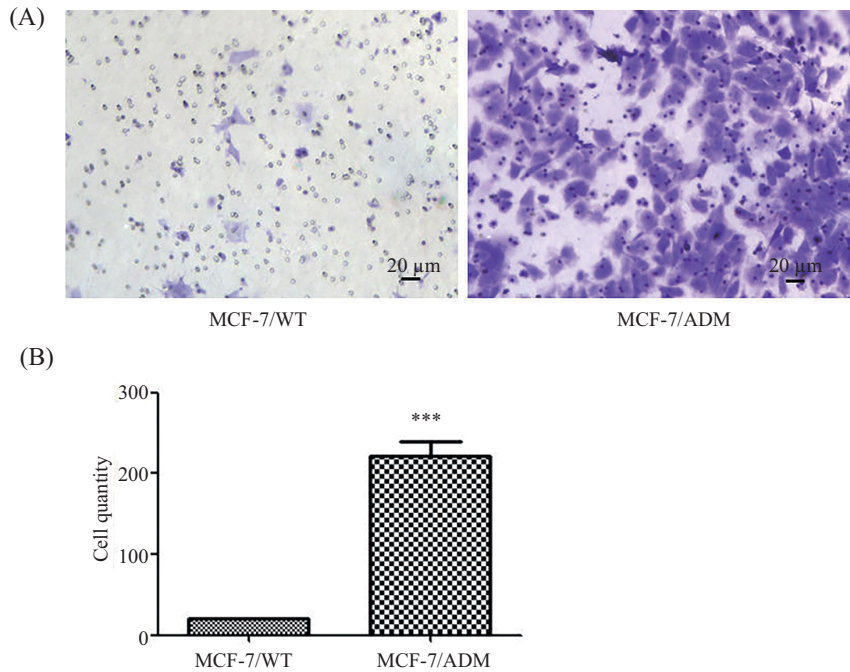


图2 不同血清浓度下的细胞生长曲线  
 Fig.2 The cell growth curve under different calf serum concentrations  
 A: 10% FBS浓度下的细胞生长曲线; B: 2% FBS浓度下的细胞生长曲线。  
 A: the cell growth curve under 10% FBS concentrations; B: the cell growth curve under 2% FBS concentrations.

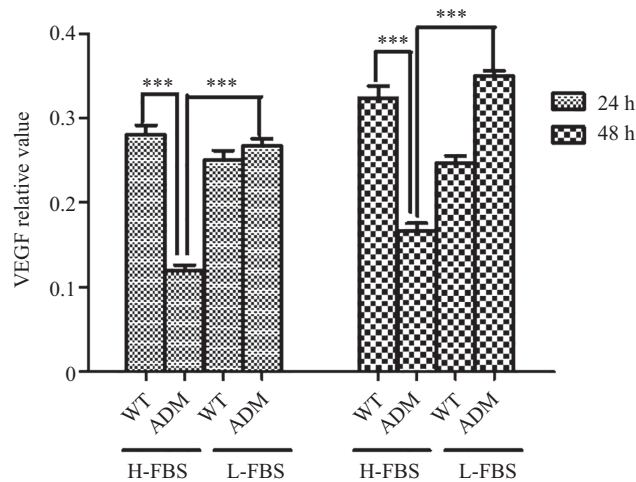


A: 两种细胞结晶紫染色的呈像结果; B: 分别对4个不同视野的两种细胞进行计数统计; \*\*\* $P < 0.001$ , 与MCF-7/WT组比较。

A: the images of the crystal purple stain in MCF-7/WT and MCF-7/ADM cells; B: statistic data of the cell numbers in 4 different fields of view; \*\*\* $P < 0.001$  vs MCF-7/WT group.

图3 低营养条件下检测两种细胞的迁移能力

Fig.3 The migration of cells cultured in low nutrition condition



H-FBS表示培养基含10% FBS, L-FBS表示培养基含2% FBS; \*\*\* $P < 0.001$ 。

H-FBS represent 10% FBS in medium, L-FBS represent 2% FBS in medium; \*\*\* $P < 0.001$ .

图4 ELISA法检测两种细胞分泌的VEGF水平

Fig.4 The levels of VEGF secreted by two different cell lines by ELISA assay

存能力更强, VEGF的高分泌量可能是促进其快速生长的重要原因。

### 3 讨论

与正常组织细胞相比, 实体瘤生长的微环境更加恶劣。有研究表明, 实体瘤拥有以缺氧和酸中毒为特点的新陈代谢环境<sup>[8]</sup>。那么, 为何在如此恶劣的

生长环境下, 肿瘤细胞仍能顽强生存, 更有胜者转化成耐药肿瘤细胞, 进而使肿瘤的迁移和浸润能力增强, 造成临床难以治疗的困难局面? 研究表明, 实体瘤的微血管系统是决定其内部微环境的主要因素, 它承担了血液与组织液之间氧、营养必需物质、代谢产物和能量等信息交换的功能, 参与一系列反馈调节, 实体瘤大多启始于肿瘤血管生成。血管内皮

生长因子VEGF是这一过程的关键调节者,其促进肿瘤血管生成的作用机理及其与人类癌症发病机制的关系目前已经确定<sup>[3]</sup>。有多项研究表明,VEGF不仅对血管新生有重要影响,在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等过程中也扮演了重要角色。赵鑫等<sup>[9]</sup>的研究显示,VEGF表位肽对黑色素瘤细胞、血管内皮细胞的增殖、迁移和成管有抑制作用。蒋源等<sup>[10]</sup>的研究表明,外源性靶向VEGF的微RNA(microRNA)能够显著降低黑色素瘤细胞SKmel-28的VEGF基因表达水平,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的体外增殖、侵袭和迁移能力。有多项临床研究表明,耐药肿瘤患者血浆VEGF含量也明显增高,VEGF与肿瘤的恶性程度直接相关<sup>[11-14]</sup>。

那么在耐药细胞中,是什么因素促发细胞的快速生长?其与VEGF是否有直接的相关性?本研究发现,在低营养状态下耐药型乳腺癌细胞反而能快速生长,且与VEGF的高量表达密切相关。这些结果提示,研究VEGF在耐药实体瘤发生发展中的作用,有望为抗耐药肿瘤治疗开辟一条有效的途径。

### 参考文献 (References)

- 1 丁旭贝, 郑秋月. 乳腺癌多药耐药机制的研究进展. 医学综述(Ding Xubei, Zheng Qiuyue. Research progress on the mechanism of multidrug resistance in breast cancer. Medical Recapitulate) 2014; 20(22): 4087-9.
- 2 Pauwels EK, Erba P, Mariani G. Multidrug resistance in cancer: Its mechanism and its modulation. Drug News Perspect 2007; 20(6): 371-5.
- 3 段泽星, 谢立群. VEGF在肿瘤生长和血管生成中的作用. 世界华人消化杂志(Duan Zexin, Xie Liqun. Role of the vascular endothelial growth factor signaling pathway in tumor growth and angiogenesis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi) 2010; 18(27): 2894-900.
- 4 郭宗明, 谢兆霞, 秦 忆. 急性白血病患者VEGF与多药耐药关系的初步探讨. 中国现代医学杂志(Guo Zongming, Xie Zhaoxia, Qin Yi. Relationship between VEGF and MDR in acute leukemia patients. China Journal of Modern Medicine) 2004; 14(5): 121-3.
- 5 Ma X, Cai YF, He DX, Zou C, Zhang P, Lo CY, *et al.* Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(40): 16282-7.
- 6 Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: A still unsolved problem. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 3145-67.
- 7 严 婷, 张莲芬, 张熔熔, 冯 磊, 金 坚. 人乳腺癌多药耐药细胞系MCF-7/MDRa的建立及其生物学特性的初步研究. 细胞生物学杂志(Yan Ting, Zhang Lianfen, Zhang Rongrong, Feng Lei, Jin Jian. Establishment of multidrug-resistant breast cancer cell line MCF-7/MDRa and its preliminary analysis on the biological properties. Chinese Journal of Cell Biology) 2006; 28(4): 591-5.
- 8 陆 萌, 吴苏稼, 施 鑫. 实体瘤微环境的特点及治疗策略. 医学研究生学报(Lu Meng, Wu Sujia, Shi Xin. The characteristics and treating strategy on the micro-environment of solid tumor. Journal of Medical Post graduates) 2009; 22(1): 104-6.
- 9 赵 鑫, 王 宏, 向军俭, 朱中松, 宋其芳, 邓 宁. 血管内皮细胞生长因子表位肽体外抗肿瘤作用研究. 中国免疫学杂志(Zhao Xin, Wang Hong, Xing Junjian, Zhu Zhongsong, Song Qifang, Deng Ning. Anti-tumor effect of epitopic peptides of vascular endothelial growth factor *in vitro*. Cellular & Molecular Immunology) 2010; 5(26): 407-11.
- 10 蒋 源, 韩永智, 孙 建. microRNA抑制黑色素瘤VEGF基因表达及对细胞增殖和侵袭能力的影响. 中山大学学报(Jiang Yuan, Han Yongzhi, Sun Jian. Inhibition of VEGF expression and suppression of tumor proliferation and invasion in malignant melanoma cells by target microRNA. Journal of Sun Yat-sen University) 2014; 35(2): 207-14.
- 11 刘登辉, 刘红光. HIF-1 $\alpha$ 和VEGF在乳腺癌中作用的研究进展. 肿瘤药学(Liu Denghui, Liu Hongguang. Advances of effects of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in breast cancer. Anti-tumor Pharmacy) 2013; 3(1): 7-10.
- 12 Li L, Jiang AC, Dong P, Wang H, Xu W, Xu C. MDR1/P-gp and VEGF synergistically enhance the invasion of Hep-2 cells with multidrug resistance induced by taxol. Ann Surg Oncol 2009; 16: 1421-8.
- 13 Chen J, Tang D, Wang S, Li QG, Zhang JR, Li P, *et al.* High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. Tumor Biol 2014; 35: 2513-9.
- 14 Chen P, Zhu J, Liu DY, Li HY, Xu N, Hou M. Over-expression of survivin and VEGF in small-cell lung cancer may predict the poorer prognosis. Med Oncol 2014; 31(775): 1-7.