

## 艾洛替尼耐药的卵巢癌 SKOV3 细胞系的建立及其耐药特性

赵青<sup>1,2,3</sup>, 任志广<sup>1</sup>, 贾砚寒<sup>1</sup>, 魏寅祥<sup>1</sup>, 李新颖<sup>1</sup>, 黎燕<sup>1</sup>, 李亚里<sup>2,3</sup>, 彭晖<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院基础医学研究所免疫学研究室, 北京 100850; 2. 南开大学医学院, 天津 300071; 3. 解放军总医院妇产科, 北京 100853)

**摘要:** **目的** 通过体外建立艾洛替尼(Erl)耐药的人浆液性卵巢癌细胞系 SKOV3/Erl, 并探讨其耐药机制, 为卵巢癌靶向性治疗的耐药性研究提供细胞模型及依据。**方法** 采用逐步递增联合大剂量冲击法诱导细胞, 取对数生长期的 SKOV3 细胞, 从 Erl 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  开始处理, 以 Erl 2, 4, 8, 16 和 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  反复换液传代, 最终维持浓度为 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 共诱导 10 个月。取 SKOV3 和 SKOV3/Erl 细胞, 加入不同浓度艾洛替尼、紫杉醇、米托蒽醌、表柔比星、拓扑替康、长春新碱和甲氨蝶呤等药物, 作用 72 h, 磺酰罗丹明 B 染色法检测耐药倍数。流式细胞术检测 SKOV3 细胞和 SKOV3/Erl 细胞的细胞周期。Western 印迹法检测 Erl 刺激对敏感和耐药细胞中表皮生长因子受体(EGFR)相关信号通路产生的变化; 流式细胞术检测 SKOV3/Erl 细胞表面 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白中 P 糖蛋白(Pgp)、多药耐药相关蛋白 1(MRP1)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)的表达以及 Toll 样受体 4(TLR4)的表达; 检测脂多糖(LPS)刺激对紫杉醇耐受的 SKOV3/Erl 细胞的敏感度。**结果** Erl 对 SKOV3 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为  $(9.54 \pm 1.04) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而对 SKOV3/Erl 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为  $(21.63 \pm 1.05) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 耐药倍数约为 2.26, 诱导成功的 SKOV3/Erl 对紫杉醇、长春新碱、米托蒽醌和甲氨蝶呤的耐药倍数均在 3 倍以上。与 SKOV3 细胞相比, SKOV3/Erl 细胞  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期比例上升, S 期比例下降,  $\text{G}_2/\text{M}$  期几乎无变化。Erl 刺激后, 与 SKOV3 细胞相比, SKOV3/Erl 细胞中 p-HER1, p-ERK 与 p-AKT 水平上调。SKOV3/Erl 细胞膜上 Pgp, BCRP 和 MRP1 表达有微弱上调, 而 TLR4 显著上调; 脂多糖可强烈刺激 SKOV3/Erl 细胞增殖, 并且对紫杉醇杀伤起到保护作用, 而亲本细胞则相对不敏感。**结论** 成功建立了对 Erl 耐受的人卵巢癌耐药细胞 SKOV3/Erl。其表现出的多药耐药机制可能与 TLR4 蛋白表达上调有关。

**关键词:** 艾洛替尼; 卵巢癌; 耐药; 酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号: Q279 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)02-0268-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.024

最新一项世界范围内肿瘤发病统计中, 在女性生殖器官恶性肿瘤中, 卵巢癌发病率居第三位, 病死率高居第一<sup>[1]</sup>。使用一线化疗方案紫杉醇联合铂类药物(TP 方案)后的绝大多数卵巢癌患者, 最终肿瘤复发并导致耐药, 中位生存期仅 18 个月<sup>[2]</sup>。随着人们对肿瘤标志物的不懈研究, 靶向治疗让人们充满期待。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是目前肿瘤治疗中非常有潜力的靶点。研究表明, 其过表达与包括卵巢癌、结肠癌、头颈癌、肺癌及胰腺癌在内的多种

癌症的预后不良有关<sup>[2]</sup>。有报道称, EGFR 在卵巢癌中阳性率为 35% ~ 70%<sup>[3]</sup>。

艾洛替尼(erlotinib, Erl)作为第二个被 FDA 批准的靶向 EGFR 的小分子抑制剂, 已在非小细胞肺癌的治疗中取得不俗的成绩。在美国临床试验官方网站上显示, 其在卵巢癌的最新的临床试验也处于第三期的阶段<sup>[4]</sup>。在一项 Erl 单药临床试验中, 药物反应率达到 6%, 而病情稳定率为 44%<sup>[5]</sup>。另外一项与紫杉醇和卡铂的联合用药的临床二期试验中, 卵巢癌 III, IV 期患者中术后化疗药与 Erl 联合使用完全有效率为 29%, 术前行新辅助化疗的患者使用联合方案的完全缓解率为 11%<sup>[6]</sup>。Erl 在卵巢癌的临床应用前景令人期待。其单药或联合其他化疗药物或靶向药物的临床研究仍在进行中, 以 EGFR 为主的靶向治疗也成为了最有希望的卵巢癌治疗途径之一。但不得不令人们关注的另一个事实是, 尽管第一代酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase

**基金项目:** 国家自然科学基金(30873083); 国家自然科学基金(81173082)

**作者简介:** 赵青(1986 -), 女, 博士研究生, E-mail: lagopsis@yahoo.com.cn

**通讯作者:** 彭晖, E-mail: p\_h2002@hotmail.com, Tel: (010)66931326; 李亚里, E-mail: Li\_Yali@hotmail.com, Tel: (010)66938044

inhibitor, TKI) 吉非替尼和 Erl 已经成功用于临床的 EGFR 靶向治疗,其有效率高达 70% ~ 80%, 中位生存期为 20 ~ 30 个月。但在治疗的 1 年内最终仍会出现 TKI 耐药导致肿瘤恶性发展<sup>[7]</sup>。Erl 在卵巢癌的靶向治疗中也可能存在着类似的问题,本研究通过建立 Erl 诱导的卵巢癌耐药株,来探讨此类药物在未来卵巢癌靶向治疗的可行性与疗效,进而为其可能产生耐药的机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物、试剂和仪器

Erl, 购自百灵威公司,由二甲亚砜(DMSO)配置成  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  储备液。紫杉醇注射液、注射用硫酸长春新碱(vincristine)与甲氨蝶呤(methotrexate), 购自浙江海正药业;顺铂(cisplatin)注射液, 购自齐鲁制药有限公司;注射用盐酸米托蒽醌(mitoxantrone)与注射用盐酸拓扑替康(topotecan), 分别购自江苏豪森药业和黄石飞云制药公司;注射用盐酸表柔比星(epirubicin), 氟尿嘧啶(flourouracil)分别购自辉瑞制药及金耀氨基酸有限公司。PE 荧光标记的流式抗人 CD243(ABCB1)-PE 抗体, 抗人 CD338(ABCG2)-PE 抗体、抗人 TLR4-PE 抗体均购自 eBioscience; 抗人 MRP1-FITC 购自 BD 公司。HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗, 购自北京中杉金桥公司; GAPDH 鼠源单抗, 购自美国 California Bioscience 公司; EGFR, p-EGFR, ERK, p-ERK, ErbB2, p-ErbB2 兔源多克隆抗体均购自 Cell Signal Technology。ECL 显色试剂盒购自 Amersham LifeScience 公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 购自 Thermo 公司; 胎牛血清, 购自北京元亨金马公司; Hyclone DMEM(高糖)培养基, 为塞默菲世尔公司产品; 胰蛋白酶、磺酰罗丹明 B、脂多糖, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; FACS Calibur 型流式细胞仪, 为美国 BD 公司产品; 5417R 型小型台式冷冻离心机, 为 Eppendorf 公司产品; 1420 VICTOR3 型荧光分光光度计, 为 PerkinElmer 公司产品; 倒置显微镜, 为 Olympus 公司产品; Forma Series II 型细胞培养箱, 为 Thermo 公司产品; 超净工作台, 为北京昌平长城空气净化设备工程公司产品; 蛋白电泳仪与电转仪, 为 Bio-Rad 公司产品。

### 1.2 艾洛替尼诱导的 SKOV3/Erl 耐药细胞系的建立

人浆液性卵巢癌细胞系 SKOV3 由本实验室保存培养, 高糖 DMEM 完全培养基中含 10% 胎牛血清及青霉素  $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$  和链霉素  $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$  置于

$37^\circ\text{C}$  恒温孵箱培养,  $\text{CO}_2$  浓度保持在 5%。采用程国钧<sup>[8-9]</sup>等介绍的逐步递增联合大剂量冲击法诱导细胞。具体方法为: 取对数生长期的 SKOV3 细胞, 从 Erl  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  开始处理, 细胞生长状态稳定后逐步增加 Erl 的浓度, 反复换液传代, Erl 依次为 2, 4, 8, 16 和  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最终维持浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 前期诱导历经 10 个月, 传代 20 次以上, 耐药性能够稳定维持在 2 ~ 3 倍。

### 1.3 磺酰罗丹明 B 染色法检测 SKOV3/Erl 细胞的耐药倍数

取对数生长期的 SKOV3 和 SKOV3/Erl 细胞, 制备单细胞悬液加入 96 孔板中, 每孔细胞数为 5000 个, 培养 24 h 后, 分别加入终浓度为 0, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 和  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Erl, 继续培养 72 h 检测药物对细胞的杀伤作用。紫杉醇、米托蒽醌、表柔比星、拓扑替康、长春新碱和甲氨蝶呤终浓度为 0, 0.2, 0.8, 3.1, 12.5, 50, 200 和  $800 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 顺铂、5-氟尿嘧啶终浓度为 0, 0.2, 0.8, 3.1, 12.5, 50, 200 和  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。检测时使用 SRB 染色法<sup>[10]</sup>, 步骤如下: 用真空泵吸出 96 孔板中每孔的培养基, 每孔加入质量浓度为 0.4% 的 SRB 染液(含 1% 醋酸), 体积为 70  $\mu\text{l}$ , 室温染色 30 min 后, 吸出染液, 每孔加入 1% 醋酸溶液洗 3 次, 晾干, 每孔加入 200  $\mu\text{l}$  Tris 溶液  $10 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 使结晶充分溶解并振荡后, 使用酶标仪, 检测波长 570 nm 的吸光度(absorbance, A)<sup>[11]</sup>, GraphPad Prism 5.0 分析软件给出细胞的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ), SKOV3/Erl 细胞的耐药倍数为 SKOV3/Erl 细胞  $\text{IC}_{50}$  与 SKOV3 细胞  $\text{IC}_{50}$  的比值。

### 1.4 流式细胞检测细胞周期

收集 SKOV3 及 SKOV3/Erl 细胞各  $2 \times 10^6$  个, PBS 洗 1 次后, 分别用 1 ml 冰乙醇在  $-20^\circ\text{C}$  固定 36 h 后,  $100 \times g$  离心 5 min, 去尽上清, PBS 洗 1 次后, 加入浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  RNase 各 100  $\mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  消化 30 min。加入 100  $\mu\text{l}$  碘化丙啶于室温避光染色 20 min。使用流式细胞仪进行周期检测, Cell Quest 软件分析细胞周期分析, 重复 3 次独立实验。

### 1.5 Western 印迹法检测 SKOV3/Erl 细胞信号通路蛋白表达

在六孔板中种植 SKOV3 及 SKOV3/Erl 细胞, 每孔  $1 \times 10^6$  个,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 后, 分别加入 Erl 2 和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 20 min 后用真空泵抽取培养液, PBS 清洗 1 次后, 立即加入冷的细胞裂解液, 每孔 150  $\mu\text{l}$ , 冰上裂解 10 min, 置入低温高速离心机中离心 10 min, 转速为  $13\ 800 \times g$ , 吸取上清, 按照

BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白定量,电泳中每份样品上样量为 30 μg。进行转膜,5%脱脂奶室温封闭 1 h后,用 5%BSA 稀释的一抗孵育 PVDF 膜,保持 4℃低温过夜。用 TBST 洗膜 3 次后,加入二抗室温孵育 1 h,多次洗膜后,使用 ECL 系统在 X 线胶片上显影。使用 Gelpro32 分析软件对全部条带进行灰度扫描,以 GAPDH 为内参,分析不同信号蛋白的表达,除内参 GAPDH 以外的条带积分吸光度值分别与对应样品的内参积分吸光度值做比值进行同一化,最后统计磷酸化条带与非磷酸化条带的比值。

**1.6 流式细胞术检测 SKOV3 及 SKOV3/Erl 细胞膜表面转运体的表达**

收集 SKOV3 及 SKOV3/Erl 细胞,每管 1 × 10<sup>6</sup> 个,每份样品加入荧光标记的抗体各 10 μl,另预留一管细胞作为裸细胞对照;在室温避光孵育 20 min 后,使用 FACS 洗液清洗细胞 3 次,加入 1%多聚甲醛对细胞进行固定,准备上机进行流式细胞测试。P 糖蛋白 (P-glycoprotein, Pgp) 与乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 的检测使用 FL-2 通道,多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-related protein 1, MRP1) 的检测使用 FL-1 通道, Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR-4) 的检测使用 FL-2 通道。分析软件为 WinMDI 2.8,阳性率以软件统计分析中的 Gate 值 (%) 表示<sup>[11]</sup>。

**1.7 SRB 法检测脂多糖刺激下药物对 SKOV3/Erl 细胞生存率的影响**

收集对数生长期的 SKOV3 及 SKOV3/Erl 细胞,计数,加入 96 孔板中,每孔 5 × 10<sup>3</sup> 个,培养 24 h 后,刺激组加入脂多糖 20 mg · L<sup>-1</sup>,无刺激组加入相同体积的培养基,再过 2 h 后每组加入紫杉醇浓度分别为 8 nmol · L<sup>-1</sup> 和 1 μmol · L<sup>-1</sup>,另以无药物组作为对照。继续培养 72 h,进行 SRB 染色法处理及

吸光度检测,方法同 1.3。

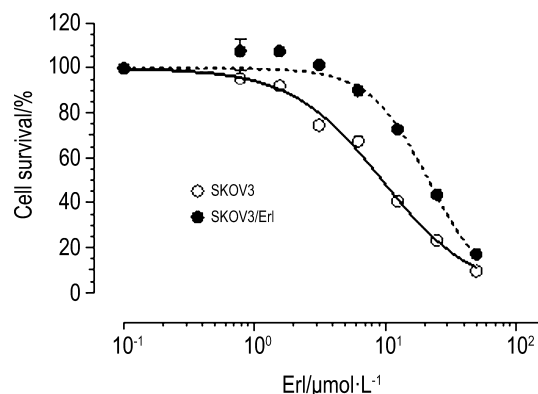
**1.8 统计学分析**

实验结果数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。浓度-效应关系曲线采用 GraphPad Prism 5.0 分析软件;显著性分析采用 Microsoft Office Excel 2010 软件进行组间 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 SKOV3/Erl 细胞的耐药性**

图 1 结果表明,Erl 对 SKOV3 的 IC<sub>50</sub> 为 (9.54 ± 1.04) μmol · L<sup>-1</sup>,对 SKOV3/Erl 细胞的 IC<sub>50</sub> 上升至 (21.63 ± 1.05) μmol · L<sup>-1</sup>,耐药倍数约为 2.26。由表 1 可见,SKOV3/Erl 对 8 种化疗药都产生了一定程度的交叉耐药,其中以 Pgp 底物的紫杉醇的耐受性最强,IC<sub>50</sub> 由对 SKOV3 (2.85 ± 1.30) nmol · L<sup>-1</sup> 上升至 (17.15 ± 1.36) nmol · L<sup>-1</sup>,耐药倍数约为 6.01。长春新碱、米托蒽醌、甲氨蝶呤均为 BCRP 底物,耐药倍数达到 3 以上,甲氨蝶呤的耐药倍数更高达 5.23。



**Fig. 1 Effect of erlotinib (Erl) on SKOV3 and SKOV3/Erl cell survival.** Cells were treated with graded concentration of Erl 0, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 and 50 μmol · L<sup>-1</sup>, and then incubated for 72 h. The IC<sub>50</sub> was determined by SRB assay.

**Tab. 1 Resistance factor (RF) of SKOV3/Erl cells to different anticancer drugs**

Drug	IC <sub>50</sub> /nmol · L <sup>-1</sup>		RF
	SKOV3	SKOV3/Erl	
Paclitaxel	2.85 ± 1.30	17.15 ± 0.36 **	6.01 ± 2.20
Cisplatin	(5.85 ± 0.86) × 10 <sup>3</sup>	(12.42 ± 0.79) × 10 <sup>3</sup> **	2.12 ± 0.13
Epirubicin	166.4 ± 60.7	474.0 ± 76.8 **	2.85 ± 0.50
Fluorouracil	(10.27 ± 0.47) × 10 <sup>3</sup>	(33.56 ± 7.24) × 10 <sup>3</sup> **	3.27 ± 0.38
Topotecan	171.6 ± 2.1	301.4 ± 1.6 **	1.76 ± 0.01
Vincristine	8.224 ± 1.184	27.27 ± 1.49 **	3.31 ± 0.21
Mitoxantrone	51.53 ± 1.10	216.8 ± 68.4 **	4.21 ± 0.83
Methotrexate	163.4 ± 4.0	854.8 ± 1.2 **	5.23 ± 0.08

Cells were treated with graded concentration paclitaxel, mitoxantrone, epirubicin, topotecan, vincristine, mitoxantrone 0, 0.2, 0.8, 3.1, 12.5, 50, 200 and 800 nmol · L<sup>-1</sup>, and cisplatin and fluorouracil 0, 0.2, 0.8, 3.1, 12.5, 50, 200 and 800 μmol · L<sup>-1</sup>, then incubated for 72 h. IC<sub>50</sub> was determined by SRB assay.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3. \*\* *P* < 0.01, compared with corresponding SKOV3 cell.

### 2.2 SKOV3/Erl 细胞的细胞周期

流式细胞同期检测结果(图 2)显示,SKOV3/Erl 细胞的( $G_0 + G_1$ )期细胞比例有所上升,为( $52.36 \pm 1.20$ )%,SKOV3 细胞仅为( $45.08 \pm 0.90$ )%;SKOV3/Erl 细胞 S 期比例有所下降,为( $35.92 \pm 1.97$ )%,SKOV3 细胞为( $42.32 \pm 0.69$ )%;而SKOV3与 SKOV3/Erl 细胞在  $G_2/M$  期无显著差异,比例分别为( $12.60 \pm 0.27$ )%和( $11.72 \pm 0.81$ )%。SKOV3/Erl 细胞中  $G_0/G_1$  期比例增加,与 S 期比例下降表明更多的细胞进入静止期,而 DNA 合成减缓,在一定程度上降低了对细胞毒类化疗药的敏感度。

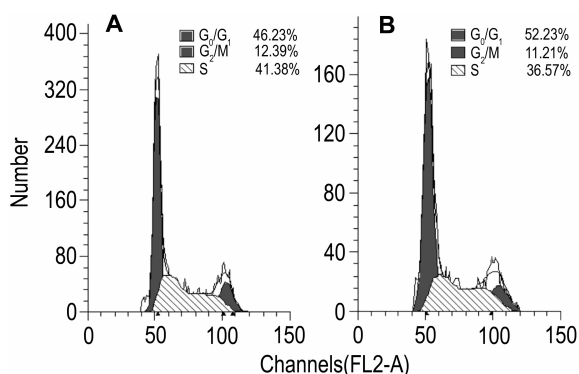


Fig. 2 Representative results of cell cycle of SKOV3 (A) and SKOV3/Erl (B) cells by flow cytometry.

### 2.3 SKOV3/Erl 细胞中 EGFR 相关蛋白的表达

如图 3 所示,随 Erl 浓度增加,SKOV3 细胞中 p-HER1 略有下调,SKOV3/Erl 细胞 p-HER1 水平显著高于 SKOV3 ( $P < 0.01$ ),加入 Erl 后并不下降。SKOV3/Erl 细胞中活化形式的 p-ERK 平显著上调 ( $P < 0.01$ ),但加入 Erl  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  后,活化程度微弱下降但仍高于相应处理的 SKOV3 细胞,当 Erl  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,不再高于 SKOV3。AKT 在 SKOV3/Erl 中的活化程度显著减弱 ( $P < 0.01$ ),加入 Erl 后活化程度 Erl 增加,即随 Erl 浓度升高而上调,与相应处理 SKOV3 细胞。尽管在 SKOV3/Erl 中 HER2 的活化程度显著升高 ( $P < 0.01$ ),但在 Erl 2 和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  刺激下,pHER2 水平均低于相应处理组的 SKOV3 细胞。

### 2.4 SKOV3/Erl 细胞膜上转运体的表达

如图 4 所示,Pgp 在 SKOV3/Erl 细胞中的表达率为( $3.56 \pm 0.24$ )%,而在 SKOV3 细胞中为( $1.07 \pm 0.11$ )% ( $P < 0.01$ );BCRP 在 SKOV3/Erl 细胞中的表达率为( $7.60 \pm 0.98$ )%,而在 SKOV3 细胞中为( $3.97 \pm 0.54$ )% ( $P < 0.01$ );而在 SKOV3/Erl 细胞中 MRP1 的表达率为( $2.43 \pm 0.36$ )%,而在 SKOV3 的细胞中为( $1.63 \pm 0.21$ )%。Pgp, BCRP 和 MRP 1 在 SKOV3/Erl 细胞中都有微量的上升,且均

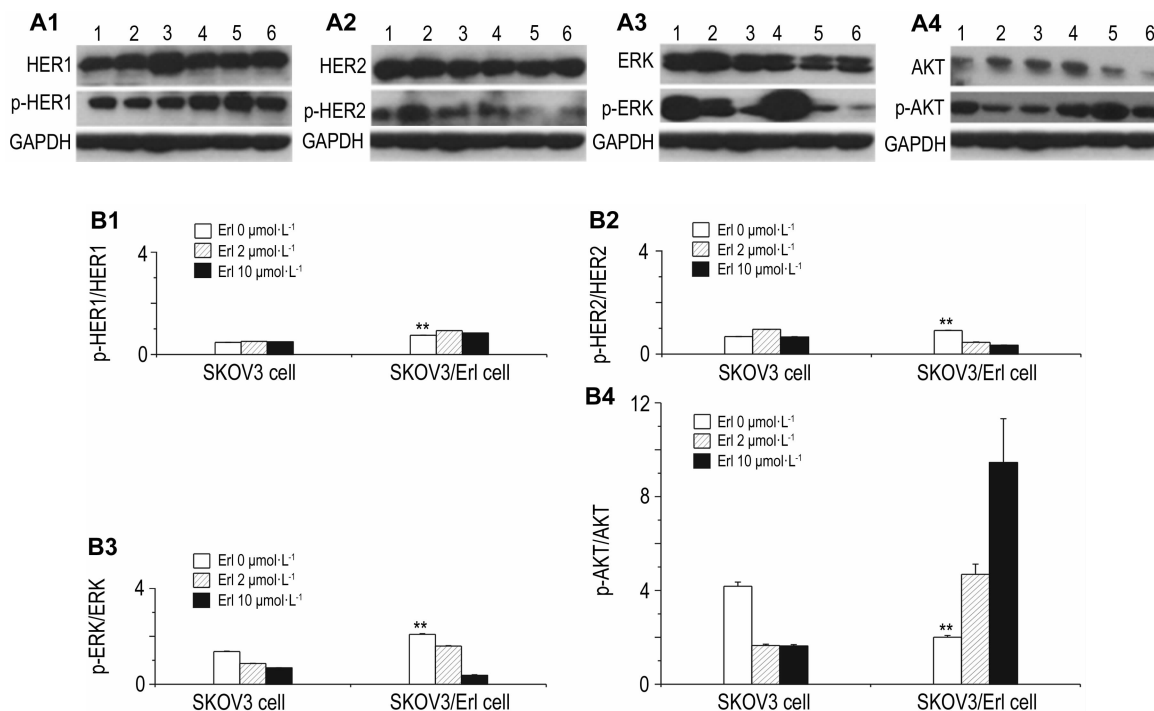
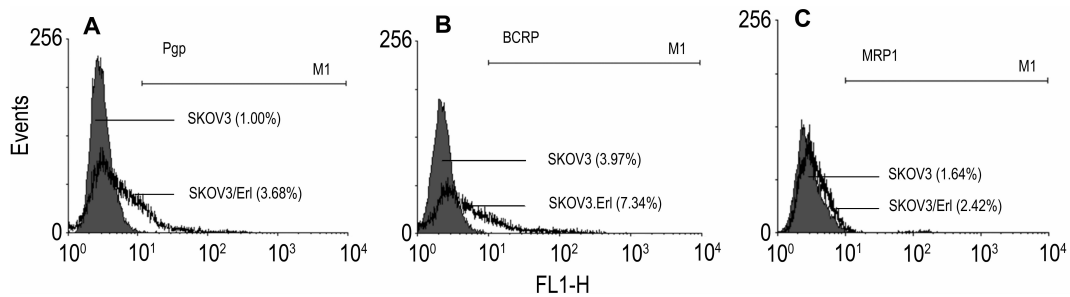


Fig. 3 Protein expression in SKOV3 cell SKOV3/Erl treated with Erl by Western blotting. B was the semiquantitative result of A. The cells were treated with Erl 2 and  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 20 min, respectively. Lanes 1, 2 and 3: SKOV3 cell treated with Erl 0, 2 and  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  groups, respectively; lanes 4, 5 and 6: SKOV3/Erl cell treated with Erl 0, 2 and  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  groups, respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with SKOV3 group.

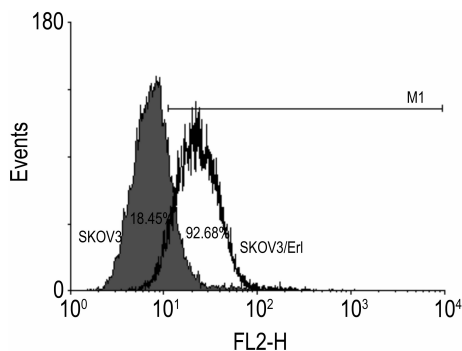


**Fig. 4** Representative result of protein expression level of surface P-glycoprotein (Pgp) (A), breast cancer resistance protein (BCRP) (B) and multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) (C) in SKOV3 and SKOV3/Erl cells.

有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 但表达率均在 10% 以内。

### 2.5 SKOV3/Erl 细胞 TLR4 蛋白的表达

如图 5 所示, SKOV3/Erl 细胞不但表现出一定的耐药性, 还伴随着细胞表面 TLR4 蛋白的表达量显著上升, 其表达率由在 SKOV3 细胞中的 (18.43 ± 5.61)% 显著提高至在 SKOV3/Erl 细胞中的 (92.68 ± 2.19)% ( $P < 0.01$ )。



**Fig. 5** Toll-like receptor 4 expression level on SKOV3 and SKOV3/Erl cells determined by flow cytometry.

### 2.6 脂多糖刺激对 SKOV3/Erl 细胞存活的影响

如表 2 所示, 脂多糖的刺激可显著提高 SKOV3/Erl 细胞存活数, SKOV3/Erl 细胞增殖程度甚至可达到空白对照组的 2 倍左右, 而脂多糖对 SKOV3 则影响微弱。紫杉醇 8 nmol·L<sup>-1</sup> 组中, SKOV3/Erl 细胞仍保持较高的存活率, 与 SKOV3 细胞相比有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 而在脂多糖刺激下, SKOV3/Erl 的存活数显著高于 SKOV3 细胞 ( $P < 0.01$ )。紫杉醇 1 μmol·L<sup>-1</sup> 作用下和脂多糖刺激时, SKOV3/Erl 细胞存活数显著高于 SKOV3 细胞 ( $P < 0.01$ ), 而无脂多糖刺激时, 两种细胞无显著差异。

**Tab. 2** Effect of lipopolysaccharide (LPS) on SKOV3/Erl cell survival

Group	Cell survival ( $A_{570\text{ nm}}$ )	
	SKOV3	SKOV3/Erl
Normal control	1.065 ± 0.096	1.166 ± 0.120
LPS 20 mg·L <sup>-1</sup>	1.059 ± 0.008	1.859 ± 0.065 **
PTX 8 nmol·L <sup>-1</sup>	0.694 ± 0.055	1.148 ± 0.076 *
1 μmol·L <sup>-1</sup>	0.286 ± 0.026	0.337 ± 0.033
LPS + PTX 8 nmol·L <sup>-1</sup>	0.589 ± 0.089	1.278 ± 0.030 **
1 μmol·L <sup>-1</sup>	0.236 ± 0.013	0.291 ± 0.018 **

After treated with LPS 20 mg·L<sup>-1</sup> for 24 h, cells were treated with paclitaxel (PTX) for 72 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with corresponding SKOV3 group.

## 3 讨论

本实验结果显示, 经过持续性药物刺激诱导而成的 SKOV3/Erl 细胞, 耐药倍数可达 2.26 倍, 对紫杉醇和顺铂为代表的常用卵巢癌化疗药物表现出多药耐药的特点, 提示未来使用 Erl 治疗卵巢癌的患者, 如出现 Erl 耐药现象, 使用多种抗肿瘤药物的化疗方案可能表现出疗效达不到预期的状况。在细胞周期的检测中, 耐药细胞表现为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的上升, 以及 S 期的下降, 这表明耐药细胞相对较多地进入了静止期, DNA 合成有所下降, 这似乎与肿瘤干细胞特征十分相似, 增殖速度慢, 造成化疗药物杀伤的选择性下降, 致使疗效降低。Erl 的长期刺激下, 细胞中 EGFR 的磷酸化活性反而有所上升。药物干预条件下 EGFR 并未出现明显抑制, 耐药细胞中的 EGFR 保持了较强的激酶活性, 其下游信号中, 活化的 ERK 维持了较高水平, 而 AKT 信号则对 ERK 不敏感。由于 HER1 可以通过同源二聚化以及与 HER2 的异源二聚化两种方式传递信号, 因此, HER2 的磷酸化水平也值得关注的。从结果来看, SKOV3/Erl 细胞 HER2 的磷酸化水平有上调, 但对 Erl 的抑制作用仍然十分敏感, 推测 HER1/HER2

的异源二聚化程度对细胞的药物耐受并无贡献。综上所述,在体外条件下,EGFR 仍然是 SKOV3/Erl 细胞增殖和存活的重要途径。在非小细胞肺癌的研究中,有文献报道,EGFR 的 T790M 突变是导致 TKI 药物治疗过程出现耐药的重要原因之一<sup>[12]</sup>,而本研究中诱导的耐药细胞 SKOV3/Erl 并不存在激酶区的任何突变,因此,SKOV3 细胞系出现的 Erl 耐药机制与非小细胞肺癌有很大差别。EGFR 活性保持与其他受体酪氨酸激酶的关系需要进一步观察。

文献[13-15]报道,与多药耐药有关的重要的 3 个 ABC 转运蛋白会引起多种药物在细胞内的积累下降,特别是 BCRP 和 Pgp 对 Erl 具有外排功能,可能是导致其疗效下降的直接原因。然而实验数据提示,耐药细胞中 Pgp, BCRP 以及 MRP1 表达仅有微弱提高,总体阳性率都保持在 10% 以下,可认为是低水平表达,难以对药物的外排起到重要作用。

TLR4 是最近几年上皮性肿瘤标志物研究中的新热点,由其在卵巢癌的增殖和耐药方面起到重要作用。最近几年的研究发现多种上皮肿瘤细胞也有 TLR4 高表达,并且与肿瘤的增殖能力和化疗耐药相关<sup>[16-18]</sup>。甚至有报道称 TLR4 信号的激活是上皮性卵巢癌干细胞的特征。在本研究中所建立的 SKOV3 耐药细胞模型中,TLR4 的阳性率显著地上升,同时脂多糖刺激实验也证实 TLR4 激活大大促进耐药细胞 SKOV3/Erl 增殖,并在相对低浓度紫杉醇的杀伤下保持较高的存活率,而相对低表达 TLR4 的 SKOV3 细胞则对紫杉醇十分敏感。推测由于紫杉醇自身具有激活 TLR4 信号的功能,TLR4 下游的 NF- $\kappa$ B 入核增多,PI3K/AKT 路径的活化信号上调所致<sup>[18]</sup>,推测 Erl 在一定程度上降低肿瘤对紫杉醇的敏感度。TLR4 上调的原因尚未得到证实,而临床上 TLR4 上调对 EGFR 小分子抑制剂靶向治疗的指示作用,也有待于根据临床做进一步验证与探究。

总之,SKOV3/Erl 表现出的耐药特点与已报道的非小细胞肺癌大不相同,初步分析 TLR4 的表达上调是其药物耐受能力提高的重要原因之一。此外,目前国内卵巢癌的靶向治疗研究刚刚处在起步阶段,SKOV3/Erl 细胞模型的建立为卵巢癌靶向治疗的耐受研究提供了物质基础和新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, **62**(1):10-29.
- [2] Mezzanzanica D, Bagnoli M, De Cecco L, Valeri B,

- Canevari S. Role of microRNAs in ovarian cancer pathogenesis and potential clinical implications[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, **42**(8):1262-1272.
- [3] Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer[J]. *Semin Oncol*, 2006, **33**(4):369-385.
- [4] Erlotinib or Observation in Treating Patients Who Have Undergone First-Line Chemotherapy for Ovarian Cancer, Peritoneal Cancer, or Fallopian Tube Cancer[DB/OL]. (2011-04-23)[2012-09-04] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00263822>.
- [5] Gordon AN, Finkler N, Edwards RP, Garcia AA, Crozier M, Irwin DH, et al. Efficacy and safety of erlotinib HCl, an epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ovarian carcinoma: results from a phase II multicenter study[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2005, **15**(5):785-792.
- [6] Blank SV, Christos P, Curtin JP, Goldman N, Runowicz CD, Sparano JA, et al. Erlotinib added to carboplatin and paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer: a phase II study based on surgical reassessment[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, **119**(3):451-456.
- [7] Murphy M, Stordal B. Erlotinib or gefitinib for the treatment of relapsed platinum pretreated non-small cell lung cancer and ovarian cancer: a systematic review[J]. *Drug Resist Updat*, 2011, **14**(3):177-190.
- [8] Xu QY, Chen YH, Zhao LJ, Li XP, Wang JL, Wei LH. Establishment of cisplatin-resistant human endometrial cancer cell line and the study of its resistant mechanisms[J]. *Chin J Obstet Gynecol*(中华妇产科杂志), 2011, **46**(7):533-537.
- [9] Chen GJ, Li YL, Tian F, Zhu H, Sun LY, Li CH, et al. Comparison of stepwise and pulse induced cisplatin-resistant ovarian cancer cell sublines[J]. *Chin J Oncol*(中华肿瘤杂志), 2001, **23**(4):305-308.
- [10] Peng H, Qi J, Dong Z, Zhang JT. Dynamic vs static ABCG2 inhibitors to sensitize drug resistant cancer cells[J]. *PLoS One*, 2010, **5**(12):e15276.
- [11] Ye WL, Lin Z, Lang XL, Qiao CX, Li XY, Wang LY, et al. Effects of cetuximab against human hepatocellular carcinoma cells HepG2 *in vitro*[J]. *Mil Med Sci*(军事医学), 2011, **35**(3):202-206.
- [12] Costa DB, Schumer ST, Tenen DG, Kobayashi S. Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2008, **26**(7):1182-1184.
- [13] Lopez JP, Wang-Rodriguez J, Chang C, Chen JS, Pardo FS, Aguilera J, et al. Gefitinib inhibition of drug resistance to doxorubicin by inactivating ABCG2 in thyroid cancer cell lines[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, **133**(10):1022-1027.
- [14] Lemos C, Kathmann I, Giovannetti E, Calhau C, Jansen G, Peters GJ. Impact of cellular folate status and epidermal growth factor receptor expression on BCRP/ABCG2-medi-

- ated resistance to gefitinib and erlotinib[J]. *Br J Cancer*, 2009, **100**(7):1120-1127.
- [15] Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, et al. Erlotinib ( Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance[J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(22):11012-11020.
- [16] Szajnik M, Szczepanski MJ, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, et al. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer[J]. *Oncogene*, 2009, **28**(49):4353-4363.
- [17] Hsu RY, Chan CH, Spicer JD, Rousseau MC, Giannias B, Rousseau S, et al. LPS-induced TLR4 signaling in human colorectal cancer cells increases beta1 integrin-mediated cell adhesion and liver metastasis[J]. *Cancer Res*, 2011, **71**(5):1989-1998.
- [18] Wang AC, Su QB, Wu FX, Zhang XL, Liu PS. Role of TLR4 for paclitaxel chemotherapy in human epithelial ovarian cancer cells[J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, **39**(2):157-164.

## Establishment of human ovarian cancer cell line SKOV3 resistant against erlotinib and its resistant characterization

ZHAO Qing<sup>1,2,3</sup>, REN Zhi-guang<sup>1</sup>, JIA Yan-han<sup>1</sup>, WEI Yin-xiang<sup>1</sup>, LI Xin-ying<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, LI Ya-li<sup>2,3</sup>, PENG Hui<sup>2</sup>

(1. Department of Molecular Immunology, Institution of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Department of Gynecology & Obstetrics, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To construct a drug-resistant human serous ovarian cancer cell model induced by erlotinib and explore its possible mechanism of resistance. **METHODS** The cell line SKOV3 was cultured by gradually increasing the concentration of erlotinib from 1, 2, 4, 8, 16 to 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  until 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  *in vitro* for 10 months to generate its resistance cell line SKOV3/Erl. In the induction process, the medium was treated with erlotinib 2, 4, 6 and 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and changed step by step, accompanied by the passage of cells. The resistance index in SKOV3/Erl was tested by sulforhodamine B (SRB), after being treated with a series of concentrations of erlotinib, paclitaxel, mitoxantrone, epirubicin, topotecan, vincristine and methotrexate. Cell cycle of SKOV3 cells and SKOV3/Erl cells was investigated by flow cytometry. The changes of signal transduction protein in sensitive and drug resistant cells treated with erlotinib were detected by Western blotting. SKOV3 and SKOV3/Erl cells were stained with antibodies conjugated with fluorescent dyes to determine the expression levels of cell surface P-glycoprotein (Pgp), breast cancer drug resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-related protein 1 (MRP1) and Toll-like receptor 4 (TLR4). To evaluate the drug-resistance function of TLR4, the viability of cells was assayed after stimulation by LPS. **RESULTS**  $\text{IC}_{50}$  Value of erlotinib to SKOV3 was  $(9.54 \pm 1.04) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  while that of erlotinib to SKOV3/Erl was  $(21.63 \pm 1.05) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , with a resistant index of 2.26. The resistant indices of paclitaxel, vincristine, mitoxantrone and methotrexate all exceeded 3. Compared with SKOV3 cells, S-phase of SKOV3/Erl cells was reduced, and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase increased while the percentage of G<sub>2</sub>/M phase showed no significant change. The phosphorylated HER1 signal was upregulated in SKOV3/Erl cells. p-ERK and p-AKT levels in SKOV3/Erl were also higher than in SKOV3 cells. Major ABC transporter Pgp, BCRP and MRP1 expressions were slightly increased in SKOV3/Erl, while TLR4 showed intensive upregulation. LPS stimulated the proliferation of SKOV3/Erl, rescued the cytotoxicity from paclitaxel, but such function was not observed in SKOV3 cells. **CONCLUSION** The erlotinib-resistant human ovarian cancer cell line SKOV3/Erl has been established. The high TLR4 expression level in SKOV3/Erl cell line may be ascribed to its resistance to erlotinib.

**Key words:** erlotinib; ovarian carcinoma; drug resistance; tyrosine kinase inhibitor

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30873083); and National Natural Science Foundation of China (81173082)

**Corresponding author:** PENG Hui, E-mail: p\_h2002@hotmail.com, Tel: (010)66931326; LI Ya-li, E-mail: Li\_Yali@hotmail.com, Tel: (010)66938044

(收稿日期: 2012-09-13 接受日期: 2012-12-19)

(本文编辑: 乔虹)