



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180649

<http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/2019111214.pdf>

## 稳定表达T-钙黏蛋白的黑色素瘤顺铂耐药细胞株的建立及其生物学特性

陆海涛, 郭健, 何磊, 刘利君, 段昕所

(承德医学院附属医院皮肤科, 河北 承德 067000)

**[摘要]** 目的: 建立稳定表达T-钙黏蛋白(T-cadherin)基因的顺铂(cisplatin, CDDP)耐药黑色素瘤B16F10细胞株(CDDP-R B16F10), 并研究其生物学特性。方法: 采用大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方法诱导CDDP-R B16F10细胞株。采用四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT]法检测CDDP-R B16F10细胞株的增殖能力, 并观察CDDP-R B16F10细胞株对CDDP和紫杉醇的敏感性。将T-cadherin互补cDNA插入增强绿色荧光蛋白质粒(enhanced green fluorescent protein plasmid, pEGFP)-N1载体中, 获得编码人T-cadherin的质粒载体pEGFP-N1-T-cadherin, 再将pEGFP-N1-T-cadherin转染CDDP-R B16F10细胞。分别采用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)、蛋白质印迹法和免疫组织化学SP法检测转染后耐药细胞株T-cadherin的mRNA及蛋白质表达情况。采用MTT法检测T-cadherin联合CDDP对CDDP-R B16F10细胞株增殖的影响, 并观察转染T-cadherin后CDDP-R B16F10细胞株对紫杉醇的敏感性。结果: 成功建立耐CDDP的CDDP-R B16F10细胞株。该细胞株同B16F10细胞株比较, 其增殖能力差异无统计学意义( $P>0.05$ )。CDDP-R B16F10细胞株和B16F10细胞株对CDDP的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )分别为268.706和19.748 mg/L, 耐药指数为13.61。CDDP-R B16F10细胞株和B16F10细胞株对紫杉醇的 $IC_{50}$ 分别为11.415和7.799 mg/L, 耐药指数为1.46。重组真核表达载体pEGFP-N1-T-cadherin构建成功。RT-PCR, 蛋白质印迹法和免疫组织化学SP法检测结果显示: CDDP-R B16F10可转录和表达T-cadherin。MTT法显示T-cadherin联合CDDP可抑制CDDP-R B16F10细胞株的增殖( $P<0.05$ ), 析因分析显示T-cadherin与CDDP联合对CDDP-R B16F10细胞株增殖的抑制有交互效应( $P<0.05$ )。T-cadherin联合紫杉醇可抑制CDDP-R B16F10细胞株的增殖( $P<0.05$ ), 析因分析显示T-cadherin与紫杉醇联合对CDDP-R B16F10细胞株增殖的抑制无交互效应( $P>0.05$ )。结论: 成功建立了稳定表达T-cadherin的CDDP-R B16F10细胞株。T-cadherin可逆转CDDP-R B16F10细胞株对CDDP的耐药性, 并能提高CDDP-R B16F10细胞株对紫杉醇的敏感性。

**[关键词]** T-钙黏蛋白; 顺铂; 黑色素瘤; 耐药性

## Establishment of cisplatin-resistant melanoma cell line with stable expression of T-cadherin and its biological characteristics

LU Haitao, GUO Jian, HE Lei, LIU Lijun, DUAN Xinsuo

(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde Hebei 067000, China)

收稿日期(Date of reception): 2018-11-01

第一作者(First author): 陆海涛, Email: PFKLHT@163.com, ORCID: 0000-0003-4894-1080

通信作者(Corresponding author): 陆海涛, Email: PFKLHT@163.com, ORCID: 0000-0003-4894-1080

**ABSTRACT**

**Objective:** To establish cisplatin (CDDP)-resistant melanoma B16F10 (CDDP-R B16F10) cell line with stable expression of T-cadherin, and to study its biological characteristics.

**Methods:** CDDP-R B16F10 cell line was exposure to high and gradually increased dose of CDDP. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was used to test the proliferation of CDDP-R B16F10 cell line, and the sensitivity of CDDP-R B16F10 cell line to CDDP and paclitaxel was examined. The pEGFP-N1-T-cadherin, a plasmid vector encoding human T-cadherin, was generated by inserting T-cadherin cDNA into a pEGFP-N1 vector. The pEGFP-N1-T-cadherin was transfected into CDDP-R B16F10 cell line. The expression of T-cadherin mRNA and protein were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting and immunohistochemistry SP method, respectively. The effect of T-cadherin combined with CDDP on proliferation of CDDP-R B16F10 cell line was determined by MTT assay. The sensitivity of CDDP-R B16F10 cell line with stably transfected T-cadherin to paclitaxel was examined by MTT assay.

**Results:** The CDDP-R B16F10 cell line was established successfully. There was no difference in proliferation between the CDDP-R B16F10 cell line and B16F10 cell line ( $P>0.05$ ). The  $IC_{50}$  of CDDP-R B16F10 cell line and B16F10 cell line to CDDP were 268.706 and 19.748 mg/L, respectively, and the resistance index was 13.61. The  $IC_{50}$  of CDDP-R B16F10 cell line and B16F10 cells to paclitaxel were 11.415 and 7.799 mg/L, respectively, and the resistance index was 1.46. The expression vector pEGFP-N1-T-cadherin was constructed successfully. RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry SP method showed that T-cadherin could be transcribed and expressed. MTT assay showed that T-cadherin combined with CDDP could inhibit the proliferation of CDDP-R B16F10 cell line ( $P<0.05$ ). Factorial analysis showed that there was interaction between T-cadherin and CDDP in inhibiting the proliferation of CDDP-R B16F10 cell line ( $P<0.05$ ). T-cadherin combined with paclitaxel could inhibit the proliferation of CDDP-R B16F10 cell line ( $P<0.05$ ). Factorial analysis showed that there was no interaction between T-cadherin and paclitaxel in inhibiting the proliferation of CDDP-R B16F10 cell line ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** The CDDP-R B16F10 cell line with stable expression of T-cadherin is established successfully. T-cadherin can reverse the CDDP resistance to CDDP-R B16F10 cell line, and promote its sensitivity to paclitaxel.

**KEY WORDS**

T-cadherin; cisplatin; malignant melanoma; drug resistance

黑色素瘤病因不明, 可能和遗传、种族等因素相关<sup>[1]</sup>。其恶性度高, 转移早, 对非手术治疗不敏感<sup>[2]</sup>。顺铂(cisplatin, CDDP)是一种细胞毒性化学治疗(以下简称化疗)药, 具有高效、广谱等特点, 但耐药的产生导致其治疗失败。解决抗肿瘤药物的耐药问题, 具有重大临床意义。前期研究<sup>[3]</sup>发现: T-钙黏蛋白(T-cadherin)在黑色素瘤中表达缺失, T-cadherin能够抑制黑色素瘤的增殖和侵袭能力, 促进其凋亡。本课题拟建立对CDDP耐药的黑色素瘤B16F10(CDDP-R B16F10)细胞株, 分别观察CDDP-R B16F10细胞株对CDDP及紫杉醇的敏感性。应用脂质体2000(lipofectamine™ 2000)将 T-cadherin基因转染CDDP-R B16F10细胞株, 经遗传霉素418 (geneticin

418, G418)筛选, 获得稳定表达T-cadherin的CDDP-R B16F10细胞株, 观察T-cadherin基因分别与CDDP和紫杉醇联合对CDDP-R B16F10细胞株的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黑色素瘤B16F10细胞株由吉林大学白求恩医学部提供。CDDP和MTT 购自美国Sigma公司; 紫杉醇购自青岛金峰制药有限公司; TRIzol, 增强绿色荧光蛋白质粒(enhanced green fluorescent protein plasmid, pEGFP)-N1和lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司; 反转录聚合酶链式反应(reverse transcription

polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒和Taq酶购自上海生工生物工程股份有限公司; G418购自美国Promega公司; 免疫组织化学(以下简称免疫组化)使用的T-cadherin一抗购自美国Santa Cruz公司; 免疫组化使用的T-cadherin二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司; 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜购自美国Millipore公司; 放射免疫沉淀试验(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解缓冲液购自上海贝博生物科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CDDP-R B16F10细胞株的建立

将B16F10细胞株加入含10%胎牛血清的罗斯维·帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, RPMI) 1640培养基中, 于37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养箱中培养, 隔日换液。应用大剂量冲击及逐步增加剂量相结合的方法, 取对数生长期的细胞, 于1 mg/L CDDP的培养基内培养24 h后换为不含CDDP的RPMI 1640培养基, 细胞恢复生长后再加CDDP, 反复诱导, 最终使肿瘤细胞可在含1 mg/L CDDP的培养基中正常生长。再依次加入含2 mg/L和4 mg/L CDDP的RPMI 1640培养基, 重复以上步骤, 最终使肿瘤细胞能够在4 mg/L CDDP的培养基中正常生长。

### 1.2.2 CDDP-R B16F10细胞株增殖能力的测定

实验分为CDDP-R B16F10组(实验组)和B16F10组(对照组), 两组的培养基为不含CDDP的RPMI 1640培养基。细胞以 $2 \times 10^5$ /mL的密度接种于96孔板, 每孔加入100  $\mu$ L细胞悬液。采用MTT法, 每日各组测定5个孔的吸光度值, 连续4 d, 绘制生长曲线。

### 1.2.3 CDDP-R B16F10细胞株对CDDP的敏感性测定

实验分4组, 即CDDP-R B16F10组(培养基无CDDP)、B16F10组(培养基无CDDP)、CDDP-R B16F10+CDDP组、B16F10+CDDP组。细胞以 $2 \times 10^5$ /mL的密度接种于96孔板, 后2组各分为5个亚组, 其培养基含有CDDP浓度分别为0.004, 0.040, 0.400, 4.000和40.000 mg/L的RPMI-1640培养基。每组设5个复孔, 每孔加入100  $\mu$ L细胞悬液。48 h后采用MTT法测定各组细胞的吸光度值。计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)及耐药指数。

### 1.2.4 CDDP-R B16F10细胞株对紫杉醇的敏感性测定

实验分4组, 即CDDP-R B16F10组(无紫杉醇)、B16F10组(无紫杉醇)、CDDP-R B16F10+紫杉醇组和B16F10+紫杉醇组。细胞以 $2 \times 10^5$ /mL的密度接种于96孔板。后2组各分为5个亚组, 其培养基为含有紫杉醇浓度分别为0.001, 0.010, 0.100, 1.000和10.000 mg/L

的RPMI 1640培养基。每组设5个复孔, 每孔加入100  $\mu$ L细胞悬液。于37 °C, 5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下孵育48 h, 采用MTT法测定各组细胞的吸光度值。计算IC<sub>50</sub>及耐药指数。

### 1.2.5 T-cadherin真核表达载体的构建

引物设计如下: 正、反向引物分别为5'-CCGGAATTCATGCAGCCGAGAACTCCGCT-3'[(G+C)%=58.62%]和5'-CGCGGATCCTCA-CAGACAAGCTAAGCTGAAG-3'[(G+C)%=54.84%]。采用TRIzol一步法, 将50~100 mg液氮存放的人子宫平滑肌组织放入研钵中, 待组织研磨成粉后加入1 mL TRIzol, 提取总RNA。以提取的总RNA反转录的cDNA为模板, 进行反转录, PCR扩增, 产物回收并纯化, 采用EcoR I和BamH I双酶切, 再采用T4 DNA连接酶将目的基因片段连入线性化的pEGFP-N1真核表达载体中, 将其转化感受态大肠杆菌Top10, 少量提取, 采用EcoR I和BamH I酶切鉴定, 送检测序, 证实pEGFP-N1-T-cadherin载体构建成功。

### 1.2.6 T-cadherin转染CDDP-R B16F10细胞株及筛选

复苏1.2.1构建的CDDP-R B16F10细胞株, 用不含抗生素的培养基, 在37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养箱中培养。至细胞90%融合时传代。应用lipofectamine™ 2000进行转染<sup>[4]</sup>, 48 h后加入G418(800  $\mu$ g/mL), 进行筛选, 2周后获得阳性克隆。采用有限稀释法选取单个CDDP-R B16F10细胞株, 反复筛选、传代, 挑选抗性培养基(800  $\mu$ g/mL G418)中生长良好的CDDP-R B16F10细胞株。

### 1.2.7 RT-PCR检测转染后CDDP-R B16F10细胞株的T-cadherin mRNA表达

实验分为3组: 未转染的CDDP-R B16F10组、转染pEGFP-N1的CDDP-R B16F10组和转染pEGFP-N1-T-cadherin的CDDP-R B16F10组。应用试剂盒分别提取各组的总RNA, 反转录反应体系、步骤严格按照试剂盒说明书。正向引物5'-TTCAGCAGAAAGTGTTCATAT-3'; 反向引物5'-GTGCATGGACGAACAGAGT-3'。内对照为 $\beta$ -actin, 预期扩增片段为435 bp, 正向引物5'-CCCCAAGGCCAACCGTGAA-3'; 反向引物5'-CGGAATCGCTCGTTGCCAATGT-3'。反应条件如下: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 进行34个循环后, 于72 °C下维持5 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪采集电泳结果。

### 1.2.8 免疫组化SP法检测转染后CDDP-R B16F10细胞T-cadherin的蛋白质表达

分组同1.2.7。胰酶消化对数生长期的CDDP-R B16F10细胞, 稀释成浓度为 $1.5 \times 10^5$ /mL的细胞。于



载玻片上每孔滴加0.2 mL细胞悬液, 细胞贴壁后, 等渗磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗3次, 甲醇固定。3%过氧化氢去除内源性过氧化物酶, 小牛血清封闭非特异抗原, 加入一抗(1:100稀释)4 ℃过夜。PBS清洗3次, 加入二抗37 ℃ 1 h, PBS清洗3次, 以DAB显色, 苏木精衬染, 1%盐酸酒精分化, 去除多余着色部分, 自来水冲洗5 min返蓝, 于室温下晾干, 以中性树脂封片, 拍照记录结果。

### 1.2.9 蛋白质印迹法检测转染后CDDP-R B16F10细胞株T-cadherin蛋白质表达

分组同1.2.7。吸出细胞培养基, 以PBS清洗3次, 提取总蛋白质, 定量(BCA法)十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)凝胶电泳(50 μg), 将蛋白质转移到PVDF膜, 5%脱脂牛奶作为封闭液, 封闭1 h, 加入一抗(1:100稀释)于4 ℃孵育过夜; 吐温-三乙醇胺盐缓冲液(tris buffered saline with 0.1% Tween-20, TBST)漂洗3次后加入二抗(1:1 000稀释)于室温孵育1 h。以TBST漂洗3次, 每次10 min, 采用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)进行显影及凝胶成像扫描。

### 1.2.10 MTT法检测T-cadherin联合CDDP对CDDP-R B16F10细胞增殖的影响

实验分为6组(每组6个复孔): 空白对照组(未转染的CDDP-R B16F10细胞)、pEGFP-N1组(转染pEGFP-N1的CDDP-R B16F10细胞)、pEGFP-N1-T-cadherin组(转染pEGFP-N1-T-cadherin的CDDP-R B16F10细胞)、CDDP组(CDDP浓度4 mg/L)、pEGFP-N1联合CDDP组(CDDP浓度4 mg/L)和pEGFP-N1-T-cadherin联合CDDP组(CDDP浓度4 mg/L)。将指数增殖期的肿瘤细胞接种于96孔板内, 每孔100 μL细胞悬液。于37 ℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育48 h, 采用MTT法检测, 酶标仪490 nm处测吸光度值。

### 1.2.11 MTT法检测T-cadherin联合紫杉醇对CDDP-R B16F10细胞增殖的影响

实验分为6组(每组6个复孔): 空白对照组、pEGFP-N1组、pEGFP-N1-T-cadherin组、紫杉醇组(紫杉醇浓度1 mg/L)、pEGFP-N1联合紫杉醇组(紫杉醇浓度1 mg/L)、pEGFP-N1-T-cadherin联合紫杉醇组(紫杉醇浓度1 mg/L)。同1.2.10步骤及方法, 测各孔吸光度值。

## 1.3 统计学处理

本实验结果采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两样本比较采用t检验。析因分析确定有无交互作用。多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用LSD-t检验。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黑色素瘤CDDP-R B16F10细胞株的建立及增殖能力的测定

采用大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方法, 历时240 d, 最终建立可在4 mg/L CDDP的培养基中稳定生长的黑色素瘤耐药细胞株, 命名为CDDP-R B16F10细胞株。MTT法结果显示: 在不含有CDDP的培养基中, CDDP-R B16F10细胞株和B16F10细胞株的增殖差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 图1)。

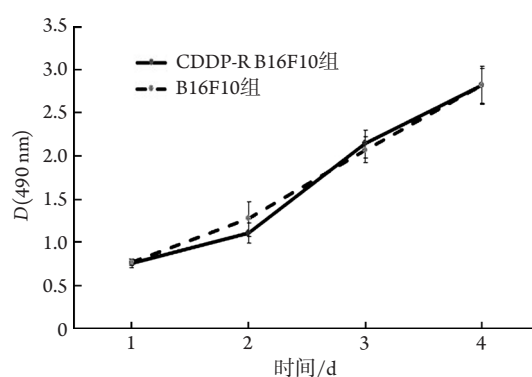


图1 CDDP-R B16F10细胞株的增殖能力

Figure 1 Proliferative ability of CDDP-R B16F10 cell line

### 2.2 CDDP-R B16F10细胞株对CDDP的敏感性测定

CDDP浓度0.004 mg/L时, CDDP-R B16F10组、B16F10组、CDDP-R B16F10+CDDP组、B16F10+CDDP组的吸光度值(分别为 $2.14 \pm 0.16$ ,  $2.07 \pm 0.15$ ,  $2.09 \pm 0.12$ ,  $2.01 \pm 0.06$ )差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。CDDP浓度为0.040, 0.400和4.000 mg/L时, CDDP-R B16F10+CDDP组(吸光度值分别为 $2.09 \pm 0.17$ ,  $2.08 \pm 0.16$ ,  $2.04 \pm 0.16$ )、CDDP-R B16F10组和B16F10组吸光度值差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ ), 但均高于B16F10+CDDP组(吸光度值分别为 $1.68 \pm 0.18$ ,  $1.45 \pm 0.06$ ,  $1.03 \pm 0.10$ )(均 $P < 0.05$ )。CDDP浓度为40.000 mg/L时, CDDP-R B16F10+CDDP组吸光度值( $1.5 \pm 0.15$ )高于B16F10+CDDP组( $0.52 \pm 0.02$ ), 低于CDDP-R B16F10组和B16F10组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。CDDP-R B16F10细胞株和B16F10细胞株对CDDP的IC<sub>50</sub>分别为268.706 mg/L和19.748 mg/L, 耐药指数为13.61。

### 2.3 CDDP-R B16F10细胞株对紫杉醇的敏感性测定

紫杉醇浓度为0.001 mg/L(CDDP-R B16F10组、B16F10组、CDDP-R B16F10+紫杉醇组、B16F10+

紫杉醇组的吸光度值分别为 $1.14\pm 0.06$ ,  $1.21\pm 0.08$ ,  $1.19\pm 0.12$ 和 $1.15\pm 0.16$ )和 $0.010\text{ mg/L}$ (4个组的吸光度值分别为 $1.14\pm 0.06$ ,  $1.21\pm 0.08$ ,  $1.15\pm 0.11$ 和 $1.19\pm 0.13$ )时, 4个组的吸光度值差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。紫杉醇浓度为 $0.100\text{ mg/L}$ 时, CDDP-R B16F10+紫杉醇组的吸光度值( $1.19\pm 0.08$ )高于B16F10+紫杉醇组( $0.98\pm 0.05$ ), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但与CDDP-R B16F10组和B16F10组比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。紫杉醇浓度为 $1.000$ 和 $10.000\text{ mg/L}$ 时, CDDP-R B16F10+紫杉醇组的吸光度值(分别为 $1.02\pm 0.04$ 和 $0.71\pm 0.08$ )均高于B16F10+紫杉醇组(吸光度值分别为 $0.76\pm 0.06$ 和 $0.5\pm 0.01$ ), 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。CDDP-R B16F10细胞株和B16F10细胞株对紫杉醇的 $IC_{50}$ 分别为 $11.415\text{ mg/L}$ 和 $7.799\text{ mg/L}$ , 耐药指数为 $1.46$ 。

#### 2.4 RT-PCR检测转染后CDDP-R B16F10细胞T-cadherin的mRNA表达情况

提取经G418筛选的CDDP-R B16F10细胞的mRNA, 进行RT-PCR扩增, 转染pEGFP-N1-T-cadherin的CDDP-R B16F10组可扩增出特异性条带, 其大小为 $208\text{ bp}$ 。未转染的CDDP-R B16F10组和转染pEGFP-N1的CDDP-R B16F10组均呈阴性。在基因水平证明T-cadherin成功转染CDDP-R B16F10细胞(图2)。

#### 2.5 稳定转染T-cadherin的CDDP-R B16F10细胞株T-cadherin的蛋白质表达情况

蛋白质印迹法及免疫组化结果均显示: 在转染pEGFP-N1-T-cadherin的CDDP-R B16F10组中T-cadherin呈阳性表达, 未转染的CDDP-R B16F10组和转染

pEGFP-N1的CDDP-R B16F10组均呈阴性。在蛋白质水平证明T-cadherin成功转染了CDDP-R B16F10细胞质(图3, 4)。

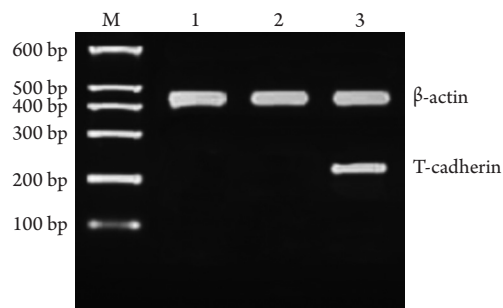


图2 PCR产物的电泳分析

Figure 2 Electrophoresis analysis of PCR products

M: 100–600 bp marker; 1: Untransfected CDDP-R B16F10 group; 2: Transfected CDDP-R B16F10 with pEGFP-N1 group; 3: Transfected CDDP-R B16F10 with pEGFP-N1-T-cadherin group

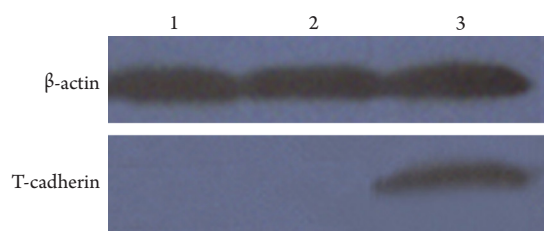


图3 蛋白质印迹法检测T-cadherin的表达

Figure 3 Expression of T-cadherin measured by Western blotting

1: Untransfected CDDP-R B16F10 group; 2: Transfected CDDP-R B16F10 with pEGFP-N1 group; 3: Transfected CDDP-R B16F10 with pEGFP-N1-T-cadherin group

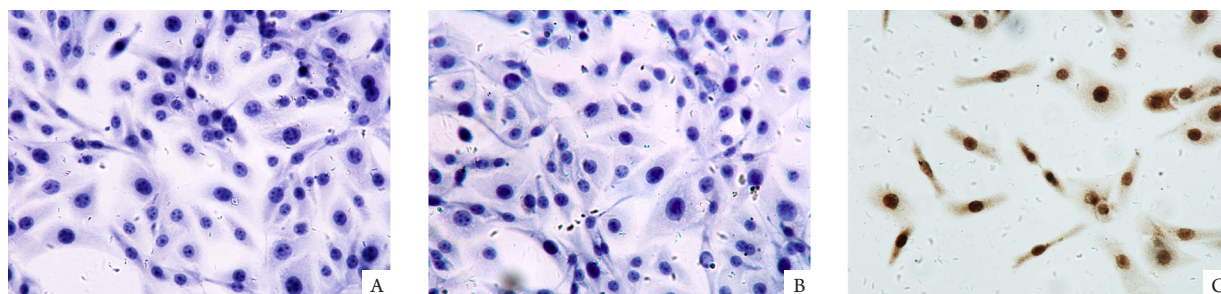


图4 免疫组化SP法检测T-cadherin的表达( $\times 200$ )

Figure 4 Expression of T-cadherin by immunohistochemistry SP method ( $\times 200$ )

A: Untransfected CDDP-R B16F10 group; B: Transfected CDDP-R B16F10 with pEGFP-N1 group; C: Transfected CDDP-R B16F10 with pEGFP-N1-T-cadherin group

### 2.6 MTT法检测T-cadherin联合CDDP对CDDP-R B16F10增殖的影响

方差分析结果显示6组间吸光度值不全相同, 差异有统计学意义( $F=30.76, P<0.05$ )。经组间多重比较, pEGFP-N1-T-cadherin联合CDDP组吸光度值低于pEGFP-N1-T-cadherin组, 差异有统计学意义( $LSD-t=-4.90, P<0.05$ )。pEGFP-N1-T-cadherin组低于空白对照组( $LSD-t=-4.55$ )、pEGFP-N1组( $LSD-t=-4.25$ )、CDDP组( $LSD-t=-5.2$ )和pEGFP-N1联合CDDP组( $LSD-t=-3.91$ ), 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ , 图5)。析因分析显示T-cadherin与CDDP联合对CDDP-R B16F10增殖的抑制有交互作用( $F=19.80, P<0.05$ )。

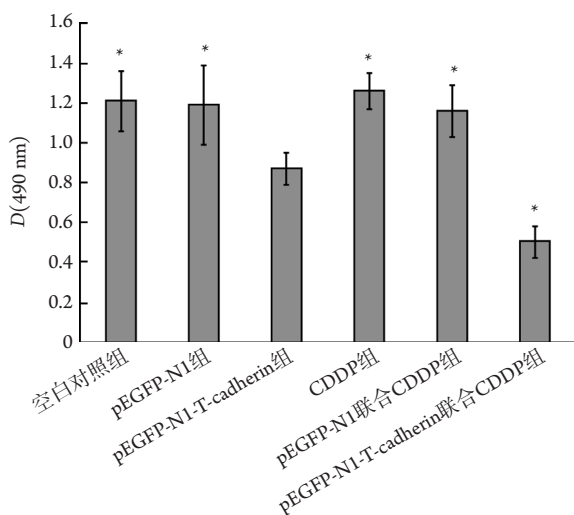


图5 T-cadherin联合CDDP对CDDP-R B16F10增殖的影响  
Figure 5 Effect of T-cadherin combined with CDDP on proliferation of CDDP-R B16F10

\* $P<0.05$  vs the pEGFP-N1-T-cadherin group

### 2.7 MTT法检测T-cadherin联合紫杉醇对CDDP-R B16F10增殖的影响

方差分析结果显示6组间吸光度值不全相同, 差异有统计学意义( $F=11.89, P<0.05$ )。经组间多重比较, pEGFP-N1-T-cadherin联合紫杉醇组吸光度值低于pEGFP-N1-T-cadherin组( $LSD-t=-3.15$ )、紫杉醇组( $LSD-t=-3.05$ )、pEGFP-N1联合紫杉醇组( $LSD-t=-3.25$ ), 差异有统计学意义(均 $P<0.05$ ); pEGFP-N1-T-cadherin组吸光度值低于空白对照组( $LSD-t=-3.47$ )、pEGFP-N1组( $LSD-t=-3.12$ ), 差异有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ); pEGFP-N1-T-cadherin组吸光度值与紫杉醇组和pEGFP-N1联合紫杉醇组差异无

统计学意义( $LSD-t$ 分别为0.09, -0.10, 均 $P>0.05$ ; 图6)。析因分析显示T-cadherin与紫杉醇联合对CDDP-R B16F10增殖的抑制无交互作用( $F=0.08, P>0.05$ )。

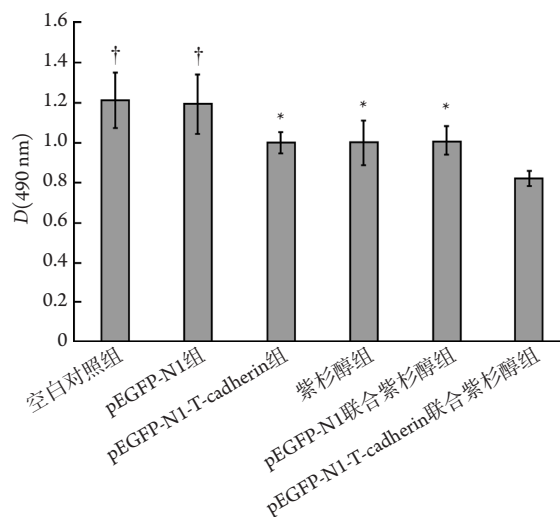


图6 T-cadherin联合紫杉醇对CDDP-R B16F10细胞株增殖的影响  
Figure 6 Effect of T-cadherin combined with paclitaxel on proliferation of CDDP-R B16F10 cell line

\* $P<0.05$  vs the pEGFP-N1-T-cadherin combined with paclitaxel group, † $P<0.05$  vs the pEGFP-N1-T-cadherin group

## 3 讨论

CDDP属于细胞周期的非特异性药物, 具有细胞毒性。CDDP通过破坏DNA的结构, 阻止肿瘤细胞DNA的正常复制, 进而诱导细胞凋亡<sup>[5]</sup>。作为传统的肿瘤化疗药, CDDP已经在多种恶性肿瘤治疗中产生耐药性。CDDP耐药的机制复杂, 如DNA损伤修复<sup>[6]</sup>、细胞凋亡信号通路和某些间接信号通路的异常、胞内化疗药物积累的减少<sup>[7]</sup>、药物去活作用的增强等。

T-cadherin基因定位于人类染色体16q的2412-2413区域, 这是一个多种肿瘤常发生等位基因丢失的区域<sup>[8]</sup>。已在多种恶性肿瘤中检测到T-cadherin的表达缺失<sup>[9-10]</sup>。有研究<sup>[11-13]</sup>报道: 上调某些cadherin的表达可提高恶性肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

本研究成功建立了CDDP-R B16F10细胞株, 然后采用MTT法检测了CDDP-R B16F10细胞对CDDP的耐药指数。采用RT-PCR技术和基因克隆技术从人子宫平滑肌组织中克隆T-cadherin, 并构建T-cadherin的真核表达载体pEGFP-N1-T-cadherin。将pEGFP-



N1-T-cadherin转染CDDP-R B16F10细胞株后,发现T-cadherin联合CDDP可抑制CDDP-R B16F10的增殖,经析因分析显示T-cadherin与CDDP联合有协同抗肿瘤作用。

磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶(protein serine/threonine kinase, AKT)信号通路的异常与恶性肿瘤发生及进展密切相关<sup>[14]</sup>。该信号通路通过补偿CDDP引发的致死信号来抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[15]</sup>,导致对CDDP的耐药。作为一种促凋亡的肿瘤抑制因子,T-cadherin的表达能够拮抗PI3K/AKT信号通路<sup>[16]</sup>。将T-cadherin转染CDDP-R B16F10,再用G418筛选,采用RT-PCR,蛋白质印迹法和免疫组化SP法检测,均证实CDDP-R B16F10可转录和稳定表达T-cadherin。笔者推测:将T-cadherin转染CDDP-R B16F10后,可能通过阻断上述补偿途径,从而恢复了CDDP对CDDP-R B16F10增殖的抑制作用。B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma, Bcl)-2家族蛋白是调控细胞凋亡的主要调节蛋白,可增强细胞对大多数DNA损伤因子的抵抗性。作为PI3K/AKT通路下游的重要效应分子,Bcl-2同样能够导致细胞对CDDP耐药性的产生,而T-cadherin可下调Bcl-2的表达<sup>[16]</sup>。笔者推测T-cadherin也可能通过直接下调Bcl-2基因的表达,最终实现CDDP耐药性的逆转。

本研究又检测了肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性。结果发现CDDP-R B16F10细胞株对与CDDP结构及抗肿瘤机制均不同的紫杉醇产生了耐药性,提示黑色素瘤B16F10细胞株对CDDP耐药后,可能获得了多药耐药的特性。作为前列腺素合成的限速酶,环氧合酶在肿瘤的耐药中也发挥了重要作用,环氧合酶-2可通过增强PI3K的磷酸化途径促进肿瘤细胞增殖<sup>[17]</sup>,还可通过增强Bcl-2通路,抑制肿瘤细胞凋亡,最终导致肿瘤细胞多药耐药。将T-cadherin转染已经发生多药耐药的肿瘤细胞后,CDDP耐药细胞株对紫杉醇的耐药性也发生了逆转,提示T-cadherin在肿瘤多药耐药预防及逆转方面,可能发挥重要作用,其具体机制有待进一步研究和证实。

**利益冲突声明:** 作者声称无任何利益冲突。

## 参考文献

- [1] 李晶,余音,刘林红,等.抑癌基因DKK3对皮肤恶性黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响[J].中华皮肤科杂志,2017,50(12):904-908.  
LI Jing, YU Yin, LIU Linhong, et al. Effects of tumor suppressor gene Dickkopf-3 on proliferation and apoptosis of cutaneous malignant melanoma cells[J]. Chinese Journal of Dermatology, 2017, 50(12): 904-908.
- [2] 孙杨,王先成,方柏荣,等. ANGPTL4基因调控黑色素瘤细胞醛缩酶A表达水平的机制[J].中南大学学报(医学版),2015,40(8):851-857.  
SUN Yang, WANG Xiancheng, FANG Bairong, et al. Angiopoietin-like 4 modulates aldolase A expression in human melanoma cell in a PKC dependent manner[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2015, 40(8): 851-857.
- [3] Duan XS, Lu J, Ge ZH, et al. Effects of T-cadherin expression on B16F10 melanoma cells[J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1205-1210.
- [4] 郭科,莫乃新.下调丙酮酸激酶2表达对膀胱癌T24细胞株生物学特性的影响[J].江苏大学学报(医学版),2015,25(1):22-26.  
GUO Ke, MO Naixin. Expression of PKM2 in bladder carcinoma and its effect of down-regulation on biological characteristics of bladder carcinoma cell line T24[J]. Journal of Jiangsu University. Medicine Edition, 2015, 25(1): 22-26.
- [5] 李良,张正详,吴波,等.小眼畸形转录因子和c-Met及组织蛋白酶-K在黑色素瘤病变中的表达及意义[J].中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(8):740-743.  
LI Liang, ZHANG Zhengxiang, WU Bo, et al. Expressions and significances of microphthalmia transcription factor, c-Met and cathepsin-K in malignant melanoma and nevi[J]. Journal of Practical Diagnosis and Therapy, 2014, 28(8): 740-743.
- [6] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(15): 1869-1883.
- [7] Kalayda GV, Wagner CH, Jaehde U. Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells[J]. J Inorg Biochem, 2012, 116: 1-10.
- [8] Ren JZ, Huo JR. Correlation between T-cadherin gene expression and aberrant methylation of T-cadherin promoter in human colon carcinoma cells[J]. Med Oncol, 2012, 29(2): 915-918.
- [9] 王梅红,孔德娣,周艳贞,等.T-钙黏蛋白在乳腺癌中表达及其与预后的关系[J].中华普外科手术学杂志(电子版),2014,8(2):157-160.  
WANG Hongmei, KONG Dedi, ZHOU Yanzhen, et al. Expression and predictive value of prognosis of T-cadherin in breast cancer[J]. Chinese Journal of Operative Procedures of General Surgery. Electronic Edition, 2014, 8(2): 157-160.
- [10] 李鲲,冯旭,石俊杰,等.T-钙黏蛋白基因甲基化在肺癌发生中的作用[J].中华实验外科杂志,2016,33(8):1897-1899.  
LI Kun, FENG Xu, SHI Junjie, et al. Role of T-cadherin genomic methylation in the development of lung cancer[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2016, 33(8): 1897-1899.
- [11] Chekhun VE, Lukyanova NY, Urchenko OV, et al. The role of the

- components of proteome in the formation of molecular profile of human ovarian carcinoma A2780 cells sensitive and resistant to cisplatin[J]. *Exp Oncol*, 2005, 27(3): 191-195.
- [12] Selga E, Morales C, Noé V, et al. Role of caveolin 1, E-cadherin, Enolase 2 and PKCalpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells[J]. *BMC Med Genomics*, 2008, 1: 35.
- [13] Fricke E, Hermannstädter C, Keller G, et al. Effect of wild-type and mutant E-Cadherin on cell proliferation and responsiveness to the chemotherapeutic agents cisplatin, etoposide, and 5-fluorouracil[J]. *Oncology*, 2004, 66(2): 150-159.
- [14] 马娜, 郭瑞珍. Caspase-9, caspase-3, Bcl-2蛋白在瘢痕癌组织中的表达及意义[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2014, 28(8): 776-780.
- MA Na, GUO Ruizhen. Expression of caspase-9, caspase-3 and Bcl-2 protein in skin scar carcinoma[J]. *Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2014, 28(8): 776-780.
- [15] Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(7): S05-S16.
- [16] Bosserhoff AK, Ellmann L, Quast AS, et al. Loss of T-cadherin (CDH-13) regulates AKT signaling and desensitizes cells to apoptosis in melanoma[J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53(8): 635-647.
- [17] Xu X, Qin J, Liu W. Curcumin inhibits the invasion of thyroid cancer cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Gene*, 2014, 546(2): 226-232.
- (本文编辑 傅希文)

**本文引用:** 陆海涛, 郭健, 何磊, 刘利君, 段昕所. 稳定表达T-钙黏蛋白的黑色素瘤顺铂耐药细胞株的建立及其生物学特性[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2019, 44(11): 1214-1221. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180649

**Cite this article as:** LU Haitao, GUO Jian, HE Lei, LIU Lijun, DUAN Xinsuo. Establishment of cisplatin-resistant melanoma cell line with stable expression of T-cadherin and its biological characteristics[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2019, 44(11): 1214-1221. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180649