

PI3K/Akt/GSK-3 β 通路介导 ABC 转运蛋白调控人结肠癌 HCT-15 细胞多药耐药*

袁亚男, 严晓丽, 黄艳洁, 杜梦楠, 郑纪宁[△]
(承德医学院病理学与病理生理学教研室, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:** 研究 PI3K/Akt 信号通路是否通过下游糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 途径调控 ABC 转运蛋白的表达参与人结肠癌 HCT-15 细胞的多药耐药。**方法:** 选用人结肠癌 HCT-15 细胞为实验对象, 分别采用 GSK-3 β 抑制剂(HY-19807)和 PI3K/Akt 通路抑制剂(HY-13898)处理细胞。CCK-8 法检测奥沙利铂对细胞的半数抑制浓度, 计算抑制率及耐药指数。Western blot 法检测细胞内 Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK3 β -Ser9 及 ABC 转运蛋白(P-gp 和 MRP-2)的水平。RT-qPCR 法检测各组细胞内 ABC 转运蛋白 mRNA 的表达变化。流式细胞术检测不同抑制剂对细胞周期的影响。**结果:** 应用 GSK-3 β 抑制剂 HY-19807 处理后的 HCT-15 细胞, 其奥沙利铂半数抑制浓度较对照组明显上升, 并出现 p-GSK3 β -Ser9、P-gp 和 MRP-2 蛋白水平的上调($P < 0.05$), Akt 及 p-Akt 的蛋白水平变化不明显($P > 0.05$); RT-qPCR 结果同样为 ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 表达量升高($P < 0.01$); 同时细胞周期检测结果显示 HY-19807 处理能够促进 HCT-15 细胞由 G₁ 期向 S 期过渡, 细胞增殖旺盛。而应用 PI3K/Akt 通路抑制剂 HY-13898 作用于 HCT-15 细胞后, 其奥沙利铂半数抑制浓度较对照组下降, 并出现 p-GSK3 β -Ser9、p-Akt、P-gp 和 MRP-2 的蛋白水平下调($P < 0.01$); RT-qPCR 检测结果同样为 ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 表达量降低($P < 0.01$); 同时出现 G₁ 期延长, 细胞由 G₁ 期向 S 期过渡受到抑制, 细胞的增殖受到抑制。各实验组总 GSK-3 β 蛋白表达一致。**结论:** PI3K/Akt 信号通路通过调控 GSK-3 β 的磷酸化水平, 改变 ABC 转运蛋白的表达, 参与结肠癌细胞的增殖与多药耐药。

[关键词] 结肠直肠癌; 多药耐药; 糖原合成酶激酶 3 β ; ABC 转运蛋白; PI3K/Akt 信号通路

[中图分类号] R363.2; R735.3⁺5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.12.014

PI3K/Akt/GSK-3 β pathway mediates ABC transporter regulating multidrug resistance in human colon cancer HCT-15 cells

YUAN Ya-nan, YAN Xiao-li, HUANG Yan-jie, DU Meng-nan, ZHENG Ji-ning

(Department of Pathology and Pathophysiology, Chengde Medical College, Chengde 067000, China. E-mail: 910235882@qq.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate whether the PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of ABC transporter through the downstream glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) pathway and participates in the multidrug resistance of colorectal cancer (CRC) HCT-15 cells. **METHODS:** Colorectal cancer HCT-15 cells were cultured and then treated with GSK-3 β inhibitor (HY-19807) and PI3K/Akt pathway inhibitor (HY-13898), respectively. The median inhibitory concentration (IC₅₀) of oxaliplatin for HCT-15 cells in each group was detected by CCK-8 assay, the inhibition rate and resistance index were also calculated. The protein levels of Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK3 β -Ser9 and ABC transporters P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP-2) in the HCT-15 cells were determined by Western blot. The mRNA expression of ABC transporter in the HCT-15 cells was detected by RT-qPCR. The cell cycle distributions were analyzed by flow cytometry assay. **RESULTS:** After GSK-3 β inhibitor HY-19807 was used in the HCT-15 cells, the median inhibitory concentration of oxaliplatin was significantly increased, the protein levels of p-GSK3 β -Ser9, P-gp and MRP-2 were up-regulated compared with control group ($P < 0.05$), the changes of Akt and p-Akt were not obvious compared with control group ($P > 0.05$). The results of RT-qPCR also showed that the mRNA levels of ABCB1 and ABCC2 were increased ($P < 0.01$). Meanwhile, analysis of the cell cycle distribution showed that GSK-3 β inhibitor HY-

[收稿日期] 2019-02-12 [修回日期] 2019-05-06

* [基金项目] 河北省高校重点学科建设资助项目 (No. 031412)

[△]通讯作者 Tel: 18931412659; E-mail: 910235882@qq.com

19807 promoted HCT-15 cell transition from G₁ phase to S phase, and cell proliferation was vigorous. After the PI3K/Akt pathway inhibitor HY-13898 was applied to HCT-15 cells, the IC₅₀ of oxaliplatin was decreased compared with control group ($P < 0.05$). Moreover, the protein levels of p-Akt, p-GSK3 β -Ser9, P-gp and MRP-2 were down-regulated ($P < 0.01$). RT-qPCR results also showed that the mRNA expression of ABCB1 and ABCC2 was decreased ($P < 0.01$). At the same time, G₁ phase was prolonged, which inhibited cell transition from G₁ phase to S phase, and inhibited cell proliferation. The protein expression of total GSK-3 β was consistent in each group. **CONCLUSION:** The PI3K/Akt signaling pathway is involved in the proliferation and multidrug resistance of colorectal cancer HCT-15 cells by regulating the phosphorylation of GSK-3 β and changing the expression of ABC transporter.

[**KEY WORDS**] Colorectal cancer; Multidrug resistance; Glycogen synthase kinase-3 β ; ABC transporter; PI3K/Akt signaling pathway

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的恶性肿瘤之一,且发病率有逐年升高趋势。据2018年全球肿瘤统计报告显示,结直肠癌在恶性肿瘤中的发病率位列第4位,但死亡率却高居第2位^[1]。在我国,结直肠癌在男性恶性肿瘤中的发病率位列第4,在女性则位列第3位^[2]。手术治疗是早期结直肠癌的根治方法,而中晚期结直肠癌患者则依赖于化疗、放疗以提高5年生存率^[3]。

目前临床上改善结直肠癌预后的主要化疗药物以奥沙利铂为主,但仍有半数以上的患者疗效不显著,肿瘤细胞的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是导致化疗失败的主要原因之一。克服结直肠癌的MDR,提高化疗效果是目前亟待解决的问题。产生MDR的机制复杂多样,其中以转运蛋白的活化最为主要。本课题所研究的转运蛋白包括P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)和多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2, MRP-2)同属于ABC家族,其中P-gp由ABCB1基因编码,MRP-2由ABCC2基因编码。目前研究发现,作为磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt信号通路下游靶因子的糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)参与肿瘤细胞的发生与发展,是肿瘤细胞的关键调节因子,但在结直肠癌细胞中关于GSK-3 β 与多药耐药的关系尚未见报道。本课题通过应用不同抑制剂改变GSK-3 β 的磷酸化状态,监测多药耐药相关蛋白的表达变化及其对奥沙利铂敏感性的影响,旨在探讨PI3K/Akt信号通路的下游靶因子GSK-3 β 与ABC转运蛋白及结直肠癌多药耐药的关系。

材 料 和 方 法

1 材料

人结肠癌HCT-15细胞购于广州吉妮欧生物有限公司。细胞计数试剂盒8(Cell Counting Kit-8,

CCK-8)购自上海同仁化工有限公司;PI3K/Akt信号通路抑制剂HY-13898及GSK-3 β 抑制剂HY-19807购自MCE;奥沙利铂购自深圳海王药业有限公司;总RNA抽提试剂盒和定量PCR试剂盒购自天根生化科技有限公司;GAPDH和ABCB1、ABCC2基因上下游引物和探针购自TaKaRa;RIPA及PMSF购自Solarbio;BCA蛋白质定量试剂购自碧云天生物技术有限公司;抗P-gp和MRP-2单克隆抗体购于Cell Signaling;抗Akt、p-Akt、GSK-3 β 和p-GSK-3 β -Ser9单克隆抗体购自博奥森生物有限公司。NanoDrop 2000超微量分光光度仪购自Thermo,CFX96定量PCR仪购自Bio-Rad,酶标仪购自Thermo,化学发光仪购自Tanon。

2 方法

2.1 细胞培养 结肠癌细胞系HCT-15用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液于37℃、5%CO₂的条件下培养。实验选用对数生长期细胞,分为3组:对照(control)组:HCT-15细胞+DMSO;HY-19807组:HCT-15细胞+GSK-3 β 抑制剂(HY-19807溶于DMSO,实验终浓度为40 μ mol/L,作用细胞2h);HY-13898组:HCT-15细胞+PI3K/Akt信号通路抑制剂(HY-13898溶于DMSO,实验终浓度为30 μ mol/L,作用细胞24h)。

2.2 Western blot检测蛋白水平 取3个实验组处于对数生长期细胞,用PBS洗涤细胞3次,加入细胞裂解液(RIPA:PMSF=100:1),在冰上静置30min。细胞刮子刮取细胞并移至EP管内,4℃、12 000 r/min离心15min,取上清至另一EP管内。采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,并取各组40 μ g蛋白上样。细胞蛋白通过10%SDS-PAGE分离,并转移到PVDF膜上。在室温下,PVDF膜在封闭缓冲液中封闭1~2h,孵育I抗缓冲液(GSK-3 β 1:1 000; p-GSK3 β -Ser9 1:1 000; Akt 1:1 000; p-Akt 1:1 000; P-gp 1:1 000; MRP-2 1:1 000),4℃过夜。次日用

TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,室温下孵育 HRP 标记的 II 抗缓冲液(1:1 000)2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。PVDF 膜浸泡于 1:1 比例的 ECL 发光液 2~3 min,使用天能分子成像仪激发和采集目的条带,借助 ImageJ 分析软件定量目的条带。

2.3 CCK-8 法检测细胞生长情况 取 3 个实验组的对数生长期细胞制成细胞悬液,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,并调整每孔细胞数约 6×10^3 个。待 4 h 后细胞贴壁,分别加入含有不同浓度奥沙利铂的培养基 100 μL ,每孔设 4 个复孔,继续放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的孵箱内培养。24 h 后每孔内加入含有 10 μL CCK-8 的 RPMI-1640 培养基 100 μL ,继续孵育 3 h 后,在 450 nm 波长下用酶标仪测量每孔的吸光度(A)值。用细胞的存活曲线计算达到 50% 细胞生长抑制的奥沙利铂的浓度,计算细胞的生长抑制率、耐药指数(resistance index, RI)。计算公式:生长抑制率(%) = (A 对照组平均值 - A 实验组平均值)/(A 对照组平均值 - A 空白对照组平均值) $\times 100\%$; RI = 实验组细胞的 IC_{50} /对照组细胞的 IC_{50} 。实验重复

3 次,取平均值。

2.4 RT-qPCR 法检测 mRNA 的表达 取 3 个实验分组中处于对数生长期的细胞加入 TRIzol 置冰上 15 min,然后 12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,小心取上层清液,按照 RNA 提取步骤依次加入 1/5 体积的氯仿及等体积异丙醇。将提取的 RNA 用 Nanodrop 2000 分光光度计分析测定所抽提 RNA 的浓度及 A260/A280 的数值,且 A260/A280 在 1.8~2.1 之间为纯度符合要求。放于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按照反转录试剂盒操作步骤将提取的 RNA 反转录为 cDNA。总反应体系 20 μL ,包含 2 \times SYBR Master Mix 标准混合液 10 μL ,上、下游引物各 1 μL ,标本 2 μL ,去 RNase 水 6 μL 。PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20s,共 40 个循环,所有标本检测 3 次。用内参照 GAPDH 标准化结果,结果采用靶基因与内参照 GAPDH 浓度的比值表示。采用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法)对定量结果进行比较分析。各基因引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 实验的各基因引物序列

Table 1. The primer sequences for RT-qPCR

| Name | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|-------|-------------------------|--------------------------|
| ABCB1 | GGAGCCTACTTGGTGCCACATAA | GTAGCTCATCATCTGGGACA |
| ABCC2 | AGTGATCACCATCGCCACA | GTTTACATTCTCAATGCCAGCTTC |
| GAPDH | GCACCGTCAAGGCTGAGAAC | TGCTGAAGACGCCAGTGGA |

2.5 细胞周期分布的检测 收集对数生长期的各组细胞,弃上清,用预冷 PBS 洗细胞 2 次。用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基稀释成细胞悬液,加入预冷的 70% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,离心,PBS 洗涤,加入 500 μL PI 染液,室温避光孵育 15 min,上流式细胞仪检测。

3 统计学处理

数据采用 SPSS 19.0 软件分析,计量资料实验数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,多个样本均数间的比较先进行方差齐性检验,方差齐时进行单因素方差分析,相关性分析采用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 Western blot 实验结果

Western blot 检测结果显示,将 HY-19807 作用于人结肠癌 HCT-15 细胞后,p-GSK-3 β -Ser9、P-gp 和 MRP-2 的表达较未用药的 HCT-15 组明显升高($P <$

0.05),GSK-3 β 上游的 Akt 及 p-Akt 的蛋白水平变化不明显($P > 0.05$);而将 HY-13898 作用于 HCT-15 细胞后,p-GSK3 β -Ser9 和 p-Akt 的蛋白水平降低($P < 0.01$),P-gp 和 MRP-2 蛋白的相对表达量均明显低于对照组($P < 0.01$);总 GSK-3 β 在 2 个实验组中的水平变化不明显,差异无统计学显著性($P > 0.05$),见图 1。提示 HY19807 能够通过促进磷酸化 GSK-3 β -Ser9 增加 HCT-15 细胞 ABC 转运蛋白的表达,而 HY13898 可以通过抑制 GSK-3 β -Ser9 磷酸化降低 ABC 转运蛋白的表达,且 p-GSK3 β -Ser9 与 P-gp 和 MRP-2 的蛋白水平存在正相关。

2 HCT-15 细胞应用不同抑制剂后对奥沙利铂敏感性的影响

应用 HY-19807 作用于人结肠癌 HCT-15 细胞后,奥沙利铂对 HCT-15 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})由(19.83 \pm 0.80) mg/L 升至(27.15 \pm 1.57) mg/L,耐药指数为 1.36($P < 0.01$)。HY-13898 作用于人结肠癌 HCT-15 细胞阻断 PI3K/Akt 信号通路激活后,

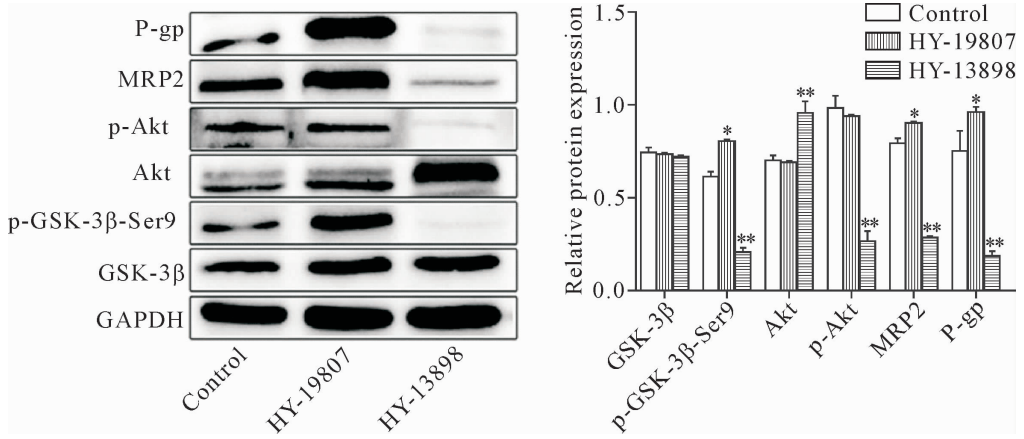


Figure 1. The results of Western blot for determining the protein levels of total GSK-3 β , p-GSK-3 β -Ser9, Akt, p-Akt, MRP2 and P-gp in the HCT-15 cells after treated with different inhibitor. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图1 Western blot 检测不同抑制剂对 HCT-15 细胞的 GSK-3 β 、p-GSK-3 β -Ser9、Akt、p-Akt、MRP2 和 P-gp 蛋白水平的影响

奥沙利铂对 HCT-15 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 由 (19.83 \pm 0.80) mg/L 降至 (9.93 \pm 1.77) mg/L, 耐药指数为 0.5 ($P < 0.01$), 见图 2。提示 HY-19807 增加

p-GSK-3 β -Ser9 的水平后可以降低 HCT-15 细胞对奥沙利铂的敏感性, 而 HY-13898 使 GSK3 β -Ser9 去磷酸化后可以增强 HCT-15 细胞对奥沙利铂的敏感性。

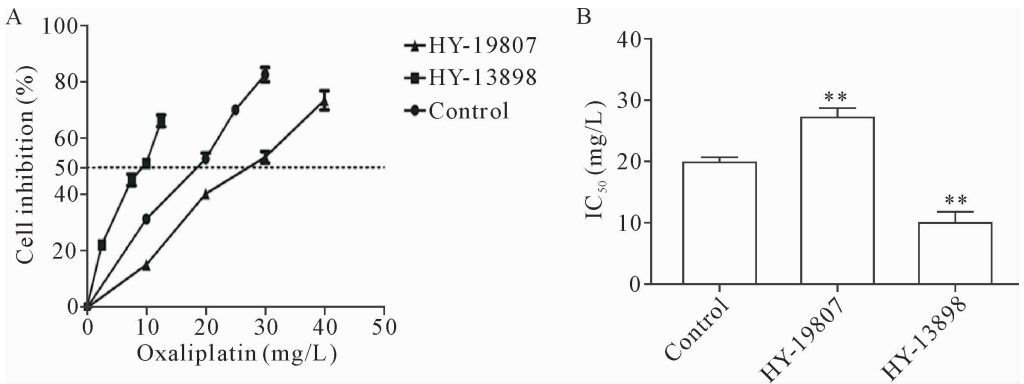


Figure 2. The effect of different inhibitors on the cell viability (A) and the changes of IC₅₀ (B) in the HCT-15 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group.

图2 不同抑制剂对 HCT-15 细胞生存率和 IC₅₀ 的影响

3 RT-qPCR 实验结果

RT-qPCR 检测结果显示, 将 HY-19807 作用于人结肠癌 HCT-15 细胞后, ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 表达较对照组明显升高 ($P < 0.01$); 将 HY-13898 作用于 HCT-15 细胞后, ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 相对表达量均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 3。提示 HY-19807 使 GSK3 β -Ser9 位点磷酸化增加, 可以促进 ABC 转运蛋白 mRNA 的表达; 相反, HY-13898 使 GSK3 β -Ser9 位点去磷酸化后可抑制 ABC 转运蛋白 mRNA 的表达。

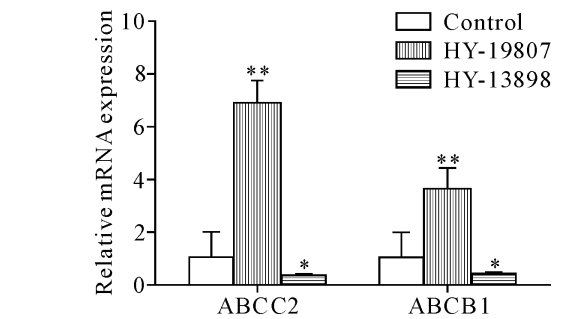


Figure 3. The relative mRNA expression of ABCC2 and ABCB1 in the HCT-15 cells after treated with different inhibitors. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图3 不同抑制剂处理 HCT-15 细胞后 ABCC2 和 ABCB1 的 mRNA 相对表达量的变化

4 细胞周期分布的变化

经流式细胞术分析, control 组 G₁ 期细胞占比 (59.61 \pm 0.73)%, S 期细胞占比 (23.38 \pm 0.74)%, HCT-15 细胞经 HY-19807 处理后与对照组相比 G₁ 期

细胞的百分率为 $(45.69 \pm 0.96)\%$,明显减少 ($P < 0.01$) ,同时 S 期细胞的百分率为 $(39.77 \pm 0.92)\%$,显著增加 ($P < 0.01$) ,表明 HY-19807 可促使 HCT-15 细胞由 G₁ 期向 S 期过渡,促进细胞增殖。用 HY-13898 处理 HCT-15 细胞后,G₁ 期的细胞百分率为 $(84.17$

$\pm 1.35)\%$,明显增加 ($P < 0.01$) ,同时 S 期的细胞百分率为 $(6.90 \pm 0.59)\%$,显著减少 ($P < 0.01$) ,表明 HY-13898 可阻止 HCT-15 细胞由 G₁ 期向 S 期过渡,细胞增殖受到抑制,见图 4。

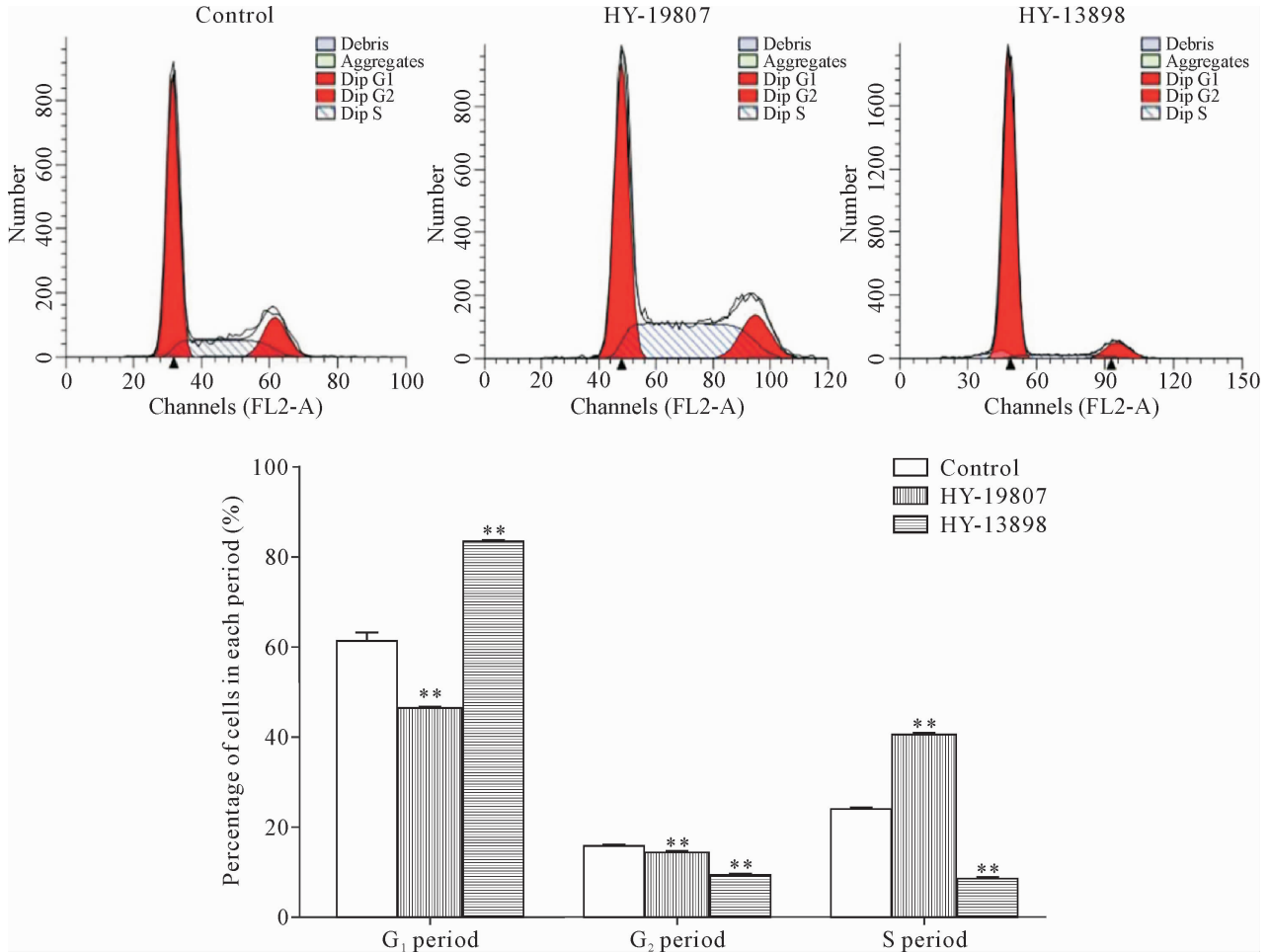


Figure 4. The effects of different inhibitors on the cell cycle distribution in the HCT-15 cells. Mean \pm SD. $n = 4$. ** $P < 0.01$ vs control group.

图 4 流式细胞术分析不同抑制剂处理 HCT-15 细胞后对细胞周期分布的变化

讨 论

结直肠癌的发病率及死亡率一直呈上升趋势,化疗是治疗结直肠癌的重要辅助手段。奥沙利铂作为临床上广泛应用的铂类化疗药,因为肿瘤细胞多药耐药的出现严重影响其化疗效果。国内外学者多方面研究发现,奥沙利铂导致多药耐药的主要原因之一是细胞内转运蛋白的活化,致使药物外排作用增加,降低细胞内的有效药物浓度。本课题研究的 2 种转运蛋白 P-gp 和 MRP2 同属于 ABC 转运蛋白家族,P-gp 是由 1 280 个氨基酸组成的分子质量为 170 kD 的单链跨膜糖蛋白,MRP 是由 1 531 个氨基酸组

成的分子质量为 190 kD 的多药耐药相关蛋白,两者能够利用 ATP 水解的能量,将疏水亲脂的化疗药物主动排出细胞外,降低细胞内药物蓄积,从而使肿瘤细胞产生多药耐药。P-gp 可以直接将药物由细胞内排出,使得细胞免受化疗药物的毒性作用。而 MRP 需要谷胱甘肽与药物的共价结合来确保转运的实现^[4-5]。越来越多的证据表明这两种转运蛋白(P-gp 和 MRP2) 的活化是由于 PI3K/Akt 通路的激活所致^[6-7]。

PI3K/Akt 信号传导通路是一条酪氨酸激酶级联信号传导通路,是细胞生存通路之一。PI3K/Akt 通路激活使 Akt 发生磷酸化而激活,活化的 Akt 通过磷

酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、caspase-9、NF-κB、GSK-3β、FKHR、mTOR、FKHR 和 p27 Kip1 等。PI3K/Akt 信号通路活化后不仅能够促进细胞增殖与侵袭, Ma 等^[8] 研究发现 PI3K/Akt 通路在介导人白血病多药耐药方面发挥重要作用。众多学者在胃癌^[9]、肺癌^[10]、人乳腺癌^[11] 和肝癌^[12] 等多种肿瘤细胞中证实 PI3K/Akt 通路能够调控 ABC 转运蛋白的表达参与肿瘤细胞多药耐药,但具体机制尚不清楚。Sui 等^[6] 研究发现通过抑制 PI3K/Akt 通路下游 NF-κB 磷酸化能够下调 P-gp 的表达,逆转人结肠癌多药耐药。

GSK-3β 是 PI3K/Akt 通路下游靶因子之一, PI3K/Akt 通路激活后可使 GSK-3β 丝氨酸 9 位点发生磷酸化,从而抑制 GSK-3β 的活性。GSK-3β 作为 PI3K/Akt 通路下游的靶因子,在人类多种肿瘤细胞中发挥着重要的作用。有研究表明,在前列腺癌^[13] 及胰腺癌^[14] 中 GSK-3β 能够促进肿瘤细胞的增殖与转移。与此同时,在胆管癌细胞^[15] 和乳腺癌^[16] 中, GSK-3β 激活后能够降低 ABC 转运蛋白的表达并逆转肿瘤细胞的多药耐药。通过前人的研究发现 PI3K/Akt 通路的激活能够导致多药耐药的发生,且 GSK-3β 与肿瘤细胞增殖与耐药之间存在密切关系,但在直结肠癌中,PI3K/Akt 通路是否通过下游靶因子 GSK-3β 途径调控 ABC 转运蛋白的表达来参与多药耐药在大肠癌细胞中的作用未见报道。

本课题研究结果显示,应用 GSK-3β 抑制剂 HY-19807 后,奥沙利铂对 HCT-15 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 由 (19.83 ± 0.80) mg/L 升至 (27.15 ± 1.57) mg/L。应用 PI3K/Akt 通路抑制剂 HY-13898 后,奥沙利铂对 HCT-15 细胞的 IC₅₀ 由 (19.83 ± 0.80) mg/L 降至 (9.93 ± 1.77) mg/L,说明抑制 GSK-3β 活性后能够增加细胞的耐药性,阻断 PI3K/Akt 信号通路,增强 GSK-3β 活性后能降低细胞的耐药性。进一步研究发现, HY-19807 作用于 HCT-15 细胞后, p-GSK-3β-Ser9、P-gp 及 MRP2 的表达增加,而 HY-13898 作用于 HCT-15 细胞后, Akt 表达增加, p-Akt、p-GSK-3β-Ser9、P-gp 及 MRP2 的表达降低,两种抑制剂对总 GSK-3β 表达无影响。RT-qPCR 检测结果显示,应用 HY-19807 后, HCT-15 细胞 ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 表达增加,应用 HY-13898 后, ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 表达降低。提示 HY-19807 抑制 GSK-3β 活性后,能够增加 HCT-15 细胞中 P-gp、MRP2 的蛋白表达及 ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 表达,导致药物外排作用增加,细胞内药物浓度降低,减弱肿瘤细

胞对奥沙利铂的化疗敏感性。HY-13898 抑制 PI3K/Akt 信号通路,使 GSK3β 去磷酸化而激活,能够降低 HCT-15 细胞中 p-Akt、p-GSK-3β-Ser9、P-gp 及 MRP2 的蛋白表达,降低 ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 表达,药物外排作用减弱,细胞内药物浓度增加,增强肿瘤细胞对奥沙利铂的化疗敏感性。GSK-3β 作为 PI3K/Akt 信号通路下游的靶因子, PI3K/Akt 信号通路激活后磷酸化 GSK-3β-Ser9 位点,使 GSK-3β 活性降低, P-gp 及 MRP2 表达增加。抑制 PI3K/Akt 信号通路能够使 GSK-3β-Ser9 去磷酸化, GSK-3β 活性增强, P-gp 及 MRP2 表达减少。以上实验结果表明在 HCT-15 细胞中 P-gp 及 MRP2 的表达是通过 PI3K/Akt 信号通路下游的 GSK-3β 途径调控的,直接参与结肠癌细胞的的多药耐药。

本课题也证实了通过改变 GSK-3β-Ser9 的磷酸化表达同样能够对 HCT-15 细胞的增殖起到调控作用。应用 GSK-3β 抑制剂 HY-19807 使 GSK3β 活性受到抑制后, HCT-15 细胞 G₁ 期细胞百分率明显减少, S 期细胞百分率显著增加,表明 GSK-3β 抑制剂可促使 HCT-15 细胞由 G₁ 期向 S 期转变,促进细胞增殖。而应用 PI3K/Akt 通路抑制剂 HY-13898 使 GSK-3β 激活后,出现 G₁ 期细胞百分率明显增加,同时 S 期细胞百分率显著减少,表明 PI3K/Akt 通路抑制剂可以阻止 HCT-15 细胞由 G₁ 期转变为 S 期,细胞增殖受到抑制。考虑 PI3K/Akt 通路可以通过 GSK-3β 途径调控 HCT-15 细胞的细胞周期,影响细胞的增殖,进而影响化疗药物在临床治疗中的效果。

直结肠癌的多药耐药机制上存在复杂性和多因素性, GSK-3β 如何调控 ABC 转运蛋白表达的机制尚不清楚。GSK-3β 作为激酶能够磷酸化多种底物, GSK-3β 是否具有直接磷酸化 ABC 转运蛋白的功能还需要进一步试验证实。本研究仅在细胞水平进行研究及实验,且细胞系单一,实验结果存在一定的局限性,后续研究可在多种细胞系间做比较,并收集临床标本开展组织学实验,从而更全面地研究 GSK-3β 在大肠癌多药耐药中的作用。如能明确 GSK-3β 与 ABC 转运蛋白之间存在直接相关性,则可将 GSK-3β 作为调控大肠癌细胞化疗敏感性的靶基因,临床上就可通过抑制大肠癌患者 GSK-3β-Ser9 位点的磷酸化表达来提高细胞的化疗敏感性。

[参 考 文 献]

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J].

- CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Chen WQ, Sun KX, Zheng RS, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(1):1-12.
- [3] Hino H, Kagawa H, Kinugasa Y, et al. Long-term survival with surgery for metachronous retroperitoneal lymph node and pancreatic metastases after curative resection of rectal cancer: a case report [J]. Surg Case Rep, 2016, 2(1):1-5.
- [4] Wu J, Lin N, Li F, et al. Induction of P-glycoprotein expression and activity by alkaloids: Implication for clinical drug-drug interactions [J]. Sci Rep, 2016, 6:25343.
- [5] Dharmapuri G, Doneti R, Philip GH, et al. Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1-5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways [J]. Leuk Res, 2015, 39(7):696-701.
- [6] Sui H, Pan SF, Feng Y, et al. ZuoJin Wan reverses P-gp-mediated drug-resistance by inhibiting activation of the PI3K/Akt/NF-kappa B pathway [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:279.
- [7] Yao J, Wei X, Lu Y. Chaetominine reduces MRP1-mediated drug resistance via inhibiting PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in K562/Adr human leukemia cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(4):867-873.
- [8] Ma HY, Cheng L, Hao KJ, et al. Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1 [J]. PLoS One, 2014, 9(1):e85113.
- [9] Chen M, Lu J, Wei W, et al. Effects of proton pump inhibitors on reversing multidrug resistance via down-regulating V-ATPases/PI3K/Akt/mTOR /HIF-1 α signaling pathway through TSC1/2 complex and Rheb in human gastric adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:6705-6722.
- [10] Chen FF, Lv X, Zhao QF, et al. Inhibitor of DNA binding 3 reverses cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells by regulating the PI3K/Akt pathway [J]. Oncol Lett, 2018, 16(2):1634-1640.
- [11] Hu Y, Guo R, Wei J, et al. Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2015, 6(12):e2020.
- [12] Dong JJ, Zhai B, Sun WH, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal transition induced multidrug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells [J]. PLoS One, 2017, 12(9):e0185088.
- [13] Zhang XW, Castanotto D, Nam S, et al. 6BIO enhances oligonucleotide activity in cells: a potential combinatorial anti-androgen receptor therapy in prostate cancer cells [J]. Mol Ther, 2017, 25(1):79-91.
- [14] Marchand B, Arsenault D, Raymond-Fleury A, et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibition induces prosurvival autophagic signals in human pancreatic cancer cells [J]. J Biol Chem, 2015, 290(9):5592-5605.
- [15] Huang GL, Shen DY, Cai CF, et al. β -Escin reverses multidrug resistance through inhibition of the GSK3 β / β -catenin pathway in cholangiocarcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(4):1148-1157.
- [16] Shen H, Li L, Yang S, et al. MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through PTEN/Akt/GSK3 β signaling pathway [J]. Gene, 2016, 593(1):84-90.

(责任编辑: 宋延君, 余小慧)