



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.10.012  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.10.012  
Chinese Journal of General Surgery, 2019, 28(10):1245-1252.

· 基础研究 ·

## 多种人结肠癌 5-氟尿嘧啶耐药细胞株的建立及耐药机制初步研究

刘蒙, 黄晓东, 韩峥, 朱庆曦, 谭洁, 刘维洁, 陈巍, 邹艳丽, 田霞

(武汉大学同仁医院 / 武汉市第三医院 消化内科, 湖北 武汉 430061)

### 摘要

**目的:** 通过建立多种 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 耐药的人结肠癌细胞株, 探讨耐药的结肠癌细胞的生物学特性与耐药机制。

**方法:** 选用人结肠癌 HT-29、LoVo 和 SW480 细胞, 通过高浓度 5-FU 反复接触结合药物浓度递增法建立耐药株 HT-29/5-FU、LoVo/5-FU 和 SW480/5-FU。不同浓度 5-FU 作用所建立的耐药细胞株及其亲本细胞后, 分别用 MTT 法、流式细胞术、qRT-PCR、Western blot 检测细胞对 5-FU 的敏感性、周期分布、耐药相关分子 [P-糖蛋白 (P-gp)、多药耐药相关蛋白 1 (MRP1)、ATP 结合盒超家族 G 成员 2 (ABCG2)] 及第十号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 与蛋白激酶 B (Akt) 的 mRNA 和蛋白的表达, 并用 Akt 活性检测试剂盒检测细胞 Akt 活性。

**结果:** 与各自的亲本细胞比较, 构建的 HT-29/5-FU、LoVo/5-FU 和 SW480/5-FU 对 5-FU 的 IC<sub>50</sub> 均明显升高 (均  $P < 0.05$ ), 耐药指数分别为 7.213、5.849 和 15.940。随着 5-FU 处理浓度的升高, 亲本细胞和耐药细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数量均明显增加 (均  $P < 0.05$ ), 但同一浓度 5-FU 处理下, 各耐药株 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数量均明显少于其对应亲本株 (均  $P < 0.05$ )。与各自的亲本细胞比较, 对应耐药株的 P-gp、MRP1、ABCG2、Akt 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高, 而 PTEN 表达均明显降低 (均  $P < 0.05$ ), 且 Akt 活性均明显提高 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** 成功建立了结肠癌 5-FU 耐药细胞株, 其耐药机制可能与 PTEN 下调所致的 PI3K/Akt 降低 PI3K/Akt 通路活化有关。

### 关键词

结肠肿瘤; 抗药性; 肿瘤; 氟尿嘧啶; PTEN 磷酸水解酶; 原癌基因蛋白质 c-akt

中图分类号: R735.3

## Establishment of several human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil and preliminary analysis of the mechanism for drug resistance

LIU Meng, HUANG Xiaodong, HAN Zheng, ZHU Qingxi, TAN Jie, LIU Weijie, CHEN Wei, ZOU Yanli, TIAN Xia

(Department of Gastroenterology, Tongren Hospital of Wuhan University/Wuhan Third Hospital, Wuhan 430061, China)

**基金项目:** 湖北省自然科学基金资助项目 (2018CFB725; 2019CFB749); 湖北省中央引导地方科技发展专项基金资助项目 (2019ZYYD067); 湖北省武汉市卫计委基金资助项目 (WX17B05)。

**收稿日期:** 2019-08-06; **修订日期:** 2019-09-23。

**作者简介:** 刘蒙, 武汉大学同仁医院 (武汉市第三医院) 主治医师, 主要从事消化道肿瘤耐药及信号通路方面的研究。

**通信作者:** 田霞, Email: xtian16@sina.cn

**Abstract**

**Objective:** Through establishing several types of 5-fluorouracil (5-FU) resistant human colon cancer cell lines, to investigate the biological characteristics of the 5-FU resistant colon cancer cells and the mechanism for drug resistance.

**Methods:** Using human colon cancer HT-29, LoVo and SW480 cells, the 5-FU resistant colon cancer cell lines HT-29/5-FU, LoVo/5-FU and SW480/5-FU were established by repeated exposure to excessive and increasing concentrations of 5-FU. In the established drug-resistant cell lines and their parent cells after treatment with different concentrations of 5-FU, the sensitivities to 5-FU, the cell cycle distributions, the mRNA and protein expressions of drug resistance-related molecules [P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), and ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2)] and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) and protein kinase B (Akt) were determined by MTT assay, flow cytometry, qRT-PCR and Western blot respectively, and the Akt activities were measured by Akt kinase assay kit.

**Results:** Compared with their corresponding parent cell line, the IC50 values to 5-FU in HT-29/5-FU, LoVo/5-FU and SW480/5-FU were all significantly increased (all  $P < 0.05$ ), with the drug resistance indexes of 7.213, 5.849 and 15.940, respectively. The numbers of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in both drug-resistant cell lines and their parent cell lines were increased with the increase of the treatment concentration of 5-FU (all  $P < 0.05$ ), but the number of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in each drug-resistant cell line was significantly less than that in their respective corresponding parent cell line under the same concentration of 5-FU (all  $P < 0.05$ ). Compared with their corresponding parent cell line, the mRNA and protein expressions of P-gp, MRP1, ABCG2 and Akt were significantly increased and the mRNA and protein expressions of PTEN were significantly decreased in all the drug-resistant cell lines (all  $P < 0.05$ ), and the Akt activities were significantly enhanced ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The 5-FU resistant colon cancer cell lines are successfully established. The mechanism for drug-resistance may probably be associated with the activation of PI3K/Akt pathway resulted from PTEN down-regulation.

**Key words**

Colonic Neoplasms; Drug Resistance, Neoplasm; Fluorouracil; PTEN Phosphohydrolase; Proto-Oncogene Proteins c-akt

**CLC number:** R735.3

结肠癌是一种世界范围内具有高发病率、高致死率的恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>, 且其发病率呈现迅速增长趋势<sup>[3-4]</sup>。常见的治疗方法有手术、放疗和化疗, 对于非转移性结肠癌, 手术切除治疗是最有效的治疗方法。但对于转移性结肠癌, 手术后存在复发和转移的风险, 而术后辅助化疗可以降低这些风险。5-氟尿嘧啶(5-FU)是结肠癌治疗中最常用的辅助化疗药物之一, 其可通过阻断胸腺嘧啶的合成从而影响DNA的合成, 并可诱导细胞周期阻滞和凋亡<sup>[5-6]</sup>。但5-FU对正常细胞具有毒性作用, 而癌细胞也会对其产生耐药性, 这是结肠癌治疗失败的主要原因<sup>[7]</sup>。因此, 研究细胞对5-FU产生耐药性的机制, 有助于提高结肠癌术后辅助化疗的成功率, 从而提高患者的生存率。建立耐药细胞株对于肿瘤耐药性机制的研究是十分必要的, 本研究利用大剂量5-FU反复接触结合药物浓度递增法诱导结肠癌细胞株HT-29、LoVo和SW480, 从而建立结肠癌耐药株HT-29/5-FU、LoVo/5-FU和SW480/5-FU, 并对原代细胞株和耐

药细胞株的生物学特性进行研究, 初步探讨结肠癌细胞对5-FU耐药的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

兔抗P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)多克隆抗体、兔抗多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)多克隆抗体、兔抗ATP结合盒超家族G成员2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)单克隆抗体、兔抗第十号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)多克隆抗体、兔抗蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)多克隆抗体、兔抗p-Akt单克隆抗体购自英国Abcam; PVDF转移膜、化学发光试剂购自美国Millipore; HRP标记的山羊抗兔IgG、PBS、PBST、MTT购自武汉Bioswamp; 兔抗GAPDH单克隆抗体购自美国

CST; AKT活性检测试剂盒购自美国Abnova。

## 1.2 方法

**1.2.1 建立耐药细胞株** 采用高浓度5-FU反复接触结合药物浓度递增法诱导结肠癌细胞建立耐药细胞株。取生长状况良好的HT-29、LoVo和SW480细胞,先用含10 μg/mL 5-FU的RPMI1640完全培养液在37 ℃ 5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中诱导细胞。当细胞开始死亡时,用PBS清洗2次后置于不含5-FU的培养液中培养。细胞恢复生长后进行传代处理,待细胞生长至对数期时再加入5-FU反复诱导。将药物浓度每次增加10 μg/mL,历时10个月获得在含40 μg/mL 5-FU的RPMI1640完全培养液正常生长的HT-29/5-FU、LoVo/5-FU和SW480/5-FU耐药细胞株。撤药两周后,可用于各耐药细胞株的生物学特性检测实验。

**1.2.2 细胞形态学观察** 倒置显微镜下,观察结肠癌亲本株HT-29、LoVo和SW480和耐药株HT-29/5-FU、LoVo/5-FU和SW480/5-FU的细胞形态。

**1.2.3 MTT检测药物敏感性** 取对数生长期细胞并制成单细胞悬液,接种于96孔板中,每孔100 μL,培养24 h,待细胞融合贴壁后,分别加入药物浓度为0、5、10、20、40、100 μg/mL 5-FU继续培养。分别于24、48、72 h,取出3个复孔,每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),继续培养3 h后弃孔内液体,加入150 μL二甲基亚砜,使用酶标仪测定各药物浓度处理组的OD<sub>490</sub>值。计算各时间段、各药物浓度处理的细胞抑制率,分析细胞半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)和耐药指数(resistant index, RI)。

**1.2.4 流式检测细胞周期** 取0、10、40 μg/mL 5-FU处理下对数生长的亲本株和耐药株,制备成单细胞悬液后收集1×10<sup>6</sup>个细胞,弃上清,PBS清洗两次后重悬细胞。-20 ℃预冷的70%乙醇固定细胞过夜。PBS清洗后,加入400 μL PI(50 μg/mL)和10 μL RNase A(10 mg/mL)混匀后,37 ℃避光孵育30 min。流式细胞仪根据细胞DNA含量不同对细胞计数,分析细胞周期情况。

**1.2.5 qRT-PCR检测mRNA表达水平** 取生长状况良好的亲本细胞和经过不同浓度5-FU(10、40 μg/mL)处理后的耐药细胞,根据TRIzol试剂盒说明书提取细胞总RNA,将其反转录为cDNA,然后进行PCR反应。反应条件:95 ℃变性5 s,56 ℃退火10s,72 ℃延伸30 s。引物序列见表1。

**1.2.6 Western blot检测蛋白表达水平** 取对数生长期细胞,加入裂解液,收集细胞总蛋白。以20 μL

上样量进行SDS-PAGE电泳,然后进行转膜、封闭。根据说明书稀释一抗(P-gp: 1:5 000; MRP1: 1:1 000; ABCG2: 1:1 000; PTEN: 1:1 000; AKT: 1:2 000; p-Akt: 1:1 000; GAPDH: 1:1 000)和二抗(经HRP标记的山羊抗兔IgG: 1:10 000),加入一抗室温孵育1 h, PBST清洗2次后再加入二抗,室温孵育1 h。PBST清洗后加入化学发光试剂,显影,读取条带灰度值。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

| 引物名称  | 序列                         | 扩增片段大小(bp) |
|-------|----------------------------|------------|
| P-gp  |                            |            |
| 正向    | TCA TGC TAT AAT GCG ACA    | 170        |
| 反向    | TAA ATC CTA CTA TAA ACC CA |            |
| MRP1  |                            |            |
| 正向    | CGT GGA ATA CCA GCA ACC    | 177        |
| 反向    | AAA ATC CCA AGG CAG TTT    |            |
| ABCG2 |                            |            |
| 正向    | GCC ATA GCA GCA GGT CAG    | 165        |
| 反向    | AGC CGT AAA TCC ATA TCG TG |            |
| PTEN  |                            |            |
| 正向    | ACC ATA ACC CAC CAC AG     | 125        |
| 反向    | TAC ACC AGT TCG TCC CT     |            |
| Akt   |                            |            |
| 正向    | CAA GGT GAT CCT GG TGA A   | 176        |
| 反向    | CGT GGG TCT GGA AAG AGT    |            |
| GAPDH |                            |            |
| 正向    | CCA CTC CTC CAC CTT TG     | 106        |
| 反向    | CAC CAC CCT GTT GCT GT     |            |

**1.2.7 Akt活性检测** 根据Akt活性检测试剂盒说明书操作,检测各组结肠癌细胞的Akt活性水平。

## 1.3 统计学处理

计量资料均以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,利用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析,多组之间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学观察

耐药株细胞形态与亲本株相比发生了较大的变化,亲本细胞(HT-29、LoVo、SW480)一般为圆形或梭形,细胞体积较小,紧密贴壁生长。耐药株(HT-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU)多为不规则形状,且部分细胞具有伪足,细胞体积变大,细胞间隙较大,分布较松散,细胞内颗粒增加(图1)。



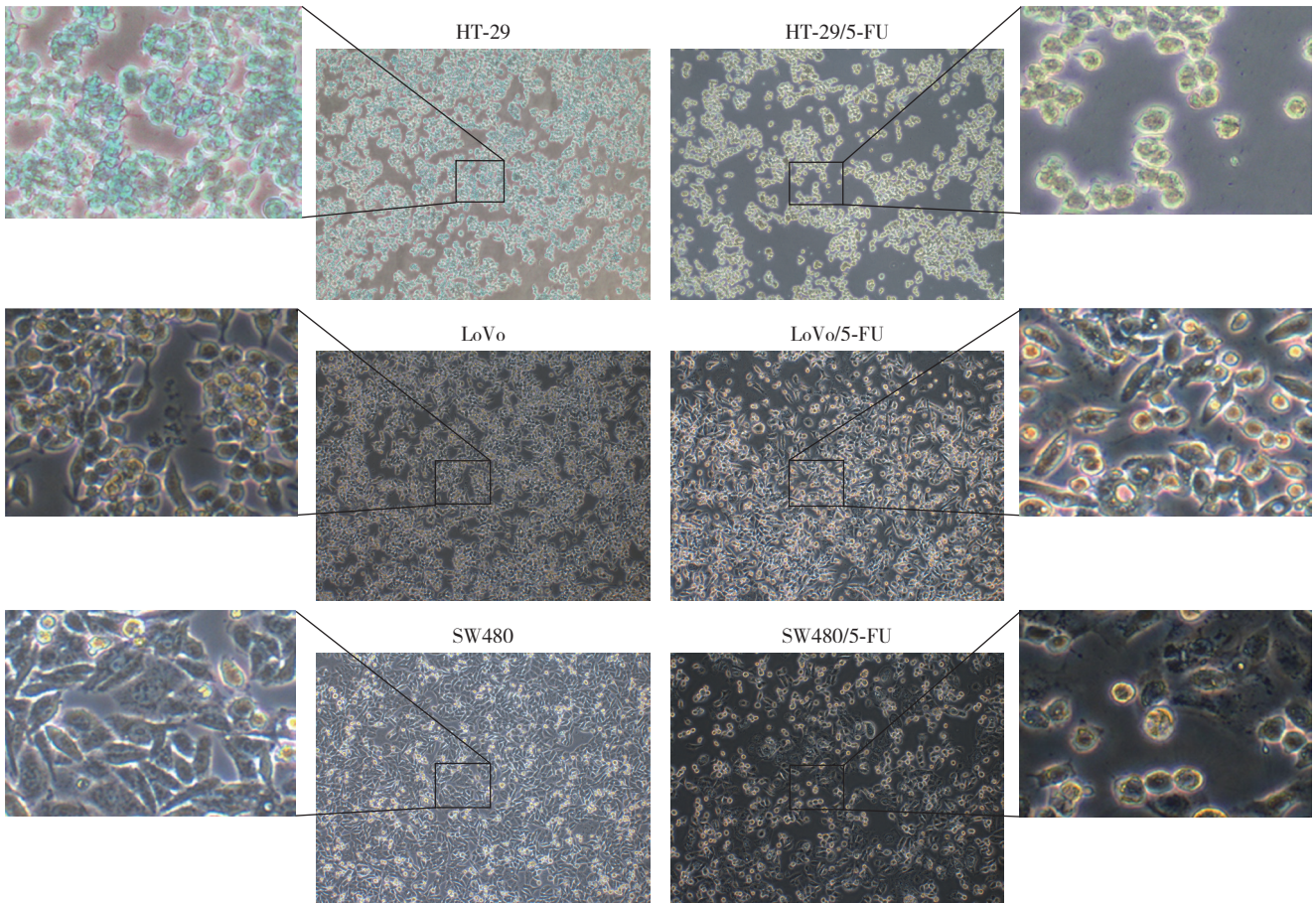


图 1 亲本细胞和耐药细胞形态观察 (×200)

Figure 1 Morphological observation of the parental cells and drug-resistant cells (×200)

## 2.2 药物敏感性检测

随着 5-FU 药物浓度的升高和培养时间的延长, 亲本株细胞生长抑制率逐渐升高。耐药株细胞生长抑制率也随着 5-FU 浓度的升高而增长, 但最终趋于稳定, 且随着培养时间的延长, 抑制率变化幅度不大。与亲本株相比, 耐药株在各时间段、5-FU 各浓度处理下的抑制率都低于亲本株 (图 2)。HT-29/5-FU 细胞  $IC_{50}$  为  $(1\ 051.000 \pm 22.76) \mu\text{g/mL}$ , HT-29 细胞  $IC_{50}$  为  $(145.713 \pm 12.39) \mu\text{g/mL}$ ,  $RI=7.213$ ; LoVo/5-FU 细胞  $IC_{50}$  为  $(689.995 \pm 17.77) \mu\text{g/mL}$ , LoVo 细胞  $IC_{50}$  为  $(117.969 \pm 10.14) \mu\text{g/mL}$ ,  $RI=5.849$ ; SW480/5-FU 细胞  $IC_{50}$  为  $(1\ 176.977 \pm 19.48) \mu\text{g/mL}$ , SW480 细胞  $IC_{50}$  为  $(73.84 \pm 6.33) \mu\text{g/mL}$ ,  $RI=15.940$ 。比较亲本细胞和耐药细胞的  $IC_{50}$ , 耐药细胞的  $IC_{50}$  明显高于亲本细胞 (均  $P<0.01$ )。

## 2.3 细胞周期分析

经过不同浓度的 5-FU (0、10、40  $\mu\text{g/mL}$ ) 处理后的亲本细胞 (HT-29、LoVo、SW480) 和

耐药细胞 (HT-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU) 随着 5-FU 浓度的升高, 处于  $G_0/G_1$  期的细胞数量明显增加 (均  $P<0.05$ ), 表明 5-FU 可以使结肠癌细胞阻滞在  $G_0/G_1$  期。与亲本细胞相比较, 同一浓度 5-FU (不包含 0  $\mu\text{g/mL}$ ) 处理下的耐药细胞处于  $G_0/G_1$  期的细胞数量明显减少 (均  $P<0.05$ ) (图 3)。

## 2.4 RT-PCR 检测耐药相关基因的 mRNA 表达水平

与亲本细胞 HT-29、LoVo、SW480 相比较, 经过 10、40  $\mu\text{g/mL}$  的 5-FU 处理过的耐药细胞的耐药相关基因 P-gp、MRP1、ABCG2、Akt 的 mRNA 的表达水平明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), PTEN 的 mRNA 表达水平明显降低 ( $P<0.01$ )。与 10  $\mu\text{g/mL}$  5-FU 处理过的耐药细胞 HT-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU 相比, 40  $\mu\text{g/mL}$  5-FU 处理过的耐药细胞 HT-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU 的 P-gp、MRP1、ABCG2、Akt mRNA 的表达水平明显升高 (均  $P<0.01$ ), PTEN 的 mRNA 表达水平明显降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ) (图 4)。

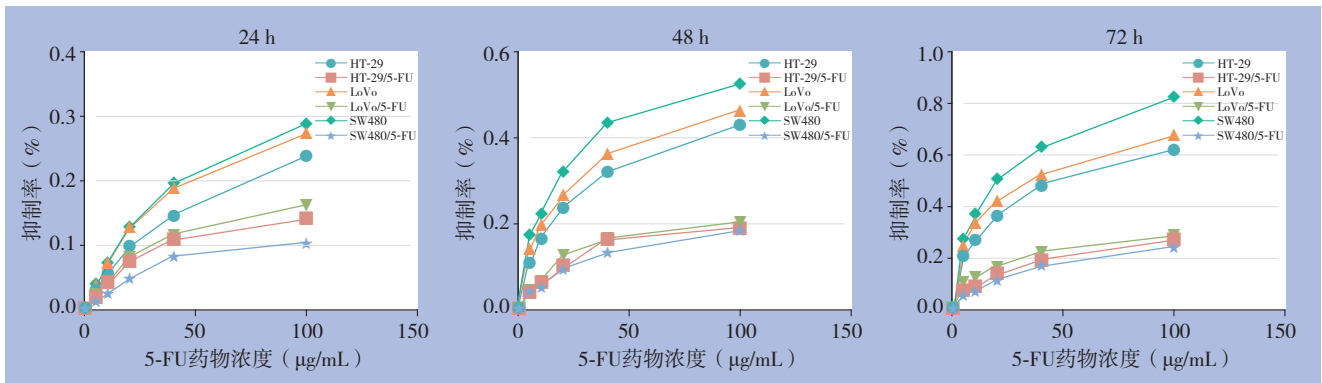


图 2 MTT 检测细胞活力及细胞生长抑制曲线

Figure 2 Cell viabilities measured by MIT and growth inhibition curves

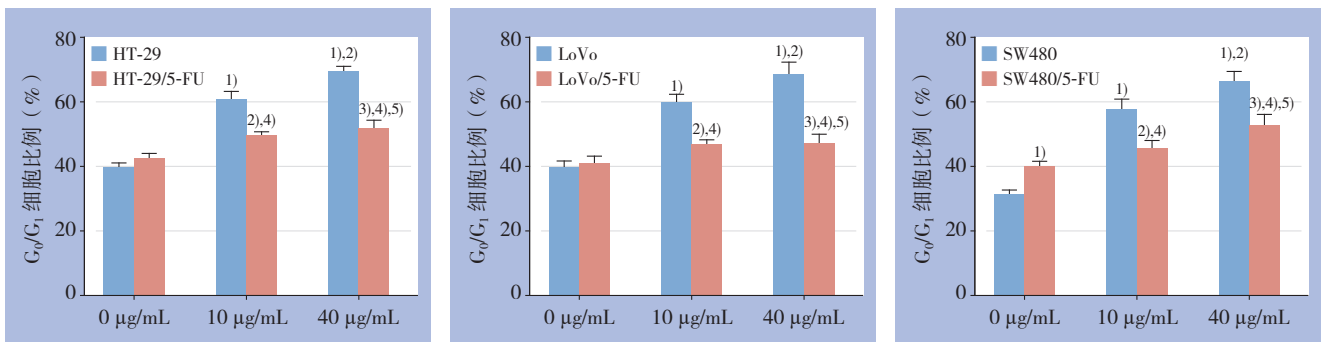


图 3 5-FU 处理后的亲本细胞和耐药细胞  $G_0/G_1$  期细胞比例 1) 与未处理的亲本细胞比较,  $P<0.05$ ; 2) 10  $\mu\text{g/mL}$  5-FU 处理的亲本细胞比较,  $P<0.05$ ; 3) 与 40  $\mu\text{g/mL}$  5-FU 处理的亲本细胞比较,  $P<0.05$ ; 4) 与未处理的耐药细胞比较,  $P<0.05$ ; 5) 与 10  $\mu\text{g/mL}$  5-FU 处理的耐药细胞比较,  $P<0.05$

Figure 3 Proportion of cells in  $G_0/G_1$  phase in parental cells and drug-resistant cells after 5-FU treatment 1)  $P<0.05$  vs. untreated parental cells; 2)  $P<0.05$  vs. parental cells treated with 10  $\mu\text{g/mL}$  5-FU; 3)  $P<0.05$  vs. parental cells treated with 40  $\mu\text{g/mL}$  5-FU; 4)  $P<0.05$  vs. untreated drug-resistant cells; 5)  $P<0.05$  vs. drug-resistant cells treated with 10  $\mu\text{g/mL}$  5-FU

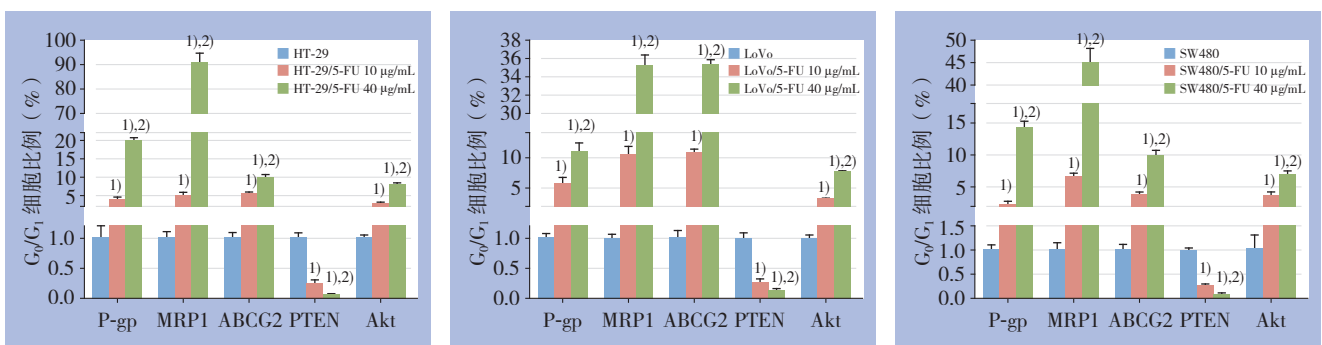


图 4 RT-PCR 检测细胞 P-gp、MRP1、ABCG2、AKT、PTEN 的 mRNA 表达 1) 与各自亲本细胞比较,  $P<0.01$ ; 2) 与 10  $\mu\text{g/mL}$  5-FU 处理的同一耐药株比较,  $P<0.01$

Figure 4 The mRNA expression levels of P-gp, MRP1, ABCG2, Akt and PTEN detected by qRT-PCR 1)  $P<0.01$  vs. corresponding parent cells; 2)  $P<0.01$  vs. same drug-resistant cell line treated with 10  $\mu\text{g/mL}$  5-FU

### 2.5 Western blot 检测耐药相关基因的蛋白表达水平

经过 10、40  $\mu\text{g/mL}$  的 5-FU 处理过的耐药细胞的 P-gp、MRP1、ABCG2、p-Akt 蛋白相对表达量明显高于亲本细胞 (均  $P<0.01$ ), PTEN 蛋白表达水平明显低于亲本细胞 (均  $P<0.01$ )。与 10  $\mu\text{g/mL}$

5-FU 处理过的耐药细胞 HT-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU 比较, 40  $\mu\text{g/mL}$  5-FU 处理过的耐药细胞 HT-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU 的 P-gp、MRP1、ABCG2、p-AKT 蛋白表达水平明显升高 (均  $P<0.01$ ), PTEN 蛋白表达水平明显降低 (均  $P<0.01$ ) (图 5)。

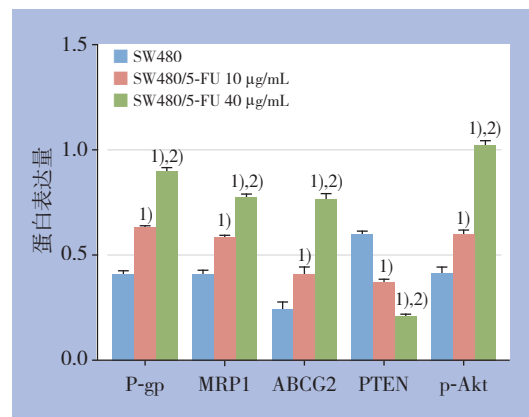
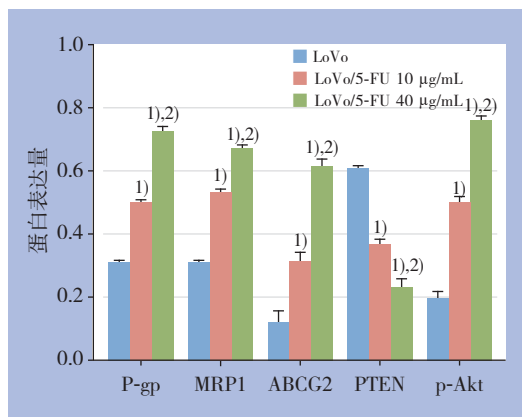
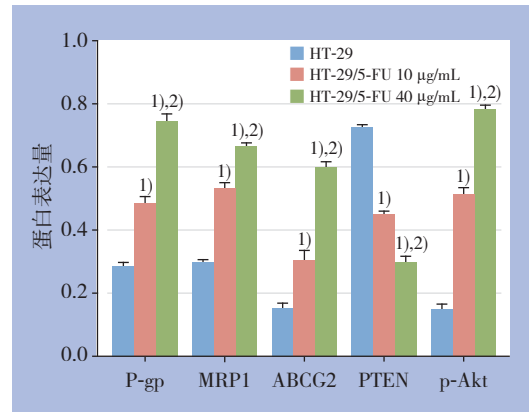
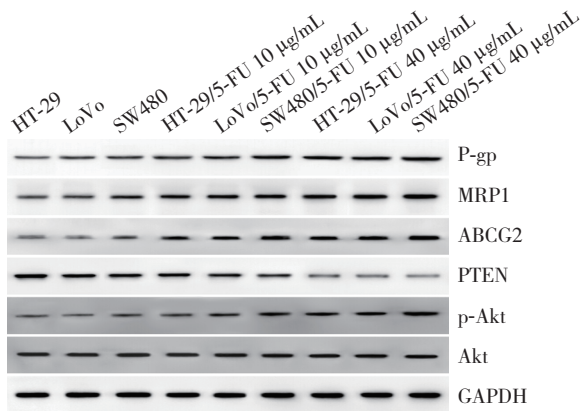


图 5 Western blot 检测细胞 P-gp、MRP1、ABCG2、p-Akt、PTEN 蛋白表达 1) 与各自亲本细胞比较,  $P < 0.01$ ; 2) 与 10 µg/mL 5-FU 处理的同一耐药株比较,  $P < 0.01$

Figure 5 The protein expressions of P-gp, MRP1, ABCG2, p-Akt and PTEN detected by Western blot 1)  $P < 0.01$  vs. corresponding parent cells; 2)  $P < 0.01$  vs. same drug-resistant cell line treated with 10 µg/mL 5-FU

### 2.6 Akt 活性水平比较

利用 Akt 活性检测试剂盒检测 Akt 活性, p-GSK-3 α 蛋白表达量的高低反映了细胞中 Akt 的活性水平, 结果显示, 与 HT-29、LoVo、SW480

相比, 10、40 µg/mL 5-FU 处理后的 HT-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU 的 p-GSK-3 α 蛋白相对表达量均明显升高, 且呈明显浓度依赖性 (均  $P < 0.05$ ) (图 6)。

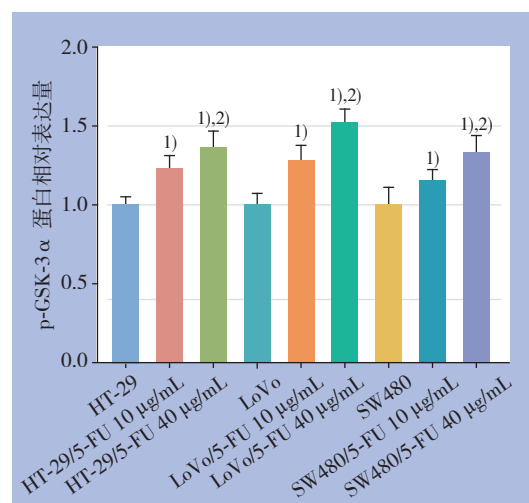
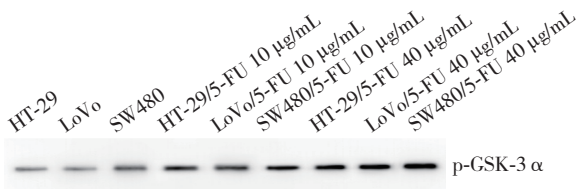


图 6 Akt 活性检测 1) 与各自亲本细胞比较,  $P < 0.01$ ; 2) 与 10 µg/mL 5-FU 处理的同一耐药株比较,  $P < 0.01$

Figure 6 Detection of Akt activities 1)  $P < 0.01$  vs. corresponding parent cells; 2)  $P < 0.01$  vs. same drug-resistant cell line treated with 10 µg/mL 5-FU



### 3 讨论

对于不能进行手术切除的转移性结肠癌患者,若无其他方法治疗,其平均预期寿命约为8个月,治疗转移性结肠癌的标准药物有5-FU、奥沙利铂和伊立替康等<sup>[8]</sup>。5-FU单独使用或与其他药物联合治疗可作为结肠癌术后辅助化疗形式<sup>[9]</sup>,5-FU是一种胸腺嘧啶合成酶(thymidylate synthetase, TS)的抑制剂,从而有抑制DNA合成的作用。而且,5-FU对RNA的合成也有一定的抑制作用<sup>[10]</sup>。由于5-FU是结肠癌术后辅助化疗的一种重要药物,所以研究其耐药机制对于结肠癌的治疗是十分必要的。建立5-FU耐药细胞模型是研究耐药机制十分必要的一步,邱婷婷等<sup>[11]</sup>通过低浓度5-FU剂量递增法建立了结肠癌耐药细胞株HT-29/5-FU,耐药细胞较亲本细胞生长缓慢,S期细胞增多,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞减少。而本次研究通过高浓度5-FU反复接触并结合药物浓度递增的方法建立了3种结肠癌细胞(HT-29、LoVo、SW480)的耐药株,检测发现耐药株的耐药性显著高于亲本株,且减缓了5-FU对细胞产生的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞作用。

5-FU化疗耐药机制包括原发性耐药和获得性耐药,原发性耐药与胸苷酸合成酶表达水平升高密切相关<sup>[12]</sup>,而获得性耐药机制并不十分明确。有学者<sup>[13]</sup>认为其可能的耐药机制是通过激活或过表达药物流失通路的相关蛋白,从而降低细胞内药物浓度,抑制治疗效果。而这些蛋白包括多药耐药蛋白(MDR1、P-gp、ABCB1)、多药耐药相关蛋白1(MRP1、ABCC1)、ABCG2,表达上调会抑制药物对癌细胞的毒性作用,增强细胞对药物的存活能力<sup>[13-15]</sup>。临床检测发现多药耐药蛋白在大肠癌组织中高表达,可能参与了大肠癌多药耐药的形成过程<sup>[16]</sup>。本研究结果显示:P-gp、MRP1和ABCG2在耐药株中的表达水平显著高于亲本株,而这些耐药蛋白的高表达导致耐药细胞的耐药性高于亲本细胞,而且高浓度的5-FU对耐药细胞的处理促进了耐药相关蛋白的表达。

PTEN是一种重要的抑癌基因,大量研究发现在多种恶性肿瘤疾病中,常常出现PTEN的突变和缺失<sup>[17-19]</sup>。PTEN的蛋白产物是一种特异性磷酸酶,在Akt信号通路中发挥着重要的作用,通过下调PI3K/Akt信号通路抑制肿瘤细胞的生长<sup>[20-21]</sup>。PI3K/AKT信号通路可减少细胞凋亡,促进细胞生长和增殖,通过靶向调控PTEN表达水平,降低

PI3K/Akt通路激活,可抑制结肠癌细胞增殖,诱导凋亡<sup>[22-23]</sup>。抑制PI3K/Akt信号通路可以增加结肠癌细胞对5-FU的敏感性,PI3K的协同作用可促进Akt磷酸化,而p-Akt可作为5-FU疗效的标志物<sup>[24]</sup>。研究<sup>[25]</sup>显示,下调PTEN,增加p-Akt水平可诱导药物敏感结肠癌细胞产生耐药特性。在本研究中,结肠癌耐药细胞中PTEN蛋白低表达降低了对PI3K/Akt信号通路的抑制作用,而PI3K/Akt的激活导致细胞对5-FU的耐药性增强。

综上所述,本次研究通过大剂量5-FU反复接触结合药物浓度递增的方法成功建立了耐5-FU的结肠癌细胞株H-29/5-FU、LoVo/5-FU、SW480/5-FU。并对亲本细胞和耐药细胞的生物学特性进行研究,推测PTEN/PI3K/Akt信号通路可能参与了结肠癌细胞对5-FU的耐药机制。耐药株的建立及耐药机制的研究将对今后结肠癌的临床治疗和耐药研究提供重要的理论基础。

### 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2013, 63(1):11-30. doi: 10.3322/caac.21166.
- [2] DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2014, 64(4):252-271. doi: 10.3322/caac.21235.
- [3] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4):271-289. doi: 10.3322/caac.21349.
- [4] Zhu J, Tan Z, Hollis-Hansen K, et al. Epidemiological Trends in Colorectal Cancer in China: An Ecological Study[J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(1):235-243. doi: 10.1007/s10620-016-4362-4.
- [5] Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(5):330-338. doi: 10.1038/nrc1074.
- [6] Fu Q, Cheng J, Zhang J, et al. miR-20b reduces 5-FU resistance by suppressing the ADAM9/EGFR signaling pathway in colon cancer[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1):123-130. doi: 10.3892/or.2016.5259.
- [7] Gao Y, Xiao X, Zhang C, et al. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF-κB/iNOS signaling pathways[J]. *J Pineal Res*, 2017, 62(2). doi: 10.1111/jpi.12380.
- [8] Attoub S, Arafat K, Khalaf T, et al. Fronodoside A Enhances the Anti-Cancer Effects of Oxaliplatin and 5-Fluorouracil on Colon Cancer Cells[J]. *Nutrients*, 2018, 10(5). pii: E560. doi: 10.3390/

- nu10050560.
- [9] Poulsen LØ, Qvortrup C, Pfeiffer P, et al. Review on adjuvant chemotherapy for rectal cancer - why do treatment guidelines differ so much?[J]. *Acta Oncol*, 2015, 54(4):437-446. doi: 10.3109/0284186X.2014.993768.
- [10] Scherf U, Ross DT, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(3):236-244. doi: 10.1038/73439.
- [11] 邱婷婷, 项晓军, 雷婉, 等. 耐5-氟尿嘧啶的人结肠癌HT-29/5-FU细胞株的建立及其生物学特性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(3):328-332.
- Qiu TT, Xiang XJ, Lei W, et al. Establishment and biological characterization of 5-fluorouracil-resistant human colon cancer HT-29/5-FU cell line[J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(3):328-332.
- [12] 丁欣, 陈国江. 5-氟尿嘧啶化疗耐药的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44(6):491-494. doi:10.13220/j.cnki.jipr.2017.06.004.
- Ding X, Chen GJ. Chemotherapy resistance of 5-fluorouracil: research advances[J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2017, 44(6):491-494. doi:10.13220/j.cnki.jipr.2017.06.004.
- [13] Zhang C, Ma Q, Shi Y, et al. A novel 5-fluorouracil-resistant human esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca-109/5-FU with significant drug resistance-related characteristics[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(5):2942-2954. doi: 10.3892/or.2017.5539.
- [14] Cai B, Miao Y, Liu Y, et al. Nuclear multidrug-resistance related protein 1 contributes to multidrug-resistance of mucoepidermoid carcinoma mainly via regulating multidrug-resistance protein 1: a human mucoepidermoid carcinoma cells model and Spearman's rank correlation analysis[J]. *PLoS One*, 2011, 8(8):e69611. doi: 10.1371/journal.pone.0069611.
- [15] Sun Y, Gu M, Zhu L, et al. Gemcitabine upregulates ABCG2/BCRP and modulates the intracellular pharmacokinetic profiles of bioluminescence in pancreatic cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2016, 27(3):183-191. doi: 10.1097/CAD.0000000000000315.
- [16] 孔易, 胡占峰, 徐树雷, 等. 多药耐药相关蛋白和肺耐药蛋白在大肠癌中的表达及其意义[J]. *广东医学*, 2014, 35(2):255-257.
- Kong Y, Hu ZF, Xu SL, et al. Expressions of multidrug resistance-associated protein and lung resistance-related protein in colon cancer and their significance[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2014, 35(2):255-257.
- [17] Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(12):3577-3584. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1609.
- [18] Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis P A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(4):289-301. doi: 10.1038/nrc3037.
- [19] 耿连婷, 李春晖, 单小松, 等. PTEN-Long在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *癌症进展*, 2019, 17(11):1241-1244. doi:10.11877/j.issn.1672-1535.2019.17.11.01.
- Geng LT, Li CH, Shan XS, et al. Research progress of PTEN-Long cancer therapy[J]. *Oncology Progress*, 2019, 17(11):1241-1244. doi:10.11877/j.issn.1672-1535.2019.17.11.01.
- [20] Waniczek D, Śnietura M, Lorenc Z, et al. Assessment of PI3K/AKT/PTEN signaling pathway activity in colorectal cancer using quantum dot-conjugated antibodies[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1):1236-1240. doi: 10.3892/ol.2017.7392.
- [21] Jing X, Cheng W, Wang S, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1):472-478. doi: 10.3892/or.2015.4384.
- [22] Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, et al. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1855(1):104-121. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.09.008.
- [23] Qin Y, Huo Z, Song X, et al. mir106a regulates cell proliferation and apoptosis of colon cancer cells through targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3):3197-3201. doi: 10.3892/ol.2017.7715.
- [24] 温彦斐, 王俊, 毕经旺. PI3K/AKT信号通路与结肠癌细胞5-氟尿嘧啶耐药机制的关系[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(6):815-818. doi:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.024.
- Wen YF, Wang J, Bi JW. The relationship of PI3K/AKT pathway with 5-fluorouracil drug-resistance in colon cancer cells[J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2015, 22(6):815-818. doi:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.024.
- [25] Zhang S, Zhang Y, Qu J, et al. Exosomes promote cetuximab resistance via the PTEN/Akt pathway in colon cancer cells[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 51(1):e6472. doi: 10.1590/1414-431X20176472.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 刘蒙, 黄晓东, 韩峥, 等. 多种人结肠癌5-氟尿嘧啶耐药细胞株的建立及耐药机制初步研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(10):1245-1252. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.10.012

Cite this article as: Liu M, Huang XD, Han Z, et al. Establishment of several human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil and preliminary analysis of the mechanism for drug resistance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2019, 28(10):1245-1252. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.10.012