本文引用:闫登科,陶丽,郝洁,等. 内质网应激对肝癌细胞硼替佐米耐药性的影响[J]. 新乡医学院学报,2021,38(2):106-111. DOI:10.7683/xxyxyxb.2021.02.002.

【基础研究】

内质网应激对肝癌细胞硼替佐米耐药性的影响

闫登科[1], 陶 丽[2], 郝 洁[3], 黄瑞娜[1], 钟加滕[4]

(1. 平顶山第一人民医院消化内二科,河南 平顶山 467000;2. 郑州大学附属肿瘤医院消化内科,河南 郑州 450000;3. 新乡医学院第一附属医院感染疾病科,河南 卫辉 453100;4. 新乡医学院基础医学院病理学教研室,河南 新乡 453003)

摘要: 目的 探讨内质网应激对肝癌细胞硼替佐米耐药性的影响。**方法** 将对数生长期 HepG2 和 HuH7 细胞分别分为 0、5、10、15、20、30 nmol·L^{-1}硼替佐米组,采用细胞计数试剂盒(CCK-8)检测硼替佐米干预 24 h 时各组细胞存活率及干预 24、48、72、96 h 时细胞增殖率。将对数生长期 HepG2 和 HuH7 细胞分别分为 0、10、15 nmol·L^{-1}硼替佐米组,采用 Western blot 法检测 HepG2 和 HuH7 细胞中凋亡相关蛋白切割片段的半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)和内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、磷酸化真核翻译起始因子 2α(p-eIF-2α)、激活转录因子 4 (ATF4)的表达。构建对硼替佐米耐药的 HepG2 细胞株(HepG2/Bort 细胞),通过抑制生长曲线计算细胞的半抑制浓度(IC_{50}),并计算细胞耐药指数(RI)。将 HepG2/Bort 细胞分为对照组、硼替佐米组(给予 15 nmol·L^{-1}硼替佐米干预)、硼替佐米 +4-苯基丁酸(4-PBA)组(给予15 nmol·L^{-1}硼替佐米和 8 mmol·L^{-1} 4-PBA 干预)、硼替佐米 + 牛磺脱氧胆酸(TUDCA)组(给予 15 nmol·L^{-1}硼替佐米和 1 mmol·L^{-1} TUDCA 干预),药物作用 24 h 后,采用 CCK-8 法检测 HepG2/Bort 细胞存活率,采用 Western blot 法检测 HepG2/Bort 细胞中凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 和内质网应激相关蛋白 GRP78、p-eIF-2α、ATF4 的表达。**结果** 硼替佐米干预 24 h 后,5、10、15、20、30 nmol·L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞存活率均显著低于 0 nmol·L^{-1}硼替佐米组($P<0.05$)。硼替佐米干预 0、24 h 时,5 nmol·L^{-1}硼替佐米组与 0 nmol·L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞增殖率比较差异无统计学意义($P>0.05$);硼替佐米干预 48、72、96 h时,5 nmol·L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞增殖率显著低于 0 nmol·L^{-1}硼替佐米组($P<0.05$)。干预 24 h 后,10、15 nmol·L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞内 cleaved caspase-3 表达显著高于 0 nmol·L^{-1}硼替佐米组($P<0.05$)。HepG2/Bort 细胞和 HepG2 细胞对硼替佐米的 IC_{50}分别为 122.36、13.23 nmol·L^{-1},HepG2/Bort 细胞对硼替佐米的 RI 为 9.25。HepG2/Bort 细胞中 GRP78、p-eIF-2α、ATF4 蛋白表达量显著高于 HepG2 细胞($P<0.05$)。硼替佐米组 HepG2/Bort 细胞存活率显著低于对照组($P<0.05$),硼替佐米 +4-PBA 组和硼替佐米 + TUDCA 组 HepG2/Bort 细胞存活率显著低于硼替佐米组($P<0.05$)。硼替佐米组 HepG2/Bort 细胞中 cleaved caspase-3 相对表达量显著高于对照组($P<0.05$),硼替佐米 +4-PBA 组和硼替佐米 + TUDCA 组 HepG2/Bort 细胞中 cleaved caspase-3 相对表达量显著高于硼替佐米组($P<0.05$)。**结论** 硼替佐米可以抑制肝癌细胞增殖,并诱导其凋亡;内质网应激抑制剂可以提高 HepG2/Bort 细胞对硼替佐米的敏感性,本研究为临床克服肝癌耐药提供了新的治疗策略。

关键词: 肝癌;内质网应激;硼替佐米;细胞增殖;细胞凋亡;耐药性

中图分类号: R735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2021)02-0106-06

Effect of endoplasmic reticulum stress on the resistance of hepatocellular carcinoma cells to bortezomib

YAN Dengke[1], TAO Li[2], HAO Jie[3], HUANG Ruina[1], ZHONG Jiateng[4]

(1. *Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Pingdingshan, Pingdingshan* 467000, *Henan Province, China*; 2. *Department of Gastroenterology, Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou* 450000, *Henan Province, China*; 3. *Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui* 453100, *Henan Province, China*; 4. *Department of Pathology, Basic Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang* 453003, *Henan Province, China*)

Abstract: Objective To investigate the effect of endoplasmic reticulum stress on the resistance of hepatocellular

DOI:10.7683/xxyxyxb.2021.02.002

收稿日期:2020-03-03

基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(编号:LHGJ20190452)。

作者简介:闫登科(1978-),男,山西侯马人,硕士,副主任医师,研究方向:消化系统恶性肿瘤的发病机制。

通信作者:钟加滕(1983-),男,山东滕州人,博士,副教授,研究方向:肿瘤靶向治疗和肿瘤代谢;E-mail:jtzhong@xxmu.edu.cn。

carcinoma cells to bortezomib. **Methods** The HepG2 and Huh7 cells in logarithmic growth phase were divided into 0,5,10,15,20 and 30 nmol · L^{-1} bortezomib groups. The cell survival rate after 24 hours of bortezomib intervention and the cell proliferation rate after 24,48,72 and 96 hours of bortezomib intervention were detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The HepG2 and Huh7 cells in logarithmic growth phase were divided into 0,10 and 15 nmol · L^{-1} bortezomib groups. The expressions of apoptosis related protein cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase (cleaved caspase-3) and endoplasmic reticulum stress related proteins glucose regulated protein 78 (GRP78), phosphorylated eukaryotic initiation factor-2α (p-eIF-2α), activating transcription factor 4 (ATF4) in HepG2 and Huh7 cells were detected by Western blot method. The bortezomib resistant HepG2 cell line (HepG2/Bort cells) were constructed, the 50% inhibiting concentration (IC_{50}) and the resistance index (RI) were calculated by inhibition growth curve. The HepG2/Bort cells were divided into control group, bortezomib group (The cells were intervened with 15 nmol · L^{-1} bortezomib), bortezomib + 4-phenylbutyric acid(4-PBA) group (The cells were intervened with 15 nmol · L^{-1} bortezomib and 8 mmol · L^{-1} 4-PBA), bortezomib + tauroursodeoxy cholic acid(TUDCA) group (The cells were intervened with 15 nmol · L^{-1} bortezomib and 1 mmol · L^{-1} TUDCA). After 24 hours of drug treatment, the survival rate of HepG2/Bort cells was detected by CCK-8, and the expression of apoptosis related protein cleaved caspase-3 and endoplasmic reticulum stress-related protein GRP78, p-eIF-2α and ATF4 in HepG2/Bort cells were detected by Western blot method. **Results** The survival rates of HepG2 and Huh7 cells in 5,10,15,20 and 30 nmol · L^{-1} bortezomib group were significantly lower than those in 0 nmol · L^{-1} bortezomib group after 24 hours of bortezomib intervention ($P < 0.05$). There was no significant difference in the proliferation rate of HepG2 and Huh7 cells between 0 nmol · L^{-1} bortezomib group and 5 nmol · L^{-1} bortezomib group after 0 and 24 hours of bortezomib intervention ($P > 0.05$). After 48,72 and 96 hours of bortezomib intervention, the proliferation rates of HepG2 and Huh7 cells in 5 nmol · L^{-1} bortezomib group were significantly lower than those in 0 nmol · L^{-1} bortezomib group ($P < 0.05$). After 24 hours of intervention, the expression of cleaved caspase-3 in HepG2 and Huh7 cells in 10 and 15 nmol · L^{-1} bortezomib groups was significantly higher than that in 0 nmol · L^{-1} bortezomib group ($P < 0.05$). The IC_{50} of HepG2/Bort cells and HepG2 cells to bortezomib was 122.36 and 13.23 nmol · L^{-1}, respectively, and the RI of HepG2/Bort cells to bortezomib was 9.25. The expressions of GRP78, p-eIF-2α and ATF4 protein in HepG2/Bort cells were significantly higher than those in HepG2 cells ($P < 0.05$). The survival rate of HepG2/Bort cells in the bortezomib group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), and the survival rate of HepG2/Bort cells in the bortezomib + 4-PBA group and bortezomib + TUDCA group was significantly lower than that in the bortezomib group ($P < 0.05$). The relative expression of cleaved caspase-3 in HepG2/Bort cells in the bortezomib group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the relative expression of cleaved caspase-3 in HepG2/Bort cells in the bortezomib + 4-PBA group and bortezomib + TUDCA group was significantly higher than that in the bortezomib group ($P < 0.05$). **Conclusion** Bortezomib can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of hepatoma carcinoma cells. Endoplasmic reticulum stress inhibitor can improve the sensitivity of HepG2/Bort cells to bortezomib. This study provides a new treatment strategy for overcoming drug resistance of liver cancer.

Key words: hepatocellular carcinoma; endoplasmic reticulum stress; bortezomib; cell proliferation; cell apoptosis; drug tolerance

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一,严重危害人们的身体健康,目前,HCC 发病率和病死率呈上升趋势,其主要治疗手段为手术治疗、放射治疗和化学治疗。随着化学治疗药物的广泛应用,HCC 对药物呈现出明显的耐受,新的治疗方案和联合用药策略的提出迫在眉睫。细胞内泛素蛋白酶体降解途径的异常与肿瘤等多种疾病的发生发展密切相关。基于此,研究者开发了多种靶向蛋白酶体的药物,其中对硼替佐米的研究最为广泛,其也是第 1 个应用于临床研究的蛋白酶体抑制剂。目前临床上硼替佐米主要应用于治疗难治性、多发性骨髓瘤和套细胞淋巴瘤,其对肝癌细胞生物学行为的影响以及可能的作用机制尚不清楚。内质网是一个动态、特化、拉长的膜状网络小管和扁平圆盘,其以囊状连接横跨细胞质的大部分区域和分支管[1]。内质网参与细胞的多种生物学过程,包括生物合成和维持细胞内 Ca^{2+} 稳态等[1]。同时,内质网可以与细胞内其他细胞器协调作用,感知细胞内外各种因子的作用,维持细胞内稳态[2-3]。研究显示,内质网调控着细胞内蛋白质的折叠与加工,包括加速适当的蛋白质折叠、未折叠蛋白反应的激活和通过内质网相关降解或自噬的蛋白质清除过程[4],当出现大量的错误折叠或未折叠蛋白在内质网内聚集会导致内质网应激[5]。近年来研究显示,内质网应激在肿瘤的发生和发展过程中发挥了重要作用,特别是在抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡的过

程中[6-7]。内质网应激往往在癌症的发生和发展过程中发挥着双向调控作用,既可以引起内质网应激保护机制,也可以通过内质网应激相关凋亡信号通路诱导细胞凋亡的发生[8]。本研究将内质网应激引入硼替佐米的作用机制研究中,通过体外实验明确靶向内质网应激对肝癌细胞的硼替佐米耐受性的影响,为临床克服肿瘤耐药和寻找可能的联合用药策略提供一定的方向和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、仪器与试剂 人肝癌 HepG2 和 HuH7 细胞购自中国科学院细胞库;细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)购自南京碧云天生物试剂有限公司,Western blot 电泳套装购自美国 Bio-Rad 公司;胎牛血清、达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)购自美国 Gibco 公司,硼替佐米、内质网抑制剂 4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid,4-PBA)和牛磺脱氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid,TUDCA)购自美国 MCE 公司,切割片段的半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase,cleaved caspase-3)、葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78,GRP78)、磷酸化真核翻译起始因子 2α(phosphorylated eukaryotic initiation factor-2α,p-eIF-2α)、激活转录因子 4(activating transcription factor 4,ATF4)、Tubulin 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 细胞培养 取 HepG2 和 HuH7 细胞加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO_2 细胞培养箱内培养,细胞生长至铺满细胞培养瓶底部面积的 80% 时利用胰蛋白酶消化后传代,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.3 CCK-8 检测 HepG2 和 HuH7 细胞的存活率及增殖率 取对数生长期 HepG2 和 HuH7 细胞,弃除原培养液后应用胰蛋白酶消化处理,细胞吹匀后进行细胞计数,将细胞接种于 96 孔板(细胞存活率检测按照每孔 1.2×10^4 个细胞,细胞增殖率检测按照每孔 5.0×10^3 个细胞),铺板混匀后培养过夜,第 2 天细胞完全贴壁后进行实验。细胞存活率检测实验将细胞分为 0、5、10、15、20、30 nmol · L^{-1} 硼替佐米组,检测药物干预 24 h 时细胞存活率;细胞增殖率检测实验将细胞分为 0、5 nmol · L^{-1} 硼替佐米组,检测药物干预 0.24、48、72、96 h 时细胞增殖率;药物作用完成后,在避光条件下每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,加入液面以下,轻轻拍打培养板侧壁,混匀 CCK-8,置于 37 ℃孵育箱中孵育 30 min 后取出 96 孔板,使用酶联免疫检测仪检测波长 450 nm 处各孔吸光度值,每组设 6 个重复孔,取均值。

1.4 Western blot 检测 HepG2 和 HuH7 细胞中凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 的表达 取对数生长期 HepG2 和 HuH7 细胞,将细胞随机分为 0、10、15 nmol · L^{-1} 硼替佐米组;药物作用完成后磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)清洗细胞 2 次,每组给予 300 μL 放射免疫沉淀试验细胞裂解液(含体积分数 1% 苯甲基磺酰氟、1∶50 蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂)冰上裂解 5 min。使用细胞刮刮下培养皿内全部细胞,移至提前预冷的 EP 管中,冰上再次裂解 20 min。将 EP 管放入离心机,12 000 r · min^{-1} 离心 15 min,离心后吸取上清进行蛋白浓度测定(二喹啉甲酸法)。根据蛋白浓度计算上样体积,蛋白中加入加样缓冲液,95 ℃煮蛋白 10 min使其变性后进行丙烯酰胺垂直电泳,电泳结束后将胶上的蛋白转移至聚偏氟乙烯膜上,转膜结束放入 50 g · L^{-1} 脱脂奶粉中封闭 1 h,加入一抗,室温孵育 30 min 后 4 ℃低温孵育过夜,第 2 天应用含 Tween-20 的 PBS 洗膜 3 次,加入二抗,温孵育 1 h,应用含 Tween-20 的 PBS 洗膜 3 次,发光显色,拍照,应用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.5 硼替佐米耐药的 HepG2 细胞株构建 取生长状态优良的对数生长期 HepG2 细胞,加入 2 mL PBS 缓慢清洗 2 遍,加入 1 mL 胰蛋白酶进行消化,消化完全后加入 4 mL DMEM 培养液中和,混匀,移至离心管内,2 000 r · min^{-1} 离心 2 min,移除上清液,加入适当的培养液制成细胞悬液,首先加入浓度为 5 nmol · L^{-1} 的硼替佐米,连续作用 48 h,移除含有硼替佐米的培养液,加入不含药物的培养液培养,细胞长至铺满皿面积的 90% 时进行消化传代,再次加入含有硼替佐米的培养液,药物浓度先后使用 10、50、100、500、1 000 nmol · L^{-1} 与 HepG2 细胞共培养,HepG2 从 5 nmol · L^{-1} 逐渐增加到 1 000 nmol · L^{-1},从而建立抗硼替佐米细胞,命名为 HepG2/Bort。为了排除选择性硼替佐米浓度的干扰,在实验开始前,将耐硼替佐米细胞在无硼替佐米培养基中培养至少 72 h。细胞耐药后,进入下一浓度筛选,最后使 HepG2 细胞能够耐受 1 000 nmol · L^{-1}。采用 CCK8 实验,通过抑制生长曲线计算细胞的半抑制浓度(50% inhibiting concentration,IC_{50}),并计算细胞耐药指数(resistance index,RI)。RI = HepG2

细胞 IC_{50}/HepG2/Bort 细胞 IC_{50}。

1.6　CCK-8 法和 Western blot 法检测 HepG2/Bort 细胞存活率和内质网应激相关蛋白的表达　将 HepG2/Bort 细胞分为对照组、硼替佐米组(给予 15 nmol · L^{-1}硼替佐米干预)、硼替佐米 + 4-PBA 组(给予 15 nmol · L^{-1}硼替佐米和 8 mmol · L^{-1} 4-PBA 干预)、硼替佐米 + TUDCA 组(给予 15 nmol · L^{-1}硼替佐米和 1 mmol · L^{-1} TUDCA 干预),药物作用 24 h后,应用 CCK-8 法检测 HepG2/Bort 细胞存活率,采用 Western blot 法检测 HepG2/Bort 细胞中凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 和内质网应激相关蛋白 GRP78、p-eIF-2α、ATF4 的表达。

1.7　统计学处理　应用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　硼替佐米对肝癌细胞存活率的影响　结果见表 1。硼替佐米干预 24 h 后,5、10、15、20、30 nmol · L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞存活率均显著低于 0 nmol · L^{-1}硼替佐米组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1　硼替佐米对肝癌细胞存活率的影响

Tab. 1　Effect of bortezomib on the survival rate of hepatoma carcinoma cells　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HepG2 存活率	HuH7 存活率
0 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	1.102 ± 0.079	0.953 ± 0.041
5 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.785 ± 0.078[a]	0.927 ± 0.006[a]
10 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.629 ± 0.030[a]	0.726 ± 0.010[a]
15 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.520 ± 0.008[a]	0.550 ± 0.018[a]
20 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.319 ± 0.010[a]	0.384 ± 0.010[a]
30 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.205 ± 0.009[a]	0.184 ± 0.012[a]

注:与对照组比较[a]$P < 0.05$。

2.2　硼替佐米对肝癌细胞增殖率的影响　结果见表 2 和表 3。硼替佐米干预 0、24 h 时,5 nmol · L^{-1}硼替佐米组与 0 nmol · L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞增殖率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);硼替佐米干预 48、72、96 h 时,5 nmol · L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞增殖率显著低于 0 nmol · L^{-1}硼替佐米组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2　硼替佐米对 HepG2 细胞增殖率的影响

Tab. 2　Effect of bortezomib on the proliferation rate of HepG2 cells　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HepG2 细胞增殖率				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.422 ± 0.005	0.723 ± 0.053	1.290 ± 0.080	1.591 ± 0.085	1.890 ± 0.096
5 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.419 ± 0.050	0.510 ± 0.052	0.669 ± 0.061[a]	0.869 ± 0.063[a]	1.065 ± 0.093[a]

注:与对照组比较[a]$P < 0.05$。

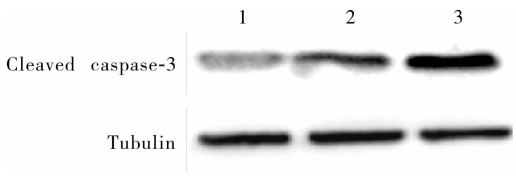
表 3　硼替佐米对 HuH7 细胞增殖率的影响

Tab. 3　Effect of bortezomib on the proliferation rate of HuH7 cells　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HuH7 细胞增殖率				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.329 ± 0.006	0.695 ± 0.058	1.085 ± 0.089	1.757 ± 0.083	2.097 ± 0.070
5 nmol · L^{-1}硼替佐米组	6	0.327 ± 0.009	0.537 ± 0.044	0.622 ± 0.046[a]	0.824 ± 0.096[a]	1.077 ± 0.075[a]

注:与对照组比较[a]$P < 0.05$。

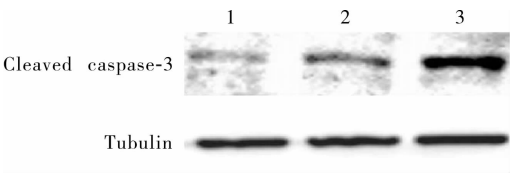
2.3　硼替佐米对肝癌细胞凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 表达的影响　结果见图 1、图 2 和表 4。10、15 nmol · L^{-1}硼替佐米组 HepG2 和 HuH7 细胞中 cleaved caspase-3 表达显著高于 0 nmol · L^{-1}硼替佐米组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



1:0 nmol · L^{-1}硼替佐米组;2:10 nmol · L^{-1}硼替佐米组;3:15 nmol · L^{-1}硼替佐米组。

图 1　HepG2 细胞中 cleaved caspase-3 的表达(Western blot)

Fig. 1　Expression of cleaved caspase-3 in HepG2 cells (Western blot)



1:0 nmol · L^{-1}硼替佐米组;2:10 nmol · L^{-1}硼替佐米组;3:15 nmol · L^{-1}硼替佐米组。

图 2　HuH7 细胞中 cleaved caspase-3 的表达(Western blot)

Fig. 2　Expression of cleaved caspase-3 in HuH7 cells (Western blot)

表 4 3 组 HepG2 和 HuH7 细胞中 cleaved caspase-3 表达比较

Tab. 4 Comparison of the expression of cleaved caspase-3 in HepG2 and HuH7 cells among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cleaved caspase-3	
		HepG2 细胞	HuH7 细胞
0 nmol · L^{-1}硼替佐米组	3	0.233 ± 0.046	0.086 ± 0.039
10 nmol · L^{-1}硼替佐米组	3	0.543 ± 0.069[a]	0.310 ± 0.059[a]
15 nmol · L^{-1}硼替佐米组	3	1.306 ± 0.215[a]	1.213 ± 0.113[a]

注:与对照组比较[a]$P < 0.05$。

2.4 HepG2 细胞和 HepG2/Bort 耐药细胞对 Bortezomib的 IC_{50} HepG2/Bort 细胞和 HepG2 细胞对硼替佐米的 IC_{50}分别为 122.36、13.23 nmol · L^{-1},HepG2/Bort 细胞对硼替佐米的 RI 为 9.25。

2.5 硼替佐米对内质网应激相关蛋白表达的影响 结果见图 3 和表 5。HepG2/Bort 细胞中 GRP78、p-eIF-2α、ATF4 蛋白表达显著高于 HepG2 细胞,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

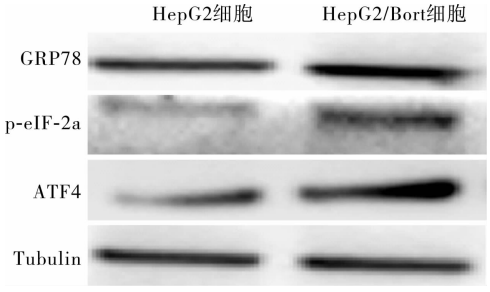


图 3 HepG2 细胞和 HepG2/Bort 细胞中质网应激相关蛋白表达(Western blot)

Fig. 3 Expression of endoplasmic reticulum stress-related protein in HepG2 and HepG2/Bort cells(Western blot)

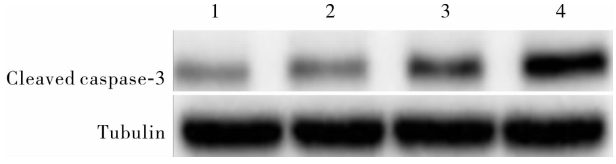
表 5 HepG2 细胞和 HepG2/Bort 细胞中内质网应激相关蛋白表达比较

Tab. 5 Comparison of the expression of endoplasmic reticulum stress-related protein between HepG2 and HepG2/Bort cells ($\bar{x} \pm s$)

细胞类别	GRP78	p-eIF-2α	ATF4
HepG2 细胞	1.267 ± 0.335	0.130 ± 0.069	0.377 ± 0.048
HepG2/Bort 细胞	2.480 ± 0.562[a]	0.579 ± 0.121[a]	0.903 ± 0.134[a]

注:与 HepG2 细胞比较[a]$P < 0.05$。

2.6 抑制内质网应激对 HepG2/Bort 细胞药物敏感性的影响 对照组、硼替佐米组、硼替佐米 + 4-PBA 组、硼替佐米 + TUDCA 组 HepG2/Bort 细胞存活率分别为 1.201 ± 0.085、1.076 ± 0.055、0.723 ± 0.045、0.570 ± 0.062;硼替佐米组 HepG2/Bort 细胞存活率显著低于对照组,硼替佐米 + 4-PBA 组和硼替佐米 + TUDCA 组 HepG2/Bort 细胞存活率显著低于硼替佐米组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、硼替佐米组、硼替佐米 + 4-PBA 组、硼替佐米 + TUDCA 组 HepG2/Bort 细胞内 cleaved caspase-3 相对表达量分别为 0.074 ± 0.026、0.105 ± 0.041、0.457 ± 0.112、0.862 ± 0.176;硼替佐米组 HepG2/Bort 细胞内 cleaved caspase-3 相对表达量显著高于对照组,硼替佐米 + 4-PBA 组和硼替佐米 + TUDCA 组 HepG2/Bort 细胞内 cleaved caspase-3 相对表达量显著高于硼替佐米组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);见图 4。



1:对照组;2:硼替佐米组;3:硼替佐米 + 4-PBA 组;4:硼替佐米 + TUDCA 组。

图 4 4 组 HepG2/Bort 细胞中 cleaved caspase-3 的表达(Western blot)

Fig. 4 Expression of cleaved caspase-3 in HepG2/bort cells in the four groups(Western blot)

3 讨论

肝癌是世界范围内常见的消化系统恶性肿瘤,在我国,肝癌发病率在所有恶性肿瘤中居第 4 位;目前,肝癌的治疗方法仍然以手术治疗、放射治疗和化学治疗为主,患者 5 a 生存率低于 12%[9]。研究显示,HCC 由于先天性或后天性耐药的出现,常用的化学治疗药物对患者生存率的改善效果不明显[10]。因此,寻找新的治疗靶点和联合用药策略,提高抗肿瘤药物的敏感性成为克服耐药和改善患者生存率的关键。

硼替佐米是一种蛋白酶体抑制剂,2003 年获得美国食品药品监督管理局批准,是目前唯一被批准应用于临床的蛋白酶体抑制剂,主要用于治疗难治性多发性骨髓瘤和套细胞淋巴瘤[11]。蛋白酶体活性抑制被认为是硼替佐米的典型功能,是治疗难治性多发性骨髓瘤的主要作用机制[12]。硼替佐米干扰 26S 蛋白酶体,通过增强凋亡相关蛋白 caspase 的表达促进细胞凋亡的发生[13]。目前,硼替佐米对肝癌细胞的影响尚不完全明确。本研究结果显示,硼替佐米可以显著降低肝癌 HepG2 和 HuH7 细胞的

存活率和增殖率,诱导肝癌细胞凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 表达升高,提高细胞内 caspase-3 酶活性;提示硼替佐米可以抑制肝癌细胞的生长、增殖,并促进肝癌细胞凋亡。为明确肝癌细胞对硼替佐米耐药的可能机制,本研究建立了对硼替佐米耐药的 HepG2 细胞株,即 HepG2/Bort 细胞,结果显示,HepG2/Bort 和 HepG2 细胞的 IC_{50} 分别为 122.36、13.23 nmol · L^{-1},HepG2/Bort 细胞对硼替佐米的 RI 为 9.25。有研究显示,内质网应激可能参与肿瘤细胞的耐药机制[14]。细胞在生长过程中面临各种应激的发生,内质网应激是其中常见的一种类型。细胞发生内质网应激时通过诱导未折叠蛋白反应来平衡应激作用。当未折叠蛋白反应达到临界阈值时,内质网应激相关伴侣分子 GRP78 与传感器分离,被激活的蛋白激酶 RNA 样内质网激酶通过磷酸化真核翻译起始因子 2α 亚基的 Ser51 降低其翻译。p-eIF-2α 会暂时抑制整体蛋白的翻译,以最大程度地降低内质网中的蛋白质折叠负荷,同时 p-eIF-2α会在其包含较短的上游开放阅读框的 5′非翻译区中选定 mRNA 优先翻译。ATF4 是翻译上调的蛋白之一,ATF4 激活旨在缓解内质激素应激的基因表达。ATF4 有助于细胞稳态的多个方面,包括氨基酸生物合成和抗氧化剂程序[15]。本研究结果显示,HepG2/Bort 细胞中内质网应激相关蛋白 GRP78、p-eIF-2α、ATF4 的表达显著高于 HepG2 细胞,而内质网抑制剂 4-PBA 和 TUDCA 可以显著降低 HepG2/Bort 细胞存活率,并诱导细胞凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 表达增加;提示抑制内质网应激可以提高 HepG2/Bort 细胞对硼替佐米的敏感性。

综上所述,硼替佐米可以抑制肝癌细胞增殖,并诱导其凋亡;对硼替佐米耐受的 HepG2 细胞中内质网应激水平明显升高,抑制内质网应激可以明显提高对硼替佐米耐受的 HepG2 细胞的药物敏感性。本研究为临床克服肝癌耐药性提供了新的方向,也为临床联合用药提供了理论依据。

参考文献:

[1] OAKES S A, PAPA F R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology[J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10(1): 173-194.

[2] WANG M, KAUFMAN R J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 581-597.

[3] STEFAN C J. Building ER-PM contacts: keeping calm and ready on alarm[J]. *Curr Opin Cell Boil*, 2018, 53(1): 1-8.

[4] COHEN S, VALM A M, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Interacting organelles[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 53(1): 84-91.

[5] WILHELM L P, WENDLING C, VEDIE B, *et al*. STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites[J]. *EMBO J*, 2017, 36(10): 1412-1433.

[6] HENNE W M, ZHU L, BALOGI Z, *et al*. Mdm1/Snx13 is a novel ER-endolysosomal interorganelle tethering protein[J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(4): 541-551.

[7] YOO Y S, HAN H G, JEON Y J. Unfolded protein response of the endoplasmic reticulum in tumor progression and immunogenicity[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2969271.

[8] WANG M, KAUFMAN R J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 326-335.

[9] EL-SERAG H B. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(12): 1118-1127.

[10] DENG G L, ZENG S, SHEN H. Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: new advances and challenges[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(5): 787-798.

[11] CHEN D, FREZZA M, SCHMITT S, *et al*. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(3): 239-253.

[12] HOCHSTRASSER M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7(2): 215-223.

[13] ACCARDI F, TOSCANI D, BOLZONI M, *et al*. Mechanism of action of bortezomib and the new proteasome inhibitors on myeloma cells and the bone microenvironment: impact on myeloma-induced alterations of bone remodeling[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 172458.

[14] KIM H J, HAN Y S, LEE J H, *et al*. Casein kinase 2α enhances 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(3): 1419-1426.

[15] TANG J Y, OU-YANG F, HOU M F, *et al*. Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects: involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 58: 109-117.

(本文编辑:徐自超)