

MK2206 对三阴性乳腺癌顺铂耐药细胞增殖及耐药性的影响

盛佳钰¹, 陈红凤²

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437;

2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: [目的] 探讨 Akt 抑制剂 MK2206 对三阴性乳腺癌顺铂耐药细胞株 MDA-MB-231/DDP 生长活性及耐药性的影响。[方法] 使用不同浓度梯度的顺铂(DDP)、MK2206 单药或联合作用于 MDA-MB-231/DDP 细胞, MTT 法检测各药物对细胞的增殖抑制率; 高效液相色谱法检测细胞内 DDP 药物浓度的改变; Western Blot、Real-time PCR 分别检测细胞内 Akt 蛋白及 MDR 相关基因 (*MDR1*、*BCRP*、*MMP7*、*GST-π*) 的表达水平。[结果] MK2206 单药对 MDA-MB-231/DDP 细胞有明显的抑制作用, 无毒剂量的 MK2206 可明显增强 MDA-MB-231/DDP 细胞对顺铂的敏感性, 增加细胞内顺铂浓度, 使细胞内 Akt 蛋白及 MDR 相关基因 (*MDR1*、*BCRP*、*MMP7*、*GST-π*) 的表达水平明显降低。[结论] MDA-MB-231/DDP 细胞的顺铂耐药性与细胞内 Akt 蛋白的过度表达有关, MK2206 有明显的顺铂增敏作用, 能部分逆转 MDA-MB-231/DDP 细胞对顺铂的耐药性, 其机制可能与降低细胞内 *MDR1*、*BCRP*、*MMP7*、*GST-π* 的基因表达水平有关。

关键词: 三阴性乳腺癌; 多药耐药; 顺铂; MK2206

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)04-0251-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.04.B001

Study on the Proliferation and Drug Resistance of MK2206 in Cisplatin-resistant Triple Negative Breast Cancer Cells

SHENG Jia-yu¹, CHEN Hong-feng²

(1. Yueyang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: [Objective] To investigate triple negative breast cancer MDA-MB-231/DDP growth activity and drug resistance of cisplatin-resistant cell lines of Akt inhibitor MK2206. [Methods] Different concentrations of cisplatin (DDP), MK2206 alone or combined were observed on the effects of MDA-MB-231/DDP cells. The drug resistance of MDA-MB-231/DDP was evaluated by MTT assay. The variation of intracellular concentration of DDP in MDA-MB-231/DDP cells was evaluated by the HPLC. *MDR1*, *BCRP*, *MMP7*, *GST-π* mRNA expression and phosphor- Akt (p-Akt)/total Akt (T-Akt) protein of breast cancer cells were detected by Real-time PCR and Western Blot, respectively. [Results] MK2206 inhibited MDA-MB-231/DDP cell proliferation. Non-toxic doses of MK2206 could significantly enhance the sensitivity of MDA-MB-231/DDP cells to cisplatin, and increased the intracellular concentration of cisplatin. It enabled significantly reduce the expression levels of intracellular Akt protein and MDR-related genes (*MDR1*, *BCRP*, *MMP7* and *GST-π*). [Conclusion] The resistance of MDA-MB-231/DDP cells is related to the overexpression of Akt protein. MK2206 can significantly increase the sensitivity to cisplatin, and it can partially reverse the MDA-MB-231/DDP cells to cisplatin resistance, which may be associated with the decreasing of the gene expression levels of *MDR1*, *BCRP*, *MMP7* and *GST-π*.

Subject words: triple negative breast cancer; multiple drug resistance; cisplatin; MK2206

近年来, PI3K/Akt 信号通路与药物耐药性之间

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373647)

通讯作者: 陈红凤, 主任医师, 博士; 上海中医药大学附属龙华医院乳腺科, 上海市徐汇区宛平南路 725 号(200032); E-mail: chhfluk@126.com

收稿日期: 2015-10-08

相关性的研究成为研究热点, 该通路被认为是耐药治疗的新靶点。其中, Akt 是 PI3K/Akt 通路中的关键性效应分子, 多项研究表明化疗药物可通过提高 Akt 的磷酸化水平, 使肿瘤细胞产生化疗耐受^[1]。针

对 PI3K/Akt 信号通路的特异性小分子抑制剂逆转乳腺癌多药耐药的研究也逐渐增多。Ding 等^[2]证实了 PI3K 通路的抑制剂 LY294002 能使 1847/MDRS 和 1847TX0.5 细胞对 Taxol 的敏感性增加 10 倍,而对野生型的细胞却没有作用,Western Blot 检测结果显示 LY294002 通过抑制 Akt 活性对耐药细胞的实现逆转^[3]。而本次研究所采用的 Akt 抑制剂 MK2206 是 PI3K/Akt 信号通路中 Akt 突变位点的变构抑制剂,它是由 Akti-1/2 衍生而来,具有更优的药学性能,对 Akt 的 3 个亚型(Akt 1、Akt 2 及 Akt 3)均有抑制作用^[4],现已进入晚期乳腺癌的临床试验阶段,但其在逆转耐药方面的研究仍然较少。

目前认为乳腺癌是一种高度异质性肿瘤,不同的病理特点和分子特征导致其对治疗的反应和预后明显不同。临床上根据免疫组化检测的雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 表达均阴性者被称为三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)。该亚型乳腺癌对内分泌治疗及抗 HER-2 的靶向治疗均不敏感,因此化疗是其主要的治疗手段。近年来研究发现, TNBC 这类与乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene-1, BRCA1) 相关的乳腺癌亚型对铂类药物表现出较高的敏感性^[5]。然而,事实证明对化疗相对敏感的 TNBC 患者并不意味着拥有更高的生存率。与其他化疗药物一样,在临床应用过程中多数患者经铂类药物化疗缓解后,即会产生耐药性而使后续治疗效果受到严重影响。因此,探索三阴性乳腺癌 DDP 耐药机制的决定因素、寻求耐药逆转剂来克服耐药现象成为当前临床治疗三阴性乳腺癌急需解决的问题。

本研究拟探讨 Akt 抑制剂 MK2206 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231/DDP 细胞耐药性的影响,初步探究其可能的作用机制,为 Akt 抑制剂应用于三阴性乳腺癌顺铂耐药的临床治疗提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自中

国科学院上海细胞库,MDA-MB-231/DDP 细胞株由本实验室采用逐步增加药物浓度、持续诱导法历时 7 个月建立,均培养于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中,隔天换液,细胞长满 80%~90%即可传代。MDA-MB-231/DDP 细胞培养液中加入终浓度为 4μg/ml 的顺铂以维持耐药表型。

1.1.2 药品与试剂

注射用顺铂(冻干粉)购自齐鲁制药有限公司(批号:ZWA2A1305034A),MK2206 购自 Selleck chemicals 公司(批号:S107806)。L-15 液体培养液、胎牛血清、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)均为 Gibco 公司产品;四甲基氮唑蓝(methylthiazolyl tetrazolium, MTT)及 DMSO 均购自上海生工生物有限公司。TRIZOL 提取试剂盒、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 所用引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成;抗磷酸化 Akt(phosphorate-Akt, p-Akt)、总 Akt (total-Akt, t-Akt)、内参 GAPDH (均为抗兔单克隆抗体)及其相应的二抗均购自美国 Cell Signaling 公司。

1.1.3 主要仪器设备

细胞培养箱购自美国 THERMO 公司,倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司,超净工作台购自苏州净化,低速离心机购自德国 Eppendorf,酶标仪购自美国 Biotek 公司,Real-time PCR 仪购自 Rcorbett 公司,制胶装置、垂直电泳仪、电转仪均购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 DDP 及 MK2206 单药对 MDA-MB-231/DDP 细胞增殖的影响

将对数生长期的细胞以按 5×10⁴ 个/ml 接种于 96 孔板,分别设空白对照组、细胞对照组及药物处理组,培养于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中,次日上午分别按 DDP(16、32、64、128、2564μg/ml)、MK2206(3.125、6.25、12.5、25、50、100nmol/L) 梯度加药。继续培养 24h,每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl,再继续培养 4h,小心弃去孔中液体,加入二甲基亚砷(DMSO)150μl,自动酶标仪测定 490nm 波长处每孔吸光度(A 值),并计算抑制率。抑制率(%)=[1-(处理组平均 A 值-空白对照组平均 A 值)/(细胞对照组平均 A 值-空白对照组平均 A 值)]×100%。最后计算各药

物的半数抑制浓度 IC_{50} 。实验重复 3 次。

1.2.2 MTT 法检测 MK2206 联合 DDP 对 MDA-MB-231/DDP 细胞增殖的影响

将对数期的细胞接种于 96 孔板, 37°C 、5% CO_2 的培养箱中继续培养, 次日上午加入无毒剂量的 MK2206 (3.125nmol/L) 与不同浓度 DDP (16、32、64、128、256 $\mu\text{g/ml}$) 联合作用 48h, 加入 MTT 溶液 $20\mu\text{l}$, 继续培养 4h, 弃上清, 加入 DMSO $150\mu\text{l}$, 自动酶标仪测定 490nm 波长处每孔吸光度 (A 值), 并计算抑制率。计算两药联合时 DDP 的 IC_{50} , 并计算 MK2206 对 DDP 的逆转倍数 (RI) 及相对逆转率 (RRR%)。

逆转倍数 (RI) = $IC_{50}(\text{DDP})/IC_{50}(\text{MK2206}+\text{DDP})$;
相对逆转率 (RRR%) = $(\text{DDP 对 MDA-MB-231/DDP 的 } IC_{50} - \text{MK2206 联合 DDP 对 MDA-MB-231/DDP 的 } IC_{50}) / (\text{DDP 对 MDA-MB-231/DDP 的 } IC_{50} - \text{DDP 对 MDA-MB-231 的 } IC_{50}) \%$ 。

$RF > 1$ 表示逆转剂 MK2206 能增强 DDP 的作用, $RF = 1$ 表示两药无交互作用, $RF < 1$ 表示拮抗作用, RF 越大, 说明逆转效果越好。 $RRR\% \geq 100\%$, 表示完全逆转作用; $RRR\% < 100\%$, 表示部分逆转作用。

1.2.3 高效液相色谱法检测细胞内顺铂质量浓度

取对数生长期 MDA-MB-231/DDP 细胞, 选取无毒剂量的 MK2206 (3.125nmol/L) 含药培养基及空白培养基分别处理细胞 24h, 将药物处理后细胞以 DDP 浓度为 $6\mu\text{g/ml}$ 的含药培养基培养 24h 后, 消化收集各组细胞并计数, PBS 冲洗 3 次后, 加入双蒸水 1ml , 液氮快速冷冻, 37°C 下迅速解冻后超声 5min (70W), 反复冻融超声 3 次, 置显微镜下观察无完整细胞, $14\,000\text{rpm}$ 离心 10min , 取上清为细胞裂解液。同时取对数生长期 MDA-MB-231 细胞, 以 DDP 浓度为 $6\mu\text{g/ml}$ 的含药培养基培养 24h 后, 以上述同样方法制备细胞裂解液。

空白培养基培养 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231/DDP 细胞获得的细胞裂解液 1:1 混合用于制备标准曲线, 取一定浓度的顺铂标准品溶液 $50\mu\text{l}$ 加入 950ml 细胞裂解液, 配制成为含 2、5、10、20、50、100 ng/ml 顺铂的细胞裂解液作为标准曲线样品用于建立标准曲线。DDP 浓度为 $6\mu\text{g/ml}$ 的含药培养基获得的两种细胞裂解液为实际待测样品。

取上述标准曲线样品和细胞裂解液各 $900\mu\text{l}$, 加入内标液 (37.5ng/ml 氯化镍) 和二乙基二硫代氨

基甲酸钠 (DDTC) 溶液 (0.25mol/L) 各 $50\mu\text{l}$, 摇匀, 37°C 孵育 30min , 放至室温后, 加入 $500\mu\text{l}$ 氯仿, 涡旋震荡 1min 进行抽提, $14\,000\text{rpm}$ 离心 5min , 下层溶液为衍生化后的待测样品。将此样品进样高效液相色谱 (安捷伦 1260 型); 色谱柱为 Diamonsil C18 (2) $5\mu\text{m}$ $150\text{mm} \times 4.6\text{mm}$, 柱温 25°C ; 检测波长为 254nm ; 流动相比比例为水: 甲醇: 乙腈 = 25:40:35, 流速 1ml/min ; 进样量 $50\mu\text{l}$ 。以 $37.5\mu\text{g/ml}$ 氯化镍为内标, 色谱峰面积对 DDP 的质量浓度进行线性回归, 其线性回归曲线为 $Y = 4814.1X - 1.9217$ ($R^2 = 1, n = 5$)。

1.2.4 Akt 磷酸化相关蛋白表达检测

取对数期 MDA-MB-231 亲本株及 MDA-MB-231/DDP 耐药株接种于培养瓶内, 分别设 MDA-MB-231 组、MDA-MB-231/DDP 组、MK2206 处理组 (3.125nmol/L)。药物处理 24h 后, 弃上清, 裂解细胞提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 将等量的蛋白样品 ($30\mu\text{g}$) 加入聚丙烯酰胺凝胶, 常规电泳、转膜。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭硝酸纤维素膜, 室温 60min , 分别加入 1:8 000 稀释的 t-Akt、p-Akt 抗体及 1:5 000 稀释的 GAPDH (内参照) 抗体。置于 4°C 摇床过夜, 用含 0.05% Tween20 的 PBS (PBST) 洗 3 次, 每次 5min , 加入 1:8 000 稀释的二抗室温培育 1h , TBST 洗涤 3 次, 加入化学底物发光液结合显影、定影和扫描。用 Photoshop Image J 软件分析各条带灰度值, 并计算相对灰度值, 以此值表示目的条带的相对表达量。相对灰度值 = 目的条带灰度值 / GAPDH 条带灰度值的比值。

1.2.5 耐药相关基因表达检测

取对数期 MDA-MB-231 亲本细胞株及 MDA-MB-231/DDP 耐药株接种于培养瓶内, 分别设 MDA-MB-231 组、MDA-MB-231/DDP 组、MK2206 处理组 (3.125nmol/L)、DDP 处理组 ($32\mu\text{g/ml}$) 及联合用药组 (MK2206 3.125nmol/L + DDP $32\mu\text{g/ml}$), 药物处理 24h 后, 采用 TRIZOL 法分别提取各组细胞的总 RNA, 分光光度法测定其纯度及浓度。用反转录试剂盒将各组细胞总 RNA 反转录, 生成 cDNA, 进一步用 *MDR1*、*BCRP*、*MMP7*、*GST- π* 引物及内参 *GAPDH* 引物扩增 (Table 1)。Real-time PCR 结果由 Rotor-Gene 6 软件分析, 确定各反应样本的 C_t 值, 采用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量, 分析各样本之间基因的表达差异。

Table 1 List of primers for Real-time PCR

Primer	Sequences(5'-3')	Product length(bp)
MDR1	Forward CCGCTGTTTCGTTTCCTTTAG	136
	Reverse CTTCTTTGCTCCTCCATTGC	
BCRP	Forward AAGCCTCAATGTTCCCTGGT	101
	Reverse ACTTTCCTTCCTGCCTGCTC	
MMP7	Forward GTCTCTGGACGGCAGCTATG	123
	Reverse GAGCCTGTTCCCACTGTAGC	
GST- π	Forward CACTCAAAGCCTCCTGCCTA	127
	Reverse TGCTGGTCCCTCCCATAGAG	
GAPDH	Forward GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	138
	Reverse TGGTGAAGACGCCAGTGA	

Note:MDR1;multidrug resistance gene 1;BCRP;breast cancer resistance gene;MMP7;matrixmetallo proteinase gene 7;GST- π ;glutathione S-transferase- π gene.

1.2.6 统计学处理

所有实验均平行重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS16.0 软件,两两比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MDA-MB-231/DDP 耐药株与 MDA-MB-231 敏感株对 DDP 的敏感性

MDA-MB-231/DDP 细胞对 DDP 的耐药性明显高于 MDA-MB-231 细胞。DDP 单药处理 24h 后的 IC₅₀ 分别为:MDA-MB-231 敏感株(18.42 $\pm$ 4.30) μ g/ml,MDA-MB-231/DDP 耐药细胞(173.7 $\pm$ 8.92) μ g/ml,与敏感株相比,耐药倍数(RF)为 9.43 倍(Figure 1)。

2.2 不同浓度的 MK2206 单药对 MDA-MB-231/DDP 细胞增殖的影响

MK2206 单药对 MDA-MB-231/DDP 细胞的生长

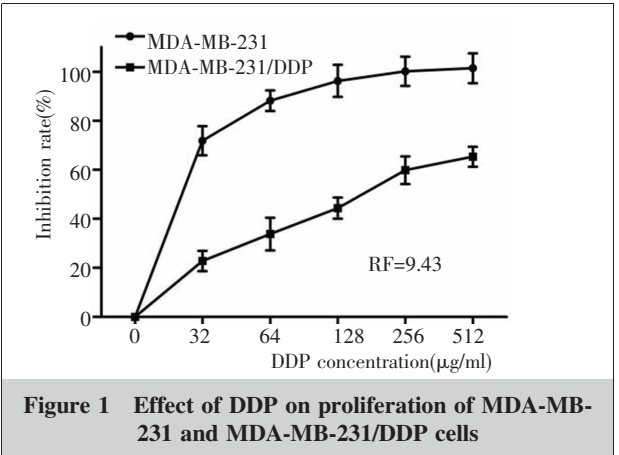


Figure 1 Effect of DDP on proliferation of MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP cells

也有抑制作用,抑制率随药物浓度的增加而增加。MK2206 处理 MDA-MB-231/DDP 细胞 24h 其半数抑制浓度(IC₅₀)为(35.36 $\pm$ 3.32)nmol/L。并且,3.13nmol/L 的 MK2206 对 MDA-MB-231/DDP 细胞的抑制率为 8.64%,抑制率<10%,可认为是该药的无细胞毒浓度(Figure 2)。

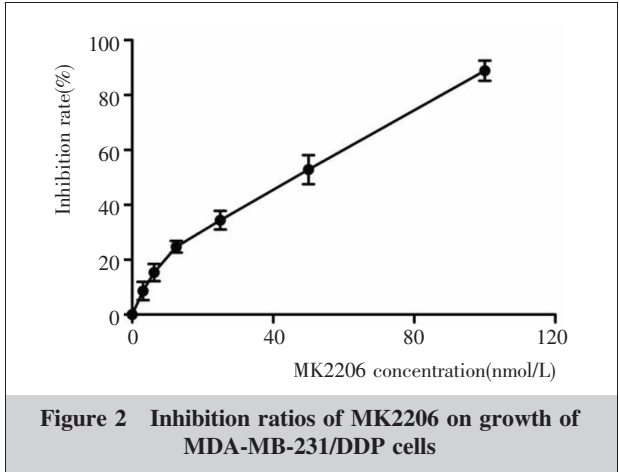


Figure 2 Inhibition ratios of MK2206 on growth of MDA-MB-231/DDP cells

2.3 无毒浓度的 MK2206 联合 DDP 可明显增强 MDA-MB-231/DDP 细胞对 DDP 的敏感性

与 DDP 单药组相比,无毒浓度(3.13nmol/L)的 MK2206 联合 DDP 组 MDA-MB-231/DDP 细胞对顺铂的敏感性明显增加,IC₅₀ 值由 (173.7 $\pm$ 8.92) μ g/ml 下降到 (79.23 $\pm$ 5.74) μ g/ml ($P<0.01$),逆转倍数(RI)为 2.19 倍,相对逆转率(RRR%)为 60.84%,提示 MK2206 具有部分逆转 MDA-MB-231/DDP 细胞 DDP 耐药的作用(Figure 3)。

2.4 MK2206 对 MDA-MB-231/DDP 细胞内 DDP 浓度的影响

用 HPLC 法测定 MDA-MB-231 及 MDA-MB-

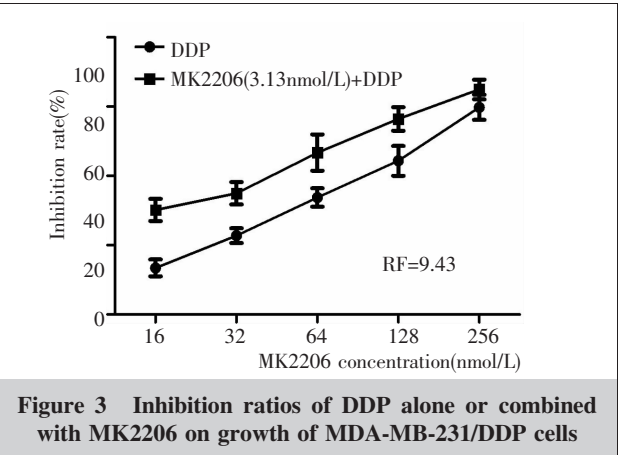


Figure 3 Inhibition ratios of DDP alone or combined with MK2206 on growth of MDA-MB-231/DDP cells

231/DDP 细胞内 DDP 的浓度,2 种细胞分别与 $6\mu\text{g/ml}$ 的 DDP 接触 24h 后,MDA-MB-231 细胞内 DDP 的浓度为 $(47.10\pm 2.37)\text{ng}/5\times 10^4\text{ cells}$,而 MDA-MB-231/DDP 细胞则为 $(6.30\pm 1.64)\text{ng}/5\times 10^4\text{ cells}$,两者具有显著性差异($P<0.01$)(Figure 4)。

用 HPLC 法测定经 MK2206 处理 24h 后的 MDA-MB-231/DDP 细胞内 DDP 浓度,结果可见细胞与 $6\mu\text{g/ml}$ 的 DDP 接触 24h 后,Control 组及 MK2206 组细胞内 DDP 浓度分别为 $(6.29\pm 1.64)\text{ng}/5\times 10^4\text{ cells}$ 及 $(24.12\pm 2.06)\text{ng}/5\times 10^4\text{ cells}$,两者具有显著性差异($P<0.01$)。与 Control 组相比,MK2206 组细胞内 DDP 的浓度积累提高 3.83 倍(Figure 5)。

2.5 MK2206 对 Akt 磷酸化相关蛋白表达影响

MDA-MB-231/DDP 细胞在基础状态下细胞内磷酸化 Akt(p-Akt)水平显著高于 MDA-MB-231,分别为 0.84 ± 0.08 和 0.25 ± 0.05 ($P<0.01$)。两种细胞的 t-Akt 蛋白表达分别为 0.99 ± 0.04 和 1.00 ± 0.02 ,两者差异无统计学意义(Figure 6)。

MK2206 作用于 MDA-MB-231/DDP 细胞,与 Control 组相比,MK2206 组 t-Akt 蛋白表达变化不明显,而 p-Akt 蛋白表达有所下降。Control 组及 MK2206 组 p-Akt 蛋白表达量分别为 0.9 ± 0.06 和 0.69 ± 0.03 ($P<0.05$)(Figure 7)。

2.6 PCR 检测基因表达

Real-time PCR 检测结果显示,耐药细胞 MDA-MB-231/DDP 中 *MDR1*、*BCRP*、*MMP7* 及 *GST- π* 基因 mRNA 的表达量均高于 MDA-MB-231 组,差异有统计学意义($P<0.01$)(Figure 8)。MK2206 联合 DDP 处理 24h 后,MDA-MB-231/DDP 耐药株内耐药相关基因的 mRNA 表达水平平均明显下降,与细胞 Control

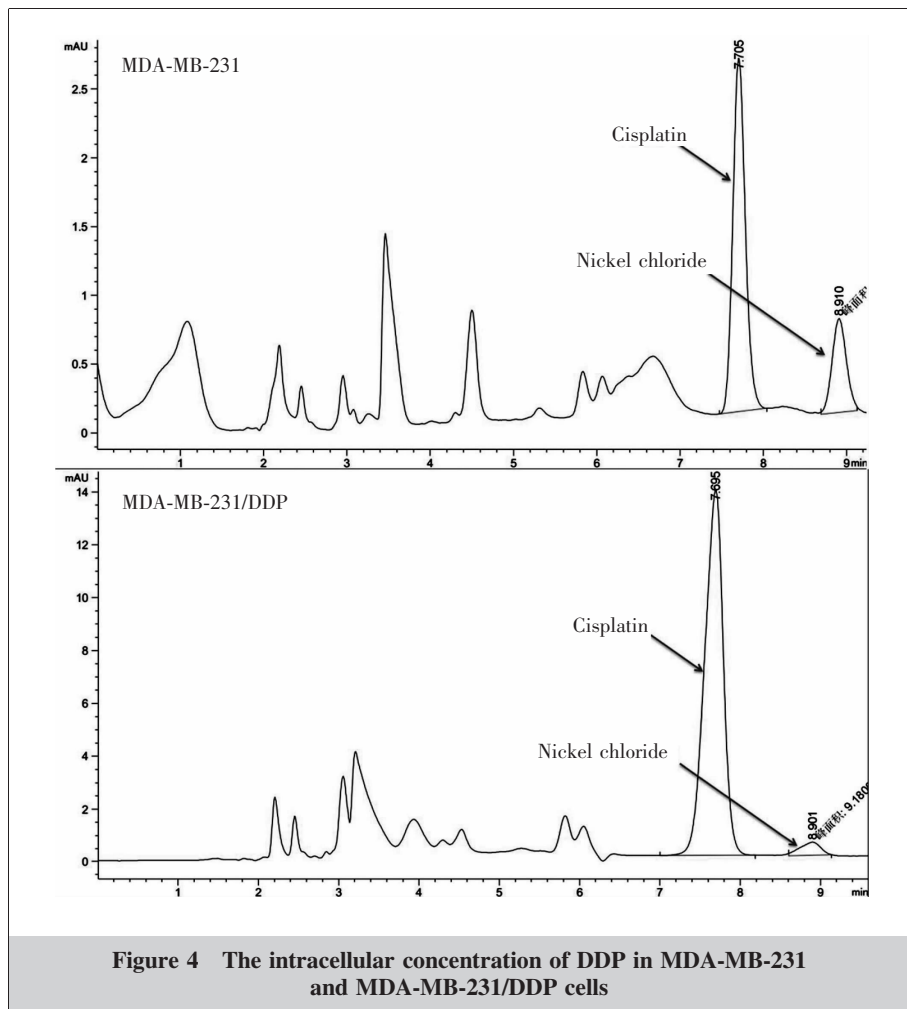


Figure 4 The intracellular concentration of DDP in MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP cells

组及单药处理组相比差异有统计学意义(Figure 9)。

3 讨论

针对逆转肿瘤 MDR,全球各大研究机构都进行了许多尝试,包括化学药物、天然药物及基因治疗。维拉帕米和免疫抑制剂环孢霉素 A 是目前研究最多的具有逆转 MDR 的化学制剂。此类化学药物具有严重的不良反应,特异性差,效果并不十分理想。主要针对多药耐药基因的高表达的基因治疗,通过运用反义技术、核酶或新兴的 RNAi 技术,起到抑制甚至完全封闭有害基因的作用。但该治疗方法还存在许多缺陷,比如靶向性不佳、治疗效果持久性较差、容易被 DNA 酶降解,且高浓度的寡核苷酸对细胞会产生毒性作用等,都限制了其临床应用^[6]。基于上述治疗方式的不尽如人意,细胞信号传导通路和

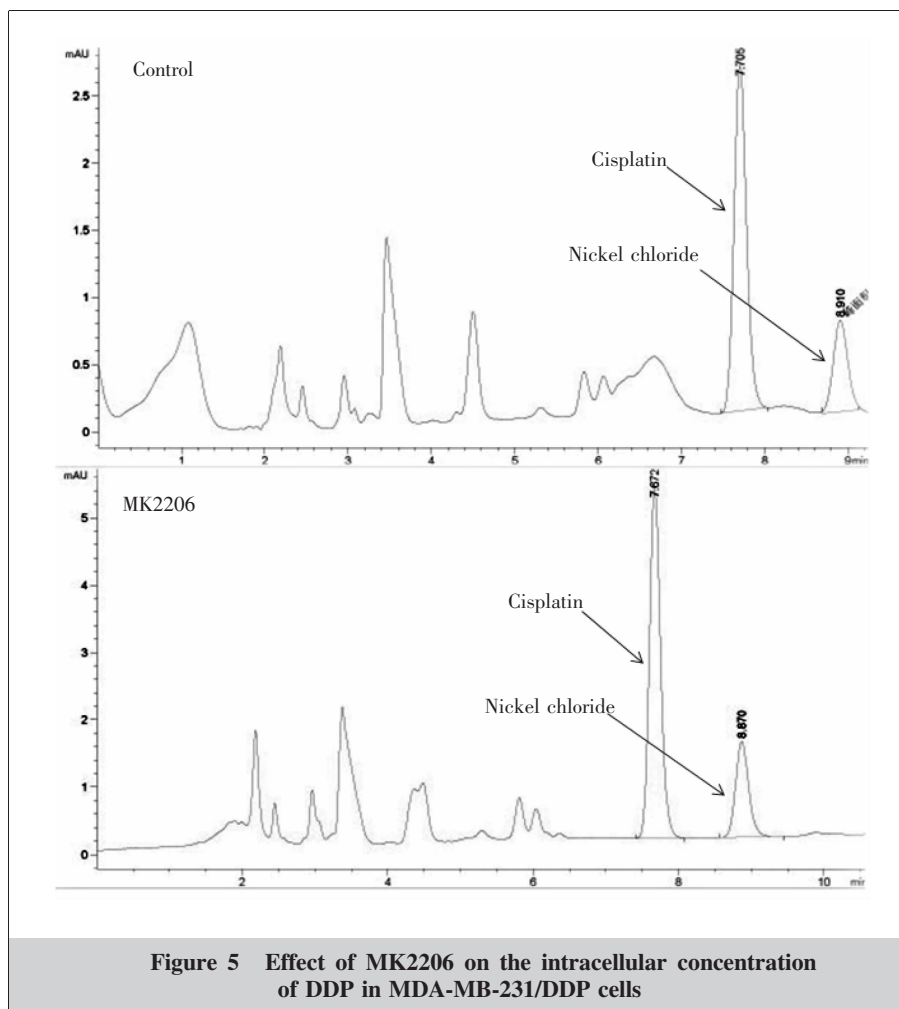


Figure 5 Effect of MK2206 on the intracellular concentration of DDP in MDA-MB-231/DDP cells

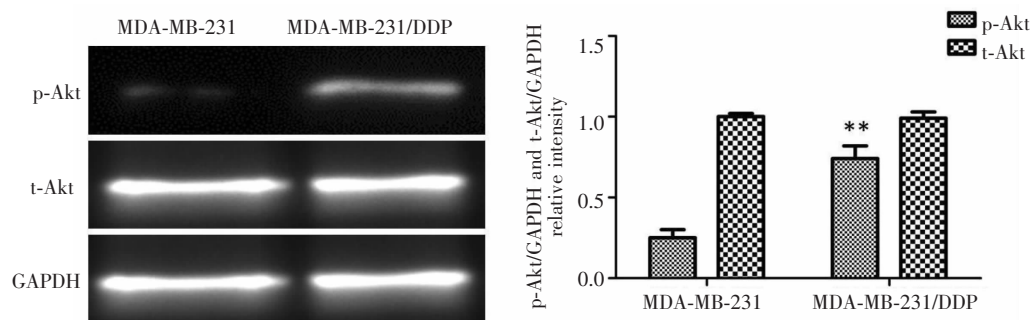
蛋白激酶抑制剂脱颖而出,被认为是逆转多药耐药非常有前景的研究方向。

近年来,关于 PI3K/Akt 信号通路 with 药物耐药性关系的研究越来越多, Han 等^[7]发现上调 PI3K/Akt 的表达导致胃癌 AGS 细胞中 P-gp 相关及不相关药物耐药的发生; Oki 等^[8]报道了 Akt 的活化与 5-Fu、阿霉素、丝裂霉素 C、顺铂等多种化疗药物耐药有关; Yuan 等^[9]发现卵巢癌耐吉西他滨细胞株 A2780CP 中存在 PI3K/Akt 通路的过度活化。基于上述研究,近年来一些学者将 PI3K/Akt 信号通路抑制剂应用于乳腺癌化疗耐药的逆转,并认为由此可能寻找到治疗乳腺癌化疗耐药的新靶点。Pick 等^[10]运用 PI3K 抑制剂 LY290042 恢复了乳腺癌耐药细胞株对化疗药物的敏感,逆转 MDR。而 Goler-Baron 等^[11]则采用 Akt 抑制剂恢复乳腺癌耐药细胞株对米托蒽醌和拓普利康的敏感性,并认为其作用机制是使 ABCG2

从细胞膜到胞浆重新分布,从而战胜 MDR。目前,在临床上已进入晚期乳腺癌的临床试验阶段的 Akt 抑制剂 MK2206 是 PI3K/Akt 信号通路中 Akt 突变位点的变构抑制剂,它是由 Akt1-1/2 衍生而来,具有更优的药学性能,对 Akt 的 3 个亚型 (Akt1、Akt 2 及 Akt 3) 均有抑制作用^[4]。已有研究证实 Akt 与细胞对化疗药物的反应性密切相关。癌细胞在多种化疗药物作用时,细胞内的 PI3K/Akt 信号通路被激活,有时为短暂现象有时可为长期的持续效应。实验证实经特异性 Akt 磷酸化抑制剂处理后耐药细胞的凋亡率明显高于敏感细胞,更加提示此通路的活性参与细胞药敏性的调节。在此次研究中我们也发现在 MDA-MB-231/DDP 耐药细胞内磷酸化的 Akt 呈现阳性,且表达水平明显高于敏感细胞株,也提示 PI3K/Akt

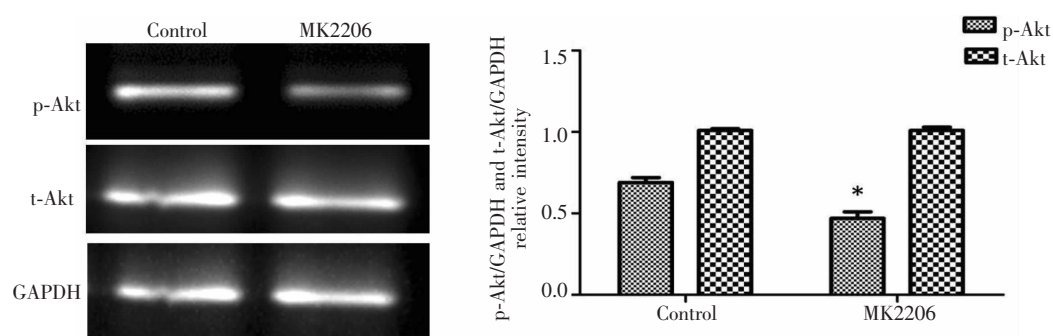
信号通路的激活是多药耐药产生的机制之一。虽然 PI3K/Akt 信号通路 with 体外培养癌细胞的药物敏感性的关系已有研究,但是是否直接与肿瘤细胞对化疗的敏感性,以及是否与肿瘤经典的 MDR 现象有关? 本研究对此进行了进一步地探讨。

在本研究中,我们将 Akt 抑制剂 MK2206 与 DDP 联合,观察 MDA-MB-231/DDP 耐药株的耐药基因表达水平变化情况。结果我们发现 MDA-MB-231/DDP 耐药株的耐药相关基因 (*MDR1*、*BCRP*、*GST-π*、*MMP7*) 表达水平均较 MDA-MB-231 敏感株明显升高。MK2206 单药可抑制 MDA-MB-231/DDP 细胞的增殖,在无细胞毒作用的低剂量 (3.13 nmol/L) 下, MK2206 可明显增强 MDA-MB-231/DDP 细胞对 DDP 的敏感性,降低 MDA-MB-231/DDP 细胞内上述耐药相关基因的表达,增加耐药细胞内 DDP 化疗药物的积累,对肿瘤细胞的耐药性有逆转作用而对敏



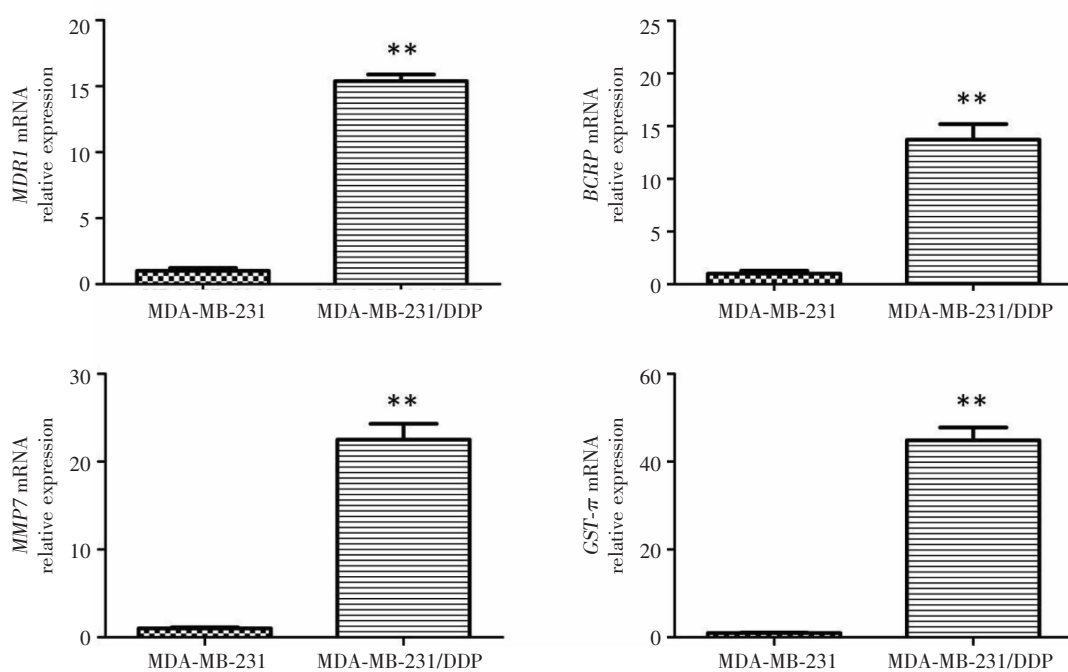
Note: ** vs MDA-MB-231, $P < 0.01$.

Figure 6 Protein expression of p-Akt and t-Akt in MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP cells



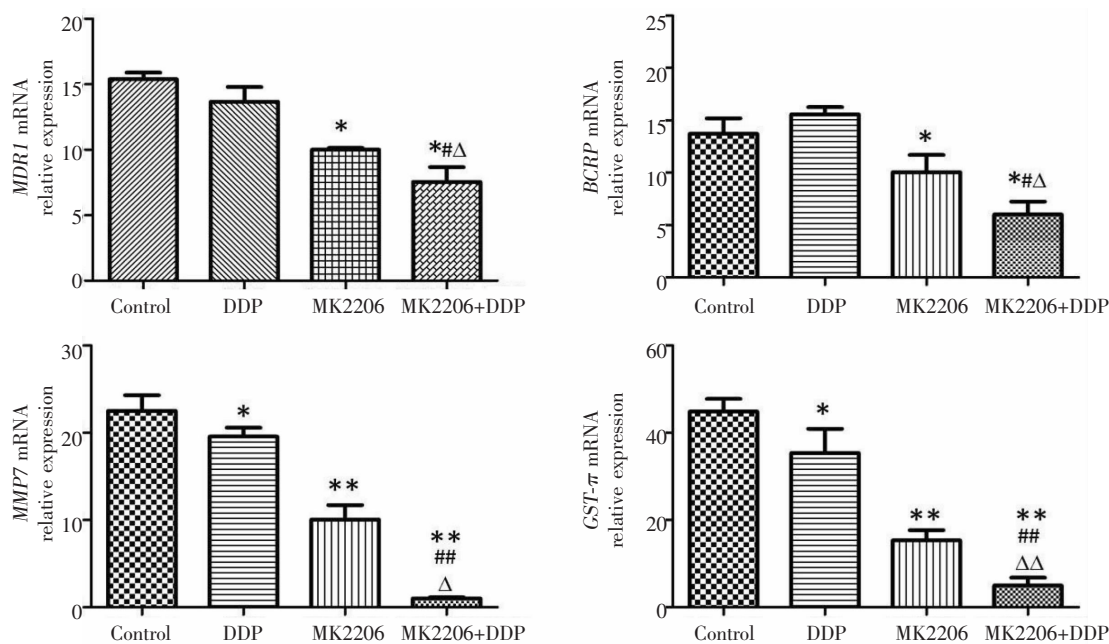
Note: * vs Control, $P < 0.05$.

Figure 7 Effect of MK2206 on the protein expression of p-Akt and t-Akt in MDA-MB-231/DDP cells



Note: ** vs MDA-MB-231, $P < 0.01$.

Figure 8 The mRNA expression of *MDR1*, *BCRP*, *MMP7* and *GST-π* in MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP cells



Note: * vs Control, $P < 0.05$; ** vs Control, $P < 0.01$; # vs DDP, $P < 0.05$; ## vs DDP, $P < 0.01$; Δ vs MK2206, $P < 0.05$; ΔΔ vs MK2206, $P < 0.01$.

Figure 9 The mRNA expression of *MDR1*, *BCRP*, *MMP7* and *GST-π* level of MK2206 alone or combined with DDP on MDA-MB-231/DDP cells

感细胞无效。说明 MK2206 逆转耐药机制可能与降低细胞内磷酸化 Akt 蛋白及耐药相关基因 (*MDR1*、*BCRP*、*GST-π*、*MMP7*) 的表达水平有关,其具体作用机制有待进一步深入研究,期望能为 DDP 耐药的三阴性乳腺癌患者的治疗提供一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Kim D, Dan HC, Park S, et al. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance[J]. Front Biosci, 2005, 10: 975-987.
- [2] Ding S, Chmaberlain M, McLaren A, et al. Cross-talk between signaling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1[J]. Br J Cancer, 2001, 85(8): 1175-1184.
- [3] Soderlund K, Perez-Tenorio G, Stal O. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway prevents radiation-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2005, 26(1): 25-32.
- [4] Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, et al. MK-2206, an allosteric AKT inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(7): 1956-1967.
- [5] Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, et al. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(18): 3342-3354.
- [6] Junko N, Hiroshi K, Hiroyuki H, et al. Reversal of drug resistance using hammerhead ribozymes against multidrug resistance-associated protein and multidrug resistance 1 gene[J]. Int J Oncol, 2002, 21(3): 1021-1026.
- [7] Han Z, Hong L, Han Y, et al. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26(2): 261-268.
- [8] Oki E, Baba H, Tokunaga E, et al. Akt phosphorylation associates with LOH of PTEN and leads to chemoresistance for gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2005, 117(3): 376-380.
- [9] Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE, et al. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1; implication of AKT2 in chemoresistance [J]. J Biol Chem, 2003, 278(26): 23432-23440.
- [10] Pick A, Wiese M. Tyrosine kinase inhibitors influence ABCG2 expression in EGFR-positive MDCK BCRP cells via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Chem Med Chem, 2012, 7(4): 650-652.
- [11] Goler-Baron V, Sladkevich I, Assaraf YG. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(10): 1340-1348.