

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.003

## 转染正常 c-CBL 基因后耐药 GIST 体外药物敏感实验研究\*

杨平<sup>1</sup>, 陈博<sup>2</sup>, 贾贵清<sup>3</sup>, 伍晓汀<sup>4</sup>, 张祥运<sup>1</sup>, 李卫<sup>1</sup>

(1. 四川省医学科学院/四川省人民医院城东病区胃肠外科, 成都 610110; 2. 安徽医科大学第一附属医院胃肠外科, 合肥 246400; 3. 四川省医学科学院/四川省人民医院胃肠外科, 成都 610072; 4. 四川大学华西临床医学院/华西医院胃肠外科, 成都 610041)

**[摘要]** **目的** 研究转染正常 c-CBL 基因后耐药胃肠道间质瘤(GIST)细胞在体外对甲磺酸伊马替尼作用的影响。**方法** 选择的瘤源细胞来自 1 例 29 岁青年男性患者, 诊断为小肠间质瘤复发伴腹腔转移。通过细胞爬片、Western blot、RT-PCR 检测基因鉴定细胞。通过将携带正常 c-CBL 基因的反转录病毒载体转染耐药 GIST 细胞中, 四唑盐比色法(MTT)测定转染前后耐药 GIST 细胞对甲磺酸伊马替尼药物敏感性。**结果** Western Blot 检测培养耐药 GIST 的 C-kit 稳定表达 C-kit 蛋白, 基因测序显示耐药 GIST 细胞 C-kit 突变位点位于第 9 号外显子, 通过检测显示培养耐药 GIST 保持了原有的生物学特性。甲磺酸伊马替尼对 GIST 细胞作用 72 h MTT 实验结果显示: 转染前耐药细胞在 1.6  $\mu\text{mol/L}$  浓度时, 抑制率未超过 50%; 然而转染后, 在 0.10  $\mu\text{mol/L}$  浓度抑制率达到 76.5%, 最佳浓度为 0.10~0.20  $\mu\text{mol/L}$ , 转染前后不同浓度的抑制率差异有统计学意义( $P<0.01$ )。**结论** 通过转染正常 c-CBL 至耐药 GIST 细胞, 增强了对甲磺酸伊马替尼的敏感性。

**[关键词]** 胃肠道间质瘤; c-CBL 基因; 耐药; 药物敏感**[中图分类号]** R453.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3013-04

## Study on the imatinib sensitivity of drug-resistant gastrointestinal stromal tumor cells by transfection of c-CBL gene in vitro\*

YANG Ping<sup>1</sup>, CHEN Bo<sup>2</sup>, JIA Guiqing<sup>3</sup>, WU Xiaoting<sup>4</sup>, ZHANG Xiangyun<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Eastern Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610110, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 246400, China; 3. Department of Gastrointestinal Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 4. Department of Gastrointestinal Surgery, West China School of Medicine/West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To study on the effect of drug-resistant gastrointestinal stromal tumor(GIST) cells on imatinib in vitro after transfection of normal c-CBL gene. **Methods** The tumor cells were derived from a 29-year-old young male patient diagnosed with GIST recurrence with abdominal metastasis. The cultured cells were detected by cell cover-slips, Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Retro-viral vector with a normal c-CBL gene was transformed into imatinib-resistant GIST, detected the imatinib sensitivity before and after transfection by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). **Results** The C-kit protein of cultured imatinib-resistant GIST cells was detected by Western blot, gene sequencing showed that the imatinib-resistant GIST cells C-kit mutation site was exon 9, the cultured cells maintained the original biological characteristics. The MTT results of imatinib terms of GIST cells for 72 hours showed that the inhibition rate did not exceed 50% when the concentration was 1.6  $\mu\text{mol/L}$  before transfection, however, the inhibition rate reached 76.5% when the concentration was 0.10  $\mu\text{mol/L}$  after transfection, the best concentration was 0.10—0.20  $\mu\text{mol/L}$ , there was statistically significant difference in the inhibition rates of different concentrations before and after transfection ( $P<0.01$ ). **Conclusion** By transfection of normal c-CBL gene into imatinib-resistant GIST cells, it enhances the sensitivity to imatinib.

**[Key words]** gastrointestinal stromal tumor; c-CBL gene; resistance; drug sensitivity

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)起源于胃肠道卡哈尔间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC), 是胃肠道最常见的间充质源性肿瘤, 每年发病率为 10~20/100 万人<sup>[1-3]</sup>。虽然 GIST

的甲磺酸伊马替尼分子靶向治疗效果较好,但仍然有 10%~20% GIST 的患者会出现原发耐药及 40%~50% 发生继发耐药<sup>[4]</sup>,且治疗期间继发耐药每年递增 10%,但 GIST 的耐药机制不明。近年来在急性骨髓性白血病研究发现 c-CBL 是一种新型泛素连接酶 E3,可以负调节受体酪氨酸激酶(RTK);突变的 c-CBL 能够激活其他 RTK(如 c-Kit)<sup>[5-6]</sup>。这些成果对探索有效逆转甲磺酸伊马替尼耐药的胃肠道间质瘤有较重要的参考意义。因此,本研究将正常 c-CBL 基因导入 GIST 耐药细胞,观察在体外甲磺酸伊马替尼对耐药细胞生长影响,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 材料** 瘤源细胞来自 1 例 29 岁青年男性患者,诊断为小肠间质瘤复发伴腹腔转移。腹腔瘤体出现体积增大,有再次手术指征。

**1.1.2 主要试剂** 中性蛋白酶(Dispase)购于美国 GIBCO 公司,胎牛血清(FBS)购于美国 GBICO 公司,RPMI-1640 培养液购于杭州吉诺生物医药公司,C-kit 抗体购于美国 Snata Curzt 公司,c-CBL 抗体购于美国 BD 公司,甲磺酸伊马替尼(格列卫,Glivec) 购于瑞士 Novatis 公司,携带正常 c-Cbl 基因的反转录病毒载体购于中国大连宝生物工程有限公司。

**1.1.3 主要仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Heareus 公司),倒置显微镜(日本 Olmypus 公司),超净工作台(德国 Hearues 公司),低温高速离心机(德国 Heraeus 公司),四唑盐比色法(MTT)酶标仪(美国 Bio-TEK)。

### 1.2 方法

**1.2.1 GIST 原代细胞的获取、分离和培养** 选择经手术切除后腹腔内复发的 GIST 患者(口服甲磺酸伊马替尼)超过 6 个月(400 mg/d),影像学证实腹腔瘤体复发),有手术指征。手术切除的新鲜 GIST 组织经快速病理证实为梭型细胞肿瘤,将肿瘤剔除坏死及污染组织,PBS 冲洗 3 次,再用含 500 μg/mL 庆大霉素、500 μg/mL 链霉素、500 μg/mL 青霉素的无血清 RPMI 1640 冲洗,剪碎组织,加入 2 倍体积的 1 mg/mL 中性蛋白酶,37 °C 消化 60 min,收集单个及小块组织的瘤细胞,离心洗涤 2 次,收集单个及小块组织的瘤细胞接种于 150 mL 培养瓶中,培养条件为含 20% FCS 的 RPMI-1640/DMEM。次日弃上清液,换新鲜培养液,此后每隔 3 d 换液 1 次。

**1.2.2 培养细胞生物学特性的鉴定** 细胞形态学观察:倒置显微镜形态学观察:取对数生长期细胞在培养瓶中进行培养,待细胞长满瓶底约 80% 时观察细胞,并在倒置显微镜下拍照;细胞爬片免疫组织化学:(1)将专用爬片泡酸,三蒸水冲洗及高压消毒后放入干燥箱备用;(2)胰酶消化后制成细胞悬液并计数,调整细胞密度 10<sup>5</sup>/mL,将细胞接种于含玻片的培养皿中,置入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;(3)待细胞爬满玻片后取出玻片,用 PBS 冲洗 2 次;(4)将爬片用 95% 的乙醇

固定 15 min 后用 PBS 冲洗 2 次;(5)PBS 清洗标本 3 次各 1 min;(6)冰丙酮固定 15 min(或 4% 多聚甲醛固定 30min);(7)空气干燥 5min 后 PBS 清洗标本 3 次各 2 min;(8)0.5% Triton X-100(DPBS 配)孵育 1 次 20 min;(9)PBS 清洗标本 3 次各 2 min,再 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(试剂 A)孵育 15 min;(10)DPBS 清洗标本 3 次各 2 min;(11)封闭血清孵育(试剂 B)20 min;(12)一抗孵育(滴度 1:200,湿盒)4 °C 过夜或 37 °C 60 min,阴性对照用一抗来源血清;(13)PBS 清洗标本 3 次各 5 min;(14)二抗工作液孵育(湿盒试剂 C)37 °C 30 min;(15)PBS 清洗标本 3 次各 5 min;(16)试剂 D(湿盒)37 °C 30 min;(17)PBS 清洗标本 3 次,各 5 min;(18)DAB 显色(避光,镜下观察至棕色)3~10 min;(19)蒸馏水洗 2 次 1 min;(20)苏木素复染 0.5~1.0 min;(21)自来水洗返蓝;(22)梯度乙醇脱水 75、85、95、100% 各需 3 min;(23)二甲苯透明 2 次各 3 min;(24)中性树胶封片。RT-PCR 检测细胞系 c-Kit 基因的突变位点状况如下,上游引物:5-CTG GGT CAC TTT GAT ATG GT-3,下游引物:5-AGC CCT GAC CTT CTG ATT C-3。据 PCR 反应试剂盒说明书,反应体系:模版 c-DNA 5 μL,上游引物和下游引物各 1.0 μL,Sterile water 18 μL,混匀后加入 High Fidelity PCR Master 25 μL,混匀。总反应总体积为 50 μL。PCR 扩增条件:94 °C 2 min;94 °C 10 s,56 °C 30 s,72 °C 60 s,35 个循环;循环结束后,72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增在 PE2400 型 PCR 仪上进行。琼脂电泳证明扩增成功后。选择 PCR base line substrated 模式进行数据分析和修正。以第 4 至 15 个循环荧光强度值标准差的 10 倍作为荧光阈值,确定不同处理间的 CT 值,进行分析。

**1.2.3 反转录病毒的转染** 携带有正常 c-CBL 基因反转录病毒转染:将第 3 代耐药 GIST 细胞,培养 24 h 后,将反转录病毒按 1:10 病毒滴度,加入到培养瓶中,继续培养 72 h,在荧光显微镜下进行观察。

**1.2.4 GIST 细胞体外药物敏感性测定(MTT 法)** 常规用胰酶消化 GIST 细胞,离心后弃上清液,用培养基重悬细胞后,接种培养。24 h 后,加入不同浓度的药物,每个浓度设 3 个复孔并设对照孔。分别培养 48、72 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT,4 h 后每孔加入二甲基亚砷,振荡使结晶物混匀,在酶标仪 570 nm 波长处读取光密度(A)值。重复 3 次。存活率(%)=(实验组 A 值/对照组 A 值)×100%,抑制率(%)=(1-存活率)×100%。

**1.3 统计学处理** 所有资料均用 SPSS13.0 统计分析软件,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 耐甲磺酸伊马替尼细胞来源患者** 患者男性,29 岁,小肠间质瘤复发伴腹腔转移。术后免疫组织化学:CD117(+),CD34(+),S-100(-),SMA(-),



### 3 讨 论

目前国内少见成熟的耐药 GIST 细胞株出售,国外已经建立的 GIST 细胞株有 GIST780、GIST-T1、GIST48、GIST882、GIST430<sup>[7-9]</sup>。GIST882 是经典的敏感细胞,对甲磺酸伊马替尼高度敏感,但是体外不易培养<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,经原代培养后,耐药 GIST 细胞在倒置相差显微镜下呈团块样生长,可见核分裂象,细胞核型为多倍体。在细胞分离方法上,本研究发现使用 1 mg/mL 中性蛋白酶消化培养的方法最容易分离出细胞,GIST 细胞也最容易爬出。1% 胰酶消化法分离的细胞数少,细胞存活率低。而组织块培养法细胞很难爬出。最适合耐药 GSIT 原代细胞生长的培养基是含 20% 进口的 GBICO 公司的 CFS 的 RPMI-1640。同时耐药 GIST 细胞在传代 7~10 代后细胞生长变慢,细胞倍增时间延长,细胞皱缩,后出现衰老、死亡。所选标本术后组织 DNA 测序均提示 C-kit 基因第 9 外显子病理性突变,培养耐药细胞爬片,Western Blot 检测显示为所培养耐药细胞 CD117+,耐药细胞稳定表达 C-kit 蛋白,因此表明经培养后原代耐药 GIST 保留了人 GIST 耐药细胞的生物特性。

本研究甲磺酸伊马替尼对 GIST 细胞作用 72 h 的 MTT 实验结果显示:转染前耐药细胞在 1.60  $\mu\text{mol/L}$  浓度时,抑制率未超过 50%;然而转然后,在 0.10  $\mu\text{mol/L}$  浓度抑制率达到 76.5%,继续增加浓度,抑制率未发现明显升高。提示转然正常 c-CBL 后的细胞对甲磺酸伊马替尼敏感。本研究证实了在耐药 GIST 中转染了正常 c-CBL 基因后,提高了对甲磺酸伊马替尼的敏感性,这说明正常的 c-CBL 在间质瘤中可能起着抑癌基因的作用。c-CBL 这种作用与 RATHINAM 等<sup>[6]</sup>在慢性髓样细胞白血病类似。

但是 c-CBL 基因是如何参与调控 GIST 细胞增殖、分化,其机制目前不清楚。在白血病细胞研究中发现 c-CBL 能和 PI3K 的 p85 亚基的相互作用,促使 PI3K 泛素化并经蛋白酶体降解<sup>[11-12]</sup>,提示其能负调控 PI3K/Akt 信号通路。有研究提示 c-CBL 通过泛素结合酶与受体酪氨酸磷酸化的蛋白质结合,导致其泛素化及降解,而负调控表皮生长因子受体,影响其蛋白表达水平<sup>[13]</sup>。本研究是初次从宏观探索 c-CBL 其在耐药 GIST 的作用,转染正常 c-CBL 后的耐药细胞对甲磺酸伊马替尼敏感性有所提升,但其机制不清楚,有待下一步研究继续深入。

### 参考文献

[1] STILLER C A, TRAMA A, SERRAINO D, et al. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(3): 684-695.

[2] SØREIDE K, SANDVIK O M, SØREIDE J A, et al. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort

studies[J]. *Cancer Epidemiol*, 2016, 40: 39-46.

- [3] RUBIÓ-CASADEVALL J, BORRÀS J L, CARMONA C, et al. Temporal trends of incidence and survival of sarcoma of digestive tract including gastrointestinal stromal tumours (GIST) in two areas of the north-east of Spain in the period 1981-2005: a population-based study[J]. *Clin Transl Oncol*, 2014, 16(7): 660-667.
- [4] VAN GLABBEKE M, VERWEIJ J, CASALI P G, et al. Initial and late resistance to imatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors are predicted by different prognostic factors; a European organisation for research and treatment of cancer-italian sarcoma group-australasian gastrointestinal trials group study[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(24): 5795-5804.
- [5] TAYLOR S J, THIEN C B, DAGGER S A, et al. Loss of c-Cbl E3 ubiquitin ligase activity enhances the development of myeloid leukemia in FLT3-ITD mutant mice[J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(3): 191-206.
- [6] RATHINAM C, THIEN C B, FLAVELL R A, et al. Myeloid leukemia development in c-Cbl RING finger mutant mice is dependent on FLT3 signaling[J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(4): 341-352.
- [7] LU Y, MAO F, LI X, et al. Discovery of potent, selective stem cell factor receptor/platelet derived growth factor receptor alpha (c-KIT/PDGFR $\alpha$ ) dual inhibitor for the treatment of imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GISTs) [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(12): 5099-5119.
- [8] PULKKA O P, NILSSON B, SARLOMO-RIKALA M, et al. SLUG transcription factor: a pro-survival and prognostic factor in gastrointestinal stromal tumour [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(9): 1195-1202.
- [9] PAULMICHL A, SUMMER D, MANZL C, et al. Targeting gastrointestinal stromal tumor with 68Ga-labeled peptides: an in vitro study on gastrointestinal stromal tumor-cell lines[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2016, 31(8): 302-310.
- [10] BERGLUND E, UBHAYASEKERA S J, KARLSSON F, et al. Intracellular concentration of the tyrosine kinase inhibitor imatinib in gastrointestinal stromal tumor cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(4): 415-422.
- [11] GAZI M, MOHARRAM S A, MARHÄLL A, et al. The dual specificity PI3K/mTOR inhibitor PKI-587 displays efficacy against T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) [J]. *Cancer Lett*, 2017, 392: 9-16.
- [12] CONGLETON J, SHEN M, MACDONALD R, et al. Phosphorylation of c-Cbl and p85 PI3K driven by all-trans retinoic acid and CD38 depends on Lyn kinase activity[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(7): 1589-1597.
- [13] SHRESTHA N, SHRESTHA, RYU T, et al.  $\delta$ -Catenin increases the stability of EGFR by decreasing c-Cbl interaction and enhances EGFR/Erk1/2 signaling in prostate cancer[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(4): 320-330.