

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2026.03.008

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20260112.1840.006\(2026-01-13\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20260112.1840.006(2026-01-13))

抗凋亡蛋白 Bcl-2 在结直肠癌细胞对微管蛋白抑制剂耐药中的作用机制*

朱钦敏¹ 杨东林² 吴春蓉³ 张雅茜¹ 杜慧慧^{1△}

[1. 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404120; 2. 重庆文理学院药学院(创新靶向药物国际研究院), 重庆 402160; 3. 重庆大学附属江津医院(重庆市江津区中心医院), 重庆 402260]

[摘要] **目的** 利用结直肠癌(CRC)耐药细胞株[HCT8/紫杉醇(PTX)、HCT8/长春新碱(VCR)]构建稳定敲低 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)基因的转基因细胞系, 分析 Bcl-2 抑制剂 AT101、obatoclox 及 Bcl-2 蛋白下调对细胞 PTX、VCR 耐药的影响。**方法** 通过 Western blot 检测 CRC 耐药细胞系和亲本细胞系中激酶、细胞凋亡、自噬相关蛋白表达水平及稳定敲低 Bcl-2 基因的耐药细胞系中 Bcl-2 表达水平; 采用噻唑蓝(MTT)法、克隆形成实验、EdU 染色实验测定 PTX、VCR 对野生型结直肠癌细胞 HCT8、耐 PTX 细胞 HCT8/PTX 及耐 VCR 细胞 HCT8/VCR、稳定敲低 Bcl-2 基因的转基因耐药细胞系的增殖能力。**结果** HCT8/PTX、HCT8/VCR 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显高于 HCT8 细胞, PTX、VCR 或 Bcl-2 抑制剂单一处理与共处理均可促使耐药细胞增殖活力下降, 而且敲减或药理性抑制 Bcl-2 蛋白表达可有效逆转结直肠癌细胞的耐药表型。**结论** 抗凋亡蛋白 Bcl-2 在 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞中高表达是引起细胞产生耐药的原因。

[关键词] 结直肠癌; 耐药细胞; B 淋巴细胞瘤-2; 紫杉醇; 长春新碱

[中图分类号] R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2026)03-0521-10

Study on the effect of anti-apoptotic protein Bcl-2 on resistance to tubulin inhibitors in colorectal cancer cells*

ZHU Qinmin¹, YANG Donglin², WU Chunrong³, ZHANG Yaqian¹, DU Huihui^{1△}

[1. College of Biological and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China; 2. College of Pharmacy (International Academy of Targeted Therapeutics and Innovation), Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160, China; 3. Department of Oncology, Chongqing University Jiangjin Hospital (Jiangjin Central Hospital of Chongqing), Chongqing 402260, China]

[Abstract] **Objective** To construct stable Bcl-2 knockdown transgenic cell lines using colorectal cancer drug-resistant cell lines [HCT8/paclitaxel (PTX), HCT8/vincristine (VCR)] and analyze the effects of Bcl-2 inhibitors (AT101, obatoclox) and Bcl-2 protein downregulation on the resistance mechanisms to PTX and VCR. **Methods** Western blot was used to detect the expression levels of kinase, apoptosis, and autophagy-related proteins in drug-resistant and parental colorectal cancer cell lines, as well as Bcl-2 expression in stable Bcl-2 knockdown resistant cell lines. The proliferative capacity of PTX and VCR on wild-type colorectal cancer cells (HCT8), PTX-resistant cells (HCT8/PTX), VCR-resistant cells (HCT8/VCR), and stable Bcl-2 knockdown transgenic resistant cell lines was assessed by MTT assay, colony formation assay, and EdU staining. **Results** The expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly higher in HCT8/PTX and HCT8/VCR cells than in HCT8 cells. Treatment with PTX, VCR, or Bcl-2 inhibitors alone or in combination reduced the proliferative activity of drug-resistant cells. Moreover, knockdown or pharmacological inhibition of Bcl-2 effectively reversed the drug-resistant phenotype of colorectal cancer cells. **Conclusion** High expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in HCT8/PTX and HCT8/VCR cells contributes to drug resistance.

[Key words] colorectal cancer; drug-resistant cells; Bcl-2; paclitaxel; vincristine

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大 常见恶性肿瘤, 其发病率和死亡率较高^[1]。CRC 发病

* 基金项目: 重庆市自然科学基金创新发展联合基金项目(CSTB2024NSCQ-LMX0022); 重庆市科学技术局自然科学基金项目(CSTB2024NSCQ-MSX0769)。△ 通信作者, E-mail: duhuihui2010@163.com。

机制涉及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)等信号通路^[2-3],临床上主要以手术切除、化疗为治疗手段,超过 90%的转移性癌症患者可能因化疗耐药性而导致疗效降低^[4],靶向阻断丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)、VEGF 等信号通路可进行高疗效、低毒性的治疗,但仍难以避免因耐药导致的疗效受限^[5]。

微管由微管蛋白组成,参与细胞有丝分裂,是研究抗肿瘤药物重要靶点之一^[6]。研究发现,微管蛋白抑制剂紫杉醇(paclitaxel, PTX)和长春新碱(vincristine, VCR)均可通过破坏微管结构,抑制 CRC 细胞体外侵袭和体内转移,诱导 CRC 细胞周期阻滞进而引发凋亡^[7-8]。CRC 细胞对 VCR、PTX 产生耐药性的问题日益突出,严重影响药物疗效^[9-11]。B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族蛋白(促凋亡 BH3-only 蛋白、抗凋亡蛋白、凋亡效应因子)参与线粒体通路介导细胞凋亡过程,在 CRC 细胞中常呈现异常表达,这可能是导致 CRC 出现耐药性的关键因素^[12-15]。Bcl-2 上调能抑制细胞凋亡与自噬,且与多种药物耐药有关^[16-17]。SHEN 等^[18]发现 ML264 通过抑制 Bcl-2/半胱天冬酶 3 通路影响奥沙利铂诱导的 CRC 细胞凋亡,增强 CRC 对奥沙利铂的敏感性。但目前抗凋亡蛋白 Bcl-2 在 CRC 微管蛋白耐药中的作用研究相对较少。

因此,分析 CRC 细胞对微管蛋白抑制剂耐药的具体机制并寻找有效的耐药逆转策略,对提高药物敏感性、改善 CRC 患者的预后具有重要意义。本研究旨在探讨微管蛋白抑制剂与 Bcl-2 抑制剂单一治疗或联合应用对 CRC 细胞耐药的影响,并分析引起 CRC 细胞耐药的可能原因,为探究 CRC 耐药的治疗靶点提供新思路。

1 材料

1.1 细胞

CRC 细胞 HCT8(货号:CBP60030,南京科佰生物科技有限公司)、耐药细胞株 HCT8/PTX、HCT8/VCR(重庆文理学院创新靶向药物国际研究院)、HEK293T 细胞(货号:CBP30277L,南京科佰生物科技有限公司)。

1.2 试剂

PTX、VCR(货号:K755161、K755980,上海笛柏生物科技有限公司);RPMI-1640 培养基(货号:PM150110,武汉普诺赛生物科技有限公司);胰酶、细胞培养用青霉素-链霉素、BeyoClick™EdU-594 细胞增殖检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、结晶紫染色液(货号:C0203、ST488S、C00078S、P0009、ST1537、

C0121,上海碧云天生物科技有限公司);20×PBS 缓冲液(货号:B548117,上海生工生物工程有限公司);抗体聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)、Raf 激酶 A(A-Raf)、B-Raf、Bcl-XL(货号:9532T、4432S、14814S、2762S,美国 Cell Signaling Technology 公司), β -微管蛋白(β -tubulin)、ULK1(货号:10094-1-AP、20986-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);荧光二抗 IRDye®800 CW 标记的山羊抗小鼠二抗 IgG、IRDye®800 CW 标记的驴抗兔二抗 IgG(货号:926-32212、926-32213,美国 LI-COR 公司)。

1.3 仪器

常温冷冻台式离心机(型号:S14YA050BB027、1-14K,重庆瑞利电子仪器有限公司);光感遥控微孔板混匀仪、细胞 CO₂ 培养箱、制冰机、台式细胞计数仪(型号:H8KT24004、3111、XB70-FZ、AMQAX1000,美国 Thermo Scientific 公司);酶标仪(型号:Cycation,美国 BioTek 公司);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium lauryl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)垂直电泳系统(型号:1645050,美国 Bio-Rad 公司);倒置生物显微镜(型号:DP73,日本 Olympus 公司);双色红外荧光成像系统(型号:CLX-1862,美国 LI-COR 公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养

将 CRC 细胞 HCT8 及其耐药细胞株 HCT8/PTX、HCT8/VCR 贴壁培养于含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基中,将 HEK293T 细胞贴壁培养于含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,耐药细胞药物维持浓度为 1 μ mol/L。待细胞生长至对数生长期时,收集细胞用于后续实验。

1.4.2 构建稳定转染细胞系

将 PMD、PSP、shBcl-2 质粒转染至 HEK293T 细胞,并接种于 60 mm 培养皿中,48 h 后收集上清液,过滤后备用。取状态良好的 HCT8/PTX、HCT8/VCR 细胞,以每孔 2×10^6 个细胞接种于 60 mm 培养皿中,加入 3 mL 培养基,待细胞生长至 70%融合度时,加入 2 mL 收集的病毒溶液,并重新加入新鲜培养基,24 h 后更换培养基,并用 10 μ g 嘌呤霉素筛选 48 h,待细胞长好后收集细胞用于后续实验。

1.4.3 细胞增殖活力测定

为了评估 PTX、VCR 及 Bcl-2 抑制剂 AT101、obatoclax 对 HCT8、HCT8/PTX、HCT8/VCR、HCT8/PTX-shBcl-2、HCT8/VCR-shBcl-2 细胞耐药的影响,采用 MTT 法检测细胞增殖活力。实验分为对照组、仅 PTX 或 VCR 处理组、仅 Bcl-2 抑制剂处理组、PTX 或 VCR 与 Bcl-2 抑制剂共处理组。具体分组如下,药物处理组:HCT8(+PTX)、HCT8(+VCR)、

HCT8/PTX(+PTX)、HCT8/VCR(+VCR); HCT8/PTX(+PTX)、HCT8/PTX-shBcl-2(+PTX)、HCT8/VCR(+VCR)、HCT8/VCR-shBcl-2(+VCR); 仅 Bcl-2 抑制剂处理组: HCT8/PTX、HCT8/PTX(+AT101)、HCT8/PTX(+obatoclox)、HCT8/VCR、HCT8/VCR(+AT101)、HCT8/VCR(+obatoclox); 药物和 Bcl-2 抑制剂共处理组: HCT8/PTX(+PTX)、HCT8/PTX(+AT101+PTX)、HCT8/PTX(+obatoclox+PTX)、HCT8/VCR(+VCR)、HCT8/VCR(+AT101+VCR)、HCT8/VCR(+obatoclox+VCR); HCT8/PTX-shBcl-2(+PTX)、HCT8/PTX-shBcl-2(+AT101+PTX)、HCT8/PTX-shBcl-2(+obatoclox+PTX); HCT8/VCR-shBcl-2(+VCR)、HCT8/VCR-shBcl-2(+AT101+VCR)、HCT8/VCR-shBcl-2(+obatoclox+VCR)。

取状态良好的细胞, 分别加入 PTX、VCR。实验分为 4 组, 分别为 HCT8(+PTX)、HCT8(+VCR)、HCT8/PTX(+PTX)、HCT8/VCR(+VCR), 实验组药物浓度如下: Bcl-2 抑制剂最高浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, PTX、VCR 最高浓度 8 $\mu\text{mol/L}$, 均以 2 倍梯度稀释, 共 8 个浓度。取状态良好的细胞, 每组设置 3 个复孔, 按每孔 1×10^4 个细胞均匀接种于 96 孔板中。待细胞融合度达 50% 时, 加入药物处理 24 h, 随后加入 20 μL MTT, 孵育 4 h 后, 吸去培养基, 加入 200 μL DMSO 终止反应, 使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度 [$A_{(570)}$]。细胞存活率计算公式为: 细胞存活率 (%) = $A_{\text{待测孔}} / A_{\text{对照孔}} \times 100\%$ 。

1.4.4 克隆形成实验

为了评估 PTX、VCR、Bcl-2 抑制剂 AT101、obatoclox 对 HCT8、HCT8/PTX、HCT8/VCR、HCT8/PTX-shBcl-2、HCT8/VCR-shBcl-2 细胞体外增殖的影响, 进行克隆形成实验检测细胞增殖能力。实验分为对照组、仅 PTX 或 VCR 处理组、和仅 Bcl-2 抑制剂处理组以及 PTX 或 VCR 与 Bcl-2 抑制剂共处理组。具体分组同 MTT 实验一致。取状态良好的细胞, 每孔设 3 个复孔, 按 $2 \times 10^3/\text{L}$ 细胞密度接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 培养基, 培养 24 h 后, HCT8/PTX、HCT8/VCR、HCT8/PTX-shBcl-2、HCT8/VCR-shBcl-2 细胞分别用 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度处理 10 d [药物浓度根据 MTT 实验测得 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 的半数致死浓度 (IC_{50})], 随后吸去培养基, 用 PBS 洗 2 次, 并在室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再次洗涤后, 细胞用结晶紫染色 1 h, 观察集落形成情况, 洗涤多余的结晶紫, 随后用爱普生扫描仪观察分析集落形成情况, 并拍照。

1.4.5 EdU 染色实验

使用 BeyoClick™ EdU-594 细胞增殖检测试剂盒评估细胞增殖情况。实验分组同细胞增殖活力实验一致。取状态良好的细胞, 每孔设 3 个复孔, 按 $2 \times 10^3/\text{L}$ 细胞密度接种于 96 孔板中, 每孔加入 200 μL

培养基, 培养 24 h 后, HCT8/PTX、HCT8/VCR、HCT8/PTX-shBcl-2、HCT8/VCR-shBcl-2 分别用 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度处理 24 h, 随后加入 EdU 工作液 (EdU 工作液浓度按 1 : 500 稀释) 处理细胞 4 h, 之后在室温下用 Click 反应液染色 30 min, 再用 Hoechst 染色液染色 10 min, 随后使用免疫荧光显微镜观察分析细胞增殖情况, 并拍照。

1.4.6 Western blot

取状态良好的细胞, 按 $2 \times 10^6/\text{L}$ 细胞密度接种于 60 mm 培养皿中, 培养 24 h 后, 收集细胞用于后续实验。用预冷的 PBS 洗涤 1 次, 加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 样品在冰上裂解 20 min, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $15\,000 \times g$ 离心 15 min, 收集上清液。使用 BCA 试剂盒测定上清液中的蛋白质浓度。随后, 等量的蛋白质通过 10%~15% 的 SDS-PAGE 分离, 分离结束后将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上, 并在室温下与 5% 脱脂牛奶孵育 1 h, 接着在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与一抗孵育过夜。膜用 TBST 洗涤后, 在室温下与二抗孵育 1 h。最后, 膜在成像系统上显影。条带的灰度通过 Image J 软件分析。

1.5 统计学处理

采用 GraphPad Prism9 软件对数据进行分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

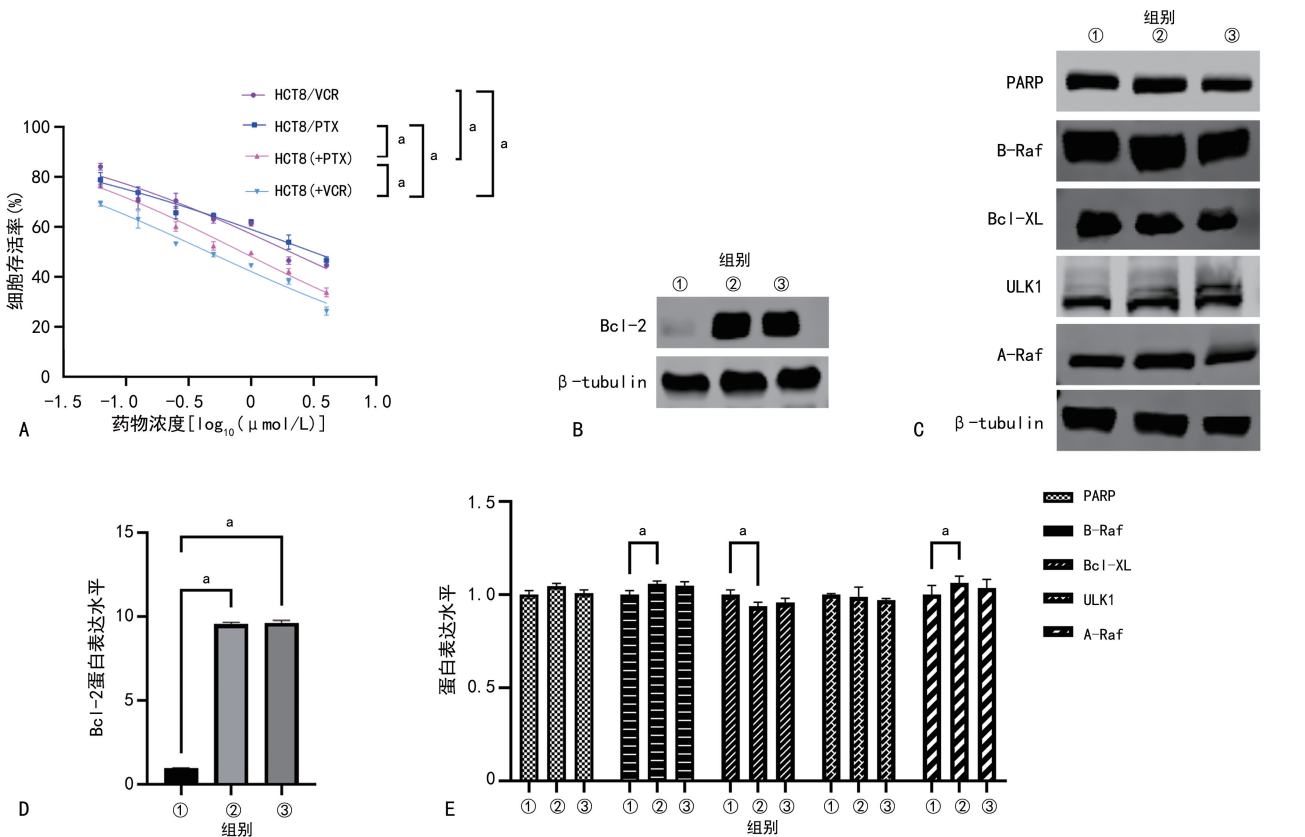
2.1 野生型和耐药 CRC 细胞株对 PTX 和 VCR 的敏感性分析

为明确野生型和耐药 CRC 细胞株对 PTX 和 VCR 的敏感性差异, 本研究采用 MTT 法分别检测了野生型 CRC 细胞 HCT8(+PTX)、HCT8(+VCR)、耐药细胞株 HCT8/PTX 及 HCT8/VCR 对 PTX 和 VCR 的药物敏感性。结果显示, HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞对相应药物的 IC_{50} 值分别为 3.121 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.051 $\mu\text{mol/L}$, 明显高于野生型 HCT8 细胞对 PTX (0.89 $\mu\text{mol/L}$) 和 VCR (0.54 $\mu\text{mol/L}$) 的 IC_{50} 值, 见图 1A。MTT 法结果显示, 两种耐药细胞的 IC_{50} 值分别较野生型提高了约 3.5 倍和 3.8 倍, 表明 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞对两种药物表现出低敏感性, 具有较强的耐药性。为进一步探讨上述耐药现象产生的分子机制, 采用 Western blot 检测了野生型及耐药细胞株中激酶、凋亡、自噬相关蛋白的表达变化。结果显示, 与野生型 HCT8 细胞相比, 耐药细胞株 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 中 PARP、Bcl-XL、ULK1、A-Raf、B-Raf 蛋白的表达水平无明显变化, 但抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达水平明显上调, 说明抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达的增加可能是导致 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞株对 PTX、VCR 产生耐药的重要原因之一, 见图 1B~E。

2.2 药理性抑制 Bcl-2 增加耐药细胞株对 PTX 和 VCR 的敏感性

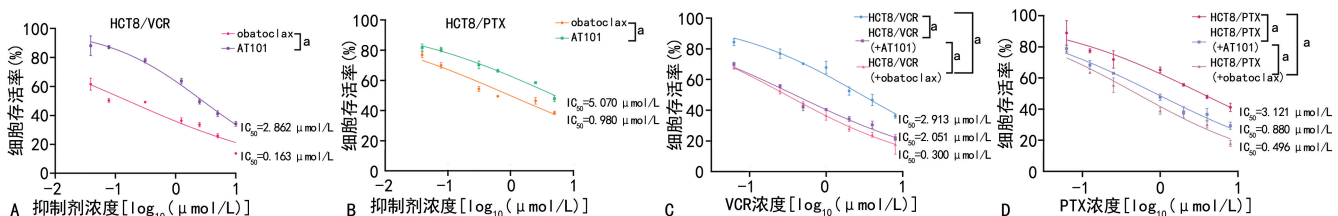
为了验证 Bcl-2 蛋白表达水平是否参与 CRC 细胞对 PTX 和 VCR 的耐药机制,本研究选用两种经典的 Bcl-2 抑制剂(AT101 和 obatoclax)分别处理耐药细胞株 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR,并通过 MTT 法检测细胞对药物敏感性的变化。AT101 抑制 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞的 IC_{50} 值分别为 $5.070 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.862 \mu\text{mol/L}$,obatoclax 抑制这两种细胞株的 IC_{50} 值分别降低至 $0.980 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.163 \mu\text{mol/L}$ 。进一步检测 PTX 和 VCR 分别对经 AT101 或 obatoclax 预处理后的耐药细胞株生长活力的影响,与单独药物处理组相比,加入 AT101 后,HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 对各自对应药物的 IC_{50} 值分别由 3.121 、 $2.051 \mu\text{mol/L}$

降低至 0.880 、 $0.390 \mu\text{mol/L}$;加入 obatoclax 后, IC_{50} 值降低至 0.496 、 $0.300 \mu\text{mol/L}$,表明药理性抑制 Bcl-2 蛋白表达明显增强了耐药细胞对 PTX 和 VCR 的敏感性。克隆形成实验表明,在相同浓度的 PTX 和 VCR 作用下,经 AT101 或 obatoclax 处理的 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞经不同浓度 PTX 或 VCR 处理,细胞的克隆形成数均明显减少,表明细胞增殖能力明显下降,见图 2~4。在 PTX 和 VCR 与 Bcl-2 抑制剂联合处理后,HCT8/PTX 与 HCT8/VCR 细胞的 EdU 阳性细胞数量明显降低($P < 0.05$),见图 5、6,且联合处理组 EdU 阳性率明显低于单独药物处理组($P < 0.05$)。这些结果进一步证实,药理性抑制 Bcl-2 可有效抑制耐药细胞的增殖能力,从而提高耐药 CRC 细胞株对 PTX 和 VCR 的敏感性。



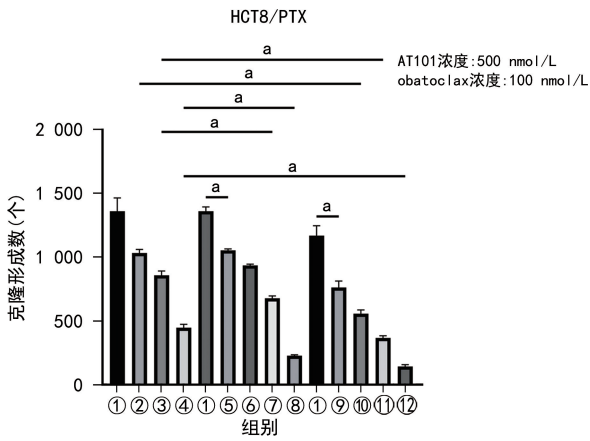
A: MTT 法测定 HCT8、HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞的 IC_{50} 值;B、C: Western blot 分析 3 株细胞中 Bcl-2、PARP、B-Raf、Bcl-XL、ULK1 和 A-Raf 蛋白的表达水平;D、E: 3 株细胞中各蛋白表达水平的定量比较;①: HCT8;②: HCT8/PTX;③: HCT8/VCR;^a: $P < 0.05$ 。

图 1 野生型与耐药 CRC 细胞株的增殖活力及相关蛋白表达水平检测



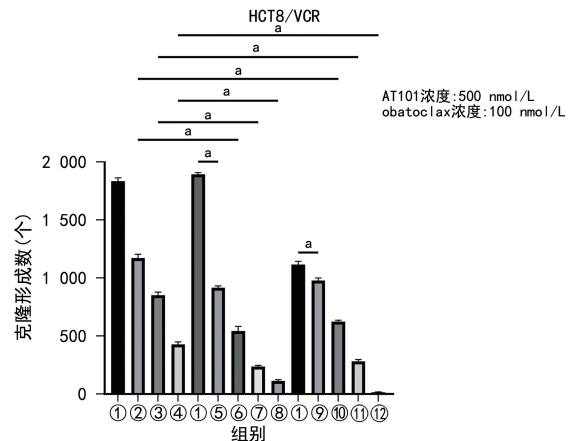
A、B: MTT 法检测不同浓度抑制剂对 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞活性的影响;C、D: MTT 法检测不同药物浓度下, HCT8/PTX、HCT8/VCR 细胞株及加抑制剂组的细胞活性。

图 2 MTT 法检测 Bcl-2 抑制剂对耐药 CRC 细胞活性的影响



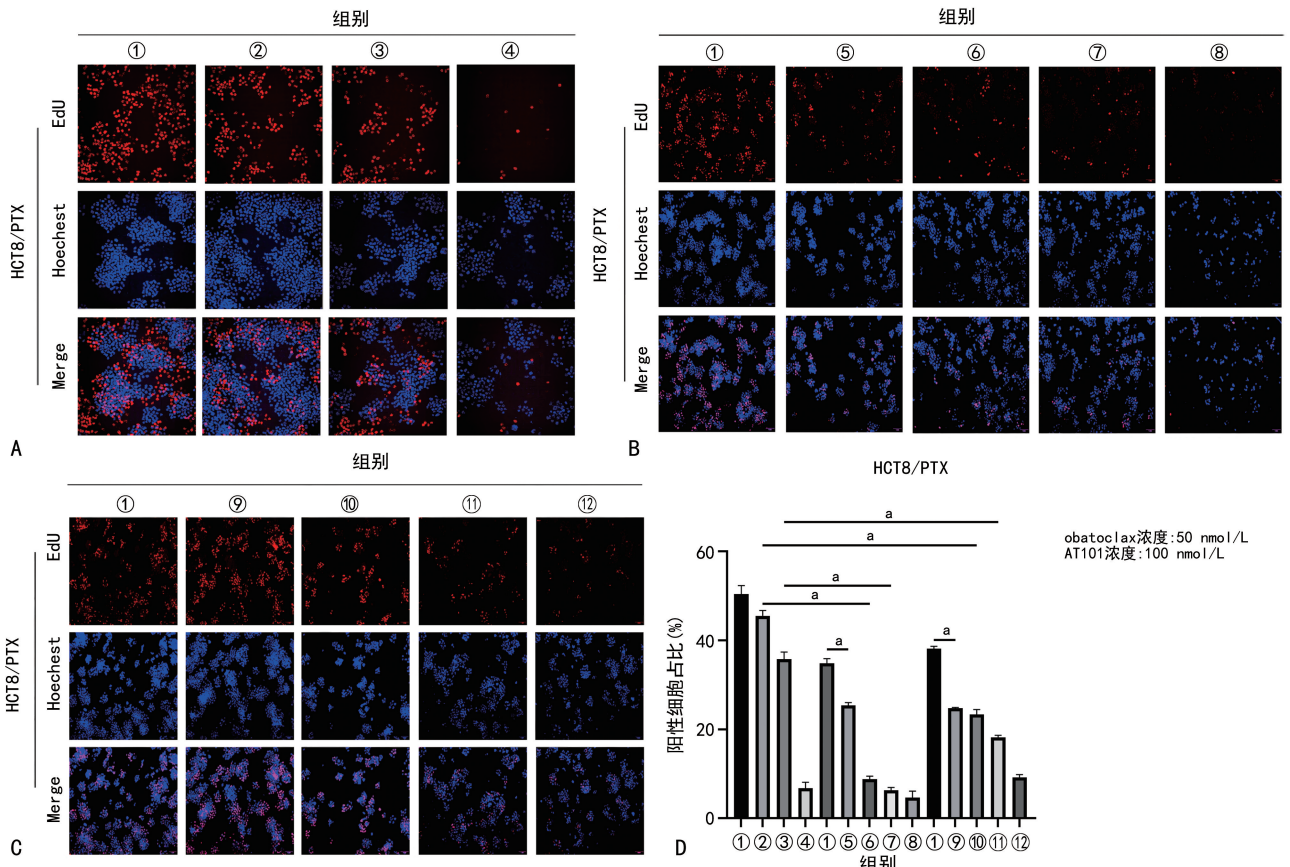
①:对照组;②:PTX 1 μmol/L 组;③:PTX 2 μmol/L 组;④:PTX 4 μmol/L 组;⑤:AT101 组;⑥:PTX 1 μmol/L+AT101 组;⑦:PTX 2 μmol/L+AT101 组;⑧:PTX 4 μmol/L+AT101 组;⑨:obatoclox 组;⑩:PTX 1 μmol/L+obatoclox 组;⑪:PTX 2 μmol/L+obatoclox 组;⑫:PTX 4 μmol/L+obatoclox 组;^a:*P*<0.05。

图 3 经抑制剂处理的 HCT8/PTX 细胞在不同药物浓度下的克隆形成数比较



①:对照组;②:VCR 1 μmol/L 组;③:VCR 2 μmol/L 组;④:VCR 4 μmol/L 组;⑤:AT101 组;⑥:VCR 1 μmol/L+AT101 组;⑦:VCR 2 μmol/L+AT101 组;⑧:VCR 4 μmol/L+AT101 组;⑨:obatoclox 组;⑩:VCR 1 μmol/L+obatoclox 组;⑪:VCR 2 μmol/L+obatoclox 组;⑫:VCR 4 μmol/L+obatoclox 组;^a:*P*<0.05。

图 4 经抑制剂处理的 HCT8/VCR 细胞在不同药物浓度下的克隆形成数比较



A:EdU 实验检测 HCT8/PTX 细胞增殖能力(4×);B:EdU 实验检测抑制剂 obatoclox 对 HCT8/PTX 细胞在不同药物浓度下增殖能力的影响(4×);C:EdU 实验检测抑制剂 AT101 对 HCT8/PTX 细胞在不同药物浓度下增殖能力的影响(4×);D:各组实验结果的统计学分析;①:对照组;②:PTX 1 μmol/L 组;③:PTX 2 μmol/L 组;④:PTX 4 μmol/L 组;⑤:obatoclox 组;⑥:PTX 1 μmol/L+obatoclox 组;⑦:PTX 2 μmol/L+obatoclox 组;⑧:PTX 4 μmol/L+obatoclox 组;⑨:AT101 组;⑩:PTX 1 μmol/L+AT101 组;⑪:PTX 2 μmol/L+AT101 组;⑫:PTX 4 μmol/L+AT101 组;^a:*P*<0.05。

图 5 EdU 实验检测靶向抑制剂对 HCT8/PTX 耐药细胞增殖能力的影响

2.3 敲低 Bcl-2 基因增加耐药细胞对 PTX 和 VCR 的敏感性

与各自亲本细胞株 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 相

比,敲低 Bcl-2 基因后的细胞株 HCT8/PTX-shBcl-2 和 HCT8/VCR-shBcl-2 中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,见图 7A,提示成功构建了 Bcl-2 基因稳定敲低的耐药细

胞模型;进一步通过 MTT 法测定了敲低 Bcl-2 后细胞对 PTX 和 VCR 的敏感性变化。PTX 处理后, HCT8/PTX 与 HCT8/PTX-shBcl-2 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 3.109、0.930 $\mu\text{mol/L}$; VCR 处理后, HCT8/VCR 与 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 2.354、0.818 $\mu\text{mol/L}$, 见图 7B、C; 敲低 Bcl-2 后的两株耐药细胞系对药物的敏感性明显提高。此外, 相同浓度梯度的药物处理后, 敲低 Bcl-2 的耐药细胞株存活率明显低于各自的亲本细胞, 说明 Bcl-2 蛋白表达水平下调明显削

弱了细胞的耐药性; 最后, 进一步采用克隆形成实验检测敲低 Bcl-2 基因后耐药细胞的增殖能力变化。PTX 和 VCR 处理后, HCT8/PTX-shBcl-2 和 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞的集落数量和大小均明显少于各自的亲本细胞系, 见图 7D、E, 表明敲低 Bcl-2 基因可明显抑制耐药细胞的增殖能力, 进而逆转细胞对药物的耐药表型。以上研究结果充分证实了 Bcl-2 蛋白在 CRC 细胞耐药机制中的关键作用, 下调 Bcl-2 蛋白表达可有效逆转耐药细胞株对 PTX 和 VCR 的耐药性。

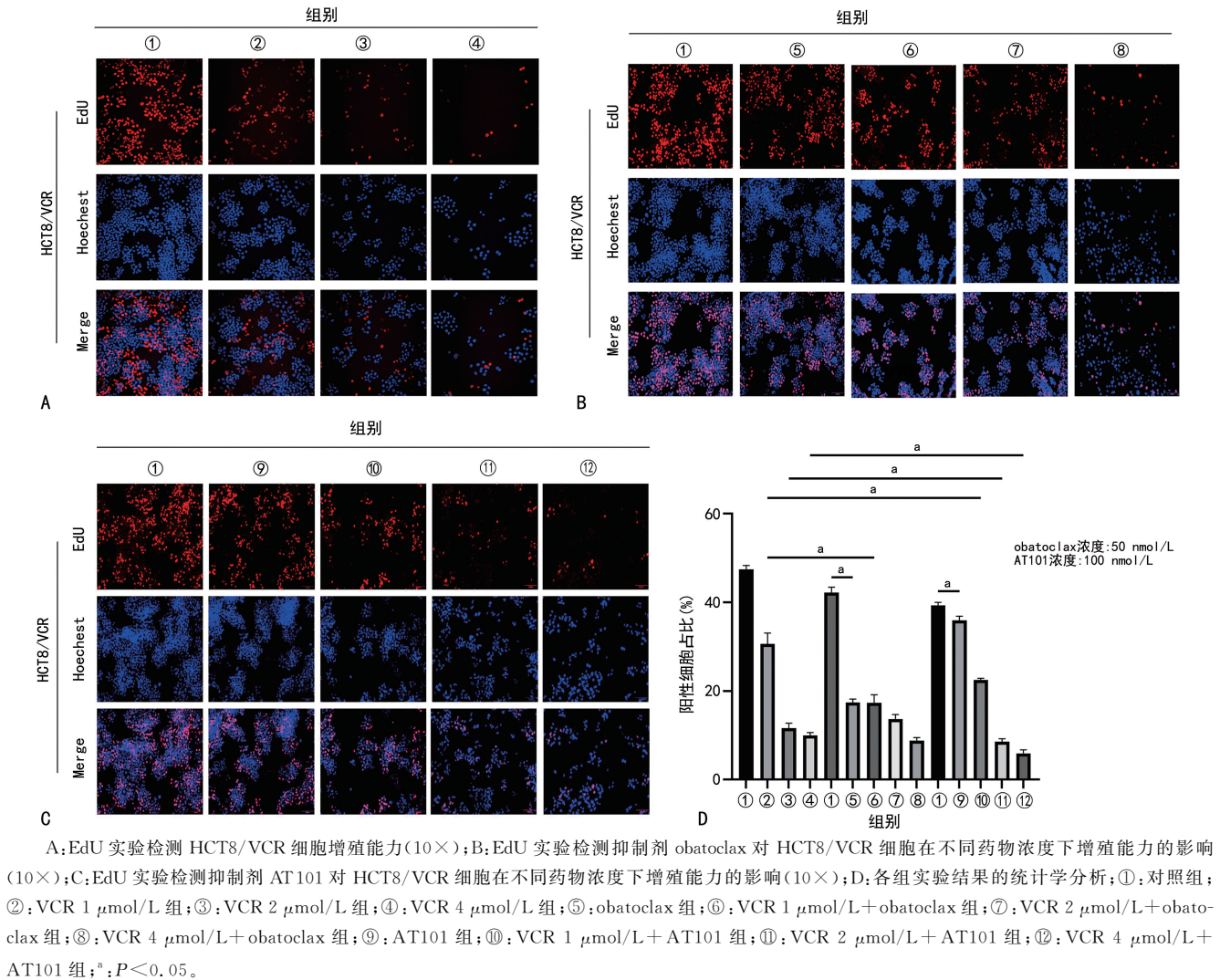


图 6 EdU 实验检测靶向抑制剂对 HCT8/VCR 细胞增殖能力的影响

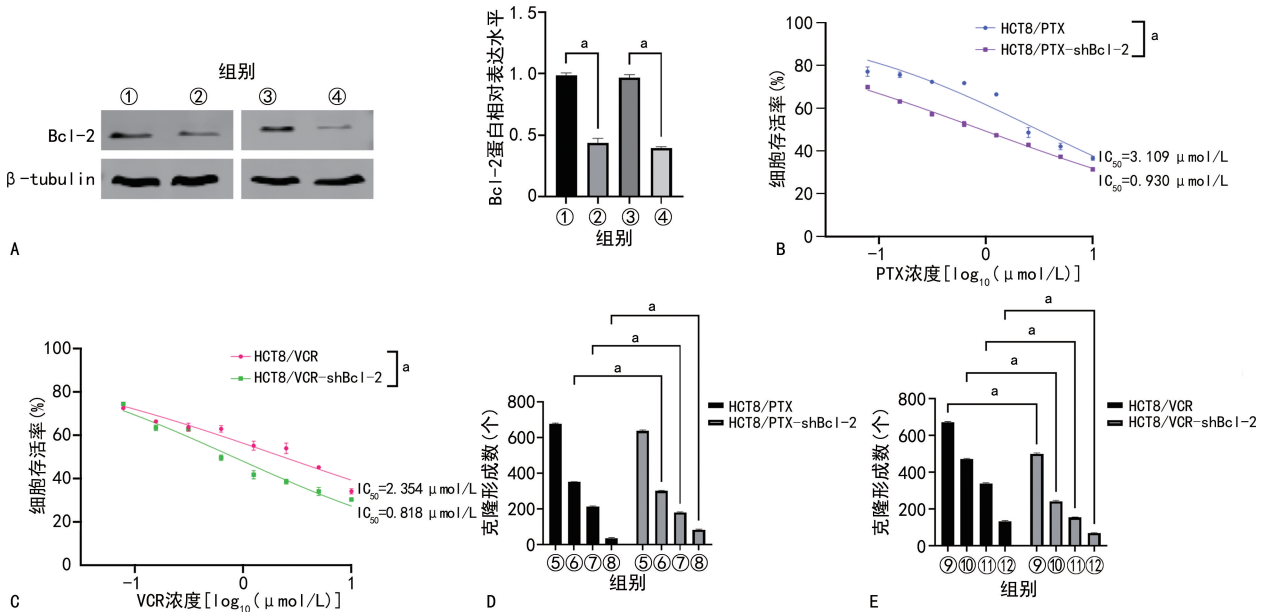
2.4 Bcl-2 蛋白介导耐药细胞对 PTX 和 VCR 的耐药性

为进一步明确 Bcl-2 蛋白表达水平与 CRC 耐药细胞对 PTX、VCR 耐药性的关联性, 利用 MTT 法分别检测了敲低 Bcl-2 基因后的耐药细胞株 HCT8/PTX-shBcl-2 和 HCT8/VCR-shBcl-2 在加入 Bcl-2 蛋白抑制剂 AT101 或 obatoclax 后的药物敏感性变化。结果显示, HCT8/PTX-shBcl-2 细胞分别在单独药物处理、联合 AT101、联合 obatoclax 处理条件下的 PTX IC_{50} 值分别为 0.933、0.103、0.003 $\mu\text{mol/L}$;

HCT8/VCR-shBcl-2 细胞分别在上述 3 种条件下的 VCR IC_{50} 值分别为 0.804、0.072、0.001 $\mu\text{mol/L}$ 。两种耐药细胞的存活率均表现为剂量依赖性降低, 且在联合 Bcl-2 抑制剂 AT101 或 obatoclax 处理后细胞存活率进一步下降, 显示出更高的药物敏感性, 见图 8。克隆形成实验和 EdU 染色实验验证 Bcl-2 表达水平降低对细胞增殖能力的影响, 结果显示, HCT8/PTX-shBcl-2 和 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞的克隆形成数随 PTX 和 VCR 浓度升高而明显减少。与单独药物处理组相比, 在药物与 Bcl-2 抑制剂联用条件下, 两株耐

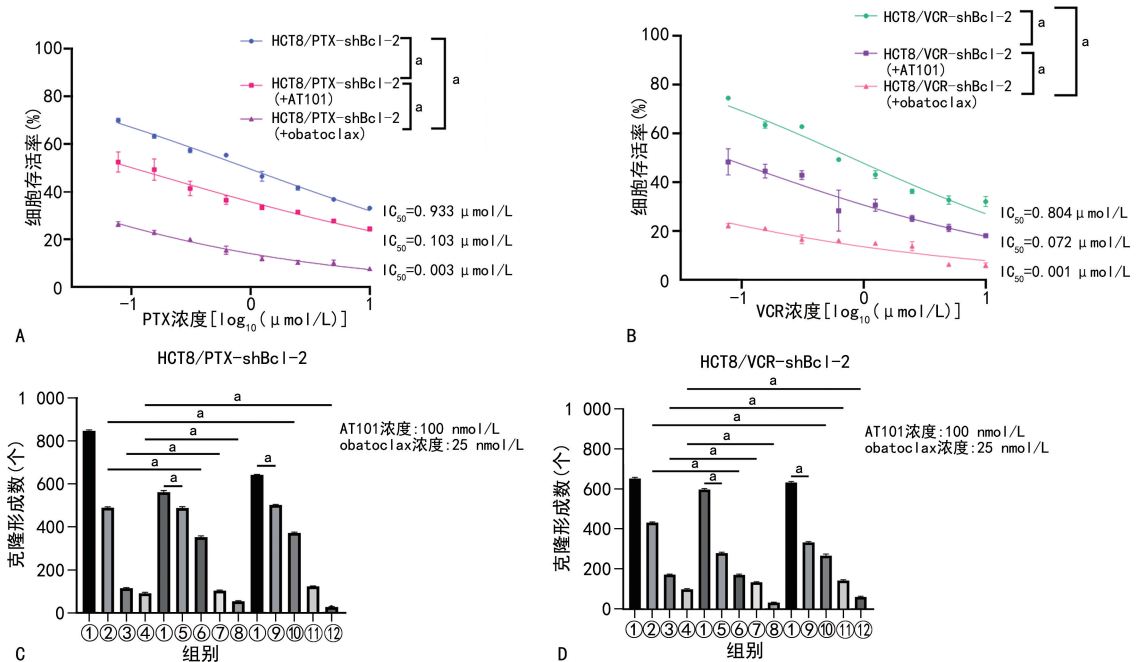
药细胞的克隆形成进一步减少,表现出更强的药物敏感性。EdU 染色实验结果同样表明,HCT8/PTX-sh-Bcl-2 和 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞的 EdU 阳性细胞比例随着 PTX 和 VCR 浓度增加而呈剂量依赖性降

低;与单独药物处理组相比,联合 Bcl-2 抑制剂 AT101 或 obatoclastax 处理后 EdU 阳性细胞比例进一步明显降低,细胞增殖活力明显下降,见图 9、10。



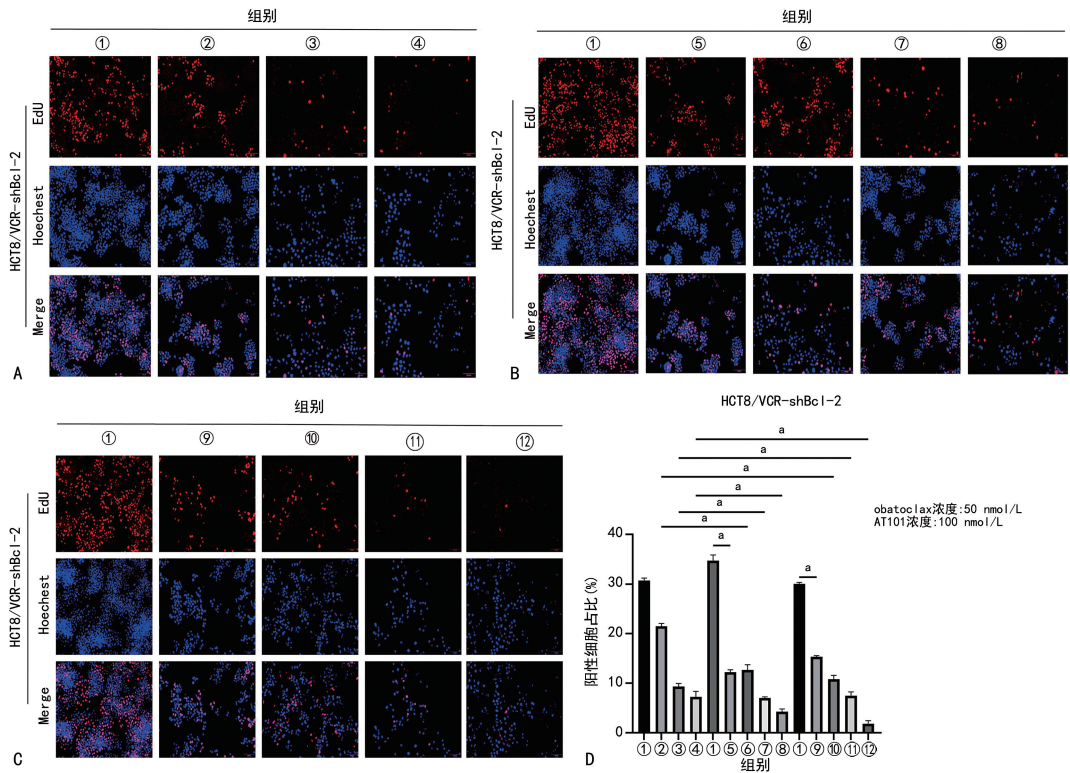
A: Western blotting 检测 Bcl-2 在亲本耐药细胞系 (HCT8/PTX、HCT8/VCR) 与 Bcl-2 敲低细胞系 (HCT8/PTX-shBcl-2、HCT8/VCR-shBcl-2) 中的表达水平; ①: HCT8/PTX 组; ②: HCT8/PTX-shBcl-2 组; ③: HCT8/VCR 组; ④: HCT8/VCR-shBcl-2 组; B、C: MTT 法检测不同药物浓度下, 亲本耐药细胞系及 Bcl-2 敲低细胞系的耐药活性; C 和 D: 克隆形成实验检测药物处理后亲本耐药细胞系与 Bcl-2 敲低细胞系的增殖能力变化; ⑤: PTX 0 $\mu\text{mol/L}$ 组; ⑥: PTX 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; ⑦: PTX 2 $\mu\text{mol/L}$ 组; ⑧: PTX 4 $\mu\text{mol/L}$ 组; ⑨: VCR 0 $\mu\text{mol/L}$ 组; ⑩: VCR 1 $\mu\text{mol/L}$ 组; ⑪: VCR 2 $\mu\text{mol/L}$ 组; ⑫: VCR 4 $\mu\text{mol/L}$ 组; ^a: $P < 0.05$ 。

图 7 PTX 和 VCR 对亲本耐药细胞系及 Bcl-2 干扰细胞系活性和增殖能力的影响



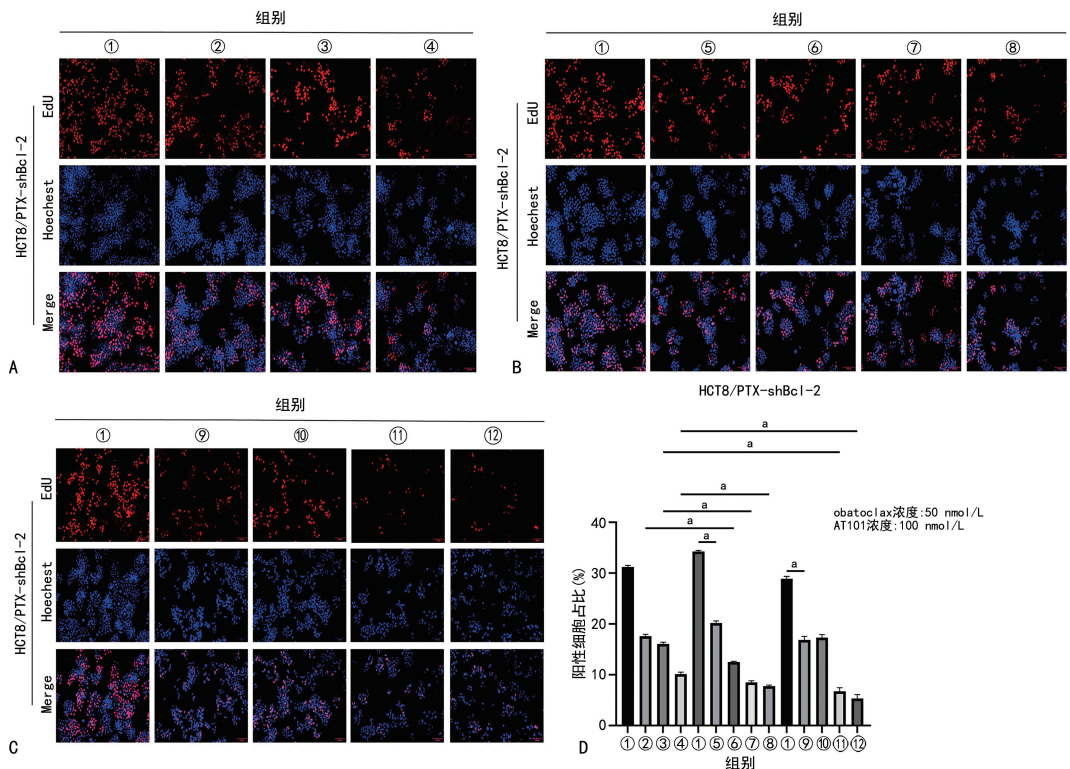
A、B: MTT 法检测 PTX 和 VCR 对 Bcl-2 敲低细胞系及其联合 Bcl-2 抑制剂 (AT101 或 obatoclastax) 处理后的细胞活性影响; C、D: 克隆形成实验测定上述细胞系在 PTX 和 VCR 药物处理后的增殖能力变化, 药物浓度分别为 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$; C 中 ①~⑫ 分别代表对照组 1、PTX 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、PTX 2 $\mu\text{mol/L}$ 组、PTX 4 $\mu\text{mol/L}$ 、AT101 组、PTX 1 $\mu\text{mol/L}$ +AT101 组、PTX 2 $\mu\text{mol/L}$ +AT101 组、PTX 4 $\mu\text{mol/L}$ +AT101 组、obatoclastax 组、PTX 1 $\mu\text{mol/L}$ +obatoclastax 组、PTX 2 $\mu\text{mol/L}$ +obatoclastax 组、PTX 4 $\mu\text{mol/L}$ +obatoclastax 组; D 中 ①~⑫ 分别代表对照组 2、VCR 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、VCR 2 $\mu\text{mol/L}$ 组、VCR 4 $\mu\text{mol/L}$ 组、AT101 组、VCR 1 $\mu\text{mol/L}$ +AT101 组、VCR 2 $\mu\text{mol/L}$ +AT101 组、VCR 4 $\mu\text{mol/L}$ +AT101 组、obatoclastax 组、VCR 1 $\mu\text{mol/L}$ +obatoclastax 组、VCR 2 $\mu\text{mol/L}$ +obatoclastax 组、VCR 4 $\mu\text{mol/L}$ +obatoclastax 组; ^a: $P < 0.05$ 。

图 8 PTX 和 VCR 对 Bcl-2 蛋白下调后 CRC 耐药细胞的活性与增殖影响



A: EdU 实验检测 VCR 对 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞增殖的影响(10×); B: EdU 实验检测 VCR 联合 Bcl-2 抑制剂 obatoclax 对 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞增殖的影响(10×); C: EdU 实验检测 VCR 联合 Bcl-2 抑制剂 AT101 对 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞增殖的影响(10×); D: 各组实验结果的统计学分析; ①: 对照组; ②: VCR 1 μmol/L 组; ③: VCR 2 μmol/L 组; ④: VCR 4 μmol/L 组; ⑤: obatoclax 组; ⑥: VCR 1 μmol/L+obatoclax 组; ⑦: VCR 2 μmol/L+obatoclax 组; ⑧: VCR 4 μmol/L+obatoclax 组; ⑨: AT101 组; ⑩: VCR 1 μmol/L+AT101 组; ⑪: VCR 2 μmol/L+AT101 组; ⑫: VCR 4 μmol/L+AT101 组; ^a: P<0.05。

图 9 EdU 实验检测 VCR 对 HCT8/VCR-shBcl-2 细胞及其联合靶向抑制剂处理后细胞增殖的影响



A: EdU 实验检测 PTX 对 HCT8/PTX-shBcl-2 细胞增殖的影响(10×); B: EdU 实验检测 PTX 联合 Bcl-2 抑制剂 obatoclax 对 HCT8/PTX-shBcl-2 细胞增殖的影响(10×); C: EdU 实验检测 PTX 联合抑制剂 AT101 对 HCT8/PTX-shBcl-2 细胞增殖影响(10×); D: 各组实验结果的统计学分析; ①: 对照组; ②: PTX 1 μmol/L 组; ③: PTX 2 μmol/L 组; ④: PTX 4 μmol/L 组; ⑤: obatoclax 组; ⑥: PTX 1 μmol/L+obatoclax 组; ⑦: PTX 2 μmol/L+obatoclax 组; ⑧: PTX 4 μmol/L+obatoclax 组; ⑨: AT101 组; ⑩: PTX 1 μmol/L+AT101 组; ⑪: PTX 2 μmol/L+AT101 组; ⑫: PTX 4 μmol/L+AT101 组; ^a: P<0.05。

图 10 EdU 染色实验检测 PTX 对 HCT8/PTX-shBcl-2 细胞及其联合靶向抑制剂处理后细胞增殖的影响

3 讨 论

CRC 是消化系统中常见的恶性肿瘤,临床常用化疗来治疗和改善患者预后,但在治疗过程中可能会出现药物抵抗,从而限制疗效^[19]。因此,探讨降低癌细胞耐药性及增加耐药癌细胞对抗癌药物的敏感性,仍是目前研究的关键问题。细胞凋亡是细胞程序性死亡的调控机制,是维持细胞稳态及生理健康的关键过程^[20],而这一过程由 Bcl-2 蛋白家族高度调控。微管抑制剂会诱导微管损伤,导致 Bcl-2 位点发生磷酸化,使细胞周期阻滞在 G₂/M 期,且 Bcl-2 蛋白磷酸化过程独立于蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、JNK 激酶通路,需要 Mps1 激酶参与有丝分裂,这表明这些蛋白的磷酸化是由线粒体活性的有丝分裂激酶介导,微管靶向药物是通过诱导细胞有丝分裂停滞从而影响肿瘤细胞增殖效应的^[21-22]。MENG 等^[23]发现 miR-206 靶向 Bcl-2 介导 CRC 的化疗耐药、增殖和凋亡。而本研究发现 Bcl-2 在 CRC 耐药细胞中呈现高表达,敲减或靶向抑制 Bcl-2 表达均可抑制 CRC 耐药细胞增殖,逆转 CRC 细胞的耐药表型。这些研究结果均提示,靶向 Bcl-2 不仅有助于诱导癌细胞凋亡,也可能成为克服耐药性的重要策略。

本研究发现,野生型 CRC 细胞对 PTX、VCR 表现出高敏感性,而耐药细胞则表现出低敏感性。研究报道卡培他滨与多西他赛联用可通过抑制 Bcl-2、c-Myc 和 Akt2 信号通路,格列宁可通过下调 Bcl-2 和 Mcl-1 等抗凋亡因子表达,以此增强前列腺癌、卵巢癌对抗肿瘤药物的敏感性^[24-25]。研究结果提示,可通过靶向抑制 Bcl-2 蛋白的表达,逆转癌细胞的耐药活性,增强对药物的敏感性,这与本研究敲减或靶向抑制 Bcl-2 表达,从而分析 CRC 耐药细胞 Bcl-2 的表达与 PTX、VCR 耐药性间的关系相一致。大多研究发现,可通过有效抑制 Bcl-2 表达从而阻止耐药细胞增殖,且能增强耐药细胞对药物的敏感性,但鲜有文献报道 Bcl-2 与 CRC 耐药细胞耐药性的关联,而本研究发现 Bcl-2 在耐 PTX 细胞 HCT8/PTX 和耐 VCR 细胞 HCT8/VCR 中高表达,表明抗凋亡蛋白 Bcl-2 高表达可能是导致 HCT8/PTX 和 HCT8/VCR 细胞株对微管蛋白抑制剂产生耐药的重要原因之一。WANG 等^[26]发现通过靶向抑制抗凋亡转运蛋白 RLIP76 在 CRC 耐药细胞中的表达,能明显增强细胞对 VCR 的敏感性。WANG 等^[27]发现 Cx43 在 CRC 细胞中过表达,能明显增加 CRC 细胞对 PTX 的敏感性。而本研究发现,敲低 CRC 耐药细胞中 Bcl-2 基因后,与亲本株相比其耐药性进一步降低,表明抑制 Bcl-2 表达后能增强耐药细胞对微管药物的敏感性,这与其他耐

药癌细胞研究得出的结论一致。但本研究发现 Bcl-2 高表达是引起 CRC 细胞耐药株耐药的原因之一,使用 Bcl-2 抑制剂或敲低 Bcl-2 基因均能抑制耐药细胞的增殖,且下调 Bcl-2 表达可有效逆转耐药细胞株对 PTX 和 VCR 的耐药性。然而,目前对 Bcl-2 介导的具体分子机制了解有限,尚缺乏系统的信号通路解析,且本研究尚未开展动物实验进行体内验证。

综上所述,本研究结果证实了 Bcl-2 在 CRC 细胞耐药机制中的关键作用,下调 Bcl-2 表达可有效逆转耐药细胞株对 PTX 和 VCR 的耐药性,明确了敲减或药理性抑制 Bcl-2 蛋白表达可有效逆转 CRC 细胞的耐药表型。因此,此次关于抗凋亡蛋白 Bcl-2 介导 CRC 耐药细胞耐药作用的研究,将为 CRC 耐药疗效限制方面提供治疗靶点,以期为提高微管药物治疗癌症疗效提供新思路,为后续解析 CRC 耐药机制奠定基础。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 胡洋,胡素芹,曾朔,等.基于 TGF- β 信号通路探讨中医药治疗结直肠癌的研究进展[J].中国中药杂志,2025,50(21):5956-5967.
- [2] LI H X, SUN X Y, YANG S M, et al. Peroxiredoxin 1 promoted tumor metastasis and angiogenesis in colorectal cancer [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(5): 655-660.
- [3] 李瑞,袁宇,蔡挺.结直肠癌发病机制及中西医治疗研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(1): 289-297.
- [4] MA S C, ZHANG J Q, YAN T H, et al. Novel strategies to reverse chemoresistance in colorectal cancer [J]. Cancer Med, 2023, 12(10): 11073-11096.
- [5] 魏才杰,屠文英,李云霞,等.转移性结直肠癌靶向治疗和免疫治疗的研究进展[J].中国肿瘤临床, 2025, 52(8): 420-426.
- [6] 魏少荫,李敏.微管抑制剂那可丁及其衍生物的抗肿瘤作用研究进展[J].中国新药杂志, 2006, 15(15): 1238-1243.
- [7] ZHAO L, ZHANG D, SHEN Q, et al. KIAA1199 promotes metastasis of colorectal cancer cells via microtubule destabilization regulated by a PP2A/stathmin pathway [J]. Oncogene, 2019, 38(7): 935-949.
- [8] WAWRO M E, SOBIERAJSKA K, CISZEWS-

- KI W M, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent vincristine-dependent cancer-associated fibroblasts formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8):1941.
- [9] DONG W, WANG F, LIU Q, et al. Downregulation of miRNA-14669 reverses vincristine resistance in colorectal cancer cells through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2022, 17(2):178-186.
- [10] 陈炳辰, 于恩达. 增强紫杉醇对结直肠癌化疗疗效的研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(6):501-505.
- [11] GUZMÁN E A, XU Q, PITTS T P, et al. Leiodermatolide, a novel marine natural product, has potent cytotoxic and antimetabolic activity against cancer cells, appears to affect microtubule dynamics, and exhibits antitumor activity [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(9):2116-2126.
- [12] RAMESH P, MEDEMA J P. Bcl-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy [J]. *Apoptosis*, 2020, 25(5/6):305-320.
- [13] MUSTAFA M, AHMAD R, TANTRY I Q, et al. Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications [J]. *Cells*, 2024, 13(22):1838.
- [14] 张双, 周惠芳, 刘玉楠, 等. 加味地黄汤调控 Bcl-2 相关线粒体凋亡信号通路改善小鼠卵巢储备功能的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(24):6493-6501.
- [15] KALONI D, DIEPSTRATEN S T, STRASSER A, et al. Bcl-2 protein family: attractive targets for cancer therapy [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(1/2):20-38.
- [16] PALABIYIK A. The role of Bcl-2 in controlling the transition between autophagy and apoptosis (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2025, 32(1):1-9.
- [17] 盛宋昊然, 李玉斌, 郭家成, 等. 槐耳清膏通过氧化应激诱导结直肠癌细胞发生线粒体途径凋亡 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(12):3320-3329.
- [18] SHEN X, ZHANG Y, XU Z, et al. KLF5 inhibition overcomes oxaliplatin resistance in patient-derived colorectal cancer organoids by restoring apoptotic response [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4):303.
- [19] ZHANG X, HE L, LI Y, et al. Compound 225 # inhibits the proliferation of human colorectal cancer cells by promoting cell cycle arrest and apoptosis induction [J]. *Oncol Rep*, 2024, 51(5):70.
- [20] DAKKAK B E, TANEERA J, EL-HUNEIDI W, et al. Unlocking the therapeutic potential of Bcl-2 associated protein family: exploring Bcl-2 inhibitors in cancer therapy [J]. *Biomol Ther*, 2024, 32(3):267-280.
- [21] PATHAN N, AIME-SEMPE C, KITADA S, et al. Microtubule-targeting drugs induce Bcl-2 phosphorylation and association with Pin1 [J]. *Neoplasia*, 2001, 3(6):550-559.
- [22] MELLOR H R, ROUSCHOP K M, WIGFIELD S M, et al. Synchronised phosphorylation of BNIP3, Bcl-2 and Bcl-xL in response to microtubule-active drugs is JNK-independent and requires a mitotic kinase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(11):1562-1572.
- [23] MENG X, FU R. miR-206 regulates 5-FU resistance by targeting Bcl-2 in colon cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:1757-1765.
- [24] FU Y K, WANG B J, TSENG J C, et al. Combination treatment of docetaxel with caffeic acid phenethyl ester suppresses the survival and the proliferation of docetaxel-resistant prostate cancer cells via induction of apoptosis and metabolism interference [J]. *J Biomed Sci*, 2022, 29(1):16.
- [25] BAE S, BAE S, KIM H S, et al. Deguelin restores paclitaxel sensitivity in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells via inhibition of the EGFR signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2024, 16:507-525.
- [26] WANG W, LIU J, QI J, et al. Downregulation of RLIP76 is associated with vincristine resistance in human colorectal cancer HCT-8/VCR cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4):1505-1512.
- [27] WANG S, ZHANG S, ZHAO Z, et al. Connexin 43 enhances paclitaxel cytotoxicity in colorectal cancer cell lines [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2):1212-1218.