

• 基础实验研究论著 •

胰岛素抵抗与肝癌细胞化疗敏感性降低的关系及机制研究^{*}

李林静^{1,2}, 李光迪¹, 刘玉梅¹, 李 飞¹, 杨佩琦¹, 刘玉凤¹, 石 翀¹, 刘玮玮¹, 魏虎来^{2Δ}

(1. 兰州大学第二医院检验科, 甘肃兰州 730000; 2. 兰州大学基础医学院医学实验中心, 甘肃兰州 730000)

摘 要:目的 建立稳定胰岛素抵抗肝癌(HepG2/IR)细胞模型,探讨模型细胞内质网应激伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)表达及其对顺铂的敏感性的关系。方法 采用 0.5、1.0 μmol/L 胰岛素诱导 HepG2 细胞发生胰岛素抵抗,日立 7600 全自动生化仪检测培养上清液中的葡萄糖水平并计算葡萄糖消耗量;MTT 法测定顺铂对细胞的增殖抑制作用,Annexin V/PI 双标记检测细胞的凋亡率;实时荧光定量 PCR、流式细胞术和 Western-Blot 法分别测定细胞胰岛素受体(InsR)及 GRP78 的表达水平。结果 HepG2/IR 细胞葡萄糖消耗量降低、InsR 表达显著受抑,对顺铂的敏感性降低,48 h 和 72 h 的 IC₅₀ 为未作诱导处理 HepG2 细胞的 165.9% 和 158.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$),凋亡率降低 50.29%。HepG2/IR 细胞 GRP78 mRNA 和蛋白的表达量分别为 HepG2 细胞的 2.12 倍和 2.27 倍。结论 肝癌 HepG2 细胞经胰岛素诱导发生胰岛素抵抗后对顺铂的耐药性增强,其机制与内质网应激伴侣蛋白 GRP78 的表达增高有关。

关键词:肝癌; 胰岛素抵抗; 顺铂; 葡萄糖调节蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)17-2273-03

The relationship of insulin resistance and reduced susceptibility to chemotherapy in hepatoma cells and its mechanism^{*}

Li Linjing^{1,2}, Li Guangdi¹, Liu Yumei¹, Li Fei¹, Yang Peiqi¹, Liu Yufeng¹, Shi Chong¹, Liu Weiwei¹, Wei Hulai^{2Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. Medical Experimental Center, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract:Objective To establish the insulin resistant HepG2(HepG2/IR) cells model, and investigate the relationship of insulin resistance and reduced susceptibility to chemotherapy in hepatoma cells and its mechanism. **Methods** HepG2 cells were cultured in medium containing 0.5 μmol/L insulin for different hours to induce insulin resistance. Glucose consumption of HepG2/IR cells were measured by Hitachi 7600 automatic biochemical analyzer. The cis-dichlorodiamineplatinum(DDP) sensitivity of the HepG2 and HepG2/IR cells were determined by MTT assay, the Annexin V/PI assay was adopted to measure the apoptosis rate. In addition, real-time PCR, flow cytometry (FCM) and Western-Blot were employed to detect the mRNA and protein levels of insulin receptor(InsR) and endoplasmic reticulum chaperonin 78(GRP78). **Results** The glucose consumption decreased and expression of InsR was down-regulated in HepG2/IR cells. The HepG2/IR cells had reduced sensitivity to DDP ($P < 0.05$). The IC₅₀ s of the HepG2/IR cells treated by DDP for 48 h and 72 h were 158.8% and 165.9% of HepG2 cells respectively, while the apoptosis rate was 50.29% lower. The mRNA and protein level of GRP78 in HepG2/IR cells were 2.12 and 2.27 times of that in HepG2 cells. **Conclusion** The stable HepG2/IR cells showed stronger resistance to DDP were established from HepG2 cell induced with insulin, and its mechanism may be related to the increased expression of GRP78.

Key words: liver cancer; insulin resistance; cis-dichlorodiamineplatinum; glucose regulated protein

胰岛素抵抗(IR)表现为机体整体、器官、组织或细胞对胰岛素的敏感性和反应性降低,糖代谢紊乱的慢性病理过程^[1]。研究表明 IR 与肿瘤耐药性发生关系密切,它既是肝癌发生的高危因素,也与肝癌复发及预后不良相关^[2-6]。有关肝癌细胞 IR 及其机制与耐药性的关系尚不明确、缺乏系统研究。本研究采用较低浓度胰岛素诱导肝细胞肝癌 HepG2 细胞建立稳定的 IR 细胞模型,观察肝癌细胞 IR 与内质网应激反应的关系以及对其顺铂敏感性的影响,探讨内质网应激伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)与 IR 肝癌细胞药物耐受性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 胰岛素、MTT、顺铂、无酚红和 DMEM 培养液均购自美国 Sigma 公司;新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;Annexin V/PI 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品;鼠抗人胰岛素受体

(InsR)单抗为美国 Biosource 公司产品;鼠抗人 GRP78 多抗由美国 Spring 公司生产;GRP78、InsR、β-actin 引物及 SYBR Green I 两步法实时荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞来源及培养 人肝癌细胞株 HepG2 由兰州大学基础医学院医学实验中心保存。用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,在 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度条件下培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 方法

1.2.2 胰岛素抵抗 HepG2(HepG2/IR)细胞模型的建立 按照参考文献[7]的方法进行改进,建立稳定的 HepG2/IR 细胞模型:用 0.5、1.0 μmol/L 胰岛素分别诱导 HepG2 细胞 48 h 和 72 h,撤除胰岛素培养 72 h 后采用日立 7600 全自动生化仪检测葡萄糖消耗量,并对糖耗量进行标准化,排除细胞数的影

^{*} 基金项目:兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(lzujbky-2013-142);甘肃省青年科技基金计划项目(1308RJYA055)。

作者简介:李林静,女,主管检验师,主要从事临床分子生物学与检验的研究。 Δ 通讯作者,E-mail:weihulai@lzu.edu.cn。

响,以细胞糖耗量判断细胞模型成功与否,并选择稳定性良好的诱导建立条件。

1.2.3 MTT 法检测细胞对顺铂的敏感性 收集 HepG2 和 HepG2/IR 细胞,按 10^5 /mL 密度接种于 96 孔平底培养板(美国 Costar 公司)中,实验组加入 1~64 mg/L 顺铂,对照组不加。将培养板置于 37 ℃,CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度条件下培养 48 h 或 72 h 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 10 μL,继续培养 4 h 后吸弃上清液并加入二甲基亚砜(DMSO),于水平摇床上震荡 15 min 后,在自动酶标仪(美国伯乐公司)上于波长 490 nm 处测定 A 值,按以下公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = [(A_{对照组} - A_{实验组}) / A_{对照组}] × 100%,并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.4 细胞凋亡的检测 收集经顺铂处理 48 h 的实验组 HepG2、HepG2/IR 细胞以及相应对照组细胞,PBS 洗涤,加入 FITC-Annexin/PI,室温避光染色,流式细胞仪(贝克曼库尔特公司)检测正常、早期凋亡和晚期凋亡细胞,实验重复 3 次。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 InsR 和 GRP78 mRNA 表达 TRIZOL 法提取细胞总 RNA,使用 ROTOR-GENE3000 型定量 PCR 仪(澳大利亚 Cotebett 公司)SYBR Green I 两步法逆转录 PCR(RT-PCR)定量检测目标基因和管家基因 mRNA 的表达水平。基因表达定量分析采用比较域值法:目的基因 mRNA 水平 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,Ct 值为荧光强度达到域值的循环数, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{实验组} - \Delta Ct_{对照组}$, $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因}$ 。检测所用引物序列为如下。GRP78 基因,上游:5'-CTG GGT ACA TTT GAT CTG ACT GG-3'。下游:5'-GCA TCC TGG TGG CTT TCC AGC CAT TC-3',扩增片段长度为 397 bp;InsR 基因,上游:5'-TAC CCT TCA AGA GAT GAT T-3'。下游:5'-CAG AAG AAG TGG TGA AGA C-3'。扩增片段长度为 260 bp;β-actin,上游:5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3',下游:5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。扩增片段长度:548 bp。

1.2.6 流式细胞仪检测 InsR 蛋白的表达 收集 HepG2 细胞及 HepG2/IR 细胞,用 PBS 洗涤后,每个样品加入抗 InsR 单抗 1 μL,室温孵育 30 min,PBS 洗涤,加入 FITC 标记二抗 0.5 μL,室温下避光孵育 15 min,PBS 洗涤 2 次后,细胞重悬于 500 μL PBS 中,流式细胞仪检测 InsR 的阳性率和平均荧光强度(MFI)。

1.2.7 Western-Blot 检测 GRP78 蛋白的表达 收集细胞,提取蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将分离后的蛋白质转移到 PVDF 膜上,封闭液封闭滤膜 2 h,依次结合相应浓度的一抗(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,洗膜后加入双红外信号标记的二抗(1:5 000~1:10 000)孵育 1 h,清洗后用 Odyssey 双红外激光扫描成像系统(美国 Licor 公司)扫描并对条带的荧光强度进行定量分析。

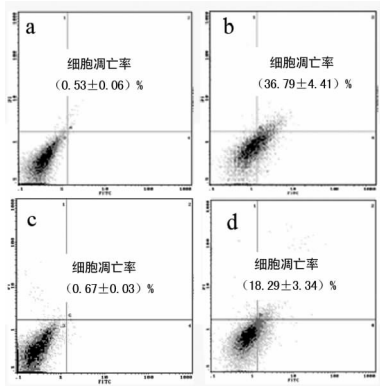
1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件分析数据,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建立了稳定 HepG2/IR 细胞模型 HepG2 细胞经 0.5、1.0 μmol/L 胰岛素分别诱导 48 h 和 72 h 后,细胞葡萄糖消耗量均表现明显降低,与诱导时间、浓度相关。将诱导细胞置于不含胰岛素的培养液中又培养 72 h,葡萄糖的消耗量仍低于未做诱导处理的 HepG2 细胞,处理 48 h 的细胞较未处理细胞降低 11.90%(0.5 μmol/L 胰岛素处理)、14.20%(1.0 μmol/L 胰岛素处理);处理 72 h 的细胞较未处理细胞降低 40.70%

(0.5 μmol/L 胰岛素处理)、48.10%(1.0 μmol/L 胰岛素处理)。选择糖耗量下降较明显且细胞状态最佳的 0.5 μmol/L 作用 72 h 作为建立 HepG2/IR 细胞模型的诱导条件。RT-PCR 检测显示 HepG2/IR 细胞的 InsR mRNA 表达量降低了 44.31%,流式细胞仪检测显示 HepG2 和 HepG2/IR 细胞的 InsR 蛋白阳性率均大于 98%,差异无统计学意义($P > 0.05$),但 HepG2/IR 细胞的表达量[平均荧光强度(MFI)]较对照降低了 82.2%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。证明已建立了稳定的 HepG2/IR 细胞模型。

2.2 HepG2/IR 细胞对顺铂的药物敏感性降低 通过 MTT 法检测顺铂对 HepG2/IR 细胞的 IC₅₀ 值,加入顺铂后 48 h 和 72 h 的 IC₅₀ 分别为 HepG2 细胞的 165.9% 和 158.8% ($P < 0.01$)。FITC-Annexin V /PI 双染色显示未加入顺铂的 HepG2 和 HepG2/IR 细胞凋亡率均小于 1%,并且差异无统计学意义($P > 0.05$)。加入顺铂的细胞中,HepG2 细胞的凋亡率为 36.79%,HepG2/IR 细胞的凋亡率为 18.29%,降低了 50.29% 且差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。



a: HepG2 细胞;b:顺铂处理的 HepG2 细胞;c:HepG2/IR 细胞;d: 顺铂处理的 HepG2/IR 细胞。

图 1 顺铂诱导 HepG2 细胞及 HepG2/IR 细胞凋亡的比较

2.3 HepG2/IR 细胞 GRP78 的表达增高 RT-PCR 检测显示,GRP78 mRNA 表达较作为对照的 HepG2 细胞增高 2.12 倍;Western-Blot 检测显示 HepG2/IR 细胞 GRP78 蛋白表达量增高了 2.27 倍,见图 2。

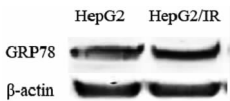


图 2 Western-Blot 检测细胞 GRP78 的表达

3 讨 论

对 IR 的深入研究发现其不仅是代谢综合征的病理生理基础,并且与内质网应激的发生互为因果^[8]。恶性肿瘤患者存在糖代谢紊乱,对胰岛素的敏感性降低而发生 IR,同时 IR 又是多种恶性肿瘤发生的高危因素。采用有效的措施缓解 IR 有助于延缓肿瘤进程和提高肿瘤患者对抗肿瘤化疗药物的敏感性^[2-6]。肝脏是胰岛素作用的主要靶器官之一,它既可以利用葡萄糖又可产生葡萄糖。肝细胞在病理状况下易对胰岛素的敏感性降低而发生 IR^[9]。HepG2 细胞是肝源性肿瘤细胞,具有正常肝细胞的某些特性并表达高亲和力的 InsR。本文采用高浓度胰岛素成功诱导 HepG2 细胞产生了稳定的 IR,主要表现为细胞葡萄糖消耗量减低、InsR 表达降低,符合 IR 的特性。

肝癌细胞天然对抗癌药物有低敏感性,化疗的疗效较差。本研究发现肝癌 HepG2 细胞经胰岛素诱导(下转第 2279 页)

血尿酸浓度降低时,机体对运动时产生的大量氧自由基的清除能力下降,其毒性会引起肾功能减退,导致高密度脂蛋白的大量排出,载脂蛋白 A 降低,低密度脂蛋白大量堆积,使载脂蛋白 B 代谢受阻,结果载脂蛋白 A 和载脂蛋白 B 的比例下降^[5],从而易造成动脉粥样硬化。而尿酸浓度降低时其抗氧化能力降低,使得氧自由基增加从而导致低密度脂蛋白的氧化作用增强。低密度脂蛋白被氧化修饰为氧化低密度脂蛋白,它可通过促进泡沫细胞的形成、介导内皮细胞损伤和促进血管内皮炎性反应等多种生物学作用,也会加速动脉粥样硬化的发生、发展。本研究分性别进行研究时发现,在低尿酸组与正常组进行比较时,女性的高密度脂蛋白与低密度脂蛋白变化不如男性明显,可能是由于女性内分泌变化及饮食习惯与男性不同所致^[6]。

本研究中,各生化指标的相关性分析显示尿酸水平与脂代谢指标中的三酰甘油呈正相关,而与高密度脂蛋白呈负相关。尿酸与脂代谢之间的关系可能为:(1)尿酸增高会降低三酰甘油分解代谢所需要酶的活性,使三酰甘油的分解降低,最终导致三酰甘油水平增高;(2)三酰甘油降解会生成游离脂肪酸,脂肪酸酯化过程中需要消耗三磷酸腺苷(ATP),而血三酰甘油水平升高造成游离脂肪酸生成增多,会加速 ATP 的消耗,生成过多尿酸^[7]。本研究中,血尿酸与血糖水平呈负相关,这与以往高尿酸血症时糖尿病的发病率要高于正常尿酸组的报道不一致^[8]。是否可以由此推测,尿酸值异常都会导致血糖的增高?是否可以将尿酸值异常作为预测糖尿病发生的一个危险因素?要解决这些问题还有待进一步研究。

高尿酸血症与高血压、高脂血症、糖尿病等其他代谢性疾病有密切关系。低尿酸血症多是在常规血清尿酸检查时发现。血尿酸是抗利尿激素分泌异常综合征诊断的有用指标,也是 2

型糖尿病早期肾病的预测指标^[9]。因此,笔者推测尿酸值异常与机体的一系列临床症状有关,它可能是原因也可能是结果,需要引起临床工作者的重视。

参考文献

- [1] Takagi S, Omae R, Makanga JO, et al. Simple and rapid detection method for the mutations in SLC22A12 that cause hypouricemia by allele-specific real-time polymerase chain reaction[J]. Clin Chim Acta, 2013, 415(1): 330-333.
- [2] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 135-137.
- [3] 久留一郎, 坪井麻理子, 重政千秋. 遗传性肾性低尿酸血症[J]. 日本临床, 1996, 54(12): 155-160.
- [4] 辛俊. 高血压患者血尿酸与脑梗死的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(17): 2132-2133.
- [5] 邵继红, 沈霞, 李东野. 高尿酸血症与代谢综合征相关关系的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(2): 180-183.
- [6] 姚依群, 尹秋生, 周书明, 等. 老年高尿酸血症患者的相关因素分析[J]. 中华保健医学杂志, 2011, 13(2): 152-153.
- [7] Krishnan E. Inflammation, oxidative stress and lipids; the risk triad for atherosclerosis in gout[J]. Rheumatology, 2010, 49(7): 1229-1238.
- [8] 焦喆, 高菡璐, 李航, 等. 糖尿病前期受高尿酸血症影响的相关因素分析[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(7): 725-727.
- [9] 林一民, 吴立翔, 李莲群, 等. 低尿酸血症临床病因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1077-1078.

(收稿日期: 2014-04-16)

(上接第 2274 页)

发生 IR 后,其对抗肿瘤药物顺铂的敏感性明显降低,细胞增殖活性增加,凋亡受到抑制,表明肝癌 HepG2 细胞发生 IR 可增强其对化疗药物的耐受性。

有研究证实内质网应激伴侣蛋白 GRP78 具有维持肿瘤内(微)环境稳定,增强肿瘤细胞存活率、侵袭性、转移性,逃避免疫监视、降低细胞毒 T 细胞杀伤力,抵抗抗肿瘤药物诱导的细胞凋亡等效应,导致肿瘤的发生、发展和对广谱治疗抵抗性的形成^[10]。本研究发现 IR 肝癌细胞内质网应激伴侣蛋白 GRP78 表达上调,这表明 IR 的 HepG2 细胞可通过上调 GRP78 蛋白表达来增强其对化疗药物的耐受性。

综上所述,肝癌 HepG2 细胞产生 IR 并上调 GRP78 蛋白的表达,产生对化疗药物的耐受性。本研究提示 IR 可能是肝癌化学治疗疗效和预后较差的原因之一,改善肝癌细胞 IR 状态,降低内质网应激伴侣蛋白 GRP78 表达,有可能提高肝癌细胞对抗肿瘤药物的敏感性,提高临床肝癌化疗的有效性。

参考文献

- [1] Wilcox G. Insulin and insulin resistance[J]. Clin Biochem Rev, 2005, 26(2): 19-39.
- [2] Yoshikawa T, Noguchi Y, Doi C, et al. Insulin resistance in patients with cancer: relationships with tumor site, tumor stage, body-weight loss, acute-phase response, and energy expenditure[J]. Nutrition, 2001, 17(7/8): 590-593.

- [3] Keku TO, Lund PK, Galanko J, et al. Insulin resistance, apoptosis, and colorectal adenoma risk[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(9): 2076-2081.
- [4] Soliman PT, Wu D, Tortolero-Luna G, et al. Association between adiponectin, insulin resistance, and endometrial cancer[J]. Cancer, 2006, 106(11): 2376-2381.
- [5] Turati F, Talamini R, Pelucchi C, et al. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma risk[J]. Cancer, 2013, 108(1): 222-228.
- [6] Donadon V, Balbi M, Pereiaccante A, et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma[J]. Clin Med Endocrinol Diab, 2009, 2(1): 25-33.
- [7] 李林静, 陈静, 程杰, 等. 胰岛素抵抗肝细胞多药耐药基因 1 的表达[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(11): 670-673.
- [8] Boden G. Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation[J]. Diabetes, 2009, 58(3): 518-519.
- [9] Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, et al. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences[J]. J Hepatol, 2007, 47(1): 142-156.
- [10] Wang G, Yang ZQ, Zhang K. Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential[J]. Am J Transl Res, 2010, 2(1): 65-74.

(收稿日期: 2014-03-13)