

## · 胃肠间质瘤 ·

甲磺酸伊马替尼耐药的胃肠间质瘤细胞中  
多药耐药基因 1 和 KIT 基因表达

刘景磊 秦净 姚礼庆 侯英勇 孙益红 沈坤堂 束平

**【摘要】** 目的 探讨多药耐药 1(MDR1)基因和 KIT 基因与胃肠间质瘤(GIST)甲磺酸伊马替尼耐药的的关系。方法 采用 RT-PCR 法半定量检测 GIST882-S 细胞和 GIST882-R 细胞中 MDR1 mRNA 和 KIT mRNA 表达水平;采用免疫细胞化学染色和 Western blot 检测 GIST882-S 细胞和 GIST882-R 细胞中 P-gp 和 CD117 蛋白表达情况。结果 GIST882-R 细胞和 GIST882-S 细胞 MDR1 mRNA 相对表达量分别为  $0.321 \pm 0.033$  和  $0.157 \pm 0.056$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); KIT mRNA 相对表达量分别为  $0.389 \pm 0.063$  和  $0.339 \pm 0.067$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); P-gp 蛋白相对表达量分别为  $0.443 \pm 0.058$  和  $0.237 \pm 0.094$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); CD117 蛋白相对表达量分别为  $0.744 \pm 0.123$  和  $0.704 \pm 0.094$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 MDR1 基因及其蛋白产物 P-gp 的过度表达可能与 GIST 甲磺酸伊马替尼耐药机制有关,而 KIT 基因可能未参与甲磺酸伊马替尼耐药。

**【关键词】** 胃肠间质瘤; 多药耐药基因; P 糖蛋白; 基因, KIT; 抗原, CD117

**Expression of MDR1 and KIT in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells** LIU Jing-lei, QIN Jing\*, YAO Li-qing, HOU Ying-yong, SUN Yi-hong, SHEN Kun-tang, SU Ping. \*Department of General Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China  
Corresponding author: QIN Jing, Email: qin.jing@zs-hospital.sh.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the relationship between imatinib resistance and genes MDR1 and KIT in gastrointestinal stromal tumor(GIST) cells. **Methods** The MDR1 and KIT mRNA level in GIST882-R and GIST882-S cells were detected by RT-PCR. Immunocytochemistry and Western blot were employed to detect P-gp and CD117 expression in GIST882-R and GIST882-S cells. **Results** The relative expression of MDR1 mRNA was  $0.321 \pm 0.033$  in GIST882-R and  $0.157 \pm 0.056$  in GIST882-S cells, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The relative expression of KIT mRNA was  $0.389 \pm 0.063$  in GIST882-R and  $0.339 \pm 0.067$  in GIST882-S, and the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The relative density of P-gp was  $0.443 \pm 0.058$  in GIST882-R and  $0.237 \pm 0.094$  in GIST882-S, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The relative density of CD117 was  $0.744 \pm 0.123$  in GIST882-R and  $0.704 \pm 0.094$  in GIST882-S, and the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Over-expression of gene MDR1 may be associated with imatinib resistance in GIST. KIT may not be involved in imatinib resistance.

**【Key words】** Gastrointestinal stromal tumors; Multi-drug resistance gene; P-glycoprotein; Gene, KIT; Antigens, CD117

多药耐药 1 (multi-drug resistance, MDR1) 基因及其蛋白产物 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 在多种肿瘤对化疗药物的耐药过程中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。

P-gp 是一种与 ATP 结合的跨膜转运蛋白,可逆浓度梯度将药物泵出细胞外。目前已经证实伊马替尼亦是 P-gp 的底物之一, P-gp 可水解 ATP 释放能量,逆浓度梯度将伊马替尼泵出细胞<sup>[2]</sup>。但 MDR1 基因在胃肠间质瘤 (gastrointestinal stromal tumors, GIST) 耐药中的作用还不明确。有文献报道, GIST 耐药组织中 KIT 基因过度扩增及 CD117 表达过量<sup>[3]</sup>; 也有研究认为 CD117 表达减少<sup>[4]</sup>。本研究对 GIST 细胞 (GIST882-S) 和耐药细胞 (GIST882-R) 中 MDR1

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1671-0274.2010.07.011

基金项目: 上海市科委科研基金 (064119622)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学附属中山医院普通外科 [刘景磊 (现在山东省立医院普通外科)、秦净、姚礼庆、孙益红、沈坤堂、束平], 病理科 (侯英勇)

通信作者: 秦净, Email: qin.jing@zs-hospital.sh.cn

和 KIT 基因表达情况的差异进行检测,以探讨 MDR1 和 KIT 基因与 GIST 耐药的关系。

## 资料与方法

### 一、材料与仪器

GIST882-S 细胞由哈佛大学医学院 Brigham 妇女医院 Flechter 教授惠赠。GIST882-R 细胞通过对 GIST882-S 细胞进行浓度梯度递增间歇诱导法获得, GIST882-S 细胞对伊马替尼的  $IC_{50}$  为  $0.136 \mu\text{mol}$ , 耐药细胞 GIST882-R 对伊马替尼的  $IC_{50}$  为  $1.549 \mu\text{mol}$ , 耐药指数为 11。细胞培养基为含 10% FBS 的 RPMI-1640。因药物伊马替尼需要二甲亚砜 (dimethylsulphoxide, DMSO) 作为溶剂进行溶解, 故用含有与 GIST882-R 培养基中相同浓度 DMSO 的培养液培养 GIST882 细胞, 获得细胞 GIST882 (DMSO), 作为对照。将细胞置入培养箱中进行培养, 培养条件为  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度。PCT100-96 型 PCR 仪(美国 MJ 公司); Image-ProPlus 专业图像软件分析系统、RunOne DNA 电泳系统、Bio Rad 垂直电泳系统、VDS 成像系统均购自美国 Pharmacia 公司。TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司); 反转录酶、Taq 酶及 10 mmol/L dNTP Mix(美国 Fermentas 公司); 蛋白裂解液(美国 Sigma 公司); P-gp、CD117 及  $\beta$ -actin 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司。

### 二、实验方法

1. RT-PCR: 分别消化收集细胞, 按照 TRIzol 试剂盒说明书抽提总 RNA, 采用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。于 Medline 基因库中检索得到 MDR1 和 c-kit 基因序列, 根据基因外显子分布和 mRNA 序列设计引物, 引物序列见表 1; 由上海生物工程公司合成, 去离子水稀释分装。反转录反应: RNA 模板  $5 \mu\text{g}$ , Oligo(dT)  $0.5 \mu\text{g}$ , 加双蒸水至总体积  $11 \mu\text{l}$ ,  $70^\circ\text{C}$  变性 5 min, 立即冰上冷却; 然后向反应体系中加入  $5\times$ buffer  $4 \mu\text{l}$ , 10 mmol/L dNTP  $2 \mu\text{l}$ , ribonuclease inhibitor 20 U, 加双蒸水至总体积  $20 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  反应 5 min, 冰上冷却后加入 200 U 反转录酶,  $42^\circ\text{C}$  60 min,  $70^\circ\text{C}$  10 min, 冰上冷却。PCR 反应体系: cDNA  $2 \mu\text{l}$ , 2 mmol/L dNTP  $0.4 \mu\text{l}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$   $1.2 \mu\text{l}$ , 引物各  $1 \mu\text{l}$ ,  $5 \text{ U}/\mu\text{l}$  Taq  $2 \text{ U}$ ,  $10\times$  buffer  $2 \mu\text{l}$ , 加双蒸水至总体积  $20 \mu\text{l}$ 。PCR 反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 10 min;  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $56^\circ\text{C}$  退火 45 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 40 s, 39 个循环;  $72^\circ\text{C}$  再延伸 10 min。电泳及图像分

析:  $80 \text{ V}$  电压下琼脂糖电泳 30 min; VDS 成像系统扫描分析图像, 计算目的条带与内参条带灰度值的比值, 进行半定量分析。每个实验组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR 的引物序列

基因	引物序列	扩增片断(bp)
MDR1	正义链 CTCAGACAGGATAGTTGC TTT	201
	反义链 GCGAGCCTGCTA GTCAATGC	
Kit	正义链 TGCGTTCTGCTCTACTGCTT	220
	反义链 CCGTCATCCATTCATTCTGCTTATT	
$\beta$ -actin	正义链 TCATGTTTGAGACCTTCAACA	317
	反义链 CATCTCTTGCTCGAAGTCCA	

2. 免疫细胞化学染色: 分别取 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞各 1 瓶, 制备成单细胞悬液, 将细胞在 6 孔板中贴附于载玻片, 待细胞融合后取出。丙酮固定, 微波加热修复抗原。10% 山羊血清, 室温孵育。滴加一抗、二抗孵育。PBS 冲洗后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 (PBS 稀释 1:300),  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min。DAB 显色, 苏木精复染, 95% 乙醇脱水, 二甲苯透明 5 min。光学显微镜下观察蛋白表达情况。

3. Western blot: 通过一步法提取细胞内的总蛋白, 紫外分光光度计测量蛋白浓度, 取等量蛋白溶液加入等体积的  $2\times$ SDS 上样缓冲液并沸水煮约 10 min, 使蛋白变性; 再取等量变性的蛋白溶液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每孔上样量为  $30 \mu\text{l}$ , 并以电转膜仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜 ( $110 \text{ V}$ , 2 h), 经丽春红染色鉴定并标记标准蛋白位置, 再以 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗及二抗孵育, ECL 试剂盒发光, 胶片曝光, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 扫描计算电泳条带灰度值。每个实验组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

### 三、统计学方法

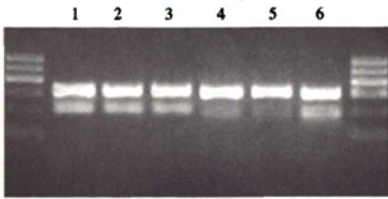
运用 SPSS 11.0 统计软件对数据结果进行检测分析, 多组间的比较用单因素方差分析, 然后用 Bonferroni 法进行两两比较。

## 结 果

### 一、MDR1 mRNA 和 KIT mRNA 半定量检测结果

在 GIST882-S 细胞和 GIST882-R 细胞中均可检测到 MDR1 和 KIT 基因的转录, 其碱基对大小分别为 201 bp 和 220 bp; 见图 1。GIST882-R、GIST882-S 和 GIST882 (DMSO) 细胞中 MDR1 mRNA 相对表达量分别为  $0.321\pm 0.033$ 、 $0.157\pm 0.056$  和  $0.138\pm 0.051$ ;

MDR1 mRNA 在 GIST882-S 和 GIST882 (DMSO) 细胞间的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),但在 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞间的表达差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。KIT mRNA 相对表达量在 3 种细胞间分别为  $0.389\pm 0.063$ 、 $0.339\pm 0.067$  和  $0.314\pm 0.081$ ;KIT mRNA 在 3 种细胞间的表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。



注:1:KIT mRNA(GIST882-S);2:KIT mRNA(GIST882-DMSO);  
3:KIT mRNA(GIST882-R);4:MDR1 mRNA(GIST882-S);5:MDR1  
mRNA(GIST882-DMSO);6:MDR1 mRNA(GIST882-R)  
图 1 MDR1 和 KIT 基因 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

二、CD117 和 P-gp 免疫细胞化学染色结果

P-gp 和 CD117 蛋白在 GIST882-S 细胞和 GIST882-R 细胞均呈阳性表达;见图 2。

三、CD117 和 P-gp 半定量检测结果

在 GIST882-S 细胞和 GIST882-R 细胞中均可检测到 P-gp 和 CD117 蛋白的表达;见图 3。GIST882-R、GIST882-S 和 GIST882(DMSO)细胞中 P-gp 相对表达量分别为  $0.443\pm 0.058$ 、 $0.237\pm 0.094$  和  $0.199\pm 0.055$ ,P-gp 在 GIST882-S 和 GIST882(DMSO)细胞间的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),但在 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞间的表达差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。CD117 蛋白在 3 种细胞中的相对表达量分别为  $0.744\pm 0.123$ 、 $0.704\pm 0.094$  和  $0.810\pm 0.102$ ,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

讨 论

临床研究发现,虽然增加药物剂量会增加药物毒

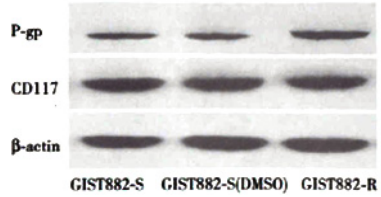
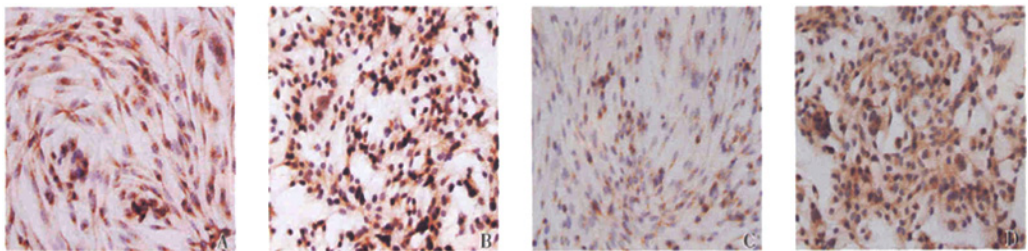


图 3 CD117 和 P-gp 的 Western blot 蛋白电泳图

性,但将耐药患者服用甲磺酸伊马替尼的剂量由 400 mg/d 增加至 600~800 mg/d,可以使耐药患者的疾病进展重新得到控制<sup>[5]</sup>,EORTC 和 S0033 临床试验的疾病控制率报道结果分别为 34%和 40%<sup>[6,7]</sup>。这一研究结果说明,耐药的发生可能和 KIT 基因过表达或伊马替尼药物浓度降低有关。

众多学者认为,KIT 基因位点出现二次突变,是 GIST 对伊马替尼耐药的重要原因。但继发突变的位点不集中,突变方式多样化,目前还没有任何一种药物能够针对如此多的突变位点进行治疗。而 Antonescu 等<sup>[8]</sup>研究认为,并不是所有继发耐药患者的标本中均存在二次基因突变。对于没有发生二次突变的患者 (GIST882-R 中同样未检测到新的突变基因位点),如何解释他们的耐药机制,给 GIST 研究工作者们提出了新的挑战。有学者认为,KIT 基因表达变化与 GIST 对伊马替尼耐药有关。Bauer 等<sup>[3]</sup>发现,甲磺酸伊马替尼耐药患者中存在 KIT 基因的扩增和 CD117 高表达,认为 KIT 基因的扩增和 CD117 高表达可能是 GIST 对抗 Imatinib 的一种代偿机制。但 Mahadevan 等<sup>[4]</sup>却在 2 例耐药患者组织中发现了 KIT 基因的表达缺失。在我们用伊马替尼诱导 GIST882-S 耐药获得 GIST882-R(IC<sub>50</sub> 值为  $1.549\pm 0.366$ )后,用 RT-PCR 和 Western blot 没有检测到耐药前后细胞内 KIT 基因转录及 CD117 蛋白表达的变化。可见 KIT 基因在耐药前后表达的变化存在多样性,可能与患者原发肿瘤突变位点的不同有关,也可能随服药时间或服药剂量发生改变。因



A. GIST882-S 中 CD117 表达 B. GIST882-R 中 CD117 表达 C. GIST882-S 中 P-gp 表达 D. GIST882-R 中 P-gp 表达  
图 2 CD117 和 P-gp 在 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞中的表达(免疫细胞化学染色,×200)

此, KIT 基因及 CD117 蛋白在耐药机制中的作用有待进一步研究。

Widmer 等<sup>[9]</sup>发现,慢性粒细胞白血病细胞株 K562 对伊马替尼耐药的产生同 MDR1 高表达有关,并通过 siRNA 技术证实了 MDR1 基因高表达在 K562 细胞对伊马替尼耐药中发挥了药物外排的作用。目前还没有关于 MDR1 基因高表达是否参与了 GIST 细胞对伊马替尼耐药的报道。Plaat 等<sup>[10]</sup>报道,在 56% 的 GIST 患者中检测到了 MDR1 mRNA 及 P-gp 的蛋白表达,并认为 MDR1 在 GIST 的表达同 GIST 对传统化疗不敏感有关。本研究在 GIST882-S 和 GIST882-R 细胞中均检测到了 MDR1 mRNA 的转录及 P-gp 蛋白的表达,并且发现 GIST882-R MDR1 基因及其蛋白产物 P-gp 的表达水平明显高于 GIST882-S 细胞,提示 MDR1 基因及其产物蛋白 P-gp 的高表达可能参与了 GIST882 细胞对伊马替尼的耐药。在后续研究中我们将运用 RNA 干扰技术沉默 MDR1 基因的表达,然后观察 GIST882-R 细胞对药物的敏感性,从而进一步验证 MDR1 基因在 GIST882 细胞耐药中的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, 2003, 8(5):411-424.
- [2] Rumpold H, Wolf AM, Wolf D. The role of P-glycoprotein in imatinib resistance. *Leukemia*, 2006, 20(1):144-145.
- [3] Bauer S, Hubert C, Heinrich MC, et al. KIT hyperactivation in imatinib-resistant GIST: Implications for salvage therapies. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2005, 23:A9034.
- [4] Mahadevan D, Cooke L, Riley C, et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, 2007, 26(27):3909-3919.
- [5] Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet*, 2004, 364(9440):1127-1134.
- [6] Zalcberg JR, Verweij J, Casali PG, et al. Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg. *Eur J Cancer*, 2005, 41(12):1751-1757.
- [7] Blay JY, Bonvalot S, Casali P, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GISJ Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol*, 2005, 16(4):566-578.
- [8] Antonescu CR, Besmer P, Guo T, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11): 4182-4190.
- [9] Widmer N, Rumpold H, Untergasser G, et al. Resistance reversal by RNAi silencing of MDR1 in CML cells associated with increase in imatinib intracellular levels. *Leukemia*, 2007, 21(7):1561-1562.
- [10] Plaat BE, Hollema H, Molenaar WM, et al. Soft tissue leiomyosarcomas and malignant gastrointestinal stromal tumors: differences in clinical outcome and expression of multidrug resistance proteins. *J Clin Oncol*, 2000, 18(18):3211-3220.

(收稿日期:2010-02-23)

### 第三届全国消化道肿瘤高级论坛征文通知

第三届全国消化道肿瘤高级论坛拟定于 2010 年 9 月 24-26 日在美丽的西子湖畔——杭州市召开。本次论坛由浙江省人民医院和《中华胃肠外科杂志》共同举办。会议特邀黎介寿、樊代明、郑树森院士和全国著名外科专家赵玉沛、董家鸿、秦新裕、朱正纲、季加孚、叶再元、周总光、兰平、卫洪波、孙益红教授围绕以下议题进行院士论坛和专家专题讲座,同时进行专题辩论。

论坛主要议题:(1)肝癌的治疗现状及展望;(2)胰腺癌治疗的若干问题;(3)胃癌手术治疗的规范化及综合治疗;(4)结直肠癌的开放手术及腹腔镜手术;(5)消化道肿瘤外科的控制性损伤。

征文要求:论文必须是在本次会议前未在国内外期刊发表。投稿论文请准备全文(4000 字以内)和中文摘要(600 字以内),中文摘要内容包括:标题、目的、方法、结果及结论;并注明作者姓名、工作单位、通信地址、邮政编码及联系电话和电子邮箱。论文请采用 Word 格式。文题请用 3 号黑体字,正文请用小 4 号宋体字,1.5 倍行距。截稿日期 2010 年 8 月 15 日。投稿联系地址:浙江省杭州市上塘路 158 号浙江省人民医院普通外科(邮编:310014),邵钦树、徐继收。推荐通过电子邮件投稿,会议邮箱:xhdzl@yahoo.cn,联系电话:0571-85893408。

参会者将获得国家 I 类继续教育学分。