



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107267458 B

(45)授权公告日 2019.10.29

(21)申请号 201710554391.5

(22)申请日 2017.07.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107267458 A

(43)申请公布日 2017.10.20

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:C201780 2017.05.18

(73)专利权人 中南大学湘雅二医院
地址 410001 湖南省长沙市人民中路139号

(72)发明人 胡野荣 周杨钊 周新民

(74)专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任公司 43113
代理人 何为 袁颖华

(51)Int.Cl.
C12N 5/09(2010.01)
A61K 35/13(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)
C12Q 1/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 104694476 A,2015.06.10,
CN 103627674 A,2014.03.12,
刘晓.非小细胞肺癌 H3122 克唑替尼耐药

细胞株的建立及耐药机制的探究.《中国学位论文全文数据库》.2017,

Sen Zhang et al..Crizotinib-Resistant Mutants of EML4-ALK Identified Through an Accelerated Mutagenesis Screen.《Chem Biol Drug Des》.2011,第78卷

吴荻等.EML4-ALK抑制剂在非小细胞肺癌中发生耐药的机制.《中国肺癌杂志》.2013,第16卷(第1期),

Ryohei Katayama et al..Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK.《PNAS》.2011,第108卷(第18期),

Daria Zdzalik et al..Activating mutations in ALK kinase domain confer resistance to structurally unrelated ALK inhibitors in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma.《J Cancer Res Clin Oncol》.2014,第140卷

蒋涛等.ALK阳性非小细胞肺癌患者克唑替尼耐药的机制和治疗措施.《中国肺癌杂志》.2015,第18卷(第2期),

审查员 梁韶

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称
一种耐克唑替尼人的非小细胞肺癌细胞株 H3122-CR23及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种新的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株,命名为耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23,保藏编号为CCTCC NO: C201780,该细胞株在ALK激酶区域有F1174C突变。本细胞株H3122-CR23可以用于研究人的克唑替尼耐药非小细胞肺癌细胞形态学及生物学特点、研究肿瘤耐药机制、开发肿瘤耐药逆转药物、分析抗肿瘤药物敏感性及筛选和评估抗肿瘤药物、研究更有效的肿瘤治疗方法等,具有较高的

科研和生产应用价值,预期能产生良好的科研、经济和社会效益。

CN 107267458 B

1. 一种耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株,命名为耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23,保藏编号为CCTCC NO:C201780。

2. 如权利要求1所述的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株,该细胞株H3122-CR23在ALK激酶区域有F1174C突变。

3. 权利要求1所述的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23在克唑替尼耐药中的应用。

4. 权利要求1所述的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23在构建人非小细胞肺癌体内外克唑替尼耐药的肿瘤模型中的应用。

一种耐克唑替尼人的非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤生物学领域,尤其涉及一种耐克唑替尼人的非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23,同时涉及该非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的应用。

背景技术

[0002] 肺癌是严重危害人类生命和健康的常见恶性肿瘤。肺癌分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),其中80%~85%为非小细胞肺癌。传统非小细胞肺癌的治疗包括手术、化疗和放疗。随着对肿瘤发病机制及其生物学行为研究的深入,目前人们把焦点聚向了特异性高、不良反应轻的分子靶向治疗。

[0003] 近几年来,肺癌的分子靶向治疗领域集中在EGFR、K-ras和VEGF等靶点上,其中EGFR靶向治疗取得了令人欣喜的成绩。但随着Rikova及Soda发现的EML4-ALK、TGF-ALK融合基因,及后来Wong发现KIF5B-ALK融合基因,ALK(Anaplastic lymphoma kinase,间变性淋巴瘤激酶)融合基因成为肺癌靶向治疗的研究热点。

[0004] 在细胞株实验及基因工程小鼠模型中EML4-ALK是一个强有力的致癌驱动器,有ALK融合基因的癌细胞对ALK激酶抑制高度敏感。在这些癌细胞中,ALK是唯一危及细胞生长和存活通路的调节器,包括PI3K-Akt和MEK-ERK通路,ALK抑制可以导致这些通路的抑制,诱导细胞增殖受阻和调亡。辉瑞公司早期研发针对c-MET致癌基因的治疗新药克唑替尼(Crizotinib)对ALK激酶有抑制作用,近期的临床试验表明进展期ALK阳性的非小细胞肺癌病人对克唑替尼靶向治疗高度敏感,但随着研究的深入,虽然大多数ALK阳性非小细胞肺癌病人对ALK酪氨酸激酶抑制剂克唑替尼敏感,但最后不可避免地在一年的之内因药物抵抗复发。

[0005] 为了探索克唑替尼获得性耐药的机制,我们建立了一种克唑替尼耐药非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23,该细胞株在ALK激酶区域存在F1174C突变,目前国内外未见有此种克唑替尼耐药非小细胞肺癌细胞株的报道。这种耐克唑替尼非小细胞肺癌细胞株的建立,可成为研究ALK阳性的非小细胞肺癌的耐药机制、耐药性逆转、开发和评价新的抗癌药物和方法等的重要工具。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种耐克唑替尼人的非小细胞肺癌细胞株,该细胞株可用于构建人非小细胞肺癌体内外克唑替尼耐药的肿瘤模型。

[0007] 上述提及的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株,命名为耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23,其保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,保藏日期为2017年5月18日,保藏编号为CCTCC NO:C201780。本细胞株H3122-CR23在ALK激酶区域有一个F1174C突变。

[0008] 本发明的细胞株采用逐步半对数递增克唑替尼药物浓度的方法来建立源于亲代

细胞H3122的人的ALK融合基因阳性的非小细胞肺癌克唑替尼耐药细胞株。该方法包括以下步骤:

[0009] (1) 人的ALK融合基因阳性的非小细胞肺癌细胞株H3122购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),该细胞株置于含25mmol/L 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)和10%胎牛血清(FBS)的RPMI1640培养液(以下简称H3122培养基)中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,0.25%胰蛋白酶和乙二胺四乙酸(0.25%Trypsin-EDTA)消化传代;

[0010] (2) 取对数生长期或汇合度70%H3122细胞,换加入30nmol/L的克唑替尼的新鲜H3122培养基中,置37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每隔3-4天换液一次,待细胞汇合至80%-90%时,消化传代。每一个药物浓度传代两次后,在原药物浓度的基础上,以半对数增加药物浓度。如此循环,直至克唑替尼浓度增加至1000nmol/L。

[0011] (3) 取上述克唑替尼浓度增加至1000nmol/L的H3122细胞株,在1000nmol/L克唑替尼中培养3-4个月,直至人的ALK融合基因阳性的非小细胞肺癌细胞株H3122能在含1000nmol/L的克唑替尼培养液中以亲代同样的速率稳定生长、传代后,至此即获得本耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23。

[0012] 提取本发明的细胞株H3122-CR23的DNA及蛋白裂解液,对提取的DNA进行ALK激酶区域外显子20-28扩增,Sanger法直接测序分析;同时对提取的蛋白裂解液进行AKT、P-AKT、ERK、P-ERK蛋白免疫印迹实验。Sanger法直接测序显示本耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23在ALK激酶区域有一个F1174C突变,蛋白免疫印迹实验显示P-AKT、P-ERK蛋白水平较H3122亲代细胞显著增加。且本耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23对克唑替尼具有高度耐药性,能用于构建人非小细胞肺癌体内外克唑替尼耐药的肿瘤模型。

[0013] 本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23可以用于研究克唑替尼耐药人非小细胞肺癌细胞形态学及生物学特点、研究肿瘤耐药机制、分析抗肿瘤药物敏感性及筛选和评估抗肿瘤药物、开发肿瘤耐药逆转药物、研究更有效的肿瘤治疗方法等,并可用于非小细胞肺癌耐药机制的探讨及其相关信号通路的研究。具有较高的科研和生产应用价值,预期能产生良好的科研、经济和社会效益。

附图说明

[0014] 图1为人的非小细胞肺癌细胞株H3122和本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23在倒置相差显微镜下拍摄的照片。

[0015] 图2为本发明耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23在ALK激酶区域F1174C突变。

[0016] 图3为本发明耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株AKT、P-AKT、ERK、P-ERK蛋白免疫印迹结果。

具体实施方式

[0017] 为详细说明本发明的技术内容、构造特征、所实现目的及效果,以下结合实施方式予以详细说明。

[0018] 本发明中涉及的现有实验方法、测试方法及溶液配制方法可以参考《细胞实验指南》,标准书号:7-03-007598-6/Q.891原著:[美]D.L.斯佩克特R.D.戈德曼&L.A.莱因万德。

[0019] 实施例中提及的RPMI1640培养液、试剂、抗体及试剂盒为市购产品。

[0020] 实施例1耐克唑替尼人的非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的制备

[0021] 步骤为：(1) 人的ALK阳性的非小细胞肺癌细胞株H3122 (以下简称人非小细胞肺癌细胞株H3122) 购买自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。将该细胞H3122株置于含25mmol/L 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)和10%胎牛血清(FBS)的RPMI1640培养液(以下简称H3122培养基)中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,0.25%胰蛋白酶和乙二胺四乙酸(0.25%Trypsin-EDTA)消化传代;

[0022] (2) 取对数生长期的H3122细胞或当H3122细胞培养至细胞密度达到70%时,换新鲜H3122培养基,加入克唑替尼,形成含克唑替尼的培养液,该含克唑替尼的培养液中克唑替尼的浓度为30nmol/L,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中继续培养,3-4天更换培养基一次。待细胞密度达到80-90%时消化细胞,1:3传代,置于新鲜原浓度克唑替尼的培养基继续培养,3-4天更换培养基一次。再次待细胞生长至密度达到80-90%时,消化细胞,1:3传代,置于新浓度的克唑替尼培养液中(新浓度的克唑替尼培养液中的克唑替尼浓度按原浓度以半对数的速率递增,为45nmol/L),3-4天更换培养基一次,待细胞生长至密度达到80-90%时,消化细胞,1:3传代,置于含45nmol/L克唑替尼的培养液中继续进行培养。培养液中的克唑替尼浓度按如此顺序递增45nmol/L→67.5nmol/L→100nmol/L→150nmol/L→200nmol/L→300nmol/L→450nmol/L→650nmol/L→1000nmol/L,进行培养。每一个药物浓度传代两次,直至克唑替尼浓度增加至1000nmol/L。

[0023] (3) 取克唑替尼浓度增加至1000nmol/L的H3122细胞株,在1000nmol/L克唑替尼中培养3-4个月,直至该人的ALK融合基因阳性的非小细胞肺癌细胞株H3122能在含1000nmol/L的克唑替尼培养液中以亲代同样的速率稳定生长、传代后,至此即获得本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23。

[0024] 实施例2本发明耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的冻存

[0025] 将实施例1中获得的耐药细胞置入冻存管的冻存液中,再将冻存管置于液氮中保存。冻存液由90%H3122培养基和10%二甲基亚砷(DMSO)组成。冻存过程采取将冻存管置于nalgene程序降温盒,-80℃过夜,最后放入液氮的步骤。

[0026] 实施例3耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的复苏

[0027] 从液氮中取出装有细胞的冻存管,立即放入37-40℃水浴中轻轻摇动,使冻存物在1分钟内解冻,用酒精棉球擦拭冻存管外壁后拿入超净台。将解冻后的细胞悬液置于15ml无菌离心管中,加入5ml磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液),1000转/分离心5分钟,弃上清,加入5ml含1000nmol/L克唑替尼的H3122培养基,稍吹打混匀成混合液,吸混合液置入一个25cm²的细胞培养瓶中,拧松瓶盖放入二氧化碳培养箱中,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下培养,3-4天更换培养基一次,细胞密度达到80-90%时消化,1:3传代培养。

[0028] 实施例4人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的形态学观察

[0029] 分别取人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23接种于25cm²培养瓶中,待生长至对数期,置倒置相差显微镜下观察活细胞形态并拍照,如图1所示,可见本发明细胞株H3122-CR23的细胞较亲本细胞H3122异型性明显,细胞体积增大,细胞之间变得更加粘连融合。

[0030] 实施例5人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的细胞生长曲线和倍增时间测定

[0031] 分别取人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23,用0.25%胰蛋白酶和乙二胺四乙酸(0.25%Trypsin-EDTA)消化制备成单细胞悬液,接种于24孔板,每孔细胞 1×10^4 个,于24、48、72、96、120小时计算细胞数,每次计数3孔,取平均值绘制细胞曲线,并计算倍增时间(Td)。按Patterson公式计算细胞在对数生长期的群体倍增时间 $Td(h) = T1g2/1g(N/N0)$,其中T表示细胞对数增值的时间,N为对数增殖期结束时的细胞数,N0为对数增殖期开始时的细胞数,算得H3122细胞群体倍增时间为 $33.26 \pm 3.15h$,H3122-CR23群体倍增时间为 $34.12 \pm 2.02h$ 。

[0032] 实施例6人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的耐药指数的测定

[0033] (1)用0.25%胰蛋白酶和乙二胺四乙酸(0.25%Trypsin-EDTA)分别消化处于对数生长期的人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23,用H3122培养基调整细胞浓度至 $4 \times 10^4/mL$,制成单细胞悬液。每孔接种0.2mL的单细胞悬液至96孔板,每个细胞株均设实验组、对照组,置 $37^{\circ}C$ 、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养过夜。然后吸弃每孔中的上清液,磷酸盐缓冲液洗一次,之后对照组中分别加入H3122培养基0.1mL,实验组中分别加入含克唑替尼的H3122培养基0.1mL,含克唑替尼的H3122培养基中加克唑替尼的终浓度分别为31.25、62.5、125、250、500、1000nmol/L,每一浓度设3个复孔,同时设仅接种细胞的无药对照孔和仅加培养液的调零孔。

[0034] (2)常规培养48小时后,每孔加20 μ L MTT液(5mg/mL)于上述细胞的96孔板,继续培养4小时,取出96孔板,吸弃上清液,每孔加入二甲基亚砷150 μ L,置于振荡器上震荡10分钟,用酶标仪检测595nm波长OD值,每3个复孔取其平均值。根据OD值计算细胞抑制率,计算公式为:细胞抑制率(%) = (1-实验组OD值/对照组OD值) \times 100%,再利用SPSS15.0软件Regression中的Probit过程计算半数抑制浓度(IC50)。根据公式:耐药指数R1 = 耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23IC50 \div 人非小细胞肺癌细胞株H3122IC50,得出耐药指数为16.3,为高度耐药。

[0035] 实施例7人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的DNA的提取、扩增及测序

[0036] 取人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明的耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23汇合至80-90%25cm²培养瓶细胞各一瓶,吸去培养液,0.25%胰蛋白酶和乙二胺四乙酸(0.25%Trypsin-EDTA)消化,离心,弃去培养基,各加入5ml磷酸盐缓冲液,漂洗一遍,离心,弃去磷酸盐缓冲液,每管加入200 μ l磷酸盐缓冲液,混匀,转移混匀液至EP管,使用凯杰生物试剂盒QIAamp DNA Blood Mini Kit提取DNA,后续操作按试剂盒操作。

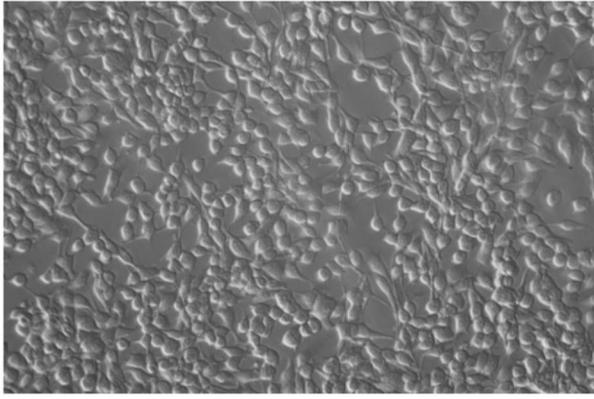
[0037] 以加入ALK基因激酶区域外显子20-28的引物对上述提取的二细胞株的DNA进行常规PCR扩增,扩增产物送Sanger法直接测序分析。结果显示,与亲代H3122相比,本发明的细胞株H3122-CR23在ALK激酶区域存在F1174C突变,见图2。

[0038] 实施例8人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明耐克唑替尼人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23的蛋白裂解液提取及AKT、P-AKT、ERK、P-ERK蛋白免疫印迹实验

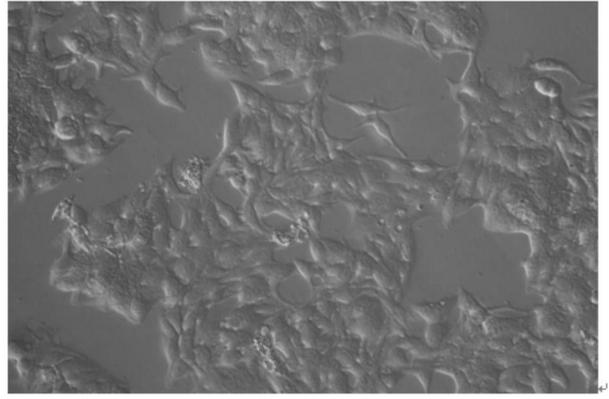
[0039] 取6孔板培养的汇合至80-90%人非小细胞肺癌细胞株H3122及本发明耐克唑替尼

人非小细胞肺癌细胞株H3122-CR23细胞,吸去原培养基,分成3组:H3122+H3122培养机组、H3122+H3122培养基+1000nmol/L克唑替尼组、及H3122-CR23+H3122培养基+1000nmol/L克唑替尼组,分别加入每组相应的培养基,37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养4小时,吸去培养基,冷磷酸盐缓冲液漂洗一遍,加入含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的细胞裂解液,冰上立即用细胞刮刮取细胞,转刮取的细胞抽提液置EP管,超声10-15s,冰上冷却,离心4℃,12000转/分,10分钟,取上清,用BCA试剂盒测蛋白浓度,每组取总蛋白25ug加上样缓冲液,上样,按蛋白免疫印迹方法常规电泳、转膜、孵育抗体,机器曝光,结果见图3。蛋白免疫印迹的结果显示,H3122-CR23的P-AKT、P-ERK蛋白水平较加1000nmol/L克唑替尼的H3122亲代细胞显著增加。

[0040] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利保护范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。



H3122

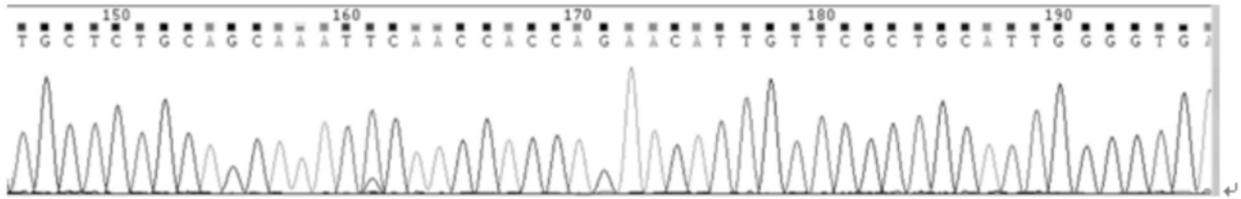


H3122-CR23

图1

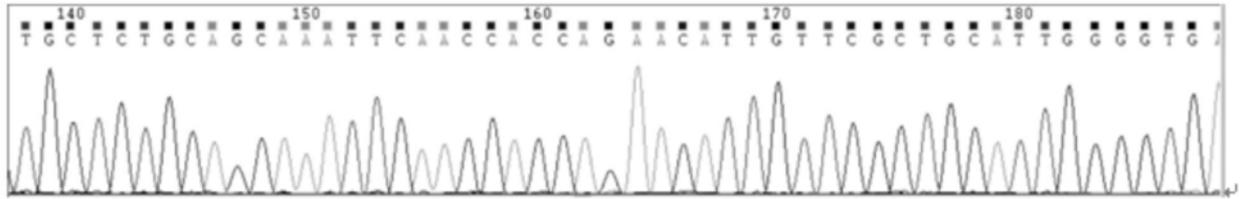
H3122-CR23 exon23 正向

↓ F1174C 杂合子突变



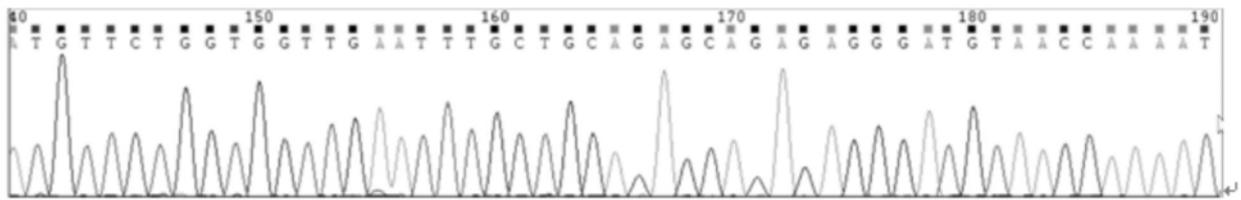
H3122 exon23 正向

↓ 无突变



H3122-CR23 exon23 反向

↓ F1174C 杂合子突变



H3122 exon23 反向

↓ 无突变

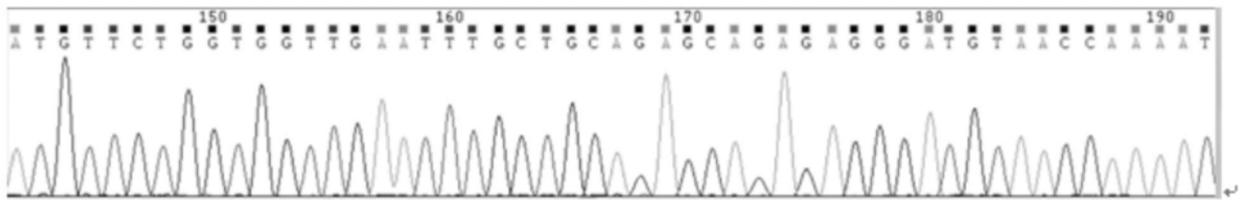


图2

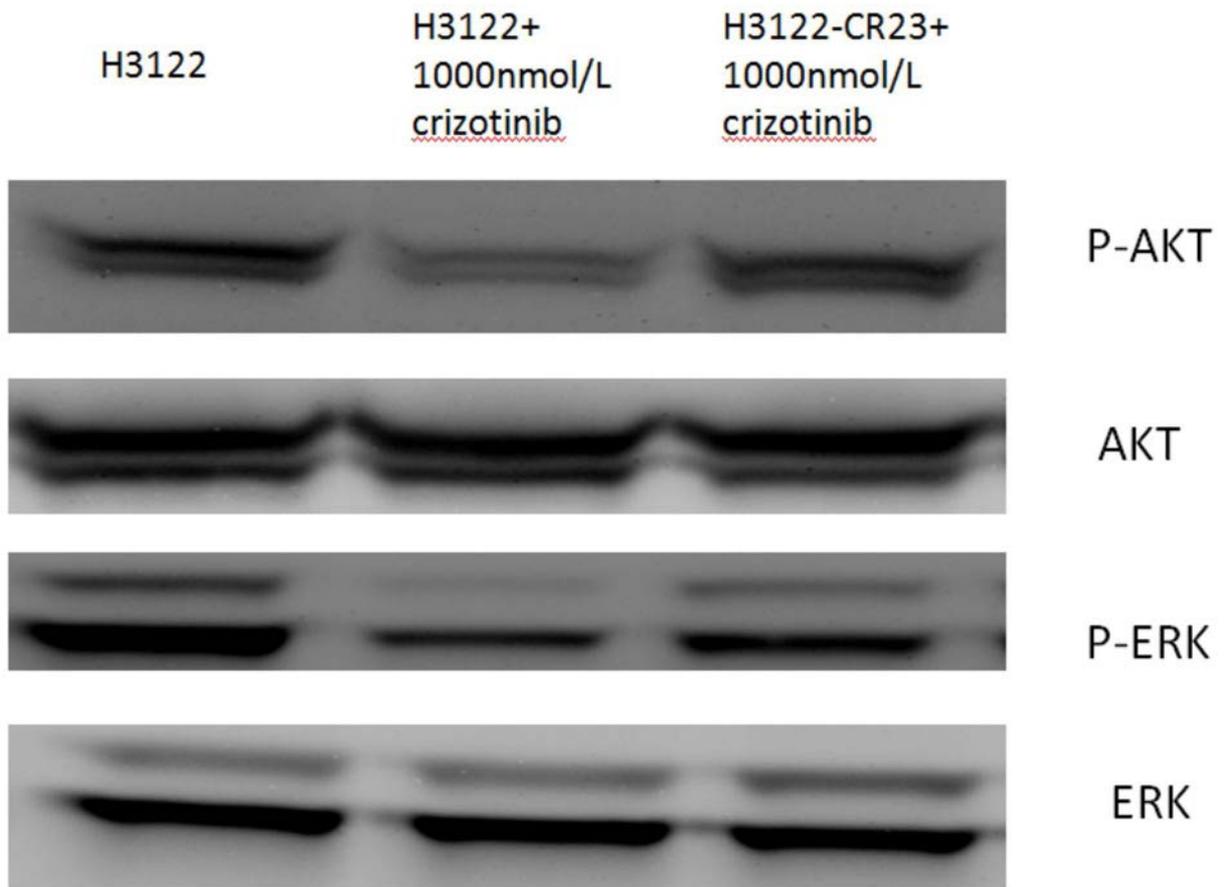


图3