

[文章编号] 1000- 4718(2006)04- 0752- 05

阿霉素诱导人胆囊癌细胞耐药过程中糖基化神经酰胺合成酶及 caspase 3 的动态变化*

李江涛¹, 彭淑牖¹, 王新保², 刘颖斌¹, 王建伟¹, 许斌¹, 李海军¹,
冯雪冬¹, 钱浩然¹, 王海军¹, 吴育连¹, 方河清¹

(¹浙江大学医学院附属第二医院外科, 浙江 杭州 310009; ²浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

[摘要] 目的: 通过检测阿霉素诱导人胆囊癌细胞多药耐药过程中糖基化神经酰胺合成酶(GCSmRNA)、蛋白及caspase 3的变化情况, 探讨神经酰胺(ceramide) 代谢中起关键作用的酶 GCS 在人胆囊癌多药耐药产生过程中的作用。方法: 阿霉素 200 μg/L 连续作用人胆囊癌细胞株 GBC- SD 12 周, 采用 MTT 法、RT- PCR、Western blotting 分别检测 GBC- SD、GBC- SD(4 周)、GBC- SD(12 周) 时的细胞毒性、GCSmRNA、蛋白的变化情况, 荧光分光光度法检测此过程中 caspase 3 的变化。结果: 诱导 12 周时, 细胞耐药倍数增加 3.8 倍, GCSmRNA、蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。3 种细胞的增殖同阿霉素浓度呈负相关, GBC- SD、GBC- SD(4 周) 增殖同作用时间呈负相关, 而 GBC- SD(12 周) 细胞同作用时间无关。GCS 的表达同 caspase 3 的活性呈负相关。结论: 阿霉素通过诱导细胞凋亡抑制人胆囊癌细胞增殖, 人胆囊癌细胞多药耐药的产生同 GCS mRNA、蛋白表达的上调相关, GCS 的表达上调抑制了 caspase 3 的激活, GCS 可能是诱导胆囊癌多药耐药产生的机制之一。

[关键词] 胆囊肿瘤; 抗药性; 神经酰胺类; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 多柔比星

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Dynamic changes of glucosylceramide synthase and caspase 3 in drug resistance induced by doxorubicin in human gallbladder carcinoma cell line GBC- SD

LI Jiang- tao¹, PENG Shu- you¹, WANG Xin- bao², LIU Ying- bin¹, WANG Jian- wei¹,
XU Bin¹, LI Hai- jun¹, FENG Xue- dong¹, QIAN Hao- ran¹, WANG Hai- jun¹, WU Yu-
lian¹, FANG He- qing¹

(¹Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; ²Cancer Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the levels of mRNA, protein of glucosylceramide synthase (GCS) and caspase 3 in the drug resistance induced by doxorubicin in human gallbladder carcinoma cell line GBC- SD, the effect of ceramide metabolism in this process was examined. **METHODS:** Human gallbladder carcinoma cell line GBC- SD was treated by doxorubicin at concentration of 200 μg/L for 12 weeks (named GBC- SD12). Cytotoxicity, mRNA and protein of GCS were measured on 1st week, 4th week and 12th week by MTT assays, RT- PCR or Western blotting. The levels of caspase 3 were measured by spectrofluorometry. **RESULTS:** A 3.8- fold increase in drug resistance to doxorubicin in GBC- SD12 was observed. Up- regulation of GCS mRNA and protein were also detected in GBC- SD12 ($P < 0.01$). Negative correlation was shown between expression of GCS and activity of caspase 3 ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** The growth inhibition via apoptosis induced by doxorubicin was observed in human gallbladder cell line GBC- SD. The drug resistance was correlated with up- regulation of GCS mRNA and protein. The activity of caspase 3 was inhibited by up- regulation of GCS. GCS may be one of the mechanisms of multi- drug resistance in gallbladder carcinoma.

[KEY WORDS] Gallbladder neoplasms; Drug resistance; Ceramides; Caspase 3; Doxorubicin

[收稿日期] 2004- 09- 09 [修回日期] 2005- 04- 06

* [基金项目] 浙江省科技计划重点项目(2003C23014)

E- mail: JTL98@21cn.com

胆囊癌近年来发病率呈上升趋势,其临床特点是发现时往往已至中晚期而失去手术治疗的机会,同肝癌、胃癌等消化系肿瘤相比,胆囊癌化疗方面的研究远远滞后,因此寻找新的药物作用靶点,逆转其多药耐药性成为胆囊癌治疗中急需研究的问题。

Zhao 等^[1]研究发现化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡过程中产生大量具有细胞毒性的糖脂类物质神经酰胺(ceramide, CM),且通过caspase 3途径执行凋亡。而肿瘤多药耐药细胞中同时也发现较多的无细胞毒性的CM代谢产物葡萄糖神经酰胺(glucosylceramide, GC),葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS)在CM转化为GC的过程中起关键作用。因此研究糖脂代谢中GCS活性的变化是近年来多药耐药研究中一个新的领域。

CM代谢途径在人胆囊癌MDR的产生和获得中是否起作用尚未见文献报道。我们利用阿霉素诱导人胆囊癌细胞株GBC-SD产生耐药,并检测在此过程中GCS和caspase 3的表达变化情况,以探讨该途径同人胆囊癌多药耐药(multidrug resistance, MDR)的关系。

材 料 和 方 法

1 试剂和药物

阿霉素由浙江海正药业股份有限公司生产(每瓶10 mg),配成2 000 mg/L储备液存于-70℃,应用时倍比稀释。Caspase 3活性检测试剂盒购自Santa-Cruz公司(SC-4263AK),GCS兔多克隆抗体由Dr. D. L. Marks和R. E. Pagano(美国Mayo Clinic and Foundation, Rochester)惠赠,人胆囊癌细胞株GBC-SD购自中科院细胞库。噻唑蓝MTT购自Sigma公司。Trizol试剂为Gibco BRL公司产品,氯仿、异丙醇、无水乙醇均为国产分析纯。AMV逆转录酶、核糖核酸酶抑制剂、Taq酶、dNTP mixture(code NO: R001A CAM)、DNA marker(Φ X174-Hinc II digest DNA marker,片段长度为79、162、210、291、341、392、495、612、770、1 057 bp)购自TaKaRa BIOTECH公司,人 β -actin内对照序列购自上海申友生物技术公司。片段长度302 bp。

2 人胆囊癌细胞株培养及耐药亚株的诱导

2.1 细胞培养 GBC-SD细胞培养在含体积分数10%小牛血清的RPMI-1640培养液中,培养条件为体积分数为5%CO₂ 37.5℃、饱和湿度,每2-3 d换液1次,测定时取对数生长期细胞,接种培养瓶或培养板中。进行实验。

2.2 阿霉素耐药细胞的诱导 细胞耐药诱导方案参照文献^[2],200 μ g/L阿霉素每2 d更换1次培养液,细胞生长至90%时传代,持续培养12周。诱导4周和12周的细胞分别命名为GBC-SD4、GBC-SD12。

2.3 阿霉素作用后GBC-SD细胞的电镜检测 按电镜细胞标本制作程序操作^[3],Hitachi-600透射电镜观察。

2.4 MTT法检测阿霉素GBC-SD、GBC-SD4、GBC-SD12的细胞毒性 MTT法参照文献完成^[3],细胞以 5×10^6 cells/L接种于96孔培养板,每孔加200 μ L培养液,24 h后细胞加药。每组设4个复孔,接种后24 h更换培养液,实验组加入含50 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L、400 μ g/L、800 μ g/L、1 600 μ g/L阿霉素的培养液。加药后分别于72 h加入20 μ L MTT,继续放入培养箱孵育4 h后吸出培养液,加入DMSO,用DYNEX酶联仪检测,波长570 nm,测定各孔的吸光度值。计算细胞存活率,存活率=实验组吸光度值/阴性对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。计算出阿霉素的IC₅₀值,阿霉素的相对耐药倍数计算公式为IC₅₀(GBC-SD4)/IC₅₀(GBC-SD)或IC₅₀(GBC-SD12)/IC₅₀(GBC-SD)。

3 RT-PCR检测

3.1 引物设计 GCSmRNA引物序列为:上游引物5'-CCITTCCTCTCCCCACCTTCCTCT-3',下游引物5'-GGTTTCAGAAGAGACACCTGGG-3',产物长度454 bp,引物经PCRDESN软件辅助自行设计。引物序列位于两个不同的外显子上,应用液浓度为25 μ mol/L。人 β -actin上游引物5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3',下游引物5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3',片段长度300 bp。应用液浓度为50 μ mol/L。

3.2 RNA提取及cDNA第1链的合成 将GBC-SD、GBC-SD4、GBC-SD12细胞分别接种于10 mm²培养皿中,所提取RNA进行半定量RT-PCR检测,观察GCSmRNA表达变化。按Trizol试剂说明提取细胞总RNA。cDNA第1链的合成后行PCR反应。扩增条件:94℃ 1 min,94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 1 min,32 cycles,72℃ 5 min。

3.3 RT-PCR产物电泳检测、照相、分析 将扩增的RT-PCR产物电泳后观察条带并保存图像。采用Magenitec Ltd.公司Band Leader Application 3.0图像分析软件分析电泳条带灰度,计算特异产物灰度同内对照 β -actin条带灰度的比值,统计分析,计算特异

产物相对的表达强度,检测3次。

3.4 RT-PCR产物的回收、纯化及测序 采用美国ABI PRISM377测序仪及配套的BigDye Terminator试剂盒检测,使用双脱氧末端终止法。由上海申友生物技术有限公司测序。

4 Western blotting 检测

蛋白提取和检测参照文献^[8],取50 μg样品进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜、封闭后,用含0.05%吐温20(Tween20)的磷酸盐缓冲液(PBST)漂洗3次,加入GCS多抗(1:1 000),4℃孵育过夜,PBST漂洗3次,加入辣根过氧化物酶标记的II抗(1:500),37℃摇床温育2h,采用增强化学发光显色系统显色。

5 Caspase 3水平检测

按试剂盒操作说明进行,荧光分光光度计上机检测,激发波长400 nm、发射波长490 nm,检测caspase 3活性。

6 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0 for Windows进行t检验和相关分析(Bivariate),组间比较采用One-Way ANOVA方法。

结 果

1 阿霉素作用不同时间细胞形态学的变化(电镜)

阿霉素作用GBC-SD细胞72h后电镜检测出现细胞凋亡形态学改变,核仁浓缩(图1)。

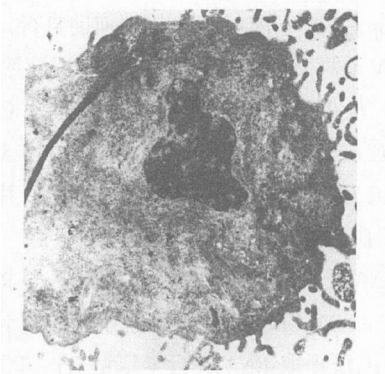


Fig 1 GBC-SD cell were observed with electron microscopy after treated by doxorubicin for 72 h (magnification, ×8 000).

图1 阿霉素作用GBC-SD细胞72h后电镜观察

2 药物毒性的测定

2.1 阿霉素对GBC-SD、GBC-SD4、GBC-SD12细胞的IC₅₀值分别为(213±154) μg/L、(430±186) μg/L、(810±253) μg/L。GBC-SD4、GBC-SD12细胞耐受阿霉素的倍数分别为2.01倍和3.8倍。

2.2 随阿霉素作用浓度增加,GBC-SD、GBC-

SD4、GBC-SD12细胞存活率明显下降(相关系数分别为r = -0.952, P < 0.05; r = -0.971, P < 0.05; r = -0.984, P < 0.05)(表1)。

表1 不同浓度阿霉素作用3种细胞的生存率

Tab 1 Cell survival rate of three different cells with vary concentration of doxorubicin (%. $\bar{x} \pm s$. n = 8)

	125 μg/L	250 μg/L	500 μg/L	1 000 μg/L
GBC-SD	78.20 ± 2.12	49.90 ± 2.00	27.16 ± 1.68	
GBC-SD4	85.30 ± 1.63	68.78 ± 2.23	48.33 ± 1.68	25.26 ± 1.99
GBC-SD12	91.40 ± 1.39	83.76 ± 2.38	77.75 ± 3.38	42.18 ± 1.79

P < 0.01, cell survival rate compared with vary concentration of doxorubicin for the same cell line.

2.3 随作用时间延长,3种细胞存活率明显下降(表2)。

表2 250 μg/L doxorubicin作用不同时间细胞生存率

Tab 2 Cell survival rate of 3 cell lines for different time with 250 μg/L doxorubicin (%. $\bar{x} \pm s$. n = 8)

	24 h	48 h	72 h
GBC-SD	62.10 ± 4.16*	49.30 ± 5.13*	36.70 ± 3.04*
GBC-SD4	89.60 ± 6.63*	81.20 ± 6.38*	69.40 ± 6.47*
GBC-SD12	93.40 ± 4.10#	83.30 ± 4.77#	84.60 ± 7.89#

* P < 0.01, cell survival rate compared on different time for the same cell line; # P < 0.05, cell survival rate compared on different time for the same cell line.

3 GBC-SD、GBC-SD4、GBC-SD12细胞GCSmRNA及蛋白的表达

3.1 GCSmRNA的表达情况 GBC-SD、GBC-SD4、GBC-SD12 3种细胞GCSmRNA相对表达强度为0.53 ± 0.11、0.44 ± 0.23、0.91 ± 0.27,前两者比较差异无显著(P > 0.05),GBC-SD12 GCSmRNA表达明显强于其它两组(P < 0.01)(图2)。

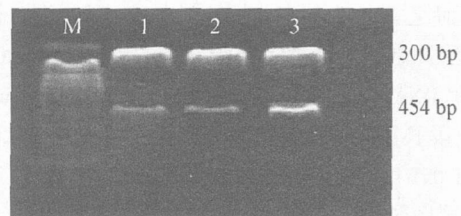


Fig 2 Expression of GCS mRNA in three cell lines. M: marker, the size of the brightest band 341 bp; 1, 2, 3: GBC-SD, GBC-SD4, GBC-SD12 β-actin as internal control.

图2 3种细胞的GCSmRNA表达情况

3.2 RT-PCR产物测序结果 RT-PCR产物测序结果表明扩增的GCSmRNA序列同所设计的序列一致,未出现碱基突变。

3.3 GCS 蛋白表达情况 GBC-SD12 的 GCS 蛋白表达明显强于其它 2 种细胞(图 3)。

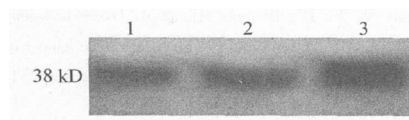


Fig 3 Expression of GCS protein. Lane 1, 2, 3: GBC-SD, GBC-SD4, GBC-SD12, GCS molecular weight 38 kD.

图 3 GCS 蛋白表达

4 阿霉素作用不同时间后, GBC-SD, GBC-SD4 细胞 caspase 3 活性同作用时间呈正相关($r = 0.866, P < 0.01$; $r = 0.949, P < 0.05$), GBC-SD12 细胞 caspase 3 的变化同阿霉素作用时间无明显相关($r = 0.545, P > 0.05$) (表 3)。

表 3 阿霉素作用不同时间 3 种细胞 caspase 3 活性变化

Tab 3 Activity of caspase 3 in three cell lines for different time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

	0 h	24 h	48 h
GBC-SD	27.5 ± 3.2*	76.2 ± 5.8*	127.7 ± 4.1*
GBC-SD4	34.7 ± 2.8*	61.3 ± 3.7*	83.2 ± 3.9*
GBC-SD12	29.8 ± 4.2#	37.8 ± 3.5#	36.3 ± 1.8#

* $P < 0.01$ vs caspase 3 activity compared on different time; # $P > 0.05$ vs caspase 3 activity compared on different time.

讨 论

化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡是其作用的主要机制,阿霉素可以引起多数实体肿瘤细胞产生凋亡,其是否可以诱导体外培养的人胆囊癌细胞凋亡未见文献报道。细胞凋亡的主要变化包括形态学、生物化学、分子生物学的改变,而其中形态学的变化最为直接可靠。本研究采用电镜检测了阿霉素作用后的人胆囊癌细胞,发现阿霉素作用后细胞出现典型的凋亡形态学变化,证实了阿霉素抑制细胞增殖是通过诱导细胞凋亡实现的。

研究表明,药物诱导肿瘤细胞凋亡时,细胞内 CM 含量明显增高,许多凋亡诱导因素经过不同途径最终产生具有细胞毒性的 CM 而起作用,表明不同作用机制的药物诱导肿瘤细胞凋亡时 CM 可能是共同作用通路。但 CM 增高至一定程度不再继续增高,即使增加药物浓度和延长作用时间也不会逆转这种现象^[4]。Gouaze 等^[5]研究发现多药耐药细胞中 CM 的代谢产物葡萄糖神经酰胺(GC)含量明显增高,而 CM 含量下降,具有细胞毒性的 CM 转化为无细胞毒性的 GC,并发现 GCS 在此过程中起重要作用,GC 的增加

总是伴随着 GCS 的活性增高。因此, GCS 可能在此过程中具有指示作用。本结果阿霉素 200 μg/L 持续作用人胆囊癌细胞系 12 周, MTT 检测发现随作用时间延长,胆囊癌细胞不仅没有出现细胞毒性作用的相应增加,而且对阿霉素产生了一定程度的耐药,表现为随药物浓度增加和作用时间延长, GBC-SD12 细胞的抑制率并没有相应增加。我们检测阿霉素诱导人胆囊癌细胞耐药过程中 GCS mRNA 和 GCS 蛋白的表达变化情况也表明,药物作用 1 周和 4 周显示 GCS mRNA 和蛋白无明显上调,而药物作用 12 周后, GCS mRNA 和蛋白较未加药的细胞明显上调($P < 0.01$),表明随阿霉素作用时间延长, GBC-SD12 细胞中 GCS 的酶合成可能明显增加,导致 CM 大量转化为无细胞毒性的 GC, GC 的大量积累引起细胞出现耐药现象。

从细胞凋亡的角度出发,肿瘤细胞的多药耐药也属于一种凋亡抗性增加,为了更深入的揭示这种凋亡抗性的产生特点,我们同时检测了凋亡诱导中起关键作用的 caspase 3, caspase 是一种特异性的蛋白酶,其家族目前已分离出 14 个成员,是与细胞凋亡密切相关的一组蛋白酶^[6]。正常情况下以无活性的酶原形式存在,在某些凋亡诱导因素的作用下,借助于细胞膜上的某些受体蛋白质使凋亡信号转导至 caspase 发生瀑布式激活,当 caspase 3 活化后可直接切割并激活 DNA 断裂因子引起 DNA 降解^[7,8]。因此, caspase 3 途径被认为是细胞凋亡的執行者。在哺乳动物细胞, ceramide 诱导细胞凋亡直接通过 caspase 3 起作用。研究 caspase 3 途径同肿瘤多药耐药的的关系有助于深入了解凋亡抗性产生的机制,阐明细胞凋亡在肿瘤细胞多药耐药产生中的意义。本研究发现在 GBC-SD12 细胞, caspase 3 活性的变化同阿霉素作用时间没有相关性,而 GBC-SD, GBC-SD4 则具有时间相关性,这两种细胞中 caspase 3 活性对阿霉素持续作用时间较敏感。同时研究 GCS 蛋白在 GBC-SD12 的表达较其它两种细胞中明显上调,显示 GCS 的高表达同 caspase 3 呈负相关,表明 GCS 表达的上调显著抑制了 caspase 3 的活性,而且 GCS 可能上调至一定程度后才对 caspase 3 的活性产生明显抑制,从而使肿瘤细胞凋亡减少,对化疗药物产生稳定的耐受。

综上所述,阿霉素诱导人胆囊癌细胞耐药产生过程中伴随着 GCS 的表达上调,以及 GCS 高表达对 caspase 3 的活性的抑制,显示 ceramide 代谢途径在这一过程中起重要作用,针对 GCS 这一靶点调控人胆囊癌的多药耐药可能将是其治疗中的一个新的方

向。

[参 考 文 献]

- [1] Zhao H, Miller M, Pfeiffer K, et al. Anoxia and reoxygenation of human endothelial cells decrease ceramide glucosyltransferase expression and activates caspases[J]. FASEB J, 2003, 17(6): 723– 724.
- [2] Uchiyama– Kokubu N, Watanabe T. Establishment and characterization of adriamycin– resistant human colorectal adenocarcinoma HCT– 15 cell lines with multidrug resistance[J]. Anti cancer Drugs, 2001, 12(9): 769– 779.
- [3] Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, et al. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/ doxorubicin– resistant human cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2778– 2785.
- [4] Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2004, 206(2): 169– 180.
- [5] Gouaze V, Yu JY, Bleicher RJ, et al. Overexpression of glucosylceramide synthase and P– glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(5): 633– 639.
- [6] 苗旭东, 杨迪生, 叶招明, 等. 细菌氧化还原蛋白 azurin 诱导 U2OS 细胞凋亡过程中 caspase– 3 的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(9): 1650– 1653.
- [7] Lee ZH, Lee SE, Kwack K, et al. Caspase– mediated cleavage of TRAF3 in FasL– stimulated Jurkat– T cells[J]. J Leukoc Biol, 2001, 69(3): 490– 496.
- [8] Alphonse G, Bionda C, Aloy MT, et al. Overcoming resistance to gamma– rays in squamous carcinoma cells by poly– drug elevation of ceramide levels[J]. Oncogene, 2004, 23(15): 2703– 2715.

《生理学报》欢迎投稿

《生理学报》是由中国生理学会和中国科学院上海生命科学研究院主办、中英文兼登的学术期刊。现任主编为中国生理学会理事长姚泰教授。双月刊,大 16 开铜版纸印刷,96 页。主要刊登生理学和相关生命科学的研究论文、研究快报、实验技术及以本人研究工作为主的综述。该刊的前身是《中国生理学杂志》,于 1927 年创刊,是我国最早出版的生理学学术期刊。从 1953 年起,改名为《生理学报》。在国内外享有较高的声誉。在所刊登的论文全面反映了中国生理学界在各个领域的最新成果和研究进展,具有较高的学术水平和创新性。

《生理学报》已被美国《生物学文摘》、《化学文摘》、《医学索引》、MEDLINE/ PubMed、BIOSIS previews 数据库,荷兰《医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》以及中国的《中国科学引文数据库》,中国期刊网,万方数据网,维普数据网等国内外检索期刊或数据库收录,是中国自然科学核心期刊和生物类核心期刊。

《生理学报》1999 年荣获首届国家期刊奖;2000 年获中国科学院优秀科技期刊特别奖;2001 年入选双奖期刊“中国期刊方阵”;2003 年又荣获第二届国家期刊奖;2005 年荣获第三届国家期刊奖百种重点科技期刊。

《生理学报》提供即期全文上网,E– mail 推送下期目录和在线网上投稿、查询的服务。稿件快速处理,1– 2 个月反馈一审结果。已接受文章摘要提前上网。学术质量好的英文稿件优先发表。

欢迎您向《生理学报》投送优质的稿件!

编辑部地址:上海市岳阳路 319 号 31B 楼 405 室

邮编: 200031

电话: 021– 54922832

传真: 021– 54922833

网址: <http://www.actaps.com.cn>

E– mail: actaps@sibs.ac.cn

国内统一刊号: CN31– 1352/Q

国际标准刊号: ISSN 0371– 0874

邮发代号: 4– 157

订阅: 全国各地邮局,也可向编辑部邮购 定价: 23 元
热忱欢迎广大读者、作者和商家订阅、投稿和发布广告!