

[文章编号] 1000-1182(2010)01-0092-03

# X-性染色体连锁凋亡抑制蛋白 与口腔鳞癌细胞Tca8113化疗耐药的关系

王家凤<sup>1</sup> 张志民<sup>1</sup> 王成坤<sup>1</sup> 聂代邦<sup>2</sup> 高文信<sup>1</sup>

(1.吉林大学口腔医院 牙体牙髓病科, 吉林 长春 130021;

2.吉林大学农学部 动物技术系, 吉林 长春 130062)

**[摘要]** 目的 研究X-性染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)在口腔鳞癌细胞Tca8113中的表达水平,并探讨XIAP表达与Tca8113细胞对化疗药物耐药性之间的关系。方法 用平阳霉素(PYM)间歇性加药,逐步递增剂量,采用甲基噻唑基四唑(MTT)法检测药物处理前后细胞对PYM的敏感性,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测XIAP在药物处理前后的各Tca8113细胞组中的表达变化,并探讨XIAP与细胞耐药性的关系。结果 Tca8113细胞在PYM间断作用下产生耐受,Tca8113-1-10组、Tca8113-10-10组耐药细胞对PYM的半数有效浓度(IC<sub>50</sub>)分别为(12.758±0.030)、(18.986±0.150) μg·mL<sup>-1</sup>。Tca8113-1-20、Tca8113-10-20组耐药细胞对PYM的IC<sub>50</sub>分别为(26.302±0.072)、(35.294±0.115) μg·mL<sup>-1</sup>。XIAP的表达水平与细胞对PYM的耐药有相关性(P<0.01)。结论 XIAP在口腔鳞癌中的表达水平升高,可能与鳞癌的化疗耐药性有关,这可作为口腔鳞癌基因治疗的一个新靶点。

**[关键词]** 口腔鳞状细胞癌; X-性染色体连锁凋亡抑制蛋白; 化疗耐药

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.01.024

**Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in Tca8113 cell and its relationship to chemoresistance** WANG Jia-feng<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-min<sup>1</sup>, WANG Cheng-kun<sup>1</sup>, NIE Dai-bang<sup>2</sup>, GAO Wen-xin<sup>1</sup>. (1. Dept. of Endodontics, School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Dept. of Animal Biotechnology, School of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP) in Tca8113 cell, and to investigate its relationship to the chemoresistance. **Methods** The Tca8113 cell line was cultured by IMDM and the concentration of Pingyangmycin(PYM) added to Tca8113 cell line was increased gradually and continually, which was to induce the PYM-resistance in Tca8113 cell line. The sensitivity of Tca8113 cell to PYM and expression of XIAP were measured with methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) chromatometry and reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The XIAP level in the cells and its chemoresistance to PYM were analyzed by linear regression. **Results** The IC<sub>50</sub> of Tca8113-1-10 group and Tca8113-10-10 group were(12.758±0.030), (18.986±0.150) μg·mL<sup>-1</sup> respectively. The IC<sub>50</sub> of Tca8113-1-20 group and Tca8113-10-20 group increased to(26.302±0.072), (35.294±0.115) μg·mL<sup>-1</sup> respectively. There was a relation between XIAP and the drug-resistance in Tca8113 cell. **Conclusion** XIAP may play an important role in the chemoresistance which might serve as a new therapeutic target for oral squamous cell carcinoma.

**[Key words]** oral squamous cell carcinoma; X-linked inhibitor of apoptosis protein; chemoresistance

X-性染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)参与了多种恶性肿瘤的增殖与转化,其表达水平与肿瘤的发生、预后以及化疗耐药密切相关<sup>[1]</sup>。口腔鳞状细胞癌是颌

面部常见的肿瘤之一,本研究旨在探讨XIAP在人口腔鳞状细胞癌细胞中的表达水平,并分析XIAP表达与Tca8113细胞化疗耐药之间的关系,为肿瘤的治疗提供依据。

[收稿日期] 2009-04-20; [修回日期] 2009-08-27

[基金项目] 吉林省科技发展计划基金资助项目(20050405-1); 吉林大学创新基金资助项目(419070200084)

[作者简介] 王家凤(1982-),女,黑龙江人,助教,硕士

[通讯作者] 张志民, Tel: 0431-88796017

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

人舌鳞癌细胞系Tca8113细胞(由中国科学院上

海细胞所提供), IMDM培养基、甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂(长春宝泰克公司), 平阳霉素(Pingyangmycin, PYM)(吉林大学口腔医院药房), 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒、PCR-marker、DNA回收试剂盒、T载体(Takara公司, 日本), XIAP引物合成送至长春宝泰克公司完成。

### 1.2 细胞的培养和处理方法

在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中, 使用含10%新生牛血清的IMDM培养液培养Tca8113细胞。取对数生长期Tca8113细胞, 培养液中加入PYM, 使其终浓度为0.5 μg·mL<sup>-1</sup>, 用该药物作用72 h, 弃去含PYM的培养液, 再用正常培养液冲洗3次, 然后加入新鲜正常培养液培养72 h, 待细胞恢复正常生长, 重复上述步骤1次后, 将药物浓度提高1倍进入下一个培养周期。重复以上步骤, 直到Tca8113细胞能够维持在药物浓度分别为1、10 μg·mL<sup>-1</sup>的培养液中正常生长, 而成为耐药Tca8113细胞, 命名为Tca8113-1、Tca8113-10。耐药细胞模型建立后, 将这2种细胞在各自的药物浓度下分别培养10、20 d, 分别为Tca8113-1-10组、Tca8113-1-20组、Tca8113-10-10组、Tca8113-10-20组。

### 1.3 MTT法检测细胞对PYM的敏感性

将Tca8113-1-10组、Tca8113-1-20组、Tca8113-10-10组、Tca8113-10-20组和未加药物处理的Tca8113组细胞分别以每孔1×10<sup>4</sup>个接种于96孔板, 各孔加入不同浓度的PYM培养基进行培养, 浓度分别为1 000、100、10、1、0.1 μg·mL<sup>-1</sup>, 每种浓度设3个复孔。3 d后每孔加入5 g·L<sup>-1</sup>的MTT 20 μg, 继续培养6 h, 吸干培养基, 加入二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)150 μL, 室温摇床上混匀10 min后, 在490 nm波长下测各孔的光密度值(A值)。实验在相同条件下重复5次, 将细胞密度的对数与细胞抑制率作半对数曲线, 根据趋势公式计算出药物半数有效浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 1.4 RT-PCR法检测XIAP mRNA的表达水平

细胞RNA的抽提及逆转录按一步法RT-PCR试剂盒的说明书进行。XIAP的上游引物序列为: 5'-AGAACAGAAGGGACAAGAATA-3'; 下游引物序列为: 5'-CACAAAGGAACAAAACGATAG-3', 扩增长度为524 bp。β-actin上游引物序列为: 5'-AGCGAG-CATCCCCAAAGTT-3'; 下游引物序列为: 5'-GG-GCACGAAGGCTCATCATT-3', 扩增长度为204 bp。反应完毕后, 经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶分析系统分析并照相, 用Quantity one图像分析系统测

光密度值进行半定量。实验在相同条件下重复5次。

1.4.1 PCR产物的检测 PCR产物用2%水平琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后取出凝胶, 进行光密度值扫描, 得到XIAP各扩增带光密度值和面积值, 然后用其表达量与对应的β-actin表达量的比值进行比较。

1.4.2 PCR产物的测序 PCR产物用2%水平琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后用刀片将扩增带割下, 按照DNA回收试剂盒的说明书将扩增后的DNA产物回收。将回收后的目的DNA连接至T载体上, 按照T载体说明书标识的方法操作, 送至长春宝泰克公司测序。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件对数据进行分析, 所有计数资料的比较均采用方差分析, 药物与IC<sub>50</sub>相对量之间的关系采用直线相关分析, P<0.05为差异有统计学意义。

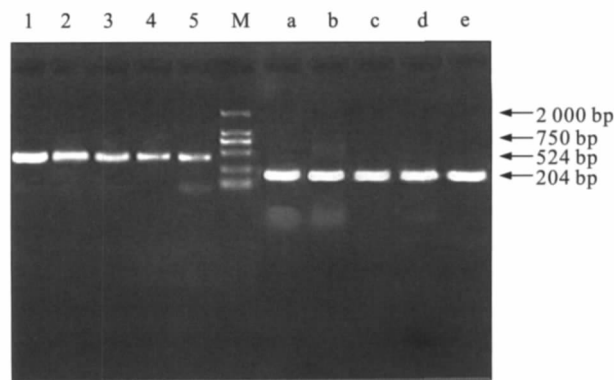
## 2 结果

### 2.1 MTT法检测结果

在各浓度PYM作用下, 各耐药组细胞抑制率明显低于Tca8113细胞组(P<0.05), 说明各耐药组细胞对PYM有明显抗药性。Tca8113-1-10组、Tca8113-10-10组耐药细胞对PYM的IC<sub>50</sub>分别为(12.758±0.030)、(18.986±0.150) μg·mL<sup>-1</sup>, 二者与Tca8113细胞组IC<sub>50</sub>(6.414 μg·mL<sup>-1</sup>±0.059 μg·mL<sup>-1</sup>)比较差异有统计学意义(P<0.05)。Tca8113-1-20组、Tca8113-10-20组耐药细胞对PYM的IC<sub>50</sub>分别为(26.302±0.072)、(35.294±0.115) μg·mL<sup>-1</sup>, 二者与Tca8113细胞组IC<sub>50</sub>比较差异有统计学意义(P<0.01)。

### 2.2 PCR产物的电泳结果

RT-PCR琼脂糖凝胶电泳结果见图1。



1: Tca8113-10-20; 2: Tca8113-1-20; 3: Tca8113-10-10; 4: Tca8113-1-10; 5: Tca8113; M: 2000 Marker; a、b、c、d、e: 对应的内参β-actin。

图1 各组细胞的电泳结果

Fig 1 The electrophoresis results of every group

图像经分析系统分析, 测得XIAP和β-actin的光

密度值和面积值，计算Tca8113细胞组、Tca8113-1-10组、Tca8113-10-10组、Tca8113-1-20组、Tca8113-10-20组结果分别为0.324、0.401、0.695、0.898、1.096。结果表明，XIAP对细胞耐药有影响，并且有浓度和时间依赖性，随着药物浓度和作用时间的增加，XIAP mRNA的表达增强，XIAP mRNA的表达水平与耐药株耐药时间呈明显正相关( $P < 0.01$ )，Tca8113-10-20组表达最强。以XIAP mRNA的相对含量为自变量( $X$ )， $IC_{50}$ 为因变量( $Y$ )，建立方程为： $Y = -3.421 + 34.326X$ 。统计结果表明XIAP的表达水平与Tca8113细胞对PYM的耐药性呈正相关( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

细胞凋亡程序失调能导致许多疾病，包括肿瘤的发生和发展、抗药、神经变性疾病、自身免疫性疾病，XIAP是参与细胞凋亡机制的主要因子<sup>[2]</sup>。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族是至今发现的哺乳类细胞中唯一的内源性半胱天冬酶(caspase)抑制物，能有效阻止细胞凋亡。研究发现，XIAP是IAP家族中对caspase抑制作用最强的成员，可通过多种途径诱导细胞凋亡：XIAP通过N-端的3个BIR结构域抑制caspase-3、caspase-7和caspase-9活性，或通过C端的RING锌指结构域催化caspase泛素化降解<sup>[3]</sup>。

目前头颈部恶性肿瘤的治疗方法仍是以外科手术配合化疗和放疗的综合治疗为主，而耐药又是化疗失败的主要原因。探讨肿瘤产生耐药的原因、分子机制以及如何抵抗肿瘤的耐药性以提高化疗的效果和降低药物的毒副作用是当前肿瘤治疗领域急需解决的问题。XIAP在口腔鳞癌组织中呈高表达，XIAP可能与肿瘤的化疗耐药有关<sup>[4]</sup>。为此本研究选择了可以被诱导产生耐药性的Tca8113细胞为研究对象，采用了间歇性加药、逐步递增剂量、体外连续培养诱导其产生耐药性<sup>[5]</sup>，并运用RT-PCR检测不同耐药剂量和时间诱导的Tca8113细胞中XIAP的表达水平。研究结果显示在Tca8113细胞中XIAP呈高水平表达；Tca8113-1-10组、Tca8113-10-10组细胞的 $IC_{50}$ 有所升高，Tca8113-1-20组、Tca8113-10-20组细胞 $IC_{50}$ 升高明显，这与冯戈等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。

本研究结果显示，随着化疗药物培养时间的延长及药物浓度的增加，细胞对化疗药物的耐药性逐

渐增加，同样XIAP的表达水平也随之增加，且与时间的关系最为密切；直线相关分析提示XIAP的表达水平与Tca8113细胞对PYM的耐药性呈正相关。有研究<sup>[7-8]</sup>采用siRNA或反义寡核苷酸技术下调XIAP的表达后，肿瘤细胞恢复了对药物的敏感性。因此，认为Tca8113细胞中XIAP表达水平的升高是在化疗药物的诱导下出现的，升高的XIAP进而参与了细胞继发性耐药性的产生，然而基因表达的调控机制是极其复杂的，XIAP在药物作用下表达的变化具体机制有待进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, et al. Targeting XIAP for the treatment of malignancy[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(2) : 179-188.
- [2] Dean EJ, Ranson M, Blackhall F, et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein as a therapeutic target[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(11) :1459-1471.
- [3] Rajcan-Separovic E, Liston P, Lefebvre C, et al. Assignment of human inhibitor of apoptosis protein(IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosomes Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization[J]. Genomics, 1996, 37(3) :404-406.
- [4] 菅志远, 李宜雄, 李小刚, 等. X染色体连锁的凋亡抑制蛋白在胰腺癌组织及细胞中的表达与化疗耐药的关系[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(2) :816-820.  
JIAN Zhi-yuan, LI Yi-xiong, LI Xiao-gang, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis in pancreatic carcinoma tissues and its relationship to chemoresistance [J]. Chin J Digestion, 2006, 26(2) :816-820.
- [5] 张萍, 王大章, 郑光勇, 等. 体外短期化疗诱导Tca8113细胞株产生耐药性的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(1) :70-73.  
ZHANG Ping, WANG Da-zhang, ZHENG Guang-yong, et al. Induction of multidrug resistance in Tca8113 cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs[J]. West China J Stomatol, 2003, 21(1) :70-73.
- [6] 冯戈, 王大章, 陈槐卿, 等. 体外诱导Tca8113细胞产生耐药性的分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(2) :184-187.  
FENG Ge, WANG Da-zhang, CHEN Huai-qing, et al. Induction of drug resistance in Tca8113 cell line by exposing to chemotherapy drug[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(2) :184-187.
- [7] McManus DC, Lefebvre CA, Cherton-Horvat G, et al. Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics [J]. Oncogene, 2004, 23(49) :8105-8117.
- [8] Galbón S, Hwang C, Rumble JM, et al. Cytoprotective effects of IAPs revealed by a small molecule antagonist [J]. Biochem J, 2009, 417(3) :765-771.

(本文编辑 王晴)