

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.013

Survivin 参与胰腺癌 PaTu8988 细胞对吉西他滨的耐药

郝利平, 王少开[△], 龚涌灵, 陈锦飞(南京医科大学附属南京第一医院肿瘤科, 南京 210006)

[摘要] 目的: 探讨凋亡抑制蛋白 survivin 在胰腺癌细胞株 PaTu8988 中的表达, 及其与吉西他滨(gemcitabine, GEM)耐药的关系。方法: MTT 法检测 GEM(0.01、0.1、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/ml)对 PaTu8988 细胞生长的抑制作用, 流式细胞术检测 GEM 作用后 PaTu8988 细胞的凋亡率, RT-PCR 检测 survivin mRNA 在 PaTu8988 细胞中的表达。结果: 高质量浓度 GEM(≥1.0 μg/ml)可显著抑制 PaTu8988 细胞的增殖、促进 PaTu8988 细胞的凋亡; 而低质量浓度 GEM(0.01、0.1 μg/ml)作用不明显。低质量浓度 GEM 时间依赖性地上调 PaTu8988 细胞中 survivin mRNA 的表达; 而质量高浓度 GEM 作用 PaTu8988 细胞后, survivin mRNA 的表达 48 h 时逐渐下降, 而后逐渐上升。结论: 胰腺癌 PaTu8988 细胞中 survivin mRNA 高表达, 可能是其对 GEM 产生耐药的原因之一。

[关键词] 胰腺癌; survivin; 吉西他滨; 耐药; 凋亡

[中图分类号] R735.9; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0186-04

Survivin is involved in drug resistance of pancreatic cancer PaTu8988 cells to gemcitabine

HAO Li-ping, WANG Shao-kai[△], GONG Yong-ling, CHEN Jin-fei (Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of apoptotic inhibitory protein survivin in pancreatic cancer cell line PaTu8988, and to study its role in the drug resistance of PaTu8988 cells to gemcitabine (GEM). **Methods:** The inhibitory effect of GEM (0.01, 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 μg/ml) on PaTu8988 cells was detected by MTT assay; apoptosis rate of PaTu8988 cells treated with GEM was determined by flow cytometry; and the survivin mRNA expression in PaTu8988 cells was examined by RT-PCR. **Results:** High dosage of GEM (≥1.0 μg/ml) greatly inhibited growth and promoted apoptosis of PaTu8988 cells, while low dosage of GEM (0.01, 0.1 μg/ml) showed no effects. Low dose of GEM time-dependently increased expression of survivin mRNA in PaTu8988 cells; high dosage of GEM gradually inhibited survivin mRNA expression within the first 48 h, and then survivin mRNA expression gradually increased as time went by. **Conclusion:** Survivin mRNA is highly expressed in pancreatic cancer cell line PaTu8988, which may be one of the reasons for drug resistance to GEM.

[Key words] pancreatic cancer; survivin; gemcitabine; drug resistance; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 186-189]

胰腺癌是常见恶性消化道肿瘤,其发生、发展与肿瘤细胞过度增殖和凋亡失控密切相关^[1]。胰腺癌临床发现时多为中、晚期,化疗对于延长患者生存期和提高生存质量有着至关重要的作用^[2-3]。在胰腺癌的辅助化疗中,存在化疗药物诱导肿瘤细胞耐药的问题。因此,提高胰腺癌细胞对化疗药物敏感性有望提高患者的生存率。

Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,在多种肿瘤细胞中高表达^[4]。Survivin 通过抑制终末凋亡效应蛋白

caspase-3 和 caspase-7, 抑制肿瘤细胞的凋亡^[5]。

[基金项目] 南京医科大学医学重点科技发展项目(No. 08NMUZ042)。Project supported by the Major Medical Science and Technology Development Program of Nanjing Medical University (No. 08NMUZ042)

[作者简介] 郝利平(1985-),女,湖南省湘雅市人,硕士生,主要从事肿瘤的临床与基础研究。王少开(1986-),男,江苏省张家港市人,硕士生,主要从事肿瘤的临床与基础研究。[△]共同第一作者

[通信作者] 龚涌灵(GONG Yong-ling, corresponding author), E-mail: gongyongling26@163.com

Survivin 表达具有肿瘤组织特异性,且肿瘤细胞的耐药性和 survivin 高表达正相关^[6],因此,以 survivin 为靶点的基因治疗不仅可逆转肿瘤细胞耐药,提高化疗效果,而且具有很好的肿瘤特异性,具有较好的临床应用前景。本研究观察 survivin 基因在吉西他滨诱导胰腺癌 PaTu8988 细胞增殖、凋亡中的作用,探讨胰腺癌细胞对吉西他滨耐药的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

人胰腺癌细胞株 PaTu8988 由德国 Michael 博士赠送。PaTu8988 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下,用含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 ng/ml 链霉素的 DMEM 培养基中培养,0.25% 胰酶消化传代。DEME 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司,RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,四噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自 Amresco 公司,AnnexinV-Fluos 试剂购自 Roche 公司,RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invotrogen 公司,RT 试剂购自 Fermentas 公司。吉西他滨(gemcitabine,GEM)购自礼来公司。

1.2 MTT 法检测 PaTu8988 细胞增殖

PaTu8988 细胞消化制成单细胞悬液,调整密度至 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ /ml,取 0.1ml 置 96 孔细胞培养板各孔中预培养 24 h。实验组加入终质量浓度为 0.01、0.1、1.0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 GEM,对照组不加药,空白对照无 PaTu8988 细胞只加培养液,每组设 6 个复孔。作用 12、24、36、48 h 后加入 10 mg/L 的 20 μl MTT,酶标仪检测波长 595 nm 时各孔的光密度值(D),用空白对照孔调零。相对抑制率% = $[(\text{对照组 } D_{595} - \text{实验组 } D_{595}) / \text{对照组 } D_{595}] \times 100\%$; 相对存活率% = $(\text{实验组 } D_{595}) / \text{对照组 } D_{595} \times 100\%$ 。

1.3 流式细胞术检测 PaTu8988 细胞凋亡

将 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ PaTu8988 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h。1.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 GEM 处理 0、4、8、12、24、36、48 h,收集 PaTu8988 细胞,PBS 洗涤,70% 乙醇 2 ml 重悬细胞,固定过夜。1 000 $\times g$ 离心,弃上清液,重悬细胞,加入 5 μl Annexin V,混匀,冰浴避光孵育 20 min。然后用 FACScan 流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.4 RT-PCR 检测 PaTu8988 细胞中 survivin mRNA 的表达

PaTu8988 细胞经不同浓度的 GEM 作用 2、4、8、12、24、48 h 后,TRIzol 提取细胞 RNA。根据 Gene

bank 中 survivin(NM-001168)的序列设计引物:正义链为 5'-TACTGCTTCGCTGGAAACCT-3',反义链为 5'-ACAGAACTGGATGCATT-3',扩增产物长度 386 bp。 β -actin 作为对照。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。反应结束后,行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶图像分析系统分析结果。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS11.0 软件,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEM 抑制 PaTu8988 细胞增殖

随着 GEM 浓度的增加,GEM 对 PaTu8988 细胞增殖的抑制作用逐渐增强,以高浓度时作用明显($P < 0.01$,图 1)。在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及以上质量浓度 GEM 作用时,PaTu8988 细胞增殖抑制率随时间延长而增加($P < 0.05$,图 1)。

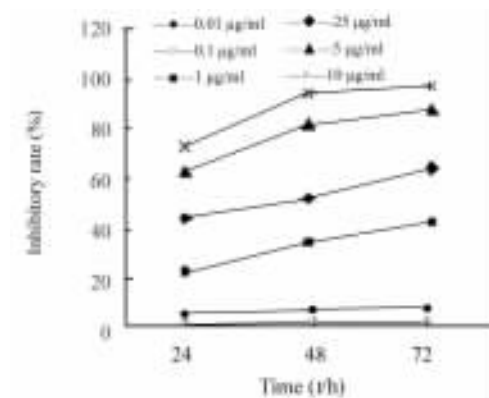


图 1 GEM 剂量和时间依赖性抑制 PaTu8988 细胞增殖
Fig.1 GEM dose- and time-dependently inhibited proliferation of PaTu8988 cells

2.2 GEM 诱导 PaTu8988 细胞凋亡

流式细胞术检测结果显示,1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GEM 处理 PaTu8988 细胞,随着时间的延长,凋亡率的变化不大;5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GEM 处理后,PaTu8988 细胞凋亡率在 12 h 急剧增加,48 h 可达 34.1% ($P < 0.05$,图 2)。

2.3 GEM 处理后 PaTu8988 细胞 survivin mRNA 表达的改变

RT-PCR 结果显示,在 0.01、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GEM 处理组,PaTu8988 细胞 survivin mRNA 表达较对照组增加;而在 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GEM 组,PaTu8988 细胞 sur-

survivin mRNA 在 12 h 表达降低,24、48 h 开始上升,72 h 接近对照组正常水平;在 5 μg/ml GEM 组, survivin mRNA 在 12、24、48 h 随时间延长而降低,72 h 时接近正常水平;在 10 μg/ml GEM 作用 12、24、48、72 h 后,PaTu8988 细胞 survivin mRNA 表达随时间延长而明显增加(表 1)。72 h 后 survivin mRNA 的表达与 PaTu8988 细胞抑制率呈负相关,提示 survivin 的高表达与 GEM 耐药相关。

2.4 Survivin 表达与 PaTu8988 细胞 GEM 耐药的关系

RT-PCR 分析 survivin mRNA 的表达,结果显示,在对照组的 PaTu8988 细胞中, survivin/β-actin 比率为 0.83,在 72 h 后, survivin mRNA 的表达水平与 GEM 浓度呈正相关,说明 survivin mRNA 的表达水平与对 GEM 的化疗敏感性密切相关 ($P < 0.05$,图 3)。

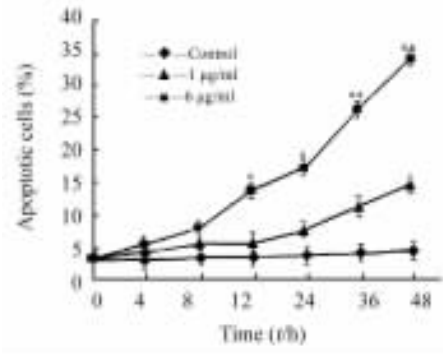


图 2 不同质量浓度 GEM 对 PaTu8988 细胞凋亡的影响
 Fig. 2 Effects of different mass concentrations of GEM on apoptosis of PaTu8988 cells
 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control group

表 1 RT-PCR 检测 GEM 作用后 PaTu8988 细胞 survivin mRNA 的表达

Tab. 1 Survivin mRNA expression in PaTu8988 cells after GEM treatment as detected by RT-PCR

GEM ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Time(t/h)				
	0	12	24	48	72
0.01	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.27 ± 0.01	1.48 ± 0.06**	2.32 ± 0.04**
0.1	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.49 ± 0.05*	0.90 ± 0.03**	1.46 ± 0.05**
1.0	0.23 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.24 ± 0.03
5.0	0.26 ± 0.04	0.21 ± 0.06	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.05	0.30 ± 0.02
10	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.37 ± 0.02*	0.48 ± 0.05*	0.50 ± 0.02*

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control group

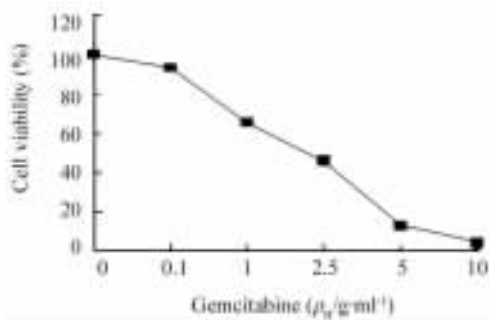


图 3 不同浓度 GEM 作用 72 h 时 PaTu8988 细胞的存活率
 Fig. 3 Survival rates of PaTu8988 cells after treatment with different concentrations of GEM for 72 h

3 讨论

临床常用抗胰腺癌的化疗药物有 GEM、5-氟尿

嘧啶、卡培他滨等。GEM 属周期特异性抗肿瘤药物,主要作用于 G_1/M 期,进入体内后由胞嘧啶核苷脱氨酶代谢,其代谢活性产物 GEM 二磷酸盐和 GEM 三磷酸盐通过掺入细胞内 DNA 而抑制细胞存活。除了抑制 DNA 合成外,GEM 还可抑制核苷酸还原酶,导致细胞内脱氧核苷三磷酸酯减少。GEM 疗效明显,但胰腺癌化疗过程中 GEM 易出现耐药,其机制尚不明确。目前已知的多药耐药机制包括 MDR 基因及其编码的 P-糖蛋白过表达、拓扑异构酶 II 的改变、谷胱甘肽及其相关酶的改变、蛋白激酶 C 改变、DNA 损伤修复能力增强、细胞凋亡相关基因表达的增加等^[7]。本研究研究化疗药物 GEM 对 PaTu8988 细胞凋亡的作用及其引起的 survivin 表达,探讨 survivin 表达与化疗耐药的关系。

细胞凋亡障碍或减少是引发耐药的重要因素,其中凋亡抑制因子过表达与肿瘤耐药密切相关。与传统的耐药机制不同,凋亡抑制因子并不阻止药物

在细胞内堆积,也不影响药物对细胞 DNA 的损伤和细胞对 DNA 的修复,但凋亡抑制蛋白可通过抑制凋亡信号的传递,阻碍细胞的凋亡,因此肿瘤细胞对化疗耐受的实质是药物不能激活其凋亡途径。不同肿瘤细胞对化疗的敏感性差异主要是因各种肿瘤细胞对凋亡的阈值不同,因此凋亡抑制基因被认为是新的耐药基因^[8]。Survivin 是 IAP 家族成员,主要分布于胚胎及分化未成熟的组织中,在成人体内除胸腺、生殖腺有微量表达外,在分化成熟的组织不表达或者低表达^[9]。在大多数常见肿瘤组织内 survivin 表达水平异常升高,同时 survivin 表达情况与肿瘤组织的转移、浸润及化学耐药等恶性生物学行为相关^[10]。Survivin 作用机制与 IAP 家族的其他蛋白相似,主要通过抑制 caspase-3 和 caspase-7 活性抑制细胞凋亡^[11]。此外,survivin 还参与细胞周期调控,使 S 及 G₂/M 期细胞比例升高。另有研究^[12]显示,survivin 促进细胞增殖和分裂,应用 survivin 反义寡核苷酸抑制正常和肿瘤细胞 survivin 的表达,细胞不能完成分裂。

本研究结果显示,不同浓度 GEM 诱导 Pa-Tu8988 细胞凋亡呈时间和剂量依赖性,可能由于随着时间的延长和剂量的增大,细胞内 caspase-3 活性增高所致。不同浓度 GEM 对 survivin mRNA 表达的影响也不同,低浓度 GEM 处理组 survivin mRNA 增加明显,而高浓度组 survivin 表达是减少的,提示小剂量 GEM 作用 PaTu8988 细胞后,更易诱导耐药的产生,这对指导临床 GEM 用药有重要意义,也揭示了部分患者由于不正规治疗产生耐药的原因。即使正规治疗,由于肿瘤深部血循环差等原因造成局部肿瘤细胞血药浓度明显降低,亦是其诱导 survivin 表达增高,从而产生肿瘤细胞耐药。本研究中高浓度 GEM 引起胰腺癌细胞 survivin 表达下降,其机制有待进一步阐明。

综上所述,诱导肿瘤细胞凋亡是化疗药物治疗胰腺癌的重要机制之一,survivin 表达可作为临床上对胰腺癌患者进行化疗方案药物选择、预后评价的参考指标。最近一项研究以 survivin 基因为靶点的反义核苷酸和 RNA 干扰能显著提高乳腺癌细胞对紫杉醇的化疗敏感性^[13]。这些结果显示,以 survivin 为靶点的基因治疗可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,为胰腺癌的治疗提供一种新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Bazzi W, Renon M, Vercherat C, et al. MEN1 missense muta-

tions impair sensitization to apoptosis induced by wild-type menin in endocrine pancreatic tumor cells [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(5): 1698-1709.

- [2] Sultana A, Smith CT, Cunningham D, et al. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(9): 2607-2615.
- [3] Gillmore R, Laurence V, Raouf S, et al. Chemoradiotherapy with or without induction chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer: A UK multi-institutional experience [J]. *Clin Oncol*, 2010, 22(7): 564-569.
- [4] Ezponda T, Pajares MJ, Agorreta J, et al. The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small-cell lung cancer survival by enhancing survivin expression [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16): 4113-4125.
- [5] Gagarina V, Carlberg AL, Pereira-Mouries L, et al. Cartilage oligomeric matrix protein protects cells against death by elevating members of the IAP family of survival proteins [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(1): 648-659.
- [6] Ling X, Calinski D, Chanan-Khan AA, et al. Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with survivin expression and p53 status but not cancer cell types [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 8-18.
- [7] Bradbury P, Middleton A, Mark R. DNA repair pathways in drug resistance in melanoma [J]. *Anticancer Drugs*, 2004, 15(5): 421-426.
- [8] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5315-5320.
- [9] Jaskoll T, Chen H, Zhou MY, et al. Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development [J]. *BMC Dev Biol*, 2001, 15(1): 5-11.
- [10] Sagol O, Yavuzsen T, Oztop I, et al. The effect of apoptotic activity, survivin, Ki-67, and P-glycoprotein expression on prognosis in pancreatic carcinoma [J]. *Pancreas*, 2005, 30(4): 343-348.
- [11] Jin Y, Wei Y, Xiong L, et al. Differential regulation of survivin by p53 contributes to cell cycle dependent apoptosis [J]. *Cell Res*, 2005, 15(5): 361-370.
- [12] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving [J]. *Nature*, 1998, 396(6711): 580-584.
- [13] Ho TF, Peng YT, Chuang SM, et al. Prodigiosin down-regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 235(2): 253-260.

[收稿日期] 2010 - 12 - 23

[修回日期] 2011 - 02 - 25

[本文编辑] 韩 丹