

survivin 及 bcl-2 基因表达在胃癌细胞株 MGC803 顺铂耐药中的作用

袁伟建, 牛小平, 张桂英

The Affection of survivin and bcl-2 mRNA Expression on Drug-resistance of Gastric Cancer Cell Line MGC803 to Cisplatin

YUAN Wei-jian, NIU Xiao-ping, ZHANG Gui-ying

Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China

Abstract: **Objective** To investigate the drug-resistance mechanisms of gastric cancer cell to cisplatin (CDDP). **Methods** Gastric cancer cell line MGC803 were treated by CDDP (0.1, 1.0, 10.0 mg/L) for 12, 24, 48 and 72 hours. Proliferation was detected by MTT assay and apoptosis was measured by fluorescence staining. Cell cycle was detected by flow cytometry. survivin and bcl-2 mRNA expression were detected by RT-PCR. **Results** High concentration of CDDP (10.0 mg/L) could inhibit proliferation and induce apoptosis, but low concentration of CDDP (0.1, 1.0 mg/L) did not. the effects of inhibiting proliferation and inducing apoptosis did not increase significantly after 24 hours, The cell cycle was altered after the cells were treated by CDDP. S phase of cells were increased and G₂/M phase of cells were decreased. survivin mRNA expression increased and bcl-2 mRNA expression decreased gradually after treated by CDDP (1.0 mg/L) for 24h ($P < 0.05$). **Conclusion** CDDP could arrest the cell cycle on MGC803 cell. But the cells were easily developing drug-resistance to low concentration of CDDP. Over expression of survivin mRNA may be one of the mechanisms of drug resistance in MGC803 cells.

Key words: Gastric cancer; Chemoresistance; Casplatin; survivin; bcl-2

摘要: **目的** 探讨胃癌细胞株 MGC803 对顺铂 (CDDP) 耐药产生的有关机制。 **方法** 观察不同浓度 CDDP (0.1、1.0、10.0 mg/L) 对 MGC803 细胞增殖、凋亡及抗凋亡基因 survivin、bcl-2 mRNA 表达的影响, 用 MTT 法检测细胞生长抑制率; 荧光染色检测细胞凋亡率; 流式细胞仪测定细胞周期的变化; RT-PCR 检测 survivin、bcl-2 mRNA 的表达。 **结果** 10 mg/L 的 CDDP 对 MGC803 细胞有较强的抑制增殖、促进凋亡作用, 而 0.1、1.0 mg/L 的 CDDP 干预 24 h 后, 其抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡的作用逐渐消失; CDDP 作用于细胞 48 h 后, 细胞 S 期增加, G₂/M 期下降; MGC803 细胞在 1.0 mg/L 的 CDDP 作用下, survivin mRNA 表达自 24 h 后逐渐增高, bcl-2 mRNA 表达逐渐下降 ($P < 0.05$)。 **结论** CDDP 可干扰 MGC803 细胞周期, 但该细胞对低浓度 CDDP 易于产生耐药, survivin mRNA 表达增高可能是 MGC803 细胞对 CDDP 产生耐药原因之一。

关键词: 胃癌细胞株; 顺铂; 耐药; 细胞凋亡; survivin; bcl-2

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2007) 01-0024-04

0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 其死亡率居各类恶性肿瘤之首, 化疗作为胃癌的重要治疗手段之一, 其疗效仍不令人满意, 原因主要与癌细胞耐药有关。为此, 本实验参照文献 [1], 将胃癌常用化疗药物顺铂 (Cisplatin, CDDP) 设为三个不同作用浓度, 通过检测 MGC803 细胞在顺铂作用过程中细胞周期, 细胞增殖、凋亡及凋亡相关基因 survivin、bcl-2 mRNA

的表达变化, 探讨胃癌细胞对细胞毒性药物顺铂耐药的产生及可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

RPMI 1640 培养液, Trizol (GibcoBRL 公司); 小牛血清 (杭州四季青公司), 四噻唑蓝 (MTT)、溴已定 (EB)、丫啶橙 (AO)、二甲基亚砷 (DMSO) (Sigma 公司), survivin、bcl-2 引物^[2] (上海生工合成); -actin (上海瑞科公司); 二步法 RT-PCR 试剂: Taq 酶、oligo-dT、dNTP、DEPC (Sangon 公司), MNLV、Rnasin (Promeg 公司), CDDP (山东齐鲁制药厂, 生理盐水溶解, 培养液稀释)。

收稿日期: 2005-12-09; 修回日期: 2006-01-19

基金项目: 湖南省教育厅重点学科建设基金资助项目 (2002-15); 湖南省卫生厅科研基金资助项目 (B2004-033)

作者单位: 410008 长沙, 中南大学湘雅医院消化内科

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及传代

人胃低分化腺癌细胞株 MGC803 购自湘雅医学院细胞中心。细胞于含青霉素 100U/L,链霉素 100mg/L,10%灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 MTT 比色法测定药物对细胞增殖的影响

以 5 × 10³/孔接种 MGC803 细胞于 96 孔培养板,设 3 个复孔,实验组加 CDDP 处理,使终浓度分别达 0.1mg/L、1.0mg/L、10mg/L,对照组加生理盐水,共同孵育 12、24、48、72h,加 20μl 的 MTT,继续培养 4h,弃上清,加 150μl 的 DMSO,酶联免疫检测分析仪测定 570nm 处的吸光值 A_{570nm},并计算该浓度下的抑制率 = [(对照组 A_{570nm} - 试验组 A_{570nm}) / 对照组 A_{570nm}] × 100%。

1.2.3 荧光显微镜检测各组药物对细胞凋亡的作用

MGC803 细胞加 CDDP 处理,使终浓度分别达 0.1mg/L、1.0mg/L、10.0mg/L,作用 12、24、48、72h,设 3 个复孔,收集细胞离心,弃上清,PBS 洗 3 次,制成细胞悬液,加入终浓度均为 100μg/ml 的 AO、EB,混匀,于显微镜下计数至少 200 个细胞的凋亡比率。早期凋亡细胞核染色质着绿色,呈固缩状或圆珠状;晚期凋亡细胞核染色质着桔红色,呈固缩状或破裂状;坏死细胞核染色质着桔红色,呈正常细胞结构;活细胞核染色质着绿色,呈正常细胞结构^[3]。

1.2.4 流式细胞仪检测各组药物对细胞周期的影响

MGC803 细胞加 CDDP 处理,使终浓度达 0.1mg/L、1.0mg/L、10.0mg/L,对照组加生理盐水,共同作用 48h,常规消化细胞,离心,PBS 洗 2 次,每管加入 70%的冰乙醇 1~1.5ml,使每个样品含细胞数至少 1 × 10⁶ 个,-20℃ 固定送检流式细胞。

1.2.5 RT-PCR 法检测 CDDP 干预前后 survivin、bcl-2 mRNA 表达变化

总 RNA 的制备:MGC803 细胞接种于 6 孔板,试验组加 CDDP 处理,使终浓度达 1.0mg/L,对照组加生理盐水,设 3 个复孔,采用 Trizol 法提取药物干预前及干预 12、24、48、72h 细胞总 RNA。

RNA 逆转录:按 M-MLV 说明书进行,cDNA 置 -20℃ 保存备用。

PCR 扩增:反应体系包括 10 × Taq Buffer 5μl, 25mM/L MgCl₂ 3μl, 10mM DNTP1μl, 10pmol/μl 的目的基因上、下游引物 (survivin 上游引物: 5'-CAG ATT TGA ATC GCG GGA CCC-3', 下游引物: 5'-CCA AGT CTG GCT CGT TCT CAG-3';

bcl-2 上游引物: 5'-GTG GAG GAG CTC TTC AGG GA-3', 下游引物: 5'-AGG CAC CCA GGG TGA TGC AA-3')、-actin 上、下游引物各 2μl,cDNA 模板 4μl,2.5U/μl Taq 酶 1μl,补充 DEPC 水至 50μl。置 PCR 扩增仪上扩增,95℃ 预变性 5min,变性、退火、延伸分别为 94℃ 30s、X (survivin 为 61℃、bcl-2 为 59℃) 1min、72℃ 1min,30 个循环后 72℃ 终末延伸 10min。PCR 产物用含 0.5mg/L de1 的 EB 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪分析结果,计算目的基因与相应 -actin 的比值。

1.3 统计学处理

定量及半定量资料,用均数 ± 标准差表示,SKN-q 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 MTT 比色法测定各浓度 CDDP 对胃癌细胞增殖的影响

各复孔平均吸光值结果发现,高浓度 CDDP (10.0mg/L) 组随着时间的延长,细胞增殖降低明显 (P < 0.05); 而低浓度 (0.1mg/L、1.0mg/L) CDDP 组在作用 24h 后不再明显下降,说明 MGC803 细胞对低浓度 CDDP 抑制增殖作用易产生耐受,见表 1。

表 1 CDDP 对 MGC803 细胞增殖的影响(OD 值)

time	control (0mg/L)	CDDP (0.1mg/L)	CDDP (1.0mg/L)	CDDP (10.0mg/L)
0h	0.63 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.63 ± 0.04	0.62 ± 0.04
12h	0.64 ± 0.05	0.61 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.49 ± 0.06
24h	0.71 ± 0.05	0.60 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.38 ± 0.06 *
48h	1.04 ± 0.07	0.73 ± 0.06	0.45 ± 0.08	0.26 ± 0.08 **
72h	1.19 ± 0.07	0.67 ± 0.07	0.46 ± 0.06	0.09 ± 0.08 **

实验组与 CDDP 处理前比较,* P < 0.05,** P < 0.01

2.2 荧光染色检测各组 CDDP 对胃癌细胞凋亡的影响

荧光染色计数凋亡细胞发现,高浓度的 CDDP (10.0mg/L) 作用后,细胞凋亡率随作用时间的延长而增加 (P < 0.05),见图 1,而低浓度的 CDDP (0.1mg/L、1.0mg/L) 作用于 MGC803 细胞 24h 后,细胞凋亡率几乎不再发生改变,表 2。

表 2 CDDP 对 MGC803 细胞凋亡的影响 (%)

Time	CDDP (0.1mg/L)	CDDP (1mg/L)	CDDP (10mg/L)
0h	3 ± 0.5	4 ± 0.6	3 ± 0.5
12h	8 ± 0.9	12 ± 0.7	23 ± 1.7
24h	11 ± 0.9	16 ± 1.4	59 ± 3.8
48h	12 ± 1.0	15 ± 1.8	74 ± 4.6 *
72h	16 ± 1.3	17 ± 1.3	/

与 CDDP 处理 12h 比较,* P < 0.05

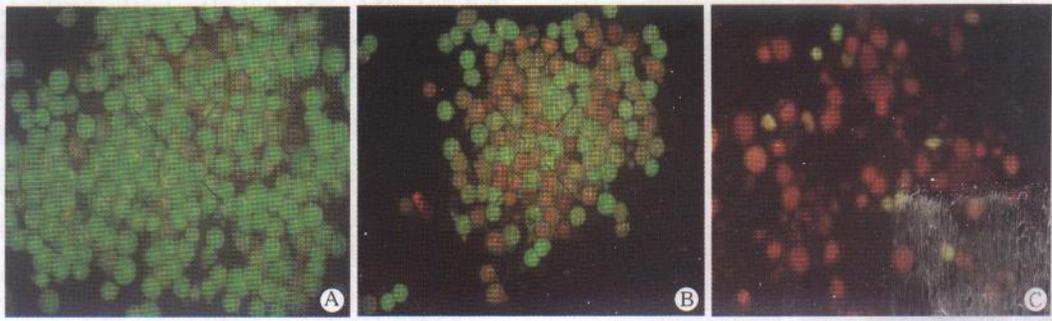


图 1 CDDP(10.0mg/L)作用于 MGC803 细胞 0h(A)、24h(B)、48h(C) 细胞凋亡的改变

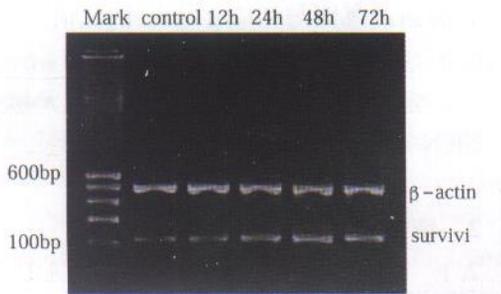


图 2 CDDP 作用后 MGC803 细胞 survivin mRNA 表达变化 (survivin mRNA 206bp, β -actin 500bp)

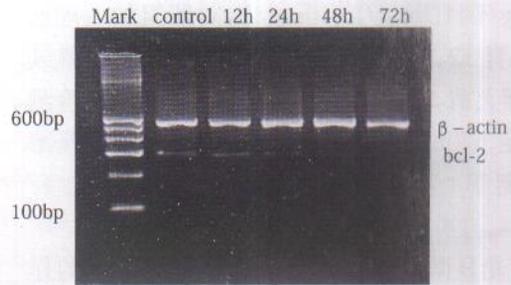


图 3 CDDP 作用后 MGC803 细胞 bcl-2 mRNA 表达变化 (bcl-2 mRNA 304bp, β -actin 500bp)

2.3 流式细胞检测各组 CDDP 对胃癌细胞周期的影响

MGC803 细胞经不同浓度的 CDDP 作用 48h 后,细胞 S 期比率逐渐增加, G₂/M 期下降。CDDP 对细胞周期的影响具有明显的量效依赖关系,见表 3。

表 3 CDDP 对 MGC803 细胞周期的影响

concentration (mg/L)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0.0	58.4	30.2	11.4
0.1	50.7	37.7	11.6
1.0	51.2	40.3	7.5
10.0	52.9	47.1	0.0

2.4 RT-PCR 检测 CDDP 对胃癌细胞 survivin、bcl-2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测 survivin、bcl-2 mRNA 表达的变化(图 2、3)、凝胶成像分析仪分析结果(表 4)发现, MGC803 细胞在低浓度(1.0mg/L) CDDP 作用下, survivin mRNA 在 24、48、72h 后表达持续增强, 72h 后其表达接近于对照组的 3 倍。而 bcl-2 mRNA 在干预 12、24、84、72h 表达逐渐减弱。

表 4 半定量 RT-PCR 检测 CDDP 对 MGC803 细胞 survivin、bcl-2 mRNA 表达的变化

group	control	12h	24h	48h	72h
survivin	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.06	0.72 ± 0.07 *	0.75 ± 0.11 *	0.89 ± 0.07 *
bcl-2	0.43 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.20 ± 0.01 *	0.23 ± 0.02 *	0.19 ± 0.01 *

与对照组比较 * P < 0.05

3 讨论

临床上由于大剂量化疗药物毒副作用大,患者

不能耐受,小剂量极易产生耐药等原因,极大地影响了其疗效。积极探索肿瘤细胞对化疗药物的耐药机制,克服肿瘤细胞耐药的产生,是胃癌非手术治疗急需解决的问题之一。

survivin 广泛表达于机体胚胎及恶性肿瘤组织^[4,5],它在胃癌病理组织中表达高达 82%^[6],而在正常组织、终末分化组织中表达阴性,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密切相关^[7],其作用机制与 IAP 家族的其他蛋白相似,它通过抑制 caspase-3 和 7 酶原的活性,从而抑制细胞凋亡,此外, survivin 还参与了细胞的有丝分裂,促进细胞增殖,研究发现,应用 survivin 反义寡核苷酸抑制正常和肿瘤细胞 survivin 的表达,结果在细胞凋亡增加的同时,多倍体产生增多,软琼脂培养基中的集落减少^[8],转染 survivin 基因的 293 细胞增殖速度加快^[9],表达磷酸化缺陷 survivin 突变体可以增加人类黑色素瘤细胞的凋亡,增强顺铂诱导的细胞死亡^[10]。bcl-2 是较早发现的、重要的细胞凋亡抑制基因,在多种恶性肿瘤组织过度表达,它通过阻止钙离子从内质网向胞浆释放,使依赖钙离子的核酸内切酶活性降低,抑制氧化自由基的产生等阻断细胞凋亡,增加肿瘤播散侵袭能力。在本实验中发现, MGC803 细胞存在凋亡抑制基因 survivin 和 bcl-2 mRNA 的表达。

CDDP 可使肿瘤细胞周期发生改变,从而诱导周期特异性细胞凋亡^[11,12],我们的研究发现, MGC803 细胞经 CDDP 处理后,细胞 S 期比例增

加, G₂/M 期下降, 说明细胞受阻于 S 期, 不能进入 G₂/M 期, 这与有关对食管癌的研究报道相一致^[13]。然而其临床疗效却不十分乐观, 主要原因与肿瘤细胞的耐药有关, 结果表明, 大剂量 CDDP (10.0mg/L) 可抑制胃癌细胞株 MGC803 增殖、诱导凋亡, 并具有较好的时效相关性, 但该浓度已远远大于临床用药剂量, 临床最大用药剂量的血药峰值浓度为 2mg/L^[14], 而接近这一浓度的低浓度组 (0.1mg/L, 1.0mg/L) 对此胃癌细胞系作用较弱, 药物干预 24 小时后, 细胞凋亡率几乎不再发生改变, 对细胞增殖抑制作用也逐渐减弱, 表明 MGC803 细胞对低浓度 CDDP 极易产生耐药, 其机制目前尚不十分清楚。除了肿瘤细胞能过度表达 mdrl 编码的 P 糖蛋白, 增加药物排出外, 还在于肿瘤细胞能抵抗药物诱导的凋亡。有研究认为, 化疗药物接触肿瘤细胞后可诱导肿瘤细胞 COX-2 表达增加, 进而诱导抗凋亡基因 bcl-2 的表达^[15], 此外, 新近研究还发现, CDDP 可诱导凋亡抑制基因家族 (IAP) 的新成员 survivin 的表达增加^[16,17]。本研究发现, MGC803 细胞经低浓度 (1mg/L) CDDP 作用后, survivin mRNA 于干预后 24、48、72h 表达逐渐增强, 72h 接近于对照组的 3 倍, Ikeguchi 等报道了用小剂量 CDDP (0.1mg/L, 1mg/L) 作用于胃癌细胞系 MKN-45 后, 早期 (1h) 细胞凋亡明显增加, 干预后期 (48h) 凋亡细胞百分比不再发生变化, 细胞 survivin mRNA 及蛋白表达均明显增加, 其报道与本研究结果相一致。CDDP 诱导凋亡的机制与 Caspase-3 的活化有关, 而 survivin 则是通过抑制 Caspase-3 的活化而抑制细胞凋亡的, 由此认为 survivin 的表达增加可抵抗 CDDP 诱导的细胞凋亡, 产生耐药^[16-18], bcl-2 mRNA 表达在 CDDP 干预后, 逐渐下降, 表明其表达受到 CDDP 的抑制, 这一结果与部分文献报导不一致, 其原因可能与使用的肿瘤细胞不同有关, 文献认为 bcl-2 表达增高是由于肿瘤细胞在 CDDP 作用下经 COX-2 受体介导所致, 而胃癌 MGC803 细胞株 COX-2 蛋白表达阴性。

结果证实低浓度 CDDP 可诱导胃癌细胞株 MGC803 survivin mRNA 表达增强, 这一凋亡相关基因的改变, 可能是导致胃癌细胞对化疗药物产生耐药的原因之一, 而在这一过程中 bcl-2 的作用似乎不明显。

参考文献:

- [1] Kim R, Tanabe K, Inoue H, et al. Mechanism(s) of antitumor action in protracted infusion of low dose 5-fluorouracil and cisplatin in gastric carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20 (3): 549-555.
- [2] Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, et al. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X Gene Expression in Sentinel Lymph Nodes From Melanoma Patients [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21 (2): 306-312.
- [3] 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2000, 8 (5): 532-535.
- [4] Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond [J]. *Med Sci Monit*, 2003, 9 (4): 25-29.
- [5] Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer [J]. *Prog Cell Cycle Res*, 2003, 5: 447-452.
- [6] Yu T, Leung WK, Eber MPA, et al. Increased expression of surviving in gastric cancer patients and in first degree relatives [J]. *Br J cancer*, 2002, 87 (1): 91-97.
- [7] 李平, 李兆申, 王雅杰, 等. 凋亡抑制基因生存素在胃癌组织中的表达及意义 [J]. *中华消化杂志*, 2003, 23 (11): 662-664.
- [8] Chen J, Wu W, Tahir SK, et al. Down regulation of Survivin by anti-sense oligonucleotides increase apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage independent growth [J]. *Neoplasia*, 2000, 2 (3): 235-241.
- [9] 朱红霞, 刘爽, 周翠琦, 等. 抗凋亡基因 Survivin 促进细胞转化的作用机制 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82 (5): 338-340.
- [10] Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, et al. Inhibition of melanoma growth in vivo by Survivin targeting [J]. *PNAS*, 2001, 98 (2): 635-640.
- [11] Chen XX, Lai MD, Zhang YL, et al. Less cytotoxicity to combination therapy of 5-fluorouracil and cisplatin than 5-fluorouracil alone in human colon cancer cell lines [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8 (5): 841-846.
- [12] 邹丽娟, 董志, 陈亚敏. 顺铂对肝癌细胞凋亡及其细胞周期的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2002, 7 (4): 267-271.
- [13] 刘先军, 彭吉霞, 吴清明, 等. 顺铂对食管癌细胞周期及端粒酶活性的影响 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2003, 12 (2): 181-182.
- [14] 杨金亮, 房殿春, 杨仕明, 等. 抑制端粒酶活性增加胃癌细胞对顺铂的敏感性 [J]. *中华内科杂志*, 2001, 40 (7): 478-479.
- [15] Sun Y, Tang XM, Half E, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (21): 6323-6328.
- [16] Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment [J]. *Apoptosis*, 2002, 7 (1): 23-29.
- [17] Ikeguchi M, Nakamura S, Kaibara N. Quantitative analysis of expression levels of bax, bcl-2, and survivin in cancer cells during cisplatin treatment [J]. *Oncol Rep*, 2002, 9 (5): 1121-1126.
- [18] Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, et al. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95 (1): 44-51.

[编辑: 安 凤]