

# 抑制 X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白 (XIAP) 和 Survivin 表达对胰腺癌 Panc-1 细胞增殖及化疗敏感性的影响

宰红艳<sup>1</sup>, 易小平<sup>2△</sup>, 李宜雄<sup>1</sup>, 龙学颖<sup>2</sup>, 曹丽平<sup>1</sup>, 刘 慧<sup>2</sup>

(中南大学湘雅医院 1. 普外科, 2. 放射科, 长沙 410008)

**[摘 要]** **目的:**探讨同时抑制 X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)和 Survivin 表达,对胰腺癌 Panc-1 细胞增殖及吉西他滨(Gem)化疗敏感性的影响,并与单独抑制 XIAP 或 Survivin 表达的策略进行对比。**方法:**运用前期实验构建的 XIAP-shRNA 慢病毒(LV-X)和 Survivin-shRNA 慢病毒(LV-S),分别建立 XIAP 和/或 Survivin 表达稳定抑制的胰腺癌 Panc-1 细胞株,即 Panc-1-X、Panc-1-S 和 Panc-1-XS。运用 Real-time PCR 和半定量 Western blot 分别检测 XIAP 和 Survivin 的 mRNA 和蛋白的表达情况,以细胞计数法及克隆形成实验检测细胞增殖能力,Caspase-3/7 试剂盒及流式细胞仪检测细胞凋亡,MTT 法检测细胞对 Gem 的化疗敏感性。**结果:**成功建立了 XIAP 和/或 Survivin 表达稳定抑制的胰腺癌细胞株 Panc-1。XIAP 和 Survivin 同时稳定抑制后,Panc-1 的增殖能力显著受到抑制,Panc-1-XS 组的克隆形成率为  $10.12\% \pm 1.33\%$ ,显著低于对照组 Panc-1-XncSnc 组( $96.61\% \pm 7.89\%$ )和 Panc-1 组( $100.28\% \pm 8.97\%$ ,  $P < 0.05$ )。用 0.5 mg/L Gem 处理 24 h 后,Panc-1-XS 组的 Caspase-3/7 相对活性明显升高至  $15.02 \pm 0.57$ ,显著高于 Panc-1 组与 Panc-1-XncSnc 组(分别为  $8.87 \pm 0.19$  和  $9.05 \pm 0.23$ ,  $P < 0.05$ );Panc-1-XS 组的细胞凋亡率为  $24.09\% \pm 2.75\%$ ,显著高于对照组 Panc-1-XncSnc 及 Panc-1 组(分别为  $12.09\% \pm 1.97\%$  和  $12.06\% \pm 1.22\%$ ,  $P < 0.05$ )。Panc-1-XS 组的 IC50 值为  $(0.47 \pm 0.04)$  mg/L,显著低于对照组 Panc-1-XncSnc 的  $(2.18 \pm 0.13)$  mg/L 及 Panc-1 组的  $(2.13 \pm 0.18)$  mg/L ( $P < 0.05$ ),对 Gem 的化疗敏感性显著增强。进一步检测显示,Panc-1-XS 组的 IC50 值为  $(0.47 \pm 0.04)$  mg/L,均显著低于 Panc-1-X 组的  $(0.76 \pm 0.07)$  mg/L 和 Panc-1-S 组的  $(0.87 \pm 0.09)$  mg/L ( $P < 0.05$ )。**结论:**同时稳定抑制胰腺癌细胞株 Panc-1 中 XIAP 和 Survivin 的表达,能显著抑制 Panc-1 细胞增殖能力,增强其 Gem 化疗敏感性,并明显优于 XIAP 或 Survivin 表达单独抑制的策略。

**[关键词]** 胰腺肿瘤;凋亡抑制蛋白质类;细胞增殖;药物治疗;抗药性;肿瘤

**[中图分类号]** R736.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2013)02-0242-08

**doi:**10.3969/j.issn.1671-167X.2013.02.016

## X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and Survivin suppression on human pancreatic cancer cells Panc-1 proliferation and chemosensitivity

ZAI Hong-yan<sup>1</sup>, YI Xiao-ping<sup>2△</sup>, LI Yi-xiong<sup>1</sup>, LONG Xue-ying<sup>2</sup>, CAO Li-ping<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, 2. Department of Radiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect on cell proliferation and chemosensitivity of human pancreatic cancer cells Panc-1 after X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and Survivin are inhibited simultaneously, and to compare it with the separate gene suppression strategy by which expression of XIAP or Survivin is inhibited respectively. **Methods:** Panc-1 (Panc-1-X, Panc-1-S and Panc-1-XS) in which expression of XIAP and/or Survivin was inhibited, was established by using XIAP-shRNA lentiviral and Survivin-shRNA lentiviral we had built. The expressions of XIAP and Survivin mRNA and protein were evaluated by Real-time PCR and Semi-quantitatively Western blot analysis; cell proliferation was investigated by cell counting and colony formation assay; cell apoptosis was investigated by Caspase-3/7 activity assay kit and flow cytometry; gemcitabine (Gem) chemosensitivity was investigated by MTT assay. **Results:** The pancreatic cell line Panc-1 in which the expression of XIAP and/or Survivin was stably

**基金项目:** 国家自然科学基金(30872492)、湖南省自然科学基金(08JJ3042)、中南大学自由探索计划(2011QNZT153)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872492), the Natural Science Foundation of Hunan Province (08JJ3042), and the Freedom Exploration Program of Central South University (2011QNZT153)

△ Corresponding author's e-mail, doctoryixiaoping@hotmail.com

网络出版时间:2013-3-28 9:21:32 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20130328.0921.007.html>

inhibited was successfully established. The cell proliferation of Panc-1-XS cells decreased significantly. The colony formation rate of Panc-1-XS cells ( $10.12\% \pm 1.33\%$ ), was significantly lower than that of Panc-1-XncSnc cells ( $96.61\% \pm 7.89\%$ ) and Panc-1 cells ( $100.28\% \pm 8.97\%$ ) respectively ( $P < 0.05$ ). After being treated by 0.5 mg/L Gem for 24 h, the Caspase-3/7 relative activity of Panc-1-XS cells ( $15.02 \pm 0.57$ ) was significantly higher than that of Panc-1 cells and Panc-1-XncSnc cells ( $8.87 \pm 0.19$  and  $9.05 \pm 0.23$ , respectively;  $P < 0.05$ ); and the rate of apoptosis of Panc-1-XS cells ( $24.09\% \pm 2.75\%$ ) was significantly higher than that of Panc-1-XncSnc cells and Panc-1 cells ( $12.09\% \pm 1.97\%$  and  $12.06\% \pm 1.22\%$ , respectively;  $P < 0.05$ ). The IC<sub>50</sub> value of Panc-1-XS cells [ $(0.47 \pm 0.04)$  mg/L] was significantly lower than that of Panc-1-XncSnc cells [ $(2.18 \pm 0.13)$  mg/L] and Panc-1 cells [ $(2.13 \pm 0.18)$  mg/L,  $P < 0.05$ ]. Further testing also showed that, the IC<sub>50</sub> value of Panc-1-XS cells [ $(0.47 \pm 0.04)$  mg/L] was significantly lower than that of Panc-1-X cells [ $(0.76 \pm 0.07)$  mg/L] and Panc-1-S cells [ $(0.87 \pm 0.09)$  mg/L,  $P < 0.05$ ]. **Conclusion:** The cell proliferation of panc-1 cells was significantly suppressed and the Gem chemosensitivity was significantly enhanced after expressions of XIAP and Survivin were inhibited simultaneously, and significantly better than the strategy in which expressions of XIAP and Survivin were inhibited separately.

**KEY WORDS** Pancreatic neoplasms; Inhibitor of apoptosis proteins; Cell proliferation; Drug therapy; Drug resistance, neoplasm

胰腺癌是一种常见的恶性程度很高的消化系统肿瘤,美国 2010 年大约有 43 140 新发病例,约 36 800 例死于胰腺癌,位居恶性肿瘤死亡原因的第四位,其发病率和死亡率近年来有逐年增加的趋势<sup>[1]</sup>。胰腺癌患者中仅 < 15% 的患者可能以手术切除,而大部分患者 (> 80%) 诊断时已经处于晚期<sup>[2]</sup>,需要化疗和放疗等辅助或新辅助治疗以减轻症状、延长生存期。然而,胰腺癌对当前的化疗和放疗高度抵抗,辅助和新辅助治疗改善预后的作用非常有限,其主要原因之一就是肿瘤细胞通过凋亡抵抗介导耐药,这也是当前胰腺癌治疗面临的主要问题之一<sup>[3-4]</sup>。

X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)和 Survivin 是已知的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAPs)中凋亡抑制功能最强的两种因子。研究表明, XIAP 或 Survivin 异常高表达与肿瘤的预后差和化、放疗抵抗密切相关<sup>[3-4]</sup>。最近的研究表明, XIAP 和 Survivin 同时高表达可能在肿瘤细胞介导凋亡抵抗机制中发挥重要作用<sup>[5-7]</sup>。因此,本研究运用前期实验中已经成功构建的 XIAP-shRNA 慢病毒(LV-X)和 Survivin-shRNA 慢病毒(LV-S)<sup>[8-9]</sup>,在胰腺癌细胞系 Panc-1 中同时稳定地抑制 XIAP 和 Survivin 的表达,并探讨同时成功抑制两种基因表达后,对 Panc-1 细胞增殖、凋亡及吉西他滨(Gem)化疗敏感性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要方法和材料

胰腺癌细胞株 Panc-1 购自中国医学科学院上海细胞库,由中南大学医学遗传学国家重点实验室保存; XIAP-shRNA 慢病毒(LV-X)和 Survivin-shRNA

慢病毒(LV-S)由本研究组前期构建并包装、滴度测定<sup>[8-9]</sup>;相应无义对照 shRNA 慢病毒(LV-Xnc、LV-Snc)及荧光对照慢病毒(LV-GFP)均购自上海吉凯基因公司; Trizol/DMEM 培养基、胎牛血清购自 Invitrogen 公司; MTT(四氮唑蓝)购自 Sigma 公司; 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司; SYBR TAQ Real-time 试剂盒购自 TAKARA 公司; Caspase-3/7 荧光酶活性检测试剂盒购自 Promeg 公司; 兔抗人 Survivin 一抗购自 NOVUS; 山羊抗人 XIAP 一抗购自 R&D 公司; 鼠抗人  $\beta$ -actin 一抗购自 Sigma 公司; 相应兔抗鼠二抗、鼠抗兔二抗、兔抗山羊二抗购自 Jackson 公司; 嘌呤霉素(Puromycin)和新霉素(G418)均购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 构建稳定感染 shRNA 慢病毒的胰腺癌细胞株 Panc-1

**1.2.1 病毒感染** 取对数期生长的 Panc-1 细胞,以  $1 \times 10^5$  cell/孔接种于 6 孔板中,用含 10% (体积分数)胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% (体积分数) CO<sub>2</sub> 条件下培养 12 h,当细胞融合度达 40% 左右时,更换新鲜 DMEM 培养基,然后按照预先摸索的最佳感染条件加入  $1 \times 10^8$  TU/mL 病毒 150  $\mu$ L (MOI = 75) 及 polybrene 进行感染(总体积 1 mL,其中 polybrene 终质量浓度 5 mg/L); 培养 8 h 后再次更换新鲜 DMEM 培养基。

**1.2.2 细胞筛选和克隆挑取、扩大及传代** 将感染病毒后、换新鲜完全培养基培养 24 h 后的细胞,以  $2.0 \times 10^5$  cell/皿传入培养皿(内径为 60 mm),2 d 后以终质量浓度为 1 mg/L 的 Puromycin 和/或 800 mg/L 的 G418 进行筛选,3 d 换液一次直至未转染细胞全部死亡,连续培养至第 14 天;然后于显微镜下挑取克隆,并以维持浓度(Puromycin: 0.5 mg/L;

G418:400 mg/L) 培养;鉴定出阳性感染克隆后,将克隆传代扩大培养 2 个月。

### 1.3 Real-time PCR 检测目标基因 mRNA 表达

运用 Trizol 裂解液裂解细胞,按使用说明抽提 RNA;使用引物(Oligo dt18)及 RNA(1  $\mu$ g),按说明配制反应体系进行 RT 反应,反应条件为 42  $^{\circ}$ C 60 min, 70  $^{\circ}$ C 5 min。XIAP 上游引物:5'-GCAAAGCTTCTC-CTCTTGCAG-3',下游引物:5'-GACAGTATGCAAGAT-GAGTCAAGTCA-3',扩增片段长度为 93 bp;Survivin 上游引物:5'-TCATCCTCACTGCGGCTGTC-3',下游引物:5'-AGGTCATCTCGGCTGTTCTG-3',扩增片段长度为 149 bp;内参  $\beta$ -actin 上游引物:5'-GTACTT-GCGCTCAGGAG-3',下游引物:5'-ACTCTTC-CAGCCTTCCTCC-3',扩增片段长度为 232 bp。根据 Real-time PCR 试剂盒的说明设置反应体系,在 ABI PRISM 7900HT 系统上运行:95  $^{\circ}$ C 30 s,然后 95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。以 LV-Xnc 或 LV-Snc 组细胞作为对照,使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量( $Ct$  为循环阈值),具体公式如下: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{XIAP/Survivin} - Ct_{\beta-actin}) - (Ct_{XIAP/Survivin} - Ct_{\beta-actin})_{Xnc/Snc}$ 。每实验组设置 3 复孔,实验重复 3 次以上。

### 1.4 半定量 Western blot 蛋白检测

运用细胞裂解液裂解适量细胞,总蛋白浓度使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测。取待检蛋白 20  $\mu$ g 使用 12% 或 15% (体积分数)聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,恒压 120 V,90 min,然后室温封闭 60 min。XIAP 一抗体积比 1:5 000, Survivin 一抗体积比 1:1 000,均作用 1 h 后 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;相应二抗体积比 1:3 000,孵育 1 h; $\beta$ -actin 一抗体积比 1:10 000,作用 1 h 后 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,相应二抗体积比 1:10 000,孵育 1 h。按说明加入 ECL 显色液反应 3 min,然后进入暗室常规曝光显影。

### 1.5 细胞增殖检测

**1.5.1 细胞计数法检测细胞增殖** 取对数期生长的待测细胞(Panc-1-XS、Panc-1-XncSnc、Panc-1),各自消化计数制备细胞悬液,台盼蓝染色计算活细胞数后以  $1 \times 10^4$  cell/孔接种入 6 孔板内,移入 37  $^{\circ}$ C、含 5%  $CO_2$ 、饱和湿度的培养箱中培养;分别于接种后第 1、2、3、4、5、6、7 天消化计数孔板内细胞。每次设 3 个复孔,取平均数,实验重复 3 次,根据数据绘制生长曲线。

**1.5.2 平板克隆形成实验** 取对数生长期的待测细胞制备细胞悬液,以  $5 \times 10^3$ /皿接种于培养皿中(内径 100 mm),37  $^{\circ}$ C、含 5%  $CO_2$ 、饱和湿度下静止培养 2~3 周,每 7~10 天更换一次新鲜培养基,当

出现肉眼可见的克隆时终止培养,弃去培养基,使用  $1 \times$  PBS 浸洗 2 次,纯甲醇 5 mL 固定 15 min,加吉姆萨染液染色 10~30 min,清水冲洗后空气干燥,计数。计算接种效率(planting efficiency, PE)、最终的克隆形成率即细胞的存活分数(survival fraction, SF)。计算公式如下: $PE = \frac{\text{集落数}}{\text{细胞接种数}} \times 100\%$ ,

$$SF = \frac{\text{某一处理组中形成的集落数}}{\text{接种的单个细胞数}} \times 100\%$$

### 1.6 细胞凋亡检测

取对数生长待测细胞以  $1 \times 10^5$  cell/孔接种入 6 孔板,移入 37  $^{\circ}$ C、含 5%  $CO_2$ 、饱和湿度的培养箱中培养 12 h;更换新鲜培养基,使用含 0.5 mg/L Gem 的培养基培养 24 h,然后制备细胞悬液进行下列检测。

**1.6.1 Caspase-3/7 荧光酶活性测定** 待测细胞以  $3 \times 10^3$  cell/孔接种于 96 孔板,按说明使用 Caspase-3/7 试剂盒检测 Caspase-3/7 活性。检测每次设 3 个复孔,取平均值,相同条件下实验重复 3 次。

**1.6.2 流式细胞仪检测细胞凋亡(Annexin V/PI 双染法)** 取  $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$  待测细胞,按照 Annexin V/PI 检测试剂盒说明处理后,以流式细胞仪检测细胞凋亡率,相同条件下实验重复 3 次。

### 1.7 MIT 法检测细胞的 Gem 化疗敏感性(IC50 值)

待测细胞以  $5 \times 10^3$  cell/孔接种于 96 孔板,每组设置 3 个复孔,细胞贴壁后加入梯度浓度的药物(Gem:1 000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 和 0.001 mg/L)持续作用 72 h,最后以 20  $\mu$ L/每孔加入 MTT(5 g/L)后置入 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  温箱中继续培养 4 h,小心弃去培养基,加入 150  $\mu$ L DMSO 后室温振荡 10 min,待结晶完全溶解后于酶标仪上测定各孔 490 nm 光密度值( $D_{490 \text{ nm}}$ 值),使用 SPSS 15.0 软件计算对应的 IC50 值。

### 1.8 统计学分析

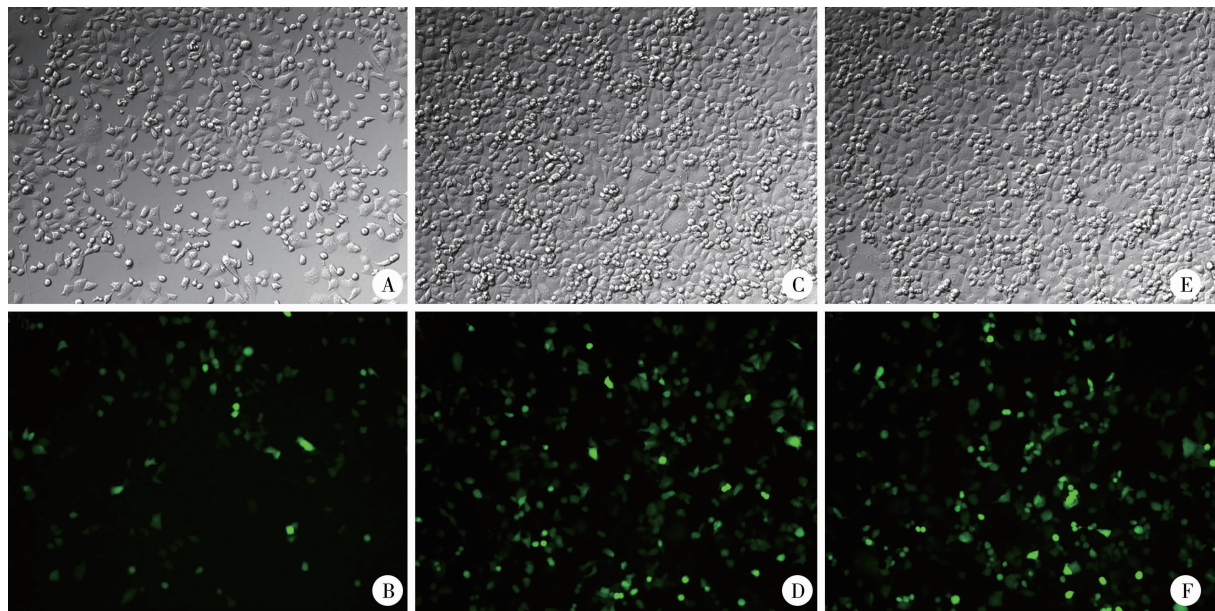
全部数据采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析。计量资料使用均数  $\pm$  标准差表示,组间差异比较采用 ANOVA 法(单因素方差分析),方差齐性时采用 SNK 检验,方差不齐时采用 Dunnett' C 检验;以  $\alpha = 0.05$  为显著性检验水准, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒感染实验及效率检测

运用预先摸索的感染条件进行慢病毒感染实验,荧光显微镜下观察感染效率。GFP 标记的病毒对照感染胰腺癌细胞 Panc-1 后,48 h 即可见荧光表达,96 h 可见强烈荧光表达(图 1A、B),感染 14 d 及

30 d 后,仍见强 GFP 荧光表达(图 1C ~ F),说明慢病毒具有高效、稳定的感染效率。



A, B, 96 h after infection; C, D, 14 d after infection; E, F, 30 d after infection.

图 1 荧光显微镜下 Panc-1 细胞感染效率(×100)

Figure 1 Virus infection efficiency of Panc-1 cells detected by fluorescence microscope (×100)

## 2.2 建立 XIAP 和/或 Survivin 稳定抑制的胰腺癌 Panc-1 细胞株

运用相应慢病毒感染 Panc-1 细胞后,使用相应抗生素(LV-X 及 LV-Xnc; Purimycin; LV-S 及 LV-Snc; G418)对细胞进行筛选,挑选阳性克隆,扩大培养 2 个月得到稳定感染株,按照感染病毒不同,分别命名为:Panc-1-X(稳定抑制 XIAP 表达),Panc-1-Xnc(无义阴性对照),Panc-1-S(稳定抑制 Survivin 表达),Panc-1-Snc(无义阴性对照),Panc-1-XS(同时稳定抑制 XIAP、Survivin 表达),Panc-1-XncSnc(无义阴性对照)。Real-time PCR 和 Western blot 分别检测相应细胞中 XIAP 和 Survivin 的 mRNA 和蛋白的表达。

稳定感染株 Panc-1-X 中, XIAP mRNA 及蛋白

表达均显著低于对照 Panc-1-Xnc 组及 Panc-1 组 ( $P < 0.05$ ),Panc-1-Xnc 组与 Panc-1 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 1,图 2 ~ 4)。

稳定感染株 Panc-1-S 中, Survivin mRNA 及蛋白表达均显著低于对照 Panc-1-Snc 组及 Panc-1 组 ( $P < 0.05$ ),Panc-1-Snc 组与 Panc-1 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 2,图 2 ~ 4)。

稳定感染株 Panc-1-XS 中,与对照组 Panc-1-Xnc-Snc 对比, XIAP 和 Survivin 的 mRNA 及蛋白表达均同时被显著抑制( $P < 0.05$ );Panc-1-XncSnc 组与 Panc-1 组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 3,图 4)。

结果表明, XIAP 和/或 Survivin 表达稳定抑制的胰腺癌细胞株 Panc-1-X、Panc-1-S、Panc-1-XS 建立成功。

表 1 XIAP mRNA 及蛋白相对表达

Table 1 The relative expression of XIAP mRNA and protein

	Panc-1	Panc-1-Xnc	Panc-1-X	Panc-1-X inhibition rate
XIAP mRNA	(98.58 ± 2.49) %	(100 ± 0) %	(26.77 ± 2.68) % *	(73.23 ± 2.68) %
XIAP protein	(98.64 ± 2.43) %	(100 ± 0) %	(7.13 ± 1.67) % *	(92.87 ± 1.67) %

\*  $P < 0.05$ , compared with the Panc-1 group and Panc-1-Xnc group.

表 2 Survivin mRNA 及蛋白相对表达

Table 2 The relative expression of Survivin mRNA and protein

	Panc-1	Panc-1-Snc	Panc-1-S	Panc-1-S inhibition rate
Survivin mRNA	(99.79 ± 1.36) %	(100 ± 0) %	(26.59 ± 0.76) % *	(73.41 ± 0.76) %
Survivin protein	(98.52 ± 3.71) %	(100 ± 0) %	(40.57 ± 3.35) % *	(59.43 ± 3.35) %

\*  $P < 0.05$ , compared with the Panc-1 group and Panc-1-Snc group.

表 3 XIAP 和 Survivin mRNA 及蛋白相对表达

Table 3 The relative expression of XIAP and Survivin mRNA and protein

	Panc-1	Panc-1-XncSnc	Panc-1-XS	Panc-1-XS inhibition rate
XIAP mRNA	(101.43 ± 0.90) %	(100 ± 0) %	(45.38 ± 1.45) % *	(54.62 ± 1.45) %
XIAP protein	(99.24 ± 3.95) %	(100 ± 0) %	(52.81 ± 3.13) % *	(47.19 ± 3.13) %
Survivin mRNA	(102.00 ± 2.34) %	(100 ± 0) %	(48.01 ± 0.57) % *	(51.99 ± 0.57) %
Survivin protein	(98.39 ± 2.83) %	(100 ± 0) %	(62.71 ± 3.05) % *	(37.29 ± 3.13) %

\* P < 0.05, compared with the Panc-1 group and Panc-1-XncSnc group.

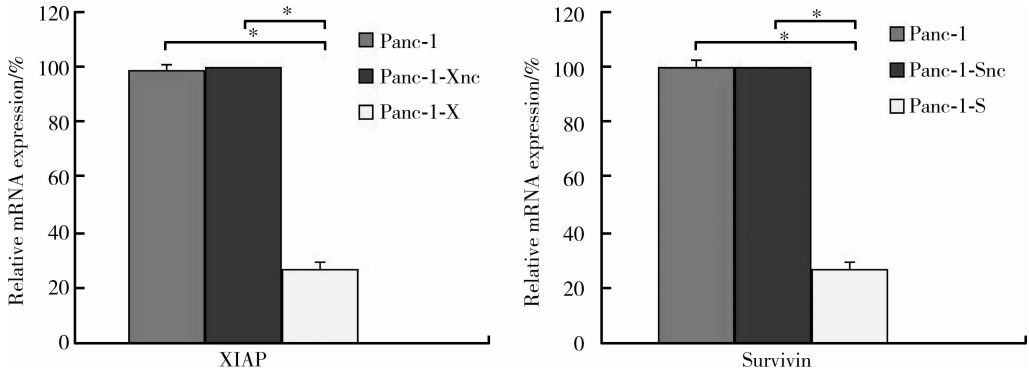


图 2 稳定感染株 Panc-1-X、Panc-1-S 中 XIAP 和 Survivin mRNA 分别的相对表达量 (\* P < 0.05)

Figure 2 The relative expression of XIAP and Survivin mRNA in corresponding stable infected cell lines (Panc-1-X and Panc-1-S, \* P < 0.05)

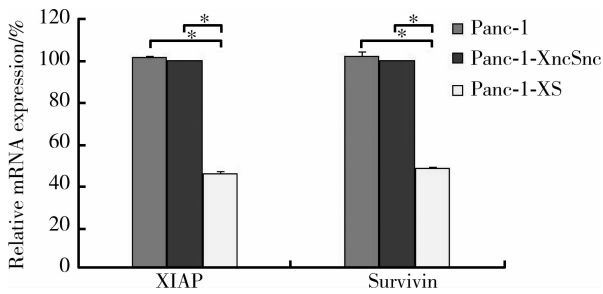


图 3 稳定感染株 Panc-1-XS 中 XIAP 和 Survivin mRNA 相对表达量 (\* P < 0.05)

Figure 3 The relative expression of XIAP and Survivin mRNA in stable infected cell lines Panc-XS (\* P < 0.05)

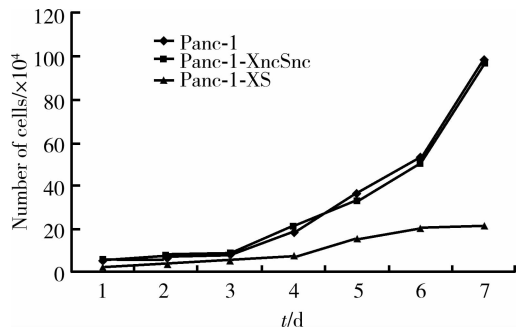
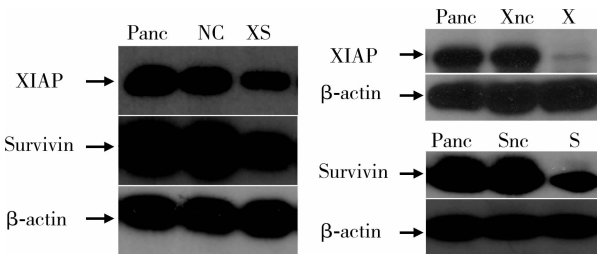


图 5 Panc-1、Panc-1-XncSnc 和 Panc-1-XS 的细胞生长曲线

Figure 5 The cell growth curve of Panc-1, Panc-1-XncSnc and Panc-1-XS



Panc, Panc-1 cells; NC, LV-Xnc, LV-Snc; XS, LV-X, LV-S; Xnc, LV-Xnc; X, LV-X; Snc, LV-Snc; S, LV-S.

图 4 Western blot 检测 Panc-1 细胞稳定感染不同 shRNA 慢病毒后 XIAP 和 Survivin 蛋白表达

Figure 4 The protein expression of XIAP and Survivin of different stable infected cell lines were detected by Western blot

2.3 XIAP 和 Survivin 同时稳定抑制 Panc-1 增殖能力

Panc-1-XS 组的生长曲线表明, XIAP 和 Survivin 同时稳定抑制后, 胰腺癌细胞株 Panc-1 的增殖能力显著受到抑制(图 5)。

克隆形成实验结果表明, Panc-1-XS 组的克隆形成率为 10.12% ± 1.33%, 显著低于 Panc-1-Xnc Snc 组(96.61% ± 7.89%) 和 Panc-1 组(100.28% ± 8.97%, P < 0.05), Panc-1-XncSnc 组和 Panc-1 组相比差异无统计学意义(P > 0.05), 说明 XIAP 和 Survivin 联合稳定抑制后, 胰腺癌细胞 Panc-1 的长期存活能力(形成克隆的能力)显著受到抑制(图 6)。

2.4 Caspase-3/7 活性检测及流式细胞仪检测细胞凋亡

运用 Gem 处理后, 稳定抑制 XIAP 和 Survivin 表达后的 Panc-1 细胞中的 Caspase-3/7 相对活性明显升高至 15.02 ± 0.57, 显著高于 Panc-1 组与 Panc-1-XncSnc 组(分别为 8.87 ± 0.19 和 9.05 ± 0.23, P < 0.05); Panc-1 组与 Panc-1-XncSnc 组相比差异无统计学意义(P > 0.05, 图 7)。

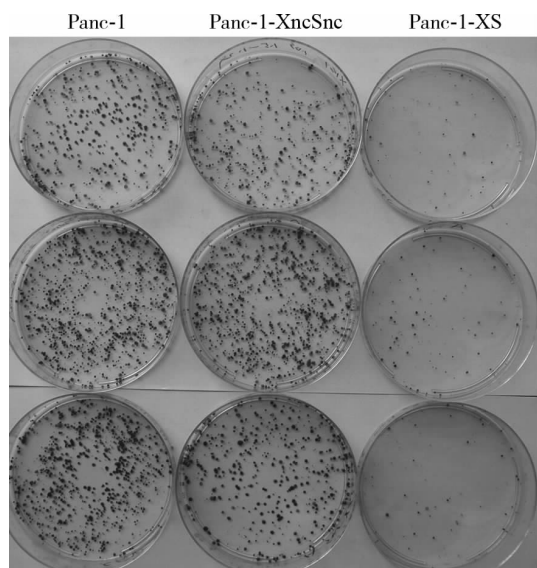


图 6 Panc-1、Panc-1-XncSnc 和 Panc-1-XS 的细胞克隆形成率

Figure 6 The cell colony formation rate of Panc-1, Panc-1-XncSnc and Panc-1-XS

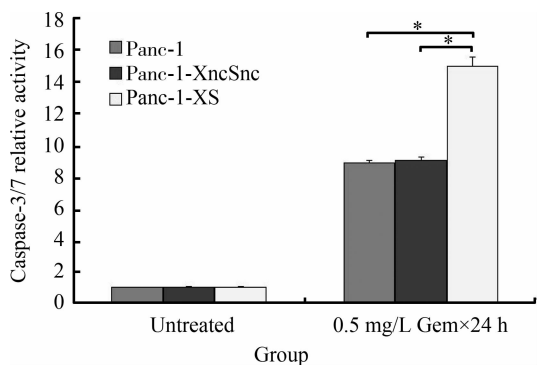


图 7 稳定感染 Panc-1 细胞运用 Gem 处理后 Caspase-3/7 相对活性变化 (\*  $P < 0.05$ )

Figure 7 The effect on Caspase-3/7 relative activity of stable infected cell lines after treated by Gem (\*  $P < 0.05$ )

流式细胞仪检测显示,Panc-1-XS 组的细胞凋亡率为  $24.09\% \pm 2.75\%$ ,显著高于对照组 Panc-1-XncSnc 及 Panc-1 组(分别为  $12.09\% \pm 1.97\%$  和  $12.06\% \pm 1.22\%$ ,  $P < 0.05$ );对照组 Panc-1-XncSnc 及 Panc-1 组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 8~9)。

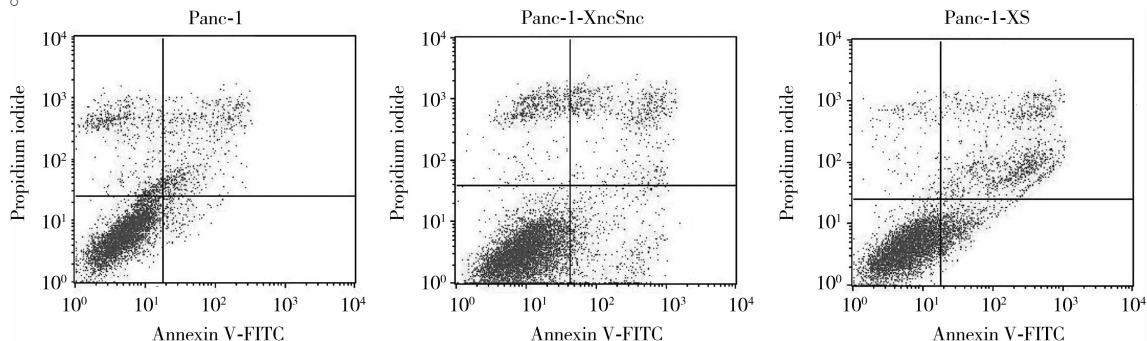


图 9 稳定感染的 Panc-1 细胞经 0.5 mg/L Gem 处理 24 h 后流式细胞仪检测细胞凋亡

Figure 9 The effect on apoptosis of stable infected cell lines was detected by flow cytometry after treated by 0.5 mg/L Gem for 24 h

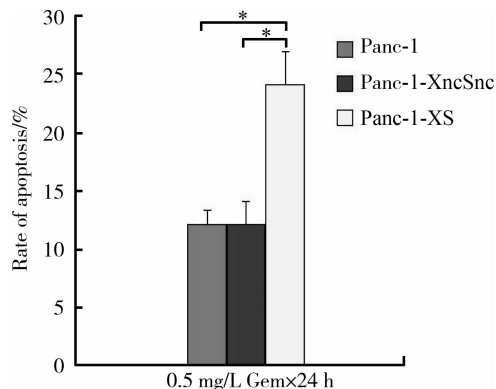


图 8 稳定感染的 Panc-1 细胞加 Gem 后流式细胞仪检测细胞凋亡 (\*  $P < 0.05$ )

Figure 8 The effect on apoptosis of stable infected cell lines was detected by flow cytometry after treated by Gem (\*  $P < 0.05$ )

## 2.5 XIAP 和 Survivin 同时稳定抑制显著增强 Panc-1 细胞化疗敏感性

MTT 检测结果显示,Panc-1-XS 组的 IC50 值为  $(0.47 \pm 0.04)$  mg/L,显著低于对照组 Panc-1-XncSnc 的  $(2.18 \pm 0.13)$  mg/L 及 Panc-1 组的  $(2.13 \pm 0.18)$  mg/L ( $P < 0.05$ );Panc-1-XncSnc 及 Panc-1 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 10A)。

Panc-1-X 组的 IC50 值为  $(0.76 \pm 0.07)$  mg/L,显著低于对照组 Panc-1-Xnc 的  $(2.15 \pm 0.11)$  mg/L 及 Panc-1 组的  $(2.13 \pm 0.18)$  mg/L ( $P < 0.05$ );而 Panc-1-Xnc 组及 Panc-1 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 10B)。

Panc-1-S 组的 IC50 值为  $(0.87 \pm 0.09)$  mg/L,显著低于对照组 Panc-1-Snc 组的  $(2.12 \pm 0.13)$  mg/L 及 Panc-1 组的  $(2.13 \pm 0.18)$  mg/L ( $P < 0.05$ );而 Panc-1-Snc 及 Panc-1 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 10C)。

Panc-1-XS 组、Panc-1-X 组、Panc-1-S 组的化疗敏感性对比分析结果显示,Panc-1-XS 组的 IC50 值均显著低于另两组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 Panc-1-X 组的 IC50 值虽然低于 Panc-1-S 组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 10D)。

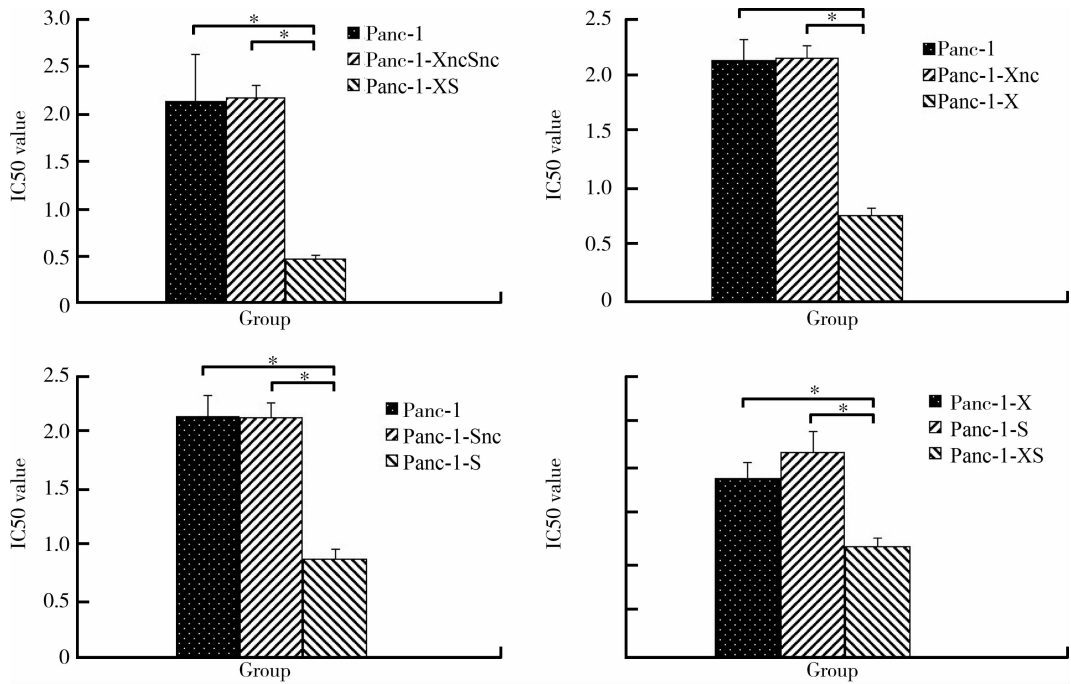


图 10 稳定感染的 Panc-1 细胞 Gem 化疗敏感性变化 (IC50 值, \*  $P < 0.05$ )

Figure 10 The gemcitabine chemosensitivity of stable infected cell lines was detected by MTT (IC50 value, \*  $P < 0.05$ )

### 3 讨论

迄今为止, IAPs 是唯一一种能同时作用于起始及效应 Caspase 的内源性蛋白, 能强力抑制各种因素诱导的细胞凋亡<sup>[10]</sup>。高表达 IAPs 是肿瘤细胞介导化疗凋亡逃逸的重要机制<sup>[11]</sup>。我们前期的研究表明, XIAP 和 Survivin 确实在胰腺癌组织中高表达, 并与胰腺癌细胞 Gem 化疗敏感性相关<sup>[12-13]</sup>。近年来的研究发现, XIAP 和 Survivin 常同时在肿瘤中高表达, 如胰腺癌、肺癌等, 并可能共同在肿瘤化疗、放疗抵抗中发挥重要作用<sup>[5-7, 14-16]</sup>。因此, 在胰腺癌中同时抑制 XIAP 和 Survivin 表达, 可能比单独抑制 XIAP 或 Survivin, 能更有效地逆转肿瘤细胞的凋亡抵抗, 增强其化疗敏感性。

最近的多项研究发现, 多种天然药物能增强肿瘤对传统化疗药物的化疗敏感性, 其机制均与下调肿瘤中 XIAP 和 Survivin 表达有关。Banerjee 等<sup>[17]</sup>通过研究发现, 人工合成的百里香醌 (thymoquinone, TQ) 类似物——TQ-2G、TQ-4A1 和 TQ-5A1, 比天然 TQ 具有更强的抗肿瘤效果, 能通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性及显著抑制其靶基因 (如 XIAP、Survivin 等) 抗凋亡蛋白表达, 显著增强 Gem 和奥沙利铂 (Oxaliplatin) 诱导的对 Gem 耐药的胰腺癌 Miapaca-2 的细胞凋亡。Guo 等<sup>[18]</sup>发现, 应用大黄素 (Emodin) 联合 Gem 治疗, 通过抑制 XIAP 和 Survivin 的表达 (包括 mRNA 和蛋白), 能显著诱导胰腺癌细胞凋亡, 增强

胰腺癌抗肿瘤治疗效果。Ling 等<sup>[19]</sup>在研究中发现, 氧化苦参碱 (Oxymatrine) 能以时间和剂量依赖形式诱导胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡, 这个过程伴随 Survivin 基因表达的显著下调。Li 等<sup>[20]</sup>研究表明, 联合马斯里酸 (Maslinic acid) 治疗能通过抑制 Survivin、XIAP 及 Bcl-2 等抗凋亡蛋白表达, 从而增强肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 诱导的细胞凋亡, 抑制细胞增殖。Sung 等<sup>[21]</sup>在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 T47D 中使用南蛇藤素 (Celastrol), 显著增强了肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 诱导的细胞凋亡, 其机制与下调 XIAP 和 Survivin、cFLIP、Bcl-2、Bcl-xL、IAP-1 的表达有关。Banerjee 等<sup>[22]</sup>对 3, 3'-二吲哚甲烷 (3, 3'-diindolylmethane, DIM) 进行了研究, 结果表明在胰腺癌细胞系 (Panc-1、COLO-357 和 Panc-28) 中, DIM 能显著增强化疗药物 (Cisplatin、Gemcitabine 和 Oxaliplatin) 诱导的细胞凋亡, 其机制是通过抑制 NF- $\kappa$ B 组成性活化及抑制其相应基因表达 (包括 XIAP、Survivin 等) 来实现。

近年来, 已经逐渐开展了一些针对凋亡抑制蛋白的联合抑制实验。Cao 等<sup>[14]</sup>在体内、外实验中应用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 技术同时抑制肺癌细胞株 H460 中 Survivin 和 XIAP 的表达后发现, 与单独抑制 Survivin 和 XIAP 的策略相比, 同时抑制的策略能更显著抑制细胞增殖, 增加其放疗敏感性, 并显著优于单独抑制 Survivin 或

XIAP 的治疗效果。Yang 等<sup>[15]</sup>在膀胱癌细胞株 T24 中,运用 siRNA 直接转染的方法同时抑制 Livin、Survivin 和 XIAP 的表达(抑制效果持续大约 7 d),获得了更显著的细胞增殖能力抑制效果,并显著增加了低浓度的丝裂霉素(5 mg/L)诱导的细胞凋亡率(接近 80%),显著优于 3 种基因的分别单独抑制组。Rückert 等<sup>[16]</sup>最近运用 siRNA 转染的手段在胰腺癌细胞系 MiaPaCa-2 和 AsPC-1 中,同时抑制了 XIAP、Survivin 及 Bcl-2 的表达,显著诱导了 MiaPaCa-2 和 AsPC-1 细胞凋亡(Caspase-3/7 活性检测及流式细胞仪检测),并认为在抑制细胞凋亡功能上,IAPs 可能比 Bcl-2 蛋白发挥更重要的作用。

在前期研究的基础上,本研究采用慢病毒介导的 RNAi 技术,在胰腺癌 Panc-1 细胞中特异性地、稳定地抑制 XIAP 和/或 Survivin 的表达。数据分析结果显示,XIAP 和 Survivin 表达同时稳定抑制后,Panc-1 细胞的增殖能力被显著抑制,其化疗敏感性显著提高。同时,对比分析结果显示,Panc-1-XS 组的 IC50 值显著低于 Panc-1-X 组和 Panc-1-S 组,这说明实行不同的基因治疗策略后,Panc-1-XS 组中 Gem 的化疗抵抗性的逆转程度显著高于 Panc-1-X 组和 Panc-1-S 组。值得关注的是,这个结果是在 XIAP 和 Survivin 表达抑制效率下降的基础上获得的(与 Panc-1-X 或 Panc-1-S 中分别的基因抑制效率相比),即 Panc-1-XS 中 XIAP 和 Survivin mRNA 和蛋白的抑制率均显著低于相应 Panc-1-X 组或 Panc-1-S 组的结果,因此,我们认为,相比于 2 种基因分别单独抑制的策略,基因联合抑制的方法(同时抑制 XIAP 和 Survivin 表达)能更有效地逆转 Panc-1 细胞的凋亡抵抗,恢复其 Gem 化疗敏感性。

综上所述,同时抑制 XIAP 和 Survivin 的表达能显著抑制胰腺癌 Panc-1 细胞增殖,且与 XIAP 或 Survivin 的单独抑制相比,能显著增强胰腺癌细胞 Gem 化疗诱导的细胞凋亡,增加化疗敏感性。本研究展现了这种两种基因共同抑制的治疗策略的相对优越性,在胰腺癌基因治疗的研究中值得进一步探讨。

## 参考文献

[ 1 ] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277 - 300.  
 [ 2 ] Muller MW, Friess H, Koninger J, et al. Factors influencing survival after bypass procedures in patients with advanced pancreatic adenocarcinomas [J]. Am J Surg, 2008, 195(2): 221 - 228.  
 [ 3 ] Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepa-

tol, 2009, 6(7): 412 - 422.  
 [ 4 ] Fulda S. Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(7): 1221 - 1227.  
 [ 5 ] LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, et al. IAP-targeted therapies for cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6252 - 6275.  
 [ 6 ] Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets [J]. Apoptosis, 2007, 12(9): 1543 - 1568.  
 [ 7 ] Krepela E, Dankova P, Moravcikova E, et al. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma [J]. Int J Oncol, 2009, 35(6): 1449 - 1462.  
 [ 8 ] 易小平,江春,宰红艳,等.慢病毒载体介导 RNAi 稳定抑制 XIAP 表达对胰腺癌细胞增殖、凋亡影响的实验研究[J].现代生物医学进展,2009,9(22):4201-4205.  
 [ 9 ] 易小平,江春,宰红艳,等.慢病毒载体介导 RNAi 靶向抑制胰腺癌细胞 survivin 表达并诱导细胞凋亡的实验研究[J].中国普通外科杂志,2010,19(3):227-233.  
 [ 10 ] 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.  
 [ 11 ] Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(6): 573 - 580.  
 [ 12 ] 陈俭云,李宜雄,江春,等.吉西他滨诱导胰腺癌细胞 PANC-1 中 survivin 基因表达的研究[J].中国普通外科杂志,2008,17(9):874-877.  
 [ 13 ] Li Y, Jian Z, Xia K, et al. XIAP is related to the chemoresistance and inhibited its expression by RNA interference sensitize pancreatic carcinoma cells to chemotherapeutics [J]. Pancreas, 2006, 32(3): 288 - 296.  
 [ 14 ] Cao C, Mu Y, Hallahan DE, et al. XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer [J]. Oncogene, 2004, 23(42): 7047 - 7052.  
 [ 15 ] Yang D, Song X, Zhang J, et al. Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010, 42(2): 137 - 144.  
 [ 16 ] Rückert F, Sann N, Lehner AK, et al. Simultaneous gene silencing of Bcl-2, XIAP and Survivin re-sensitizes pancreatic cancer cells towards apoptosis [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 379.  
 [ 17 ] Banerjee S, Azmi AS, Padhye S, et al. Structure-activity studies on therapeutic potential of Thymoquinone analogs in pancreatic cancer [J]. Pharm Res, 2010, 27(6): 1146 - 1158.  
 [ 18 ] Guo HC, Bu HQ, Luo J, et al. Emodin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in PANC-1 pancreatic cancer xenograft model *in vivo* via inhibition of inhibitors of apoptosis [J]. Int J Oncol, 2012, 40(6): 1849 - 1857.  
 [ 19 ] Ling Q, Xu X, Wei X, et al. Oxymatrine induces human pancreatic cancer PANC-1 cells apoptosis via regulating expression of Bcl-2 and IAP families, and releasing of cytochrome c [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 66.  
 [ 20 ] Li C, Yang Z, Zhai C, et al. Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-kappaB signaling pathway [J]. Mol Cancer, 2010, 9: 73.  
 [ 21 ] Sung B, Park B, Yadav VR, et al. Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors [J]. J Biol Chem, 2010, 285(15): 11498 - 11507.  
 [ 22 ] Banerjee S, Wang Z, Kong D, et al. 3,3'-Diindolylmethane enhances chemosensitivity of multiple chemotherapeutic agents in pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5592 - 5600.