



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.012
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3815.shtml

· 基础研究 ·

吉西他滨诱导胰腺癌细胞 ABCG2 表达其化疗耐药的关系研究

王飞通¹, 周兵², 刘小云³, 汪正伟², 牛坚¹, 魏鑫¹, 刘斌¹

(1. 徐州医学院附属医院 普通外科, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院研究生学院, 江苏 徐州 221000; 3. 徐州医学院附属医院 中心实验室, 江苏徐州 221002)

摘要

目的: 探讨吉西他滨诱导胰腺癌细胞 ABCG2 的表达及与其化疗耐药的关系。

方法: 吉西他滨不同浓度、不同时间作用胰腺癌 SW1990 细胞后, 用 CCK-8 法检测细胞的增殖抑制率, 并计算吉西他滨不同作用时间的半数抑制浓度 (IC₅₀); 根据 IC₅₀ 值选择合适浓度的吉西他滨, 作用 SW1990 细胞 24、48、72 h 后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 并用 Western blot 和 RT-PCR 法检测 ABCG2 蛋白与 mRNA 的表达。

结果: 吉西他滨作用后, SW1990 细胞增殖明显抑制, 并呈浓度与时间依赖性, 但 IC₅₀ 值呈时间依赖性增加 (均 $P < 0.05$); 3.9 mg/mL 吉西他滨作用 24、48、72 h 后, SW1990 细胞总凋亡率逐渐增加, 但晚期凋亡率呈降低趋势, ABCG2 蛋白与 mRNA 的表达明显升高, 并呈时间依赖性 (均 $P < 0.05$)。

结论: 吉西他滨能抑制胰腺癌细胞 SW1990 的增殖, 但作用呈时间依赖性减弱, 这可能与诱导 ABCG2 上调表达有关。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(3):324-328]

关键词

胰腺肿瘤; 吉西他滨; 多药耐药相关蛋白质类; 抗药性, 肿瘤

中图分类号: R735.9

Relationship between ABCG2 expression induction and chemoresistance of gemcitabine in pancreatic cancer cells

WANG Feitong¹, ZHOU Bing², LIU Xiaoyun³, WANG Zhengwei², NIU Jian¹, WEI Xin¹, LIU Bin¹

(1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Graduate School, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 3. Central Laboratory, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Corresponding author: LIU Bin, Email: liubin.xy@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the relationship between ABCG2 expression induction and chemoresistance of gemcitabine in pancreatic cancer cells.

Methods: The inhibition ratio of the pancreatic cancer SW1990 cells was measured by CCK-8 assay after exposure to different concentrations of gemcitabine for different time periods, and the half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of gemcitabine for SW1990 cells at different incubation times were determined. SW1990 cells were exposed to a proper concentration of gemcitabine chosen according to the IC₅₀ values for 24, 48 and

收稿日期: 2013-11-11; 修订日期: 2014-02-27。

作者简介: 王飞通, 徐州医学院附属医院主治医师, 主要从事胰腺肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 刘斌, Email: liubin.xy@163.com

72 h respectively, and then, the apoptosis rates of the cells were examined by flow cytometry, and the protein and mRNA expressions of ABCG2 were detected by Western blot and RT-PCR, respectively.

Results: The proliferation of SW1990 cells was significantly inhibited by gemcitabine treatment, in a concentration- and time-dependent manner, but the IC_{50} value of gemcitabine showed a time-dependent increase (all $P < 0.05$). After exposure to 3.9 mg/mL gemcitabine for 24, 48 and 72 h, the total apoptosis rate of SW1990 cells was gradually increased but their late apoptosis rate showed a decreasing trend; both protein and mRNA expressions of ABCG2 in SW1990 cells were significantly elevated in a time-dependent manner (all $P < 0.05$).

Conclusion: Gemcitabine can inhibit the growth of pancreatic cancer SW1990 cells, but its effect weakens with time, which may probably be associated with the up-regulation of ABCG2 expression induced by gemcitabine.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(3):324-328]

KEYWORDS Pancreatic Neoplasms; Gemcitabine; Multidrug Resistance-Associated Proteins; Drug Resistance, Neoplasm
CLC number: R735.9

胰腺癌是一种恶性程度极高、治疗效果及预后极差的肿瘤,在西方国家总体五年生存率不超过 5%^[1],且手术切除率仅有 10%~15%^[2],术后不久就会出现复发和转移。有研究^[3]表明,可切除的胰腺癌的标准治疗应该是手术加术后系统性辅助化疗。吉西他滨(gemcitabine, GEM)是第一个能有效缓解胰腺癌症状和改善预后,具有临床疗效的新型抗癌药物^[4],也是经美国食品和药品监督管理局(FDA)批准的胰腺癌治疗药物^[5]。但吉西他滨单药治疗的中位生存期仅为 5.4~5.6 个月,10 年生存率仅为 16%~19%,效果仍不理想,这与胰腺癌内在的和(或)获得性的耐药密切相关。乳腺癌耐药蛋白 ABCG2(ATP-binding cassette subfamily G member 2)是一种跨膜糖蛋白,为 ABC 超家族成员之一。已有大量文献^[6-8]报道 ABCG2 参与多种肿瘤细胞多药耐药机制,甚至被作为肿瘤干细胞的标志,用来筛选肿瘤干细胞。但国内对于 ABCG2 与胰腺癌耐药方面报道较少,本实验旨在探讨吉西他滨诱导胰腺癌细胞中 ABCG2 的表达及其与化疗耐药的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

胰腺癌细胞株 SW1990 由南京医科大学第一附属医院胰腺中心苗毅教授馈赠。吉西他滨(江苏豪森药业股份有限公司),蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术公司),RT 试剂盒(北京天根生化科技有限公司),兔

抗人 ABCG2 多克隆抗体(Epitomics-an Abcam Company),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及山羊抗鼠 IgG 抗体、鼠抗人 β -actin 抗体(北京中杉生物技术有限公司),ABCG2 及 β -actin 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与传代 用 0.25% 的胰酶及 0.02% EDTA 的消化液消化 SW1990 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,在 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养,细胞每 2~3 d 按 1:3 传代 1 次。

1.2.2 CCK-8 法测定 SW1990 细胞对吉西他滨的半数有效浓度 (IC_{50}) 取 70%~80% 融合并处于对数生长期的细胞,调节细胞浓度为 5×10^3 /孔接种于含 100 μ L 上述培养液的 96 孔板中,在 37 °C, CO₂ 体积分数为 5%, 饱和湿度的培养箱中培养 24 h。细胞贴壁后,更换成含有不同浓度吉西他滨的培养液 100 μ L, 浓度分别为 10、5、2.5、1.25、0.5 mg/mL, 每个浓度设 6 个复孔,以不加药物的细胞存活率为 100% 的孔和没有接种细胞的培养液孔分别作为阴性对照组和空白对照组。细胞在浓度梯度药物作用下分别培养 24、48、72 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,继续培养 1.25 h 后,在酶联免疫检测仪 450 nm 波长处测各孔吸光度(OD)值,参比波长 630 nm。细胞增殖抑制率(%) = (1 - 试验孔 OD 值 / 对照孔 OD 值) \times 100%, 根据 IC_{50} 计算软件分别得出 24、48、72 h 细胞对化疗药物的 IC_{50} 。

1.2.3 吉西他滨对 SW1990 胰腺癌细胞内 ABCG2 的诱导 取融合率为 70%~80% 处于对数生长期的

SW1990 细胞进行消化传代至培养瓶, 并调整细胞浓度为 1×10^6 /瓶, 在 37°C , CO_2 体积分数为 5%, 饱和湿度的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 参考 24 h 的 IC_{50} , 更换成含有 3.9 mg/mL 吉西他滨的培养液 4.5 mL, 继续培养 24、48、72 h 后作为实验组, 以未加吉西他滨的细胞作为空白对照组, 检测 ABCG2 mRNA 及 ABCG2 蛋白的表达。

1.2.4 流式细胞仪分析细胞凋亡 用不含 EDTA 的胰酶消化各组细胞至单细胞悬液状态, 1200 r/min 离心 5 min 去上清液后 PBS 清洗再离心, 重复 3 次, 收集细胞 1×10^6 /管, 按凋亡试剂盒步骤逐步进行染色后, 在 FACS Vantage SE 流式细胞仪上进行检测。

1.2.5 Western blot 检测 ABCG2 蛋白的表达 PMSF 裂解液提取细胞总蛋白, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒定量, 取样本蛋白 20 μg 上样进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 调整电泳电压 80 V 进行 30 min, 当样本进入分离胶时, 调节电压使其恒定在 120 V, 维持 1 h。调整恒定电流为 50 mA (电流 mA = 胶长 \times 宽 \times 2.5), 转 78 min (时间 = 分子量 + 6 min) 至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 2 h。分别加入兔抗人 ABCG2 抗体及鼠抗人 β -actin 抗体于 4°C 过夜, 加入 1:5 000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及山羊抗鼠 IgG 抗体。进行压片显影, 且采用 Image J 软件测量条带灰度值并进行数据处理, 以 β -actin 蛋白作为内参照进行目的蛋白定量分析。

1.2.6 RT-PCR 检测 ABCG2 mRNA 的表达 采用 Trizol 法提取实验组、对照组的总 RNA。取 10 μg 逆转录合成 cDNA, ABCG2 上游引物: 5'-AAT ACA TCA GCG GAT ACT ACA GAG-3', 下游引物: 5'-AGC CAC CAT CAT AAG GGT AAA CAT-3', 扩增长度 179 bp; 内参照 β -actin 上游引物: 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3', 下游引物: 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3', 扩增长度 434 bp。PCR 反应条件: 95°C 3 min, 95°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 1 min (35 个循环), 72°C 5 min。各取 5 μL PCR 反应产物混合 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 通过 Smart View 凝胶成像扫描仪观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理, 两样本均数比较采用 t 检验, 多样本均数间比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 吉西他滨对胰腺癌细胞株 SW1990 的增殖影响

CCK-8 结果显示, 在同一浓度时, 随着时间的延长, 吉西他滨对细胞株的抑制逐渐减低, 各时间点两两比较, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 在同一时间点时, 随着浓度的增加, 吉西他滨对细胞株的抑制效应逐渐增强, 各浓度间两两比较, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。吉西他滨作用 24、48、72 h 对 SW1990 细胞的 IC_{50} 分别为 (3.90 ± 0.05)、(5.14 ± 0.12)、(6.13 ± 0.18) mg/mL, 随着时间延长, IC_{50} 逐渐增加 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 不同浓度与不同作用时间的吉西他滨对 SW1990 细胞增殖的抑制率 (%)

Table 1 Inhibitory ratio of different concentrations and different treatment times of gemcitabine on proliferation of SW1990 cells (%)

| 浓度 (mg/mL) | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------|------------------|------------------|------------------|
| 0.5 | 20.04 ± 3.73 | 14.03 ± 2.70 | 9.14 ± 3.59 |
| 1.25 | 32.67 ± 3.27 | 26.48 ± 4.98 | 20.19 ± 5.29 |
| 2.5 | 47.58 ± 3.72 | 38.85 ± 3.66 | 31.75 ± 4.45 |
| 5 | 62.33 ± 3.58 | 54.41 ± 5.41 | 47.93 ± 4.17 |
| 10 | 78.88 ± 2.11 | 74.80 ± 2.55 | 70.21 ± 3.17 |

2.2 细胞凋亡分析

流式细胞仪分析显示, 3.9 mg/mL 吉西他滨作用胰腺癌 SW1990 细胞株不同时间后, 与未加药的空白对照组比较, 总凋亡率呈增加趋势, 但 24 h 与 48 h 时间点比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.586$), 其余时间点两两比较, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 细胞的早期凋亡率逐渐增加, 且两两比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 而晚期凋亡率方面则逐渐减低, 且两两比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 吉西他滨不同作用时间的 SW1990 细胞凋亡率 (%)

Table 2 Apoptosis rates of SW1990 cells after gemcitabine treatment for different time (%)

| 时间 (h) | 早期凋亡率 | 晚期凋亡率 | 总凋亡率 |
|--------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 9.03 ± 0.35 | 8.10 ± 0.44 | 17.13 ± 0.61 |
| 24 | 16.77 ± 0.85 | 20.43 ± 1.47 | 37.20 ± 2.17 |
| 48 | 22.33 ± 1.29 | 14.50 ± 0.98 | 36.67 ± 1.34 |
| 72 | 38.91 ± 0.72 | 6.40 ± 1.26 | 45.33 ± 2.24 |

2.3 ABCG2 蛋白的表达情况

以 β -actin 的灰度为内参照,比较 β -actin 与目的蛋白 ABCG2 条带灰度比值。与未加药的空白对照组比较,吉西他滨作用 24、48、72 h 组 ABCG2 蛋白表达量分别上升 (2.25 ± 0.15)、(3.57 ± 0.13)、(5.02 ± 0.09) 倍,且各组间两两比较差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 1)。

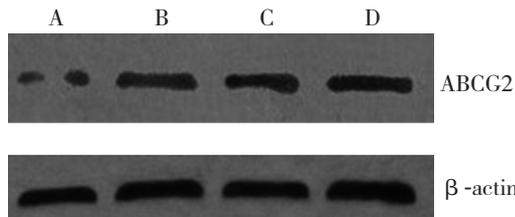


图 1 Western blot 检测 SW1990 细胞 ABCG2 蛋白的表达

A: 空白对照组; B: 吉西他滨 24 h 组; C: 吉西他滨 48 h 组; D: 吉西他滨 72 h 组

Figure 1 Western blot analysis for ABCG2 protein expression in SW1990 cells A: Blank control group; B: Gemcitabine 24-h treatment group; C: Gemcitabine 48-h treatment group; D: Gemcitabine 72-h treatment group

2.4 ABCG2 mRNA 的转录情况

以 β -actin 的灰度为内参照,比较 β -actin 与目的基因 ABCG2 条带灰度比值。与未加药的空白对照组比较,吉西他滨作用 24、48、72 h 组 ABCG2 mRNA 表达量分别上升 (2.18 ± 0.08)、(3.26 ± 0.12)、(4.69 ± 0.05) 倍,且各组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2)。

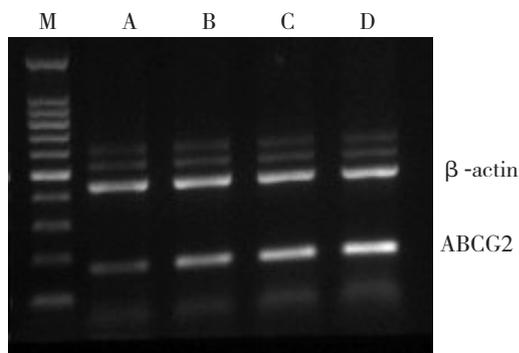


图 2 RT-PCR 检测 SW1990 细胞 ABCG2 mRNA 的表达

M: 分子量标准; A: 空白对照组; B: 吉西他滨 24 h 组; C: 吉西他滨 48 h 组; D: 吉西他滨 72 h 组

Figure 2 RT-PCR for detection of ABCG2 mRNA expression in SW1990 cells M: Molecular weight marker; A: Blank control group; B: Gemcitabine 24-h treatment group; C: Gemcitabine 48-h treatment group; D: Gemcitabine 72-h treatment group

3 讨论

吉西他滨是一种细胞周期特异性抗代谢类药物,主要作用于 DNA 合成期的肿瘤细胞,即 S 期细胞,在酶的作用下,可以阻止 G_1 期向 S 期的进展,使细胞停滞于 G_0/G_1 期,并且吉西他滨在细胞内转化为吉西他滨二磷酸盐(dFdCDP)使 DNA 链合成停止、断裂,从而诱导细胞死亡。本研究流式细胞结果提示,随着时间的延长的吉西他滨能有效的诱导胰腺癌细胞株的凋亡,但 48 h 组与 72 h 相比无统计学意义($P=0.586$),表明胰腺癌 SW1990 细胞对吉西他滨产生药物抵抗,这抗性在用药约 48 h 左右表现出来,且 CCK-8 结果提示,24、48、72 h 吉西他滨对 SW1990 细胞的 IC_{50} 分别为(3.90 ± 0.05)、(5.14 ± 0.12)、(6.13 ± 0.18) mg/mL。这表明随着时间的延长,吉西他滨诱导 SW1990 细胞株凋亡和抑制其增殖的能力逐渐减低,这也证明了 SW1990 细胞株对吉西他滨的化疗敏感性逐渐减低,在细胞株中有药物耐药的产生。

近数年来,ABCG2 的高表达常作为肿瘤不良预后的指标^[9-13]。Benderra 等^[14]研究结果表明:在急性白血病症中 ABCG2 基因的阳性表达率达 37.6%; ABCG2 mRNA 阴性和阳性患者化疗后的首次完全缓解率分别为 79.3% 和 31.6%;复发组中 ABCG2 mRNA 的水平明显高于新诊断组,而在正常个体和长期存活的白血病患者中,ABCG2 基因的表达水平非常低,ABCG2 mRNA 的高表达直接导致临床耐药的发生,对急性白血病的预后是一个不良的标志。Zen 等^[15]在研究人肝癌标本肿瘤干细胞时发现,标本中分离出了少量的侧群细胞,这种侧群细胞能进行不对称分裂生成,具有无限增殖的能力,而这种侧群细胞具有高表达耐药蛋白 ABCG2 的能力,对细胞毒性药物有很强的抵抗性,对化疗不敏感。本实验中 RT-PCR 及 Western blot 结果显示,在使用 3.9 mg/mL 吉西他滨作用胰腺癌 SW1990 细胞株 24、48、72 h 后,ABCG2 mRNA 与蛋白的表达较未用药组相比逐渐上升,组间比较 P 值均小于 0.05。说明吉西他滨能诱导 ABCG2 的增加,呈时间依赖性,而 ABCG2 的增加可能促进胰腺癌 SW1990 细胞株对吉西他滨的抵抗,使细胞获得化疗耐药,这与 Summer 等^[16]在研究乳腺癌耐药的结果相似。

由此推测,吉西他滨能诱导胰腺癌细胞内 ABCG2 mRNA 和蛋白表达升高,而其表达增加可

能就是胰腺癌逃避化疗药物杀伤的机制之一，这对后续研究抑制 ABCG2 的过表达，提高胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性有着重要的意义。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1):10–29.
- [2] Chua YJ, Zalberg JR. Pancreatic cancer--is the wall crumbling?[J]. Ann Oncol, 2008,19(7):1224–1230.
- [3] Neoptolemos JR, Stocken DD, Friess H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 350(12):1200–1210.
- [4] Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patient with advanced pancreas cancer: a randomized trial[J]. J Clin Oncol, 1997, 15(6):2403–2413.
- [5] Rothenberg ML. New developments in chemotherapy for patients with advanced pancreas cancer[J]. Oncology (Williston Park), 1996, 10(9 Suppl):18–22.
- [6] Natarajan K, Xie Y, Baer MR, et al. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(8):1084–1103.
- [7] Mosaffa F, Kalalinia F, Parhiz BH, et al. Tumor necrosis factor alpha induces stronger cytotoxicity in ABCG2-overexpressing resistant breast cancer cells compared with their drug-sensitive parental line[J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(6):413–418.
- [8] Peng H, Qi J, Dong Z, et al. Dynamic vs static ABCG2 inhibitors to sensitize drug resistant cancer cells[J]. PLoS One, 2010, 5(12):e15276.
- [9] Cusatis G, Sparreboom A. Pharmacogenomic importance of ABCG2[J]. Pharmacogenomics, 2008, 9(8):1005–1009.
- [10] Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, et al. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates[J]. Cancer Res, 2005, 65(10):4425–4430.
- [11] Wang YH, Li F, Luo B, et al. A side population of cells from a human pancreatic carcinoma cell line harbors cancer stem cell characteristics[J]. Neoplasia, 2009, 56(5):371–378.
- [12] Yajima T, Ochiai H, Uchiyama T, et al. Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1[J]. Int J Oncol, 2009, 35(2):273–280.
- [13] Dou J, Wen P, Hu W, et al. Identifying tumor stem-like cells in mouse melanoma cell lines by analyzing the characteristics of side population cells[J]. Cell Biol Int, 2009, 33(8):807–815.
- [14] Benderra Z, Faussat A M, Sayada L, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(23):7896–7902.
- [15] Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S, et al. Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma[J]. Am J Pathol, 2007, 170(5):1750–1762.
- [16] Summer R, Kotton DN, Sun X, et al. Side population cells and Bcrpl expression in lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(1):L97–104.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式：王飞通，周兵，刘小云，等. 吉西他滨诱导胰腺癌细胞 ABCG2 表达其化疗耐药的关系研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(3):324–328. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.012
Cite this article as: WANG FT, ZHOU B, LIU XY, et al. Relationship between ABCG2 expression induction and chemoresistance of gemcitabine in pancreatic cancer cells[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(3):324-328. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.012