

文章编号:1005-6947(2007)02-0129-04

· 基础研究 ·

胆囊癌 GBC-SD 细胞经顺铂处理后的 survivin 表达及意义

沈汉斌, 郑启昌

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 肝胆外科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探讨经顺铂(DDP)处理胆囊癌细胞后 survivin 表达及其与肿瘤细胞耐药之间的关系。方法 采用 MTT 比色法测定胆囊癌细胞对 4 种化疗药物的敏感性。RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达。Western blot 检测 survivin 蛋白表达的变化。结果 GBC-SD 细胞对化疗药物的敏感性从高到低依次为 DDP > ADM > 5-FU > MMC。化学药物处理后的第 1 天, 3 组胆囊癌细胞的 survivin mRNA 表达水平均降低; 其中 0.5 μg/mL DDP + GBC-SD 组下降了 10%, 3 μg/mL DDP + GBC-SD 组下降 36%, 6 μg/mL DDP + GBC-SD 组下降了 28%。第 3 天, 0.5 μg/mL DDP 组和 3 μg/mL DDP 组 GBC-SD 细胞的 survivin mRNA 表达与第 1 天比较, 分别上升 22% 和 64%, 但 6 μg/mL DDP 组仍持续降低, 仅为第 1 天的 66%。0.5 μg/mL DDP 组和 3 μg/mL DDP 组作用 3 d 后的 GBC-SD 细胞中 survivin 蛋白含量分别升高了 15% 和 12%, 而 6 μg/mL DDP 组则下降了 80%。结论 低浓度的 DDP 即能诱导胆囊癌细胞内 survivin 的表达增加, 这可能是胆囊癌细胞对化疗药物产生耐药性的因素之一。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(2):129-132]

关键词: 胆囊肿瘤/药物疗法; 顺铂/治疗应用; 蛋白质, Survivin

中图分类号: R657.4 文献标识码: A

The expression of survivin mRNA and protein induced by cisplatin in gallbladder carcinoma cell line (GBC-SD)

SHEN Han-bin, ZHENG Qi-chang

(Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between survivin and chemoresistance of gallbladder cancer cell line (GBC-SD) cells after treatment with various concentrations of cisplatin. **Methods** RT-PCR and Western blot were used to analyze the changes in expression levels of survivin mRNA and protein. GBC-SD cells were examined with MTT assay to determine drug sensitivity to 4 routine chemotherapeutic drugs. **Results** In GBC-SD cells, the sensitivity sequence of those 4 drugs from high to low was DDP > ADM > 5-FU > MMC. The level of survivin mRNA decreased in all the GBC-SD cells treated with three concentrations of cisplatin for one day. The survivin mRNA treated with 0.5 μg/mL DDP decreased 10%, decreased 36% for 3 μg/mL DDP, and decreased 28% for 6 μg/mL DDP. In the third day, the survivin level treated with 0.5 μg/mL DDP cells increased 22%, with 3 μg/mL DDP increased 64%, but with 6 μg/mL DDP decreased 34% compared with the first day. Similarly, survivin protein level increased 15% for those cells treated with 0.5 μg/mL DDP after three days, increased 12% for 3 μg/mL DDP, but decreased 80% for 6 μg/mL DDP. **Conclusions** A high expression of survivin was induced in GBC-SD by low concentration of cisplatin. Survivin may correlate with the chemoresistance of GBC-SD cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(2):129-132]

收稿日期: 2005-08-28; 修订日期: 2006-03-10。

作者简介: 沈汉斌, 男, 湖北随州人, 华中科技大学同济医学院附属协和医院(现在湖北襄樊市解放军第四七七医院)主治医师, 主要从事肝胆及微创方面的研究。

通讯作者: 沈汉斌; E-mail: shbsqj@yahoo.com.cn。

Key words: Gallbladder Neoplasms/drug ther; Cisplatin/ther use; Protein, Survivin

CLC number: R657.4

Document code: A

胆囊癌并非少见,患病率为消化道肿瘤的第6位^[1]。但胆囊癌早期症状不明显,诊断时多已属晚期,往往失去手术时机,预后非常差。据AJCC(American Joint Committee on Cancer)报道,5年生存率I期为60%,II期和III期分别只有5%和1%^[2]。治疗过程中胆囊癌细胞易对化疗药物产生耐药性,是其治愈率低的主要原因。本文研究胆囊癌GBC-SD细胞对4种常用化疗药物的敏感性,分析不同浓度顺铂处理GBC-SD细胞后survivin mRNA和蛋白水平的变化。企以探讨经顺铂(DDP)处理后的胆囊癌细胞引起survivin表达的差异及其肿瘤细胞耐药之间的关系。

1 材料和方法

1.1 试剂与药品

人胆囊癌GBC-SD细胞株购自上海生化细胞所国家细胞库。化疗药物阿霉素(ADM)产自浙江海正药业股份有限公司、顺铂(DDP)产自齐鲁制药厂、5-氟脲嘧啶(5-FU)来自上海徐东海普公司、丝裂霉素(MMC)产自日本协和发酵工业。MTT(四甲基氮唑蓝)用0.01mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成5mg/mL,购自美国Sigma公司。DMSO(二甲亚砜)产自北京化工厂。RPMI-1640培养基、新生牛血清、Trizol试剂购自Gibco公司。MMLV逆转录酶、RNA抑制物为Promega公司产品。DNA聚合酶购自日本TaKaRa公司。兔抗人survivin多克隆抗体为Santa Cruz公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG购自北京中山生物工程公司。 β -actin和survivin的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 药物试验浓度

待检测的化疗药物的试验浓度参考其血浆峰浓度(PPC)^[3]:ADM为0.4 μ g/mL,DDP为3.0 μ g/mL,5-FU为10 μ g/mL,MMC为3.0 μ g/mL。试验前分别用生理盐水稀释至上述浓度。

1.3 细胞培养

GBC-SD细胞用含15%小牛血清的RPMI-1640培养液在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内培养。当细胞长满瓶底80%并贴壁后,用0.25%胰酶消化,倒置

显微镜下见细胞间隙增大、胞质回缩时终止消化。然后分瓶再培养,待进入对数生长期(细胞贴壁、胞浆延展)约为传代后24h时,弃去原培养液,用PBS液冲洗后用于实验。用1640培养液调整细胞密度为 2×10^5 /mL,接种于96孔板中,每孔体积180 μ L;然后再往其中加入上述浓度的化疗药物20 μ L。每组设5个复孔。空白对照孔只加培养基,不加细胞。阴性对照只加细胞,不加药物。振荡器上振荡混匀。

取对数生长期GBC-SD细胞,按 2×10^5 /mL的浓度接种于6孔板,每孔5mL;分别加入0.5 μ g/mL,3 μ g/mL,6 μ g/mL浓度的DDP。以不加药GBC-SD组为阴性对照,分别于培养的第1天和第3天收集细胞并用于后续试验。

1.4 MTT法测定肿瘤细胞生长抑制率

将上述已经加入化疗药物的含有细胞的96孔板送细胞培养箱中培养48h后取出;每孔加入MTT 20 μ L,继续培养4h;加入DMSO 150 μ L/孔,震荡10min,使紫蓝色甲臞结晶完全溶解,即在酶标仪(ELX800, USA)上测定各孔吸光度值A,检测波长为490nm,空白对照调零。记录结果,计算各种化疗药物下的细胞抑制率。抑制率=(1-实验孔A值/对照孔A值) \times 100%。

1.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测

分别检测给药和不给药细胞中survivin mRNA的表达。人类survivin的PCR引物为5'-CTCAAG-GACCACCGCATCTC-3'和5'-CCTCAATCCATGGCAGC-CAG-3';合成产物为392bp; β -actin作为内参照,引物为5'-TGTACGTTGCTATCCAGGCT-3'和5'-CTC-CTTAATGTCACGCACGA-3',合成产物为247bp。用Trizol试剂提取细胞总RNA,紫外分光光度计检测其浓度(公式:样品的A₂₆₀值 \times 40 \times 稀释倍数;单位为 μ g/mL)和纯度(样品的A₂₆₀/A₂₈₀比值),RT-PCR二步法进行合成。PCR的总反应体系为50 μ L,其中包括cDNA 3 μ L,10 \times 缓冲液5 μ L,MgCl₂ 10 μ L,dNTP 1.5 μ L,Taq酶0.5 μ L,survivin primer各2 μ L, β -actin primer各1 μ L,ddH₂O 4 μ L。反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性5min,然后94 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 1min30s,循环32次,最

后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,紫外灯下观察、摄相。试验重复 3 次。

1.6 Western blot (免疫印迹) 检测 Survivin 蛋白表达

不同浓度 DDP 处理的胆囊癌贴壁细胞经胰酶消化后,将预冷至 4℃ 的裂解缓冲液加至经 PBS 漂洗的第 3 天收集的培养细胞中;冰上作用 20min,2 500r/min 离心 2min 后,上清液保存于 -20℃。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。以 50 μg/孔上样,12% 蛋白质的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,通过电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜;硝酸纤维素膜在含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐溶液(TBS/T)中 37℃ 封闭 90min;加入一抗(兔抗人 survivin 多克隆抗体,稀释度为 1:1 000)4℃ 孵育过夜,TTBS 充分漂洗(10min × 3 次);加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,稀释度为 1:1 000)37℃ 作用 40min,TTBS 充分漂洗(10min × 3 次);化学荧光法(ECL)显色,观察结果。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行数据处理。比较采用 *t* 检验,结果数值用($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 化疗药物对 GBC-SD 细胞生长的抑制作用

化疗药对 GBC-SD 细胞的抑制率:DDP 为(0.756 ± 0.054)% ;5-FU 为(0.684 ± 0.072)% ;ADM 为(0.716 ± 0.056)% ;MMC 为(0.598 ± 0.089)%。抑制的顺序为:DDP > ADM > 5-FU > MMC。DDP 与 5-FU、DDP 与 MMC 之间差异有显著性($P < 0.05$);其余各组间差异均皆无显著性(均 $P > 0.05$)。

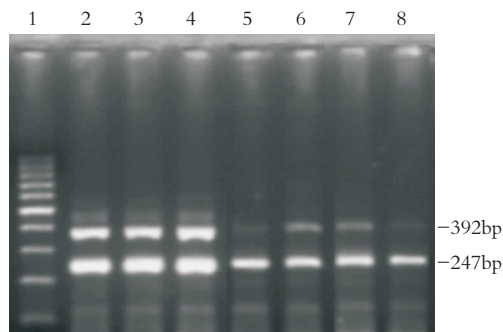
2.2 DDP 处理细胞 survivin mRNA 表达的变化

不同浓度 DDP 处理后的胆囊癌细胞,经 RT-PCR 产物电泳分析表明,不管是何种浓度的 DDP,第 1 天 GBC-SD 细胞中的 survivin 表达全部降低:0.5 μg/mL DDP 组下降 10% ;3 μg/mL DDP 组下降 36% ;6 μg/mL DDP 组下降 28%。第 3 天,0.5 μg/mL DDP 组和 3 μg/mL DDP 组 survivin 表达较第 1 天升高,分别上升 22% 和 64% ;6 μg/mL DDP 高浓度组胆囊癌细胞的表达仍然下降,仅为

第 1 天表达量的 66% (图 1)。

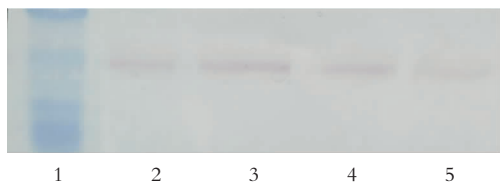
2.3 DDP 处理细胞的 survivin 蛋白水平的变化

Western blot 检测经不同浓度 DDP 干预后的第 3 天胆囊癌细胞 survivin 蛋白表达,与对照相比,0.5 μg/mL DDP 组和 3 μg/mL DDP 组有不同程度的升高,其中 3 μg/mL DDP 组升高幅度较 0.5 μg/mL DDP 组为小,6 μg/mL DDP 组则降低。0.5 μg/mL DDP 组和 3 μg/mL DDP 组作用 3 天后 GBC-SD 细胞中 survivin 蛋白含量分别升高了 15% 和 12% ,而 6 μg/mL DDP 组则下降了 80% (图 2)。



1:100bp DNA Ladder; 2:GBC-SD; 3~4:0.5 μg/mL DDP + GBC-SD 第 1,3 天;5~6:1 μg/mL DDP + GBC-SD 第 1,3 天;7~8 6 μg/mL DDP + GBC-SD 第 1,3 天

图 1 经 3 种浓度的 DDP 作用后,GBC-SD 细胞中 survivin 的表达情况



1:蛋白 marker; 2:GBC-SD; 3:0.5 μg/mL DDP + GBC-SD; 4:3 μg/mL DDP + GBC-SD; 5:6 μg/mL DDP + GBC-SD

图 2 经 3 种浓度 DDP 作用后 survivin 蛋白的表达

3 讨论

细胞凋亡是化疗和放疗介导杀伤肿瘤细胞的主要机制。抑制细胞凋亡可促使肿瘤细胞的存活力增强。肿瘤细胞逃避机体的免疫监视及细胞毒性治疗引起的细胞死亡,是肿瘤形成、发展和对化疗药物耐药的重要机制。事实表明,诱导肿瘤细胞凋亡是化疗药物治疗的重要机制,而各种细胞凋亡的阈值不同造成对治疗的反应有差别。MTT 分子中的四氮唑环在活细胞线粒体酶的作用下,被还原为不溶性紫蓝色的甲臞化合

物,经适当溶解后,通过分光光度计测得其产量;甲臞数量同活细胞数成正比^[4]。对患者进行肿瘤细胞药敏试验,旨在选择有效化疗药物,以便进行针对性的化疗。本组针对 GBC-SD 细胞的化疗药敏试验与曾庆华等^[5]针对肝癌细胞的化疗药敏试验相比较,敏感性由高到低的次序大致相同。然而本研究毕竟是体外试验,且是同一个细胞系的,体内癌细胞增殖与宿主的代谢及与体内药物的相互作用非常复杂,受到多种因素的影响,故化疗药物的选择尚需结合临床情况全面考虑。此外,随着对肿瘤发生、发展和转移机制的深入研究,化疗药物的不断开拓和化疗方案的不断更新,受试的药物也要不断更新,才能为临床提供最佳的化疗药物和化疗方案。

细胞凋亡是基因调控下的细胞自杀行为,其过程受凋亡促进因子 p53, Fas 等和凋亡抑制因子如 bcl, CAP 家族及 survivin 等的共同调节。研究表明, survivin 是迄今发现最强的凋亡抑制因子。Ingo 等^[6]研究证实: survivin 可抑制 Fas, Bax, caspase 3, 7 诱导的细胞凋亡。survivin 也可抵抗某些化疗药物(依泊多肽和紫杉醇)所诱导的凋亡^[7]。survivin 的表达和肿瘤的耐药有密切关系。本试验中,低浓度的 DDP 对 survivin 的表达是先降低后上升的,说明与肿瘤耐药有关系。但高浓度 DDP 时 survivin 的表达降低可能因浓度过高细胞坏死, mRNA 表达停止并降解。本结果表明, DDP 对细胞生长具有浓度和时间依赖性。研究表明, survivin 的表达和乳腺癌细胞凋亡丢失相关, survivin 协同 bcl-2 抑制细胞凋亡是乳腺癌不良预后的重要参数。本研究表明,在胆囊癌细胞

系中, survivin 表达升高可能与化疗药物耐受有关。survivin 反义核苷酸降低内源性 survivin mRNA 的表达,诱导肿瘤细胞凋亡增强对化疗药物的敏感性^[8]。说明化疗辅以 survivin 为靶基因的基因治疗可能提高化疗药物对肿瘤细胞的敏感性。

参考文献:

- [1] Endo K, Ashida K, Miyake N, *et al.* E-Cadherin gene mutations human intrahepatic holangiocarcinoma [J]. *J Pathol*, 2001, 193(2): 310-317.
- [2] Joo YE, Park CS, Kim HS, *et al.* Prognostic significance of E-Cad-herin/Catenin expression in Gastric Cancer [J]. *J Korean Med Sci*, 2000, 15(4): 655-666.
- [3] 刘叙仪. 人新鲜癌组织药敏试验及其方法 [A]. 见: 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗 [M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991. 429.
- [4] 韩晓冈, 王燕婷, 欧阳红荣. MTT 法体外药敏试验研究进展 [J]. *肿瘤*, 1999, 19(1): 55-57.
- [5] 曾庆华, 吕新生, 汤辉焕. MTT 测定恶性肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 [J]. *中国普通外科杂志*, 2000, 9(6): 552-554.
- [6] Ingo T, Yan Wang, Sausville ED, *et al.* IAP-Family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bas, caspase and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(18): 5315-5320.
- [7] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(2): 239-252.
- [8] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, *et al.* Induction of apoptosis and inhibition of cell prolix-feration by survivin gene targeting [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(18): 11177-11182.