

文章编号:1005-6947(2008)09-0874-04

· 基础研究 ·

# 吉西他滨诱导胰腺癌细胞 PANC-1 中 survivin 基因表达的研究

陈俭云, 李宜雄, 江春, 韦志远, 易小平, 吕新生

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

**摘要:**目的 探讨吉西他滨诱导胰腺癌细胞 PANC-1 中 survivin 表达与化疗耐药的关系。方法 胰腺癌细胞株 PANC-1 用 1640 液培养, 吉西他滨的浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 运用 RT-PCR 和 Western blot 检测 survivin 的表达。分析细胞中 survivin 的表达水平与化疗耐药的关系。结果 用 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的吉西他滨作用胰腺癌细胞株 24 h 和 48 h, survivin mRNA 水平分别上升了 (1.34  $\pm$  0.12) 倍, (2.40  $\pm$  0.17) 倍和 (3.33  $\pm$  0.20) 倍, (4.41  $\pm$  0.18) 倍; 蛋白水平上升了 (1.20  $\pm$  0.07) 倍, (1.48  $\pm$  0.19) 倍和 (2.90  $\pm$  0.04) 倍, (4.50  $\pm$  0.20) 倍, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。结论 胰腺癌细胞的化疗耐药可能通过吉西他滨的作用上调 survivin 的表达而增强。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 874-877]

**关键词:** 胰腺肿瘤; 吉西他滨; survivin(存活素); 抗药性, 肿瘤

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

## Study of the survivin expression in pancreatic carcinoma cell line PANC-1 induced by gemcitabine

CHEN Jianyun, LI Yixiong, JIANG Chun, WEI Zhiyuan, YI Xiaoping, LU Xinsheng

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To study the relationship between chemoresistance and the expression of survivin, induced by gemcitabine, in pancreatic carcinoma cell line PANC-1. **Methods** The pancreatic carcinoma cell line PANC-1 was cultured by RPMI 1640 and gemcitabine with the concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, and survivin expression was examined by RT-PCR and Western blot. The relationship of the survivin level of the cell and its chemoresistance to gemcitabine was analyzed. **Results** Twenty-four and 48 hours after culture with gemcitabine concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, survivin mRNA level was increased (1.34  $\pm$  0.12), (2.40  $\pm$  0.17), and (3.33  $\pm$  0.20), (4.41  $\pm$  0.18) folds, and the protein expression was enhanced (1.20  $\pm$  0.07), (1.48  $\pm$  0.19), and (2.90  $\pm$  0.04), (4.50  $\pm$  0.20) folds respectively. There was a significant difference between the two groups ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** The intensity of pancreatic carcinoma cell lines chemoresistance could be enhanced by the action of gemcitabine on the up-regulated expression of survivin.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9): 874-877]

**Key words:** Pancreatic Neoplasms; Gemcitabine; Survivin; Drug Resistance, Neoplasm

CLC number: R 735.9

Document code: A

**基金项目:** 中南大学研究生教育创新工程课题资助(2340-75242)。

**收稿日期:** 2008-04-18; **修订日期:** 2008-07-20。

**作者简介:** 陈俭云, 男, 中南大学湘雅医院普外科博士研究生, 主要从事胆道胰腺外科的基础和临床研究。

**通讯作者:** 李宜雄 E-mail: liyixiong6@hotmail.com

胰腺癌发病隐匿,手术切除率低,能根治者仅为 5%~7.5%。约有 80% 以上的患者需依靠化疗和放疗等辅助治疗延长生存期。然而,大部分胰腺癌细胞对化疗药物耐药,导致胰腺癌预后极差。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)的过表达是肿瘤细胞化疗敏感性下降的重要机制。IAP 是一类新的癌基因家族。目前发现的人类凋亡抑制基因共有 8 种,其中生存素(survivin)基因是抑制凋亡作用最强的一种<sup>[1]</sup>,本研究旨在探讨吉西他滨诱导胰腺癌细胞中 survivin 表达与化疗耐药的的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株和主要试剂

1.1.1 细胞株 胰腺癌细胞株 PANC-1 购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.2 试剂 DAB 显色试剂盒购、BCA 蛋白定量试剂盒(北京中山生物技术有限公司),兔抗人 survivin 多克隆抗体(R&D 公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(Sigma 公司),辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG(Pierce 公司),RT 试剂盒(Promega 公司),GEM 为 Lilly France S. A. 公司产品,survivin 引物由上海博雅生物技术有限公司合成。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与传代 用 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 的消化液消化 PANC-1 细胞,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 °C,含 5% CO<sub>2</sub>,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 PANC-1 细胞对化疗药物 GEM 的半数有效浓度(IC<sub>50</sub>)的测定 (1) 细胞以 3 × 10<sup>4</sup>/孔接种于 96 孔板中,在 37 °C,含 5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h;(2) 在各孔中均加入浓度梯度的 gemcitabine,浓度分别为 1 000 μg/mL,100 μg/mL,10 μg/mL,1 μg/mL,0.1 μg/mL,0.01 μg/mL,0 μg/mL,每个浓度设 3 个复孔,以不加药物的细胞存活率为 100% 和没有接种细胞的孔为零作为对照;(3) 细胞在浓度梯度药物作用下分别继续培养 24 h 和 48 h,每孔加入 5 mg/mL 的噻唑蓝(MTT)溶液 20 μL,37 °C 继续培养 4 h;(4) 吸干培养基,每孔加入 DMSO 溶液 150 μL,室温摇床上振荡 10 min,使甲臞充分溶解;(5) 在用 Bio-rad Model 550 酶联免疫检测仪 490 nm 波长测各孔的吸光度值;(6) 细胞增殖抑制率(%) =

(1-A 实验孔值/A 阴性对照孔值) × 100%,根据 IC<sub>50</sub> 计算软件得出 24 h 和 48 h 细胞对化疗药物的 IC<sub>50</sub>。

1.2.3 GEM 对 PANC-1 胰腺癌细胞内 survivin 的诱导 细胞生长状态良好时,取 1 × 10<sup>6</sup>/瓶传代接种于 2 个 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,参考 IC<sub>50</sub> 值,分别加入低、高浓度含 1.0 μg/mL 和 10.0 μg/mL GEM (Gemcitabine 吉西他滨)的 RPMI 1640 培养基 5 mL,继续培养 24 h 或 48 h 后检测 survivin mRNA 的表达和 survivin 蛋白的表达。

1.2.4 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达 (1) 细胞总 RNA 的抽提:消化未经 GEM 培养(对照组)和经过 GEM 培养 24,48 h 后(实验组)的 PANC-1 细胞,计数,各取 1 × 10<sup>6</sup> 置于 Eppendorf 管中,用 Trizol 法提取细胞总 RNA。取 8 μL 抽提的 RNA,以 100V 的电压下行 1% 琼脂糖凝胶电泳,同时稀释 60 倍分别测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度,检验纯度;以公式:RNA 浓度(μg/mL) = OD<sub>260</sub> × 40 μg/mL × 稀释倍数计算 RNA 浓度;立即行 RT-PCR 反应。(2) RT-PCR 反应:取 1 μg 总 RNA,RT 反应体系为 25 mM 的 MgCl<sub>2</sub> 4.0 μL,10 × 逆转录缓冲液 2.0 μL,10 mM 的 dNTP 混合物 2.0 μL,重组 RNA 酶抑制剂 0.5 μL,AMV 逆转录酶 5 U,0.5 μg/μL 随机引物 1 μL,总 RNA 1 μg,加无 RNA 酶的水补足至 20 μL。RT 的反应条件:室温孵育 10 min,转入 PCR 仪中 42 °C 15 min,95 °C 5 min,4 °C 5 min。survivin 的引物序列为:5'-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3'(上游引物);5'-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA -3'(下游引物),扩增的产物大小为 447 bp;内参照 GAPDH 的引物序列采用国际标准序列:5'-CGA AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'(上游引物);5'-AGC CTT CTC GGT GGT GAA GAC-3'(下游引物),扩增的产物大小为 306 bp。PCR 反应体系:TEM 2 μL,Taq 酶 0.3 μL,BF(缓冲液)2 μL,PANC-1 UP(上游引物)0.5 μL,PANC-1 PL(下游引物)0.5 μL,GAPDH UP(甘油醛-3-磷酸脱氢酶上游引物)0.5 μL,GAPDH PL(甘油醛-3-磷酸脱氢酶下游引物)0.5 μL,25 mM dNTP 2 μL,H<sub>2</sub>O 11.7 μL,共 20 μL。PCR 反应:95 °C 5 min,95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 60 s(进行 30 个循环),72 °C 10 min,4 °C 保持。反应完毕后,取 10 μL,以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳;EB 染色 10 min,用 Bio-Rad 公司的凝胶电泳成像仪成像,以 Quantity one 分析各条带的吸光度,计算 survivin 的 mRNA 相对值。

1.2.5 Western blot 检测 survivin 蛋白的表达 以 BCA 蛋白定量试剂盒定量,取蛋白 20  $\mu\text{g}$  进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,120V 恒定电压转膜 2 h,室温封闭 1 h,4  $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜。survivin 一抗工作浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,作用 1 h,二抗工作浓度为 1:80 000,作用 50 min,GAPDH 一抗工作浓度为 11:1 000,二抗工作浓度为 11:20 000,抗体反应时间同 survivin。DAB 显色 5 min,凝胶成像测灰度行数据分析。

### 1.3 统计学分析

试验在相同条件下重复 3 次,两样本均数间比较采用  $t$  检验,多样本均数间比较采用 ANOVA 方差分析。以  $P < 0.05$  为有统计学意义。统计分析采用 SPSS13.0 统计软件包完成。

## 2 结果

### 2.1 胰腺癌细胞 PANC-1 对化疗药物 GEM 的半数有效浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )

MTT 检测结果显示,不同浓度的 GEM 均可以抑制 PANC-1 细胞生长,且表现为时间和浓度依赖性。GEM 处理 24 h 与 48 h 后,在 1 000 ~ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内,同一浓度下,随着时间的延长 GEM 的抑制增殖效应降低 ( $P < 0.05$ ),而 0.1 ~ 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的抑制效应虽亦有降低,但差异无显著性 ( $P > 0.05$ );同一时间点随着浓度的增加,GEM 的增殖抑制效应逐渐增加 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。24 h 和 48 h GEM 对 PANC-1 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 (1.48  $\pm$  0.23)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 (3.12  $\pm$  0.36)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;48 h 组较 24 h 组  $\text{IC}_{50}$  增加 ( $P < 0.05$ )。

表 1 GEM 对 PANC-1 细胞增殖的抑制率 (%)

浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	24 h	48 h	$t$	$P$
1 000	95.34 $\pm$ 0.74	92.11 $\pm$ 0.53	6.156	<0.05
100	85.05 $\pm$ 1.53	77.55 $\pm$ 1.18	6.695	<0.05
10	73.15 $\pm$ 1.36	68.99 $\pm$ 1.01	4.245	<0.05
1	47.49 $\pm$ 0.81	42.67 $\pm$ 0.89	6.924	<0.05
0.1	22.68 $\pm$ 2.85	18.57 $\pm$ 0.81	2.402	>0.05
0.01	8.91 $\pm$ 1.61	6.43 $\pm$ 0.59	2.511	>0.05

### 2.2 survivin mRNA 的表达情况

以 GAPDH 的灰度值为内参照,比较目的基因 survivin 与 GAPDH 条带灰度的比值。1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  24 h (A) 组,10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  24 h (B) 组,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  48 h

(C) 组,10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  48 h (D) 组,较空白对照 (E) 组上升分别为 (1.34  $\pm$  0.12), (2.40  $\pm$  0.17), (3.33  $\pm$  0.20), (4.41  $\pm$  0.18) 倍,差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。A 与 B,C 与 D,A 与 C,B 与 D 两两比较,差异均具有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。提示 survivin mRNA 的表达表现为 GEM 诱导时间和浓度依赖性 (图 1)。

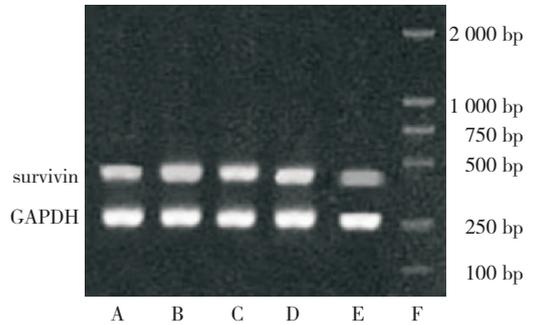


图 1 survivin mRNA 的表达 (RT-PCR) A:1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  24 h 组; B:10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  24 h 组; C:1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  48 h 组; D:10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  48 h 组; E: 空白对照组; M: DNA marker; survivin 的 PCR 产物为 447 bp; GAPDH 的 PCR 产物为 306 bp

### 2.3 survivin 蛋白的表达情况

以 GAPDH 的灰度值为内参照,比较目的蛋白 survivin 与 GAPDH 的比值,A,B,C,D 组与 E 组比较,分别上升 (1.20  $\pm$  0.07), (1.52  $\pm$  0.14), (2.90  $\pm$  0.04), (4.50  $\pm$  0.20) 倍,差异均具有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。A 与 B,C 与 D,A 与 C,B 与 D 两两比较,差异均具有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。提示 survivin 蛋白的表达表现为 GEM 诱导时间和浓度依赖性 (图 2)。

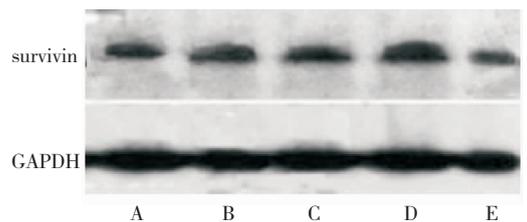


图 2 survivin 蛋白的表达 (western-blot) A:1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  24 h 组; B:10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  24 h 组; C:1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  48 h 组; D:10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  48 h 组; E: 空白对照组

### 3 讨论

胰腺癌细胞对凋亡的抵抗导致胰腺癌对大多数的抗肿瘤治疗如放疗、化疗不敏感,这是胰腺癌预后极差的重要原因之一<sup>[2]</sup>。细胞凋亡在维持多细胞动物的生长发育、体内平衡及免疫防御中起着重要的作用,受相关基因包括凋亡促进基因和凋亡抑制基因的双重控制。

Survivin 是近年发现的一种凋亡抑制基因,属于 IAP 家族,是迄今为止发现的抑制凋亡作用最强的凋亡抑制因子<sup>[3]</sup>。其抑制凋亡的机制主要是通过直接或间接作用于凋亡蛋白酶级联通路的终末效应因子 caspase-3 和 caspase-7 而发挥抗凋亡作用<sup>[4]</sup>; survivin 也可抑制由细胞色素 C 或 caspase-8 诱导的 caspase 活化,能阻止 caspase-3 和 caspase-7 的自发活化;同时 survivin 也可与细胞周期凋亡因子 CDK4 形成 survivin-CDK4 复合体,使 p21 从 CDK4 的复合体中释放出来,与线粒体 procaspase-3 结合,形成 procaspase-3/P21 复合物,抑制 procaspase-3 激活成活化的 caspase3,从而阻止细胞凋亡<sup>[5]</sup>。

研究表明, survivin 的组织分布具有明显细胞选择性,在正常终末分化组织中不表达或低表达,而在人类各种肿瘤组织中广泛表达。survivin 的表达与肿瘤患者的病程恶性进展、肿瘤的复发及耐药性密切相关,其过度表达预示患者的预后差<sup>[6-8]</sup>。

目前由于胰腺癌对放射治疗不敏感,有学者认为与凋亡促进因子的抑制和凋亡抑制因子的诱导有着重要作用。Asanuma 等<sup>[9]</sup>以 5 个胰腺癌细胞系 PANC-1, AsPC-1, Capan-1, BxPc-3 及 MIA-Paca-2 为实验对象,采用定量 RT-PCR 技术,进行了 survivin 作为胰腺癌细胞放射治疗抗性因子的可能性及其可诱导性的研究,结果发现其表达与辐射敏感性呈负相关, survivin 表达水平高的 PANC-1 细胞对 X 射线有较强的抵抗力,而较少表达的 MIAPaca-2 细胞则非常敏感:经半致死量的 X 射线照射后 PANC-1 细胞和 MIAPaca-2 细胞的 survivin mRNA 水平明显升高, Caspase-3 酶活力受到抑制;接受致死量照射后细胞的生存情况则明显改善,提示 survivin 的表达能直接降低胰腺癌的放疗敏感性,因此通过抑制 survivin 表达可能会增加放射治疗的敏感性,达到增强治疗胰腺癌的目的。

本研究结果表明, 24 h 和 48 h GEM 对 PANC-1 的 IC<sub>50</sub> 分别为 (1.48 ± 0.23) μg/mL 和 (3.12 ± 0.36) μg/mL。不同浓度的 GEM 均可以抑制 PANC-1 细胞生长,且表现为时间和浓度依赖性。

PANC-1 对 GEM 的化疗敏感性随诱导时间增加而降低。在人胰腺癌细胞株 PANC-1 内,加入 1 μg/mL (低) 和 10 μg/mL (高) 两种浓度的化疗药物 GEM, survivin mRNA 在加药后 24 h 和 48 h 分别较加药前约上升了 (1.34 ± 0.12), (2.40 ± 0.17) 倍和 (3.33 ± 0.20), (4.41 ± 0.18) 倍,蛋白上升了 (1.20 ± 0.07), (1.48 ± 0.19) 倍和 (2.90 ± 0.04), (4.50 ± 0.20) 倍。survivin 的表达上升呈现 GEM 诱导时间和浓度依赖关系。Ikeguchi 等<sup>[10]</sup>研究,在胃癌细胞中,利用顺铂处理会出现 survivin mRNA 和蛋白质表达水平上升。表明 PANC-1 对 GEM 的化疗敏感性降低可能与 survivin 表达上升有关。

由此推测, GEM 诱导胰腺癌细胞内 survivin mRNA 和蛋白表达升高,可能是胰腺癌细胞逃避化疗药物毒性的机制之一。survivin 表达的升高可能参与了 PANC-1 对 GEM 的耐药性的产生,抑制 survivin 的表达可能提高 PANC-1 细胞对化疗药物的敏感性。

#### 参考文献:

- [1] Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif [J]. *J Virol*, 1993, 67(4): 2168 - 2174.
- [2] Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer [J]. *Mol Cancer*, 2003, 2(1): 6 - 19.
- [3] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nature Med*, 1997, 3(8): 917 - 921.
- [4] Shin S, Sung BI, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 [J]. *Biochem*, 2001, 40(4): 1117 - 1123.
- [5] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspase-3/p21 complex formation as a result of interaction with CDK4 to resist Fas mediated cell death [J]. *Oncogene*, 2000, 19(10): 1346 - 1353.
- [6] Kami K, Doi R, Koizumi M, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients [J]. *Surgery* 2004, 136(2): 443 - 448.
- [7] Jhala N, Jhala D, Vickers SM, et al. Biomarkers in Diagnosis of pancreatic carcinoma in fine-needle aspirates [J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 126(4): 572 - 579.
- [8] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(4): 463 - 476.
- [9] Asanuma K, Moriai R, Yajima T, et al. Survivin as a radio resistance factor in pancreatic cancer [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(11): 1204 - 1209.
- [10] 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.