

· 论 著 ·

阿司匹林引起胰腺癌细胞株 SW1990 对吉西他滨耐药及其机制研究

林永良, 陈良岂, 杜荣国, 林英卓

(广东省阳江市人民医院消化内科 529500)

摘要:目的 探讨阿司匹林是否引起胰腺癌细胞株 SW1990 对吉西他滨耐药及其可能机制。方法 通过四氮唑蓝(MTT)和 HOCHESST33258 染色方法检测药物对人胰腺癌耐药株 SW1990 细胞的生长情况以及凋亡的影响;并应用蛋白免疫印迹方法检测细胞信号通路 PI3K/AKT 的变化。结果 阿司匹林能明显降低吉西他滨对细胞的抑制率并提高 IC₅₀。0.4 μmol/L 吉西他滨干预细胞后,凋亡率达 56%,明显高于吉西他滨与阿司匹林合用时细胞的凋亡率(28%, $P < 0.01$)。磷酸化 AKT 和 PI3K 水平明显增高。PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 能明显逆转阿司匹林引起的 SW1990 细胞耐受吉西他滨的现象。结论 阿司匹林通过激活 PI3K/AKT 信号通路引起胰腺癌细胞株 SW1990 对吉西他滨耐药。

关键词:胰腺癌;阿司匹林;吉西他滨

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.011

中图分类号:R735.9;R73-361

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)17-2267-03

Aspirin protects human pancreatic cancer cell SW1990 from gemcitabine-induced apoptosis

LIN Yong-liang, CHEN Liang-qi, DU Rong-guo, et al.

(Department of Digestion, Yangjiang People's Hospital, Yangjiang, Guangdong 529500, China)

Abstract: Objective To investigate whether aspirin induces resistance to gemcitabine in human pancreatic cancer cell SW1990 and its possible mechanism. Methods Human pancreatic cancer cell SW1990 was used as an in vitro model. MTT and HOCHESST33258 staining were carried on to evaluate cell growth and apoptosis. Western blot was taken to access the effects of aspirin on the PI3K/AKT signaling pathway. Results The viability of human pancreatic cancer cell SW1990 was inhibited to 50% compared to control, after treatment with 0.4 μmol/L gemcitabine for 72 h. The IC₅₀ for gemcitabine in SW1990 cells was (0.42 ± 0.05) μmol/L. Aspirin was able to significantly block the inhibitory effect of gemcitabine on cell viability and increase the IC₅₀ for gemcitabine. Gemcitabine at the dose of 0.4 μmol/L was enough to trigger 56% apoptosis in cancer cells, which was higher than the combination of aspirin and gemcitabine. The level of phosphorylated protein of AKT and PI3K were profoundly raised by aspirin. Furthermore, the inhibitor of PI3K/AKT, LY294002, could reverse the interference of aspirin. Conclusion Aspirin is able to induce resistance to gemcitabine in human pancreatic cancer cell SW1990 though activation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: human pancreatic cancer; aspirin; gemcitabine

胰腺癌是一恶性程度极高,治疗效果及预后极差的肿瘤,且发病率逐年上升^[1]。在西方国家已成为恶性肿瘤导致死亡的第四大原因^[2]。除手术外,化疗是重要的辅助治疗手段,尤其对于不能切除的肿瘤,化疗是主要的治疗手段。吉西他滨是一种核苷类似物,是临床上应用广泛并是迄今治疗胰腺癌最好的药物,在缓解症状、延长生存时间和提高生存质量等方面发挥重要作用,特别是在晚期胰腺癌治疗中有着无可替代的重要作用^[3]。但在肿瘤化疗过程中,耐药现象的存在,尤其是获得性耐药,严重地阻碍了该化疗药物应用^[3-4]。国外研究显示常用非甾体类抗炎药阿司匹林能明显减低抗肿瘤药物的作用^[5]。在此,本研究探讨阿司匹林对吉西他滨在胰腺癌细胞上的作用影响以及其中可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)细胞系:人胰腺癌细胞株 SW1990 经美国引进,由上海细胞库提供。培养条件为高糖达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM)培养基,含 10% 胎牛血清,37 ℃,5% CO₂ 孵箱培养。(2)药品与试剂:吉西他滨由美国礼来公司生产(规格每支 200 mg,批号:FF0E240);阿司匹林(美国 Sigma 公司),经二甲亚砜(DMSO)溶解,并用 DMEM 培养基稀释到工作浓度,振荡助溶,使 DMSO 的终浓度为 0.1%。由于药物呈酸性,

故用 2.8% 碳酸氢钠(NaHCO₃)(上海生工)调整 pH 值到 7.2。四氮唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司)。烟酸己可碱(Hoechst) 33258(美国 Sigma 公司)。(3)抗体:磷酸化 AKT(SER437),总 AKT,磷酸 PI3K p85(Tyr458)/p55(Tyr199),总 PI3Kp85 抗体均购于美国 CST 公司,按 1:1 000 稀释成工作液。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测吉西他滨对细胞生存率的抑制作用以及细胞对吉西他滨的敏感性实验 取对数生长期的细胞接种于 96 孔板,每孔加入 100 μL 共 104 个细胞,细胞贴壁加入药物处理,一定时间后,每孔加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h 后,吸走上清液,加入 100 μL DMSO 溶解紫色结晶,振荡 5 min,应用自动酶标仪测 490 nm 处吸光度(A)值。并设不加细胞仅加培养基的空白对照组及接种细胞但不加药物的对照组。按下式计算不同浓度药物作用下细胞存活率,细胞存活率=(加药组 A 值-空白对照组 A 值)/(对照组 A 值-空白对照组 A 值)×100%。每一项实验重复 3 次,绘制浓度-细胞存活率曲线。根据 Microsoft Excel 软件中给出的相应公式求得 72 h 时抑制 50% 细胞生长的药物浓度(IC₅₀)和耐药系数(resistance Index, RI),RI=IC_{50Gem}+ASA/IC_{50Gem}。

1.2.2 凋亡细胞的检测 细胞经过处理后,去掉培养基,用磷

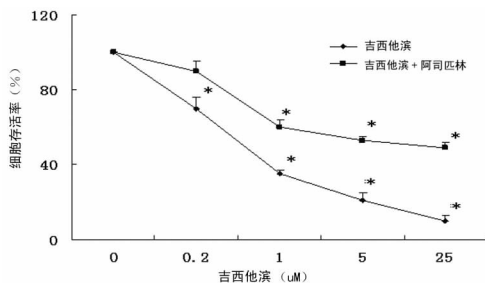
酸盐缓冲液(PBS)洗涤一次,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,去掉多聚甲醛,加入 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 溶液孵育 5 min,在荧光显微镜下观察细胞核形态。凋亡细胞表现为核固缩,核碎裂以及凋亡小体形成。

1.2.3 蛋白免疫印迹 细胞经过处理后,用 M-PER(美国 Pierce 公司)细胞裂解液裂解细胞,加入磷酸酶抑制剂(PhosSTOP,ROCHE)离心取上清液,用二辛可宁酸(BCA)试剂盒(美国 Pierce 公司)进行蛋白定量,取相同总量蛋白上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,在电转缓冲液中 100 V 低温转移 60 min,所得硝酸纤维膜在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜,再在室温下孵育与 HRP 结合的二抗和 HRP 结合的抗生物素抗体(1:1 000)1 h,最后曝光,拍照并用 Gel-Pro analyzer 软件进行灰度扫描。

2 结果

2.1 吉西他滨对 SW1990 细胞生存率的抑制作用以及阿司匹林对其影响 经 MTT 方法检测细胞的活性并计算生存率,单用吉西他滨能呈浓度依赖性降低 SW1990 细胞的生存率。单用吉西他滨 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$,72 h 即可使细胞的生存率抑制到对照组的 50%,实验所用最大浓度 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 可能使抑制率达 90%。吉西他滨对 SW1990 的 IC_{50} 为 $(0.42 \pm 0.05) \mu\text{mol}/\text{L}$ 。合用 2 mmol/L 阿司匹林后,细胞对吉西他滨反应性明显下降,细胞存活曲线较单用吉西他滨时明显上移,此时 SW1990 对吉西他滨的 IC_{50} 为 $(25.03 \pm 0.04) \mu\text{mol}/\text{L}$ 。可见,阿司匹林能使 SW1990 细胞耐受吉西他滨的处理。计算阿司匹林处理后,吉西他滨对 SW1990 的 RI 为 60。细胞经药物处理的存活曲线,见图 1。

2.2 吉西他滨诱导 SW1990 细胞凋亡以及阿司匹林对凋亡的保护作用 阿司匹林对 SW1990 耐受吉西他滨的作用,用 Hoechst33258 染色来检测细胞的凋亡情况,发现对照组细胞有少数细胞发生自身性凋亡,经吉西他滨处理后,大量细胞(56%)发生细胞核浓缩、碎裂以及产生凋亡小体(封 2 图 2)。合用阿司匹林后,吉西他滨这种促凋亡作用被大大减弱,发生凋亡的细胞数较单用吉西他滨组下降 28%。可见阿司匹林能明显使细胞耐受吉西他滨引起的凋亡,见图 3。



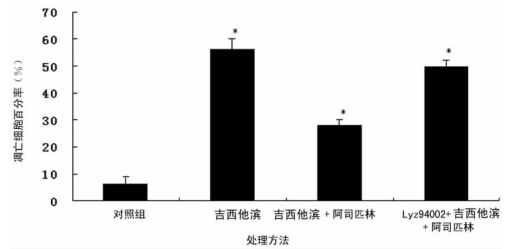
*:与吉西他滨比较, $P < 0.01$ 。

图 1 细胞经不同药物处理 72 h 后活性的变化

2.3 阿司匹林激活细胞 PI3K/AKT 促存活通路 用蛋白免疫印迹的方法检测阿司匹林对 SW1990 细胞 AKT 的活性情况,发现阿司匹林单独或者合用吉西他滨能明显增加 AKT 蛋白 437 位丝氨酸的磷酸化水平,而单用吉西他滨对磷酸化 AKT 水平无明显影响。同时,阿司匹林单独或者合用吉西他滨能提高 AKT 的上游激酶 PI3K 的磷酸化水平。蛋白免疫印迹的图片和灰度扫描见图 4A。

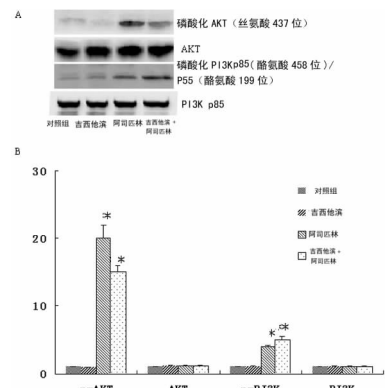
2.4 抑制 PI3K/AKT 通路使细胞恢复对吉西他滨的敏感性

用 PI3K/AKT 通路的抑制剂 LY294002 预处理 SW1990 细胞 30 min,能明显逆转阿司匹林引起的 SW1990 细胞对吉西他滨的耐受作用,细胞的凋亡率回升到 50%,较未经 LY294002 处理时明显增加($P < 0.01$),见图 4B。



*:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

图 3 经不同药物处理后凋亡细胞的百分率



A:蛋白免疫印迹结果。B:灰度扫描结果。*:与对照组、吉西他滨组比较, $P < 0.01$ 。

图 4 药物对细胞 PI3K/AKT 通路的影响

3 讨论

众所周知,胰腺癌预后很差,中位生存期仅为 3~6 个月^[5-6]。初诊时,2/3 的患者已失去手术治疗机会;对传统化疗药物和放疗均耐受。吉西他滨问世后,用于胰腺癌治疗,不仅改善了有效率,而且还显著提高了胰腺癌患者的生活质量。但是就算以此药治疗,在临床上患者的有效率也还是低于 10%^[7-8],这与胰腺癌广泛的耐药特性有关。胰腺癌耐药有些是细胞本来具备的特性,有些是获得性耐药。所以在胰腺癌内科治疗方面,有必要对这一重要的药物进行深入研究,探讨其与其他药物合用时是否产生耐药及其机制。

阿司匹林自从 1897 年开始应用于临床,至今已有一百年的使用历史^[9-10]。虽然有研究提示阿司匹林能促进癌细胞凋亡而抑制胰腺癌细胞存活以及在动物模型上成瘤,然而不少报道显示阿司匹林能使结肠癌细胞免受去血清培养或者抗癌药物处理引起的凋亡^[5,11]。所以,研究阿司匹林在胰腺癌的治疗中是否引起吉西他滨耐药是非常必要的。

本研究应用人源的胰腺癌细胞株探讨了临床常用的非甾体抗炎药阿司匹林对胰腺癌一线药物吉西他滨的治疗作用的影响。本研究发现阿司匹林能明显引起胰腺癌细胞对吉西他滨的耐受作用,主要表现在存活率抑制幅度的减少以及凋亡细胞的减少。以上阿司匹林的作用是由激活细胞促存活通路 PI3K/AKT 而引起的。本研究对临床治疗胰腺癌时合用药物具有提示意义,也为进一步研究吉西他滨耐药机制提供了有效的依据。

本研究中先用 MTT 法检测到阿司匹林使吉西他滨对胰腺癌细胞的生存抑制率降低,而且通过核形态染色发现阿司匹林减少了吉西他滨引起的细胞凋亡,说明阿司匹林能引起胰腺癌细胞株 SW1990 对吉西他滨耐药。阿司匹林引起耐药的主要机制可能是 PI3K/AKT 通路的激活。因为 PI3K/AKT 是著名的细胞内促存活途径^[12],是多种细胞产生耐药的主要分子,且阿司匹林在保护结肠癌细胞免受去血清培养或者抗癌药物处理引起的凋亡的过程中起着主导作用^[5]。本研究用蛋白免疫印迹的方法检测到阿司匹林能明显活化 PI3K 和 AKT 激酶,而且,此通路的特异性抑制剂 LY294002 的应用能消除阿司匹林在胰腺癌细胞上抑制凋亡的作用,进一步表明 PI3K/AKT 通路是阿司匹林发挥作用的主要分子机制。

综上所述,阿司匹林能引起胰腺癌细胞 SW1990 产生对吉西他滨的耐药,此发现对临床合理用药有非常重要的指导作用。为此,需要在其他人胰腺癌细胞株上实验并在动物实验上得到验证,以明确阿司匹林对吉西他滨临床用药的影响。

参考文献:

[1] 李耀波. 胰腺癌与慢性胰腺炎的 CT 鉴别诊断[J]. 广西医学, 2001, 23(3): 497.

[2] Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and prevention of pancreatic cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2004, 34(5): 238.

[3] Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, et al. Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death[J]. *Oncogene*, 2003, 22(21): 3243.

[4] El Maalouf G, Le Tourneau C, Batty GN, et al. Markers involved in resistance to cytotoxics and targeted therapeutics in pancreatic cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35

(2): 167.

[5] di Palma A, Matarese G, Leone V, et al. Aspirin reduces the outcome of anticancer therapy in Meth A-bearing mice through activation of AKT-glycogen synthase kinase signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(5): 1318.

[6] 史文昕, 赵秋. 221 例胰腺癌早期诊断临床分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(12): 27.

[7] Li L, Aggarwal BB, Shishodia S, et al. Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis[J]. *Cancer*, 2004, 101(10): 2351.

[8] 陈轶. 胰腺癌 71 例临床分析[J]. 海南医学, 2005, 16(9): 95.

[9] Gilroy DW. The role of aspirin-triggered lipoxins in the mechanism of action of aspirin[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, 73(3-4): 203.

[10] 朱志霞, 张为民. 吉西他滨与靶向药物联合治疗胰腺癌研究进展[J]. 广东医学, 2009, 30(7): 1188.

[11] Ricchi P, Palma AD, Matola TD, et al. Aspirin protects Caco-2 cells from apoptosis after serum deprivation through the activation of a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/p21Cip/WAF1 pathway[J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(2): 407.

[12] Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy[J]. *Nature*, 2004, 428(6980): 332.

(收稿日期: 2009-11-11 修回日期: 2010-02-24)

(上接第 2266 页)

结论完全不受血糖水平的影响。

综上所述, 血脂异常患者除了存在明显的 IR 外, 已出现轻度的胰岛 β 细胞功能损害, 而血清 FFA 的增高在其中发挥重要作用。

参考文献:

[1] 李光伟. 胰岛 β 细胞功能评价[J]. 国外医学内分泌学分册, 2001, 21(5): 225.

[2] Tripathy D, Wessman Y, Gullstrom M, et al. Importance of obtaining independent measures of insulin secretion and insulin sensitivity during the same test: results with the Botnia clamp[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(5): 1395.

[3] Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function[J]. *Diabetes*, 1993, 42: 1663.

[4] Vrbkova J, Bendlova B, Hill M, et al. Insulin sensitivity and beta-cell function in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Diabetes Care*, 2002, 25(7): 1217.

[5] DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp tech-

nique: a method for quantifying insulin secretion and resistance[J]. *AM J Physiol*, 1979, 237(3): E214.

[6] Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Dose-response characteristics for effects of insulin on production and utilization of glucose in man[J]. *Am J Physiol*, 1981, 240(6): E630.

[7] DeFronzo RA, Hendler R, Simonson D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes[J]. *Diabetes*, 1982, 31(9): 795.

[8] 白晓苏, 程庆丰, 刘秀蓉, 等. 应用 Botnia 钳夹术对格华止改善多囊卵巢综合征患者的胰岛素敏感性和 β 细胞功能的研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(10): 868.

[9] Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Failure of beta-cell function to compensate lack of insulin action in hyperuricemic subjects[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009, 25(6): 535.

[10] Jia SD, Wang YG, Li J. An analysis of islet beta-cell function in hyperuricemia[J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2006, 45(6): 456.

(收稿日期: 2009-11-17 修回日期: 2010-02-13)