

· 论 著 ·

LY294002 对 SGC7901/VCR 细胞 VCR 耐药逆转作用研究

谢霞, 周建云, 王雷, 郭红, 凌贤龙, 赵晓晏[△]

(第三军医大学新桥医院消化科, 重庆 400037)

摘要:目的 观察 LY294002 对 SGC7901/VCR 胃癌细胞长春新碱(VCR)耐药的逆转作用,并探讨其可能机制。方法 通过 MTT 法明确 LY294002 可以逆转 SGC7901/VCR 对 VCR 的耐药作用后,采用 TUNEL 检测细胞的凋亡,高效液相法检测细胞内药物浓度,RT-PCR 法和 Western blot 法分别检测细胞中 MDR1、caspase-3 和 XIAP 的基因和蛋白表达水平。结果 LY294002 能明显提高 VCR 的诱导细胞凋亡作用,明显增加细胞内 VCR 的浓度,并可降低耐药细胞中 MDR1、XIAP 的基因和升高 caspase-3 表达水平。结论 抑制 PI3K/PKB 通路可逆转胃癌耐药,其机制可能与降低耐药基因 MDR1 的表达以及调控凋亡相关基因 caspase-3 和 XIAP 的表达有关。

关键词:LY294002; SGC7901/VCR 细胞; 凋亡; MDR1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.011

中图分类号:R735.2;R730.53

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)21-2875-03

Drug resistance reversing effects on gastric carcinoma cell line by inhibition of PI3K/PKB signal pathway and its mechanism

XIE Xia, ZHOU Jian-yun, WANG Lei, et al.

(Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe whether inhibition of PI3K/AKT signal pathway could reverse drug resistance of gastric carcinoma, and to study its potential mechanism. **Methods** The growth inhibition effects of VCR alone and VCR in combination with PI3K/PKB inhibitor LY294002 on SGC7901/VCR cells were detected by in vivo and in vitro experiments. The protein and mRNA expression levels of MDR1, caspase-3 and XIAP in SGC7901/VCR cells were determined by Western-blot and reverse transcription PCR. The content of VCR in cells was determined with high performance liquid chromatography (HPLC). Besides, the apoptosis was detected by TUNEL. **Results** LY294002 enhanced the sensitivities of SGC7901/VCR cells to VCR significantly, and promoted the apoptosis rate induced by VCR prominently. The protein and gene expression levels of MDR1 and XIAP were inhibited, while the expression of caspase-3 was improved significantly. When VCR coupled with the LY294002, the VCR accumulation in cells increased significantly than used only. **Conclusion** Inhibition of PI3K/PKB signal pathway by LY294002 can reverse the drug resistance of gastric carcinoma cell line. Reduction of MDR1 expression levels, and regulation of apoptosis related genes, such as caspase-3 and XIAP expression levels play key roles in this progress.

Key words: LY294002; SGC7901/VCR cells; apoptosis; MDR1

肿瘤化疗过程中的一个主要问题是多药耐药(multidrug resistance, MDR)的产生,其产生原因还不是很清楚,MDR 的产生是一个复杂的过程,因药物作用使 P-gp 转录激活是引起肿瘤多药耐药的主要途径^[1]。最近研究发现,抑制 PI3K/PKB 信号转导通路,可以降低 P-gp 的表达水平,从而逆转肿瘤多药耐药^[2-3]。因此通过抑制蛋白激酶信号途径逆转肿瘤多药耐药是目前研究的热点。

LY294002 是 PI3K 特异性抑制剂,研究已证实其对 PI3K 及其下游靶点 PKB 均有抑制作用^[4]。本文旨在通过研究 PI3K/PKB 通路抑制剂 LY294002 对胃癌多药耐药细胞的多药耐药的影响,探讨逆转胃癌多药耐药的新途径。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SGC7901 细胞购于中科院上海细胞所,SGC7901/VCR 耐药细胞由第四军医大学樊代明院士惠赠。

1.1.2 主要试剂 长春新碱(vincristine, VCR)为深圳万乐有限公司生产(批号 0706V1);LY294002 购于美国 Cayam 公司,用 DMSO 溶解;TUNEL 试剂盒购于美国 Roche 公司;甲醇和乙腈均购于江苏汉邦科技有限公司;鼠抗人 caspase-3 一抗购

于北京中杉生物技术开发有限公司;羊抗人 XIAP 一抗购自美国 R&D Systems;PCR 引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成;RNA 提取试剂购自美国 Roche 公司;逆转录试剂盒购自日本 TOYOBO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 SGC7901/VCR 细胞培养于含 1.00 mg/L 的 VCR 及含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养基中维持耐药,实验前 2 周改用无 VCR 的培养基。

1.2.2 MTT 法 将 SGC7901/VCR 细胞分为空白对照组、VCR 组、LY294002 组及 VCR+LY294002 组 4 组,以 5×10^3 个/孔细胞密度接种于 96 孔板,每组设 4 个复孔,分别加入不同终浓度 VCR(0~10 mg/L)和 LY294002(0~80 μ mol/L),刺激 72 h 后,加入 MTT 继续培养,4 h 后加入 DMSO,以 570 nm 波长检测每孔吸光值(A),并参照夏曙和于世英^[5]的方法求出细胞对 VCR 和 LY294002 的中效浓度(IC₅₀)。

1.2.3 TUNEL 法 将 SGC7901/VCR 细胞分为空白对照组、VCR 组、LY294002 组及 VCR+LY294002 组 4 组,其中 VCR 终浓度为 1.00 mg/L,LY294002 为 20 μ mol/L,培养 72 h 后收集细胞,用 4% 多聚甲醛进行固定 1 h 后,按 TUNEL 试剂

[△] 通讯作者,电话:(023)687755604;E-mail:zhaosx@medmail.com.cn。

盒说明书依次加入 TUNEL 反应液, 反应完成后, 加入配好的 DAB 进行显色, 复染, 光镜下观察。

1.2.4 高效液相法 将细胞分为 VCR 及 LY294002+VCR 两组, LY294002 的终浓度为 20 μmol/L, VCR 的浓度分别为 90、120、180 mg/L, 分别培养 1、3、6 h 后收集细胞, 留取细胞外液, 同时以 1×10⁷ 个/mL 将细胞悬浮于生理盐水中, -20℃ 反复冻融至镜下观察细胞完全破碎, 16 000 r/min 离心 15 min, 上清液用高效液相色谱仪测定 VCR 的含量, 并采集色谱图。

1.2.5 Western blot 检测 制备胃癌 SGC7901/VCR 和 SGC7901 细胞的总蛋白质, 并用 BCA 法测定蛋白浓度, 取 50 μg 蛋白量上样于 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离, 转膜, 封闭, 然后依次结合 MDR1、XIAP 和 caspase-3 多克隆抗体及 HRP 标记的二抗, goldview 显色, 数据分析测定条带的面积和灰度值, 得出积分灰度值以代表蛋白表达量。

1.2.6 RT-PCR 根据 Genbank 基因序列设计引物, MDR1: 上游引物 5'-CTC GAG GAA TCA GCA TTC AG-3', 下游引物 5'-AGA TCT CTT TGA GCT TGG AAG AGC-3', 片段大小 173 bp; XIAP: 上游引物 5'-TGG CAC GAG CAG GGT TTC TTT-3', 下游引物 5'-TGG CAC GAG CAG GGT TTC TTT-3', 片段大小 404 bp; caspase-3: 上游引物 5'-AAG CGA ATC AAT GGA CTC TG-3', 下游引物 5'-GAC TTC TAC AAC GAT CCC CTC-3', 片段大小 383 bp, 以 β-actin 为内参。琼脂糖凝胶浓度为 2%, 以 0.5×TBE 为电泳缓冲液, 恒压 5 V/cm, 30 min, 电泳结束后, 将电泳凝胶置于 GelDoc2000 型凝胶图像分析系统中进行紫外扫描并图像分析。以目的产物电泳带面积吸光度与内参照 β-actin 的电泳带面积吸光度比值作为相对表达值。

1.3 统计学方法 应用 SPSS10.0 统计软件, 采用 ANOVA 分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 LY294002 对 SGC7901/VCR 胃癌细胞 VCR 耐药的逆转作用 VCR 对细胞 SGC7901/VCR 的抑制作用呈时间和剂量依赖性, 在 48 h 内各浓度对细胞的抑制作用变化明显, 仅在 72 h 时抑制作用呈线性关系 (图 1、2); 并且 LY294002 对 SGC7901/VCR 细胞 72 h 的 IC₅₀ 为 (58.56 ± 1.25) μmol/L, 所以在进一步实验中将 LY294002 的浓度定为 20 μmol/L; 20 μmol/L LY294002 可以显著增加 VCR 对 SGC7901/VCR 的生长抑制作用, 逆转细胞对 VCR 的耐药性, 逆转倍数为 4.7 倍 (图 2)。

2.2 LY294002 协同 VCR 促凋亡作用 LY294002+VCR 组细胞凋亡率明显高于 VCR、LY294002 组 (P<0.01), 说明 LY294002 和 VCR 具有协同促凋亡作用, 分别为 (82.2 ± 4.1)%、(19.2 ± 1.8)%、(20.1 ± 1.6)%, 空白对照组为 (7.8 ± 1.0)%, 见封 2 图 3。

2.3 LY294002 对细胞内 VCR 浓度的影响 通过 HPLC 分析显示, VCR 的最低检测限为 0.04 μg/mL; 当 VCR 浓度为 90、120 μg/mL 时, 在各时间点均未检测到细胞内药物浓度; 在 VCR 浓度为 180 μg/mL、时间点为 6 h 时, 仅 LY294002+VCR 组可以检测到细胞内药物浓度为 (0.169 ± 0.0095) μg/mL。

2.4 LY294002 对细胞内蛋白表达的影响 LY294002 作用 SGC7901/VCR 细胞 72 h 后, MDR1 和 XIAP mRNA 的表达水平明显下降 (P<0.01), caspase-3 mRNA 表达水平明显升

高 (P<0.01), 处理前后 MDR1 相对表达强度由 0.34 ± 0.04 降至 0.09 ± 0.01; XIAP 由 0.92 ± 0.07 降至 0.55 ± 0.06; caspase-3 由 0.53 ± 0.04 升高到 0.91 ± 0.03, 见图 4。

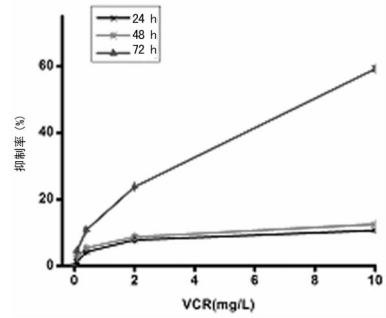


图 1 VCR 对 SGC7901/VCR 细胞生长的抑制作用

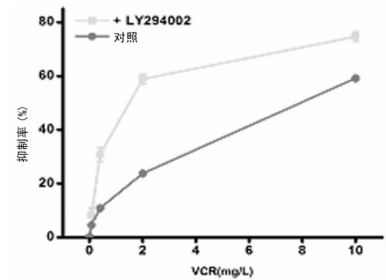
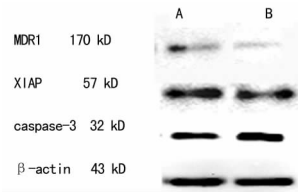


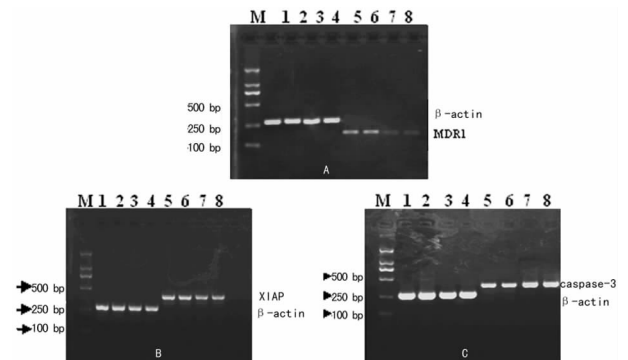
图 2 LY294002 对细胞的耐 VCR 的逆转作用



A: 对照组; B: LY294002 处理组。

图 4 LY294002 对 SGC7901/VCR 细胞 MDR1、XIAP 和 caspase-3 蛋白表达的影响

2.5 LY294002 对细胞内基因表达的影响 同样 LY294002 MDR1 和 XIAP mRNA 的表达水平明显下降 (P<0.01), caspase-3 mRNA 表达水平明显升高 (P<0.01), 处理前后 MDR1 相对表达强度由 0.46 ± 0.05 降至 0.16 ± 0.01; XIAP 由 0.9 ± 0.07 降至 0.58 ± 0.04; caspase-3 由 0.54 ± 0.02 升高到 0.89 ± 0.02, 见图 5。



1 和 2, 3 和 4, 5 和 6, 7 和 8 为复孔, M: marker; 1、2、5、6: 对照组; 3、4、7、8: LY294002 组。A: MDR1; B: XIAP; C: caspase-3。

图 5 LY294002 对 SGC7901/VCR 细胞 MDR1、XIAP 和 caspase-3 基因表达的影响

3 讨 论

目前胃癌仍是消化道最常见的恶性肿瘤^[6],很多胃癌患者就诊时已属中晚期,失去手术机会^[7],对于这类胃癌患者,化疗仍是其治疗的主要手段,而且有效的化疗也为胃癌患者争取手术切除创造机会。因此胃癌细胞对化疗药物是否敏感将直接影响患者预后,而胃癌细胞对化疗药物产生耐药是目前导致化疗失败的一个重要原因。

肿瘤细胞耐药的产生是一个复杂的过程,其确切的机制尚不清楚。目前认为耐药的产生可能与耐药相关膜蛋白(MDR1、MRP、LRP 等)的高表达^[1,8]、酶蛋白(GST、TOPO-II)的异常表达以及肿瘤细胞对凋亡耐受等多种因素有关。最近研究发现,通过抑制生存信号转导通路,如 PI3K/PKB 信号转导通路,可降低 P-gp 的表达水平^[2-3],促进细胞凋亡,从而增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[9],但其确切机制尚不清楚。

PI3K/PKB 信号通路调节细胞凋亡、增殖、分化、血管生成和代谢等,在此通路中,催化亚基 P110 被激活后使 3-磷酸肌醇磷酸化生成产物 4,5-二磷酸肌醇(PIP2)和 3,4,5-三磷酸肌醇(PIP3),后者与 PKB 的 PH(pleckstrin homology)域结合,使 PKB 的构象发生变化,磷酸化并得以激活。PKB 活化后继而磷酸化 GSK-3、Bax、caspase-3 等一系列下游靶点来调节细胞生长代谢等;PKB 在肿瘤细胞中可被化疗药物激活^[10],使细胞获得抗凋亡的能力,应用 PI3K/PKB 通路抑制剂可以增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,因此认为 PI3K/PKB 通路在调节肿瘤细胞对化疗药物的耐药性上有重要的作用。

LY294002 是 PI3K 的特异性抑制剂,研究已证实其对 PI3K 及其下游靶点 PKB 均有抑制作用^[11],通过抑制此通路从而抑制肿瘤生长。最近研究证实 PI3K 特异性抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)^[12]、LY294002^[2]可以逆转由 P-gp 介导肿瘤多药耐药。而且 PI3K/PKB 通路的特异性抑制剂 LY294002 也可通过促进 VCR 诱导耐药细胞 L1210/VCR 的凋亡,激活耐药细胞中的 caspase-3,从而逆转肿瘤细胞的多药耐药^[2]。在本研究中,作者观察到 LY294002 可以在蛋白和基因水平上抑制耐药细胞中的抗凋亡因子 XIAP 和 MDR1 的表达,增加凋亡因子 caspase-3 的表达,从而增加 VCR 的细胞毒性,诱导细胞凋亡,增加肿瘤细胞内 VCR 的聚集,从而使胃癌的耐药性得到逆转。

综上所述,PI3K/PKB 通路参与胃癌细胞 SGC7901/VCR 的多药耐药过程,应用 PI3K/PKB 通路特异性抑制剂 LY294002 可以通过抑制耐药基因 MDR1 和调节凋亡相关基因的表达来逆转胃癌多药耐药,为克服肿瘤多药耐药提供了新的思路和实验依据。

(上接第 2874 页)

学学报,2009,31(7):615.

[13] 周天贵,周承贵,袁红纲,等.青蒿琥酯和 TRAIL 对前列腺癌细胞凋亡诱导作用的实验研究[J].重庆医学,2010,39(6):663.

[14] Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Hemolysis induced by artemisinin and its derivatives in vitro[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1986, 7(3):269.

参考文献:

- [1] Zhang D, Fan D. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2007, 7(10):1369.
- [2] Barancik M, Bohacova V, Sedlak J, et al. LY294002, a specific inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway, antagonizes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 29(5):426.
- [3] Han Z, Hong L, Han Y, et al. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26(2):261.
- [4] Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, et al. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) [J]. J Biol Chem, 1994, 269(7):5241.
- [5] 夏曙,于世英.抑制 PI3K/Akt 信号转导通路提高化疗效果的实验研究[J].肿瘤,2006,26(4):311.
- [6] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74.
- [7] Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer[J]. Lancet, 2003, 362(9380):305.
- [8] Breier A, Barancik M, Sulova Z, et al. P-glycoprotein—implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(6):457.
- [9] Nicholson KM, Quinn DM, Kellett GL, et al. LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, causes preferential induction of apoptosis in human multidrug resistant cells[J]. Cancer Lett, 2003, 190(1):31.
- [10] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle[J]. Cell, 2002, 109 Suppl: S81.
- [11] 赵灵芝,银巍,苏兴文,等. IGF-经 PI3K/Akt 依赖性途径保护苯妥英钠诱导的小脑颗粒神经元凋亡[J].中国药理学通报,2005,21(01):53.
- [12] Yang JM, Vassil A, Hait WN. Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase in membrane ruffling induced by P-glycoprotein substrates in multidrug-resistant carcinoma cells[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(5):959.

(收稿日期:2010-03-31 修回日期:2010-06-07)

[15] Shekalaghe SA, Ter Braak R, Daou M, et al. Haemolysis after a single dose of primaquine co-administered with an artemisinin is not restricted to glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDA-variant)deficient individuals in Tanzania [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5):1762.

(收稿日期:2010-06-25 修回日期:2010-07-27)