

乳腺癌耐药蛋白ABCG2对胰腺癌SW1990细胞耐药性影响的实验

王飞通¹, 周兵², 刘小云³, 汪正伟², 牛坚¹, 魏鑫¹, 刘斌¹

Effect of ABCG2 Expression on Chemoresistance of Pancreatic Carcinoma Cell Line SW1990

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

1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 2221004, China; 2. Graduate School of Xuzhou Medical College; 3. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College

Corresponding Author: LIU Bin, E-mail: liubin.xy@163.com



Abstract: Objective To explore the relationship between chemoresistance to gemcitabine and ABCG2 expression in pancreatic carcinoma cell line SW1990. **Methods** The pancreatic carcinoma cell line SW1990 was cultured by DMEM and treated with 0.82 mg/ml gemcitabine for 24, 48 and 72 h. Then apoptosis rate was measured by flow cytometry, ABCG2 expression was examined by Western blot and ABCG2 mRNA expression was detected by RT-PCR. The relationship between ABCG2 expression and chemoresistance to gemcitabine was analyzed. **Results** After treated with 0.82 mg/ml gemcitabine for 24, 48 and 72 h, the apoptosis rates were (21.1±0.61)%, (13.4±2.17)%, (6.4±1.34)%, respectively (comparison between different time points, $P<0.05$); moreover, compared with control group, ABCG2 mRNA expression were increased by (2.21±0.11), (3.30±0.08) and (4.72±0.12) times and the protein expression were increased by (2.17±0.14), (3.61±0.09) and (4.98±0.13) times respectively (comparison between groups, $P<0.05$). **Conclusion** Gemcitabine could inhibit cell proliferation of pancreatic carcinoma cell line SW1990, but the chemoresistance would be enhanced gradually with time, which may be related with increased ABCG2 expression.

Key words: Pancreatic cancer; Gemcitabine; ATP-binding cassette, subfamily G, member 2 (ABCG2); Chemoresistance

摘要: 目的 探讨吉西他滨诱导胰腺癌细胞SW1990中ABCG2的表达及其与化疗耐药的关系。**方法** 胰腺癌细胞SW1990用DMEM培养液常规培养, 用0.82 mg/ml吉西他滨作用SW1990细胞24、48和72 h后, 使用流式细胞仪测其细胞凋亡率, Western blot检测ABCG2蛋白的表达, RT-PCR检测ABCG2 mRNA的表达, 并且分析ABCG2表达水平与化疗耐药的关系。**结果** 0.82 mg/ml吉西他滨作用SW1990细胞24、48和72 h后, 细胞凋亡率分别为(21.1±0.61)%(13.4±2.17)%(6.4±1.34)%, 不同时间点两两相比 $P<0.05$ 。0.82 mg/ml吉西他滨作用SW1990细胞24、48、72 h后与对照组相比, ABCG2 mRNA分别上升了(2.21±0.11)倍、(3.30±0.08)倍和(4.72±0.12)倍, 蛋白上升了(2.17±0.14)倍、(3.61±0.09)倍和(4.98±0.13)倍, 且组间比较 $P<0.05$, 有统计学意义。**结论** 吉西他滨能抑制胰腺癌细胞SW1990的增殖, 但随着时间延长, 药物抵抗逐渐增强, 这可能与吉西他滨作用细胞后上调ABCG2的表达有关。

关键词: 胰腺癌; 吉西他滨; 乳腺癌耐药蛋白(ABCG2); 化疗耐药

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A

0 引言

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5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。有研究表明^[3], 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, 即所谓的金标准^[5]。但吉西他滨单药治疗胰腺癌的中位

收稿日期: 2014-01-10; 修回日期: 2014-02-12

作者单位: 1. 221002 江苏徐州, 徐州医学院附属医院普外科; 2. 徐州医学院研究生学院; 3. 徐州医学院附属医院中心实验室

通信作者: 刘斌, E-mail: liubin.xy@163.com

作者简介: 王飞通(1983-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事胰腺肿瘤的临床及基础研究

生存期仅为5.4~5.6月,一年生存率仅为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。国外已有大量文献报道ABCG2参与多种肿瘤细胞多药耐药机制^[6-8],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GEM诱导胰腺癌细胞中ABCG2的表达及其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SW1990由南京医科大学第一附属医院胰腺中心苗毅教授馈赠。

1.1.2 试剂 GEM(江苏正大天晴药业股份有限公司),蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(北京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(美国Epitomics公司),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(北京中杉金桥生物技术有限公司),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 试验方法

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高糖培养液,在37℃、浓度为5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,细胞每2~3d按1:3传代1次。

1.2.2 MTT法测定SW1990细胞对GEM的半数有效浓度(IC₅₀) (1)取70%~80%融合并处于对数生长期的细胞,调节细胞浓度为每孔 5×10^3 ,接种于含100 μ l上述培养液的96孔板中,在37℃、CO₂体积分数为5%,饱和湿度的培养箱中培养24 h。(2)细胞贴壁后,更换成含有不同浓度GEM的培养液100 μ l,浓度分别为8、2、0.5、0.125、0.03 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。(3)细胞在浓度梯度药物作用下分别培养24、48和72 h,每孔加入20 μ l的MTT试剂,继续培养4 h后,吸弃培养液,每孔加入200 μ l二甲亚砜溶液,室温25℃振荡8 min使结晶充分溶解。(4)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。(5)细胞增殖抑制率(%)=(1-试验孔OD值/对照孔OD值)×100%,根据IC₅₀计算软件分别得出24、48及72 h细胞对化疗药物的IC₅₀。

1.2.3 GEM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,并调整细胞浓度为每瓶 1×10^6 ,在37℃、CO₂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IC₅₀,更换成含有0.82 mg/ml GEM的培养液4.5 ml,继续培养24、48和72 h后作为实验组(分别为B组、C组及D组),以未加GEM的细胞作为对照组(A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,1 200 r/min离心5 min弃上清液后,加入PBS清洗再离心,重复3次,收集细胞每管 1×10^6 ,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 μ g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×宽×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℃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 μ g反转录合成cDNA,ABCG2上游引物:5'-AATACATCAGCGGATACTACAGAG-3',下游引物:5'-AGCCACCATCATAAGGGTAAACA T-3',扩增长度179 bp;内参照 β -actin上游引物:5'-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3',下游引物:5'-TGGAAGGTGGACAGCGAGG-3',扩增长度434 bp。PCR反应条件:95℃ 3 min,95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min(35个循环),72℃ 5 min。各取5 μ l 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 统计学方法

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 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEM对胰腺癌细胞株SW1990的增殖影响

MTT结果显示,在同一浓度时,随着作用时间的延长,GEM对细胞株的抑制逐渐减低,且两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$),在同一时间点时,随着药物浓度的增加,GEM对细胞株的抑制效应逐渐增强,且两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。24 h、48 h及72 h GEM对SW1990细胞的 IC_{50} 分别为 (0.82 ± 0.08) mg/ml、 (1.58 ± 0.16) mg/ml和 (2.36 ± 0.15) mg/ml,随着时间延长, IC_{50} 逐渐增加($P < 0.05$)。可以得出,GEM对胰腺癌细胞株SW1990有明显的时间和浓度依赖性,见表1。

表1 盐酸吉西他滨对胰腺癌SW1990细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)
Table1 Effect of gemcitabine on cell proliferation of pancreatic carcinoma cell line SW1990 ($\bar{x} \pm s$)

Groups (mg/ml)	Inhibition rates (%)		
	24 h	48 h	72 h
0.03	20.04±3.73	14.03±2.70	9.14±3.59
0.125	32.67±3.27	26.48±4.98	20.19±5.29
0.5	47.58±3.72	38.85±3.66	31.75±4.45
2	62.33±3.58	54.41±5.41	47.93±4.17
8	78.88±2.11	74.80±2.55	70.21±3.17

2.2 细胞凋亡的分析

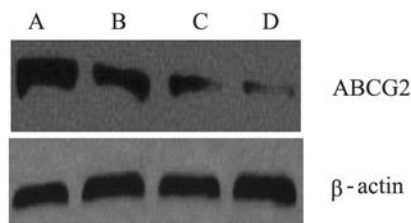
流式细胞仪分析显示,0.82 mg/ml GEM作用胰腺癌SW1990细胞株不同时间后,与对照组相比较,细胞晚期凋亡率逐渐减低,且两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1。

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。加药后24、48及72 h组与对照组比较,分别上升 (2.21 ± 0.11) 倍、 (3.30 ± 0.08) 倍和 (4.72 ± 0.12) 倍,且加药后24 h与48 h组、24 h与72 h组、48 h与72 h组两两比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。提示ABCG2蛋白的表达具有明显的时间依赖性,见图2。

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

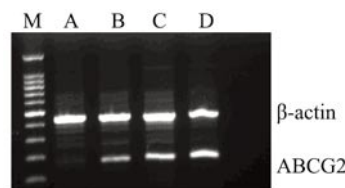


A: 72h; B: 48h; C: 24h; D: control group

图2 0.82mg/ml GEM作用不同时间点后胰腺癌SW1990细胞株中ABCG2蛋白的表达

Figure2 ABCG2 protein expression in pancreatic cancer cell line SW1990 treated with 0.82mg/ml GEM at different time points

基因ABCG2条带灰度比值。加药后24、48及72 h组与对照组比较,分别上升 (2.21 ± 0.11) 倍、 (3.30 ± 0.08) 倍和 (4.72 ± 0.12) 倍,且加药后24 h与48 h组、24 h与72 h组、48 h与72 h组,两两比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。提示ABCG2 mRNA的转录具有明显的时间依赖性,见图3。



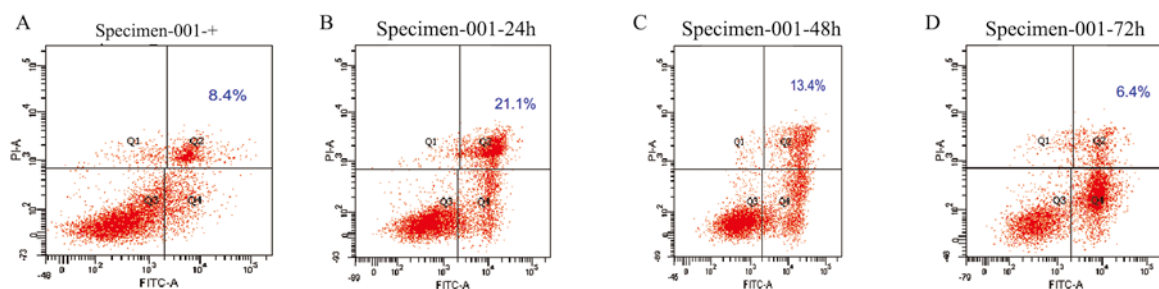
M: marker; A: control group; B: 24h; C: 48h; D: 72h

图3 0.82mg/ml GEM作用不同时间点后胰腺癌SW1990细胞株中ABCG2 mRNA的转录情况

Figure3 ABCG2 mRNA transcription in pancreatic cancer cell line SW1990 treated with 0.82mg/ml GEM at different time points

3 讨论

Doyle在研究维拉帕米筛选的乳腺癌耐阿霉素株(MCF-7/AdrVP)时发现一段cDNA转染MCF-7细胞后,细胞株对甲氨蝶呤、阿霉素和柔红霉素产生了耐药,并降低细胞内柔红霉素的蓄积、滞留,增加了罗丹明外排,故将其编码的跨膜转运蛋白称为乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein,



A: control group; B: 24h; C: 48h; D: 72h

图1 0.82mg/ml GEM作用胰腺癌SW1990细胞株不同时间点后细胞凋亡分析

Figure1 Apoptosis of pancreatic cancer cell line SW1990 treated with 0.82mg/ml GEM at different time points

BCRP/ABCG2)。ABCG2介导的多药耐药机制目前尚不完全明确,一般认为有以下两种:(1)加速化疗药物的外排,降低细胞内有效化疗药物浓度,尤其在耐药的肿瘤细胞中,ABCG2可高效运载多种化疗药物^[9];(2)影响肿瘤细胞中化疗活性药物的作用,主要表现在降低药物的活化或增强细胞内药物的解毒作用,例如甲氨蝶呤,在细胞内通过多聚谷酰胺化提高活性,作用于靶酶发挥疗效。ABCG2不仅能转运甲氨蝶呤原型,还能与在细胞内活化的多聚谷酰胺化形式的甲氨蝶呤高度亲和,与后者结合后泵出细胞,这种能结合转运药物活化成分的功能是其他耐药蛋白所不能具备的^[10]。

随着研究的进展,ABCG2的高表达常作为肿瘤不良预后的指标^[11-13]。Benderra等^[14]研究结果表明:在急性白血病组中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,从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。

本研究结果显示,GEM对胰腺癌细胞株有明显的时间和浓度依赖性。但24、48及72 h GEM对SW1990细胞的 IC_{50} 分别为 (0.82 ± 0.08) mg/ml、 (1.58 ± 0.16) mg/ml和 (2.36 ± 0.15) mg/ml,这表明随着时间的延长,SW1990细胞株对吉西他滨的化疗敏感度逐渐减低,在细胞株中有药物耐药的产生,流式细胞的结果也得出相似的结论。同时RT-PCR及Western blot结果显示,在使用0.82 mg/ml GEM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GEM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GEM的抵抗,使细胞获得化疗耐药,这与Summer等^[16]研究乳腺癌耐药的结果相似。

总之,GEM能诱导胰腺癌细胞内ABCG2表达升高,而其表达增加可能就是胰腺癌产生化疗耐药的机制之一,这对后续研究提高胰腺癌细胞对化疗药物的敏感度,抑制ABCG2的过表达有着重要意义。

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): 1224-30.
- [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):1200-10.
- [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): 2403-13.
- [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): 1084-103.
- [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): 413-8.
- [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): 1005-9.
- [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): 4425-30.
- [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): 371-8.
- [12] Yajima T, Ochiai H, Uchiyama T, *et al.* Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell line Ho-1-N-1[J]. Int J Oncol, 2009, 35(2): 273-80.
- [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 of cells[J]. Cell Biol Int, 2009, 33(8): 807-15.
- [14] Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, *et al.* Breast cancer resistance protein an P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(23): 7896-902.
- [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): 1750-62.
- [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.