

# 热疗增强盐酸吉西他滨对人胰腺癌细胞株 SW1990增殖抑制作用的实验研究

李小平<sup>1,2</sup> 郑磊贞<sup>1</sup> 王雅杰<sup>2</sup>

1. 上海交通大学附属新华医院肿瘤科, 上海 200092 ;  
2. 第二军医大学附属长海医院肿瘤科, 上海 200096

[关键词] 吉西他滨; 热疗; 细胞活性; 凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.11.013

中图分类号: R735.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)11-0871-03

胰腺癌是一种恶性程度高, 预后极差的肿瘤, 手术切除率低, 术后容易复发和转移, 并且对放、化疗不敏感。以吉西他滨为基础的化疗在胰腺癌治疗中占有重要的地位, 但其远期疗效较差, 如何提高化疗的疗效是目前困扰临床的一个难题。近年来, 高热作为一种新的治癌方法引起医学界的关注和重视, 尤其是热疗与化疗联合应用取得了意想不到的效果, 表明热疗可以提高某些化疗药物的敏感性<sup>[1-2]</sup>。本研究旨在探讨热疗对化疗药盐酸吉西他滨增敏的规律及机制, 从而为临床治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品与试剂

RPMI-1640培养液、胎牛血清购自美国Gibco公司, 二甲基亚砜(DMSO)和MTT购自美国Sigma公司, 盐酸吉西他滨(GEM)购自美国礼来公司, MDM2抗体、p53抗体、c-myc抗体、caspase-8抗体购自美国Santa Cruz公司,  $\beta$ -actin抗体购自美国Sigma公司。

### 1.2 主要设备

细胞培养箱购自美国Thermo公司, 96孔板购自美国Corning公司, 酶标仪购自美国Bio-Tek公司, 水浴箱、电泳及转膜仪购自上海天能科技有限公司, PVDF膜购自美国Millipore公司, 摇床购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 蛋白质印迹法(Western blot)成像仪购自美国Bio-Rad公司。

### 1.3 细胞培养与计数

胰腺癌细胞株SW1990购自中国科学院典型培养物保藏

委员会细胞库。培养条件: SW1990细胞使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液, 于37.5 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%、饱和湿度的培养箱中常规传代培养。

### 1.4 实验分组

实验分为单吉西他滨组(37 °C, 不同浓度吉西他滨)、热化疗联合组(43 °C加热1 h, 不同浓度吉西他滨)及对照组(37 °C, 0  $\mu$ mol/L吉西他滨)。

### 1.5 MTT法检测胰腺癌细胞株SW1990生长的变化

取对数生长期细胞, 常规胰酶消化后制成新鲜培养液混悬细胞, 进行细胞计数, 调整细胞至合适浓度。取90  $\mu$ L细胞混悬液接种于96孔板, 5  $\times$  10<sup>3</sup>个细胞/孔。待细胞贴壁后, 加入以含10%胎牛血清培养液配制的不同浓度吉西他滨溶液4 800、2 400、1 200、600和0  $\mu$ mol/L 10  $\mu$ L, 使各孔终浓度分别为480、240、120、60和0  $\mu$ mol/L。处理不同时间后(24、48 h), 加入10  $\mu$ L MTT, 继续培育4 h。加入150  $\mu$ L含10%SDS的溶解液, 过夜。次日在酶标仪562 nm波长处测定吸光度(A)值。细胞存活率=(A<sub>加药组平均值</sub>-A<sub>空白组平均值</sub>)/(A<sub>对照组平均值</sub>-A<sub>空白组平均值</sub>) $\times$ 100%。

### 1.6 Western blot法对热疗及吉西他滨处理后SW1990细胞内增殖相关基因的蛋白水平变化进行检测

取对数生长期细胞, 按实验所需数量分别接种于10 cm培养皿中, 待细胞贴壁后, 单热疗组于43 °C培养箱中培养1 h后放入37 °C培养箱中继续培养; 单吉西他滨组加入吉西他滨溶液, 使终浓度为60  $\mu$ mol/L; 热化疗联合组于43 °C培养箱中培养1 h后加入吉西他滨溶液, 使终浓度为60  $\mu$ mol/L, 放入37 °C培养箱中继续培养; 处理48 h后收集细胞。去除上层培养液, 加入适量RIPA裂解液, 进行蛋白浓度测定。Western blot具体检测步骤参照参考文献

献[3], 蛋白表达量用目标蛋白与内参 $\beta$ -actin光密度值的比值表示。

### 1.7 统计学处理

实验重复3次, 资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据分析采用SPSS 18.0统计学软件, 其中两组间的比较用 $t$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MTT结果

浓度分别为480、240、120、60和0  $\mu\text{mol/L}$ 的单吉西他滨组和热化疗联合组作用SW1990细胞48 h后, 细胞的生长存活率见图1。热化疗联合组和单吉西他滨组, 存活率明显低于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 即热疗联合吉西他滨可以增强吉西他滨对SW1990细胞的抑制作用。

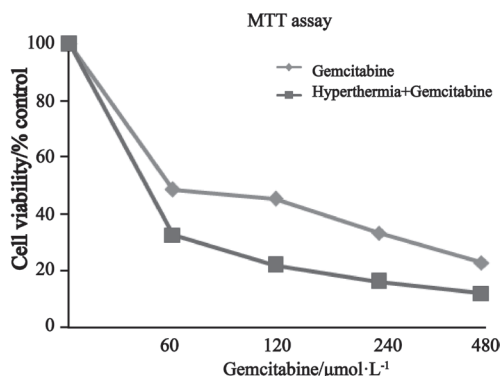


图1 吉西他滨处理48 h MTT结果

Fig.1 The MTT results of hyperthermia and gemcitabine

### 2.2 Western blot检测结果

Western blot有4个样品, 从左到右依次为: 对照组、单热疗组、单吉西他滨组和热化疗联合组, 都是处理48 h的样品。p53、MDM2、c-myc、caspase-8蛋白的表达情况如图2所示。单热疗组对SW1990细胞的p53、MDM2蛋白表达无明显改变, 单吉西他滨组p53和MDM2蛋白表达增加, 而c-myc和caspase-8蛋白表达有减少。而热化疗联合组p53和MDM2蛋白表达明显增加, c-myc和caspase-8蛋白表达减少则更为明显。说明热化疗对胰腺癌SW1990细胞c-myc和caspase-8蛋白表达的抑制具有明显增强的协同效果, 同时明显提高p53和MDM2蛋白的表达。

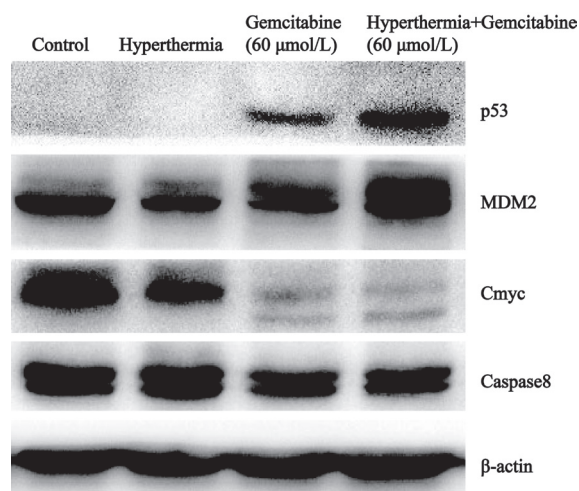


图2 Western blot法检测蛋白表达情况

Fig.2 Detection of protein expression by Western blot

## 3 讨论

吉西他滨为细胞周期特异性药物, 主要作用于DNA合成期。GEM在细胞内转化成GEM磷酸盐, 后者可使DNA链合成停止, 进而DNA断裂、细胞凋亡, 从而发挥抗癌作用[4]。加热可增加细胞膜的通透性, 有利于化疗药物的渗透吸收。加热抑制肿瘤细胞对化疗药物损伤的修复。热疗还可以促进化疗药物诱发的细胞凋亡[5]。

野生型p53(*wtp53*)做为抑癌基因参与了多种生物过程的基因调控, 如细胞衰老、细胞周期停滞等, 同时也可诱导细胞凋亡, 特别是对DNA损伤所诱发的细胞凋亡是必不可少的[6-7]。p53可直接激活Bax或Bak, 或者同Bcl-2或Bcl-XL结合, 使线粒体外膜通透性增加, 或者直接激活蛋白水解酶, 从而诱发凋亡[8]。MDM2是一种进化上保守的癌基因, MDM2的扩增与肿瘤生长、转移有密切关系。它是主要的p53负调控因子, 有研究显示, p53诱导MDM2基因转录, MDM2蛋白和p53结合促其失活及降解。MDM2与p53形成一个精细的负反馈调节环[9-10]。

通常热化疗是加热和化疗同时进行的。2009年Adachi等[11]发现热疗后再给药吉西他滨效果最好。本研究热化疗联合组的给药方式参照了该文献。研究表明, 热疗与化疗同时作用的结合方式能够提高吉西他滨的细胞毒作用。既往的实验研究主要考虑可能与热疗增加细胞膜通透性有关。我们进一步对热化疗诱发细胞凋亡的基因蛋白进行了研究, 发现热化疗联合组p53和MDM2蛋

白表达明显增加, c-myc和caspase-8蛋白表达减少则更为明显。因此, 初步证实热疗联合吉西他滨能显著抑制SW1990细胞的增殖, 其机制可能与上调P53和MDM2蛋白表达有关。

以上研究结果为热疗联合吉西他滨用于胰腺癌临床治疗提供了初步的理论依据, 但需要进一步扩大细胞株样本和分子生物学研究, 要用于临床实验, 还需先从动物实验中验证。

#### [参 考 文 献]

- [1] BLACKHAM A U, SWETT K, ENG C, et al. Perioperative systemic chemotherapy for appendiceal mucinous carcinoma peritonei treated with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy [J]. *J Surg Oncol*, 2014, 109(7): 740-745.
- [2] LIANG Z, LI X, XIE Y, et al. 'Smart' gold nanoshells for combined cancer chemotherapy and hyperthermia [J]. *Biomed Mater*, 2014, 9(2): 025012.
- [3] ZHANG J J, ZHU Y, XIE K L, et al. Yin Yang-1 suppresses invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma by downregulating MMP10 in a MUC4/ErbB2/p38/MEF2C-dependent mechanism [J]. *Molecular Cancer*, 2014, 13(1): 130.
- [4] TSCHOEP-LECHNER K E, MILANI V, BERGER F, et al. Gemcitabine and cisplatin combined with regional hyperthermia as second-line treatment in patients with gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer [J]. *Int J Hyperthermia*, 2013, 29(1): 8-16.
- [5] HIROAKI N, KENJI M, NORIYUKI Y, et al. Thermochemoradiotherapy using superselective intra-arterial infusion for N3 cervical lymph node metastases of tongue cancer [J]. *J Cancer Res Ther*, 2013, 9(4): 718-720.
- [6] DONG Y, CAO A, SHI J, et al. Tangeretin, a citrus polymethoxyflavonoid, induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1788-1794.
- [7] XIA G, XIN N, LIU W, et al. Inhibitory effect of Lycium barbarum polysaccharides on cell apoptosis and senescence is potentially mediated by the p53 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1237-1241.
- [8] HOE K K, VERMA C S, LANE D P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(3): 217-236.
- [9] ZHUANG C, MIAO Z, WU Y, et al. Double-Edged Swords as Cancer Therapeutics: Novel, Orally Active, Small Molecules Simultaneously Inhibit p53-MDM2 Interaction and the NF- $\kappa$ B Pathway [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(3): 567-577.
- [10] BARONE G, TWEDDLE D A, SHOHET J M, et al. MDM2-p53 interaction in paediatric solid tumours: preclinical rationale, biomarkers and resistance [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(1): 114-123.
- [11] ADACHI S, KOKURA S, OKAYAMA T, et al. Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines [J]. *Int J Hyperthermia*, 2009, 25(3): 210-219.

(收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-07-14)