

姜黄素对胰腺癌 SW1990 细胞耐吉西他滨的逆转作用及机制研究[△]

彭梦媛*, 邱峰#, 黄丹, 秦霞, 张渊(重庆医科大学附属第一医院药学部, 重庆 400016)

中图分类号 R361⁺.3;R730.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)09-1192-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.09

摘要 目的:研究姜黄素对胰腺癌 SW1990 细胞耐吉西他滨(GEM)的逆转作用及机制。方法:采用 CCK8 法检测不同浓度(50、100、150、200、250 $\mu\text{mol/L}$)GEM 对 SW1990 细胞和耐 GEM SW1990 细胞(SW1990/GEM 耐药细胞)存活率的影响,计算半数抑制浓度(IC_{50})和耐药倍数;采用 CCK8 法检测不同浓度(1、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)姜黄素对 SW1990/GEM 耐药细胞存活率的影响,计算 IC_{50} ;采用 CCK8 法检测 2.41 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素与不同浓度(25、50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$)GEM 联用对 SW1990 细胞和 SW1990/GEM 耐药细胞存活率的影响,计算 GEM 的 IC_{50} 和耐药逆转倍数。采用流式细胞仪检测以 GEM 的 IC_{50} 为给药浓度, GEM 单用、姜黄素(2.41 $\mu\text{mol/L}$)与 GEM 联用处理 SW1990 细胞和 SW1990/GEM 耐药细胞后的细胞凋亡率和细胞周期分布,并采用 Western blot 法检测细胞中脂肪酸合成酶(FAS)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)、磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、胱天蛋白酶 3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)及其相关 X 蛋白(Bax)的蛋白表达,反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 mRNA 表达。结果:GEM 对 SW1990 细胞的 IC_{50} 为 92 $\mu\text{mol/L}$, 对 SW1990/GEM 耐药细胞的 IC_{50} 为 216 $\mu\text{mol/L}$, SW1990 细胞对 GEM 的耐药倍数为 2.35;姜黄素对 SW1990/GEM 耐药细胞的 IC_{50} 为 9.2 $\mu\text{mol/L}$;2.41 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素下, GEM 对 SW1990 细胞的 IC_{50} 为 75 $\mu\text{mol/L}$, 对 SW1990/GEM 耐药细胞的 IC_{50} 为 98 $\mu\text{mol/L}$, SW1990/GEM 耐药细胞对 GEM 的耐药逆转倍数为 2.2。与 GEM 单用比较,姜黄素与 GEM 联用时 SW1990 细胞和 SW1990/GEM 耐药细胞的凋亡率均明显升高($P < 0.05$),主要阻滞在 G_0/G_1 期,细胞中 FAS、p-AKT、p-PI3K、Bcl-2 蛋白表达水平和 FAS、Bcl-2 mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.05$), Bax、Caspase-3 蛋白表达水平和 mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.05$)。结论:姜黄素可逆转 SW1990 细胞对 GEM 的耐药性,其机制可能与 PI3K/AKT 通路有关。

关键词 姜黄素;吉西他滨;胰腺癌 SW1990 细胞;耐药;凋亡;机制

Reversal Effects of Curcumin on Gemcitabine-resistant Pancreatic Cancer SW1990 Cells and Its Mechanism Study

PENG Mengyuan, QIU Feng, HUANG Dan, QIN Xia, ZHANG Yuan (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of curcumin on gemcitabine (GEM)-resistant pancreatic cancer SW1990 cells and its mechanism. METHODS: CCK8 assay was used to detect the effects of different concentrations of GEM (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol/L}$) on the survival rate of SW1990 cells and GEM-resistant SW1990 cells (SW1991/GEM resistant cells); half inhibitory concentration (IC_{50}) and drug resistance multiple were calculated. CCK8 assay was performed to detect the effects of different concentrations of curcumin (1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) on survival rate of SW1990/GEM resistant cells, and IC_{50} was calculated. CCK8 assay was used to detect the effects of curcumin 2.41 $\mu\text{mol/L}$ combined with different concentrations of GEM (25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{mol/L}$) on the survival rate of SW1990 cells and SW1990/GEM resistant cells, and IC_{50} and drug resistance reversal fold of GEM were calculated. Flow cytometry was carried out to detect the cell cycle distribution and apoptosis rate of SW1990 after treated with GEM alone or curcumin (2.41 $\mu\text{mol/L}$) combined with GEM using IC_{50} of GEM as drug concentration. Western blot assay was used to the protein expression of FAS, AKT, p-AKT, PI3K, p-PI3K, Caspase-3, Bcl-2 and related X protein (Bax). RT-PCR was used to detect mRNA expression. RESULTS: IC_{50} of GEM to SW1990 cells was 92 $\mu\text{mol/L}$. IC_{50} of GEM to SW1990/GEM resistant cells was 216 $\mu\text{mol/L}$, and drug resistance multiple SW1990 cells to GEM was 2.35. IC_{50} of curcumin to SW1990/GEM resistant cells was 9.2 $\mu\text{mol/L}$. Under 2.41 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, IC_{50} of GEM to SW1990 cells was 75 $\mu\text{mol/L}$, and IC_{50} of GEM to SW1990/GEM resistant cells was 98 $\mu\text{mol/L}$; drug resistance reversal multiple of SW1990/GEM resistant cells to GEM was 2.2. Compared with GEM alone, the apoptosis rate of SW1990 cells and SW1990/GEM resistant cells were increased significantly after curcumin combined with GEM ($P < 0.05$), blocking at G_0/G_1 phase; the protein expression of FAS, p-AKT, p-PI3K and Bcl-2 and mRNA expression of FAS and Bcl-2 were decreased significantly ($P < 0.05$); the protein and mRNA expression of Bax and Caspase-3 were increased significantly ($P < 0.05$).

[△] 基金项目:重庆市社会民生科技创新专项(No.cstc2015shmszx120023)

* 硕士研究生。研究方向:药理学,临床药理学。电话:023-89012410。E-mail:271443906@qq.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:临床药理学、临床药理学、医院药事管理学。电话:023-89012410。E-mail:qiufeng.cn@gmail.com

CONCLUSIONS: Curcumin can reverse drug resistance of SW1990 cells to GEM, the mechanism of which may be associated with PI3K/AKT pathway.

KEYWORDS Curcumin; Gemcitabine; Pancreatic cancer SW1990 cell; Drug resistance; Apoptosis; Mechanism

胰腺癌是常见的恶性肿瘤之一,而吉西他滨(Gemcitabine, GEM)是目前临床上常用的针对胰腺癌的化疗药物^[1-2]。胰腺癌细胞对GEM耐药可能是耐药相关蛋白导致药物摄取减少或药物外排增加,或改变了细胞凋亡途径的活性,而影响细胞凋亡途径的主要机制是非典型耐药相关蛋白导致的DNA损伤修复机制增强及磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、磷酸化的蛋白激酶B(p-AKT)等信号调控转导通路的活性改变等^[3]。研究证实,异常的脂肪代谢与恶性肿瘤的发生发展有着密切的联系^[4-6],包括胰腺癌在内的恶性肿瘤细胞生长代谢所需要的腺苷三磷酸(ATP)也来源于脂肪酸的代谢。脂肪酸合成酶(Fatty acid synthase, FAS)是脂类物质合成过程中的限速酶,是脂质合成中的关键酶^[7],大量研究表明,FAS与多种肿瘤的发生发展密切相关,是代谢性致癌基因^[8-9]。有研究表明,胰腺癌细胞中FAS表达异常或细胞中脂质代谢异常均与胰腺癌细胞对化疗药物产生耐药性有关^[10-11]。姜黄素作为一种天然存在的FAS抑制剂,能抑制多种癌细胞的增殖并促进其凋亡,在肿瘤的发生发展中起着重要作用^[12-13],但关于其是否也对胰腺癌耐药细胞具有逆转作用及其是否也是通过FAS发挥耐药逆转作用及作用机制的相关研究较少,本文就此进行了研究。

有研究表明,应用PI3K抑制剂LY294002与GEM共处理GEM耐药的胰腺癌细胞,细胞明显表现出凋亡,同时还发现GEM诱导凋亡的增加与p-AKT减少密切相关^[14]。因此笔者推测,姜黄素可能通过影响PI3K/AKT通路及其下游相关因子逆转胰腺癌细胞对GEM的耐药性。综上,在本研究中,笔者采用人胰腺癌细胞株SW1990和耐GEM SW1990细胞株(SW1990/GEM耐药细胞),以流式细胞术观察细胞凋亡情况及细胞周期的分布,初步分析姜黄素对SW1990细胞耐GEM的逆转作用机制。

1 材料

1.1 仪器

HH-CP-01W CO₂细胞培养箱(上海兰仪实业有限公司); Bio-Plex200 流式细胞仪(美国Bio-Rad公司); DA7600实时定量核酸扩增荧光(qPCR)检测系统(美国Bio-Rad公司); SpectraMax iD3多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

姜黄素原料药(美国Sigma公司,批号:SLBN7214V,纯度:≥97%);注射用盐酸吉西他滨(江苏豪森药业股份有限公司,批号:160802,规格:1.0 g);胎牛血清(上海联硕生物科技有限公司,批号:11061-1125);RPMI1640

培养基(美国Corning公司,批号:05118006);CCK8试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)辣根过氧化物酶显色试剂盒和Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0037、P0202、C1062M);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒和Trizol试剂盒(上海生物工程股份有限公司,批号:C503021-0500、B511311-0100);反转录(RT)试剂盒和qPCR试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号:AE101、AQ101-01);鼠抗人PI3K、AKT、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)及其相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国Santa Cruz公司,货号:sc-7480、sc-7272、sc-7382、sc-7412、sc-7469、sc-47724);鼠抗人FAS单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:ZA-0005)。

1.3 细胞株

人胰腺癌细胞SW1990购自中科院细胞库。

2 方法与结果

2.1 姜黄素溶液的制备

姜黄素临床用时以少量二甲基亚砷(DMSO)溶解姜黄素对照品,再加培养液稀释至所需浓度(DMSO终体积分数<0.01%)。

2.2 细胞培养

将SW1990细胞用含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI1640培养基在37℃的CO₂细胞培养箱中培养,24 h换液,待细胞融合度达到80%~90%时,用0.25 g/L的胰酶消化液对细胞进行传代培养,利用GEM浓度梯度递增法建立人胰腺癌SW1990/GEM耐药细胞,以3 μmol/L的GEM维持细胞耐药性。SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞均采用RPMI1640培养基培养。

2.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.4 GEM对SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞的增殖抑制作用

消化SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞,制备单细胞悬液,接种于96孔板,每孔 3×10^3 个;置于37℃的CO₂培养箱继续培养24 h,取出培养板,弃培养液加入不同浓度(50、100、150、200、250 μmol/L)的GEM溶液(溶剂为生理盐水),每个浓度3个复孔,同时设不加药物的空白组。每孔终体积为200 μL;再置于培养箱培养48 h,弃培养液,每孔加入含CCK8试剂10 μL的培养液200 μL,染色2 h,使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔

的吸光度(A),计算SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞的存活率,以GEM的不同浓度与细胞的存活率作图,确定细胞的半数抑制浓度(IC_{50}),再计算SW1990细胞对GEM的耐药倍数。存活率= $A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$,耐药倍数= $IC_{50}(\text{SW1990/GEM耐药细胞})/IC_{50}(\text{SW1990细胞})$ 。结果显示,GEM对SW1990细胞的 IC_{50} (92 $\mu\text{mol/L}$)显著低于对SW1990/GEM耐药细胞的 IC_{50} (216 $\mu\text{mol/L}$),差异有统计学意义($P < 0.05$),表明GEM对SW1990细胞的增殖抑制作用显著强于对SW1990/GEM耐药细胞的增殖抑制作用,SW1990细胞对GEM的耐药倍数为2.35。不同浓度GEM对SW1990细胞与SW1990/GEM耐药细胞存活率的影响见图1。

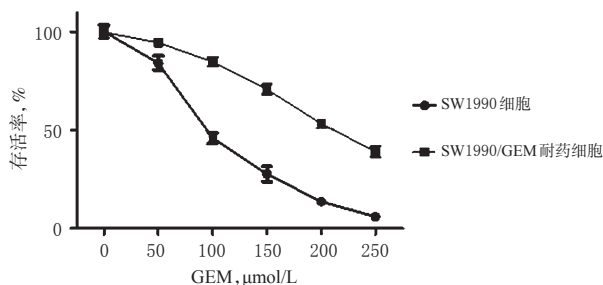


图1 不同浓度GEM对SW1990细胞与SW1990/GEM耐药细胞存活率的影响

Fig 1 Effects of different concentrations of GEM on the survival rate of SW1990 cells and SW1990/GEM cells

2.5 姜黄素对SW1990/GEM耐药细胞的增殖抑制作用

消化SW1990/GEM耐药细胞,制备单细胞悬液,接种于96孔板,每孔 3×10^3 个;置于37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱继续培养24 h,取出培养板,弃培养液加入不同浓度的姜黄素(1、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),每个浓度3个复孔,同时设不加药物的空白组。按“2.4”项下方法培养48 h,加入CCK8试剂染色后,检测450 nm波长处的 A ,计算存活率,并以药物的不同浓度与细胞的存活率作图,确定细胞的 IC_{50} 。结果显示,姜黄素对SW1990/GEM耐药细胞有增殖抑制作用,且呈浓度依赖性, IC_{50} 为9.2 $\mu\text{mol/L}$ 。为了避免细胞增殖抑制作用是由姜黄素引起的,后期选择无显著细胞毒性(细胞抑制率小于15%)的姜黄素浓度2.41 $\mu\text{mol/L}$ 作为联用时的试验浓度。不同浓度姜黄素对SW1990/GEM耐药细胞存活率的影响见图2。

2.6 姜黄素联用GEM对SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞的增殖抑制作用

取SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞,分别用2.41 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素联合不同浓度的GEM(25、50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$)进行处理,培养48 h,加入CCK8试剂染色后,检测450 nm波长处的 A ,计算存活率,确定联用2.41 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素条件下GEM的 IC_{50} ,再计算联用2.41 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素条件下SW1990/GEM耐药细胞对GEM的耐药逆转倍数,耐药逆转倍数= $IC_{50}(\text{SW1990/}$

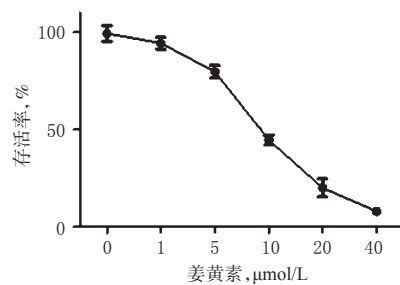


图2 不同浓度姜黄素对SW1990/GEM细胞存活率的影响

Fig 2 Effects of different concentrations of curcumin on the survival rate of SW1990/GEM cells

GEM耐药细胞+GEM)/ $IC_{50}(\text{SW1990/GEM耐药细胞+姜黄素+GEM})$ 。结果显示,姜黄素与GEM联合处理细胞后,GEM对SW1990细胞的 IC_{50} 为75 $\mu\text{mol/L}$,低于GEM单用时的 IC_{50} (92 $\mu\text{mol/L}$);对SW1990/GEM耐药细胞的 IC_{50} 为98 $\mu\text{mol/L}$,明显低于GEM单用时的 IC_{50} (216 $\mu\text{mol/L}$)($P < 0.05$),联用2.41 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素条件下SW1990/GEM耐药细胞对GEM的耐药逆转倍数为2.2。姜黄素联用不同浓度GEM对SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞存活率的影响见图3。

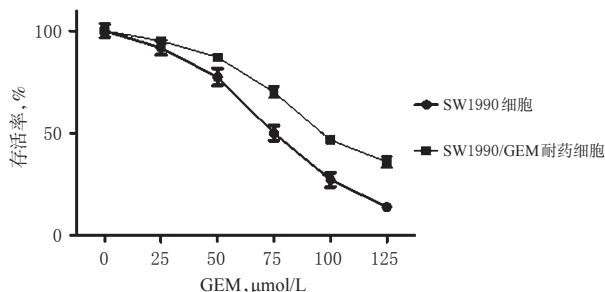


图3 姜黄素联用不同浓度GEM对SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞存活率的影响

Fig 3 Effects of curcumin combined with different concentrations of GEM on survival rate of SW1990 cells and SW1990/GEM cells

2.7 姜黄素联用GEM对SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞周期和凋亡的影响

取SW1990细胞分为SW1990+GEM组(SW1990细胞+92 $\mu\text{mol/L}$ GEM)、SW1990联用组(SW1990细胞+75 $\mu\text{mol/L}$ GEM+2.41 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理);取SW1990/GEM耐药细胞分为SW1990/GEM+GEM组(SW1990/GEM耐药细胞+216 $\mu\text{mol/L}$ GEM)、SW1990/GEM联用组(SW1990/GEM耐药细胞+98 $\mu\text{mol/L}$ GEM+2.41 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素),加入相应药物培养48 h后,经胰酶消化,PBS冲洗3次,离心取沉淀,每组加入 $1 \times$ Annexin V结合缓冲液100 μL ,充分混匀细胞后,加入5 μL Annexin V-FITC染液和5 μL 碘化丙啶(PI)染液,室温避光孵育15 min,然后每管加300 μL $1 \times$ Annexin V结合缓冲液,孵育1 h后,使用流式细胞仪分别检测各组细胞的凋亡率和周期

分布。结果显示,与对应的GEM组比较,联用组SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞的凋亡率均明显升高($P<0.05$),主要阻滞在G₀/G₁期。4组细胞凋亡的散点图见图4,凋亡率的测定结果图5,周期分布的流式图见图6,周期分布的测定结果见图7。

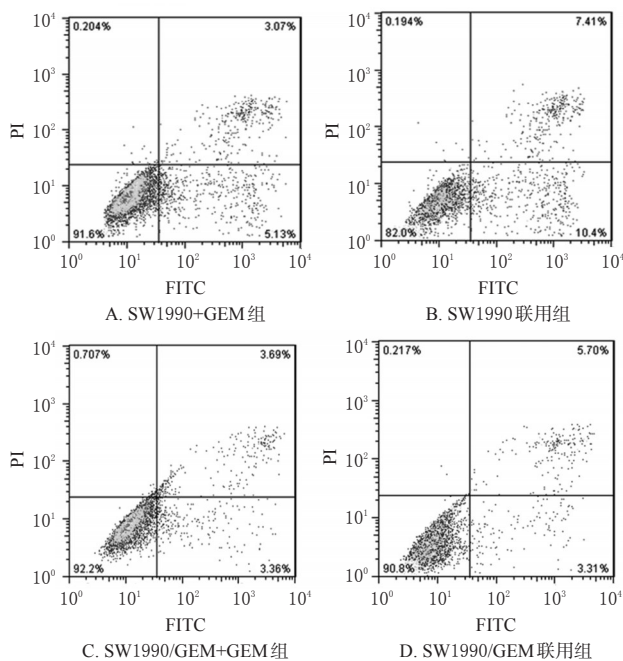


图4 4组细胞凋亡的散点图

Fig 4 Scatter diagram of cell apoptosis in 4 groups

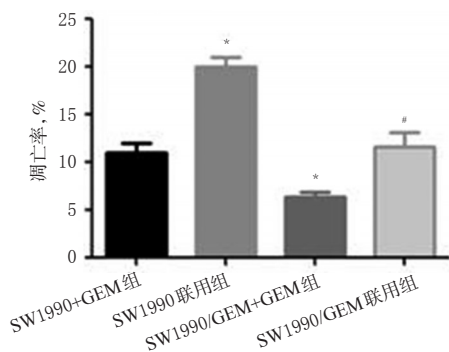


图5 4组细胞凋亡率的测定结果

Fig 5 Results of cell apoptosis rate in 4 groups

2.8 细胞中FAS、PI3K、AKT、Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的检测

细胞分组与给药同“2.7”项下,培养48 h后,消化收集细胞,加入细胞裂解液,于4℃,12 000 r/min离心10 min,提取细胞总蛋白,取25 μg蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后,100 V恒压电泳2 h,分离蛋白,然后进行转膜,室温下用5%的脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h,加入鼠抗人FAS(1:500)、PI3K(1:500)、AKT(1:500)、Bcl-2(1:500)、Bax(1:500)、Caspase-3(1:500)单克隆抗体,4℃孵育过夜,TBST缓冲液洗膜3次,并选择相应的二抗(1:2 000)室温孵育2 h,再用TBST缓冲液洗膜3次,使用增强化学发光

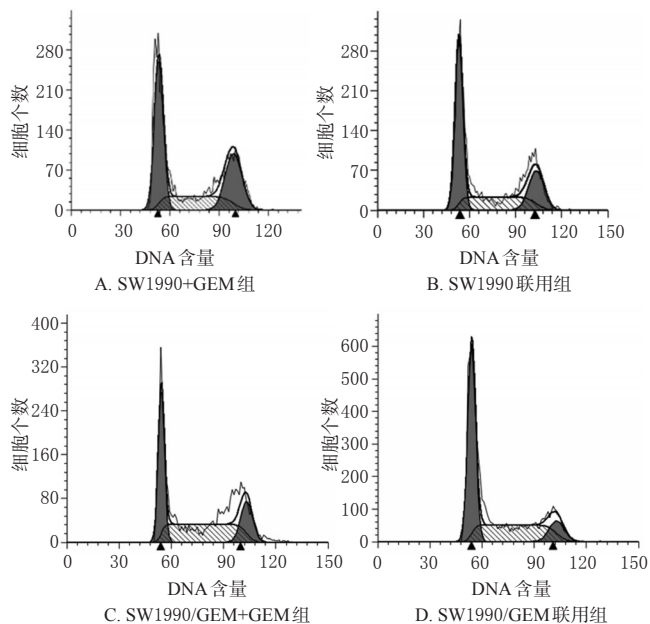
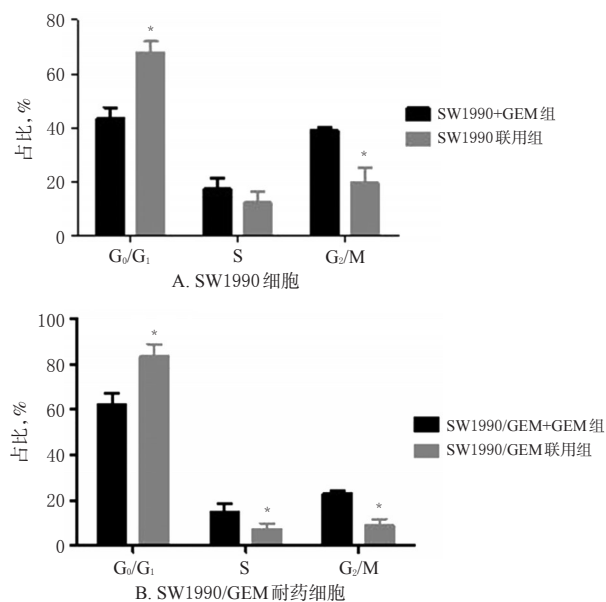


图6 4组细胞周期分布的流式图

Fig 6 Flow cytometry of cell cycle distribution in 4 groups



注:与GEM组比较,* $P<0.05$

Note: vs. GEM group, * $P<0.05$

图7 4组细胞周期分布的测定结果

Fig 7 Determination results of cell cycle distribution in 4 group

(ECL)液显示免疫印迹条带,试验重复3次。以目标条带与内参GAPDH的比值评价蛋白表达水平。结果显示,与对应的GEM组比较,联用组SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞中FAS、p-AKT、p-PI3K、Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),Bax、Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.05$)。4组细胞中FAS、AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的电泳图

见图8,测定结果见图9。

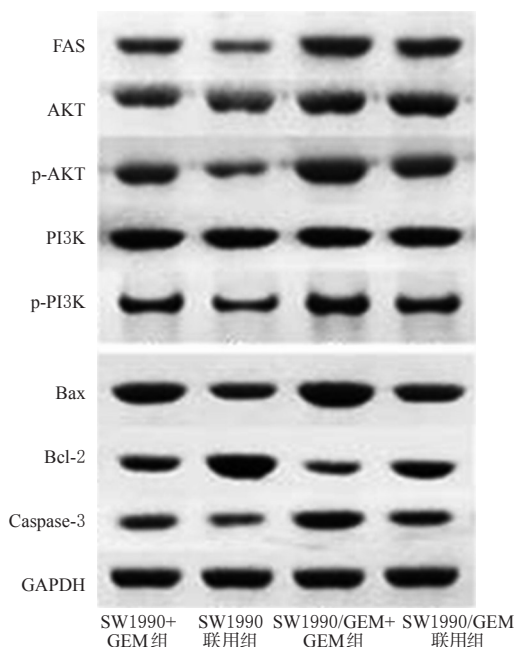
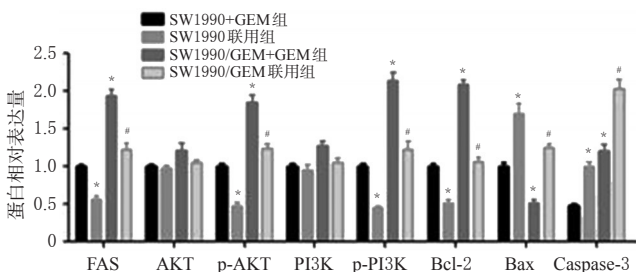


图8 4组细胞中FAS、AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的电泳图

Fig 8 Electrophorogram of protein expression of FAS, AKT, p-AKT, PI3K, p-PI3K, Bcl-2, Bax and Caspase-3 in 4 groups



注:与SW1990+GEM组比较,* $P<0.05$;与SW1990/GEM+GEM组比较,# $P<0.05$

Note: vs. SW1990 + GEM group, * $P<0.05$; vs. SW1990/GEM + GEM group, # $P<0.05$

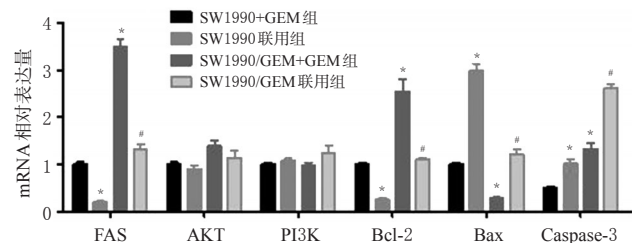
图9 4组细胞中FAS、AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的测定结果

Fig 9 Protein expression of FAS, AKT, p-AKT, PI3K, p-PI3K, Bcl-2, Bax and Caspase-3 in 4 groups

2.9 RT-PCR法检测FAS、PI3K、AKT、Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA表达

细胞分组与给药同“2.7”项下,培养48 h后,经胰酶消化,收集细胞,用Trizol裂解细胞后试剂盒提取细胞总RNA,利用反转录试剂盒合成cDNA,利用PCR扩增后测RNA表达水平。其中反转录的引物由上海生工生物技术有限公司合成,其中FAS的引物:上游5'-CTCCAAGGGATTGGAATTGA-3',下游5'-TTGGT-

GTTGCTGGTGAGTGT-3',片段长度296 bp;AKT的引物:上游5'-CTCATTCCAGACCCACGAC-3',下游5'-ACAGCCCGAAGTCCGTTA-3',片段长度242 bp;PI3K的引物:上游5'-GCCCAGGCTTACTACAGAC-3',下游5'-AAGTAGGGAGGCATCTCG-3',片段长度236 bp;Bcl-2的引物:上游5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3',下游:5'-TGCATATTTGTTTGGGGCAGG-3',片段长度304 bp;Bax的引物:上游5'-TCCACCAAGAA-GCTGAGCGAG-3',下游5'-GTCCAGCCCATGATG-GTTCT-3',片段长度257 bp;Caspase-3的引物:上游5'-TGGAATTGATGCGTGATGTT-3',下游5'-GTCG-GCATACTGTTTCAGCA-3',片段长度834 bp;内参 β -actin的引物:5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3',下游5'-GGGGTGTGAAGGTTCTCAA-3',片段长度268 bp。试验重复3次。结果显示,与对应的GEM组比较,联用组SW1990细胞和SW1990/GEM耐药细胞细胞中FAS、Bcl-2 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$),Bax、Caspase-3 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$)。4组细胞中FAS、AKT、PI3K、Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA表达的测定结果见图10。



注:与SW1990+GEM组比较,* $P<0.05$;与SW1990/GEM+GEM组比较,# $P<0.05$

Note: vs. SW1990 + GEM group, * $P<0.05$; vs. SW1990/GEM + GEM group, # $P<0.05$

图10 4组细胞中FAS、AKT、PI3K、Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA表达的测定结果

Fig 10 mRNA expression of FAS, AKT, PI3K, Bcl-2, Bax and Caspase-3 in 4 groups

3 讨论

GEM是临床治疗胰腺癌的一线药物,但在化疗过程中,由于耐药性的产生,严重影响了化疗的效果。有研究表明,逆转耐药性可显著提升临床的治疗效果^[16]。另一方面,肿瘤细胞为了满足自身增殖、生长的需要,需要不断从临近组织中获取能量,必然要通过异常的脂质代谢来实现,而FAS是脂质代谢过程中的关键酶。在本试验中,通过前期预试验检测到胰腺癌组织及癌旁组织中FAS的表达量,结果显示FAS在癌组织中高表达,表明FAS的过表达可能与胰腺癌的发生发展有关。姜黄素是一种天然存在的FAS抑制剂,能通过抑制FAS的表达而抑制癌细胞增殖并促进癌细胞凋亡。本研究发现,姜黄素对SW1990/GEM耐药细胞的生长有抑制作用;在

姜黄素浓度为 2.41 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 SW1990/GEM 耐药细胞无明显抑制作用,但与 GEM 联用后,其抑制率又显著升高。接着采用流式细胞术检测表明,姜黄素使更多 SW1990 细胞与 SW1990/GEM 耐药细胞处在 G_0/G_1 期进而促进细胞的凋亡。通过以上结果,笔者发现姜黄素能增敏 GEM 化疗胰腺癌 SW1990/GEM 耐药细胞株的效果,两种药物联合使用可以更有效地抑制肿瘤细胞生长,诱导其凋亡。

PI3K/AKT 信号通路在肿瘤细胞增殖、存活、侵袭转移和耐药性等方面产生非常关键的效应,而通路中某些成分变化可导致其功能发生改变^[17]。Bax、Bcl-2 共属于 Bcl-2 基因家族,Bcl-2 是细胞凋亡抑制基因,通常情况下 Bcl-2 和 Bax 两种蛋白表达相对稳定,而当 Bax 处于高表达状态,Bax-Bax 同源二聚体数量明显增多,细胞对死亡信号的反应性增强,从而诱导凋亡开始^[18]。有文献报道姜黄素可以影响 PI3K/AKT 通路的活化,下调凋亡抑制蛋白,从而促进细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖^[19]。由此推测,姜黄素有可能通过改变 PI3K/AKT 信号通路的传导而逆转 SW1990/GEM 耐药细胞的耐药。通过 Western blot 法检测该通路及其下游凋亡相关蛋白,研究结果显示,在联用组中,PI3K、p-AKT、Bcl-2 蛋白的表达水平下降,Bax 与凋亡关键蛋白 Caspase-3 表达水平均升高。该结果提示,姜黄素联用 GEM 能影响 PI3K/AKT 信号途径及其下游因子,其逆转 SW1990/GEM 耐药细胞耐药,可能是通过下调 PI3K 蛋白表达,减少 AKT 磷酸化水平,降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平,同时激发 Bax-Bax 同源二聚体对死亡信号的响应,活化 Caspase-3,最终诱导细胞凋亡而实现的。同时有研究表明,棕榈酸能对脂肪酸合酶抑制剂造成的细胞能量不足进行补救^[20],从反面表明姜黄素作为 FAS 抑制剂可通过引起胰腺癌细胞能量不足,影响细胞存活及正常凋亡,增加了 SW1990 细胞对 GEM 的敏感性。总之,姜黄素可能通过影响 PI3K/AKT 通路逆转 SW1990 细胞对 GEM 的耐药性。这些结果可为临床治疗胰腺癌中患者出现化疗耐药性时提供新的解决思路。

参考文献

[1] KAMISAWA T, WOOD LD, ITOI T, et al. Pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10039): 73-85.
 [2] 樊慧锦. 两种天然来源的脂肪酸合酶抑制剂对肿瘤细胞作用机制的研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2012.
 [3] AMRUTKAR M, GLADHAUG IP. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine[J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(11): E157-E160.
 [4] 仇世钦, 刘经纬, 孙旭杰, 等. 脂肪酸合酶抑制剂浅蓝菌素对裸鼠膀胱癌移植瘤生长抑制的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(6): 1097-1099.
 [5] 张嘉穗, 陈惠, 魏国清, 等. 脂肪酸合酶: 抑制肿瘤的新靶点[J]. *华西药学杂志*, 2014, 29(5): 599-601.

[6] MENENDEZ JA, LUPU R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(10): 763-777.
 [7] MENENDEZ JA, LUPU R. Fatty acid synthase(FAS) as a therapeutic target in breast cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(11): 1001-1016.
 [8] 徐晓伟, 王晓奎, 李松. 脂肪酸合酶抑制剂的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2009, 36(2): 105-108, 120.
 [9] 覃飞, 王晓波, 龚建平. 脂肪酸合酶在肿瘤中表达的调节机制[J]. *医学分子生物学杂志*, 2010, 7(5): 453-456.
 [10] 陈一婧, 张厚德. 脂肪酸合酶抑制剂及其抗肿瘤作用研究进展[J]. *中国现代医生*, 2015, 53(15): 152-155.
 [11] YUAN R, HOU Y, SUN W, et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1401(1): 19-27.
 [12] 苗常青, 许静, 王军, 等. 脂肪酸合酶在胰腺癌细胞凋亡过程中的作用[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2015. DOI: 10.7652/jdyxb201506011.
 [13] WU J, DU J, FU X, et al. Lciartin, a novel FASN inhibitor, exerts anti-melanoma activities through IGF-1R/STAT3 signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51251-51269.
 [14] EBRAHIMI S, HOSSEINI M, SHAHIDSALES S, et al. Targeting the Akt/PI3K signaling pathway as a potential therapeutic strategy for the treatment of pancreatic cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(13): 1321-1331.
 [15] ADAMSKA A, ELASKALANI O, EMMANOUILIDI A, et al. Molecular and cellular mechanisms of chemoresistance in pancreatic cancer[J]. *Adv Biol Regul*, 2018. DOI: 10.1016/j.jbior.2017.11.007.
 [16] DE SOUSA CAVALCANTE L, MONTEIRO G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.041.
 [17] GUO H, GAO M, LU Y, et al. Coordinate phosphorylation of multiple residues on single AKT1 and AKT2 molecules[J]. *Oncogene*, 2014, 33(26): 3463-3472.
 [18] TSUKAHARAS S, YAMAMOTO S, TIN-TIN-WIN-SHWE, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the bcl-2/bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(2): 63-68.
 [19] MASHIMA T, SEIMIYA H, TSURUO T. De novo fatty acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(9): 1369-1372.
 [20] 王祎. 天然来源的脂肪酸合酶抑制剂对肿瘤细胞的作用机制[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.

(收稿日期: 2019-01-15 修回日期: 2019-03-20)

(编辑: 邹丽娟)