

吉西他滨对人胰腺癌Patu-8988细胞株APE/Ref-1的诱导作用

熊光苏, 吴叔明, 徐晓晶, 周 璠, 朱红音, 李恩灵, 莫剑忠

熊光苏, 吴叔明, 徐晓晶, 周璠, 朱红音, 李恩灵, 莫剑忠, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001

上海市领先学科建设项目, No. Y0205

上海交通大学医学院博士点基金项目, No. BXJ0617

通讯作者: 吴叔明, 200001, 上海市山东中路145号, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

wusm2002@hotmail.com

电话: 021-53882027

收稿日期: 2007-01-24 接受日期: 2007-02-08

Expression of APE/Ref-1 in human pancreatic cancer cell line Patu-8988 induced by gemcitabine

Guang-Su Xiong, Shu-Ming Wu, Xiao-Jing Xu, Jun Zhou, Hong-Yin Zhu, En-Ling Li, Jian-Zhong Mo

Guang-Su Xiong, Shu-Ming Wu, Xiao-Jing Xu, Jun Zhou, Hong-Yin Zhu, En-Ling Li, Jian-Zhong Mo, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 20001, China

Supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. Y0205, and the Foundation of the Authorization Spot for Doctor's Degree of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, No. BXJ0617

Correspondence to: Shu-Ming Wu, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 145 Shandong Middle Road, Shanghai 20001, China. wusm2002@hotmail.com

Received: 2007-01-24 Accepted: 2007-02-08

Abstract

AIM: To investigate the changes of APE/Ref-1 expression in human pancreatic cancer cells after induction of gemcitabine.

METHODS: Human pancreatic cancer cell line Patu-8988 was incubated with 0, 10, 20, 40 and 60 $\mu\text{mol/L}$ gemcitabine for 24 hours. The mRNA and protein levels of APE/Ref-1 were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Twenty-four hours after treatment with gemcitabine, the expression of APE/Ref-1 were elevated significantly both at mRNA and

protein level, and was positively correlated with the concentrations of gemcitabine (RT-PCR: $r = 0.645$, $P = 0.012$; Western blot: $r = 0.598$, $P = 0.020$).

CONCLUSION: Up-regulated APE/Ref-1 expression may be an adaptive response contributing to the overall chemoresistance in pancreatic carcinomas, which implies the potential therapeutic effect targeting on APE/Ref-1.

Key Words: Pancreatic neoplasm; APE/Ref-1; Gemcitabine; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Xiong GS, Wu SM, Xu XJ, Zhou J, Zhu HY, Li EL, Mo JZ. Expression of APE/Ref-1 in human pancreatic cancer cell line Patu-8988 induced by gemcitabine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(12):1425-1428

摘要

目的: 研究人胰腺癌细胞株在吉西他滨化疗时APE/Ref-1基因表达的变化, 并试图揭示其在胰腺癌化疗耐药中所起的作用。

方法: 不同浓度吉西他滨0、10、20、40及60 $\mu\text{mol/L}$ 作用人胰腺癌Patu-8988细胞株24 h, 分别以RT-PCR及Western blot方法测定作用后APE/Ref-1的mRNA及蛋白表达情况。

结果: 吉西他滨作用人胰腺癌Patu-8988细胞株24 h后, APE/Ref-1的mRNA及蛋白表达水平明显上升, 并与吉西他滨的浓度呈正相关 (RT-PCR: $r = 0.645$, $P = 0.012$; Western blot: $r = 0.598$, $P = 0.020$)。

结论: APE/Ref-1在胰腺癌化疗时表达明显增强, 可能与化疗耐药性的产生有关, 并提示针对APE/Ref-1的靶向干预可能有助于提高胰腺癌的化疗敏感性。

关键词: 胰腺肿瘤; 无嘌呤嘧啶核酸内切酶; 吉西他滨; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫印迹

熊光苏, 吴叔明, 徐晓晶, 周璠, 朱红音, 李恩灵, 莫剑忠. 吉西他

■背景资料

胰腺癌是一种常见而又恶性程度很高的消化系统肿瘤, 近年来其发病率在国内外都呈上升趋势, 国内上海地区的发病率最高。目前, 唯一显示有一定疗效的药物是吉西他滨, 但效果也不理想。无嘌呤嘧啶核酸内切酶(APE)是DNA修复酶家族中的一员, 同时还有氧化还原功能, 也通常被称为氧化还原因子-1(Ref-1)。文献报道多种肿瘤中APE/Ref-1的表达升高, 并有可能参与了肿瘤对放、化疗抵抗的产生。

■研发前沿

胰腺癌化疗的耐药性是胰腺癌预后不佳的重要原因。由于其基因治疗也取得了很大的发展, 故联合基因治疗和化疗将是胰腺癌治疗的一个重要方向。

■创新盘点

本研究发现,胰腺癌细胞在以吉西他滨作用时,APE/Ref-1的表达反应性升高,结合国外相关文献,提出APE/Ref-1可能参与了胰腺癌对吉西他滨化疗耐药性的产生,国内尚未见相关报道。

滨对人胰腺癌Patu-8988细胞株APE/Ref-1的诱导作用. 世界华人消化杂志 2007;15(12):1425-1428

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1425.asp>

0 引言

胰腺癌是一种常见而又恶性程度很高的消化系统肿瘤,近年来其发病率在国内外都呈上升趋势,国内上海地区的发病率最高^[1-2]。目前,唯一显示有一定疗效的药物是吉西他滨,但效果也不理想。无嘌呤嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease, APE)是DNA修复酶家族中的一员,APE同时还有氧化还原功能,也通常被称为氧化还原因子-1(redox effector factor-1, Ref-1)^[3]。文献报道多种肿瘤中APE/Ref-1的表达升高,并有可能参与了肿瘤对放、化疗抵抗的产生。本研究通过吉西他滨干预胰腺癌细胞株,观察APE/Ref-1表达情况,旨在探讨其在胰腺癌对化疗耐药中起的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株Patu-8988由上海交通大学医学院附属瑞金医院内科实验室惠赠。吉西他滨(泽菲)购自江苏豪森药业公司。DMEM培养基干粉购自Gibco公司。多克隆兔抗人APE抗体购自美国Novus公司。多克隆兔抗人 β -actin抗体购自上海康成公司。M-MLV逆转录酶购自美国Promega公司。

1.2 方法 人胰腺癌细胞株在含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液、37℃ 50 mL/L CO₂孵箱中培养。分别以不同浓度吉西他滨(0, 10, 20, 40, 60 μ mol/L)作用Patu-8988细胞株24 h。收集细胞。

1.2.1 RT-PCR半定量测定APE/Ref-1 mRNA表达情况 总RNA抽提采用TRIzol按照说明书操作步骤进行。取10 μ g逆转录合成cDNA。PCR扩增引物由上海基康生物技术公司合成, APE/Ref-1上游引物: 5'-ACTTCAGGAGCTGCCTGGACT-3', 下游引物: 5'-AATGCAGGTAACAGAGAGTGGGA-3', 扩增长度564 bp, 退火温度56℃, 35个循环。内参照 β -actin: 上游引物: 5'-CACCCACACTGTGCCCATC-3', 下游引物: 5'-CCACAGGACTCCATGCCC-3', 扩增长度342 bp, 退火温度55℃, 28个循环。5 μ L PCR产物15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 通过SmartView凝胶成像扫描仪观察。

1.2.2 Western blotting检测蛋白表达 以细胞裂解液冰浴裂解收集的细胞, BCA法测定蛋白浓度。取50 μ g蛋白进行不连续SDS-PAGE电泳, 泳毕电转移至硝酸纤维素膜。50 g/L BSA溶液室温孵

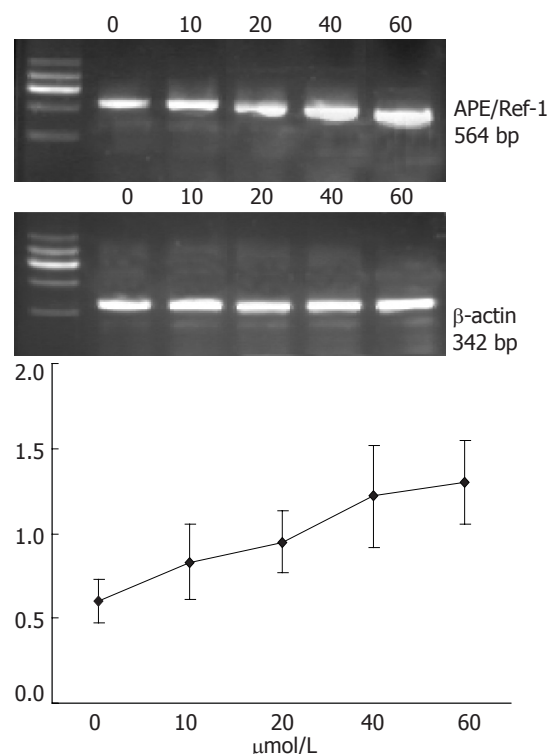


图1 APE/Ref-1 RT-PCR结果。

育1 h封闭非特异性结合, 加入多克隆兔抗人抗体室温孵育1.5 h后, 加入HRP标记的二级抗体以结合一级抗体及HRP标记的抗生物素抗体以结合分子量标准, 室温孵育膜1 h。KCTM显色发光, 暗室胶片曝光, 采用 β -actin作为内参照, 通过SmartView软件分析。

统计学处理 统计采用SAS6.12软件包。计量资料用mean \pm SD表示, 组间有无显著性差异用one-way ANOVA检验, $P < 0.05$ 为有显著性。

2 结果

2.1 APE/Ref-1 mRNA表达情况 吉西他滨作用人胰腺癌Patu-8988细胞株24 h后, APE/Ref-1的mRNA表达明显上升, 与浓度呈正相关($r = 0.645$, $P = 0.012$) (图1)。

2.2 APE/Ref-1蛋白表达情况 吉西他滨作用24 h后, APE/Ref-1蛋白表达明显上升, 与浓度呈正相关($r = 0.598$, $P = 0.020$) (图2)。

3 讨论

每个细胞每天在生理条件下大约可自发产生100多个无嘌呤嘧啶(apurinic/aprimidinic, AP)位点。但由于离子辐射、DNA损伤药物、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生等因素, 细胞实际每天可产生超过20 000个AP位点, 是

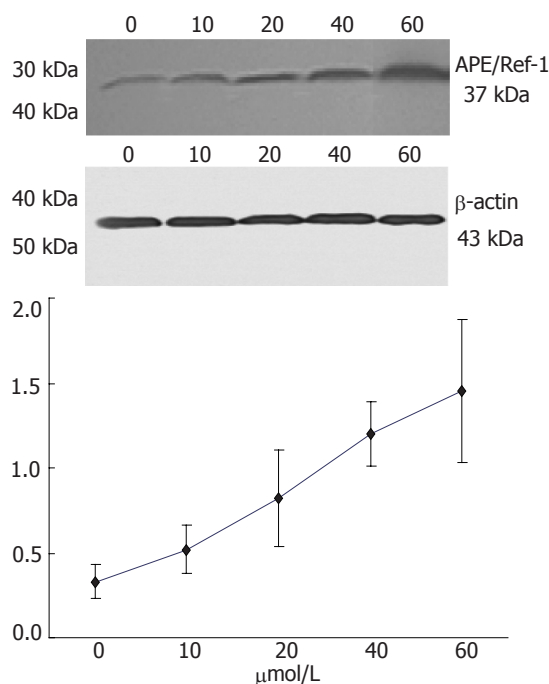


图 2 APE/Ref-1 Western blot结果.

最常见的DNA损伤形式之一^[3-4]. 持续存在的AP位点如得不到修复则会导致DNA复制停止、突变以及基因稳定性丢失. DNA的碱基切除修复(base excision repair, BER)途径通过切除和替换AP位点从而维持DNA完整性, 是DNA修复系统中最重要的一种修复途径. APE是DNA修复酶家族中的一员, 主要通过BER方式修复AP位点. 一旦确定DNA的一处碱基损伤, 则通过转葡萄糖苷酶切除该碱基, 留下一处AP位点, 然后APE通过Mg²⁺依赖的核酸内切酶作用, 水解AP位点5'端, 形成3'-OH和5'-脱氧核苷. 脱氧核糖磷酸酶切除AP位点, DNA聚合酶β以及DNA连接酶I或DNA连接酶III/XRCCI替换核苷酸, 并关闭新合成核苷酸和DNA股之间的裂隙. 此外, APE还有氧化还原功能, 他通过转录因子来激活多种肿瘤基因产物的活性, 如c-Jun, c-Fos, c-Myb, NF-κB以及p53. 已发现APE/Ref-1在多种肿瘤组织中表达升高, 如: 宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、儿童横纹肌肉瘤、骨肉瘤、胚胎瘤、肝癌等^[5-9], 以及胰腺癌^[10]. 研究表明, 使哺乳动物细胞中的APE/Ref-1蛋白降低可增加细胞对甲磺酸甲酯、过氧化氢的敏感性^[11]; 在APE/Ref-1的降低时宫颈癌的抗辐射性也降低^[12]. 暴露于离子辐射及氧应激时肿瘤细胞APE/Ref-1蛋白升高^[6,13-14], 同时, 睾丸癌中APE/Ref-1的升高也可导致博来霉素敏感性降低^[8]. 胰腺导管腺癌是一种预后很差的恶性肿瘤, 位居北

美第4大肿瘤死亡原因^[2]. 1990年代上海市区全人群男女性胰腺癌5 a观察生存率仅为5.8%和4.3%, 5 a相对生存率为6.9%和5.1%^[1]. 上海市区2000年男女胰腺癌标化发病率分别为7.7/10万和5.8/10万, 分别居男女恶性肿瘤发病率的第9位和第7位^[15], 已属较高水平. 胰腺癌对化、放疗均不敏感, 致使其死亡率几乎达100%^[16]. 目前唯一显示有一定效果的药物为吉西他滨(2, 2-二氟脱氧胞嘧啶核苷), 为脱氧胞苷酸2'位碳原子被氟原子所代替, 通过抑制DNA连结而抑制肿瘤的复制, 并通过掩盖肽链的末端阻断DNA修复; 另外他还能增强自我抗细胞毒素的能力. 他优于其他抗代谢药物(如阿糖胞苷)的主要特点在于其半衰期更长, 从而加强了其抑制拓扑异构酶-I的活性等细胞毒性作用^[17-18].

我们推测, APE/Ref-1可能在吉西他滨作用肿瘤细胞时, 其表达会反应性增高, 从而参与了胰腺癌对化疗耐药的产生. 我们的研究证实以不同浓度的吉西他滨干预胰腺癌细胞株Patu-8988, APE/Ref-1的表达随着吉西他滨的浓度升高而升高, 呈正相关, 和国外有关研究结果相似^[19], 表明APE/Ref-1可能在胰腺癌对化疗耐药产生中起着重要作用, 并提示针对APE/Ref-1的靶向干预可能有助于提高胰腺癌的化疗敏感性.

4 参考文献

- 1 高玉堂. 胰腺癌流行病学研究进展. 实用肿瘤杂志 2003; 18: 347-349
- 2 Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30
- 3 Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000; 461: 83-108
- 4 Kelley MR, Parsons SH. Redox regulation of the DNA repair function of the human AP endonuclease Ape1/ref-1. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 671-683
- 5 Xu Y, Moore DH, Broshears J, Liu L, Wilson TM, Kelley MR. The apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme is elevated in premalignant and malignant cervical cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 3713-3719
- 6 Kelley MR, Cheng L, Foster R, Tritt R, Jiang J, Broshears J, Koch M. Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 824-830
- 7 Moore DH, Michael H, Tritt R, Parsons SH, Kelley MR. Alterations in the expression of the DNA repair/redox enzyme APE/ref-1 in epithelial ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 602-609
- 8 Robertson KA, Bullock HA, Xu Y, Tritt R, Zimmerman E, Ulbright TM, Foster RS, Einhorn LH, Kelley MR. Altered expression of Ape1/ref-1

■应用要点

本研究为下一步通过基因敲除抑制其表达以提高胰腺癌化疗敏感性的研究提供了方向.

■同行评价

本文通过检测在不同浓度的吉西他滨作用下,人胰腺癌细胞株 APE/Ref-1 表达的变化,研究其在胰腺癌化疗耐药中的作用,具有实用意义。

- in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. *Cancer Res* 2001; 61: 2220-2225
- 9 张沁宏, 肖华亮, 李增鹏, 仲召阳, 何怡, 卿毅, 王东. 肝细胞癌组织中DNA损伤修复基因APE1表达意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 508-511
- 10 高扬, 李兆申, 高军, 屠振兴, 龚燕芳, 王洋. 无嘌呤嘧啶核酸内切酶在胰腺癌组织的表达及其临床意义. *胰腺病学* 2006; 6: 74-77
- 11 Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4884-4889
- 12 Herring CJ, West CM, Wilks DP, Davidson SE, Hunter RD, Berry P, Forster G, MacKinnon J, Rafferty JA, Elder RH, Hendry JH, Margison GP. Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref-1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers. *Br J Cancer* 1998; 78: 1128-1133
- 13 Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 5061-5066
- 14 Silber JR, Bobola MS, Blank A, Schoeler KD, Haroldson PD, Huynh MB, Kolstoe DD. The apurinic/aprimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3008-3018
- 15 上海市肿瘤研究所流行病学研究室. 2000年上海市恶性肿瘤发病率. *肿瘤* 2003; 23: 532-532
- 16 Magee CJ, Greenhalf W, Howes N, Ghaneh P, Neoptolemos JP. Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical implications. *Surg Oncol* 2001; 10: 1-23
- 17 Moore MJ, Feld R, Hedley D, Oza A, Siu LL. A phase II study of temozolomide in advanced untreated pancreatic cancer. *Invest New Drugs* 1998; 16: 77-79
- 18 Pourquier P, Giffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, Yu S, Pon RT, Gmeiner WH, Pommier Y. Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2499-2504
- 19 Lau JP, Weatherdon KL, Skalski V, Hedley DW. Effects of gemcitabine on APE/ref-1 endonuclease activity in pancreatic cancer cells, and the therapeutic potential of antisense oligonucleotides. *Br J Cancer* 2004; 91: 1166-1173

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].