

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.05.003

◇ 药学研究 ◇

# 吉西他滨联合大黄素对胰腺癌 SW1990 细胞多耐药基因-1、miRNA-1271 及上皮-间充质细胞转化的影响

张旭<sup>1</sup>, 程远方<sup>2</sup>, 张江霞<sup>1</sup>, 宋沛然<sup>1</sup>, 张静<sup>1</sup>作者单位:<sup>1</sup>南石医院药学部, 河南 南阳 473000, <sup>2</sup>河南省肿瘤医院药学部, 河南 郑州 450008

**摘要:**目的 探究吉西他滨联合大黄素对胰腺癌 SW1990 细胞生长的抑制作用及对多耐药基因-1(MDR-1)、miRNA-1271 和上皮-间充质细胞转化(EMT)的影响。方法 将胰腺癌 SW1990 细胞分为大黄素组(40  $\mu\text{mol/L}$ )、吉西他滨(20  $\mu\text{mol/L}$ )、吉西他滨联合大黄素组及对照组(生理盐水), 流式细胞仪检测细胞凋亡, MTT 法检测细胞增殖, Transwell 小室模型检测胰腺癌细胞侵袭能力, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 MDR-1、miRNA-1271 及 EMT 相关标志物(TWIST1、ZEB1、E-cadherin) mRNA 表达, 流式细胞仪检测 MDR-1 编码的 P 糖蛋白(P-gp)阳性率, 蛋白质免疫印迹法检测肿瘤组织凋亡相关蛋白[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)及 Survivin]及 EMT 相关标志物蛋白含量。结果 联合组可显著抑制胰腺癌 SW1990 细胞增殖和侵袭, SW1990 细胞凋亡率显著更高, 与其他三组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。联合组 MDR-1 mRNA 显著降低, miRNA-1271 及 E-cadherin mRNA 显著升高, 且与其他组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 各组 TWIST1、ZEB1 mRNA 水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。联合组可以显著抑制 Bcl-2、Caspase-3 及 Survivin 表达, 上调 Bax 表达, 降低 Bcl-2、Bax 比值, 其效果明显高于吉西他滨组和大黄素组( $P < 0.05$ )。联合组 E-cadherin 蛋白表达显著高于其他组, P-gp、TWIST1、ZEB1 蛋白表达显著低于其他组( $P < 0.05$ )。结论 大黄素能够下调 MDR-1 降低胰腺癌细胞对吉西他滨耐药性, 并能通过提高 miRNA-1271 抑制胰腺癌细胞 EMT 转化。

**关键词:** 大黄素; 吉西他滨; 胰腺肿瘤; 多药耐药相关蛋白质类; P 糖蛋白; 胰腺癌 SW1990 细胞; 多耐药基因-1; 微小 RNA-1271

## Effects of gemcitabine combined with emodin on MDR-1, miRNA-1271 and EMT in pancreatic cancer SW1990 cells

ZHANG Xu<sup>1</sup>, CHENG Yuanfang<sup>2</sup>, ZHANG Jiangxia<sup>1</sup>, SONG Peiran<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>Author Affiliations: <sup>1</sup>Department of Pharmacy, Nanshi Hospital, Nanyang, Henan 473000, China;<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou, Henan 450008, China

**Abstract: Objective** To investigate the inhibitory effect of gemcitabine combined with emodin on the growth of pancreatic cancer SW1990 cells and the transformation of multidrug resistance gene-1 (MDR-1), miRNA-1271 and epithelial-mesenchymal cells (The transformation of epithelial-mesenchymal, EMT). **Methods** Pancreatic cancer SW1990 cells were divided into the emodin group (40  $\mu\text{mol/L}$ ), gemcitabine (20  $\mu\text{mol/L}$ ), gemcitabine plus emodin group and the control group (normal saline). Apoptosis was detected by flow cytometry. Proliferation, Transwell chamber model was used to detect the invasion ability of pancreatic cancer cells. qRT-PCR was used to detect mRNA expression of MDR-1, miRNA-1271 and EMT-related markers (TWIST1, ZEB1, E-cadherin), P-gp positive rate and MDR-1 coding was detected by flow cytometry. Western-blot were adopted to detect tumor tissue apoptosis-related proteins [B lymphocyte tumor 2 (Bcl-2) and its related X protein (Bax), caspase-3 (Caspase-3) And Survivin] and EMT related marker protein content. **Results** The proliferation and invasion of pancreatic cancer SW1990 cells in the combined group were significantly inhibited. The apoptosis rate of SW1990 cells was significantly higher than that of the other three groups ( $P < 0.05$ ). MDR-1 mRNA was significantly decreased in the combined group, and miRNA-1271 and E-cadherin mRNA were significantly increased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in TWIST1 and ZEB1 mRNA levels between the two groups ( $P > 0.05$ ). The expression of Bcl-2, Caspase-3 and Survivin, up-regulate the expression of Bax, and decrease the ratio of Bcl-2 and Bax were significantly inhibited in the combination group. The effect was significantly higher than that of the gemcitabine group and the emodin group ( $P < 0.05$ ). The expression of E-cadherin protein in the combined group was significantly higher than that in other groups. The expression of P-gp, TWIST1 and ZEB1 protein was significantly lower than that in other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Emodin can down-regulate MDR-1 and reduce the resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine, and can inhibit EMT transformation of pancreatic cancer cells by increasing miRNA-1271.

**Key words:** Emodin; Gemcitabine; Pancreatic neoplasms; Multidrug resistance-associated proteins; P-glycoprotein; Pancreatic cancer SW1990 cells; Multi-drug resistance gene-1; miRNA-1271

胰腺癌是世界范围内致死率较高的重度恶性消化系统癌症,病人多早期症状较为隐匿,疾病确诊时多已处于中晚期,多治疗效果不佳,5年生存率不及5%<sup>[1]</sup>。吉西他滨(Gemcitabin, GEM)是中晚期胰腺癌化疗的标准用药,但随着化疗期延长而逐步耐药,并具有一定的毒副作用,吉西他滨联合卡培他滨、奥沙利铂、5-FU 顺铂等虽能一定程度改善治疗效果,但疗效仍不理想<sup>[2-3]</sup>。因此,寻找一种能够降低胰腺癌细胞对吉西他滨耐药并提升其抑瘤效果的药物意义重大。在化疗过程中,多药耐药基因(multidrug resistance gene-1, MDR-1)是导致肿瘤细胞耐药和化疗失败的主要因素,MDR-1 编码的P糖蛋白(P-gp)过表达而导致胰腺癌病人对多种化疗药物产生耐药<sup>[4]</sup>。同时,肿瘤细胞的侵袭转移与上皮-间充质细胞转化(epithelial-mesenchymal, EMT)有着显著相关性。大黄素本质为蒽醌类提取物,十多张抗肿瘤重要的有效活性成分,多项研究表明其能抑制肿瘤发展,促进肿瘤生长和凋亡<sup>[5]</sup>。本研究自2018年3月至2019年3月探究吉西他滨联合大黄素对胰腺癌SW1990细胞增殖与侵袭的影响,并尝试初步分析联合应用增强胰腺癌治疗效果的可能机制。

## 1 资料与方法

**1.1 细胞系与细胞培养** 人胰腺癌细胞株SW1990由美国组织培养库(ATCC)提供。均培养于含100 μg/mL链霉素、100U/mL青霉素和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,37℃、5%二氧化碳培养箱中培养,至细胞单层贴壁生长融合70%~80%,胰蛋白酶消化传代。

**1.2 药品、试剂和仪器** 药品与试剂:胎牛血清、RPMI1640及胰酶购自美国Gibco公司;大黄素(emodin),购自美国Sigma公司,用DMSO配制成0.2 mol/L,终浓度<0.1%;吉西他滨购自法国礼来公司;Trizol和MTT试剂购自美国Sigma公司;兔抗人Bcl-2多克隆抗体及鼠抗人Bax单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;Caspase-3及Survivin兔抗人单克隆抗体购自美国Abcam公司;TWIST1、ZEB1、E-cadherin、β-actin单克隆抗体购自美国CST公司;Transwell小室模型购自美国康宁公司;RT-PCR试剂盒由中国吉林制药技术有限公司提供。

仪器:Bio-Plex200流式细胞仪及1658001蛋白印迹电泳仪购自美国Bio-Rad公司,RD-PCR仪由西安天空科技有限公司提供,HH-CP-01W二氧化碳细胞培养箱由上海兰仪实业有限公司提供。

**1.3 细胞分组与处理** 将处于生长对数期的

SW1990细胞分为大黄素组、吉西他滨组、大黄素联合吉西他滨组及对照组,大黄素组给予40 μmol/L大黄素处理SW1990/Gem细胞,吉西他滨组给予20 μmol/L吉西他滨处理SW1990/Gem细胞,联合组给予与前等量大黄素和吉西他滨联合处理SW1990/Gem细胞,对照组给予等量0.1%DMSO溶液。

**1.4 流式细胞仪检测** (1)流式细胞仪检测细胞凋亡。96孔板每孔接种 $4 \times 10^3$ 的细胞过夜培养,细胞按照1.3分组处理48 h后,采用胰蛋白酶消化,1 000 r/min离心5 min, PBS冲洗2次,加入Binging Buffer重悬细胞,加入5 μL PI和5 μL Annexin V-FITC,室温避光15 min,于激发波长488 nm、发射波长530 nm上机检测,重复3次,采用Cell quest软件分析。

(2)流式细胞仪检测细胞膜糖蛋白(P-gp)阳性率。收集各组胰腺癌细胞调至 $1 \times 10^7$ /mL备用,台盼蓝染色计数(>90%~95%),加入工作浓度(1:50)PE标记荧光素抗体,以阴性SW1990胰腺癌细胞做对照,室温孵育20 min, PBS冲洗2次,1 500 r/min离心3 min弃去上清, PBS冲洗2次,加入300 mL PBS重悬细胞,上机检测阳性率。

**1.5 MTT法检测细胞增殖** 96孔板每孔接种 $4 \times 10^3$ 的细胞过夜培养,细胞按照1.3分组处理48 h后,弃去上清,加入5 mg/mL的MTT溶液,培养4 h,弃掉培养液,加入150 μL DMSO后震荡10 min,实验重复3次,每组6个重复,测定每孔光密度,计算细胞存活率。

**1.6 Transwell小室模型检测胰腺癌细胞侵袭能力** 收集各组胰腺癌细胞调至 $1 \times 10^5$ /mL备用。将60 mg于4℃冷藏过夜的Matrigel胶取出放置在冰上,与无血清培养基混匀稀释,取60 μL混合液加入Transwell小室,于37℃5%二氧化碳培养箱孵育2 h,将200 μL预先备好的胰腺癌细胞悬液均匀加入Transwell小室底部膜上室面,下室面加入600 μL的10%胎牛血清培养基,于37℃5%二氧化碳培养箱培养48 h,取出上室,弃去液体,4%多聚甲醛固定15~20 min,0.1%结晶紫染色40 min, PBS冲洗静置干燥,×100显微镜下观察胰腺癌细胞穿透数量。

**1.7 qRT-PCR检测MDR-1、miRNA-1271及EMT相关标志物(TWIST1、ZEB1、E-cadherin) mRNA表达** (1)收集各组胰腺癌细胞,采用Trizol试剂提取细胞总RNA,以RNA为模板逆转录合成cDNA,所有操作严格按照试剂盒说明书进行。反应体系:RNA样本1 μL, dNTPs(10 mmol/L)0.8 μL, RT primers(1 μmol/L)1.3 μL, 5×RT buffer 4 μL, MMLV Re-

verse TranscriptASC 0.3 μL, 总反应体系 20 μL, 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 10 min。

(2)RT-PCR反应体系:cDNA 1.33 μL,无核酸酶水 7.67 μL、引物及探针混合物 1.0 μL、2×通用混合物 10 μL,U6 及 β-actin 基因作为内参,反应条件:95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,40个循环。

MDR-1 引物,正向:5'-GAATCTGGAGGAACA-CATGACC-3',反向:5'TCCAATTTTGTAC-CAATTCC3'。

miRNA-1271 引物,正向:5'-CAGCACTTG-GCACCTAGCA-3';反向:5'-TATGGTT-GTTCTCTCTCTGTCTC-3'。

TWIST1 引物,正向:5'-AGCTGAGCAA-GATTCAGACCCTCA-3',反向:5'-CTGCAGCTTGC-CATCTTGGAGT-3'。

ZEB1 引物,正向:5'-GCACAACCAAGTG-CAGAAGA-3',反向:5'-CATTTCAGATTGAG-GCTG-3'。

E-cadherin 引物,正向:5'-AAGTGCTGCAGC-CAAAGACAGA-3',反向:5'-AGGTAGACCCACCT-CAATCATCCTC-3'。

MDR-1、miRNA-1271、TWIST1、ZEB1 及 E-cadherin 相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算,  $\Delta\Delta Ct = (\text{待测组目的基因平均 Ct 值} - \text{待测组内参基因平均 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因平均 Ct 值} - \text{对照组内参基因平均 Ct 值})$ 。

**1.8 蛋白质免疫印迹法检测相关蛋白表达** 收集各组胰腺癌细胞常规方法提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,10%SDS-PAGE凝胶电泳,将蛋白质转移至PVDF膜,加入含5%脱脂奶粉Tris缓冲液封闭2h,加入Caspase-3、Survivin、TWIST1、ZEB1、E-cadherin抗体孵育过夜,加入二抗孵育2h,ECL发光液显色。采用BandsScan 5.0分析条带灰度值,并计算蛋白的相对表达量。目的蛋白相对表达量 = 目的条带灰度值/样本内参灰度值。

**1.9 统计学方法** 本研究实验数据采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析。观测资料主要为计量资料,多组间比较采用单因素方差分析+两两比较LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 大黄素与吉西他滨单独及联合作用对胰腺癌SW1990细胞凋亡、增殖及侵袭的影响** 联合组可显著抑制胰腺癌SW1990细胞增殖和侵袭,SW1990细胞凋亡率显著更高,与其他三组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

**表1** 各组胰腺癌SW1990细胞凋亡、增殖及侵袭能力比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡/%	细胞增殖/%	细胞侵袭/个
对照组	2.2±1.5	100.0±3.0	244.4±9.1
大黄素组	8.3±2.4 <sup>ab</sup>	80.5±2.8 <sup>ab</sup>	175.3±9.5 <sup>ab</sup>
吉西他滨	10.1±3.0 <sup>ab</sup>	77.6±3.1 <sup>ab</sup>	192.0±8.6 <sup>ab</sup>
联合组	26.9±3.7 <sup>a</sup>	60.1±2.4 <sup>a</sup>	105.8±7.8 <sup>a</sup>
F值	14.622	9.850	13.141
P值	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与联合组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

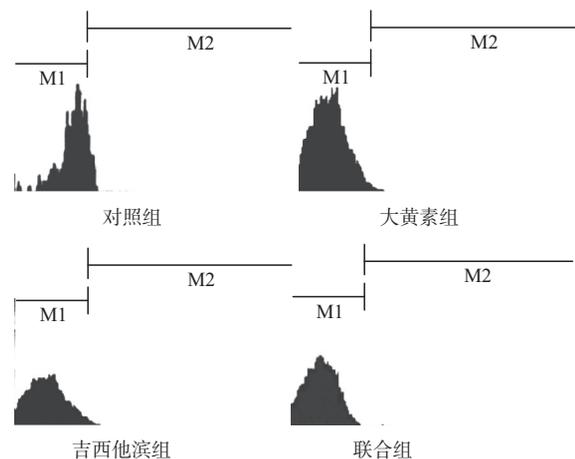
**2.2 RT-PCR检测MDR-1、miRNA-1271及EMT相关标志物表达** 联合组MDR-1 mRNA显著降低,miRNA-1271及E-cadherin mRNA显著升高,且与其他组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),各组TWIST1、ZEB1 mRNA水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表2。

**表2** 各组MDR-1、miRNA-1271及EMT相关标志物表达RT-PCR检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MDR-1	miRNA-1271	E-cadherin	TWIST1	ZEB1
对照组	3.6±0.7	0.3±0.1	0.6±0.2	1.1±0.5	1.0±0.3
大黄素组	2.2±0.3	1.1±0.3 <sup>ab</sup>	1.1±0.4 <sup>ab</sup>	1.0±0.5 <sup>ab</sup>	1.1±0.5 <sup>b</sup>
吉西他滨	2.3±0.4	1.0±0.4 <sup>ab</sup>	0.9±0.3 <sup>ab</sup>	1.0±0.4 <sup>ab</sup>	1.0±0.5 <sup>ab</sup>
联合组	1.3±0.1	3.8±0.8 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>a</sup>	1.0±0.5 <sup>a</sup>	1.1±0.4 <sup>a</sup>
F值	20.572	27.456	15.838	0.894	0.988
P值	0.000	0.000	0.000	0.374	0.326

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与联合组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,MDR-1为多耐药基因-1,miRNA-1271为微小RNA-1271,EMT为上皮-间充质细胞转化

**2.3 流式细胞仪检测MDR-1编码的P糖蛋白(P-gp)阳性率** 对照组、大黄素组、吉西他滨组与联合组P-gp阳性率分别为(42.6±3.5)%、(28.4±2.9)%、(23.6±1.8)%、(13.3±1.8)%、联合组显著低于其他组,差异有统计学意义( $F = 12.777, P = 0.000$ )。见图1。



注:M1为第1个细胞门,M2为第2个细胞门

**图1** 流式细胞仪检测各组P糖蛋白表达情况



细胞凋亡,还参与抑制EMT,EMT是促进肿瘤细胞侵袭和转移的重要病理机制。E-cadherin、TWIST1、ZEB1是肿瘤细胞EMT进程发挥重要作用的转录因子,研究显示<sup>[16]</sup> TWIST1、ZEB1可作为胰腺癌恶性程度的重要指示指标。本研究中,在吉西他滨+大黄素作用下,miRNA-1271及E-cadherin mRNA显著升高,同时,联合组E-cadherin蛋白表达显著高于其他组,TWIST1、ZEB1蛋白表达显著低于其他组( $P < 0.05$ )。大黄素可以通过调节多种信号抑制恶性肿瘤的转移、侵袭,研究发现<sup>[17]</sup> 大黄素可以调节miR-1271表达抑制恶性肿瘤的恶性生物学行为。因此,大黄素不仅可以增强吉西他滨对于胰腺癌细胞的药效,还可以提高miRNA-1271水平,抑制胰腺癌细胞EMT转化,从而发挥抑制胰腺癌细胞侵袭转移能力的效果。

### 参考文献

- [1] 陈小艳,贾建新.胰腺癌侵袭转移作用机制的研究进展[J].天津医药,2018,46(8):899-904.
- [2] 王婧,赵磊,车娟娟,等.大黄素联合吉西他滨抑制胰腺癌细胞系PANC-1细胞增殖能力的研究[J].肿瘤预防与治疗,2016,29(3):139-143.
- [3] 魏为添,刘殿雷.大黄素联用吉西他滨对胰腺癌细胞Bxpc-3裸鼠移植瘤的抑制作用[J].中国临床保健杂志,2014,17(6):616-619.
- [4] YANG T, KONG B, KUANG Y, et al. Emodin plays an interventional role in epileptic rats via multidrug resistance gene 1 (MDR1)[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 3418-3425.
- [5] 王瑞涛,尹涵,董顺斌,等.大黄素抗胆囊癌作用的研究进展[J].中国中药杂志,2014,39(11):1976-1978.
- [6] 王越,沈灿,胡正军,等.中医药逆转胰腺癌耐药性的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(11):220-227.
- [7] 赵玲华,韩乔,李红.恶性肿瘤患者多重耐药菌医院感染监测[J].中国感染控制杂志,2017,16(5):462-465.
- [8] IYER VV, PRIYA PY, KANGEYAVELU J. Effects of increased accumulation of doxorubicin due to emodin on efflux transporter and LRP1 expression in lung adenocarcinoma and colorectal carcinoma cells[J]. Mol Cell Biochem, 2018, 449(1/2): 91-104.
- [9] SONG K, LV T, CHEN Y, et al. Emodin inhibits TGF- $\beta$ 2 by activating the FOXD3/miR-199a axis in ovarian cancer cells in vitro[J]. Oncol Rep, 2018, 39(5): 2063-2070.
- [10] 李鸿,唐敏,陈艳华,等.大黄素衍生物A对卵巢癌细胞迁移和侵袭的影响[J].中国现代医学杂志,2015,25(19):1-6.
- [11] 第三军医大学学报编辑部.化疗药物耐药怎么办?——抑制肿瘤细胞自噬可增强吉西他滨的化疗敏感性[J].第三军医大学学报,2017,39(7):706.
- [12] BAI J, WU J, TANG R, et al. Emodin, a natural anthraquinone, suppresses liver cancer in vitro and in vivo by regulating VEGFR2 and miR-34a[J]. Invest New Drugs, 2019, DOI: 10.1007/s10637-019-00777-5.
- [13] JIANG J, ZHOU N, YING P, et al. Emodin promotes apoptosis of human endometrial cancer through regulating the MAPK and PI3K/ AKT pathways[J]. Open Life Sciences, 2019, 13(1): 58.
- [14] 王磊,胡晨曦,夏铀铀,等.人胰腺癌PANC-1细胞株中不同亚群放射敏感性的比较分析[J].重庆医学,2015,44(32):4493-4495.
- [15] ZHOU Z, NIU X, LI C, et al. Inhibition of the growth of non-small cell lung cancer by miRNA-1271[J]. American Journal of Translational Research, 2015, 7(10): 1917-1924.
- [16] 何姝瑾,陈厚文,熊丽霞. MicroRNA对EMT的调节作用及其与肿瘤侵袭的关系[J].中国生物化学与分子生物学报,2016,32(11):1197-1205.
- [17] LI N, WANG C, ZHANG P, et al. Emodin inhibits pancreatic cancer EMT and invasion by up regulating microRNA 1271[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 18(3): 3366-3374.

(收稿日期:2019-06-26,修回日期:2019-08-18)

◇ 编读往来 ◇

### 校对诀要

为保证作者文稿刊出准确无误,责编会将编辑的文稿发回作者,要做好这份刊前稿样的核校,作者的操作诀要是:(1)必须回答编者提出的问题(将有批注或文字提问)。详核文题、作者姓名和单位名称(邮编)、科室。(2)对正文(包括外文拼写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对。无原则问题,尽量不改动。(3)务请核查文内角码是否与文末参考文献序号相对应。参考文献缺项的内容,按本刊规定格式补充(如前3位作者全部著录,卷、期要同时写明,作者名刊名宜缩写)。(4)认真核查法定计量单位及药物剂量;认真核校文内、表和图中的数字有无计算错误;认真复核统计学处理,写出统计量的具体值(如 $\chi^2$ 值、 $t$ 值、 $P$ 值的大小)。(5)若改动,必须将编辑编审的电子稿(编辑发回的刊前稿样)下载后用“修订格式”直接修改发回即可——切勿删去修改痕迹。切勿另行启用其它稿样修改。(6)校毕应于3d内发回修改稿,可附以修改说明。

(郝希春)