

糖原合成酶激酶 3 β 对卵巢癌顺铂耐药性的影响及其机制研究

朱饮源,姚 军*,李 曼

(桂林医学院附属医院生殖中心,广西 桂林 541001)

[摘要] 目的:探讨糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase, GSK-3 β)对卵巢癌顺铂耐药性的影响及机制。方法:运用氯化锂(lithium chloride, LiCl)增加失活性 GSK-3 β 即 p-GSK-3 β 表达,MTT 法筛选合适的 LiCl 浓度和作用时间并检测顺铂的半数抑制浓度,流式细胞仪检测 p-GSK-3 β (ser9)的表达量,免疫荧光观察其细胞内定位情况。结果:据 MTT 结果选择 LiCl 20 mmol/L 处理 6 h,处理后 24、48、72 h,SKOV3 细胞顺铂的半数抑制浓度从处理前的(20.37 \pm 0.56)、(7.79 \pm 0.72)、(2.8 \pm 0.32) μ g/ml 增加至(27.57 \pm 0.81)、(12.15 \pm 1.00)、(5.84 \pm 0.64) μ g/ml,差异均有统计学意义。流式结果显示, LiCl 处理后 SKOV3 细胞内 p-GSK-3 β (ser9)的平均荧光强度由处理前的 661.67 \pm 37.63 增加到 1 191.33 \pm 30.37,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫荧光结果提示, LiCl 处理后 SKOV3 细胞核内 p-GSK-3 β (ser9)表达上调。结论: LiCl 预处理后卵巢癌细胞顺铂耐药性的增强可能与 GSK-3 β 失活性磷酸化水平增加,尤其是与核内水平上调有关。

[关键词] 糖原合成酶激酶 3 β ;卵巢癌;顺铂;耐药性

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)03-332-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150307

卵巢癌的病死率高居妇科恶性肿瘤之首,其5年生存率仅为30%^[1]。以铂类和紫杉醇为基础的化疗方案仍是目前卵巢癌治疗的一线化疗方案,但是化疗耐药的存在极大影响了卵巢癌的临床疗效和预后,且卵巢癌的耐药机制迄今尚未明确。近来研究表明,糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase, GSK-3 β)在肿瘤细胞耐药性形成、凋亡调控、细胞周期调节等诸多生物学作用中起着重要作用^[2]。然而,由于 GSK-3 β 是一种多功能激酶,其对卵巢癌耐药性的影响和相关机制仍存在争议,因此本研究通过运用 GSK-3 β 抑制剂氯化锂(Lithium chloride, LiCl)改变其活性和细胞内定位,探讨其在顺铂耐药中的作用,进一步明确 GSK-3 β 对卵巢癌耐药的影响并阐述其可能机制,为以 GSK-3 β 为靶点逆转卵巢癌耐药提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

卵巢癌细胞系 SKOV3(中国科学院典型培养物保藏委员会上海细胞库);顺铂、LiCl、MTT、DMSO(Sigma 公司,美国);p-GSK-3 β (ser9)、Rabbit mAb IgG Isotype Control 抗体(Cell Signal 公司,美国);Alexa Four 488 标记山羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉金

桥公司);DAPI、封闭用山羊血清、Triton X-100、BSA、4%多聚甲醛、甲醇(北京索莱宝科技有限公司);DMEM 高糖培养液(Gibco 公司,美国);胎牛血清(GEMINI 公司,美国)。流式细胞仪(BD 公司,美国),酶标仪(伯乐公司,美国),荧光倒置相差显微镜(奥林巴斯公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SKOV3 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养液在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、相对湿度 90%的培养箱中培养,细胞呈贴壁生长。

1.2.2 MTT 检测 LiCl 对细胞增殖的影响

取对数生长期 SKOV3 细胞接种于 96 孔板,调整细胞浓度为 5 \times 10⁴ 个/ml,每孔接种 200 μ l,每组设 6 个复孔,培养 24 h 后加入 20 mmol/L 的 LiCl,空白对照为细胞培养液,阴性对照为未处理的细胞悬液,细胞继续培养 1、3、6、24 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ l,孵育 4 h 除去培养液,加入 DMSO 150 μ l,摇匀 15 min,酶标仪测定 490 nm 处吸光度值。按以下公式计算抑制率:细胞抑制率(%)=[1-(试验组吸光度值-空白对照组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白对照组吸光度值)] \times 100%。实验重复 3 次。选取抑制率小于 10%的最长时间点进行后续实验。

1.2.3 MTT 测定顺铂半数抑制浓度

[基金项目] 广西壮族自治区自然科学基金(0728235)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:glyaojun@163.com

取对数生长期 SKOV3 细胞接种于 96 孔板,调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml,每孔接种 200 μ l,每组设 6 个复孔,培养 24 h 后加药。空白对照仅加培养液;阴性对照加入未处理的细胞悬液;A 组加入不同浓度顺铂 (0.75、1.50、3.00、6.00、12.00、24.00、48.00 μ g/ml) 培养液;B 组先加入 20 mmol/L 的 LiCl 预处理 6 h 后,再加入上述不同浓度顺铂,细胞继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ l,孵育 4 h 除去培养液,加入 DMSO 150 μ l,摇匀 15 min,酶标仪测定 490 nm 处吸光度值。抑制率计算方法同上。采用改良寇氏公式计算半数抑制浓度 (IC₅₀),实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测磷酸化 GSK-3 β 表达^[3]

取对数生长期细胞,药物组加入 20 mmol/L 的 LiCl 培养 6 h,设阴性对照组和同型对照组。胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后加入 1 ml 4%多聚甲醛,37 $^{\circ}$ C 固定 10 min,冰浴 1 min,加入 9 ml 冰甲醇,冰浴 30 min。PBS 洗涤 2 次,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,取 100 μ l 细胞悬液,药物组和阴性对照组加入 1:200 稀释的 p-GSK-3 β (ser9) 抗体溶液,同型对照组加入相同浓度的同型对照抗体,室温孵育 1 h。PBS 洗涤 2 次,用 100 μ l PBS 重悬细胞后加入 1:200 稀释的 Alexa Four 488 标记山羊抗兔抗体,室温孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次,200 μ l PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测,各组重复 3 次。

1.2.5 免疫荧光检测 GSK-3 β 定位

胰酶消化收集细胞,调整浓度为 4×10^4 个/ml,24 孔板中每孔加入 500 μ l 细胞悬液,培养 24 h。实验组加入 20 mmol/L 的 LiCl 处理 6 h,阴性对照组更换普通培养液。弃去培养液,PBS 洗涤后每孔加入 1 ml 4%的多聚甲醛溶液室温固定 20 min。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。每孔加入 500 μ l 封闭液室温封闭 1 h。弃去封闭液,每孔加入 400 μ l 1:400 稀释的 p-GSK-3 β (ser9) 抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗 3 次,每孔加入 400 μ l 1:200 稀释的 Alexa Four 488 标记山羊

抗兔抗体,室温避光孵育 30 min。PBS 漂洗 3 次,每孔加入 400 μ l 5 μ g/ml 的 DAPI 染色液室温作用 15 min 以上。PBS 漂洗 3 次,在荧光倒置显微镜下观察,用合适波段激发,保存实验结果。

1.3 统计学方法

应用 SPSS18.0 统计软件对实验数据进行统计分析,实验数据均为计量资料,用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两两比较采用 *t* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LiCl 对 SKOV3 细胞增殖活性的影响

20 mmol/L LiCl 处理 SKOV3 细胞 1、3、6、24 h 后的抑制率分别为 $(1.83 \pm 0.35)\%$ 、 $(4.77 \pm 0.55)\%$ 、 $(9.45 \pm 0.53)\%$ 、 $(12.65 \pm 0.86)\%$ 。因此,为尽可能地降低 LiCl 对顺铂抑制 SKOV3 细胞增殖活性的干扰,同时又能使 LiCl 充分作用于卵巢癌细胞,后续实验采用 20 mmol/L LiCl 孵育 6 h。

2.2 LiCl 对 SKOV3 细胞顺铂 IC₅₀ 的影响

不同浓度顺铂作用后,A 组 24、48、72h 的 IC₅₀ 分别为 (20.37 ± 0.56) 、 (7.79 ± 0.72) 、 (2.8 ± 0.32) μ g/ml,经 20 mmol/L LiCl 预处理的 B 组 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 (27.57 ± 0.81) 、 (12.15 ± 1.00) 、 (5.84 ± 0.64) μ g/ml,差异具有统计学意义 ($P=0.0002$ 、 0.0036 、 0.0019),提示 LiCl 预处理后的 SKOV3 细胞对顺铂的耐药性增加。

2.3 SKOV3 细胞内磷酸化 GSK-3 β 表达量

FACS 结果显示,阴性对照组 p-GSK-3 β (ser9) 的平均荧光强度为 661.67 ± 37.63 ,LiCl 预处理组 p-GSK-3 β (ser9) 的平均荧光强度为 1191.33 ± 30.37 ,差异有统计学意义 ($P = 0.005$,图 1)。说明 LiCl 可显著增加卵巢癌细胞内失活性磷酸化 GSK-3 β 的表达量,结合上述 MTT 的结果,提示失活性磷酸化 GSK-3 β 表达量的上调可以增强卵巢癌细胞对顺铂的耐药性。

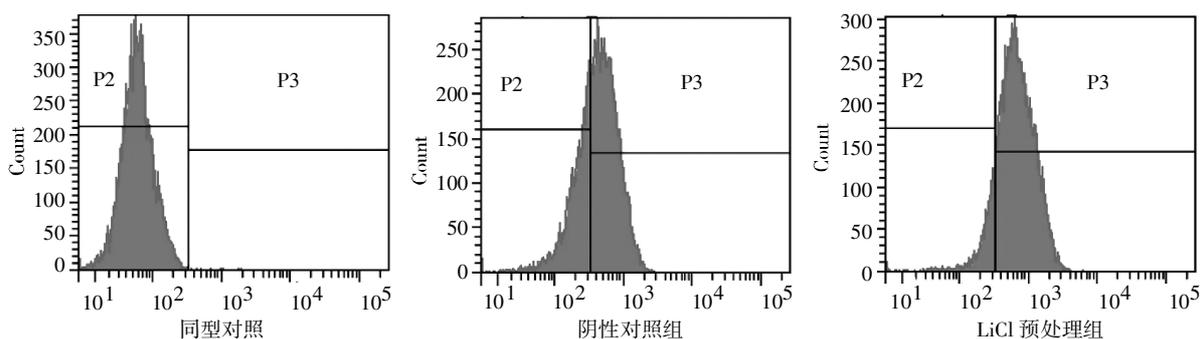


图 1 SKOV3 细胞内 p-GSK-3 β (ser9) 表达量

2.4 SKOV3 细胞内磷酸化 GSK-3β 的定位

免疫荧光结果显示(图 2),阴性对照组 SKOV3 细胞内的 p-GSK-3β (ser9)定位于胞浆内,经 LiCl 处理后的 SKOV3 细胞除了胞浆,核内亦可见 p-GSK-3β (ser9)的绿色荧光,说明 LiCl 处理后 SKOV3

细胞内的 p-GSK-3β (ser9)表达上调,且这一现象在细胞核内尤为显著,结合 MTT 的结果提示卵巢癌细胞对顺铂的耐药性除了与 p-GSK-3β (ser9)表达量的增加有关,还与 p-GSK-3β (ser9)在细胞内定位的改变有关。

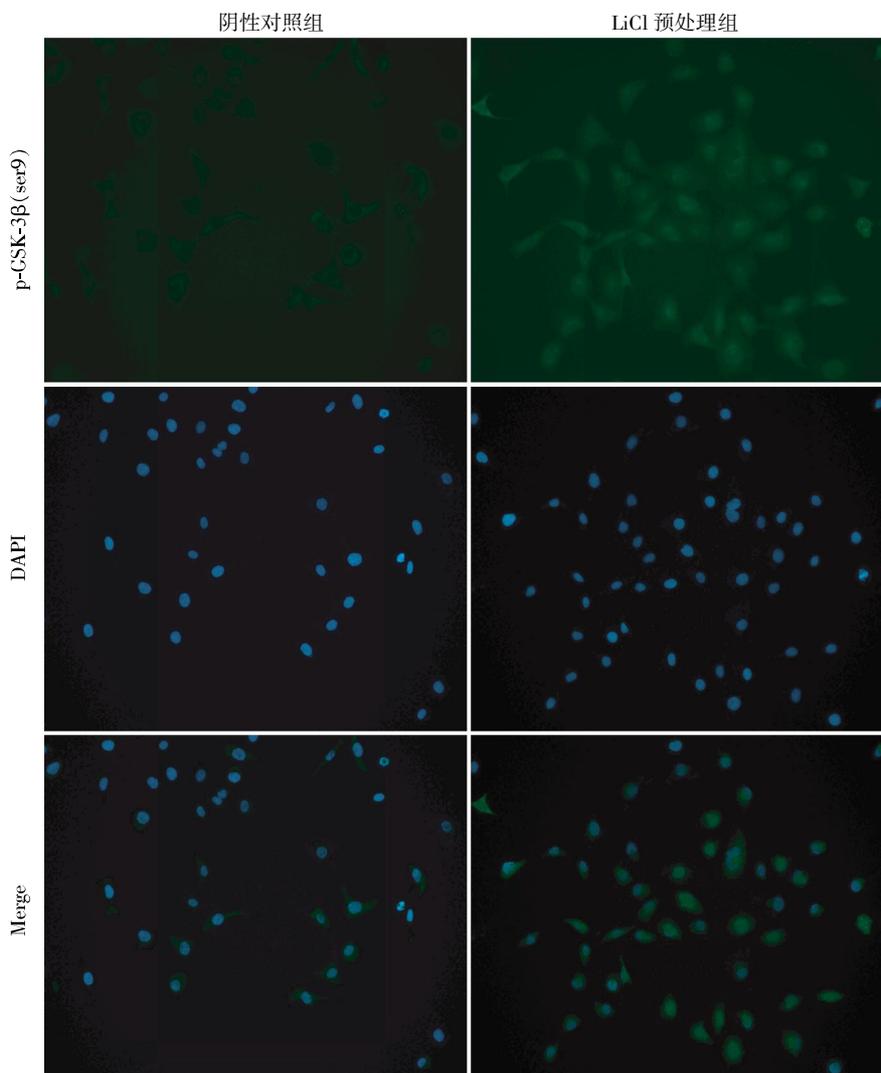


图 2 SKOV3 细胞内 p-GSK-3β (ser9)定位情况(免疫荧光,×200)

3 讨论

卵巢癌发生发展的分子机制众说纷纭^[4-5],且缺乏有效的早期诊断方法,因此发现时多为晚期,化疗耐药的存在又严重影响了卵巢癌的疗效和预后,从而导致了卵巢癌的高复发率和病死率。顺铂仍然是目前卵巢癌化疗方案中的一线用药,所以研究卵巢癌细胞对顺铂的耐药机制具有重要的临床意义。

肿瘤细胞耐药性的产生是细胞内复杂的信号通路与细胞外环境产生交互作用的结果。其中,GSK-3β 是近年来备受关注的肿瘤治疗的分子靶点之一,因为它在 Wnt、PI3K、Hedgehog、NF-κB 等多种信号转

导通路中起着关键性的调节作用,这些信号转导通路的异常与肿瘤细胞的各项生物学特性息息相关^[6]。GSK-3β 最早仅被认为是一种调节糖原代谢的蛋白激酶^[7],近年来随着研究的不断深入,发现 GSK-3β 是一种多功能蛋白激酶,它参与了癌基因转录、细胞周期调节、肿瘤细胞侵袭转移以及凋亡调控等诸多肿瘤细胞的恶性生物学作用。GSK-3β 是一种丝氨酸/苏氨酸类激酶,磷酸化是其活性的主要调节方式,GSK-3β 氨基末端的 Ser9 位点磷酸化后会显著降低 GSK-3β 活性。同时,GSK-3β 的生物学活性还与其在细胞内的定位有关,近期研究发现 GSK-3β 从胞浆移位至核内后活性增强,导致肿瘤细胞侵袭

性增强^[8,9]。因此本研究通过探讨 GSK-3 β 在卵巢癌细胞 SKOV3 中的活性和细胞内定位的改变来进一步阐明 GSK-3 β 在卵巢癌细胞顺铂耐药中的作用及其机制。

由于 GSK-3 β 是一种多功能激酶,对肿瘤具有双重调节作用,在胰腺癌^[10]、前列腺癌^[11]、骨髓瘤^[12]中起着促癌作用,然而在肺癌^[13]、乳腺癌^[14]中则是抑癌作用。就卵巢癌而言,虽然早已发现 GSK-3 β 呈高表达^[15],但是其活性改变对卵巢癌的作用还存在一定争议。Hilliard 等^[16]用裸鼠体内实验证明抑制 GSK-3 β 活性后,卵巢癌细胞增殖能力减弱,因此他们认为抑制 GSK-3 β 的活性可以成为治疗卵巢癌的新策略。近期几项研究也证实了以上观点^[17-18]。但是,Vergara 等^[19]发现失活性磷酸化 GSK-3 β 的减少是白藜芦醇诱导卵巢癌细胞 OVCAR-3 凋亡、抑制其增殖的关键环节。魏欣等^[20]则证实了卵巢癌组织标本中 p-GSK-3 β (Ser9)蛋白的阳性率显著高于良性和交界性卵巢肿瘤,且与卵巢癌的分化程度及临床分期密切相关;在用紫杉醇(PTX)、表阿霉素(EADM)、顺铂(CDDP)和卡铂(CBP)对 40 例卵巢癌标本进行体外药敏试验时发现,p-GSK-3 β (Ser9)蛋白表达阳性组的化疗药物平均抑制率均显著下降。从而得出 GSK-3 β 磷酸化失活可以增强卵巢癌细胞耐药性的结论。

从以上研究中不难看出,抑制 GSK-3 β 活性在抑制卵巢癌增殖的同时增强了卵巢癌对化疗药物的耐药性,由于本研究侧重于耐药性研究,因此本研究先用 MTT 法筛选出对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖活性影响较低的 GSK-3 β 抑制剂 LiCl 的剂量和作用时间,旨在尽可能降低 LiCl 对卵巢癌细胞增殖抑制作用的前提下探讨 GSK-3 β 活性对卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响,最终选定 LiCl 20 mmol/L 作用 6 h 来增加卵巢癌细胞内丝氨酸 9 位点磷酸化的 GSK-3 β 的表达,以此构建高表达 p-GSK-3 β (ser9)的细胞实体状态。MTT 结果显示,LiCl 预处理后 SKOV3 顺铂的 IC₅₀ 在 24、48、72 h 均有显著升高,提示卵巢癌细胞中 GSK-3 β (ser9)磷酸化水平的增加能增强其对顺铂的耐药性。流式结果显示 LiCl 预处理后 SKOV3 细胞内 p-GSK-3 β (ser9)明显上调,证实了 LiCl 预处理后卵巢癌细胞顺铂耐药性的增强可能是 GSK-3 β (ser9)磷酸化增加所致。值得一提的是,本研究采用流式细胞仪测定胞内磷酸化蛋白的表达量,相较于传统的 Western blot 法,流式能精确地检测到单个细胞内 p-GSK-3 β (ser9)的表达量,能更好反映卵巢癌细胞内 GSK-3 β (ser9)的磷酸化状态。另外,大多研究仅测定磷酸化 GSK-3 β 的水平,未探讨其细胞

内定位情况,本实验中免疫荧光的结果提示 LiCl 处理后细胞核内的 p-GSK-3 β (ser9)增加,说明卵巢癌细胞对顺铂耐药性的增强除了与 p-GSK-3 β (ser9)的增加有关,还与其在细胞内定位的改变密切相关。但是细胞核内的 p-GSK-3 β (ser9)是由核内 GSK-3 β 磷酸化而来还是胞浆内 GSK-3 β 磷酸化后转移至核内还有待进一步证实。

本实验通过采用 GSK-3 β 抑制剂 LiCl 证实,卵巢癌细胞内 GSK-3 β (ser9)磷酸化水平的升高以及细胞核内 p-GSK-3 β (ser9)水平的上调可以提高顺铂耐药性,因此解除其磷酸化的抑制状态,尤其是下调细胞核内 p-GSK-3 β (ser9)的水平有望成为逆转卵巢癌细胞顺铂耐药性的方法之一,GSK-3 β 有望成为卵巢癌治疗的新分子靶点,但是这一结果有待体内试验进一步证实。

[参考文献]

- [1] Ahmedin J, Freddie B, Melissa CM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61 (2): 69-90
- [2] Takahashi-Yanaga F. Activator or inhibitor GSK-3 as a new drug target[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86 (2): 191-199
- [3] Krutzyk PO, Trejo A, Schulz KR, et al. Phospho flow cytometry methods for the analysis of kinase signaling in cell lines and primary human blood samples[M]. 3rd Edition. American: Humana Press, 2011: 179-202
- [4] 徐娟,潘世扬,黄珮珺,等. Toll 样受体在卵巢癌发生发展中作用机制的初步探讨[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(3): 308-313
- [5] 朱巧英,孟惠娟,周金华,等. ARHI 基因诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞株 S 期阻滞、凋亡及自体吞噬的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(7): 902-906
- [6] McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(10): 2881-2911
- [7] Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase - 3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic - AMP - dependent protein kinase and phosphorylase kinase[J]. Eur J Biochem, 1980, 107 (2): 519-527
- [8] Stadler SC, Vincent CT, Fedorov VD, et al. Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 β activates TGF- β signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(29): 11851-11856
- [9] Shin SH, Lee EJ, Chun J, et al. The nuclear localization of glycogen synthase kinase 3 β is required its putative PY-nuclear localization sequences[J]. Mol Cells, 2012, 34

(4):375-382

[10] Zhou W, Wang L, Gou SM, et al. shRNA silencing glycogen synthase kinase-3 beta inhibits tumor growth and angiogenesis in pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2012, 316(2):178-186

[11] Menschikowski M, Hagelgans A, Tiebel O, et al. Regulation of thrombomodulin expression in prostate cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2012, 322(2):177-184

[12] Busino L, Millman SE, Scotto L, et al. Fbxw7 α - and GSK3-mediated degradation of p100 is a pro-survival mechanism in multiple myeloma [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(4):375-385

[13] Gao Y, Liu Z, Zhang X, et al. Inhibition of cytoplasmic GSK-3 β increases cisplatin resistance through activation of Wnt/ β -catenin signaling in A549/DDP cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336(1):231-239

[14] Sokolosky M, Chappell WH, Stadelman K, et al. Inhibition of GSK-3 β activity can result in drug and hormonal resistance and alter sensitivity to targeted therapy in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(5):820-833

[15] Rask K, Nilsson A, Brannst Rom M, et al. Wnt- signaling pathway in ovarian epithelial tumours; increased expression of beta-catenin and GSK3 beta[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(7):1298-13041

[16] Hilliard TS, Gaisina IN, Muehlbauer AG, et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibitors induce apoptosis in ovarian cancer cells and inhibit in-vivo tumor growth[J]. *Anti-cancer Drugs*, 2011, 22(10):978-985

[17] 廖菁, 丁冬, 杨宗元等. 氯化锂对卵巢癌细胞增殖凋亡影响及其机制探讨[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(4):241-245

[18] Song YH, Jeong SJ, Kwon HY, et al. Ursolic acid from *Oldenlandia diffusa* induces apoptosis via activation of caspases and phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 beta in SK-OV-3 ovarian cancer cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(7):1022-1028

[19] Vergara D, Simeone P, Toraldo D. Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells[J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(4):1078-1087

[20] 魏欣, 吕庆杰, 孙寒雪, 等. P-GSK3 β 、P-Akt在卵巢癌中的表达及与卵巢癌耐药关系的研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(3):584-589

[收稿时间]2014-09-10

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定,建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张xx^[1]研究发现……”,“李xx等^[2]认为……”,“模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:
主要责任者. 题名;其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者,出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。

(本刊编辑:接雅俐)