

异甘草素抑制胰腺癌 SW1990 细胞增殖及对 survivin 表达的影响

刘 丽¹, 张 旭², 陈 劫³, 秦 笑², 沈 洪^{4*}

(¹南京中医药大学附属医院中心实验室, 江苏 南京 210029; ²南京中医药大学江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 江苏 南京 210023; ³南京中医药大学附属医院病理科, ⁴消化科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究异甘草素对人胰腺癌 SW1990 细胞增殖及细胞内 survivin 表达的影响。方法:体外培养 SW1990 细胞,给予不同浓度的异甘草素处理,MTT 法检测异甘草素对 SW1990 细胞增殖的影响,实时定量 PCR 技术检测肿瘤细胞 survivin 基因 mRNA 的表达,蛋白免疫印迹法检测 survivin 蛋白的表达。结果:在一定浓度范围内,异甘草素能显著抑制人胰腺癌 SW1990 细胞的增殖,并呈时间与剂量依赖性,且异甘草素能显著抑制人胰腺癌 SW1990 细胞内 survivin 基因 mRNA 及蛋白的表达。结论:异甘草素对人胰腺癌 SW1990 细胞增殖有明显的抑制作用,且可能与下调 survivin 基因 mRNA 及蛋白的表达有关。

[关键词] 异甘草素;胰腺癌;增殖;survivin

[中图分类号] Q253

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)10-1383-04

doi:10.7655/NYDXBNS20151010

Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and down-regulate survivin expression in human pancreatic cancer SW1990 cells

Liu Li¹, Zhang Xu², Chen Jie³, Qin Xiao², Shen Hong^{4*}

(¹Central Laboratory, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029; ²Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ³Department of Pathology, ⁴Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of isoliquiritigenin on the proliferation of human pancreatic cancer SW1990 cells and survivin expression. **Methods:** SW1990 cells were treated with different concentrations of isoliquiritigenin and then the cell proliferation was analyzed by MTT. Survivin mRNA and protein expressions were detected with Real-time PCR and Western blot, respectively. **Results:** In a certain concentration range, isoliquiritigenin significantly inhibited the proliferation of SW1990 cells in a dose- and time-dependent manner. Real-time PCR revealed that isoliquiritigenin down-regulated mRNA expression of survivin in SW1990 cells. The protein expression of survivin was also decreased by isoliquiritigenin treatment. **Conclusion:** Isoliquiritigenin can inhibit SW1990 cells proliferation and down-regulate survivin expression.

[Key words] isoliquiritigenin; pancreatic cancer; proliferation; survivin

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1383-1386, 1414]

胰腺癌是一种预后较差和高病死率的消化系统恶性肿瘤。虽然胰腺癌患者的 1 年相对生存率

(relative survival rates, RSRs)逐年有所提高,但是胰腺癌患者的长期生存率仍然很低,只有少数患者生存超过 5 年,2000—2010 年胰腺癌患者的 5 年 RSRs 值仅为 6.9%^[1]。统计分析表明胰腺癌在我国的发病率亦呈逐年上升趋势^[2]。虽然目前胰腺癌的临床治疗有手术、化疗和放疗等多种手段,但仍然难以取得良好的治疗效果。作为一种具有简单查尔酮结构的黄酮类化合物,异甘草素(isoliquiritigenin,

[基金项目] 欧盟第七框架项目(PIRSES-GA-2013-612589);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);科技部十一五支撑计划(2006BAI11B08-01);南京中医药大学附属医院院级课题项目(Y11008)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:shenhong999@163.com

ISL)存在于中药甘草和豆芽、葱等植物中^[3],具有抗炎^[4]、缺血-再灌注损伤保护^[5]、抗病毒^[6]、抗肿瘤^[7]等多种药理活性。以往研究表明,异甘草素可对多种肿瘤细胞如肺癌^[3]、胃癌^[8]、宫颈癌^[9]、乳腺癌^[10]、前列腺癌^[11]、黑色素瘤^[12]、白血病^[13]等具有生长抑制作用,但异甘草素对胰腺癌肿瘤细胞作用的研究目前尚未见报道。本研究拟探讨异甘草素对胰腺癌 SW1990 细胞增殖的影响,并观察异甘草素对肿瘤增殖相关的 survivin 基因 mRNA、蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 (Hyclone 公司, 美国), 胎牛血清 (GIBCO 公司, 美国), 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(Sigma 公司, 美国), 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, AMRESCO 公司, 美国)。TRIZOL 试剂(Invitrogen 公司, 美国)、逆转录反应试剂盒、定量 PCR 试剂(TaKaRa 公司, 日本)。RIPA 蛋白裂解液、抗 β -actin 抗体和超敏 ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天生物技术研究所)。survivin 抗体(Bio basic 公司, 加拿大)。异甘草素(纯度 98%, 南京泽朗医药科技有限公司)。人胰腺癌细胞株 SW1990 来源于美国 ATCC。Survivin 基因上游引物序列为 5'-AAGGACCACCGCATCTCT-3', 下游引物序列为 5'-CAAGTCTGGCTCGTTCTCAGT-3'; GAPDH 基因上游引物序列为 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3', 下游引物序列为 5'-AGTCTTCCACGATACCAAAGT-3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人胰腺癌细胞株 SW1990 置于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 0.25%胰蛋白酶消化细胞进行传代培养。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖

将生长状态良好的 SW1990 细胞接种于 96 孔细胞培养板内(约 1×10⁴ 个/孔), 孵育 24 h 后, 更换含不同浓度 (20、40、60、80 μ mol/L) 异甘草素的 200 μ L 细胞培养液, 并设立溶剂 DMSO 对照组。孵育 24、48 h 之后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 继续孵育 4 h。弃上清, 每孔分别加入 150 μ L DMSO, 室温振荡, 于 490 nm 测定各孔吸光值。

1.2.3 实时定量 PCR 技术检测细胞内 survivin 基因 mRNA 的表达

SW1990 细胞(约 5×10⁵ 个/孔)接种在 6 孔细胞

培养板上, 24 h 孵育培养后, 每孔加入不同浓度异甘草素 (0、40、60、80 μ mol/L), 对照组为加 DMSO 的培养液。药物作用 24 h 后, 使用 TRIzol 试剂按照说明书操作步骤提取总 RNA, -70℃保存。参照逆转录试剂说明书配制逆转录反应体系, 逆转录反应程序为 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ ∞ 。参照试剂说明书配制定量 PCR 反应体系, 于定量 PCR 仪上运行 PCR 反应 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s 共 40 个循环, 并进行熔解曲线反应分析。survivin 基因的表达以 GAPDH 基因为参照, 数值用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 表示。

1.2.4 蛋白免疫印迹实验检测细胞内 survivin 蛋白的表达

SW1990 细胞(约 5×10⁵ 个/孔)接种于 6 孔细胞培养板中, 培养过夜后加入不同浓度异甘草素(0、40、80 μ mol/L)。药物作用 24 h 后, 按照 RIPA 裂解液试剂说明书收集细胞蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。配制 12%SDS-PAGE 分离胶和 5%浓缩胶, 100 V 恒压电泳上样蛋白后, 再 20 mA 恒流电转过夜。取膜室温封闭 1 h, 4℃孵育 survivin 抗体(1:500 稀释)和 β -actin 抗体(1:1 000 稀释)过夜。洗膜 3 次, 室温孵育二抗 2 h。ECL 发光液进行显影, 获取图像。

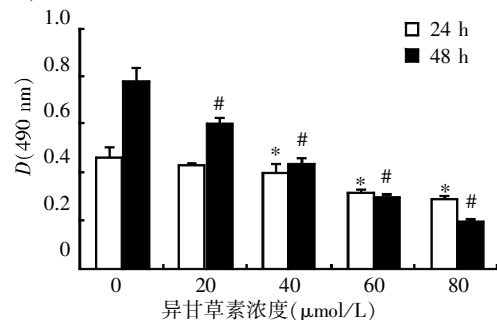
1.3 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件对实验数据进行 One-Way ANOVA 分析, 以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异甘草素对 SW1990 细胞增殖的抑制作用

异甘草素对体外培养的 SW1990 细胞具有显著抑制增殖的作用, 且抑制作用随着异甘草素浓度增大、作用时间延长而加强, 呈时间和剂量依赖性(图 1)。



异甘草素作用细胞 24 h 时, 与 DMSO 对照组相比, * $P < 0.01$; 异甘草素作用细胞 48 h 时, 与 DMSO 对照组相比, # $P < 0.01$ ($n=6$)。

图 1 MTT 检测异甘草素处理胰腺癌 SW1990 细胞的增殖
Figure 1 Proliferation of ISL-treated pancreatic cancer Sw1990 cells detected by MTT

2.2 倒置显微镜观察胰腺癌 SW1990 细胞的形态变化

图 2 显示异甘草素处理 SW1990 细胞 24 h 后,细胞密度较 DMSO 溶剂对照组变得稀疏,且随着药物浓度的增加,贴壁生长的细胞逐渐减少,缩小、变圆的细胞逐渐增加,漂浮的细胞亦逐渐增多,细胞活力下降。

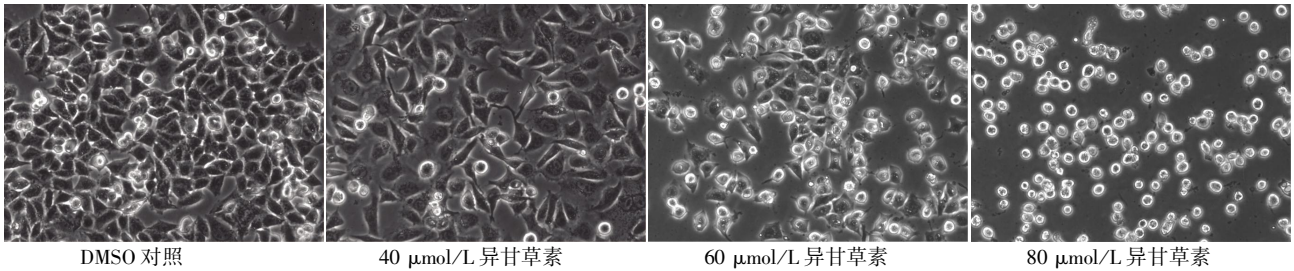


图 2 不同浓度异甘草素处理 SW1990 细胞 24 h 的细胞形态($\times 200$)
Figure 2 Cellular morphology of SW1990 cells treated with different concentrations of ISL for 24 h

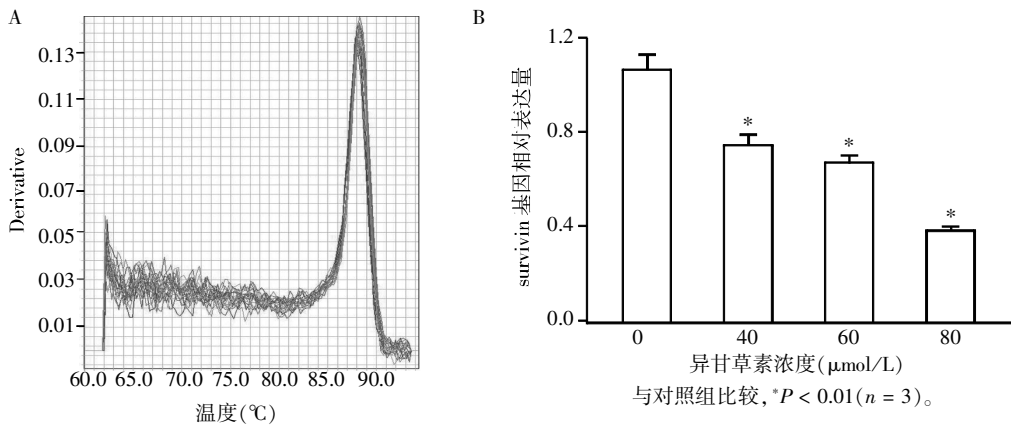


图 3 异甘草素处理 SW1990 细胞 24 h 后 survivin 基因的 mRNA 表达
Figure 3 mRNA expression of survivin in SW1990 cells treated with ISL for 24 h

2.4 异甘草素处理对胰腺癌 SW1990 细胞中 survivin 蛋白表达的影响

从图 4 可看出,40 $\mu\text{mol/L}$ 异甘草素作用 24 h 后的 SW1990 细胞 survivin 蛋白较 DMSO 对照组明显减少,而 80 $\mu\text{mol/L}$ 异甘草素处理 24 h 后,SW1990 细胞中 survivin 蛋白表达量则变得极少。

3 讨论

survivin 是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 家族中的一员,其基因定位于染色体 17q25。survivin 显著表达于大多数人类恶性肿瘤细胞中,而在对应的成人正常组织中不表达^[14]。以往研究表明,survivin 与胰腺癌的增殖密切相关。在胰腺癌中,88%的癌细胞中可检测到 survivin 表达,且 survivin 表达与细胞增殖指数增高相关^[15]。组织病理

2.3 异甘草素处理对胰腺癌 SW1990 细胞中 survivin 基因表达的影响

survivin 基因定量 PCR 反应的熔解曲线呈单一峰曲线(图 3A)。与 DMSO 溶剂对照组比较,不同浓度的异甘草素(40、60、80 $\mu\text{mol/L}$)处理 SW1990 细胞 24 h 后,survivin 基因的 mRNA 表达水平均显著下调($P < 0.01$,图 3B)。

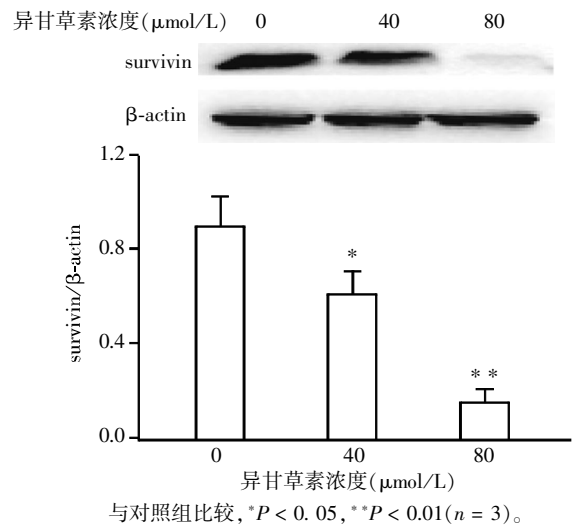


图 4 异甘草素处理 SW1990 细胞 24 h 后 survivin 蛋白表达
Figure 4 Expression of survivin protein in SW1990 cells treated with ISL for 24 h

学分析胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(intraductal papillary-mucinous tumor, IPMT) 的腺瘤和癌组织中 survivin 的表达, 发现从 IPMT 腺瘤到原位癌, survivin 的免疫反应明显增加, 且这种转变与肿瘤细胞的凋亡下降显著相关^[16]。

survivin 不仅与肿瘤的增殖相关, 还可以作为胰腺癌治疗的靶点, 即操控 survivin 分子的表达能够诱导肿瘤细胞的凋亡, 提高胰腺癌的化疗和放疗疗效^[15]。例如将 survivin 反义寡核苷酸(oligonucleotide, ODN)转染胰腺癌 PANC-1 细胞, survivin 反义寡核苷酸能以剂量依赖的方式下调细胞内 survivin 的 mRNA 和蛋白表达, 并且能够抑制胰腺癌细胞生长和诱导细胞凋亡^[17]。与吉西他滨单独作用胰腺癌细胞相比, 使用含有阻断 survivin 表达的显性负突变体 survivin-T34A 的外泌小体(exosome), 或和吉西他滨联合使用, 都能够显著增加胰腺癌细胞的凋亡发生^[18]。当胰腺癌细胞 survivin 和 XIAP 同时被抑制表达时, 胰腺癌细胞的增殖能力会明显下降, 而细胞对 5-FU 的致敏会显著增加, 吉西他滨的疗效也得到显著提高^[19]。抑制 survivin 的表达还可以显著提高胰腺癌细胞对放射治疗的敏感性^[20-21]。

本研究结果证实异甘草素不仅可以抑制胰腺癌细胞 SW1990 的增殖, 减少生长状态贴壁细胞的数量, 降低细胞活力, 还能够显著下调与胰腺癌细胞增殖有密切关联的 survivin 基因 mRNA 和蛋白的表达。由于目前传统的治疗手段对于胰腺癌患者的生存率提高很有限^[19], 因此异甘草素可考虑作为抗胰腺癌治疗的一种有潜力的化合物进行研究, 相关实验结果也可为临床探索胰腺癌治疗提供新的思路和方法。针对异甘草素抑制胰腺癌增殖及与 survivin 相关的信号通路的分子作用机制, 今后还值得进一步深入地研究。

[参考文献]

- [1] Sun H, Ma H, Hong G, et al. Survival improvement in patients with pancreatic cancer by decade: A period analysis of the SEER database, 1981-2010 [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6747
- [2] 陈万青, 王庆生, 张思维, 等. 2003~2007 年中国胰腺癌发病与死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(4): 248-253
- [3] Ii T, Satomi Y, Katoh D, et al. Induction of cell cycle arrest and p21(CIP1/WAF1) expression in human lung cancer cells by isoliquiritigenin [J]. *Cancer Lett*, 2004, 207(1): 27-35
- [4] Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, et al. Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96(6): 1087-1100
- [5] An W, Yang J, Ao Y. Metallothionein mediates cardioprotection of isoliquiritigenin against ischemia-reperfusion through JAK2/STAT3 activation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(11): 1431-1437
- [6] Adianti M, Aoki C, Komoto M, et al. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species[J]. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(3): 180-187
- [7] Yamamoto S, Aizu E, Jiang H, et al. The potent anti-tumor-promoting agent isoliquiritigenin[J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12(2): 317-323
- [8] Ma J, Fu NY, Pang DB, et al. Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Planta Med*, 2001, 67(8): 754-757
- [9] Hsu YL, Chia CC, Chen PJ, et al. Shallot and licorice constituent isoliquiritigenin arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and initiation of the mitochondrial system in human cervical carcinoma HeLa cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(7): 826-835
- [10] Wang Z, Wang N, Han S, et al. Dietary compound isoliquiritigenin inhibits breast cancer neoangiogenesis via VEGF/VEGFR-2 signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68566
- [11] Jung JI, Chung E, Seon MR, et al. Isoliquiritigenin (ISL) inhibits ErbB3 signaling in prostate cancer cells [J]. *Biofactors*, 2006, 28(3-4): 159-168
- [12] Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, et al. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells [J]. *BioSci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(9): 1813-1820
- [13] Li D, Wang Z, Chen H, et al. Isoliquiritigenin induces monocytic differentiation of HL-60 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(6): 731-736
- [14] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921
- [15] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(6): 886-892
- [16] Jinfeng M, Kimura W, Sakurai F, et al. Histopathological study of intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas: special reference to the roles of Survivin and p53 in tumorigenesis of IPMT [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2002, 32(2-3): 73-81
- [17] 戴德坚, 陆才德, 赖日勇, 等. 靶向抑制 survivin 对胰腺癌细胞增殖和凋亡效应的影响 [J]. *中华医学杂志*, (下转第 1414 页)