

PARP 抑制剂对胰腺癌细胞的抗肿瘤机制及耐药性分析*

王蒲雄志, 夏光慨, 卢家俊, 袁周**, 史向军, 黄新余

(上海交通大学附属第六人民医院 肝胆胰外科, 上海 200233)

[摘 要] 目的: 分析聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 抑制剂对胰腺癌细胞的抗肿瘤机制及耐药性。方法: 将人胰腺癌顺铂耐药细胞株 PATU-8988/DDP 细胞分为对照组、PARP 抑制组、联合顺铂组, 对照组细胞加入 DMEM 培养液培养 24 h, PARP 抑制组细胞加入 10 μmmol/L PARP 抑制剂 AG014699 培养, 联合顺铂组细胞加入 10 μmmol/L PARP 抑制剂 AG014699 及 10 mg/L 顺铂培养; 3 组细胞培养 24 h 后, 采用 MTT 法检测各组细胞的增殖率, 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率, Western blot 法检测各组细胞中 PARP 蛋白表达水平。结果: 3 组细胞培养 24 h 时的增殖率比较, 联合顺铂组 < PARP 抑制组 < 对照组, 两两比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3 组细胞培养 24 h 时的细胞凋亡率比较, 联合顺铂组 > PARP 抑制组 > 对照组, 两两比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3 组细胞培养 24 h 时的细胞中 PARP 蛋白表达水平比较, PARP 抑制组及联合顺铂组显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 联合顺铂组与 PARP 抑制组细胞中 PARP 蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: PARP 抑制剂可抑制胰腺癌细胞的增殖及促进胰腺癌细胞凋亡, 提高胰腺癌细胞对顺铂的敏感性, 其机制可能与 PARP 抑制剂下调 PARP 表达有关。

[关键词] 胰腺肿瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 基因表达; 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂; 耐药; 机制

[中图分类号] R736.7 [文献标识码] A [文章编号] 2096-8388(2020)05-0556-05

DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2020.05.010

Analysis on the Anti-Tumor Mechanisms and Drug Resistance of PARP Inhibitors to Pancreatic Cancer Cells

WANG Puxiongzi, XIA Guangkai, LU Jiajun, YUAN Zhou, SHI Xiangjun, HUANG Xinyu
(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Sixth Affiliated People's Hospital
of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

[Abstract] Objective: To investigate the antitumor mechanism and drug resistance of poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitor to pancreatic cancer cells. Methods: Cells of human pancreatic cancer cisplatin resistant cell line patu-8988/DDP were divided into control group (group A), PARP inhibition group (group B) and cisplatin combination group (group C). Group A was cultured in DMEM medium for 24 h, group B was cultured with 10 μmmol/L PARP inhibitor AG014699 for 24 h, and group C was cultured with 10 μmmol/L PARP inhibitor AG014699 and 10 μg/mL cisplatin for 24 h. After 24 h of cell culture, the proliferation rates of PATU-8988/DDP cells, apoptosis rates of PATU-8988/DDP cells and the PARP protein expression levels in PATU-8988/DDP cells in each group were detected by MTT assay, flow cytometry, and Western blot respectively. Results: The cell proliferation rates were compared among the three groups 24 h after cell culture, it was showed that the cisplatin combination group < PARP inhibition group < control group and the difference was statistically

* [基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目 (18ZR1429100)
** 通信作者 E-mail: zhouyuan851@163.com

significant when compared in pairs ($P < 0.05$). The apoptosis rates were compared among the three groups 24 h after cell culture, it was showed that the cisplatin combination group > PARP inhibition group > control group and the difference was statistically significant when compared in pairs ($P < 0.05$). The PARP protein expression levels in the cells were compared among the three groups 24h after cell culture, the PARP inhibition group and the cisplatin combination group were significantly lower than the control group 24 h after cell culture and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); but the PARP protein expression levels between the cisplatin combination group and the PARP inhibition group were compared, there was no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** PARP inhibitors can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of pancreatic cancer cells as well as can improve the sensitivity of pancreatic cancer cells to cisplatin and enhance the chemical toxicity of cisplatin to pancreatic cancer cells. The mechanism may be related to the down-regulation of PARP expression by PARP inhibitors.

[**Key words**] pancreatic neoplasms; cell proliferation; apoptosis; gene expression; poly ADP-ribose polymerase(PARP) inhibitor; drug resistance; mechanism

胰腺癌是消化道的恶性肿瘤,发病率居我国恶性肿瘤第 10 位^[1]。胰腺癌是预后极差的恶性肿瘤之一,死亡率居我国恶性肿瘤第 6 位^[2]。随着人们生活方式的不断改变及生活水平不断提高,胰腺癌的发病比例和死亡比例逐年增加^[3]。目前对于胰腺癌患者临床多采用外科手术为主、放射性治疗和化学药物治疗为辅的综合治疗方案,能够缓解临床症状,缩小原发病灶,减缓肿瘤发展速度,但胰腺癌恶性程度极高,病情进展迅速,手术切除率低,对放疗敏感性低,患者往往预后不良,5 年生存率不足 5%,严重威胁人类健康^[4-6]。因此,寻找有效的治疗方法对提升胰腺癌患者的预后尤为重要。聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶(poly ADP-ribose polymerase,PARP)是一种重要的 DNA 修复酶,广泛存在于真核生物细胞核中,具有维持基因组稳定、参与 DNA 复制、转录及修复、保持染色体结构完整性的作用,在细胞生物学行为、恶性肿瘤发生及进展过程中发挥关键的作用^[7-8]。随着肿瘤分子生物学的不断发展,分子靶向治疗逐渐应用于临床肿瘤治疗^[9]。PARP 抑制剂是一种新型分子靶向药物,能够影响癌细胞的自我复制,在胃癌^[10]、乳腺癌^[11]、卵巢癌^[12]等恶性肿瘤的靶向治疗中有较好的应用,但其在胰腺癌中的应用较为少见。本研究以人胰腺癌顺铂耐药细胞株 PATU-8988/DDP 细胞作为研究对象,采用 PARP 抑制剂 AG014699 及顺铂处理细胞,观察处理后细胞的增殖及凋亡的变化,同时检测细胞中 PARP 蛋白表达水平,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人胰腺癌顺铂耐药细胞株 PATU-8988/DDP,购于上海美轩生物科技有限公司。

1.1.2 实验分组及处理 将 PATU-8988/DDP 细胞分为对照组、PARP 抑制组及联合顺铂组,进行原代培养,待细胞融合度达 85% 时,细胞消化、传代,取对数生长期的 PATU-8988/DDP 细胞,以 5×10^6 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中,用含 10% 胎牛血清(上海源叶生物科技有限公司)的 DMEM 培养基(上海觅拓生物科技有限公司),于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱(常州普天仪器制造有限公司)培养,待细胞融合度达 90% 时,对照组加入 DMEM 培养液培养 24 h,PARP 抑制组加入 10 μmmol/L PARP 抑制剂 AG014699(上海联迈生物工程有限公司)培养 24 h,联合顺铂组加入 10 μmmol/L PARP 抑制剂 AG014699 及 10 mg/L 顺铂(南京赛泓瑞生物科技有限公司)培养 24 h。

1.2 方法

1.2.1 PATU-8988/DDP 细胞增殖率检测 采用 MTT 法,取 1.1.2 项下的各组 PATU-8988/DDP 细胞,吸掉培养液,每孔加入 MTT 溶液(武汉益普生物科技有限公司)20 μL,37 ℃ 孵育 4 h,每孔加入二甲基亚砷溶液(北京金克隆生物技术有限公司)150 μL,振荡 10 min,采用酶标仪(上海枫起生物科技有限公司,型号 Infinite ® F50)测定 490 nm 波长下 OD 值,计算细胞增值率,细胞增殖率 = (处理

组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。

1.2.2 PATU-8988/DDP 细胞凋亡率检测 采用流式细胞术,取 1.1.2 项下的各组 PATU-8988/DDP 细胞,吸掉培养液,用 1 × Tris Buffer 缓冲液(武汉华联科生物技术有限公司)洗涤,0.25% 胰蛋白酶(上海圻明生物科技有限公司)消化,制备细胞悬液,向流式管中依次加入细胞悬液 300 μL、PI 染液(上海赫果生物科技有限公司)5 μL、Annexin V-FITC(北京博迈斯科技发展有限公司)5 μL,避光反应 15 min,采用流式细胞仪(上海迪奥生物科技有限公司,型号 CyFlow® Cube 6)检测各组 PATU-8988/DDP 细胞凋亡率。

1.2.3 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达 采用 Western blot 法,取 1.1.2 项下的各组 PATU-8988/DDP 细胞,加入细胞裂解液(上海子起生物科技有限公司),充分裂解,采用离心机(广州菲罗门科学仪器有限公司,型号 Selectspin™ 17R),13 000 r/min 离心 15 min,取上清液,使用 BCA 试剂盒(北京泽平科技有限责任公司)测定白浓度并对蛋白定量,取总蛋白上样于 10% SDS-PAGE 胶、电泳、切胶、转膜,5% 脱脂奶粉封闭液(上海君瑞生物技术有限公司)封闭、加入 1 : 200 稀释的 PARP 单克隆抗体一抗(上海钰博生物科技有限公司)、1 : 400 稀释的 β-actin 单克隆抗体一抗(南京善本生物科技有限公司),4 ℃ 孵育过夜,PBS 溶液(上海春晓生物技术有限公司)漂洗,加山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Invitrogen 公司),37 ℃ 孵育 1 h,采用 ECL 发光试剂盒(上海传秋生物科技有限公司)显色,洗片后显影、定影,应用 Image Quant TL 软件(上海浩然生物技术有限公司)进行分析,选取 β-actin 为内参照,以 PARP 灰度值与 β-actin 灰度值之比表示 PARP 蛋白表达量。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料用率(%)表示,数据比较采用χ² 检验;计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,两两计量资料比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PATU-8988/DDP 细胞增殖率

结果显示,培养 24 h 时,3 组细胞增殖率比较,联合顺铂组 < PARP 抑制组 < 对照组,两两比较,

差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 各组 PATU-8988/DDP 细胞增殖率($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Cell proliferation rate of PATU-8988/DDP cells in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	PATU-8988/DDP 细胞增殖率/%
对照组	95.28 ± 4.41
PARP 抑制组	78.25 ± 3.76 ⁽¹⁾
联合顺铂组	53.78 ± 2.88 ⁽¹⁾⁽²⁾
<i>F</i>	187.040
<i>P</i>	< 0.001

注:⁽¹⁾与对照组比较,*P* < 0.001;⁽²⁾与 PARP 抑制组比较,*P* < 0.001。

⁽¹⁾与治疗前比较,*P* < 0.01。

2.2 PATU-8988/DDP 细胞凋亡率

结果显示,培养 24 h 时,3 组细胞增殖率比较,联合顺铂组 > PARP 抑制组 > 对照组,两两比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 各组 PATU-8988/DDP 细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Apoptosis rate of PATU-8988/DDP cells in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	PATU-8988/DDP 细胞凋亡率/%
对照组	7.33 ± 1.17
PARP 抑制组	15.20 ± 2.54 ⁽¹⁾
联合顺铂组	24.91 ± 3.23 ⁽¹⁾⁽²⁾
<i>F</i>	76.470
<i>P</i>	< 0.001

注:⁽¹⁾与对照组比较,*P* < 0.001;⁽²⁾与 PARP 抑制组比较,*P* < 0.001。

2.3 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达

结果显示,培养 24 h 时,PARP 抑制组及联合顺铂组 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达水平显著低于对照组,差异具有统计学意义(*P* < 0.05);联合顺铂组与 PARP 抑制组 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见图 1、表 3。

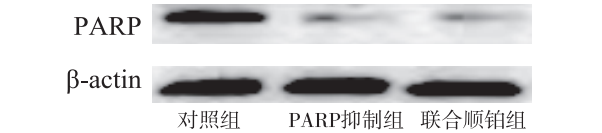


图 1 各组 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达量
Fig. 1 Expression of PARP protein of PATU-8988/DDP cells in each group

表 3 各组 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Levels of PARP protein expression of PATU-8988/DDP cells in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	PARP 蛋白表达水平
对照组	2.87 ± 1.23
PARP 抑制组	1.11 ± 0.49 ⁽¹⁾
联合顺铂组	1.09 ± 0.47 ⁽¹⁾
F	9.520
P	0.002

注:⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.001$ 。

3 讨论

胰腺癌病因尚不明确,目前认为与环境污染、吸烟、饮酒、过量饮用咖啡、高脂肪饮食、高蛋白饮食及遗传因素有关,已经成为严重威胁人类健康的主要公共卫生问题之一^[13]。外科手术是目前治疗胰腺癌的主要方法,但胰腺癌初期症状不具备特异性,早期诊断困难,60% ~ 80% 患者因上腹部饱胀不适、恶心、呕吐、腹泻、消瘦、疼痛而就诊时多已处于中晚期,已不能行外科手术治疗^[14-15]。且胰腺为人体重要腺体之一,解剖关系隐匿且复杂,手术不能彻底切除,癌细胞可向腹腔内种植,还可沿切口面、缝线处转移,术后复发率高^[16-17]。放射性治疗和化学药物治疗是目前治疗胰腺癌的辅助方法,能够清除原发病灶,阻止肿瘤进展,但具有不良反应多、易产生耐药性等不足^[18],因此寻找有效治疗方案对降低胰腺癌病死率有着重要意义。

PARP 是一种广泛存在于真核生物细胞核中的 DNA 修复酶,能够催化 ADP-核糖单元从烟酰胺腺嘌呤二核苷酸转移到各种受体蛋白,维持基因组稳定,参与 DNA 复制、转录及修复,保持染色体结构完整性,并在细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡等细胞生物学过程中发挥关键作用^[19-20]。PARP 也是恶性肿瘤发生、发展过程中的主要转录因子,抑制其活性可以增强 DNA 损伤类化疗药物及放射性治疗的治疗效果,现已成为抗肿瘤治疗的新靶点之一^[21]。随着广大学者对肿瘤分子生物学的不断深入研究,分子靶向治疗逐渐应用于临床治疗各类恶性肿瘤。PARP 抑制剂为 DNA 修复酶抑制剂,是一种新型分子靶向药物,能够通过靶向阻断癌细胞 DNA 修复而发挥抗癌作用^[22-23]。有研究发现,沉默卵巢癌细胞中 PARP 表达后可抑制 DNA 损伤修

复机制,增强化疗药物对卵巢癌细胞 DNA 损伤,促进卵巢癌细胞凋亡,抑制卵巢癌细胞增殖^[24]。也有研究发现,PARP 抑制剂能够上调微小核糖核苷酸 664b-5p (Microribonucleotide 664b-5p, miR-664b-5p) 表达而增加 BRCA1 突变三阴性乳腺癌对化疗药物的敏感性^[25]。本研究的结果与上述研究相符,结果显示 PARP 抑制组 PATU-8988/DDP 细胞增殖率显著低于对照组,PARP 抑制组 PATU-8988/DDP 细胞凋亡率显著高于对照组,提示 PARP 抑制剂可抑制胰腺癌细胞的增殖及促进胰腺癌细胞的凋亡。本研究还发现联合顺铂组 PATU-8988/DDP 细胞增殖率显著低于 PARP 抑制组、而细胞凋亡率显著高于 PARP 抑制组,提示 PARP 抑制剂可提高胰腺癌细胞对顺铂的敏感性,增强顺铂对胰腺癌细胞的化学毒性。本研究另一个结果还发现,PARP 抑制组 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达水平显著低于对照组,而联合顺铂组 PATU-8988/DDP 细胞中 PARP 蛋白表达水平与 PARP 抑制组差异不大,提示 PARP 抑制剂可能通过下调 PARP 表达发挥对胰腺癌细胞的抗肿瘤作用,降低胰腺癌细胞对顺铂的耐药性,这可为 PARP 抑制剂的临床应用提供一定的理论基础。

综上所述,PARP 抑制剂可抑制胰腺癌细胞增殖,促进胰腺癌细胞凋亡,提高胰腺癌细胞对顺铂的敏感性,增强顺铂对胰腺癌细胞的化学毒性,其机制可能与 PARP 抑制剂下调 PARP 表达有关。但 PARP 抑制剂抗胰腺癌的机制是否还有其他,有待进一步研究。

4 参考文献

[1] 黄巍,孙诚谊,喻超,等. microRNA-100 对胰腺癌细胞侵袭和转移能力的影响及机制[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(7):749-753.

[2] 中国抗癌协会胰腺癌专业委员会,赵玉沛,虞先濬,等. 胰腺癌综合诊治指南(2018 版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018,1(10):256-258.

[3] LICHTENSTEIN G R. Pancreatic cancer[J]. Gastroenterology & Hepatology, 2017, 13(5):255-258.

[4] 白燕南,严茂林. 胰腺癌综合诊治指南(2018 版)外科相关部分解读[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2018, 20(6):669-672.

[5] 王春友,金钢,戴梦华,等. 胰腺癌新辅助治疗的选择策略[J]. 中华消化外科杂志, 2019, 18(7):648-656.

- [6] 张贤彬,董鑫,闫玉梅,等. 手术联合辅助治疗与单纯手术治疗可切除胰腺癌临床疗效的 Meta 分析[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(12):1222-1228.
- [7] ADACHI K, MIYAJIMA S I, NAKAMURA N, et al. Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase activation in the pathogenesis of periodontitis in diabetes[J]. Journal of Clinical Periodontology, 2017, 44(10):256-257.
- [8] ROBU M, SHAH R G, PUROHIT N K, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 escorts XPC to UV-induced DNA lesions during nucleotide excision repair[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(33):6981-6983.
- [9] 赵洪焕,孔艺璇,章广玲,等. 微小 RNA 在恶性肿瘤靶向治疗中的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 12(5):562-564.
- [10] 陈祖华,张滕琦,高静,等. PARP 抑制剂 SC10914 在胃癌中的抗肿瘤作用及机制探索[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(1):108-114.
- [11] 王宏宇,王伏生. PARP 抑制剂在三阴性乳腺癌中的作用及研究进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(9):25-29.
- [12] 药品资讯网. FDA 批准 Clovis 的 PARP 抑制剂 rucaparib 用于 BRCA 变异晚期卵巢癌[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(2):11-13.
- [13] GONG J, SACHDEV E, ROBBINS L, et al. Statins and pancreatic cancer (Review) [J]. Oncology Letters, 2017, 3(7):771-773.
- [14] NEOPTOLEMOS J P, JÖRG KLEEFF, MICHL P, et al. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2018, 15(3):1817-1820.
- [15] CHEN Z, LIN L, GJIKI E, et al. Selective treatment of pancreatic cancer cells by plasma-activated saline solutions[J]. IEEE Transactions on Radiation & Plasma Medical Sciences, 2018, 2(2):116-120.
- [16] LUO G, LIU C, GUO M, et al. Potential biomarkers in lewis negative patients with pancreatic cancer[J]. Annals of Surgery, 2017, 265(4):800-802.
- [17] HALBROOK C J, LYSSIOTIS C A. Employing metabolism to improve the diagnosis and treatment of pancreatic cancer[J]. Cancer cell, 2017, 31(1):5-19.
- [18] DING F, ZHANG S, GAO S, et al. MiR-137 functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting MRGP: MiR-137 in pancreatic cancer[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(6):2563-2565.
- [19] KURGINA T A, ANARBAEV RO, SUKHANOVA M V, et al. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity[J]. Analytical Biochemistry, 2018, 56(7):545-547.
- [20] RAJAWAT J, SHUKLA N, MISHRA D P. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1: A therapeutic hope in gynecologic cancers[J]. Frontiers in Bioscience, 2017, 9(3):214-216.
- [21] PIAO L, FUJIOKA K, NAKAKIDO M, et al. Regulation of poly ADP-Ribose polymerase 1 functions by post-translational modifications[J]. Frontiers in Bioscience, 2017, 23(1):568-570.
- [22] THOMAS A, MURAI J, POMMIER Y. The evolving landscape of predictive biomarkers of response to PARP inhibitors[J]. Journal of Clinical Investigation, 2018, 128(5):5562-5564.
- [23] 郑礼胜. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂 rucaparib [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(6):914-918.
- [24] 刘国艳,薛凤霞. PARP 抑制剂在卵巢上皮性癌分子靶向治疗中的研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 12(6):473-475.
- [25] 李少钟,刘静,张国君. PARP 抑制剂在 BRCA 胚系突变乳腺癌治疗中作用的研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2019, 11(6):748-752.

(2020-03-09 收稿, 2020-05-12 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 冉海勇