

· 论 著 ·

# 糖原合成酶激酶 3 $\beta$ 对卵巢癌紫杉醇耐药性的影响及机制研究

朱饮源, 姚 军, 李 曼

**[摘要]** **目的** 探讨糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )对卵巢癌紫杉醇耐药性的影响及机制。**方法** 运用氯化锂(LiCl)增加卵巢癌细胞内失活性 GSK-3 $\beta$  的表达,MTT 法测定紫杉醇的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>),流式细胞仪检测 p-GSK-3 $\beta$ (ser9)的表达量,免疫荧光观察其细胞内定位情况。**结果** LiCl 20mmol/L 处理 1 h 后,24、48、72 h SKOV3 细胞紫杉醇的 IC<sub>50</sub> 从(10.11 ± 0.87)、(1.07 ± 0.17)、(0.03 ± 0.01)  $\mu$ g/mL 增加至(11.56 ± 0.96)、(1.74 ± 0.24)、(0.06 ± 0.01)  $\mu$ g/mL,除 24 h 外差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。LiCl 处理后 SKOV3 细胞内 p-GSK-3 $\beta$ (ser9)的平均荧光强度由(661.67 ± 37.63)增加到(841.67 ± 41.53),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。LiCl 处理后 SKOV3 细胞核内 p-GSK-3 $\beta$ (ser9)表达水平上调。**结论** GSK-3 $\beta$  失活性磷酸化水平的增加,尤其是细胞核内表达水平的上调可导致卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的增强。

**[关键词]** 糖原合成酶激酶 3 $\beta$ ;卵巢癌;紫杉醇;耐药性

**[中图分类号]** R737.31 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.01.009

## The effects of GSK-3 $\beta$ on paclitaxel chemoresistance of ovarian cancer cells

ZHU Yin-yuan, YAO Jun, LI Man. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of GSK-3 $\beta$  on paclitaxel chemoresistance of ovarian cancer cells. **Methods** SKOV3 cells was treated with LiCl 20 mmol/L for 1 hour to enhance the expression of p-GSK-3 $\beta$  (ser9) which is inactivated. MTT was used to test the IC<sub>50</sub> of paclitaxel. The expression of p-GSK-3 $\beta$  (ser9) was tested by FACS. The location of p-GSK-3 $\beta$  (ser9) in SKOV3 cells was analyzed by immunofluorescence. **Results** After treated with LiCl, the IC<sub>50</sub> of paclitaxel was increased from (10.11 ± 0.87)  $\mu$ g/mL to (11.56 ± 0.96)  $\mu$ g/mL for 24 h, (1.07 ± 0.17)  $\mu$ g/mL to (1.74 ± 0.24)  $\mu$ g/mL for 48 h, (0.03 ± 0.01)  $\mu$ g/mL to (0.06 ± 0.01)  $\mu$ g/mL for 72 h respectively. Except the increase of 24 h others had statistical difference( $P < 0.05$ ). FACS results show that the mean fluorescence intensity of p-GSK-3 $\beta$  increased from (661.67 ± 37.63) to (841.67 ± 41.53) after treated with LiCl( $P < 0.05$ ). The results of immunofluorescence show that the expression of p-GSK-3 $\beta$  in nuclear increased obviously than in the cytoplasm. **Conclusion** The augment of inactivated GSK-3 $\beta$  expression, especially in the nuclear, can improve the chemoresistance of ovarian cancer cells.

**[Key words]** GSK-3 $\beta$ ; ovarian cancer; paclitaxel; chemoresistance

卵巢癌是严重威胁女性身心健康的妇科三大恶性肿瘤之一,目前的标准治疗方案仍为手术联合化疗,然而化疗耐药极大地影响了卵巢癌的临床疗效和预后,致使其 5 年生存率仅为 30%<sup>[1]</sup>。卵巢癌的耐药机制迄今尚不清楚。近来研究表明,糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )在肿瘤细胞的诸多恶性生物学作用中起着重要作用,耐药性也是其中之一<sup>[2]</sup>。然而,由于 GSK-3 $\beta$  是多功能激酶,其对卵巢癌耐药性的影响和相关机制仍存在争议。本研究通过应用 GSK-3 $\beta$  抑制剂 LiCl 改变其活性和细胞内定位,探讨其在紫杉醇耐药中的作用,进一步明确 GSK-3 $\beta$  对卵巢癌耐药的影响并阐述其可能机制,为以 GSK-3 $\beta$  为靶点逆转卵巢癌耐药提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和仪器** 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);紫杉醇、LiCl、MTT、DMSO(美国 Sigma 公司);phospho-GSK-3 $\beta$ (ser9)、Rabbit mAb IgG Isotype Control 抗体(美国 Cell Signal 公司);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(Solarbio 公司);DMEM 高糖培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 GEMINI 公司)。流式细胞仪(美国 BD 公司);酶标仪(美国伯乐公司);荧光倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司)。

**1.2 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 ℃、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 90% 的培养箱中培养,细胞呈贴壁生长。

**1.3 MTT 测定紫杉醇半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)** 取对数生长期 SKOV3 细胞接种于 96 孔板, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 每孔接种 200  $\mu$ 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 组加入不同浓度紫杉醇 (0.002、0.01、0.05、0.25、1.25、6.25、31.25  $\mu$ g/mL) 培养液; B 组加入 20 mmol/L 的氯化锂预处理 1 h 后, 加入上述不同浓度紫杉醇, 细胞继续培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L, 孵育 4 h 除去培养液, 加入 DMSO 150  $\mu$ L, 摇匀 15 min, 酶标仪 490 nm 测定透光率 (OD 值)。按以下公式计算抑制率: 细胞抑制率 (%) =  $[1 - (\text{试验组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})] \times 100\%$ 。采用改良寇氏公式计算紫杉醇 IC<sub>50</sub>。实验重复 3 次。

**1.4 流式细胞仪检测磷酸化 GSK-3 $\beta$  表达** 取对数生长期细胞, 药物组加入 20 mmol/L 的氯化锂培养 1 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  $1 \times 10^6$  个/mL, 取 100  $\mu$ L 细胞悬液, 药物组和阴性对照组加入 1:2200 稀释的 Phospho-GSK-3 $\beta$  (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  $\mu$ 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  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测, 各组重复 3 次。

**1.5 免疫荧光检测 GSK-3 $\beta$  定位** 胰酶消化收集细胞, 调整浓度为  $4 \times 10^4$  个/mL, 24 孔板中每孔加入 500  $\mu$ L 细胞悬液, 培养 24 h。实验组加入 20 mmol/L 的 LiCl 处理 1 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  $\mu$ L 封闭液室温封闭 1 h。弃去封闭液, 每孔加入 400  $\mu$ L 1:400 稀释的 Phospho-GSK-3 $\beta$  (ser9) 抗体, 4  $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗 3 次, 每孔加入 400  $\mu$ 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  $\mu$ L 5  $\mu$ g/mL 的 DAPI 染色液, 室温作用 15 min 以上。PBS 漂洗 3 次, 在倒置荧光显微镜下观察, 照相保存实验结果。

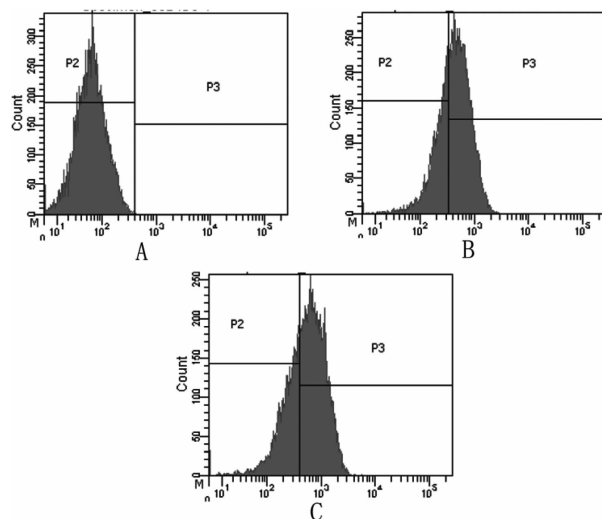
**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行统计分析, 半数抑制浓度、荧光强度用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两样本比较采用  $t$  检验, 以  $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 LiCl 对 SKOV3 细胞紫杉醇 IC<sub>50</sub> 的影响** 不同浓度紫杉醇作用后, A 组 24、48、72 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为  $(10.11 \pm 0.87)$ 、 $(1.07 \pm 0.17)$ 、 $(0.03 \pm 0.01)$   $\mu$ g/mL, 经 20 mmol/L LiCl 预处理的 B 组 24、48、72 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为  $(11.56 \pm 0.96)$  ( $t = 1.93$ ,  $P = 0.12$ )、 $(1.74 \pm 0.24)$  ( $t = 4.00$ ,  $P = 0.02$ )、 $(0.06 \pm 0.01)$  ( $t = 3.67$ ,  $P = 0.02$ )  $\mu$ g/mL, 除了 24 h 外 48 h 和 72 h 的结果差异均有统计学意义, 提示 LiCl 预处理后的 SKOV3 细胞对紫杉醇的耐药性增加。

**2.2 SKOV3 细胞内磷酸化 GSK-3 $\beta$  表达量** FACS 结果显示, 阴性对照组 p-GSK-3 $\beta$  (ser9) 的平均荧光强度为  $(661.67 \pm 37.63)$ , LiCl 预处理组 p-GSK-3 $\beta$  (ser9) 的平均荧光强度为  $(841.67 \pm 41.53)$ , 差异有统计学意义 ( $t = 5.56$ ,  $P = 0.005$ , 图 1)。说明 LiCl 可明显增加卵巢癌细胞内失活性磷酸化的 GSK-3 $\beta$  表达量, 结合上述 MTT 的结果, 提示 ser9 位点磷酸化的 GSK-3 $\beta$  表达量的上调可以增强卵巢癌细胞对紫杉醇的耐药性。



A: 同型对照; B: 阴性对照组; C: LiCl 处理组

图 1 SKOV3 细胞内 p-GSK-3 $\beta$  (ser9) 表达量

**2.3 SKOV3 细胞内磷酸化 GSK-3 $\beta$  的定位** 免疫荧光结果显示, 阴性对照组 SKOV3 细胞内的 p-GSK-3 $\beta$  (ser9) 定位于细胞浆内, 经 LiCl 处理后的 SKOV3 细胞核内可见 p-GSK-3 $\beta$  (ser9) 的绿色荧光 (图 2), 说明 LiCl 处理后 SKOV3 细胞核内的 p-GSK-3 $\beta$  (ser9) 表达上调, 提示卵巢癌细胞核内失活性磷酸化 GSK-3 $\beta$  表达的上调能显著增强卵巢癌细胞耐药性。

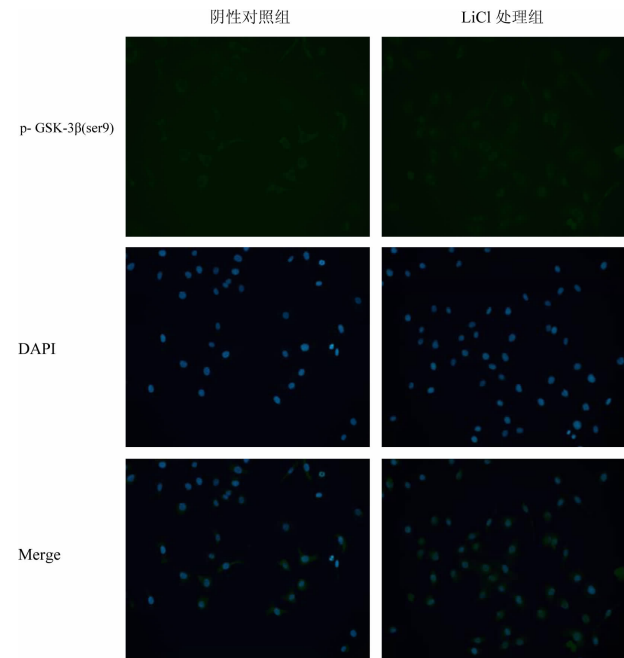


图 2 SKOV3 细胞内 p-GSK-3β (ser9) 定位情况 (荧光显微镜 ×200)

3 讨论

尽管新的化疗药物在探索开发中<sup>[3]</sup>,紫杉醇仍然是目前卵巢癌化疗方案中的基础用药,但耐药性大大降低了其临床疗效,从而导致卵巢癌的高复发率和高死亡率,所以研究卵巢癌细胞对紫杉醇的耐药机制具有重要的临床意义。

信号通路是目前研究肿瘤细胞耐药的热点。其中,GSK-3β 是近年来备受关注的肿瘤治疗的分子靶点之一,因其在 Wnt、PI3K、Hedgehog、NF-κB 等多种信号传导通路中起关键性的调节作用。这些信号传导通路异常与肿瘤细胞的各项生物学特性密切相关<sup>[2]</sup>。近年的研究发现 GSK-3β 是多功能蛋白激酶,参与癌基因的转录、细胞周期的调节、肿瘤细胞的侵袭与转移以及凋亡的调控等诸多肿瘤细胞的恶性生物学作用。因此本研究通过探讨 GSK-3β 在卵巢癌细胞 SKOV3 中的活性和细胞内定位的改变来进一步揭示 GSK-3β 在卵巢癌细胞紫杉醇耐药中的作用及其机制。

虽然早已发现 GSK-3β 在卵巢癌中呈高表达状态<sup>[4]</sup>,由于 GSK-3β 是多功能激酶,对肿瘤细胞具有双重调节作用,因此其活性的改变对卵巢癌的作用依然存在一定争议。GSK-3β 是丝氨酸/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 的活性。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<sup>[5]</sup>。在卵巢癌的研究中,部分学者认为抑制 GSK-3β 的活性可以成为治疗卵巢癌的新策略<sup>[6-7]</sup>。但是,Vergara 等<sup>[8]</sup>发现失活性磷酸化 GSK-3β (P-GSK-3β-ser9) 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<sup>[9]</sup>则证实了卵巢癌组织标本中高表达 p-GSK-3β (Ser9),且紫杉醇 (PTX)、表阿霉素 (EADM)、顺铂 (CDDP) 和卡铂 (CBP) 对高表达组的平均抑制率显著降低,因而认为 GSK-3β 被磷酸化失活可以增强卵巢癌细胞的耐药性,提高其活性可逆转耐药性。

综合上述研究成果,我们发现 GSK-3β 对卵巢癌的作用存在以下矛盾:抑制其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,为了降低 LiCl 自身对卵巢癌细胞增殖的抑制作用,在参考前人研究结果<sup>[10-11]</sup>的基础上选择了 LiCl 20 mmol/L 作用 1 h,作为对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖活性影响较低的 GSK-3β 抑制剂 LiCl 的剂量和作用时间,在此前提下探讨 GSK-3β 活性对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的影响。LiCl 可以增加卵巢癌细胞内丝氨酸 9 位点磷酸化的 GSK-3β 的表达,以此构建高表达 p-GSK-3β (ser9) 的细胞实体状态。MTT 结果显示,LiCl 预处理 1 h 后 SKOV3 紫杉醇的 IC50 在 24 h 的结果未见明显差异性,考虑是在该时间点紫杉醇的药性尚未稳定,但 48、72 h 均有显著升高,提示卵巢癌细胞中,GSK-3β (ser9) 磷酸化水平的增加能增强其对紫杉醇的耐药性。流式细胞仪的结果显示 LiCl 预处理后 SKOV3 细胞内 p-GSK-3β (ser9) 的表达明显上调,证实了 LiCl 预处理后卵巢癌细胞耐药性的增强是因为 GSK-3β (ser9) 磷酸化增加所致。本研究采用流式细胞仪测定细胞内磷酸化蛋白的表达量,比传统的 Western blot 法能更精确地检测到单个细胞内 p-GSK-3β (ser9) 的表达量,更好地反映卵巢癌细胞内 GSK-3β (ser9) 的磷酸化状态。多数研究仅测定磷酸化的 GSK-3β 的表达水平,未探讨其细胞内定位的情况。本实验中免疫荧光的结果提示 LiCl 处理后细胞核内的 p-GSK-3β (ser9) 表达增加,说明卵巢癌细胞对紫杉醇耐药性的增强除了与 p-GSK-3β (ser9) 表达量的增加有关,还与其在细胞内定位的改变密切相关。但细胞核内的 p-GSK-3β (ser9) 是由细胞核内 GSK-3β 磷酸化而来还是细胞胞浆内 GSK-3β 磷酸化后移位至细胞核内还有待进一步证实。

- Cardiol, 2013, 166(3):584-588.
- [7] Parodi G, Bellandi B, Del Pace S, et al. Natural history of takotsubo cardiomyopathy[J]. Chest, 2011, 139(4):887-892.
- [8] Zeb M, Sambu N, Scott P, et al. Takotsubo cardiomyopathy: a diagnostic challenge[J]. Postgrad Med J, 2011, 87(1023):51-59.
- [9] Frohlich GM, Schoch B, Schmid F, et al. Takotsubo cardiomyopathy has a unique cardiac biomarker profile: NT-proBNP/myoglobin and NT-proBNP/troponin T ratios for the differential diagnosis of acute coronary syndromes and stress induced cardiomyopathy[J]. Int J Cardiol, 2012, 154(3):328-332.
- [10] Citro R, Piscione F, Parodi G, et al. Role of echocardiography in takotsubo cardiomyopathy[J]. Heart Fail Clin, 2013, 9(2):157-166.
- [11] Wittstein IS, Thieman DR, Lima JA, et al. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress[J]. N Engl J Med, 2005, 352(6):539-548.
- [12] Manolis AJ, Poulimenos LE, Kallistratos MS, et al. Sympathetic Overactivity in Hypertension and Cardiovascular Disease[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2014, 12(1):4-15.
- [13] Paur H, Wright PT, Sikkil MB, et al. High levels of circulating epinephrine trigger apical cardiodepression in a beta2-adrenergic receptor/Gi-dependent manner: a new model of Takotsubo cardiomyopathy[J]. Circulation, 2012, 126(6):697-706.
- [14] Lyon AR, Rees PS, Prasad S, et al. Stress (Takotsubo) cardiomyopathy—a novel pathophysiological hypothesis to explain catecholamine-induced acute myocardial stunning[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008, 5(1):22-29.
- [15] Wybraniec M, Mizia-Stec K, Krzych L. Stress cardiomyopathy: yet another type of neurocardiogenic injury ‘stress cardiomyopathy’[J]. Cardiovasc Pathol, 2014, 23(3):113-120.
- [16] Nef HM, Mollmann H, Akashi YJ, et al. Mechanisms of stress (Takotsubo) cardiomyopathy[J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(4):187-193.
- [17] Szardien S, Mollmann H, Willmer M, et al. Mechanisms of stress (takotsubo) cardiomyopathy[J]. Heart Fail Clin, 2013, 9(2):197-205.
- [18] Prasad A, Lerman A, Rihal CS. Apical ballooning syndrome (Takotsubo or stress cardiomyopathy): a mimic of acute myocardial infarction[J]. Am Heart J, 2008, 155(3):408-417.
- [19] Yoshioka T, Hashimoto A, Tsuchihashi K, et al. Clinical implications of midventricular obstruction and intravenous propranolol use in transient left ventricular apical ballooning (Takotsubo cardiomyopathy)[J]. Am Heart J, 2008, 155(3):521-527.
- [20] Kumar S, Kaushik S, Nautiyal A, et al. Cardiac rupture in takotsubo cardiomyopathy: a systematic review[J]. Clin Cardiol, 2011, 34(11):672-676.
- [21] Xu ZL, Li Q, Liu RG, et al. Very early recurrence of takotsubo syndrome[J]. Ann Noninvas Electrocardiol, 2014, 19(1):93-97.

(收稿日期:2014-06-02;修回日期:2014-10-15)

(本文编辑:齐 名)

(上接第 31 页)

本实验通过采用 GSK-3 $\beta$  抑制剂 LiCl 证实, 卵巢癌细胞内 GSK-3 $\beta$ (ser9) 磷酸化水平的升高, 尤其是细胞核内表达的可以增加提高紫杉醇耐药性。因此, 消除其磷酸化的抑制状态, 尤其是细胞核内 p-GSK-3 $\beta$ (ser9) 的表达有望成为逆转卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的方法之一。

## 【参考文献】

- [1] Jemal A, Bray F, Melissa M, et al. Global cancer statistics[J]. Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] 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.
- [3] 吴岩印, 张明月, 丁 虹, 等. 喷他脒对人卵巢癌 CAOV3 细胞的抑制作用研究[J]. 东南国防医药, 2012, 14(1):27-28.
- [4] Rask K, Nilsson A, Brannstrom 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):1298-1304.
- [5] Stadler SC, Vincent CT, Fedorov VD, et al. Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 $\beta$  activates TGF- $\beta$  signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(29):11851-11856.
- [6] Hilliard TS, Gaisina IN, Muehlbauer AG, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitors induce apoptosis in ovarian cancer cells and inhibit in-vivo tumor growth[J]. Anticancer Drugs, 2011, 22(10):978-985.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 魏 欣, 吕庆杰, 孙寒雪, 等. P-GSK3 $\beta$ , 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.
- [10] Suganthi M, Sangeetha G, Gayathri G, et al. Biphasic dose-dependent effect of lithium chloride on survival of human hormone-dependent breast cancer cells (MCF-7)[J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 150(1-3):477-486.
- [11] 宋晓红, 翁丹卉, 刑 辉, 等. 糖原合酶激酶-3 $\beta$  磷酸化抑制紫杉醇诱导卵巢癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(18):1383-1386.

(收稿日期:2014-08-24;修回日期:2014-09-12)

(本文编辑:齐 名; 英文编辑:王建东)