

胰腺癌曲古霉素A耐药细胞株转移相关基因表达的研究

刘彪¹ 陈孝倩² 张翠² 王本泉¹ 白永恒² 王斯璐² 金嵘¹ 周蒙滔¹ 陈必成^{1,2*}

(¹温州医学院附属第一医院肝胆胰外科, 温州 325000; ²温州医学院附属第一医院外科实验室, 温州 325000)

摘要 该实验旨在探讨曲古霉素A(trichostatin A, TSA)对胰腺癌PANC-1细胞株侵袭转移力的影响。分别通过短时间低浓度TSA(0.1~0.2 μmol/L)处理胰腺癌细胞株PANC-1 24 h, 以及长期低浓度递增法建立TSA耐药株(PANC-1-TSA)。采用CCK8(cell counting kit-8)测得PANC-1、PANC-1-TSA的IC₅₀分别为(0.51±0.09) μmol/L、(78±5) μmol/L, 耐药株耐药指数为153。Transwell侵袭小室实验显示, 0.1 μmol/L TSA处理后, 胰腺癌PANC-1细胞侵袭力未见明显改变, 而耐药株PANC-1-TSA侵袭力较亲本株明显增强。实时荧光定量PCR(RT-qPCR)结果显示, 耐药株PANC-1-TSA转移相关基因MMP1/2/7/9/14/15及TIMP1/2 mRNA的表达均明显上升, 尤以MMPs mRNA明显。在倒置显微镜观察到耐药细胞形态上发生上皮型向间叶型转化(epithelial mesenchymal transition, EMT), 进一步通过RT-qPCR及蛋白免疫印迹(Western blot)实验证实耐药株发生EMT, 其中上皮型标志物表达下降及间叶型标志物表达上升。该实验显示, 耐药细胞株PANC-1-TSA侵袭力增强, 侵袭、转移相关基因表达明显增加。耐药株形成的过程中, 发生上皮-间叶转化(EMT), EMT可能参与了胰腺癌PANC-1-TSA细胞株侵袭能力的增强。

关键词 胰腺癌; 曲古霉素A耐药; 上皮-间叶转化

Enhanced Expression of Genes Associated with Invasion and Metastasis in Trichostatin A Resistance Pancreatic Cancer Cells Line

Liu Biao¹, Chen Xiaoqian², Zhang Cui², Wang Benquan¹, Bai Yongheng², Wang Silu²,
Jin Rong¹, Zhou Mengtao¹, Chen Bicheng^{1,2*}

(¹Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;

²Laboratory of Surgery, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the change of invasion ability on PANC-1. PANC-1 cells line was treated with 0.1~0.2 μmol/L TSA for 24 hours. TSA-resistant pancreatic cancer cells line (PANC-1-TSA) was established by drug concentration step-elevation method. The 24 h IC₅₀ of PANC-1 and PANC-1-TSA was (0.51±0.09) μmol/L and (78±5) μmol/L respectively, and the resistance index of PANC-1-TSA was 153. Transwell array experiment showed that PANC-1-TSA has stronger capability for invasion and metastasis than PANC-1 cells, while there was no significant difference in the 0.1 μmol/L TSA group. In RT-qPCR assessments, the expressions of MMPs and TIMPs mRNA were all up-regulated in PANC-1-TSA, and the MMPs mRNA increased much more

收稿日期: 2013-03-24 接受日期: 2013-05-13

浙江省教育厅重中之重学科——外科学和温州市科技局项目(批准号: Y20090028)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88069447, E-mail: chenbicheng@hotmail.com

Received: March 24, 2013 Accepted: May 13, 2013

This work was supported by the Priority Subjects of Zhejiang Education Department-Surgery and Wenzhou Science & Technology Bureau (Grant No. Y20090028)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88069447, E-mail: chenbicheng@hotmail.com

网络出版时间: 2013-07-24 10:51

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130724.1051.001.html

significantly. We also found that PANC-1-TSA cells suffered morphological alteration from epithelial morphology to mesenchymal morphology. Both the RT-qPCR and Western blot experiments confirmed that the PANC-1 cells line was suffered EMT during the process of forming drug resistance, with up-regulation of mesenchymal markers and down-regulation of epithelial markers. This paper demonstrated that TSA-resistant cells line had stronger capability for invasion and metastasis and much more aggressive than PANC-1. EMT might contribute to PANC-1-TSA cells line aggression.

Key words pancreatic cancer; trichostatin A-resistant; EMT

胰腺癌是一种高度恶性的消化系统肿瘤, 其临床治疗效果不理想, 预后差。目前常用的化疗药物不能显著延长胰腺癌患者的生存率, 世界范围内5年生存率不足1%。其主要原因是胰腺癌早期诊断困难, 大部分胰腺癌患者在确诊时已经发生局部侵犯或远处转移, 从而无法获得根治^[1]。上皮-间叶转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)可以促进肿瘤细胞干细胞化, 促进细胞远处转移的同时, 下调肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[2-4]。在吉西他滨耐药过程中, 残存肿瘤细胞发生EMT并对前期敏感的化疗或靶向治疗形成耐药性, 成为治疗的一大难题^[3,5-6]。去乙酰酶抑制剂作为一类新型抗肿瘤药物, 具有明显的促肿瘤细胞凋亡、抑制其增殖的作用^[7]。但是其对肿瘤细胞耐药及其侵袭、转移能力的影响还无相关文献报道。本研究通过检测EMT及肿瘤转移相关基因的表达, 探讨低浓度TSA对胰腺癌细胞株PANC-1侵袭、转移力的影响及耐药的

形成。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

曲古霉素A(TSA)购自Sigma(USA)公司, 用二甲亚砜(DMSO, Sigma)溶解至10 $\mu\text{mol/L}$, 使用前用培养基稀释至工作浓度。DMEM培养基、胎牛血清、Trizol购自Gibco BRL公司。逆转录试剂盒和SYBR Green I荧光定量试剂盒购自东洋纺(上海)生物科技有限公司, 荧光PCR所用引物由上海生工生物技术有限公司合成(引物序列见表1)。CCK8试剂盒购于日本同仁公司。Matrigel胶购自BD公司, E-cadherin、Vimentin兔抗人一抗以及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗购于Abcam生物公司。酶标仪为ELX800(Bio-Tek)产品, 荧光PCR仪为ABI7500(ABI)。

1.2 细胞培养及耐药株的培育

胰腺癌细胞株PANC-1培养在含10%的胎牛血

表1 荧光PCR各引物序列

Table 1 List of all primers used with Real-time PCR

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	反向引物(3'→5') Backward primer(3'→5')
<i>MMP1</i>	CTA CGA TTC GGG GAG AAG TGA T	AGC CCA TTT GGC AGT TGT G
<i>MMP2</i>	AGC CAA CTA CGA TGA TGA CCG	GCT CCT GAA TGC CCT TGA TGT
<i>MMP7</i>	TGG GAA CAG GCT CAG GAC TAT CT	GGC ACT CCA CAT CTG GGC TT
<i>MMP9</i>	TGG CAC ACG CCT TTC CTC CT	CGC GCC ATC TGC GTT TCC A
<i>MMP14</i>	CAT CTT CCT GGT GGC TGT GC	TGA CTC ACC CCC ATA AAG TTG CT
<i>MMP15</i>	TGG AAC AAC CAC CAT CTG ACC T	GGG CAC CTC CTG GAA GAC C
<i>TIMP1</i>	ACA ACC GCA GCG AGG AGT TTC T	GCT GTT CCA GGG AGC CAC AAA A
<i>TIMP2</i>	CAC CAC CCA GAA GAA GAG CCT	TGT GAC CCA GTC CAT CCA GAG
<i>Vimentin</i>	GAA CCT GAG GGA AAC TAA TCT GG	GAA GTT TCG TTG ATA ACC TGT CCA T
<i>E-cadherin</i>	AGC CTC AGG TCA TAA ACA TCA TTG	GAT AGA TTC TTG GGT TGG GTC G
<i>Snail</i>	ACC CCA CAT CCT TCT CAC TG	TAC AAA AAC CCA CGC AGA CA
<i>GAPDH</i>	TCC CAT CAC CAT CTT CCA GG	GAT GAC CCT TTT GGC TCC C

清、100 mg/mL的链霉素、100 mg/mL的青霉素的DMEM培养液里,放在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。取对数生长期的细胞处理后分组,实验组加入不同浓度的TSA,对照组加入等浓度的DMSO共同培养。采用逐渐增加浓度的方法培育耐药株,TSA起始浓度为0.05 μmol/L,每两周浓度增加0.01 μmol/L TSA,正常传代连续培养30周后获得胰腺癌PANC-1耐药TSA细胞株,并维持0.2 μmol/L TSA传代培养,并将此细胞株命名为PANC-1-TSA。

1.3 耐药指数的测定

CCK8方法测定PANC-1-TSA细胞株的耐药指数。按上述方法培养两组细胞,待胰酶消化后细胞计数,调节细胞浓度为 $1 \times 10^4/L$,在96孔板中接种细胞悬液(100 μL/孔)。将培养板放在培养箱中预培养。待细胞长至80%时,加入不同浓度TSA处理PANC-1细胞株(0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 μmol/L)以及PANC-1-TSA组TSA终浓度为(0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 μmol/L)。TSA处理24 h后,每孔加入含有10 μL CCK8的100 μL培养液,并设置空白对照组。将培养板在培养箱内孵育1~4 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。采用GraphPad Prism6.0软件计算PANC-1及其耐药株PANC-1-TSA的 $IC_{50(TSA\ 24\ h)}$ 。并计算耐药株耐TSA指数RI(Resistant Index)= $IC_{50}(PANC-1-TSA)/IC_{50}(PANC-1)$ 。

1.4 Transwell小室检测细胞侵袭力

侵袭能力的测定采用Transwell侵袭小室,具有8 μm孔径的聚碳酸酯膜用Matrigel胶进行包被,亲本株和耐药株细胞培养至70%~80%融合后胰酶消化,用DMEM调整细胞浓度至 $(1.5\sim3) \times 10^5/mL$,上室中加入200 μL 0.1% BSA的无血清培养液细胞悬液,在24孔板的下室中加入含8% FBS的DMEM培养液800 μL,然后在37 °C的培养箱中孵育24 h,取出滤膜,用95%乙醇固定,棉签擦去滤膜上未贴壁的细胞,DAPI染液染色,在200倍的荧光显微镜下随机取4个视野计数穿透到滤膜背面的细胞数,每组重复3次,每次每组设置2个副孔,结果求平均数。

1.5 实时定量PCR方法检测靶基因表达情况

用Trizol试剂盒提取PANC-1细胞组、TSA处理组(0.1 μmol/L, 24 h)及PANC-1-TSA组培养细胞的总RNA。吸取2 μg RNA样本在10 μL体系中进行逆转录反应,参照逆转录试剂盒说明书进行。取逆转录产物1 μL进行PCR扩增,PCR扩增体系为:5 μL荧光

定量染料2×SYBR荧光定量试剂、2 μL引物(上、下游各1 μL)、2 μL plus反应液、1 μL cDNA。检测靶基因包括:转分化相关分子(*Snail*、*E-cadherin*、*Vimentin*)、基质金属蛋白酶(*MMP1/2/7/9/14/15*)、基质金属蛋白酶组织抑制因子(*TIMP1/2*)。扩增程序为:95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 62 °C 15 s, 72 °C 45 s, 40个循环。得到的Ct值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA表达的变化(结果为倍数关系)。

1.6 蛋白质印迹法检测靶蛋白表达情况

PANC-1细胞组、TSA处理组(0.1 μmol/L, 24 h)及PANC-1-TSA组培养细胞每 5×10^6 个加100 μL细胞裂解液(RIPA),作用20 min后用细胞刮收集提取液;12 000 r/min离心10 min($r=95\ mm$),取上清液测蛋白浓度;制备10%聚丙烯酰胺分离胶和4%积层胶,样品 $5 \times$ SDS上样缓冲液,设置恒压100 V,电泳60 min;设置恒流350 mA,湿法电转移60 min;转膜后的PVDF膜经5% TBST脱脂奶粉室温封闭2 h;然后加一抗(稀释在一抗稀释液中),4 °C孵育过夜,加入相应种属二抗,室温孵育1.5 h,加入ECL发光液孵育膜5 min,暗室压片曝光,显影定影后胶片保存。

1.7 统计学处理

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用GraphPad Prism6统计软件进行单因素方差分析及配对T检验方法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药株PANC-1-TSA的鉴定

经CCK8方法测定PANC-1及其耐药株PANC-1-TSA 24 h的 IC_{50} 。予以梯度浓度的TSA处理两组细胞24 h,其 IC_{50} 分别为 $(0.51 \pm 0.09) \mu mol/L$ 、 $(78 \pm 5) \mu mol/L$,

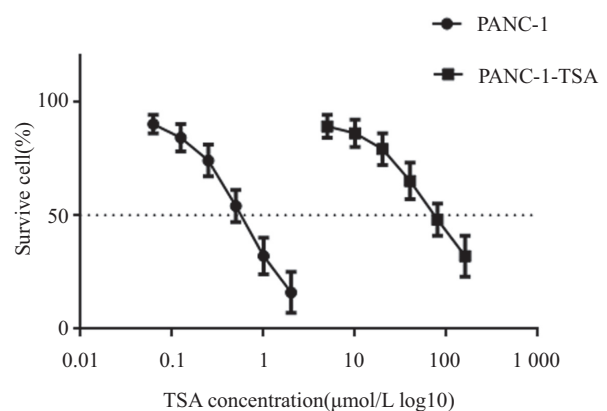


图1 TSA在胰腺癌PANC-1及耐药株PANC-1-TSA中的 IC_{50}
Fig.1 The IC_{50} of TSA in PANC-1 and PANC-1-TSA

PANC-1-TSA的IC50较亲本株有显著升高($P < 0.05$, 图1及表2)。

2.2 Transwell小室检测细胞侵袭力的改变

Transwell检测各组细胞侵袭能力, DAPI(4',6-

表2 胰腺癌PANC-1-TSA细胞株对TSA耐药指数

细胞系 Cells line	50%抑制浓度($\mu\text{mol/L}$)* IC50($\mu\text{mol/L}$)	耐药指数 Resistant index
PANC-1	0.51 \pm 0.09	153
PANC-1-TSA	78 \pm 5	

*表示三次独立实验的平均值。

*The average of three independent experiments.

二脒基-2-苯基吡唑)染色后在200倍的荧光显微镜下随机取4个视野计数穿透到滤膜背面的细胞数, 发现PANC-1细胞株予以0.1 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理24 h后, 其侵袭能力未见明显改变, 而耐药株PANC-1-TSA较亲本株显示出更强的侵袭力。

2.3 转移相关基因mRNA的表达

PANC-1组、低剂量TSA组和PANC-1-TSA组转移相关基因mRNA表达见图3。TSA耐药株PANC-1-TSA各指标均较对照组升高, 尤其以MMPs上升明显, TIMP1/2上升不明显。低浓度0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ TSA 24 h处理组的MMP2、MMP9和TIMP2 mRNA

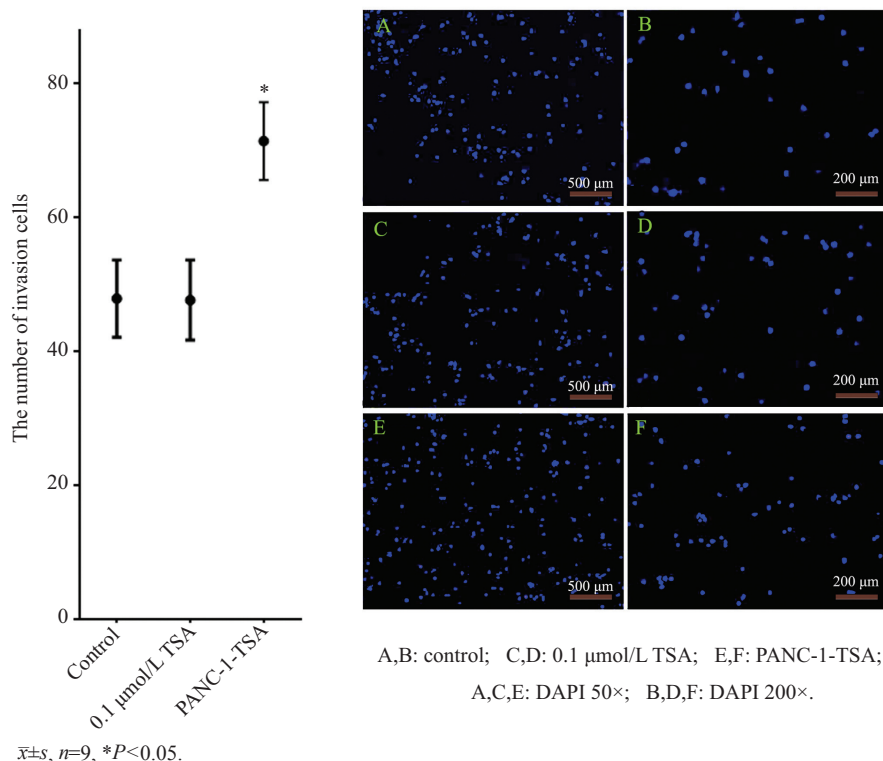


图2 Transwell检测细胞侵袭力的改变(DAPI染色)

Fig.2 Detection of the changes of cell invasion ability (DAPI stain) using Transwell invasion assays

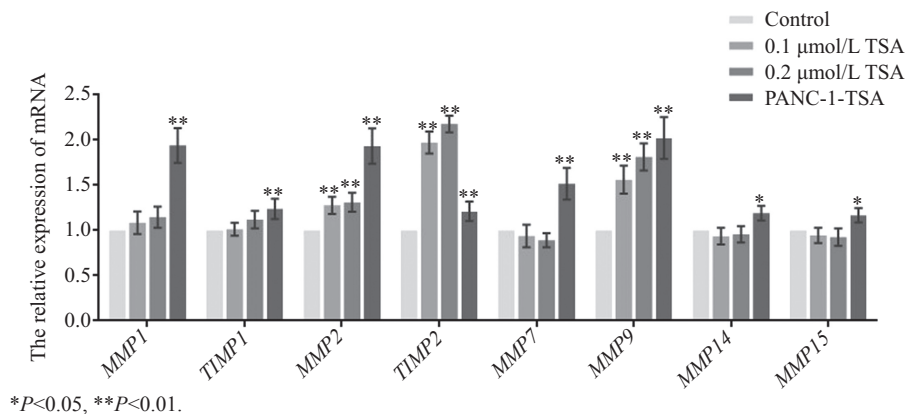


图3 转移相关基因(MMPs、TIMPs) mRNA的表达

Fig.3 The mRNA relative expression of MMPs and TIMPs

表达上升,且TIMP2的上升幅度明显大于MMP2 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

2.4 耐药株PANC-1-TSA上皮-间叶转化的改变

2.4.1 胰腺癌PANC-1及其耐药株PANC-1-TSA细胞的形态学差异 在细胞形态上,耐药株PANC-1-TSA细胞形态发生明显改变,相较亲本株的椭圆形,PANC-1-TSA细胞形状更加不规则,PANC-1-TSA更倾向于间质性(图4)。

2.4.2 EMT相关基因mRNA及蛋白表达的改变 荧光定量PCR显示,与PANC-1组比较,耐药株PANC-1-TSA的间质细胞标志基因*Snail*、*Vimentin*表达上升,

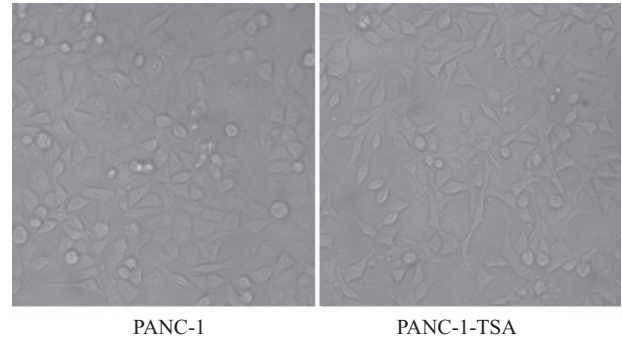
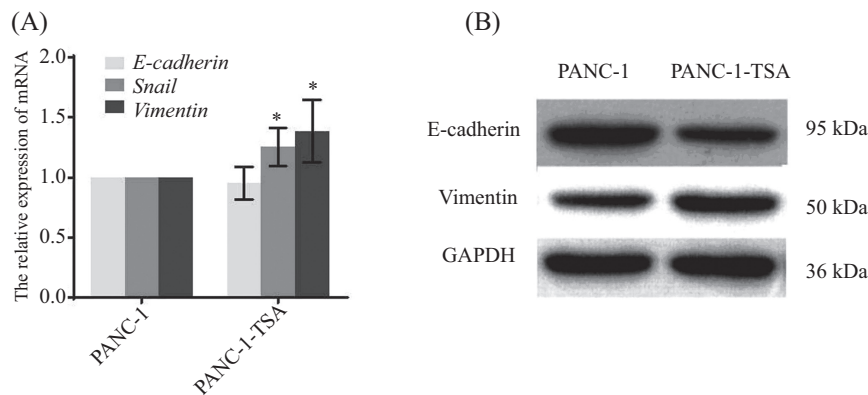


图4 PANC-1与PANC-1-TSA细胞的形态学差异
Fig.4 The difference between PANC-1 and PANC-1-TSA in cytormorphology



A: 胰腺癌PANC-1细胞株及其耐药株PANC-1-TSA细胞株*E-cadherin*、*Snail*及*Vimentin* mRNA的相对表达量。均数±标准差, $n=3$; * $P<0.05$, 与对照组比较; B: 胰腺癌PANC-1细胞株及其耐药株PANC-1-TSA细胞株*E-cadherin*、*Vimentin*蛋白表达的变化。

A: the relative expression of *E-cadherin*、*Snail* and *Vimentin* mRNA. PANC-1 and PANC-1-TSA cells line. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with control group; B: the expression of *E-cadherin* and *Vimentin* in PANC-1 and PANC-1-TSA.

图5 EMT相关基因mRNA及蛋白表达的改变

Fig.5 The changes of mRNA and Protein levels of genes associated with EMT

虽然上皮性细胞标志物*E-cadherin* mRNA未见明显改变,但蛋白印迹分析结果却显示*E-cadherin*的蛋白水平有着显著下降,间质细胞标志转录因子*Vimentin*表达增加(图5)。表明耐药细胞株PANC-1-TSA较亲本株表现出更加明显的间质特性,发生EMT。

3 讨论

胰腺癌恶性生物学行为的主要特征是其强烈的向周围组织侵袭以及向远处转移。大部分胰腺癌患者在诊断时往往发现已经有转移,因此很难获得根治。化疗作为治疗胰腺癌的重要手段之一,其作用因而显得尤为重要,但胰腺癌对传统化疗药物可产生明显的抗药性^[7]。TSA是一种高效、广泛的组蛋白去乙酰酶抑制剂(HDACi)。近年来国内外研究表明,TSA通过改变组蛋白和非组蛋白的乙酰化程

度来改变染色质结构,在转录和翻译水平调控肿瘤生长、凋亡及侵袭转移相关蛋白的表达和降解。作为一类新抗肿瘤药物,TSA对胰腺癌PANC-1细胞具有明确的抑增殖、促凋亡的作用^[8]。但是肿瘤细胞对TSA耐药性如何,耐药后的肿瘤侵袭、转移能力有何改变至今尚未有相关文献报道。本研究通过CCK8方法检测亲本株及耐药株的IC₅₀,计算其耐药指数,证明低浓度TSA长期作用胰腺癌PANC-1细胞株,可使胰腺癌PANC-1明显产生TSA耐药性。进一步运用Transwell小室检测细胞侵袭力发现胰腺癌对TSA产生耐药后其侵袭力也明显增强了。而短时间0.1 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理PANC-1 24 h后,其侵袭力未见明显改变。

细胞外基质的分解被认为是恶性肿瘤浸润和转移的早期信号,基质金属蛋白酶(matrix metallo

preinases, MMPs)能降解基膜和细胞外基质,与金属基质蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)保持动态平衡,在肿瘤的浸润和转移中发挥重要作用^[9-11]。胰腺癌组织MMPs较正常胰腺组织明显升高,其中侵袭性强、分期高的胰腺癌表达相对更高^[12-13]。为了探究腺癌PANC-1耐药株细胞侵袭、转移力的改变,我们检测了基质金属蛋白酶(MMP1/2/7/9/14/15)、基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP1/2) mRNA的表达改变。在本实验中胰腺癌PANC-1细胞株予以0.1~0.2 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理24 h后, MMP2、TIMP2、MMP9 mRNA的表达均较对照组上升,其中TIMP2 mRNA的表达上升更为明显。我们考虑细胞具有维持MMPs/TIMPs稳定的自我调节能力, TIMP1/2的升高可能是由于MMP1、MMP2 mRNA升高所致反馈性升高。Transwell实验证实, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ TSA对PANC-1侵袭力无明显影响。然而, PANC-1-TSA耐药株的MMPs、TIMPs mRNA表达均明显上升, 尤以MMPs mRNA为显著。Transwell实验亦证实胰腺癌PANC-1-TSA耐药株表现为更强的侵袭力。虽然, MMPs能够快速降解基膜和细胞外基质,但细胞的侵袭力的改变不仅依赖MMPs/TIMPs的动态稳定,亦与EMT有着密切的联系,现已证实EMT在肿瘤细胞耐药的形成以及侵袭转移力的改变上有着重要的作用。

EMT相关基因*E-cadherin*、*Vimentin*、*Snail*是细胞表型的标志性分子。*E-cadherin*是上皮细胞界定的重要标志之一,被认为是决定上皮细胞表型的关键分子,其编码基因*CDH1*被公认为癌浸润转移抑制基因。发生EMT时*E-cadherin*表达下调破坏细胞连接和细胞骨架,引发细胞极性的缺失,进而癌细胞发生游离、浸润和转移^[14]。外源性补充*E-cadherin*可以部分或者完全抑制肿瘤细胞侵袭性表型。*Vimentin*是一种来源间叶组织的III型中间纤维,是间质型细胞的标志性分子。在癌症的发生发展中,转录因子*Snail*是*E-cadherin*的直接抑制因子^[15]。Kong等^[16]实验发现, TSA可以导致胰腺癌PANC-1发生间质上皮转化(MET),上调上皮标志物*CDH1*(*E-cadherin*)表达的同时抑制*Vimentin*的表达。我们之前的研究也显示TSA短时间处理胰腺癌PANC-1细胞具有上调*E-cadherin* mRNA的表达的作用。但在本实验中,荧光半定量PCR提示耐药后的胰腺癌PANC-1细胞*Snail*、*Vimentin* mRNA的表达上升, *E-cadherin* mRNA

的表达未见明显变化,但蛋白印迹结果显示耐药株*E-cadherin*蛋白表达下降, *Vimentin*蛋白表达上升,说明PANC-1细胞株在耐药形成过程中发生EMT改变。*E-cadherin* mRNA未见明显改变可能是由于mRNA转录或细胞内microRNA对mRNA的调节,或可能由于在胰腺癌PANC-1诱导耐药过程中的细胞筛选作用及本身耐药形成过程中多种机制的参与所致。在胰腺癌PANC-1诱导TSA耐药的过程中, TSA诱导的MET及耐药促进的EMT共同调节了*E-cadherin*的表达,但其中具体影响的机制尚有待进一步的研究。

针对去乙酰化酶抑制类(HDACi)药物对EMT的影响,研究者们持不同甚至相反的意见。Uchida等^[17]研究提示HDACi类药物SAHA可以诱导内皮细胞发生EMT。Dejuan等^[18]也证明HDACi SAHA及TSA均可诱导前列腺癌细胞发生EMT。同时Shah等^[2]培育的胰腺癌L3.6pl、AsPC-1及吉西他滨耐药株L3.6pl-GR、AsPC-1-GR中, *E-cadherin*蛋白表达明显下降, *Vimentin*明显上升,均发生了EMT。但是Aghdassi等^[19]及von Burstin等^[20]研究提示, HDAC1/2具有募集*Snail*、*ZEB*等因子、形成SNAIL/HDAC1/HDAC2复合物、抑制*E-cadherin*表达的作用。HDACi类药物则可以通过抑制HDAC1/2,抑制SNAIL/HDAC1/HDAC2复合物的形成,减弱其对*E-cadherin*的抑制作用,上调*E-cadherin*的表达,继而抑制EMT的作用。HDACi还是TGF- β 1诱导EMT的必要因子^[21], TSA可以通过抑制HDACi阻断TGF- β 1所诱导的EMT进程^[22]。故而我们认为,不同种类肿瘤细胞对不同种类的HDACi反应会有所不同,甚至不同胰腺癌细胞株对不同种类HDACi的反应也可能各异,甚至剂量的高低及作用的时间都可能影响EMT相关基因转录因子的活性状态,其具体机制尚有待更加深入的研究。本实验结果提示对于胰腺癌PANC-1细胞株,长期予以TSA治疗形成耐药后,发生EMT转变,EMT与耐药作用相互促进,最终导致细胞侵袭能力的增强。

本实验结果证明,长期低浓度TSA暴露可诱导胰腺癌PANC-1产生耐药性,耐药株更具侵袭能力。PANC-1在耐药形成的过程中发生了明显的EMT,提示HDACi类药物长期使用可能诱导胰腺癌细胞产生耐药性,而耐药肿瘤细胞向更强侵袭力和转移性进化。

参考文献 (References)

- 1 Keleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H. Invasion

- and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 14.
- 2 Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(12): 3629-37.
 - 3 Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir* 2009; 64(5): 489-500.
 - 4 Krantz SB, Shields MA, Dangi-Garimella S, Munshi HG, Bentrem DJ. Contribution of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells to pancreatic cancer progression. *J Surg Res* 2012; 173(1): 105-12.
 - 5 Li Y, VandenBoom TG, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, *et al.* Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69(16): 6704-12.
 - 6 安勇, 姚捷, 卫积书, 陆子鹏, 蔡辉华, 戴存才, 等. 吉西他滨耐药人胰腺癌细胞株的建立及其与肿瘤干细胞的相关性研究. *中华外科学杂志*(*An Yong, Yao Jie, Wei Jishu, Lu Zipeng, Cai Huihua, Dai Cuncai, et al.* Establish a gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell line SW1990/GZ and research the relationship between SW1990/GZ and pancreatic cancer stem cell. *Chinese Journal of Surgery*) 2010; 48(13): 999-1003.
 - 7 Kim DH, Kim M, Kwon HJ. Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36(1): 110-9.
 - 8 杨云秀, 胡孙宽, 叶星照, 白永恒, 王斯璐, 刘彪, 等. 曲古抑菌素A对细胞PANC-1株凋亡和肿瘤转移相关基因表达的影响. *中国药理学与毒理学杂志*(*Yang Yunxiu, Hu Sunkuan, Ye Xingzhao, Bai Yongheng, Wang Silu, Liu Biao, et al.* Effect of trichostatin A on the expression of apoptosis related genes and metastasis related genes in human pancreatic cancer cell line PANC-1. *Chin J Pharmacol Toxicol*) 2012; 26(05): 624-9.
 - 9 Bramhall SR. Stromal degradation by the malignant epithelium in pancreatic cancer and the therapeutic potential of proteolytic inhibition. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5(4): 392-401.
 - 10 Bramhall SR. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. From molecular science to a clinical application. *Int J Pancreatol* 1997; 21(1): 1-12.
 - 11 Lukaszewicz M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2008; 62: 141-7.
 - 12 Durlík M, Gardian K. Metalloproteinase 2 and 9 activity in the development of pancreatic cancer. *Pol Przegl Chir* 2012; 84(8): 377-82.
 - 13 Okada Y, Eibl G, Guha S, Duffy JP, Reber HA, Hines OJ. Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21(4): 285-92.
 - 14 Zheng ZH, Sun XJ, Zhou HT, Shang C, Ji H, Sun KL. Analysis of metastasis suppressing function of E-cadherin in gastric cancer cells by RNAi. *World J Gastroenterol* 2005; 11(13): 2000-3.
 - 15 Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 2004; 24(1): 306-19.
 - 16 Kong B, Michalski CW, Hong X, Valkovskaya N, Rieder S, Abiatari I, *et al.* AZGP1 is a tumor suppressor in pancreatic cancer inducing mesenchymal-to-epithelial transdifferentiation by inhibiting TGF-beta-mediated ERK signaling. *Oncogene* 2010; 29(37): 5146-58.
 - 17 Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A, *et al.* Studies using an *in vitro* model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. *J Biol Chem* 2012; 287(7): 4441-50.
 - 18 Kong D, Ahmad A, Bao B, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Histone deacetylase inhibitors induce epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells. *PLoS One* 2012; 7(9): e45045.
 - 19 Aghdassi A, Sendler M, Guenther A, Mayerle J, Behn CO, Heidecke CD, *et al.* Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut* 2012; 61(3): 439-48.
 - 20 von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, *et al.* E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer *in vivo* and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 2009; 137(1): 361-71, 71 e1-5.
 - 21 Lei W, Zhang K, Pan X, Hu Y, Wang D, Yuan X, *et al.* Histone deacetylase 1 is required for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(9): 1489-97.
 - 22 Kaimori A, Potter JJ, Choti M, Ding Z, Mezey E, Koteish AA. Histone deacetylase inhibition suppresses the transforming growth factor beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes. *Hepatology* 2010; 52(3): 1033-45.