

mTOR 抑制剂通过 mTOR 通路介导 胰腺癌顺铂耐药的机制研究

朱小长^{1,2}, 陶连元³, 杜瀛瀛¹, 时云⁴

摘要 目的 研究哺乳动物雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)抑制剂雷帕霉素(RAPA)通过mTOR通路介导胰腺癌(PC)顺铂(DDP)耐药的机制,探索逆转该耐药性的可行性方案。方法 用含10%胎牛血清的达尔伯克必需培养基DMEM(PANC-1)或RPMI-1640(BxPC-3、SW1990)于37℃、5%CO₂培养箱中培养,取对数期细胞进行实验:用划痕修复实验检测细胞的迁移能力;用迁移(Transwell)实验检测细胞的侵袭能力;用四甲基偶氮唑盐(MTT)实验检测加入0.5、10、20 μmol/L的RAPA后,DDP对PANC-1、BxPC-3、SW1990耐药株的半数抑制浓度(IC₅₀)的变化;用Western blot实验检测0.5、10、20 μmol/L的RAPA抑制mTOR信号通路相关蛋白磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、磷酸化的PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶B(AKT)、磷酸化的AKT(p-AKT)、mTOR、磷酸化的mTOR(p-mTOR)的表达。结果 PANC-1、BxPC-3、SW1990 3种PC细胞株均对DDP耐药,单用DDP时3种细胞株均具有很强的细胞迁移能力和侵袭能力,其IC₅₀较高;联用RAPA后,3种细胞株的迁移能力和侵袭能力显著下降(P<0.01);加入不同浓度的RAPA后,3种细胞株的生存率均明显降低,其IC₅₀显著下降(P<0.01)。Western blot实验显示:RAPA可明显下调PANC-1及BxPC-3细胞中PI3K、AKT、mTOR蛋白的表达,抑制PI3K、AKT、mTOR被磷酸化,对SW1990的mTOR蛋白表达的影响较弱,但降低p-mTOR蛋白表达。结论 RAPA可降低PC细胞迁移能力、侵袭能力,提高PC对DDP的敏感性,逆转DDP耐药性,该过程是通过抑制mTOR信号通路相关蛋白的表达及磷酸化来实现的。

关键词 mTOR抑制剂;胰腺癌;mTOR信号通路;耐药性
中图分类号 R 576

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1205-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.008

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一种常见的消

化道肿瘤,其恶化程度高、病程短,具有早期不易确诊、手术治愈率低、5年生存率不足1%的特点,是预后效果最差的恶性肿瘤之一^[1]。目前PC的化疗方案主要以铂类药物为基础,顺铂(cis-dichlorodiamine platinum, DDP)是代表药物之一。DDP属于细胞周期非特异性抗肿瘤药物,与PC肿瘤细胞的DNA结合并抑制其复制转录,促进肿瘤细胞凋亡^[2]。大量研究^[3]表明PC细胞已经对DDP产生耐药性,雷帕霉素哺乳动物靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路改变是原因之一。雷帕霉素(rapamycin, RAPA)是一种新型高效低毒的大环内酯类免疫抑制剂,能抑制mTOR信号通路,减缓肿瘤细胞对DDP的耐药性^[4]。该研究选取3种PC细胞株,旨在进一步研究RAPA通过mTOR信号通路抑制PC肿瘤细胞作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂 PANC-1细胞、BxPC-3细胞、SW1990细胞购自中国北京细胞系资源库;RAPA购自海门市碧云天生物技术研究所;DDP、四甲基偶氮唑盐(methylthio tetrazole, MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司;迁移(Transwell)小室、抗磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase, p-PI3K)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)、磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、mTOR、磷酸化雷帕霉素哺乳动物靶点(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)、β-actin、羊抗兔IgG二抗等抗体、胰蛋白酶、青霉素链霉素双抗均购自美国赛默飞世尔科技公司;RPMI-1640、胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司。

1.2 实验方法 用含10%的胎牛血清的达尔伯克必需培养基(dulbecco minimum essential medium, DMEM)(PANC-1)或RPMI-1640(BxPC-3、SW1990)于37℃、5%CO₂培养箱中培养,取对数期细胞进行实验。

2019-04-19 接收

基金项目:安徽省重点研究计划和开发计划项目(编号:1704a0802163)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,合肥 230022

²庐江县中医院肿瘤科,合肥 231500

³河南省人民医院肝胆胰脾外科,郑州 450003

⁴南京鼓楼医院消化科,南京 210000

作者简介:朱小长,男,主治医师;

杜瀛瀛,男,副教授,硕士生导师,副主任医师,责任作者,

E-mail: duyinying@126.com

1.2.1 划痕修复方法 3种细胞接种于6孔板,待细胞融合度80%,划痕、拍照,去除培养基,加2.5%血清培养基,用含20 mg/L DDP或20 mg/L DDP + 10 μmol/L RAPA的血清培养基,培养24 h拍照。划痕修复率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 × 100%。

1.2.2 Transwell 方法 用胰蛋白酶消化细胞,去除培养基,磷酸盐缓冲液清洗2次,加无血清培养基调整细胞密度至 15×10^4 个/ml,上室接种200 μl 细胞液,下室加600 μl 10%的胎牛血清,用20 mg/L DDP或20 mg/L DDP + 10 μmol/L RAPA处理细胞12 h,甲醇固定,结晶紫染色,显微镜下观察并计算穿膜细胞数。

1.2.3 MTT 方法 胰蛋白酶消化细胞,接种于96孔板,每孔 5×10^3 个细胞,孵育12 h,细胞贴壁后吸去培养基,加入DDP及0.5、10、20 μmol/L RAPA血清培养基200 μl,每24 h换液1次,48 h后加入MTT 20 μl,培养4 h,去除培养基加入DMSO 150 μl,避光摇10 min,取100 μl,490 nm检测光密度(optical density, OD)值,计算DDP对细胞株的半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)。每组6孔,重复3次,取平均值。

1.2.4 Western blot 方法 取总蛋白,上样10 μg, SDS-PAGE分离蛋白,转印PVDF,牛血清白蛋白封闭1 h,加一抗4℃过夜, TBST洗涤3次,加二抗孵育2 h,加ECL发光液,拍照,分析条带灰度。

1.3 统计学处理 采用SPSS 19.0进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用t检验,多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAPA 抑制胰腺癌细胞株迁移能力 划痕实验显示,单用DDP时,PANC-1、BxPC-3、SW1990三

种耐DDP细胞株均具有较强的迁移能力,PANC-1的迁移能力最强,其次为SW1990、BxPC-3。联合RAPA 3株耐药株的迁移能力均显著低于未加RAPA ($P < 0.01$),见表1、图1。

表1 RAPA 抑制胰腺癌细胞株迁移能力(% $n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	DDP(20 mg/L)	DDP(20 mg/L) + RAPA(10 μmol/L)	t 值	P 值
PANC-1	92.15 ± 5.42	40.24 ± 2.21	21.724	<0.01
BxPC-3	80.75 ± 4.39	48.35 ± 4.34	12.856	<0.01
SW1990	86.41 ± 5.15	54.15 ± 3.68	12.484	<0.01

2.2 RAPA 抑制胰腺癌细胞株侵袭能力 Transwell 实验显示:单用DDP,PANC-1、BxPC-3、SW1990三种耐DDP细胞株均具有较强的侵袭能力,联合RAPA 3株耐药株的侵袭能力显著降低 ($P < 0.01$),见表2、图2。

表2 RAPA 抑制胰腺癌细胞株侵袭能力(μm $n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	DDP(20 mg/L)	DDP(20 mg/L) + RAPA(10 μmol/L)	t 值	P 值
PANC-1	226.56 ± 45.37	140.45 ± 15.68	4.394	0.001
BxPC-3	190.78 ± 36.74	100.38 ± 12.75	5.694	<0.010
SW1990	248.28 ± 40.25	120.16 ± 13.98	7.365	<0.010

2.3 RAPA 降低胰腺癌细胞株 IC₅₀ 划痕修复实验及Transwell实验显示:10 μmol/L RAPA能抑制PANC-1、BxPC-3、SW1990耐药株的迁移能力和侵袭能力,故进一步设计DDP联合不同浓度梯度的RAPA,考察DDP对3种细胞株的IC₅₀的变化。结果显示:未加RAPA时,3株细胞株的IC₅₀较高,加入5、10、20 μmol/L RAPA 3株细胞株的IC₅₀显著降低 ($P < 0.01$),见表3。

2.4 RAPA 抑制 PANC-1 细胞株 PI3K/AKT/mTOR 通路的蛋白表达 Western blot 实验显示:单用DDP时,PANC-1耐药株的PI3K、p-PI3K、AKT、

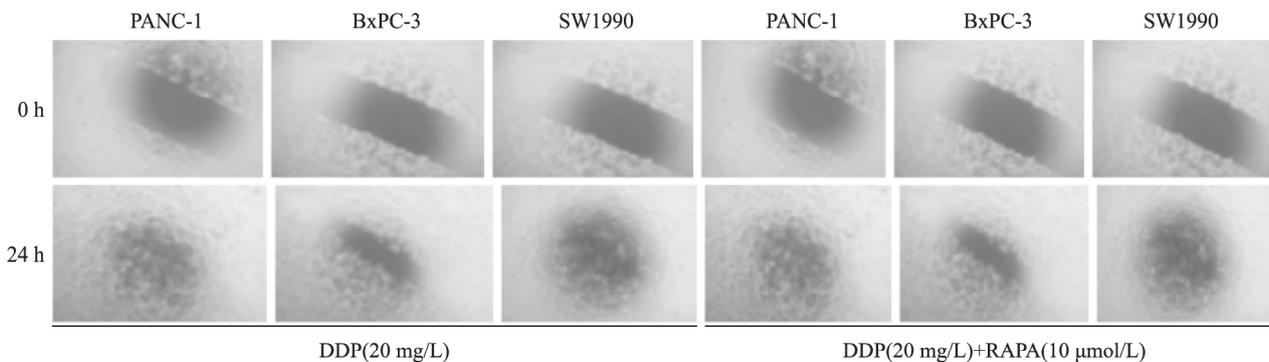


图1 划痕修复实验结果 ×40

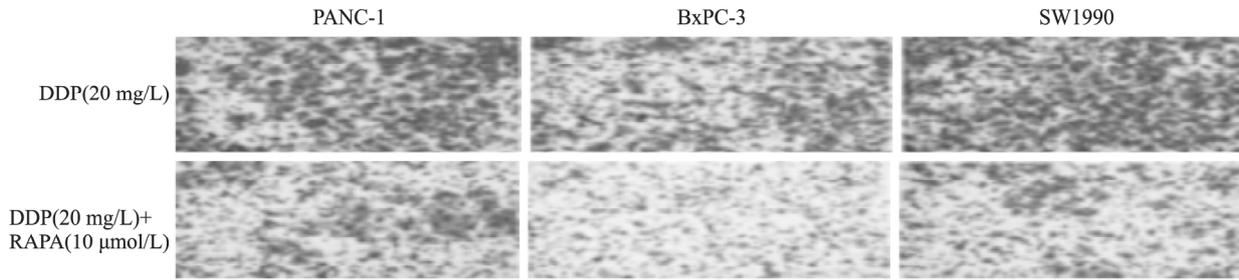


图2 Transwell 实验结果 ×100

表3 RAPA 辅助对 3 株细胞株 IC₅₀ 的影响 (n = 6 $\bar{x} \pm s$)

组别	DDP	DDP + RAPA(5 $\mu\text{mol/L}$)	DDP + RAPA(10 $\mu\text{mol/L}$)	DDP + RAPA(20 $\mu\text{mol/L}$)	t 值	P 值
PANC-1	42.31 \pm 4.68	34.59 \pm 4.22 **	23.38 \pm 4.24 ***	13.78 \pm 3.11 *** $\Delta\Delta$	55.90	<0.01
BxPC-3	37.58 \pm 4.24	30.24 \pm 3.52 **	18.34 \pm 4.01 ***	10.36 \pm 3.24 *** $\Delta\Delta$	62.01	<0.01
SW1990	33.69 \pm 3.57	27.21 \pm 3.28 **	18.34 \pm 3.21 ***	12.24 \pm 3.14 *** $\Delta\Delta$	49.36	<0.01

与对照组比较: ** P < 0.01; 与低剂量组比较: ## P < 0.01; 与中剂量组比较: $\Delta\Delta$ P < 0.01

p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量较高,联合加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ RAPA 后,PANC-1 耐药株的 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量显著降低 (P < 0.01),见图 3。

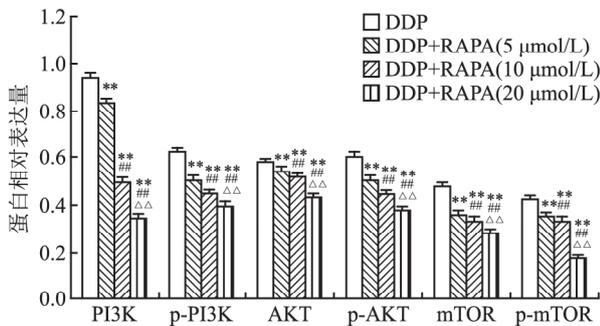
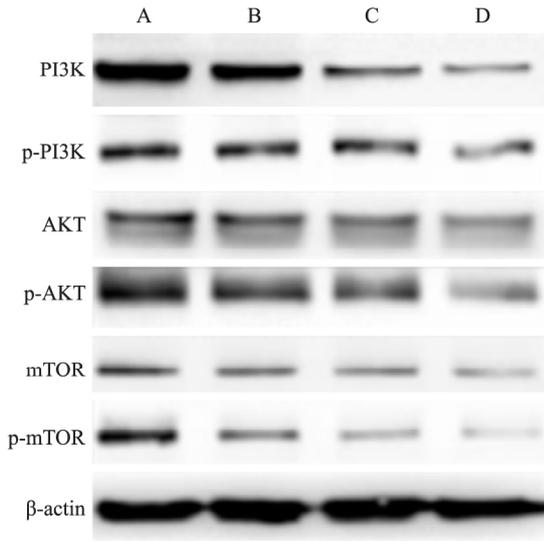


图3 RAPA 对 PANC-1 细胞蛋白表达的影响

A: DDP; B: DDP + RAPA(5 $\mu\text{mol/L}$); C: DDP + RAPA(10 $\mu\text{mol/L}$); D: DDP + RAPA(20 $\mu\text{mol/L}$); 与 DDP 组比较: ** P < 0.01; 与 DDP + RAPA(5 $\mu\text{mol/L}$) 组比较: ## P < 0.01; 与 DDP + RAPA(10 $\mu\text{mol/L}$) 组比较: $\Delta\Delta$ P < 0.01

2.5 RAPA 抑制 BxPC-3 细胞株 PI3K/AKT/mTOR 通路的蛋白表达 Western blot 实验结果显示:仅加入 20 mg/L DDP 时,BxPC-3 耐药株的 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量较高,联合加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ RAPA 后,BxPC-3 耐药株的 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量显著降低 (P < 0.01),见图 4。

2.6 RAPA 抑制 SW1990 细胞株 PI3K/AKT/mTOR 通路的蛋白表达 Western blot 实验显示:仅加入 20 mg/L DDP 时,SW1990 耐药株的 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量较高,联合加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ RAPA,SW1990 耐药株的 mTOR 蛋白表达量降低,三组间差异无统计学意义 (P > 0.05); SW1990 耐药株的 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达量显著降低 (P < 0.01),见图 5。

3 讨论

研究^[5]表明,肿瘤细胞的化疗耐药是导致化疗失败的重要原因,根据耐药性产生的机制,可分为原发性耐药(primary drug resistance, PDR)和多药耐药(multidrug resistance, MDR),PDR 仅对诱导药物产生耐药,MDR 不仅对诱导药物产生耐药,还对结构不同、作用机制不同的药物产生耐药,是肿瘤化疗失败的首要原因,抑制多药耐药蛋白,能增加 DDP 对耐药基因 DNA 的损伤。细胞产生耐药性的机制最主要有:① 细胞内药物浓度下降:肿瘤细胞膜改变使药物不易进入细胞内,或肿瘤细胞增加药物外排,最终使细胞内药物浓度下降,不能达到最低有效浓

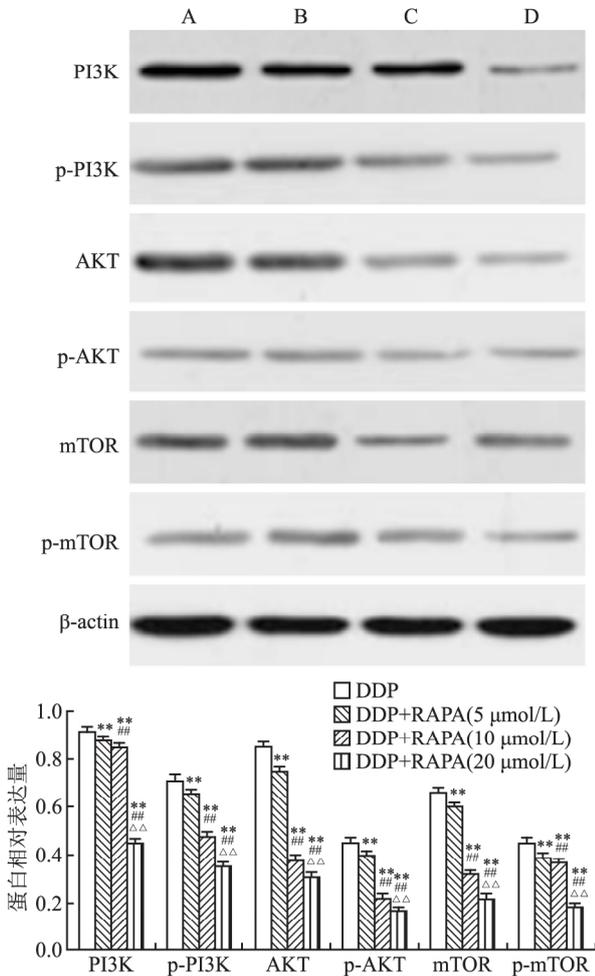


图4 RAPA对BxPC-3细胞蛋白表达的影响

A: DDP组; B: DDP+RAPA(5 μmol/L); C: DDP+RAPA(10 μmol/L); D: DDP+RAPA(20 μmol/L); 与DDP组比较: ** P < 0.01; 与DDP+RAPA(5 μmol/L)组比较: ### P < 0.01; 与DDP+RAPA(10 μmol/L)组比较: ΔΔ P < 0.01

度^[6]; ② 肿瘤细胞凋亡程序改变,例如 肿瘤细胞损伤激活细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,增强肿瘤细胞 DNA 损伤修复机制,改变信号通路相关基因活性^[7-8]。

mTOR 信号通路主要由 PI3K、AKT、mTOR 等组成,影响细胞增殖、凋亡、代谢等生理活动。胰岛素样生长因子作用,激活 PI3K,使磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-diphosphate,PIP2)磷酸化生成 PIP3,PIP3 促使 AKT 在细胞膜表面被脯氨酸依赖性激酶磷酸化形成 p-AKT,使处于抑制状态的 mTOR 被激活。磷酸化的 p-mTOR 激活下游相关分子,促进细胞翻译、合成,调节细胞代谢等生理功能^[9]。有研究^[10]证实 mTOR 信号通路可以影响肿瘤细胞的生长代谢、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、增强细胞的侵袭能力。有学者从 DDP 耐药肺癌

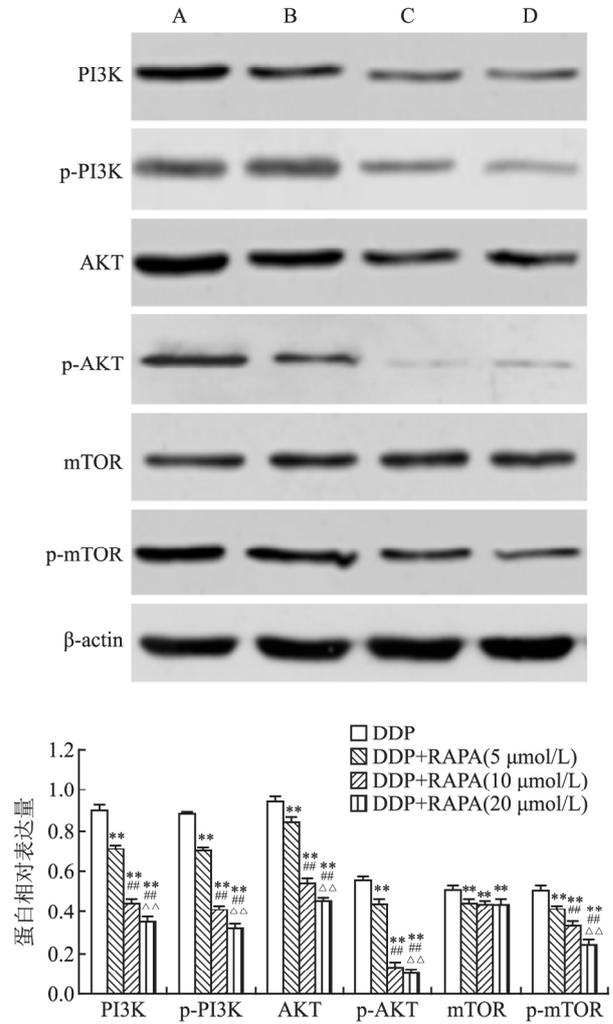


图5 RAPA对SW1990细胞蛋白表达的影响

A: DDP组; B: DDP+RAPA(5 μmol/L); C: DDP+RAPA(10 μmol/L); D: DDP+RAPA(20 μmol/L); 与DDP组比较: ** P < 0.01; 与DDP+RAPA(5 μmol/L)组比较: ### P < 0.01; 与DDP+RAPA(10 μmol/L)组比较: ΔΔ P < 0.01

细胞株 A549/顺二氨基二氯铂中发现 AKT1 呈高表达,抑制 AKT1 表达可以逆转肺癌细胞对 DDP 的耐药^[11]。Wang et al^[12]和 Zhang et al^[13]研究表明,CA916798 基因编码的蛋白存在于 mTOR 信号通路的 3 个磷酸化位点,mTOR 通路可在转录水平上调控该基因的表达,诱导 DDP 耐药。

本研究显示:PANC-1、BxPC-3、SW1990 3 种 PC 细胞株均对 DDP 耐药,单用 DDP 时,3 种细胞株均具有很强的细胞迁移能力和侵袭能力,IC₅₀ 较高;联用 RAPA 后,3 种细胞株的迁移能力和侵袭能力显著下降(P < 0.01),这与朱方等^[14]的研究结果一致。当加入不同浓度的 RAPA 后,3 种细胞株的生存率均明显降低,其 IC₅₀ 显著下降(P < 0.01),这提示 RAPA 可以增强耐药株对 DDP 的敏感性。进一

步的 Western blot 实验检测显示: RAPA 可下调 PANC-1 及 BxPC-3 细胞中 PI3K、AKT、mTOR 蛋白的表达,抑制 PI3K、AKT、mTOR 磷酸化,虽然对 SW1990 的 mTOR 表达的影响较弱,但仍可显著抑制相关蛋白磷酸化,表明 RAPA 可能是通过抑制 mTOR 通路逆转 PC 细胞株 DDP 耐药机制。mTOR 有 mTORC1 和 mTORC2 两种复合体,均对肿瘤细胞的增殖、分化、生长、转移等有不同的效应。蔡鹏涛等^[15]研究表明, mTORC2 在耐药细胞中的表达明显高于敏感株, mTORC1 在敏感细胞中的活性更高,但是在两种细胞中, mTOR 信号通路均处于高度活化状态,提示 mTORC1 和 mTORC2 之间可能存在动态平衡,当上游信号发生改变时,将使 mTORC1 向 mTORC2 转化,产生耐药性,这也可能是本研究中 RAPA 对 SW1990 耐药株的 mTOR 蛋白抑制不明显的原因,表明可能还存在其他通路影响 mTOR 蛋白的表达,其对 DDP 产生耐药的具体机制还值得进一步研究。

参考文献

- [1] 项金峰,施思,梁丁孔,等. 2015 年胰腺癌研究及诊疗前沿进展[J]. 中国癌症杂志,2016,26(4):281-9.
- [2] 徐子舒,吴欣爱. 吉西他滨联合替吉奥与联合顺铂治疗晚期胰腺癌的疗效比较[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(10):103-6.
- [3] 江华,沈晓莹,刘雁冰,等. mTOR 信号通路在胰腺癌发病中的作用[J]. 中华胰腺病杂志,2011,11(1):28-30.
- [4] 张家利,黄加鹏,华晔,等. 雷帕霉素对胰腺癌生长的抑制作用及其与基质细胞衍生因子 1 α 的关系[J]. 中国普通外科

- 杂志,2016,25(3):375-80.
- [5] 韩柯,郝吉庆. PJ34 对 A549/DDP 细胞耐药相关基因表达的影响[J]. 安徽医科大学学报,2016,51(8):1128-32.
- [6] Falcone M, Paterson D. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR Gram-negative infections [J]. J Antimicrob Chemother,2016,71(10):2713-22.
- [7] Januchowski R, Sterzyńska K, Zaorska K, et al. Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines [J]. J Ovarian Res,2016,9(1):65.
- [8] 张春,李清漪,董海影,等. PI3K/AKT/mTOR 信号通路在诱导胶质瘤细胞凋亡中的作用[J]. 中国新药杂志,2016,25(16):1909-12.
- [9] Kim M S, Haney M J, Zhao Y, et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells [J]. Nanomedicine,2016,12(3):655-64.
- [10] Wu J, Hu G, Dong Y, et al. Matrine induces Akt/mTOR signaling inhibition-mediated autophagy and apoptosis in acute myeloid leukaemia cells [J]. J Cell Mol Med,2017,21(6):1171-81.
- [11] 王言森,曹洪丽. 胰腺癌组织中 PI3K、p-AKT1 蛋白表达的变化及意义[J]. 山东医药,2017,57(29):65-70.
- [12] Wang Y L, Zhu B J, Qi Z Z, et al. Akt1 enhances CA916798 expression through mTOR pathway [J]. PLoS One,2013,8(5):e62327.
- [13] Zhang Z, Wang M. PI3K/AKT/mTOR pathway in pulmonary carcinoid tumours [J]. Oncol Lett,2017,14(2):1373-8.
- [14] 朱方,张全安,郑勤,等. HER-2 介导 mTOR-FASN 通路调节胰腺癌细胞恶性表型 [J]. 江苏医药,2014,40(11):1252-5.
- [15] 蔡鹏涛,吴志强,郭会,等. 中药抑制非小细胞肺癌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路克服 EGFR-TKIs 获得性耐药研究进展 [J]. 中草药,2015,46(12):1849-52.

Mechanism of mTOR inhibitors in cisplatin resistance in pancreatic cancer by mediating the mTOR pathway

Zhu Xiaozhang^{1,2}, Tao Lianyuan³, Du Yingying¹, et al

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Oncology, Lujiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hefei 231500;

³Dept of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003)

Abstract Objective To investigate the mechanism of mTOR inhibitors in cis-dichlorodiamine platinum (DDP) resistance in pancreatic cancer by mediating the mTOR pathway, and to explore the feasibility of reversing the drug resistance. **Methods** PANC-1, BxPC-3 and SW1990 were cultured in 10% fetal bovine serum and RPMI-1640 in an incubator with 5% CO₂ and temperature 37 °C. Then the cells in logarithmic growth phase received the various detections: wound healing assay for migration ability; Transwell for invasion ability; MTT for half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) after adding rapamycin (0, 5, 10, 20 μ mol/L); Western blot for the expression levels of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, and p-mTOR. **Results** The PANC-1, BxPC-3 and SW1990 were all resistant to cisplatin, which also had strong cell migration and invasion ability when DDP was used, and the IC₅₀ was at

风疹病毒 E1 抗原特异性片段在酵母系统中重组表达及应用

李秀义 高冬梅 张守柱 潘继文 温 和

摘要 目的 利用真核系统对 E1 蛋白进行表达并纯化, 建立一种以重组 E1 蛋白为包被抗原的风疹病毒抗体 ELISA 检测方法。方法 通过生物信息学预测 E1 优势抗原表位, 根据真核系统表达的特点进行序列优化, 全基因合成获得风疹病毒 E1 优势片段核酸序列, 构建真核表达载体, 在真核系统内进行诱导表达并纯化, 用 Western blot 证实 E1 蛋白的抗原性。建立 ELISA 检测系统, 并初步检测 100 份临床血清标本。结果 SDS-PAGE 证实重组 E1 蛋白在酵母中高表达, Western blot 证实该 E1 蛋白具有良好的抗原性, 成功建立了检测 IgM 间接 ELISA 方法, 对临床血清标本的初步检测显示该试剂盒具有较好的敏感性和特异性。结论 本 ELISA 检测试剂有较高敏感性和较强的特异性, 可进一步开发用于检测风疹病毒的早期感染的试剂盒。

关键词 风疹病毒; E1 蛋白; 酵母表达

中图分类号 R 392-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1210-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.009

风疹病毒(rubella virus, RV) 的主要危害在于孕早期(前 3 个月)感染可导致胎儿严重的出生缺陷, 即先天性风疹综合征(congenital rubella syndromes, CRS)^[1-3]。RV 有 3 个结构蛋白 C、E2 和

E1, 其中 E1 是主要的膜蛋白, 为免疫显性^[4-5]。Bosma et al^[6] 和 Starkey et al^[7] 研究发现, E1 蛋白上 195~296aa 区域是 E1 蛋白的主要抗原区域, 其相应氨基酸序列高度保守, 提示 E1 蛋白的此特异片段可作为特异诊断抗原用于 RV 抗体检测。目前血清学特异性抗体检测是我国孕妇产前致畸因子筛查的主要手段, 新发 RV 感染的血清学诊断主要依赖于 RV-IgM 抗体的检测^[8]。课题通过生物信息学预测获得 E1 蛋白优势抗原表位序列进行全基因合成, 在毕赤酵母中表达, 为研发特异性强和灵敏度高的国产 RV-IgM 抗体 ELISA 试剂盒提供基础, 以改善试剂长期依赖进口的局面。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 质粒 pGAPZ α A、*E. coli* XL1-blue、毕赤酵母 KM17 和 JM109 由合肥市第一人民医院检验科免疫室留存。

1.1.2 血清 100 份由合肥市 CDC 提供的经酶联免疫捕获法(珠海海泰制药有限公司)检测 IgM 可疑阳性血清, 300 份合肥市第一人民医院正常体检经检测(同上) IgM 阴性血清。

1.1.3 实验试剂 限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I、T4DNA 连接酶、PCR Marker、Taq DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂和琼脂糖凝胶电泳 DNA 纯化回收试剂均购自北京道普生物科技有限公司; 化学发光试剂(ECL) 购自美国 Pierce 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

2019-05-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81101273); 合肥市科技局科技计划项目(编号: 2010-014)

作者单位: 安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院) 检验科, 合肥 230061

作者简介: 李秀义, 男, 副主任检验技师, 硕士研究生;

温 和, 女, 副主任检验技师, 副教授, 责任作者, E-mail: 2488207025@qq.com

high level. After the application of DDP combined with rapamycin, the migration ability and invasive ability of the three cell lines decreased significantly ($P < 0.01$), moreover, the survival rate of the three cell lines was decreased significantly, so did the IC_{50} ($P < 0.01$). Western blot showed that rapamycin significantly down-regulated the expression of PI3K, AKT and mTOR proteins in PANC-1 and BxPC-3 cells, inhibited the phosphorylation of PI3K, AKT and mTOR, decreased p-mTOR protein expression, but its effect on the expression of mTOR protein in SW1990 was weaker. **Conclusion** Rapamycin can reduce the migration and invasion of pancreatic cancer cells, increase the sensitivity of pancreatic cancer to cisplatin, and reverse the resistance of cisplatin. This process is achieved by inhibiting the expression and phosphorylation of mTOR signaling pathway related proteins.

Key words mTOR inhibitors; pancreatic cancer; mTOR pathway; resistance