

槐耳颗粒逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 耐药的初步机制

李戎 谢莎 张莉 王先明

【摘要】 目的 研究槐耳颗粒逆转乳腺癌细胞株 MCF-7 耐药的初步机制。方法 使用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法测定敏感/耐药乳腺癌细胞 MCF-7-S/A 对单药阿霉素(ADM)和槐耳颗粒的药物毒性,耐药倍数和槐耳颗粒对 MCF-7/A 的耐药逆转倍数,分别采用荧光定量逆转录-聚合酶链反应和免疫组化 SP 法测定多药耐药基因 *mdr1*、多药耐药相关蛋白基因 MRP 的 mRNA 和其相应的表达产物 P-gp、MRP 蛋白,在 MCF-7/S 及非细胞毒性剂量的槐耳颗粒处理前后 MCF-7/A 上的表达。结果 非细胞毒性剂量(0.01 mg/ml)的槐耳颗粒能显著降低 ADM 对 MCF-7/A 的 IC₅₀(5.06 μm),与逆转前 MCF-7/A 的 IC₅₀(25.8 μm),相比差异有统计学意义($P < 0.01$),其逆转倍数为 5.1 倍;0.01 mg/ml 的槐耳颗粒使 MCF-7/A 细胞的耐药基因 *mdr1*、MDR-1 的 mRNA 以及相应的 P-gp、MRP 蛋白的表达水平均下调,与未加槐耳颗粒处理的对照组 MCF-7/A 相比有显著性差异($P < 0.01$)。结论 非细胞毒性剂量槐耳颗粒具有逆转 MCF-7/A 细胞耐药性的作用,逆转机制和其耐药基因 *mdr1*、MDR-1 的 mRNA 以及相应的 P-gp、MRP 蛋白的表达水平下调相关,暗示槐耳颗粒是一种有潜力的耐药逆转剂。

【关键词】 逆转耐药;MCF-7/A;槐耳颗粒;多药耐药

Primary study on the mechanism of reversal drug-resistance of human breast cancer cell line MCF-7 by Huaier Granule Li Rong, XIE Sha, ZHANG Li, et al. Shenzhen Second People's Hospital Shenzhen 518035, China

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of the reversal drug-resistance of human breast cancer cell MCF-7 by Huaier Granule. **Methods** MTT method was used to detect the cell toxicity, drug-resistant multiple and reversing multiple; fluorescent quantitation reverse transcription polymerase chain reaction and immuno-histo-chemical SP staining was used to detect the mRNA level of multidrug resistance 1 (*mdr1*), multi-drug resistance-associated protein (MRP) and their corresponding proteins P-gp, MRP expression of drug sensitive cell line MCF-7/S and drug resistant cell line MCF-7/A before and after treated by non-toxicity dose of Huaier Granule, respectively. **Results** Non-toxicity dose (0.01 mg/ml) of Huaier Granule could significantly reduce the IC₅₀ (5.06 μm) of ADM to the MCF-7/A, compared to the IC₅₀ (25.8 μm) of ADM to the MCF-7/A without reverseing ($P < 0.01$), its reversing multiple was 5.1 times. 0.01 mg/ml Huaier Granule could remarkably down-regulate the mRNA level of *mdr1*, MRP and their corresponding proteins P-gp, MRP expression of MCF-7/A, and it showed significant reduction ($P < 0.01$) compared to their expression of control group without Huaier Granule treatment. **Conclusion** Non-toxicity dose of Huaier Granule could reverse the drug-resistance of MCF-7/A, and the reversal mechanism is related to the down-regulation of the mRNA level of *mdr1*, MRP and their corresponding proteins P-gp, MRP expression. It implied that Huaier Granule could be a potential reversal agent for clinic.

【Key words】 Drug-resistant reversal; MCF-7/A; Huaier Granule; MDR

化疗是乳腺癌治疗的重要手段,却常因多药耐药现象(MDR)而失败,因此克服MDR一直为人们关注。已发现的许多逆转多药耐药的药物,由于毒副作用大难以在临床上推广应用。槐耳是一种药用真菌,槐耳颗粒是从槐耳菌质中提取并作为国家中药一类新药,除了良好的促肿瘤细胞凋亡作用和免疫增强剂作用,也能促进肺癌耐药细胞株耐药性发生逆转,无毒副作用^[1,2]。本研究为验证槐耳颗粒在无毒剂量时能否增强乳腺癌多药耐药细胞株 MCF-7/A 对阿霉素的敏感性,进行体外实验并初步研究其逆转耐药所涉及的基因表达。进一步发挥槐耳颗粒在乳腺癌化疗中的增强作用和提高患者生存率提供依据。

1 资料与方法

1.1 设备及主要试剂 槐耳颗粒由江苏启东盖天力制药有

限公司生产,ADM来自广东金泰嵘医药科技有限公司,胎牛血清和 RPMI1640 购自 GIBCO, P-gp 和 MRP 蛋白检测试剂盒来自达科为公司,MTT 为 Sigma 产品,其余试剂均购自广州试剂公司。塑料培养瓶和培养板均为美国 Costar 公司产品,酶标仪为 BioRAD 公司产品 450 型,实时检测 PCR 仪为 ABI Prism7000 型。

1.2 细胞株及细胞培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7/S 及相应的耐阿霉素细胞株 MCF-7/A 均由中山大学肿瘤医院友情赠送并由我研究室保存。在 37℃、5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中,分别培养于含 10% 胎牛血清、青链霉素各 100 U 的 RPMI 1640 培养液中,2~3 d 传代一次。MCF-7/A 细胞除上述培养条件外,需加入 1.0 μg/ml 的 ADM,以维持细胞的耐药性,但 MCF-7/A 实验前 2 周无药培养。

1.3 细胞毒性实验 用胰酶消化细胞后,调整敏感株和耐药株细胞浓度为 2×10^4 /ml,每孔 100 μl 接种于 96 孔板中。实

作者单位:518035 深圳市第二人民医院乳腺疾病诊疗中心

实验 4 组, 每组均设 3 个平行孔, 实验组为槐耳颗粒组和 ADM 组, 对照组为未加药的空白对照, 实验组两组均分别从第 1 孔到第 12 孔倍比稀释, 每孔所加的药物最终为 100 μ l。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中, 培养 48 h 后, 每孔加入 MTT 液 20 μ l (生理盐水配制, 5 mg/ml), 每孔 20 μ l, 继续培养 4 h 后, 去掉上清液, 显微镜下见细胞周围形成蓝紫色针状甲管结晶; 加入二甲亚砜 (DMSO), 每孔 100 μ l, 振荡溶解甲管, 5 min 内用全自动酶标仪测定每孔的 A560 nm 值, 取三个平行孔的平均值, 按公式计算细胞抑制率 (IR): IR = [1 - 实验组 A 均值 / 对照组 A 均值] \times 100%, 并求出 IC50 值 (半数细胞抑制剂量) 及耐药倍数 (MCF-7/A 的 IC50/MCF-7/S 的 IC50)。选择细胞抑制率 < 5% 的药物浓度为槐耳颗粒的无毒剂量。

1.4 MTT 法测定耐药细胞对 ADM 的敏感性: 实验方法同 3, 只是细胞均为耐药细胞。实验设计分为 2 组: ①倍比稀释的 ADM 组; ②无毒剂量槐耳颗粒 + 倍比稀释的 ADM 组; 以未加药的细胞做空白对照。计算 IC50 值, 求出逆转倍数 (未加槐耳颗粒组的 IC50/加槐耳颗粒组的 IC50)。

1.5 荧光定量 PCR 法测定 MDR1 和 MRP 基因表达水平 细胞培养同前, 实验分 3 组: ①敏感细胞 MCF-7/S 组; ②耐药细胞 MCF-7/A 组; ③耐药细胞 MCF-7/A + 无毒剂量槐耳颗粒组。继续培养 24 h 后, 用 PBS 洗 3 次, 收集细胞, 按荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明的条件操作, 大致是: Trizol 试剂提取各组总 RNA, 经 AMV 逆转录酶系统合成 cDNA, 在 50 μ l 反应体系中扩增, 测定各组 MDR1 和 MRP 基因表达水平。Mdr1、MRP 引物、探针由上海生工公司合成。Mdr1 上游是: cccatcatgcaatagcagg, 下游是: gtcaaacattctgctcctga, 探针为: atcgctactgaagcaatagaaaactcc; MRP 上游是: tgactctgtctgaccc, 下游是: gtcacatgatgtgttgagcc, 探针为: ctgcccgtggcctcaccacaca; β -actin 上游是: gtcacacattcatgatggagtt, 探针为: tcctggcctgagctctg。引物、探针序列方向是 5' 端至 3' 端。

1.6 免疫组化 SP 法检测 MCF-7 细胞 P-gp 和 MRP 蛋白的表达水平 细胞培养同前, 将所用细胞贴于无菌玻片制成细胞爬片。实验处理分 3 组: ①敏感细胞 MCF-7/S 组; ②耐药细胞 MCF-7/A 组; ③耐药细胞 MCF-7/A 加无毒剂量槐耳颗粒组。药物处理 24 h 后, 用 PBS 洗 3 次, 70% 无水乙醇固定后进行 SP 法染色, 按试剂盒说明的条件操作, 检测各组细胞 P-gp 和 MRP 蛋白表达水平。判断标准: 以 + + + +、+ + +、+ +、+、- 进行染色判定, 超过 + + 者为表达阳性。

1.7 统计学方法 全部资料用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 统计学比较用 *t* 或 χ^2 检验。

2 结果

2.1 槐耳颗粒和 ADM 对 MCF-7/S 及 MCF-7/A 生长的影响

根据实验结果, 槐耳颗粒对两种细胞株抑制率及其浓度呈正相关。槐耳颗粒在 0.01 ~ 0.1 mg/ml 时, 对敏感细胞 MCF-7/S 和耐药细胞 MCF-7/A 均无明显的抑制作用, 细胞存活率 > 80%; 当槐耳颗粒浓度为 0.01 mg/ml 时, 细胞存活率 > 95%, 故选择 0.01 mg/ml 槐耳颗粒作为 MCF-7/S 和 MCF-7/A 非细胞毒性剂量。槐耳颗粒对 MCF-7/S 和 MCF-7/A 的 IC50 分别是 1.98 mg/ml 和 2.23 mg/ml, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 说明 MCF-7/A 细胞对槐耳颗粒不具有耐药性。ADM 对 MCF-7/S 和 MCF-7/A 的 IC50 则分别是 0.49 μ m 和 25.8 μ m, 耐药株较敏感株细胞对 ADM 耐药倍数为 52.6 倍。

2.2 0.01 mg/ml 的槐耳颗粒对 MCF-7/A 细胞 MDR 的逆转作用 根据结果, 不加槐耳颗粒的耐药株对 ADM 的 IC50 是 25.8 μ m, 经 0.01 mg/ml 的槐耳颗粒与 ADM 联合作用后, MCF27/A 对 ADM 的敏感性均增强, 其 IC50 明显下降至

5.06 μ m, 逆转倍数为 5.1 倍。

2.3 荧光定量 PCR 测定 MCF-7 细胞 MDR1 和 MRP 的 mRNA 表达水平的变化 从结果看, 多药耐药基因 mdr1 和 MRP 的 mRNA 在 MCF-7/A 中的表达分别是其在 MCF-7/S 的表达强度的 128 倍和 51 倍, 两者差异均有显著性 (表 1)。0.01 mg/ml 槐耳颗粒处理 MCF-7/A 细胞后, 其 mdr1 和 MRP 的 mRNA 的表达与处理前 MCF-7/A 相比, 都有显著性下调 (*P* < 0.01), 但仍然明显高于 MCF-7/S 的细胞 (*P* < 0.01)。

表 1 无毒剂量 (0.01 mg/ml) 槐耳颗粒对 MCF-7 细胞 mdr1 和 MRP 的 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞内 MDR1 cDNA 拷贝数	细胞内 MRP cDNA 拷贝数
MCF-7/S	5551 \pm 238.0	9054 \pm 107.0
MCF-7/A	710600 \pm 5102.0*	461800 \pm 2633.0*
MCF-7/A + 槐耳	293610 \pm 1600.0* ^Δ	186040 \pm 960.0* ^Δ

注: * 与对照组 MCF-7/S 比较, *P* < 0.01; ^Δ 与对照组 MCF-7/A 比较, *P* < 0.01

2.4 SP 法检测 MCF-7 细胞 P-gp 和 MRP 蛋白的表达水平 从显微镜下观察染色结果看, MCF-7/A 中 P-gp 和 MRP 的蛋白表达都呈强阳性, 而敏感细胞 MCF-7/S 中 P-gp 和 MRP 的蛋白表达均为阴性 (表 2); 0.01 mg/ml 槐耳颗粒作用于 MCF-7/A 细胞后, 其 P-gp 和 MRP 的蛋白表达比未处理的要弱, 但仍然是阳性表达。即 SP 染色结果和荧光定量 PCR 的检测是一致的。

表 2 无毒剂量 (0.01 mg/ml) 槐耳颗粒对 MCF-7 细胞 P-gp 和 MRP 的蛋白表达的影响

组别	P-gp	MRP
MCF-7/S	-	-
MCF-7/A	+ + + +	+ + + +
MCF-7/A + 槐耳	+ +	+ +

3 讨论

近年来乳腺癌的发病率一直呈现上升趋势, 也是引起女性死亡的重要肿瘤之一, 其中临床化疗过程中产生多药耐药性 (MDR) 导致化疗失败是乳腺癌治疗的常见现象。应用 MDR 逆转剂是克服肿瘤细胞耐药, 提高化疗效果的一种重要手段。引起耐药的机制很多, 目前研究最多的是多药耐药基因 (MDR1) 及其编码的细胞膜 P-糖蛋白 (P-gp)。但仍有研究表明在乳腺癌的多药耐药机制中, 除了 mdr1 基因起主导作用外, 其它的耐药基因也很可能同时发挥着重要作用^[3]。故单针对一种耐药因素比如 MDR1 的干预, 可能会引起肿瘤其它耐药基因例如 MRP 反馈式的表达增强, 影响干预效果。

文献显示 MRP 与 mdr1 有相似之处, 它们同属于 ABC 家族, 两者有 15% 的氨基酸序列相同, 都有药物泵作用, 但 MRP 与 mdr1 作用的化疗药物明显不同, 并且 MRP 在乳腺癌组织中的阳性表达率 (70% ~ 100%) 比 mdr1 的表达率 (50% 左右) 还要高^[4]。所以进行乳腺癌的多药耐药逆转研究时, 除了要阻断 mdr1 基因的表达, 同时也要考虑对 MRP 基因的抑制, 或许能更全面地提高乳腺癌的化疗作用。

本研究的槐耳颗粒或许是这样一种可能的化疗耐药逆转剂。槐耳颗粒是从槐耳菌质中提取的多种有效成分, 其成品 (金克槐耳颗粒, 国家一类新药) 对肝癌、肺癌、胃癌、乳腺癌均有独特疗效。过去认为其作用机制主要是提高机体自身免疫力从而达到抑瘤作用, 最近研究表明, 槐耳颗粒还通过诱导肿瘤细胞凋亡达到抑瘤作用^[5,6]。

本研究证实乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/A 较其敏感株 MCF-7/S 细胞对 ADM 的耐药倍数为 52.6 倍, 其原因之一是 MCF-7/A 表达的 mdr1 和 MRP 的 mRNA 分别是其在 MCF-7/S 的表达强度的 128 倍和 51 倍; 槐耳颗粒在无细胞毒性剂量 0.01 mg/ml 时能增强 ADM 对其耐药株 MCF-7/A 细胞的毒性

作用,其逆转倍数为 5.1 倍,而荧光定量 PCR 说明 0.01 mg/ml 槐耳颗粒处理 MCF-7/A 细胞后,其 *mdr1* 和 *MRP* 的 mRNA 的表达与处理前 MCF-7/A 相比,都有显著性下调($P < 0.01$),暗示 5.1 倍的耐药逆转原因可能是 *mdr1* 和 *MRP* 的 mRNA 的表达下降;免疫组化 SP 染色结果也说明这种逆转与槐耳颗粒下调 MCF-7/A 细胞的 P-gp 和 *MRP* 蛋白的表达相关。

总之,中药槐耳颗粒与化疗药合用不仅能增强机体免疫力,还具有逆转多药耐药的功能,而且作用靶点多,毒副作用小,具备作为 MDR 逆转剂的必备特征。虽然其机制还未完全明确,但对其进行深入研究可为拓展 MDR 逆转剂领域,增强肿瘤化疗效果提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] 程若川,汤礼贵,兰丽琴. 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究. 中国肿瘤,2003,12(2):122-124.
- [2] 郑梦利,周乃康,梁朝阳,等. 槐耳颗粒对胸部恶性肿瘤病人术后免疫功能的影响. 中国肿瘤,2003,12(2):111-113.
- [3] Wu H, Hait WN, Yang JM. Small Interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-Glycoprotein) restores relativity to Multidrug-resistant cancer cells. Cancer Res,2003,4:1515.
- [4] Lacave R, Coulet F, Ricci S, et al. Comparative evaluation by semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of *mdr1*, *MRP* and *GSTp* gene expression in breast carcinomas. Br J Cancer, 1998,77:694-698.
- [5] 钟少文,江慧玲,刘鑫,等. 金克槐耳颗粒治疗 IV 期乳腺癌. 中国肿瘤,2003,12(12):754-755.
- [6] 修忠标,朱夏. 金克对骨肉瘤的化疗增效及减毒作用的临床观察. 福建中医学院学报,2004,14(1):30-31.