

· 论 著 ·

Pgp、MRP1 和 GST 介导乳腺癌细胞对 As₂O₃ 耐药的初步研究印国兵, 孙治君, 郭 丹[△], 杨 露, 林子晶, 范胜浩

(重庆医科大学附属第二医院普外科 400010)

摘 要:目的 探讨乳腺癌细胞对三氧化二砷(As₂O₃)是否耐药及其机制。方法 以乳腺癌 MCF-7/ADR 和 MCF-7 细胞为研究对象,通过 MTT 还原法比较 As₂O₃ 对二者细胞毒作用的差异,用 SABC 法测定细胞用药前后 P 糖蛋白(Pgp)、多药耐药相关蛋白(MRP1)的表达;用紫外分光光度计法测定细胞谷胱甘肽 S 转移酶(GST)的活性。结果 MCF-7/ADR 和 MCF-7 细胞对 As₂O₃ 的敏感性存在显著差异,IC₅₀ 值分别为 12.8 μmol/L、3.0 μmol/L,表明 MCF-7/ADR 细胞对 As₂O₃ 耐药;MCF-7/ADR 细胞 Pgp、MRP1 和 GST 的表达用药前已明显强于 MCF-7 细胞,并在用药后呈过度共表达,而后者未出现此情况。结论 Pgp、MRP1 和 GST 的表达增强介导了乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞对 As₂O₃ 耐药。

关键词:砷;乳腺癌;多药耐药

中图分类号:R737.9;R730.53

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)07-0812-03

A preliminary study of breast cancer cells' tolerance to arsenic trioxide mediated by Pgp, MRP1 and GST

YIN Guo-bing, SUN Zhi-jun, GUO Dan[△], et al.

(Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

Abstract:Objective To explore whether human breast cancer cells are resistant to arsenic trioxide and to study associated mechanism in vitro. **Methods** MTT test was used to detect the sensibility of human breast cancer MCF-7 and multidrug resistant MCF-7/ADR cell line to arsenic trioxide. The expression of Pglycoprotein (Pgp) and multidrug resistance associated protein(MRP) of the two cell lines were assayed by SABC immunohistochemical method before and after medication, and the glutamylcysteinyl glycine sulfurtransferase (GST) activity was detected by ultraviolet spectrophotometer method. **Results** The sensibility of MCF-7 and MCF-7/ADR cell to arsenic trioxide was not consistent, and the IC₅₀ was 3.0 μmol/L and 12.8 μmol/L respectively. Meanwhile, marked overexpression of Pgp, MRP and GST of MCF-7/ADR cell after medication were detected, but it did not occur in MCF-7 cell. **Conclusion** Overexpression of Pgp, MRP1 and GST contributes to the resistance of multidrug resistance MCF-7/ADR cell to arsenic trioxide.

Key words: arsenic trioxide; breast carcinoma; multidrug resistance

自从 20 世纪 70 年代发现三氧化二砷(As₂O₃)有抗肿瘤作用以来,恶性肿瘤细胞是否对其耐药一直存在广泛争议,为此,本文对乳腺癌多药耐药 MCF-7/ADR 细胞及其亲本 MCF-7 细胞对 As₂O₃ 的耐药状况进行了研究,并对相关机制作了初步探讨。

1 材料与方

1.1 材料 MCF-7/ADR 细胞购自中山医科大学肿瘤研究所, MCF-7 细胞由重庆医科大学附属第一医院普外科实验室馈赠。RPMI1640 培养液由干粉按说明书配制而成,加 10% 胎牛血清(杭州四季青公司产品)。亚砷酸注射液(含 As₂O₃ 1 mg/mL,每支 10 mg)以生理盐水配成 200 μmol/L 储备液,存放于 -80℃,临用时以培养液稀释到相应浓度。临用前 1 d 将 MTT 干粉以生理盐水配成 5 mg/mL。Pgp、MRP1 免疫组化试剂盒购自武汉博士得公司;GST 试剂盒购自南京建成公司。

1.2 研究方法

1.2.1 MTT 实验 将细胞培养于 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下, MCF-7/ADR 细胞培养液中加入 5 μmol/L 的阿霉素维持培养,实验前 1 周停药。MCF-7/ADR 和 MCF-7 细胞均

按 As₂O₃ 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、16.0 μmol/L 分为 7 个实验组,设阴性对照和空白对照。将对数生长期的上述两种细胞按 10³/mL 分别接种于 5 块 96 孔培养板,每孔 200 μL,每组设 4 个复孔,重复 3 遍。待细胞贴壁后,更换含有相应浓度 As₂O₃ 的培养液,但阴性对照不加 As₂O₃,空白对照只加培养液。加药后每 24 h 各取出一块培养板,分别加入 20 μL MTT,继续培养 4 h,加入 150 μL DMSO 振荡溶解 10 min,用空白对照调零,在酶联仪 490 nm 波长下检测各孔的吸光值。生长抑制率=(阴性对照组 OD 值-药物组 OD 值)/阴性对照组 OD 值×100%。

1.2.2 Pgp、MRP1 表达的测定及结果判断 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞设空白组、0.5 μmol/L 组、2.0 μmol/L 组,每组 20 个标本。细胞直接培养于 6 孔板内的盖玻片上,细胞进入对数生长期后,空白组不加药,药物组加入相应浓度 As₂O₃ 继续培养 48 h,取出盖玻片,PBS 液洗片,丙酮固定,依照 SABC 免疫组化试剂盒说明书进行染色。根据每张载玻片上至少 10 个视野(大于 200 个细胞)中阳性细胞数的比例计算表达率。另参照 Simler 等的方法进行染色强度分级,(-):胞膜及胞浆内无

[△] 通讯作者。

表 1 两种细胞用药前后 Pgp、MRP1 的阳性表达率($\bar{x} \pm s, \%$)

癌株	空白组		0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组		2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组		P
	Pgp	MRP1	Pgp	MRP1	Pgp	MRP1	
MCF-7	45.82 \pm 5.91	35.99 \pm 4.10	47.51 \pm 6.12	38.19 \pm 4.62	48.80 \pm 6.90	37.14 \pm 5.82	>0.05
MCF-7/ADR	66.67 \pm 6.99	46.54 \pm 4.79	72.15 \pm 6.93	61.11 \pm 5.03	85.87 \pm 7.72	64.72 \pm 5.64	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

明显染色,放大倍数为 10×40 时仍难辨认;(+):浅着色,胞膜及胞浆内部分为浅棕色,放大倍数为 10×40 时可以辨认,但着色弱,放大倍数为 10×10 时难辨认;(++):中度着色,胞膜及胞浆内均为浅棕色,放大倍数为 10×10 时能辨认;(+++):强着色,胞膜及胞浆内深着色,放大倍数为 10×10 时能清楚辨认。

1.2.3 GST 活性的测定 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞均取空白组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组进行测定,每组 15 个标本。细胞培养于 100 mL 培养瓶内,细胞进入对数生长期后,空白组不加药,药物组加入相应浓度 As_2O_3 继续培养 48 h,胰酶消化收获细胞,调整每个标本内细胞数至 10^7 ,加入匀浆介质(0.86%生理盐水),冰浴条件下在匀浆管中充分研磨,制成细胞匀浆,用 Lowry 法测定蛋白含量,然后调整蛋白含量至约 5 mg/mL 后进行 GST 酶活性的测定。操作过程按照 GST 试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法 结果用 SAS8.1 统计软件进行分析,MTT 试验和 GST 测定结果采用方差分析,Pgp、MRP1 表达情况采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 As_2O_3 对 MCF-7/ADR 和 MCF-7 细胞的不良反应 不同剂量 As_2O_3 对 MCF-7/ADR 和 MCF-7 细胞的抑制率随时间的变化分别见图 1、2。可见,0.5~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 对 MCF-7/ADR 和 MCF-7 细胞抑制作用都较弱,而 2.0~16.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 对两种细胞均有抑制作用,并呈时间剂量依赖关系;其 96 h 的 IC_{50} 分别为 12.8 $\mu\text{mol/L}$ 和 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 。单因素重复测定的方差分析显示作用时间和作用浓度对两种细胞都有正向的交互作用,在相同条件下, As_2O_3 对 MCF-7/ADR 和 MCF-7 细胞抑制率的两两比较差异有统计学意义($P<0.05$),前者的抑制率明显低于后者。

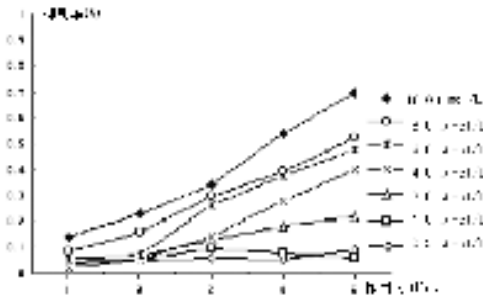


图 1 As_2O_3 对 MCF-7/ADR 细胞的生长抑制作用

2.2 Pgp、MRP1 免疫组化测定结果 见表 1。采用 χ^2 检验,MCF-7 细胞用药前后各组间 Pgp、MRP1 的表达差异无统计学意义($P>0.05$),而 MCF-7/ADR 细胞用药前后各组间 Pgp、

MRP1 的表达差异有统计学意义($P<0.05$),相同组别下 MCF-7/ADR 细胞 Pgp、MRP1 的表达率均显著强于 MCF-7 细胞($P<0.05$),且表达强度也强于 MCF-7 细胞(图 3、4)。

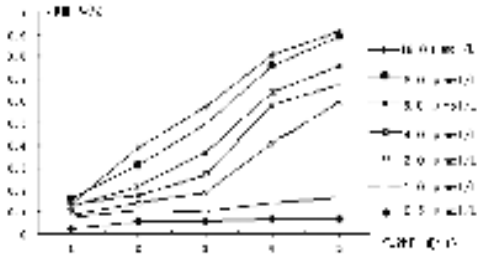
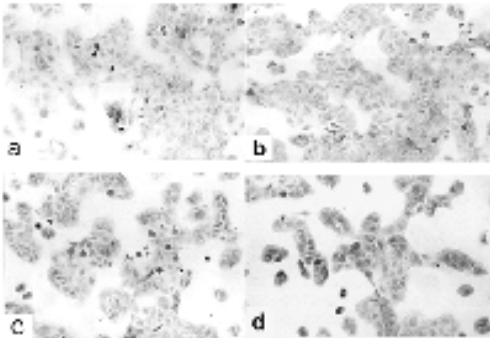
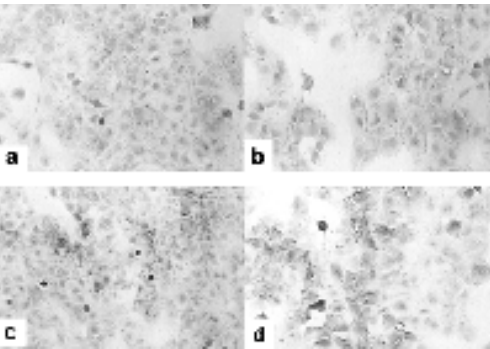


图 2 As_2O_3 对 MCF-7 细胞的生长抑制作用



a:用药前 MCF-7 细胞 Pgp 的表达;b:2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 MCF-7 细胞 Pgp 的表达;c:用药前 MCF-7/ADR 细胞 Pgp 的表达;d:2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 MCF-7/ADR 细胞 Pgp 的表达。

图 3 用药前后 Pgp 的表达情况(SABC 10×40)



a:用药前 MCF-7 细胞 MRP1 的表达;b:2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 MCF-7 细胞 MRP1 的表达;c:用药前 MCF-7/ADR 细胞 MRP1 的表达;d:2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 MCF-7/ADR 细胞 MRP1 的表达。

图 4 用药前后 MRP1 的表达情况(SABC 10×40)

2.3 用药前后 GST 活性 见表 2。未用药前 MCF-7/ADR 细胞 GST 活性高于 MCF-7 细胞,用药后 MCF-7/ADR 细胞

GST 活性进一步增高,而 MCF-7 细胞未出现此情况。

表 2 两种细胞用药前后 GST 活性测定

结果 (u/mg, $\bar{x} \pm s$)

癌株	空白组	0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	P
MCF-7	4.80 \pm 1.13 ^a	5.29 \pm 1.22 ^b	5.62 \pm 1.48 ^c	>0.05
MCF-7/ADR	9.36 \pm 1.90 ^d	16.94 \pm 2.73 ^e	19.25 \pm 2.84 ^f	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05	

方差分析显示,^a与^d、^b与^e、^c与^f比较, $P<0.05$; ^d与^e、^d与^f比较, $P<0.05$;而^a与^b、^a与^c比较, $P>0.05$ 。

3 讨 论

已有一些研究表明,As₂O₃ 对多种恶性肿瘤有治疗作用^[1],也有报道认为 As₂O₃ 可部分逆转入乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞对 ADM 的耐药性,其逆转机制可能与细胞内 GST- π 的改变有关^[2]。但乳腺癌尤其其耐药株对 As₂O₃ 耐药与否至今仍然是相关研究领域的一个空白。本研究发现,0.5~16.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As₂O₃ 对 MCF-7 细胞均有生长抑制作用,其中,0.5~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As₂O₃ 抑制作用较弱,2.0~16.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As₂O₃ 则显示明显的生长抑制作用,并随作用时间和作用浓度的增加而增强。可见,As₂O₃ 对 MCF-7 细胞有良好的增殖抑制作用,与文献报道一致。As₂O₃ 也能抑制 MCF-7/ADR 细胞的增殖,但细胞毒实验表明:(1)相同浓度 As₂O₃ 对 MCF-7/ADR 细胞的抑制率明显低于其亲代 MCF-7 细胞,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As₂O₃ 作用 120 h 两者的抑制率分别为 18.6% 和 40.1%;(2)MCF-7/ADR 细胞 96 h 的 IC₅₀ 值高达 12.8 $\mu\text{mol/L}$,显著高于其亲代 MCF-7 细胞的 3.0 $\mu\text{mol/L}$;(3)8 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 达到 50% 的抑制率,MCF-7/ADR 细胞需要 115.2 h,而 MCF-7 细胞仅需 72.6 h,表明 As₂O₃ 对 MCF-7/ADR 细胞的起效时间晚于 MCF-7 细胞。可见,MCF-7/ADR 细胞较其亲代 MCF-7 细胞对 As₂O₃ 有耐药表现,耐药倍数为 4.27 倍。

耐药性是影响肿瘤患者化疗效果的重要因素,其中多药耐药是化疗失败的主要原因之一,多药耐药表型与许多因素有关,其中,Pgp、MRP1、GST 过度表达是多药耐药的重要发病机制。随着近年来对 As₂O₃ 耐药问题研究的深入,越来越多的研究结果表明高表达 Pgp、MRP1 和 GST/GSH 解毒酶系统的癌细胞可对 As₂O₃ 产生有效的耐受。Vernhet 等^[3-4]以肺癌 GLC4 细胞和 MRP1 高表达的 GLC4/Sb30 细胞为研究对象,

发现后者对亚砷酸盐、砷酸盐的耐药倍数分别是其母细胞 (GLC4 细胞) 的 12.7、16.3 倍,同时,该细胞 MRP1 的表达明显增加。Yang 等^[5]的研究发现对 As₂O₃ 敏感的膀胱癌、APL、胃癌细胞内谷胱甘肽浓度明显低于其他癌细胞,而对砷交叉耐药的多种耐药癌细胞较其敏感的亲代细胞往往含有较高的 GSH 水平。Liu 等^[6]则认为长期砷暴露的细胞通过过表达 Pgp、MRP1/MRP2 以及 GST-Pi 对砷产生获得性耐药。本实验中,用药前 MCF-7 细胞 Pgp、MRP1 和 GST 的表达较 MCF-7/ADR 细胞弱,施加 As₂O₃ 48 h 后 Pgp、MRP1 和 GST 的表达增强也不明显;而 MCF-7/ADR 未用药前 3 者的表达均已较强,给药后更出现了 Pgp、MRP1 的过表达以及 GST 活性的显著增加。推测这种差异正是造成 MCF-7/ADR 对 As₂O₃ 耐药的原因,但何者在此过程中起了主导作用尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 印国兵,吴诚义. 砷剂对乳腺癌 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞生长抑制作用的比较研究[J]. 重庆医科大学学报, 2005,30:570.
- [2] 王婷,双跃荣. 三氧化二砷逆转入乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞耐药的机制研究[J]. 中华肿瘤杂志,2002,24:339.
- [3] Vernhet L, Allain N, Payen L, et al. Resistance of human multidrug resistance-associated protein 1 overexpressing lung tumor cells to the anticancer drug arsenic trioxide [J]. Biochemical Pharmacology, 2001,61(7):1387.
- [4] Vernhet L, Seite MP, Allain N, et al. Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001,298(1):234.
- [5] Yang CH, Kuo ML, Chen JC, et al. Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells[J]. Br J Cancer, 1999,81(5):796.
- [6] Liu J, Chen H, Miller DS, et al. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic[J]. Mol Pharmacol, 2001,60(2):302.

(收稿日期:2009-09-23 修回日期:2009-12-23)

《重庆医学》撰稿新规定

《重庆医学》为进一步提高文章学术水平,对部分栏目作出如下规定:

1. 部分栏目字数要求:论著、临床研究、调查报告、综述栏目的论文正文字数不低于 4 000 字。
2. 部分栏目论文的参考文献数量规定:论著在 15 条以上,临床研究、调查报告在 10 条以上,综述必须在 20 条以上(大部分应为近 5 年文献)。

《重庆医学》编辑部