



## X射线照射后鼻咽癌细胞多药耐药基因的表达

多药耐药基因(mdr1基因)扩增及其编码产物P糖蛋白(P-gp)的过度表达是目前已发现的最重要的一种MDR(多药耐药)机制,大多数肿瘤MDR的发生被认为与P-gp有关。鼻咽癌是中国及东南亚各国发病率较高的肿瘤。早期鼻咽癌一般采取单纯放疗,中晚期鼻咽癌一般采取放疗、化疗综合治疗的原则。临床中我们感受到:再次或多次化疗肿瘤的化疗敏感性降低;有时放疗后化疗敏感性也降低。关于中晚期鼻咽癌放化疗的临床经验总结的文献较多[1],但国内外针对鼻咽癌放化疗顺序安排方面的基础研究少有报道。作者对鼻咽癌细胞CNE1放射线照射前后mdr1基因和P-gp的表达,以及对化疗药物转运功能的变化等方面进行研究为临床提供参考依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验仪器

倒置相差显微镜和照相系统(日本Olympus),超净工作台(西安国华电器),CO<sub>2</sub>孵箱(美国Formu Scientific),Heraecus Eppendorf 台式离心机(Biofuge Pico公司),冷冻离心机(湘西仪器仪表总厂GL20A型),空气恒温摇床(江苏太仓医疗器械厂THZ-82型),PCR仪(新加坡Applied Biosystems),电子分析天平(日本岛津公司),蛋白电泳仪(美国Bio-RAD),核酸电泳仪(大连睫迈科公司),流式细胞仪(美国COULTER EPICS XL型)。

#### 1.2 细胞和材料

鼻咽癌细胞系CNE1(中山大学肿瘤研究所夏云飞教授馈赠),小牛血清(杭州四季青公司),RPMI 1640基础培养基(Invitrogen公司),二甲基亚砷(DMSO)(广州化学试剂厂),PBS(博士德生物有限公司),柔红霉素(意大利Pharmacia & Upjohn S. p. A),P-gp单克隆抗体C219(Calbiochem-Novabiochem公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(二抗)(晶美公司),DNA Marker(华美生物工程公司),低融点琼脂糖(Promega公司,华美生物工程公司分装),Taq Plus II DNA聚合酶(Sangon公司),PCR扩增缓冲液和dNTP(华美生物工程公司),各种限制性内切酶、连接酶等(Promega、Gibco、Clontech等公司),Trizol试剂盒(Invitrogen公司),mdr1基因及内参照基因三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)PCR引物由上海生工公司合成,P-gp阳性对照来自第四军医大学消化研究所陈彩平博士馈赠的胃癌多药耐药细胞系HT70细胞裂解液。

#### 1.3 细胞培养

CNE1细胞用含10%小牛血清及1%双抗的RPMI1640培养基常规37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,0.25%胰酶消化、传代。射线照射后每隔4 d消化1次细胞,冻存。用于RT-PCR检测和Western blotting分析。

#### 1.4 射线照射

取指数生长期细胞进行射线照射。照射源为美国VARIAN 2300 C/D 型双光子直线加速器;照射条件:X射线,剂量率200 cGy/min;照射剂量4 Gy;照射野大小15 cm×15 cm。照射前有物理室测量照射剂量率,并对培养皿进行衰减校正。把培养皿置于照射野中心。

#### 1.5 RT-PCR检测

1.5.1 细胞总RNA提取 用Trizol试剂盒提取。

1.5.2 将RNA反转录为cDNA (1)取1  $\mu\text{g}$ 总RNA加入1  $\mu\text{l}$  oligo dT, 70  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 迅速置于冰中;(2)加入AMV 5 $\times$ buffer 5  $\mu\text{l}$ , 10 mmol/L dNTP 1 $\mu\text{l}$ , RNA酶抑制剂(40 U/ $\mu\text{l}$ ) 1 $\mu\text{l}$ , AMV RT(20 U/ $\mu\text{l}$ )反转录酶1  $\mu\text{l}$ ;(3)加DEPC处理的水至25  $\mu\text{l}$ , 42  $^{\circ}\text{C}$ 温育60 min, 70  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 终止反应, 即得cDNA。

1.5.3 引物设计 *mdr1*引物序列P1: 5'-CACAAAGCCC AAGACAGAAAG-3', P2: 5'-TTGCCAACCATAGATGAAGG-3', 扩增片段长度545 bp。GAPDH作为内参照, 其引物序列P1: 5'-CGGGAAGCTTGTGATCAAT GG-3'; P2: 5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3', 扩增片段长度357 bp。

1.5.4 *mdr1*的PCR扩增 在25  $\mu\text{l}$ 的反应体系中加入: 2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , cDNA 2  $\mu\text{l}$ , P1 1  $\mu\text{l}$ , P2 1  $\mu\text{l}$ , Taq酶4 U, H<sub>2</sub>O 14  $\mu\text{l}$ 。以上述反转录的cDNA 为模板进行PCR扩增, 条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s后, 加入Taq DNA聚合酶4 U, 按94  $^{\circ}\text{C}$  5 s、72  $^{\circ}\text{C}$  4 min进行5个循环, 94  $^{\circ}\text{C}$  5 s、70  $^{\circ}\text{C}$  4 min进行5个循环, 94  $^{\circ}\text{C}$  5 s、68  $^{\circ}\text{C}$  4 min进行25个循环, 另加72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。

1.5.5 内参照的PCR扩增 在25  $\mu\text{l}$ 的反应体系中加入: 2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , cDNA 2  $\mu\text{l}$ , T1 1  $\mu\text{l}$ , T2 1  $\mu\text{l}$ , H<sub>2</sub>O 16  $\mu\text{l}$ 。PCR扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s后, 加入Taq DNA聚合酶4 U, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s、54  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35个循环, 另加72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。

1.5.6 琼脂糖电泳观察PCR结果 将*mdr1* PCR产物和相应的内参PCR产物按1:1混合, 1%琼脂糖凝胶电泳观察PCR扩增产物。

## 1.6 Western blotting

1.6.1 细胞裂解 取细胞加入1 ml NP-40 细胞裂解液(1%NP-40、20 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0、150 mmol/L NaCl、0.02% NaN<sub>3</sub>、100 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 用前加入1.0 mmol/L PMSF), 冰浴条件下放置30 min。将液体转移到1.5 ml的离心管中, 冰上放置10 min后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g离心10 min。

1.6.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用SDS-变性聚丙烯酰胺凝胶不连续系统, 先后配制5%的分离胶和4%的积层胶, 取蛋白样品各50  $\mu\text{g}$ 经上样缓冲液处理后上样, 120 V电泳约1 h。

1.6.3 转移 在转移缓冲液(含有20%甲醇、39 mmol/L甘氨酸、48 mmol/L Tris碱、0.1% SDS)中进行转移, 转移至NC膜上, 恒压100 V、3 h。转移完毕后, 将NC膜在丽春红染液中染色2 min, 观察转移效果, 进行下一步的Western blotting。

1.6.4 Western blotting 转移后, 在膜上标记正反面, 放入含有0.5%Tween-20的PBST中, 洗膜5 min, 封入含有5%BSA的封闭液的塑料袋中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动1 h。PBST洗膜15 min $\times$ 3次。用PBST稀释一抗(1:500), 将膜封入塑料袋中, 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST洗膜15 min $\times$ 3次。用PBST稀释二抗(1:3 000), 将膜封入塑料袋中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动1 h。PBST洗膜15 min $\times$ 3次。DAB显色, 用滤纸将膜上的液体吸干, 在DAB反应物中反应2 min。

## 1.7 FCM检测

细胞照射后经两次传代, 待细胞长满单层, 加入可自发红色荧光的柔红霉素(daunorubicin, DNR)。参照文献[2]使培养基DNR终浓度达2  $\mu\text{mol/L}$ , 2 h后消化收获细胞, 冷PBS(0  $^{\circ}\text{C}$ )吹洗、离心3次后, 用500  $\mu\text{l}$ 冷PBS吹散细胞。在FCM上检测(激发光源波长488 nm, 滤过光源波长575 nm)。每个标本检测的细胞数超过10 000个。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR结果

CNE1细胞射线照射前未观察到*mdr1*基因(*mdr1* mRNA)的表达; 射线照射后*mdr1*基因明显表达(图1)。

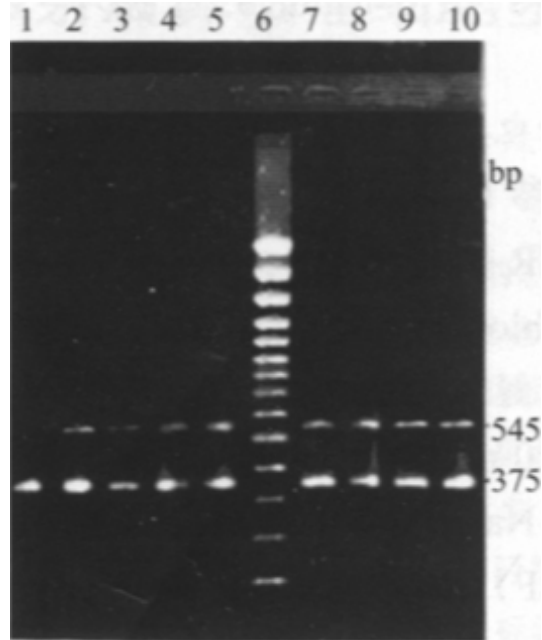


图1 RT-PCR结果

Fig.1 Results of RT-PCR products

Lane 1: Unirradiated CNE1 cells; Lane 6: DNA marker; Lanes 2-5, 7-10: CNE1 cells every 4 d following irradiation

## 2.2 Western blotting

CNE1细胞射线照射前未观察到P-gp的表达；射线照射后P-gp明显表达(图2)。

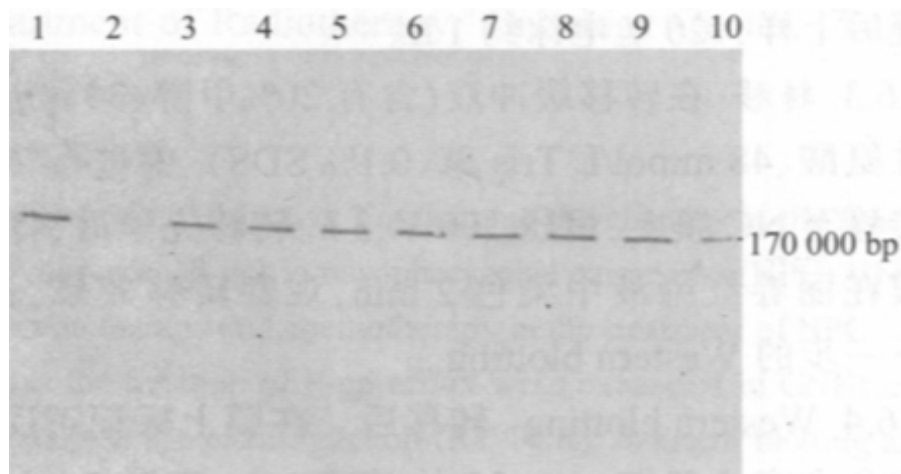


图2 Western blotting结果

Fig.2 Results of Western blotting of the CNE1 cells before and after irradiation exposure

Lane: Positive control; Lane 2: Unirradiated CNE1 cells;  
Lanes 3-10: CNE1 cells every 4 d following irradiation

## 2.3 FCM结果

FCM检测到射线照射前CNE1细胞内的DNR平均荧光度为1.41(图3)，射线照射后CNE1细胞内的DNR平均荧光度为1.37(图4)。射线照射后细胞内的荧光较射线照射前低，射线照射后对DNR的摄取较射线照射前低。

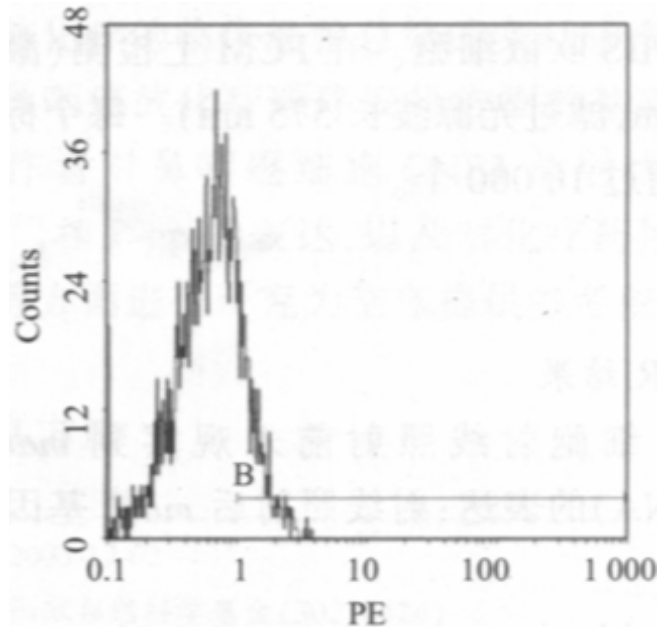


图3 细胞照射前DNR平均荧光强度

Fig.3 Average fluorescence intensity of daunorubicin (DNR) absorbed by unirradiated CNE1 cells

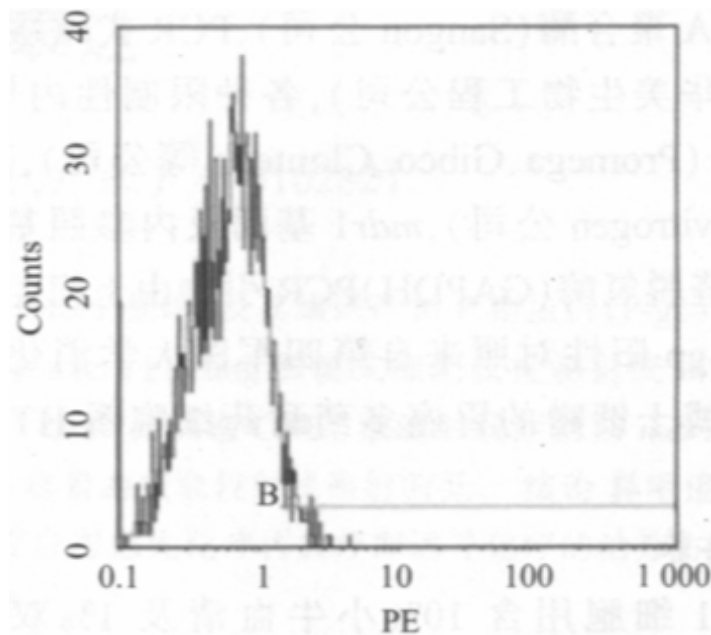


图4 细胞照射后DNR平均荧光强度

Fig.4 Average fluorescence intensity of DNR absorbed by irradiated CNE1 cells

### 3 讨论

1976年Juliano与Ling首先观察到具有MDR表型的CHO细胞内药物积聚发生障碍，相对分子质量为170 000的膜糖蛋白—P-gp过度表达。该细胞摄入药物与敏感细胞没有差异，但药物外排能力却加强，表明P-gp能调节细胞膜通透性，影响药物在细胞内积聚[3]。随后一系列研究证明，MDR细胞抗药程度及胞内药物积聚与P-gp过度表达有关[4][5][6]。P-gp是由mdr1基因编码、1 280个氨基酸残基组成、相对分子质量为170 000的跨膜蛋白。在肿瘤细胞中，P-gp通过ATP供能，将长春新碱、秋水仙素、放线菌素D等药物泵出细胞外导致

肿瘤细胞耐药。现已证实编码人P-gp的基因(mdr1)位于第7号染色体7q21, 含28个外显子, 全长为4.5 kb, 仅有一个开放阅读框[7]。在不同的细胞系中MDR1启动子显示的活性不同, 其增强子的活性亦不同, 因此mdr1表达具有异质性和组织特异性[8][9]。Chen等[10]曾应用免疫组化的方法检测143个原发鼻咽癌患者, P-gp表达率为12.6%, 43个复发鼻咽癌患者中表达率为32.6%, 20个转移鼻咽癌患者中表达率为0%, 并认为MDR-1的表达与原发鼻咽癌病理学类型和生存率有关, 但与分期无关。

中国华南地区鼻咽癌中约70%的病例为III、IV患者, 中晚期鼻咽癌患者治疗失败的主要原因为局部复发或远处转移, 严重影响鼻咽癌治疗生存率的提高[1]。中晚期鼻咽癌的治疗一般采取放疗、化疗综合治疗的原则。但化疗与放疗如何匹配目前尚无令人满意的结果。按照化疗安排在放疗前、同时和放疗后分为诱导化疗、同步化疗和辅助化疗, 目前上述各种匹配方法临床上都有应用。以往往往着眼于化疗后P-gp的表达情况, 但在射线照射后P-gp的表达尤其在鼻咽癌细胞及其基础研究较少。在其他肿瘤方面, Nielsen等[11]报道, 鼠Ehrlich腹水肿瘤细胞(EHR2)体外分次照射后获得MDR表型, P-gp表达水平升高。Osmak等[12]报道, 人宫颈癌细胞(HeLa)射线照射后对长春新碱抵抗, 并认为与P-gp有关。Hill[13][14][15]、McClellan[16][17]等用中国仓鼠卵巢肿瘤细胞(CHO)、人卵巢癌细胞经X线照射均获得MDR表型, P-gp过度表达。来自临床的研究报道放疗后残存的口腔癌组织P-gp表达明显上调[18]。

本研究从P-gp的基因、蛋白及其功能三个层次研究鼻咽癌细胞射线照射后的MDR。应用敏感性高的RT-PCR、Western blotting方法检测到鼻咽癌CNE1细胞射线照射后较长时间内mdr1基因、P-gp均明显表达; 应用FCM技术检测鼻咽癌CNE1细胞内可自发荧光的化疗药物DNR的平均荧光度, 证明射线照射后鼻咽癌细胞对DNR的摄取较射线照射前低, 说明射线照射后鼻咽癌细胞获得MDR表型, 对化疗药物敏感性下降。因此, 在中晚期鼻咽癌的临床治疗中应尽量避免先放疗再化疗即辅助化疗的治疗方案, 而应采取先化疗再放疗即诱导化疗的治疗方案, 从而避免因放疗诱导的MDR。Teo等[19]针对III、IV期鼻咽癌的临床报道亦支持诱导化疗的治疗方案。我们仅从鼻咽癌CNE1细胞进行研究, 考虑到实体肿瘤与肿瘤细胞的不同、同种肿瘤的不同个体差异、化疗后的放射敏感性变化等, 仍有许多问题值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 马 骏. 化疗联合放疗治疗鼻咽癌的研究进展[J]. 癌症 (Chin J Cancer), 2000, 19(4): 390-2.
- [2] 平宝红, 周淑芸, 刘启发, 等. 4种细胞因子对K562/S及其耐药细胞株K562/A02积蓄柔红霉素的影响[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(2): 158-60.  
Ping BH, Zhou SY, Liu QF, et al. Effect of 4 cytokines on intracellular accumulation of daunorubicin in K562/A02[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2000, 20(2): 158-60.
- [3] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants[J]. Biochem Biophys Acta, 1976, 455(1): 152-62.
- [4] Lehne G, Elonen E, Baekelandt M, et al. Challenging drug resistance in cancer therapy[J]. Acta Oncol, 1998, 37(5): 431-9.
- [5] 袁亚维, 张积仁, 周殿元. 乳腺癌mdr1基因表达调控的探讨[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(5): 408-10.  
Yuan YW, Zhang JR, Zhou DY. Study of mdr1 gene modulation in breast cancer[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(5): 408-10.
- [6] 陈 俊, 袁亚维, 张积仁, 等. 耐药乳腺癌MCF-7/Adr细胞c-myc的表达上调及与耐药的关系[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 124-6.  
Chen J, Yuan YW, Zhang JR, et al. Up-regulation of c-myc expression in MCF-7/Adr human breast cancer cells and its association with resistance against doxorubicin[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 124-6.
- [7] Roninson IB, Chin JE, Choi KG, et al. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83

(12): 4538-42.

[8] Leonardo E, Valente G, Cappia S, et al. Immunohistochemical evaluation of P-glycoprotein in human malignancies by monoclonal antibody MC57[J]. *Int J Cancer*, 1994, 57(6): 841-6.

[9] Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(1): 265-9.

[10] Chen CL, Sheen TS, Lou IU, et al. Expression of multidrug resistance 1 and glutathione-S-transferase-P protein in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2001, 32(11): 1240-4.

[11] Nielsen D, Maare C, Eriksen J, et al. Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein in Ehrlich ascites tumor cells after fractionated irradiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 51(4): 1050-7.

[12] Osmak M, Miljanic S, Kapitanovic S. Low doses of gamma-rays can induce the expression of mdr gene[J]. *Mutat Res*, 1994, 324(1-2): 35-41.

[13] Hill BT, Whelan RD, Hosking LK, et al. Differential expression of drug resistance following in vitro exposure of human tumour cell lines to fractionated X-irradiation[J]. *Cancer Treat Rev*, 1990, 17 (Suppl A): 21-6.

[14] Hill BT. Differing patterns of cross-resistance resulting from exposures to specific antitumour drugs or to radiation in vitro[J]. *Cytotechnology*, 1993, 12(1-3): 265-88.

[15] Hill BT, Moran E, Etievant C, et al. Low-dose twice-daily fractionated X-irradiation of ovarian tumor cells in vitro generates drug-resistant cells overexpressing two multidrug resistance-associated proteins, P-glycoprotein and MRP1[J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11(3): 193-200.

[16] McClean S, Hosking LK, Hill BT. Expression of P-glycoprotein-mediated drug resistance in CHO cells surviving a single X-ray dose of 30 Gy[J]. *Int J Radiat Biol*, 1993, 63(6): 765-73.

[17] McClean S, Hill BT. Modified multiple drug resistance phenotype of Chinese hamster ovary cells selected with X-rays and vincristine versus X-rays only[J]. *Br J Cancer*, 1994, 69(4): 711-6.

[18] Ng IO, Lam KY, Ng M, et al. Expression of P-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 1998, 83(5): 851-7.

[19] Teo PM, Chan AT, Lee WY, et al. Expression of multiple drug resistance genes in NPC cell irradiated[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999, 43(2): 261-71.

#### 参考文献:

[1] 马骏. 化疗联合放疗治疗鼻咽癌的研究进展[J]. *癌症 (Chin J Cancer)*, 2000, 19(4): 390-2.

[2] 平宝红, 周淑芸, 刘启发, 等. 4种细胞因子对K56/S及其耐药细胞株K562/A02积蓄柔红霉素的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2000, 20(2): 158-60.

Ping BH, Zhou SY, Liu QF, et al. Effect of 4 cytokines on intracellular accumulation of daunorubicin in K562/A02[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2000, 20(2): 158-60.

- [3] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1976, 455(1): 152-62.
- [4] Lehne G, Elonen E, Baekelandt M, et al. Challenging drug resistance in cancer therapy[J]. *Acta Oncol*, 1998, 37(5): 431-9.
- [5] 袁亚维, 张积仁, 周殿元. 乳腺癌mdr1基因表达调控的探讨[J]. *第一军医大学学报*, 1999, 19(5): 408-10.
- Yuan YW, Zhang JR, Zhou DY. Study of mdr1 gene modulation in breast cancer[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 1999, 19(5): 408-10.
- [6] 陈俊, 袁亚维, 张积仁, 等. 耐药乳腺癌MCF-7/Adr细胞c-myc的表达上调及与耐药的关系[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(2): 124-6.
- Chen J, Yuan YW, Zhang JR, et al. Up-regulation of c-myc expression in MCF-7/Adr human breast cancer cells and its association with resistance against doxorubicin[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(2): 124-6.
- [7] Roninson IB, Chin JE, Choi KG, et al. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(12): 4538-42.
- [8] Leonardo E, Valente G, Cappia S, et al. Immunohistochemical evaluation of P-glycoprotein in human malignancies by monoclonal antibody MC57[J]. *Int J Cancer*, 1994, 57(6): 841-6.
- [9] Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(1): 265-9.
- [10] Chen CL, Sheen TS, Lou IU, et al. Expression of multidrug resistance 1 and glutathione-S-transferase-P protein in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2001, 32(11): 1240-4.
- [11] Nielsen D, Maare C, Eriksen J, et al. Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein in Ehrlich ascites tumor cells after fractionated irradiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 51(4): 1050-7.
- [12] Osmak M, Miljanic S, Kapitanovic S. Low doses of gamma-rays can induce the expression of mdr gene[J]. *Mutat Res*, 1994, 324(1-2): 35-41.
- [13] Hill BT, Whelan RD, Hosking LK, et al. Differential expression of drug resistance following in vitro exposure of human tumour cell lines to fractionated X-irradiation[J]. *Cancer Treat Rev*, 1990, 17 (Suppl A): 21-6.
- [14] Hill BT. Differing patterns of cross-resistance resulting from exposures to specific antitumour drugs or to radiation in vitro[J]. *Cytotechnology*, 1993, 12(1-3): 265-88.
- [15] Hill BT, Moran E, Etievant C, et al. Low-dose twice-daily fractionated X-irradiation of ovarian tumor cells in vitro generates drug-resistant cells overexpressing two multidrug resistance-associated proteins, P-glycoprotein and MRP1[J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11(3): 193-200.
- [16] McClean S, Hosking LK, Hill BT. Expression of P-glycoprotein-mediated drug resistance in CHO cells surviving a single X-ray dose of 30 Gy[J]. *Int J Radiat Biol*, 1993, 63(6): 765-73.
- [17] McClean S, Hill BT. Modified multiple drug resistance phenotype of Chinese hamster ovary cells selected with X-rays and vincristine versus X-rays only[J]. *Br J Cancer*, 1994, 69(4): 711-6.

[18] Ng IO, Lam KY, Ng M, et al. Expression of P-glycoprotein, a multi-drug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 1998, 83(5): 851-7.

[19] Teo PM, Chan AT, Lee WY, et al. Expression of multiple drug resistance genes in NPC cell irradiated[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999, 43(2): 261-71.

---

[回结果列表](#)