

X射线照射后鼻咽癌细胞多药耐药基因的表达

卜俊国,袁亚维,陈俊(第一军医大学珠江医院肿瘤中心放疗科,广东广州510282)

摘要:目的 通过检测射线照射前后鼻咽癌 CNE1 细胞多药耐药基因(*mdr1* 基因)及其编码产物 P 糖蛋白(P-gp)的表达和功能为临床鼻咽癌放疗化疗顺序提供参考。方法 利用 RT-PCR、Western blotting 和流式细胞仪检测射线照射前后 CNE1 细胞的 *mdr1* 基因和 P-gp 的表达及对柔红霉素的外排功能。结果 鼻咽癌 CNE1 细胞射线照射前 *mdr1* 基因、P-gp 不表达;照射后较长时间内 *mdr1* 基因、P-gp 均明显表达;对柔红霉素的摄取较射线照射前低。结论 鼻咽癌 CNE1 细胞射线照射后化疗敏感性降低,提示临床对于中晚期鼻咽癌的治疗应考虑先化疗再放疗即诱导化疗的治疗方案。

关键词:鼻咽肿瘤;肿瘤细胞,培养的;药物耐受性;X线;P-糖蛋白类

中图分类号:R394.7;R739.63 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)06-0646-04

Expression of multidrug resistance gene in nasopharyngeal carcinoma cells after irradiation exposure

BU Jun-guo, YUAN Ya-wei, CHEN Jun

Department of Radiotherapy, Oncology Center, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To examine the changes in the function and expression of multidrug resistance gene (*mdr1*) and P-glycoprotein (P-gp) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE1 cell following irradiation for determining the sequential order of radiotherapy and chemotherapy in the treatment of NPC. **Methods** The expressions of *mdr1* gene and its protein P-gp as well as the function of P-gp efflux were examined in CNE1 cells before and after irradiation exposure by reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting and flow cytometry, respectively. **Results** Irradiation of CNE1 cells induced a long-term overexpression of *mdr1* gene and P-gp and reduction in intracellular daunorubicin accumulation. **Conclusion** Irradiation decreases the chemotherapy sensitivity of CNE1 cell, and induction chemotherapy should be therefore performed before radiotherapy in the treatment of advanced NPC.

Key words: nasopharyngeal neoplasm; tumor cells, cultured; drug tolerance; X-rays; P-glycoproteins

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疗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疗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

收稿日期:2003-12-02

基金项目:国家自然科学基金(30270424)

Supported by National Natural Science Foundation of China(30270424)

作者简介:卜俊国(1971-),男,第一军医大学在读硕士研究生,电话:

020-61643480

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),CO₂ 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),二甲基亚砜(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),低熔点琼脂糖(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 °C、5% CO₂ 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 μg 总 RNA 加入 1 μl oligo dT,70 °C、5 min,迅速置于冰中;(2)加入 AMV 5×buffer 5 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,RNA 酶抑制剂(40 U/μl) 1 μl,AMV RT(20 U/μl)反转录酶 1 μl;(3)加 DEPC 处理的水至 25 μl,42 °C 温育 60 min,70 °C、15 min,终止反应,即得 cDNA。

1.5.3 引物设计 *mdr1* 引物序列 P1:5'-CACAAGCCC AAGACAGAAAG-3',P2:5'-TTGCCAACCATAGAT GAAGG-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 μl 的反应体系中加入:2.5 mmol/L dNTP 4 μl,10×buffer 2.5 μl,cDNA 2 μl,P1 1 μl,P2 1 μl,Taq 酶 4 U,H₂O 14 μl。以上述反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,条件为:94 °C 预变性 30 s 后,加入 Taq DNA 聚合酶 4 U,按 94 °C 5 s、72 °C 4 min 进行 5 个循环,94 °C 5 s、70 °C 4 min 进行 5 个循环,94 °C 5 s、68 °C 4 min 进行 25 个循环,另加 72 °C 延伸 7 min。

1.5.5 内参照的 PCR 扩增 在 25 μl 的反应体系中加入:2.5 mmol/L dNTP 2 μl,10×buffer 2.5 μl,cDNA 2 μl,T1 1 μl,T2 1 μl,H₂O 16 μl。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 30 s 后,加入 Taq DNA 聚合酶 4 U,94 °C

30 s,54 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环,另加 72 °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% NaN₃、100 mmol/L CaCl₂,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 °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 μg 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 °C 缓慢摇动 1 h。PBST 洗膜 15 min×3 次。用 PBST 稀释一抗(1:500),将膜封入塑料袋中,4 °C 过夜。PBST 洗膜 15 min×3 次。用 PBST 稀释二抗(1:3 000),将膜封入塑料袋中,37 °C 缓慢摇动 1 h。PBST 洗膜 15 min×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 μmol/L,2 h 后消化收获细胞,冷 PBS(0 °C)吹洗、离心 3 次后,用 500 μl 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)。

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)。

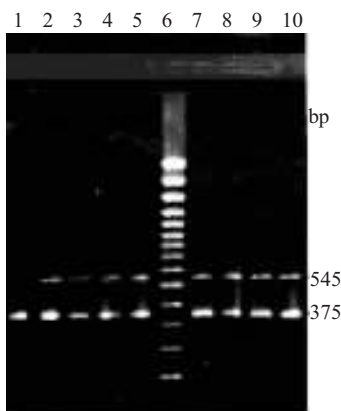


图 1 RT-PCR 结果

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

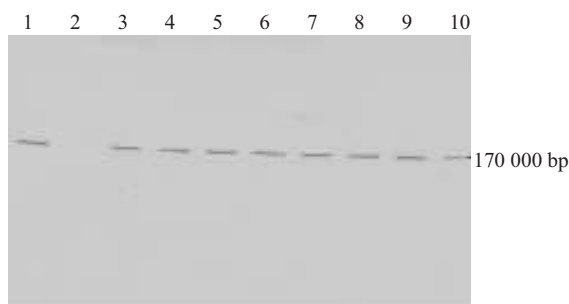


图 2 Western blotting 结果

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

Lane 1: 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。

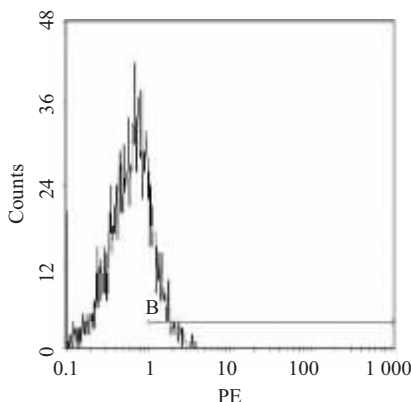


图 3 细胞照射前 DNR 平均荧光强度

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

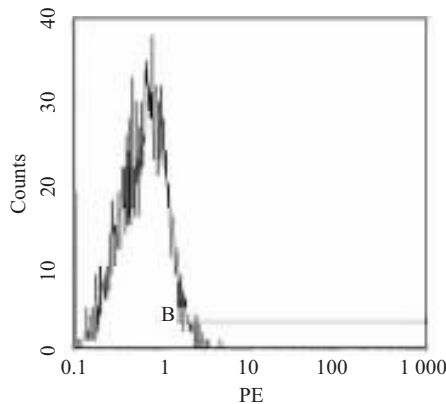


图 4 细胞照射后 DNR 平均荧光强度

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^[4-6]。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^[13-15]、McClean^[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 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 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.