

KBV200 细胞多药耐药与蛋白激酶 C 亚型表达的关系

袁亚维¹,孙爱民¹,李传刚¹,陈俊¹,邱鹏新² (1第一军医大学珠江医院放疗科,广东广州 510282;2中山医科大学药理实验室,广东广州 510089)

摘要:目的 探讨蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 亚型与 KBV200 肿瘤细胞多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 的关系。方法 (1)用 Western blotting 法检测 PKC 亚型在耐药株 KBV200 及敏感株 KB 的表达及亚细胞分布;(2)流式细胞仪检测 PKC 亚型的荧光强度并对数据进行统计分析。结果 (1)PKC 亚型的表达在 KBV200 中选择性升高,而 PKC α 、无显著变化,PKC β 、则未测出表达;(2)流式细胞仪检测发现 KBV200 细胞的 PKC 的荧光强度较 KB 细胞显著升高,PKC α 、则无显著差别。结论 PKC 与 KBV200MDR 细胞株的 MDR 表型关系密切。在 PKC 亚型中,PKC α 可能在 KBV200 细胞的 MDR 表型中起重要作用。

关键词:蛋白激酶 C; 药物耐受性; KBV200 细胞

中图分类号:R733.14 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)03-0215-02

Correlation of protein kinase C isoform expression with multidrug resistance in KBV200 cells

YUANYa-wei¹,SUNAi-min¹,LICHuan-gang¹,CHENJun¹,QIUPeng-Xin²

¹Department of Radiotherapy, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China;

²Laboratory of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China

Abstract Objective To investigate the association of protein kinase C (PKC) isoforms and multidrug resistance (MDR) mechanism in KBV200 cells. Methods Western blotting was utilized to examine the expression and subcellular distribution of PKC isoforms were measured in KBV200 cells with MDR and drug-sensitive KB cells, and the fluorescence intensity of PKC isoforms was detected by flow cytometry (FCM). Results KBV200 cells possessed higher PKC activities, with increased percentage of membrane fraction. As compared with parental KB cells, the expression of PKC α was significantly increased in KBV200 cells, while PKC β and PKC γ expressions remained unchanged, and PKC δ failed to be detected. Fluorescence intensity of PKC α in KBV200 cells was increased. Conclusion PKC might contribute to MDR phenotype in KBV200 cells, and of the isoforms so far detected, PKC α might play an important role in MDR phenotype.

Key words protein kinase C; drug tolerance; KBV200 cell

多药耐药 (MDR) 是肿瘤化疗失败的主要原因,其产生机制非常复杂^[1]。近年来细胞信号传导在 MDR 中的作用受到人们的关注,蛋白激酶 C (PKC) 作为一系列细胞级联信号传导途径的关键环节,可能参与肿瘤 MDR 的形成,且其不同亚型在不同细胞的表达具有异质性。因此,研究耐药细胞系中 PKC 亚型的表达对于揭示多药耐药的发生机制以及选择逆转药物具有重要意义^[2]。

目前,有关 PKC 亚型与肿瘤 MDR 的关系,国内较少报道。本研究旨在对 PKC 亚型的表达与 KBV200 细胞的 MDR 的关系进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞株和材料

KB 和 KBV200 细胞株购自中国医学科学院生物技术研究所 KBV200 是以对长春新碱 (VCR) 敏感的 KB 细胞为亲本,在培养液中加入浓度递增的 VCR 诱导而得,VCR 浓度为 200 nmol/L 时生长良好^[3]; RPMI1640 培养基和小牛血清购自 Hyclone 公司;抗-PKC 亚型特异性多克隆抗体抗 PKC α 、 β 、 γ 、 δ 和 PKC 分析试剂盒均购自 Gibco 公司;Western blotting 试剂盒购自 New England Biolab 公司;FITC-羊抗兔抗体 (二抗) 购自华美公司。

1.2 细胞培养及蛋白提取

见文献 [4]。

1.3 Western blotting 检测

取处理好的样品 20 μ l 以 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (电压为 200 V, 45 min)。将凝胶分离胶取下,置于转移缓冲液中 10 min,然后以 100 V 转膜 1 h。室温封闭 2 h,置于 10 ml 一抗稀释液 (1:1000) 4 $^{\circ}$ C 过夜。与辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的二抗稀释液、HRP- 抗生物素抗体室温下孵育 1 h。1 \times TBST 洗硝酸纤维素膜 3 次 (15 ml, 5 min),加入 10 ml 1 \times LumiGLO 室温

收稿日期:2001-08-04

基金项目:国家自然科学基金 (39870809)

作者简介:袁亚维 (1966-),女,湖南邵阳人,博士,副教授,硕士生导师,电话:020-85143868, E-mail: ywyuan@163.net

下轻摇 1min。显影、定影、冲洗、晾干、成像。

1.4 流式细胞仪检测 PKC 亚型荧光强度

单细胞层 PBS 洗 1 次,500r/min 离心 5min;1% 多聚甲醛固定 30min,0.1% Triton-X100 打孔;加入 20 μl 山羊血清封闭 10min;加 1:25 的一抗 (PKC α 、 β 、 γ)50 μl,37℃ 孵育 1h;再加入 1:50 的 FITC-羊抗兔二抗 50 μl,在黑暗中室温下孵育 1h;流式细胞仪检测。

1.5 统计方法

采用 SPSS8.0 统计软件,行 t 检验。

2 结果

2.1 PKC 亚型的表达及亚细胞分布

用 Westernblotting 法检测 KBV200 和 KB 细胞株的细胞质和细胞膜的 PKC α 、 β 、 γ 、 δ 表达,发现:(1)两株细胞的细胞质及细胞膜均有 PKC 的表达,但 KBV200 细胞的表达较敏感细胞 KB 的表达明显增强(图 1);(2)PKC 则主要在细胞膜表达,两株细胞差别不明显,而细胞质未测出表达(图 2),由于我们的抗 PKC 多克隆抗体不能分别检测 PKC I 和 II,所以无法观察这两种亚型的差别;(3)两株细胞胞质和胞膜均有 PKC 的表达,两株间无明显差异(图 3)。不论细胞膜还是细胞质,KB 和 KBV200 细胞株均未检测到 PKC ϵ 的表达。

2.2 流式细胞仪检测 PKC 亚型的荧光强度

流式细胞仪检测结果显示,耐药细胞 KBV200 的 PKC α 的荧光强度较 KB 细胞具有显著差异 ($P=0.001$,表 1),PKC β 、 γ 在两株细胞间差别不显著。从表 1 中还可以看出 PKC α 的荧光强度较 PKC β 、 γ 高。由于用 Westernblotting 法未检测到 PKC ϵ ,因此,本实验未测定这两种亚型的荧光强度。

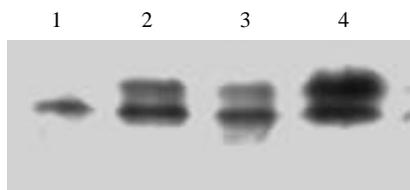


图 1 KB 和 KBV200 细胞中 PKC 的表达及分布
Fig.1 Expression and distribution of PKC in KB and KBV200 cells

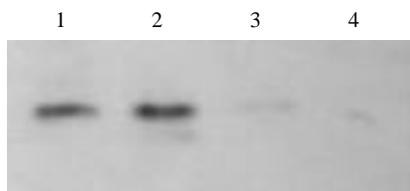


图 2 KB 和 KBV200 细胞中 PKC 的表达及分布
Fig.2 Expression and distribution of PKC in KB and KBV200 cells



图 3 KB 和 KBV200 细胞中 PKC 的表达和分布
Fig.3 Expression and distribution of PKC in KB and KBV200 cells

1:MembranefractioninKBcells;2:MembranefractioninKBV200 cells;3:CytosolfractioninKBcells;4:CytosolfractioninKBV200 cells

表 1 KBV200 和 KB 细胞株 PKC 亚型的荧光强度 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.1 Fluorescence intensity of PKC isoforms in KB and KBV200 cells (Mean \pm SD)

Group	PKC α	PKC β	PKC γ
KB	2.07 \pm 0.22	0.91 \pm 0.13	2.11 \pm 0.69
KBV200	5.34 \pm 0.56	1.06 \pm 0.11	2.89 \pm 0.79
t value	9.423	1.623	1.280
P value	0.001	0.180	0.270

3 讨论

PKC 是一族结构相近、磷脂依赖的同工酶,是一系列细胞级联信号传导途径的关键环节 [2]。现已明确,在哺乳动物组织中,PKC 有 12 种亚型,各亚型具有不同的组织表达和特定的细胞定位。

研究表明,在体外建立的耐药细胞株,PKC 的表达和活性较相应的亲本细胞株明显升高 [5]。我们在以前的研究 [4] 中用放射性 ^{32}P 掺入法测定 KBV200 和其亲本 KB 细胞的 PKC 活性,发现 KBV200 细胞的细胞膜、细胞质、总活性均比 KB 细胞的高,且其细胞膜所占百分比也升高,说明有 PKC 自细胞质转移至细胞膜,这可能有利于其更好地发挥功能。

PKC 存在多种亚型,不同的耐药细胞株所表达的亚型不同,如耐阿霉素的白血病 HL60 细胞株主要表达 PKC α [6],而阿霉素诱导的大鼠白血病 MDR 细胞株 P388 主要表达 PKC β 、 γ (和 δ) [7]。新近国内研究结果亦发现,在人胃癌耐药细胞系 SGC7901/VCR 中,PKC α 的表达明显高于亲本细胞,且随耐药剂量的增加,其表达呈逐渐增加趋势 [2]。不同的 PKC 同工酶中,PKC α 和 MDR 表型的关系特别突出,PKC α 是 MDR 表型的主要调节剂 [8,9]。

为了更进一步探讨 PKC 亚型与 MDR 的关系,我们用 Western blotting 法和流式细胞术比较研究了 PKC α 、 β 、 γ 、 δ 在国内建立的耐药株 KBV200 及其亲本细胞株 KB 的表达及亚细胞分布,发现 PKC α 在耐药细胞株 KBV200 的表达不同于 KB 细胞株,PKC α 在 MDR 细胞株中的表达明显升高,提示 PKC α 在 MDR 中可能起重要的作用。有研

(下转 219 页)

偏光镜检查证实,胶原纤维有正的单轴双折光的属性,它与天狼星红结合可增强双折射,提高分辨率。运用苦味酸天狼星红偏振光法,可以在一张切片上观察胶原的类型、分布及排列,结合图像分析技术可以精确测量出瘢痕组织中各型胶原的含量,有助于完成增生性瘢痕的病理诊断和鉴别诊断。我们还将此法与目前常使用的免疫组化方法作了对比性实验研究,其结果具有良好的一致性(另文报道)。此法廉价、操作简便、利于综合分析,是一种检测病理性瘢痕组织胶原类型、分布、排列与含量较理想的方法。

参考文献:

- [1] Junqueira LC, Cossermlli W, Brentani W, et al. Differential staining of collagen soft type, and by sirius red and polarization microscopy [J]. Arch Histol Jpn, 1978, 41(2): 267-71.
- [2] Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, et al. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats [J]. Hypertension, 1995, 26(1): 101-11.
- [3] 陈怀茂,宗永生.鼻咽癌中泡状癌细胞核的形态定量学特征[J].中华病理学杂志,1993,22(2):113-4.

- [4] 郑庚唐,胡兆军.CIM在病理学研究中的应用[J].临床与实验病理学杂志,1993,9(2):75-7.
- [5] Friedman DW, Boyd CD, Mackenzie JW, et al. Regulation of collagen gene expression in keloid and hypertrophic scars [J]. J Surg Res, 1993, 55(2): 214-22.
- [6] Zhang LQ, Laato M, Muona P, et al. Normal and hypertrophic scars; quantification and localization of messenger RNAs for type I and II collagens [J]. Br J Dermatol, 1994, 130(4): 453-9.
- [7] Sato M, Ishiko O, Miyachi Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture [J]. Br J Dermatol, 1998, 138(6): 938-43.
- [8] Cohen IK, Keiser HR, Sjoerdsma A. Collagen synthesis in human keloid and hypertrophic scar [J]. Surg Forum, 1971, 22(5): 488-90.
- [9] 许增禄,刘秉慈,沈晓明,等.马凡氏综合征胶原异常的研究[J].中华病理学杂志,1992,21(3):164-6.
- Xu ZL, Liu BC, Shen XM, et al. Study of collagen abnormality in Marfan's syndrome [J]. Chin J Pathol, 1992, 21(3): 164-6.
- [10] 李保玉,金毅,孙波,等.不同类型克山病心肌间质纤维化的形态学分析[J].中华病理学杂志,1998,27(1):13-6.
- Li BY, Jin Y, Sun B, et al. Morphological studies of myocardial fibrosis in different types of Keshan disease [J]. Chin J Pathol, 1998, 27(1): 13-6.

(上接 216 页)

究^[10]亦发现耐长春新碱的 KB-V1 和耐阿霉素的 KB-A1 细胞株的 PKC 的表达均比它们的亲本株高,但他们在 KBV1 及其亲本细胞还检测到 PKC, 另外也有研究^[9]发现耐药的 KB 细胞的 PKC 的表达较敏感细胞高,这与我们的实验结果不同,可能与细胞株的不同有关。

综上所述,PKC 的活性升高可能是 KBV200 细胞耐药的原因之一,在所研究的 PKC 亚型中,PKC 可能起更重要的作用。但 PKC 在多药耐药中的作用机制、传导通路具体过程究竟是怎样的,仍需进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia [J]. Leukemia, 2000, 14(3): 467-73.
- [2] 韩英,时永全,李玲,等.蛋白激酶 C 同工酶 PKC 及 I 在胃癌及其耐药细胞中的表达和功能 [J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(2): 103-6.
- [3] 张晓红,张福荣,籍秀娟,等.KB 细胞耐药株的建立及其耐药机制的探讨 [J]. 药学学报, 1994, 29(4): 246-51.
- [4] 孙爱民,袁亚维,李传刚,等.蛋白激酶 C 活性、亚细胞分布与

KBV200 细胞多药耐药性的相关研究 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 121-3.

- Sun AM, Yuan YW, Li CG, et al. Correlation of protein kinase C activity and its subcellular distribution with multidrug resistance in KBV200 cells [J]. J First Mil Med Univ, 2002, 22(2): 121-3.
- [5] Chen L, Burger RA, Zaunbrecher GM, et al. Protein kinase C isoform expression and activity alter paclitaxel resistance in vitro [J]. Gynecol Oncol, 1999, 72(2): 171-9.
- [6] Aquino A, Warren BS, Omichinski J, et al. Protein kinase C-gamma is present in adriamycin resistant HL-60 leukemia cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 166(2): 723-8.
- [7] Gollapudi S, Soni V, Thadepalli H, et al. Role of protein kinase beta isozyme in multidrug resistance in murine leukemia P388/ADR cells [J]. J Chemother, 1995, 7(2): 157-9.
- [8] Hu YP, Robert J. Inhibition of protein kinase C in multidrug-resistance cells by modulators of multidrug resistance [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1997, 123(4): 201-10.
- [9] Budworth J, Gant TW, Gescher A. Co-ordinate loss of protein kinase C and multidrug resistance gene expression in revertant MCF-7/ADR breast carcinoma cells [J]. Br J Cancer, 1997, 75(9): 1330-5.
- [10] Cloud Heflin BA, McMasters RA, Osborn MT, et al. Expression, subcellular distribution and response to phorbol esters of protein kinase C (PKC) isozymes in drug-sensitive and multidrug-resistant KB cells: evidence for altered regulation of PKC-alpha [J]. Eur J Biochem, 1996, 239(3): 796-804.