

Reversing Effect of Thallus Laminariae PE on Drug Resistance in B-MD-C1(ADR^{+/+}) Cell Line

LI Qiao-min, SHAN Bao-en*, ZHANG Jing
(Research Center, the Fourth Hospital of Hebei
Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

中药昆布对 B-MD-C1 (ADR^{+/+}) 耐药细胞 逆转作用的 体外研究

李巧敏/单保恩*/张静
(河北医科大学第四医院科研中心, 石家庄
050011)

【摘要】背景与目的: 研究昆布提取物(thallus laminariae PE, TLPE)在体外对耐药细胞 B-MD-C1(ADR^{+/+})的逆转作用, 深入探讨 TLPE 逆转肿瘤多药耐药的机制。材料与方法: MTT 法检测昆布提取物对耐药细胞 B-MD-C1(ADR^{+/+})的逆转作用, 采用免疫细胞化学方法及流式细胞术检测 P-gp 蛋白表达的变化。用 RT-PCR 法检测 TLPE 作用前后 B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞中多药耐药基因(MDR1)的表达水平。结果: 昆布提取物在体外对 B-MD-C1(ADR^{+/+})有逆转作用, 逆转倍数为 4.65; 免疫细胞化学方法显示, TLPE 作用后, B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞 P-gp 的表达降低, 流式细胞术结果显示, TLPE 处理后细胞的荧光表达量降低, 且与 TLPE 浓度呈依赖性, RT-PCR 结果表明, TLPE 可以使 B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞的 MDR1 mRNA 表达减弱。结论: 昆布提取物具有逆转 B-MD-C1(ADR^{+/+})的作用, 其逆转作用与降低 P-gp 的表达有关, 具有临床应用前景。

【关键词】昆布提取物; 多药耐药; P-gp 蛋白; MDR1 基因

中图分类号: R730.52

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)02-0219-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To investigate the reversing effect of Chinese drug thallus laminariae PE on drug resistance B-MD-C1(ADR^{+/+}) cell line, and to identify the mechanism of TLPE in reversing the multidrug resistance. MATERIALS AND METHODS: MTT assay was used to determine the reversing effect of TLPE and reversal fold; cytoimmunochemistry and flow cytometry were used to assess the expression of P-gp in the level of protein. RT-PCR was used to detect the level of MDR1 gene treated by TLPE. RESULTS: TLPE had reversing effect on B-MD-C1(ADR^{+/+}) *in vitro* and the reversal fold was 4.65. Cytoimmunochemistry showed that TLPE could decrease the expression of P-gp. Flow cytometry showed that TLPE could decrease the expression of P-gp with dose-dependence. RT-PCR suggested that TLPE could reduce the MDR1 gene of B-MD-C1(ADR^{+/+}). CONCLUSION: TLPE could exert reversing effect in B-MD-C1(ADR^{+/+}) by decreasing the expression of P-gp.

【KEY WORDS】 thallus laminariae PE; multidrug resistance; P-gp protein; MDR1 gene

肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)是肿瘤化疗失败的主要原因之一。寻找有逆转 MDR 作用而毒副作用小的化疗增敏剂, 对提高肿瘤治疗水平具有重要意义^[1]。目前, 用于临床的逆转剂主要有环孢素 A (CSA) 和异博定(VPL)等, 但其毒

性相对较大, 患者难以耐受^[2]。昆布作为传统中药, 具有广泛药理作用, 临床用途很广泛, 为此, 我们试用 TLPE 作为 MDR 逆转剂, 研究了其对多药耐药细胞株 B-MD-C1(ADR^{+/+})的逆转及其机制, 以期为临床上使用昆布逆转多药耐药, 提供可能的理论依据。

收稿日期: 2006-06-27; 修订日期: 2006-11-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.30371753)

作者简介: 李巧敏(1973-), 女, 河北省藁城市人, 主管检验师, 硕士, 研究方向: 肿瘤多药耐药研究。

* Correspondence to: SHAN Bao-en, Tel: 0311-86095283, E-mail: Baoenshan@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 TLPE 水提液的制备

昆布干品 5 g, 加蒸馏水 100 ml 浸泡过夜, 100 °C 水浴 1 h, 滤纸过滤除去不溶物质, 用无菌滤器除菌后作为昆布提取液, 4 °C 冰箱保存备用 (昆布提取液原液浓度为 50 mg/ml)。

1.2 材料

阿霉素 (ADM, 注射用盐酸多柔吡星, 浙江海正药业股份有限公司), RPMI 1640 购于 Sigma 公司, 四甲基噻唑蓝 (MTT) 为美国 Sigma 产品, 用 PBS 配成 5 g/L, 4 °C 避光保存。二甲基亚砷 (DMSO) 购于美国 Gibco 公司。鼠抗人多药耐药蛋白 (P-gp) 单克隆抗体购于北京中山生物技术有限公司。MDR1-cDNA 扩增引物由上海生物工程技术有限公司合成。反转录试剂盒购于华美生物工程公司。FOTODYNE 凝胶成像系统 60-2107 型为美国 Image 公司产品。

1.3 细胞培养

B-MD-C1(wt) 细胞为阿霉素敏感细胞, 不表达 P-gp。B-MD-C1(ADR^{+/+}) 耐药细胞株为本室留存^[3]。在含 ADM (5 mg/L) 和含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中稳定生长。实验前 2 周换用无 ADM 的 RPMI 1640 培养液培养。

1.4 MTT 法检测细胞耐药性及耐药性逆转

体外药敏试验采用常规 MTT 法^[4]。收集对数生长期的 B-MD-C1(ADR^{+/+}) 和 B-MD-C1(wt) 细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液配成 1.1×10^5 /ml 细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 90 μ l (含 1×10^4 个细胞), 分为 4 个组: ① 对照组: 加入培养液 10 μ l; ② ADM 处理组: 加入 10 μ l ADM (终浓度为 5 mg/L); ③ TLPE 处理组: 加入 10 μ l 不同浓度的 TLPE (终浓度分别为 78、156、312、625、1 250、2 500 μ g/ml); ④ (TLPE + ADM) 处理组: 同时加入不同浓度的 TLPE (终浓度分别为 78、156、312、625、1 250、2 500 μ g/ml) 和 ADM (终浓度为 5 mg/L) 各 10 μ l, 每组均设 3 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 72 h, 然后每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μ l, 37 °C 继续孵育 4 h 终止培养。小心吸弃孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 震荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 选择 570 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔 A 值, 计算细胞抑制率和 IC₅₀ 值。

抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$

抑制率 $\leq 5\%$ 的药物浓度为非细胞毒性浓度。

耐药倍数 = 耐药细胞 IC₅₀ 值 / 敏感细胞 IC₅₀ 值

逆转倍数 = 耐药细胞逆转前 IC₅₀ 值 / 耐药细胞逆转后 IC₅₀ 值^[5]

1.5 免疫细胞化学方法 (SP 法) 检测两组细胞内

P-gp 的表达

取对数生长期的 B-MD-C1(ADR^{+/+}) 和 B-MD-C1(wt) 细胞 (终浓度均为 2×10^5 /ml), 传代于装有盖玻片的 6 孔板中, 每孔 2 ml, 然后加入 TLPE (终浓度为 0、125、250 μ g/ml), 72 h 后取出, 甲醛固定 30 min, 干燥后按免疫组化试剂盒说明书操作。DAB 染色, 苏木素复染, 以细胞膜和/或胞浆呈棕黄色者为阳性。采用盲法计数, 随机选取 10 个高倍视野, 计算阳性细胞百分率, $\leq 5\%$ 为阴性, $> 5\% \sim 75\%$ 为弱阳性, $\geq 75\%$ 为强阳性。

1.6 流式细胞术检测 P-gp 蛋白的表达水平

将对数生长期的 B-MD-C1(ADR^{+/+}) 细胞制成 1×10^6 /ml 细胞悬液, 接种于 6 孔培养板中, 每孔 2 ml, 分为 2 组, 即耐药组和逆转组。耐药组为 B-MD-C1(ADR^{+/+}) 细胞中加入 ADM (终浓度为 5 mg/L), 逆转组为 B-MD-C1(ADR^{+/+}) 细胞中加入不同浓度的 TLPE (终浓度分别为 125、250 μ g/ml)。每组均设 3 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 45 min, 各孔加入抗 P-gp 单克隆抗体 (1 μ g/ml) 1 μ l 混匀, 4 °C 孵育 40 min, PBS 液冲洗 3 次, 加标记荧光素的兔抗鼠 IgG 抗体 50 μ l, 混匀后, 4 °C 孵育 40 min, PBS 液冲洗后用流式细胞仪进行膜抗原 P-gp 测定。

1.7 RT-PCR 法检测 MDR1 RNA 水平的表达

1.7.1 引物设计和合成 MDR1-cDNA 扩增引物序列: 上游 5'-TCG TAG GAG TAT CCG TGG AT-3', 下游 5'-CAT TGG CGA GCC TGG TAG-3', 扩增产物 455 bp; 内参 GAPDH 扩增引物序列: 上游 5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3', 下游 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3', 扩增产物 214 bp^[5]。

1.7.2 细胞总 RNA 的提取 按试剂盒所述方法裂解细胞, 提取总 RNA。用紫外分光光度计测定所得 RNA 样品的含量和纯度。

1.7.3 反转录 PCR 采用华美生物工程公司一步法 RNA 扩增试剂盒, 反应体系为 30 μ l。具体步骤按说明书进行。反应条件为 37 °C 50 min 反转录合成 cDNA, 94 °C 5 min 使逆转录酶失活, 而后 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环终止反应。各组分别取 RT-PCR 产物 3.0 μ l 与 2.0 μ l 溴酚蓝上样缓冲液混合, 于 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴乙啶) 中电泳, 80 V 恒压 40 min, 用 FOTODYNE 凝胶成像分析系统及 Gel-pro 凝胶分析软件对电泳条带进行成像分析, 以观察到相应特异性条带为阳性, 以目的条带与内参照条带的光密度 (A) 比值表示目的基因 mRNA 的相应表达水平, 即:

目的基因 mRNA 相对含量 = 目的条带光密度值 / 内参照条带光密度值

1.8 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 TLPE 对 B-MD-C1(ADR^{+/+})和 B-MD-C1(wt)细胞的体外抑制作用及对耐药性的逆转

TLPE 对 B-MD-C1(ADR^{+/+})和 B-MD-C1(wt)细胞增殖呈明显的抑制作用,在(50~300 μg/ml)范围内具有较好的剂量依赖性,高浓度时反而促进两种细胞的生长。当 TLPE 浓度为 70 μg/ml 时,对 B-MD-C1(ADR^{+/+})和 B-MD-C1(wt)细胞的抑制率均 < 5%,故选用该浓度作为

逆转浓度。ADM 单独作用时,对 B-MD-C1(ADR^{+/+})和 B-MD-C1(wt)细胞的 IC₅₀ 值分别是 87.12 μg/ml 和 2.76 μg/ml,相差 31.565 倍。当加入 70 μg/ml TLPE 时,IC₅₀ 值分别降为 18.72 和 2.19 μg/ml,相差 8.539 倍。B-MD-C1(ADR^{+/+})对 ADM 的耐药性被降低了约 23 倍。逆转倍数为 4.654。但其耐药性仍未被完全逆转,仍高出 B-MD-C1(wt)细胞的耐药性 8.55 倍。

2.2 TLPE 对 P-gp 表达的影响

B-MD-C1(wt)细胞 P-gp 表达阴性,而 B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞则呈强阳性表达,表达率达 98%。125 μg/ml、250 μg/ml TLPE 作用后,B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞的 P-gp 阳性表达率虽无明显改变(结果未显示),但其表达强度却明显降低(图 1)。

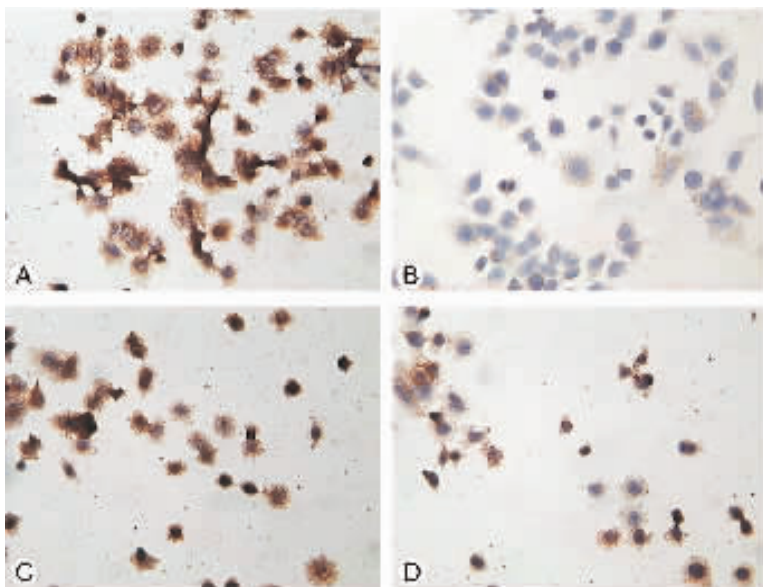


图 1 TLPE 作用后 P-gp 表达的免疫组化检测结果

Figure 1 Expression of Pgp proteins after treatment with TLPE detected with cytoimmunochemistry. A: BMD-C1(ADR^{+/+}) cells B: BMD-C1(wt) cells; C: BMD-C1(ADR^{+/+}) cells after 125 μg/ml TLPE treatment for 72 h; D: BMD-C1(ADR^{+/+}) cells after 250 μg/ml TLPE treatment for 72 h.

2.3 流式细胞术检测 P-gp 蛋白表达水平的变化

B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞高表达 P-gp,荧光表达量为 1.799 ± 0.04 经不同浓度的 TLPE(终浓度分别为 125、250

μg/ml)处理后,B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞的荧光表达量分别为 1.711 ± 0.02、1.604 ± 0.04,P-gp 的表达水平明显降低(P < 0.05)并与 TLPE 具有明显的浓度依赖性(图 2、3)。

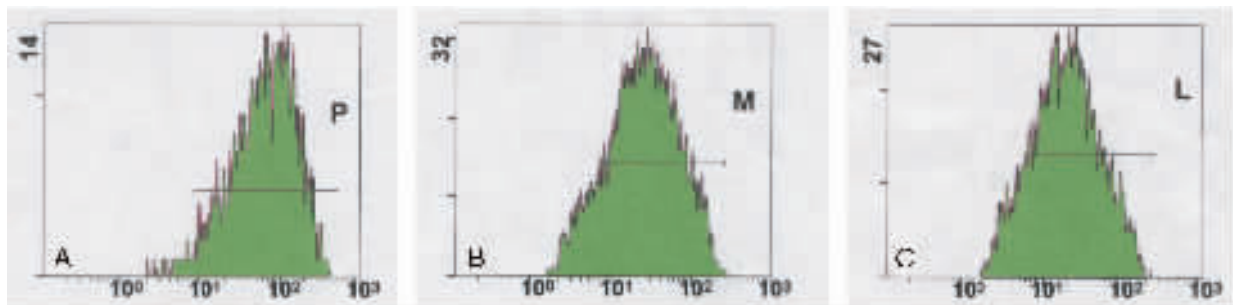


图 2 TLPE 对 BMD-C1(ADR^{+/+})细胞 P-gp 表达的流式细胞术测定结果

Figure 2 Expression of Pgp protein in BMD-C1(ADR^{+/+}) cells after treatment with different concentration of TLPE detected with flow cytometry. A: control; B: 125 μg/ml TLPE; C: 250 μg/ml TLPE.

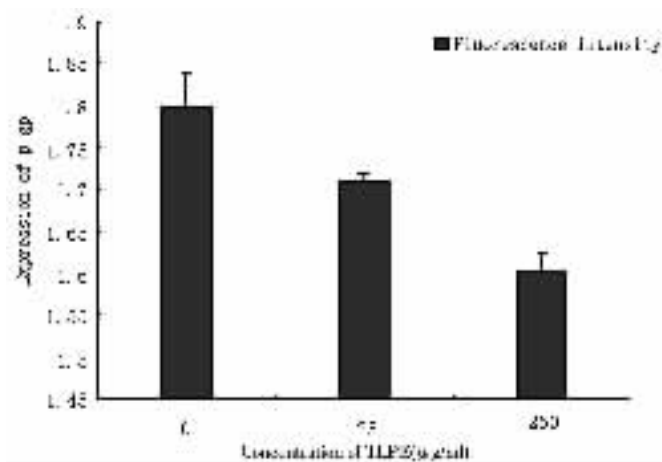


图3 TLPE对B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞P-gp蛋白表达的影响

Figure 3 Expression of P-gp protein in B-MD-C1(ADR^{+/+}) cells after treatment with TLPE

2.4 TLPE对P-gp mRNA表达的影响

MDR1 mRNA在B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞呈强表达,而在B-MD-C1(wt)细胞未见表达。TLPE对MDR1 mRNA表达水平有明显影响。在TLPE处理前,B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞的MDR1 mRNA表达指数为1.6523;不同浓度TLPE作用72 h后,B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞的MDR1 mRNA表达指数为1.1480和0.8174,较用药前明显降低($P < 0.01$)。(图4)。

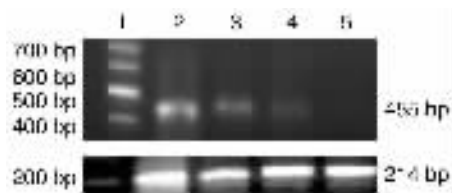


图4 TLPE作用后P-gp的mRNA的RT-PCR产物电泳结果

Figure 4 Expression of P-gp gene after treatment with TLPE. 1: DNA Marker; 2: B-MD-C1(ADR^{+/+}) cells; 3: B-MD-C1(ADR^{+/+}) cells after 125 μg/ml TLPE treatment for 72 h; 4: B-MD-C1(ADR^{+/+}) cells after 250 μg/ml TLPE treatment for 72 h; 5: B-MD-C1(wt) cells.

3 讨论

B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞是在体外从低浓度逐渐加大ADM浓度所诱导产生的多药耐药细胞株。该细胞高表达耐药膜糖蛋白P-gp,耐药基因MDR1在转录水平的活性也明显增高,是一株典型的多药耐药细胞株^[3]。目

前认为,肿瘤细胞的MDR是多因素共同作用的结果,其中P-gp介导的MDR被称为经典的耐药途径。昆布为海带科植物昆布 *Ecklonia kurome* Okam、裙带菜 *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur 的干燥叶状体。其化学成分主要为褐藻酸盐、岩藻依多糖和海带多糖。对心血管系统、中枢神经系统、免疫系统等多系统具有明显的药理作用,且毒性甚微^[6]。近年来对昆布的研究侧重于提高机体免疫功能方面,而对其能否逆转肿瘤多药耐药方面的研究尚未见报导。本研究结果显示,TLPE可从mRNA水平逆转P-gp介导的MDR,使细胞膜表面的P-gp蛋白量减少,从而达到部分逆转B-MD-C1(ADR^{+/+})细胞多药耐药的作用,其逆转倍数可达到4.654倍。但其在高浓度时反而刺激肿瘤细胞的生长,考虑为昆布提取物中富含多糖成分及其它多种营养物质,故高浓度时反而刺激肿瘤细胞的生长。其具体有效成分有待进一步分离和纯化。昆布分布广泛,易大量获得,提取物价廉、低毒,有望成为临床广泛应用的肿瘤细胞耐药的逆转剂。但其在体内是否有同样的逆转作用,尚待进一步实验研究。

参考文献:

- [1] Evers R, Kool M, Smith AJ, *et al.* Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and pluronic L61 on MDR1-P-gp, MRP1 and MRP2-mediated report[J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(3): 366-374.
- [2] Lopes EC, Scolinik M, Alvarez E. Modulator activity of psc833 and cycloporin-A in vincristine and doxorubicin-selected multidrug resistance murine leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2001, 25(1): 85-93.
- [3] 单保恩,张静,等. MDR逆转因子筛选技术P-gp细胞系的建立及其生物学特性评价[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(7): 389-391.
- [4] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社, 1996: 246-256.
- [5] 甄永苏. 抗肿瘤药物研究与开发[M]. 北京:化学工业出版社, 2004: 132-139.
- [6] 张朝晖,蔡宝昌. 海洋药物研究与开发[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003: 72-79.