

热放疗对舌鳞癌 Tca 8113 细胞多药耐药蛋白及耐药性的影响

冷卫东 罗志晓 胡孝丽 王大章 冯戈

【摘要】 目的 探讨热放疗对舌鳞癌 Tca 8113 细胞和耐药的 Tca 8113/CBDEA 细胞耐药性的影响。方法 应用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结 (SP) 法检测热放疗对 P-糖蛋白 (P-gp)、多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 和谷胱甘肽硫-转移酶 π (GST- π) 表达的影响和检测热放疗对细胞内阿霉素 (ADM) 浓度的影响。结果 P-gp 在 Tca 8113/CBDEA 和 Tca 8113 细胞中的表达在热放疗后第 4 小时和第 24 小时无明显变化 ($P > 0.05$), MRP1 在 Tca 8113/CBDEA 中的表达无明显改变 ($P > 0.05$), 在 Tca 8113 细胞中热放疗后第 24 小时 MRP1 有明显下降 ($P < 0.01$)。在 Tca 8113/CBDEA 和 Tca 8113 细胞热放疗后第 4 小时 GST- π 无明显改变, 第 24 小时均有明显下降。热放疗以后肿瘤细胞内 ADM 浓度有明显上升 ($P < 0.01$)。结论 热放疗联合应用能提高化疗的效果, 抑制放疗所造成的多药耐药蛋白表达上升, 提高细胞内的药物浓度, 不会促使肿瘤细胞产生多药耐药现象 (MDR)。

【关键词】 舌鳞状细胞癌; 多药耐药; 热放疗

The effect of thermo-radiotherapy on multidrug resistance in tongue squamous cell carcinoma cell line Tca 8113 LENG Wei-dong*, LUO Zhi-xiao, HU Xiao-li, WANG Da-zhang, FENG Ge. *Center for Stomatology, Taihe Hospital, Shiyan 442000, China

【Abstract】 Objective To study the effect of thermo-radiotherapy on multidrug resistance (MDR) and levels of intracellular adriamycin (ADM) in tongue squamous cell carcinoma cell line Tca 8113 and its MDR cell line Tca 8113/CBDEA. **Methods** Samples of the two cell lines were treated with thermo-radiotherapy (42 °C for 0.5 h and 2 Gy of radiation). Four and 24 hours later, the expression of the MDR relative proteins P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance associate protein 1 (MRP1) and glutathione s-transferase- π (GST- π) were detected using immunohistochemistry. Intracellular ADM concentrations were measured using an HTS 7000 Plus bioassay reader. **Results** No change in the expression of P-gp was observed in the Tca 8113/CBDEA and Tca 8113 cell lines after 4 or 24 hours. Expression of MRP1 was not significantly altered in the Tca 8113/CBDEA cell line, but there was a significant drop in the Tca 8113 cell line 24 hours post-thermo-radiotherapy. Expression of GST- π was not altered in either the Tca 8113/CBDEA or the Tca 8113 cell line at 4 hours post-thermo-radiotherapy, but there was a significant decrease at 24 hours. At both 4 and 24 hours, drug tolerance had decreased and intracellular drug concentration had increased significantly in both cell lines. **Conclusions** Thermo-radiotherapy can enhance the effects of chemotherapy and suppress the expression of MDR factors induced by radiation. The combination of hyperthermia and radiotherapy does not induce MDR.

【Key words】 Tongue squamous cell carcinoma; Multidrug resistance; Thermo-radiotherapy

恶性肿瘤对化疗药物发生耐受是一种常见现象, 影响化疗的效果。肿瘤对化疗药物的耐受可以发生在第一次接触化疗药物时, 也可在接触化疗药物后, 可扩增到对多种结构和机能不同的化疗药物耐受, 这种现象被称为多药耐药 (multidrug resistance, MDR)。因

此, 如何克服肿瘤化疗过程中的 MDR 成为肿瘤治疗的研究热点之一。本课题组以前的实验证实, 舌鳞癌的多药耐药机理是 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance associate protein 1, MRP1) 和谷胱甘肽硫-转移酶 π (glutathione S-transferase π , GST- π) 共表达增强所致^[1]。放疗也可诱发舌鳞癌细胞的多药耐药蛋白的表达上升, 而热疗却可诱发舌鳞癌细胞的多药耐药蛋白的表达下降, 逆转舌鳞癌细胞的多药耐药^[2-3]。放疗和热疗联用对舌鳞癌的 MDR 的影响尚不十分清楚, 相关研究也少见。本实验拟对 Tca 8113 及其耐卡铂的 Tca 8113/CBDEA 细

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-1424. 2010. 03. 007

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970798), 湖北省十堰市科技基金 (2006s16)

作者单位: 442000 十堰, 湖北省十堰市郧阳医学院附属太和医院口腔中心 (冷卫东、罗志晓、胡孝丽); 四川大学华西口腔医学院颌面外科 (王大章、冯戈)

胞株进行体外培养,应用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法(streptavidin-peroxidase, SP)法检测热放疗对上述 3 种相关耐药蛋白表达的影响和热疗对细胞内阿霉素(adriamycin, ADM)浓度的影响。

材料与方法

一、细胞来源及培养条件

人舌鳞癌 Tca 8113 细胞由四川大学华西细胞生物教研室提供。培养条件:于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中加入青霉素 $1 \times 10^5 \mu\text{g/L}$, 链霉素 $1 \times 10^2 \text{mg/L}$, 37°C , 5% CO_2 条件下培养。取对数生长期的细胞进入下一步实验。

耐卡铂的 Tca 8113/CBDEA 细胞于培养基中加入卡铂培养,经递增剂量,间歇性加药,直到 Tca 8113 能够维持在 $20 \mu\text{g/ml}$ 卡铂浓度下正常生长即成为耐药人舌鳞癌细胞模型 Tca 8113/CBDEA。进入下一步实验之前, Tca 8113/CBDEA 需在正常培养液中培养 1 周。

二、细胞处理

将对数生长期的 Tca 8113 和 Tca 8113/CBDEA 细胞放入 42°C 恒温水浴箱中 0.5 h 热浴处理后即刻行 ^{60}Co 照射,采用 GWGP80 型远距离 ^{60}Co 治疗机,能量为 1.25MeV - γ 射线,源皮距为 80 cm,放射剂量率为 160.79cGy/min ,射野可覆盖所有的细胞培养瓶,照射剂量为 2 Gy,照射后进入下一步实验。

三、热放疗前、后细胞免疫组化检测

P-gp、MRP1 和 GST- π 的免疫组织化学染色根据美国 ZYMED 公司首创的 SP 法进行。鼠抗人 P-gp 单克隆抗体,兔抗人 MRP1 多克隆抗体,鼠抗人 GST- π 单克隆抗体及鼠 SP 免疫组化试剂盒,鼠 SP 免疫组化试剂盒购自 ZYMED 公司。

在培养皿中放入小盖玻片,加入含培养基的对数生长期细胞悬液,浓度约为 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养 24 h。分别对 Tca 8113 和 Tca 8113/CBDEA 细胞于热放疗前及热放疗后第 4 小时和第 24 小时吸尽培养皿中的培养液,滴入丙酮处理 40 min,吸尽每孔中的丙酮,然后放在 -20°C 冰箱中备用。微波炉加热修复抗原,新鲜配制的 DAB 溶液显色 5 min,苏木素复染,常规脱水封片。实验中以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。

每张切片在 TE2000-V 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)下随机选取 3 个视野,用 Image-ProPlus 专业图像分析系统(美国 Media Cybernetics)测其细胞胞浆平均光密度值(OD),OD 值越大,说明耐药蛋白表达越高。

四、细胞内药物浓度的测定

ADM(深圳万乐药业有限公司)有自身激发荧光,以 $\text{Ex} = 485 \text{nm}$, $\text{Em} = 595 \text{nm}$ 对其检测。其 F 值为激发出的荧光强度,可反映药物浓度的变化。在热放疗前及处理后第 4 小时和第 24 小时 2 个时间点于待测细胞中加入 ADM,终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$,处理 30 min, 0.25% 胰酶消化,收集 2×10^5 个细胞移入离心管中。短时低速离心弃去上清,加入 PBS 洗涤,再离心,重复 3 次,洗净细胞外残余的阿霉素。加入 PBS 0.5 ml 制备成细胞悬液,用多孔板高效分析仪(美国 PERKIN ELMER 公司)测定其 F 值。

五、统计学分析

采用 SPSS 11.0 版统计软件对结果进行分析,对同组内的多个均数之间比较用方差分析。

结 果

一、免疫组化结果

P-gp、MRP1 阳性表达主要定位于细胞膜及细胞质, GST- π 阳性表达位于细胞质,呈棕色颗粒。对 P-gp、MRP1 和 GST- π 用相同标准的免疫组化染色后,对细胞浆的平均光密度值(OD)进行分析。

对免疫组化结果进行图像分析后发现, P-gp 在 Tca 8113/CBDEA 和 Tca 8113 细胞中的表达在热放疗后第 4 小时和第 24 小时 2 个时间点无明显变化($P > 0.05$), MRP1 在 Tca 8113/CBDEA 中的表达无明显改变($P > 0.05$),在 Tca 8113 细胞中热放疗后第 24 小时 MRP1 有明显下降($P < 0.01$)。 GST- π 热放疗后,在 Tca 8113/CBDEA 和 Tca 8113 细胞热放疗后第 4 小时无明显改变,第 24 小时均有明显下降。表明热放疗联合可使 MRP1 和 GST- π 的表达有所下降, P-gp 的表达无明显改变,热放疗联合可有效抑制放疗造成的耐药蛋白表达上调。见表 1,图 1~6。

表 1 热放疗后耐药蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

细胞系	检测时间点	P-gp	MRP1	GST- π
Tca 8113/CBDEA	热放疗前	0.112 ± 0.008	0.144 ± 0.014	0.220 ± 0.033
	热放疗后第 4 小时	0.111 ± 0.008	0.132 ± 0.007	0.213 ± 0.014
	热放疗后第 24 小时	0.103 ± 0.009	0.127 ± 0.007	0.159 ± 0.001^{bc}
Tca 8113	热放疗前	0.014 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.060 ± 0.006
	热放疗后第 4 小时	0.013 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.058 ± 0.002
	热放疗后第 24 小时	0.012 ± 0.001	0.011 ± 0.001^a	0.043 ± 0.004^{ad}

注:与热放疗前相比,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$,与热放疗后第 4 小时相比,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

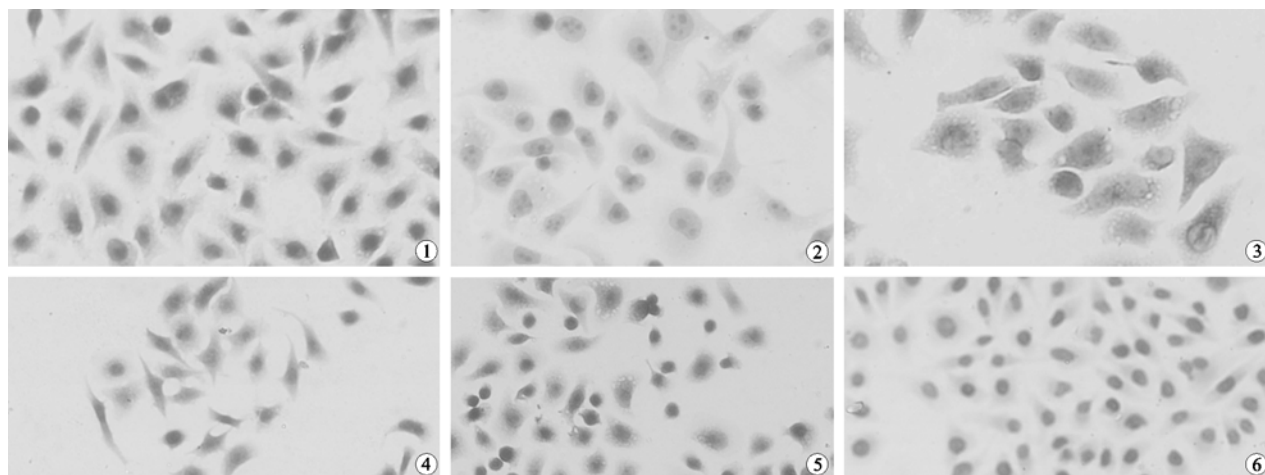


图 1 Tca 8113/CBDEA Pgp 染色结果(免疫细胞化学染色, ×200); 图 2 Tca 8113 Pgp 染色结果(免疫细胞化学染色, ×200); 图 3 热放疗后第 4 小时 Tca 8113/CBDEA Pgp 染色(免疫细胞化学染色, ×200); 图 4 热放疗后第 4 小时 Tca 8113 Pgp 染色结果(免疫细胞化学染色, ×200); 图 5 热放疗后第 24 小时 Tca 8113/CBDEA Pgp 染色结果(免疫细胞化学染色, ×200); 图 6 热放疗后第 24 小时 Tca 8113 Pgp 染色结果(免疫细胞化学染色, ×200)

二、细胞内 ADM 浓度的测定

热放疗后与热放疗前对照组相比, 耐药及亲本细胞内 ADM 浓度均明显上升 ($P < 0.01$), 表明热疗和放疗联合可以预防因单独使用放疗所引起的细胞内药物浓度下降。见表 2。

表 2 热放疗后细胞内 ADM 浓度 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

细胞系	热放疗前	热放疗后第 4 小时	热放疗后第 24 小时
Tca 8113/CBDEA	64.67 ± 4.51	74.33 ± 4.04 ^a	88.00 ± 4.58 ^b
Tca 8113	490.00 ± 10.54	535.67 ± 18.77 ^b	588.67 ± 15.18 ^{bc}

注: 与热放疗前相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与热放疗后第 4 小时相比, ^c $P < 0.01$

讨 论

放疗、热疗和化疗的相互协同作用已有较多研究, 高热可提高化疗药物在肿瘤细胞中的浓度, 增强细胞毒作用^[2], 提高放射线对癌细胞的杀伤作用, 以及降低肿瘤细胞由于放射线和化疗药物所造成的致死损伤的修复能力等^[4-5], 但具体机制尚不清楚。

热疗和放疗作为单独因素对细胞 MDR 因子的影响已有较多的研究。有研究表明, 热疗提高了化疗药物在肿瘤细胞内的浓度, 而且逆转了耐药相关因子 MDR1 及 MRP1 等的表达^[6-7]。本研究的前期实验也获得了相似的结果。一些对口腔癌小细胞肿瘤的研究发现, 放疗可引起耐药相关因子 MDR1、MRP1、MRP2 和 Topo II α 的表达上升, 放疗可引起转录因子 YB-1 从胞浆转移至胞核中, 增强 MDR1 和 MRP1 的表达^[8-10]。本研究的相关实验同样发现了放疗致耐药因子在 Tca 8113 细胞中表达上升。这表明, 无论放疗还是热疗, 均可影响肿瘤细胞内耐药蛋白的表达, 热疗与化疗相结

合可能会增强化疗疗效, 而单纯放疗与化疗相结合有可能会抵消部分化疗疗效。本实验采用加热 (42 °C, 0.5 h) 及放疗 (2 Gy) 联合, 分别对 Tca 8113 和 Tca 8113/CBDEA 细胞的体外模拟实验, 对免疫组化结果进行图像分析后发现, P-gp 的表达无明显改变, MRP1 和 GST- π 的表达有明显下降, 与热疗实验中的相应组进行比较发现 MRP1 和 GST- π 的表达下降幅度较缓。检测热放疗后细胞内药物浓度的变化显示有明显上升, 在 Tca 8113 细胞中药物浓度上升幅度与在热疗中相似, 但在 Tca 8113/CBDEA 中热疗组上升幅度远高于热放疗组。这也说明了热疗的作用可能是间接的。

肿瘤的治疗常为综合性治疗, 多种治疗手段联合运用才能达到最佳效果。通过本研究及其他人的研究表明, 单纯放、化疗可增加耐药蛋白的表达, 从而减弱治疗效果, 加剧 MDR 现象; 而热疗可降低癌细胞株的耐药蛋白的表达从而增强化疗疗效, 减少 MDR 现象。提示在肿瘤治疗过程中不仅要联合应用多种手段以达到最好疗效, 也要注意治疗手段使用的先后顺序。

综上所述, 本研究发现, 热放疗联合应用抑制了放疗造成的耐药蛋白表达上升, 并使某些耐药蛋白的表达下调, 热放疗联用不会促使肿瘤细胞产生 MDR; Tca 8113/CBDEA 细胞热放疗后细胞内药物上升值与热疗组相比较进一步印证了热疗后 Tca 8113/CBDEA 细胞中药物浓度上调是受到热疗增加了细胞膜通透性以促进药物的渗透吸收和 MDR 因子下调的双重影响。本实验的结果为临床制定高效的抗癌综合治疗方案提供了有益的依据。

参 考 文 献

[1] 冷卫东, 王大章, 冯戈, 等. 肿瘤耐药蛋白在舌鳞癌中的表达及意

- 义. 华西口腔医学杂志, 2004, 22: 23-25.
- [2] 冷卫东, 王大章. 放疗对舌鳞癌 Tca8113 细胞及其耐药细胞株耐药性的影响. 实用口腔医学杂志, 2006, 22: 615-619.
- [3] 冷卫东, 王大章, 冯戈, 等. 热疗对舌鳞癌 Tca8113 细胞及其耐药细胞株耐药性的影响. 华西口腔医学杂志, 2006, 24: 447-450.
- [4] Dewey WC. Interaction of heat with radiation and chemotherapy. Cancer Res, 1984, 44: 4714-4720.
- [5] Lung H. A generalized concept for cell killing by heat. Radiat Res, 1986, 106: 56-72.
- [6] Hettinga JV, Lemstra W, Meijer C, et al. Hyperthermic potentiation of cisplatin toxicity in a human small cell lung carcinoma cell line and a cisplatin resistant subline. Int J Hyperthermia, 1994, 10: 705-805.
- [7] Souslova T, Averill-Bates DA. Multidrug-resistant hela cells over expressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60: 1538-1551.
- [8] Irene OL, King YL, Matthew N, et al. Expression of P-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. Cancer, 1998, 83: 851-857.
- [9] Hennessy S, Davey MW, Harvie RM, et al. Fractionated irradiation of H69 small-cell lung cancer cells causes stable radiation and drug resistance with increased MRP, MRP2 and topoisomerase II alpha expression. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 54: 895-902.
- [10] Koike K, Uchiumi T, Ohga T, et al. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. FEBS Letters, 1997, 417: 390-394.

(修回日期: 2010-01-25)

(本文编辑: 松 明)

· 消息 ·

2010 年康复医学新技术与新进展国际研讨班招生通知

首都医科大学宣武医院、中国医师协会康复医师分会、北京康复医学会将于 2010 年 5 月在北京举办“2010 年康复医学新技术与新进展国际研讨班”, 届时将邀请美国约翰·霍普金斯大学康复系 Zorowitz 教授、德国科隆体育大学康复医院 PT 长 Eibo Schwitters 教授等国内外知名康复专家前来授课。培训结束时, 将授予国家级继续教育 I 类学分及培训合格证书。

主要授课内容: (1) 卒中康复治疗的新进展; (2) 脑损伤植物状态促醒研究的新进展; (3) 经颅磁刺激 (TMS) 在康复医学中的应用; (4) 功能性电刺激 (FES) 在康复医学中的应用; (5) 心肺康复研究的新进展; (6) 骨科康复治疗的临床原则实例: 腰背痛的康复、前交叉韧带重建术后的康复、肩痛的康复; (7) 平衡功能障碍的康复治疗方法; (8) 康复治疗技术的新动态; (9) 失语症心理语言评价; (10) 临床各种康复治疗新技术实习。

培训对象: 康复科医师、治疗师、神经科医师、骨科医师以及相关临床、科研及治疗人员。

报到及培训时间: 2010 年 5 月 20 日报到, 5 月 21 至 23 日培训。

报到地点: 北京市宣武区长椿街 45 号大府宾馆。

收费标准: 培训费 1000 元 (包括学费和资料费), 食宿及差旅费自理。

联系电话: 010-83198326, 手机: 13641026802; 传真: 010-83156838; 电子信箱: kfysfh@yahoo.cn; 联系人: 北京市宣武区长椿街 45 号宣武医院康复医学科 张艳明; 邮编: 100053。

首都医科大学宣武医院
中国医师协会康复医师分会
北京康复医学会