

[文章编号] 1671-587X(2010)02-0238-04

新型多胺缀合物 NMMB 逆转 K562/ADM 细胞多药耐药及其机制

盖晓东¹, 程鹏飞², 历 春¹, 冯 凯¹, 王超杰²

(1. 北华大学基础医学院病理学教研室, 吉林 吉林 132001; 2. 河南大学天然产物与药物化学研究所, 河南 开封 475004)

[摘 要] 目的: 研究新型多胺缀合物 NMMB 对白血病细胞株 K562/ADM 的多药耐药 (MDR) 逆转作用, 并进一步探讨其耐药逆转机制。方法: 分别以不同浓度的 NMMB ($10 \sim 1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于体外培养的 K562 和 K562/ADM 细胞 24 h, 采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率, 确定 NMMB 的非毒性剂量; 采用非毒性剂量, NMMB 0、2.5、5.0 和 $10.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 分别与不同浓度 ADM ($0.25 \sim 100.00\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 联合作用, 检测各组细胞生长抑制 50% 的 ADM 浓度, 即 IC_{50} , 计算逆转倍数; 利用流式细胞术检测 NMMB 联合 ADM 作用后 K562/ADM 细胞内 ADM 蓄积程度和细胞周期变化。结果: 随着 NMMB 浓度的增加, 细胞增殖抑制率也相应增加, 呈剂量-效应关系; NMMB 的最大无毒剂量为 $12.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 逆转倍数为 4 倍; NMMB 可明显提高 ADM 在 K562/ADM 细胞内的蓄积, 与未加 NMMB 对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$); K562/ADM 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期, 与未加 NMMB 对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。结论: NMMB 对白血病耐药细胞株 K562/ADM 有增殖抑制和多药耐药逆转作用, 其部分逆转机制可能是通过增加细胞内化疗药物蓄积和将 K562/ADM 细胞阻滞在 G_0/G_1 期而实现的。

[关键词] 多胺缀合物; 多药耐药; 耐药逆转; K562/ADM 细胞

[中图分类号] R733.7 **[文献标志码]** A

Effect of a novel polyamine conjugate on MDR reversal of K562/ADM cells and its mechanism

GAI Xiao-dong¹, CHENG Peng-fei², LI Chun¹, FENG Kai¹, WANG Chao-jie²

(1. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China;

2. Institute of Natural Products and Medicinal Chemistry, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Objective To investigate the reversal effect of a novel polyamine conjugate, NMMB, on multidrug resistance (MDR) of myelogenous leukemia K562/ADM cells and discuss the possible correlative mechanism. **Methods** K562 and K562/ADM cells in culture medium were treated with NMMB ($10 - 1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) respectively. The inhibitory rates of these cells were measured by MTT assay. Non-cytotoxic dose of NMMB was determined. K562/ADM cells at logarithmic growth phase were randomly divided into ADM control, NMMB 2.5, 5.0, $10.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ groups. The inhibitory rate 50% (IC_{50}) and the reversal index in all groups were determined. The effects of NMMB on ADM accumulation in K562/ADM cells and cell cycle were examined by flow cytometry (FCM). **Results** The inhibitory rates were significantly increased when the cells were treated with different doses of NMMB ($10 - 1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) in a dose-dependent manner. The available reversal concentration of NMMB was $12.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the reversal index was 4 folds on K562/ADM cells. ADM accumulation in K562/ADM cells was significantly increased ($P < 0.05$). The cells were blocked at the period of G_0/G_1 ($P < 0.01$). **Conclusion** NMMB has an effect on proliferation inhibition and MDR reversal of K562/ADM cell line. The reversal mechanisms of NMMB may be due to increasing the accumulation of chemo-drugs in cells and arresting the cells at

[收稿日期] 2009-09-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (20472016); 吉林省科技厅自然科学基金资助课题 (200505246)

[作者简介] 盖晓东 (1962-), 女, 吉林省吉林市人, 教授, 医学博士, 主要从事肿瘤分子病理学研究。

[通信作者] 王超杰 (Tel: 0432-4608104, E-mail: wjcsxq@henu.edu.cn)

G₀/G₁ phase.

Key words: polyamines conjugate; multi-drug resistance; reversal of drug resistance; K562/ADM cell

多药耐药 (multi-drug resistance, MDR) 一直是白血病化疗的主要障碍, 而维拉帕米 (VER)、环孢素 A (CsA) 等逆转剂由于毒副作用限制其在临床的应用。研究 MDR 并寻找低毒有效的逆转剂, 一直是研究白血病治疗的重要课题。人体内天然多胺包括腐胺 (putrescine)、亚精胺 (spermidine) 和精胺 (spermine), 广泛存在于原核和真核细胞中并参与体内多种生理和病理过程。肿瘤细胞的生长需要大量的多胺, 有研究发现: 增殖旺盛的组织, 如再生肝、胚胎、肿瘤组织等, 多胺水平升高; 反之, 多胺水平降低, 细胞的增殖和分化就会受到抑制^[1-6]。新型多胺缀合物由于其化学结构与天然多胺相似, 能与天然多胺竞争多胺转运体并进入细胞内, 但其并不具有天然多胺促进细胞增殖等功能。本课题组曾报道多胺缀合物对多种肿瘤细胞均有明显的诱导凋亡作用^[7], 但其是否具有 MDR 逆转作用尚不明确。因此, 本实验以人类慢性髓系白血病耐药细胞株 K562/ADM 为研究对象, 研究一新型多胺缀合物 N-(N¹-2-(6-甲氧基) 奈甲基) 丁胺基-1, 4-丁二胺 (N¹-(2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) methylamino) butane-1, 4-diamine, NMMB) 的多药耐药逆转作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 胰蛋白酶、RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco (USA) 公司; MTT、胺基胍、溴化乙啶购自 Sigma (USA) 公司; NMMB 由本课题组合成; 阿霉素 (adriamycin, ADM) 购自浙江海正药业股份有限公司。

1.2 细胞培养 人白血病细胞株 K562 的 ADM 耐药细胞株 K562/ADM 及其敏感株 K562 由吉林大学再生医学科学研究所提供。用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养, 取对数生长期的细胞用于实验。为抑制血清中的胺基氧化酶, 向培养液中加入终浓度 1 mmol · L⁻¹ 的胺基胍, 该浓度对本实验所检测的各种参数均无影响。

1.3 NMMB 作用下 K562 和 K562/ADM 细胞的增殖抑制率检测 分别取对数生长期的 K562 和 K562/ADM 细胞 (1 × 10⁶ mL⁻¹) 接种在 96 孔板内, 实验组加入不同浓度的 NMMB (10 ~

1 000 mg · L⁻¹), 对照组加等体积的培养基不加药物。培养 24 h 后, 每孔加 5 g · L⁻¹ MTT 20 μL (调零组除外), 再培养 4 h, 倾去培养液, 每孔加入 DMSO 100 μL, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解后于自动酶标仪上测定各孔吸光度 (A₅₇₀) 值, 每组各设 3 个平行孔。按下式计算抑制百分率: 抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值 × 100%, 同时计算 IC₅₀ 及最大无毒剂量。

1.4 NMMB 作用下 K562/ADM 细胞的逆转倍数检测 取对数生长期的 K562/ADM 细胞 (1 × 10⁶ mL⁻¹) 接种在 96 孔板内, 选用 NMMB 最大无毒剂量以下浓度 2.5、5.0 和 10.0 mg · L⁻¹ 分别与不同浓度 ADM (0.25 ~ 100.00 mg · L⁻¹) 联合作用于 K562/ADM 细胞。方法同 1.3 测定 A₅₇₀ 值, 每组各设 3 个平行孔。计算各组的 IC₅₀, 求出 NMMB 作用后的逆转倍数 (RI), RI = 耐药细胞逆转前的 IC₅₀ / 耐药细胞逆转后的 IC₅₀。

1.5 流式细胞术检测 K562/ADM 细胞内 ADM 浓度 取对数生长期的 K562/ADM 细胞 (6 × 10⁵ mL⁻¹) 接种在 24 孔板内, 实验分组如下: ① K562/ADM + ADM; ② K562/ADM + ADM + NMMB (10 mg · L⁻¹), ADM 浓度分别为 50.0、25.0 和 12.5 mg · L⁻¹。细胞加药后, 常规培养 4 h, PBS (4℃) 洗 2 次后用 PBS (4℃) 400 μL 混匀。依据 ADM 本身发荧光的特点, 应用流式细胞仪测定荧光强度 (激发波长 488 nm、发射波长 575 nm)。

1.6 流式细胞术检测 K562/ADM 细胞周期变化 收集 10 mg · L⁻¹ 的 NMMB 与 12.5 mg · L⁻¹ 的 ADM 作用 24 h 的 K562/ADM 细胞和未加 NMMB 对照组细胞 (1 × 10⁶ mL⁻¹), 细胞沉淀加 75% 冷乙醇固定 4℃ 过夜, PBS 洗 2 次, 加入 PI 染色液, 4℃ 避光放置 30 min, 流式细胞仪分析细胞周期变化。

1.7 统计学分析 所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 细胞药物敏感性、细胞内药物浓度及细胞周期的组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 NMMB 作用下 K562 和 K562/ADM 细胞的增殖抑制率变化 NMMB (10 ~ 1 000 mg · L⁻¹)

8个浓度作用24 h后,随着NMMB浓度的增加,细胞的增殖抑制率也相应增加,呈剂量-效应关系(图1)。NMMB对K562/ADM细胞的最大无毒剂量为 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,抑制率为95%。因此,可选择NMMB最大无毒剂量以下的浓度作为最佳药物逆转浓度。NMMB对K562和K562/ADM的 IC_{50} 值分别为82.5和154.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

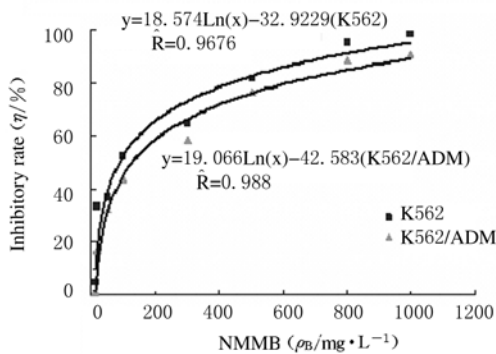


图1 NMMB作用下K562和K562/ADM细胞的增殖抑制率

Fig.1 Inhibitory rates of proliferation in K562 and K562/ADM cells after treated with NMMB

2.2 NMMB作用下K562/ADM细胞株耐药性的逆转倍数 NMMB的最大无毒剂量为 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,取2.5、5.0和10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NMMB与不同浓度ADM($0.25 \sim 100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)进行逆转作用,测定 IC_{50} 。从表1可以看出:3个浓度的NMMB与不同浓度ADM的联合作用均可使K562/ADM的 IC_{50} 明显下降,呈现剂量依赖性,与逆转前 IC_{50} 比较差异均有显著性($P < 0.01$)。其中10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NMMB逆转效果最佳,逆转倍数为4倍。

表3 流式细胞术检测NMMB联合ADM作用下K562/ADM细胞周期的变化

Tab.3 The change of cell cycle in K562/ADM cells after treated with NMMB and ADM determined by flow cytometry ($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Dose($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cell cycle		
		G_0/G_1	S	G_2/M
ADM	0	51.50 ± 1.15	40.00 ± 1.37	8.50 ± 0.98
ADM	12.5	22.60 ± 1.28	37.40 ± 1.61	40.00 ± 1.05
ADM+NMMB	12.5+10.0	$85.10 \pm 2.11^*$	$4.00 \pm 1.54^*$	$10.90 \pm 0.87^*$

* $P < 0.01$ compared with ADM $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

表1 NMMB与ADM联合作用下K562/ADM细胞株耐药性的逆转倍数

Tab.1 Reversal index of K562/ADM cells after treated with NMMB and ADM ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IC_{50}	Reversal index (RI)
ADM	0	50.00 ± 3.10	—
ADM+NMMB	2.5	$27.60 \pm 2.51^*$	1.8
	5.0	$22.70 \pm 2.13^*$	2.2
	10.0	$12.50 \pm 2.65^*$	4.0

* $P < 0.01$ compared with ADM group.

2.3 NMMB作用下K562/ADM细胞内ADM浓度的变化 随着ADM培养浓度的增加,K562/ADM细胞内ADM荧光强度有所增加;加入NMMB $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,细胞内ADM荧光强度也相应增加($P < 0.05$)。提示NMMB可增加细胞内ADM的蓄积。见表2。

表2 NMMB与ADM联合作用下K562/ADM细胞内ADM浓度的变化

Tab.2 The change of ADM level in K562/ADM cells after treated with NMMB and ADM ($n=3, \bar{x} \pm s$)

ADM ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Intracellular ADM level (MFI)	
	NMMB $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NMMB $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
12.5	5.087 ± 131	$6.011 \pm 118^*$
25.0	6.963 ± 184	$7.343 \pm 156^*$
50.0	8.509 ± 197	$8.810 \pm 210^*$

* $P < 0.05$ compared with NMMB $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

2.4 NMMB作用下细胞周期时相分布的变化 加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NMMB 24 h后,K562/ADM细胞与未加NMMB的K562/ADM细胞比较, G_0/G_1 期细胞增加($P < 0.01$),S期和 G_2/M 期细胞减少($P < 0.01$)。见表3。

3 讨论

多胺类似物是与多胺具有极相似结构的化合物, 能通过多种方式降低多胺含量, 发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用^[8-10]。本研究检测了新型多胺缀合物 NMMB 对 K562 和 K562/ADM 细胞的生长抑制作用, 结果显示: NMMB 在 $10 \sim 1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 8 个浓度作用 K562 和 K562/ADM 细胞 24 h 后, 均有明显的增殖抑制作用; 随 NMMB 剂量的增加, 细胞的增殖抑制率也相应增加, 呈现剂量依赖性。

有关多胺类似物与肿瘤 MDR 逆转的研究目前尚不清楚。本研究结果显示: 2.5、5.0 和 $10.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NMMB 非细胞毒性剂量下均可使 K562/ADM 的 IC_{50} 明显下降, 其逆转倍数分别为 1.8、2.2 和 4.0 倍, 逆转作用具有浓度依赖性。提示新型多胺缀合物 NMMB 具有逆转 K562/ADM 细胞 MDR 的作用。

ADM 自身可发出荧光, 荧光强度与浓度相关, 检测荧光强度可以反映出细胞内 ADM 的浓度。本研究结果显示: NMMB 联合 ADM 作用 K562/ADM 细胞后, 细胞内的荧光强度明显提高, 提示 NMMB 可以增加 K562/ADM 细胞中 ADM 的蓄积。MDR 的形成机制错综复杂, 包括经典耐药标志蛋白 P-gp、细胞周期调控异常、凋亡基因表达失控及 DNA 修复能力增强等因素。本研究结果显示: NMMB 逆转 K562/ADM 细胞的 MDR 与细胞周期改变有关。NMMB 处理后 G_0/G_1 期细胞明显增加, 从而抑制了 G_2/M 期的继续分裂。 G_1 期为细胞分化期, 也是药物作用的敏感期, 提示 NMMB 逆转作用可能是通过将 K562/ADM 细胞

阻滞在 G_0/G_1 期而发挥作用。

综上所述, 新型多胺缀合物 NMMB 对 K562/ADM 细胞具有一定的增殖抑制和逆转作用, 其逆转作用可能是通过增加细胞内化疗药物的蓄积或将 K562/ADM 细胞阻滞在 G_0/G_1 期从而抑制其增殖, 其他的相关逆转机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jänne J, Alhonen L, Pietilä M, et al. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271 (5): 877-894.
- [2] Pegg AE. Spermidine/spermine-N (1) -acetyltransferase: a key metabolic regulator [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294 (6): E995-1010.
- [3] 赵雅君, 王丽娜, 李鸿珠, 等. 大鼠心肌多胺代谢限速酶 ODC、SSAT 活性分析 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21 (5): 555-559.
- [4] Thomas T, Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7 (2): 113-126.
- [5] Gilmour SK. Polyamines and nonmelanoma skin cancer [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224 (3): 249-256.
- [6] Wallon UM, O' Brien TG. Polyamines modulate carcinogen-induced mutagenesis in vivo [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2005, 45 (1): 62-69.
- [7] Xie S, Cheng P, Liu G, et al. Synthesis and bioevaluation of N-(aryalkyl)-homospermidine conjugates [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17 (16): 4471-4475.
- [8] 任玉珊, 韩 钰, 曹春雨, 等. 多胺类似物 BENS 对黑素瘤 B16-F1 细胞生长的影响 [J]. *肿瘤*, 2009, 29 (3): 206-209.
- [9] 韩 钰, 曹春雨, 王艳林, 等. 多胺类似物 CHEN, CPEN 和 BENS 对 HeLa 宫颈癌细胞生长的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17 (6): 478-481.
- [10] 王艳林, 韩 钰, 袁太宁, 等. 多胺类似物 CPENSpm 通过干扰多胺代谢抑制肺癌细胞的增殖 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24 (1): 132-135.

《吉林大学学报 (医学版)》2008 年被引用指标及排序情况

根据中国科学技术信息研究所 2009 年版《中国科技期刊引证报告 (核心版)》收录的 1 868 种中国科技论文统计源期刊的统计报告, 2008 年《吉林大学学报 (医学版)》发表论文总数 281 篇, 总被引频次为 934, 影响因子 0.400, 基金论文比 0.99, 被引半衰期 4.58, 即年指标 0.018, 他引率 0.88, 引用刊数 33, 扩散因子 3.53, 权威因子 333.69, 学科扩散指标 0.67, 学科影响指标 0.57, 文献选出率 0.64, 参考文献量 2 776, 平均引文数 9.91, 平均作者数 5.17, 地区分布数 13, 机构分布数 33。《吉林大学学报 (医学版)》在 49 种医科大学学报类期刊中总被引频次排第 7 名, 影响因子排第 9 名。49 种医科大学学报类期刊总被引频次排序前几期期刊: 第四军医大学学报, 第三军医大学学报, 南方医科大学学报, 第二军医大学学报, 北京大学学报医学版, 中国医学科学院学报, 吉林大学学报医学版, 四川大学学报医学版, 郑州大学学报医学版, 新乡医学院学报; 49 种医科大学学报类期刊影响因子排序前 10 名期刊: 新乡医学院学报, 中国医学科学院学报, 中山大学学报医学科学版, 浙江大学学报医学版, 北京大学学报医学版, 第三军医大学学报, 中南大学学报医学版, 西安交通大学学报医学版, 吉林大学学报医学版, 第四军医大学学报。