

抗疟药氯喹增强胃癌裸鼠移植瘤对顺铂的化疗敏感性

方念 张慧卿 刘小梅 何波 万以叶 程海涛 谢桂生

【摘要】 目的 探讨抗疟药氯喹(CQ)增强顺铂(DDP)抑制胃癌SGC7901细胞裸鼠移植瘤生长的作用。方法 建立胃癌SGC7901细胞裸鼠异位移植瘤模型,将24只荷瘤鼠随机分为对照组、DDP组、CQ组和CQ+DDP组。腹腔注射给药,给药后每3日测量肿瘤体积。给药结束时处死裸鼠,剥离移植瘤,称重。Western Blot检测肿瘤组织 beclin-1、LC3 II/I caspase3 和 P-gp 表达,RT-PCR技术检测MDR1 mRNA水平。结果 与对照组相比,DDP组移植瘤生长缓慢,体积较小,抑瘤率为47.6%,而且 Beclin1 和 LC3 表达增加,LC I 转换 LC II 增多。联合氯喹后,抑瘤率提高至84.7% ($P < 0.01$),LC3 II/I 比值下降;检测到 caspase3 蛋白水平升高,MDR1/P-gp 表达下降(均 $P < 0.05$)。结论 氯喹能增强胃癌裸鼠移植瘤对顺铂的化疗敏感性,这一作用可能与抑制自噬活性和下调多药耐药基因MDR1/P-gp的表达有关。

【关键词】 顺铂; 氯喹; 胃肿瘤; 抗药性,多药; 移植瘤

Chloroquine sensitizes cisplatin cytotoxicity in human gastric cancer xenografts Fang Nian*, Zhang Huiqing, Liu Xiaomei, He Bo, Wan Yiye, Cheng Haitao, Xie Guisheng. *Gastrointestinal Department of Internal Medicine, The Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003, China
Corresponding author: Zhang Huiqing, Email: hqzhang888@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the enhanced effect of cisplatin on chloroquine in SGC7901 xenografts. **Methods** The models of SGC7901 xenograft on athymic mouse were established and randomized to four groups with intraperitoneal injection of different drugs: control, cisplatin(DDP), chloroquine(CQ) and DDP+CQ. Drugs were injected once every 3 days, 10 times in all. The tumor volume were measured during the process of drug therapy. The mice were sacrificed 3 days after the last injection, and then the weight of tumor were measured. Western Blot was performed to detect the expression of beclin-1, LC3 II/I, Caspase3 and P-gp, RT-PCR was performed to detect the expression of MDR1 mRNA. **Results** Compared to group control, the growth of tumor were more slowly and the tumor volume were much smaller in group DDP, the inhibition of tumor rate was 47.6%; and the expression of Beclin1 and LC3 were up-regulated. After combined with CQ, the inhibition of tumor rate was increased to 84.7% ($P < 0.01$), and the ratio between LC3 II/I was decreased; the expression of MDR1 and P-gp were also down-regulated. **Conclusion** Chloroquine can enhance the anti-tumor effect of cisplatin on gastric cancer xenografts, inhibition of autophagy and down-regulation of MDR1/P-gp expression are possibly the related mechanisms.

【Key words】 Cisplatin; Chloroquine; Stomach neoplasms; Drug resistance, multiple; Xenograft

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.01.026

基金项目: 江西省青年科学基金(20122BAB215029)

作者单位: 330003 南昌大学第四附属医院消化内科(方念、程海涛、谢桂生); 江西省肿瘤医院内三科(张慧卿、刘小梅、何波、万以叶)

通讯作者: 张慧卿, Email: hqzhang888@sina.com

顺铂 (Cisplatin, DDP) 作为传统的化疗药, 贯穿在胃癌化疗的不同时段, 如辅助化疗的 ECF 方案, 姑息化疗的 DCF 方案和分子靶向治疗的 PF+曲妥单抗方案, 在 NCCN 指南中都被作为 I 类证据推荐使用^[1-3]。研究表明, 接受含顺铂方案化疗的晚期胃癌患者获益更大, 生存期更长^[4]。目前认为, 化疗药主要通过诱导细胞凋亡实现对肿瘤的杀伤作用。自噬是真核生物降解细胞内蛋白、脂质和细胞器的过程, 维持着细胞代谢的平衡, 在肿瘤的发展和治理中起重要作用^[5-6]。我们的前期研究证实, 顺铂诱导胃癌 SGC7901 细胞凋亡的同时, 也引起了自噬的发生; 通过氯喹 (Chloroquine, CQ) 特异性抑制细胞自噬后, 顺铂的抗癌能力得到明显增强^[7-8]。本研究旨在明确氯喹联合顺铂对胃癌 SGC7901 裸鼠移植瘤的抑制作用, 并初步探讨其机制。

材料与方法

一、主要试剂

顺铂和氯喹购自于美国 Sigma-Aldrich 公司, Caspase-3 抗体、Beclin 1 抗体和 LC3 抗体购于美国 CST 公司, P-gp 抗体购于英国 Abcam 公司。MDR1 基因扩增引物由上海生工合成。

二、细胞株和裸鼠

常规传代培养人胃癌细胞株 SGC7901。24 只 8 周龄的 BALB/C 雌性裸鼠购自中山大学实验动物中心, 在 SPF 屏障系统的洁净层流架内饲养。

三、动物分组与药物处理

取对数生长期的 SGC7901 细胞接种于裸鼠背部右下侧皮下, 每只小鼠接种约 5×10^6 个细胞。接种 6 d 后采用随机数字表法将 24 只裸鼠随机分为 4 组: 对照组 (control, Con)、氯喹组 (CQ)、顺铂组 (DDP) 和联合组 (CQ+DDP), 每组 6 只。对照组为 PBS, 氯喹组为 45 mg/kg 的氯喹; 顺铂组为 5 mg/kg 顺铂; 联合组为 45 mg/kg 的氯喹和 5 mg/kg 顺铂。每 3 d 给药 1 次, 共 10 次, 每 3 d 测量肿瘤长、短径。结束给药后 3 d 处死动物, 剥离肿瘤组织, 称重。肿瘤体积计算公式: 体积 = 长径 \times 短径²/2。

四、RNA 提取及 RT-PCR

将实验所用器物用 DEPC 水进行灭酶处理, 包括研磨组织用的研钵, 吸取试剂的移液枪枪头等。整个操作过程应尽量在低温下进行, 以免 RNA 降解。称取 50~100 mg 冻存标本置于液氮冷却的研

钵中研磨, 研磨完成后, 向标本中加入 1 ml Triol 试剂继续研磨; 将磨好的组织移入到 1.5 ml 的去酶 EP 管中, 按说明书的步骤提取 RNA 行 RT-PCR。MDR1 基因的引物序列为 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3' 和 3'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-5'。将产物进行凝胶成像。应用 Gel-Pro 3.2 软件分析 PCR 电泳图像。

五、Western Blot

取肿瘤组织 100 mg, 加入 300 μ l RIPA 裂解液, EP 管收集后进行超声, 超声后 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 采用 Bradford 方法进行蛋白定量。上样前煮沸 5 min, 冰上冷却后 10 000 r/min 离心 30 s, 吸取上清进行 SDS-PAGE (200 V, 45 min), 100 V 转膜 1 h, 0.5% (W/V) 脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.1% (V/V) TBST 洗膜两次后, 二抗室温孵育 1 h, 洗膜 3 次后采用 ECL 法显色。

六、统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析。组间计量资料的两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 裸鼠移植瘤生长状态: 给药前各组裸鼠体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 给药后 Con 组肿瘤生长迅速, DDP 组及 CQ+DDP 组生长相对缓慢。在整个实验过程中, DDP 组和 CQ+DDP 组之间肿瘤体积变化有统计学差异 ($P < 0.05$); 在接种 36 d 后处死裸鼠时, DDP 组和 CQ+DDP 组移植瘤的重量分别为 (0.96 ± 0.21) g 和 (0.28 ± 0.08) g, 均低于 Con 组的 (1.83 ± 0.41) g (均 $P < 0.05$), 抑瘤率分别为 47.6% 和 84.7%; 与 DDP 组比较, CQ+DDP 组裸鼠移植瘤体重量明显更轻 ($P < 0.01$) (图 1)。

2. 顺铂诱导胃癌 SGC7901 细胞裸鼠移植瘤自噬增强: Western blot 的结果显示, 与 Con 组相比, DDP 组裸鼠肿瘤组织中 Beclin-1 的表达增高, 且 LC3 II/I 比值显著增加 ($P < 0.01$); 相对 DDP 组, DDP+CQ 联合组的 LC3 II/I 比值出现下降 (图 2)。

3. Western Blot 检测 P-gp 和 caspase3: 在 Con 组, 移植瘤细胞 P-gp 表达较高, caspase3 表达较低; 与 Con 组相比较, DDP 组和 CQ+DDP 组的 caspase3 水平增高, 而 P-gp 水平有所降低, 尤以 CQ+DDP

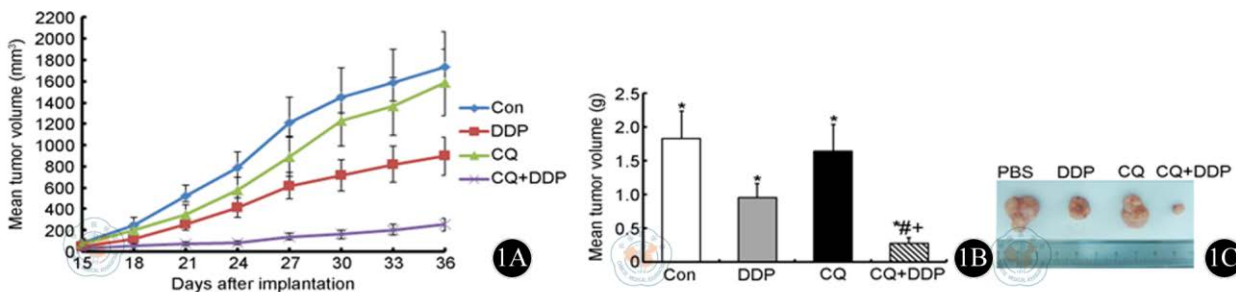


图1 各组胃癌SGC7901细胞裸鼠移植瘤生长状况。与Con组比较, * $P < 0.05$; 与DDP组比较, # $P < 0.01$; 与CQ组比较, + $P < 0.05$

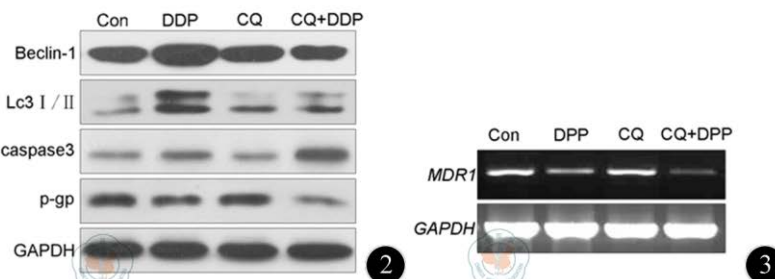


图2 Western Blot检测胃癌移植瘤细胞相关蛋白的表达 图3 RT-PCR检测裸鼠移植瘤多药耐药基因MDR1

组的变化更为明显(均 $P < 0.05$) (图2)。

4. RT-PCR 检测多药耐药基因 MDR1: 腹腔注射给药 10 次后, 与 Con 组相比, CQ 组 MDR1 mRNA 的表达无统计学差异 ($P > 0.05$); 与 DDP 组比较, CQ+DDP 组 MDR1 mRNA 水平下降, 均有统计学差异 ($P < 0.05$) (图3)。

讨 论

胃癌是我国和全球的第二癌症死因, 严重危害人类健康^[9-10]。唯一可能根治胃癌的治疗手段是手术, 然而, 超过 2/3 的患者在诊断胃癌时已是晚期, 无法进行根治性切除; 实行 R0 切除的患者中, 也有 25% 以上出现复发或转移^[11]。晚期胃癌最主要的治疗方法是化疗治疗。遗憾的是, 患者的中位生存时间仍在 1 年左右, 多数患者最终因耐药的产生而导致化疗失败^[2-3]。因此, 如何增强化疗药物敏感性, 提高胃癌化疗疗效是临床需要解决的问题。

氯喹因具备安全有效的优势一直被用于预防疟疾和治疗类风湿性关节炎^[12]。近年来, 氯喹“老药新用”, 与传统抗癌手段联合治疗恶性肿瘤, 显示出良好的前景^[13]。Sotelo 等^[14]入组了 30 例多形性胶质母细胞瘤术后患者, 随机分成氯喹和安慰剂组, 安慰剂组给予化放疗+安慰剂, 氯喹组在化放疗基础上联合氯喹 (150 mg/d, 12 个月), 结果表明: 安慰剂组患者中位生存时间 11 个月, 氯喹组

24 个月, 死亡风险下降到 0.52。

氯喹是一种自噬特异性抑制剂, 具有弱化溶酶体内酸性环境, 稳定溶酶体膜的功能, 它能增强多种化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用^[13,15]。我们的前期研究表明, 5 mg/L 的顺铂作用于胃癌 SGC7901 细胞, 导致细胞凋亡的同时也发现自噬囊泡增多, Beclin-1 和 LC3 II 蛋白表达上调, 即诱发了细胞自噬; 在联合氯喹后, 自噬活性明显下降, 细胞凋亡显著增加。因此我们推论顺铂引起的自噬是保护性自噬, 部分拮抗了顺铂诱导的胃癌细胞凋亡, 导致化疗的敏感性下降^[7-8]。

在本研究中, 我们建立了胃癌 SGC7901 细胞裸鼠移植瘤模型, 发现与顺铂给药组相比, 顺铂联合氯喹组移植瘤的生长速度明显减慢, 瘤体负荷显著降低; Western Blot 的结果显示, 联合用药组 Beclin-1 和 LC3 II 的表达水平下降, caspase3 水平升高, 提示腹腔注射氯喹能抑制裸鼠的自噬活性, 进而抑制肿瘤生长, 增加顺铂的抗癌作用; 结合 MDR1 mRNA 和 P-gp 蛋白水平的变化, 我们推测氯喹可能通过抑制多药耐药基因的表达来增强顺铂的化疗敏感性。这与 Mazzanti 等^[16]在人肝癌细胞系中的研究相一致, 他们发现塞来昔布作用于高表达 MDR 的肝癌细胞时, 会导致细胞自噬的发生和细胞周期静止, 而且这一作用与 P-gp 介导的 HGF/MET 自分泌环表达下调有关。

传统抗疟药氯喹能增强顺铂对胃癌胃癌裸鼠移植瘤细胞的杀伤作用, 提高化疗敏感性, 分析可能与抑制自噬活性和下调多药耐药基因 MDR1/P-gp 的表达有关。总之, 氯喹和化疗药物的联合应用有望成为胃癌治疗的新策略。

参 考 文 献

- [1] Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(1): 11-20.
- [2] Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(31): 4991-4997.
- [3] Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2010, 376(9742): 687-697.
- [4] Pasini F, Fracon AP, DE Manzoni G. The role of chemotherapy in metastatic gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(10): 3543-3554.
- [5] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [6] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12 (6): 401-410.
- [7] 张慧卿, 方念, 芦珊, 等. 氯喹促进顺铂诱导胃癌细胞 SGC7901 细胞凋亡及其机制[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(16): 947-950.
- [8] Zhang HQ, He B, Fang N, et al. Autophagy inhibition sensitizes Cisplatin cytotoxicity in human gastric cancer cell line sgc7901[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(8): 4685-4688.
- [9] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [10] 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(1): 1-12.
- [11] Kim DH, Kim SM, Hyun JK, et al. Changes in postoperative recurrence and prognostic risk factors for patients with gastric cancer who underwent curative gastric resection during different time periods[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(7): 2317-2327.
- [12] Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1/3): 220-233.
- [13] Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 3-7.
- [14] Sotelo J, Briceño E, López-González MA. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Ann Intern Med*, 2006, 144(5): 337-343.
- [15] Levy JM, Thorburn A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes[J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 131(1): 130-141.
- [16] Mazzanti R, Platini F, Bottini C, et al. Down-regulation of the HGF/MET autocrine loop induced by celecoxib and mediated by P-gp in MDR-positive human hepatocellular carcinoma cell line[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(1): 21-32.

(收稿日期: 2013-11-30)

(本文编辑: 马超)

方念, 张慧卿, 刘小梅, 等. 抗疟药氯喹增强胃癌裸鼠移植瘤对顺铂的化疗敏感性 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8 (1): 120-123.

中 华 临 床 医 学 会