

异长春花碱对耐顺铂人鼻咽癌细胞多药耐药的逆转作用及其机制

韩建庚*(天津医科大学附属肿瘤医院药学部,天津 300060)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0019-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.07

摘要 目的:研究异长春花碱对耐顺铂(DDP)人鼻咽癌细胞(CNE2/DDP)多药耐药的逆转作用及其机制。方法:以对数生长期的CNE2/DDP细胞为对象,检测0.1、1、5、10、50、100 μmol/L异长春花碱作用24 h后细胞的增殖抑制率,与空白对照组比较考察5、10 μmol/L异长春花碱对细胞耐DDP的逆转倍数(RF)、细胞内罗丹明123的含量、多药耐药基因1(MDR1)、多药耐药相关蛋白1(MRP1)mRNA及其蛋白表达和磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)蛋白表达、激活蛋白1(AP-1)活性。结果:异长春花碱与剂量呈正相关地抑制CNE2/DDP细胞的增殖;5、10 μmol/L异长春花碱对细胞耐DDP的RF分别为2.81、8.38倍;与空白对照组比较,细胞中罗丹明123含量分别提高了2.16和2.79倍($P < 0.05$),MDR1、MRP1 mRNA及其蛋白,p-JNK蛋白和AP-1活性均明显降低($P < 0.05$)。结论:异长春花碱可逆转CNE2/DDP细胞对DDP的耐药性,降低细胞中MDR1、MRP1的表达,其机制可能与抑制JNK磷酸化、下调AP-1活性有关。

关键词 异长春花碱;人鼻咽癌CNE2细胞;顺铂;多药耐药;机制

Reversal Effects and Mechanism of Vinorelbine on the Multi-drug Resistance of Cisplatin-resistant Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line

HAN Jian-geng (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the reversal effects and mechanism of vinorelbine on multi-drug resistance of cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE2/DDP). **METHODS:** The inhibitory rate of the proliferation CNE2/DDP cells at logarithmic growth phase were detected after treated with 0.1, 1, 5, 10, 50 and 100 μmol/L vinorelbine for 24 h. The reversal fold (RF) of 5 and 10 μmol/L vinorelbine to cisplatin-resistance in CNE2/DDP cell, the contents of intracellular Rh-123, the expressions of MDR1, MRP1 and p-JNK and the activity of AP-1 were investigated, compared with blank control group. **RESULTS:** Vinorelbine could inhibit the proliferation of CNE2/DDP cells in positive dose-dependant manner; 5 and 10 μmol/L vinorelbine reversed cisplatin-resistance in CNE2/DDP cell with the folds of 2.81 and 8.38, respectively; compared with blank control group, the intracellular contents of Rh-123 was improved by 2.16 and 2.79 fold respectively ($P < 0.05$), while the expression of MDR1, MRP1 and p-JNK protein and the activity of AP-1 were decreased significantly ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Vinorelbine could reverse the multi-drug resistance and down-regulate the expression of MDR1 and MRP1, and the mechanism may be associated with the inhibition of JNK phosphorylation and the down-regulation of AP-1 transcriptional activity.

KEYWORDS Vinorelbine; Nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell line; Cisplatin; Multi-drug resistance; Mechanism

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国常见的恶性肿瘤之一,在头颈部恶性肿瘤中占首位,在我国的华南地区其发病率高达十万分之十五至十万分之三十三^[1]。目前,鼻咽癌公认和有效的根治性手段为放疗,或以放疗为主的综合治疗。化疗是鼻咽癌最主要的辅助治疗手段,但是癌细胞多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)的产生常常引起鼻咽癌化疗的失败。因此,逆转肿瘤细胞的MDR对提高化疗效果有重要意义。近来异长春花碱逆转肿瘤细胞MDR的作用引起人们的广泛关注^[2],本文旨在探讨异长春花碱对耐顺铂人鼻咽癌细胞(CNE2/DDP)MDR的逆转作用及其机制。

1 材料

1.1 仪器

ABI7500荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司); PowerPac Basic电泳仪、PowerPac HC转膜电泳仪、

*药师。研究方向:临床药学。电话:022-23340123。E-mail: hanjiangeng@163.com

ChemiDocXRS凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);PTC-200 PCR仪(美国MJ公司);CO₂培养箱(美国Forma公司);生物化学发光测量仪(美国Promega公司)。

1.2 药品与试剂

异长春花碱原料药(美国Sigma公司,分析纯,C₄₅H₅₁N₅含量:≥99.0%);DDP注射液(南京制药有限公司,批号:20080802,规格:20 mg:20 ml);多药耐药基因1(MDR1)、多药耐药相关蛋白1(MRP1)、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)抗体(美国Abcam公司);胎牛血清(批号:8122818)、达尔伯克改良伊格格(DMEM)培养基(批号:8112018)(美国Gibco公司);Trizol RNA提取试剂(美国Invitrogen公司,批号:15596026);逆转录试剂盒、SYBGREE实时定量PCR试剂盒(日本Takara公司);Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号:P0012);ECL化学发光试剂(美国GE公司,批号:RPN2109);双荧光素酶报告试剂盒(美国Promega公司,批号:E1910);激活蛋白1(Activator protein 1, AP-1)荧光报告质粒3xAP-1-pGL3(美国Addgene公司,批号:32729);罗

丹明 123 原料药(美国 Sigma 公司,批号:R8004,纯度:≥95%)。

1.3 细胞株

CNE2/DDP 为天津医科大学附属肿瘤医院药学部实验室保存。

2 方法

2.1 细胞培养

取细胞用含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 u/ml 链霉素的 DMEM 培养基在 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中常规传代培养。细胞密度 80% 时,经 0.25% 胰酶消化后吹打成单细胞悬液常规传代。

2.2 细胞的增殖情况

采用 MTT 法,取对数生长期的 CNE2/DDP 细胞,经 0.25% 胰酶消化后吹打成单细胞悬液,调整细胞密度为 $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl ,培养 24 h 后,弃原培养液,将异长春花碱按照 0.1、1、5、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 梯度稀释加入新培养液,每个浓度设 5 个平行复孔,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h,各孔加入 MTT (5 mg/ml),继续培养 4 h,弃上清液,然后加入 200 μl 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min,用酶标仪检测 490 nm 波长处的光密度(OD)。另设不加任何药物处理的空白对照组和只加 DMSO 的阴性对照组,计算细胞在异长春花碱作用下的增殖抑制率,绘制细胞增殖的抑制曲线。

2.3 细胞耐药性的逆转作用考察

采用 MTT 法,取对数生长期的 CNE2/DDP 细胞,经 0.25% 胰酶消化后吹打成单细胞悬液,调整细胞密度为 $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl ,培养 24 h 后,弃原培养液,将 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度异长春花碱和 0.1、1、5、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 梯度稀释的 DDP 加入新培养液,每个浓度设 5 个平行复孔,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h,各孔加入 MTT (5 mg/ml),继续培养 4 h,弃上清液,然后加入 200 μl DMSO,振荡 10 min,用酶标仪检测 490 nm 波长处的 OD。另设空白对照组(未逆转),计算细胞在 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱作用下的半数抑制浓度(IC₅₀),按照公式耐药倍数(RF) = $\text{IC}_{50 \text{ 未逆转}} / \text{IC}_{50 \text{ 逆转}}$ ^[3],计算细胞在异长春花碱作用下的 RF。

2.4 药物蓄积试验

取“2.3”项下 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱作用 24 h 后的细胞和空白对照组的细胞,经胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,300×g 离心 5 min,去上清液,重悬于含 5 mmol/L 罗丹明 123 的培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 30 min 后,以培养液洗涤细胞 3 次,再在 37 °C、5% CO₂ 条件下继续用 DMEM 培养液培养 10 min,用培养液洗涤细胞,然后以 1 ml 预冷的 DMEM 培养液重悬细胞,用流式细胞仪检测细胞中罗丹明 123 的荧光强度,以此评价药物的蓄积情况。

2.5 检测耐药相关基因 mRNA 表达

采用荧光定量 PCR 法,取“2.3”项下 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱作用 24 h 后的细胞和空白对照组的细胞,经胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,以 Trizol 试剂盒提取总 RNA,提取的 RNA 经琼脂糖凝胶甲醛变性电泳鉴定其完整性,通过紫外分光光度计测定 260、280 nm 波长处的吸光度(A),考察 RNA 的纯度与浓度。使用 1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)水调节 RNA 至相同浓度,按照试剂盒说明书进行逆转录、PCR 反应。引物根据文献^[4]获得,由上海生工生物工程公司合成,序列如下,MDR1: 上游引物 5'-GAATCTGGAGGAAGACATGACC-3',下游引物 5'-TCCAATTTTGTACCAATTCC-3'(扩增片段长度:259 bp);MRP1: 上游引物 5'-TCAGCCCTTCTGACAAGCT-3',

下游引物 5'-TCTCTGCTGCAGGAGTCCG-3'(扩增片段长度:318 bp);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH): 上游引物 5'-ACCACCATGGAGAAGGCTGG-3',下游引物 5'-CT-CAGTGTAGCCCAGGATGC-3'(扩增片段长度:527 bp)。

2.6 检测耐药相关蛋白表达

采用蛋白质印迹(Western blot)法,取“2.3”项下 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱作用 24 h 后的细胞和空白对照组的细胞,用 0.9% 氯化钠溶液(生理盐水)清洗 3 次,加入适量预冷的细胞裂解液冰浴裂解 30 min,移至 1.5 ml EP 管中,4 °C 下 10 000×g 离心 20 min,吸取上清液至新的 EP 管中,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白经聚丙烯酰胺凝胶(PAGE,4% 浓缩胶、10% 分离胶)80 V 下电泳 3 h 后,电转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入相应 MDR1、MRP1 和 p-JNK 抗体,4 °C 孵育过夜,用 TBST 缓冲液洗膜 6 次后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5 000),室温孵育 30~45 min,TBST 缓冲液洗膜 6 次后与 ECL 化学发光试剂显色 1~2 min,曝光 X 胶片。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,考察目的条带与内参条带灰度比值。

2.7 检测 AP-1 活性

取“2.3”项下 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱作用 24 h 后的细胞和空白对照组细胞,将 1 μg AP-1 荧光报告质粒以及 0.02 μg 海肾荧光素酶对照质粒转染进入空白对照组、5 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱组细胞,24 h 后按照双荧光素酶报告试验盒说明书考察细胞目的基因荧光强度与对照质粒荧光强度比值。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对 *t* 检验。每组试验均重复 3 次, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞的增殖作用

CNE2/DDP 细胞经异长春花碱作用后,随着异长春花碱剂量的增加,增殖抑制作用明显增加,其中 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞的增殖抑制率分别为 4.3%、12.6%,即分别为无毒浓度(增殖抑制率 < 5%)和低毒浓度(增殖抑制率 < 15%)^[6],故采用上述两种浓度进行下述实验。异长春花碱对 CNE2/DDP 细胞增殖的抑制作用见图 1。

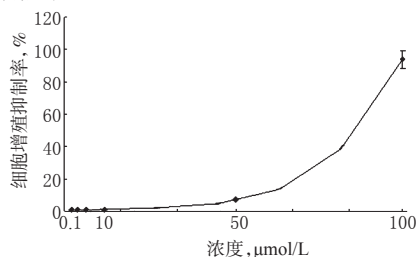


图 1 异长春花碱对 CNE2/DDP 细胞增殖的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of vinorelbine on the proliferation of CNE2/DDP cell line

3.2 细胞耐 DDP 的逆转作用

经 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱作用后,CNE2/DDP 细胞对 DDP 的敏感性显著升高,IC₅₀ 分别为 38.2、12.8 $\mu\text{mol/L}$,RF 分别为 2.81 和 8.38 ($P < 0.05$),表明异长春花碱可提高 CNE2/DDP 细胞对 DDP 的药物敏感性。

3.3 细胞中罗丹明 123 的含量

空白对照组细胞中罗丹明 123 的荧光强度为 342,5、10

μmol/L 异长春花碱作用后细胞中罗丹明 123 的荧光强度分别为 739、954。与空白对照组比较, 5、10 μmol/L 异长春花碱作用后 CNE2/DDP 细胞中罗丹明 123 的荧光强度分别提高了 2.16 倍和 2.79 倍 ($P < 0.05$), 说明异长春花碱可提高细胞中药物的蓄积。

3.4 细胞耐药相关基因 mRNA 表达

提取的细胞样品于紫外分光光度计上测总 RNA 质量浓度为 1.15~1.25 μg/μl, A_{260}/A_{280} 比值均为 1.8~2.0, 表明 RNA 浓度及纯度符合试验要求。以 GAPDH 为内参, 检测结果显示, 5、10 μmol/L 异长春花碱作用后 CNE2/DDP 细胞中 MDR1 mRNA 表达分别是空白对照组的 34.1% 和 11.6% (与空白对照组比较: $P < 0.05$), MRP1 mRNA 表达分别是空白对照组的 45.8% 和 21.4% (与空白对照组比较: $P < 0.05$)。

3.5 细胞耐药相关蛋白表达

空白对照组细胞中 MDR1、MRP1、p-JNK 蛋白表达均为 100%, 5 μmol/L 异长春花碱作用后 CNE2/DDP 细胞中 MDR1、MRP1、p-JNK 蛋白表达分别为 13.1%、12.8%、44.8%, 10 μmol/L 异长春花碱作用后 CNE2/DDP 细胞中 MDR1、MRP1、p-JNK 蛋白表达分别为 3.8%、7.1%、4.9%。与空白对照组比较, 5、10 μmol/L 异长春花碱作用后 CNE2/DDP 细胞中 MDR1、MRP1、p-JNK 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。异长春花碱作用后 CNE2/DDP 细胞耐药相关基因蛋白表达的电泳图见图 2。

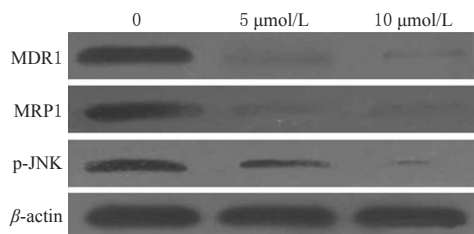


图 2 不同浓度异长春花碱对 CNE2/DDP 细胞耐药相关基因蛋白表达的影响

Fig 2 Effect of different concentrations of vinorelbine on protein expression of drug-resistance relative gene in CNE2/DDP cell line

3.6 AP-1 活性变化

空白对照组细胞中 AP-1 的荧光强度为 232.4, 5、10 μmol/L 异长春花碱作用后细胞内 AP-1 的荧光强度分别为 146.9、73.7, 表明 5、10 μmol/L 异长春花碱作用后 CNE2/DDP 细胞中 AP-1 的荧光强度分别是空白对照组的 63.2% 和 31.7% (与空白对照组比较: $P < 0.05$), 提示异长春花碱抑制了 AP-1 转录因子的活化。

4 讨论

鼻咽癌是我国发病率较高的癌症之一, 但单纯放射治疗鼻咽癌的 5 年生存率仅 50% 左右, 而晚期鼻咽癌 (Ⅲ、Ⅳ期) 的 5 年生存率更低, 约 10%~40%^[6]。化疗是治疗中晚期鼻咽癌的主要辅助手段, 但 MDR 的发生往往导致化疗效果欠佳。因此寻找 MDR 逆转剂成为抗肿瘤研究的一个热点。

肿瘤细胞 MDR 的形成是一个复杂的、多因素参与的过程, 其机制主要有药物外排增加、药物代谢酶活性的变化、DNA 损伤修复能力增强及药物亲和力改变等, 其中药物转运蛋白活性增强导致的药物外排是肿瘤细胞产生 MDR 的一个重要原因。这些转运蛋白包括 MDR1 编码的 P 糖蛋白、MRP、肺耐药蛋白 (LRP) 和乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 等, 其通过 ATP 提供能量, 将细胞毒类药物泵出细胞外, 降低细胞内药物浓

度, 从而使细胞产生对多种药物的耐药性。因此, 抑制肿瘤细胞耐药相关基因表达成为逆转 MDR 的主要手段之一^[7-8]。

转录因子 AP-1 由 c-Jun 和 c-Fos 两个亚单位构成, 参与众多信号通路。AP-1 可通过促进细胞增殖、抑制分化、抑制凋亡、促进肿瘤细胞的侵袭和转移等在肿瘤形成及发展过程中发挥重要作用。同时, AP-1 可以结合 MDR1^[9]、MRP1^[10] 基因启动子区的 AP-1 结合位点, 促进 MDR1 的转录、翻译表达, 从而导致肿瘤细胞耐药。本研究通过蛋白质印迹法和双荧光素酶报告检测发现, 异长春花碱可抑制 p-JNK 的表达, 降低 AP-1 的活性, 从而进一步下调 MDR1 表达, 逆转肿瘤细胞的 MDR。

综上所述, 异长春花碱可降低 MDR1 和 MRP1 表达, 提高肿瘤细胞内药物浓度, 从而提高 CNE2/DDP 细胞对 DDP 的药物敏感性、逆转细胞的 MDR, 其机制可能与抑制 JNK 磷酸化、下调 AP-1 活性有关。本研究结果为逆转鼻咽癌耐药细胞 MDR 的临床应用提供了试验基础, 但异长春花碱对癌细胞 MDR 的逆转的作用机制还有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Xu ZJ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Nasopharyngeal carcinoma incidence and mortality in China in 2009[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(8): 453.
- [2] Mi YJ, Liang YJ, Huang HB, et al. Apatinib (YN968D1) reverses multidrug resistance by inhibiting the efflux function of multiple ATP-binding cassette transporters[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 7 981.
- [3] 崔秀英, 郭运杰, 姚和瑞. 耐药乳腺癌细胞株 MCF-7/ADR 中 microRNA 的分析[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(10): 1 813.
- [4] Tang K, Lin Y, Li LM. The role of phenethyl isothiocyanate on bladder cancer ADM resistance reversal and its molecular mechanism[J]. *Anat Rec: Hoboken*, 2013, 296(6): 899.
- [5] Ji Z, Long H, Hu Y, et al. Expression of MDR1, HIF-1α and MRP1 in sacral chordoma and chordoma cell line CM-319[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010(29): 158.
- [6] Chen C, Wang F, Wang Z, et al. Polymorphisms in ER-CC1 C8092A predict progression-free survival in metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma treated with cisplatin-based chemotherapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(2): 315.
- [7] 杜承润, 应红梅. 鼻咽癌中 P 糖蛋白和多药耐药相关蛋白-1 的研究现状及其应用[J]. *复旦学报: 医学版*, 2011, 38(6): 569.
- [8] 文柳静. 羟喜树碱冻干粉针和纳米制剂在原位肝肿瘤小鼠的组织分布研究[J]. *西北药学杂志*, 2011, 26(1): 40.
- [9] Daschner PJ, Ciolino HP, Plouzek CA, et al. Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 53(3): 229.
- [10] Kurz EU, Cole SP, Deeley RG. Identification of DNA-protein interactions in the 5' flanking and 5' untranslated regions of the human multidrug resistance protein (MRP1) gene: evaluation of a putative antioxidant response element/AP-1 binding site[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(4): 981.

(收稿日期: 2013-03-12 修回日期: 2013-05-06)