



P糖蛋白功能抑制对耐药肿瘤细胞MCF-7/Adr放射敏感性的影响

近年研究表明, P糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是产生肿瘤多药耐药 (multidrug-resistance, MDR) 的主要因素。P-gp是一种相对分子质量为170 000的跨膜蛋白, 具有能量依赖的药物外流泵功能。目前, 人们已普遍认为, P-gp表达可上调肿瘤细胞的耐药性, 随着对P-gp认识的不断深入, 又逐步发现P-gp可能直接或间接地参与着细胞的分子代谢、增殖、分化等方面的调控, 揭示P-gp可能具有潜在的多种生理功能 [1], 并可能参与肿瘤的放射抵抗表型的形成 [2]。

本研究以适量X射线诱导细胞凋亡条件, 运用药物维拉帕米抑制MCF-7/Adr耐药细胞P-gp功能, 观察了耐药细胞对X射线敏感性的变化, 并初步探讨了产生这种变化的可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株和材料

乳腺癌MCF-7/Adr耐药细胞株购自中国医学科学院生物技术研究所, 经过阿霉素(Adr)加压克隆筛选, 其对阿霉素的耐药性是MCF-7敏感细胞株的1 000倍, 其P-gp的表达明显高于 MCF-7敏感细胞株 [3]; RPMI-1640细胞培养基、无菌小牛血清均购自Hyclone公司; 0.25%胰蛋白酶、维拉帕米(Verapamil)、罗丹明123 (Rhodamine 123) 均购自Sigma公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒 购自法国Biovision公司; 6孔细胞培养板购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养

MCF-7/Adr细胞株用含10%小牛血清的RPMI-1640细胞培养基, 常规37 °C、95%空气、5% CO₂培养箱中培养; 0.25%胰酶和0.02%依地酸钠1:1(V:V)液消化传代。

1.3 X射线照射

MCF-7/Adr细胞按 1×10^6 /ml接种于6孔细胞培养板, 5 ml/孔, 待细胞贴壁并呈对数生长期, 弃上清, 加入0.01 mol/L PBS 5 ml/孔, 在美国瓦利安2 300 C/D直线加速器下照射, 剂量率为500 cGy/min, 距靶源100 cm, 射野大小为20 cm×30 cm, 吸收剂量率是5.0 Gy [4]。辐射后去上清, 加入细胞培养液 5 ml/孔。

1.4 P-gp功能抑制

将辐射后的实验细胞随机分为两组, (1)抑制组 [5]: 加入终浓度为5 μmol/L的维拉帕米抑制P-gp功能; (2)对照组: 不加药。细胞在照射和加药处理后仍放回培养箱中培养。

1.5 细胞凋亡检测

实验参照文献方法 [5]。分别在X射线照射和并经加药处理后6、12、24 h收集细胞, 使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒, 按试剂盒说明书进行实验操作。每管取细胞悬液500 μl, 以美国Coulter Elite流式细胞仪检测细胞凋亡率(发射光为氩离子激光器激发, 激发波长488 nm), 每管测定10 000个细胞。

1.6 细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)检测

实验分组、细胞处理同细胞凋亡检测。参照 Ushmorov [6]的方法, 分别在X线照射和经加药处理后6、12、24 h收集细胞, 加入0.01 mol/L PBS配制的Rhodamine 123溶液, 使细胞悬液的Rhodamine 终浓度为26 $\mu\text{mol/L}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, 以0.01 mol/L PBS轻洗二次, PBS重悬细胞, FCM检测细胞线粒体膜电位平均荧光强度值。

1.7 统计方法

采用SPSS10.0统计软件包, 单独效应用两样本t检验和单向方差分析处理, 主效应和交互效应用析因分析处理。

2 结果

2.1 细胞凋亡检测结果

在X射线照射后6、12、24 h, 抑制组各时间点的细胞凋亡率均显著高于对照组($P<0.01$, 表1)。以X射线照射后24 h细胞凋亡率最高($F=47.870$, $P=0.000$)。P-gp功能抑制方法与X射线照射后时间点两个因素无交互效应($F=0.650$, $P=0.539$)。

表1 X射线照射后6、12、24 h两组的细胞凋亡率 ($n=3$, %, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Apoptosis rate of verapamil-treated and untreated cells 6, 12 and 24 h after X-ray exposure ($n=3$, %, $Mean\pm SD$)

Group	Time			Total	F value	P value
	6 h	12 h	24 h			
Verapamil	25.53 \pm 2.85	30.43 \pm 2.21	39.03 \pm 2.60 ^{▲△}	31.67 \pm 6.32	21.240	0.002
Control	16.13 \pm 1.16	21.73 \pm 1.31 [▲]	27.53 \pm 2.56 ^{▲△}	21.80 \pm 5.17	30.494	0.001
Total	20.83 \pm 5.50	26.08 \pm 5.03 [▲]	33.28 \pm 6.70 ^{▲△}	26.73 \pm 7.56	47.870*	0.000*
t/F value	5.286	5.863	5.465	89.465*	F=0.650 [#]	P=0.539 [#]
P value	0.006	0.004	0.005	0.000*		

*F value and P value of main effect; #F value and P value of interactive; [▲] $P<0.05$ vs 6 h; [△] $P<0.05$ vs 12 h

2.2 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)检测结果

在X射线照射后6、12、24 h, 抑制组各时间点的细胞线粒体膜电位平均荧光强度值均显著高于对照组($P<0.01$, 表2)。以X射线照射后12 h平均荧光强度值最高($F=74.485$, $P=0.000$)。P-gp功能抑制方法与X射线照射后时间点两个因素有交互效应($F=5.685$, $P=0.018$)。

表 2 X 射线照射后 6、12、24 h 两组的细胞线粒体膜电位平均荧光强度值 ($n=3, \bar{x}\pm s$)Tab.2 Mean fluorescence intensity of the mitochondrial membrane potential of verapamil-treated and untreated cells 6, 12 and 24 h after X-ray exposure ($n=3, Mean\pm SD$)

Group	Time			Total	F value	P value
	6 h	12 h	24 h			
Verapamil	75.27±4.90	96.47±5.59 [▲]	57.77±2.55 ^{▲△}	76.50±17.24	54.703	0.000
Control	54.17±4.05	62.30±5.93	39.53±2.65 ^{▲△}	52.00±10.63	22.854	0.002
Total	64.72±12.24	79.38±19.35 [▲]	48.65±10.25 ^{▲△}	64.25±18.76	74.485*	0.000*
t/F value	5.751	7.624	8.574	141.907*	F=5.685 [#]	P=0.018 [#]
P value	0.005	0.002	0.001	0.000*		

* F value and P value of main effect; [#]F value and P value of interactive; [▲]P<0.05 vs 6 h; [△]P<0.05 vs 12 h

3 讨论

目前, 研究发现, 通过mdr1基因水平上的逆转、运用P-gp的单克隆抗体阻断或运用钙通道阻滞剂如维拉帕米阻断均可抑制P-gp功能。Gollapud [7]报道用抗P-gp单抗阻断P-gp功能可诱导外周血单核细胞的细胞凋亡; Notarbartolo [8]等用P-gp功能抑制剂维拉帕米部分逆转了阿霉素诱导的细胞凋亡的耐受性, 说明P-gp对细胞凋亡可能具有负调控作用。Canton [9]观察到P-gp高表达的肿瘤细胞能明显减轻紫外线的杀伤作用; 而Ruth [10]将mdr1 CDNA 转染NTH 3T3肿瘤细胞使他们过度表达P-gp, 结果发现 γ 射线诱导的细胞凋亡效应显著下调。

本实验中MCF-7/Adr细胞的P-gp功能受到维拉帕米的抑制后, 各时间点细胞凋亡率均显著高于对照组, 表明抑制MCF-7/Adr耐药细胞P-gp功能上调了X射线照射后的细胞凋亡率。提示P-gp可能呈递了肿瘤细胞对X射线的抵抗机制。

细胞凋亡可以被多种生理、病理性刺激所诱发, 是细胞对所处环境中某些特定信息的一种应答反应。目前X射线诱导细胞凋亡的分子生化执行程序已基本明确: 细胞在X射线的照射下, 线粒体发生肿胀, 其外膜膜电位降低, 膜通透性转变孔(MPTP)的开放增强, 使线粒体内细胞色素C(Cyt-c)、凋亡诱导因子(AIF)等凋亡因子释放到胞质中, 而MPTP的开放又有一个自我放大的过程, 从而开始并加速了细胞凋亡的进程 [11]。正常的线粒体膜电位是细胞生存所必需的, 线粒体的去极化在细胞凋亡中起的重要作用, 提示封闭P-gp功能, 可能是作用于膜电位水平而上调了X射线诱导的细胞凋亡。

本实验中抑制组各时间点细胞线粒体膜电位平均荧光强度值均显著高于对照组, 表明抑制MCF-7/Adr耐药细胞P-gp功能上调了X射线照射后的细胞线粒体膜电位平均荧光强度值, 结果使细胞线粒体膜电位下降。这也与抑制MCF-7/Adr细胞P-gp功能上调了X射线照射后的细胞凋亡率实验结果一致。

另外, X线照射后24 h细胞凋亡率最高, 照射后12 h细胞线粒体膜电位平均荧光强度值最高, 细胞线粒体膜电位变化的峰值早于细胞凋亡率变化的峰值, P-gp功能抑制方法与X射线照射后时间点两个因素对细胞线粒体膜电位平均荧光强度值有交互效应。这些都进一步证实线粒体的去极化开始了细胞凋亡程序 [11]。而细胞P-gp功能抑制, 使线粒体膜电位下降, 导致线粒体膜通透性加大, 揭示P-gp可能通过调控线粒体膜通透性而调节X射线诱导的凋亡效应。P-gp功能抑制方法与X射线照射后时间点两个因素对细胞凋亡率无交互效应, 可能是因为P-gp功能抑制剂Verapamil部分参与细胞凋亡的分子生化程序[8]所致。

由于抑制P-gp功能, 显著增加了X射线诱导的细胞凋亡, 而中小剂量X射线对肿瘤细胞的杀伤作用主要是

通过其诱导的细胞凋亡产生的, 所以, 抑制P-gp功能, 明显上调了肿瘤细胞对X射线的放射敏感性。我们推测P-gp呈递细胞凋亡效应的放射抵抗机制与它具有的外流泵功能密切相关, P-gp不但可以将胞浆中如阿霉素等药物成分泵出胞外, 也可能将Cyt-c、AIF等凋亡因子泵出胞外。封闭P-gp功能的肿瘤细胞, 细胞质中Cyt-c等凋亡因子增加, 其细胞线粒体膜电位因MPTP开放的自我放大过程加强而显著下降, 最终上调了细胞凋亡, 导致耐药细胞对放射线的抵抗。

参考文献:

- [1] Johnstone RW, Ruefli AA, Tainton KM, et al. A role for p-glyco- protein in regulating cell death[J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 38(1-2): 1-11.
- [2] Ruefli AA, Bernhard D, Tainton KM, et al. Suberoylanilide hydro- xamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in p-glycoprotein-expressing cells[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(2): 292-8.
- [3] 袁亚维, 张积仁, 周殿元, 等. Ribozyme 基因对人肿瘤细胞株MCF-7/Adr多药抗药性的靶向逆转[J]. *中华医学杂志*, 1997, 77(7): 494-6.
- Yuan YW, Zhang JR, Zhou DY, et al. The reversion of multidrug resistance in tumor cell line MCF-7/Adr by ribozyme[J]. *Natl Med J Chin*, 1997, 77(7): 494-6.
- [4] Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C. Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability[J]. *Radiat Res*, 2002, 157(4): 365-70.
- [5] Liu ZL, Onda K, Tanaka S, et al. Induction of multidrug resistance in MOLT-4 cells by anticancer agents is closely related to increased expression of functional p-glycoprotein and MDR1 mRNA[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 49(5): 391-7.
- [6] Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid de- gradation and cytochrome c release[J]. *Blood*, 1999, 93(7): 2342-52.
- [7] Gollapud S, Gupda S. Anti-p- glycoprotein antibody-induced apop- tosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of p- glycoprotein in lymphocyte survival [J]. *J Clin Immunol*, 2001, 21(6): 420-30.
- [8] Notarbartolo M, Cervello M, Dusonchet L, et al. Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of p-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP(inhibitory of apoptosis proteins)[J]. *Cancer Lett*, 2002, 180(1): 91-101.
- [9] Canton M, Caffieri D, Dall F, et al. PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permea- bility transition pore[J]. *FEBS Lett*, 2002, 522(1-3): 168-72.
- [10] Ruth AC, Roninson IB. Effects of the multidrug transporter p-glyco- protein on cellular responses to ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2576-78.
- [11] Ogawa Y, Nishioka A, Kobayashi T, et al. Radiation-induced apop- tosis of human peripheral T cells: analyses with cDNA expression arrays and mitochondrial membrane potential assay[J]. *Int Mol Med*, 2001, 7(6): 603-7.

参考文献:

- [1] Johnstone RW, Ruefli AA, Tainton KM, et al. A role for p-glyco- protein in regulating cell death[J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 38(1-2): 1-11.
- [2] Ruefli AA, Bernhard D, Tainton KM, et al. Suberoylanilide hydro- xamic acid

(SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in p-glycoprotein-expressing cells[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(2): 292-8.

[3] 袁亚维, 张积仁, 周殿元, 等. Ribozyme 基因对人肿瘤细胞株MCF-7/Adr多药抗药性的靶向逆转[J]. *中华医学杂志*, 1997, 77(7): 494-6.

Yuan YW, Zhang JR, Zhou DY, et al. The reversion of multidrug resistance in tumor cell line MCF-7/Adr by ribozyme[J]. *Natl Med J Chin*, 1997, 77(7): 494-6.

[4] Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C. Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability[J]. *Radiat Res*, 2002, 157(4): 365-70.

[5] Liu ZL, Onda K, Tanaka S, et al. Induction of multidrug resistance in MOLT-4 cells by anticancer agents is closely related to increased expression of functional p-glycoprotein and MDR1 mRNA[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 49(5): 391-7.

[6] Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid de-gradation and cytochrome c release[J]. *Blood*, 1999, 93(7): 2342-52.

[7] Gollapud S, Gupda S. Anti-p-glycoprotein antibody-induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of p-glycoprotein in lymphocyte survival [J]. *J Clin Immunol*, 2001, 21(6): 420-30.

[8] Notarbartolo M, Cervello M, Dusonchet L, et al. Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of p-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP(inhibitory of apoptosis proteins)[J]. *Cancer Lett*, 2002, 180(1): 91-101.

[9] Canton M, Caffieri D, Dall F, et al. PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore[J]. *FEBS Lett*, 2002, 522(1-3): 168-72.

[10] Ruth AC, Roninson IB. Effects of the multidrug transporter p-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2576-78.

[11] Ogawa Y, Nishioka A, Kobayashi T, et al. Radiation-induced apoptosis of human peripheral T cells: analyses with cDNA expression arrays and mitochondrial membrane potential assay[J]. *Int Mol Med*, 2001, 7(6): 603-7.