

三氧化二砷对胃癌细胞 SGC7901 多药耐药的逆转作用及其机制

薛英威^{1*}, 韩继广¹, 李宝馨², 杨宝锋²

(1. 哈尔滨医科大学 附属第三医院 腹外二科, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨医科大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 研究三氧化二砷 (arsenic trioxide, As₂O₃) 对胃癌细胞多药耐药的逆转作用及其机制。逐渐递增长春新碱 (VCR) 的浓度诱导胃癌细胞株 SGC7901 产生多药耐药性 (SGC7901/VCR)。MTT 法测定药物对肿瘤细胞的杀伤作用; Western blotting 检测肿瘤细胞内 P-糖蛋白 (P-gp)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST-s) 表达。结果表明, 胃癌 SGC7901/VCR 细胞对长春新碱 (VCR)、5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 及表阿霉素的耐药倍数分别为 16.56 倍、2.69 倍及 13.05 倍。经 As₂O₃ 预处理 24 h 后, 长春新碱、5-氟尿嘧啶及表阿霉素对 SGC7901/VCR 的耐药倍数显著下降 ($P < 0.05$)。SGC7901/VCR 在静息时细胞内 P-gp、GST-s 蛋白表达显著高于 SGC7901。而 As₂O₃ 可使 SGC7901/VCR 细胞内 P-gp、GST-s 蛋白表达显著下降, 但是对 SGC7901 无明显作用。从而证实 As₂O₃ 部分逆转 SGC7901/VCR 的耐药性, 其机制可能与 P-gp、GST-s 蛋白表达降低有关。

关键词: 胃癌; 多药耐药; 三氧化二砷

中图分类号: R963; R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)09 - 0949 - 05

Reversal effect and mechanism of arsenic trioxide on multidrug resistance of gastric carcinoma cells SGC7901

XUE Ying-wei^{1*}, HAN Ji-guang¹, LI Bao-xin², YANG Bao-feng²

(1. Abdominal Surgery, Third Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, China;

2. College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: The purpose of this study is to investigate the reversal effect and its mechanism of arsenic trioxide (As₂O₃) on multidrug resistance of gastric carcinoma cells. The concentration of vincristine (VCR) increased gradually to induce the drug resistance of gastric carcinoma cell SGC7901. MTT assay was used to determine the lethal effect of anticarcinogens on tumor cells and Western blotting assay was applied to determine the expression of P-glycoprotein (P-gp) and glutathione S-transferase (GST-s) in tumor cells. As a result, the resistance of SGC7901/VCR cells to VCR, fluorouracil and epirubicin was 16.56, 2.69 and 13.05 times, respectively, more than that of SGC7901 cells. After 24 h precondition with As₂O₃, RI of vincristine, fluorouracil and epirubicin decreased significantly ($P < 0.05$). Expression of P-gp and GST-s in resting SGC7901/VCR cells was significantly higher than that in carcinogen-sensitive SGC7901 cells. As₂O₃ decreased the expression of P-gp and GST-s in SGC7901/VCR cells significantly, while it showed no significant effect on carcinogen-sensitive SGC7901 cells. The result suggested that As₂O₃ could partly reverse drug resistance of SGC7901/VCR cells by probably the mechanism of decreasing the expression of P-gp and GST-s.

Key words: gastric carcinoma; multidrug resistance; arsenic trioxide

胃癌是我国恶性肿瘤中发病率和死亡率较高的

肿瘤之一, 胃癌化疗迄今仍是重要的临床治疗方法。然而多数患者化疗失败, 其主要原因就是肿瘤产生了多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)。多药耐药是指肿瘤细胞对结构与作用机制不同的多种药物

收稿日期: 2006-12-29.

* 通讯作者 Tel: 86 - 451 - 86298309,

E-mail: xyw801@163.com

产生的交叉耐药现象。胃癌的化疗敏感性非常低。研究表明,三氧化二砷(As_2O_3)对多种实体肿瘤有诱导凋亡作用^[1],而且对肺癌等肿瘤还有一定的耐药逆转作用,但是在胃癌方面罕有相关报道。如果 As_2O_3 能有效地逆转胃癌多药耐药,则会提高临床化疗效果,降低胃癌死亡率。本研究通过诱导胃癌细胞耐药,建立体外耐药模型,观察 As_2O_3 的耐药逆转作用,为进一步研究 As_2O_3 对胃癌的治疗作用提供依据。

材料与方法

试剂及抗癌药 胃癌细胞系 SGC7901(黑龙江省肿瘤研究所提供),优质胎牛血清(Hyclone公司产品),胰蛋白酶、表阿霉素(浙江海正药业股份有限公司);三氧化二砷(As_2O_3 ,哈尔滨伊达药业);长春新碱、5-氟尿嘧啶、Western blotting试剂盒(二抗为羊抗鼠)抗 P-gp、抗 GST-s(鼠抗人抗体)及 RPMI 1640均为 Gibco公司产品。

耐药细胞株的建立 敏感细胞株胃癌 SGC7901间断与长春新碱相互作用,加入较低剂量长春新碱(VCR) 24 h后,洗涤,加入正常培养液继续培养,待生长良好后,递增剂量加入长春新碱,依此类推: $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\xrightarrow{5\text{次}}$ $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\xrightarrow{5\text{次}}$ $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\xrightarrow{5\text{次}}$ 维持在含有 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ VCR的培养基中,生长良好,传代稳定,即获得耐药的胃癌 SGC7901细胞株,即 SGC7901/VCR, 7个月传 42代。

细胞生物学特性 倒置显微镜观察细胞形态、核浆比例及核仁等。细胞倍增时间: 24孔培养板,加入细胞 5×10^4 孔,每天取 3孔细胞计数,共 8 d,计算细胞生长倍增时间。

MTT法体外药物敏感实验 在 96孔板中,接种细胞 2×10^4 孔。培养过夜后,加入不同浓度的药物,每个浓度设 3个复孔,48 h后加入噻唑蓝(MTT) 15 μL 。37 $^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,弃上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 150 μL ,振荡溶解 10 min,全自动酶标仪测定每孔 $A_{560 \text{ nm}}$ 值,重复 3次实验,计算生长率:处理组 $A_{560 \text{ nm}}$ / 对照组 $A_{560 \text{ nm}}$ 。绘制药浓度-生长率曲线,确定细胞 50%存活的药物浓度(IC_{50})。耐药指数(RI): $IC_{50}(\text{SGC7901/VCR}) / IC_{50}(\text{SGC7901})$ 。

按照上述方法分别计算长春新碱、5-氟尿嘧啶和表阿霉素对两细胞系 SGC7901/VCR及 SGC7901

的 IC_{50} 和 RI。同法计算 As_2O_3 的非毒性剂量 IC_{98} 和低毒性剂量 IC_{95} 。

在 SGC7901/VCR中加入 As_2O_3 ,浓度分别为 IC_{98} 和 IC_{95} 。培养 24 h后,接种于 96孔板,MTT法分别测定长春新碱、5-氟尿嘧啶和表阿霉素对细胞系 SGC7901/VCR的 IC_{50} 和 RI。并计算耐药逆转倍数 RI/RI' 。

细胞总蛋白的提取 以 SGC7901为对照组,SGC7901/VCR为试验组,将浓度为 IC_{98} 的 As_2O_3 加入 SGC7901/VCR培养 24 h为干预组。在细胞融合生长约 90%时,用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS将细胞轻洗 2次,弃净 PBS;加入 $1 \times$ SDS上样缓冲液 200 μL 使细胞充分裂解,将裂解液置于 1.5 mL Ep管中,超声破碎细胞 30 min,常温 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心约 10 min;将上清液移至新的 1.5 mL Ep管中 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

Western blotting检测 P-gp及 GST-s蛋白的表达

蛋白浓缩 将透析袋置于 PGE 8000中,分别取各组细胞总蛋白液各 5 mL,小心置于透析袋中,透析至液体体积为 500 μL 时(即浓缩 10倍),立即回收至新的 Ep管中。

Western blotting检测 以 SGC7901为对照组,检测 SGC7901/VCR在 As_2O_3 作用前后 P-gp及 GST-s蛋白的表达量。分别取上述蛋白浓缩液 500 μL 与等体积 $1 \times$ 上样缓冲液($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 6.8, $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴酚蓝, $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油)混匀, $100 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min变性,冷却后取 200 μL 上样于 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS-PAGE电泳胶进行电泳分离,然后电转移至硝酸纤维素膜,含 5%(w/v)脱脂奶粉的 PBS $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 1~2 h封闭 NC膜,加入 1%一抗室温孵育过夜, PBS洗涤膜 3次后用 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)洗涤 1次,然后加入用 Tris-HCl缓冲液 1:5 000稀释的相应二抗 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 1~2 h;用 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)洗涤 3次,加入含二氨基联苯胺 6 mg、30% H_2O_2 10 μL 的 Tris-HCl ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.6)显色液进行反应,观察当形成的蛋白带颜色深度达到要求时用水漂洗,放入 PBS中保存。实验重复 3次,然后用凝胶图像分析仪分析条带灰度。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较均采用 *t*检验。

结果

1 SGC7901/VCR细胞的光镜下形态

SGC7901/VCR细胞体积较大,贴壁生长,形态不规则,多边形,核大,核仁多个,细胞铺满瓶底后有重叠现象,核浆比例略增大,胞浆内可见颗粒。HE染色见细胞核大,核仁多个,分裂相多见。偶有细胞巨大,内含多个细胞核,传代后不能贴壁,无增殖能力。

2 SGC7901/VCR细胞的生长情况

观察 SGC7901/VCR细胞,在培养的第4天分裂指数最高,为27%。传代后24 h起细胞数量开始上升,第7天达最高点,倍增时间约为54 h。细胞生长曲线如图1。

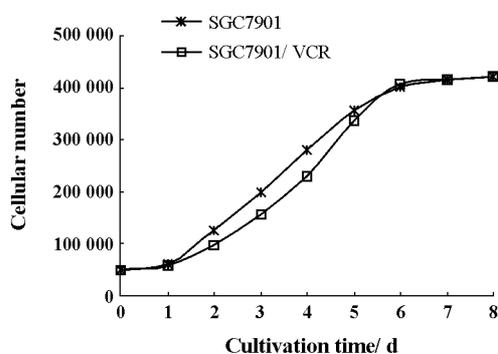


Figure 1 Cellular growth curve of SGC7901/VCR and SGC7901

3 MTT法对耐药细胞进行细胞毒测定

以敏感细胞 SGC7901 为对照,结果 SGC7901/VCR除对长春新碱耐受外,对5-氟尿嘧啶和表阿霉素均呈交叉耐药,生长曲线见图2。这符合肿瘤细胞的多药耐药性,经计算长春新碱、5-氟尿嘧啶和表阿霉素的耐药倍数分别为16.56倍、2.69倍和13.05倍(表1)。

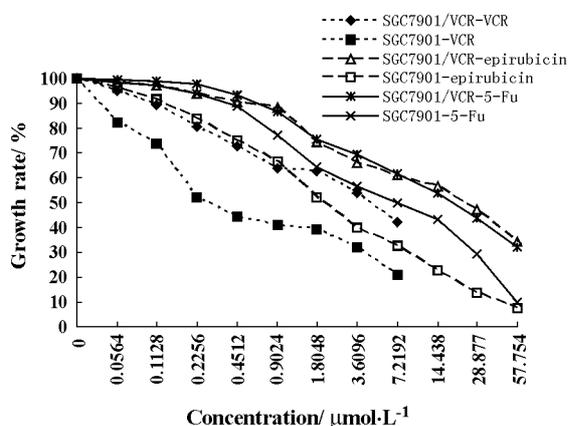


Figure 2 Growth curve of SGC7901/VCR and SGC7901 in VCR, epirubicin, and 5-Fu

Table 1 Comparison of IC_{50} in drug-resistance and parental cell line SGC7901 and SGC7901/VCR

Group	$IC_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		R1
	SGC7901	SGC7901/VCR	
VCR	0.295 ± 0.057	$4.885 \pm 0.086^{**}$	16.56
5-Fu	7.101 ± 0.092	$19.102 \pm 0.183^{**}$	2.69
Epirubicin	1.851 ± 0.013	$24.162 \pm 0.131^*$	13.05

$\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SGC7901 group

4 MTT法观察 As_2O_3 对胃癌耐药细胞的逆转作用

As_2O_3 作用于 SGC7901 的 IC_{98} 和 IC_{95} 分别为 0.05 及 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图3)。SGC7901/VCR 经这两种浓度的 As_2O_3 作用后,其对长春新碱、5-氟尿嘧啶及表阿霉素的耐药倍数明显降低(表2)。由此可以计算出 $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} As_2O_3$ 对 SGC7901/VCR 对长春新碱、5-氟尿嘧啶及表阿霉素的耐药逆转倍数的影响分别为 1.62 倍 ($16.56/10.22$)、1.32 倍 ($2.69/2.04$) 及 1.83 倍 ($13.05/7.14$); $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} As_2O_3$ 对其逆转耐药逆转的倍数的影响分别为 2.09 倍 ($16.56/7.91$)、1.95 倍 ($2.69/1.38$) 及 2.09 倍 ($13.05/6.25$)。

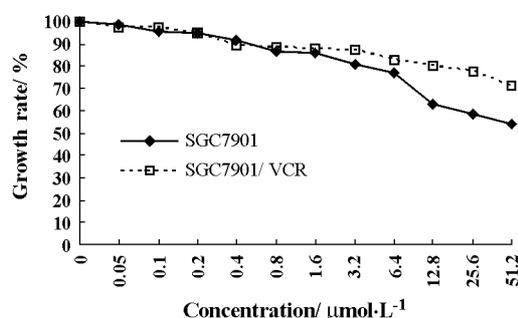


Figure 3 Effect of As_2O_3 on growth curve of SGC7901 and SGC7901/VCR

5 Western blotting检测 As_2O_3 逆转前后 P-gp 和 GST-s 蛋白的表达

SGC7901/VCR 组及 As_2O_3 ($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 SGC7901/VCR 组的 P-gp 及 GST-s 蛋白的表达均明显强于 SGC7901 组;而 As_2O_3 预处理 SGC7901/VCR 组的 P-gp 蛋白表达又明显低于 SGC7901/VCR 组(图4),其灰度值约为后者的 0.554 倍, GST-s 蛋白表达也明显低于 SGC7901/VCR 组(图5),其灰度值约为后者的 0.443 倍。由此可见,在 As_2O_3 作用后 SGC7901/VCR 的 P-gp 及 GST-s 蛋白的表达明显降低。

Table 2 Comparison of IC₅₀ in SGC7901 and SGC7901 /VCR treated with As₂O₃

Group	IC ₅₀ / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			RI	
	SGC7901	SGC/V + As0.05	SGC/V + As0.1	SGC/V + As0.05	SGC/V + As0.1
VCR	0.295 ± 0.057	3.015 ± 0.096 [*]	2.333 ± 0.104 [*]	10.22	7.91
5-Fu	7.101 ± 0.092	14.486 ± 0.123 [*]	9.799 ± 0.117 [*]	2.04	1.38
Epinubicin	1.851 ± 0.013	13.216 ± 0.106 [*]	11.569 ± 0.994 [*]	7.14	6.25

SGC/V + As0.05: SGC7901 /VCR treated with 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃; SGC/V + As0.1: SGC7901 /VCR treated with 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SGC7901 group

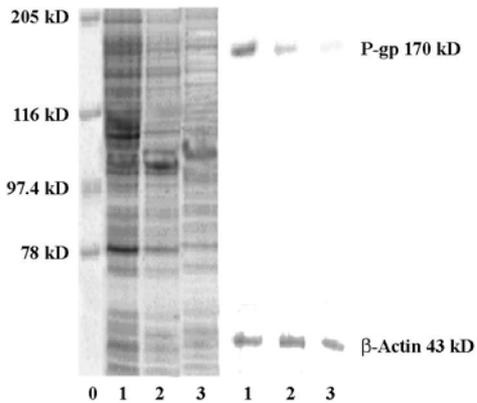


Figure 4 Western blotting analyzes P-gp in SGC7901 /VCR and SGC7901 cells. 0: Marker; 1: SGC7901 /VCR; 2: SGC7901 /VCR treated with 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ for 24 hours; 3: SGC7901

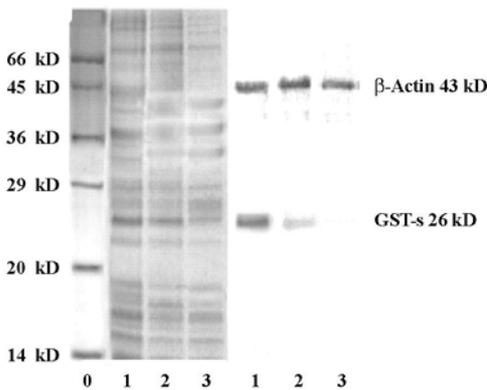


Figure 5 Western blotting analyzes GST-s in SGC7901 /VCR and SGC7901 cells. 0: Marker; 1: SGC7901 /VCR; 2: SGC7901 /VCR treated with 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As₂O₃ for 24 hours; 3: SGC7901

讨论

肿瘤细胞的多药耐药性是肿瘤化疗失败的重要原因之一。多药耐药的机制目前普遍被认为与 P-gp 的表达有关, P-gp 被认为是细胞膜上的一种药物泵, 能将进入细胞内的多种抗肿瘤药物泵出细胞外, 使胞内药物聚积减少, 从而减弱药物的细胞毒作用,

产生耐药性^[2]。其次 GST-s 的表达也与胃癌多药耐药有着密切的关系。GST-s 与细胞株中表达多药耐药表型的细胞株有关。有假说认为在耐药产生的早期阶段 GST-s 比 P-gp 重要, GST-s 与药物非特异性的结合作用可协助药物通过 P-gp 形成的排流泵^[3]。许多研究也表明, GST-s 与肿瘤的发生、发展、转归和预后判断密切相关^[4]。近期研究发现, GST-s 和 P-gp 共表达在耐药中普遍存在, 而且不存在相互制约或促进的关系^[5]。

实验中长春新碱长期间断诱导胃癌细胞 SGC7901 产生耐药性, MTT 法检测其具有多药耐药性, 并且 Western blotting 检测细胞中 P-gp 和 GST-s 过表达, 从而建立胃癌耐药细胞系 SGC7901 /VCR。本实验以中药砒霜的有效成分 As₂O₃ 体外逆转胃癌耐药细胞系 SGC7901 /VCR 的耐药性。结果表明, As₂O₃ 在非细胞毒性剂量下 (0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可显著降低耐药细胞对长春新碱、5-氟尿嘧啶及表阿霉素的 RI 值, 其逆转倍数分别为 1.62 倍、1.32 倍和 1.83 倍。而 As₂O₃ 浓度为 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时其逆转倍数分别为 2.09 倍、1.95 倍和 2.09 倍。说明 As₂O₃ 具有逆转胃癌耐药细胞系 SGC7901 /VCR 多药耐药的作用, 而且伴随浓度增高, 可能其逆转倍数也相应增加。此外, 可能还与化疗药物之间具有一定协同作用。选择何种有效而低毒的 As₂O₃ 剂量配合胃癌化疗还有待进一步研究。

有关 As₂O₃ 的研究, 主要是集中在抗白血病方面的临床工作。目前 As₂O₃ 已成为全世界公认的治疗急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的药物^[6-9]。许多研究者通过不懈的努力, 终于成功证实 As₂O₃ 诱导凋亡的效应也存在于某些实体细胞瘤, 其中也包括胃癌^[10,11]。还有研究认为 As₂O₃ 诱导的细胞死亡可能与离子通道有关, 如 As₂O₃ 能增加 HeLa 细胞的电压依赖性钾电流等^[12]。本研究采用 Western blotting 蛋白印迹方法, 在 As₂O₃ 作用前后检测与胃癌多药耐药相关的蛋白 P-gp 及 GST-s 的表达。结果表明, As₂O₃ 除诱导胃

癌细胞凋亡外,还可逆转胃癌耐药细胞多药耐药。实验中 As_2O_3 大幅降低了胃癌耐药细胞 P-gp 及 GST-s 的表达,这表明 As_2O_3 逆转多药耐药的机制在于降低了耐药蛋白的表达,维持了耐药细胞的化疗敏感性。

总之,关于寻求低毒、高效的 MDR 逆转剂的研究将是一项大量的、长期的工作。 As_2O_3 用于白血病的治疗已显示了其疗效高、副作用小等优越性。对实体肿瘤的化疗,已积累了一定的和必要的实验结果和经验,为将其用于临床打下了一定的基础。关于 As_2O_3 的研究还在继续,新的用途正不断涌现,它也将成为胃癌多药耐药逆转剂研究的一个新课题。

References

- [1] Chan JY, Siu KP, Fung KP. Effect of arsenic trioxide on multidrug resistant hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2006, 236: 250 - 258.
- [2] Su CY. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics and its clinical implications [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 673 - 679.
- [3] Lu Q, Li X, Zhang J, et al. Expression of glutathione S-transferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance-associated protein in neuroblastoma and its clinical significance [J]. *Chin J Pathol (中华病理学杂志)*, 2002, 31: 506 - 509.
- [4] Burg D, Filippov DV, Hemanns R, et al. Peptidomimetic glutathione analogues as novel gammaGT stable GST inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10: 195 - 205.
- [5] Yu DQ, Yi YF. Expression and significance of MRP, GST-pi, Topo IIalpha, and LRP in gastric carcinoma [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 2003, 22: 496 - 499.
- [6] Sun HD, Ma L, Hu XC. The clinical effect of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med (中国中西医结合杂志)*, 1992, 12: 170 - 172.
- [7] Zhang P, Wang SY, Hu LH. Arsenic trioxide in the treatment of 72 cases of acute promyelocytic leukemia [J]. *Chin J Hematol (中华血液学杂志)*, 1996, 16: 58 - 60.
- [8] Lu JM, He HS, Huang DP, et al. Clinical effects of As_2O_3 in previously untreated patients of acute promyelocytic leukemia [J]. *Appl J Gen Pract (实用全科医学)*, 2003, 1: 182 - 183.
- [9] Wang ZG, Rivi R, Delva L, et al. Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML RAR α independent manner [J]. *Blood*, 1998, 92: 1497 - 1504.
- [10] Jiang XH, Wong BC, Yuen ST, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of p53 and activation of caspase-3 [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91: 173 - 179.
- [11] Tu SP, Zhong J, Tan JH, et al. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxy camptothecin in gastric cancer cells *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol (世界胃肠病学杂志)*, 2000, 6: 532 - 539.
- [12] Dong DL, Song WH, Ma PL, et al. Arsenic trioxide-induced HeLa cell death is partially prevented by K^+ channel blockers [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 644 - 648.