

# MIF 对耐 ADM 人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 体内外耐药逆转作用

黄俊辉<sup>1</sup>, 张轶<sup>2</sup>, 黄玉婷<sup>3</sup>, 张曦蓓<sup>3</sup>, 肖佳<sup>3</sup>

(1. 中南大学湘雅医院肿瘤科, 长沙 410008; 2. 湖南省肿瘤医院外科, 长沙 410006; 3. 中南大学湘雅医学院 2006 级研究生班, 长沙 410078)

**[摘要]** 目的: 采用动物体内外结合方法探讨米非司酮(mifepristone, MIF)对耐阿霉素(adriamycin, ADM)人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 耐药逆转作用。方法: 四甲基偶氮唑蓝法检测 5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 对 MCF-7/ADM 体外耐药逆转作用。MCF-7/ADM 接种裸鼠皮下构建裸鼠移植瘤模型, 空白对照组(NS 组)为 0.2 mL 生理盐水腹腔注射 + 0.5 mL 食用油灌胃; ADM 组为 5 mg/kg ADM 腹腔注射 + 0.5 mL 食用油灌胃; MIF 组为 30 mg/kg MIF 灌胃 + 0.2 mL 生理盐水腹腔注射; ADM + MIF 组为 5 mg/kg ADM 腹腔注射 + 30 mg/kg MIF 灌胃。观察各组裸鼠移植瘤情况。结果: (1) 5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 对 MCF-7/ADM 细胞的抑制率小于 5%, 与未用 MIF 组的抑制率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 (2) ADM 对 MCF-7/ADM 细胞的半抑制率为 17.21 mg/L, 而对非耐药乳腺癌细胞 MCF-7 细胞的半抑制率为 0.42 mg/L, ADM 对 MCF-7/ADM 细胞的半抑制率明显高于 MCF-7 的半抑制率( $P < 0.05$ )。 (3) 5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 与 ADM 联合处理 MCF-7/ADM 细胞后, MCF-7/ADM 半抑制率为 1.96 mg/L, 明显低于单用 ADM 组的半抑制率( $P < 0.05$ )。逆转 ADM 耐药倍数为 8.78。 (4) ADM + MIF 组瘤体积 [ $(232.5149 \pm 309.2377) \text{ mm}^3$ ] 均低于 NS 组的瘤体积 [ $(962.2309 \pm 261.1313) \text{ mm}^3$ ] (均  $P < 0.05$ ), 也低于 MIF 组的瘤体积 [ $(778.2846 \pm 42.6919) \text{ mm}^3$ ], 还低于 ADM 组的瘤体积 [ $(508.9648 \pm 16.2609) \text{ mm}^3$ ] (均  $P < 0.05$ )。MIF + ADM 组的瘤质量抑制率为 78.0%。结论: MIF 对耐阿霉素的人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 体内外均有逆转耐药性的作用。

**[关键词]** 米非司酮; 阿霉素; 耐阿霉素人乳腺癌细胞株 MCF-7; 逆转; 多药耐药  
DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.06.007

## Reversal effect of mifepristone on adriamycin resistance in human breast cancer cell line MCF-7/ADM in vitro and in vivo

HUANG Junhui<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, HUANG Yuting<sup>3</sup>, ZHANG Xibe<sup>3</sup>, XIAO Jia<sup>3</sup>

(1. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. Department of Surgery, Tumor Hospital of Hunan, Changsha 410006; 3. Postgraduates of Grade 2006 Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the reversal effect of mifepristone (MIF) on adriamycin (ADM) resistance in human breast cell line MCF-7/ADM in vitro and in vivo. **Methods** The transplantable models of MCF-7 cells resisting against adriamycin were established in nude mice by subcutaneous implantation to observe the reversal effect of MIF in vivo. The mice were randomly divided into 4 groups: a control group (treated with saline water 0.2 mL intraperitoneally and edible oil

收稿日期 (Date of reception) 2009-07-22

作者简介 (Biography) 黄俊辉, 主任医师, 主要从事以化疗为主的恶性肿瘤的综合治疗。

通信作者 (Corresponding author) 黄俊辉, E-mail: hjhmail@xysm.net

基金项目 (Foundation item) 湖南省中医药基金(24201)。 This work was supported by Traditional Chinese Medicine Foundation of Hunan Province, P. R. China (24201).

0.5 mL orally), an MIF group (treated with mifepristone 30 mg/kg orally and saline water 0.2 mL intraperitoneally), an ADM group (treated with adriamycin 5 mg/kg intraperitoneally and edible oil 0.5 mL orally) and an ADM + MIF group (treated with ADM 5 mg/kg intraperitoneally and mifepristone 30 mg/kg orally every 3 days). Tumor changes were investigated after different drug treatments. The reversal effect of 5  $\mu$ mol/L MIF in vitro on the ADM resistance cell line MCF-7/ADM and non ADM resistance cell line MCF-7 was determined by 4, 5-dimethylthiazol-2-yl (MTT) assay.

**Results** (1) The inhibitory rate of 5  $\mu$ mol/L of MIF for both cell lines MCF-7 and MCF-7/ADM was less than 5%, and it had no statistical difference compared with the group that was not treated with MIF ( $P > 0.05$ ). (2) ADM could inhibit the growth of both MCF-7 and MCF-7/ADM, but the inhibition concentration 50 ( $IC_{50}$ ) of MCF-7 (0.42 mg/L) was obviously less than that of MCF-7/ADM (17.21 mg/L) ( $P < 0.05$ ). (3)  $IC_{50}$  of MCF-7/ADM of MIF + ADM group was 1.96 mg/L in vitro, which was significantly less than that in ADM alone group (17.21 mg/L) ( $P < 0.05$ ), and 5  $\mu$ mol/L of MIF reversed ADM resistance with fold-reversal of 8.78. (4) MIF had some effect on the inhibition of MCF-7/ADM cell growth in vivo, the xenograft volume in the MIF + ADM group [(232.5149  $\pm$  309.2377) mm<sup>3</sup>] was significantly smaller than that in the control group [(962.2309  $\pm$  261.1313) mm<sup>3</sup>] after the 4 week treatment ( $P < 0.05$ ), and also smaller than that in the MIF group [(778.2846  $\pm$  42.6919) mm<sup>3</sup>] and in the ADM group [(508.9648  $\pm$  16.2609) mm<sup>3</sup>] ( $P < 0.05$ ). There was significant inhibition on xenograft weight after MIF combined with ADM treatment in vivo, and the inhibitory rate was 78.0%. **Conclusion** MIF can effectively reverse ADM resistance in human breast cancer cell line MCF-7/ADM both in vitro and in vivo.

**Key words:** mifepristone; adriamycin; adriamycin resistance in human breast carcinoma cell line MCF-7; reverse; multidrug resistance

阿霉素 (adriamycin, ADM) 是乳腺癌化疗的常用药物, 但乳腺癌细胞的多药耐药性也是 ADM 化疗失败的主要原因<sup>[1]</sup>。因此, 寻找克服乳腺癌多药耐药的药品或方法成为当前肿瘤研究的热点。米非司酮 (mifepristone, MIF) 是炔诺酮衍生物, 临床主要应用于计划生育。随着对其药理与生物学特性研究的深入, 发现 MIF 在体外有逆转肿瘤耐药细胞的多药耐药性<sup>[2]</sup>。有研究表明: MIF 在体外可逆转肺癌、卵巢癌等多种肿瘤耐药细胞的耐药性<sup>[3,4]</sup>, 但体内实验报道较少。本研究旨在通过对耐阿霉素人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 和非耐药人乳腺癌 MCF-7 比较, 结合体内外试验探讨 MIF 对 MCF-7/ADM 细胞耐药逆转的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

耐阿霉素人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞和非耐药 MCF-7 细胞购自上海肯强公司, MIF

(10 mg/片) 为浙江仙琚制药股份有限公司产品, 10 mg/瓶 ADM 为浙江海正药业产品。4 周龄裸鼠 (24 只, 雌性, 体质量 10 ~ 16 g) 由中南大学实验动物学部提供, 饲养于中南大学实验动物学部 SPF 级动物实验室内。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细 胞 培 养

MCF-7/ADM 和 MCF-7 细胞培养于含 10% 灭活小牛血清, 1  $\mu$ mol/L ADM, 青霉素 100  $\mu$ g/mL, 链霉素 0.1 mg/mL 的 1640 培养基, 置饱和湿度、37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 每日观察细胞生长情况。隔天以 D-Hank's 液清洗后换液, 细胞长满单层后, 以胰酶消化, 2 ~ 3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 计数待用。

#### 1.2.2 四甲基偶氮唑蓝法检测 MIF 细胞毒性浓度

取对数生长期的 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 以 RPMI 1640 培养基调整细胞悬液浓度为  $1 \times 10^5$ /mL,

接种于96孔板,100  $\mu\text{L}$ /孔,放入含有5%  $\text{CO}_2$ ,饱和湿度,37  $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养24 h后分组试验。两种细胞均设立空白组(不接种细胞)、对照组(接种细胞并加入RPMI 1640培养基)和实验组,实验组在接种细胞,加入RPMI 1640培养基的同时,根据加入MIF浓度不同又分为5,10,20和40  $\mu\text{mol/L}$  MIF浓度组,每个浓度设置3个复孔,将培养板再次放入含有5%  $\text{CO}_2$ ,饱和湿度,37  $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养72 h,各孔均加入四甲基偶氮唑蓝(4,5-dimethylthiazol-2-yl, MTT)溶液(5 mg/mL)20  $\mu\text{L}$ ,放入培养箱培养4 h。吸去各孔上清液,加入150  $\mu\text{L}$ 的二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO),振荡15 min,充分溶解结晶,用酶标仪测定570 nm波长的OD值,取3个孔的OD值均数,按公式计算细胞抑制率(inhibitory rate, IR):
$$\text{IR} = (\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$$
。以平均抑制率为Y轴,MIF浓度为X轴分别绘制MIF浓度对两种细胞抑制率的散点图。选取细胞IR均小于5%的药物浓度作为MIF的无毒剂量,并将此作为逆转浓度。

### 1.2.3 MTT法检测ADM对MCF-7/ADM与MCF-7细胞的毒性浓度

参照1.2.2的方法进行细胞培养和分组,对照组不加ADM。实验组分别用0.01,0.1,1,10,100 mg/L浓度的ADM代替MIF,每个浓度设置3个复孔。酶标仪测定OD值均数,计算细胞抑制率IR,绘制散点图,确定两种细胞对ADM的50%抑制浓度(50% inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ),计算MCF-7/ADM细胞的耐药倍数。

### 1.2.4 MTT法测定MIF对MCF-7/ADM细胞耐药性的逆转作用

参照1.2.2的方法进行细胞培养并分组,实验组又分为0.01,0.1,1,10,100 mg/L浓度的ADM组,同时在各浓度组中均加入5  $\mu\text{mol/L}$ 的MIF溶液,每个浓度设置3个复孔。测试OD值,计算两种细胞对ADM的 $\text{IC}_{50}$ ,结合单用ADM时两种细胞的 $\text{IC}_{50}$ ,计算逆转倍数。

### 1.2.5 MCF-7/ADM细胞移植与肿瘤干预

将对数生长期细胞制备单细胞悬液,以无血清1640培养基洗涤3次,并调整细胞浓度至 $1 \times 10^8$ 个/mL,在超净工作台内进行裸鼠皮下接种。以TB空针将细胞悬液注入试验裸鼠背部皮下(选取血管丰富处),每只裸鼠接种0.1 mL,含细胞数 $1 \times 10^7$ 个/点,约10 d左右待皮下移植瘤粟

粒大小开始干预处理,观察移植瘤生长情况。

裸鼠成瘤后<sup>[11]</sup>随机分为4组:MIF组、ADM组、ADM + MIF组和对照组。对照组腹腔注射生理盐水0.2 mL + 食用油0.5 mL灌胃;MIF组腹腔注射生理盐水0.2 mL + MIF 30 mg/kg灌胃;ADM组腹腔注射ADM 5 mg/kg + 食用油0.5 mL灌胃;ADM + MIF组ADM腹腔注射5 mg/kg + 30 mg/kg MIF灌胃。每3天给药1次,干预4周。干预前、后分别对裸鼠称重。每3天以游标卡尺测量移植瘤大小,计算移植瘤体积,绘制生长曲线,记录外观形态等。干预结束以颈椎脱臼法处死裸鼠,切取移植瘤,10%中性甲醛固定。以对照组平均瘤体积(瘤质量)减治疗组平均体积(瘤质量)/对照组平均瘤体积(瘤质量)  $\times 100\%$ 为抑瘤率。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS13.0统计软件包进行统计学处理,实验结果均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,Bliss法计算 $\text{IC}_{50}$ 值,两组数据比较采用 $t$ 检验分析,多组数据间的比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 MIF对MCF-7及MCF-7/ADM细胞的细胞毒性浓度分析

MIF对MCF-7和MCF-7/ADM细胞均有抑制作用。MIF作用72 h后,5  $\mu\text{mol/L}$ 组的OD值与对照组无明显差异( $P > 0.05$ ),但10  $\mu\text{mol/L}$ 组、20  $\mu\text{mol/L}$ 组、40  $\mu\text{mol/L}$ 组OD值与对照组有显著差异( $P < 0.05$ );并且,各浓度组之间比较有统计学意义( $P < 0.05$ )(表1)。5,10,20,40  $\mu\text{mol/L}$  MIF溶液作用于MCF-7细胞72 h后,IR分别为3.17%,7.74%,25.96%,35.10%,作用于MCF-7/ADM细胞72 h后的IR分别为2.23%,11.72%,22.25%,30.30%(表1)。经直线回归分析发现,MIF浓度与两种细胞的抑制率有差异( $P < 0.05$ ),随着MIF浓度的增大,抑制率提高,呈剂量依赖关系。因此,5  $\mu\text{mol/L}$ ( $\text{IR} < 5\%$ )视为无细胞毒性剂量,可将其作为体外逆转试验浓度。

### 2.2 ADM对MCF-7及MCF-7/ADM细胞的细胞毒性浓度分析

ADM对MCF-7细胞和MCF-7/ADM细胞均有抑制作用。单因素方差分析得知,各浓度之间的OD值不全相等( $P < 0.05$ ),对照组,0.01,0.1,

1, 10, 100 mg/L 组之间有差异 ( $P < 0.05$ )。不同浓度的 ADM 作用于 MCF-7 细胞 72 h 后的 IR 分别为 23.93%, 42.00%, 60.37%, 69.50%, 78.75%, 而 MCF-7/ADR 细胞的 IR 分别为 3.58%, 13.70%, 5.61%, 34.74%, 81.72% (表 2)。直线回归分析表明: ADM 浓度的 Ig 值与 MCF-7

和 MCF-7/ADR 细胞的抑制率之间存在直线关系 ( $P < 0.05$ ), 即随着 ADM 浓度 Ig 值的增大, 抑制率增大 (图 1, 2)。MCF-7 细胞对 ADM 的  $IC_{50}$  为 0.42 mg/L, MCF-7/ADM 细胞对 ADM 的  $IC_{50}$  为 17.21 mg/L, MCF-7/ADM 细胞的耐药倍数为 41 倍。

表 1 不同浓度 MIF 处理组 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞 OD 值和 IR ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

Tab. 1 OD and IR of MCF-7 and MCF-7/ADM cells in the different concentration MIF treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

组别	MCF-7		CF-7/ADM	
	OD 值	IR/%	OD 值	IR/%
对照组	1.016 ± 0.030	0.00 ± 0.00	1.002 ± 0.020	0.00 ± 0.00
5 μmol/L MIF 组	0.968 ± 0.050	3.17 ± 1.46	0.974 ± 0.010	2.23 ± 0.55
10 μmol/L MIF 组	0.923 ± 0.080 *	7.74 ± 1.11 *	0.883 ± 0.020 *	11.72 ± 1.15 *
20 μmol/L MIF 组	0.774 ± 0.030 *	25.96 ± 5.95 *	0.778 ± 0.100 *	22.25 ± 4.92 *
40 μmol/L MIF 组	0.649 ± 0.080 *	35.10 ± 3.73 *	0.697 ± 0.040 *	30.30 ± 3.75 *

与对照组 (0 μmol/L MIF) 比较, \*  $P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度 ADM 处理组 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞 OD 值和 IR ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

Tab. 2 OD and IR of MCF-7 and MCF-7/ADM cells in the different concentration ADM treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

组别	MCF-7		MCF-7/ADM	
	OD 值	IR/%	OD 值	IR/%
对照组	1.025 ± 0.090	0.00 ± 0.00	1.010 ± 0.040	0.00 ± 0.00
0.01 mg/L ADM 组	0.760 ± 0.010 *	23.93 ± 1.40 *	0.942 ± 0.010 *	3.58 ± 0.61 *
0.1 mg/L ADM 组	0.583 ± 0.030 *	42.00 ± 1.44 *	0.862 ± 0.060 *	13.70 ± 2.51 *
1 mg/L ADM 组	0.398 ± 0.020 *	60.37 ± 2.20 *	0.944 ± 0.040 *	5.61 ± 4.25 *
10 mg/L ADM 组	0.305 ± 0.040 *	69.50 ± 4.32 *	0.653 ± 0.160 *	34.74 ± 1.57 *
100 mg/L ADM 组	0.216 ± 0.030 *	78.75 ± 3.43 *	0.183 ± 0.080 *	81.72 ± 2.66 *

与对照组 (0 mg/L ADM) 比较, \*  $P < 0.05$ 。

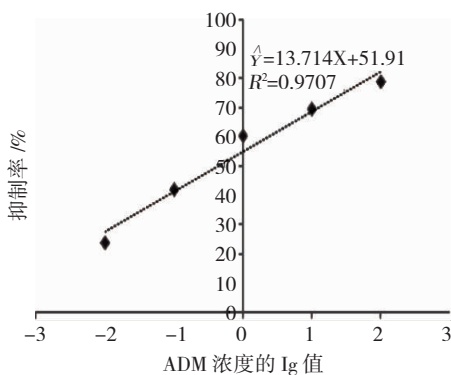


图 1 ADM 浓度的 Ig 值与 MCF-7 细胞抑制率的散点图。  
Fig. 1 Scatter of Ig of ADM concentration and inhibitory rate of MCF-7 cells.

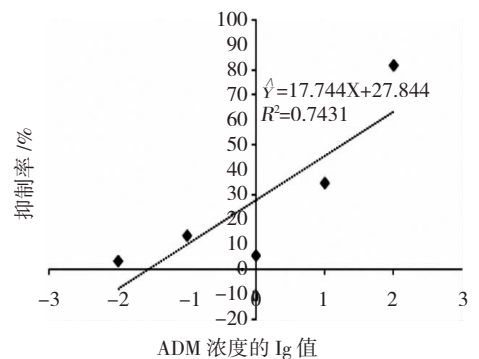


图 2 ADM 浓度的 Ig 值与 MCF-7/ADM 细胞抑制率的散点图。  
Fig. 2 Scatter of Ig of ADM concentration and inhibitory rate of MCF-7/ADM cells.

2.3 MIF 对 MCF-7/ADM 细胞耐药性的逆转作用

从表 3 可见,5 μmol/L MIF 与不同浓度 ADM 联合处理 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞 72 h 后,两种细胞对照组的 OD 值与不同浓度 ADM 组有明显差异,随着 ADM 浓度的升高,两种细胞的 OD 值下降;并且,不同浓度 ADM 组之间的 OD 值也有明显差异( $P < 0.05$ );MCF-7 细胞各组 IR 分别为 0.80%,49.50%,68.63%,88.57%,97.47%,MCF-7/ADM 细胞的 IR 分别为 4.87%,14.63%,37.77%,82.17%,83.83%。采用 Bliss 法统计,经

MIF 处理后 MCF-7 细胞对 ADM 的  $IC_{50}$  为 0.29 mg/L, MCF-7/ADM 细胞对 ADM 的  $IC_{50}$  为 1.96 mg/L。MCF-7/ADM 细胞对 ADM 的  $IC_{50}$  在 MIF + ADM 组较 ADM 组明显下降( $P < 0.05$ ),逆转倍数为 8.78,但 MCF-7 细胞对 ADM 的  $IC_{50}$  与 MIF 的加入与否其差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),逆转倍数为 1.44。加入 MIF 后 MCF-7/ADM 细胞与 MCF-7 细胞的  $IC_{50}$  有显著性差异( $P < 0.05$ ) (表 4, 图 3, 4),表明 MIF 能逆转 MCF-7/ADM 细胞的耐药性。

表 3 5 μmol/L MIF 与不同浓度 ADM 联合处理组 MCF-7 和 MCF-7/ADM 的 OD 值和 IR ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Tab. 3 OD and IR of MCF-7 and MCF-7/ADM cells in 5 μmol/L MIF and different concentration ADM treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

组别	MCF-7		MCF-7/ADM	
	OD 值	IR (%)	OD 值	IR (%)
对照组	1.025 ± 0.090	0.00 ± 0.00	1.010 ± 0.040	0.00 ± 0.00
0.01 mg/L ADM 组	0.990 ± 0.020*	0.80 ± 1.05*	0.951 ± 0.030*	4.87 ± 2.53*
0.1 mg/L ADM 组	0.506 ± 0.010*	49.50 ± 2.76*	0.854 ± 0.010*	14.63 ± 1.16*
1 mg/L ADM 组	0.314 ± 0.070*	68.63 ± 1.81*	0.626 ± 0.030*	37.77 ± 3.72*
10 mg/L ADM 组	0.114 ± 0.050*	88.57 ± 4.25*	0.178 ± 0.060*	82.17 ± 5.47*
100 mg/L ADM 组	0.025 ± 0.100*	97.47 ± 1.11*	0.161 ± 0.080*	83.83 ± 1.96*

与对照组(0 mg/L ADM)比较,\* $P < 0.05$ 。

表 4 MIF 对 MCF-7/ADM 细胞耐药逆转( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Tab. 4 Reversal of multidrug resistance in MCF-7/ADM cells ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

组别	$IC_{50}/(mg/L)$		逆转倍数
	ADM	ADM + MIF	
MCF-7 组	0.42 ± 0.11	0.29 ± 0.52*	1.44
MCF-7/ADM 组	17.21 ± 0.83	1.96 ± 0.47#	8.78

MCF-7 组内比较,\* $P > 0.05$ ; MCF-7/ADM 组内比较,# $P < 0.05$ 。

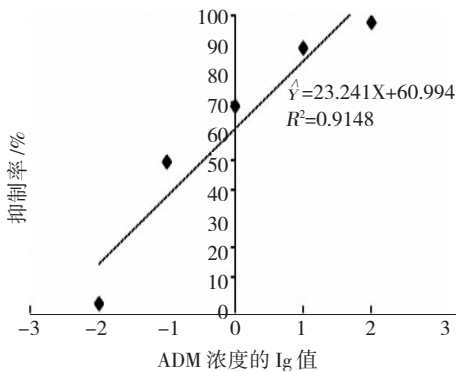


图 3 5 μmol/L MIF 与不同浓度 ADM 处理 MCF-7 细胞后抑制率的散点图。

Fig. 3 Scatter of the inhibitory rate of MCF-7 cells after 5 μmol/L MIF and different concentration ADM.

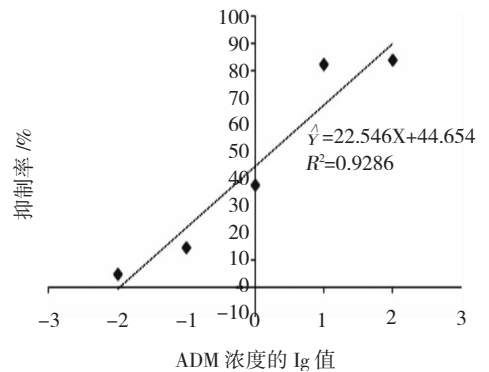


图 4 5 μmol/L MIF 与不同浓度 ADM 处理 MCF-7/ADM 细胞后抑制率的散点图。

Fig. 4 Scatter of the inhibitory rate of MCF-7/ADM cells after 5 μmol/L MIF and different concentration ADM.

## 2.4 裸鼠体内成瘤

### 2.4.1 移植瘤形态学变化

MCF-7/ADM 细胞接种于裸鼠背部皮下,1 周左右出现肉眼可见的移植瘤,20 只裸鼠成瘤,成瘤率 83.33% (20/24), 2 只荷瘤裸鼠因药物误灌入气管死亡,另 2 只裸鼠肿瘤自然消退。移植瘤初成时,呈椭圆形,质地中等,表面光滑,边界较清,从皮下隐约可见肿瘤血管。随着观察时间的延长,肿瘤出现不规则,凹凸不平,边界欠清,质地变硬,逐渐与周围组织粘连,活动度差。对照组瘤体积为  $(962.2309 \pm 261.1313) \text{ mm}^2$ , MIF 组为  $(778.2846 \pm 42.6919) \text{ mm}^2$ , ADM 组为  $(508.9648 \pm 16.2609) \text{ mm}^2$ , ADM + MIF 组  $(232.5149 \pm 309.2377) \text{ mm}^2$ ; 各组瘤体积抑瘤率分别为 MIF 组 19.1%, ADM 组 47.1%, ADM + MIF 组 75.8%。除 MIF 组外,各用药组瘤体积均低于对照组 ( $P < 0.05$ ), ADM + MIF 组瘤体积较单用 MIF 组和单用 ADM 组

均降低 (均  $P < 0.05$ )。ADM + MIF 组抑瘤率显著,ADM 组次之(表 5,图 5A)。各组移植瘤重量分别为对照组  $(0.91 \pm 0.23) \text{ g}$ , MIF 组  $(0.76 \pm 0.47) \text{ g}$ , ADM 组  $(0.48 \pm 0.17) \text{ g}$ , ADM + MIF 组  $(0.20 \pm 0.38) \text{ g}$ 。重量抑瘤率分别为 MIF 组 16.5%, ADM 组 47.3%, ADM + MIF 组 78.0%。除 MIF 组,各用药组瘤重均低于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), ADM + MIF 组瘤重较单用 MIF 与单用 ADM 组低 ( $P < 0.05$ )。ADM + MIF 组抑瘤率最显著,ADM 组次之(表 5)。

光镜下移植瘤细胞异型性明显,细胞大小形态不一,排列紊乱,细胞核大深染、核仁清晰、核浆比例增大,呈现乳腺癌病理组织学特征。各组移植瘤病理形态有差异,空白对照组癌细胞异型性较为明显,移植瘤中可见大片肿瘤细胞,ADM 组肿瘤中有小灶性坏死,ADM + MIF 组瘤组织中可见大片坏死的无结构组织(图 5B,5C)。

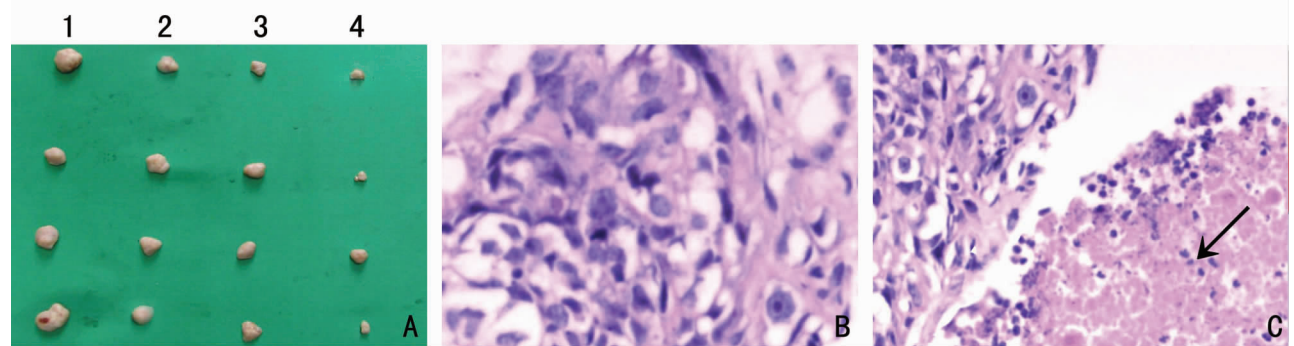


图 5 移植瘤组织病理学变化。A:裸鼠移植瘤全体观。1~4 分别为对照组、MIF 组、ADM 组和 MIF + ADM 组移植瘤样本大小; B:对照组瘤组织形态(HE,  $\times 100$ ); C:MIF + ADM 组瘤组织病理改变(HE,  $\times 40$ ),黑色箭头示坏死区。

Fig 5 Histopathology of xenograft in nude mice. A:View of xenograft in nude mice. Line 1-4 shows the xenograft size in the control group, MIF group, ADM group and MIF + ADM group; B:Morphology of xenograft tissue in the control group (HE,  $\times 100$ ); C:Morphology of xenograft tissue in MIF + ADM group (HE,  $\times 40$ ), arrow show necrosis area of tumor.

表 5 各组移植瘤体积、质量及抑瘤率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 16$ )

Tab. 5 Tumors in size, weight and inhibitory rate in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 16$ )

组别	体积/ $\text{mm}^3$	抑瘤率/%	质量/g	抑瘤率/%
对照组	$962.2309 \pm 261.1313$	—	$0.91 \pm 0.23$	—
MIF 组	$778.2846 \pm 42.6919$	19.1	$0.76 \pm 0.47$	16.5
ADM 组	$508.9648 \pm 16.2609^*$	47.1 <sup>#</sup>	$0.48 \pm 0.17^*$	47.3 <sup>#</sup>
ADM + MIF 组	$232.5149 \pm 309.2377^*$	75.8 <sup>#</sup>	$0.20 \pm 0.38^*$	78.0 <sup>#</sup>

与对照组瘤体积和瘤质量比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MIF 组的抑瘤率比较, #  $P < 0.05$ 。



### 2.4.2 移植瘤生长曲线

从裸鼠移植瘤的生长曲线可见,移植瘤初成时(1周内),各组体积无明显差别,之后差别逐渐明显,但各组移植瘤生长曲线无相交。给予不同干预处理,空白对照组移植瘤生长曲线上升快,居于各组移植瘤生长曲线之上,表明瘤体体积增长快;其次为 MIF 组、ADM 组,两条生长曲线均呈上升趋势。表明移植瘤体积随时间推移增长;ADM + MIF 组移植瘤生长曲线居于各组移植瘤生长曲线之下,虽然在用药早期也有上升趋势,但慢于其他两组,用药中期生长曲线趋于平缓,用药后期生长曲线下降(图 6)。

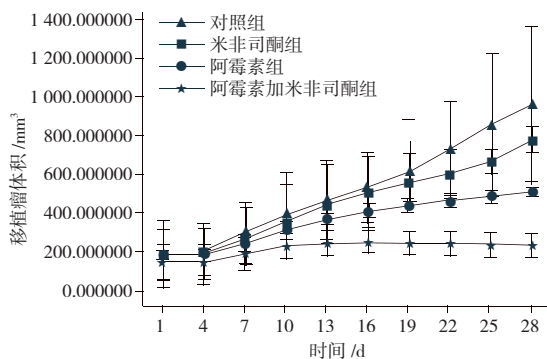


图 6 各组裸鼠移植瘤生长曲线。

Fig. 6 Growth curve of xenograft in nude mice in each group.

## 3 讨 论

国外有学者<sup>[5]</sup>使用 MIF 对卵巢癌耐药细胞株进行体外细胞毒性试验,结果发现 5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 对细胞生长无影响,但使用该剂量的 MIF 能成功逆转该细胞的耐药性<sup>[6-7]</sup>。国内刘永等<sup>[5]</sup>应用 MIF 进行白血病耐药细胞 K562/HHT 的细胞毒性试验,显示 MIF 对该细胞生长抑制率的影响呈剂量依赖性,5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 对细胞生长的抑制率小于 5%,采用该剂量作为 MIF 的逆转耐药性。本研究发现, MIF 无论对非耐 ADM 的 MCF-7 细胞还是对耐 ADM 的 MCF-7/ADM 细胞均有一定的细胞毒性作用,而且呈剂量依赖性,随着剂量增大,细胞毒性增大。5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 对两种细胞的抑制率均小于 5%,与未加入 MIF 组的抑制率没有统计学差异。因此,以 5  $\mu\text{mol/L}$  作为 MIF 的无毒剂量,并以此浓度逆转乳腺癌耐药细胞株

MCF-7/ADM 的耐药性,与多数作者意见基本一致。5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 对细胞的生存无影响,表明此浓度的 MIF 无直接抑制瘤作用,主要是通过 MIF 恢复 ADM 对肿瘤细胞的敏感性,从而起到抗肿瘤的作用。

有研究<sup>[7-8]</sup>发现,5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 能显著 MIF 能提高人肺癌 GLC/sbn30 细胞内钙黄绿素浓度,10  $\mu\text{mol/L}$  MIF 能提高 2 倍,25  $\mu\text{mol/L}$  可提高 3 倍,能达到敏感细胞内的浓度,而 5  $\mu\text{mol/L}$  的 MIF 能明显降低耐药细胞 GLC4/sb30 对长春新碱的  $\text{IC}_{50}$ ,接近敏感细胞的  $\text{IC}_{50}$  值。Freeburg 等<sup>[9]</sup>发现,1.25 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  的 MIF 能逆转卵巢癌耐药细胞株的耐药性,其逆转强度呈剂量依赖性,且 MIF 浓度为 5 和 10  $\mu\text{mol/L}$  时,能将耐药细胞的  $\text{IC}_{50}$  降低至敏感细胞水平。国内有学者<sup>[10]</sup>使用 2.5 ~ 40  $\mu\text{mol/L}$  MIF 逆转白血病耐药细胞 K562/A02 细胞的耐药性, MIF 浓度小于 10  $\mu\text{mol/L}$  时,耐药细胞的  $\text{IC}_{50}$  值能达到或接近敏感细胞水平,当 MIF 浓度在 10  $\mu\text{mol/L}$  以上时,对细胞的毒性作用明显,证实了 MIF 只需较低浓度就能产生较为满意的逆转作用。本研究用 5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 联合不同浓度的 ADM 进行逆转实验,发现 MCF-7/ADM 细胞对 ADM 的  $\text{IC}_{50}$  由 17.21 mg/L 降低至 1.96 mg/L,逆转 8.78 倍。5  $\mu\text{mol/L}$  MIF 能产生较为满意的逆转效果,克服了既往学者体外研究的其它逆转剂使用剂量较大、临床不能耐受的缺点,并且 MIF 本身也具有一定的抗肿瘤作用,有较理想的临床应用前景。

MIF 是炔诺酮的衍生物,为临床常用计划生育药物。随着对 MIF 作药理作用机制和生物学特性的深入研究,发现 MIF 有抗肿瘤耐药作用<sup>[3-4]</sup>。国外学者研究发现, MIF 的抗肿瘤耐药作用可能是通过抑制 P 糖蛋白 (p-gp) 对化疗药物的外排、对抗多药耐药蛋白等以增加细胞内药物浓度、干扰神经酰胺糖基化等机制逆转耐药细胞的耐药性<sup>[11-13]</sup>。国内柯佩琪等<sup>[4]</sup>通过体外实验发现, MIF 有逆转人卵巢癌耐药细胞系 SK-OV-3 对顺铂的耐药性。刘永等<sup>[5]</sup>的研究也表明: MIF 不但可以逆转高三尖杉酯碱 (HHT) 诱导的多药耐药细胞 K562/HHT 对阿霉素的耐药,还可不同程度地逆转长春新碱类的耐药性。但 MIF 在体内是否仍有逆转肿瘤细胞耐药的作用报道少见。

本研究中动物实验的移植瘤生长情况显示,单用 ADM 组移植瘤体积与重量均低于空白对照组,但明显高于 MIF 与 ADM 联合用药组的瘤体积和瘤重量。移植瘤的组织病理学检查也显示, MIF 与 ADM 联合用药组的肿瘤标本中有大片坏死灶形成,这些均说明 MIF 促进了 ADM 对 MCF-7/ADM 细胞的抗癌作用。作者推测在联合用药组中,移植瘤的生长抑制作用是通过 MIF 逆转 MCF-7/ADM 细胞的耐药性,恢复对 ADM 的敏感性所致。

本研究通过体内外试验探讨 MIF 对耐 ADM 人乳腺癌细胞和非耐药人乳腺癌细胞的作用,表明 MIF 能逆转耐 ADM 细胞 MCF-7/ADM 的耐药性,体外逆转剂量以 5  $\mu\text{mol/L}$  为宜。但人体内准确的逆转剂量有待进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] 李慧艳,苗新普,侯梅. 肿瘤多药耐药逆转研究现状及进展[J]. 华西医学,2008,3(5):1226-1227.  
LI Huiyan, MIAO Xinpu, HOU Mei. The state and development in research of multidrug resistance in tumor[J]. West China Medical Journal, 2008, 3(5):1226-1227.
- [2] Li D Q, Wang Z B, Bai J. et al. Reversal of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SCG7901/VCR by antiprogestin drug mifepristone [J]. World Gastroenterol, 2004, 10(12):1722-1725.
- [3] Payen L, FAU-Delugin L, Courtois A, et al. Reversal of MRP-mediated multidrug resistance in human lung cancer cells by the antiprogestatin drug RU486 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(3):513-518.
- [4] 柯佩琪,郑闻亭,朱云晓,等. MIF 对人耐药卵巢癌细胞系 SK-OV-3 的增殖及 DDP 耐药性的影响[J]. 中山大学学报:医学版,2004,3(s):223-225.  
KE Peiqi, ZHENG Wenting, ZHU Yunxiao, et al. The influence of increasing and multidrug resistance in human ovarian cancer cell line SK-OV-3 by MIF [J]. Journal of Sun Yat-Sen University. Medical Sciences, 2004, 3(s):223-225.
- [5] 刘永,陈春燕,孔德晓,等. 高三尖杉酯碱白血病多药

耐药细胞系 K562/HHT 的诱导及 MIF 逆转耐药的研究[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(11):2168-2172.

LIU Yong, CHEN Chunyan, KONG Dexiao, et al. Study of establishment of K562/HHT cell line and reversal of multidrug resistance by antiprogestin drug mifepristone [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007, 23(11):2168-2172.

- [6] Carbonell Esteve J L, Acosta R. Mifepristone for the treatment of uterine leiomyomas: a randomized controlled trial [J]. Obstet Gynecol, 2008, 112(5):1029-1036.
- [7] Elizabeth M F, Alica A G. Resistance to cisplatin does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to mifepristone cytotoxicity [J]. Cancer cell international, 2009, 9(4):1-13.
- [8] Burger H, Foekens J A, Look M P, et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9:827-836.
- [9] Liu C F, Chen C L, Liu Y S. Ceramide in apoptotic signaling and anticancer therapy [J]. Curr Med Chem, 2006, 13(14):1609.
- [10] 孔德晓,陈春燕. MIF 逆转 K562/A02 细胞多药耐药的研究[J]. 中华血液学杂志,2007,28(8):555-559.  
KONG Dexiao, CHEN Chunyan. Study of reversal of mifepristone on K562/A02 cell lines [J]. Chinese Journal of Hematology, 2007, 28(8):555-559.
- [11] Assaraf Y G. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis [J]. Drug Resistant Update, 2006, 9(4):227-246.
- [12] Perez-Tomas R. Multidrug-resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment [J]. Curr Med Chem, 2006, 13(16):1859-1876.
- [13] Freeburg E M, Goyeneche A A. Mifepristone modulates glucosylceramide synthase expression and reverse multidrug resistance in ovarian cancer cells [J]. Int J Oncol, 2009, 34(3):743-755.

(本文编辑 傅希文)