

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.01.003

环氧合酶-2 抑制剂对人舌鳞癌 Tca8113/BLM 细胞 MDR1/P-gp 表达的影响

李伟忠¹, 王晓燕², 霍秋菊¹**Effect of Cyclooxygenase-2 Inhibitor on Expression of MDR1 mRNA and P-glycoprotein in Human Tongue Cancer Drug-resistance Cell Line Tca8113/BLM**LI Wei-zhong¹, WANG Xiao-yan², HUO Qiu-ju¹

1. Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China, 2. Department of Pathology

Abstract: Objective To investigate the effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on the expression of multidrug resistance gene (MDR1) and P-glycoprotein (P-gp) in human tongue cancer drug-resistance cell line Tca8113/BLM. **Methods** Human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 cells were repeatedly treated with BLM (30 μ g/ml) to establish drug-resistant cell line Tca8113/BLM. The inhibitory effect of celecoxib on Tca8113/BLM cell line was determined by MTT assay. The expression of P-gp and MRP were detected by flow cytometry and RT-PCR, respectively. **Results** The MTT results suggested that celecoxib inhibited the growth and proliferation of Tca8113/BLM cell lines in dose-dependent manner. Celecoxib treatment also resulted in significant down-regulated expression of MDR1 mRNA and P-gp. **Conclusion** Celecoxib shows a significant effect on inhibiting expression of MDR1 mRNA and P-gp in Tca8113/BLM cells, this is probably related to enhancing the lethal effects of anticancer agents against carcinoma cells.

Key words: Cyclooxygenase-2 inhibitors; Squamous Cell Carcinoma; P-Glycoprotein; MDR genes

摘要:目的 探讨环氧合酶-2 抑制剂塞来昔布对人舌鳞癌耐药细胞系 Tca8113/BLM 细胞多药耐药基因和 P-糖蛋白表达的影响。**方法** 采用 BLM(30 μ g/ml)反复 24h 暴露法处理人舌鳞癌细胞系 Tca8113 细胞,采用不同浓度的塞来昔布作用于 Tca8113/BLM 细胞,MTT 法检测细胞增殖活性,流式细胞仪测定 P-gp 的表达水平,RT-PCR 检测多药耐药基因 mRNA 的表达。**结果** 塞来昔布显著抑制 Tca8113/BLM 细胞增殖、下调 Tca8113/BLM 细胞 MDR1 基因表达,其作用呈剂量依赖关系。**结论** 塞来昔布以剂量依赖方式抑制人舌鳞癌耐药细胞系 Tca8113/BLM 细胞 MD1/P-gp 表达,并抑制细胞增殖,这种作用可能与 COX-2 抑制剂增强抗癌药物对肿瘤细胞的杀伤作用有关。

关键词: 环氧合酶-2 抑制剂;鳞状细胞癌;P-糖蛋白;多药耐药基因**中图分类号:**R730.53;R739.86 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)01-0009-04

0 引言

化疗是舌癌重要的辅助治疗手段,但由于对化疗药物耐药性的产生和敏感度的降低,化学治疗往往难以达到理想的效果。研究认为,肿瘤细胞多药耐药性的产生,与肿瘤细胞多药耐药基因(multi-drug resistance gene,MDR1)及其编码产物 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)的过度表达有关。MDR1 基因属于转运蛋白 ATP 结合家族,与细胞的多药

耐药表型有关,P-gp 是一种 ABC 超家族跨膜磷酸糖蛋白,可将多种复合物从细胞内转运至细胞外间隙,导致细胞内药物浓度降低,降低了药物的作用效果^[1-2]。近来发现,环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)可以调节 MDR1 的表达,因而认为 COX-2 可能与药物抗药性的产生有关。本研究通过观察 COX-2 抑制剂对 Tca8113/BLM 细胞株的生长抑制及 MDR1/P-gp 的表达的影响,探讨 COX-2 抑制剂增强肿瘤细胞对抗癌药物敏感度的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

COX-2 抑制剂塞来昔布标准品(International

收稿日期:2009-11-12;修回日期:2010-04-02

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(06024396)

作者单位:1.510515 广州,南方医科大学南方医院口腔科,2. 病理科

作者简介:李伟忠(1962-),男,博士,副主任医师,主要从事头颈部肿瘤的研究

Laboratory, 美国),用二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide,DMSO)(Sigma, 美国)配成 100 mmol/L 的贮存液, - 20℃ 保存备用。博来霉素(Bleomycin, BLM, 日本化药株式会社),甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)和 RPMI 1640(Amersco, 美国)。Trizol 试剂盒(Invitrogen, 美国)。RT-PCR 成套试剂盒(TaKaRa, 日本)。MDR1 和 β -actin 引物(上海生工生物工程)。鼠抗人 P-gp 抗体(一抗)及 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(荧光二抗)抗体(BD Farmingen, 美国)。

1.2 博来霉素耐药株的建立

人舌鳞癌细胞系 Tca8113 由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔医学院建株,南方医院口腔科实验室保存。按照文献介绍的方法^[3],建立耐博来霉素细胞株 Tca8113/BLM,采用大剂量博来霉素 24h 暴露法建立耐药细胞系 Tca8113/BLM,用含 30 μ g/ml 博来霉素的培养液培养 Tca8113 细胞,作用 24h 后,弃培养液,D-Hank's 缓冲液洗 3 次,换新鲜培养液,待细胞恢复生长,按上述方法处理细胞,共 9 次。MTT 法检测平阳霉素的半数抑制浓度(IC_{50}),当 IC_{50} 至逐渐稳定后,撤药培养 1 月,MTT 法复检 IC_{50} ,以确定 Tca8113/BLM 耐药的稳定性。

1.3 MTT 法测定塞来昔布对 Tca8113/BLM 细胞增殖抑制作用

将 Tca8113/BLM 培养于含 10% 灭活胎牛血清的低糖 DMEM 培养液中,以每孔 4×10^3 的密度接种于 96 孔培养板,每组 4 个复孔,置 5% CO_2 培养箱内培养 24 h 后,加入用低糖 DMEM 培养液稀释的塞来昔布,其浓度分别为 10、20、40、80、160 μ mol/L,继续培养 24、48、72 h 后,测定 570 nm 处的吸光度值(A_{570}),计算细胞生长抑制率:生长抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 } A_{570} / \text{对照组 } A_{570}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测 P-gp 表达

调整细胞数量至 3×10^5 /ml,取 6 ml,接种于 50 ml 培养瓶中,培养 24 h 后分别加入不同浓度为 0、20、40、80、160 μ mol/L 的塞来昔布,每组 4 个复瓶。培养 24、48 h 后收获细胞。用胰蛋白酶消化细胞,磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 3 次,离心获取细胞后,用 95% 乙醇 1 ml 固定 15 min,加入 PBS 2 ml 离心洗涤 2 次,加入细胞破膜液 0.5 ml,10 min 后加入 PBS 2 ml 离心洗 1 次,加入饱和剂量的鼠抗人 P-gp 抗体,37℃ 孵育 40 min,加入 PBS 离心洗 1 次,加入羊抗鼠 IgG(1 : 20)封闭非特异结合位点,加入 PBS 离心洗 1 次后,每管加入 100 μ l FITC 标记的羊抗鼠 IgG,37℃ 孵育 40 min,加入 PBS 离心洗 2 次,最后加 PBS 500 μ l 混匀细胞,在流式细胞仪上检测 P-

gp 的表达阳性率。阴性对照组不加鼠抗人 P-gp 抗体,只加入 FITC-标记的羊抗鼠 IgG。

1.5 RT-PCR 检测 MDR1 mRNA 的表达

Tca8113/BLM 细胞经不同浓度的塞来昔布处理 24h 后,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,以 β -actin 为内参照,二步法 RT-PCR 检测 MDR1 基因 mRNA 表达情况。MDR1 上游引物 F:5'-CCCAT-CATTGCAATAGCAGG-3',下游引物 R:5'-GT-TCAAACCTT-CTGCTCCTGA-3',产物长度 167bp; β -actin 上游引物 F:5'-CACCCAGCACAATGAAGAT-3',下游引物 R:5'-CAAATAAAGCCATGCCAAT-3',产物长度:255 bp。PCR 产物扩增后进行凝胶电泳,采用凝胶图像分析系统(Geldoc XR, BIO-RAD, USA)分析。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件包进行分析,数据采用均数 \pm 标准差表示,采用 one-way ANOVA 分析,组间多重比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 塞来昔布对 Tca8113/BLM 细胞的生长抑制作用

MTT 结果显示,塞来昔布对 Tca8113/BLM 细胞具有明显的增殖抑制作用,经 one-way ANOVA 分析显示,随着浓度的增加,其生长抑制作用也明显增强(P 均 = 0.000),组间多重比较显示,除 24 h 20 μ mol/L 组与 10 μ mol/L 组之间差异无统计学意义($P = 0.055$),其他各组与 10 μ mol/L 组相比,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.001),见图 1。

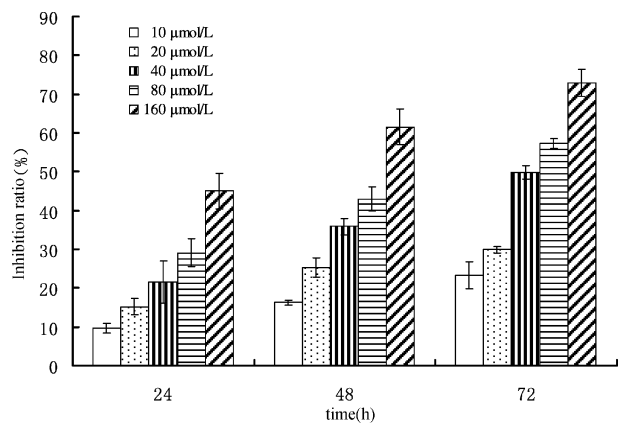


图 1 MTT 法检测塞来昔布对 Tca8113/BLM 细胞作用后的生长抑制作用

Figure 1 Effect of celecoxib on the growth of Tca8113/BLM cells measured by MTT assay

2.2 塞来昔布对 Tca8113/BLM 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

流式细胞术结果显示,Tca8113 细胞 P-gp 阳性

细胞表达率为(1.60 ± 0.53)%, Tca8113/BLM 细胞 P-gp 阳性细胞表达率则明显增多,当经不同浓度的塞来昔布处理 24、48 h 后,可明显降低 P-gp 的合成,且随浓度的增加而增强,经方差分析,差异有统计学意义($P = 0.000$),各处理组与对照组相比,P-gp 表达的降低均有统计学意义(P 均 < 0.01)。但塞来昔布处理后 48 h 与 24 h 相比,除 20 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 组间差异有统计学意义外,其他各组差异无统计学意义,见表 1、图 2。

表 1 塞来昔布对 Tca8113/BLM 细胞 P-gp 表达的影响

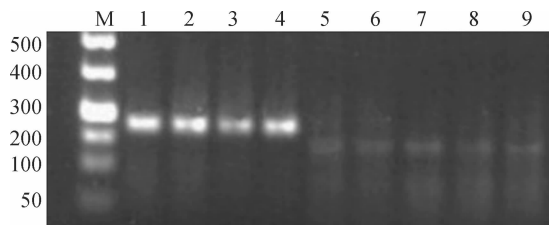
Table 1 Effect of celecoxib on expression of P-gp in Tca8113/BLM cells

Group ($\mu\text{mol/L}$)	n	Positive rate of the cells (%)	
		24 h	48 h
0(Control)	4	66.29 ± 0.99	62.99 ± 3.00
20	4	60.75 ± 1.15 ^a	58.28 ± 0.86 ^{b,d}
40	4	55.00 ± 0.52 ^{a,c}	54.38 ± 5.07 ^a
80	4	49.37 ± 0.62 ^{a,c}	42.31 ± 1.30 ^{a,c,e}
160	4	39.41 ± 1.21 ^{a,c}	38.77 ± 1.48 ^{a,c}
F		488.478	54.996
P		0.000	0.000

Note: ^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, compared with the control group; ^c: $P < 0.01$, compared with the 20 $\mu\text{mol/L}$ group; ^d: $P < 0.05$, ^e: $P < 0.01$, compared with the 24h group

2.3 细胞 MDR1 mRNA 的表达

塞来昔布处理前 Tca8113/BLM 细胞 MDR1 的半定量值为(0.72 ± 0.02),采用 20、40、80 及 160 $\mu\text{mol/L}$ 的塞来昔布处理 24h 后,MDR1 的表达明显降低,其值分别为(0.59 ± 0.02)、(0.58 ± 0.03)、(0.55 ± 0.03)和(0.44 ± 0.02),与对照组相比,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.01),见图 3。



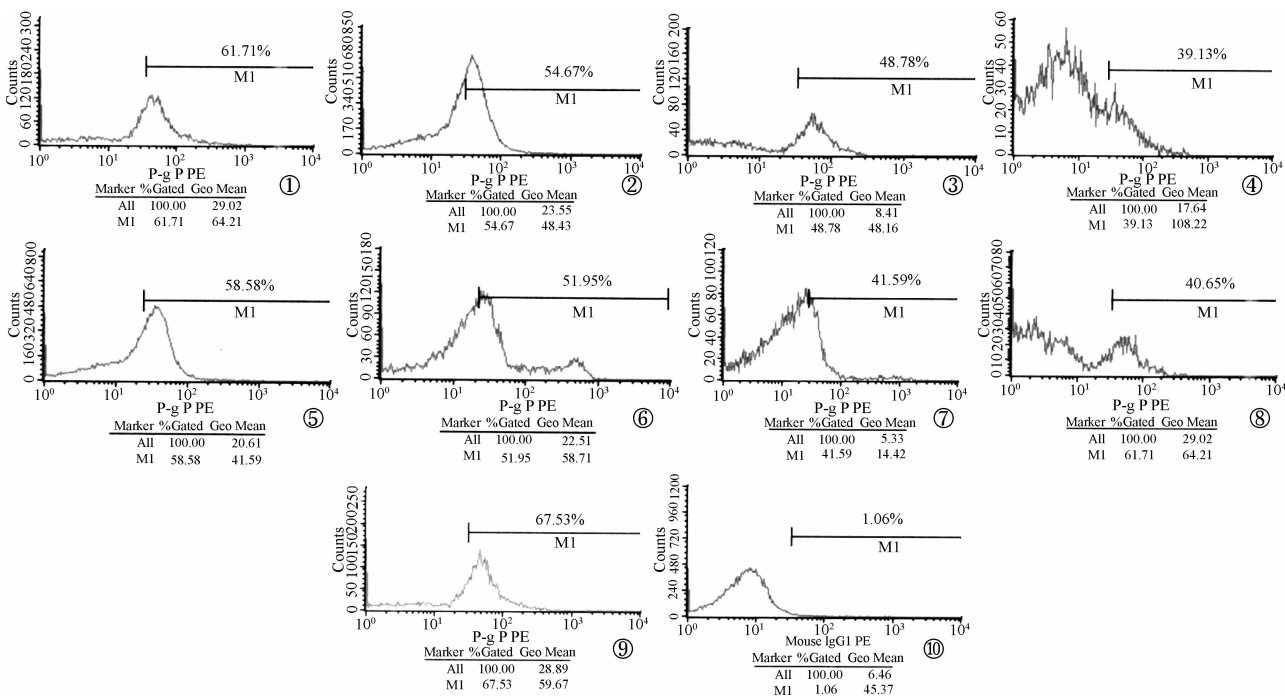
M: marker, 1~4: β -actin; 5: Control; 6~9: cells were treated with celecoxib with concentration of 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$

图 3 塞来昔布作用 Tca8113/BLM 细胞 24 h 后对 MDR1 mRNA 表达的影响

Figure 3 The electrophoresis results of MDR1 mRNA in Tca8113/BLM cells after treated with celecoxib for 24 h

3 讨论

P-gp 是由位于 7q21 的 MDR1 基因编码的跨膜糖蛋白,由 1 280 个氨基酸组成,相对分子质量为 170 kD,



①~④ The expression of cells treated with celecoxib with concentration of 20,40,80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h;
⑤~⑩ The expression of cells treated with celecoxib with concentration of 20,40,80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h;
⑨ Control group; ⑩ Negative control

图 2 流式细胞术检测塞来昔布对 Tca8113/BLM 细胞 P-gp 蛋白的阳性表达率

Figure 2 The P-gp expression was measured using flow cytometry

属于转运蛋白 ATP 结合家族,是一种三磷酸腺苷依赖性输出泵,它可以将一些结构相似的物质从脑组织转运至血液,以保护脑组织免受毒性物质的侵害^[4-5]。P-gp 除了能够清除有害物质外,也将治疗性药物移出细胞,从而阻止了药物在靶组织中如中枢神经系统或肿瘤中的积累^[6]。P-gp 的过表达导致恶性肿瘤细胞多药耐药性的产生,给肿瘤治疗带来困难,抑制 P-gp 的作用可以促进抗肿瘤药进入 P-gp 表达的组织增加药物疗效,这对筛选临床用药具有十分重要的意义^[7]。已有研究证实,非甾体类抗炎药塞来昔布可以增强化疗药物的作用效果^[8-11],这些药物大部分为 P-gp 的作用底物,如多柔比星、长春新碱、依托泊甙、伊立替康、利培酮、瑞波西汀等^[12-13]。

非甾体类抗炎药是一种抗炎止痛药,其作用机制是抑制 COX-1 和 COX-2 的表达^[14]。选择性 COX-2 抑制剂可选择性抑制 COX-2 酶的活性,减少了胃肠道溃疡和出血的不良反应。研究证实,COX-2 抑制剂可以抑制多种肿瘤细胞的生长及诱导细胞凋亡,并且可以增强肿瘤细胞对抗癌药物的敏感度。本实验及前期研究发现,选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布不但可以抑制人舌鳞癌 Tca8113 细胞的生长及诱导细胞凋亡,并且可以增强抗癌药物对 Tca8113 细胞的杀伤作用^[15-16]。Awara 等^[9]实验证实,尽管塞来昔布本身缺乏抗肿瘤活性,但它可增强阿霉素的抗肿瘤作用。Hashitani 等^[9]证实塞来昔布可增强抗癌药物(P-gp 作用底物)特别是阿霉素和长春新碱诱导的细胞凋亡作用。Ponthan 等^[10]也证实塞来昔布与 P-gp 作用底物阿霉素、依托泊甙、伊立替康、长春新碱联合应用可产生协同或相加的细胞毒效应。这些研究均证实 COX-2 抑制剂增强抗癌药物的抗肿瘤作用与抑制 P-gp 的作用有关。Tegeder 等^[17]研究证实,NSAIDs 如布洛芬可以通过 COX-2 依赖途径抑制转录因子如核因子- κ B 和活化剂蛋白-1 的表达,并随即下调节相关基因如 α (TNF- α) 的表达来抑制炎症反应过程,推断 MDR1 基因启动子可能含有 AP-1 和 NF- κ B 的结合位点,这可能与 MDR1 基因的诱导作用有关,而采用 NSAIDs 抑制这些因子可下调节 MDR1 基因的表达^[18],其作用机制有待进一步研究。

综上所述,COX-2 抑制剂塞来昔布在抑制 Tca8113/BLM 细胞增殖的同时,可降低 P-gp 和 MDR1 的表达,这对探讨 COX-2 抑制剂在增强肿瘤化疗敏感度方面具有重要意义。

参考文献:

- [1] Yasui K, Mihara S, Zhao C, et al. Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance [J]. *Cancer Res*, 2004,64(4):1403-1410.
- [2] Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004,25(8):423-429.
- [3] 何春梅,王柯敏,刘斌,等. 舌癌细胞耐药系 Tca8113/BLM 的建立及其耐药机理的分析 [J]. *中国癌症杂志*, 2004,14(5):443-446.
- [4] Arancia G, Molinari A, Calcabrini A, et al. Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells [J]. *Ital J Anat Embryol*, 2001,106(2 Suppl 1):59-68.
- [5] Bart J, Groen HJ, Hendrikse NH, et al. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation [J]. *Cancer Treat Rev*, 2000,26(6):449-462.
- [6] Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, et al. PET studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS [J]. *Curr Pharm Des*, 2004,10(13):1493-1503.
- [7] Wang RB, Kuo CL, Lien LL, et al. Structure-activity relationship: analyses of P-glycoprotein substrates and inhibitors [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2003,28(3):203-228.
- [8] Awara WM, El-Sisi AE, El-Sayad ME, et al. The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? [J]. *Pharmacol Res*, 2004,50(5):487-498.
- [9] Hashitani S, Urade M, Nishimura N, et al. Apoptosis induction and enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs by celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human head and neck carcinoma cell lines [J]. *Int J Oncol*, 2003,23(3):665-672.
- [10] Ponthan F, Wickström M, Gleissman H, et al. Celecoxib prevents neuroblastoma tumor development and potentiates the effect of chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo [J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(3):1036-1044.
- [11] van Wijngaarden J, van Beek E, van Rossum G, et al. Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF- κ B-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation [J]. *Eur J Cancer*, 2007,43(2):433-442.
- [12] Zhu HJ, Wang JS, Markowitz JS, et al. Risperidone and paliperidone inhibit p-glycoprotein activity in vitro [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2007,32(4):757-764.
- [13] Weiss J, Dormann SM, Martin-Facklam M, et al. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003,305(1):197-204.
- [14] de Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 61(1):52-69.
- [15] 李伟忠,王晓燕,丁彦青. 塞来昔布对 Tca8113 细胞环氧化酶-2 表达及诱导凋亡的作用 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2009,27(4):374-377.
- [16] 李伟忠,王晓燕,李祖国,等. 塞来昔布增强博来霉素对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 杀伤作用的研究 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2009,44(3):140-143.
- [17] Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors [J]. *FASEB J*, 2001,15(12):2057-2072.
- [18] Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, et al. NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2003,22(1):90-97.

[编辑:周永红;校对:黄国玲]