

As₂O₃ 对胃癌细胞 SGC7901/ADR 阿霉素耐药性逆转作用

杨鸿武*, 屈重霄, 关宏伟

Arsenic Trioxide Reversing the Multidrug Resistance of Gastric Carcinoma Cell Line SGC7901/ADR to Adriamycin

YANG Hong-wu, QU Chong-xiao, GUAN Hong-wei

The Pathology Department of First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, China

Corresponding Author: GUAN Hong-wei

Abstract :Objective To explore the reversal effect of Arsenic trioxide(As₂O₃) on multidrug resistance of gastric tumor cell line SGC7901/ADR to adriamycin(ADM) and the impact of As₂O₃ to the expressions of P-gp and GST- in SGC7901/ADR cells. **Methods** Multidrug resistant human gastric carcinomas cell line SGC7901/ADR was used as target cells, the sensitivity of cell to adriamycin was assessed with MTT assay, the drug concentration in cells was detected with flow cytometry(FCM), and the impact of arsenic trioxide to the expressions of P-gp, GST- was determined by immunohistochemical methods. **Results** Arsenic trioxide at 0.4 μmol/L to 0.8 μmol/L concentrations weren't evidently cytotoxic to resistant cell line SGC7901/ADR (P>0.05). As₂O₃ can enhance the sensitivity of SGC7901/ADR cells to adriamycin via down-regulation P-gp and GST- expressions, improving the concentration of ADM in SGC7901/ADR cells. **Conclusion** As₂O₃ can reverse partly the resistance of ADM by inhibiting the P-gp, GST- expressions of SGC7901/ADR cells and enhancing the ADM concentration in SGC7901/ADR cells.

Key words: Gastric carcinomas; SGC7901 cell line; SGC7901/ADR cell line; Multidrug resistance; Arsenic trioxide

摘要:目的 探讨三氧化二砷(As₂O₃)对胃癌细胞 SGC7901/ADR 阿霉素(ADM)耐药性的逆转作用和对 P-gp、GST- 表达的影响。**方法** 以胃癌多药耐药细胞株 SGC7901/ADR 为靶细胞,用 MTT 法检测 SGC7901/ADR 细胞对 ADM 的敏感性,用流式细胞仪检测细胞内药物浓度及免疫组织化学法检测细胞 P-gp、GST- 表达。**结果** 0.4~0.8 μmol/L As₂O₃ 对耐药细胞 SGC7901/ADR 无明显毒性 (P>0.05)。As₂O₃ 可下调 P-gp、GST- 表达,提高 SGC7901/ADR 细胞内 ADM 浓度,增加 SGC7901/ADR 细胞对 ADM 的敏感性。**结论** As₂O₃ 能够抑制 SGC7901/ADR 细胞 P-gp、GST- 表达,增加细胞内 ADM 药物浓度而部分逆转其对 ADM 的耐药性。

关键词:胃癌;SGC7901 细胞株;SGC7901/ADR 细胞株;多药耐药;三氧化二砷

中图分类号:R979.1;R735.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-8578(2006)03-0148-03

0 引言

三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)注射液主要用于治疗急性早幼粒白血病。最近研究发现,As₂O₃可引起白血病细胞 K562/ADR P-gp 表达下调,使其多药耐药性部分逆转,具有增强肿瘤细胞化疗敏感性的作用^[1];而 As₂O₃ 对实体瘤细胞株 SGC7901/ADR 是否具有相同作用还未见报道。本

实验以 SGC7901/ADR 细胞为研究对象,通过 MTT 法、流式细胞仪和免疫组织化学等方法研究 As₂O₃ 对 SGC7901/ADR 细胞的逆转作用及可能的机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 As₂O₃ (即亚砷酸注射液,哈尔滨伊达制药有限公司产品,批准文号:国药准字 H:19990191;批号:021031),MTT(美国 Sigma 公司产品),盐酸阿霉素(ADM)(浙江海正药业有限公司产品,批准文号:国药准字 H33021980,批号:021005),鼠抗人 P-gp、GST- 单克隆抗体及即用型

收稿日期:2005-04-12;修回日期:2005-07-07

作者单位:116011 大连医科大学附属第一医院病理科
(*现工作单位:辽宁省疾病预防控制中心)

通讯作者:关宏伟

作者简介:杨鸿武(1971-),男,硕士,主要从事胃癌多药耐药研究

第二代免疫组化 Elivision™ plus 广谱试剂盒(福州 Maixin 生物工程公司产品)。

1.1.2 细胞 人胃癌细胞株 SGC7901 和 SGC7901/ADR,由第四军医大学西京医院全军消化内科研究所惠赠。

1.2 方法

1.2.1 As₂O₃ 细胞毒性测定 取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,加入不同浓度的 As₂O₃ (3.2 ~ 0.1μmol/L),参照文献[2]说明进行,每个实验重复 3 次,选取细胞存活率 > 90 % 的药物浓度为该药的非细胞毒性浓度。

1.2.2 MTT 法测定细胞药物敏感性 实验分 3 组进行,按前述方法培养细胞 48 h,测定 A_{490nm} 值。分组如下:(1) SGC7901 (或 SGC7901/ADR) 细胞 + ADM (0.01 ~ 100mg/L,终浓度);(2) SGC7901 (或 SGC7901/ADR) 细胞 + ADM (0.01 ~ 100mg/L,终浓度) + As₂O₃ (0.4μmol/L,终浓度);(3) SGC7901 (或 SGC7901/ADR) 细胞 + ADM (0.01 ~ 100mg/L,终浓度) + As₂O₃ (0.8μmol/L,终浓度)。

1.2.3 细胞内 ADM 荧光强度测定 实验分 3 组进行,按前述方法培养细胞 24h,按照文献[3]采用流式细胞仪测定细胞内 ADM 荧光强度。分组如下:(1)加入 ADM (5mg/L,终浓度);(2)加入 As₂O₃ (0.4μmol/L,终浓度) 和 ADM (5mg/L,终浓度);(3)加入 As₂O₃ (0.8μmol/L,终浓度) 和 ADM (5mg/L,终浓度)。

1.2.4 用免疫组织化学方法测定细胞 P-gp、GST-表达 实验分 3 组进行:(1) SGC7901;(2) SGC7901/ADR;(3) SGC7901/ADR + As₂O₃ (0.8μmol/L,终浓度)。调整细胞数为 1 × 10⁵/ml 滴于处理过的载玻片上,培养 4h。按 Elivision 二步法免疫组织化学试剂盒说明进行。

1.2.5 统计方法 采用 SPSS 10.0 统计软件中的 t 检验作统计学分析。

2 结果

2.1 As₂O₃ 的细胞毒作用

As₂O₃ 在 0.8μmol/L 和 0.4μmol/L 时,耐药细

胞 SGC7901/ADR 的存活率分别为 93.92 % 和 95.84 %;相同剂量的 As₂O₃ 对敏感细胞 SGC7901 也无明显细胞毒性。故将 0.8μmol/L 和 0.4μmol/L 作为非细胞毒性药物浓度。

2.2 MTT 法测定细胞药物敏感性

0.8μmol/L 和 0.4μmol/L As₂O₃ 与 ADM 同时作用,可降低耐药细胞的存活率,增加耐药细胞对 ADM 的敏感性,逆转倍数分别为 2.11 和 1.58 (P < 0.01)。与 0.4μmol/L As₂O₃ 相比,0.8μmol/L 的 As₂O₃ 能显著增加耐药细胞对 ADM 的敏感性 (P < 0.05);而 As₂O₃ 对敏感细胞却无增敏作用 (P > 0.05),见表 1。

表 1 As₂O₃ 对 SGC7901/ADR 细胞 ADM 耐药性的逆转作用 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

组别	IC ₅₀ (mg/L)		RF	RI	P
	SGC7901	SGC7901/ADR			
对照组	0.095	5.861 ± 0.670	61.69		
一组	0.091	3.711 ± 0.213	40.78	1.58	< 0.01
二组	0.087	2.773 ± 0.164	31.87	2.11	< 0.01

:vs SGC7901; :vs SGC7901/ADR

2.3 As₂O₃ 对细胞内 ADM 浓度的影响

通过流式细胞仪检测细胞内 ADM 荧光强度,分析 As₂O₃ 对 SGC7901/ADR 细胞内 ADM 浓度的影响。由表 2 可见,SGC7901/ADR 细胞内 ADM 荧光强度比 SGC7901 低 4.65 倍 (P < 0.05);加入 0.4μmol/L As₂O₃ 后,SGC7901/ADR 细胞内荧光强度无显著性增加 (P > 0.05);加入 0.8μmol/L As₂O₃ 后,耐药细胞内 ADM 的荧光强度明显增加 (P < 0.01),增加倍数为 1.32 倍。

2.4 As₂O₃ 对 SGC7901/ADR 细胞 P-gp、GST-表达的影响

耐药细胞的 P-gp、GST- 表达明显高于敏感细胞 (P < 0.01),加入 As₂O₃ 后,耐药细胞 P-gp、GST- 表达明显降低 (P < 0.05),见表 3。

3 讨论

肿瘤细胞对化疗药的多药耐药性(MDR)是临床上的棘手问题,尤其在实体瘤中更为突出。各种

表 2 As₂O₃ 对 SGC7901/ADR 细胞内 ADM 荧光强度的影响 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞内 ADM 荧光强度	增减倍数	P
SGC7901 + ADM	11.63 ± 1.31		
SGC7901/ADR + ADM	2.06 ± 0.49	- 4.65	< 0.05
SGC7901/ADR + 0.4μmol/L As ₂ O ₃ + ADM	3.19 ± 1.13	0.55	> 0.05
SGC7901/ADR + 0.8μmol/L As ₂ O ₃ + ADM	4.78 ± 0.86	1.32	< 0.05

:vs SGC7901; :vs SGC7901/ADR

表 3 As_2O_3 对 SGC7901/ADR 细胞 P-gp、GST 表达的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	P-gp		GST-	
	阳性率 (%)	P	阳性率 (%)	P
SGC7901	29.6 \pm 4.9		31.6 \pm 4.8	
SGC7901/ADR4	47.8 \pm 6.1	< 0.01	46.4 \pm 4.9	< 0.01
SGC7901/ADR + As_2O_3	36.2 \pm 1.9	< 0.05	39.6 \pm 2.7	< 0.05

:vs SGC7901; :vs SGC7901/ADR

研究表明,肿瘤细胞 MDR 的产生是由多种因素共同作用的结果,其中肿瘤细胞膜上的药物外流泵向外排出药物,导致细胞内药物浓度降低是引起 MDR 的主要原因,P-gp 作为 ABC 家族的主要成员在化疗后表达增加,部分解释了 MDR 产生的原因^[4]。人们在探讨 MDR 发生机制的同时,也在寻找更为有效的逆转剂。我们研究发现 0.4 ~ 0.8 μ mol/L 的 As_2O_3 对细胞无明显毒性 ($P < 0.01$),可降低 P-gp 表达 ($P < 0.05$),增加细胞内 ADM 浓度 ($P < 0.05$),提高耐药细胞 SGC7901/ADR 对 ADM 的敏感性。因此我们推断 As_2O_3 部分逆转 SGC7901/ADR 细胞对 ADM 的耐药性与降低 P-gp 表达,抑制 ADM 外流有关。

GST 是一类参与化疗药的解毒、降低脂酯过氧化及修复 DNA 损伤有关的酶,在氮芥类化合物及 ADM 耐药细胞株中的改变最为显著^[5]。 As_2O_3 具有与细胞内 GSH 结合的作用,从而降低 As_2O_3 的细胞毒性,同样也可与 GST- 内的巯基结合抑制其活性,从而降低细胞内 GSH 含量,而 MRP 是一种 GSH 偶联的外流泵^[6],那么 As_2O_3 是否能够通过抑制 GST- 活性来影响 MRP 功能从而部分逆转肿瘤细胞的耐药性呢?在本研究中,我们发现 0.8 μ mol/ml As_2O_3 可显著降低 SGC7901/ADR 细胞 GST- 表达 ($P < 0.05$),因此,我们推测 As_2O_3 通过抑制肿瘤细胞内 GST- 的表达参与了对 SGC7901/ADR 细胞 ADM 耐药性的部分逆转作用。

本实验研究表明, As_2O_3 可降低 P-gp 和 GST- 表达,增加细胞内 ADM 浓度,部分逆转 SGC7901/ADR 胃癌细胞对 ADM 的耐药性,且逆转浓度远低于

于临床血药浓度,是具有临床应用价值的新型逆转剂。然而肿瘤细胞的 MDR 是由多种因素、多种机制共同作用的结果,涉及到多种转运蛋白的改变、解毒系统的激活、凋亡通路的改变、DNA 修复系统的增强等等,特别是多种转运蛋白共同转运一种抗癌药形成的耐药性是导致目前的逆转剂只能部分逆转肿瘤细胞耐药性的重要原因。随着人们对多药耐药机制的不断深入研究及新的不同机制的逆转剂的出现,联合应用 As_2O_3 和不同作用机制的逆转剂将会更有效地逆转肿瘤细胞的耐药性。

参考文献:

- [1] WEI Hulai, SU Haixiang, BAI Decheng, et al. Arsenic trioxide inhibits p-glycoprotein expression in multidrug-resistant human leukemia cells that overexpress the MDR1 gene[J]. Chin Med J, 2003, 116 (11): 1644-1648.
- [2] Lin HL, Liu TY, Wu CW, et al. Berberine modulates expression of mdr1 gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel[J]. Br J Cancer, 1999, 81 (3): 416-422.
- [3] Tanaka S, Aizawa K, Katayangi N, et al. Flow cytometric analysis of early steps in development of adriamycin resistance in a human gastric cancer cell line[J]. Jpn J Cancer Res, 1994, 85 (1): 86-92.
- [4] Ramesh S, Shanthi P, Krishnan KB, et al. Multidrug resistance 1 gene expression in Indian patients with gastric carcinoma[J]. Indian J Gastroenterol, 2003, 22 (1): 19-21.
- [5] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Expression of drug resistance gene products during progression of lung carcinomas[J]. Oncology Reports, 2002, 9 (6): 1181-1184.
- [6] Saengkhae C, Loetchutinat C, Garnier-Suillerot A. Kinetic analysis of rhodamines efflux mediated by the multidrug resistance protein (MRP1) [J]. Biophys J, 2003, 85 (3): 2006-2014.

[编辑: 贺文]