

MDR 逆转因子筛选技术 P-gp 细胞系的建立及其生物学特性评价

单保恩, 张 静

The Establishment of P-gp Expression on Cell Line and its Biological Characteristics

SHAN Bao-en, ZHANG Jing

Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Abstract :Objective To establish a cell line expressing P-glycoprotein(P-gp) stably by gene transduction and drug inducement, to screen drugs used to specifically reverse P-gp. **Methods** P-gp DNA of tumor cells in mice that was obtained by RT-PCR was transferred into colibacillus, constructed plasmids DNA and transduced it into retroviral vector, then to transfect B-MD-C1 cell. Northern blot analysis was used to investigate P-gp mRNA and flow cytometry was performed to assess the expression of P-gp. Proliferation assay was measured by MTT method. The biological characteristics of P-gp positive cell line were evaluated by drug accumulation assays and drug efflux assays. **Results** B-MD-C1 (ADR + / +) cell expressing P-gp stably was established. Significant overexpression of P-gp on B-MD-C1 (ADR + / +) cell was induced by Adriamycin, the cell survivor of B-MD-C1 (ADR + / +) was 80 % when the concentration of Adriamycin was 12 000ng/mL, while the cells of B-MD-C1 (wt) were all died when the concentration of Adriamycin was 1 000ng/mL. The accumulation of MD-123 in B-MD-C1 (ADR + / +) was lower than in B-MD-C1 (wt), the efflux of MD-123 in B-MD-C1 (ADR + / +) was higher. But the accumulation of MD-123 was significantly increased and the cells efflux was vanished in B-MD-C1 (ADR + / +) with Verapami. **Conclusion** B-MD-C1 (ADR + / +) is multidrug resistant, Verapami can reverse its resistance of P-gp. B-MD-C1 (ADR + / +) cell line can be used to screen drugs, those having the same character with Verapami may specifically reverse P-gp resistance.

Key words: Multidrug resistance; P-glycoprotein; Gene transduction; P-gp expression cell line

摘 要:目的 通过基因转导和药物诱导,建立稳定表达 P-gp 的细胞系,用于筛选特异性逆转 P-gp 的药物。方法 经 RT-PCR 反应得到小鼠肿瘤细胞 P-gp DNA,转化大肠杆菌,构建并将质粒 DNA 转导逆转录病毒载体中,进而感染 B-MD-C1 细胞。采用 Northern 印迹法和流式细胞技术检测细胞 P-gp mRNA 和 P-gp 分子的表达;以 MTT 法分析细胞的增殖活性;应用药物聚集和排放实验检测其生物学活性。结果 成功构建了稳定表达特异性 P-gp 基因和 P-gp 分子的 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞系。经阿霉素诱导,B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞 P-gp 的表达明显增高,在阿霉素增加至 12 000ng/mL 时,仍有 80 % 的细胞保持良好增殖状态,而 B-MD-C1 (wt) 细胞在 1 000ng/mL 时 100 % 细胞死亡。B-MD-C1 (ADR + / +) 较 (wt) 细胞对 MD-123 有较低的聚集量和较高的排放量,加入 P-gp 逆转剂 Verapamil 后,B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞 MD-123 聚集量增加,药物外排作用消失。结论 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞系具有较强的药物耐受性,可用于筛选特异性逆转 P-gp 的药物,Verapamil 可逆转 P-gp 耐药性,具有 Verapamil 特性者可视为具有逆转 P-gp 耐药性。

关键词:多药耐药;P-糖蛋白;基因转导;P-gp 细胞系

中图分类号:R730.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)07-0389-03

0 引言

化疗在恶性肿瘤综合治疗中占有很重要的地位。然而,耐药是肿瘤细胞免受药物攻击的重要防御机制,是化疗失败的主要原因。当肿瘤细胞对一

种抗肿瘤药物出现耐药的同时,对其他结构不同、作用靶位不同的抗肿瘤药物也产生耐药性,该现象称为多药耐药(multidrug resistance, MDR)^[1]。MDR 由多种途径诱导,由 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)介导的 MDR 常被称为经典 MDR^[2]。临床治疗中为了克服 MDR 制定了不同治疗措施,其中应用耐药逆转因子改变化疗疗效,是目前最被

收稿日期:2004-10-11;修回日期:2005-01-11

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院科研中心暨河北省肿瘤基因诊断、预防和治疗重点实验室

认可的方案。许多药物可与 P-gp 反应,但这种反应可被一些物质进行逆转,这些物质作为药物的竞争基质或空间异构调节剂,拮抗 P-gp 介导的 MDR,加强抗癌药物对 MDR 细胞的毒性^[3]。已有许多逆转 P-gp 的 MDR 调节剂用于临床,但有些制剂不能发挥应有的作用,主要原因是对 P-gp 特异性不强。我们通过基因转导和药物诱导,建立了稳定表达 P-gp 的细胞系,用于筛选特异性逆转 P-gp 的药物。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 逆转录病毒载体 LXS_N 购自美国 Life Technologies 公司。质粒 PCR2.1 使用美国 Clontech 公司产品。大肠杆菌 DH5 菌株购自日本 TOYOBO 公司。脂质体 Lipofectamine™、DMEM 培养基、阿霉素、Verapamil(已知 P-gp 抑制剂)、Polybrene 和 Trizol 购自 Gibco; RT-PCR 一步法试剂盒购自 Qiagen 公司;mdr1 基因 PCR 引物由上海 Sangon 公司合成;羊抗鼠 IgG-FITC 和 P-gp-FITC 抗体购自华美公司;荧光底物 MD-123 和 B-MD-C1 细胞由本室制备。

1.2 质粒的构建、转导病毒载体以及感染细胞 提取小鼠肿瘤细胞 RNA,在特异性 mdr1 基因 PCR 引物作用下^[4],进行 RT-PCR 扩增 P-gp 基因,扩增产物应用限制性内切酶进行酶切,在 T₄ DNA 连接酶作用下与 PCR 2.1 载体相连接,按 TA Cloning 试剂盒(Life Technologies)操作说明转化 DH5 及阳性重组质粒,筛选得到质粒 PCR 2.1 P-gp。将质粒插入逆转录病毒 LXS_N 载体中,回收 LXS_N/P-gp 病毒载体,在 lipofectamine 存在下,转染 B-MD-C1 (wt) 细胞(P-gp 表达阴性细胞),经 G418 (400μg/mL, Life Technologies) 筛选,收集 G418 抗性细胞 B-MD-C1 (ADR + / +)。

1.3 诱导高表达 P-gp 的 B-MD-C1 细胞 采用浓度梯度诱导法,向 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞培养液中加入阿霉素,并逐渐加大剂量,诱导其高表达 P-gp。

1.4 Northern 印迹分析 提取细胞总 RNA,于琼脂糖凝胶进行电泳,采用虹吸法将 RNA 转移至尼龙膜。将尼龙膜与[⁻³²P]dCTP 标记的小鼠 P-gp DNA 探针在 QuickHib 溶液(Stratagene, La Jolla, CA)和 0.1 mg/μl 鱼精蛋白 DNA 存在下,68 °C 杂交 1h,用 0.2 × SSC/0.1% SDS 溶液于 65 °C 洗涤数次,X 光片成像。尼龙膜与小鼠 GAPDH cDNA 的杂交作为对照。

1.5 流式细胞分析 B-MD-C1 细胞与抗 IgG-FITC 或抗 P-gp 单克隆抗体在 0.1% 叠氮钠存在下,室温培育 20min,用流式细胞仪(FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA)应用 CellQuest 软件进行分析。

1.6 细胞增殖实验分析 B-MD-C1 细胞(1 × 10⁴)接种于 96 孔培养板中(Falcon # 3072, Becton Dickinson Co. USA),分别加入不同浓度的阿霉素,37 °C、5%CO₂ 条件下培养 3 天,用 MTT 法分析细胞的增殖活性。

1.7 药物聚集和排放实验 应用流式细胞仪检测加入 Verapamil 前后,B-MD-C1 (ADR + / + ; wt) 细胞对荧光底物 MD-123 聚集量和排放量的变化。

2 结果

2.1 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞高水平表达 P-gp 的诱导 经 P-gp 基因转染的 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞虽有 P-gp 表达,但表达量不高。我们通过阿霉素诱导实验,使 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞的 P-gp 的表达稳定增加(见图 1)。

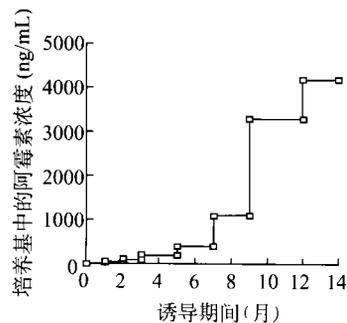


图 1 阿霉素诱导 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞 P-gp 的高水平表达

2.2 P-gp mRNA 表达分析 经阿霉素诱导后,B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞产生大量的 P-gp 基因拷贝,经 Northern 印迹分析,证明是特异性片段(图 2 泳道 2 和 4)。而 B-MD-C1 (wt) 细胞中无此特异性片段(见图 2 泳道 1 和 3)。

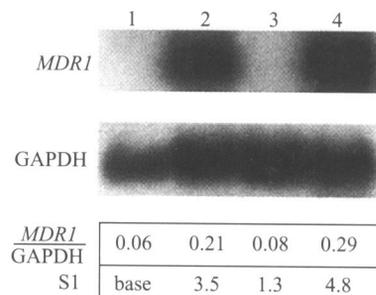


图 2 P-gp mRNA 表达的 Northern 印迹实验检测结果

2.3 P-gp 分子表达于细胞膜上 经免疫组织化学分析,B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞膜 P-gp 的表达呈强阳性(P-gp 被染成红色,细胞核被染成蓝色),而 B-MD-C1 (wt) 细胞则未见 P-gp 表达(见图 3)。

2.4 细胞药物抵抗性分析 经细胞增殖实验分析,B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞在阿霉素增加至 12 000

ng/mL 时,仍有 80% 的细胞增殖状态良好,而 B-MD-C1 (wt) 细胞在 1 000ng/mL 浓度时 100% 死亡。证明 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞具有较强的药物耐受性(见图 4)。

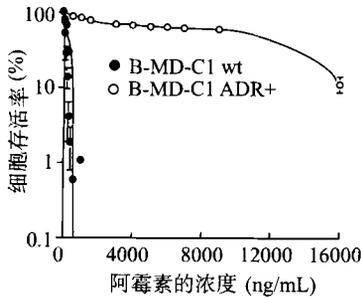


图 4 阿霉素存在下 B-MD-C1 (ADR + / + ; wt) 细胞的增殖反应性分析

2.5 P-gp 调节剂对 B-MD-C1 细胞的药物聚集和外排作用 B-MD-C1 (wt) 细胞对荧光底物 MD-123 的聚集量明显高于 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞,但加入 Verapamil 后,两种 B-MD-C1 细胞均有 MD-123 的大量聚集,说明 Verapamil 逆转了 P-gp 耐药性。同样,B-MD-C1 (wt) 细胞对 MD-123 的排放量较少,而 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞对 MD-123 排放量多。当加入 Verapamil 后,B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞对 MD-123 外排作用消失,细胞荧光强度增加,说明 Verapamil 逆转了 P-gp 耐药性。在药物筛选中,具有 Verapamil 特性者可视为具有逆转 P-gp 耐药性(结果未显示)。

3 讨论

化疗虽然成为肿瘤治疗的三大治疗手段之一,而且有数十种化疗药物用于临床,但化疗对所有肿瘤的总有效率不超过 14%,其主要原因是 MDR 的产生^[5]。MDR 产生的耐药机制包括:减少药物吸收、增加药物排出、减少药物活性、加强药物失活、药物靶分子的过表达和变异以及增加药物的分解等。消除耐药最有效的办法,化疗同时或预先投入 MDR 逆转因子^[6]。由于目前用于临床逆转 MDR 的药物还较少,为此我们应用 PCR、RT-PCR 技术直接从小鼠肿瘤细胞中获得 P-gp cDNA,插入经酶切的逆转录病毒 LXSXN 载体中,感染 B-MD-C1 细胞,建立了 B-MD-C1 (ADR + / +) 细胞。经 Northern blot 实验、免疫组化实验和流式细胞分析,显示该肿瘤细胞具有 P-gp 的高表达,而 wt 细胞则未见 P-gp 表达,经药物聚集和排放实验,证明该细胞系是一种稳定的、高通量的逆转抗肿瘤药物耐药性的

筛选系统,可用于筛选特异性逆转 P-gp 的药物。

许多中药具有抗 MDR 作用,是因为这些中药中的成分通过在基因转录和翻译水平抑制 mdr 的表达,使 P-gp 表达量减少,达到逆转耐药性。Kim 等^[7]研究发现,槲皮素(中药鱼腥草等多种植物中的黄酮类化合物)可抑制 mdr1 基因启动子中 HSF 磷酸化,抑制 HSF 与热休克反式作用因子(HSE)的结合能力,从而影响 mdr1 基因转录。有些中药提取物与化疗药物竞争 P-gp 的药物结合位点,抑制药物外溢,使胞内药物浓度升高^[8]。我们应用 B-MD-C1 (ADR + / + ;wt) 细胞系通过对中药蝙蝠葛根(北豆根)的蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱等成分研究结果表明,这两种成分具有钙通道阻滞剂作用,可竞争性地与 P-gp 结合,从而可阻断药物外排;另外,我们也从中药中筛选出 5 种逆转 P-gp 作用的化合物,正在进行作用机理和动物实验中。

(本文图 3 见第 455 页)

参考文献:

- [1] Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents[J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 85(3): 217-229.
- [2] Schneider E, Yamazaki H, Sinha BK, et al. Buthionine sulphoximine-mediated sensitization of etoposide-resistant human breast cancer MCF7 cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein involves increased drug accumulation[J]. *Br J Cancer*, 1995, 71(4): 738-743.
- [3] Lau A, MighLingale S, Taylor GP, et al. Enhanced MDR1 gene expression in human T-cell leukemia virus-infected patients offers new prospects for therapy[J]. *Blood*, 1998, 91(7): 2467-2474.
- [4] Noskova V, Dzubak P, Kuzmina G, et al. In vitro chemoresistance profile and expression/function of MDR associated proteins in resistant cell lines derived from CCRF-CEM, K562, A549 and MDA MB 231 parental cells[J]. *Neoplasma*, 2002, 49(6): 418-425.
- [5] Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, et al. Placental p-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice[J]. *Reprod Toxicol*, 1998, 12(4): 457-463.
- [6] Schinkel AH, Borst P. Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins[J]. *Semin Cancer Biol*, 1991, 2(4): 213-226.
- [7] Kim SH, Yeo GS, Lim YS, et al. Suppression of multidrug resistance via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells[J]. *Exp Mol Med*, 1998, 30(2): 87-92.
- [8] Pan QC, Tian H. Rereral of multidrug resistance by varice principles from Chinese herbal medicine[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1996, 41(5): 410-416.

[编辑校对:刘红武]

MDR 逆转因子筛选技术 P-gp 细胞系的建立及其生物学特性评价

(正文见 389 页)

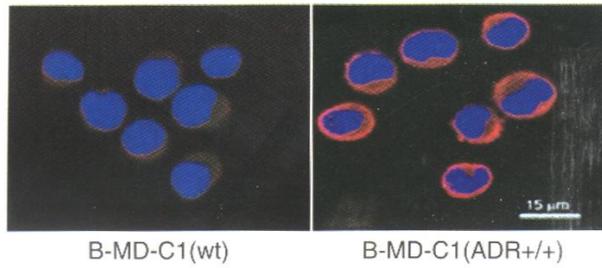


图3 B-MD-C1 细胞 P-gp 表达的免疫组化分析

窦组织细胞增生伴巨大淋巴结病 2 例及文献复习

(正文见 453 页)

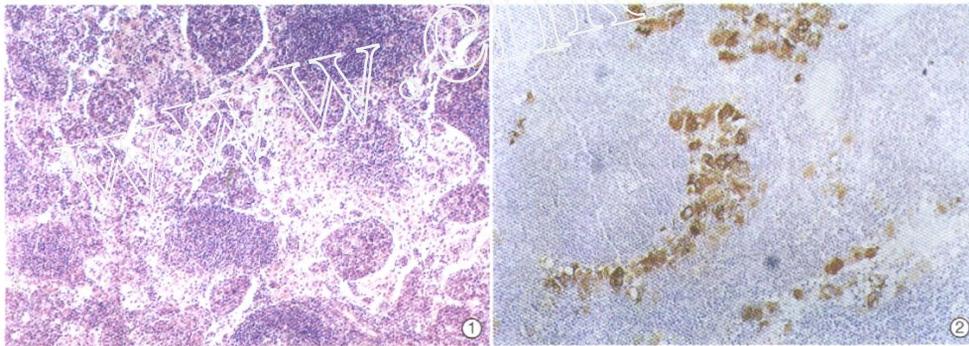


图1 淋巴窦明显扩张, 淋巴结实质萎缩, 窦内组织细胞吞噬大量淋巴细胞 (HE × 100)

图2 窦内组织细胞 S-100 阳性 (SP × 100)

CD147、MMP-2 与 MMP-9 在 NHL 中的表达及临床病理意义

(正文见 420 页)

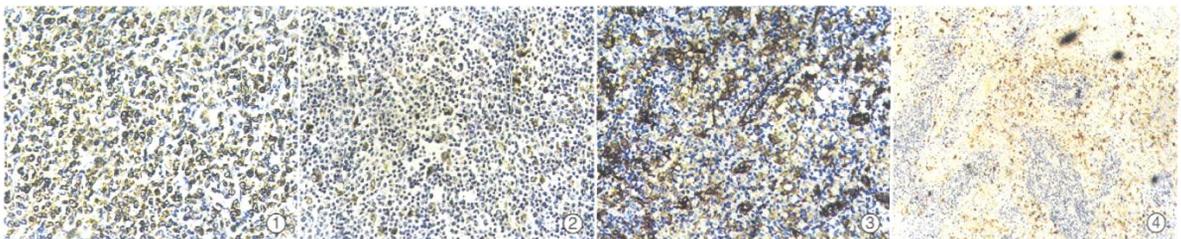


图1 NHL 中 CD147 弥漫性阳性 (SP × 200)

图2 NHL 中 CD147 散在性阳性 (SP × 200)

图3 NHL 中 MMP-2 弥漫性阳性 (SP × 200)

图4 NHL 中 MMP-9 弥漫性阳性 (SP × 200)