

干扰素和环孢霉素 A 协同逆转 K562/ADM 细胞对阿霉素的耐药性

魏虎来,葛建国,赵怀顺,王东海,白德成

Synergistic Reversal of Multidrug Resistance of Leukemia Cells by γ -Interferon and Cyclosporine A

WEI Hu-lai, GE Jian-guo, ZHAO Huai-shun, WANG Dong-hai, BAI De-cheng

Laboratory Center for Medical Science, Lanzhou University; Key Laboratory of Preclinical Study for New Chinese Traditional Drugs of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Abstract: **Objective** To investigate the synergistic reversal effect of γ -Interferon (γ -IFN) and Cyclosporine A (CsA) on the multidrug-resistance of human leukemia K562/ADM cells. **Methods** Human leukemia K562/ADM cell that overexpresses P-glycoprotein (P-gp) encoded by human multidrug resistance gene (mdr1) was used as the target cells. The γ -IFN- or / and CsA-administrated K562/ADM cells were analyzed for proliferation and sensitivity to adriamycin using MTT method, P-gp expression was determined by flow cytometry, and the intracellular adriamycin accumulation was examined by confocal laser-scanning fluorescence microscopy. **Results** K562/ADM cells were highly resistant to adriamycin, and cross-resistant to daunorubicin and etoposide, but uncross-resistant to CsA. CsA, γ -IFN or γ -IFN plus CsA both significantly decreased the drug-resistance of K562/ADM cells to adriamycin. Cytometric and confocal microscopic analysis showed that CsA and γ -IFN did not down-regulate the mdr1/P-gp expression in K562/ADM cells, and contrarily exerted a stress-activated increase of P-gp synthesis, but they could inhibit the pump function of P-gp and increase the adriamycin accumulation in K562/ADM cells. **Conclusion** γ -IFN combined with CsA synergistically reverse the multidrug-resistance of K562/ADM cells and increase their sensitivity to conventional chemotherapeutic agents via the inhibition of pump function of P-glycoprotein not down-regulation of its expression.

Key words: γ -Interferon; Cyclosporine A; Leukemia; Multidrug resistance (MDR); Synergism; Reversal

摘要: **目的** 观察干扰素(γ -Interferon, γ -IFN)和环孢霉素 A(Cyclosporine A, CsA)对白血病 K562/ADM 细胞耐药性的协同逆转效应。**方法** 以多药耐药基因/P-糖蛋白(Multidrug resistance gene/P-glycoprotein, mdr1/P-gp)超表达的 K562/ADM 细胞为靶细胞,MTT 比色法检测药物的细胞毒效应;流式细胞仪检测细胞 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达水平;激光共聚焦显微镜观察细胞内阿霉素含量变化。**结果** K562/ADM 细胞对阿霉素呈高度耐药性,并与柔红霉素和鬼臼乙叉甙交叉耐药,但与 CsA 无交叉耐药。CsA 和 γ -IFN 单独或联合应用均对 K562/ADM 细胞的耐药性有较强的抑制效应。流式细胞仪和激光共聚焦显微镜分析发现 γ -IFN 和 CsA 单独或联合均不能下调细胞 mdr1/P-gp 的表达,反而应激性地刺激耐药细胞 P-gp 的合成增加,但可抑制 P-gp 的功能、增加 K562/ADM 细胞内阿霉素的积聚。**结论** γ -IFN 和 CsA 联合可协同逆转耐药白血病细胞的耐药性,其作用机制为抑制 P-gp 的功能而非下调 mdr1/P-gp 的表达水平。

关键词: γ -干扰素;环孢霉素 A;白血病;多药耐药;协同;逆转

中图分类号: R73-36; R733.7; R730.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2005)02-0099-03

0 引言

白血病细胞经化疗药物诱导而发生多药耐药

(Multidrug resistance, MDR)是化疗失败和复发的根源。多药耐药基因(mdr1)编码的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp 或 P-170)可迅速地将进入细胞内的药物“泵”出细胞外,降低白血病细胞内的药物浓度,无法构成对白血病细胞的有效杀伤而导致 MDR 的发生^[1]。目前临床克服白血病耐药多采用环孢霉素 A(Cyclosporine A, CsA)、异博定等化学逆转剂,由于不良反应的限制,效果并不十分理

收稿日期:2004-02-10;修回日期:2004-03-25

基金项目:甘肃省中青年科技基金资助项目(YS981-A23-010);甘肃省培养造就跨世纪学术技术带头人专项基金资助项目(G3KZ-2-031)

作者单位:730000 兰州大学医学实验中心;甘肃省中药新药临床前研究重点实验室

想^[2,3]。本研究采用基因重组 γ -干扰素 (γ -Interferon, γ -IFN) 和环孢霉素 A (Cyclosporine A, CsA) 联合逆转 K562/ADM 细胞的耐药性。

1 材料与方法

1.1 试剂

MTT 购自 Sigma 公司; PE 标记 UIC₂、PE 标记 IgG_{2a} 购自 Coulter-Immounech 公司; 阿霉素 (Adriamycin, ADM) 为日本明治医药公司产品; 柔红霉素 (Daunorubicin, DNR) 为意大利 Pharmacia & Upjohn 公司产品; 鬼臼乙叉甙 (Etoposide, Vp16) 由兰州大学化学系合成。CsA 为瑞士 Novartis 公司产品; IFN- γ 为天津华立达生物工程有限公司生产。

1.2 靶细胞

K562 细胞及其 mdr1 基因超表达多药耐药株 K562/ADM 细胞由本室保存, 用含 20% 小牛血清 (Hyclone) 的 RPMI 1640 培养液 (Gibco BRL) 培养。K562/ADM 细胞培养过程中定期添加 ADM (5.2 μ mol/L), 以刺激其有效耐药性。ADM 处理的细胞在无 ADM 的条件下培养 1 周方可用于实验。所有实验均重复 3 次。

1.3 细胞增殖活性和耐药性

K562 细胞 (1×10^8 /L) 和 K562/ADM 细胞 (2×10^8 /L) 接种于 96 孔培养板 (丹麦 NUNC) 中, 药物浓度分别为 ADM 0.02 ~ 172.4 μ mol/L, CsA 0.5 ~ 20 mg/L, γ -IFN 10^5 ~ 10^6 U/L, 在 37 \pm 5% CO₂ 条件下培养 24 ~ 72 h 后 MTT 法^[4] 检测细胞增殖率和半数抑制浓度 (IC₅₀)。

耐药倍数 = (K562/ADM) IC₅₀ / K562 IC₅₀。

1.4 细胞耐药性逆转

K562/ADM 细胞以 (2×10^8 /L) 接种于 96 孔培养板中, 对照组加入 ADM 0.02 ~ 172.4 μ mol/L; 逆转组分别为 ADM + CsA (1 mg/L)、ADM + γ -IFN (10^6 U/L) 和 ADM + CsA (1 mg/L) + γ -IFN (10^6 U/L)。培养 72 h 后 MTT 法^[4] 检测测定细胞增殖率和 IC₅₀。耐药逆转倍数 = 对照组 IC₅₀ / 逆转组 IC₅₀。

1.5 流式细胞法检测 P-gp 表达

参照文献^[5]。K562/ADM 经 CsA, γ -IFN 和 CsA + γ -IFN 处理 72 h 后, 收集细胞制成 1×10^9 /L 的细胞悬液, PBS 洗涤, PE 标记的 P-gp 单抗 (UIC₂)₄ 避光反应 30 min, PE 标记的小鼠 IgG_{2a} 为阴性对照, PBS 洗涤后重悬, 流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter EPICS XL) 检测细胞 P-gp 阳性率和平均荧光强度。

1.6 激光共聚焦显微镜检测 P-gp 功能

参照文献^[6]。K562/ADM 细胞经 CsA (1 mg/L)、 γ -IFN (10^6 U/L) 和 CsA + γ -IFN 分别处理 72 h 后, 再与 ADM (51.7 μ mol/L) 37 \pm 5% CO₂ 共育 1 h, 冷 PBS 洗涤, 置冰浴, 激光共聚焦显微镜 (Confocal, 德国 Leica TCS SP2) 下观察细胞内 ADM 的荧光强度。

2 结果

2.1 K562/ADM 细胞的耐药性

与其亲本 K562 细胞比较, K562/ADM 细胞对 ADM 显著耐药, 其 ADM IC₅₀ 较前者高 118 倍, 并与 DNR 和 Vp16 交叉耐药, 但与 CsA 无交叉耐药性, 见表 1、图 1; 1×10^5 ~ 1×10^6 U/L γ -IFN 对 K562 和 K562/ADM 细胞的增殖均无影响。

表 1 K562/ADM 细胞对 ADM、DNR 和 Vp16 的耐药性

细 胞	IC ₅₀ (μ mol/L)		
	ADM	DNR	Vp16
K562	0.71 \pm 0.05	0.28 \pm 0.04	15.99 \pm 0.78
K562/ADM	83.89 \pm 11.07	28.41 \pm 5.38	153.22 \pm 11.49
耐药倍数	118.16	101.46	9.58

n = 3

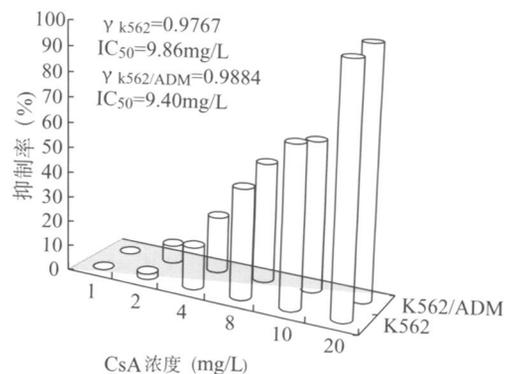


图 1 CsA 对 K562 和 K562/ADM 细胞增殖的抑制作用

2.2 CsA 和 γ -IFN 对 K562/ADM 细胞耐药性的逆转作用

如表 2 所示, 1 mg/L CsA 可使 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性增高 21 倍; γ -IFN (1×10^6 U/L) 作用可使 K562/ADM 细胞对 ADM 的 IC₅₀ 值由 83.89 μ mol/L 降至 26.95 μ mol/L, 降低 3 倍; CsA (1 mg/L) 和 γ -IFN (1×10^6 U/L) 联合应用 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性增高 34 倍, 呈协同效应。

表 2 CsA 和 γ -IFN 对 K562/ADM 细胞耐药性的逆转作用

药 物	ADM IC ₅₀ (μ mol/L)	耐药逆转倍数
对 照	83.89 \pm 11.07	/
CsA (1 mg/L)	4.01 \pm 1.39 *	20.9
γ -IFN (1×10^6 U/L)	26.92 \pm 11.32 *	3.1
CsA + γ -IFN	2.45 \pm 0.61 *	34.3

n = 3; * P < 0.01

2.3 CsA、-IFN 对 K562/ADM 细胞 P-gp 表达和功能的影响

流式细胞术(Flow cytometry, FCM)检测证实无论 CsA 和 -IFN 单独或联合均对 K562/ADM 细胞 P-gp 表达的阳性率无明显影响,但 P-gp 表达的平均荧光强度(Mean fluorescence intensity, MFI)反而增高,见图 2,推测为药物刺激所致的细胞应激性保护反应;Confocal 观察 K562/ADM 细胞内仅有非常微弱的 ADM 荧光反应,而 CsA 和 -IFN 处理后细胞内 ADM 荧光强度明显增强。说明 CsA 和 -IFN 并不是通过抑制 K562/ADM 细胞 mdr1/P-gp 的表达,而是通过抑制 P-gp 的功能增加细胞内药物积聚而达到逆转耐药的作用。

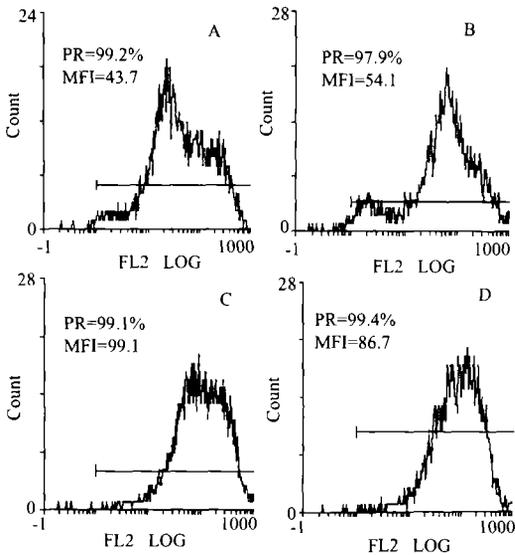


图 2 -IFN 和 CsA 对 K562/ADM 细胞 P-gp 表达的影响
PR: 阳性率; MFI: 平均荧光强度
A: 对照 K562/ADM; B: -IFN 1 ×10⁶ U/L; C: CsA 1mg/L; D: CsA + -IFN

3 讨论

白血病细胞对化疗药物的多药耐药性严重影响临床白血病的治疗效果和预后。耐药逆转是干预白血病耐药的重要措施,目前用于白血病耐药逆转的耐药调整剂很多,但具有临床实用价值的并不多。CsA 是从真菌中提取的天然药物,是一种强免疫抑制剂,临床上用于逆转白血病及其他肿瘤的耐药性,取得了较好的效果,并发现能增强化疗药物对肿瘤细胞的诱导凋亡作用,但其严重的不良反应限制了临床应用^[3]。本研究中对较低浓度的 CsA 即对白血病多药耐药细胞株 K562/ADM 细胞有很强的逆转效应。进一步研究发现 CsA 并不抑制 mdr1/P-gp

的表达,反而应激性地刺激使 P-gp 的合成有所增加,但 CsA 对 P-gp 的“药泵”功能有较强的抑制效应,细胞内药物积聚增加,提示 CsA 主要通过抑制 P-gp 的功能而发挥耐药逆转效应。

干扰素具有广泛的生物活性,已广泛应用于临床疾病的治疗,研究发现干扰素亦可逆转白血病细胞的多药耐药性^[7],但干扰素逆转耐药的机制尚不完全清楚。本研究发现 -干扰素并不能下调 K562/ADM 细胞 mdr1/P-gp 的表达,但同 CSA 一样对 P-gp 的功能有较强的抑制作用,推测 -干扰素可能也是通过抑制 P-gp 的功能及其他途径从而达到逆转耐药作用的。

CsA 的耐药逆转很强,但有较强的毒副作用,而 -IFN 的逆转作用相对较弱但无明显不良反应。CsA 和 -IFN 均可抑制 P-gp 的功能而增加耐药细胞内抗癌药物的浓度而杀伤肿瘤细胞,两者联合可协同性地逆转耐药细胞对化疗药物的耐药性。因此, -IFN 与 CsA 联合应用可提高白血病耐药性的逆转效果,并可减小 CsA 的用量以减轻其不良反应。

参考文献:

- [1] Huang Y, Ibrado AM, Reed JC, et al. Co-expression of several molecular mechanisms of multidrug resistance and their significance for paclitaxel cytotoxicity in human AML HL-60 cells [J]. *Leukemia*, 1997, 11(2): 253-257.
- [2] Miller TP, Grogan TM, Dilton WS. P-glycoprotein expression of in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil [J]. *J Clin Oncol*, 1991, 9(1): 17-24.
- [3] Yahanda AM, Adler KM, Fisher GA. Phase I trial of etoposide with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance [J]. *J Clin Oncol*, 1992, 10(10): 1624-1634.
- [4] Ruefli AA, Smyth MJ, Johnstone RW. HMBA induces activation of a caspase-independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance [J]. *Blood*, 2000, 95(7): 2378-2385.
- [5] Fu JX, Wang W, Cen JN, et al. Retroviral mediated efficient transfer and expression of multiple drug resistance gene to human leukemia cells [J]. *Chin J Cancer Res*, 2000, 12(2): 120-124.
- [6] Lautier D, Bailly JD, Demur C, et al. Altered intracellular distribution of daunorubicin in immature acute myeloid leukemia cells [J]. *Int J Cancer*, 1997, 71(2): 292-299.
- [7] 平宝红,周淑芸,刘启发,等. 干扰素逆转白血病细胞多药耐药性的研究及机制的初步探讨[J]. *中华血液学杂志*, 1996, 17(1): 13-15.

[编辑:贺文;校对:杨卉]