

EGCG 对人耐药口腔表皮样癌细胞株耐药逆转的实验

梁 钢¹, 林晓贞¹, 唐安洲², 黎 莉¹, 周 铭¹

MDR-reversing Effect of (-)epigallocatechin-3-gallate on Human MDR Cell Lines KBV200

LIANG Gang¹, LIN Xiao-zhen¹, TANG An-zhou², LI Li¹, ZHOU Ming¹

1. Dep of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital

Abstract: Objective Experiments were carried out to examine the potential of EGCG(epigallocatechin-gallate) as a multidrug resistance(MDR) reversal agents. **Methods** MTT assay was used to detect cytotoxicity of EGCG and vincristine (VCR). Intracellular concentration of VCR was detected by high performance liquid chromatography(HPLC). Flow cytometry was used to determine the expression of P-gp. In a BALB/C-nu/nu mouse model, cells of drug-sensitive KB and KBV200 (MDR) cell lines were inoculated to yield tumors in opposite flanks. EGCG and VCR were injected to the peritoneal of nude mice with carcinoma xenografts. MDR1 mRNA expression was observed with reverse-transcriptase PCR. **Results** Survival of cells incubated with EGCG at 75 mg/l for 72 h was over 80%. EGCG at 8 mg/l almost completely reversed resistance to VCR in KBV200 cells and produced a 13.0-fold reversal of MDR. It increased intracellular concentration of VCR in KBV200 cells while not influence that in KB cells. In KBV200 xenograft model, neither EGCG nor VCR inhibited tumor growth. However, VCR and EGCG combined inhibited tumor growth by 72.8%. EGCG inhibited MDR1 expression and augmented accumulation of VCR in KBV200 cells. **Conclusion** The results suggest that EGCG is a potent MDR-reversing agent in vitro and in vivo. The mechanism is probably associated with down-regulating the expression of MDR1 and P-gp. So that increases the concentrations of anticancer drug in tumor cells.

Key words: Multidrug resistance; P-glycoprotein; Resistance; reversal agents; Squamous cell carcinoma

摘 要:目的 研究 EGCG 对人多药耐药口腔癌细胞 KBV200 的细胞毒增敏作用及裸鼠移植瘤的抑瘤作用。方法 MTT 法检测药物对细胞的毒性作用,流式细胞术分别检测细胞 P 糖蛋白的表达, HPLC 检测细胞内 VCR 浓度,采用 KB 和 KBV200 细胞分别种植同一裸鼠左、右腋下,观察用药后体重、抑瘤率的改变。RT-PCR 检测瘤组织 mdrl 的表达。结果 EGCG 在 100mg·L⁻¹ 以下剂量对两株肿瘤细胞的抑制率均小于 10%,EGCG 与 VCR 联合应用可明显提高 VCR 的细胞毒作用;EGCG 联合 VCR 作用后 KBV200 细胞内 VCR 浓度升高,P 糖蛋白的表达下降;EGCG 可增加 VCR 对 KBV200 的抑瘤作用,可降低瘤组织 MDR1 的表达量。结论 EGCG 可增强 VCR 对多药耐药肿瘤细胞 KBV200 的细胞毒作用,机制可能与降低 MDR1-mRNA、P-gp 表达,提高细胞内药物浓度有关。

关键词:多药耐药;P 糖蛋白;耐药逆转剂;鳞癌

中图分类号:R739.85 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0004-04

0 引言

口腔癌在世界范围内高发,居头颈部肿瘤第二位,是十大最低患者生存率肿瘤之一,原发多药耐药(Multidrug resistance,MDR)及继发 MDR 较为严重,常见机制是 MDRI、LRP(Lungresistance related protein,LRP)、MRP1(Multidrug-resistance related

protein,MRP)表达升高,导致相应胞膜或核膜蛋白表达增高^[1]。如何解决以鳞癌、肝癌等为代表的实体瘤 MDR 问题是当前抗肿瘤研究的热点。目前 MDR 逆转剂多数为 P 糖蛋白(P-gp)功能抑制剂,如维拉帕米(Verapamil,VRP,Ver),临床上的 VRP 最大耐受浓度为 2μmol/L,这一浓度在体外组织培养中不能逆转 MDR,限制了临床的使用。到目前为止,二、三代多药耐药逆转剂(Reuersalagents,RRA)尚未成功应用于临床。因此在天然药物中寻找高效、低毒 RRA 或改造已知 RRA 的化学结构以降低其毒性是主要研究方向。国内外研究绿茶提取

收稿日期:2005-12-27;修回日期:2006-03-01

基金项目:广西科技厅自然科学基金项目(0004302)

作者单位:1. 530021 南宁,广西医科大学药理教研室;

2. 第一临床医学院耳鼻喉科

作者简介:梁钢(1957-),男,教授,主要从事抗肿瘤新药研究

物,特别是 EGCG 的抗肿瘤和逆转 MDR 作用,研究集中于逆转机制与 MDR1 或 MRP1 的关系,部分结果表明 EGCG 可通过抑止 P-gp 功能发挥逆转作用,而部分资料显示其逆转作用独立于 P-gp 和 MRP2,体内实验较缺乏;我们前期已证实 EGCG 在体外可逆转人 MDR 肝癌细胞 BEL-7404/ADR 的 MDR 作用^[2]。本研究探讨 EGCG 体内逆转 KBV200 的 MDR 作用,为进一步发现新的多药耐药逆转剂和可能的作用靶点提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞与动物

人口腔表皮样癌细胞株 KB 和 KBV200 由北京大学临床肿瘤学院许佐良教授惠赠。BALB/C-nu/nu 裸小鼠(4~5 周),体重(15±2)g,雌雄各半,购自上海斯莱克实验动物公司,饲养于 SPF 条件下。

1.2 药物及试剂

盐酸长春新碱(VCR)购于上海华联制药有限公司;EGCG 按专利 CN1060488A 分离得;MTT 购自 Sigma,RPMF1640、新生牛血清购自 GIBCO-BRL;抗 P-gp-PE 抗体:Becton Dickinson;小量组织总 RNA 快速抽提纯化试剂盒购自北京华舜;First strand cDNA synthesis kit、MassRuler™ DNA Ladder 购自 MBI。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 用含 10% 新生牛血清的 RPMF-1640 培养液于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 环境中培养 KBV200 培养液中含有 200nmol/L VCR 以维持耐药性,用 0.25% 胰蛋白酶联合 0.02% EDTA 消化传代。

1.3.2 耐药倍数测定(MTT 法)^[2] 对数生长期细胞,制成(2~5)×10⁵/ml 悬液,每孔 100μl 接种于 96 孔板,加入相应浓度的含药培养液,参照文献[2],用酶联免疫检测仪检测波长 570nm 处的吸光度。细胞存活率=(实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。由细胞存活率与药物浓度作图,求出 IC₅₀ 值。逆转倍数=逆转前耐药细胞 IC₅₀/逆转后耐药细胞 IC₅₀。MTT 试验在不同日重复 3 次。

1.3.3 高效液相色谱(HPLC)检测细胞对 VCR 的转运

1.3.3.1 细胞对 VCR 的被动转运 用含 15mM 叠氮化钠、10mM 脱氧葡萄糖和 10% NBS 的 PBS (pH 7.4) 处理细胞 15min,换用含 1.91mg/L 的 VCR、或又含 EGCG 8mg/L 的上述培养液孵育 2h,冷 PBS 洗涤 3 次,用 0.5ml 冷三蒸水,-20℃ 反复冻融 3 次,取上清做 HPLC 分析。色谱条件及数据处理

等详见文献[3]。

1.3.3.2 细胞对 VCR 的摄入和外排 参照文献[4],细胞接种于 24 孔培养板,待长满孔板,用含 10mM 葡萄糖和 10% NBS 的 PBS 培养 1h,换为相应培养液 2h,冷 PBS 洗涤 3 次,同样方法检测 VCR 浓度;单层细胞用 8mg/L EGCG 的培养液处理 1h,换用相应含 VCR 培养液处理 2h, PBS 洗涤 1 遍,换为不含 VCR,只含 EGCG 的培养液,培养至指定时间,收获细胞,同样方法检测 VCR 含量。

1.3.4 流式细胞仪检测 P-gp 表达 按分组给药消化各组细胞,制备 1×10⁶/ml 浓度的细胞悬液,取 5μl 抗 P-gp-PE 加入 50μl 细胞悬液中,充分混匀,室温避光孵育 30min 后, PBS 洗涤,加入 0.5ml 1% 多聚甲醛混匀,上机检测 488nm 激发波长下的荧光强度。

1.3.5 裸小鼠异种移植瘤动物模型的建立^[5] 24 只裸小鼠,取对数生长期 KB、KBV200 细胞制成 5×10⁷/ml,各取 0.2ml 分别接种于裸小鼠左、右侧腋窝皮下,第 4 天见皮下肿瘤生长,两株细胞出瘤率均 100%。分组:雌雄各半,随机分组:对照组、VCR 组、EGCG 组、EGCG 联合 VCR 组(VE 组),两种移植瘤分别用 KB-(对照组、VCR 组、EGCG 组、VE 组),KBV-(对照组、VCR 组、EGCG 组、VE 组)代表,于接种后第 8 天,KB 肿瘤体积平均为(0.159±0.058)cm³,KBV200 肿瘤体积平均为(0.125±0.056)cm³,开始用药。EGCG 20mg·kg⁻¹,一日一次;VCR 0.46mg·kg⁻¹,四日一次,均腹腔注射。每隔一天测量肿瘤最长径(L)和其垂直径长(D),按下式计算肿瘤体积(V):V=1/6·L·D²,观察至给药 14 天结束。颈椎脱臼致死,取瘤组织,称瘤重,计算抑瘤率,抑瘤率(IR)=(1-实验组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

1.3.6 RT-PCR 检测多药耐药基因的表达 提取瘤组织总 RNA,逆转录为 cDNA,取 1μl cDNA,按说明建立 20μl 的体系,PCR 扩增引物及条件:MDR1 参照文献[2],LRP 及 MRP1 参考文献[6],产物长度分别为 157bp,285bp,256bp;-actin 上游引物 AAG CAG GAG TAT GAC GAG GAT CCG,-actin 下游引物 GCC TTC ATA CAT CTC AAG TTG G,产物 559bp。产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描成像,Quantity one 软件分析产物光密度值,用目的基因与 -actin 的比值表示相应基因的表达水平。

1.3.7 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.5 进行 Student t 检验或析因设计方差分析。

2 结果

2.1 EGCG 对肿瘤细胞增殖的影响

药物作用后细胞存活率见表 1,作用 72h KBV200 的 IC_{50} 为 (1.91 ± 0.07) mg/L,KB 的 IC_{50} 为 0.036 mg/L, KBV200 的耐药倍数为 53 倍。30mg/L 的 EGCG 联合 0.14 mg/L 的 VCR 处理后,检测 KBV200 的 IC_{50} 为 (0.14 ± 0.03) mg/L;而 0.3 mg/L 的维拉帕米联合不同浓度 VCR 处理后,KBV200 的 IC_{50} 为 (0.45 ± 0.06) mg/L,逆转倍数分别为 13.0 倍和 4.3 倍,两者相比有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 EGCG 和 VCR 对两种肿瘤细胞的细胞毒性作用 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

EGCG (mg/L)	surviving rate (%)		VCR (mg/L)	surviving rate (%)	
	KB	KBV200		KB	KBV200
75	83.5 ± 7.1	85.4 ± 4.2	0.024	62.4 ± 14.3	90.4 ± 15.8
150	71.7 ± 6.2	77.2 ± 3.9	0.072	37.1 ± 8.5	87.6 ± 11.3
285	57.6 ± 4.3	62.7 ± 8.4	0.12	24.5 ± 9.8	82.2 ± 18.3
560	35.3 ± 2.8	43.5 ± 5.4	0.36	20.3 ± 7.7	75.8 ± 11.4
			1.25	11.5 ± 4.3	66.4 ± 10.5
			2.24	2.9 ± 0.7	28.4 ± 6.3

2.2 EGCG 对 KB 和 KBV200 细胞以及对 VCR 转运的影响

在含叠氮钠的培养条件下,VCR 在 KB 和 KBV200 细胞内的浓度分别为 (25.4 ± 2.1) ng 和 (25.3 ± 1.7) ng,无显著差异 ($P > 0.05$),EGCG 对 VCR 在细胞内的浓度没有影响 ($P > 0.05$),见图 1;在能量供应的条件下,无 EGCG 时 VCR 在 KB 细胞内浓度 (22.4 ± 1.9) ng 是 KBV200 (6.9 ± 1.4) ng 的 3.3 倍 ($P < 0.01$),EGCG 处理后,VCR 浓度是原来的 3.2 倍,接近 KB 细胞内水平 ($P >$

0.05),EGCG 对 KB 细胞内的 VCR 浓度 (21.8 ± 2.4) ng 没有影响,见图 2;撤去 VCR 培养 2h,发现未用 EGCG 处理时 KBV200 细胞内 VCR 浓度明显降低,远低于同期的 KB 细胞,60min 时,8mg/L 的 EGCG 显著抑制 KBV200 细胞内 VCR 的外排 ($P < 0.01$),但对 KB 细胞没有影响 ($P > 0.05$),见图 3。

2.3 EGCG 对肿瘤细胞 P-gp 表达的影响 EGCG 处理后的 KBV200 P-gp 表达下降,比单用 VCR 时 P-gp 表达水平低 ($P < 0.01$),EGCG 对 KB 细胞 P-gp 表达水平无明显作用 ($P > 0.05$),见表 2。

表 2 EGCG 对 KB 和 KBV200 细胞膜 P-gp 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

agents(mg/L)	KB	KBV200
	Control/ P-gp (%)	Control/ P-gp (%)
VCR(0.036)	95.1 ± 9.8	
VCR(0.036) + EGCG(8)	113.4 ± 10.2	
VCR(0.14)		97.2 ± 10.4
VCR(0.14) + EGCG(8)		311.0 ± 37.6 *

* $P < 0.01$

2.4 EGCG 对裸鼠体重及抑瘤率的影响 EGCG 对裸鼠的体重没有影响 ($P > 0.05$),KB-对照组移植瘤生长速度稍快于 KBV200-对照组,从专业角度考虑 KB-EGCG 组抑瘤率 - 5.8%,KBV-EGCG 组 9.5% 无明显抑瘤和促瘤生长作用,EGCG 联合 VCR 处理后可增强 VCR 对 KBV200 移植瘤的抑瘤作用 ($P < 0.01$);达到 VCR 对 KB 移植瘤的抑瘤作用 70.0%,而对 KB 移植瘤无明显影响 ($P > 0.05$),见表 3,图 4、5。

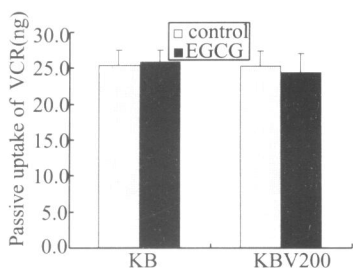


图 1

图 1 EGCG 对 KB 和 KBV200 细胞以及对 VCR 被动转运的影响

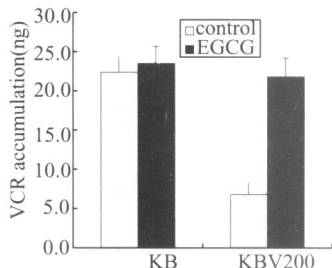


图 2

图 2 VCR 在 KB 和 KBV200 细胞内的积累 ($\bar{x} \pm s$)

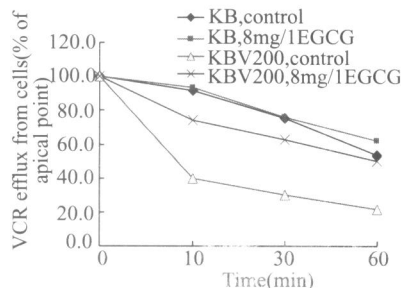


图 3

图 3 EGCG 对 VCR 的外排的影响

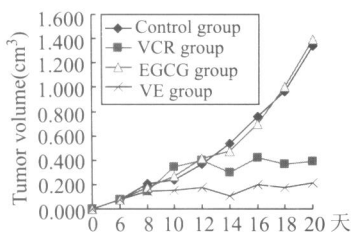


图 4 KB 裸鼠移植瘤生长曲线

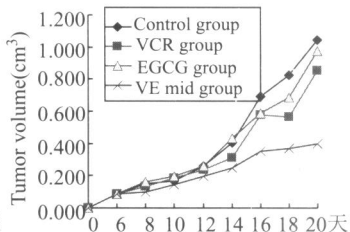


图 5 KBV200 裸鼠移植瘤生长曲线

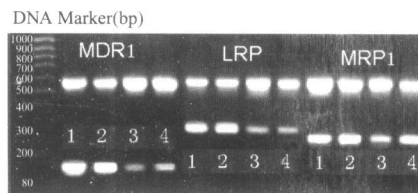


图 6 RT-PCR 法检测 KBV200 裸鼠移植瘤三种耐药基因 mRNA 的电泳图谱

表 3 EGCG 对 KBV200 及 KB 裸鼠移植瘤的抑瘤作用及几种耐药基因的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	B·W(g)	T·W(g)	IR(%)	MDR ₁ (%)	LRP(%)
KB-control	18.9 ±0.9	1.37 ±0.54			
KB-VCR	14.2 ±2.4 ^{**}	0.41 ±0.35 ^{**}	70.0		
KB-EGCG	17.7 ±1.0	1.45 ±0.44	- 5.8		
KB-VE	14.5 ±1.5	0.22 ±0.06	84.0		
KBV-control		0.99 ±0.30		99.3 ±32.9	139.2 ±42.7
KBV-VCR		0.82 ±0.21 ^{**}	17.6	104.0 ±29.4	138.3 ±35.6
KBV-EGCG		0.90 ±0.19 ^{**}	9.5	35.0 ±13.0 ^{**}	58.3 ±18.1 ^{**}
KBV-VE		0.27 ±0.10 [*]	72.8	37.2 ±11.3	75.4 ±21.2

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, VE 组处有显著差异代表两种药物有相互作用。

2.5 EGCG 对几种多药耐药基因表达的影响
MDR1 mRNA 在对照组, VCR 组有较高水平表达, EGCG 可降低 MDR1 的表达量 ($P < 0.01$)。LRP mRNA 在对照组、VCR 组亦有较高水平表达。EGCG 可降低 LRP 的表达量 ($P < 0.01$)。MRP1 在各组表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 2, 图 6。

3 讨论

本次发现 EGCG 体内外可耐受剂量可以逆转 KBV200 细胞对 VCR 的耐药性, 增敏 VCR 的细胞毒作用, 其抑瘤作用接近 KB 移植瘤。而 EGCG 在体外对多种肿瘤的耐药逆转作用机制众说不一, 如有说可通过抑制 P-gp 功能逆转 MDR 细胞株 CH (R) C5、Caco-2 的耐药性^[7], 有提出 EGCG 对 KB-A-1 的 MDR 的逆转效果可能与下调阿霉素诱导的细胞内活性氧簇的浓度有关^[8], 更有研究说绿茶提取物(含 EGCG) 0.01mg/ml 不影响 LS-180 细胞 P-gp 和 MRP2 的 mRNA 的表达, 也没有证实 EGCG 可影响 MRP2 的活性^[9]。本实验应用叠氮钠阻滞细胞能量代谢后, 药物进出细胞表现为被动转运, EGCG 对 KBV200 细胞内 VCR 浓度没有影响; 没有叠氮钠的情况下, KBV200 细胞内 VCR 浓度低于 KB 细胞, EGCG 作用后接近 KB 细胞水平; 除去培养液中的 VCR 后, EGCG 作用的 KBV200 细胞也表现出“蓄积”现象, 提示 EGCG 是抑制 P-gp 对药物的泵出而发挥逆转作用。实验也显示 EGCG 在体内可降低 MDR1 mRNA 的表达, 从而进一步降低 P-gp 的表达。综上可知, EGCG 在体内外均可逆转 KBV200 的 MDR 作用, 机制可能是降低 MDR1 的表达并影响 P-gp 的功能, 从而提高细胞内

VCR 浓度。另外 RT-PCR 结果发现, EGCG 也降低了 LRP 在基因水平的表达, 对 MRP1 则没有表现出明显的作用, 而 LRP 在药物进出细胞核时发挥一定作用, 至于其逆转作用是否存在其他作用靶点和机制, 有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 钟清木, 叶韵斌, 陈强, 等. 多药耐药基因在口腔鳞癌的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2003, 10(1): 17-20.
- [2] 梁钢, 张肃, 黄志明, 等. 两种儿茶素成分体外逆转人肝癌细胞 BEL-7404/ADR 多药耐药性[J]. 癌症, 2004, 23(4): 401-405.
- [3] 黎丹戎, 涂文升, 李力, 等. 肿瘤细胞中长春新碱的高效液相色谱法测定[J]. 色谱, 1998, 16(1): 50-52.
- [4] Chen ZS, Kawabe T, Ono M, et al. Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter [J]. Molecular Pharmacology, 1999, 56(6): 1219-1228.
- [5] Terez M, Gabor S, Katalin G, et al. In vivo and in vitro multi-tracer analyses of P-glycoprotein expression-related multidrug resistance[J]. European Journal of Nuclear Medicine and molecular Imaging, 2003, 30(8): 1147-1154.
- [6] 朱虹, 陈孝平, 罗顺峰, 等. 缺氧诱导因子 1- 依赖性缺氧诱导人肝癌细胞多药耐药相关基因的表达及意义[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(5): 277-281.
- [7] Jodoin J, Demeule M, Beliveau R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1542(1-3): 149-159.
- [8] Mei Y, Wei D, Liu J. Reversal of Multidrug Resistance in KB Cells with Tea Polyphenol Antioxidant Capacity[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4(4): 468-473.
- [9] Netsch MI, Gutmann H, Luescher S, et al. Inhibitory activity of a green tea extract and some of its constituents on multidrug resistance-associated protein 2 functionality[J]. Planta Med, 2005, 71(2): 135-141.

[编辑: 贺文]