

· 实验研究 ·

热疗逆转乳腺癌细胞系耐药的实验研究

张霖 杨毅 魏熙胤 史玉荣 王瑞 刘洪隐 姚智 牛瑞芳

【摘要】 目的 探讨热疗对体外培养的乳腺癌细胞多药耐药的逆转作用。**方法** 对乳腺癌多药耐药细胞系 MCF-7/ADR 给予 42.5 °C 0.5 h 的加温处理。MTT 法检测热疗前后细胞对阿霉素(ADM)、5-FU、环磷酰胺(CTX)的耐药性的变化,计算半抑制浓度(IC₅₀)、耐药倍数;定量 PCR 测定热疗前后细胞多药耐药基因 *mdr1* 的表达;流式细胞术检测细胞表面 P-gp 的表达。**结果** 热疗后细胞的生长及细胞周期没有明显的变化,但是热疗后 MCF-7/ADR 细胞对多种临床一线化疗药(ADM、5-FU 及 CTX)的耐药性均产生下调效应,IC₅₀ 分别下降 21.2%、14.9%、16.6% ($P < 0.01$)。定量 PCR 未检测到 *mdr1* 表达的明显变化,但是流式细胞仪检测却显示 P-gp 的表达显著降低。**结论** 热疗能够对体外培养的乳腺癌细胞系的耐药性产生逆转作用,增强化疗药的敏感性,其机制可能是热疗在翻译水平下调 P-gp 的表达。热疗的耐药逆转作用可能为临床化疗开辟新的途径。

【关键词】 乳腺癌;热疗;耐药逆转

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Modulatory effect of hyperthermia on multidrug-resistance of breast cancer cell

ZHANG Lin, YANG Yi, WEI Xi-yin, SHI Yu-rong, WANG Rui, LIU Hong-yin, YAO Zhi, NIU Rui-fang. Central Laboratory of Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

【Abstract】 Objective To investigate the reversal of multidrug-resistance (MDR) by hyperthermia at 42.5 °C in breast cancer cell line. **Methods** The breast cancer cell line MCF-7/ADR was heated at 42.5 °C for 0.5 h. The cell survival rate and IC₅₀ of treated and untreated cells were measured by MTT test. The expression of MDR1 gene was detected by Real-time PCR, and the expression of P-gp on the surface of cells was detected by flow cytometry. **Results** Although the obvious alteration of cell growth was not found by colony forming test and cell cycle assay after hyperthermia, the IC₅₀ of MCF-7/ADR treated with ADM, 5-FU and CTX was markedly decreased respectively.

基金项目:天津市科委重点项目(06TJJC14502)

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院中心实验室(张霖、杨毅、魏熙胤、史玉荣、王瑞、刘洪隐、牛瑞芳);300070 天津,天津医科大学免疫学教研室(姚智)

通讯作者:牛瑞芳,niurf1982@yahoo.com.cn

Although the expression of *mdr1* gene was detected in heated cells by Real-time PCR, the expression of P-gp reduced significantly using FCM. **Conclusions** Hyperthermia at 42.5 °C partly reverses multidrug-resistance of the breast cancer cell line MCF-7/ADR. The possible mechanism is that hyperthermia down-regulates the expression of P-gp at protein post-translation level. The present study could open a new field for hyperthermia utilization in clinical chemotherapy.

【Key words】 Breast neoplasms; Hyperthermia; Multidrug-resistance reversal

乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤,近年来其发病率持续增高。化疗是乳腺癌治疗中的重要手段之一,但是多药耐药(multidrug resistance, MDR)的产生常常导致化疗的失败。因此,耐药性的逆转和克服成为肿瘤治疗中亟待解决的关键问题。目前国内外研究表明,多药耐药的产生是多种机制共同作用的结果^[1,2],包括 ABC 转运蛋白超家族(ATP-binding cassette transporter superfamily)成员介导的药物外排、DNA 拓扑异构酶 II (Topoisomerase II, Topo II)、谷胱甘肽转移酶(GST)、蛋白激酶 C(PKC)介导的多药耐药等等,其中以 MDR1、P-gp 介导的耐药最为经典^[3]。P-gp 是由多药耐药基因 1(*mdr1*) 基因编码的一种 M_r 170 000 的跨膜蛋白, 又称 P-170。它是一种 ATP 依赖性转运排出泵,具有 ATP 结合的位点,通过 ATP 提供能量将已进入细胞内的药物从胞内泵出胞外,使肿瘤细胞内药物浓度降低。目前,学者们认为 P-gp 是恶性肿瘤原发性耐药的主要原因之一。

热疗,无论是单独使用还是作为化疗和放疗的辅助手段,其治疗效果已得到广泛认可。热疗能够对多种化疗药起到调理作用,并且导致温度依赖性的 DNA 损伤^[4]。热疗可以引发肿瘤坏死因子(TNF)及其他细胞因子介导的免疫反应^[5]。此外,一些研究还表明热疗可以驱动脂质体的运输,并触发脂质体包裹药物在肿瘤部位的释放^[6]。虽然热疗在肿瘤治疗中得到极大的关注,但是其在逆转肿瘤耐药中的作用尚未得到充分研究。

本研究拟以人乳腺癌细胞系 MCF-7 和具有 MDR 表型的 MCF-7/ADR 为体外实验模型,通过加温处理来观察热疗逆转耐药作用,并对可能的机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 培养条件

人乳腺癌细胞系 MCF-7 和耐药细胞系 MCF-7/ADR 由美国底特律医院侯子正先生馈赠。细胞培养于含有 15% 胎牛血清的 1640 培养液中,其中 MCF-7/ADR 培养液中含 1 μ g/ml 阿霉素,37 °C 5% CO₂ 培养箱培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 试剂

RPMI- 1640 培养液和胎牛血清为 GIBCO 公司产品;阿霉素(adriamycin,

ADM)为浙江海正药业股份公司产品;环磷酰胺(CTX)为江苏恒瑞医药股份公司产品;5-FU(5-fluorouracil)为上海旭东海普药业有限公司产品。碘化丙锭(PI)、四唑盐(MTT)、二乙基焦磷酸胺(DEPC)购自Sigma公司;Trizol试剂购自Invitrogen;Quantiteck SYBRGreen 定量PCR试剂盒购自Qiagen公司;Reverse Transcription System 反转录试剂盒购自Promega公司;PE 标记 P-170 单克隆抗体由 Beckman Coulter 公司提供。

1.3 热疗后细胞生长及细胞周期检测

两株细胞系 MCF-7 和 MCF-7/ADR 给予加温处理(42.5 °C 水浴 0.5 h)。常规克隆形成实验检测加温对于细胞生长的影响。流式细胞仪检测细胞周期,取加温处理前后的细胞, pH7.4 PBS 洗 3 次, 95% 的乙醇固定过夜, 离心、沉淀加入含有 RNA 酶的 PI (50 µg/ml) 溶液 500 µl 重悬, 室温避光孵育 30 min, 上机检测。

1.4 MTT 法检测细胞耐药性

加温处理前后的细胞分别给予化疗药(5 种质量浓度)处理, ADM 分别为 0.01、0.1、1.0、10、100 µg/ml; 5-FU 及 CTX 分别为 0.001、0.01、0.1、1.0、10 µg/ml。

耐药测定采用 MTT 生长曲线法, 根据分组将药物工作液加入 96 孔板中, 100 µl/孔, 平行 3 孔, 再加入 100 µl 含 1×10^4 细胞悬液, 37 °C 5% CO₂ 培养 72 h, 弃药液, 加 5 mg/ml MTT 液 20 µl, 继续培养 4 h, 弃上清液, DMSO 显色, 酶标仪测 570 nm 处吸光度(A)值, 耐药性按以下公式计算, 细胞存活率 = (加药组 $A_{570 \text{ nm}}$ / 空白组 $A_{570 \text{ nm}}$) × 100%。根据不同药物浓度的细胞存活率绘制生长曲线, 推算半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)。耐药倍数 = 加温细胞 IC₅₀ / 未加温细胞 IC₅₀。

1.5 定量 RT-PCR 测定细胞多药耐药 mdrl 基因

取加温处理前后的细胞, 分别消化、离心、生理盐水洗 2 次后, Trizol 法提取总 RNA, 取出部分经甲醛凝胶电泳测定其质量。然后在 50 µl 的反应体系中进行逆转录, 合成 cDNA。先将总 RNA 在 70 °C 变性 10 min, 冰上冷却 3 min, 混合反应体系, 置 42 °C 水浴 1 h, 完成逆转录, 在 95 °C 水浴中 5 min, 将酶灭活后立即置冰浴中。PCR 反应中 mdrl 和 β-actin 引物见表 1, 用 QIAGEN SYBR Green PCR 试剂盒在定量 PCR 仪 GeneAmp 5700 上进行实时定量 PCR, 反应参数为 95 °C 预变性 15 min, 94 °C 变性 15 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次。用 GenAmp 5700 SDS Software 分析结果。对定量 PCR 产物作琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增效果。

1.6 流式细胞术检测 P-gp 蛋白的表达率

取 MCF-7 及加温处理前后的 MCF-7/ADR 培养 72 h, 胰酶消化, 用生理盐水洗涤 2 次, 离心弃上清液。生理盐水重悬细胞, 将每种细胞分成两管, 一管加 PE 标记的 P-gp 单克隆抗体, 另一管加鼠 IgG2a PE 作同型对照, 室温避光孵育

15 min。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。每管加 0.5 ml PBS(或生理盐水),重悬细胞并吹散后,行流式细胞仪检测。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物长度
mdr1	5'-CATAGCTCGTGCCCTTGTTAGA-3'	157 bp
	5'-GATGGTGGACAGCGGTGAG-3'	
β -actin	5'-TGGACTCTTGAGGGACATATTG-3'	234 bp
	5'-GCCCATCTTCCCCTAGCCTT-3'	

1.7 统计学处理

两组之间的均数比较采用 Student's *t* 检验。

2 结果

2.1 热疗对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞的生长及细胞周期的影响

热疗后两种细胞的克隆形成率略有下降,其差异没有统计学意义(图 1)。流式细胞仪检测细胞周期,结果显示 MCF-7 细胞处理后的 S 期略有下降,而 MCF-7/ADR 细胞却无变化。细胞形态观察无明显变化(图略),提示 42.5 °C 加温 0.5 h 后,细胞没有产生明显的病理生理的变化。

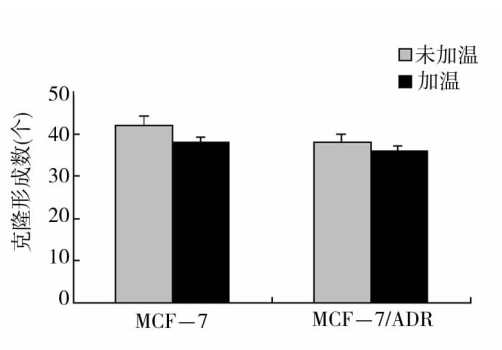


图 1 热疗对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞的生长及细胞周期影响

2.2 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞对 ADM 耐药活性测定

单独用含 0.01 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ ADM 培养液培养 MCF-7 及 MCF-7/ADR 细胞, IC_{50} 值分别为 0.14 $\mu\text{g/ml}$ 和 16.6 $\mu\text{g/ml}$, MCF-7/ADR 耐受 ADM 的耐药倍数为 114.85 倍(图 2),说明 MCF-7/ADR 保持了 MDR 的表型。

2.3 热疗对 MCF-7/ADR 细胞耐药活性的影响

42.5 °C 加温 0.5 h 后 MCF-7/ADR 细胞的耐药性发生改变,ADM、5-FU、CTX 的 IC_{50} 值比处理前分别下降了 21.2%、14.9%、16.6% ($P < 0.01$),表明热疗对细胞的多药耐药产生了负性调节作用(图 3)。

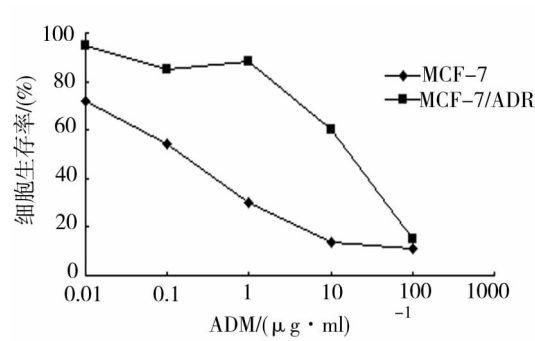


图 2 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞对 ADM 耐药活性测定

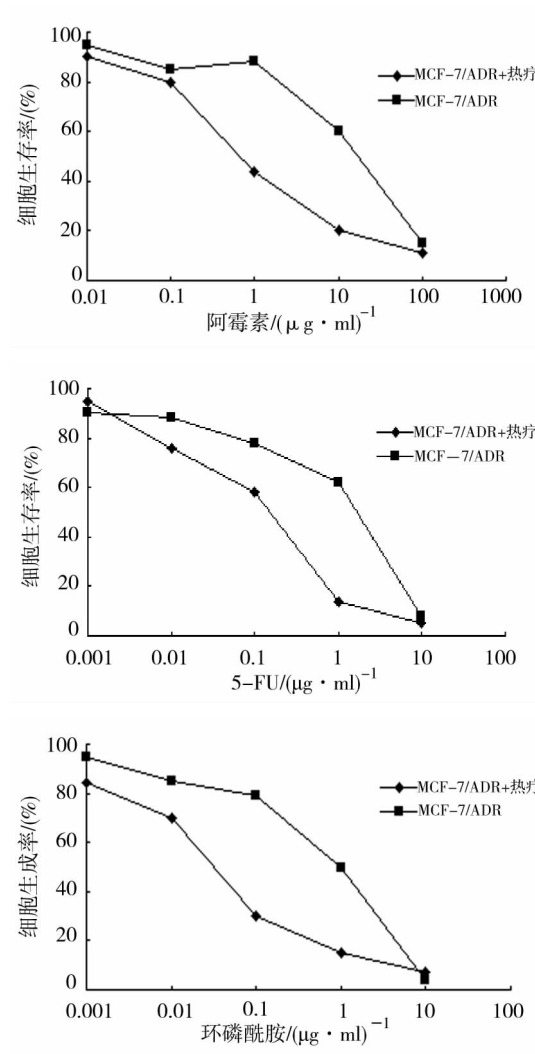
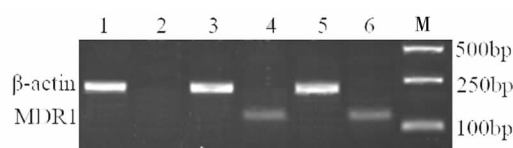


图 3 热疗后 MCF-7/ADR 细胞耐药活性测定

2.4 热疗后 MCF-7/ADR 细胞 MDR1 基因表达

根据定量 PCR 产物电泳结果分析,mdr1 和 β -actin 分别得到 157 bp 和 234 bp 左右的条带,与设计扩增片段大小相符;热疗后细胞 mdr1 基因的 mRNA 表达没有

明显的变化,与定量 PCR 的扩增曲线结果相一致(图 4)。



M: 标记条带; 1, 2: MCF-7; 3, 4: MCF-7/ADR; 5, 6: MCF-7/ADR + 热疗; β -actin 为 234 bp, MDR1 为 157 bp.

图 4 定量 PCR 检测热疗后细胞 MDR1 基因

2.5 热疗后 MCF-7/ADR 细胞 P-gp 表达

用流式细胞仪检测表达 P-gp 的阳性细胞比例,结果显示 MCF-7 为 8.6%, MCF-7/ADR 热疗前后分别为 99.2% 和 38.6%,表明热疗后 P-gp 表达明显下降。

3 讨论

热疗具有悠久的历史,是一种在肿瘤浸润部位进行加温的方法。由于它的副作用小,而且能够增强化疗和放疗的作用,因而得到广泛的关注。目前热疗作为化疗和放疗的辅助手段已在多种肿瘤中得到成功应用,例如直肠癌、肝癌及复发性乳腺癌等^[6-8]。大量研究证实,加温和化疗药对于肿瘤细胞具有明显的互补和增效作用,其可能的协同抗癌机制为:(1)加温可破坏细胞膜的稳定状态,使细胞膜的通透性增强,增加了细胞对药物的吸收和渗透;(2)加温可提高细胞内药物的浓度及反应速度;(3)加温可改变药物代谢的机理;(4)加温增加了药物与 DNA 的作用或抑制 DNA 的修复。

本研究对热疗能否对细胞耐药产生逆转作用进行初步探索,结果显示:42.5 °C 加温 0.5 h 对于细胞的生长无明显影响,但加温后 MCF-7/ADR 细胞耐药性明显降低,对多种临床一线化疗药(ADM、5-FU 及 CTX)的耐药性均产生下调效应。

P-gp 是一种 ATP 依赖性转运排出泵,由 *mdr1* 基因编码。本研究选择的多药耐药模型 MCF-7/ADR 是由 ADM 诱导乳腺癌细胞 MCF-7 产生的,高表达 P-gp 是其产生耐药的主要机制^[9,10]。热疗处理后该细胞的耐药性下调,提示我们 P-gp 的表达可能受到抑制。因此,我们从 mRNA 水平和蛋白水平分别检测 P-gp,目的在于进一步验证这一推测。

定量 PCR 检测加温后 MCF-7/ADR 细胞,未发现 *mdr1* mRNA 表达的明显变化,但流式细胞仪检测却发现 P-gp 表达显著降低,这说明热疗可能在翻译水平对 *mdr1* 产生下调作用,具体作用机制有待进一步深入研究。

热疗常通过改变细胞膜的通透性,增加耐药细胞内药物浓度,但是本实验发现加温能够对 P-gp 的表达产生下调作用,从而抑制细胞外排作用,加强药物的细

胞毒作用。热疗的耐药逆转作用可望为临床化疗开辟新的途径。

参考文献

- [1] Leonessa F, Clarke R, Leonessa F, *et al.* ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endoc Relat Cancer*, 2003,10:43 – 73.
- [2] Gottesman M, Fojo T, Bates S E, *et al.* Multidrug resistance in cancer: role of ATP – dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002,2:48 – 58.
- [3] Brooks T A, Minderman H, Ó'Loughlin K L, *et al.* Taxane-based reversal agents modulate drug resistance mediated by P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2:1195 – 1205.
- [4] Blasiak J, Wiedera K, Pertynski T, *et al.* Hyperthermia can differentially modulate the repair of doxorubicin-damaged DNA in normal and cancer cells. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50:191 – 195.
- [5] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 2002,3:487 – 497.
- [6] Kouloulis V E, Dardoufas C E, Kouvaris J R, *et al.* Liposomal doxorubicin in conjunction with reirradiation and local hyperthermia treatment in recurrent breast cancer: a phase I/II trial. *Clin Cancer Res*, 2002,8:374 – 382.
- [7] Moroz P, Jones S K, Gray B N, *et al.* Status of hyperthermia in the treatment of advanced liver cancer. *J Surg Oncol*, 2001, 77:259 – 269.
- [8] Ohno S, Sumiyoshi Y, Mori M, *et al.* Hyperthermia for rectal cancer. *Surgery*, 2002,131:S121 – S127.
- [9] Li J, Xu L Z, He K L, *et al.* Reversal effects of nomegestrol acetate on multidrug resistance in adriamycin-resistant MCF7 breast cancer cell line. *Breast Cancer Res*, 2001, 3:253 – 263.
- [10] 李臣宾, 张峰, 史玉荣. 小干扰 RNA 引发多药耐药乳腺癌细胞内 *mdr1* 基因沉默的研究. *中华实验外科杂志*, 2004,21: 1199 – 1201.

(收稿日期:2007-04-22)

(本文编辑:罗承丽)