

马钱子碱对白血病 K562/A02 细胞多药耐药性的逆转作用

梁虹¹, 茆俊卿², 张育¹, 高娜¹, 沈维干¹, 顾健¹

A Study on Vauqueline in Reversal of Multidrug Resistant in K562/A02 Cells

LIANG Hong¹, MAO Jun-qing², ZHANG Yu¹, GAO Na¹, SHEN Wei-gan¹, GU Jian¹

¹ Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China; ² Yangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine

Corresponding Author: ZHANG Yu, E-mail: yzzy10182001@yahoo.com.cn

Abstract: Objective The purpose of this study is to investigate the reversal effects of Vauqueline on human leukemic multidrug resistance(MDR) in K562/A02 cell line *MDR1* (multidrug resistance 1), *MRP* (multidrug resistance-associated protein), *Topo II* (topoisomerase II), *GST-π* (glutathione-s-transferase) genes and their proteins. **Methods** The MTT assay was used to analyze the cytotoxic effect of vauqueline. The expression of *MDR1*, *MRP*, *Topo II*, *GST-π* and their proteins in leukemia K562/A02 cells were respectively detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. **Results** Semi-quantitative RT-PCR showed that mRNA transcription of *MDR1* gene was reduced significantly($P<0.01$); and the other genes were not conspicuously changed ($P>0.05$). Western blot showed that the expression of P-gp was decreased ($P<0.01$); the other proteins were not conspicuously changed($P>0.05$). Vauqueline could increase the accumulation of medicine in K562/A02 cells. **Conclusion** Vauqueline could partly reverse the multidrug resistance of K562/A02 cells. Decreasing of *MDR1* gene and p-glycoprotein expression and increase the accumulation of medicine in cells may be the MDR reversal mechanisms in K562/A02 cells.

Key words: Vauqueline; K562/A02 cells; Multidrug resistance; Reversal

摘要:目的 研究马钱子碱(vauqueline)对人白血病 K562/A02 细胞多药耐药性的逆转作用。**方法** 采用噻唑蓝(MTT)法检测马钱子碱的细胞毒作用;采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹(Western blot)分别检测非细胞毒浓度(IC_{10})的马钱子碱对 K562/A02 细胞 *MDR1* (multidrug resistance gene 1)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein,*MRP*)、拓扑异构酶 II (topoisomerase II, *Topo II*)、谷胱甘肽-S 转移酶(glutathione s-transferase, *GST-π*) mRNA 及其蛋白表达的影响。**结果** 非细胞毒浓度(IC_{10})的马钱子碱作用后, K562/A02 细胞中 *MDR1* mRNA 及 P-gp 表达降低($P<0.01$)。而 *MRP*、*Topo II*、*GST-π* mRNA 及其蛋白的表达无明显变化($P>0.05$),同时马钱子碱能增加化疗药物在白血病细胞内的积累。**结论** 马钱子碱能部分逆转 K562/A02 细胞的耐药性,其作用机制可能与下调 K562/A02 细胞 *MDR1* mRNA 的表达,导致细胞膜上 P-gp 的表达量减少,化疗药物从细胞内溢出减少有关。

关键词: 马钱子碱; K562/A02 细胞; 多药耐药; 逆转

中图分类号: R730.53; R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2010)07-0739-05

0 引言

化学治疗目前仍是白血病及某些恶性肿瘤的主要治疗方法,但肿瘤细胞多药耐药性(multidrug re-

sistance,MDR)的产生常常导致化疗的失败。多药耐药已成为目前肿瘤化疗所面临的最主要的困难之一,因此探讨肿瘤的多药耐药相关机制及寻找有效的逆转剂具有十分重要的临床意义。自 Tsumo 等报道异博定可逆转肿瘤耐药性以来,相继发现了环孢霉素、三氟拉嗪等数种逆转药物,但这些药物多因严重的心、肝、肾毒性作用而使其临床应用受到限制^[1-2]。中药因其自身具有资源丰富、低毒、作用靶点多等特点,近年越来越受到关注。许多学者把目

收稿日期:2009-03-16;修回日期:2009-11-19
基金项目:江苏省中医药管理局资助课题(H05110)
作者单位:1. 225001 江苏扬州大学医学院;2. 江苏扬州市中医院
通信作者:张育, E-mail: yzzy10182001@yahoo.com.cn
作者简介:梁虹(1961-),女,本科,副教授,主要从事组织学与病理学研究

光转向从传统中草药中寻求单药有效成分或复方制剂来逆转肿瘤 MDR。研究证实,植物多酚类、生物碱类、天然皂甙类药物的有效成分及部分中药复方具有逆转 MDR 的作用^[3]。我们的实验选用具有典型 MDR 表型的人白血病细胞株 K562/A02 为研究对象,研究喹啉类生物碱马钱子碱对 K562/A02 细胞 MDR 的逆转作用,以期为寻找高效、低毒的白血病 MDR 逆转剂提供初步的理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

盐酸阿霉素(adriamycin, ADM)和柔红霉素(Daunorubicin, DNR)为 Pharmacia&Upjohn 公司产品;马钱子碱为中国药品检验所产品;K562 细胞、K562/A02 细胞均购自中国医学科学院天津血液学研究所;小牛血清购自杭州四季青公司;RPMI 1640 培养液(Gibco 公司);Trizol 试剂(Gibco/BRI 公司);RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司);PerfectShot™ Taq(宝生物工程(上海)有限公司);引物合成(上海生工生物技术有限公司);山羊抗人 P-gp 单克隆抗体(Santa Cruz 公司);山羊抗人 MRP 单克隆抗体(Santa Cruz 公司);小鼠抗人 Topo II 单克隆抗体(BD 公司);小鼠抗人 GST- π 单克隆抗体(BD 公司);小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(上海康成公司);兔抗山羊 IgG-HRP 及羊抗小鼠 IgG-HRP(武汉博士德公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562 细胞、K562/A02 细胞分别接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中常规培养, 2~3 天换液 1 次, K562/A02 细胞培养体系中加入终浓度为 0.8 μ g/ml 的 ADM 以维持耐药性, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)法检测马钱子碱对 K562 和 K562/A02 细胞的细胞毒作用 取对数生长期的细胞调整细胞浓度为 2.2×10^5 / ml, 接种于 96 孔培养板, 每孔加入含不同药物的细胞悬液 200 μ l, 置 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养 72 h, 每孔加 MTT 20 μ l, 继续培养 4 h, 离心(1000 r/min, 5 min), 弃上清液, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μ l, 终止反应, 在酶联免疫测定仪上检测波长 490 nm 处吸光度(A)值, 分别计算上述药物对 K562 和 K562/A02 细胞的非细胞毒浓度(IC₁₀)。

1.2.3 实验分组 取对数生长期的 K562 细胞、K562/A02 细胞接种至培养瓶中, 每瓶(5 ml)细胞数 1.5×10^6 加入非细胞毒浓度(IC₁₀)的马钱子碱(4 μ g/ml), 培养 72 h 后收集细胞, 进行 RT-PCR 及 Western blot 检测。具体分组如下:(1)K562/A02 细胞未加药组;(2)K562/A02 细胞 + 马钱子碱组;(3)K562 细胞组。

1.2.4 总 RNA 提取、鉴定及 RT-PCR 扩增及产物分析 细胞总 RNA 提取参照 Trizol 试剂盒说明书进行, 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 反应。MDR1 引物序列为 Sense: 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG; Anti-sense: 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA; PCR 循环条件: 变性 94℃、30 s, 退火 55℃、60 s, 延伸 72℃、60s, 30 个循环, PCR 产物大小为 157 bp。MRP 引物序列为 Sense: 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG; Anti-sense: 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA; PCR 循环条件: 变性 94℃、30 s, 退火 58℃、60 s, 延伸 72℃、60 s, 30 个循环, PCR 产物大小为 292 bp。Topo II 引物序列为 Sense: 5'-GGCTCGATTGT-TATTTCCAC; Anti-sense: 5'-GGTTGTAGAAT-TAAGAATAGC; PCR 循环条件: 变性 94℃、30 s, 退火 60℃、45 s, 延伸 72℃、60 s, 30 个循环, PCR 产物大小为 322 bp。GST- π 引物序列为 Sense: 5'-GGCTCACTAAAAGCCTCCTG; Anti-Sense: 5'-AGTGCCTTCACATAGTCATC; PCR 循环条件: 变性 94℃、30 s, 退火 62℃、45 s, 延伸 72℃、60 s, 30 个循环, PCR 产物大小为 244 bp。 β -actin 引物序列为 Sense: 5'-GTGGGGCGC CCCAGGCAC-CA; Anti-sense: 5'-CTCCTTAATGTCACGCAC GATTTC; PCR 循环条件: 变性 94℃、30 s, 退火 55℃、60 s, 延伸 72℃、60 s, 30 个循环, PCR 产物大小为 540bp。取 PCR 产物进行 DNA 琼脂糖电泳, 应用 Genegenivs 凝胶成像系统拍照, 用 Quantity One 灰度分析软件进行吸光度计算, 以目的片段条带灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值作为相应目的基因的表达量指标, 每个样本至少重复 3 遍。

1.2.5 Western blot 法检测 P-gp、MRP、Topo II、GST- π 蛋白的表达 细胞处理及分组同前, 收集培养至预定时间点的细胞, 细胞总蛋白抽提及蛋白浓度测定参照试剂盒说明。按每 5×10^6 个细胞加入 100 μ l RIPA 强裂解液(1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS), 裂解细胞制备总蛋白, 冰浴 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用紫外分光光度计法检测蛋白浓度。取细胞总蛋白, 每孔按 8 μ g/ μ l $\times$ 10 μ l 每孔上样, 行 SDS-PAGE 电

泳及衡压/衡流冰浴电转至 PVDF 膜。其中 P-gp 蛋白分子量大小为 170 kD,电泳时分离胶浓度为 6%,浓缩胶浓度为 5%,转膜条件:100 V、90 min;MRP 蛋白分子量大小为 190 kD,电泳时分离胶浓度为 6%,浓缩胶浓度为 5%,转膜条件:100 V、95 min;Topo II 蛋白分子量大小为 170 kD,电泳时分离胶浓度为 6%,浓缩胶浓度为 5%,转膜条件:100 V、90 min;GST- π 蛋白分子量大小为 23 kD,电泳时分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%,转膜条件:250 mA、45 min;内参 GAPDH 分子量大小为 36 kD,电泳时分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%,转膜条件:250 mA、50 min。3%BSA 室温封闭 2 h,用封闭液稀释相应的一抗:单克隆抗体工作浓度按其具体的说明应用,4℃ 孵育过夜,PBST 漂洗 15 min $\times$ 3 次,再加 HRP 标记的兔抗山羊及山羊抗小鼠 IgG 二抗(工作浓度为 1:1000)室温孵育 2 h 后,PBST 漂洗 15 min $\times$ 3 次,DAB 法显色。以 GAPDH 为内参照,每个样本至少重复 3 遍。Western 条带应用图像凝胶成像系统存入计算机,用 Quantity One 灰度分析软件进行吸光度计算。以目的蛋白条带灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值作为相应目的蛋白的表达量指标。

1.2.6 马钱子碱对 K562/A02 细胞内柔红霉素浓度聚集影响 取对数生长期的 K562/S 细胞和 K562/A02 细胞用含 10%BCS 的 RPMI 1640 培养液调整细胞数为 5×10^5 /ml,将细胞悬液接种于 24 孔培养板中,1 000 μ l/孔。实验分 K562/S 细胞组、K562/A02 细胞组、阳性对照组(10 μ mol/L 异搏定)和中药马钱子碱组。按实验分组分别加入相应浓度的药物工作液,使 DNR 终浓度 10 μ g/ml,混匀后置 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,1h 后,收集细胞到离心管中,离心(1 000 r/min,5 min),弃上清液,4℃PBS 洗 2 次,再加 PBS 调整细胞数为 1×10^6 /ml,用流式细胞仪测定细胞内柔红霉素浓度。

1.3 统计学方法

灰度分析数据用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计学处理均在 SPSS11.0 和 Excel 2003 软件中完成。

2 结果

2.1 MTT 法检测马钱子碱的细胞毒作用

根据剂量效应曲线得出,马钱子碱对 K562 及 K562/A02 细胞的非细胞毒浓度(IC₁₀),见表 1。选择小于等于 IC₁₀ 的中药浓度进行后面实验。

表 1 马钱子碱对 K562/A02 和 K562 细胞的非细胞毒浓度 (IC₁₀)

Table 1 The IC ₁₀ of ADM after K562/A02 cells treated with vauqueline and K562 cells	
Cell(IC ₁₀)	Vauqueline (μ g/ml)
K562	0.5
K562/A02	4

2.2 RT-PCR 结果

2.2.1 RNA 提取 提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳显示 28 s、18 s、5 s 三条电泳带,亮度以 28 s 最强,18 s 次之,5 s 最弱,见图 1。

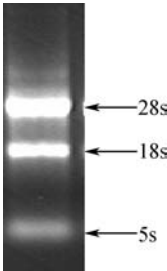


图 1 K562/A02 细胞 RNA 经琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 The electrophoretogram of RNA by K562/A02 cells

2.2.2 RT-PCR 检测马钱子碱对 K562/A02 细胞各种耐药基因 mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测表明:(1)K562 细胞组 *MDR1* mRNA 无表达,而 K562/A02 细胞未加药组和加药组 *MDR1* mRNA 均阳性表达(图 2A),反映其 *MDR1* mRNA 相对表达水平的灰度值分别为:(0.861 $\pm$ 0.023);(0.541 $\pm$ 0.017);组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。 (2)K562 细胞组 *MRP* mRNA 微弱表达,其灰度值为(0.122 $\pm$ 0.007);K562/A02 细胞未加药组和加药组 *MRP* mRNA 均阳性表达(图 2B),其 *MRP* mRNA 的灰度值分别为:(0.451 $\pm$ 0.005);(0.448 $\pm$ 0.004);组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。 (3)K562 细胞组、K562/A02 细胞未加药组和加药组 *Topo II* mRNA 均阳性表达(图 2C),*Topo II* mRNA 的灰度值分别为(0.316 $\pm$ 0.010);(0.220 $\pm$ 0.006);(0.210 $\pm$ 0.009);K562/A02 细胞组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。 (4)K562 细胞组、K562/A02 细胞未加药组和加药组 *GST- π* mRNA 均阳性表达(图 2D),其灰度值分别为(0.563 $\pm$ 0.007);(0.685 $\pm$ 0.007);(0.671 $\pm$ 0.008);K562/A02 细胞组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

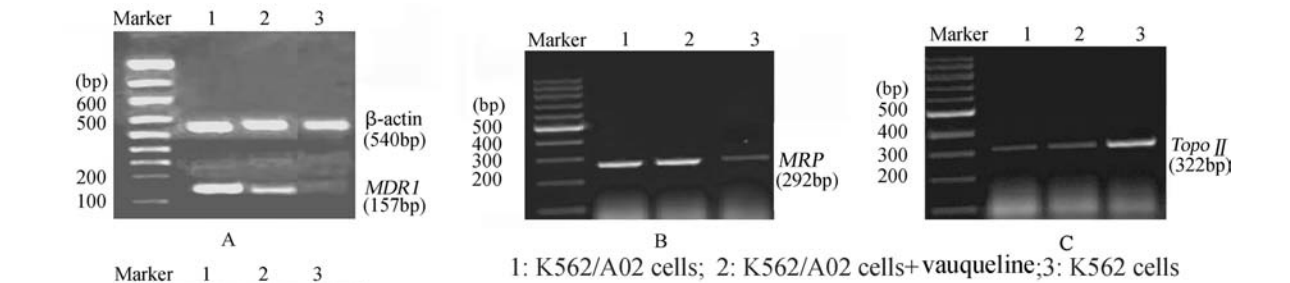


图 2 RT-PCR 分析马钱子碱处理后 K562/A02 细胞 *DMR1* mRNA(A), *MRP* mRNA(B), *Topo II* mRNA(C) and *GST-π* mRNA(D) 的表达

Figure 2 RT-PCR analysis of *DMR1* mRNA(A), *MRP* mRNA(B), *Topo II* mRNA(C) and *GST-π* mRNA(D) expression in K562/A02 cells treated with Vauqueline

2.2.3 Western blot 检测马钱子碱对 K562/A02 细胞 P-gp、MRP、*Topo II* 及 GST-π 蛋白表达的影响 (1) K562 细胞组未检测到 P-gp 表达, K562/A02 细胞未加药组和加药组均可见 P-gp 阳性表达 (图 3A), P-gp 的灰度值分别为: (0.867 ± 0.020); (0.609 ± 0.009); 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 (2) K562 细胞组 MRP 蛋白微弱表达, 灰度值为 (0.118 ± 0.006); K562/A02 细胞未加药组和加药组 MRP 蛋白均阳性表达 (图 3B), 其灰度值分别为: (0.446 ± 0.008); (0.438 ± 0.003); 组间比较

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 (3) K562 细胞组、K562/A02 细胞未加药组和加药组均可见 *Topo II* 蛋白阳性表达 (图 3C), 其灰度值分别为: (0.314 ± 0.011); (0.204 ± 0.006); (0.194 ± 0.008); K562/A02 细胞组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 (4) K562 细胞组、K562/A02 细胞未加药组和加药组均可见 GST-π 蛋白阳性表达 (图 3D), 其灰度值分别为: (0.552 ± 0.039); (0.673 ± 0.018); (0.638 ± 0.025); K562/A02 细胞组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

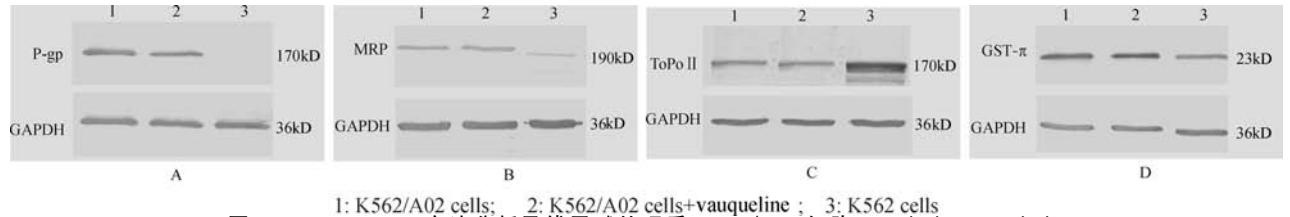


图 3 Western blot 方法分析马钱子碱处理后 K562/A02 细胞 P-gp(A), MRP(B), *Topo II* (C) and GST-π(D) 蛋白的表达

Figure 3 Western blot analysis of P-gp(A), MRP(B), *Topo II* (C) and GST-π(D) expression in K562/A02 cells treated with vauqueline

2.2.4 马钱子碱对 K562/A02 细胞内 DNR 浓度聚集的影响 马钱子碱干预前, 代表细胞内 DNR 药物浓度的平均荧光强度为 127.88 ± 1.80, 加用异搏定和马钱子碱后细胞内的平均荧光强度明显增强, 分别为 300.29 ± 14.73 和 211.12 ± 2.56, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示马钱子碱可以使细胞内 DNR 浓度增加, 见表 2。

表 2 马钱子碱对 K562/S 和 K562/A02 细胞内柔红霉素累积的作用

Table 2 The effect of vauqueline on the accumulation of intracellular DNR in K562/S and K562/A02 cells	
Groups	MFI
K562/A02	1.45 ± 0.02
K562/S + DNR	336.83 ± 16.68
K562/A02 + DNR	127.88 ± 1.80
K562/A02 + DNR + verapamil	300.29 ± 14.73 *
K562/A02 + DNR + vauqueline	211.12 ± 2.56 *

Note: *: $P < 0.01$ vs. K562/A02 + DNR group

3 讨论

肿瘤诱导化疗不易缓解或缓解后极易复发的重

要原因之一是肿瘤细胞的耐药现象, 即多药耐药 (MDR)。MDR 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时产生交叉耐药, 对结构和作用机制完全不同的其他多种抗肿瘤药物也产生耐药性^[4]。MDR 产生机制复杂, 是多步骤、多阶段、多基因参与的过程^[5], 主要与多药耐药基因 (multidrug resistance gene 1, *DMR1*) 及其编码产物 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 所介导的经典机制及多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP)、DNA 拓扑异构酶 II (topoisomerase II, *Topo II*)、谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione s-transferase, GST) 等介导的非经典机制密切相关^[6-8]。本实验从经典及非经典机制探讨马钱子碱对 K562/A02 细胞 MDR 的逆转作用。首先我们通过 MTT 法检测马钱子碱的非细胞毒浓度 (IC_{10}), 取非细胞毒浓度 (IC_{10}) 的马钱子碱分别作用于 K562/A02 细胞, 观察马钱子碱对 K562/A02 细胞 *DMR1*、MRP、

Topo II、*GST-π* mRNA 及其蛋白表达的影响。实验结果显示,非细胞毒浓度(IC_{10})的马钱子碱能显著抑制 *DMR1* mRNA 及 P-gp 的表达($P<0.01$),而对 *MRP*、*Topo II*、*GST-π* mRNA 及其蛋白的表达无明显影响($P>0.05$)。笔者推测,马钱子碱可能通过降低 K562/A02 细胞 *DMR1* mRNA 的表达,使细胞膜上 P-gp 的表达量减少,继而降低 P-gp 介导的细胞内化疗药物的外排能力,使细胞内药物的浓度升高而发挥逆转作用(即:本实验研究结果提示马钱子碱逆转作用可能以 P-gp 介导的经典 MDR 机制为主);为了进一步证实马钱子碱的作用,我们利用流式细胞仪观察了该药对肿瘤细胞内药物浓度的影响,结果发现马钱子碱能够使得肿瘤细胞内 DNR 的浓度增加,进一步证实了该药是通过抑制 *DMR1* mRNA 及 P-gp 的表达,使化疗药物从肿瘤细胞内溢出减少,而达到逆转肿瘤细胞耐药性的作用。但是,我们也观察到马钱子碱对肿瘤细胞耐药作用的逆转作用并不是完全的,肿瘤细胞 MDR 的产生是多机制参与作用的结果,除了我们实验研究的 *DMR1*、*MRP*、*Topo II*、*GST-π* 基因外,尚有其他非经典耐药机制(例如:BCRP、LRP、BCL-2、BCR/ABL 等)的参与,故此机制尚待进一步探讨。

参考文献:

[1] Tsuruo T, Lida H, Tsukagoshi S, et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil[J]. Cancer Res, 1981, 41(5): 1967-1972.

[2] 舒鹏, 刘沈林. 肿瘤多药耐药逆转剂研究现状[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14 (21): 2884-2886.

[3] 叶琳, 陈鸿雁. 天然药物逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(1): 102-105.

[4] 张锦海, 陈幸华. 血液肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(6): 1151-1154.

[5] Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells[J]. Biochemistry Moscow, 2000, 65(1): 95-106.

[6] Valera ET, Scrideli CA, Queirez RG, et al. Multidrug resistance 1(MDR-1), multidrug resistance-related protein(MRP) and lung resistance protein(LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Sao Paulo Med J, 2004, 122 (4): 166-171.

[7] Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP(ABCG2) in tissue defense[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 204(3): 216-237.

[8] Chikamori K, Hill JE, Grabowski DR, et al. Downregulation of topoisomerase II beta in myeloid leukemia cell lines leads to activation of apoptosis following all-trans retinoic acid-induced differentiation/growth arrest[J]. Leukemia, 2006, 20 (10): 1809-1818.

[编辑:杨 卉;校对:黄国玲]