

硒化壳聚糖逆转 K562/ADM 细胞多药耐药的实验研究

邓守恒, 潘东风, 李芳, 李林均, 王贤和, 陈萍*

(湖北医药学院附属人民医院肿瘤中心, 湖北 十堰 442000)

[摘要] **目的:**研究硒化壳聚糖对人慢性粒细胞白血病耐阿霉素细胞株(K562/ADM)mdr-1 基因/P-糖蛋白(P-gp)表达及功能的影响,为逆转肿瘤多药耐药提供新的途径。**方法:**硒化壳聚糖 100,200 mg·L⁻¹作用 K562/ADM 细胞 24 h,应用 RT-PCR 法和免疫印迹法检测 mdr-1/P-gp 表达的改变;应用高效液相色谱法检测细胞内阿霉素积聚浓度;应用 MTT 法检测阿霉素对 K562/ADM 细胞增殖的影响。**结果:**硒化壳聚糖可增强 K562/ADM 细胞对阿霉素的敏感性,增加细胞内阿霉素集聚浓度,200 mg·L⁻¹硒化壳聚糖作用效果显著强于 100 mg·L⁻¹硒化壳聚糖($P < 0.01$);硒化壳聚糖能明显抑制 K562/ADM 细胞 mdr-1/P-gp 的表达($P < 0.01$),100 mg·L⁻¹硒化壳聚糖可使 mdr-1/P-gp 表达分别下降(40.87 ± 3.19)%和(35.08 ± 0.09)%,200 mg·L⁻¹硒化壳聚糖可使 mdr-1/P-gp 表达分别下降(78.24 ± 3.42)%和(79.61 ± 0.23)%。**结论:**硒化壳聚糖可明显抑制 K562/ADM 细胞 mdr-1/P-gp 表达,增加细胞内阿霉素含量,恢复细胞对化疗药物敏感性,逆转 mdr-1 编码蛋白 P-gp 介导的多药耐药。

[关键词] 硒化壳聚糖; K562/ADM 细胞; 多药耐药

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0179-04

Reverse Effect of Selenium Chiston on Multidrug Resistance in Human Leukemia Cell Line K562/ADM

DENG Shou-heng, PAN Dong-feng, LI Fang, LI Lin-jun, WANG Xian-he, CHEN Ping*

(Center of Oncology, Renming Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of selenium chiston (SC) on mdr-1 gene and P-glycoprotein (P-gp) expression in multidrug resistance human leukemia cell line K562/ adriamycin (ADM) *in vitro*. **Method:** After treated with 100, 200 mg·L⁻¹ SC for 24 h. The expression level of P-gp in K562/ADM was determined by western blot and transcription of mdr-1 gene was detected by semi-quantitative RT-PCR. The intracellular ADM concentration was tested by HPLC. The proliferation of K562/ADM cell line was determined by MTT. **Result:** The relative efficiency of K562/ADM to ADM and the intracellular accumulation of ADM increased after SC treatment and the effect of 200 mg·L⁻¹ SC was more obvious than that of 100 mg·L⁻¹ SC ($P < 0.01$); SC could inhibit the expression of mdr-1/P-gp according to results of semi-quantitative RT-PCR and Western blot ($P < 0.01$), the down-regulating rate on mdr-1/P-gp was (40.87 ± 3.19)% and (35.08 ± 0.09)% in 100 mg·L⁻¹ SC group, (78.24 ± 3.42)% and (79.61 ± 0.23)% in 200 mg·L⁻¹ SC group. **Conclusion:** SC could obviously inhibit the P-gp protein and mdr-1 gene expression and could effectively restore the sensitivity of K562/ADM cells to conventional chemotherapeutic.

[Key words] selenium chiston; K562/ADM cells; multidrug resistance

慢性粒细胞白血病(CML)是第一个被发现的 与异常基因相关的恶性肿瘤,95%的 CML 患者可

[收稿日期] 20111006(004)

[基金项目] 湖北省卫生厅基金(QJX2008-6);湖北医药学院基金(2008QDJ1)

[第一作者] 邓守恒,博士,副教授,主要从事硒的抗肿瘤研究,Tel:0719-8637939,E-mail:dshblue@163.com

[通讯作者] *陈萍,教授,硕士研究生导师,主要从事肿瘤药理研究,Tel:0719-8637939,E-mail:yychenping@163.com

检测到由 9 号和 22 号染色体易位形成的 bcr/abl 融合基因,该基因表达的 P210 融合蛋白具有很强的酪氨酸激酶(PTK)活性,被认为是 CML 发病及耐药等的重要原因^[1]。

硒化壳聚糖^[2]是来自于海洋生物的壳聚糖与亚硒酸在酸性条件下,以混合金属离子为催化剂,通过拼合原理制备而成的有机硒,前期研究发现它可通过下调 NF- κ B 通路对体外培养的 CML 细胞株 K562 增殖产生抑制^[3],且可对细胞特征性的 P210 融合蛋白产生明显的下调作用^[4],提示它可能会对 K562 耐药细胞产生逆转作用。

K562 耐阿霉素(ADM)细胞株(K562/ADM)是体外采用 ADM 诱导建立的耐药细胞株,具有典型的高表达 mdr-1 基因及 P-糖蛋白(P-gp)的多药耐药(MDR)表型,本研究以 K562/ADM 细胞为研究对象,检测了硒化壳聚糖对 K562/ADM 细胞内阿霉素积聚浓度、mdr-1/P-gp 表达的改变,为逆转白血病 MDR 提供新的途径。

1 材料

1.1 试药与试剂 硒化壳聚糖(SC,批号 100601-201016)由本院化学系合成,含硒量为 0.8%;阿霉素(adriamycin,ADM)及阿霉素对照品为浙江海正药业产品;噻唑蓝(MTT)为 Sigma 产品;Western blot 试剂盒,Promega 产品;P-gp 单抗,Santa Cruz 产品;Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、Revert AidTM First strand cDNA synthesis kit 为 Fermentas 产品;mdr-1 及 β -actin 引物由上海生工公司合成。

1.2 仪器 1100 型高效液相色谱仪(美国 Hewlett-Packard 公司),Mod 550 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),SL-1200 型超声波细胞破碎仪(南京顺流仪器有限公司),AM-PLITRON II 型 PCR 扩增仪(美国 Barnscreed/Thermolyne 公司)。

1.3 细胞 人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 及耐阿霉素细胞株(K562/ADM)均购自中国医学科学院天津血液病研究所。

2 方法

2.1 细胞培养 K562 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素、100 U·mL⁻¹链霉素和 2 U·mL⁻¹谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基内,于 37 °C、饱和湿度,5% CO₂ 条件下培养;K562/ADM 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 内培养。在培养体系中加入终浓度为 0.6 g·L⁻¹阿霉素以维持其耐药性,培养条件同 K562 细胞,2 种细胞均每隔 3~4 d 传代 1 次。

2.2 对 K562/ADM 细胞体外细胞毒性^[5] 收集指数生长期 K562/ADM 细胞以全培养液稀释成 5 × 10⁴ 个/mL 单细胞悬液,接种于 96 孔板,每个浓度复种 4 孔,于 37 °C、饱和湿度,5% CO₂ 条件下培养 12 h,将 K562/ADM 细胞分为阴性对照组(含 1640 培养基)、ADM 组(含 50 mg·L⁻¹ADM)、100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组(含 50 mg·L⁻¹ADM)、200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组(含 50 mg·L⁻¹ADM),各组加样后继续培养 24 h,每孔加入 MTT 10 μ L,继续培养 4 h,弃上清,加入 200 μ L 二甲基亚砜(DMSO),酶标仪检测 570 nm 波长吸光度(A)并计算抑制率,实验重复 3 次。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \text{不同处理组 } A / \text{阴性对照组 } A) \times 100\%$$

$$\text{逆转倍数} = (\text{逆转剂} + \text{抗癌药物}) \text{组细胞毒性} / \text{抗癌药物组细胞毒性}$$

2.3 对 K562/ADM 细胞内 ADM 积聚浓度的影响 实验分 4 组:K562/ADM 细胞(K/A);K562 细胞;K/A + 100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖;K/A + 200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖,分别离心,弃上清,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调细胞密度为 5.0 × 10⁵/mL,将细胞悬液接种于 6 孔板,5 mL/孔,加入阿霉素对照品 9.6 mg·L⁻¹,混匀后继续培养,于 1,3 h 各取 2 mL,立即用冷生理盐水洗涤 2 次,用 2 mL 生理盐水制成悬液,以 40 Hz 超声波破碎细胞 1 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清后高效液相色谱仪测定细胞内阿霉素的含量,实验重复 3 次。

2.4 Western blot 法观察 P-gp 蛋白的表达 细胞分组同 2.3,作用 24 h 后收集各组细胞各 3 × 10⁵ 个,PBS 洗 2 次,裂解,离心,收集上清,即为细胞总蛋白,进行蛋白定量,调节每份样品蛋白浓度,加等量蛋白于上样缓冲液,煮沸,SDS-PAGE 电泳,电泳后转膜,依次加入 P-gp 一抗和二抗,显色,拍照,Quanti Scan 软件进行密度扫描分析。

2.5 RT-PCR 法检测细胞 mdr-1 mRNA 的表达^[6] 细胞分组及处理同 2.4,用 Trizol 提取细胞总 RNA,cDNA 合成体系 20 μ L,小鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus,M-MLV)逆转录酶 200 U,二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)0.2 μ mol·L⁻¹,RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor,RNasin)20 U,4 种脱氧核苷酸混合物(Dntp)20 nmol·L⁻¹,随机引物 100 ng,RNA 模板 1 μ g,25 °C 10 min,42 °C 60 min,95 °C 1 min 灭活逆转录酶,冰浴 1 min。PCR 反应引物,mdr-1 上游引物:5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA

GG-3',下游引物:5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT CA-3',扩增产物 157 bp; β -actin 上游引物:5-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3',下游引物:5-GAC CAC AGT CCA TGA CAT CAC T-3',扩增产物 450 bp。PCR 反应体系:上下游引物各 15 pmol·L⁻¹,Taq 酶 1U,dNTP 5 nmol·L⁻¹,cDNA 模板 2 μ L,94 $^{\circ}$ C 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 70 s,28 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 结束反应。取 20 μ L 扩增产物行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察并照相,经凝胶图像分析仪分析,根据 mdr-1 与 β -actin 灰度比值,进行目的基因表达的半定量分析。

表 1 硒化壳聚糖对 K562/ADM 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞增殖/A	抑制率/%	逆转倍数
无药细胞	-	1.18 ± 0.09	-	-
单纯 ADM	50	0.65 ± 0.04	48.72 ± 9.21	-
ADM + 硒化壳聚糖	50 + 100	0.19 ± 0.02	72.44 ± 6.73 ¹⁾	1.47 ± 0.01
	50 + 200	0.10 ± 0.01	87.51 ± 8.34 ^{1,2)}	1.76 ± 0.05 ²⁾

注:与单纯 ADM 组相比¹⁾ P < 0.01;与 ADM + 硒化壳聚糖 100 mg·L⁻¹组相比²⁾ P < 0.05。

3.2 对 K562/ADM 细胞内 ADM 积聚浓度的影响
 高效液相色谱检测结果显示,与 ADM 共处 1 h 和 3 h,K562 细胞内 ADM 含量均高于 K562/ADM 细胞 (P < 0.01);经硒化壳聚糖作用后的 K562/ADM 细胞与 ADM 共处 1 h 和 3 h,细胞内的 ADM 含量均高于 K562/ADM 细胞组 (P < 0.01),但低于 K562 细胞组 (P < 0.01),其中经 200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖处理的 K562/ADM 细胞内 ADM 含量又均高于 100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖处理组 (P < 0.01);各同一浓度硒化壳聚糖处理组 1 h 和 3 h 之间 ADM 积聚浓度两两比较无显著差异,见表 2。

表 2 K562 及处理前后 K562/ADM 细胞内 阿霉素积聚浓度($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞内 ADM 积聚浓度/mg·L ⁻¹	
		1 h	3 h
K/A	-	0.39 ± 0.01	0.47 ± 0.03
K562	-	1.94 ± 0.22 ¹⁾	1.96 ± 0.17 ¹⁾
K/A + SC	100	1.09 ± 0.19 ^{1,2)}	1.17 ± 0.09 ^{1,2)}
	200	1.47 ± 0.03 ^{1,2,3)}	1.60 ± 0.23 ^{1,2,3)}

注:与 K/A 组相比¹⁾ P < 0.01;与 K562 组相比²⁾ P < 0.01;与 K/A + 100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组相比³⁾ P < 0.05。

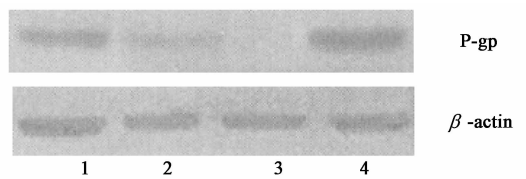
3.3 对 K562/ADM 细胞内 P-gp 表达的影响
 免疫印迹及灰度扫描结果显示,K562 细胞内 P-gp 蛋白呈低表达,检测不到,而耐 ADM 的 K562/ADM 细胞内 P-gp 蛋白呈高表达(灰度值 1.072 3 ± 0.22),

2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 K562/ADM 细胞耐药逆转的影响
 MTT 检测结果显示,经 100,200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖处理 K562/ADM 细胞后,ADM 对 K562/ADM 细胞的抑制率显著高于单纯 ADM 组 (P < 0.01);200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖处理 K562/ADM 细胞后,ADM 对 K562/ADM 细胞的抑制率显著高于 100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组 (P < 0.05);200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组对 K562/ADM 细胞耐药的逆转倍数高于 100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组 (P < 0.05)。见表 1。

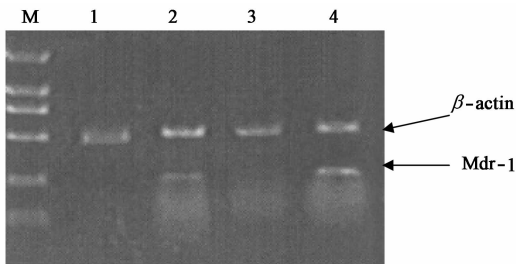
K562/ADM 细胞经 100,200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖作用 24 h 后,细胞内 P-gp 蛋白含量明显下降(灰度值分别为 0.653 2 ± 0.11 和 0.196 4 ± 0.21),与未处理 K562/ADM 细胞组比较,均有显著性差异 (P < 0.01),100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖使 K562/ADM 细胞 P-gp 表达下调 (35.08 ± 0.09)%,200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖使其下调 (79.61 ± 0.23)%,见图 1。



1. K/A + 100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖;
 2. K/A + 200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖;
 3. K562 细胞; 4. K562/ADM 细胞 (K/A) (图 2 同)
 图 1 硒化壳聚糖对 K562/ADM 细胞 P-gp 的影响

3.4 对 K562/ADM 细胞 mdr-1 mRNA 表达的影响
 RT-PCR 检测结果显示,K562 细胞中 mdr-1 基因表达水平低,未见阳性条带,K562/ADM 细胞组、K/A + 100 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组及 K/A + 200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖组均可在 157 bp 处见清晰的 mdr-1 基因阳性条带。半定量分析结果显示,K562/ADM 细胞 mdr-1 基因表达比值为 0.762 3 ± 0.05,经 100 mg·L⁻¹ 或 200 mg·L⁻¹ 硒化壳聚糖作用 24 h 后,基

因比值分别降至 0.4431 ± 0.17 , 0.1426 ± 0.24 , 与未处理 K562/ADM 细胞比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硒化壳聚糖使 K562/ADM 细胞 *mdr-1* 基因表达下调 (40.87 ± 3.19)%, $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硒化壳聚糖使其下调 (78.24 ± 3.42)%, 见图 2。



M. Marker

图 2 硒化壳聚糖对 K562/ADM 细胞 *mdr-1* mRNA 水平的影响

4 讨论

白血病多药耐药 (MDR) 是指白血病细胞接触一种抗癌药物后产生的对多种结构和功能迥异的抗癌药物的耐受性^[7]。其发生涉及到多种机制,其中以白血病细胞过度表达 *mdr-1* 基因编码的 ABC 转运蛋白超家族成员膜 P-gp 为主要的机制。钙离子拮抗剂、免疫抑制剂等能通过抑制 P-gp 的外泵功能来阻止 MDR 的发生,但是它们的心脏毒性、免疫抑制及肾脏毒性等严重不良反应限制了临床应用。此外,肿瘤细胞对这类药物同样能产生再次耐药,因此有必要探寻毒性更低、更有效的方法来逆转 MDR。

硒化壳聚糖是将硒酸根吸附于壳聚糖单体 2-NH₂ 和 6-OH 制备成的低相对分子质量有机硒,具有高效低毒的特性,前期研究结果显示,硒化壳聚糖能对 K562 细胞及耐 ADM 的 K562/ADM 细胞的增殖产生明显抑制作用,对 K562 细胞的作用强于 K562/ADM 细胞^[8],而本文结果则进一步显示,硒化壳聚糖可通过下调 K562/ADM 细胞内 *mdr-1* 基因表达水平及 P-gp 含量,达到升高细胞内 ADM 含量,增强 ADM 对 K562/ADM 细胞的杀伤作用。

已知人 *mdr-1* 基因定位于染色体 7q21.1,其 cDNA 含 4 669 个碱基对,转录产物为 4.5 kb mRNA,编码的产物 P-gp 是由 1 280 个氨基酸组成的 ATP 依赖性膜转运蛋白,相对分子质量为 170×10^3 ,主要分布于细胞膜,小部分位于内质网和高尔基体^[9],P-gp 能够运输多种不同结构的底物,当药物进入浆膜后,P-gp 能与之结合并活化 ATP 结合区,水解 ATP 释放出能量将药物转运至细胞外从而降

低细胞内药物浓度,肿瘤细胞由此逃避化疗药物的杀伤而产生耐受^[10]。硒化壳聚糖可在基因水平上抑制 P-gp 的合成,并最终减少了 P-gp 对 ADM 的外泵作用,增加了 K562/ADM 细胞内化疗药的药物浓度,增强了白血病细胞对化疗药物的敏感性。

然而,从本文结果中可看出,硒化壳聚糖对 K562/ADM *mdr-1*/P-gp 的下调作用远未达到 K562 阴性对照组水平,说明硒化壳聚糖逆转肿瘤细胞耐药尚需进行更深入的研究。

[参考文献]

[1] Cortez D, Stoica G, Pierce J H, et al. The BCR/ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway [J]. *Oncogene*, 1996, 13 (10):2589.

[2] 孙兰萍,张胜义,许晖. 硒化壳聚糖的制备及理化性质的研究 [J]. *食品工业科技*, 2006, 27(2):145.

[3] 邓守恒,孙各琴,朱名安,等. 硒化壳聚糖对 K562 细胞的作用及其与 NF-KB 信号分子的关系 [J]. *陕西医学杂志*, 2005, 34(12):1472.

[4] 邓守恒,李芳,李林均,等. 硒化壳聚糖对慢性粒细胞白血病 K562 细胞 *bcr/abl* 融合基因表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(1):106.

[5] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996:284.

[6] 祝众,谢兆霞,谭达人,等. 急性白血病患者单个核细胞内一氧化氮含量、一氧化氮合酶活性的变化与多药耐药的关系 [J]. *中华血液学杂志*, 2007, 23 (12):651.

[7] Biedler J L, Riehm H. Cellular resistance to aetinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: Eross-resistance, radioautographie, and cytogenetic studies [J]. *Cancer Res*, 1970, 30(4):1174.

[8] 邓守恒,孙各琴,周有利,等. 硒化壳聚糖对 K562 和 K562/ADM 作用的比较研究 [J]. *广东微量元素科学*, 2005, 12(12):28.

[9] Szabo D, Keyzer H, Kaiser H E, et al. Reversal of multi drug resistance of tumorells [J]. *Anticancer Res*, 2010, 20(6B):4261.

[10] Flens M J, Zaman G J, Vander Valk P, et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein [J]. *Am J Pathol*, 1999, 148(4):1237.

[责任编辑 聂淑琴]