

三氧化二砷逆转肝癌细胞株HepG2/ADM多药耐药的作用

李贺, 熊茂明, 孟翔凌, 耿小平

李贺, 熊茂明, 孟翔凌, 耿小平, 安徽医科大学第一附属医院
普外科 安徽省合肥市 230022
李贺, 住院医师, 在读研究生, 主要从事肝胆疾病研究.
通讯作者: 熊茂明, 230022, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第一
附属医院普外科三病区. xiongmd@yahoo.com.cn
电话: 0551-2322035 传真: 0551-3633742
收稿日期: 2006-07-17 接受日期: 2006-08-10

Reversing effect of arsenic trioxide on multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma HepG2/ADM cells

He Li, Mao-Ming Xiong, Xiang-Ling Meng,
Xiao-Ping Geng

He Li, Mao-Ming Xiong, Xiang-Ling Meng, Xiao-Ping Geng, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China

Correspondence to: Mao-Ming Xiong, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China. xiongmd@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-17 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To explore the reversing effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on the multidrug resistance (MDR) of human hepatocellular carcinoma HepG2/ADM cells *in vitro* and its potential mechanism.

METHODS: MTT assay was used to test the toxicity of As_2O_3 and the chemosensitivity to chemotherapeutics in As_2O_3 -treated HepG2 and HepG2/ADM cells. Flow cytometry was used to determine the concentration of intracellular adriamycin (ADM). The expression of MDR1 was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The inhibitory rates of HepG2 and HepG2/ADM cells caused by As_2O_3 were lower than 15% under the dose of 0.25 mg/L, and the IC_{50} were 1.02 and 1.34 mg/L, respectively. As_2O_3 at 0.2 mg/L partly overcame the MDR of HepG2/ADM cells. The reverse efficiencies

(multiples) to ADM, cisplatin (CDDP), mytomy-
cin (MMC), 5-fluororacil (5-FU) were 2.92, 3.09,
2.13 and 2.60, respectively. Furthermore, after
exposure to 0.2 mg/L As_2O_3 , the concentration
of ADM was significantly increased while MDR1
expression was partially decreased in HepG2/
ADM cells.

CONCLUSION: As_2O_3 can reverse the multidrug
resistance of human hepatocellular carcinoma
cells *in vitro*, and the possible mechanism is re-
lated to the down-regulated expression of MDR1
and raised concentration of drug inside the cells.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Multidrug
resistance; Arsenic trioxide

Li H, Xiong MM, Meng XL, Geng XP. Reversing effect
of arsenic trioxide on multidrug resistance of human
hepatocellular carcinoma HepG2/ADM cells. *Shijie
Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(27):2691-2694

摘要

目的: 探讨三氧化二砷(As_2O_3)体外逆转人肝
癌细胞多药耐药性的作用及机制。

方法: MTT法检测 As_2O_3 的细胞毒作用和处理
前后耐药细胞对化疗药物的敏感性, 用流式细
胞仪检测细胞内阿霉素浓度, 通过RT-PCR检
测MDR1基因的表达。

结果: As_2O_3 在0.25 mg/L剂量以下时对HepG2
和HepG2/ADM耐药细胞株的抑制率均小于
15%, 半数抑制率(IC_{50})分别为1.02和1.34 mg/
L, 无细胞毒剂量0.2 mg/L的 As_2O_3 能部分逆转
HepG2/ADM细胞对阿霉素、顺铂(CDDP)、
丝裂霉素(MMC)、5-氟尿嘧啶(5-FU)的耐药
性, 逆转倍数分别为2.92, 3.09, 2.13, 2.60倍。同
时无细胞毒剂量0.2 mg/L的 As_2O_3 能使HepG2/
ADM细胞内阿霉素浓度明显增加, MDR1表
达下降。

结论: As_2O_3 具有体外逆转人肝癌细胞多药耐
药性的作用, 可能与下调MDR1表达、增加细
胞内药物积累有关。

■背景资料

多药耐药是肿瘤
细胞免受化疗药
物攻击的最重要
的细胞防御机制,
因此如何逆转多
药耐药成为目前
对肿瘤化疗最常
解决的问题, 而寻
找多药耐药逆转
剂成为解决问题的
关键。MDR1基
因被认为是使肿
瘤细胞产生多药
耐药性的最主要
基因, Pgp是其表
达产物, 而Pgp能
够降低化疗药物
在肿瘤细胞内的
蓄积。

■应用要点

本文证实三氧化二砷体外能够有效逆转肝癌耐药细胞株HepG2/ADM的耐药性,为肝癌的临床治疗开辟了一条新的途径,临床应用前景广阔。

关键词: 肝癌; 多药耐药; 三氧化二砷

李贺, 熊茂明, 孟翔凌, 耿小平. 三氧化二砷逆转肝癌细胞株HepG2/ADM多药耐药的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(27):2691-2694

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2691.asp>

0 引言

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,虽然近年来治疗技术有了很大提高,但手术切除率及5 a生存率都较低,在各种综合性治疗中化疗仍是很重要的手段,然而肝癌细胞多药耐药(multidrug resistance, MDR)的存在常使化疗失败. 因此寻找多药耐药逆转剂成为解决肝癌MDR的有效途径之一. 我们选用中药砒霜的有效成分-三氧化二砷(As_2O_3)体外逆转肝癌耐药细胞株HepG2/ADM的耐药性,以期寻求一种具有临床应用价值的逆转新药,从而优化化疗方案,提高临床疗效.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2、人肝癌细胞耐药株HepG2/ADM由华中科技大学附属同济医院肝脏外科中心陈孝平教授建立并惠赠. As_2O_3 (哈尔滨伊达药业有限公司产品), 阿霉素(ADM, 法玛西亚公司), 顺铂(CDDP, 山东齐鲁制药), 丝裂霉素(MMC, 浙江海正药业), 5-氟尿嘧啶(5-FU, 旭东海普公司), 维拉帕米(VER, 上海天禾制药), TRIzol Resgeant试剂盒(Gibco公司), P170-PE鼠抗人mAb(Coulter公司), RT-PCR试剂盒(TaKaRa产品).

1.2 方法

1.2.1 As_2O_3 细胞毒性实验^[1] 将对数生长期HepG2, HepG2/ADM细胞制成 $1 \times 10^6/\text{L}$ 单细胞悬液, 分别接种于96孔板, 每孔加细胞悬液100 μL , 培养24 h, 按分组情况分别加入4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 mg/L的 As_2O_3 , 每个浓度设5个复孔, 每孔终体积200 μL , 培养48 h后, 每孔加入MTT (5 g/L) 20 μL , 继续培养4 h, 吸弃培养液, 每孔加入DMSO 150 μL , 充分振荡10 min, 于酶标仪上检测490 nm处吸光度值(A值), 计算细胞抑制率, 细胞抑制率 = $[1 - (A_x - A)/(A_0 - A)] \times 100\%$, A_x 为加药孔吸光度值, A 为只加培养液不加细胞悬液对照组吸光度值, A_0 为只加细胞悬液不加药孔的吸光度值.

1.2.2 MTT实验 将细胞分成HepG2, HepG2+ As_2O_3 , HepG2/ADM, HepG2/ADM+ As_2O_3 和HepG2/ADM+VER五组(以VER

作逆转效能阳性对照, As_2O_3 浓度根据 As_2O_3 细胞毒性实验结果, 选取无细胞毒剂量0.2 mg/L), 按上述方法接种于96孔板, 培养24 h, 分别加入ADM, CDDP, MMC, 5-FU, 每种药物设6组浓度, 每组浓度5个复孔; 继续培养48 h, 进行MTT测定, 计算半数抑制率(IC_{50}). 耐药倍数(RI) = 耐药株 IC_{50} /亲本株 IC_{50} ; 逆转倍数 = 耐药株 IC_{50} /加 As_2O_3 后 IC_{50} ; 相对逆转效率 = (逆转前 IC_{50} -逆转后 IC_{50})/(逆转前 IC_{50} -亲本株 IC_{50}) $\times 100\%$. 实验在不同日重复3次.

1.2.3 流式细胞仪检测细胞内药物浓度和细胞膜转运蛋白(Pgp)的表达 取对数生长期的HepG2, HepG2/ADM制备成单细胞悬液($5 \times 10^5/\text{L}$), 实验组以无细胞毒剂量的 As_2O_3 , 即0.2 mg/L As_2O_3 分别联合1.2, 2.4, 4.8 mg/L的ADM共培养4 h, 对照组仅含1.2, 2.4, 4.8 mg/L的ADM, 冷PBS (4 $^{\circ}\text{C}$, 0.01 mol/L, pH 7.4)洗涤2次, 再重悬于冷PBS中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存至上样行流式细胞仪(Beckman Coulter, EPICS-XL-4)检测($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$)细胞内阿霉素荧光强度. 将细胞分成HepG2/ADM和HepG2/ADM+ As_2O_3 (0.2 mg/L)组, 作用48 h后, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{L}$, 取1 mL离心, 弃上清, 加P170-PE鼠抗人mAb 5 μL , 室温下20 min, 加PBS 1 mL离心, 除去未结合的荧光抗体, 最后加入PBS 0.5 mL待测, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$, Pgp含量以Pgp荧光强度表示.

1.2.4 RT-PCR检测MDR1表达 取对数生长期细胞 1×10^7 用TRIzol一步法提取总RNA, 紫外分光光度计检测总RNA含量. 取0.5 μg 细胞总RNA, 0.5 μL 的逆转录酶AMV, 在Oligo dT-Adaptor Primer存在下建立10 μL 反应体系, 操作步骤严格按照试剂盒说明进行. PCR扩增MDR1上游引物: 5'CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG, 下游引物: 5'GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA; β_2 -mg上游引物: 5'ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA, 下游引物: 5'ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG. 按试剂盒说明建立反应体系, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸4 min, 共35个循环, 得到157 bp的MDR1和121 bp的 β_2 -mg扩增产物. 扩增产物于25 g/L琼脂糖凝胶电泳进行检测, EB染色, 用凝胶成像系统(Tanon GIS-2010)进行分析.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 结果用SPSS 12.0统计软件进行t检验和方差分析.

2 结果

2.1 As_2O_3 细胞毒性检测结果 As_2O_3 在0.25 mg/L

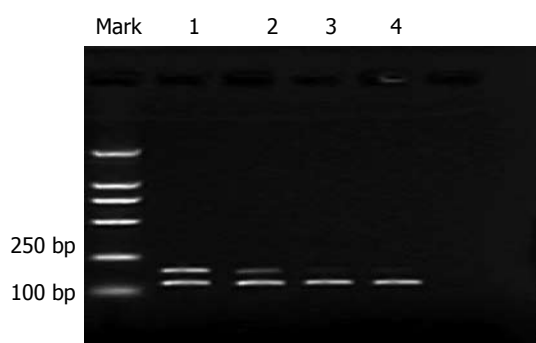


图 1 As_2O_3 对HepG2/ADM及HepG2细胞MDR1表达的影响。
1: As_2O_3 处理前HepG2/ADM; 2: As_2O_3 处理后HepG2/ADM;
3: As_2O_3 处理前HepG2; 4: As_2O_3 处理后HepG2。

表 1 As_2O_3 的细胞毒性测定 (mean \pm SD)

As_2O_3 (mg/L)	抑制率 (%)	
	HepG2	HepG2/ADM
0.25	12 \pm 0.2	7 \pm 0.4
0.5	33 \pm 0.6	22 \pm 0.3
1	49 \pm 0.4	44 \pm 0.2
2	66 \pm 0.3	57 \pm 0.6
4	87 \pm 0.4	81 \pm 0.5

■名词解释

多药耐药(multi-drug resistance, MDR): 是指肿瘤细胞接触某一种化疗药物, 不仅对此种药物产生抗药性, 而且还可对其他结构和功能不同的多种化疗药物产生交叉耐药性。MDR细胞的存在不仅大大降低了化疗效果, 而且是肿瘤复发转移的重要原因。

表 2 HepG2细胞与HepG2/ADM细胞的药物敏感性 (mean \pm SD, mg/L)

分组	IC_{50}			
	ADM	CDDP	MMC	5-FU
HepG2	0.074 \pm 0.004	0.156 \pm 0.024	0.105 \pm 0.008	0.307 \pm 0.011
HepG2+ As_2O_3	0.041 \pm 0.002 ^a	0.132 \pm 0.011	0.067 \pm 0.011	0.150 \pm 0.005 ^a
HepG2/ADM	0.913 \pm 0.055	0.895 \pm 0.074	0.260 \pm 0.012	1.169 \pm 0.028
HepG2/ADM+ As_2O_3	0.312 \pm 0.031 ^b	0.290 \pm 0.023 ^b	0.122 \pm 0.010 ^b	0.450 \pm 0.015 ^c
HepG2/ADM+VER	0.152 \pm 0.003 ^e	0.3 \pm 0.009	0.085 \pm 0.009	0.377 \pm 0.017

^a $P < 0.05$ vs HepG2; ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$ vs HepG2/ADM; ^d $P < 0.05$ vs HepG2/ADM+ As_2O_3 ; VER浓度为10 μ g/L, As_2O_3 浓度为0.2 mg/L。

表 3 HepG2/ADM细胞的耐药程度和 As_2O_3 的逆转作用

	ADM	CDDP	MMC	5-FU
耐药倍数	12.34	5.74	2.48	3.81
逆转倍数	2.92	3.09	2.13	2.60
相对逆转效率	71.6%	81.9%	86.8%	83.4%

时对HepG2, HepG2/ADM细胞无明显毒性, 超过此浓度呈剂量效应关系, As_2O_3 对HepG2, HepG2/ADM的 IC_{50} 分别为1.02 mg/L, 1.34 mg/L(表1)。

2.2 细胞对抗癌药的敏感性 使用0.2 mg/L浓度 As_2O_3 后ADM, CDDP, MMC和5-FU对HepG2/ADM的 IC_{50} 明显降低(表2)。 As_2O_3 对HepG2/ADM不同化疗药物耐药性的逆转倍数分别为: ADM 2.92倍、CDDP 3.09倍、MMC 2.13倍、5-FU 2.60倍(表3)。

2.3 As_2O_3 对细胞内药物浓度的影响 实验组ADM与无细胞毒性的 As_2O_3 合用, 与对照组单用ADM比较, 细胞内ADM的累积量明显提高($P < 0.01$, 表4)。

2.4 对HepG2/ADM细胞Pgp和MDR1表达的影响 HepG2/ADM细胞的Pgp表达(细胞内平均荧光强度: 7.22 ± 0.23)较HepG2细胞(3.26 ± 0.24)

表 4 HepG2细胞与HepG2/ADM细胞内平均阿霉素荧光强度 (mean \pm SD)

细胞	ADM (mg/L)	细胞内平均荧光强度	
		实验组	对照组
HepG2	1.2	11.32 \pm 0.14 ^b	7.22 \pm 0.09
HepG2	2.4	15.47 \pm 0.29 ^b	8.29 \pm 0.05
HepG2	4.8	18.25 \pm 0.22 ^b	9.60 \pm 0.01
HepG2/ADM	1.2	3.98 \pm 0.04 ^b	1.44 \pm 0.06
HepG2/ADM	2.4	5.29 \pm 0.06 ^b	1.52 \pm 0.02
HepG2/ADM	4.8	6.44 \pm 0.03 ^b	2.11 \pm 0.03

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

高, As_2O_3 作用于HepG2/ADM细胞后, 其Pgp表达降低(5.65 ± 0.03)。RT-PCR结果显示: HepG2细胞的MDR1表达明显弱于HepG2/ADM细胞, 且 As_2O_3 作用后无显著变化; 而HepG2/ADM经0.2 mg/L As_2O_3 作用48 h后, 强度明显下降, 但仍高于HepG2细胞(图1)。

3 讨论

砒霜是中国的传统中药, 作为药物应用已有2000多年历史。1970年哈尔滨医科大学首先使用 As_2O_3 治疗急性早幼粒细胞性白血病获得显

■同行评价

逆转MDR的研究是目前的热点之一,特别是用中药作为逆转剂,本文选题具有先进性,科研方案设计严谨合理,方法先进,结果可信,文字流畅,表达简洁准确。

著的临床效果。随后的研究发现, As_2O_3 对许多实体组织肿瘤耐药细胞如人乳腺癌耐药细胞株MCF-7/ADM^[2]有逆转作用, 韩冰 *et al*^[3]研究发现, As_2O_3 能降低人肺腺癌细胞A594 MDR1基因的表达式。史立军 *et al*^[4]研究发现, As_2O_3 可能通过抑制凋亡抑制因子survivin基因的表达, 促进胰腺癌PC₂细胞凋亡。何景利 *et al*^[5]研究发现, As_2O_3 与顺铂联合应用能够降低人结肠癌细胞株colon26的Bcl-2蛋白表达, 从而促进细胞凋亡。有关 As_2O_3 作用与肝癌细胞的实验研究也有报道, 刘连新 *et al*^[6]研究发现, As_2O_3 可通过诱导肝癌细胞株凋亡而抑制肝癌细胞生长, 其诱导凋亡机制可能是通过半胱氨酸蛋白酶-3起作用。但目前尚未有 As_2O_3 直接作用与肝癌多药耐药细胞株的研究报道。

肿瘤细胞在化疗过程中会产生多药耐药性, 目前对MDR的研究主要集中在MDR的发生机制和寻找有临床应用价值的MDR逆转剂两方面。我们以中药砒霜的有效成分 As_2O_3 体外逆转人肝癌耐药细胞株HepG2/ADM的耐药性。本组实验结果显示, 当 As_2O_3 剂量达到0.5 mg/L时, 对HepG2, HepG2/ADM细胞毒性明显增强。而小剂量 As_2O_3 (0.2 mg/L), 可明显增加ADM在HepG2/ADM细胞内的蓄积浓度, 同时能有效逆转HepG2/ADM细胞对ADM, cDDP, MMC, 5-FU的耐药, 逆转倍数分别为2.92倍、3.09倍、2.13倍、2.60倍。MDR产生的最大原因是肿瘤细胞

化疗后细胞内Pgp的过度表达^[7]。本组流式细胞术结果表明, As_2O_3 可部分抑制HepG2/ADM细胞Pgp的表达, RT-PCR结果显示, As_2O_3 可使HepG2/ADM细胞MDR1表达降低。以上结果表明, As_2O_3 在体外逆转肝癌耐药主要是通过抑制MDR1表达, 阻断Pgp蛋白表达, 抑制Pgp泵功能, 从而提高HepG2/ADM细胞内的化疗药物浓度, 增强对耐药细胞的杀伤力。 As_2O_3 在体外表现出较强的逆转肝癌多药耐药性作用, 为临床肝癌的化疗提供了一条新的途径。

4 参考文献

- 1 Yu DS, Ma CP, Chang SY. Establishment and characterization of renal cell carcinoma cell lines with multidrug resistance. *Urol Res* 2000; 28: 86-92
- 2 王秀丽, 孔力, 赵瑾瑶, 杨佩满. 三氧化二砷逆转人乳腺癌MCF-7/ADM细胞耐药的机制研究. *中华肿瘤杂志* 2002; 24: 339-343
- 3 韩冰, 石玉枝, 霍建民. 三氧化二砷对肺腺癌细胞凋亡及肺耐药蛋白基因多药耐药蛋白基因表达的影响. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 243-244
- 4 史立军, 闫彬彬, 李双星, 孟艳玲, 马珊珊, 刘铁夫, 李呼伦. As_2O_3 对胰腺癌细胞株的抑制作用及其机制的初步探讨. *中国病理生理杂志* 2005; 21: 1572-1574
- 5 何景利, 王贵英, 单宝恩. 三氧化二砷联合顺铂对人结肠癌细胞株colon26抑制作用机理的研究. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 1125-1128
- 6 刘连新, 朱安龙, 陈炜, 郭化鑫, 王秀琴, 刘芝华, 张亭栋, 姜洪池, 吴旻. 三氧化二砷对原发性肝癌的作用及其机理研究. *中华外科杂志* 2005; 43: 33-36
- 7 Huesker M, Folmer Y, Schneider M, Fulda C, Blum HE, Hafkemeyer P. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes. *Hepatology* 2002; 36: 874-884

电编 张敏 编辑 张焕兰