论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0328-04

NHE-1特异性抑制剂DMA逆转HL-60/ADM细胞多药耐药的实验研究

常 城,孔佩艳,陈幸华,彭贤贵,刘 林,刘 红,曾东风,梁 雪,王庆余 (第三军医大学新桥医院血液内科,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨钠/氢交换器-1(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)特异性抑制剂二甲基氨氯吡咪(dimethyl amiloride, DMA)是否能在体外逆转耐药细胞株HL-60/ADM的多药耐药及其可能机制。**方法** 以阿霉素诱导产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)的HL-60/ADM细胞株为研究对象,用MTT法检测化疗药物敏感性,流式细胞仪检测细胞内柔红霉素积累量,RT-PCR法检测mrp、bcl-2、bax mRNA表达,免疫细胞化学法检测细胞膜多药耐药相关蛋白(MRP)表达,TUNEL法检测原位细胞凋亡。**结果** 与50 μmol/L DMA共同培养24 h后,HL-60/ADM细胞对ADM、MIT、VCR、HAR 4种化疗药物的IC_{50}值分别由(839.5±45.2)、(321.2±28.9)、(70.5±15.5)、(65.2±20.7)ng/ml降低至(180.5±38.9)、(76.4±12.0)、(30.2±7.5)、(31.7±7.2)ng/ml;分别与50、100 μmol/L DMA共培养24 h后,HL-60/ADM细胞内DNR积累量荧光强度由作用前的33.56升高到48.74和70.10,细胞内mrp mRNA表达量、MRP蛋白表达量及bcl-2 mRNA表达量明显降低,bax mRNA表达量明显升高;与100 μmol/L DMA共同培养24 h后,5 μg/ml ADM作用下的HL-60/ADM细胞凋亡率明显增高。**结论** DMA可逆转HL-60/ADM细胞的MDR,其机制可能与下调MRP表达及促进bcl-2/bax凋亡途径有关。

关键词: 二甲基氨氯吡咪;钠/氢交换蛋白-1;HL-60/ADM;多药耐药;逆转

中图法分类号: R730.53;R733.7;R965 **文献标识码**: A

Reversal of multi-drug resistance in HL-60/ADM cells by dimethyl amiloride *in vitro*

CHANG Cheng, KONG Pei-yan, CHEN Xing-hua, PENG Xian-gui, LIU Lin, LIU Hong, ZENG Dong-feng, LIANG Xue, WANG Qing-yu (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the reversal and the possible mechanism of multidrug-resistance (MDR) by dimethyl amiloride(DMA), a specific inhibitor of Na^+/H^+ exchanger-1(NHE-1), in HL-60/ADM cell line *in vitro*. **Methods** After DMA treatment, the chemosensitivity of HL-60/ADM cells was studied by MTT assay. Intracellular concentration of daunorubicin (DNR) was determined by flow cytometry. Expression of mrp mRNA, bcl-2 mRNA, bax mRNA was assayed by semi-quantitive RT-PCR. MRP protein expression was detected immunohistochemically. Cell apoptosis was observed with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results** After treated with 50 μmol/L DMA for 24 h, IC_{50} of HL-60/ADM cells to ADM, MIT, VCR and HAR decreased from (839.5±45.2), (321.2±28.9), (70.5±15.5), (65.2±20.7) ng/ml to (180.5±38.9), (76.4±12.0), (30.2±7.5), (31.7±7.2) ng/ml. After treated with 50 μmol/L or 100 μmol/L DMA for 24 h, the intracellular concentration of DNR in HL-60/ADM cells increased from 33.56 to 48.74 or 70.10, and expression of mrp mRNA, MRP protein and bcl-2 mRNA decreased significantly, but bax mRNA increased significantly. After treated with 100 μmol/L DMA for 24 h, the rate of apoptotic cells in HL-60/ADM cells treated with 5 μg/ml ADM increased significantly. **Conclusion** DMA could reverse MDR of HL-60/ADM cells *in vitro*, and the mechanisms were associated with decrease of MRP expression and induction of cell apoptosis through bcl-2/bax pathway.

Key words: dimethyl amiloride; Na^+/H^+ exchanger-1; HL-60/ADM; multidrug resistance; reversal

基金项目:第三军医大学新桥医院创新性基金(2001D068)

Supported by the Creation Funds of Xinqiao Hospital of Third Military Medical University(2001D068)

作者简介:常 城(1972-),男,云南省昆明市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事血液病诊断治疗方面的研究。电话:(023)68755609,E-mail: changcheng1231@yahoo.com.cn

通讯作者:孔佩艳,电话:(023)68755609,E-mail: peiyankong@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-04-14;**修回日期**:2006-11-15

白血病细胞产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)是导致化疗失败、白血病复发的根本原因。由于MDR机制复杂多样且往往复合存在,临床逆转MDR的药物效果均不理想。Larsen等[1]报道白血病耐药细胞有比敏感细胞更高的细胞内pH值(intracellular pH, pHi),且这一现象与耐药细胞存在何种耐药机制无关。我们前期研究也证实了阿霉素诱导产生MDR的白血病细胞株HL-60/ADM细胞pHi较不耐药的HL-60细胞明显升高,且细胞内钠/氢交换器-1(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)表达显著增高,提示白血病细胞内与pHi变化相联系的机制在MDR中也起了重要作用。本研究拟探讨NHE-1特异性抑制剂二甲基氨氯吡咪(dimethyl amiloride, DMA)是否能在体外逆转白血病细胞的MDR及其可能机制。

1　材料与方法

1.1　细胞株

HL-60/ADM细胞株由中国医学科学院血液学研究所药物室提供,引自日本细胞库,由阿霉素诱导产生耐药,与多种化疗药物交叉耐药,细胞膜表面高表达多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)。HL-60细胞株为我室保存。以含10%胎牛血清(Hyclone公司)的RPMI1640培养基(Hyclone公司)37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。HL-60/ADM细胞系传代培养时,培养基中加入阿霉素0.5 μg/ml,进行指标检测前2周更换为无药培养基培养。

1.2　主要试剂

噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、DMA购自美国Sigma公司,鼠抗人MRP单克隆抗体及S-P免疫组化试剂盒购于北京中杉生物公司,阿霉素(ADM)为深圳万乐药业有限公司产品,米托蒽醌(MIT)为四川升合公司产品,长春新碱(VCR)、阿糖胞苷(Ara-c)、三尖杉酯碱(HAR)为上海华联公司产品,体外最大化疗药物浓度分别为:ADM 12.5 mg/L, MIT 5 mg/L, VCR 1 mg/L, HAR 1.25 mg/L。

1.3　干预条件及分组

不同浓度DMA与实验细胞共同培养24 h后进行各项检测。DMA干预HL-60/ADM为实验组,无DMA干预HL-60/ADM及HL-60细胞为对照组。

1.4　药物敏感性检测

采用MTT法。对数生长期HL-60/ADM细胞培养液中加入50 μmol/L DMA共同孵育24 h后,以1×10^5/ml浓度接种于96孔板,每孔80 μl。加入上述各种化疗药物20 μl/孔,终浓度分别为体外最大化疗浓度的0.01、0.1、1、10倍,每种浓度各加4复孔,预留不加药物的阴性对照孔和只加RPMI1640培养基的空白对照孔。培养72 h后,加入无血清1640培养液180 μl/孔,同时加入MTT工作液20 μl/孔,继续孵育5 h,离心后弃上清,加入DMSO 150 μl/孔,室温震荡使结晶充分溶解。酶联免疫检测仪选择570 nm波长,测定每孔的光吸收值[$D(570)$],计算出IC_{50}值、耐药逆转倍数及相对逆转效率。相对逆转效率$=(IC_{50A}-IC_{50B})/(IC_{50A}-IC_{50C})$,其中$IC_{50A}$是HL-60/ADM细胞的$IC_{50}$,$IC_{50B}$是DMA干预后HL-60/ADM细胞的$IC_{50}$,$IC_{50C}$是HL-60细胞的$IC_{50}$。

1.5　细胞内柔红霉素(daunorubicin, DNR)积累量的测定

与50、100 μmol/L DMA共同培养24 h后,HL-60/ADM细胞按1×10^6/ml的浓度与1 μg/ml的DNR 37 ℃共同孵育1 h后,冰浴终止DNR作用。参照文献[2]方法用流式细胞仪检测细胞内DNR稳态积累量。以未经处理的HL-60/ADM细胞及HL-60细胞为对照。

1.6　mrp、bcl-2、bax mRNA表达检测

半定量RT-PCR法。HL-60/ADM细胞经过100 μmol/L DMA共同培养24 h后,Tripure法提取细胞总RNA,紫外分光光度计测定总RNA的纯度[$D(260)/D(280)>1.75$],并进行RNA定量,逆转录得到cDNA。PCR引物(由上海生工生物工程公司合成):MRP上游引物:5′-CGCCTTCGCTGAGTTCCTGC-3′,下游引物:5′-GTTCTGCGGTGCTGTTGTGG-3′,扩增产物为221 bp。bcl-2上游引物:5′-GTGGGATACTGGAGATGAAGACT-3′,下游引物:5′-CAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3′,扩增产物为550 bp。bax上游引物:5′-CAGGCGAATTGGAGATGAAC-3′,下游引物:5′-GGTGAGTGAGGCAGTGAGGA-3′,扩增产物为370 bp。内参照为β-actin,上游引物:5′-CCAAGGCCAAC-CGCGAGAAGATGAC-3′,下游引物:5′-AGGGTACATGGTGGT-GCCGCCAGAC-3′,扩增产物为587 bp。反应条件:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性40 s;退火50 s(温度MRP 55 ℃、bcl-2 54 ℃、bax 58 ℃);72 ℃延伸90 s;共重复30个循环;末次循环后延伸10 min。电泳后,扫描测定目的产物和β-actin产物条带光密度D值之比($D_{目的产物}/D_{\beta\text{-actin}}$)作数据分析。

1.7　MRP蛋白表达检测

HL-60/ADM细胞与100 μmol/L DMA共同孵育24 h后,按照S-P试剂盒说明书进行MRP免疫细胞化学染色。

1.8　原位细胞凋亡率检测

在ADM 5 μg/ml培养基中培养HL-60/ADM细胞,同时加入DMA 100 μmol/L共同培养24 h,不加DMA为对照,采用TUNEL法检测原位凋亡细胞比率。封片后光镜(×400)下观察5个视野,计数200个细胞以上,计算阳性细胞百分率。

1.9　统计学分析

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,SPSS 11.0软件进行t检验。

2　结果

2.1　HL-60/ADM细胞药物敏感性变化

HL-60/ADM细胞对ADM、MIT、VCR、HAR 4种化疗药物的IC_{50}值分别为(839.5±45.2)、(321.2±28.9)、(70.5±15.5)、(65.2±20.7) ng/ml,与HL-60细胞相比,耐药倍数在26.1~51.5倍之间。HL-60/ADM细胞与50 μmol/L DMA共同培养24 h后,HL-60/ADM细胞对上述4种化疗药物的IC_{50}值分别降

低至(180.5 ± 38.9)、(76.4 ± 12.0)、(30.2 ± 7.5)、(31.7 ± 7.2) ng/ml,较 DMA 作用前显著降低,耐药相对逆转率均达到 50% 以上。HL-60/ADM 细胞对 Ara-c IC_{50} 值较 HL-60 细胞无明显差异,DMA 作用后也无显著下降($P>0.05$)(表 1)。

表 1 HL-60/ADM 细胞多药耐药性变化($n=4$)

组别	IC_{50}($x \pm s$, ng/ml)			耐药相对逆转率(%)
	HL-60	HL-60/ADM	HL-60/ADM + DMA	
ADM	16.3 ± 5.1	839.5 ± 45.2	180.5 ± 38.9[a]	80.1
MIT	12.4 ± 4.2	321.2 ± 28.9	76.4 ± 12.0[a]	79.3
VCR	3.1 ± 0.5	70.5 ± 15.5	30.2 ± 7.5[a]	59.8
HAR	2.5 ± 0.4	65.2 ± 20.7	31.7 ± 7.2[a]	53.4
Ara-c	176.8 ± 35.5	210.5 ± 24.3	199.4 ± 44.7	32.9

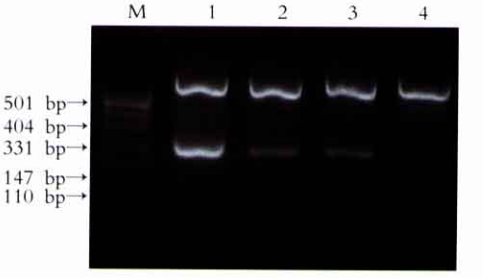
a: $P<0.01$,与 HL-60/ADM 组细胞比较

2.2 细胞内 DNR 积累的变化

HL-60/ADM 细胞分别与 50、100 μmol/L DMA 共培养 24 h,细胞内 DNR 积累量荧光强度(FIR)分别达到 48.74 和 70.10,细胞阳性率分别为 50.38% 和 82.04%,明显高于 DMA 作用前的 33.56% 和 23.62%,但与 HL-60 细胞相比(89.12% 和 97.18%),荧光强度和阳性率仍较低。

2.3 mrp、bcl-2 、bax mRNA 表达变化

HL-60/ADM 细胞分别与 50、100 μmol/L DMA 共同孵育 24 h后,细胞内 mrp、bcl-2 mRNA 表达显著降低,bax mRNA 表达显著增加(图 1,表 2)。



M: 分子量标志物; 1: HL-60/ADM 细胞; 2: HL-60/ADM 细胞与 50 μmol/L DMA 共孵育 24 h; 3: HL-60/ADM 与 100 μmol/L DMA 共孵育 24 h; 4: HL-60 细胞

图 1 mrp mRNA 表达变化

表 2 mrp、bcl-2、bax mRNA 表达变化($n=3$, $x \pm s$)

组别	D(mrp)/D(β-actin)	D(bcl-2)/D(β-actin)	D(bax)/D(β-actin)
HL-60/ADM	1.13 ± 0.23	0.86 ± 0.05	0.17 ± 0.02
HL-60/ADM + 50 μmol/L DMA	0.40 ± 0.08[a]	0.15 ± 0.03[a]	0.40 ± 0.14[a]
HL-60/ADM + 100 μmol/L DMA	0.38 ± 0.09[a]	0.15 ± 0.02[a]	0.59 ± 0.08[a]

a: $P<0.01$,与 HL-60/ADM 组细胞比较

2.4 MRP 蛋白表达变化

HL-60/ADM 细胞与 100 μmol/L DMA 共同孵育 24 h 后,免疫细胞化学染色显示细胞膜 MRP 蛋白表达量较 HL-60/ADM 细胞降低(图 2)。



A: HL-60 细胞; B: HL-60/ADM 细胞; C: HL-60/ADM 细胞与100 μmol/L DMA 共孵育 24 h

图 2 MRP 蛋白表达变化 (S-P ×400)

2.5 原位细胞凋亡变化

HL-60/ADM 细胞在 5 μg/ml ADM 作用下,与 100 μmol/L DMA 共同培养 24 h 后的 HL-60/ADM 细胞凋亡率为(32.7 ± 9.5)%,与对照组(13.3 ± 3.5)% 相比,显著增高($P<0.01$)。

3 讨论

白血病细胞 MDR 的产生,往往伴随着其亚细胞结构和功能的改变。Larsen 等[1]发现,耐药白血病细胞除了表达多种耐药相关蛋白外,普遍存在细胞 pHi 增高的现象。有研究报道,耐药肿瘤细胞 ATP 酶活性膜转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC)表达增高的同时,伴有 NHE-1 的表达增加[3]。NHE-1 广泛存在于真核细胞膜上,是一种管家基因蛋白,介导 Na^+ 和 H^+ 的 1:1 交换以维持细胞内环境的稳定和正常膜电位,其活性和表达量直接影响细胞 pHi 水平。这提示耐药肿瘤细胞将化疗药物向细胞外转运的同时可能需要 Na^+、H^+ 离子的配合转运。因此,抑制细胞内 NHE-1 的表达,降低细胞 pHi 是否可以改变耐药白血病细胞的耐药性值得尝试。本实验采用 NHE-1 抑制剂——DMA 来特异性阻断耐药白血病细胞 Na^+-H^+ 转运从而降低细胞 pHi,结果表明,DMA 可增加 HL-60/ADM 细胞内化疗药物的浓度,增强细胞对药理

作用不同的多种化疗药物的敏感性，具有体外逆转 MDR 的作用。

耐药白血病细胞 pHi 增高、NHE-1 表达增强，一方面满足了耐药细胞 MRP"泵功能"转运过程中对 Na^+-H^+ 交换的需要[3]，另一方面可增强细胞内 BCL-2 蛋白的表达及其磷酸化水平，抑制细胞凋亡[4]。本实验结果表明，DMA 作用下，mrp 基因 mRNA 及蛋白表达降低，bcl-2/bax 比例降低、细胞凋亡增加，这可能是 DMA 逆转 HL-60/ADM 细胞 MDR 的主要机制。此外，白血病细胞 pHi 的升高可以改变化疗药物的分布，在细胞内形成药物间隔囊泡，减少化疗药物与靶位的结合，并通过增强分泌囊泡移除药物[5]。由于耐药细胞内 pH 值增加和膜电位减低，可以导致膜攻击复合体功能异常以及补体在细胞膜上沉积延迟，沉积量减少[6]，从而减弱化疗药物引起的细胞毒作用。DMA 可直接降低 pHi 水平，增加耐药细胞化疗敏感性。

迄今为止，已经发现很多种在体外具有逆转白血病 MDR 活性的药物，但临床效果均不理想，并且可产生明显的毒副作用。有报道 DMA 可以抑制肺动脉平滑肌的增殖[7]，改善肺动脉高压引起的肺功能减退，也可以降低心肌对缺血、缺氧的敏感性，减少心肌梗死的发生率[8,9]，提示 DMA 对心、肺等功能有潜在保护作用。临床使用 DMA 逆转 MDR、特别是对心、肺功能低下的患者具有独到的优越性，有待进一步研究。

参考文献：

[1] Larsen A K, Escargueil A E, Skladamowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents [J]. Pharmacol Ther, 2000, 85(3): 217 - 229.

[2] 彭　智，肖志坚，王　一，等. siRNA 逆转 K562/A02 细胞多药耐药的研究[J]. 中华血液学杂志，2004，25(1)：5 - 7.

[3] ROSS D D. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia[J]. Leukemia, 2000, 14(3): 467 - 473.

[4] Vereninov A A, Vassilieva I O, Yurinskaya V E, *et al*. Differential transcription of ion transporters, NHE1, ATP1B1, NKCC1 in human peripheral blood lymphocytes activated to proliferation[J]. Cell Physiol Biochem, 2001, 11(1): 19 - 26.

[5] Wang E, Lee M D, Dunn K W. Lysosomal accumulation of drugs in drug-sensitive MES-SA but not multidrug-resistant MES-SA/Dx5 uterine sarcoma cells[J]. J Cell Physiol, 2000, 184(2): 263 - 274.

[6] Weisburg J H, Roepe P D, Dzekunov S, *et al*. Intracellular pH and multidrug resistance regulate complement-mediated cytotoxicity of nucleated human cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(16): 10877 - 10888.

[7] Yao W, Qian G, Yang X. Roles of NHE-1 in the proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(1): 107 - 109.

[8] Wu D, Stassen J M, Seidler R, *et al*. Effects of BIIB513 on ischemia-induced arrhythmias and myocardial infarction in anesthetized rats[J]. Basic Res Cardiol, 2000, 95(6): 449 - 456.

[9] Kusumoto K, Haist J V, Karmazyn M. Na^+/H^+ exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(2): H738 - H745.

（编辑　栾　嘉）

（上接 327 页）

外伤骨折时 X 线无疑是首选诊断工具，而在以下情况则应做骨显像：①患者有骨及关节的外伤主诉而 X 线检查结果正常；②X 线片有病理性改变而无疼痛主诉。有多处外伤性疾患的患者全身骨显像，在检测外伤骨性改变上有非常高的敏感性。

3.2　新鲜骨折与陈旧性骨折的鉴别

膜性骨骨折、脊椎压缩性骨折的形成时间是 X 线、CT 及法医学中的难题之一，在有些情况损伤时间对案件的定性是非常关键的。虽然戴力扬[4]的研究结果表明，MRI 检查不仅可估计椎体骨折愈合程度，而且有助于新鲜骨折与陈旧性骨折的鉴别。但对膜性骨骨折、脊椎压缩性骨折的形成时间，SPECT 更准确、实用些。研究表明，单纯性骨折于创伤后 24 h 内可显示骨折部位有放射性浓聚，3 d 后更加明显，可持续 8 ~ 12 周，以后放射性逐渐减低。2/3 显像在 1 年内恢复正常（至少 5 ~ 7 个月），90% 在 2 年内，少数人，特别是长骨骨痂形成且反复重力负荷者需要更长时间才逐渐正常。

3.3　股骨颈骨折后继发股骨头缺血性坏死的诊断

非创性股骨头缺血性坏死的诊断比较容易，而股骨颈骨折后继发股骨头缺血性坏死的诊断较为复杂。SPECT 显像诊断股骨头缺血性坏死的阳性率远高于 X 线[5]。如果伤后 2 周内股骨头放射性缺损，在 7 ~ 9 周内仍未见放射性填充为预后不佳，可能发生早期股骨头坏死。5 ~ 7 个月股骨头顶端放射性分布稀疏，其周围若被不同程度的放射性沉集区包围，则提示中期缺血性坏死。核素扫描可诊断股骨颈骨折后是否有股骨头坏死和（或）骨不连，且阳性率高于 X 线平片。

关键词：SPECT；临床法医学；鉴定

中图法分类号：R817.4　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 潘中允. 简明核医学[M]. 第 2 版. 北京：北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社，1997：18.

[2] 徐春福，褚瑞华，高丽娟，等. CT 对隐匿性骨折的诊断价值[J]. 临床放射学杂志，1998，17(4)：247 - 248.

[3] 陈绍亮. 核医学影像与临床思维[M]. 上海：上海科学技术出版社，2001：193 - 199.

[4] 戴力扬. MRI 对于骨质疏松性椎体压缩性骨折的诊断价值（新鲜骨折与陈旧性骨折的鉴别）[J]. 骨与关节损伤杂志，1999，14(5)：295 - 296.

[5] 黄恩惠. ^{99M}TC - MDP 对 60 例股骨颈骨折后继发股骨头缺血性坏死的诊断[J]. 实用医技杂志，1997，4(12)：923 - 924.

（编辑　陈聪连）