论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1880-03

紫草素逆转绒癌细胞JAR/MTX耐药与survivin和Bcl-2表达关系研究

于月新,李 巨 (解放军第202医院妇产科,沈阳 110003)

提 要:目的 探讨紫草素逆转绒癌细胞耐药效应在凋亡方面的机制。**方法** 体外培养细胞并将其分为4组,各组加药后观察每组细胞24、48、72 h生长情况并计算细胞贴壁率,电化学发光法检测β-HCG值,S-P免疫组织化学及RT-PCR法检测survivin、Bcl-2基因表达。**结果** MTX对细胞JAR/MTX毒性作用、细胞贴壁率、β-HCG下降程度与对照相比差异无统计学意义($P>0.05$);紫草素作用细胞后与对照相比差异有统计学意义($P<0.05$);二者合用作用于JAR/MTX细胞与对照相比差异显著($P<0.01$),survivin基因的mRNA和蛋白表达与对照相比差异显著($P<0.01$),Bcl-2基因的mRNA表达与对照相比差异显著($P<0.01$),蛋白表达与对照相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 紫草素可逆转JAR/MTX细胞对MTX耐药是通过下调survivin、Bcl-2基因表达增加细胞凋亡实现的;紫草素有可能成为绒癌化疗的新型增敏剂。

关键词:紫草素;多药耐药;绒毛膜癌;逆转

中图法分类号:R73-36;R730.52;R737.33 **文献标识码**:A

Relationship between the reverse effect of shikonin on methotrexate-resistant human choriocarcinoma cell line JAR/MTX and expressions of survivin and Bcl-2

YU Yue-xin, LI Ju (Department of Obstetrics and Gynecology, 202nd Hospital of PLA, Shenyang 110003, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of how shikonin to reverse the multi-drug resistance of human choriocarcinoma cells. Methods JAR/MTX cells were divided into 4 groups. The cell growth condition of each group at 24, 48, and 72 h was observed and cell adhesion rate was calculated. β-HCG values at 24 and 48 h after adding drugs were assayed. Cytomorphologic changes were observed by H-E staining. The gene expression of survivin and Bcl-2 was detected by S-P immunocytochemistry and RT-PCR. Results There was no significant difference in cell adhesion rate and secretion of β-HCG between methotrexate treatment group and control group ($P>0.05$), but there was difference between shikonin group and control one ($P<0.05$). The strong effect was noted after combining use of methotrexate and shikonin as compared with control group ($P<0.01$). There were significant differences in mRNA and protein expression of survivin and Bcl-2 between shikonin group and control one ($P<0.01$). Conclusion Shikonin can reverse drug-resistance of JAR/MTX to methotrexate by down-regulating the expression of survivin and Bcl-2 and accelerating apoptosis. Shikonin is promising as a synergist of chemotherapy used for choriocarcinoma.

Key words: shikonin; multi-drug resistance; choriocarcinoma; reverse

甲氨蝶呤(methotrexate,MTX)为治疗绒癌首选药物,但获得性耐药严重,单用MTX约30%患者出现耐药[1]。研究表明,多药耐药(multidrug resistance,MDR)是肿瘤化疗失败的重要原因[2],MDR是指抗某种细胞毒药物的耐药细胞系对许多结构上无关和作用机制不同的其他抗癌药物产生交叉抗药性。MDR产生机制复杂,其中凋亡受阻是肿瘤细胞产生耐药性的重要机制[3]。survivin、Bcl-2作为抑制凋亡基因,其过量表达可引起肿瘤耐药。通过逆转剂逆转MDR是克服肿瘤耐药的有效方法,其中重要一点为MDR基因水平的逆转[4]。紫草素是从天山紫草中提取出来的萘醌色素,其成分为多种萘醌(naphthoquinone)类色素[5],它具有消炎、抗早孕、抗真菌、抗肿瘤、抑制血小板聚集等功用[6]。本研究根据MDR产生的分子机制,通过观察MTX与紫草素联合应用对多药耐药细胞JAR/MTX的协同抑制作用,以探讨研究在凋亡方面紫

作者简介:于月新(1973-),女,辽宁省大连市人,硕士,主治医师,主要从事绒癌化疗机制方面的研究。电话:(024)23053549,E-mail:yuyuexinpingan@163.com

通讯作者:李 巨,电话:(024)23053560

收稿日期:2006-11-28;修回日期:2007-05-15

草素体外逆转绒癌 JAR/MTX 细胞耐药机制。

1　材料与方法

1.1　一般资料

1.1.1　细胞培养及分组　　人绒毛膜癌甲氨蝶呤耐药细胞株 JAR/MTX 由浙江大学医学院提供并培养于含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基中。将细胞分为 4 组：①空白对照组：加生理盐水；②MTX 组：MTX 2 μg/ml；③紫草素组：紫草素 0.2 μg/ml；④MTX + 紫草素组：MTX 2 μg/ml + 紫草素 0.2 μg/ml。

1.1.2　主要药品及试剂　　紫草素购自北京药品检验所，MTX 购于上海华联制药有限公司。鼠抗人 survivin、Bcl-2 单克隆抗体及 S-P 即用型免疫组化试验盒（北京中杉金桥生物技术有限公司），HCG 试剂盒（天津福莱特公司），总 RNA 抽提试剂 Trizol（Invitrogen 公司），逆转录试剂盒（Promega 公司），PCR 扩增相关试剂及引物合成（TaKaRa，大连宝生物）。

1.2　方法

1.2.1　细胞贴壁率测定

细胞贴壁率（%）= 贴壁细胞数/全部细胞数 × 100%

1.2.2　人绒毛膜促性腺激素（β-HCG）测定　　分别于用药后 24、48 h 收集上清，电化学发光法检测 β-HCG 含量，每组 6 次取平均值。计算 β-HCG 分泌抑制率。

抑制率 =（对照组 − 用药组）/对照组 × 100%

1.2.3　S-P 免疫组织化学法检测 survivin 和 Bcl-2 蛋白表达

细胞加药后继续培养 24 h 后弃上清，按产品说明书操作，以 PBS 代替一抗进行染色做阴性对照。每组 6 张，Olympus 显微镜以 400 × 镜下任意观察 5 个视野，阳性结果的判断：以滋养细胞质或细胞核出现棕黄色颗粒为阳性，由专业病理医师读片，并采用染色强度及阳性细胞数进行评分[7]，阴性（0 分），淡黄色（1 分），黄色（2 分），棕黄色（3 分）；阳性细胞数分为 5 级：<5%（0 分），6% ~25%（1 分），26% ~50%（2 分），51% ~75%（3 分），>75%（4 分），两者的乘积作为最终的结果判断：0 分（−）、1 ~4 分（+）、5 ~8 分（++）、9 ~12 分（+++），取其均值。

1.2.4　逆转录 PCR 分析　　各组细胞用药 24 h 后吸弃培养液，以 Trizol 法提取细胞总 RNA，RNA 纯度测定为 $D(260)/D(280)=2.0$。cDNA 合成后进行 PCR 扩增，PCR 反应条件为 Bcl-2 94 ℃变性 45 s，60 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 60 s，共 35 个循环。Survivin 94 ℃变性 45 s，60 ℃复性 30 s，72 ℃延伸 60 s，共 35 个循环。Bcl-2 引物上游：5′-GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA-3′，下游：5′-AGGCACCCAGGGTGATGCAA-3′，长度 304 bp。survivin 引物上游：5′-GGACCACCGCATCTCTACAT-3′，下游：5′-CCAAGTCTGGCTCGTTCTCAG-3′，长度 338 bp。β-actin 引物上游：5′-TTCCAGCCTTCCTTCCTGGG-3′，下游：5′-GTACTTGCGCTCAGGAGGAG-3′，长度 224 bp。产物上样于 1% 琼脂糖凝胶中，紫外灯下观察并拍摄结果。Fluorchem v2.0 Stand Alone 凝胶分析系统分析灰度值，分别用 Bcl-2/β-actin 灰度值比及 survivin/β-actin 灰度值比表示 Bcl-2 及 survivin 基因相对表达量。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件，多组均数之间比较用单因素方差分析，组内两两比较用 q 检验，率的比较用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　各组细胞贴壁率测定

对照组 24、48、72 h 分别为 98%、97%、99%，MTX 组作用细胞 24、48 h 后，细胞贴壁率分别为 94% 及 91%，与对照组相比无明显差异（$P>0.05$），72 h 后有所下降（$P<0.05$）。紫草素组 24、48、72 h 分别为 90%、88%、80%，与对照组相比明显下降（$P<0.05$）。紫草素 + MTX 组 24、48、72 h 分别为 40%、22%、6%，与对照组相比明显下降（$P<0.01$）；与 MTX 组及紫草素组相比明显下降（$P<0.01$）。

2.2　药物作用后各组细胞 β-HCG 水平变化

通过分析，紫草素与 MTX 作用细胞 24、48 h 后，β-HCG 分泌抑制率与 MTX 组及紫草素组相比明显增加（$P<0.01$）。见表 1。

表 1　各组药物作用于 JAR/MTX 后上清中 24 h 及 48 h β-HCG 水平（mIU/ml，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h		48 h	
	β-HCG 值	抑制率（%）	β-HCG 值	抑制率（%）
对照组	124.77 ± 13.93	–	407.07 ± 14.12	–
MTX 组	98.78 ± 10.52	20.82 ± 8.43[a]	316.07 ± 14.61	12.52 ± 3.59[a]
紫草素组	77.29 ± 8.04	38.05 ± 6.45[a]	321.47 ± 21.93	21.02 ± 5.39[a]
MTX + 紫草素组	41.37 ± 4.22	66.85 ± 3.38	57.02 ± 12.54	85.99 ± 3.08

a：$P<0.01$，与 MTX + 紫草素组比较

2.3　药物作用细胞 JAR/MTX 后各组蛋白表达

由表 2 可见，与对照组相比，MTX 组 survivin 蛋白表达增强（$P<0.05$），紫草素组有所下降（$P<0.05$），MTX + 紫草素组下降明显（$P<0.01$）；MTX + 紫草素组分别与紫草素、MTX 组相比表达下降（$P<0.05$）。Bcl-2 蛋白 MTX 组与对照组相比差异不明显（$P>0.05$），MTX + 紫草素组与对照组相比明显下降（$P<0.01$）；MTX + 紫草素组分别与紫草素、MTX 组相比表达下降（$P<0.05$）。

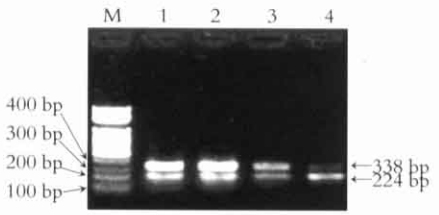
表 2　药物作用细胞 JAR/MTX 后各组蛋白及 mRNA（灰度比）表达（$n=6$）

组别	survivin		Bcl-2	
	蛋白表达	mRNA 相对表达	蛋白表达	mRNA 相对表达
对照组	9.00 ± 2.68	1.689 9	7.00 ± 2.39	2.038 8
MTX 组	9.50 ± 2.26[ac]	1.849 6[ac]	7.10 ± 1.78[c]	2.204 8[ac]
紫草素组	7.50 ± 1.64[ac]	1.499 9[bc]	6.78 ± 1.59[c]	1.346 0[bc]
MTX + 紫草素组	2.33 ± 1.21[b]	0.646 1[b]	2.95 ± 1.17[b]	0.770 9[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，与 MTX + 紫草素组比较

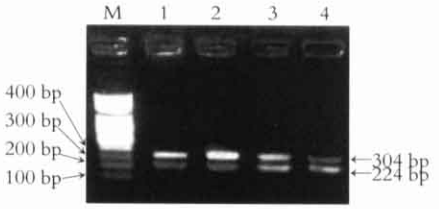
2.4　药物作用细胞 JAR/MTX 后各组 mRNA 表达

由表 2 可见，各组均有 survivin 及 Bcl-2 mRNA 表达。MTX 组 survivin 及 Bcl-2 mRNA 与对照相比表达明显增强（$P<0.05$），紫草素组 survivin 及 Bcl-2 mRNA 与对照相比表达减弱（$P<0.01$）。MTX + 紫草素组 survivin 及 Bcl-2 mRNA 表达与对照相比显著下降（$P<0.01$），与 MTX 组及紫草素组相比下降（$P<0.05$）。见图 1、2。



M：标准；1：对照组；2：MTX 组(2 μg/ml)；3：紫草素组(0.2 μg/ml)；4：MTX + 紫草素组

图1 Survivin 基因表达



M：标准；1：对照组；2：MTX 组(2 μg/ml)；3：紫草素组(0.2 μg/ml)；4：MTX + 紫草素组

图2 Bcl-2 基因表达

3 讨论

肿瘤耐药是由于多个基因及多条传导通路的异常导致的，涉及细胞增殖、凋亡、代谢等改变，最终出现耐药。本研究通过细胞贴壁率、电化学发光法检测 β-HCG 结果显示，MTX 对绒癌 JAR/MTX 细胞产生严重耐药，对 JAR 细胞半数致死量剂量 MTX 对 JAR/MTX 细胞作用不明显。MTX 与紫草素合用后，细胞 24 h 即出现明显凋亡及坏死，48 h 后细胞贴壁率达22%，72 h 后达 6%，细胞大片脱落，漂浮、破碎，β-HCG 分泌明显下降，表明紫草素在体外逆转了绒癌细胞 JAR/MTX 对 MTX 耐药。

在哺乳动物细胞中，细胞凋亡受两类蛋白家族调控：B 细胞白血病原/淋巴瘤 2 家族(Bcl-2)和凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis proteins，IAP)。凋亡受阻是肿瘤细胞产生耐药性的重要机制。Notarbartolo 等[8]发现 survivin 基因过表达与肿瘤耐药有关。Bcl-2 表达与肿瘤细胞的抗药性关系密切，随着 Bcl-2 表达的提高，患者的生存时间缩短，预后不良[9]。为进一步研究紫草素逆转 JAR/MTX 细胞耐药是否与 Bcl-2 及 survivin 基因表达有关，我们运用 S-P 免疫组织化学法及 RT-PCR 法检测 Bcl-2 及 survivin 蛋白及 mRNA 表达情况。结果显示，紫草素可减少绒癌耐药细胞 survivin、Bcl-2 表达，MTX 可增加绒癌耐药细胞 survivin 表达，二者合用后 Bcl-2 mRNA 表达下降，但蛋白水平下降不明显，survivin 蛋白及 mRNA 水平皆下降。分析有以下几种可能：①二者合用后，两种分子相遇后使 MTX 分子构象发生改变，加强了耐药细胞 JAR/MTX 对它的监视，使 survivin 和 Bcl-2 表达下降，最终细胞凋亡。②紫草素也可能抑制了其他耐药基因的表达，如通过抑制 GST-π、HSP-27 等的表达间接使细胞凋亡。③紫草素不但抑制 JAR/MTX 细胞中 survivin、Bcl-2 的活性，而且抑制 MTX 对 survivin、Bcl-2 的激活。至于其通过什么途径抑制 MTX 对 survivin、Bcl-2 的激活尚需进一步研究。可见紫草素逆转 JAR/MTX 细胞对 MTX 产生耐药机制是恢复绒癌多药耐药细胞 JAR/MTX 对 MTX 的敏感性，其逆转耐药并非单一机制，其中重要一方面是通过使抑制凋亡基因 survivin 及 Bcl-2 表达量下降，使细胞凋亡增加实现的。本研究表明，紫草素可逆转 JAR/MTX 细胞对 MTX 耐药，是通过下调 survivin、Bcl-2 基因表达来增加细胞凋亡实现的，因此可以推测，紫草素逆转绒癌细胞耐药与抑制 survivin、Bcl-2 的活性有关。如果抑制基因 survivin 及 Bcl-2 活性，可以增强绒癌细胞对化疗药物的敏感性。我们设想，临床上对绒癌患者可先检测 survivin 及 Bcl-2 表达，如果 survivin 及 Bcl-2 表达增强，说明绒癌细胞对 MTX 产生了耐药，可加用小剂量紫草素以恢复对 MTX 的敏感性。紫草素可作为一种新型的中药逆转剂，有可能成为治疗耐药绒癌的一种新的手段，对该药的研究有重大意义。

参考文献：

[1] Garrett A P, Garner E O, Goldstein D P, *et al*. Methotrexate infusion and folinic acid as primary therapy for nonmetastatic and low-risk metastatic gestational trophoblastic tumors. 15 years of experience[J]. J Reprod Med, 2002, 47(5): 355 - 362.

[2] Ford J M, Hait W N. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer[J]. Pharmacol Rev, 1990, 42(3): 155 - 199.

[3] 罗顺峰，朱 虹，张万广，等. 5-Fu 对肝癌细胞内凋亡抑制蛋白 survivin 的诱导作用[J]. 肝胆外科杂志, 2002, 10(3): 227 - 228.

[4] 胡 静，钱晓萍，刘宝瑞，等. 拓扑异构酶与肿瘤多药耐药及耐药逆转[J]. 国外医学：肿瘤学分册, 2005, 32(2): 110 - 113.

[5] 黎玉红，周晓荣. 新疆紫草的研究进展[J]. 新疆中医药, 2002, 20(4): 75 - 77.

[6] 刘建华，法韫玉，孙 桦，等. 紫草辅助米非司酮抗早孕对生殖激素的影响[J]. 生殖医学杂志, 2000, 9(3): 155 - 158.

[7] Kawasaki H, Altieri D C, Lu C D, *et al*. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5071 - 5074.

[8] Notarbartolo M, Cervello M, Dusonchet L, *et al*. Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins)[J]. Cancer Lett, 2002, 180(1): 91 - 101.

[9] Kullak-Ublick G A, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport[J]. J Hepatol, 2000, 32(1 Suppl): 3 - 18.

(编辑 王小寒)