论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1724-04

超声辐照维拉帕米微泡体外对神经母细胞瘤多药耐药的逆转作用

陈镜宇[1],全学模[1],郭振华[2],王 荞[1],唐 毅[1],王 佚[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:超声科[1],普通外科[2])

【摘要】 **目的** 探讨超声辐照维拉帕米(verpamil,VER)微泡逆转肿瘤多药耐药的作用及机制。**方法** 制备包裹维拉帕米的乳酸-羟基乙酸共聚物(VER-PLGA)超声微泡造影剂;通过长春新碱(VCR)多次小剂量递增诱导法建立神经母细胞瘤耐药株(SK-N-SH/VCR),并检测其耐药性;根据处理因素不同分为6组:A:空白对照组(SK-N-SH/VCR培养组),B:SK-N-SH/VCR + VER(50 μg/ml)组,C:SK-N-SH/VCR + VER(250 μg/ml)组,D:SK-N-SH/VCR + 超声辐照组,E:SK-N-SH/VCR + PLGA微泡 + 超声辐照组,F:SK-N-SH/VCR + VER-PLGA微泡(VER 50 μg/ml) + 超声辐照组。48 h后,利用RT-PCR和免疫组织化学染色法(ICC)检测各组细胞中MDR1基因及P-gp的表达水平,评估VER在不同处理组中逆转肿瘤细胞耐药的效果。**结果** ①成功制备包裹维拉帕米的VER-PLGA微泡造影剂,包封率为32%;②成功建立神经母细胞瘤耐药株SK-N-SH/VCR,MTT法证实其对不同化疗药物的耐药倍数是野生株的2.3~5.4倍;③ ICC证实耐药株高表达MDR1基因;④RT-PCR及免疫组化法检测发现MDR1基因在F组中的光密度值及P-gp表达水平较其他组明显降低($P < 0.05$)。**结论** 超声辐照包裹小剂量维拉帕米的微泡可有效逆转肿瘤多药耐药。

【关键词】 超声;微泡;维拉帕米;肿瘤;多药耐药

【中图法分类号】 R739.4;R972.2;R979.1 【文献标志码】 A

Ultrasound irradiation microbubble verapamil reverses multidrug resistance of neuroblastoma cells *in vitro*

Chen Jingyu[1], Quan Xuemo[1], Guo Zhenhua[2], Wang Qiao[1], Tang Yi[1], Wang Yi[2] ([1]Department of Ultrasonography, [2]Department of General Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effects of ultrasound irradiation microbubbles with verpamil (VER) on reversing tumor multidrug resistance. **Methods** VER-PLGA microbubbles were prepared with double emulsion and freeze drying techniques. The neuroblastoma cell line SK-N-SH/VCR with multidrug resistance (MDR) phenotype was established by inducing with small-doses of VCR. Then the cells were divided into 6 groups according to different treatments, that is, group A: SK-N-SH/VCR, group B: SK-N-SH/VCR + VER (50 μg/ml), group C: SK-N-SH/VCR + VER (250 μg/ml), group D: SK-N-SH/VCR + ultrasound, group E: SK-N-SH/VCR + PLGA + ultrasound, group F: SK-N-SH/VCR + VER-PLGA (50 μg/ml) + ultrasound. RT-PCR and immunocytochemical staining were used to detect the expression levels of MDR1 gene and P-gp respectively. And the effects of VER on reversing multidrug resistance of tumor in different groups were evaluated. **Results** The VER-PLGA microbubbles were prepared successfully, and the encapsulated rate was 32%. SK-N-SH/VCR cells with MDR phenotype were established and the resistance index (RI) was 2.3 to 5.4 times to different chemotherapy drugs when compared with the wild cells. Compared with others, the level of MDR1 gene was the most lowest in group F ($P < 0.05$). The expression levels of P-gp and MDR1 gene were the lowest in group F among the all 6 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Ultrasound irradiation microbubbles enhance the effects of verapamil to reverse the multidrug resistance of tumor.

【**Key words**】 ultrasound; microbubble; verapmil; tumor; multidrug resistance

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600579) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Committee of Education (KJ060304). Corresponding author: Wang Yi, Tel: 86-23-63622049, E-mail: wy757311@hotmail.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30600579);重庆市教委科学技术研究项目(市教委KJ060304)

【通信作者】 王 佚,电话:(023)63622049,E-mail:wy757311@hotmail.com

恶性肿瘤是严重威胁人类生命健康的重大疾病，化疗在恶性肿瘤治疗中起着重要作用。尽管新的抗癌药物和化疗方案不断推出，但临床治疗效果并不令人满意。究其原因，肿瘤多药耐药是其免受化疗药物攻击的最重要的细胞防御机制。肿瘤对化疗药物产生多药耐药性是严重影响治疗效果的重大难题，直接影响化疗的成败[1]。多药耐药基因（multidrug resistance gene 1，MDR1）及其编码的P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）是造成肿瘤细胞多药耐药最主要的原因。研究发现维拉帕米（verapamil，VER）可在分子水平逆转肿瘤细胞的多药耐药性，但全身用药具有很强的毒副作用[2]。故药物定位释放技术应运而生，逐步成为医学研究的重要方向。微泡作为一种新型的药物或基因载体，可提高病灶局部药物浓度，降低用药量，减轻毒副作用。本研究通过体外实验探讨超声辐照维拉帕米微泡逆转肿瘤多药耐药性的效果。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

维拉帕米由重庆市药物监测研究所提供，乳酸羟基乙酸共聚物（poly lactic-co-glycolic acid，PLGA）由山东省医疗器械研究所提供，优质胎牛血清、培养基为Gibco公司产品。UGT1025型超声基因转染仪由重庆医科大学超声影像学研究所研制。

1.2 包裹维拉帕米的乳酸-羟基乙酸共聚物（VER-PLGA）微泡造影剂的制备

1.2.1 制备VER-PLGA微泡造影剂 参考冉海涛等[3]的方法，采用双乳化法和冷冻干燥技术制备本实验所需的VER-PLGA微泡造影剂。

1.2.2 载药量及包封率测定 配制浓度为1、2、4、8、16、20 μg/ml的VER标准品溶液，于最大吸收波长处测定VER的光密度值，拟合光密度值和VER浓度，绘制标准曲线，建立回归方程。在微球制备过程中收集所有洗涤液体，容量瓶定容，12 000 r/min离心10 min，取上清液测定游离VER的量，计算微泡载药量及包封率。

载药量 =（总投药量 − 游离的VER的量）/微泡质量 × 100%

包封率 =（总投药量 − 游离的VER的量）/总投药量 × 100%

1.3 神经母细胞瘤耐药株SK-N-SH/VCR瘤株的建立

利用VCR小剂量多次递增诱导培养法，VCR从0.01 μg/ml逐步递增到0.50 μg/ml，细胞株在0.50 μg/ml可以稳定传代。MTT法测定耐药株的耐药指数。RT-PCR检测耐药基因MDR1表达水平。耐药指数 = 耐药株IC_{50}/野生株IC_{50}。

1.4 实验分组及处理

根据处理因素不同分组：A：空白对照组（SK-N-SH/VCR培养组），B：SK-N-SH/VCR + VER组（50 μg/ml），C：SK-N-SH/VCR + VER组（250 μg/ml），D：SK-N-SH/VCR + 超声辐照组，E：SK-N-SH/VCR + PLGA微泡 + 超声辐照组，F：SK-N-SH/VCR + VER-PLGA微泡（VER含量50 μg/ml）+ 超声辐照组。D、E、F组行超声辐照（频率665 kHz，声强0.5 W/cm^2，超声辐照15 s）。

1.5 RT-PCR检测各组肿瘤细胞MDR1基因的表达

常规方法裂解各组细胞提取总RNA；合成cDNA；PCR扩增cDNA（Primer 1：5′-GCTGGTTTGATGTGCACGATGTTGG-3′，Primer 2：5′-ATTTTGTCACCAATTCCTTCATTAA-3′，目的片段87 bp）；反应结束后，取5 μl反应产物于1.5%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.6 免疫组化染色检测各组肿瘤细胞P-gp表达

采用SABC法，选用鼠抗人P-gp单克隆抗体C219和链霉素抗生物素-过氧化物酶免疫组化试剂盒检测不同处理组细胞P-gp表达的阳性率。P-gp表达位于细胞膜和细胞质，阳性反应为棕色。根据染色强度和阳性细胞所占比例进行半定量分析。每张切片在高倍镜下（×400）随机计数10个视野，计算其阳性率。根据试剂公司提供的标准：阳性细胞数 < 10%为阴性（−），10% ~ 25%为低度表达（+），25% ~ 75%为中度表达（++），>75%为高度表达（+++）。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行分析，计数资料采用χ^2检验，计量资料采用t检验分析（检验水准$\alpha = 0.05$）。

2 结果

2.1 成功制备包裹维拉帕米的PLGA微泡造影剂

VER-PLGA微泡造影剂外观为白色粉末状，水溶性好；普通光学显微镜下观察形态规则，呈球形，表面光滑，大小均匀；光学显微镜观察与激光测径仪检测，粒径2 ~ 3 μm，分布范围0.5 ~ 5 μm，大小均匀，粒径分布范围窄；载药量为1.4%，包封率为32%。

2.2 MTT法检测SK-N-SH/VCR耐药株药物敏感性

SK-N-SH/VCR耐药株对本实验所检测的5种药物（VCR、ADM、Vp-16、MMC、CTX）均产生了不同程度的耐药性，耐药倍数2.3 ~ 5.4倍（表1）。RT-PCR结果示耐药株MDR1基因表达水平明显高于野生株（图1），提示耐药细胞株建立成功。

表1 MTT法检测神经母细胞瘤株化疗药物敏感性（$n = 6$）

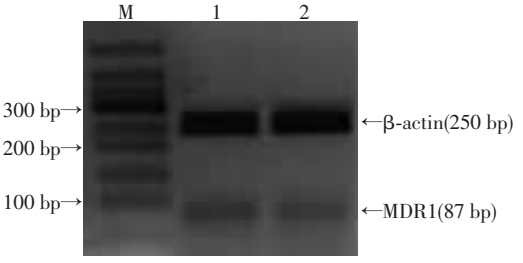
药物	SK-N-SH	SK-N-SH/VCR	耐药指数
ADM	0.213 ± 0.018	1.012 ± 0.041[a]	4.75
VCR	0.062 ± 0.009	0.335 ± 0.060[a]	5.40
Vp-16	4.209 ± 0.018	9.681 ± 0.780[a]	2.30
MMC	3.677 ± 0.349	11.237 ± 1.062[a]	3.05
CTX	1.897 ± 0.138	6.920 ± 0.211[a]	3.65

a：$P < 0.05$，与野生型SK-N-SH细胞比较

2.3 RT-PCR检测各组肿瘤细胞MDR1基因表达

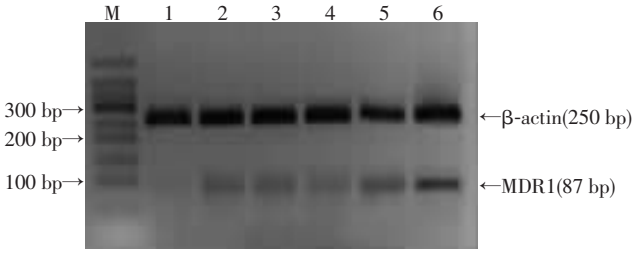
根据实验设计，SK-N-SH/VCR高表达MDR1基因，维拉帕米逆转后MDR1基因表达水平下降。使用特异性引物行PCR扩增后可于87 bp处见特异性条带。RT-PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后在各泳道的250 bp处均可以观察到β-actin的电泳条带，对照组在87 bp处见到电泳条带，MDR1 mRNA表达阳性；

其余5组在87 bp处分别观察到表达下降的MDR1电泳条带(图2),说明在不同处理条件下,维拉帕米逆转耐药肿瘤细胞株MDR1的水平。以β-actin作为对比片段,各组MDR1 mRNA表达的光密度比值以F组最低(0.18±0.04),与其余5组间比较差异有统计学意义(A~E组分别为0.93±0.17、0.82±0.09、0.35±0.07、0.55±0.09、0.37±0.06,$P<0.05$)。



M:标准;1:SK-N-SH/VCR细胞;2:SK-N-SH细胞

图1　RT-PCR检测耐药株与野生株MDR1 mRNA的表达



M:标准;1:F组;2:E组;3:D组;4:C组;5:B组;6:A组

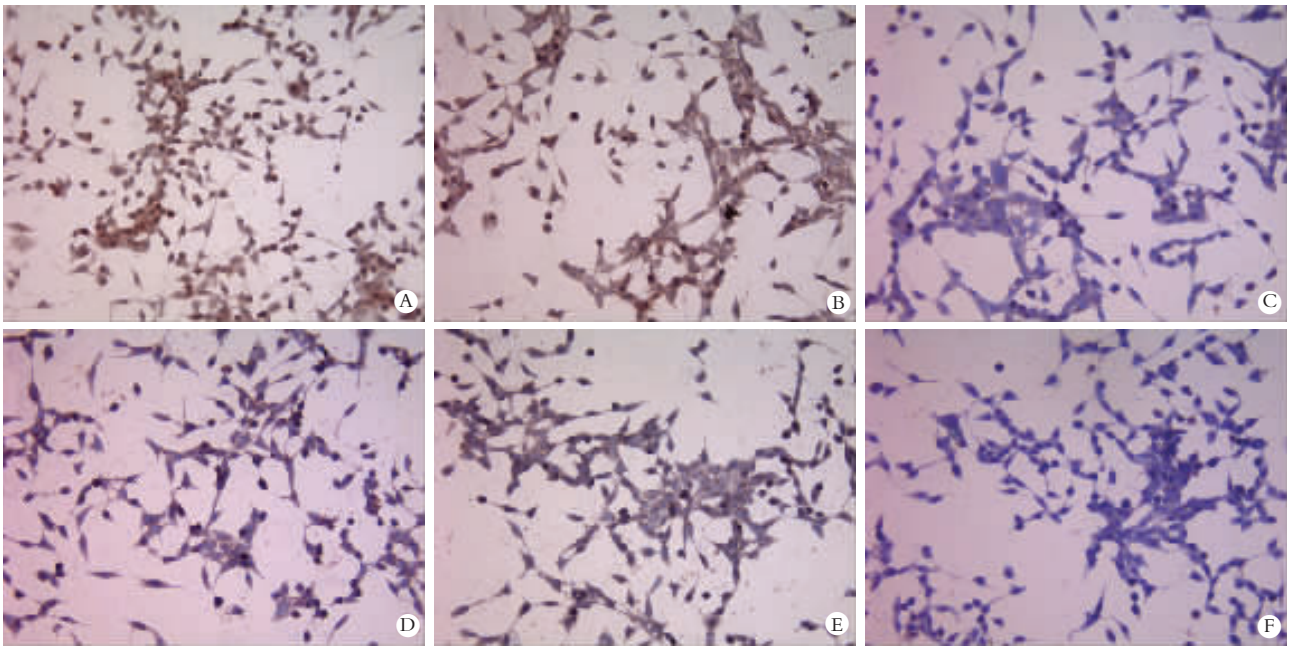
图2　RT-PCR检测不同处理组肿瘤细胞MDR1 mRNA的表达

2.4　免疫组化检测各组肿瘤细胞P-gp的表达

免疫组化检测结果显示:A组细胞的细胞膜及细胞质内着色最高,P-gp表达阳性率为98.5%;其余5组细胞膜及细胞质内着色均有不同程度的下降,B~F组细胞P-gp表达阳性率分别为92%、37%、64%、52%及23%。C、E组细胞P-gp表达阳性率与A组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。F组细胞P-gp表达阳性率与其余5组相比差异均有统计学意义($P<0.05$,图3)。

3　讨论

肿瘤多药耐药是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药的同时,对结构和作用机制完全不同的多种抗肿瘤药物也产生交叉耐药。多药耐药是导致肿瘤化疗失败的重要原因,其机制十分复杂。肿瘤细胞高表达MDR1基因及其编码的P-gp是造成肿瘤多药耐药最主要的原因,其主要机制是P-gp作为药物外排泵将化疗药物泵出细胞外,减少药物在细胞内的聚集而表现出耐药[1]。近年来,对MDR逆转剂已开展了广泛深入的研究,因其作用机制不同而种类繁多,包括钙离子通道阻滞剂、钙调蛋白抑制剂、亲脂性化合物等。VER系钙离子通道阻滞剂,是临床最常用的抗心律失常药物,也是应用最早的MDR逆转剂。VER竞争性与P-gp结合后降低其与药物的结合,增加细胞内化疗药物的量来实现逆转作用[4]。但VER在体外逆转细胞MDR表型的所需浓度为3 200 μg/L (616 μmol/L)[5],大大超过了其安全用量,会产生严重的毒副作用,如传导阻滞和低血压[6],限制了VER作为肿瘤多药耐药逆转剂在临床上的应用。因此,找到一种能提高肿瘤局部VER浓度而不造成全身毒副反应的方法成为该药应用于临床的关键。本研究以微泡作为VER载体,通过超声辐照定向释放VER,检测肿瘤细胞耐药性的变化。



A:A组;B:B组;C:C组;D:D组;E:E组;F:F组

图3　免疫组化检测不同处理组肿瘤细胞P-gp的表达　(SABC ×200)

微泡作为一种声学造影剂,不仅能显著增强超声显像,还是一种新型的靶向基因和药物载体[7,8],可显著增强医学超声检测信号,增强肿瘤组织的灰阶显像及彩色多普勒血流信号,提高病灶及多普勒血流信号检出率,目前已被广泛用于疾病的影像学诊断与鉴别诊断[9]。载药微泡是一种十分有效的空化核,可以诱导超声空化效应发生,使细胞膜通透性增高,利于携带药物释放,增强肿瘤细胞对化疗的敏感性[10,11]。PLGA 作为微泡成膜材料,将药物与外界隔开,可以减少外界环境与药物的相互影响,达到较高的包封率,是亲水性药物的理想载体[12,13]。本实验成功制备了 VER-PLGA 微泡造影剂,其包封率可达 32%。

本结果发现,E 组将 PLGA 微泡联合超声辐照可降低肿瘤耐药细胞株 P-gp 表达水平,与 A 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示超声辐照微泡可降低肿瘤 P-gp 表达,在一定程度上逆转肿瘤的多药耐药。其原因可能是超声空化效应和热效应部分杀伤肿瘤细胞[14]。微泡超声空化时不断地被压缩和膨胀,当声压达到一定强度时,微泡内爆,聚集的能量得以迅速释放,产生冲击波或微射流等机械效应,会对周围细胞产生不同程度的损伤,故超声辐照下肿瘤细胞易受损伤[15]。B 组仅用 50 μg/ml VER 作用于 SK-N-SH/VCR,MDR1 表达水平略有下降,P-gp 在耐药株中的表达略有降低;C 组用 250 μg/ml VER 作用于 SK-N-SH/VCR,MDR1 表达水平下降明显,且明显降低 P-gp 在耐药株中的表达,与对照组(A 组)相比差异有统计学意义($P<0.05$),证明大剂量 VER 能更有效地逆转肿瘤多药耐药性。F 组通过超声辐照携带低浓度 VER(50 μg/ml)的 PLGA 微泡后,MDR1 基因表达水平及 P-gp 表达均显著降低,与其余 5 组比较均有显著性差异($P<0.05$),说明小剂量 VER 微泡比大剂量 VER 逆转肿瘤多药耐药的效果更佳,所以利用包裹 VER 的微泡联合超声辐照促使 VER 直达肿瘤细胞靶点,有效逆转肿瘤细胞耐药性,同时避免大剂量 VER 诱发心血管等方面的毒性反应[6]。

本研究初步证明了体外 VER-PLGA 超声微泡联合低强度超声辐照逆转 SK-N-SH 耐药瘤株多药耐药的作用,证明其可能是一种逆转肿瘤多药耐药的新手段。本研究仅为体外实验结果,与体内实验存在一定的差异,有必要进一步开展体内肿瘤多药耐药的逆转研究,为临床克服肿瘤耐药的难题提供新思路。

参考文献:

[1] Ishikawa T, Nakagawa H. Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy and pharmacogenomics[J]. J Exp Ther Oncol, 2009, 8(1):5-24.

[2] Susa M, Choy E, Yang C, *et al*. Multidrug Resistance Reversal Agent, NSC77037, Identified with a Cell-Based Screening Assay[J]. J Biomol Screen, 2010, 15(3):287-296.

[3] 冉海涛, 任红, 王志刚, 等. 包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2005, 7(4):217-220.

[4] Hong S P, Chang K S, Koh Y Y, *et al*. Effects of lovastatin on the pharmacokinetics of verapamil and its active metabolite, norverapamil in rats: possible role of P-glycoprotein inhibition by lovastatin[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(10):1447-1452.

[5] Cowie F J, Pinkerton C R, Phillips M, *et al*. Continuous-infusion verapamil with etoposide in relapsed or resistant paediatric cancers[J]. Br J Cancer, 1995, 71(4):877-881.

[6] Song X R, Cai Z, Zheng Y, *et al*. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles[J]. Eur J Pharm Sci, 2009, 37(3/4):300-305.

[7] Maeda H, Tominaga K, Iwanaga K, *et al*. Targeted drug delivery system for oral cancer therapy using sonoporation[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(7):572-579.

[8] 王佚, 郭振华, 金先庆, 等. 超声微泡促腺病毒载体转染 MDR1 基因效率的体外实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1):67-70.

[9] Furlow B. Contrast-enhanced ultrasound[J]. Radiol Technol, 2009, 80(6):547S-561S.

[10] Qin S, Caskey C F, Ferrara K W. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering[J]. Phys Med Biol, 2009, 54(6):R27-R57.

[11] 冯若. 超声空化与超声医学[J]. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(1):63-65.

[12] Lu J M, Wang X, Marin-Muller C, *et al*. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9(4):325-341.

[13] Kumari A, Yadav S K, Yadav S C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010, 75(1):1-18.

[14] Hernot S, Klibanov A L. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(10):1153-1166.

[15] Gao Z, Kennedy A M, Christensen D A, *et al*. Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy[J]. Ultrasonics, 2008, 48(4):260-270.

(收稿 2010-01-29 修回 2010-03-22)

(编辑 汪勤俭)