论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1900-04

蛋白激酶C在人骨肉瘤细胞多药耐药中的作用及机制

陈 渝[1],邓忠良[2] (400700 重庆,重庆市第九人民医院骨科[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院骨科[2])

[摘要] **目的** 研究蛋白激酶C(PKC)主要亚型在人骨肉瘤143B细胞中的表达情况及其与143B细胞耐药的关系。**方法** 采用Western blot法检测PKC主要亚型α、β和γ磷酸化形式p-PKCα、p-PKCβ、p-PKCγ和多药耐药蛋白-1(mutidrug resistance protein-1,MDR-1)在人骨肉瘤143B/WT野生型细胞和143B/ADM耐药细胞中的表达水平,通过PKC特异性抑制剂staurosporine抑制PKC对MDR-1蛋白表达的影响;CCK法检测药物敏感性;荧光分光光度计法检测细胞内阿霉素浓度,流式细胞术检测细胞凋亡水平和细胞外排罗丹明水平。**结果** 相对于143B/WT野生型细胞,143B/ADM耐药细胞中p-PKCα表达显著增加,而p-PKCβ和p-PKCγ表达则无明显差异,同时143B/ADM耐药细胞中MDR-1表达也明显上调;143B/ADM耐药细胞对阿霉素的耐药指数为15.7,而加入staurosporine抑制143B/ADM细胞PKC表达后,细胞耐药指数下降为5.5($P<0.01$);143B/ADM耐药细胞接受ADM处理后,细胞凋亡率为(28.41±4.33)%,而其PKC表达被抑制后,细胞内阿霉素浓度增加的同时($P<0.01$),细胞凋亡率增加为(70.63±4.80)%($P<0.01$),外排罗丹明减少,同时MDR-1蛋白表达明显下调。**结论** 人骨肉瘤耐药细胞中过表达的PKCα可通过调控MDR-1参与骨肉瘤耐药。

[关键词] 人骨肉瘤143B细胞;阿霉素;蛋白激酶C;多药耐药蛋白-1

[中图法分类号] R341.5;R738.1;R730.23 [文献标志码] A

Effect of protein kinase C on multidrug resistance in human osteosarcoma cells and its underlying mechanism

Chen Yu[1], Deng Zhongliang[2] ([1]Department of Orthopedics, Chongqing Ninth People's Hospital, Chongqing, 400700; [2]Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of major protein kinase C (PKC) subtypes in human osteosarcoma 143B cells and its relation with drug resistance to 143B cells. **Methods** Expression levels of p-PKCα, p-PKCβ, p-PKCγ and multidrug resistance protein 1 (MDR-1) in wild human osteosarcoma cells or 143B/ADM-drug resistant cells were measured by Western blotting. Effect of PKC on expression of MDR-1 was inhibited by the PKC special inhibitor, staurosporine. Drug sensitivity was measured by CCK assay. Concentration of adriamycin (ADM) in 143B cells was measured by fluorescence spectrometry. Cell apoptosis and extracellular rho123 levels were measured by flow cytometry. **Results** The expression level of p-PKCα was significantly higher in 143B/ADM-drug resistant cells than in 143B/WT cells. However, no significant difference was found in expression of p-PKCβ and p-PKCγ. The expression of MDR-1 in 143B/ADM-drug resistant cells was significantly up-regulated. The drug-resistant index to ADM was 15.7 in 143B/ADM-drug resistant cells but decreased to 5.5 after the expression of PKC in 143B/ADM cells was inhibited by staurosporine ($P<0.01$). The apoptosis rate of 143B/ADM-drug resistant cells was 28.41% ±4.33% and increased to 70.63% ±4.80%, while the extracellular rho123 level and MDR-1 expression level were significantly down-regulated after the expression of PKC in 143B/ADM cells was inhibited by staurosporine ($P<0.01$). **Conclusion** Over-expression of PKCα in drug-resistant human osteosarcoma 143B cells may attenuate drug resistance by regulating MDR-1 expression.

[**Key words**] human osteosarcoma 143B cell; adriamycin; protein kinase α; multidrug resistance protein-1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772211). Corresponding author: Deng Zhongliang, Tel: 86-23-63693558, E-mail: deng7586@gmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30772211)

[通信作者] 邓忠良,电话:(023)63693558, E-mail: deng7586@gmail.com

骨肉瘤是临床上最常见的一种原发恶性骨肿瘤，化疗在其治疗中占有重要地位，其效果的好坏已成为决定患者预后的主要因素。虽然针对骨肉瘤的化疗研究已取得了很大进展，但临床上仍有一定比例的患者对现行化疗反应不敏感，导致预后很差，其根本原因是肿瘤细胞对化疗药物产生了耐药，而其中最主要的耐药类型便是多药耐药（muti-drug resistance, MDR）[1-2]，即肿瘤对一类化疗药物产生耐药后，对其他化疗药物也产生不同程度的耐药。蛋白激酶C（protein kinase C, PKC）为细胞内信号传递的关键分子之一，在多种肿瘤组织中存在高表达，参与肿瘤发生、发展、转移等过程，并可能与肿瘤耐药有很大关联，但PKC在骨肉瘤耐药中的作用及机制仍不清楚[3]。本研究对PKC不同亚型α、β和γ的磷酸化形式在骨肉瘤耐药细胞143B/ADM中的表达进行检测，并对其在骨肉瘤细胞耐药中的作用及潜在机制进行观察和分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人骨肉瘤野生型细胞株143B/WT和多药耐药型细胞株143B/ADM分别由芝加哥大学医学中心分子肿瘤实验室和重庆医科大学生物化学与分子药理学实验室提供；阿霉素（adriamycin, ADM）购自意大利法玛西亚制药厂；PKC抑制剂staurosporine、罗丹明123（Rhodamine 123, Rho123）购自美国Sigma公司；细胞计数试剂盒-8（Cell Counting Kit-8, CCK-8）试剂盒购自江苏南京碧云天生物技术研究所；流式Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自江苏南京凯基生物技术公司。p-PKCα、β和γ的抗体购自美国Cell Signal Technology公司，MDR-1抗体购自美国Chemicon公司。

1.2 细胞的培养及实验分组

人骨肉瘤143B细胞在37 ℃、5% CO_2条件下，培养于含10%胎牛血清、青霉素（100 U/ml）和链霉素（100 U/ml）的DMEM培养液中，0.1%胰蛋白酶消化传代。实验分为4组：143B/WT对照组；143B/WT + staurosporine组，用10 μmol/L PKC抑制剂staurosporine处理细胞24 h；143B/ADM耐药组；143B/ADM + staurosporine组，用10 μmol/L PKC抑制剂staurosporine处理细胞24 h。

1.3 Western blot法检测磷酸化PKCα、β、γ和MDR-1蛋白的表达

细胞弃掉培养基后，PBS洗3次，加入预冷的20 mmol/L细胞裂解液，冰上孵育30 min后刮起细胞，并转移到EP管中，超声裂解3次。4 ℃，12 000 ×g离心10 min后，收集上清，BCA法蛋白定量。取50 μg蛋白上样，SDS-PAGE电泳后，转移至硝酸纤维素膜上，室温下封闭1 h，加入一抗4 ℃冰箱封闭过夜；次日脱洗3次，二抗孵育1 h，再脱洗5次后，ECL显色，X线片曝光，洗片。

1.4 药物敏感性试验

CCK法检测143B细胞对ADM的敏感性。将处于对数生长期的细胞经胰酶消化后离心，用DMEM培养液制备单细胞悬液（5×10^5/ml），分别接种到96孔板（200 μl/孔，即1×10^5个细胞）。培养72 h后加入不同浓度的ADM（设5个复孔），37 ℃，5% CO_2培养72 h。每孔加入20 μl的CCK-8，37 ℃下继续培养2 h，酶标仪检测波长450 nm处每孔的光密度值[D(450)]。以药物浓度为横轴，抑制率为纵轴绘制浓度-效应曲线，确定半数抑制浓度（IC_{50}），计算耐药指数（resistance index, RI）。

抑制率 = [1 − 实验孔 D(450)值/对照孔 D(450)值] × 100%

RI = 耐药细胞 IC_{50}/亲代细胞 IC_{50}

1.5 流式细胞仪测定细胞凋亡

按照Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒说明书进行操作。把待处理细胞中的培养液吸出至离心管内，PBS洗涤细胞1次，用胰酶消化液（不含EDTA）消化细胞；将消化下来的细胞与先前收集的细胞培养液混合，1 000 ×g离心5 min，弃上清，收集细胞，PBS轻悬细胞并计数；取（5 ~ 10）万重悬的细胞，1 000 ×g离心5 min，弃上清，加入195 μl Annexin V-FITC结合液轻悬细胞；加入5 μl Annexin V-FITC，轻轻混匀，室温（20 ~ 25 ℃）避光孵育10 min；1 000 ×g离心5 min，弃上清，加入195 μl Annexin V-FITC结合液轻悬细胞；再加入10 μl PI染色液，轻轻混匀，冰浴避光存放；随后立即进行流式细胞仪检测。

1.6 荧光分光光度计检测细胞内阿霉素浓度

将143B骨肉瘤细胞以10^5/孔接种于12孔板中，待细胞丰度达到80%后，加入含10 μg/ml ADM的培养基，培养1 h；弃掉含ADM的培养基，冰PBS洗3次；加入不含ADM的新鲜培养基，继续培养2 h；弃掉培养基，冰PBS洗3次，加入0.5 ml含1% Triton-X的PBS裂解细胞；取100 μl细胞裂解液，BCA法测定其中总蛋白浓度；另取200 μl细胞裂解液，荧光分光光度计（激发波长λex为478 nm，发射波长λem为594 nm）检测荧光强度；依据标准曲线计算细胞内ADM的浓度，以总蛋白浓度标准化。

1.7 细胞内罗丹明积聚实验

加Rho123到1×10^6/ml单细胞悬液中（终浓度1 μg/ml），37 ℃培养箱中孵育1 h，离心后PBS洗3次，重悬细胞于不含Rho123的培养基中，继续培养2 h，再用PBS洗3次，流式细胞仪4 ℃下检测细胞内残留Rho123的相对荧光强度。

1.8 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SAS 9.0软件进行t检验。

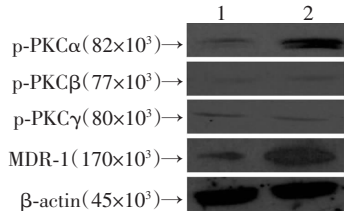
2 结果

2.1 磷酸化PKC不同亚型在人骨肉瘤143B细胞中的表达

相对于143B/WT野生型细胞，143B/ADM耐药细胞中p-PKCα表达显著增加，而p-PKCβ和p-PKCγ表达则无明显差异（图1）。

2.2 MDR-1在人骨肉瘤143B细胞中的表达

相对于143B/WT野生型细胞，143B/ADM耐药细胞中MDR-1表达显著增加（图1）。



1:143B/WT 野生型细胞;2:143B/ADM 耐药细胞

图1 p-PKC 不同亚型和 MDR-1 蛋白在不同 143B 细胞中的表达

2.3 抑制 PKC 表达对 143B 细胞药物敏感性的影响

143B/ADM 细胞中过表达的 PKC 被抑制后,细胞对 ADM 的敏感性显著增加($P<0.01$,表1)。

表1 抑制 PKC 表达对 143B 细胞药物敏感性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	半数抑制浓度(μg/ml)	相对耐药指数
143B/WT 对照组	1.21±0.11	1
143B/WT + staurosporine 组	1.85±0.59	1.5
143B/ADM 耐药组	19.03±0.73[a]	15.7
143B/ADM + staurosporine 组	6.64±0.38[b]	5.5

a:$P<0.01$, 与 143B/WT 对照组比较; b:$P<0.01$,与 143B/ADM 耐药组比较

2.4 抑制 PKC 表达对 143B 细胞凋亡的影响

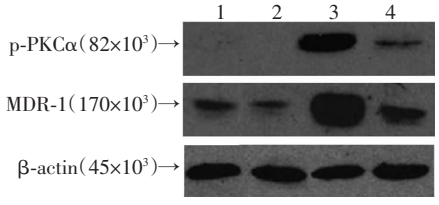
143B/WT 细胞死亡及凋亡率为(80.38±3.65)%,staurosporine 处理过的 143B/WT 细胞则为(76.05±4.49)%,143B/ADM 细胞死亡和凋亡率为(28.41±4.33)%,而 staurosporine 处理过的 143B/ADM 细胞则为(70.63±4.80)%,说明 143B/ADM 细胞中过表达的 PKC 被抑制后,细胞凋亡显著增加。

2.5 抑制 PKC 表达对 143B 细胞外排药物的影响

细胞内 ADM 浓度检测和罗丹明积聚实验显示,143B/WT 细胞 ADM 浓度为(1 072.67±164.13)ng/μg,残余罗丹明荧光强度为 195.29±11.55;staurosporine 处理过的 143B/WT 细胞 ADM 浓度为(1 104.00±198.07)ng/μg,残余罗丹明荧光强度为 205.71±9.08;143B/ADM 细胞 ADM 浓度为(347.17±65.65)ng/μg,残余罗丹明荧光强度为 80.62±13.49;而 staurosporine 处理过的 143B/ADM 细胞 ADM 浓度为(729.67±120.63)ng/ug,残余罗丹明荧光强度为 168.85±10.31。提示,143B/ADM 细胞中过表达的 PKC 被抑制后,细胞内 ADM 浓度增加,细胞外排罗丹明减少($P<0.01$)。

2.6 抑制 PKC 表达对 143B 细胞 MDR-1 表达的影响

143B/ADM 细胞中过表达的 PKC 被抑制后,MDR-1 的表达也出现显著下调(图2)。



1: 143B/WT 对照组;2: 143B/WT + staurosporine 组;3: 143B/ADM 耐药组;4: 143B/ADM + staurosporine 组

图2 Western blot 检测 PKC 不同干预条件下 143B 细胞中 MPR-1 的表达

3 讨论

PKC 广泛分布于真核细胞中,由多种具有不同生物学特性的同工酶组成,是细胞内信号传导的重要递质,可参与机体各种生理及病理过程[3-5]。在哺乳动物体内已发现 12 种以上 PKC 亚型,而各亚型在不同类型的肿瘤中具有不同的表达,其中研究最多的便是经典 PKC——PKCα、PKCβ 和 PKCγ。静息状态下,PKC 以无活性的形式存在于细胞质中,但在外界刺激作用下,PKC 可移位到细胞膜而被激活[6-7]。随着对 PKC 研究的深入,其在肿瘤中的异常表达及调节作用逐渐被人们所重视,并发现其与肿瘤耐药显著相关。大量研究已经证实,在多种肿瘤耐药细胞株或组织中存在高表达的 PKC,且具有一定的亚型特异性,其可能通过调节多药耐药相关的细胞膜蛋白或其他途径来诱导肿瘤耐药的产生,但详细机制仍不明确,而其抑制剂可不同程度的逆转肿瘤耐药[8]。PKC 在骨肉瘤发生、发展中的作用也多有研究,发现其可促进骨肉瘤细胞的增殖,参与肿瘤疼痛机制,影响钙稳态等[9-11],但其在骨肉瘤耐药中的作用还少见报道。

本研究发现,与 143B/WT 相比,143B/ADM 耐药细胞株 PKCα 表达明显上调,而 PKCβ 和 PKCγ 未见显著变化,提示主要是 PKC 亚型 PKCα,而非 PKCβ 和 PKCγ,与 143B/ADM 细胞的耐药有关。随后使用 PKC 特异性抑制剂 staurosporine 阻断 PKCα 表达后发现,143B/ADM 细胞凋亡增加,对化疗药物敏感性增强,说明 PKCα 很可能为骨肉瘤 143B 细胞耐药的重要参与因素,抑制其表达将有效逆转耐药。与此同时,抑制 PKCα 表达后,143B/ADM 细胞内 ADM 浓度增加,罗丹明外排减少,而且先前高表达的 MDR-1 蛋白水平也出现明显下调,提示 PKCα 极有可能通过上调 MDR-1 蛋白的表达,从而导致肿瘤细胞外排药物增加,产生耐药。虽然此前少见人骨肉瘤细胞中 PKCα 的表达及参与耐药机制的报道,但在其他部分肿瘤中却有所证实。如:在 KBV200 耐药细胞中发现 PKCα 的高表达,而 PKCβ 和 PKCγ 则未见变化[12];在人胃癌 SGC7901/VCR 细胞中,抑制 PKCα 的表达可显著提高癌细胞对 ADM 的敏感性[13];在胃癌 MGC803 细胞中,PKCα 和 β 的抑制剂 myr-psiPKC 可抑制 MDR-1 的表达,提示 PKCα 对 MDR-1 存在调节作用[14];在软组织肉瘤中,抑制 PKCα 可显著下调 MDR-1 的表达,提高化疗药物治疗敏感性[10];在肾癌细胞中,转染了 PKCα cDNA 的肾癌细胞比正常肾癌细胞高表达 MDR-1[15];而对人神经胶质瘤细胞株 SHG-44 耐药的研究也发现,PKCα 激活剂 PMA 增强细胞 PKCα 活性,同时增加 MDR-1 表

达和活性,PKCα 抑制剂 staurosporine 抑制细胞 PKCα 活性,减少 MDR-1 表达和活性[16]。

本研究发现在人骨肉瘤 143B 多药耐药细胞中,PKC 亚型 PKCα 可通过促进 MDR-1 的表达参与骨肉瘤耐药。这不仅为骨肉瘤耐药的逆转提供了新的作用靶点,也是 PKC 参与肿瘤耐药的又一有力证明,但其参与骨肉瘤耐药的详细作用方式尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Rosier R N, Teot L A, Hicks D G, *et al*. Multiple drug resistance in osteosarcoma[J]. Iowa Orthop J, 1995, 15(1): 66-73.
[2] 范顺武, 杨迪生, 陶惠民, 等. 骨肉瘤化疗的历史和现状[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(3): 288-290.
[3] Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, *et al*. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance[J]. Prog Lipid Res, 2010, 49(4): 429-437.
[4] 王新国, 刘杞, 孙航. 人肝再生增强因子对体外单个核细胞 PKCα-NF-κB 及 IL-2 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2065-2068.
[5] 徐竞, 杨光明, 李涛, 等. 缺血预适应诱导的失血性休克血管反应性和钙敏感性保护[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(17): 1807-1811.
[6] Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression[J]. Cancer Lett, 2006, 235(1): 1-10.
[7] Martiny-Baron G, Fabbro D. Classical PKC isoforms in cancer[J]. Pharmacol Res, 2007, 55(6): 477-486.
[8] Gonelli A, Mischiati C, Guerrini R, *et al*. Perspectives of protein kinase C (PKC) inhibitors as anti-cancer agents[J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(4): 498-509.
[9] Long G J. Cadmium perturbs calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells; a possible role for protein kinase C[J]. Toxicol Lett, 1997, 91(2): 91-97.
[10] Kawamoto T, Akisue T, Kishimoto K, *et al*. Inhibition of PKCalpha activation in human bone and soft tissue sarcoma cells by the selective PKC inhibitor PKC412[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2A): 825-832.
[11] Minana M D, Felipo V, Cortes F, *et al*. Inhibition of protein kinase C arrests proliferation of human tumors[J]. FEBS Lett, 1991, 284(1): 60-62.
[12] 袁亚维, 孙爱民, 李传刚, 等. KBV200 细胞多药耐药与蛋白激酶 C 亚型表达的关系[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 215-216, 219.
[13] Wu D L, Sui F Y, Du C, *et al*. Antisense expression of PKCalpha improved sensitivity of SGC7901/VCR cells to doxorubicin[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(10): 1259-1263.
[14] 陈波, 金锋, 卢香兰, 等. PKC 抑制剂对 MGC803 细胞中 P-gp 表达及耐药性的影响[J]. 癌症, 2004, 23(4): 396-400.
[15] 刘涛, 孔垂泽, 毕建斌, 等. 蛋白激酶 C 抑制剂逆转肾癌多药耐药机制的探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(2): 92-95.
[16] 陈晋, 程远, 万敬员. 蛋白激酶 Cα 介导人神经胶质瘤细胞株多药耐药机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(4): 341-344.

(**收稿**:2011-04-16;**修回**:2011-05-03)

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2011)18-1903-01

个案与短篇

输尿管镜钬激光碎石术治疗盆腔异位肾合并结石3例

陈 刚,吴小侯,唐 伟,尹志康,何云峰 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科)

[**关键词**] 肾结石;盆腔异位肾;输尿管镜
[**中图法分类号**] R699.4 [**文献标志码**] B

1 临床资料

病例1,男性,26岁,因下腹痛半月就诊。入院体检:双肾区无明显叩痛。尿常规:8~12个/HP。B超:左肾区未见确切肾脏图像,盆腔1肿块,考虑异位肾可能。CT:左侧异位肾伴轻度积液,左肾盂结石可能。诊断为左侧盆腔异位肾伴结石可能。遂在硬膜外麻醉下行输尿管镜碎石术。术中发现左输尿管开口稍狭窄,在斑马导丝引导下置入输尿管镜,入镜至肾盂输尿管交界处见结石1枚,直径约0.8 cm,遂行钬激光碎石术。术后留置双J管。术后2周复查KUB,未见明确的结石残留,拔除双J管。

病例2,男性,40岁,因排尿困难伴尿痛半月就诊。入院体检:双肾区无明显叩痛。B超:右肾区未见确切肾脏图像,左肾轻度积液,尿道内口处中强回声团(考虑结石)。KUB:盆腔内见2粒类圆形高密度影,大的直径约1 cm,考虑为膀胱结石。本拟行IVU或CT等进一步确诊,但患者因经费原因要求只处理膀胱结石。于入院当天拟在局麻下行膀胱镜碎石术。术中反复寻找膀胱内未见结石,左输尿管开口清晰,在对应的位置未见明确的右输尿管开口。在三角区靠右侧壁见一圆形小孔,孔直径约0.3 cm,在斑马导丝引导下扩张后置入输尿管镜,入镜1~2 cm见类似于肾盂肾盏结构,其中中下盏各有结石1枚,大的直径约1.2 cm。考虑为右侧盆腔异位肾合并结石,遂行钬激光碎石术。因输尿管太短,留置双J管未成功。术后2周复查KUB,发现有1枚结石残留,约0.5 cm。本拟行ESWL处理,患者不愿意,予以保守治疗。

[**通信作者**] 吴小侯, E-mail:chengang127@163.com

(下转1911页)