论著

文章编号:1000-5404(2012)17-1762-04

阿苯达唑抑制P-糖蛋白表达对耐顺铂卵巢癌细胞耐药性的影响

何迎盈[1],刘娜娜[1],罗治彬[2],李少林[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院核医学教研室[1];401520 重庆,重庆市合川区人民医院肿瘤血液科[2])

[摘要] **目的** 探讨阿苯达唑(albendazole,ABZ)通过抑制人耐顺铂卵巢癌SKOV-3/DDP细胞P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)的表达对细胞耐药性的影响。**方法** 在体外,用溴化二甲噻唑二苯四氨唑(MTT)比色法检测ABZ对SKOV-3/DDP细胞增殖的影响,求得抑制率为0%、25%、50%、75%所对应的ABZ浓度,并按抑制率将实验分为对照组,25%抑制浓度(IC_{25})组、半数抑制浓度(IC_{50})组和75%抑制浓度(IC_{75})组,每组给予相应浓度的ABZ处理,并按作用时间再将每组分为12、24、36 h亚组。分别用流式细胞仪检测各组细胞表面P-gp的表达。将不同浓度的顺铂(cisplatin,DDP)、表阿霉素(epirubicin,EPI)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-Fu)按照分组,联合和序贯ABZ处理细胞后,采用MTT比色法检测SKOV-3/DDP细胞体外增殖情况。**结果** ABZ作用SKOV3/DDP细胞后使P-gp表达下降,呈浓度和时间依赖性。联合和序贯ABZ均能降低DDP、EPI和5-Fu对SKOV-3/DDP细胞的作用浓度,有浓度和时间依赖性,且联合作用优于序贯作用。**结论** 在体外ABZ通过抑制SKOV-3/DDP细胞P-gp表达提高细胞对DDP、EPI、5-Fu的敏感性,并能逆转细胞的耐药性。

[关键词] 阿苯达唑;P-糖蛋白;耐药性

[中图法分类号] R965; R978.6; R979.1 [文献标志码] A

Albendazole reverses chemoresistance of cisplatin-resistant ovarian cancer cells by inhibiting P-glycoprotein expression

He Yingying[1], Liu Nana[1], Luo Zhibin[2], Li Shaolin[1] ([1]Department of Nuclear Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Hematology, Peoples' Hospital of Hechuan District, Chongqing, 401520, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of albendazole (ABZ) on the chemoresistance of cisplatin-resistant human ovarian cancer SKOV-3/DDP cells by inhibiting P-glycoprotein (P-gp) expression. **Method** The effect of ABZ on the proliferation of SKOV-3/DDP cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry. According to the inhibition concentrations (IC) of 0%, 25%, 50% and 75%, the cells were then divided into 4 groups including a control group, an IC_{25} group, an IC_{50} group and an IC_{75} group. Moreover, each group was divided into three subgroups (12, 24 and 36 h) based on the ABZ treatment time. P-gp expression was determined by flow cytometry. The proliferation of SKOV-3/DDP cells was detected by MTT colorimetry after the treatment with ABZ combined and sequential with cisplatin (DDP), epirubicin (EPI) and 5-fluorouracil (5-Fu). **Results** The expression of P-gp was decreased by ABZ in a dose- and time-dependent manner. Both combined and sequential with ABZ could decrease the effective concentrations of DDP, EPI and 5-Fu to SKOV-3/DDP cells in a dose- and time-dependent manner, and the effect of combination was better than that of sequential treatment. **Conclusion** Through down-regulating the expression of P-gp in SKOV-3/DDP cells, ABZ can increase the sensitivity of SKOV-3/DDP cell to DDP, EPI and 5-Fu, and reverse its chemoresistance.

[**Key words**] albendazole; P-glycoprotein; chemoresistance

Corresponding author: Luo Zhibin, E-mail: luozhibincq@126.com

卵巢癌是病死率最高的妇科肿瘤,且发病率和病死率逐年上升[1]。虽然手术与化疗提高了5年生存率,但耐药仍是治疗所面临的难题[2],且常表现为多药耐药(multidrug resistance,MDR)。多数学者认为耐药卵巢癌细胞高表达P糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)[3]介导了卵巢癌的多药耐药[4]。阿苯达唑属于苯并咪唑类(benzimidazole carbamate,BZs)抗寄生虫药物,安全低毒,至今仍在使用。国外研究发现,它可以通过抑制

[通信作者] 罗治彬,E-mail: luozhibincq@126.com

肿瘤细胞微管蛋白聚合[5],诱导以 Caspase 和细胞色素 C 释放的凋亡,耐紫杉醇的白血病细胞 CEM/dE-poB300[6]和卵巢癌细胞 1A9PTX22[7]却对 ABZ 敏感。本实验运用流式细胞术,检测 ABZ 对 SKOV3/DDP 细胞 P-gp 表达的影响,MTT 法检测 DDP、EPI、5-Fu 联合及序贯 ABZ 后对 SKOV3/DDP 细胞增殖的影响,验证 ABZ 是否能够抑制 P-gp 的表达而改善耐药。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人耐顺铂卵巢癌 SKOV-3/DDP 细胞株购自中国医学科学院肿瘤细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清 RMPI1640 培养基购自 Gibco 公司,ABZ(纯度为 97.5%)购自 AccuStandard 公司,MTT 和二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司,顺铂(cisplatin,DDP)注射液购自南京制药厂,氟尿嘧啶注射液(fluorouracil,5-Fu)购自上海旭东海普药业,盐酸表柔比星(epirubicin,EPI)购自浙江海正药业,P-gp 抗体(货号:557003)、同型异构体(货号:555743)购自 BD 公司,FACS Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 SKOV-3/DDP 细胞按 1×10^4/孔接种于 96 孔板,加入含终浓度为 1、2、4、8、16、32、64、128 μmol/L 的 ABZ 培养液。每个浓度设 3 个复孔。培养 24 h 后,加入 5 mg/ml MTT 20 μl,4 h 后,加入 150 μl DMSO,酶标仪 490 nm 处测定吸光值[D(490)],计算细胞增殖抑制率。增殖抑制率 = {1 -[实验孔 D(490)值 - 空白对照孔 D(490)值]/[阴性对照孔 D(490)值 - 空白对照孔 D(490)值]} × 100%。按照实验结果,将实验分为对照组、25% 抑制浓度组(IC_{25})、半数抑制浓度组(IC_{50})和 75% 抑制浓度组(IC_{75})。

1.2.2 流式细胞术测 SKOV-3/DDP 细胞表面 P-gp 的表达 SKOV-3/DDP 细胞按 1×10^6/孔接种于 6 孔板,加入培养基孵育过夜。待细胞贴壁后,按组分别加入含 0、1.5、8.0、50.0 μmol/L ABZ 的培养液,在 12、24、36 h 时用胰酶消化并收集细胞,PBS 轻洗 2 次,室温 1 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液。避光条件下,空白孔加入 20 μl PBS,同型对照孔加入同型对照抗体 20 μl,对照组和实验组均加入 P-gp 抗体 20 μl。避光室温孵育 1 h,每 20 分钟轻轻震荡 1 min,最后加入 PBS 至 300 μl,上机检测。

1.2.3 ABZ 影响 SKOV3/DDP 细胞对 DDP、EPI、5-Fu 的敏感性 SKOV-3/DDP 细胞按 1×10^4/孔接种于 96 孔板,培养过夜。待细胞贴壁后,小心吸去孔内培养基,按照 1.2.1 中分组,将 DDP、EPI、5-Fu 分别溶于含相应浓度的 ABZ 培养液中,使 DDP 和 5-Fu 终浓度为 5、10、20、40、80、160、320、640 μmol/L,EPI 的终浓度为 3.5、7、14、28、56、112、224、448 μmol/L。将配好的药液加到实验孔内,每个浓度设 3 个复孔。培养 24 h 后,按 1.2.1 方法行 MTT 法检测,计算细胞增殖抑制率 25%、50%、75% 所对应的 DDP、EPI、5-Fu 的浓度。

1.2.4 ABZ 影响 SKOV-3/DDP 细胞对 DDP、EPI、5-Fu 的耐药性 SKOV-3/DDP 细胞按 1×10^4/孔接种于 96 孔板,培养过夜。待细胞贴壁后,小心吸去孔内培养基,按组分别加入含 ABZ 的培养液。培养 12 h 后,小心吸去孔内培养基,无菌 PBS 轻洗 2 遍,再每孔加入血清培养基培养 24 h,再吸去孔内培养基,按组分别加入含 DDP、EPI、5-Fu 的血清培养基。DDP、EPI、5-Fu 的终浓度同 1.2.3。每个浓度设 3 个复孔。培养 24 h 后,行 MTT 法检测并计算细胞增殖抑制率为 25%、50%、75% 所对应的 DDP、EPI、5-Fu 的浓度。

1.3 统计学方法

以上实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,样本均数差别的多重比较采用单因素多水平 LSD 法方差分析。

2 结果

2.1 分组实验结果

抑制率 0%、25%、50%、75% 所对应的 ABZ 浓度分别为 0、(0.99 ± 0.11)、(5.73 ± 0.65)、(33.15 ± 3.94) μmol/L。因此对照组、IC_{25}组、IC_{50}组和 IC_{75}组所对应的 ABZ 作用浓度分别为 0、1.0、5.5、35.0 μmol/L,再按 ABZ 作用时间将各组分为 12、24、36 h 3 个亚组,以便横向比较。

2.2 SKOV3/DDP 细胞膜上 P-gp 表达

经过 CellQuest 软件拟合得出各组细胞膜上 P-gp 的表达(表 1),从浓度和时间依赖性两方面分析 ABZ 对 P-gp 表达的影响。ABZ 作用于 SKOV3/DDP 细胞后,实验组的 P-gp 表达明显下降。12 h 时,IC_{25}组和 IC_{50}组 P-gp 表达无明显差异。24 h 和 36 h 时,各实验组间 P-gp 表达差异明显。说明,ABZ 能够明显抑制 SKOV3/DDP 细胞 P-gp 表达,并在 24 h 和 36 h 时有浓度依赖性。相同浓度的 ABZ 作用不同时间,P-gp 表达都具有明显的差异性,说明 ABZ 抑制 P-gp 表达还具有时间依赖性。见图 1~3。

表 1 ABZ 不同作用时间对 SKOV3/DDP 细胞膜上 P-gp 表达的影响[$n=3$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	12 h	24 h	36 h
对照组	94.46 ± 3.22	95.26 ± 4.09	94.40 ± 1.83
IC_{25}组	88.04 ± 2.55[a]	53.16 ± 3.50[a]	20.95 ± 2.61[a]
IC_{50}组	83.34 ± 3.76[a]	32.47 ± 1.71[abd]	10.52 ± 1.48[abde]
IC_{75}组	61.26 ± 3.22[abc]	18.83 ± 2.35[abcd]	4.42 ± 0.62[abcde]

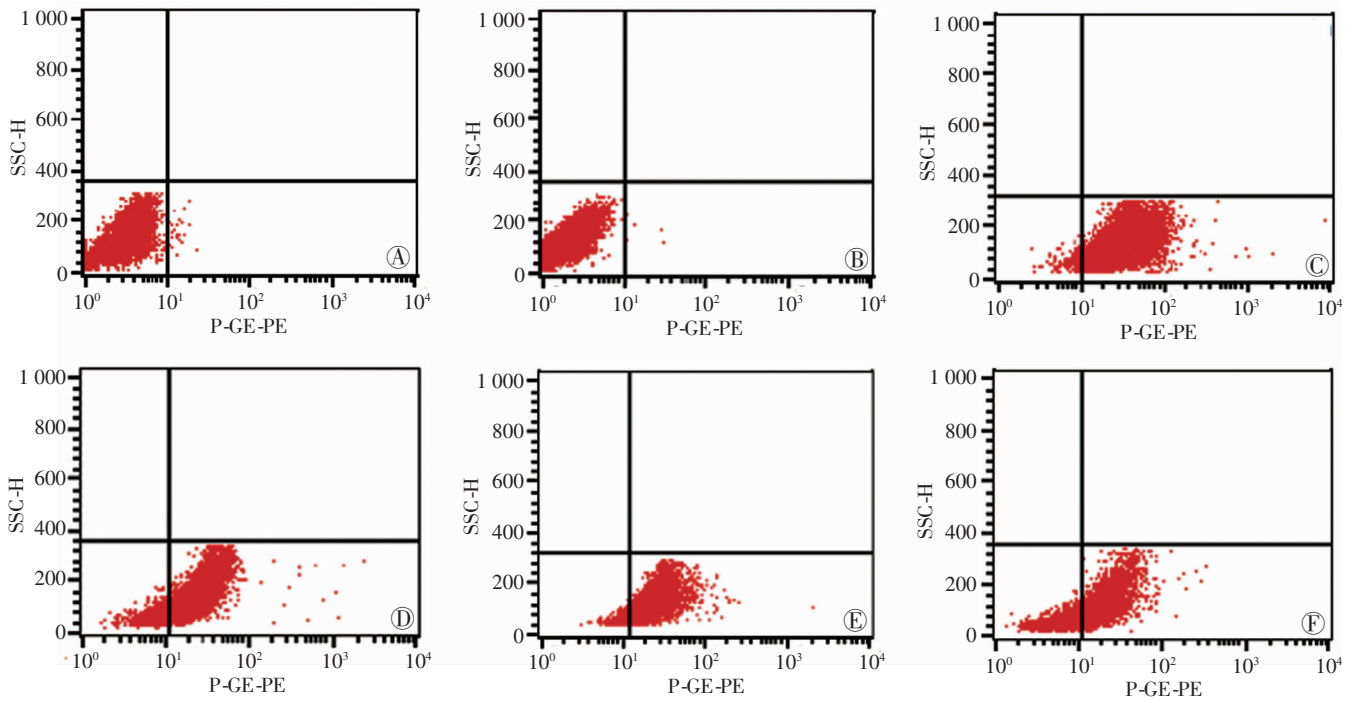
a:$P<0.05$,与同时间对照组比较;b:$P<0.05$,与同时间 IC_{25}组比较;c:$P<0.05$,与同时间 IC_{50}组比较;d:$P<0.05$,与同组 12 h 比较;e:$P<0.05$,与同组 24 h 比较

2.3 ABZ 影响 SKOV3/DDP 细胞敏感性

DDP、EPI 和 5-Fu 联合 ABZ 作用细胞后,实验组细胞对上述 3 种化疗药物敏感性均明显提高,且 ABZ 浓度越高,DDP、EPI 和 5-Fu 的作用浓度越低(表 2),说明,ABZ 能够降低 DDP、EPI 和 5-Fu 对 SKOV-3/DDP 细胞的作用浓度,且具有浓度依赖性。

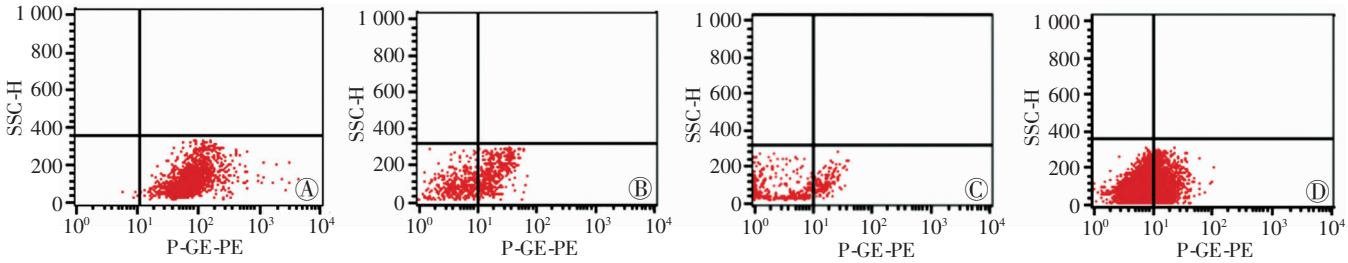
2.4 ABZ 影响 SKOV-3/DDP 细胞的耐药性

ABZ 序贯 DDP、EPI 和 5-Fu 作用细胞后,实验组细胞对上述 3 种化疗药物耐药性均明显降低;越高浓度的 ABZ 可使 DDP、EPI 和 5-Fu 对细胞的作用浓度越低(表 3),说明,ABZ 能够逆转 SKOV3/DDP 细胞对 DDP、EPI 和 5-Fu 的耐药性且呈浓度依赖性。



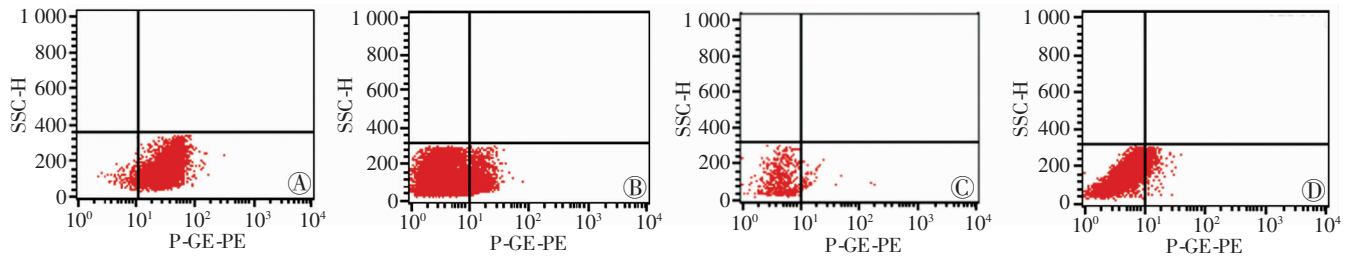
A:空白孔;B:同型对照孔;C:对照组;D:IC_{25}组;E:IC_{50}组;F:IC_{75}组

图 1 ABZ 作用 12 h 后各组细胞的 P-gp 表达



A:对照组;B:IC_{25}组;C:IC_{50}组;D:IC_{75}组

图 2 ABZ 作用 24 h 后各组细胞的 P-gp 表达



A:对照组;B:IC_{25}组;C:IC_{50}组;D:IC_{75}组

图 3 ABZ 作用 36 h 后各组细胞的 P-gp 表达

表 2 ABZ 影响 SKOV3/DDP 细胞对 DDP、EPI、5-Fu 敏感性(μmol/L, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	DDP			EPI			5-Fu		
	25%	50%	75%	25%	50%	75%	25%	50%	75%
对照组	33.55±2.05	363.50±18.62	3 938.57±162.71	45.17±2.25	625.03±43.84	8 650.78±785.41	107.78±2.37	2 534.20±112.48	59 607.69±3 993.72
IC_{25}组	3.49±0.10^{a}	68.02±3.13^{a}	1 329.07±140.51^{a}	9.95±0.73^{a}	205.73±5.73^{a}	4 282.63±536.47^{a}	57.82±2.99^{a}	1 162.51±93.93^{a}	23 388.75±2 592.36^{a}
IC_{50}组	0.38±0.06^{ab}	7.39±0.66^{ab}	144.43±3.91^{ab}	0.14±0^{ab}	4.04±0.08^{ab}	115.38±2.44^{ab}	8.30±0.20^{ab}	63.42±1.45^{ab}	484.32±11.01^{ab}
IC_{75}组	0^{abc}	0.05±0.01^{abc}	9.81±0.50^{abc}	0^{abc}	0.07±0.01^{abc}	8.18±0.82^{abc}	0.02±0.01^{abc}	0.81±0.13^{abc}	39.94±1.63^{abc}

a:$P<0.05$,与相应对照组比较;b:$P<0.05$,与 IC_{25}组比较;c:$P<0.05$,与 IC_{50}组比较

表 3 ABZ 影响 SKOV3/DDP 细胞对 DDP、EPI、5-Fu 的耐药性(μmol/L, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	DDP			EPI			5-Fu		
	25%	50%	75%	25%	50%	75%	25%	50%	75%
对照组	33.03±1.08	365.41±16.60	4 043.08±238.10	44.86±2.03	627.29±38.71	8 772.55±687.89	105.50±92.17	2 479.65±108.70	58 290.49±4 638.51
IC_{25}组	12.93±0.99[a]	95.86±3.49[a]	711.56±4.76[a]	21.03±0.47[a]	290.42±14.81[a]	4 012.34±319.87[a]	82.97±1.84[a]	1 471.12±70.05[a]	26 125.32±2 418.85[a]
IC_{50}组	2.12±0.83[ab]	38.85±2.03[ab]	618.03±55.51[ab]	8.24±0.28[ab]	79.18±1.77[ab]	762.25±61.10[ab]	16.97±0.77[ab]	141.79±8.78[ab]	1 185.00±94.57[ab]
IC_{75}组	0.51±0.05[abc]	10.00±0.61[abc]	196.90±7.65[abc]	0.08±0.01[abc]	2.92±0.20[abc]	103.28±2.53[abc]	0.39±0.04[abc]	9.17±0.40[abc]	214.68±14.34[abc]

a: $P<0.05$, 与相应对照组比较; b: $P<0.05$, 与 IC_{25} 组比较; c: $P<0.05$, 与 IC_{50} 组比较

2.5 增敏和逆转效应比较

将 DDP、EPI、5-Fu 联合 ABZ 时在抑制率分别为 25%、50%、75% 所对应的浓度与 ABZ 序贯 DDP、EPI、5-Fu 相对应的浓度对比后发现, IC_{25} 浓度 ABZ 联合和序贯 EPI、5-Fu 对细胞的敏感性和耐药性改变无明显差别, IC_{50}、IC_{75} 的 ABZ 都表现了联合作用优于序贯作用, 即 ABZ 增敏效果强于逆转效果。

3 讨论

阿苯达唑是临床上至今仍在使用的抗寄生虫药物, 它通过抑制寄生虫肠细胞摄取葡萄糖抑制糖酵解相关酶活性, 阻止三磷腺苷产生, 耗竭糖原使虫体无法生存和繁殖[8]。1985 年 Lacey 等[9]发现 BZs 可抑制小鼠白血病细胞 L1210 生长后, 国外学者对 BZs 抗肿瘤效应进行了不少的研究, 并证实了 ABZ 通过抑制微管蛋白聚合有抗肿瘤作用, 抑制乏氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)[10]和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)[11]表达, 改善乏氧和血管形成等。

顺铂是卵巢癌化疗的一线用药, 疗效明显且价格便宜, 但治疗后期常产生耐药[12], 多表现为 MDR。P-gp 由 MDR1 和 MDR3 基因指导, 定位于细胞膜, 是依赖 ATP 的药物外排泵, 它通过将药物泵出细胞膜外而降低细胞内药物浓度导致耐药[13]。目前普遍认为耐药的产生与 P-gp 高表达有密切关系, 另外, P-gp 高表达可能也会影响细胞的凋亡[14]。通过抑制 P-gp 的功能可逆转耐药细胞的化疗抵抗性[15]。本实验发现, ABZ 通过抑制 P-gp 表达, 不仅提高了 SKOV3/DDP 细胞对 DDP、EPI、5-Fu 的敏感性, 还逆转了细胞对这 3 种药物的耐药性, 且增敏作用优于逆转作用。

现在使用的绝大多数的化疗药物毒副反应很大, 以至于许多患者不能耐受, 或死于化疗药物毒性。ABZ 有很高的临床安全性, 研究发现它具有卓越抗肿瘤效果, 对耐药细胞的效果也很明显, 希望经过深入研究后, 它能够应用于肿瘤临床化疗, 改善耐药细胞的耐药性, 提高患者生存率。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

[2] Bast R C Jr, Hennessy B, Mills G B. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(6): 415-428.

[3] Kawakami Y, Miyamoto K, Takehara K, *et al*. Down-regulation of MDR1 by epigenetic alteration in human epithelial ovarian cancer cells[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(Suppl): e16556.

[4] Bell D R, Gerlach J H, Kartner N, *et al*. Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance[J]. J Clin Oncol, 1985, 3(3): 311-315.

[5] Pourgholami M H, Woon L, Almajd R, *et al*. In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole[J]. Cancer Lett, 2001, 165(1): 43-49.

[6] Khalilzadeh A, Wangoo K T, Morris D L, *et al*. Epothilone-paclitaxel resistant leukemic cells CEM/dEpoB300 are sensitive to albendazole: Involvement of apoptotic pathways[J]. Biochem Pharmacol, 2007, 74(3): 407-414.

[7] Chu S W, Badar S, Morris D L, *et al*. Potent inhibition of tubulin polymerisation and proliferation of paclitaxel-resistant 1A9PTX22 human ovarian cancer cells by albendazole[J]. Anticancer Res, 2009, 29(10): 3791-3796.

[8] Li Q Z, Hao Y H, Gao X J, *et al*. The target of benzimidazole carbamate against cysticerci cellulosae[J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(8): 1009-1017.

[9] Lacey E, Watson T R. Activity of benzimidazole carbamates against L1210 mouse leukaemia cells: correlation with *in vitro* tubulin polymerization assay[J]. Biochem Pharmacol, 1985, 34(19): 3603-3605.

[10] Pourgholami M H, Cai Z Y, Badar S, *et al*. Potent inhibition of tumoral hypoxia-inducible factor 1alpha by albendazole[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 143.

[11] Pourgholami M H, Cai Z Y, Lu Y, *et al*. Albendazole: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1928-1935.

[12] Krieger M L, Eckstein N, Schneider V, *et al*. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes *in vitro*[J]. Int J Pharm, 2010, 389(1/2): 10-17.

[13] Aller S G, Yu J, Ward A, *et al*. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding[J]. Science, 2009, 323(5922): 1718-1722.

[14] Johnstone R W, Ruefli A A, Smyth M J. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(1): 1-6.

[15] Jovelet C, Benard J, Forestier F, *et al*. Inhibition of P-glycoprotein functionality by vandetanib may reverse cancer cell resistance to doxorubicin[J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 46(5): 484-491.

(收稿:2012-02-15;修回:2012-04-19)

(编辑 汪勤俭)