临床研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.029

结肠癌细胞核受体 PXR 表达对 CPT-11 化疗效果的影响

史祖宣[1]，汤　喻[2]，李　克[3]，陈　静[1]，岳冬丽[1]，樊青霞[1]
（1. 郑州大学第一附属医院肿瘤科，郑州　450052；2. 郑州大学第一附属医院内分泌科，郑州　450052；
3. 河南省肿瘤医院肿瘤内科，郑州　450008）

【摘　要】目的：探讨结肠癌细胞核受体 PXR 表达的变化对 CPT-11 化疗效果的影响。方法：用 Western blot 方法检测 PXR 蛋白在人结肠癌细胞株 LS174T、HT29 和 HCT116 中的表达。通过莱菔硫烷、利福平分别敲低或上调 PXR 受体的表达，利用 MMT 或流式细胞术研究其表达下调或上调对细胞增殖和凋亡的影响。结果：3 株结肠癌细胞株 LS174T、HT29、HCT116 中，LS174T 细胞的 PXR 表达水平最高（P=0.000）。莱菔硫烷处理后，LS174T 细胞中 PXR 表达明显减弱（P=0.000），CPT-11 作用后，细胞增殖明显受到抑制（P=0.013），对 CPT-11 敏感性增强；同时利用利福平处理后，LS174T 细胞中 PXR 表达增强（P=0.000），CPT-11 作用后，细胞增殖明显加速（P=0.019），对 CPT-11 敏感性降低。结论：结肠癌细胞核受体 PXR 表达的变化对于 CPT-11 化疗敏感性具有十分重要的影响，其可能在结肠癌耐药机制中具有重要作用。

【关键词】细胞核受体 PXR；莱菔硫烷；利福平；伊立替康
【中国图书分类法分类号】R735.3+5　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-08-03

Effect of pregnane X receptor(PXR) expression on chemotherapeutic sensitivity to CPT-11 in colon cancer cells

SHI Zu-xuan[1], TANG Yu[2], LI Ke[3], CHEN Jing[1], YUE Dong-li[1], FAN Qing-xia[1]
(1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; 2. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; 3. Department of Oncology, Tumor Hospital of Henan Province)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of PXR expression changes in human colon cancer cell on chemotherapeutic sensitivity to CPT-11. *Methods*: The expression levels of PXR in human colon cancer cells LS174T、HT29 and HCT116 were measured by Western blot. After upregulation or downregulation of PXR expression by rifampicin or sulforaphane, cell growth was studied by MTT assay and cell cycle was measured by flow cytometry. *Results*: The expression levels of PXR in LS174T cell were the highest among human colon cancer cells LS174T、HT29 and HCT116(P=0.000). After being treated with sulforaphane, PXR expression in LS174T cell was significantly down-regulated (P=0.000)and cell proliferation was suppressed after being treated with CPT-11(P=0.013), so the chemotherapeutic sensitivity of LS174T cell to CPT-11 was significantly increased. By contrast, after being treated with rifampicin, PXR expression in LS174T cell was significantly up-regulated(P=0.000) and cell proliferation was enhanced(P=0.019), so the chemotherapeutic sensitivity to CPT-11 was significantly decreased. *Conclusion*: The expression changes of PXR in human colon cancer cell have significant effect on chemotherapeutic sensitivity to CPT-11, and this mechanism may play an important role in the drug resistance mechanisms of human colon cancer.

【Key words】 pregnane X receptor; sulforaphane; rifampicin; CPT-11

孕烷 X 受体（Pregnane X receptor，PXR）又名类固醇和外源性受体（Steroid and xenobiotic receptor，SXR），属配体活化的转录因子，是核受体家族重要成员之一。它参与调控了众多涉及药物代谢和转运的靶基因，从而在介导药物相互作用方面发挥重要作用。多药耐药是一种多基因参与的复杂过程，与药物代谢和转运密切相关，而 PXR 正是通过对药物代谢和转运的调控参与了多药耐药形成[1]。莱菔硫烷（Sulforaphane，SFN）是主要从十字花科蔬菜中提取的一种具强抗癌作用的植物化学活性物质，本实验通过莱菔硫烷敲低PXR 受体的表达从而增强结肠癌细胞对 CPT-11 的敏感性[2]。本研究检测了结肠癌细胞株中核受体 PXR 的表达，观察了敲低和活化 PXR 对 CPT-11 治疗结肠癌的效果。

作者介绍：史祖宣（1986-），男，在读硕士，
研究方向：恶性肿瘤临床研究及治疗。
通信作者：樊青霞，女，教授，Email: fqx2243@yahoo.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 实验所用人结肠癌细胞 LS174T、HT29 细胞株均购自中科院上海生科院细胞库。

1.1.2 试剂 1640 培养基为索莱宝公司产品，利福平、D-L-莱菔硫烷购自 Sigma 公司，胰蛋白酶购自碧云天公司，胎牛血清购自杭州四季青，SDS-PAGE 凝胶试剂盒（上海碧云天），PXR、α-Tubulin 一抗和相应的 IgG-HRP 标记二抗购自 Santa Cruz 公司，细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒、MTT 试剂盒购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 1640 培养基，于 37℃、95%CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。每 2~3 d 换液 1 次，每 6~7 d 用 0.25 %胰蛋白酶消化传代 1 次。实验选用对数生长期细胞。

1.2.2 Western blot 检测 PXR 蛋白表达 细胞核蛋白的提取参照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明书，使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定提取的核蛋白浓度，将提取的核蛋白统一调整为 4 μg/μl，并与 5×的上样缓冲液混匀，取核蛋白 20 μg 与等体积上样缓冲液混匀，100℃，加热 10 min 变性，冷却后上样，12%SDS-PAGE 电泳分离，电转至硝酸纤维膜，用含 2%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 3~4 h，加入一抗 4℃孵育过夜，洗膜 3 次后加 HRP 标记相应二抗，室温封闭孵育 2 h。洗膜 3 次后 ECL 发光，曝光显像。VisionWorkLS 软件分析。

1.2.3 MTT 检测莱菔硫烷、利福平处理后的结肠癌细胞对 CPT-11 的敏感性 经 Western blot 检测，LS174T 中 PXR 呈高表达，选用 LS174 作为实验细胞。将 LS174T 细胞接种于 96 孔板，每孔约 8×10^3 个细胞，贴壁 24 h 后按以下分组：①正常对照组；②莱菔硫烷作用组；③利福平作用组，每组 10 个复孔。分别用莱菔硫烷、利福平作用细胞 48 h 后，3 组均加入等量的 CPT-11（10 μg/ml）分别作用 24、48、72 h 和 96 h 后，在不同的时间点分别加入 MTT 10 μl，孵育 4 h，吸取培养基后加入 DMSO 100 μl，室温摇床上震荡 10 min，酶标仪测定，波长 490 nm 处的吸光度值。

1.3 统计学分析

所有的实验数据均采用 SPSS17.0 软件进行分析，数据结果均表示为均数±标准差（$\bar{x}\pm s$），3 组定量资料的比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），重复测量数据的比较采用重复测量数据方差分析，$P\leq0.05$，表明差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 人结肠癌细胞 HT29、LS174T 和 HCT116 细胞株中 PXR 蛋白的表达

利用 Western blotting 检测 3 株人结肠癌细胞 HT29、LS174T 和 HCT116 中 PXR 蛋白的表达。结果表明，在人结肠癌细胞 HT29 和 HCT116 中 PXR 蛋白的表达明显低于 LS174T 细胞中 PXR 蛋白的表达（图 1），且差异具有统计学意义（P=0.000）（表 1）。因此在后续的研究中采用LS174T 细胞株研究 PXR 的功能。

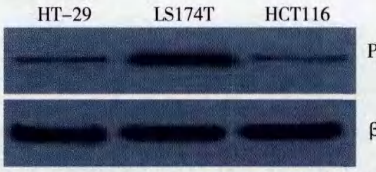


图 1 Western blot 检测 HT29、LS174T 和 HCT116 细胞株中 PXR 蛋白的表达

表 1 HT29、LS174T 和 HCT116 细胞株中 PXR 蛋白表达的定量分析

细胞株	PXR蛋白表达
HT29	0.111 7 ± 0.024 5
LS174T	0.609 0 ± 0.086 5
HCT116	0.102 3 ± 0.023 2
*F*值	87.781
*P*值	0.000

注：检验水准 α=0.05

2.2 利福平和莱菔硫烷处理后 LS174T 细胞中 PXR 蛋白表达的变化

利用 Western blot 检测莱菔硫烷和利福平分别处理 LS174T 细胞 48 h 后 PXR 蛋白表达的变化。结果显示，利用 10 μmol/L 的利福平处理 LS174T 细胞 48 h 后，PXR 核蛋白表达水平明显升高，而 25 μmol/L 的莱菔硫烷处理 LS174T细胞 48 h 后，PXR 核蛋白表达水平明显降低（图 2），且 3 组细胞中PXR 蛋白的相对表达水平差异具有统计学意义（P=0.000）（表 2）。

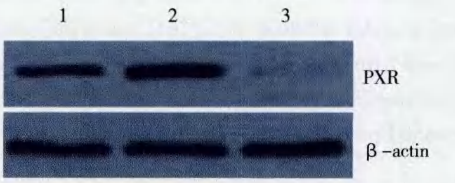


图 2 莱菔硫烷和利福平处理后 LS174T 细胞中 PXR 蛋白表达

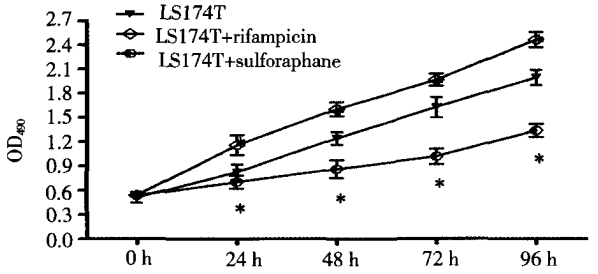
表 2 莱菔硫烷和利福平处理后 LS174T 细胞中 PXR 蛋白表达变化的定量分析

处理方式	PXR蛋白表达
未处理的 LS174T 细胞利福平处	0.519 7 ± 0.091 4
理的 LS174T 细胞莱菔硫烷处理	1.453 3 ± 0.178 5
的 LS174T 细胞	0.020 9 ± 0.013 6
*F*值	117.784
*P*值	0.000

注：检验水准 α=0.05

2.3 利福平和莱菔硫烷处理后 LS174T 细胞对 CPT-11 敏感性的变化

与未处理的 LS174T 细胞相比，利福平 10 μmol/L 处理后的各个不同时间点细胞增殖较未处理组明显加速（P=0.019）（图 3），LS174T 细胞对 CPT-11 敏感性降低，而莱菔硫烷 25 μmol/L 处理后的各个不同时间点细胞增殖较未处理组明显减弱（P=0.013）（图 3），LS174T 细胞对 CPT-11 敏感性增强。表明 PXR 表达的变化对于结肠癌 LS174T 细胞对 CPT-11 的敏感性具有重要的影响。



*，P=0.019 利福平 vs 未处理组；P=0.013，莱菔硫烷 vs 未处理组

图 3 和莱菔硫烷对结肠癌 LS174T 细胞增殖的影响

3 讨 论

化疗是结肠癌的重要治疗手段之一，而耐药性的形成是导致化疗失败并引起肿瘤复发及患者死亡的重要原因[3,4]。肿瘤耐药性的形成是个多因素的复杂过程，而有关实验表明 PXR 在肿瘤耐药性的形成中起着重要作用，而多种化学物质均可以导致 PXR 的活化[5]。PXR 又名类固醇和 SXR，属配体活化的转录因子，是核受体家族重要成员之一。PXR 与相应配体、转录辅调节因子结合形成复合物，并与视黄醛 X 受体（Retinoid X receptor，RXR）形成异二聚体结合于靶基因启动子区域的特异重复序列，从而调控基因转录。PXR 调控的靶基因涉及众多与药物代谢和转运相关的基因[1]。已有研究表明，PXR 在结肠癌组织中呈高表达；PXR 可以通过促进结肠癌细胞中 CPT-11 活性代谢产物 SN38 的糖基化而降低其疗效；通过 RNA 干扰技术沉默 PXR 在结肠癌细胞中的表达可以增加细胞对 CPT-11 化疗敏感性[6]。

Takami N 等发现在子宫内膜癌顺铂耐药细胞株中，PXR 呈高表达。用 PXR 的反义寡核苷酸处理耐药细胞株后，可逆转对顺铂耐药，而用反义核苷酸预处理的细胞，不能诱导对顺铂的耐药。这提示 PXR 可能参与了子宫内膜癌细胞耐药表型的获得[7]。Mensah-Osman 等发现 PXR 蛋白表达水平与骨肉瘤细胞对足叶乙甙的耐药直接相关[8]。Chen等检测了PXR 在前列腺癌及癌旁正常组织中表达，发现二者有显著差异。其配体 SR12813 活化 PXR 后，可提高前列腺细胞 PC3 对紫杉醇和长春新碱的耐受性，而下调其表达后可增强细胞对化疗药物的敏感性[9]。Gupta 等在体内体外的试验中也发现利福平活化 PXR 后，可促进卵巢癌细胞增殖和提高其对化疗药物的耐受性[10]。这些研究都有力证实了 PXR 在多药耐药中的重要性。

本实验中我们用 Western blot 方法检测了 PXR 受体在人结肠癌细胞中的表达情况。而后在高表达 PXR 的 LS174T 细胞中，分别用莱菔硫烷、利福平处理，通过 Western blot 方法检测到两者降低和增强了 PXR 核蛋白的表达水平，再给予 CPT-11 后发现两者分别提高和降低了 LS174T 细胞对 CPT-11 化疗的敏感性。本实验的研究证实了 PXR 对 CPT-11 治疗结肠癌敏感性的影响，但它们之间的具体机制有待进一步研究，以便为临床应用提供更可靠的证据。

参 考 文 献

[1] Synold T W, Dussault I, Forman B M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux[J]. Nat Med, 2001, 7(5): 584-590.

[2] Ekins S, Kholodovych V, Ai N, et al. Computational discovery of novel low micromolar human pregnane X receptor antagonists[J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(3): 662-672.

[3] Bates S E, Regis J I, Robey R W, et al. Chemoresistance in the clinic: Overview 1994[J]. Bull Cancer, 1994, 81: 55-61.

[4] Gupta A K, McKenna W G, Weber C N, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(3): 885-892.

[5] Chen Y, Nie D. Pregnane X receptor and its potential role in drug resistance in cancer treatment[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2009, 4(1): 19-27.

[6] Raynal C, Pascussi J M, Lequelinel G, et al. Pregnane X Receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation[J]. Mol Cancer, 2010, 2(9): 46.

[7] Takami N, Sakamoto H, Yamamoto T. Steroid and xenobiotic receptor (SXR) is a key system for the acquisition of cisplatin resistance in endometrial cancer cells[J]. J Int Med Res, 2003, 31(2): 59-68.

[8] Mensah-Osman E J, Thomas D G, Tabb M M, et al. Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma celllines[J]. Cancer, 2007, 109(5): 957-965.

[9] Chen Y, Tang Y, Wang M T, et al. Human pregnane X receptor and resistance to chemo -therapy in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10361-10367.

[10] Gupta D, Venkatesh M, Wang H, et al. Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: proliferation and drug resistance in ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(17): 5332-5340.

（责任编辑：冉明会）