维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0712-04

反义 mdr1 对鼻咽癌细胞放射敏感性的影响

任庆兰[1],吴永忠[2],陈晓品[1],李少林[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016;2. 重庆市肿瘤医院放疗科,重庆 400030;
3. 重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨用反义技术抑制多药耐药基因 1(Multidrug resistance gene 1,mdr1基因)对鼻咽癌细胞 CNE 放射敏感性的影响。方法:设立空白组、脂质体组(仅加入等量的脂质体)和 mdr1正义寡核苷酸组作对照,用 RT-PCR 检测鼻咽癌细胞转染反义 mdr1 前后 mdr1 表达水平的变化。用集落形成试验检测各实验组照射后人鼻咽癌 CNE 细胞株的集落形成率,免疫组织化学法测定甲基鸟嘌呤甲基转移酶(Methylguanine-methyltransferase,MGMT)的表达。结果:mdr1 反义寡核苷酸能有效抑制 mdr1基因的表达。mdr1 反义寡核苷酸 +^{60}Co γ 射线照射组,其集落形成率较正义寡核苷酸组及单纯照射组明显下降,MGMT 蛋白的表达也显著下调,与各对照组比较有显著差异($P<0.05$)。结论:mdr1 反义寡核苷酸通过抑制 mdr1基因降低了人鼻咽癌 CNE 细胞放射抗性。其辐射增敏作用可能与 mdr1 反义寡核苷酸下调照射后鼻咽癌细胞 MGMT 蛋白表达有关。

【关键词】鼻咽癌细胞;mdr1;放射敏感性

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-23

Effect of inhibiting mdr1 on radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cell line

REN Qing-lan, et al

(*Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of inhibiting mdr1 by antisense technology on radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cell line(CNE). *Methods*: There were four groups in the study: control group, lipofectin group, sense oligodexynucleotides (SODN) group, and antisense oligodexynucleotides(ASODN) group. The expression of mdr1 was detected by RT-PCR. Cellular response to irradiation was evaluated by the colony forming test. Methylguanine-DNA methyltransferase(MGMT)protein expression was determined by immunohistochemical staining. *Results*: ASODN group could significantly decrease the proliferation rate and downregulate the expression of MGMT of irradiated nasopharyngeal carcinoma cells(vs lipofectin group or SODN group, $P<0.05$). *Conclusion*: mdr1 antisense oligodexynucleotides sensitize the CNE to ionizing irradiation through decreasing the expression of mdr1, which might be related to decreasing the expression of MGMT.

【Key words】 Nasopharyngeal carcinoma cell line; mdr1; Radiosensitivity

放疗是治疗鼻咽癌的重要手段。mdr1 基因编码的磷酸糖蛋白 P-gp,它的过度表达是产生化疗多药耐药(Multidrug resistance,MDR)的重要机制。本文利用反义技术抑制 mdr1基因,观察它对鼻咽癌细胞 CNE 放射敏感性的影响,同时检测试验各组细胞 MGMT 表达变化,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

作者介绍:任庆兰(1972-),女,博士,
研究方向:肿瘤辐射增敏。

基金项目:重庆医科大学科研课题基金资助(2006-12)。

1.1 实验分组

设立空白组、脂质体组(加入等量脂质体)、mdr1正义寡核苷酸组(SODN)作为对照组,mdr1 反义寡核苷酸组(A-SODN)为实验组。

1.2 寡核苷酸

mdr1 正义寡核苷酸序列为:5'-CCATCCCGACCTCGCGCTCC-3'。

mdr1 反义寡核苷酸序列为:5'-GGAGCGCGAGGTCGGGATGG-3'。

皆经全硫代修饰,由上海生物工程公司合成。

1.2 细胞培养

鼻咽癌细胞株 CNE 购自湖南医科大学湘雅医院。用含

维普资讯 http://www.cqvip.com

10%小牛血清，青－链霉素各 100μ/ml 的 RPMI1640 培养液，置于 37℃、饱和湿度、5%CO_2 孵箱中无菌培养。

1.3 用脂质体介导转染寡核苷酸

将数目为 2×10^5 的细胞接种于 6 孔培养板上，大约 24h 后，细胞有 40%～60%融合，参照 Lipofectamine™2000 的转染策略进行转染。转染时用无血清，无抗生素的 RPMI1640 培养液。6h 后，去除含脂质体－寡核苷酸的转染液，换用含 20%小牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养 48h。

1.4 RT-PCR 检测转染寡核苷酸前后 CNE 细胞的 mdr1 表达

用 Trizol 提取转染寡核苷酸前后 CNE 细胞的总 RNA。用分光光度计对溶解于 DEPC 的 RNA 定量，并将 3μgRNA 进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳，检测 RNA 的完整性。取 5μgRNA 为模板，逆转录合成 cDNA，用 mdr1的特异引物(Primer1：5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'；Primer2：5'-GTTCAAACTTCTGCTCCTGA-3')及内参照 β-actin(肌动蛋白)引物(Primer1：5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3'；Primer2：5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3')，在 Taq 酶作用下进行 PCR 扩增：94℃预变性 5min 后进入循环。循环参数为 94℃×35s，54℃×40s，72℃×7min，30 个循环。然后 72℃×7min。取 PCR 产物 10μl 进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，在 Doc Gel 2000(美国 Bio-Rad 公司产品)凝胶成像系统下成像并以 Bio-Image Analysis System 进行半定量检测，结果以 A 值×面积(S)表示。mRNA 相对含量 =(A 目的基因×S)/(Aβ-actin×S)

1.5 ^{60}Coγ 射线照射

收集处理后活细胞，将其悬浮于新鲜培养液中，在室温下行 ^{60}Coγ 射线照射，平均剂量率为 62.89cGy/min，按实验要求给予照射剂量(0Gy、2Gy、4Gy、6Gy)。

1.6 集落形成试验

照射后立刻制成单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^3 个/ml，以每孔 300μl 接种于 6 孔板上(设 2 个复孔)，7～14 d 后，终止培养，细胞固定、染色。在显微镜下计数含有≥50 个细胞的集落，计算集落形成率。重复实验 3 次，取 3 次实验结果做统计学处理。

集落形成率 = 计数集落形成数 /300×100%

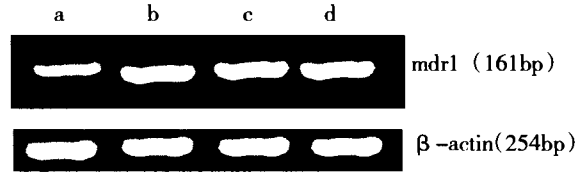
集落形成率下降率 =(脂质体集落形成率－实验组集落形成率)/脂质体集落形成率×100%

1.7 免疫组织化学法测定 MGMT 蛋白的表达

取照射前和 2Gy 照射后各组细胞涂片，进行 SP 法免疫细胞化学染色。鼠抗人 MGMT(MT311)单抗(Neomarkers 公司)使用浓度为 1∶100。结果判定：采用双人双盲法用显微镜观察，以细胞核黄色或棕黄色为阳性标记。随机选择 10 个视野，高倍镜下观察 500~800 个细胞，计数阳性细胞。表达强度标准如下：阴性(-)：没有阳性细胞；弱阳性(+)：阳性细胞数占所观察细胞数的 20%以下；中等强度(++)：阳性细胞数占所观察细胞数的 20%~50%；强阳性(+++)：阳性细胞数占所观察细胞数的 50%以上。

1.8 统计学处理

用 SPSS 10.0 for windows 统计软件处理。检测数据以均数±标准差 $\bar{x}\pm s$ 表示，计数资料采用 χ^2 检验，计量资料采用 t 检验，$P<0.05$ 则表示有显著差异性，$P<0.01$ 表示有极显著差异性。



a. mdr1 ASODN 组；b. mdr1 SODN 组；c. 脂质体组；d. 空白组

图 1 MDR1 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测转染 mdr1 寡核苷酸前后 CNE 的 mdr1 表达

见图 1。由图 1 可见，空白组、脂质体组、正义寡核苷酸组 mdr1基因的表达变化不明显。转染反义寡核苷酸后，CNE 细胞 mdr1基因的表达较对照组明显减弱。半定量分析显示，其转录水平仅为空白组的 50%。

2.2 集落形成试验结果及集落形成下降率的比较

由表 2 可见照射前，脂质体组、正义和反义寡

表 1 CNE 细胞经 ^{60}Coγ 射线照射后的集落形成率(%，$\bar{x}\pm s$)

组 别	0Gy	2Gy	4Gy	6Gy
空白组	83.86±3.89	64.78±3.18	46.77±3.12	33.47±2.17
脂质体组	82.79±3.53	63.82±3.25*	46.12±2.68*	32.78±3.23*
正义寡核苷酸组	81.78±2.84*	63.17±3.42*	45.68±3.34*	32.21±1.98*
反义寡核苷酸组	77.37±2.75*	49.36±2.74△	31.12±2.49△	17.55±1.82△

* 和空白组比较，$P>0.05$；△和空白组、脂质体组及正义寡核苷酸组比较，$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 转染反义寡核苷酸组和照射组及转染反义寡核苷酸后照射的集落形成下降率的比较

组 别	集落形成下降率(%, $\bar{x} \pm s$)			
	0Gy	2Gy	4Gy	6Gy
单独转染反义寡核苷酸组	6.45 ± 1.93	–	–	–
单独照射组	–	19.02 ± 2.56	36.89 ± 2.67	50.37 ± 3.12
转染反义寡核苷酸后照射组	–	35.51 ± 2.84	52.25 ± 2.42	66.35 ± 2.98

表 3 实验各组 MGMT 蛋白阳性率(%, $\bar{x} \pm s$)

	照射前		2Gy 照射后	
组别	阳性强度	阳性率%	阳性强度	阳性率%
空白组	++ ~ +++	61.3 ± 2.34	++ ~ +++	62.2 ± 2.23
脂质体组	++ ~ +++	60.2 ± 2.25*	++ ~ +++	61.8 ± 2.54*
正义寡核苷酸组	++ ~ +++	58.9 ± 1.97*	++ ~ +++	60.5 ± 2.48*
反义寡核苷酸组	++ ~ +++	55.7 ± 2.68*	+ ~ +++	30.9 ± 1.95△

* 和空白组比较，$P>0.05$；△和空白组、脂质体组及正义寡核苷酸组比较，$P<0.05$

核苷酸组的形成率都较空白组有所下降，但无统计学显著性差异($P>0.05$)；但照射后，转染 mdr1反义寡核苷酸组集落形成率明显下降，与对照组比较有统计学显著性差异($P<0.05$)，而且由表 3 可见其集落形成下降率大于单独转染反义寡核苷酸组与单独照射组集落形成下降率之和(2Gy：35.51＞19.02+6.45；4Gy：52.25＞36.89+6.45；66.35＞50.37+6.45)，因此转染 mdr1反义寡核苷酸对鼻咽癌 CNE 细胞具有辐射增敏作用。

2.3 免疫组织化学法测定 MGMT 蛋白的表达

MGMT 阳性表达主要位于细胞核和部分细胞浆。由上表可见照射前后空白组、脂质体组和正义寡核苷酸组 MGMT 蛋白的表达变化不大；各组细胞照射后，mdr1 反义寡核苷酸组肿瘤细胞 MGMT 表达明显下调，与其它各组比较皆有统计学显著性差异($P<0.05$)。

3 讨 论

鼻咽癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，据 WHO 估算，全世界 80%以上的病例发生在中国。由于鼻咽腔周围解剖关系复杂、手术对病人容貌的破坏以及周围组织对射线的耐受性尚可等因素决定了放射治疗是治疗鼻咽癌的重要手段。鼻咽癌综合治疗后 5 年生存率高达 50%以上，而放射性颌骨炎、骨坏死、放射性脑脊髓病和放射后张口困难等放疗副反应，严重影响了患者的生存质量。因此研究鼻咽癌的辐射增敏一直是放射肿瘤学者关注和研究的课题。

MDR 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时，对结构和作用机制完全不同的抗肿瘤药物产生交叉耐药性。由 mdr1基因编码的分子量为 170ku 的磷酸糖蛋白 P-gp，它的过度表达是产生多药耐药的重要机制。目前国内外研究较多的是 mdr1基因或 P-gp 与化疗的关系[1-3]。通过检测治疗前 mdr1基因的表达，可预测患者的预后和肿瘤化疗的疗效[4]。研究表明抑制 mdr1基因或 P-gp 能有效提高恶性肿瘤化疗的疗效[5]。肿瘤细胞对放疗和化疗的反应性存在某些关联，一般而言，对化疗不敏感的肿瘤细胞对放疗也不甚敏感。那mdr1基因与放疗的关系呢？Zubova SG 等报道转染 mdr1基因的 K-562 细胞对放疗具有抵抗性[6]。Maier P 等[7]用基因芯片技术发现：mdr1 基因过度表达可导致肿瘤细胞辐射抗拒相关蛋白如 ALDH1A，UNC13 增加，前凋亡蛋白 CASP1，NALP7 下调，而抗凋亡基因 AKT3 过度表达。众多实验结果说明：mdr1 基因的过度表达可抑制肿瘤细胞的凋亡和引起辐射抵抗。本研究利用反义技术抑制 mdr1基因，使其在鼻咽癌细胞中的基因表达率下降近 50%。抑制 mdr1基因后，受照鼻咽癌细胞集落形成率较正义寡核苷酸组及单纯照射组明显下降，而且其下降率大于单独转染 mdr1反义寡核苷酸组与单独照射组集落形成下降率之和，提示转染

维普资讯 http://www.cqvip.com

mdr1 反义寡苷酸对鼻咽癌 CNE 细胞具有辐射增敏作用,降低了肿瘤细胞的辐射抗性。

本实验同时使用免疫组织化学测定各组 MGMT 蛋白。受照射后 mdr1 反义寡核苷酸组肿瘤细胞的 MGMT 蛋白阳性率为 30.9%,而脂质体组和mdr1 正义寡核苷酸组分别为 61.8%、60.5%,表明抑制 mdr1 后,肿瘤细胞的 MGMT 蛋白的表达明显低于其它各组。MGMT 基因位于染色体 10q26 上,基因组 DNA 全长 170kb,含有 5 个外显子,编码207 个氨基酸的蛋白质,分子量约 22ku。MGMT 是机体一种非常重要的修复蛋白,在维持整个基因组的稳定性、预防肿瘤发生中起重要作用。MGMT 主要修复由烷化剂、电离辐射等诱变剂造成的 DNA 损伤[8]。有研究表明 DNA 链的断裂是诱导 MGMT 表达的最终信号,电离和紫外线辐射可以诱导 MGMT 的表达。MGMT 蛋白可作为肿瘤预后预测因子和治疗靶点[9]。国外学者研究表明使用替莫唑胺(Temozolomide)来抑制 MGMT 可以增加脑胶质瘤的放疗疗效[10]。本实验结果表明抑制 mdr1 后,肿瘤细胞的 MGMT 蛋白的表达明显低于其它各组,提示抑制 mdr1 基因后照射细胞存活率下降与 MGMT 基因表达下调有关。因为 MGMT 基因表达下调使照射后细胞的损伤修复减少,从而抑制了肿瘤细胞的增殖。

深入研究抑制 mdr1 后使肿瘤放射增敏机制可能对肿瘤治疗带来突破性进展,因其能为有关 mdr1 在化疗领域的最新成果运用于肿瘤的放射治疗或放化疗综合治疗领域提供实验室基础,由于放射增敏机制可能还涉及细胞周期、放射损伤修复、辐射信号转导等还多方面,我们将会进行进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Saeki T,Tsuruo T,Sato W,et al. Drug resistance in chemotherapy for breast cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2005;56(Suppl 7):84-89.

[2] 王萍玲,胡丽娜,邓凯贤,等. RNA 干扰沉默 mdrl 基因联合阿霉素对卵巢癌耐药细胞株 SKOV_3/ADM 增殖的抑制作用[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(2):232-235.

[3] Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy[J]. Med Princ Pract,2005;14 (Suppl 1):35-48.

[4] Lu L,Katsaros D,Wiley A,et al. Expression of MDR1 in epithelial ovarian cancer and its association with disease progression [J].Oncol Res,2007;16(8):395-403.

[5] Gao P,Zhou GY,Guo LL,et al. Reversal of drug resistance in breast carcinoma cells by anti-mdr1 ribozyme regulated by the tumor-specific MUC-1 promoter[J]. Cancer Lett,2007;256(1):81-89.

[6] Zubova SG,Danilov AO,Myshkov AI,et al. The MDR gene and cellular sensitivity to various effects[J]. Vopr Onkol,2000;46(2):199-201.

[7] Maier P,Fleckenstein K,Li L,et al. Overexpression of MDR1 using a retroviral vector differentially regulates genes involved in detoxification and apoptosis and confers radioprotection[J]. Radiat Res,2006;166(3):463-473.

[8] Kaina B,Christmann M,Naumann S,et al. MGMT:key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents[J]. DNA Repair(Amst),2007;6(8):1079-1099.

[9] Madhusudan S,Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive,prognostic and therapeutic targets in cancer[J]. Cancer Treat Rev,2005;31(8):603-617.

[10] Chakravarti A,Erkkinen MG,Nestler U,et al.Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma:a report on underlying mechanisms[J]. Clin Cancer Res,2006;12(15):4738-4746.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 711 页)

[8] 潘中允.临床核医学[M].北京:原子能出版社,1994.134-135.

[9] Michel C,Carol E B,George A T,et al.Renal blood flow in pigs:changes depicted with contrastenhanced harmonic US imaging during acute urinay obstruction[J]. Radiology,1999;212(3):725-731.

[10] Hancock J,Dittrich H,Jewitt DE,et al. Evaluation of myocardial. hepatic and renal perfusion in a variety of clinical conditions using an intravenous ultrasound contrast agent(optison) and second harmonic imaging[J]. Heart,1999;81(6):636-641.

[11] George AT,Carol EB,Michel Claudon,et al.Depiction of renal perfusion defects with contrast-enhanced harmonic sonography in a porcine model[J]. AJR,1999;173(3):757-760.

[12] Chandra MS,Peter HA,Anthony CS,et al. Renal blood flow changes induced with endothelin and fenoldopam messy-late at quantitative doppler US:initial results in a canine study[J]. Radiology,2001;219(2):419-426.

[13] Hsiet J.Investigation of the slice sensitivity profile for step-and shoot mode multislice computed tomography[J]. Med Phys,2001;28(5):491-500.

[14] Roberts HC,Roberts TP,Smith WS,et al. Multisection dynamic CT perfusion for acute Cerebral ischemia:the "toggling-table"technique[J]. AJNR,2001;22(3):1077-1080.

[15] Klotz E,Konig M.Perfusion measurements of the brain:using dynamic CT for the quantitative assessment on cerebral ischemia in acute stroke[J]. Eur J Radiol,1999;30(8):170-184.

(责任编辑:关蕴良)