维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2008)06-0686-05

MDR1/MRP 反义寡核苷酸逆转胃癌细胞耐药的研究

李 玲,徐 曼,石 群

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 MDR1/MRP 反义寡脱氧核苷酸(Antisense oligodooxynucleotide,ASODN)片段逆转人胃腺癌耐药细胞 SGC7901/ADM 多药耐药(Multidrugresistance,MDR)的作用。方法:经 MDR1 或多药耐药相关蛋白(Multidrugresistance-asscociated protein,MRP)ASODN 分别或联合转染 SGC7901/ADM 细胞后,采用 RT-PCR 法检测 MDR1mRNA 和 MRPmRNA 的表达,免疫细胞化学检测 SGC7901/ADM 细胞内 p- 糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)、MRP 的表达,流式细胞术检测瘤细胞内 Rh123 的潴留状况,MTT 法检测瘤细胞对阿霉素、卡铂等抗癌药的敏感性。结果:SGC7901/ADM 细胞经 ASODN 转染 12h 后,MDR1 和 MRP mRNA 的表达均降低,转染 24h 后下降最明显,48h 后恢复至转染前水平。经转染 ASODN48h 后,SGC7901/ADM 细胞 P-gp、MRP 的表达显著下降,瘤细胞内 Rh123 的潴留量显著高于转染前,且联合转染 MDR1 和 MRP ASODN 后瘤细胞内 Rh123 的潴留量显著高于单纯转染组。SGC7901/ADM 细胞在联合转染 MDR1 和 MRP ASODN 后对阿霉素、卡铂等化疗药物的敏感性明显高于单纯转染 ASODN。结论:分别转染 MDR1 或 MRP ASODN 可部分逆转人胃腺癌耐药细胞 SGC7901/ADM 多药耐药,而联合转染 2 种 ASODN 则可显著提高瘤细胞耐药逆转效率。

【关键词】反义寡核苷酸;胃癌细胞;逆转效率;多药耐药

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-22

Study on the reversal effect of MDR1 and MRP ASODN on drug-resistance gastric carcinoma cells

LI Ling,et al

(*Department of Pathology,College of Basic Medicine,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the reversal effect of MDR1 and MRP antisense oligodooxynucleotide (ASODN) on adriamycin-resistant SGC7901/ADM cells. *Methods*:SGC7901/ADM cells were transfected by MDR1 or MRP ASODNs or the combination of two. Then the mRNA expressions of proteins MDR1 and MRP were checked by RT-PCR,and the expressions of P-gp and MRP by immunocytochemistry;the intracellular fluorescence intensity of Rhodamine 123 in these cells were determined by flow cytometry;and the sensitivity of these cells to adriamycin,carboplatin and other anticancer drugs were determined by MTT assay. *Results*:The expression of MDR1mRNA and MRP mRNA in SGC7901/ADM cells decreased at 12h after transfection of ASODNs,decreased to the lowest level at 24h and returned to the level before transfection after 48h. The expression of P-gp and MRP decreased significantly at 48h after transfection with ASODNs compared with the control cells. The retention of Rhodamine 123 in SGC7901/ADM cells was significantly higher than that before transfection, and the intracellular fluorescence intensity significantly increased in ASODNs cotransfection SGC7901/ADM cells, compared with those transfected by MDR1 or MRP ASODNs respectively;In addition,the sensitivity of SGC7901/ADM cells to adriamycin, carboplatin and other anticancer drugs obviously increased after cotransfection of MDR1 and MRP ASODNs compared with transfection of MDR1 or MRP ASODN respectively. *Conclusion*:The transfection of MDR1 or MRP ASODN can partly reverse the multidrug resistance of gastric glandular carcinoma cells SGC7901/ADM,while cotransfection of MDR1 and MRP ASODNs can significantly reverse drug-resistance of these tumor cells.

【Key words】Antisense oligodooxynucleotide(ASODN);Gastric carcinoma cells;Reversal effect;Multidrug resistance

作者介绍:李 玲(1978-),女,硕士,
研究方向:胃肠道肿瘤。

通讯作者:徐 曼,女,副教授,E-mail:manxucqmu@yahoo.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

多数胃癌患者确诊时已为晚期,化疗常作为主要治疗手段,但由于瘤细胞产生 MDR,使抗癌药的疗效不佳。近年来的研究证实癌细胞产生 MDR 与 P-gp,MRP 的高表达密切相关[1],人的胃癌细胞也普遍存在 MDR1 和 MRP 基因和蛋白质高表达的现象[2~5]。我们设计了针对MDR1mRNA、MRPmRNA 翻译起始区的反义寡脱氧核苷酸序列并进行硫代化修饰,经脂质体包裹后转染高表达 MDR1 和 MRP 的耐药胃癌细胞 SGC7901/ADM,分别从该细胞 MDR1 和 MRPmRNA 及蛋白质的表达水平、细胞内 Rh123 潴留状况以及瘤细胞对化疗药物敏感性的改变等方面,检测 MDR1 或 MRP ASODN 逆转瘤细胞多药耐药的效果。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

SGC7901/ADM(由重医病理学教研室提供,耐阿霉素浓度为 0.3μg/ml) 于含 10%小牛血清及青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养基中,37℃、5%CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

1.2 硫代磷酸寡核苷酸(SODNs)的合成及脂质体包裹

MDR1 SODN 序列为 5'-CCATCCCGACCTCGCGCTCC-3',对照的正义 SODN 序列为 5'-GGAGCGCGAGGTCGGGATGG-3'[6];MRP 的 SODN 序列为 5'-TGCTGTTCGTGCCCC-CCGCCG-3',对照的正义 SODN 序列为 5'-CGGCGGGGGCACGAACAGCA-3'[7],均已硫代磷酸化。

ODN/LF 复合物的制备:将 10μl 的脂质体 2000(Invitrogen 公司)和 240μl 转染液(未加血清及抗生素的 RPMI1640)混匀后,再将 0.1μg/μl 浓度的寡核苷酸(μg)与脂质体 2 000 溶液(μl)以 1:2.5 的比例轻轻混匀,室温下静置 30min。

转染前 2 周将 SGC7901/ADM 在无 ADM 的 RPMI1640 的培养液中培养,将生长状态良好的对数生长期细胞接种至 24 孔板、96 孔板和 25ml 培养瓶中培养。第 2d 待细胞达到 90%融合时培养液更换为转染液,将制备好的 ODN/LF 复合物加入各培养皿,37℃孵育 5h,滴加血清终止转染,继续孵育,实验备用。

1.3 转染 ASODN 后瘤细胞 MDR1 或 MRP mRNA 的表达

分别在转染 MDR1 和 MRP 的 ASODN 后 12h、24h 及 48h 收集细胞,用 TRIzol 试剂提取总 RNA。MRP、MDR1 引物分别由上海生工和上海鼎安科技有限公司合成,序列如下:MDR1(482bp)F 5'-TGCTCTGGCCTTCTGGTATG-3',R 5'-CACCAATGATTTCCCGTAGA-3',MRP(241bp)F 5'-CTGCCTCTTCAGAATCTTAG-3',R 5'-CCCAAGTTGCAGGCTGGCC-3',β-actin(381bp)F 5'-CACACTGTGCCCATCTACGA-3'R 5'-TACAGGTCTTTGCGGATGTC-3'。

经逆转录后行 PCR 扩增,以 β-actin 作为内参照。扩增 MDR1 片段反应条件为:94℃4min,94℃45s、52℃35s、72℃40s,40 循环后,72℃延伸 5min;扩增 MRP 片段反应条件为:94℃ 4min,94℃ 45s,55℃ 45s,72℃ 30s,33 循环后,72℃延伸 5min。电泳结果用 Quantity One 分析系统进行电泳条带光密度分析,计算 MDR1 及 MRP 产物与 β-actin 产物的光密度积分比例,判断 MDR1mRNA、MRP mRNA 相对表达水平。

1.4 P-gp 及 MRP 的表达

以 1:2.5 ASODN/LF 转染 SGC7901/ADM 细胞 48h 后,进行免疫细胞化学 SP 染色,阳性表达位于细胞浆及胞膜。

1.5 细胞内诺丹明荧光强度检测

收集生长状态良好的 SGC7901/ADM 细胞及转染 ASODN 24h、48h 和 72h 的 SGC7901/ADM 细胞各 1×10^6 个,PBS 洗 2 次,重悬于 150ng/ml 诺丹明 123 的无血清培养液中,37℃、5%CO_2 孵箱中孵育 30min,PBS 洗 2 次;加入 1ml 含 100%小牛血清的培养液中继续培养 1h 后进行流式细胞术检测,同时以 SGC7901 细胞为对照。

1.6 转染反义寡核苷酸后瘤细胞对化疗药物的敏感性

实验设空白对照组、脂质体组、正义寡核苷酸组(1:2.5 SODN/LF)、反义寡核苷酸组(分为 MDR1/ASODN/LF、MRP/ASODN/LF 和 MDR1/ASODN/LF+MRP/ASODN/LF3 组)。以 1:2.5 ASODN/LF 或 SOND/LF 转染 48h 后,分别检测化疗药物 ADM、紫杉醇、卡铂和 5-FU 对 SGC7901/ADM 细胞抑制率的变化。以空白组吸光度值 A 调零,以不含药物组作对照,抑制率=1-实验孔 A/对照孔 A×100%。

1.7 统计学处理

所有数据均使用 SPSS12.0 软件包进行统计学分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验和单因素方差分析(one way ANOVA)。

2 结 果

2.1 转染前后 SGC7901/ADM 细胞 MDR1mRNA 和

表 1 转染 ASODN/LF 后 MDR1mRNA、MRPmRNA 的相对表达值($\bar{x}\pm s$,n=3)

	空白对照组	12h	24h	48h
MDR-1mRNA	1.61±0.98	1.12±0.97	0.56±0.04[a]	1.68±0.42
MRPmRNA	3.21±0.16	2.59±0.43	1.53±0.06[b]	3.09±0.08

与空白对照组比较,[a]$P<0.05$,[b]$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

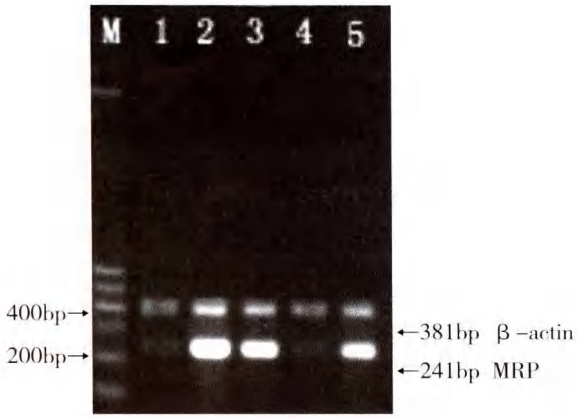


图 1 RT-PCR 检测转染 MRP/ASODN 后 MRPmRNA 的表达

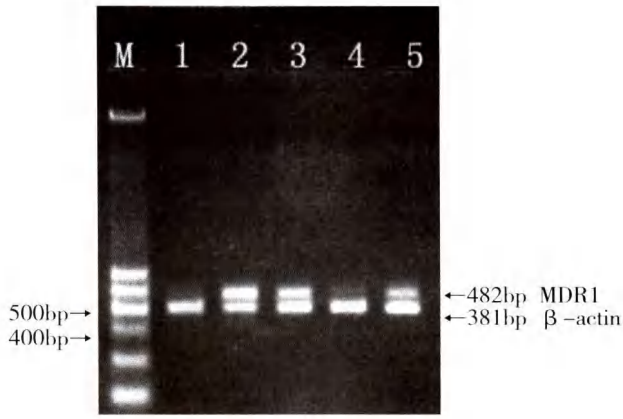


图 2 RT-PCR 检测转染 MDR1/ASODN 后 MDR1mRNA 的表达

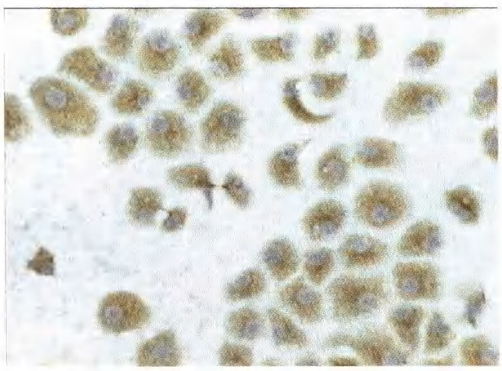


图 3 P-gp 在 SGC7901/ADM 细胞强阳性表达,S-P ×400

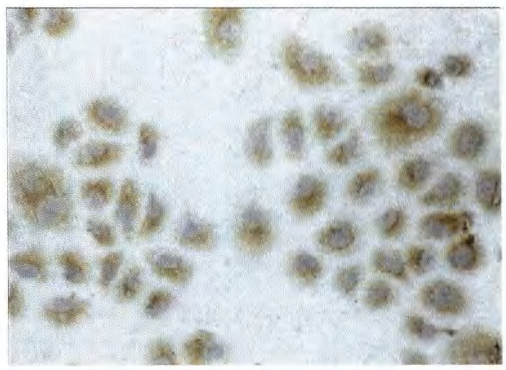


图 4 MRP 在 SGC7901/ADM 细胞强阳性表达,S-P ×400

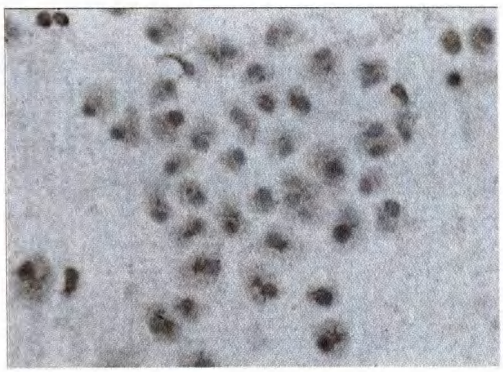


图 5 MDR1/ASODN 转染 48h,SGC7901/ADM 细胞 P-gp 染色减弱,S-P×200

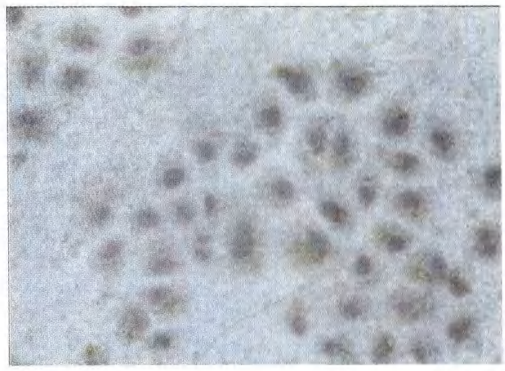


图 6 MRP/ASODN 转染 48h,SGC7901/ADM 细胞 MRP 染色减弱,S-P×400

MRP mRNA 的表达(见表 1,图 1、2)

2.2 转染前后 P-gp 及 MRP 的表达

免疫细胞化学染色显示 SGC7901/ADM 细胞经 ASODN 转染 48h 后,P-gp 及 MRP 的表达较转染前明显减弱(见图 3~6)。

2.3 细胞内 Rh123 荧光强度

ASODN 转染后 24h,SGC7901/ADM 细胞内 Rh123 与转染前相比无明显变化;当转染后 48h 和 72h,细胞内 Rh123 平均荧光强度明显增加。其中 MDR1+MRP/ASODN 联合转染 48h 和 72h,细胞内 Rh123 平均荧光强度显著高于单纯转染 MDR1/ASODN 或 MRP/ASODN(表 2)。

2.4 转染后细胞对化疗药物的敏感性

经 1:2.5ASODN/LF 转染 48h 后SGC7901/ADM

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 ASODN 转染后 SGC7901/ADM 细胞内 Rhodamin123 平均荧光强度

细胞株	Rhodamin123 平均荧光强度			
	0h(空白对照)	24h	48h	72h
MDR1/ASODN	95.66	96.04	112.01	130.89
MRP/ASODN	95.66	96.11	103.46	120.35
MDR1+MRP/ASODN	95.66	93.78	118.82	155.58

表 3 化疗药物对转染后 SGC7901/ADM 的生长抑制率(%) ($\bar{x} \pm s$, n=3)

细胞株	卡铂	5- 氟尿嘧啶	紫杉醇
MDR-1+MRP /ASODN	80.39 ± 2.44[cd]	72.40 ± 1.26[cd]	87.16 ± 1.49[cd]
MDR-1/ASODN	66.32 ± 2.98[a]	56.27 ± 1.34[a]	62.79 ± 0.57[a]
MRP/ASODN	48.63 ± 1.82[b]	55.11 ± 0.18[b]	51.90 ± 0.61[b]
MDR-1/SODN	22.93 ± 0.91	43.32 ± 1.45	34.12 ± 1.88
MRP/ SODN	27.95 ± 0.48	32.15 ± 0.85	17.33 ± 0.62
blank control	27.80 ± 0.29	30.01 ± 0.25	15.81 ± 0.74
lipofectamine group	26.82 ± 0.43	32.00 ± 0.16	18.52 ± 0.21

与 MDR-1/SODN 组比较 [a]$P < 0.05$;与 MRP/SODN 组比较 [b]$P < 0.05$;与 MDR-1/ASODN 组比较 [c]$P < 0.05$;与 MRP/ASODN 组比较 [d]$P < 0.05$

细胞对阿霉素的敏感性增强,转染前 IC_{50} 为 16.82 μg/ml,单纯转染或联合转染组瘤细胞 IC_{50} 均明显降低,MDR1/ASODN 组和 MRP/ASODN 组 IC_{50} 分别为 2.66 μg/ml 和 2.91 μg/ml, 联合转染组 IC_{50} 为 2.34 μg/ml, 各单纯转染组或联合转染组与转染前瘤细胞的 IC_{50} 均存在明显差别。

ASODN/LF 转染 SGC7901/ADM 细胞后,瘤细胞对卡铂、5- 氟尿嘧啶、紫杉醇 3 种抗癌药物的敏感性明显高于 SODN/LF 转染组([a]$P < 0.05$, [b]$P < 0.05$);MDR-1+MRP/ASODN 联合转染较单纯MDR-1 或 MRP ASODN 转染组瘤细胞对抗癌药物的敏感性显著提高([c]$P < 0.05$, [d]$P < 0.05$)。结果见表 3。

3 讨 论

肿瘤细胞耐药的机制包括多个方面,如细胞内药物的隔离外排、药物靶分子的改变、代谢解毒、细胞凋亡调节失控等,但瘤细胞膜上转运蛋白,P-gp、MRP 等的过表达导致的抗癌药外排是瘤细胞多药耐药的重要原因[8,9]。

人类多药耐药基因 MDRl 基因编码产物 P-gp 是细胞膜上的一种药物泵,能在 ATP 参与下将药物单向转运出细胞,从而降低药物对癌细胞的毒性作用;同时还可直接结合化疗药物,使药物无法进入细胞发挥作用[1]。

MRP 基因产物 MRP1 在 ATP 的参与下,通过识别和转运与谷胱甘肽(GSH)耦合的底物(如阿霉素、长春新碱、鬼臼乙叉甙等),使瘤细胞内药物浓度降低或分布改变[10]。

本实验利用 MDR1 和 MRP mRNA 翻译起始区的反义寡脱氧核苷酸,经硫代化修饰和脂质体包裹后转染高表达 MDR1 和 MRP 的耐药细胞 SGC7901/ADM。RT-PCR 结果显示 MDR1 和 MRP 两种 ASODN 分别转染 SGC7901/ADM 后均能明显降低 MDR-1mRNA、MRP mRNA 的表达。在转染 ASODN 12h 后,瘤细胞的 MDR1 和 MRP mRNA 水平开始降低,24h 降至最低,但 48h 后 mRNA 水平基本恢复到转染前水平。提示 ASODN 转染可短期下调 SGC7901/ADM 细胞 MDR1 和 MRP mRNA 的水平,但ASODN 的作用是短暂而可逆的,这可能与ASODN 在细胞内的稳定性和浓度改变有关,因为 ASODN 进入瘤细胞后可能被核酸酶(RnaseH)降解,或通过其他机制使其细胞内浓度下降[11]。因此,如何有效的增强 ASODN 在细胞内的稳定性并维持有效浓度还有待进一步深入研究。

免疫细胞化学结果也证实 ASODN 转染 SGC7901/

维普资讯 http://www.cqvip.com

ADM 48h 后，瘤细胞表达 P-gp、MRP 较转染前明显减弱，偶见部分细胞呈阴性表达。FCM 检测结果显示 SGC7901/ADM 细胞在 ASODN 转染前对 Rhodamine123 具有很强的泵出功能，细胞内潴留量很少；但 ASODN 转染后 48h 瘤细胞内 Rhodamine123 潴留量明显增多，间接反映了瘤细胞对药物的泵出能力下降。

在 MDR1 和 MRP 2 种 ASODN 分别转染 SGC 7901/ADM 细胞 48h 后，阿霉素对瘤细胞的抑制作用明显增强，且 SGC7901/ADM 细胞对卡铂、紫杉醇、5-Fu 等化疗药物的敏感性也有所提高；2 种 ASODN 联合转染后，SGC7901/ADM 细胞对卡铂、紫杉醇等化疗药物的敏感性显著提高；提示联合转染两种 ASODN 后 SGC7901/ADM 细胞内药物的蓄积明显增加，从而发挥更强的细胞毒作用。罗华友等的实验结果也证实联合抑制 MDR1 和 MRP 基因能更有效地逆转肝癌耐药细胞的耐药表型，癌细胞对阿霉素和柔红霉素的敏感性提高了 47.8 和 21.6 倍[12]。

本实验结果证实 MDR1 和 MRPASODN 可抑制其基因的表达，从而降低 P-gp 和 MRP1 蛋白水平，有效逆转了 SGC7901/ADM 细胞的耐药表型，联合转染 2 种 ASODN 较单纯转染明显提高了瘤细胞的耐药逆转效率。肿瘤的耐药与多个耐药基因高表达有关，因此同时抑制多个基因能发挥更大的耐药逆转作用，本实验的结果也充分证实了基因联合治疗的有效性。

参 考 文 献

[1] Chen CJ,Clark D,Ueda K,et al. Genomic organization of the human multidrug resistance (mdr1)gene and origin of P-glycoprotein [J]. J Biol Chem,1990;265(1):506-514.

[2] 张 威，邹寿椿，赵大健，等.多药耐药相关基因在胃癌组织中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志，2002;8(2):76-78.

[3] 王延明，王爱民，王文杰，等.胃癌组织中多药耐药相关蛋白基因表达的临床意义[J]. 临床军医杂志，2002;30(4):1-3.

[4] Ramesh S,Shanthi P,Krishnan KB,et al. Multidrug resistance 1 gene expression in Indian patients with gastric carcinoma[J]. Indian J Gastroenterol,2003;22(1):19-21.

[5] 张 燕，金先庆，赵珍珍，等. 5 种耐药基因在成人常见恶性肿瘤中的表达特点[J]. 重庆医科大学学报，2007;32(10):1023-1026.

[6] Alahari SK,Dean HM,Fisher MH,et al. Inhibition of expression of the multidrug resistance associated P-glycoprotein of by phosphorothioate and 5'cholesterol-conjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides[J]. Mol Pharmacol,1996;50(4):808-819.

[7] Stewart AJ,Canitrot Y,Banacchini E,et al. Reduction of expression of the multidrug resistance protein(MRP) in human tumor cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides[J]. Biochem Pharm,1996,51(4):461-469.

[8] 徐志渊，李德锐.肿瘤化疗多药耐药研究新进展[J]. 中国肿瘤，2006;15(6):382-385.

[9] 马 华，梅 峰，马千里，等.RegⅣ在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报，2006;28(5):441-443.

[10] O'Connor R. The pharmacology of cancer resistance[J]. Anticancer Res,2007;27(3A):1267-1272.

[11] Dexter DW,Reddy RK,Geles KG,et al. Quantitative reverse transcript-.tasepolymerase chain reaction measured expression of MDR1 and MRP in primary breast carcinoma[J]. Clin Cancer Res,1998;4(6):1533-1542.

[12] 罗华友，扬家印，刘自明，等. 多药耐药基因反义寡核苷酸逆转肝癌细胞耐药的研究[J]. 中华肝脏病杂志，2004;12(2):85-87.

(责任编辑：关蕴良)

(上接第 685 页)

[1] 陶 蓉，陆 林，沈卫峰，等. TL 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 上海第二医科大学学报，2005;25(8):780-783.

[2] 李 玫，吴宗贵，陈金明，等. 雷公藤甲素诱导大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国药理学通报，2000;16(1):49-51.

[3] 王宇令，刘 源，孙 威，等.自体静脉移植术后血管平滑肌细胞凋亡与增殖的研究[J]. 中国现代医学杂志，2005;15(6):822-824.

[4] 岗艳云，张正行.雷公藤及其单体的药理作用研究进展[J]. 中国药科大学学报，1995;26(4):252-256.

[5] Hachida M,Lu H,Zhang X,et al. Inhibitory effect of triptolide on platelet derived growth factor-A and coronary arteriosclerosis after heart transplantation[J]. Transplant Proc,1999;31(7):2719-2723.

[6] 陆东风，刘 威，李昭骥.TL 对大鼠血管平滑肌细胞的增殖及 DNA 合成的影响[J]. 岭南心血管病杂志，2002;8(6):418-420.

[7] 李 玫，吴宗贵，潘晓明，等. 雷公藤甲素抑制大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的作用及机制[J]. 中华国际医学杂志，2001;1(4):297-300.

[8] 黄 璟，陆东风，吴 昊，等. TL 洗脱支架对冠状动脉支架内再狭窄的影响[J]. 岭南心血管病杂志，2006;12(4):298-300.

[9] Neschis DG,Sattord SD,Hanna AK,et al. Antisense basic fibroblast growth factor gene transfer reduces early intimal thickening in a rabbit femoral artery balloon injury model[J]. J Vasc Surg,1998;27(1):126-134.

[10] 杨 军，胡新华，刘程伟，等.转染反义 survivin 寡脱氧核苷酸对移植血管内膜增生的影响[J]. 中国普通外科杂志，2006;15(1):32-36.

[11] Hu Z,ZouY,Dietrieh H,et al. Inhibition of neointimal hyperplasia of a mouse vein graft by locally applied suramin[J]. Circulation,1999;100(8):861-868.

(责任编辑：冉明会)