维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0369-04

抗肿瘤药物与维拉帕米联合对 KBV200 细胞 P-糖蛋白表达的影响研究

陈鸿雁[1],王 驰[2],舒 艳[3],陈 燕[1],吕彩凤[1],余晓燕[1],沈 娜[1],张潜英[1],叶 玲[1],蒋纪恺[4]

(1. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科;2. 重庆医科大学基础医学院;
3. 重庆医科大学附属儿童医院耳鼻喉科;4. 汕头大学医学院;重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 6 种常用抗肿瘤药物长春新碱、阿霉素、平阳霉素、顺铂、5-Fu、环磷酰胺与维拉帕米联合对 KBV200 细胞 P-糖蛋白表达的影响。方法:以喉癌 KBV200 细胞株为研究对象,通过流式细胞术检测 6 种抗肿瘤药物作用 KBV200 细胞的 P-糖蛋白表达以及联合维拉帕米对 P-糖蛋白表达的影响。结果:维拉帕米分别与长春新碱、阿霉素、平阳霉素、环磷酰胺联合作用,使 KBV200 细胞的 P-糖蛋白表达下降 80.17%、89.69%、19.19 %及 53.48%。其中维拉帕米与长春新碱、阿霉素作用较强。结论:维拉帕米分别与长春新碱、阿霉素、平阳霉素、环磷酰胺联合作用后,P-糖蛋白的表达水平明显下降,对 KBV200 细胞耐药性的逆转有一定作用。

【关键词】KBV200 细胞株;多药耐药;耐药逆转;P 糖蛋白;维拉帕米
【中国图书分类法分类号】R73 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-07

Investigation of the effect of verapamil and chemotherapeutic agents on the P-glucoprotein of the KBV200 cell line

CHEN Hongyan,et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affilated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effect of verapamil and 6 chemotherapeutic agents vincristine,adriamycin,bleomycin,cyclophosphamide,5-Fu,cisplatin on the P-glucoprotein (P-gp) of the KBV200 cell line. *Methods*: Flow cytometer(FCM) assay was used to investigate the expression of P-gp on the KBV200 cell line in the different conditions. *Results*: Verapamil act with vincristine, adriamycin, pingyangmycin and cyclophosphamide separately decreased expression of P-gp on KBV200 cell line by 80.17%,89.69%,19.19% and 53.48% Among all the combinations, the synergistic effects of varapamil act with vincristine and adriamycine show a better effect. *Conclusion*: Verapamil act with vincristine, adriamycin, pingyangmycin and cyclophosphamide separately can decrease expression of P-gp on KBV200 cell line significantly, and can reverse the drug resistance of KBV200 cell line.

【Key words】KBV200 multidrug resistance cell line; Multidrug resistance; Reversion of multidrug resistance; P-gp; Verapamil

肿瘤细胞多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)的产生是肿瘤化学治疗失败的一个主要原因[1],故多药耐药是研究者普遍关注的焦点。P 糖蛋白(P-glucoprotein, P-gp)过度表达是产生多药耐药性的重要原因之一。目前人们正积极寻求能有效抑制 P-糖蛋白表达、毒副作用低的药物,以逆转肿瘤细胞的多药耐药性。本实验采用流式细胞术(Flow cytometry, FCM)检测维拉帕米(Verapamil, VRP)分别联合 6 种抗肿瘤药物作用于 KBV200 细胞后 P-糖蛋白的表达,了解维拉帕米对 KBV200 细胞的耐药逆转作用。

1 材料与方法

1.1 KBV200 细胞株

KBV200 细胞株由重庆医科大学检验系临床生化实验室提供。KBV200 细胞是以 KB 细胞为亲本,通过诱变剂甲基磺酸酯刺激,然后在培养液中加入浓度递增的长春新碱(Vincristine VCR)诱导而得,在 VCR 浓度为 200 nmol/L 时生长良好,故取名 KBV200。采用含 10%小牛血清、青霉素、链霉素

作者介绍:陈鸿雁(1963-),女,医学博士,副教授,主要研究方向:头颈部肿瘤研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

各 100 μ/ml 的 RPMI-1640 细胞培养液，在 37℃饱和湿度 5% CO_2 孵箱中常规培养，每 3～4 d 换液传代培养。实验前使用的 KBV200 细胞脱离 VCR 培养 3 个月。

1.2 药品与试剂

小牛血清（FBS）购自杭州四季青生物工程材料研究所，56℃加热 30 min 灭活，-20℃存放备用，临用前 37℃融化；RPMI-1640 培养液重蒸水配制，调节 pH 值为 7.2，过滤除菌，4℃保存备用；青链霉素用无菌生理盐水配制成为 1×10^5u/ml，-20℃存放，临用前由 RPMI-1640 培养液稀释成 100 u/ml；四甲基偶氮唑盐（MTT）购自北方同正生物制品公司；6 种抗肿瘤药物及维拉帕米均为国产。

鼠抗人 P- 糖蛋白荧光抗体由晶美生物工程有限公司提供。

磷酸缓冲液（PBS 0.1M，pH=7.4） 本实验室自备流式细胞仪 FACS Calibur Belton-dickson (BD) USA 重庆医科大学儿童医院检验中心提供。

1.3 流式细胞仪检测 P-糖蛋白表达

选用 KBV200 细胞（2×10^7/ml），加药 24 h 后，用胰酶消化，PBS 洗涤 2 次，加入 200 μl PBS 重悬细胞，取 100μl 细胞悬液加入鼠抗人 p-gp-PE（1∶50）20μl，阴性对照另取 100μl 悬液加入鼠抗人 -IgG2b-PE 20μl，混匀后静置于 4℃，避光 30min，用 PBS 洗涤去未结合单抗，400μl PBS 重悬细胞，上机检测。

1.4 抗肿瘤药物及浓度的选用

采用 MTT 实验检测 6 种抗肿瘤药对 KBV200 细胞的抑制作用，选用抑制作用较弱（即有耐药作用）的浓度点作为实验浓度（表 1），VRP 浓度为非 KBV200 细胞抑制剂量 12.5 μg/ml。

表 1 6 种抗肿瘤药物浓度

药物名称	浓度(μg/ml)
环磷酰胺	2.00
长春新碱	1.50
阿霉素	0.01
平阳霉素	7.50
5-氟尿嘧啶	15.00
顺铂	1.50

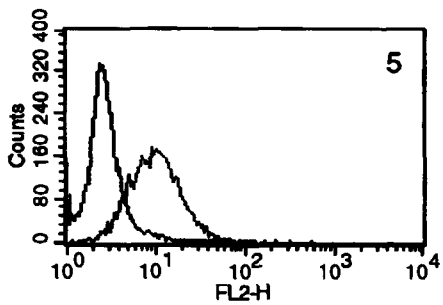


图 1 VCR

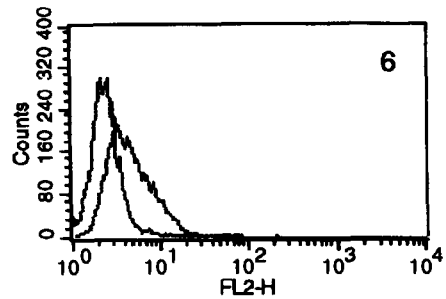


图 2 VRP+VCR

2 结 果

2.1 维拉帕米与长春新碱（Vincristine VCR）作用于 KBV200 细胞 P- 糖蛋白表达（图 1,2）

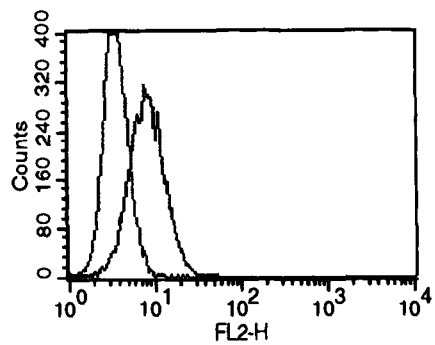


图 3 ADM

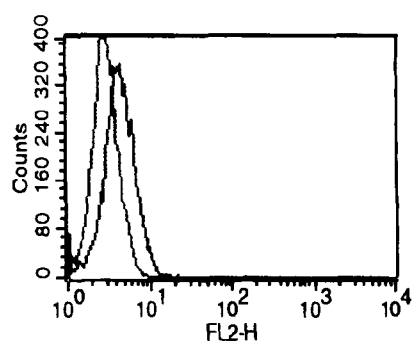


图 4 ADM+VRP

长春新碱作用于 KBV200 细胞 24h 后，P- 糖蛋白表达为 46.09%，加入 VRP 者，P- 糖蛋白表达率仅为 9.14%，曲线明显左移。

2.2 维拉帕米与阿霉素（Adriamycin ADM）作用于 KBV200 细胞株 P-糖蛋白的表达（图 3,4）

维拉帕米 + 阿霉素可使 KBV200 细胞表面 P-糖蛋白表达从 32.9%迅速下降到 3.31%。

2.3 维拉帕米与环磷酰胺（Cyclophosphamide CTX）作用于 KBV200 细胞 P-糖蛋白的表达（图 5,6）

维普资讯 http://www.cqvip.com

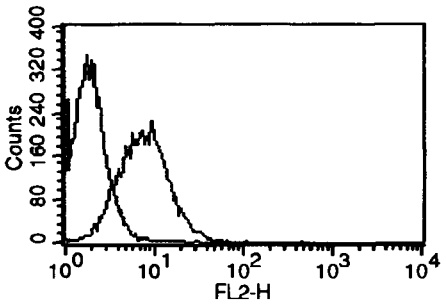


图 5 CTX

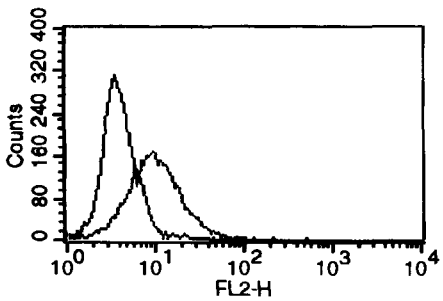


图 6 CTX+VRP

维拉帕米 + 环磷酰胺能使 P- 糖蛋白的表达率从 50.45%明显降低到 23.46%。

2.4 维拉帕米与平阳霉素(Pingyangmycin PYM)作用于 KBV200 细胞 P-糖蛋白的表达(图 7,8)

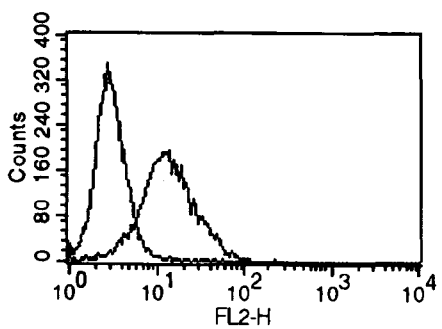


图 7 PYM

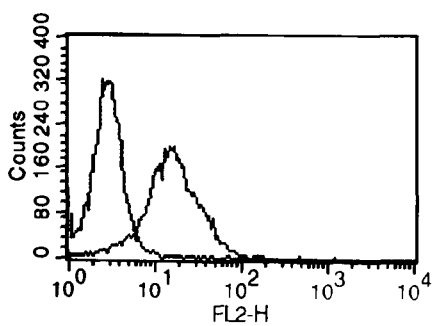


图 8 PYM+VRP

维拉帕米作用前后 P- 糖蛋白表达从 74.18%下降到 56.71%。

2.5 维拉帕米与 5-氟尿嘧啶（5-fluoro-2,4(1H,3H) pyrimidinedione 5-Fu)作用于 KBV200 细胞 P-糖蛋白表达(图 9,10)

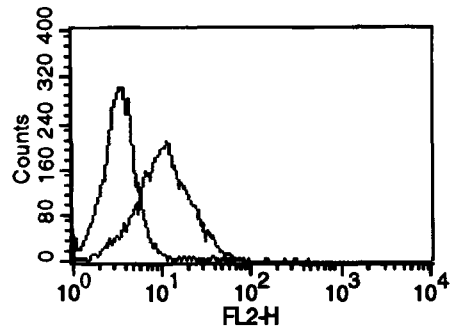


图 9 5-Fu

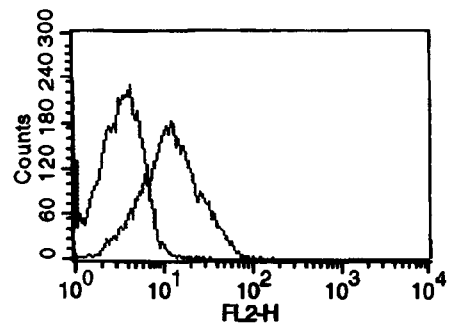


图 10 5-Fu+VRP

维拉帕米 +5- 氟尿嘧啶对 KBV200 细胞 P- 糖蛋白表达无明显改变。

2.6 维拉帕米与顺铂（Cisplatin DDP）作用于 KBV200 细胞 P-糖蛋白表达(图 11,12)

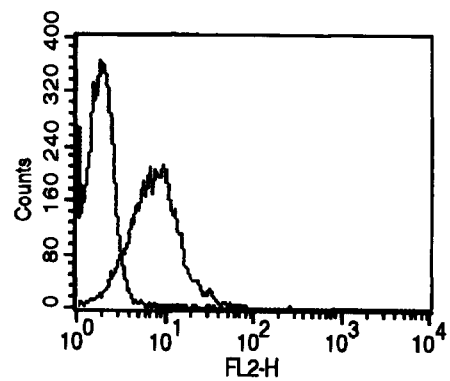


图 11 DDP

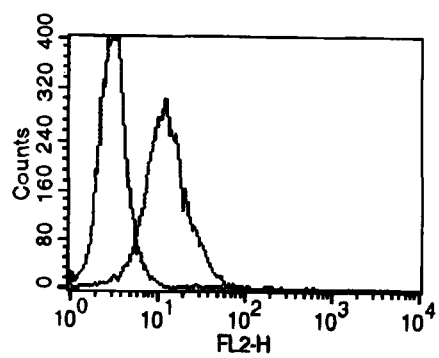


图 12 DDP+VRP

维普资讯 http://www.cqvip.com

维拉帕米 + 顺铂对 KBV200 细胞 P- 糖蛋白表达无明显改变。

2.7 6 种常用抗肿瘤药物与维拉帕米分别作用于 KBV200 细胞 P-糖蛋白的表达(表 2 及图 13)

表 2 P-糖蛋白表达(%)(脱离 VCR 未加任何药物培养 3 个月的 KBV200 细胞对照的 P-糖蛋白表达为 20.31%)

抗肿瘤药物	长春新碱	阿霉素	平阳霉素	5-氟尿嘧啶	环磷酰胺	顺铂
抗肿瘤药物组	46.09	32.09	78.18	48.40	50.43	55.78
逆转耐药组(+VRP)	9.14	3.31	56.71	45.61	23.46	64.4

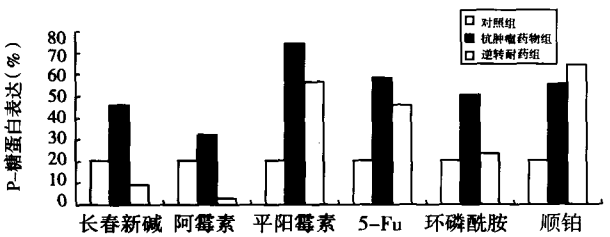


图 13 P-糖蛋白表达(%)

从以上图表我们发现,VRP 与长春新碱、阿霉素、平阳霉素、环磷酰胺作用,使 KBV200 细胞的 P-糖蛋白表达明显下降,其中对长春新碱、阿霉素作用较强,分别下降 80.17%、89.69%,对环磷酰胺及平阳霉素作用较弱,分别下降 53.48%及 19.19%;而 VRP 与 5-Fu、顺铂作用后,KBV200 细胞 P- 糖蛋白表达无明显变化。

3 讨 论

化疗是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一,尽管新的抗癌药物和化疗方案不断推出,但治疗效果仍不理想,其中一个重要原因就是肿瘤对化疗药物产生耐药性,而多药耐药性是肿瘤细胞免受化疗药物攻击的最重要的细胞防御机制。

P- 糖蛋白是最早发现的一种与多药耐药有关的蛋白,也是多药耐药性的主要机制之一,化疗药物可以诱导肿瘤细胞多药耐药基因 (multidrug resistance gene MDR-1)过度表达 P- 糖蛋白产生耐药性,导致化疗失败。P- 糖蛋白是由 MDR-1 基因编码的跨膜蛋白,属转运蛋白 ATP 结合家族,能利用水解 ATP 释放的能量将疏水亲脂性药物泵出细胞外,导致细胞内药物浓度降低,从而使许多化疗药物的毒性降低[2,3]。目前已发现有多种物质在体外能有效抑制 P-gp 的药物转运泵功能,包括钙通道阻滞剂(如维拉帕米)、钙调蛋白拮抗剂(如三氟拉嗪)、环孢菌素类(如环孢菌素 A)等[4]。

维拉帕米是目前已明确的具有逆转多药耐药性的钙通道阻滞剂,其中维拉帕米在胃癌、胰腺癌、脑膜瘤、卵巢癌、肺癌等中报道有抗肿瘤生长、转移等作用[5-8],而在头颈肿瘤中的研究中尚少。本研究以头颈部常见肿瘤喉癌 KBV200 耐药细胞株为研究对象,通过 FCM 检测 6 种抗肿药物分别与维拉帕米联合作用,检测 KBV200 细胞的 P- 糖蛋白表达,结果显示维拉帕米能选择性地降低 KBV200 细胞 P- 糖蛋白表达水平,与长春新碱、阿霉素、平阳霉素及环磷酰胺联合作用后,使 P- 糖蛋白的表达分别下降 80.17%、89.69%、19.19%及 53.48%,其中阿霉素作用最强,平阳霉素最弱,本实验组前期研究结果表明,维拉帕米与长春新碱、阿霉素、平阳霉素、环磷酰胺联合作用后,可增强抗肿瘤药物对 KBV200 细胞的抑制作用[9]。可以推测,维拉帕米对 KBV200 细胞的耐药逆转作用可能与维拉帕米降低 P-gp 表达有关。

(通信作者:蒋纪恺,汕头大学医学院。)

参 考 文 献

[1] Sonneveveld P. Multidrug resistance in haematological mailgicies [J]. J Intern Med, 2000;147:521-534.

[2] Borowski E, Bontemps-Gracz MM. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells[J]. Acta Biochim Pol, 2005;52(3):57-69.

[3] Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein An[J]. Acad Bras Ci, 2001;73(1):159-165.

[4] Volm M. Multidrug resistance and its reversal [J]. Aticancer Res, 1998;18:2905-2917.

[5] 张立阳, 赵玉沛, 廖 泉, 等. 维拉帕米逆转胰腺癌化疗耐药的研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004;10(04):263-266.

[6] 杨 琳, 朱兆华. 维拉帕米对多药耐药胃癌细胞耐药逆转作用的研究 [J]. 中华消化杂志, 2002;22(2):112-113.

[7] 张洪涛,王和平,陈 坚,等. 维拉帕米对脑膜瘤生长影响的实验研究(英文)[J].中国现代医学杂志, 2005;15(06):811-814.

[8] 廖美淼,陈惠祯,水 华,等. 顺铂、维拉帕米和环保菌素诱导卵巢癌细胞凋亡的研究 [J]. 中华妇产科杂志,2000;35(2):101-104.

[9] 陈鸿雁,王 驰,朱 旦,等.常用抗肿瘤药对 KBV200 细胞增殖抑制作用的研究[J].临床检验杂志,2003;21:45-46.