维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0016-04

氧化苦参碱对放疗鼻咽癌 HNE-1 细胞 P-糖蛋白表达影响

王 驰[1], 陈鸿雁[2], 舒 艳[2], 邱宗荫[3]

(1.重庆医科大学基础医学院化学教研室;2.重庆医科大学临床学院耳鼻喉科;3.重庆医科大学药学系,重庆 400016)

【摘 要】目的:(1)氧化苦参碱对放射前后鼻咽癌 HNE-1 细胞有无生长抑制作用;(2)研究天然产物氧化苦参碱对鼻咽癌 HNE-1 细胞株放射前、后 P-糖蛋白表达的影响。方法:(1)MTT 法检测长春新碱、维拉帕米、氧化苦参碱对放射前 HNE-1 细胞、放射后 HNE-1(200)细胞生长抑制情况;(2)免疫化学法检测氧化苦参碱、维拉帕米对 HNE-1(200)细胞 P-糖蛋白表达的影响。结果:(1)长春新碱、维拉帕米、氧化苦参碱对放射前、后细胞生长均有抑制作用,呈浓度依赖关系,随着浓度的增加抑制作用也增加;(2)高浓度 VCR 对放射治疗后细胞 HNE-1(200)的抑制率比对 HNE-1 细胞的抑制率降低了近 50%,P 值小于 0.01,有显著差异;氧化苦参碱、维拉帕米对两种实验细胞抑制没有显著差异。(3)免疫组化检测细胞 P-糖蛋白表达,结果为 HNE-1 阴性,HNE-1(200)阳性,维拉帕米、氧化苦参碱分别作用于 HNE-1(200)细胞后 P-gp 表达弱阳性。结论:(1)氧化苦参碱对放射前后鼻咽癌 HNE-1 细胞有明显生长抑制作用;(2)放射后细胞 HNE-1(200)对长春新碱产生耐药;(3)低毒性浓度氧化苦参碱具有与维拉帕米相似的作用,能使放射照射后鼻咽癌 HNE-1 细胞株 P-糖蛋白的表达下降。

【关键词】鼻咽癌 HNE-1 细胞株;P-糖蛋白;MTT 法;氧化苦参碱

【中国图书分类法分类号】R739.62 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-06-09

Effects of oxymartine on expression of P-glycoprotein in HNE-1 cell line radiation therapy

WANG Chi, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of oxymartine on cell growth and the changes of P-glycoprotein in HNE-1 cell line after exposed to fractionated X-irradiation. *Methods*: By MTT, the cell proliferation was observed both before X-irradiation and after X-irradiation conditions with the extent of vincristine, oxymartine and verapamil respectively. P-glycoprotein expression was tested by immunohistochemistory method SP. *Results*: (1) Vincristine, oxymartine and verapamil were capable of inhibiting cell growth on HNE-1 cell line and fractionated X-irradiated HNE-1(200) cell subline; (2) Vincristine was less inhibitory on cell growth in HNE-1(200) cell subline than HNE-1 cell line, and the difference had statistic significance; (3) P-glycoprotein expression in HNE-1 cell line was negative while HNE-1(200) cell subline positive; oxymartine with low inhibitory concentration could increase the expression of P-glycoprotein in HNE-1(200) cell subline, which is similar to that of verapamil. *Conclusion*: (1) Oxymartine is capable of inhibiting cell growth on HNE-1 cell line and fractionated X-irradiated HNE-1(200) cell subline; (2) HNE-1(200) cell subline is resistant to vincristine; (3) Oxymartine with low inhibitory concentration could increase the expression of P-glycoprotein in HNE-1(200) cell subline. which is similar to that of verapamil.

【Key words】HNE-1 cell line; P-glycoprotein; MTT; Oxymartine

鼻咽癌(NPC)是头颈部常见恶性肿瘤,放射治疗是鼻咽癌首选且是有效的治疗手段,国内各期单纯放疗 5 年生成率约为 50%;但是,大部分鼻咽癌确诊时大多已是中晚期,因此,以放疗为主化疗为辅的综合治疗是中晚期鼻咽癌的首选治疗。临床观察发现,放疗后的患者再接受化疗时其疗效往往较差;实验表明,放射可以诱导肿瘤细胞产生多药耐药性(Multidrug Resistance, MDR)[1]。

苦参是中医常用的药物,其化学成分主要为生物碱,主要包括苦参碱和氧化苦参碱等,文献报道苦参碱[2-4]具有逆转白血病及多种肿瘤多药耐药作

作者介绍:王 驰(1958-),男,副教授,博士,主要研究方向:生物技术、酶工程。

基金项目:本课题为重庆市卫生局中医药科研项目(2003—B-90)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

用,但氧化苦参碱相关报道较少。本研究以鼻咽癌 HNE－1 细胞为研究对象,观察氧化苦参碱对该细胞放射线照射后 P 一糖蛋白表达的影响,为进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

人鼻咽癌 HNE－1 细胞株由重庆医科大学医学超声工程研究所惠赠;HNE－1(200)细胞是参照 McCleans[5] 实验方法,用 HNE－1 细胞经 X－射线小剂量、多次照射而成。在重庆医科大学临床学院肿瘤科以加速器 200cGy 照射 8－12 次,照射期间,细胞进行正常换液、传代培养。

1.1.2 试剂及溶液配制

氧化苦参碱、维拉帕米、长春新碱均按照说明和使用浓度配置储备液,4℃冰箱保存,备用。小牛血清(FBS):购自杭州四季青生物工程材料研究所;RPMI－1640 培养液(GIB10 U.S.A.);MTT(四甲基偶氮唑盐):购自北方同正生物制品公司;免疫细胞化学检测细胞膜表面 P－gp170,采用中山生物公司 S－P 试剂盒。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HNE－1 细胞于含 10%新生牛血清及双抗(青霉素、链霉素)的 RPMI－1640 培养基中,37℃、5% CO_2 饱和湿度中培养。间日更换培养基,待细胞贴壁生长至 95%覆盖瓶底时,吸尽培养液,以 0.25%胰蛋白酶消化成单个细胞,1,000r/min 离心,按 1:3 进行传代培养。

1.2.2 X 射线照射 HNE－1 细胞 将处于对数生长期的 HNE－1 细胞行 X 射线照射,经筛选(200、400 和 600 cGy),照射剂量选为 200cGy,照射多次(8～12 次),期间细胞正常传代培养。以免疫细胞化学检测细胞膜表面 P－gp170 的表达增加,该细胞为 HNE－1(200)。在实验中,加药组为照射后立即加药,培养 24h 后,进行处理。

1.2.3 MTT 法测定药物抑制 HNE－1、HNE－1(200)细胞增殖 取对数生长期 HNE－1、HNE－1(200)细胞稀释至 $(1.5\sim2)\times10^5$/ml,于 96 孔细胞培养板中培养 1d,加药,继续培养 4 天,弃去培养液,每孔加 0.5mg/ml 的 MTT200μl,培养 4h,弃去 MTT,每孔加二甲基亚砜(DMSO)150μl,待溶解后于 BIO－RADMode1450 型酶标仪 570nm 处测吸光度。其原理是:活细胞内线粒体脱氢酶能将 MTT 转化为蓝紫色衍生物甲;产物甲颜色深浅(可以用吸光度 A 值表示)与活细胞数成正比。因此,利用此原理测定抗肿瘤药物作用后肿瘤细胞 A 值变化,并计算种瘤细胞存活率,从而预测抗肿瘤药物对某种肿瘤细胞的抑制作用。

1.2.4 免疫细胞化学法测定细胞膜 P－gp 表达 免疫细胞化学检测细胞膜表面 P－gp,步骤略。

1.2.5 免疫细胞化学结果判断 P－糖蛋白染色细胞显示胞膜及胞浆呈棕黄色,高倍镜下随机选择视野,计数 200 个细胞,着色细胞＜10%为阴性,10%～30%为弱阳性 30%～50%为阳性。

1.3 统计学方法

采用 χ^2 检验,每次结果均为 3 次重复试验的 $\bar{x}\pm s$。

2 结 果

2.1 长春新碱、氧化苦参碱、维拉帕米对 HNE－1 和 HNE－1(200)细胞的抑制作用,结果见图 1、2、3。

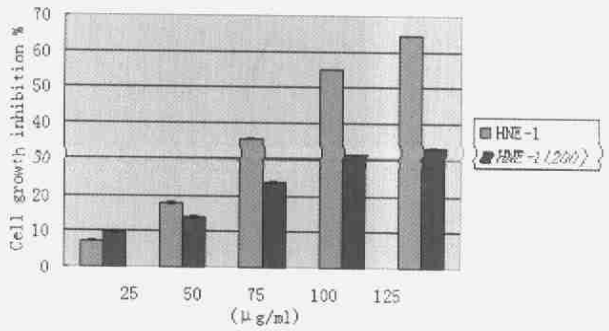


图 1 长春新碱对 HNE－1、HNE－1(200)细胞的抑制作用

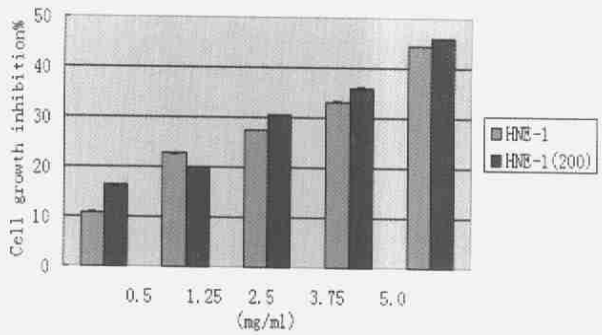


图 2 氧化苦参碱对 HNE－1、HNE－1(200)细胞的抑制作用

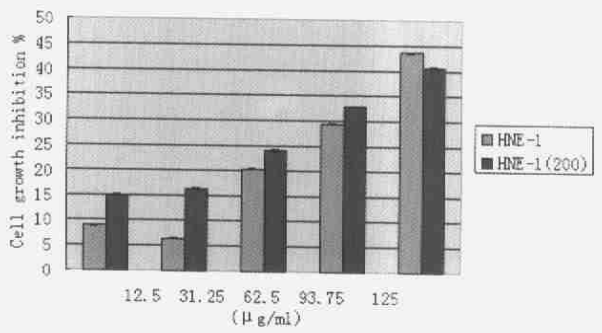


图 3 维拉帕米对 HNE－1、HNE－1(200)细胞的抑制作用

2.1.1 长春新碱对 HNE－1、HNE－1(200)细胞的抑制作用

从图 1 可以看出,在浓度为 25、50μg/ml 时,

维普资讯 http://www.cqvip.com

VCR 对 HNE－1 细胞抑制作用较弱，抑制率分别为 6.34%、17.87%；当浓度升高时，其抑制率增加。在相同浓度 25、50μg/ml 下，VCR 对 HNE－1(200)细胞抑制作用分别为 9.81%、13.98%，其后，浓度升高，抑制率增加，遵从浓度依赖关系。VCR 对 HNE－1 细胞和 HNE－1(200)细胞的抑制率在低浓度时基本一致；但在高浓度时，VCR 对 HNE－1(200)细胞的抑制率比对 HNE－1 细胞的抑制率降低了近 50%，P 值小于 0.01，有显著差异。

2.1.2　氧化苦参碱对 HNE－1、HNE－1(200)细胞的抑制作用

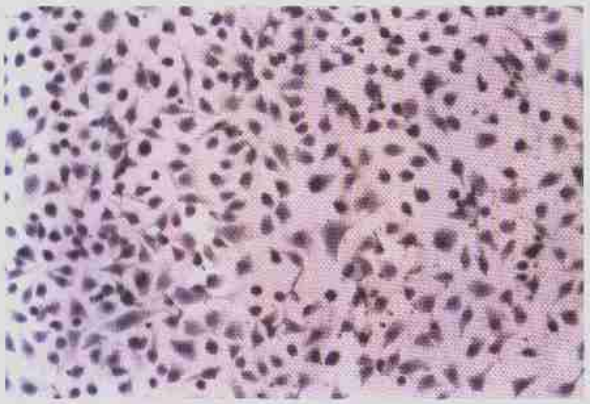


图 4　HNE－1 细胞的 P－gp 检测，阴性



图 5　HNE－1(200)细胞的 P－gp 检测，阳性



图 6　氧化苦参碱作用于 HNE－1(200)细胞的 P－gp 检测



图 7　维拉帕米作用于 HNE－1(200)细胞的 P－gp 检测

从图 2 看出，氧化苦参碱对两种实验细胞均有抑制作用，呈浓度依赖关系，随氧化苦参碱浓度的增加，抑制作用增加；但是，氧化苦参碱对两种实验细胞的抑制作用没有显著差异。

2.1.3　维拉帕米对 HNE－1、HNE－1(200)细胞的抑制作用

图 3 显示，维拉帕米对 HNE－1、HNE－1(200)细胞有抑制作用，且抑制作用与维拉帕米浓度成正比；维拉帕米对两种实验细胞的抑制率基本相同。

2.2　P－gp 表达检测结果

2.2.1　HNE－1、HNE－1(200)细胞的 P－gp 表达，见图 4、5。

从图 4 及 5 可以看出，放射前 HNE－1 细胞 P－糖蛋白表达阴性，而放射后 HNE－1(200)细胞 P－糖蛋白表达阳性。

2.2.2　选择低毒性浓度(20%以下细胞抑制率)氧化苦参碱、维拉帕米分别作用于 HNE－1(200)细胞后 P－gp 检测，见图 6、7。

维拉帕米、氧化苦参碱分别作用于 HNE－1(200)细胞后 24h 后，P－gp 表达均为弱阳性。

3　讨　论

鼻咽癌(NPC)是我国南方常见的恶性肿瘤，放、化综合治疗应是中晚期鼻咽癌的合理选择。但临床实践中，尤其是从随机分组研究中，尚未得出令人满意的结果。肿瘤耐药性的出现却是临床化疗、放疗失败最常见和最难克服的问题之一。肿瘤细胞产生耐药的方式很多，其中以多药耐药性(MDR)比较常见。MDR 作为一种独特的耐药现象，是近年来国内外研究和探索的热点之一。MDR 是肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生抗药的同时，对结构和作用机制

维普资讯 http://www.cqvip.com

不同的其它抗肿瘤药物也产生交叉耐药性。MDR的特点:①多出现于天然来源的抗肿瘤药物,这些药物通常为分子量较大的亲脂性化合物,如 CLC、VCR、VLB、ADM、DNR、ACTD、VP-16、VM-26、TAX 等。较少为抗代谢类和烷化剂类;②MDR 细胞中药物积累量减少;③MDR 细胞膜上出现一种特殊的蛋白,名为 P-糖蛋白(P-glycoprotein、P-gp),P-糖蛋白是目前公认的 MDR 生物学基础。

本实验以鼻咽癌细胞株 HNE-1 为研究对象,采用高能 X 射线照射细胞,得到 HNE-1(200)细胞,MTT 法检测提示,高浓度长春新碱对 HNE-1(200)的抑制率比对 HNE-1 细胞的抑制率降低了近 50%,P 值小于 0.01,有显著差异用免疫组化检测该细胞 P-糖蛋白表达,结果为 HNE-1 阴性,HNE-1(200)阳性,表明放射可以诱导细胞产生多药耐药,使细胞对化疗药物敏感性降低,与文献报道一致[1]。

研究肿瘤多药耐药的最终目的是逆转耐药,提高治疗敏感性。氧化苦参碱是从中药中提取的一种苦参型生物碱,已被证实有一定的抑瘤作用[6]和诱导癌细胞凋亡的作用[7]。本研究发现,氧化苦参碱对鼻咽癌 HNE-1 及 HNE-1(200)细胞生长均有抑制作用,呈浓度依赖关系,随着浓度的增加抑制作用也增加,提示氧化苦参碱对是否产生耐药的肿瘤细胞均有生长抑制作用,与文献报道一致[6]。进一步研究发现,低毒性浓度的氧化苦参碱(0.5mg/ml)可以使 HNE-1(200)细胞 P-糖蛋白表达减低,提示氧化苦参碱可能部分逆转肿瘤耐药,增加放疗后肿瘤细胞对化学治疗的敏感性。

维拉帕米是临床常用的钙通道阻止剂,是公认的第一代 P-糖蛋白抑制剂,但由于其心脏毒、副作用较大而限制了其在耐药逆转方面的应用[8]。在蛋白质水平上,维拉帕米逆转肿瘤耐药的机制是(1)竞争性抑制药物与 P-gp 或药物外排泵的结合。P-gp 是细胞对药物的共同外排泵,其特异性不高,维拉帕米能与药物竞争这一共同通道的结合而达到抑制药物的外排作用,(2)使 P-gp 磷酸化,抑制药物外排泵功能,结果细胞内抗肿瘤药物浓度增高。(3)最近又发现维拉帕米可诱导 P-gp 跨膜区蛋白的构象改变来抑制 P-gp 的作用。本研究表明,氧化苦参碱与维拉帕米作用相似,均能使抑制两种细胞增殖且使 HNE-1(200)细胞 P-糖蛋白表达下降,故推测氧化苦参碱可能具有与维拉帕米一致的耐药逆转作用,氧化苦参碱能否进一步逆转肿瘤细胞多药耐药,有待在今后的实验中作进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Hill BT, Deuchars K, Hosking LK, et al. Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X-irradiation in vitro[J]. J Natl Cancer Inst, 1990; 82: 607-612.

[2] 朱宁希,罗文纪,虞荣喜. 苦参碱诱导白血病细胞株 HL-60 分化的实验研究[J]. 中国医药学报,2001;16(5):21-24.

[3] 许相儒,蒋纪恺. 苦参及其生物碱抗肿瘤活性研究进展[J]. 中西医结合杂志,1998;18(5):314-316.

[4] 陈鸿雁,王 驰,朱 旦,等. 抗肿瘤药物及苦参碱对 KBV200 细胞 P-糖蛋白表达的影响[J]. 临床检验杂志,2003;21:10.

[5] Dempke WCM, Hosking LK, Hill BT. Expression of collateral sensitivity to cisplatin, methotrexate, and fluorouracil in a human ovarian carcinoma cell line following exposure to fractionated X-irradiation in vitro (supplement)[J]. Semin Oncol, 1992; 19: 66-72.

[6] Yuan C, Lu SQ, Yao X. Effects of oxymatrine on the antitumor activity and toxicity of cyclophosphamide in mice[J]. Yao Xue Xue Bao, 1987; 22(4): 245-249.

[7] Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli[J]. Cell Prolif, 1991; 24(2): 203-214.

[8] 余润泉. 异博停逆转长春碱抗药性的实验及临床观察[J]. 中华血液学杂志,1988;9:340.

(上接第 11 页)

[5] Liotta LA. Tumor invasion and metastasis L Role of the basement membrane[J]. American J of Pathology. 1984; 117: 339-348.

[6] Arck PC, Hertwig K, Hagen E. Pregnancy as a model of controlled invasion might be attributed to the ratio of CD3/CD8 to CD56[J]. Am J Reprod Immunol. 2000; 44(1): 1-8.