维普资讯 http://www.cqvip.com

245-246
文章编号：0253-3626(2000)03-0245-02

三苯氧胺和雌激素对MCF-7乳癌细胞内耐药基因 mdr-1mRNA的影响

郑 军[1]，姚榛祥[1]，邓 兵[2]
（1. 重庆医科大学临床学院普外科 400016；2. 重庆医科大学儿科学院免疫实验室 400010）

摘 要：目的 观察三苯氧胺(Tamoxifen,TAM)及雌激素(E_2)对乳腺癌MCF-7细胞株耐药基因 mdr-1 mRNA水平的影响；**方法** 应用 RT-PCR法观察 TAM 及E_2 在不同时间、浓度作用下细胞内mdr-1mRNA水平的变化；**结 果** TAM 可以使 MCF-7 细胞内 mdr-1mRNA水平降低，而E_2 则相反。且以上变化表现出剂量、时间依赖关系。**结论** TAM通过降低 mdr-1mRNA 水平，使肿瘤细胞的耐药性降低，有利于抗肿瘤药物更好的发挥作用。

关键词： TAM；E_2；乳癌细胞；mdr-1mRNA
中国图书分类法分类号： R459.1；R737.9 **文献标识码：** A **收稿日期：** 1999-12-06

The effect of estrogen and TAM on the mdr-1 mRNA level in MCF-7 cell by RT-PCR

ZHENG Jun, et al
Department of General Surgery, College of Clinical Medicine

Abstract: Objective Study the effects of Tamoxifen(TAM) and estrogen(E_2) on the mdr-1 mRNA level in MCF-7 cell. **Methods** RT-PCR was used to observe the variation of mdr-1 mRNA level in MCF-7 cell after treatment with TAM and E_2 at different time and concentration. **Results** TAM could decrease the level of mdr-1 mRNA in MCF-7 cell but E_2 could not. These results came together with the relationship with the concentration of the drug and the treatment of the given time. **Conclusion** The drug-resistance of neoplasm cells could be down-regulated by TAM via decreasing the mRNA level in cells, which would be helpful in tumor drug therapy.

Key Words: TAM; E_2; Breast cancer cells; mdr-1

抗肿瘤药物治疗在现代肿瘤治疗中已成为重要的措施。但其耐药性问题严重阻碍着疗效的进一步提高。本文应用 RT-PCR法，观察乳腺癌细胞株MCF-7在三苯氧胺(Tamoxifen,TAM)及雌激素(E_2)作用下，对其耐药基因 mdr-1 mRNA的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和细胞培养

1.1.1 试剂 雌激素受体阳性的MCF-7乳癌细胞株，由中科院上海细胞生物所提供；无酚红 RPMI 1640细胞培养液（sigma公司）；三苯氧胺（Tamoxifen）及雌二醇（β-Estradiol，Sigma公司），溶于70%乙醇，冰箱贮存。

1.1.2 细胞培养 参照 Estti等方法[11]，将 MCF-7细胞培养于含 10%胎牛血清培养液，37℃、5%CO_2孵育箱内贴壁生长3～4代后，取指数生长期细胞每瓶 1×10^5个种于 50 ml 培养瓶，无血清及无酚红 RPMI 1640 5ml培养24h作同步化处理，再加完全培养液（含10%的用活性炭吸附除去内源性雌激素之胎牛血清）培养24h后分组实验。

1.1.3 培养细胞分组及处理

实验组1：TAM 5μmol/L 处理；实验组2：E_2 1×10^{-8} mol/L 处理；实验组3：对照组（仅加等量乙醇）每组均在0、24、48及72h取细胞作检测；实验组4：TAM 各以0、1、3、及5μmol/L处理72h；实验组5：E_2各以0、1×10^{-10}、1×10^{-9}、及 1×10^{-8}mol/L处理 72h。

1.2 RT-PCR法测定各组细胞内 mdr-1mRNA含量

1.2.1 抽提细胞总 RNA

各实验组细胞采用异硫氰酸胍－酚－氯仿－步法抽提RNA[12]。提抽后 RNA 用12μl DEPC处理的纯水于 55℃、10min溶解，-70℃保存。

1.2.2 逆转录－聚合酶链反应(RT-PCR)

1.2.2.1 逆转录

以mRNA为模板，Oligo(dT) 15为引物，经RT酶逆转录合成cDNA，每份标本（12μl总RNA)加入 4μl 5×RT缓冲液，1μl(10mM/L)dNTP，1μl（100pmol/μl)Oligo(dT) 15，混匀后置 65℃5min，然后加入0.5μl（100mM/L）DTT，0.5μl（40u/μl)RNasin，1μl(200u/μl)M-MLV逆转

作者介绍：郑 军（1957- ），男，讲师，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

录酶，RT反应总体积 20μl，混匀后置37℃ 1h，95℃ 5min终止反应，5000r/min离心 3min后-20℃保存。

1.2.2.2 PCR测mRNA

mdr-1引物：中科院上海细胞生物研究所合成，

上游链：5'-GTACCCATCATTGCAATAGC-3'，

下游链：5'-CAAACTTCTGCTCCTGAGTC-3'，

PCR产物大小：157 bp。

β2-MG引物：中科院上海细胞生物研究所合成，

上游链：5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'，

下游链：5'-TAGCTCTTCTTCAGGGAGGA-3'，

PCR产物大小：426 bp。

参照 Nooter 等[3]方法，取各实验组cDNA标本进行 PCR反应检测 mdr-1 mRNA（9600型 PCR仪），扩增结束后，取 15μl样品6%聚丙烯酰胺凝胶电泳，150 V，15 mA，40 min，结束后用溴化乙锭(10mg/ml)染色5～10min，紫外照像。

2 结 果

实验 1，2 组细胞经 TAM 5 μmol/L 作用后，与对照组比较，显示从 24h开始 MCF-7 细胞内mdr-1 mRNA开始减少，48～72h减少更明显，而 E_2作用后除 48hmdr-1 mRNA略有减少外，其余时间内变化不明显，见图1。

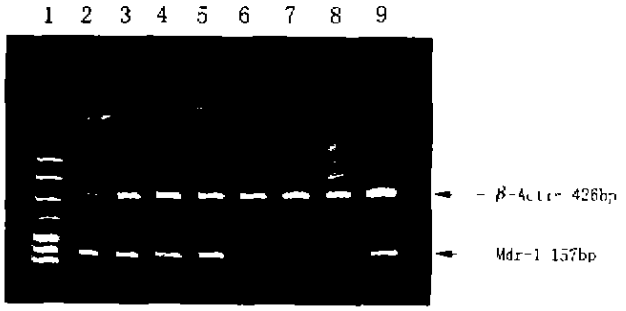


图1 RT-PCR显示TAM作用48、72h后mdr-1 mRNA明显减少（6,8）

（1. 分子量标记；2, 3 对照组；4, 6, 8 TAM 5 μmol/L 作用24、48及72h；5, 7, 9 E_2 1×10^{-8}mol /L 作用24、48及72h）

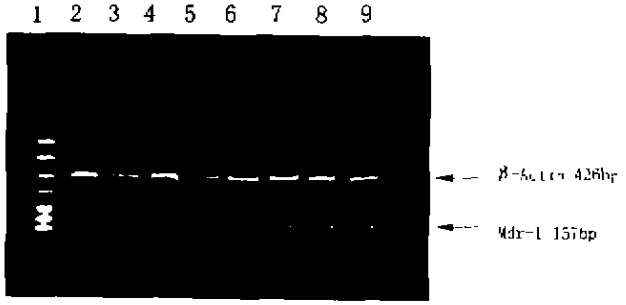


图2 RT-PCR显示随着TAM浓度增加mdr-1 mRNA逐渐减少（3,4,5）；但在E_2作用下mdr-1 mRNA略有增强（7,8,9）

（1. 分子量标记；2, 6 对照组；3，4，5.TAM 1 μmol/L、3 μmol/L及5 μmol/L 作用72h；7、8，9 .E_2 1×10^{-8}mol /L、1×10^{-9}mol /L 及1×10^{-10}mol /L作用72h）

实验 4、5 组细胞经不同浓度的 TAM及 E_2作用后，与对照组比较，随着 TAM浓度增高，mdr-1 mRNA水平明显降低，而随着 E_2浓度的增高，mdr-1 mRNA水平略有增高。见图2。

3 讨 论

已知TAM 除通过和雌激素竞争与受体蛋白结合，抑制肿瘤细胞内雌激素的活性，从而抑制癌细胞生长外，近年人们已认识到 TAM在体外、动物及临床试验中均表现出具有较强的多药耐药性（MDR）逆转作用[4]，Kirk 等[5]研究发现 TAM、ICI164可以使阿霉素耐药细胞MCF-7对长春新碱、阿霉素的敏感性提高 25～35倍。其机制 Rao等[6]认为抗雌激素药物主要是通过影响 P-糖蛋白而发挥作用，但其中的详细过程还不清楚。本研究结果提示当 MCF-7细胞与 TAM 5 μM作用 48h，其 mdr-1 mRNA水平明显降低，且随着 TAM 浓度的增高及作用时间的延长，mdr-1 mRNA的水平降低愈明显，而雌激素（E_2）对mdr-1 mRNA的转录则无明显影响。因此，本文认为 mdr-1 mRNA转录水平受 TAM 影响较大；TAM通过降低 mdr-1 mRNA 水平，减少 P-糖蛋白合成，使肿瘤细胞的耐药性降低，进一步解释了 TAM逆转 MDR的现象，为临床应用 TAM降低乳腺癌化疗中的耐药性，提供实验依据。

参 考 文 献

[1] Estti AM, Huovinen RL, Laine AM, et al. Apoptosis in toremifen induced growth inhibition of human breast cancer cells in vitro[J]. J Nati. Cancer Ins 1993; 85:1412-1416.

[2] Chomczynski,sacchi P, et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocy anate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochen 1989;162:156-158.

[3] Nooter K and Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer[J]. Br J Cancer 1991;63: 663-665.

[4] 缪泽鸿，等. P糖蛋白介导的多药耐药逆转剂研究进展[J]. 国外医学药学分册，1996;23:97-100.

[5] Kirk J, Syed SK, Harris AL, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance by pure anti-obstrogens and novel tamoxifen derivatives [J]. Biochemical Pharmacology 1994;48:277-285.

[6] Rao US, Fine RL and Scarborough GA, Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein[J]. Biochemical Pharmacology 1994;48:287-292.