

咯萘啶逆转人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞耐药性及机制探讨

李 柱, 农巧红, 童刚领, 王树滨*

(北京大学深圳医院肿瘤科, 广东 深圳 518000)

摘要: **目的** 在明确咯萘啶(PND)逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 耐药性的药效基础上,初步探索作用机制。 **方法** 采用 MTT 法检测单用阿霉素(ADM)和联用咯萘啶(PND)对人乳腺癌敏感细胞 MCF-7 和耐药细胞 MCF-7/ADM 的抑制作用,得出半数抑制浓度(IC₅₀),并计算耐药倍数和逆转倍数。Western blot 检测细胞中 Fas 和 Caspases-3 蛋白表达。 **结果** ADM 对 MCF-7 和 MCF-7/ADM 的 IC₅₀ 分别为 1.399 μg/mL 和 43.885 μg/mL,耐药倍数为 31.4 倍。PND(0.5 μg/mL)联合 ADM 作用 MCF-7/ADM 的 IC₅₀ 为 3.246 μg/mL,逆转倍数为 13.5 倍,并能提高耐药 MCF-7/ADM 中 Fas 和 Caspases-3 蛋白表达。 **结论** PND 能够逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 耐药性,通过上调膜蛋白 Fas 表达,增加 MCF-7/ADM 对 ADM 的敏感性,从而促进细胞凋亡。

关键词: 咯萘啶; 阿霉素; 乳腺癌; MCF-7/ADM 细胞; 逆转耐药; 细胞凋亡

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

Reversal effect and mechanism of pyronaridine on drug resistance of breast cancer cell MCF-7/ADM

LI Zhu, NONG Qiaohong, TONG Gangling, et al

(Department of Oncology, Shenzhen Medical College, Peking University, Shenzhen 518000, Guangdong China)

Abstract: **Objective** Based on the effect of pyronaridine (PND) in reversing drug-resistance of human breast cancer cell MCF-7/ADM, to explore the mechanism of action. **Methods** The inhibitory effect of simple adriamycin (ADM) and combined with PND on sensitive human breast cancer cell MCF-7 and drug-resistance MCF-7/ADM was detected by MTT assay, and to calculate median inhibitory concentration, resistance index and reversal index. Cells were designated as MCF-7/ADM group, MCF-7/ADM+ADM group and MCF-7/ADM+ADM+PND group. Western blot detected the expression of Fas and Caspases-3 in cells. **Results** The IC₅₀ of ADM to MCF-7 and MCF-7/ADM were 1.399 μg/mL and 43.885 μg/mL, respectively, and the resistance index was 31.4. The IC₅₀ of PND combined with ADM to MCF-7/ADM was 3.246 μg/mL, and the reversal index was 13.5. Compared with MCF-7/ADM group, the expression of Fas and Caspases had no statistic difference ($P>0.05$) in MCF-7/ADM+ADM group, but the expression increased significantly in MCF-7/ADM+ADM+PND group ($P<0.05$). **Conclusion** PND could reverse drug-resistance of MCF-7/ADM by up-regulating expression of membrane protein Fas, which increased sensibility of MCF-7/ADM to ADM, and induced the cell apoptosis.

Key words: pyronaridine; adriamycin; breast cancer; MCF-7/ADM cell; reversing drug-resistance; apoptosis

随着人们生存环境和生活习惯的改变,乳腺癌已成为女性癌症患者死亡率最高的的癌症^[1]。虽然乳腺切除术能够有效降低肿瘤负荷,但存在预后差、免疫功能下降等问题,并且给患者心理带来极大的负担^[2]。化疗是另一种乳腺癌治疗手段,但容易

出现多药耐药(multidrug resistance, MDR)的棘手问题,这极大限制了阿霉素(adriamycin, ADM)等药物的抗肿瘤作用^[3]。目前,解决 MDR 问题的主要研究方向为寻找有效的肿瘤耐药逆转剂^[4]。本研究采用咯萘啶(pyronaridine, PND)联合 ADM 作用于人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM,观察 PND 对 MCF-7/ADM 的逆转耐药作用,并初步探索作用机制。

收稿日期:2017-02-20;修回日期:2017-05-23

基金项目:深圳市创新知识计划基础研究项目(JCYJ2015040309144300)。

* 通讯作者, E-mail: zhuewt@163.com.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于中国科学院上海细胞生物所。

1.1.2 药物与试剂 阿霉素购于南京奥多福尼生物科技有限公司,使用灭菌注射用水稀释成 16 mg/mL 的母液,分装后 -20 °C 保存;咯萘啶购于上海恒远生物科技有限公司,使用 DMSO 配制为 16 mg/mL 的母液,分装, -20 °C 保存,使用时用培养基稀释成相应浓度。胎牛血清、RPMI-1640 培养基、MTT 噻唑蓝购于 Solarbio 公司。小鼠抗 β -actin 单抗、小鼠抗 Fas 单抗、兔抗 Caspases-3 单抗、辣根酶标记山羊抗小鼠或兔,均购自 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 使用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基,于 37 °C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养 MCF-7 细胞。以起始浓度为 4 μ g/mL 的 ADM 培养基培养 MCF-7 细胞,待细胞稳定生长后,逐渐增加 ADM 的浓度,每次 ADM 浓度增加 2 倍,同时监测 MCF-7 细胞对 ADM 的 IC₅₀,待 IC₅₀ 达到 40 μ g/mL 左右时,认为其出现较强耐药性,即成功培养出 MCF-7/ADM 细胞,在含 1 μ g/mL 的 ADM 的上述培养基中,培养 MCF-7/ADM 细胞,以维持其耐药性。设置 MCF-7/ADM 组、MCF-7/ADM +ADM 组、MCF-7/ADM +ADM +PND 组,共三个组。

1.2.2 MTT 法检测细胞抑制率 取对数生长期的细胞(MCF-7 或 MCF-7/ADM),制备成悬液,细胞计数板计数为 1×10^4 /mL,接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,每组设 3 个副孔,细胞培养箱中培养 24 h 后,加入含相应浓度药物的无血清培养基进行干预,作为处理组,同时设立只加培养基的空白对照组和不加药物的阴性对照组,继续培养 20 h 后,每孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL),然后继续培养 4 h,吸去上清液后每孔加入 200 μ L 的 DMSO,摇床摇晃 10 min,待晶体全部溶解后,使用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(OD)。使用公式计算抑制率,抑制率(%) = $[1 - (\text{处理组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}) / (\text{阴性对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})] \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.3 ADM 对 MCF-7 和 MCF-7/ADM 的抑制作用 使用无血清培养基将 ADM 母液进行稀释,终浓

度为 0.01、0.05、0.25、1.25、6.25、31.25 μ g/mL,然后干预 MCF-7。同时,另外配制终浓度为 5、10、20、40、80、160 μ g/mL 的 ADM 无血清培养基,用于干预 MCF-7/ADM。其余操作方法同“1.2.2”,得出抑制率,分别计算出 ADM 对 MCF-7 和 MCF-7/ADM 的半数抑制浓度(IC₅₀),然后计算耐药倍数,耐药倍数 = (MCF-7 的 IC₅₀) / (MCF-7/ADM 的 IC₅₀)。

1.2.4 PND 对 MCF-7/ADM 的抑制作用 使 PND 在无血清培养基中的终浓度分别为 0.5、1、2、4、8、16 μ g/mL,求出对 MCF-7/ADM 的抑制率,然后将各浓度对应的抑制率与不加药物的阴性对照组比较,计算出抑制率无统计学意义的 PND 浓度。

1.2.5 PND 逆转 MCF-7/ADM 对 ADM 耐药的作用 将“1.2.4”筛选出的对 MCF-7/ADM 无显著抑制作用浓度的 PND,与浓度分别为 1、2、4、8、16、32 μ g/mL 的 ADM 联用,按照“1.2.2”的步骤,求出逆转后 ADM 对 MCF-7/ADM 的 IC₅₀,并计算逆转倍数,逆转倍数 = (逆转前 IC₅₀) / (逆转后 IC₅₀)。

1.2.6 Western blot 检测细胞凋亡通路蛋白 同时设置 MCF-7/ADM 组、MCF-7/ADM +ADM 组、MCF-7/ADM +ADM +PND 组,共三个组。MCF-7/ADM 组正常培养传代。根据“1.2.3”和“1.2.5”中 ADM 对 MCF-7/ADM 的抑制率,选取单用 ADM 对 MCF-7/ADM 抑制率较低,但联用 PND 对 MCF-7/ADM 抑制率较高的某一浓度作为 ADM 的浓度,用于 MCF-7/ADM +ADM 组和 MCF-7/ADM +ADM +PND 组。MCF-7/ADM +ADM +PND 组中的 PND 浓度与“1.2.5”中的浓度相同。将细胞配制成密度为 3×10^4 /mL 的悬液,然后接种于 6 孔板,每孔 2 mL,24 h 后,MCF-7/ADM 组只更换培养基,MCF-7/ADM +ADM 组加入相应浓度的 ADM,MCF-7/ADM +ADM +PND 组同时加入 ADM 和 PND,继续培养。24 h 后,弃去上清液,加入 200 μ L 含 1%PMSF 的细胞裂解液,冰上放置,并于振荡器上摇晃 15 min,然后用细胞刮将细胞碎片刮至一侧,移液器转移至 1.5 mL 离心管中,放于 4 °C 恒温离心机中,13 000 rpm 离心 10 min,转移上清液,BCA 试剂盒检测蛋白含量,加入蛋白上样缓冲液,并补双蒸水将总蛋白浓度调至 5 μ g/ μ L,沸水浴加热 5 min,分装, -20 °C 保存。配制聚丙烯酰胺凝胶,分离胶浓度 10%,浓缩胶浓度 5%,取 10 μ L 样品上样,电泳结束后,转膜 3 h,室温封闭 2 h,加入一抗 4 °C 孵育过夜(内参 β -actin 浓度 1 : 500, Fas 和 Caspases-3 浓度 1 : 1 000),二抗(浓

度 1 : 5000) 室温孵育 2 h, 显色并曝光胶片。

1.2.7 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 进行 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 ADM 对 MCF-7 和 MCF-7/ADM 的抑制作用

表 1 和表 2 结果表明, ADM 对 MCF-7 和 MCF-7/ADM 的抑制作用均与浓度呈正相关, 但对两种细胞的效价差别较大, 对 MCF-7 的 IC_{50} 为 $1.399 \mu\text{g/mL}$, 但对 MCF-7/ADM 的 IC_{50} 达 $43.885 \mu\text{g/mL}$, 耐药倍数为 31.4 倍。

表 1 ADM 对 MCF-7 细胞的抑制作用

剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	抑制率 (%)
阴性对照组	1.219 ± 0.042	—
0.01	1.204 ± 0.039	1.23
0.05	1.004 ± 0.031^a	17.6
0.25	0.820 ± 0.028^a	33.39
1.25	0.594 ± 0.020^a	51.24
6.25	0.380 ± 0.013^a	68.79
31.25	0.248 ± 0.007^a	79.63

与阴性对照组比较, $a: P < 0.05$

表 2 ADM 对 MCF-7/ADM 细胞的抑制作用

剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	抑制率 (%)
阴性对照组	1.144 ± 0.031	—
5	1.102 ± 0.035	3.64 ± 0.65
10	0.918 ± 0.031^a	19.75 ± 2.79
20	0.736 ± 0.024^a	35.69 ± 6.88
40	0.508 ± 0.016^a	55.61 ± 10.24
80	0.397 ± 0.014^a	65.32 ± 12.21
160	0.327 ± 0.012^a	71.45 ± 13.39

与阴性对照组比较, $a: P < 0.05$

2.2 PND 对 MCF-7/ADM 的抑制作用 表 3 结果显示, 高浓度 PND 对 MCF-7/ADM 具有较强的抑制作用, 在较低浓度时仅有微弱的抑制作用, 因此, 选择无显著抑制作用浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 PND, 用于下一步逆转耐药性研究。

2.3 PND 逆转 MCF-7/ADM 对 ADM 耐药的作用

表 4 结果表明, 与单用 ADM 比较, 在联用 PND 时, 低浓度的 ADM 对 MCF-7/ADM 具有显著的抑制作用, IC_{50} 为 $3.246 \mu\text{g/mL}$, 逆转倍数为 13.5 倍。

表 3 PND 对 MCF-7/ADM 细胞的抑制作用

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	抑制率 (%)
阴性对照组	0.998 ± 0.034	—
0.5	0.996 ± 0.032	0.21 ± 0.03
1	0.975 ± 0.033	2.31 ± 0.32
2	0.905 ± 0.029	9.36 ± 1.65
4	0.782 ± 0.027^a	21.68 ± 3.94
8	0.513 ± 0.019^a	48.61 ± 8.98
16	0.386 ± 0.011^a	61.36 ± 11.12

与阴性对照组比较, $a: P < 0.05$

表 4 PND 逆转 MCF-7/ADM 对 ADM 耐药的作用

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	抑制率 (%)
阴性对照组	1.119 ± 0.04	—
1	0.813 ± 0.028^a	27.32 ± 4.97
2	0.590 ± 0.018^a	47.26 ± 8.85
4	0.466 ± 0.014^a	58.37 ± 10.01
8	0.386 ± 0.013^a	65.49 ± 12.25
16	0.334 ± 0.011^a	70.11 ± 12.96
32	0.312 ± 0.009^a	72.14 ± 12.76

与阴性对照组比较, $a: P < 0.05$

2.4 细胞凋亡通路蛋白 与 MCF-7/ADM 组比较, MCF-7/ADM + ADM 组 Fas 和 Caspase-3 蛋白表达无显著性差异 ($P > 0.05$); 而 MCF-7/ADM + ADM + PND 组中 Fas 和 Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 结果见图 1。

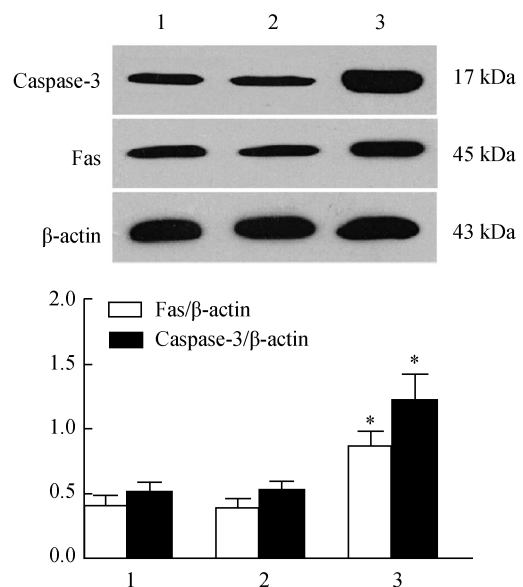


图 1 联用 PND 对 Fas 和 Caspase-3 蛋白的影响

1: MCF-7/ADM 组; 2: MCF-7/ADM + ADM 组;

3: MCF-7/ADM + ADM + PND 组

与 MCF-7/ADM 组比较, $*: P < 0.05$

3 讨 论

细胞凋亡又称程序性死亡,是一种由基因调控的主动的死亡方式,在生理与病理中起到重要作用^[5]。细胞凋亡通路主要分为线粒体途径和死亡受体途径,半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase)是两条细胞凋亡通路的共同效应因子,在细胞凋亡中起到关键作用^[6]。死亡受体 Fas (又称 APO-1 或 CD95)是一种细胞膜表面受体,能将凋亡信号转导给下游的 Caspase,从而启动凋亡功能,诱导细胞发生程序性死亡^[7]。研究表明,肿瘤的发生、发展与细胞凋亡通路密切相关,通过诱导细胞凋亡是治疗肿瘤的有效策略^[8]。通过上调乳腺癌细胞膜表面 Fas 表达,进而将信号转导给下游 Caspase,能促进该肿瘤细胞的凋亡^[9]。ADM 可通过 Fas 介导细胞凋亡信号,激活 Caspase,从而发挥抗肿瘤作用^[10-11]。但是,在治疗中可能会出现耐药情况,乳腺癌细胞对 ADM 敏感性下降,导致疗效不佳,虽然加大剂量可提高疗效,但容易引起严重的不良反应,限制了临床使用,因此,寻找有效的肿瘤耐药逆转剂成为是有效提高抗肿瘤治疗的重要手段^[12-13]。PND 是我国研制的抗疟药,能够逆转疟原虫对氯喹的耐药性,并且具有逆转肿瘤耐药性的作用,有望成为新一代肿瘤耐药逆转剂^[14-15]。

本研究主要观察 PND 对乳腺癌的耐药逆转作用,结果表明,CMF-7/ADM 对 ADM 具有较强的耐药性,耐药倍数达 31.4 倍,而与 PND 联用可有效逆转耐药性,逆转倍数为 13.5 倍。PND 和 ADM 联用可上调细胞凋亡通路中 Fas 和 Caspase-3 蛋白的表达,从而增加 CMF-7/ADM 对 ADM 的敏感性,促使肿瘤细胞凋亡。综上所述,PND 可逆转 CMF-7/ADM 对 ADM 的耐药性,其机制可能为上调膜表面 Fas 表达,增加 CMF-7/ADM 对 ADM 的敏感性,促进乳腺癌细胞凋亡。

参考文献:

[1] 黄国兴,苏国森,李上芹,等.亚甲蓝染色法乳腺癌前哨淋巴结活检术 158 例分析 [J].中南医学科学杂志,2016,44(1):38-40,50.
[2] 闫存礼,侯林都,夏秀林.原发肿瘤切除对晚期乳腺癌

患者远期预后的影响 [J].中南医学科学杂志,2016,44(6):667-669,684.
[3] 张晓娇,李小娜,张慧珠.叶黄素等天然抗氧化剂逆转 MCF-7/ADM 多药耐药作用的筛选及机制研究 [J].中药药理与临床,2014,30(3):35-39.
[4] 盛佳钰,陈红凤.MK-2206 联合顺铂对乳腺癌 4T1/DDP 移植瘤耐药性的影响 [J].实用肿瘤杂志,2017,32(1):33-38.
[5] 陈康,贺燕勤,于顾然.楮实子水煎剂对 H2O2 介导 PC12 细胞凋亡的影响 [J].四川中医,2017,35(2):41-44.
[6] Hazawa M, Kudo M, Iwata T, et al. Caspase-independent apoptosis induction of quorum-sensing autoinducer analogs against chronic myeloid leukemia K562 [J]. Invest New Drugs, 2012, 30(3):862-869.
[7] Erdogan M, Kulaksizoglu M, Ganidagli S, et al. Fas/FasL gene polymorphism in patients with Hashimoto's thyroiditis in Turkish population [J]. J Endocrinol Invest, 2017, 40(1):77-82.
[8] 陈干涛,董卫国.羟基树碱通过诱导自噬抗宫颈癌的机制研究 [J].实用癌症杂志,2017,32(3):349-353.
[9] Shi LY, Han Z, Li XX, et al. Inactivated Sendai virus strain Tianjin induces apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by promoting caspase activation and Fas/FasL expression [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2015, 30(1):33-40.
[10] 杨旭东,张杰,杨清东,等.白毛藤多糖联合阿霉素对乳腺癌细胞凋亡的影响 [J].中医药通报,2017,16(1):64-66,12.
[11] 易坚,刘志勇,刘凤恩.二氢丹参酮 I 抑制乳腺癌细胞生长的机制 [J].广东医学,2016,37(22):3371-3375.
[12] Baek JS, Cho CW. A multifunctional lipid nanoparticle for co-delivery of paclitaxel and curcumin for targeted delivery and enhanced cytotoxicity in multidrug resistant breast cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(18):30369-30382.
[13] 顾卓珺,王萌,方琼艳,等.载阿霉素普朗尼克化聚酰胺-胺树状聚合物对乳腺癌多药耐药细胞株 MCF-7/ADR 的抑制作用 [J].药科学报,2014,49(8):1188-1193.
[14] 农巧红,李柱,程勃然,等.PND 对乳腺癌多药耐药的逆转作用分析 [J].中国医学创新,2015,12(21):56-57.
[15] 王莹,刘继华,刘屹,等.HPLC 法测定磷酸咯萘啶注射液的含量 [J].海峡药学,2016,28(7):55-56.

(本文编辑:秦旭平)