

多药耐药相关蛋白在肝癌耐药细胞系 HepG2/Oxal 中的作用机制研究

滕凤猛¹, 吴 穷², 陈昌杰¹, 杨清玲¹, 王 惠¹

[摘要] **目的:**探讨多药耐药(multi-drug resistance, MDR)相关蛋白在肝癌细胞系 HepG2 及不同浓度耐奥沙利铂(oxaliplatin, Oxal)亚系中的表达及参与肝癌对 Oxal 耐药的机制。**方法:**以浓度递增法诱导肝癌细胞系 HepG2, 建立 2.5、5.0 μg/ml 的 Oxal 耐药亚系, 以半定量 RT-PCR 法测定 MDR、多药耐药相关蛋白(multi-drug resistance related protein, MRP)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)在亲代和不同耐药亚系中的 mRNA 表达, 并在蛋白水平以 Western blot 法验证基因表达的差异性。**结果:**成功建立了 IC₅₀ 值为 15 和 25 倍亲代细胞的 Oxal 耐药亚系(HepG2/Oxal); 在 mRNA 和蛋白水平, BCRP 的表达与 HepG2 的耐药性呈正相关, 而 MDR、MRP 的表达在耐药的早期升高不明显, 随着耐药程度的增加其表达增加。**结论:**BCRP 在 HepG2 对 Oxal 获得性耐药中起着重要作用, MDR 和 MRP 在 HepG2/Oxal 耐药过程中早期起的作用不明显, 随着耐药浓度的增加, 表达越来越高。

[关键词] 肝肿瘤; 奥沙利铂; 多药耐药蛋白; 乳腺癌耐药蛋白

[中国图书资料分类法分类号] R 735.7; R 979.1 **[文献标识码]** A

Role of multi-drug resistance proteins in drug resistance cell line HepG2/Oxal of hepatocellular carcinoma

TENG Feng-meng¹, WU Qiong², CHEN Chang-jie¹, YANG Qing-ling¹, WANG Hui¹

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of multi-drug resistance-associated proteins(MDR) in Hepatocellular cancer cell line HepG2 and in different concentrations of sub-cell line of oxaliplatin(Oxal), and to study the mechanism of their resistance to Oxal.

Methods: HepG2 multi-drug resistance sub-cell line was induced by increasing the concentration of Oxal progressively, and the drug resistance cell line 2.5 μg/ml HepG2/Oxal and 5.0 μg/ml HepG2/Oxal was successfully established. The mRNA expression of the MDR, the expression of multi-drug resistance related protein(MRP) and breast cancer resistance protein(BCRP) in the cell lines (HepG2/Oxal) of 2.5 μg/ml HepG2/Oxal and 5.0 μg/ml HepG2/Oxal were detected using RT-PCR, and the variability of the gene expression was verified by Western blot. **Results:** HepG2/Oxal drug resistance cell subseries with IC₅₀ value of 15 and 25 times were successfully constructed. BCRP expression was positively correlated with HepG2 drug resistance at mRNA and the protein level. But MDR and MRP did not display significant high expression in the prophase drug resistance subseries; the expression of MDR and MRP increased along with the rise of drug resistance level. **Conclusions:** BCRP plays an important role in the acquired character resistance of HepG2 cell line to Oxal; the expression of MDR and MRP is not obvious at the prophase of the resistance, but increases with the rise of the resistance level.

[Key words] liver neoplasms; oxaliplatin; multi-drug resistance protein; breast cancer resistance protein

肝癌为我国最常见的恶性程度极高、预后极差的恶性肿瘤之一, 发病率高, 治疗难度大, 手术切除(包括肝移植)是治愈的唯一方法; 对于不能切除

者, 采取消融和介入治疗等手段, 虽然提高了局部控制率, 却在延长患者的生存时间上不能令人满意。晚期肝癌的系统性化疗仍有重要的临床价值, 但部分患者往往由于肝癌细胞的多药耐药(multi-drug resistance, MDR)而导致化疗无效或逐渐由有效转为无效。MDR 的产生与多药耐药基因、多药耐药蛋白表达增多密切相关^[1]。肝癌的 MDR 是严重影响化疗效果及患者生存的主要原因。故研究肝癌对新一代化疗药物的 MDR 产生机制, 对提高肝癌的化疗效果, 延长患者的生存期及合理化疗方案的应用有着重要的意义。因此, 探讨奥沙利铂(oxaliplatin,

[收稿日期] 2010-02-03

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 临床检验诊断学实验中心, 安徽 蚌埠 233030, 2. 蚌埠医学院第一附属医院 肿瘤内科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 滕凤猛(1981-), 男, 硕士研究生。

[通讯作者] 陈昌杰, 博士, 硕士研究生导师, 教授, E-mail: bbmcccj@sohu.com

Oxal) 在肝癌 MDR 中的作用机制,为临床合理使用化疗方案及逆转剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 (1)细胞株:HepG2 细胞购于中科院细胞研究所,不同浓度的 HepG2/Oxal 耐药细胞株由本实验室建立。于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 37 ℃、5% 体积分数 CO₂ 条件下培养。(2)主要试剂:奥沙利铂购于美国 Sigma 公司,相对分子质量为 39 729;DMEM 培养基和胰酶均购自 Gibco 公司;MTT 由上海华舜生物有限工程公司生产。RNA 反转录试剂盒购于 Ferment 公司。兔抗人乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)、多药耐药相关蛋白 (multi-drug resistance related protein, MRP)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗、辣根过氧化物酶标记羊抗兔和大鼠抗小鼠多克隆抗体均购自北京中杉生物技术有限公司。ECL 发光试剂盒购自 Amersham 公司,Western blot 法使用的 PVDF 膜购于 Millipore 公司;预染标准分子量蛋白购自 GIBCO/BRL 公司。

1.2 方法

1.2.1 耐药细胞株的建立 采用浓度梯度诱导法建立 2.5、5.0 μg/ml 浓度的奥沙利铂耐药细胞株;HepG2/Oxal 诱导按文献[2]将 Oxal 浓度递增诱导至 5 μg/ml 的 DMEM 培养基中维持生长;成功获得 2.5、5.0 μg/ml 浓度下稳定耐药的细胞株,并在该浓度药物压力下稳定生长。

1.2.2 耐药性的测定 HepG2 细胞在含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。取对数生长期细胞,不同浓度的 Oxal 分别加入 HepG2 和 HepG2/Oxal 中作用 48 h 后 MTT 法测 A 值,重复 3 次取其平均值,计算细胞生存率 = (A 实验组 - A 空白组)/(A 对照组 - A 空白组) × 100%。根据细胞生存率绘制细胞存活曲线,计算 IC₅₀。

1.2.3 RT-PCR 检测亲本及不同浓度耐药亚系中 BCRP、MDR 和 MRP mRNA 表达水平 取对数生长期的亲本及 2.5、5.0 μg/ml 耐药亚系细胞,细胞 RNA 提取参照 Trizol 试剂说明书进行;cDNA 合成参照 Ferment 公司的反转录试剂盒合成。利用引物设计软件 Primer 5.0 设计,由上海生工生物有限公司合成。MDR sense:5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3', antisense:5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA - 3'(扩增片段为 156 bp);MRP sense:5'-

TGA AGG ACT TCG TGT CAG CC-3', antisense:5'-GTC CAT GAT GGT GTT GAG CC-3'(扩增片段为 256 bp);BCRP sense:5'-CAG GTG GAG GCA AAT CTT CGT-3', antisense:5'-ACA CAC CAC GGA TAA ACT GA-3'(扩增片段为 315 bp);GAPDH sense:5'-GGG AAG GTG AAG GTC GG AGT C - 3', antisense:5'-AGC AGA GGG GGC AGA GAT GAT-3'(扩增片段为 375 bp)。PCR 反应体系为 50 μl:cDNA10 μl,引物浓度为 50 nmol/L,Taq 酶 1 u。反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 变性 45 s,63 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 反应结束后,取 5 μl 产物于 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳,用 Bio-Rad 凝胶成像系统扫描并测定灰度值,判断耐药相关基因在亲本及不同耐药亚系中的表达水平。

1.2.4 Western blot 检测亲本及不同耐药亚系中耐药相关基因蛋白的表达 分别收集对数生长期的亲本细胞、2.5、5.0 μg/ml 耐药亚系的细胞,用细胞裂解液提取各细胞总蛋白,Brand-ford 法测定总蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳后转到 PVDF 膜。室温封闭 1 h,分别加兔抗人的 (BCRP、MDR、MRP) 一抗,抗体工作浓度为 1:200,GAPDH 作为内参,于 4 ℃ 孵育过夜。TBS-Tween 20 缓冲液洗膜 10 min × 3 次,加入 1:4 000 稀释辣根过氧化物酶标记的偶联二抗室温温育 1 h;TBS-Tween 20 缓冲液洗膜 10 min × 3 次。加入 ECL 液在 Bio-RAD 成像分析系统上成像并进行密度分析,表示 3 种耐药蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 HepG2/Oxal 性状测定 耐药细胞和亲本细胞的形态差异较大,且生长速度变慢。MTT 法测定发现 5.0 μg/ml HepG2/Oxal 细胞对 Oxal 的 IC₅₀ 是 12.5;2.5 μg/ml HepG2/Oxal 细胞对 Oxal 的 IC₅₀ 为 7.71;HepG2 细胞对 Oxal 的 IC₅₀ 是 0.49。5.0 μg/ml HepG2/Oxal 耐药亚系细胞 IC₅₀ 是亲本的 25 倍;2.5 μg/ml HepG2/Oxal 耐药亚系的 IC₅₀ 是亲本的 15 倍(见表 1)。

2.2 亲本及不同耐药亚系中耐药相关基因 mRNA 的表达 结果显示,在亲本 HepG2 细胞与不同浓度耐药亚系 HepG2/Oxal 细胞中,随着耐药浓度的增加,BCRP mRNA 的表达水平逐渐增加,各组间比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。MDR、MRP mRNA 的表达水平也逐渐增加,但亲本和 2.5 μg/ml 耐药

表 1 不同浓度作用下亲本与耐药细胞存活率 ($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	亲本细胞	2.5 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系	5.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系
0	1.00 \pm 0.000	1.00 \pm 0.000	1.00 \pm 0.000
0.25	0.62 \pm 0.015	0.98 \pm 0.012	0.99 \pm 0.017
0.5	0.45 \pm 0.017	0.96 \pm 0.018	0.97 \pm 0.020
1	0.37 \pm 0.025	0.93 \pm 0.023	0.96 \pm 0.027
1.5	0.29 \pm 0.036	0.92 \pm 0.031	0.94 \pm 0.036
2	0.25 \pm 0.042	0.91 \pm 0.035	0.93 \pm 0.041
2.5	0.20 \pm 0.051	0.89 \pm 0.043	0.91 \pm 0.052
5	0.17 \pm 0.043	0.76 \pm 0.027	0.90 \pm 0.035
7.5	0.13 \pm 0.022	0.55 \pm 0.011	0.73 \pm 0.021
10	0.10 \pm 0.013	0.27 \pm 0.026	0.54 \pm 0.034
F	408.80	416.40	104.15
P	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.001	0.001	0.001

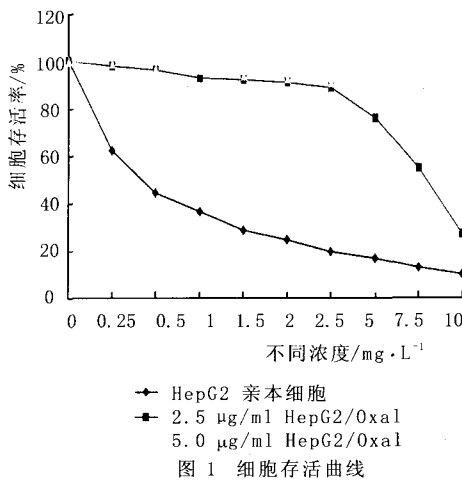


图 1 细胞存活曲线

表 2 亲本及不同耐药亚系中与 GAPDH mRNA 表达的相对密度比值 (%) 比较 ($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

分组	MDR 基因		
	BCRP	MDR	MRP
HepG2 亲本细胞	1.56 \pm 0.34	0.42 \pm 0.10	0.43 \pm 0.08
2.5 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系	27.31 \pm 0.58*	0.61 \pm 0.14	0.51 \pm 0.10
5.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系	33.52 \pm 0.65*	0.84 \pm 0.21*	0.61 \pm 0.11*
F	4 925.87	9.00	4.28
P	<0.01	<0.01	<0.05
MS _{组内}	0.292	0.025	0.100

q 检验:与 HepG2 亲本细胞组比较 * $P < 0.05$

表 3 亲本及不同浓度耐药亚系中蛋白表达与 GAPDH 的相对密度比值 (%) 比较 ($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

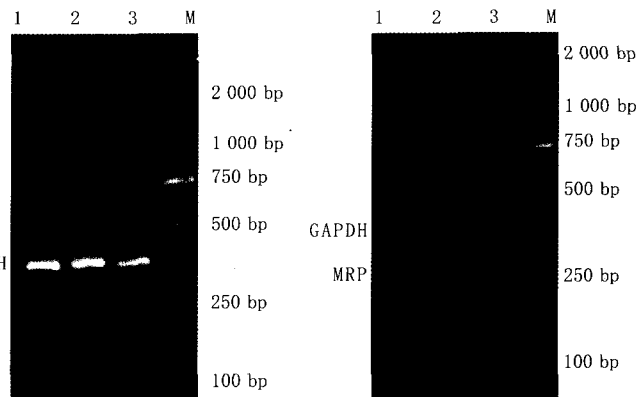
分组	MDR 蛋白		
	BCRP	MDR	MRP
HepG2 亲本细胞	1.23 \pm 0.31	0.37 \pm 0.10	0.40 \pm 0.09
2.5 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系	25.42 \pm 0.67*	0.52 \pm 0.16	0.52 \pm 0.13
5.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系	32.78 \pm 0.86*	0.78 \pm 0.23*	0.69 \pm 0.20*
F	3 181.40	7.29	4.90
P	<0.01	<0.01	<0.05
MS _{组内}	0.428	0.030	0.022

q 检验:与 HepG2 亲本细胞比较 * $P < 0.05$

亚系之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 亲本与 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 及 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 1、表 2)。

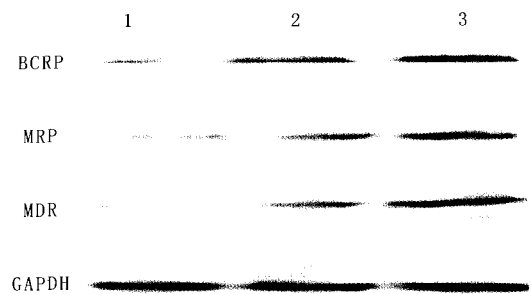
2.3 亲本及不同耐药亚系中耐药基因蛋白的表达

结果显示,在亲本 HepG2 细胞与不同浓度耐药亚系 HepG2/Oxal 细胞中:(1)随着耐药浓度的增加,BCRP 的表达水平逐渐增加,且各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。(2)随着耐药浓度的增加,MDR、MRP 的表达水平也逐渐增加 ($P < 0.01$);亲本和 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但亲本与 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐药亚系之间相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2、表 3)。



1:5.0 $\mu\text{g/ml}$ HepG2/Oxal; 2:2.5 $\mu\text{g/ml}$ HepG2/Oxal; 3:HepG2 亲本细胞; M:Marker

图 2 3种耐药基因在亲本及不同耐药亚系中mRNA的表达



1:亲本 HepG2 细胞; 2:2.5 $\mu\text{g/ml}$ HepG2/Oxal 耐药亚系; 3:5.0 $\mu\text{g/ml}$ HepG2/Oxal 耐药亚系

图 3 3种耐药蛋白在亲本及不同耐药亚系细胞中蛋白的表达

3 讨论

肝癌在我国发病率高,治疗难度大,预后凶险。晚期肝癌的系统性化疗仍有重要的临床价值,顺铂、阿霉素等既往用于肝癌化疗的药物有效率低,不能显著延长患者的生存期,新一代化疗药物如 Oxal、吉西他滨和卡培他滨等的疗效有了显著提高。虽然分子靶向药物代表了晚期肝癌药物治疗的方向,但从

我国的医疗现状和成本效益角度分析,化疗仍然是晚期肝癌系统治疗的基础。最近,多个Ⅱ期临床研究^[3-4]表明含有新一代化疗药物的方案如 GEMOX、XELOX 等,在控制晚期肝癌进展、改善生活质量方面疗效确切,并初步观察到生存期获益,且这些方案与分子靶向药物联合使用有增效作用^[5]。可见,新一代化疗药物的联合方案,或与分子靶向药物联合应用,在晚期肝癌系统性治疗方面取得了长足进步。

然而,肝癌耐药是系统性化疗失败的根源。肿瘤耐药有内在性和获得性 2 种类型,前者是肿瘤细胞原发性耐药,后者是肿瘤细胞在反复接触药物的过程中获得的耐药,也为临床上主要的耐药形式。肿瘤细胞耐药机制包括:药物聚集降低、细胞内药物分布改变、细胞周期失控、凋亡反应降低、基因损伤修复增加以及药物靶标突变等^[6]。目前已知肝癌耐药主要与药物转运系统或者代谢酶的异常表达有关,而凋亡抑制蛋白 IAPs 和转录因子 NF- κ B 等的异常激活,也在很大程度上决定了肝癌对药物的反应。例如:转运体 P 糖蛋白(P-gp, MDR1)的过表达参与了肝癌的 MDR^[7],其他药物转运体 MRP、肺抗拒相关蛋白等参与了不同药物在肝癌中的化疗抗拒^[8]。可见,肝癌具有复杂和多面的耐药机制。

本研究通过奥沙利铂浓度递增诱导法建立不同浓度的 HepG2/Oxal 耐药亚系模型,其耐药程度较亲本细胞大大提高,且能够获得稳定的耐药表型;这与文献^[9]报道相类似。进一步研究显示,肝癌 MDR 细胞 HepG2/Oxal 中 BCRP 随着耐药浓度的增加而增加;MDR 和 MRP 表达随着耐药浓度的增加而增加,但在开始低浓度耐药时所增加的不是很明显,随着耐药浓度的增大,MDR 和 MRP 增加的越明显。并且在蛋白水平也发现了这 3 个基因在耐药细胞中高表达,并与 RT-PCR 相一致。揭示了这 3 个基因的高表达是肝癌 MDR 机制的重要分子基础,在肝癌 MDR 中 BCRP 起主要作用,这与袁翔等^[10]报道的通过抑制 CK8 和 BCRP 的表达可以有效逆转乳腺癌对奥沙利铂 MDR 相一致。MDR 和 MRP 在低剂量耐药中起的作用很小;但随着耐药浓度的增大所起的作用越来越明显。

通过比较我们发现在肝癌的耐药过程中,不同的耐药基因所起的作用不同,肝癌细胞对不同药物耐药的过程中有不同的耐药基因参与。例如李高

鹏^[11]等报道的 HepG2/ADM 中起主要作用的是 MDR1 和 BCRP,但 MRP1 与肝癌的耐药无关。本研究显示 HepG2/Oxal 的耐药与这 3 个基因相关,只是在不同时间段起的作用不同,肝癌的 MDR 与国外报道的如在白血病和结直肠癌中得到的结果不同,这可能与不同组织来源的肿瘤细胞多药耐药机制的相对独立性有关。本文揭示了在肝癌耐药的过程可能是一个多因素参与的过程,在不同的阶段耐药蛋白所起的不同作用,为我们对肝癌耐药逆转提供了新的靶点,也为临床上合理的安排化疗方案,防止肿瘤耐药的形成和新的靶向分子药物的应用提供了良好的理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] 胡俊峰,夏雪梅,李殿明,等. LRP 和 MRP 在肺癌中表达及其临床意义[J]. 蚌埠医学院学报,2010,25(1):17-19.
- [2] Yan T,Zhang LF. Establishment of multidrug-resistant breast cancer cell line MCF-7/MDR_a and its preliminary analysis on the biological properties[J]. Chin J Cell Biol,2006,29(4):591-595.
- [3] Samy L,Valerie B,Michel D, et al. Gemcitabine plus oxaliplatin in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2007,109(7):1384-1390.
- [4] Boige V,Raoul JL,Pignon JP, et al. Multicentre phase II trial of capecitabine plus oxaliplatin in patients with advanced hepatocellular carcinoma: FFCO 03-03 trial[J]. Br J Cancer, 2007,97(7):862-867.
- [5] Asnacios A,Fartoux L,Romano O, et al. Gemcitabine plus oxaliplatin combined with cetuximab in patients with progressive advanced stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter phase 2 study[J]. Cancer,2008,112(12):2733-2739.
- [6] Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance[J]. Annu Rev Med,2002,53:615-617.
- [7] Ng IO,Liu CL,Fan ST, et al. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response[J]. Am J Clin Pathol,2000,113(3):355-363.
- [8] Nies AT,Konig J,Pfannschmidt M, et al. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer,2001,94(4):492-499.
- [9] 马晓峰,张莲芬,屈琳,等. 化疗药体外干预诱导人乳腺癌细胞产生耐药性的研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(11):733-777.
- [10] 袁翔,陈昕,许元富,等. 降低细胞膜角蛋白 8 和乳腺癌耐药蛋白的表达逆转耐药性[J]. 中国药理学通报,2009,25(11):1425-1429.
- [11] 李高鹏,陈孝平,王其,等. 多药耐药蛋白在肝癌耐药细胞系 HepG2/ADM 中的作用[J]. 中华普通外科杂志,2006,21(11):766-768.

(本文编辑 刘璐)