

P-gp 和 MDR₁ 在三种乳腺癌细胞中表达差异研究 *

谌海燕¹ 侯 丽¹ 李冬云¹ 柴立民² 陈信义^{1,2△}

(1 北京中医药大学东直门医院血液肿瘤科 北京 100700 ;2 北京市与教育部重点实验室(中医内科学) 北京 100700)

摘要 目的:比较 P-gp 和 MDR₁ 在人乳腺癌敏感细胞(MCF-7/S)和耐药细胞(MCF-7/ADR、MCF-7/TAM)中的表达差异,初步探讨乳腺癌细胞对阿霉素与对三苯氧胺产生耐药机制的区别。方法:采用免疫细胞化学法、流式细胞术检测 P-gp,采用实时荧光定量 PCR 法检测 MDR₁ 在三种乳腺癌细胞中的表达情况。结果:在 MCF-7/ADR 细胞中 P-gp 和 MDR₁ 均呈高表达,阳性表达率与 MCF-7/S 细胞比较,有统计学意义($P<0.01$)。在 MCF-7/TAM 细胞中 P-gp、MDR₁ 均呈低表达,与 MCF-7/S 细胞比较,无统计学意义($P>0.05$)。结论 P-gp 和 MDR₁ 的高表达是乳腺癌细胞对阿霉素产生耐药的主要机制,而并非是乳腺癌细胞对三苯氧胺产生耐药的机制。

关键词 乳腺癌 耐药 P-gp MDR₁

中图分类号 R737.9 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)10-1808-04

The Study of Differential Expression of P-gp and MDR₁ in Three Breast Cancer Cells*

CHEN Hai-yan¹, HOU Li¹, LI Dong-yun¹, CHAI Li-min², CHEN Xin-yi^{1,2△}

(1 Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2 The Key Laboratory of Beijing (Traditional Chinese Physician), Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: To compare the differential expression of P-gp and MDR₁ in human breast cancer sensitive cells(MCF-7/S) and resistant cells (MCF-7/ADR, MCF-7/TAM), and to preliminary distinguish the mechanism between breast cancer cells resistant to adriamycin and to tamoxifen. **Methods:** We detected the expression of P-gp by using the methods of immunocytochemistry and flow cytometry, and detected the expression of MDR₁ by using real-time fluorescence quantitative PCR in the three breast cancer cells. **Results:** In MCF-7/ADR cells, P-gp and MDR₁ showed a high expression, which had a statistical significance compared with MCF-7/S cells ($P<0.01$). In MCF-7/TAM cells, P-gp and MDR₁ showed a low expression, which had no statistical significance compared with MCF-7/S cells ($P>0.05$). **Conclusion:** The high expression of P-gp and MDR₁ is the main mechanism in breast cancer cells resistant to adriamycin, and is not the mechanism in breast cancer cells resistant to tamoxifen.

Key words: Breast cancer; Resistant; P-gp; MDR₁

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)10-1808-04

与肿瘤患者接受化疗药物一样,雌激素受体阳性的乳腺癌患者长期接受三苯氧胺(Tamoxifen,TAM)治疗也会产生耐药性。因此,难以提高临床疗效便成为乳腺癌内分泌治疗中的难题^[1]。目前,已知由 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)介导的 MDR 是乳腺癌细胞对化疗药物产生耐药的经典机制^[2]。但乳腺癌细胞对内分泌治疗的耐药机制与 P-gp 高表达之间的关联性国内未曾见到文献报道。因此,以人乳腺癌敏感细胞(MCF-7/S)、耐三苯氧胺细胞(MCF-7/TAM)和耐阿霉素细胞(MCF-7/ADR)为对象,研究 P-gp 及其编码基因 MDR1 在三种乳腺癌细胞中的表达差异,对于了解乳腺癌细胞耐化疗药物与耐三苯氧胺的发生机制,并选择应对措施具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人乳腺癌细胞系(MCF-7/S)由中国中医科学院肿瘤研究所林洪生教授惠赠;耐三苯氧胺的人乳腺癌细胞系(MCF-7/TAM)由美国弗吉尼亚大学医学院内科岳微教授惠赠;耐阿霉素的人乳腺癌细胞系(MCF-7/ADR)由中南大学湘雅医学院细胞库惠赠。上述三种细胞均培养在含 5%胎牛血清的 IMEM 培养基中,耐药细胞于实验前一周撤药。

1.2 试剂和仪器

胎牛血清和 IMEM 培养基均为 Gibco 公司产品;TAM 为 Sigma 公司产品;ADR 为 Biobasic Inc 公司产品;流式抗体 P-gp 为 eBioscience 公司产品;免疫组化多克隆抗体 P-gp 购自武汉博士德生物科技有限公司;Trizol 为 Invitrogen 公司产品;反转录试剂盒为 Promega 产品;SYBR GREEN Mix 为美国 ABI 公司产品;MDR₁ 引物由北京奥科生物科技有限公司合

* 基金课题 北京中医药大学自主创新课题(2009TYBZZ-XS057)

作者简介:谌海燕(1982-),女,博士研究生,研究方向:中药治疗乳腺癌应用研究,E-mail:chenhaiyan590@163.com

△通讯作者:陈信义,教授,博士研究生指导教师,E-mail:chenxinyi0729@126.com

(收稿日期:2011-10-09 接受日期:2011-10-30)

成。荧光定量 PCR 仪为美国 Agilent 公司产品,型号 Mx3000P;流式细胞仪为 Beckman-Coulter 产品,型号为 EPICS-XL;免疫细胞化学图像分析系统为 Olympus 产品,型号为 BX60。

1.3 方法

1.3.1 免疫细胞化学法检测 P-gp 表达 将载玻片在 1:10 的多聚赖氨酸中浸泡 10min,干燥过夜。取对数生长期细胞 MCF-7/S、MCF-7/TAM 和 MCF-7/ADR 分别接种于预置载玻片的 24 孔培养板内,接种细胞数为 2.5×10^4 个,37℃ 5%CO₂ 条件下培养 48h。然后用 PBS 洗 3 次,用 4%多聚甲醛常温下固定细胞 20min,再用 PBS 洗 3 次,最后按照免疫细胞化学试剂盒说明书进行操作,并用图像分析系统检测 P-gp 表达强度。

1.3.2 流式细胞术检测 P-gp 表达 取对数生长期细胞接种于 6 孔板内,37℃ 5%CO₂ 条件下培养 48h。收集细胞, PBS 洗 2 次,重悬于 100μl PBS 中,加 P-gp 流式单克隆抗体 5μl,混匀,室温避光孵育 30min,用 1%多聚甲醛固定,上机检测 P-gp 的荧光强度,重复实验 3 遍。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 法检测 MDR₁ 表达 (1)引物 MDR₁ 基因上游是 1ccctctccccgcgactct,下游是 1cccccttgcatgagatg-ca,扩增片段长度为 270bp,β-actin 基因上游是 1cctccctggagaa-gagcta,下游是 1caggaggagcaatgatcttg,扩增片段长度为 302bp;引物序列方向均是 5' 端至 3' 端。

(2) RNA 提取和 cDNA 合成 细胞培养 48h 后,用 Invotri-gen 公司的 Trizol 提取 RNA,测 A260 和 A280 的吸光值,计算出 RNA 浓度,采用 M-MLV 逆转录酶按 30μl 体系将 1.5μg RNA 逆转录成 cDNA。反应体系为 M-MLV 1μl, RNA 酶抑制

剂 1μl, Oligo dT 1μl, dNTP 2μl, 5× RT-buffer 6μl, RNA 1.5μg, 无 RNA 酶水补足至 30μl。反应条件:42℃ 1h→95℃ 5min,终止反应。合成后的 cDNA 于 -20℃ 保存。

(3) 实时荧光定量 PCR 法 20μl 反应体系:含 2× SYBR GREEN Mix 10μl, MDR₁ 和 β-actin(0.5μg/μl)上、下游引物各 1μl, cDNA 1μl, 无 RNA 酶水 7μl。在 ABI Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪上进行扩增,反应条件为:95℃ 5min(预变性)→95℃ 30s(变性)→57℃ 30s(退火)→72℃ 30s(延伸)→72℃ 5min(后延伸),共 40 个循环。溶解曲线模式定为:95℃ 1min,55℃ 30s,95℃ 30s。

(4) 数据处理与分析 将目的基因在耐药细胞内相对于敏感细胞的表达差异倍数用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算来表示^[3]。 $\Delta Ct = Ct$ (MDR₁ 基因)-Ct (β-actin 基因), $-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct \text{ 耐药细胞} - \Delta Ct \text{ 敏感细胞})$ 。当 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$, 目的基因表达上调,反之下调。

1.4 统计方法

实验数据采用 SPSS13.0 统计软件处理,多组均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学法检测的 P-gp 表达结果

P-gp 在 MCF-7/S、MCF-7/TAM 和 MCF-7/ADR 三种乳腺癌细胞中均有表达,阳性为棕黄色颗粒,主要分布在细胞膜和细胞浆内,免疫细胞化学染色与分析结果见图 1、表 1。

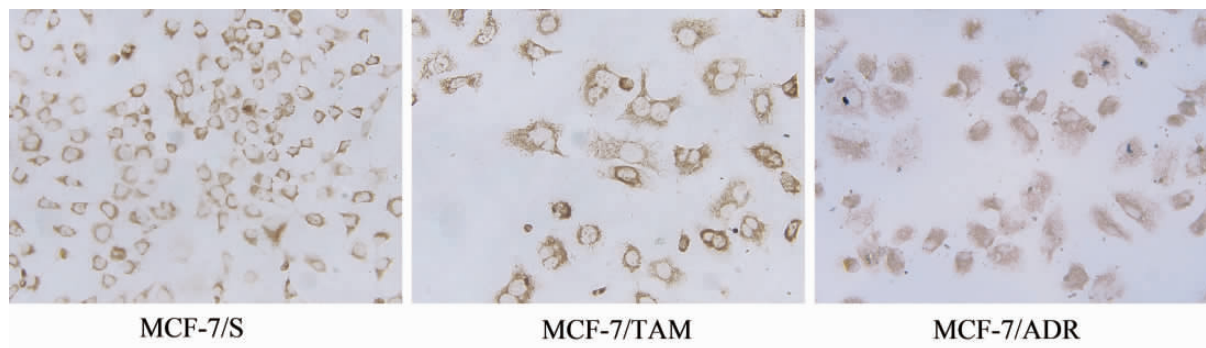


图 1 三种乳腺癌细胞中 P-gp 的表达(× 400)

Fig.1 The expression of P-gp in three breast cancer cells(× 400)

从图 1 可以看出, P-gp 在 MCF-7/S、MCF-7/TAM 细胞中呈弱表达,而在 MCF-7/ADR 细胞膜与细胞浆具有明显表达。

表 1 P-gp 在三种乳腺癌细胞中的表达($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 1 The expression of P-gp in three breast cancer cells

Breast cancer cells	Average optical density of P-gp
MCF-7/S	0.23 ± 0.02
MCF-7/TAM	$0.22 \pm 0.04^{\Delta}$
MCF-7/ADR	$0.30 \pm 0.02^{*}$

Note: Compared with MCF-7/S, $^{\Delta}P>0.05$, $^{*}P<0.01$

从表 1 可以看出, MCF-7/ADR 细胞的 P-gp 表达强于

MCF-7/S、MCF-7/TAM 细胞,具有统计学意义 ($P<0.01$);而 MCF-7/S 细胞与 MCF-7/TAM 细胞比较,无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 流式细胞术检测的 P-gp 表达结果

P-gp 在 MCF-7/S、MCF-7/TAM 和 MCF-7/ADR 细胞中均有表达(见图 2)。其中, MCF-7/S 和 MCF-7/TAM 细胞中 P-gp 平均荧光强度分别为 4.32 ± 0.83 、 5.67 ± 0.76 ,二者比较,无统计学意义 ($P>0.05$)。MCF-7/ADR 细胞中 P-gp 平均荧光强度为 251.4 ± 6.22 ,与 MCF-7/S 细胞相比,有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测的 MDR₁ 表达结果

从扩增曲线可见待测样品均已进入扩增的平台期,反应条件设定准确(见图 3、图 4),溶解曲线单一,未见杂峰,说明产

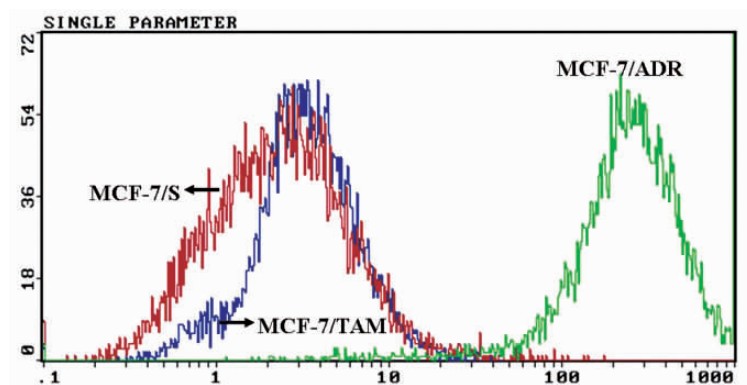


图 2 P-gp 在三种乳腺癌细胞中的荧光强度比较

Fig.2 The comparison of fluorescence intensity of P-gp in three breast cancer cells

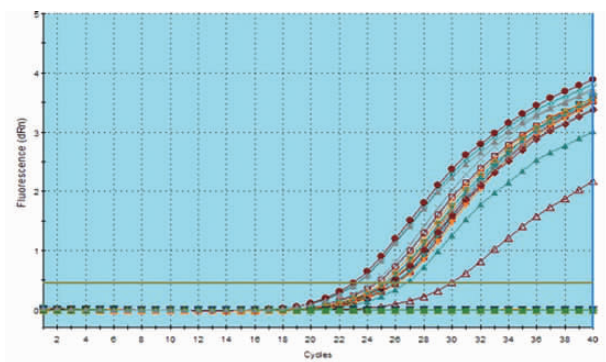


图 3 实时荧光定量 PCR-action 扩增曲线

Fig.3 The FQ-PCR amplification curves of action

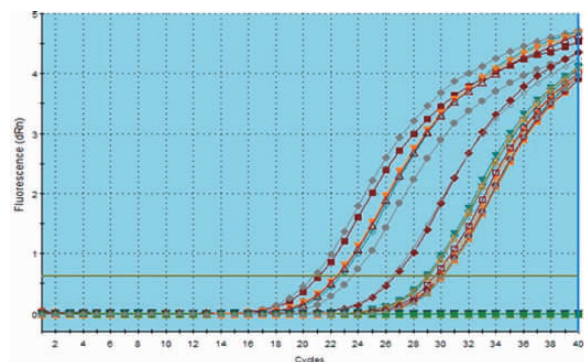


图 4 实时荧光定量 PCR MDR1 扩增曲线

Fig.4 The FQ-PCR amplification curves of MDR1

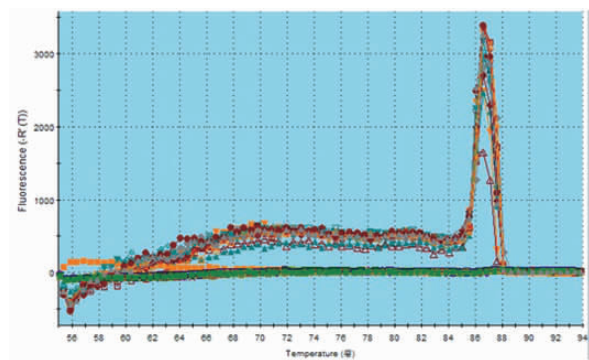


图 5 实时荧光定量 PCR-action 溶解曲线

Fig. 5 The FQ-PCR dissociation curves of action

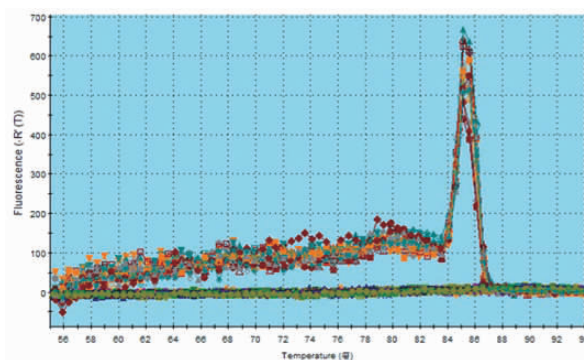


图 6 实时荧光定量 PCR MDR1 溶解曲线

Fig.6 The FQ-PCR dissociation curves of MDR1

表 2 MDR₁ 在三种乳腺癌细胞中的表达

Table 2 The expression of MDR₁ in three breast cancer cells

Breast cancer cells	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	P
MCF-7/S	2.14± 0.74	1	
MCF-7/TAM	2.07± 0.12	1.06± 0.44 [△]	0.990
MCF-7/ADR	-5.67± 0.072	243.95± 57.74*	0.008

Note: Compared with MCF-7/S, [△]P>0.05, *P<0.01

物特异性较好(见图 5、图 6)。统计结果显示(见表 2)。

从表 2 可以看出, MCF-7/TAM、MCF-7/S 细胞中的 MDR₁ 表达相比较, 无统计学意义(P>0.05)。MCF-7/ADR 细胞中的 MDR₁ 表达明显高于 MCF-7/S、MCF-7/TAM 细胞(P<0.01)。

3 讨论

P-gp 是 MDR₁ 基因编码的一种能量依赖性转运蛋白, 最早由 Ling 等^[4]在对秋水仙碱耐药的中国仓鼠卵巢癌细胞上分离发现。它能将肿瘤细胞内的抗癌药物泵出细胞外, 从而降低细胞内的药物浓度, 使抗癌药物的细胞毒性作用减弱或丧失^[5-7], 导致细胞耐药。P-gp 作为防御保护机制, 在人体正常组织如肠

道、肝、肾以及血脑屏障、胎盘屏障的上皮细胞中均有表达,其目的是对药物或化疗物质的吸收、分布、排泄发挥调控作用,且能抵御外源性毒素对机体正常组织造成的损伤^[8]。而在对化疗药物不敏感或疗效差的肿瘤细胞中 P-gp 均为高表达^[9]。多项研究结果显示 P-gp 过度表达是乳腺癌对化疗药物产生耐药性主要原因之一^[10]。但与乳腺癌对内分泌治疗产生耐药性是否有相关性,国内外文献很少报道。

基于上述原因,我们利用免疫细胞化学法、流式细胞术与实时荧光定量 PCR 技术检测了 P-gp 和 MDR₁ 在三种乳腺癌细胞中的表达差异。结果发现 P-gp 在 MCF-7/S 和 MCF-7/TAM 细胞中表达无统计学意义 ($P > 0.05$); 而在 MCF-7/ADR 细胞中具有高表达,与 MCF-7/S、MCF-7/TAM 细胞比较,具有统计学意义 ($P < 0.01$)。实时荧光定量 PCR 技术检测的 MDR1 基因在三种乳腺癌细胞中表达结果与 P-gp 表达结果基本一致。MDR₁ 及其编码的 P-gp 在对阿霉素耐药的乳腺癌细胞中均呈高表达,在耐三苯氧胺的乳腺癌细胞与敏感的乳腺癌细胞中表达不明显。结论认为 MDR₁ 及其编码的 P-gp 高表达是 MCF-7/ADR 细胞的主要耐药机制,而与 MCF-7/TAM 细胞耐药机制无明显相关性。

参考文献(References)

- [1] Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(9): 631-643
- [2] Liscovitch M, Lavie Y. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research[J]. IDrugs, 2002, 5(4): 349-355
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [4] Juliano R L, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 455(1): 152-162
- [5] Pleban K, Kopp S, Csaszar E, et al. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(2): 365-374
- [6] Rosenberg MF, Callaghan R, Modok S, et al. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state [J]. J Biol Chem, 2005, 280(4): 2857-2862
- [7] Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer[J]. FEBS Lett, 2006, 580(12): 2903-2909
- [8] 涂春华, 杨冬梓. P-糖蛋白结构及作用机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(1): 7-11
- [9] Tu C H, Yang D Z. Molecular structure and functions of P-glycoprotein[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2009, 25(1): 7-11
- [10] Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I, et al. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines [J]. Br J Cancer, 2003, 88(12): 1963-1970
- [10] 张小平, 陶永辉, 陈其亮, 等. 人乳腺癌细胞 MCF-7 紫杉醇耐药株的建立及其生物学特征研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(6): 804-809
- Zhang X P, Tao Y H, Chen Q L, et al. Establishment and characteristics of a paclitaxel resistant human mammary adenocarcinoma cell sub-line (MCF-7/Taxol)[J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24(6): 804-809