

文章编号:1005-6947(2006)03-0202-04

· 实验研究 ·

葡萄籽多酚逆转胆囊癌细胞株 GBC-SD 耐药的研究

杨凤辉, 王占民, 乌新林

(山东大学齐鲁医院 普通外科, 山东 济南 250012)

摘要:目的 研究葡萄籽多酚(GSP)逆转先天性耐药细胞株 GBC-SD 耐药的机制,寻找高效低毒的耐药逆转剂。方法 选择先天性耐药细胞株 GBC-SD 为研究对象。MTT 比色法测定各化疗药物的半数抑制浓度(IC₅₀);RT-PCR 测定 MDR1 mRNA 的变化;流式细胞仪检测 P-gp, bcl-2 蛋白和细胞内阿霉素浓度的变化。结果 (1)无毒(3 μg/mL)和低毒(6 μg/mL)浓度的 GSP 处理后各化疗药物的 IC₅₀ 值均明显下降($P < 0.05$),能明显逆转 GBC-SD 的多药耐药性;(2)上述两浓度的 GSP 能下调 GBC-SD 细胞 MDR1 mRNA 表达($P < 0.05$);(3)上述两浓度的 GSP 能下调 GBC-SD 细胞 P-gp 和 bcl-2 蛋白表达($P < 0.05$);(4)GSP 增加 GBC-SD 细胞内 ADM 药物浓度($P < 0.05$)。结论 GSP 能部分逆转先天性耐药细胞株 GBC-SD 多药耐药性,其作用机制为下调 GBC-SD 细胞 MDR1 mRNA,及 P-gp 和 bcl-2 蛋白表达。

关键词: 胆囊癌细胞株; 葡萄籽多酚/药理学; 耐药性

中图分类号: R735.8; R915

文献标识码: A

Study on reversal of multidrug resistance of GBC-SD cell lines by grape seed polyphenols

YANG Feng-hui, WANG Zhan-min, WU Xin-lin

(Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of reversal of multidrug resistance of GBC-SD cell lines by grape seed polyphenols (GSP). **Methods** GBC-SD cell lines were used to determine the effect of GSP. MTT assay was adopted to evaluate the cytotoxicity (IC₅₀), RT-PCR were used to determine MDR1 mRNA, P-gp, bcl-2 and cellular adriamycin was measured by flow cytometry. **Results** In non-toxic (3 μg/mL) and low toxic (6 μg/mL) concentration of GSP treated group ($P < 0.05$), the IC₅₀ of chemotherapeutic agents was reduced the expression of P-gp, bcl-2 and MDR1 mRNA inhibited ($P < 0.05$), and cellular accumulation of adriamycin increased ($P < 0.05$). **Conclusions** GSP could reverse multidrug resistance of GBC-SD cell lines, and the suggested mechanism is that GSP decreased the expression of P-gp, bcl-2 and MDR1 mRNA.

Key words: Gallbladder Carcinoma Cell Line; Grape Seed Polyphenols/pharm; Multidrug Resistance

CLC number: R735.8; R915

Document code: A

胆囊癌为胆道系统常见的恶性肿瘤,手术切除率较低,手术后常死于肿瘤复发或转移,化疗仍是其重要的治疗手段,但化疗效果往往较差。研究证明

肿瘤的先天性耐药是影响其化疗效果的重要原因。寻找合适的耐药逆转剂是当前的研究热点。常用的耐药逆转剂如环孢素 A、维拉帕米等,因毒副作用较大而难用于临床。有研究证明葡萄籽多酚(GSP)在体内有一定的抗肿瘤作用且副作用小,药效学研究发现其有理想的耐药逆转剂特征。本实验所用胆囊癌细胞株 GBC-SD 为一先天性耐药细胞株,呈多药耐药基因(MDR1 基因)及 P-gp 和 bcl-2

收稿日期:2005-05-19; 修订日期:2005-08-15。

作者简介:杨凤辉,男,山东聊城人,山东大学齐鲁医院副主任医师,主要从事肝胆胰疾病的诊断和治疗方面的研究。

通讯作者:杨凤辉 电话:0531-85186931; E-mail:yangfh66@tom.com。

蛋白高表达。本实验旨在研究 GSP 对 GBC-SD 耐药的逆转作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

GBC-SD 细胞株由本院普外科所建立。用含 10% 小牛血清及青、链霉素各 100 U/mL 的 1640 培养液置于 37℃、饱和湿度的 5% CO₂ 培养箱内,隔天换液;细胞长满瓶底后,以 0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。GSP 由本校遗传教研室提供,纯度 95%;以二甲基亚砷溶解后,以 1640 培养液配置成母液后过滤 -20℃ 冻存储用。用时以 1640 培养液稀释至工作浓度。胎牛血清购自杭州四季青公司;MTT 购自 Sigma 公司;阿霉素购自深圳万乐药业公司;小鼠抗人 P-gp, bcl-2 单抗购自晶美公司。引物合成:β-action 及 mdr1 基因序列由北京百胜生物工程公司合成。MDR1 上游引物为 5-ACTGAGCCTGCAGGTGAAGA-3;下游引物为 5-CCACCAGAGAGCTGAGTTCC-3;扩增产物为 396bp。以 β-action 为内参照。β-action 序列上游引物为 5-AGCAGAGAATGGAAAGTCAAAA-3';下游引物为 5-ATGCTGCTTACATGTCTCGAT-3;扩增产物为 266bp。

1.2 MTT 比色法测定各化疗药物的半数抑制浓度 (IC₅₀) 和 GSP 的逆转试验

接种 96 孔板,每孔 10⁴ 个细胞。24h 贴壁后加入化疗药物和 GSP;调整药物终浓度,终体积为 200 μL。每种浓度设 5 个复孔,培养 72h 后每孔加入 20 μL MTT,培养 4h 后吸出培养液,加入 150 μL DMSO,轻微震荡 10 min。酶标仪检测每孔的吸光度 (A) 值,计算生长抑制率;寇氏法计算各药物的 IC₅₀ 值。

1.3 GSP 作用前后 MDR1 mRNA 的测定

根据预实验结果,细胞传代贴壁后分别加入无毒剂量 (3 μg/mL) 及低毒剂量 (6 μg/mL) GSP,共同培养 72h 后收集细胞,提取 RNA 行逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR)。

1.4 GSP 作用前后 P-gp 和 bcl-2 蛋白的测定

同上,根据预实验结果,细胞传代贴壁后分别加入无毒剂量 (3 μg/mL) 及低毒剂量 (6 μg/mL) GSP,共同培养 72h 后收集细胞。PBS 洗 2 次后弃

上清,将细胞以 1 × 10⁶/mL 悬于 70% 乙醇中固定,流式细胞仪分别检测 P-gp, bcl-2 的蛋白表达。

1.5 细胞内阿霉素浓度的测定

根据阿霉素自发荧光的特性,采用流式细胞仪检测细胞内阿霉素浓度。取对数生长期细胞 10⁶ 个分别加入 5 μmol/L 阿霉素和无毒及低毒剂量 GSP,37℃ 保温 3h;收集细胞,1 500 r/min 离心 2 min,培养液洗 1 次,37℃ 孵育 10 min,培养液再洗 1 次,加入冷培养液,流式测细胞荧光强度。

1.6 统计学处理

数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;统计学分析采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 GSP 对 GBC-SD 的抑制率及对化疗剂 IC₅₀ 的影响

GSP 单独与 GBC-SD 作用 72h 均表现抑制作用,并呈剂量依赖关系 (图 1)。3 μg/mL 浓度的 GSP 细胞抑制率小于 10%,6 μg/mL 浓度的 GSP 细胞抑制率小于 20%。故分别取 3 μg/mL 和 6 μg/mL 作为无毒和低毒逆转浓度。结果显示两种浓度 GSP 处理后各化疗药物的 IC₅₀ 值均明显下降,与 GSP 处理前比较,差异均有显著性 ($P < 0.05$) (附表)。

图 1 GSP 对 GBC-SD 的抑制作用

附表 GSP 逆转化疗药物耐药的作用

GSP(μg/mL)	IC ₅₀ 值(μg/mL)		
	阿霉素	顺铂	5-氟尿嘧啶(5-FU)
0	14.62 ± 0.11	4.26 ± 0.14	104.37 ± 2.35
3	7.85 ± 0.07	2.84 ± 0.06	76.74 ± 1.17
6	3.27 ± 0.05	1.27 ± 0.05	62.52 ± 2.08
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 GSP 下调 GBC-SD 细胞 MDR1 mRNA 的表达

GBC-SD 细胞 MDR1 高表达,可见两条清晰的条带,266bp 的 β -action 和 396bp 的 *mdr 1* 基因片段(图2)。无毒剂量 GSP 处理 72h 后, β -action 仍清晰,*mdr1* 变浅,低毒剂量 GSP 处理 72h 后 *mdr1* 明显变浅。GSP 处理前 MDR1 mRNA 相对表达量为 0.90;无毒剂量 GSP 处理 72h 后 MDR1 mRNA 相对表达量为 0.61,低毒剂量 GSP 处理 72h MDR1 mRNA 相对表达量为 0.32,与 GSP 处理前比较,差异均有显著性 ($P < 0.05$)。

2.3 GSP 下调 GBC-SD 细胞 P-gp 蛋白

GBC-SD 细胞 P-gp 蛋白表达 87%,无毒剂量 GSP 和 GBC-SD 细胞共同作用细胞 72h,P-gp 蛋白表达下降为 57%(图3),低毒剂量 GSP 和 GBC-SD 细胞共同作用细胞 72h,P-gp 蛋白表达下降为 28%(图4),与 GSP 处理前比较,差异均有显著性 ($P < 0.05$)。

m: Marker; a b c: β -action; a': GBC-SD 细胞 MDR1 mRNA 表达; b':无毒剂量 GSP 处理后 mRNA 表达; c':低毒剂量 GSP 处理后 mRNA 表达

图2 RT-PCR 检测 GSP 处理前后 MDR1 mRNA 表达

2.4 GSP 下调 GBC-SD 细胞 bcl-2 表达

GBC-SD 细胞 bcl-2 蛋白表达 76%。无毒剂量 GSP 和 GBC-SD 细胞共同作用细胞 72h,bcl-2 表达下降为 49%(图5),低毒剂量 GSP 和 GBC-SD 细胞共同作用细胞 72h,bcl-2 表达下降为 36%(图6),两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。

图3 无毒剂量 GSP 下调 P-gp 蛋白表达

图4 低无毒剂量 GSP 下调 P-gp 蛋白表达

图5 无毒剂量 GSP 下调 bcl-2 蛋白表达

图6 低毒剂量 GSP 下调 bcl-2 蛋白表达

2.5 GSP 增加 GBC-SD 细胞内 ADM 药物浓度

GSP 能明显增加细胞内的 ADM 药物积累,荧光强度增大。用无毒和低毒剂量 GSP 分别和 ADM 共同作用细胞 72h,细胞内的 ADM 药物积累较用药前

分别增加 1.4 倍和 2.3 倍,两者与处理前比较,差异均有显著性 ($P < 0.05$) (图7)。

图7 GSP 增加细胞内 ADM 药物积累

3 讨 论

胆囊癌细胞株 GBC-SD 呈 MDR 和 P-gp 蛋白高表达,可能是胆囊癌细胞对化疗药产生耐药机制之一^[1]。该细胞株的建立为研究胆囊癌细胞株的逆转耐药创造了条件。通常应用一种化疗药物后,肿瘤细胞不但对该化疗药物产生耐药,而且可以获得对从未接触过的、结构和功能及作用机制完全不同的其他多种化疗药物的耐药,称为 MDR^[1]。MDR 可分为先天性耐药和获得性耐药,主要与 ATP 依赖的膜转运蛋白超家族过表达有关,其主要代表为 MDR1 基因及其编码的糖蛋白 P-gp,作为药物排出泵,依赖 ATP 供能将化疗药物排出体外,导致细胞内药物浓度降低而产生耐药,近年来发现 bcl-2 过度表达也与 MDR 有关。许多药物如三苯氧胺、环孢素 A、肿瘤坏死因子等在体外均具有逆转 MDR 耐药的作用,但由于毒副作用大而难应用于临床。研究表明茶多酚具有 MDR 逆转作用^[3-4]。GSP 是由葡萄籽中提取的多酚类物质,具有抗氧化、抗肿瘤的作用;近年来研究发现其具有逆转剂的化学结构,有研究发现其可逆转乳腺癌细胞的多药耐药,是一较好的天然逆转剂^[5-6]。

通过对细胞生长的 MTT 测试发现,无毒(3 μg/mL)和低毒(6 μg/mL)剂量的 GSP 可以明显降低化疗药物的 IC₅₀ 值,明显增强胆囊癌细胞株 GBC-SD 对化疗药物的敏感性。该两种剂量的 GSP 作用于胆囊癌细胞株 GBC-SD 可以部分下调 MDR mRNA 的表达,并可下调 P-gp 蛋白的表达;两者的下调具有同步性,且下调随 GSP 浓度的增加而增加($P < 0.05$)。将 GSP 与阿霉素共同作用于细胞,结果显

示,GSP 可明显提高细胞内阿霉素的药物积累。可见 GSP 逆转胆囊癌细胞株 GBC-SD 耐药可能是通过下调 MDR mRNA 的基因表达水平,使其编码的 P-gp 在细胞膜上的含量减少,导致耐药细胞对化疗药外排减少,提高细胞内的药物浓度,部分逆转了胆囊癌细胞株 GBC-SD 的耐药性。

多因素参与调控细胞凋亡的抑制是细胞耐药的主要机制之一。调控因素 bcl-2 基因及其产物的研究较多。bcl-2 基因最初从 B 细胞淋巴瘤中分离鉴定出来,与多种肿瘤耐药有关;主要是抑制细胞程序性死亡,从而使细胞寿命延长。有人^[7]将 bcl-2 反义寡核苷酸转染胃癌耐药细胞株 GC7901/VCR,发现可增强该株对化疗药的敏感性。本研究显示 GSP 作用后 bcl-2 水平降低,提示 GSP 亦可能通过下调 bcl-2 表达诱导胆囊癌细胞株 GBC-SD 的凋亡而部分逆转其耐药性。

参考文献:

- [1] 李东华,王占民,刘军,等. 人胆囊癌细胞系 GBC-SD 的多药耐药机制[J]. 中华实验外科杂志,2003,20(11):995-997.
- [2] Sharp SY, Smith V, Hobbs S, *et al.* Lack of a role for MRP1 in drug resistance in human ovarian cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 1998, 78(2):175-178.
- [3] Zhu A, Wang X, Guo Z. Study of tea polyphenol as a reversal agent for carcinoma cell lines multidrug resistance (study of TP as a MDR reversal agent)[J]. Nucl Med Biol, 2001, 28(6):735-740.
- [4] Pan H, Wu J, Zheng S. Inhibition of colorectal carcinoma induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice with tea polyphenols[J]. Zhonghua Yufang Yixue Zazhi, 1995, 29(6):356-359.
- [5] 李丽,周庚,张翠娟,等. GSP 逆转人乳腺癌多药耐药性及其机制的研究[J]. 中华普通外科杂志,2004,19(8):488-451.
- [6] 张翠娟,周庚,李丽,等. GSP 对人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 在裸鼠体内的多药耐药逆转作用[J]. 中华外科杂志,2004,42(13):795-797.
- [7] Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulation of cell death[J]. Blood, 1992, 80(4):879-886.