

· 基础研究 ·

亚致死量陡脉冲调节人卵巢癌细胞多药耐药的实验研究

杨孝军 郑飞云 陈必成 胡丽娜 李均 孙才新 熊兰 姚陈果 王士彬

【摘要】目的 研究亚致死量陡脉冲对人卵巢癌多药耐药细胞亚株的杀伤及对多药耐药性的调节,并探讨其可能的作用机制。方法 以人卵巢癌细胞亲本株(SKOV3)及多药耐药亚株(SKOV3/ADM)为研究对象,采用 60 Hz 陡脉冲电击处理,甲基噻唑基四唑(MTT)法检测两株细胞的电敏感性及化疗敏感性;逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)法检测耐药亚株中的多药耐药基因(MDR1)mRNA 水平,免疫细胞化学法检测其 P 糖蛋白(P-gp)表达,用透射电镜观察超微结构的改变。结果 SKOV3 亲本及耐药亚株对陡脉冲电场的电敏感性相近($P=0.642$);亚致死量脉冲处理后的耐药亚株出现:化疗敏感性增强,半效抑制浓度(IC_{50})值及耐药指数(RI)均减低,MDR1 mRNA 水平无显著改变($P=0.947$),P-gp 蛋白表达强度显著减弱($P=0.001$),细胞出现凋亡改变。结论 陡脉冲对 SKOV3 多药耐药亚株亦可有效杀伤;亚致死量陡脉冲可逆转多药耐药,其可能的机制为增加膜渗透性的同时亦可能诱导并持久改变了耐药相关蛋白的正常构象与功能。

【关键词】亚致死量陡脉冲; 卵巢癌; SKOV3/ADM; 多药耐药; 基因

Experimental studies of modifying effect of sub-lethal dose of pulsed electric field on multidrug resistance of human ovarian cancer cell line YANG Xiao-jun*, ZHENG Fei-yun, CHEN Bi-cheng, HU Li-na, LI Jun, SUN Cai-xin, XIONG Lan, YAO Chen-guo, WANG Shi-bin. * Department of Obstetrics and Gynaecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China

【Abstract】Objective To investigate the killing and modifying effects of sub-lethal dose of pulsed electric field on human ovarian cancer multidrug resistant cell line and its possible underlying mechanisms. Methods Multidrug resistant human ovarian cancer cell subline SKOV3/ADM was derived from its parental cell line SKOV3 by stepwise exposure to adriamycin(ADM). Then the parental and its resistant subline were exposed to sub-lethal dose of pulsed electric field for 20 minutes. The MTT assay was used to evaluate electrosensitivity and chemosensitivity of both parental and resistant sublines; for resistant subline, RT-PCR was used to analyze the level of MDR1 mRNA, immunocytochemistry used to detect expression of P-gp(P-glycoprotein), transmission electron microscope(TEM) to detect ultrastructural changes. Results Similar electrosensitivity was found for SKOV3 and SKOV3/ADM($P=0.642$). After being exposed to sub-lethal dose of pulsed electric field, resistant subline manifested the following changes: enhanced chemosensitivity with decreased 50% inhibiting concentration IC_{50} (IC_{50}) values and resistance index (RI), no alteration for MDR1 mRNA($P=0.947$) in RT-PCR, significant decrease of P-gp expression ($P=0.001$), apoptosis of SKOV3/ADM. Conclusion Our results showed that sub-lethal dose of pulsed electric field can effectively kill multidrug resistant subline and reverse the multidrug resistance in SKOV3/ADM. The possible underlying mechanisms include increasing membrane permeability and probably inducing lasting changes in normal P-gp conformation and functions.

【Key words】Pulsed electric field; Sub-lethal dose; Ovarian cancer; SKOV3/ADM; Multidrug resistance(MDR); Gene

多药耐药是导致肿瘤化疗失败的重要原因^[1]。目前诸多逆转化疗耐药的方法虽有一定效果,但也各存缺憾,如化学逆转剂的毒副作用较大^[2]、热/化疗的

反复应用会导致耐受等^[3]均限制了各自的临床应用。本课题组致力于能量可控陡脉冲治疗恶性肿瘤的系列研究,已证实其杀癌机制为致死量陡脉冲引发瘤细胞膜的不可逆电穿孔^[4]。而陡脉冲对耐药瘤细胞是否也有同等的杀伤效率先前未见报道,脉冲电场对肿瘤细胞多药耐药性的调节作用则仍存争议^[5,6]。为此,我们以人卵巢癌的多药耐药细胞亚株[SKOV3/ADM(ADM 为阿霉素,即 adriamycin)]为研究对象,给予一定能量的陡脉冲电场处理,通过甲基噻唑基四唑

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO.30371619)

作者单位:325000 温州,温州医学院第一附属医院妇产科(杨孝军、郑飞云、陈必成);重庆医科大学第二附属医院妇产科(胡丽娜、李均);重庆大学高电压与电工新技术教育部重点实验室(孙才新、熊兰、姚陈果、王士彬)

通讯作者:胡丽娜

(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、免疫细胞化学、逆转录-多聚酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及透射电镜,研究亚致死量脉冲电场对该耐药亚株的杀伤及耐药性的调节作用,并探讨其可能的机制,以期为化疗失败的晚期肿瘤患者的电化学治疗提供实验依据。

材料与方法

一、材料

1. 细胞株及主要试剂:人卵巢癌 SKOV3 细胞亲本株由重庆医科大学超声医学研究所提供,常规(37℃、5% CO₂、100%湿度)培养于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 完全培养液中。耐药亚株 SKOV3/ADM 系本室采用浓度梯度递增法历时 12 个月建立的具有高度耐药特性的多药耐药细胞亚株,MTT 法测其耐药指数(resistance index, RI)为 51.5,可在含 0.4 μg/ml ADM 的培养液中稳定生长及传代,该亚株对其它多种化疗药物有交叉耐药性。胎牛血清和 RPMI-1640 为北方同正公司产,MTT 和二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为 Sigma 公司产,ADM 为齐鲁制药厂产,博来霉素(bleomycin, BLM)为天津河北制药厂产,5-氟尿嘧啶(5-FU)为上海旭东制药厂产,鼠抗人 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)单抗为福州迈新公司产,小量组织细胞总 RNA 提取试剂盒购自华舜公司、RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。引物由 Primer Premier 5.0 软件设计,上海生工合成,多药耐药基因(multidrug resistance, MDR1):上游 5-CCCATCAT-TGCAATAGCAGG-3,下游 5-GTTCAAACCTCTGCTCCT-CA-3;内对照 β₂-微球蛋白(β₂-MG):上游 5-AC-CCCCACTGAAAAAGATGA-3,下游 5-ATCTTCAAAC-CTCCATGATG-3,PCR 热反应仪为美国 PE 公司产。

2. 脉冲发生装置:能量可控陡脉冲发生仪由重庆大学电气工程学院高电压技术与系统信息监测实验室自行研制,组合不同的脉冲参数便可产生能量可控的电磁脉冲^[7]。实验中用示波器截获陡脉冲波形以精确控制能量输出。

二、方法

1. 陡脉冲电场作用后的细胞毒性:取对数生长期的 SKOV3 及 SKOV3/ADM 细胞亚株,胰酶消化,按 1 × 10⁵ 株/孔接种至 24 孔培养板后,再培养 24 h。电击时换上预先钻好小孔、并焊接好间距 1.0 cm 铂金电极针的 24 孔消毒培养板盖,接陡脉冲发生仪,相同脉冲能量下同时电击两组细胞。脉冲参数为:固定频率 60 Hz,脉宽 25 μs,作用时间 20 min,梯度改变电压为 50, 100, 150, 200, 250 V。培养板剩余孔的亲本及耐药亚株只插电极,不通电,作为阴性对照。数字化测温仪

测定细胞悬液温度的变化,每剂量组重复 3 次。电击完毕,同时取 SKOV3 及 SKOV3/ADM 细胞悬液,再培养 5 min 后行 MTT 检测^[8],于波长 570 nm 处测光密度(OD)值,并计算:杀伤率 = [(对照孔 OD 值 - 实验孔 OD 值)/对照孔 OD 值] × 100%。

2. 药物敏感性测定:在以上陡脉冲电场细胞毒性的测定中,发现电压 50 V 时,细胞存活率可维持在 82% 左右,对细胞活力无明显影响,故选用此剂量为亚致死量脉冲。细胞制备、电击、对照组设置和 MTT 操作均同前,MTT 法^[8]分别检测 SKOV3 亲本及耐药亚株对 ADM、BLM、5-FU 的化疗敏感性,绘图法得出细胞对药物的半效抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)值,计算 RI:耐药细胞的 IC₅₀/亲本细胞的 IC₅₀。

3. MDR1 基因的 RT-PCR 分析:取上述电击处理前、后的耐药亚株,置相同条件下再培养 48 h,行 RT-PCR 检测。首先按试剂盒操作说明抽提总 RNA;第一步,逆转录为 cDNA 的反应体系为:RNA 4 μl, Oligo(dT)₁₈ 2 μl,加水至 10 μl。在 PCR 仪上保持 70℃,反应 10 min 后,再加 dNTP 2 μl, Rnasin 0.5 μl, MMLV 逆转录酶 1 μl,加水至 20 μl,在 PCR 仪上 42℃ 反应 1 h, 95℃ 反应 5 min;第二步,扩增 cDNA 的反应体系为:cDNA 4 μl,引物各 1 μl, MgCl₂ 4 μl, 20 mM 的 dNTP 1 μl, DNATaq 酶 2.5 U,加水至 50 μl。在 PCR 仪上反应,MDR1 的扩增反应参数依次为:变性 94℃、延伸 52℃、复性 72℃ 各 45 s,内对照 β₂-MG 的扩增反应参数依次为:变性 94℃、延伸 55℃、复性 72℃ 各 45 s,均 35 个循环。结果判定:10 μl 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下观察,157 bp 处为 MDR1 扩增带,120 bp 处为内对照 β₂-MG,软件计量条带光密度,取 MDR1 与 β₂-MG 扩增带光密度的比值作为 MDR1 mRNA 的相对表达量。

4. P-gp 蛋白的检测(S-P 法):取上述电击前、后的耐药亚株,24 孔板内细胞爬片,48 h 后行免疫细胞化学检测,操作按试剂盒说明进行,磷酸盐缓冲溶液代替一抗作阴性对照。结果判断参照文献[9]:光镜下胞膜及胞浆内有棕褐显色颗粒为阳性,不着色为阴性,每张切片在强、弱染色区分别随机计数 10 个高倍(400 倍)视野下的阳性细胞率,取其均值为该张切片的阳性率。观察电击处理前、后 P-gp 蛋白的改变。

5. 细胞超微结构观察:电击后的耐药亚株悬液依次经离心、沉淀,戊二醛、锇酸固定,脱水。环氧树脂包埋,超薄切片制作,铀/铅染色,然后用透射电镜(H-600 HITACHI)检测,同时取电击前的耐药亚株作阴性对照。

三、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用 SPSS

11.0 行 t 检验及两独立样本秩和检验, 设定 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、陡脉冲电场的细胞毒性

脉冲电场作用后的细胞毒性与电场强度间有一定的线性关系(图 1), 统计分析发现 SKOV3 亲本和耐药亚株的电敏感性差异无统计学意义(两独立样本秩和检验, $z = 0.46, P = 0.642$)。MTT 检测发现电压 50 V 时, 细胞存活率可维持在 82%, 本研究中将视为亚致死量陡脉冲, 电压 250 V 时细胞存活率仅为 5%, 这与本课题组先前研究结果相符^[4]。测温仪显示电击过程中细胞悬液最高温度仅达 30℃。

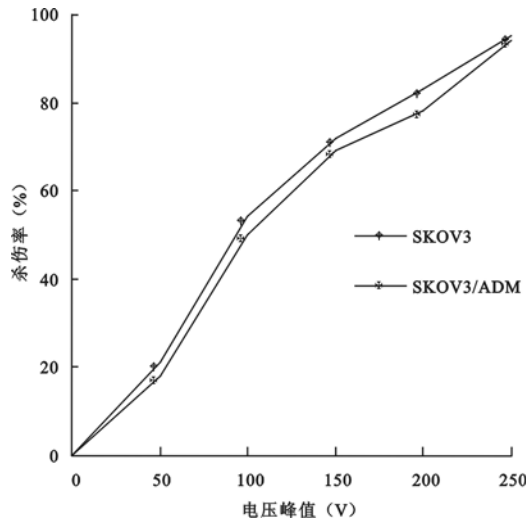


图 1 陡脉冲对 SKOV3 及 SKOV3/ADM 的杀伤率

二、药物敏感性的改变

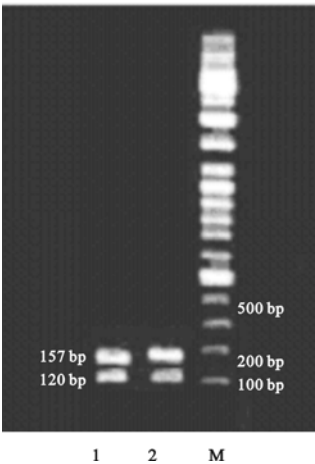
SKOV3/ADM 有多药耐药性, MTT 检测发现, 经亚致死量脉冲电场处理后, 耐药亚株对 ADM、BLM、5-FU 的敏感性显著提高, IC_{50} 值及 RI 均减低, 在一定程度上恢复了对化疗药的敏感性(表 1)。

表 1 低能脉冲处理后耐药亚株对 3 种化疗药的敏感性 & RI 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别及化疗药物	IC_{50} ($\mu g/ml$) ($\bar{x} \pm s$)	RI
SKOV3		
ADM	0.02 ± 0.005	—
BLM	1.01 ± 0.067	—
5-FU	4.61 ± 1.082	—
SKOV3/ADM 对照组		
ADM	1.03 ± 0.105	51.50
BLM	95.09 ± 1.327	94.15
5-FU	328.46 ± 5.472	71.25
SKOV3/ADM 电击组		
ADM	0.35 ± 0.016	17.50
BLM	26.67 ± 1.294	26.41
5-FU	166.93 ± 4.612	36.21

三、耐药基因的检测

非致死量陡脉冲处理前、后的耐药亚株均有目的基因表达(图 2), 脉冲处理前 MDR1mRNA 的相对表达量为 1.93 ± 0.36 , 处理后则为 1.92 ± 0.45 (t 检验, $t = 0.07, P = 0.947$), 差异无统计学意义, 表明非致死量陡脉冲处理 48 h 后, 存活的癌细胞并未改变其 MDR1 基因的转录水平。

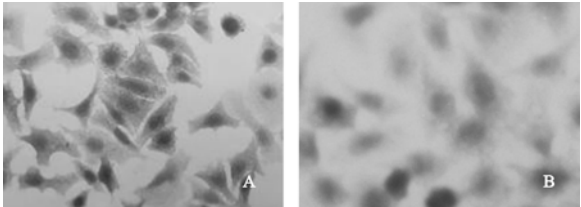


1. 处理前 2. 处理后 M. marker

图 2 RT-PCR 法检测低能脉冲处理前、后耐药亚株 MDR1mRNA 水平

四、耐药蛋白表达分析

P-gp 蛋白表达于胞膜, 表现为胞膜或胞浆的棕褐染色, 非致死量陡脉冲处理前的耐药亚株 P-gp 蛋白高表达, 处理后的表达强度显著降低, 部分细胞完全无染色(图 3); 脉冲处理前的阳性表达率中位数为 83.26%, 四分位间距 12%; 处理后的中位数为 41.89%, 四分位间距 14% (两独立样本秩和检验, $z = -8.46, P = 0.001$), 表明非致死量陡脉冲处理后 48 h, 存活的癌细胞通过某种机制改变了其自身 P-gp 蛋白的表达量, 且差异有统计学意义。



A. 处理前 P-gp 高表达 B. 处理后表达强度减弱

图 3 低能脉冲处理前、后耐药亚株 P-gp 蛋白表达强度的变化 (S-P 法 $\times 400$)

五、超微结构改变

透射电镜下处理前的耐药亚株癌细胞核畸形, 核仁多个, 胞较幼稚, 胞质内游离核糖体丰富, 可见线粒体和粗面内质网; 非致死量陡脉冲处理后的耐药亚株出现典型的凋亡小体, 细胞器结构难以辨认。

讨 论

本试验中利用药物浓度梯度递增法建立起来的 SKOV3/ADM 亚株属获得性耐药,与临床中的耐药形成较为相似^[10],是一种 P-gp 高表达的耐药细胞亚系,具多药耐药性。陡脉冲作为一种能量的传递形式,其电场有着广泛的生物学效应。从电学角度看,细胞是具有介质特性的胞膜包绕着易导电的细胞质^[4],据此理论模型可推测,SKOV3 亲本和耐药亚株的电导率及电敏感性应相近。这也为本实验所证实:陡脉冲对两株细胞杀伤率的差异无统计学意义($P=0.642$),提示陡脉冲对耐药亚株亦能非选择性杀灭。郭伟剑等^[11]的研究中亦有类似现象。

亚致死量的低能陡脉冲因安全性高,故仍有其临床适用性。本研究中低能脉冲处理后的耐药亚株在一定程度上恢复了对多种化疗药的敏感性,表现出多药耐药的逆转。分析为低能陡脉冲能引发膜可逆性电穿孔,增加胞膜通透性,促使化疗药物渗透并进入胞内,并累积以增敏化疗。低能脉冲处理后的耐药亚株还表现出 P-gp 蛋白表达强度显著减弱($P=0.001$),部分细胞甚至完全不着色,无 P-gp 蛋白表达征象。但相同条件下处理后的耐药亚株却并未改变其 MDR1 的转录水平,分析其改变可能是在蛋白水平,低能陡脉冲虽不足杀灭瘤细胞,但在促渗的同时,也会对镶嵌在细胞膜上的 P-gp 蛋白产生电构象上的破坏效应(electroconformational damages)^[12],可诱导并持久改变该蛋白的正常空间构象及抗原结合位点等,导致不能被抗体所识别,以及外排药物的功能减弱,化疗药物遂在胞内累积,从而表现为多药耐药的逆转。目前对电场能否调节耐药基因表达的研究结论尚未统一,Holandino 等^[5]报道,直流电场对瘤细胞耐药性无影响,Walter 等^[6]发现,中等强度正弦电脉冲能抑制多药耐药的发生,国内则报道电化学治疗可上调耐药基因的表达^[13]。本研究中 60 Hz 低能陡脉冲并未改变 SKOV3/ADM 的 MDR1 转录水平,分析可能是低能陡脉冲逆转耐药中并未涉及耐药基因的改变。

低能陡脉冲包含的丰富高频电磁场成分能直接穿过细胞膜对胞核、线粒体等产生强而广泛的无选择性杀伤作用^[4]。电镜下,处理后的耐药亚株内见典型的凋亡小体,表明低能陡脉冲虽不足以直接杀灭瘤细胞,却仍可诱导其凋亡。

已知热/化疗 42℃ 数分钟即可致瘤细胞过表达 HSP70 而致耐受,但本实验中细胞悬液最高温度仅达 30℃,非热/化范畴^[3];放疗存在组织敏感性等问题,显然电脉冲的非选择性杀灭优于放疗^[14];低频超声则

只是单纯促渗以逆转多药耐药^[15]。作为肿瘤综合治疗的一部分,陡脉冲在促渗的同时亦可能诱导并持久改变了 P-gp 蛋白的正常构象及功能,从而逆转化疗耐药,为晚期肿瘤患者提供有效的替代治疗。本研究为非致死量陡脉冲逆转化疗耐药提供了可靠的实验依据,但体外实验仍需经动物及临床的重复验证才会有实用价值,这是下一步要开展的工作。

参 考 文 献

- Johnson WW. P-glycoprotein-mediated efflux as a major factor in the variance of absorption and distribution of drugs: modulation of chemotherapy resistance. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2002, 24: 501-514.
- Gate L, Couvreur P, Nguyen-Ba G, et al. N-methylation of anthracyclines modulates their cytotoxicity and pharmacokinetic in wild type and multidrug resistant cells. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57: 301-308.
- 沈群. 热休克蛋白在白白血病细胞凋亡和耐药中的分子机制. 国外医学输血及血液学分册, 2002, 25: 324-327.
- 孙才新, 姚陈果, 熊兰, 等. 陡脉冲电场对恶性肿瘤细胞杀伤效应的研究. *生物物理学报*, 2002, 18: 474-477.
- Holandino C, Veiga VF, Rodrigues ML, et al. Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukemic cells. *Bioelectromagnetics*, 2001, 22: 470-478.
- Walter RJ, Shtil AA, Roninson IB, et al. 60-Hz electric fields inhibit protein kinase C activity and multidrug resistance gene (MDR1) up-regulation. *Radiat Res*, 1997, 147: 369-375.
- 米彦, 孙才新, 姚陈果, 等. 陡脉冲肿瘤治疗仪的研制及应用. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2003, 26: 12-14.
- Sargent JM. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. *Recent Results Cancer Res*, 2003, 161: 13-25.
- Richart J, Brunt EM, Di Bisceglie AM. Expression of P-glycoprotein and C-MOAT in human hepatocellular carcinoma: detection by immunostaining. *Dig Dis Sci*, 2002, 47: 2454-2458.
- Devarajan E, Chen J, Multani AS, et al. Human breast cancer MCF-7 cell line contains inherently drug-resistant subclones with distinct genotypic and phenotypic features. *Int J Oncol*, 2002, 20: 913-920.
- 郭伟剑, 于尔辛, 郑颂国, 等. 电化学治疗对具多药耐表型的人乳腺癌细胞 MCF-7ADR 的作用. *中国癌症杂志*, 2000, 10: 65-67.
- Chen W. Evidence of electroconformational changes in membrane proteins: field-induced reductions in intra membrane nonlinear charge movement currents. *Bioelectrochemistry*, 2004, 63: 333-335.
- 郭伟剑, 罗建明, 于尔辛, 等. 电化学治疗对人肝癌细胞 SMMC7721 化疗耐药性的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22: 151-153.
- 辛育龄, 主编. 癌症的电化学治疗. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 93.
- Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophysical J*, 2003, 84: 3087-3101.

(修回日期: 2005-06-29)

(本文编辑: 熊芝兰)