

低频脉冲电场逆转 MCF-7/ADR 对高三尖杉酯碱和长春新碱的耐药性

殷俊 刘莹 张红锋*
(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 为了探讨低频脉冲电场对人乳腺癌多药耐药细胞系 MCF-7/ADR 耐药性的逆转作用及机制, 采用 MTT 比色法检测 MCF-7/ADR 的耐药指数和耐药性的逆转倍数, 荧光显微镜观察脉冲电场对 MCF-7/ADR 细胞内 DiOC₂(3) (P-gp 的特异性荧光底物) 积累和外排的影响。结果发现, 在低频脉冲电场不影响 MCF-7/ADR 细胞生长的情况下, 不同时间的电场作用均能逆转 MCF-7/A 的多药耐药, 对高三尖杉酯碱(HHT)耐药性的逆转倍数在 1.429 ~ 1.848 之间, 对长春新碱(VCR)耐药性的逆转倍数在 1.473 ~ 2.090 之间, 45 min 电场作用的逆转效果最好, 其次是 30 min 电场作用。药物积累和外排实验结果表明, 脉冲电场作用 45 min 能使细胞内的 DiOC₂(3) 积累明显增加, 而 30 min 电场作用能显著抑制 DiOC₂(3) 的外排。促进药物积累和抑制其外排可能是脉冲电场逆转多药耐药的机制之一。

关键词 低频脉冲电场; 多药耐药; 人乳腺癌多药耐药细胞系 MCF-7/ADR; 高三尖杉酯碱; 长春新碱

肿瘤细胞对化疗药物产生的多药耐药(multi-drug resistance, MDR)是导致肿瘤化疗失败的重要原因之一。多药耐药是指肿瘤细胞在抗肿瘤药物长期反复作用下对药物产生耐药性的同时, 对其他多种结构、作用机制不同的抗肿瘤药物也产生交叉抗药性, 这是一种广谱耐药现象^[1]。目前已经发现一些化合物能在体外不同程度的逆转肿瘤细胞的多药耐药性。如: 环孢菌素 A (cyclosporin A, CsA)、维拉帕米(verapamil, Ver)和他莫昔芬(tamoxifen, TAM)等化合物在体外实验中能够逆转甚至完全逆转多药耐药^[2,3]。但是 CsA 和 Ver 等对心血管系统有较大的副作用; TAM 是主要治疗乳腺癌的一种抗雌激素药, 在临床实验中发现只有当 TAM 的剂量远远超过体内排毒量时才能逆转细胞的耐药性。近来不断有新的化合物被证明可以逆转 MDR, 虽然这些化合物的毒性比第一代 MDR 逆转剂低, 但是这些化合物也有毒副作用, 会增加肾脏和胆管的负担^[4]。因此寻找有抵抗 MDR 作用且毒副作用小的方法, 对提高肿瘤治疗水平具有重要的意义。

电化学疗法(electrochemotherapy, ECT)在上世纪 80 年代已提出^[5]。在近 20 多年的研究中发现, ECT 可通过改变膜的通透性或直接在细胞膜上瞬时穿孔来促使化疗药物进入肿瘤细胞, 提高细胞内的药物浓度, 对肿瘤细胞产生高效的杀伤作用, 从而对抗肿瘤

细胞的多药耐药^[6-9]。由于 ECT 对体内或表浅肿瘤破坏性强且破坏范围易于控制, 为肿瘤局部治疗提供了新方法。但是使用较高的脉冲电场使耐药肿瘤细胞的细胞膜瞬时穿孔, 其对正常细胞必然也会有一定的影响。为此, 本文采用脉冲重复频率为 $f=50$ Hz, 脉宽为 $t=20$ s, 培养液中场强峰值为 1 V/m 的低频脉冲电场(LF-PEF), 研究其对肿瘤细胞多药耐药的逆转作用。因为这种脉冲电场不会引起细胞膜的电穿孔, 所以其逆转作用的机制不同于电化学疗法。本文研究 5 min、15 min、30 min 和 45 min 的低频脉冲电场, 对人乳腺癌多药耐药细胞系 MCF-7/ADR 的高三尖杉酯碱(HHT)和长春新碱(VCR)耐药的逆转作用, 并以 DiOC₂(3)(P-gp 的特异性底物)为荧光指示物, 观察脉冲电场对 DiOC₂(3) 积累和外排的影响, 以此探究低频脉冲电场的抗多药耐药作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系 MCF-7 和人乳腺癌多药耐药细胞

收稿日期: 2007-02-26 接受日期: 2007-06-18

国家自然科学基金资助项目(No.50677022)

* 通讯作者。Tel: 021-62233549, Fax: 021-62233754, E-mail:

hfzhang@bio.ecnu.edu.cn

胞系MCF-7/ADR 由江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室提供。DMEM 为美国 Gibco 公司产品。小牛血清为杭州四季青生物工程有限公司产品。四甲基偶氮唑蓝(MTT)由 Sigma 公司进口分装, 购自上海实生公司。DiOC₂(3)购自吉泰生物有限公司。HHT、VCR、表阿霉素(ADR)、柔红霉素(DNR)分别购自北京协和药厂、深圳万乐药业有限公司和法玛西亚有限公司。其他试剂均为国产分析纯。低频脉冲电场刺激仪由华东师范大学物理系生物物理研究室研制, 脉冲电场存在于两圆形平板电极板之间。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养条件 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞于 37 °C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中无菌培养。培养液为含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基。

MCF-7/ADR 细胞系采用持续加量的 ADR 诱导法建立。将细胞维持在含 0.2 μg/ml ADR 的 DMEM 完全培养液中, 每 2~3 天传代一次, 耐药细胞系在无药培养 7~28 天时, 进行以下实验检测。

1.2.2 MTT 比色法检测低频脉冲电场对 MCF-7/ADR 细胞生长的影响 将 7×10⁴ 个/ml MCF-7/ADR 细胞分别接种在 96 孔板中, 每孔 100 μl。24 h 后对细胞进行电场作用, 将细胞培养板放在两圆形平板电极板之间。电场作用时间分别为 5 min、15 min、30 min 和 45 min, MCF-7/ADR 细胞经低频脉冲电场处理后, 继续培养 48 h。每孔加入 100 μl 0.5 mg/ml MTT 溶液, 37 °C 温育 4 h 后弃去 MTT 溶液, 加入 100 μl/孔 DMSO, 振荡 10 min, 待甲瓚完全溶解后, 在酶标仪的 570 nm 波长下检测吸光度。每组设 8 个平行孔, 实验重复 3 次。细胞生存率以各电场作用组 A 值 / 未经电场作用的对照组 A 值 ×100% 表示。

1.2.3 MTT 比色法检测 MCF-7/ADR 的耐药性 将 7×10⁴ 个/ml 的 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞分别接种在 96 孔板中, 每孔 100 μl。24 h 后分别加入不同浓度的化疗药物 ADR、DNR、HHT 和 VCR。药物作用 48 h 后进行 MTT 比色检测。每组设 8 个平行孔, 实验重复 2 次。

计算细胞生存率和半数抑制浓度(IC₅₀)。细胞生存率(%)= 各浓度的药物作用组 A 值 / 未经药物作用的对照组 A 值 ×100%。使用 Origin 7.5 软件以药物浓度为横轴, 细胞生存率为纵轴绘制浓度效应曲线, 确定 IC₅₀。耐药指数(resistance Factor, RF)以 IC₅₀(MCF-7/ADR) / IC₅₀(MCF-7) 表示。分别检测 MCF-

7/ADR 对 ADR、DNR、HHT 和 VCR 的耐药指数。

1.2.4 检测脉冲电场作用对 MCF-7/ADR 耐药性的逆转作用 将 7×10⁴ 个/ml MCF-7/ADR 细胞接种在 96 孔板中, 每孔 100 μl。24 h 后对细胞进行电场作用, 电场作用时间分别为 5 min、15 min、30 min 和 45 min, MCF-7/ADR 细胞经低频脉冲电场处理后, 在细胞培养液中添加不同浓度的化疗药物 HHT 或 VCR, 化疗药物的浓度分别为 0 μg/ml、0.5 μg/ml、1 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml 和 15 μg/ml。继续培养 48 h。进行 MTT 比色检测。每组设 8 个平行孔, 实验重复 2 次。

计算各不同时间的脉冲电场作用后的细胞生存率和半数抑制浓度 IC₅₀。细胞生存率(%)= 某一时间电场作用后各浓度的药物作用组 A 值 / 未经电场和药物作用的对照组 A 值 ×100% 表示。使用 Origin 7.5 软件以药物浓度为横轴, 细胞生存率为纵轴绘制浓度效应曲线, 确定 IC₅₀。逆转倍数(reversal index, RI)= 不加电场时的 IC₅₀ / 电场作用时的 IC₅₀。

1.2.5 荧光显微镜观察脉冲电场对 DiOC₂(3) 在细胞内的积累 观察不同的电场处理时间对细胞内 DiOC₂(3) 积累的影响。将 7×10⁴ 个/ml MCF-7/ADR 细胞接种在 96 孔板中, 每孔 100 μl。24 h 后对细胞进行电场作用, 电场作用时间分别为 5 min、15 min、30 min 和 45 min, 然后吸去原来的培养液, 每孔加入 100 μl 含 10 ng/ml DiOC₂(3) 的培养液, 90 min 后弃去含 DiOC₂(3) 的培养液, 用 D-Hank's 漂洗 2 遍, 荧光显微镜观察。

1.2.6 荧光显微镜观察脉冲电场对 DiOC₂(3) 外排的影响 将 7×10⁴ 个/ml MCF-7/ADR 细胞接种在 96 孔板中, 每孔 100 μl。24 h 后, 每孔换成 100 μl 含 10 ng/ml DiOC₂(3) 的培养液, 90 min 后吸去原来的培养液, 用 D-Hank's 漂洗 2 遍, 加入新的无药完全培养液。分别对细胞进行 5 min、15 min、30 min 和 45 min 的电场作用, 90 min 后用 D-Hank's 漂洗 2 遍, 荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 MCF-7/ADR 的多药耐药

MCF-7/ADR 细胞系是采用持续加量的 ADR 诱导法产生的。经检测发现, 该细胞不仅对 ADR 有一定的耐药性, 而且对 DNR、HHT 和 VCR 产生多药耐药。从表 1 可见, MCF-7/ADR 对 VCR 的耐药性最高, 耐药指数为 620.558, 对 HHT 的耐药指数为 37.141, 对 DNR 的耐药性最低, 耐药指数为 6.136。

2.2 低频脉冲电场对 MCF-7/ADR 细胞生长的影响

低频脉冲电场作用 5 min, 对细胞生长没有影响。15 min、30 min 和 45 min 的电场作用, 对细胞生长略有抑制(4.27%~10.56%), 但与未经电场作用的对照组相比没有显著差异($P>0.05$)(表 2)。

2.3 低频脉冲电场对 MCF-7/ADR 多药耐药的影响

从表 3、表 4 中可以看出, 不同时间的电场作用对 MCF-7/A 的多药耐药都有不同程度的逆转作用。对 HHT 耐药性的逆转倍数在 1.429~1.848 之间, 对 VCR 耐药性的逆转倍数在 1.473~2.090 之间。电场作用 45 min 时, 对 MCF-7/ADR 的 HHT 和 VCR 耐药性的逆转倍数最高, 分别为 1.848 和 2.090。其次是 30 min 的电场作用, 对 MCF-7/ADR 的 HHT 和 VCR 耐药性的逆转倍数分别为 1.756 和 1.723; 15 min 和 5min 电场作用的逆转效果略低于前两者。并且, 从 MTT 检测的 A 值看, 低频脉冲电场与较高浓度的 HHT 和 VCR(10 和 15 $\mu\text{g/ml}$)协同作用, 对耐药肿瘤

细胞的生长具有更明显的抑制效果。

2.4 低频脉冲电场对 DiOC₂(3) 在细胞内积累的影响

结果表明, 45 min 电场处理使 MCF-7/ADR 绿色荧光最强, 细胞内积聚的 DiOC₂(3) 最多; 5 min 和 30 min 电场处理仅使个别细胞内高度积聚 DiOC₂(3); 15 min 电场作用细胞与未经电场作用细胞内 DiOC₂(3) 荧光强度基本相同(图 1)。说明 45 min 电场作用能明显促进 MCF-7/ADR 细胞对 DiOC₂(3) 的积累。

2.5 低频脉冲电场对 DiOC₂(3) 外排的影响

在细胞培养液中加入 DiOC₂(3) 90 min 后, 观察到细胞内 DiOC₂(3) 的积累。然后将细胞外的 DiOC₂(3) 彻底洗去, 细胞继续培养 90 min 后再次观察, 发现细胞内 DiOC₂(3) 的荧光明显降低, 说明 DiOC₂(3) 由 P-gp 外排。结果发现, 30 min 电场作用使细胞内绿色荧光最强(图 2), 说明 30 min 电场作用能明显抑制 DiOC₂(3) 的外排, 影响 P-gp 的外排功能。

表 1 MCF-7/ADR 对 ADR、DNR、HHT 和 VCR 的多药耐药($n=8$)

化疗药物	MCF-7		MCF-7/ADR	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	RF	
ADR	0.258	3.850	14.922	
DNR	0.169	1.037	6.136	
HHT	0.078	2.897	37.141	
VCR	0.017	10.550	620.558	

表 2 低频脉冲电场对 MCF-7/ADR 细胞生长的影响($n=8$)

电场作用时间	MTT 检测的 A 值	细胞生存率
0 min	0.890±0.027	100.00%
5 min	0.888±0.073	99.78%
15 min	0.838±0.035	94.16%
30 min	0.852±0.021	95.73%
45 min	0.796±0.031	89.44%

表 3 脉冲电场作用对 MCF-7/ADR 的 HHT 耐药性的逆转作用($n=8$)

电场作用时间 / MTT 检测的 A 值	HHT 浓度($\mu\text{g/ml}$)						IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	RI
	0	0.5	1	5	10	15		
0 min	0.890±0.027	0.779±0.028	0.649±0.023	0.390±0.023	0.322±0.035	0.326±0.033	3.102	
5 min	0.888±0.073	0.763±0.034	0.584±0.049*	0.405±0.027	0.361±0.016*	0.358±0.035*	1.864	1.664
15 min	0.838±0.035	0.663±0.065*	0.642±0.033	0.391±0.025	0.365±0.026*	0.360±0.017*	2.170	1.429
30 min	0.852±0.021	0.703±0.034*	0.620±0.046	0.415±0.041	0.396±0.023*	0.396±0.027*	1.766	1.756
45 min	0.896±0.031	0.666±0.032*	0.577±0.024*	0.348±0.021*	0.391±0.021*	0.380±0.017*	1.679	1.848

与未经电场处理的各相应药物浓度的对照组相比较, * $P<0.05$ 。

表 4 脉冲电场作用对 MCF-7/ADR 的 VCR 耐药性的逆转作用($n=8$)

电场作用时间 / MTT 检测的 A 值	VCR 浓度($\mu\text{g/ml}$)						IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	RI
	0	0.5	1	5	10	15		
0 min	0.764±0.033	0.738±0.030	0.719±0.021	0.633±0.042	0.459±0.070	0.374±0.013	10.556	
5 min	0.777±0.026	0.758±0.022	0.736±0.015	0.495±0.041*	0.392±0.030*	0.538±0.035*	7.164	1.473
15 min	0.695±0.038	0.741±0.021	0.690±0.019	0.419±0.028*	0.325±0.021*	0.300±0.017*	6.358	1.660
30 min	0.716±0.019	0.687±0.008	0.690±0.025	0.475±0.020*	0.313±0.014*	0.278±0.028*	6.126	1.723
45 min	0.694±0.022	0.704±0.026	0.706±0.027	0.450±0.035*	0.315±0.025*	0.300±0.033*	5.050	2.090

与未经电场处理的各相应药物浓度的对照组相比较, * $P<0.05$ 。

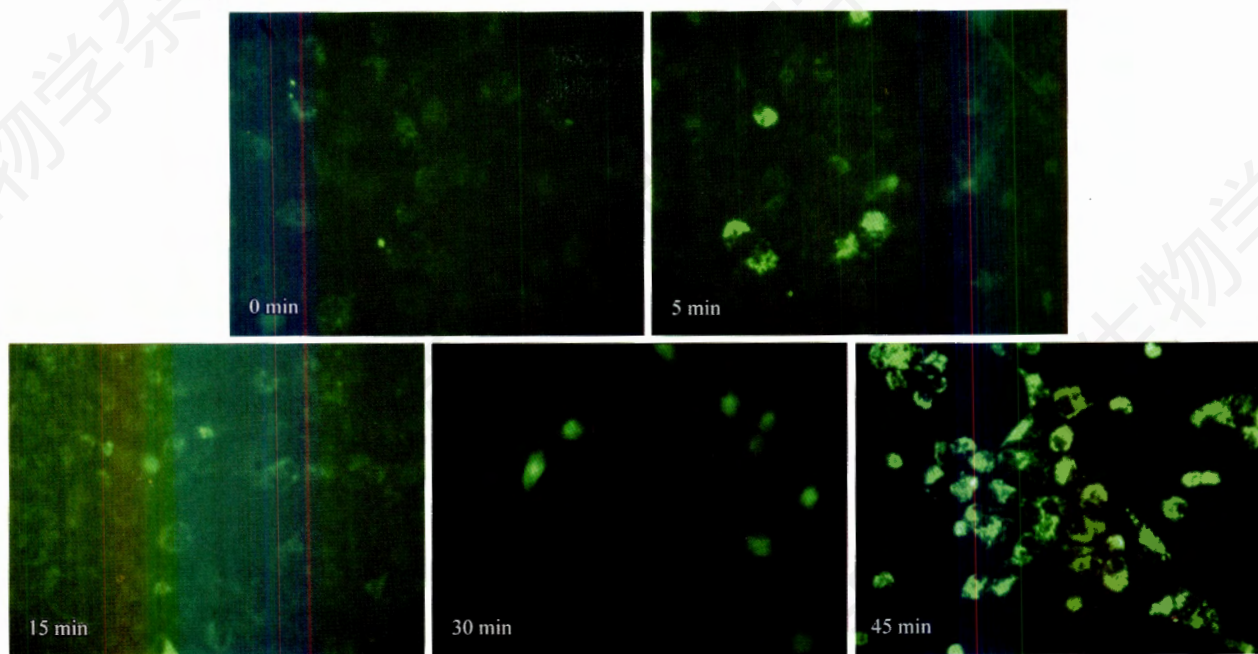


图1 不同时间电场作用对 MCF-7/ADR 细胞内 DiOC₂(3) 积累的影响
400×, 曝光时间为 838 ms。

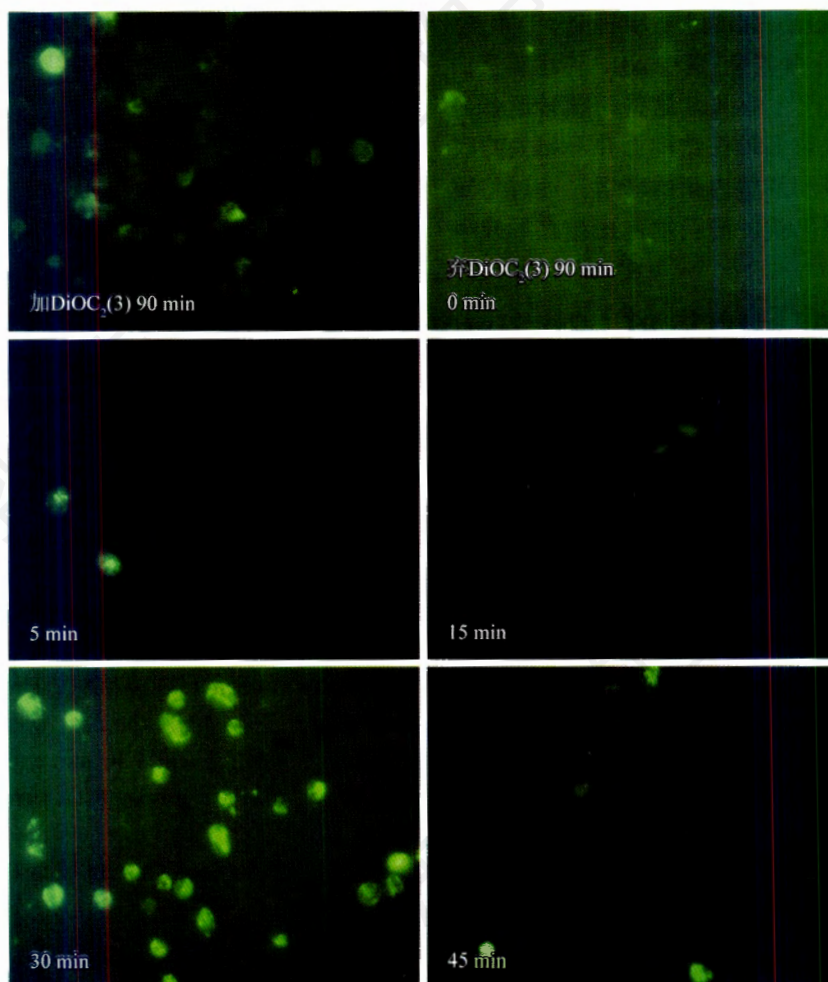


图2 不同时间电场作用对 DiOC₂(3) 外排的影响
400×, 曝光时间为 1.5 s。

3 讨论

低频脉冲电场逆转 MCF-7/ADR 多药耐药的实验结果表明, 45 min 电场作用的逆转效果最好, 对 HHT 耐药性的逆转倍数为 1.848, 对 VCR 耐药性的逆转倍数为 2.090; 其次是 30 min 的电场作用, 对 HHT 耐药性的逆转倍数为 1.756, 对 VCR 耐药性的逆转倍数为 1.723; 15 min 电场作用的逆转倍数分别为 1.429 和 1.660; 5 min 电场作用的逆转倍数分别为 1.664 和 1.473。

从 P-gp 特异荧光底物 DiOC₂(3) 的积累和外排的实验结果分析, 45 min 电场作用能明显促进 MCF-7/A 细胞对 DiOC₂(3) 的积累, 30 min 电场作用能明显抑制 DiOC₂(3) 的外排。以此推论, 45 min 电场作用对多药耐药的逆转效果可能来自于促进药物的积累, 而 30 min 电场作用对多药耐药的逆转效果可能来自于对药物外排的干预, 以及对 P-gp 泵的抑制作用。然而 15 min 和 5 min 电场作用对多药耐药的逆转机制既不反映在药物的积累, 也不反映在药物的外排, 可能还有其他的逆转机制, 有待进一步研究。

MDR 形成机制十分复杂, 其中 ABC 转运膜蛋白现已证明与 MDR 的产生有关。这些跨膜转运蛋白通过相似的机制实现对多种在结构上并不相关的底物和药物跨细胞外膜和细胞内膜的转运。通过将抗肿瘤药物泵出细胞或将抗肿瘤药物包裹起来形成小

泡与细胞内部隔绝从而降低药物的作用浓度^[10]。与乳腺癌相关的 ABC 转运蛋白包括: 由 *mdr1* 基因编码的 P-gp 蛋白、由 *mrp1* 基因编码的多药耐药相关蛋白(MRP)以及乳腺癌耐药蛋白(BCRP)^[11]。在目前的肿瘤多药耐药研究中, 不仅发现逆转 MDR 的机制与下调 ABC 转运膜蛋白的表达有关, 而且与多种因素有关, 例如蛋白激酶抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、钙通道阻滞剂等均表现出一定的逆转 MDR 作用^[12]。我们将进一步从多个方面探讨低频脉冲电场逆转肿瘤多药耐药的机制。应用低频脉冲电场, 探究多药耐药治疗的新策略和新方法, 将为肿瘤防治研究提供重要的参考数据。

参考文献(References)

- [1] Gottesman MM *et al. Annu Rev Biochem*, 1993, **62**: 385
- [2] Lavie Y *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 1682
- [3] Liscovitch M *et al. IDrugs*, 2002, **5**: 349
- [4] 戴春岭等. *中国药理学通报*, 2005, **21**: 513
- [5] Okino M *et al. Jpn J Cancer Res*, 1987, **78**: 1319
- [6] Hofmann GA *et al. IEEE Trans Biomed Eng*, 1999, **46**: 752
- [7] Allegretti JP *et al. Laryngoscope*, 2001, **111**: 52
- [8] Horiuchi A *et al. Int J Cancer*, 2000, **88**: 640
- [9] Glass LF *et al. Arch Dermatol*, 1996, **132**: 1353
- [10] Cascorbi I. *Pharmacol Ther*, 2006, **112**: 457
- [11] Doyle LA *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 15665
- [12] 郭仕华等. *食品与药品*, 2005, **7**: 16

Reversal Effects of Low-frequency Pulsed Electrical Field on Multidrug Resistance of MCF-7/ADR to HHT and VCR

Jun Yin, Ying Liu, Hong-Feng Zhang*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract In order to explore the reversal effect and mechanism of low-frequency pulsed electrical field (LF-PEF) on multidrug resistance (MDR) of MCF-7/ADR, MTT analysis was used to detect resistance factor (RF) and reversal index (RI). The accumulation and efflux of DiOC₂(3) were studied by fluorescence microscopy. The results showed that LF-PEF could reverse the MDR under the condition which not influence the growth of MCF-7/ADR. RI of HHT was between 1.429–1.848 while RI of VCR was between 1.473–2.090. The sensitivity of MCF-7/ADR to HHT and VCR were enhanced by 45 min exposure to LF-PEF best and the next was 30 min exposure. 45 min exposure to LF-PEF increased the accumulation of intracellular DiOC₂(3) while 30 min exposure inhibited P-gp-dependent efflux of DiOC₂(3). So promoting drug accumulation and inhibiting drug efflux may be one of reversal mechanism of LF-PEF on MDR.

Key words low-frequency pulsed electrical field; multidrug resistance; human breast drug-resistant cancer cell line MCF-7/ADR; HHT; VCR

Received: February 26, 2007 Accepted: June 18, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.50677022)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233549, Fax: 86-21-62233754, E-mail: hfzhang@bio.ecnu.edu.cn