

EFFECT OF ARTIFICIAL BASEMENT MEMBRANE ON THE GROWTH OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CELL LINE (CNE-2)

Xie, Zuoxuan et al.

(Dept. of pathology, medical college, JNU Guangzhou 510632)

ABSTRACT

Artificial basement membrane (ABM) with spongiform configuration was mainly made of type I collagen (rat tail) which was formed into hydrated collagen lattices (HCLS), fibronectin, type IV collagen and laminin. ABM could cut off 10% of the fetal bovine serum (FBS) in medium, raise the viability of cells and prolong the period of subculture. The growth efficiency, plating efficiency and the rate of clonal growth of CNE-2 cells propagated on ABM with 2—5% FBS cultural medium were higher but the uptake of ^3H -TdR was lower than that of these cells on glass dishes with the same cultural medium. These findings suggested that the lower concentration FBS of medium should be used for researching the effect of extracellular matrix on cells, and that the ABM is ideal matrix of culture for inducing the differentiation of carcinoma cells in vitro.

Keywords: Artificial basement membrane CNE-2 cell line Growth and differentiation

环孢菌素 A 逆转 HL-60/Har 细胞对抗肿瘤药物的抗性

王晨光 葛曰萍 陈尊器

(广州医学院肿瘤研究所 510182)

何琪扬 张鸿卿

(北京师范大学生物系 100875)

人肿瘤细胞的多药抗性导致肿瘤细胞对一系列结构及作用机理不同的抗肿瘤药物敏感性降低而使化疗失败^[1]。多药抗性 与 P-糖蛋白 (一种 170 KD 的糖蛋白) 在细胞内的过表达有关, 该蛋白执行跨膜泵药功能, 能将进入细胞内的药物泵到细胞外。P-糖蛋白由 MDR 1 基因编码, 其作用受磷酸化的调控, 多种激酶如蛋白激酶 A 和 Cl^{2-57} 参与其功能的调控。

目前研究的一个重点就是如何克服肿瘤细胞的多药抗性。多种药物包括钙调素拮抗剂、

钙通道抑制剂能够改变多药抗性表型。环孢菌素 A (Cyclosporin A CSA) 是一种由真菌产生的免疫抑制剂, 文献多有报道能增强抗肿瘤药物对细胞的毒性, 逆转对药物的抗性^[4]。

实验采用 HL-60 细胞及本室建立的 HL-60 抗三尖杉酯碱亚系 HL-60/Har, 该细胞对三尖杉酯碱、秋水仙素有明显抗性。实验测定较之敏感株 HL-60 对阿霉素 (Doxorubicin DOX) 的抗性近 600 倍, 对柔红霉素 (Daunorubicin DAN) 的抗性 69 倍, 显示出具有多药

抗性。我们采用浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 的 CSA, 该浓度对 HL-60/Har 细胞的增殖抑制不明显, 但能明显增强 HL-60/Har 细胞对 DOX 的敏感性。基于细胞增殖抑制、克隆形成抑制、FCM 分析细胞周期和 DAN 在细胞内的积累及滞留, 表明 CSA 对 HL-60/Har 的抗性逆转明显。

材料和方法

1. 药物

阿霉素、柔红霉素由 Fanutakub Carti Erban, Italy 生产。环孢菌素购自杭州华东制药厂。

2. 细胞培养

人早幼粒白血病 HL-60 细胞和本室建立的抗三尖杉酯碱(Harringtonine Har)的细胞亚系 HL-60/Har, 培养液含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640(Gibco), 置 37°C , 5% CO_2 条件下培养。

3. 细胞增殖抑制分析

收集对数期生长的细胞, 悬浮于培养液, 细胞浓度为 $4 \times 10^4/\text{ml}$, 加入 24 孔培养板(Denmark), 每孔 1 ml。将相应浓度的药物加入, 每个浓度平行 3 孔, 于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 72 小时, 用 Coulter Counter(ZBI)计数细胞的最终数目。各浓度组与对照组的细胞数目百分比对药物浓度绘制剂量反应曲线, 同时对数据进行对数回归求出 IC_{50} 值。

4. 克隆形成抑制

细胞悬浮于含 30% 胎牛血清的培养液, 每毫升 2000 个细胞。细胞悬液、10 倍于终浓度的药物和 3% 的琼脂以 8:1:1 的比例加入 24 孔板, 每孔终体积为 300 μl , 置 37°C 、5% CO_2 的潮湿条件下培养 5 天后, 计数细胞集落。

5. FCM 对细胞内 DAN 积累和滞留的分析

收集对数期生长的细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释至每毫升含 10^6 个细胞。加入相应药物, 37°C 温育 1 小时, 流式细胞仪(FACS 420) 488 nm 激光激发, 对数方式处理实验结果。

6. FCM 分析细胞周期

对数期生长的细胞接种至大方瓶, 每瓶 5 ml, 总细胞数目为 5×10^4 , 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 小时。加入相应浓度的药物, 继续培养 24 小时。收集细胞, PBS 洗一次, 70% 酒精 4°C 固定过夜。测定前, 离心去除酒精, PBS 洗两次, 碘化丙啶(propidium iodide PI)染色。流式细胞仪测定细胞内 DNA 含量,

结果用软件 DNA Cell-Cycle Analysis Software-Ver C 5/87 Polynomial Model 处理。

结果

一、HL-60/Har 细胞的多药抗性

阿霉素(DOX)和柔红霉素(DAN)对细胞增殖的抑制表明, DOX 对 HL-60 细胞的 IC_{50} 值为 3.16 ng/ml , HL-60/Har 的 IC_{50} 是 $1.89 \mu\text{g/ml}$, 抗性近 600 倍。DAN 对 HL-60 细胞的半致死浓度为 3.94 ng/ml ; HL-60/Har 的 IC_{50} 为 $0.27 \mu\text{g/ml}$, 抗性约 69 倍。

二、CSA 增强 Dox 对 HL-60/Har 细胞的抑制作用

DOX 与环孢菌素 A(CSA)合用, 结果如图 1 所示, DOX 的几个浓度对 HL-60/Har 细胞抑制作用不大, 但与对细胞无明显抑制的 $0.5 \mu\text{mol/L}$ CSA 合用后, CSA 大大增强了 DOX 对细胞的毒性($P < 0.01$)。表 1 为克隆形成抑制的结果, $0.5 \mu\text{g/ml}$ 阿霉素单独用药, 克隆形成 155 ± 19 ; 与 $0.5 \mu\text{mol/L}$ CSA 合用, 克隆形成只有 19 ± 7 , 有显著差异($P < 0.01$)。

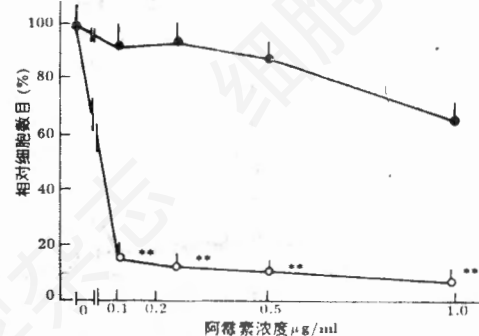


图 1 阿霉素单独用药(—●—)及与 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 环孢菌素联合用药(—○—)对 HL-60/Har 细胞的生长抑制。(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 环孢菌素单独用药时细胞存活不低于对照 85%, 培养时间 72 小时。n = 9**P < 0.01)

三、CSA 增强 DOX 对 HL-60/Har 细胞 G₂M 期的阻断作用

$0.1 \mu\text{g/ml}$ DOX 及 $0.5 \mu\text{mol/L}$ CSA 对 HL-60/Har 细胞增殖周期均无明显改变, 不

表 1 HL-60/Har 细胞在软琼脂中的克隆形成

药 物	平行样本						X±SD
	A	B	C	D	E	F	
DOX	137	158	132	152	184	172	155±19.
CSA	189	192	168	174	175	206	184±14
DOX + CSA	30	18	25	9	13	22	19±7
对照	252	230	249	240	244	253	244±8

药物浓度: DOX (0.5 ug/ml); CSA (0.5 umol/L)

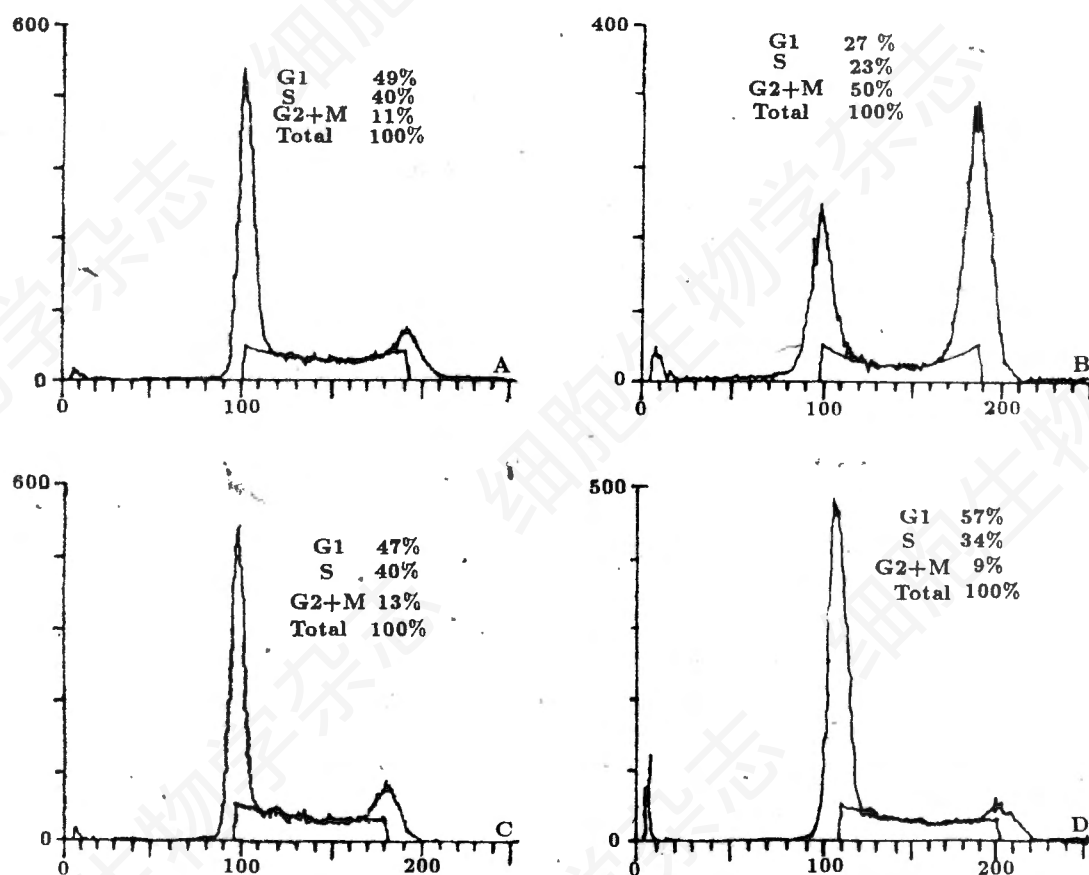


图 2 药物对 HL-60/Har 细胞周期的影响。

A. 0.1 μg/ml 阿霉素 (DOX) 作用 24 小时; B. 0.5 μmol/L 环孢菌素 A (CSA) 与 0.1 μg/ml DOX 联合用药 24 小时; C. 0.5 μmol/L CSA 作用 24 小时; D. 不加药物的对照。

图中数据为各周期时相占总细胞数的百分比, 总细胞数为 1×10^4 个。横座标——相对 DNA 含量; 纵座标——细胞数目。

加药物的对照组 G₂M 期细胞占 9%, DOX 和 CSA 单独用药时 G₂M 期细胞分别为 11% 和 13%, 没有多大变化。联合用药可使 G₂M 期细胞由 DOX 单独用药时的 11% 增加至 50%, 阻断明显增加。由图 2 可以看出 DNA 含量的

峰在联合用药时由 G₁、S 期向 G₂M 期发生较大偏移。

四、CSA 增加 DAN 在细胞内的积累和滞留

利用 DAN 自发荧光可以直接观察引起药

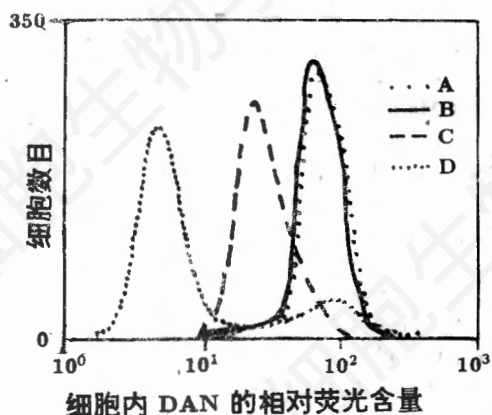


图3 流式细胞光度术分析柔红霉素(DAN)在HL-60细胞和HL-60/Har细胞内的积累和滞留。

(A. 10 $\mu\text{g/ml}$ DAN 和 0.5 μM 环孢菌素 A(CSA) 联合用药作用 HL-60 细胞 1 小时; B. 10 $\mu\text{g/ml}$ DAN 单独作用 HL-60 细胞 1 小时; C. HL-60/Har 细胞在 10 $\mu\text{g/ml}$ DAN 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ CSA 联合用药下 1 小时; D. 10 $\mu\text{g/ml}$ DAN 作用 HL-60/Har 细胞 1 小时。

物毒性下降的药物外排。荧光显微镜下,用紫外光激发,加入 10 $\mu\text{g/ml}$ DAN 短时间细胞内荧光逐渐增强。1 小时后,细胞内没有可以观察到的荧光。加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ CSA 的实验组,细胞内可见桔黄色荧光。FCM 分析表明,488 nm 激光激发,收集 DAN 发射的荧光,HL-60/Har 细胞内的荧光峰(图 3 D)转之 HL-60 细胞(图 3 A)向左明显偏移。加入 CSA 的 HL-60/Har 组(图 3 C),细胞内荧光峰向右出现移动。但 HL-60 细胞在 CSA 存在(图 3 A)和不存在(图 3 B)两组间,细胞内的荧光量没有改变。

讨 论

目前研究肿瘤细胞多药抗性的一个重点是抗性的逆转。许多种药物如钙调素拮抗性或钙通道抑制剂能逆转这种抗性。如异博定(Verpamil)、硫酸奎尼宁(Quinidine Sulphate)、三氟拉嗪(Trifluoperazine)、Tamoxifen 等^[5]。异博定是一种研究较多的良好逆转药物,但其心脏毒性限制了临床应用。近期的研究表明环

孢菌素 A(CSA)能改变肿瘤细胞的抗性表型,增强细胞对抗肿瘤药物的敏感性^[6],但其作用机理仍未被阐明。

0.5 $\mu\text{mol/L}$ CSA 单独用药对细胞无明显抑制,但与 DOX 联合使用,明显增强了 DOX 对细胞的毒性。DOX 作为一种抗肿瘤药,能将细胞 DNA 合成特异地阻断于 G₂M 期。由图 2, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 的 DOX 对细胞 DNA 合成的阻断说明, CSA 能明显增加阻断于 G₂M 期的细胞数目。为进一步研究 CSA 如何起作用导致细胞对抗肿瘤药敏感性增强,我们利用了 DAN 自发荧光的特点,研究了药物在细胞内的积累和滞留情况,发现 HL-60/Har 细胞对 DAN 有强烈外排作用,加入 CSA,外排减少,药物在细胞内的积累和滞留增加。图 3 中峰值向右偏移,荧光量增大,表示细胞内药物浓度增大。但 CSA 在 HL-60 敏感株中不存在这种作用,结果与 Chambers 等人报道的不同^[6,7]。

从以上讨论可以得到以下结论: 1. CSA 能增加 DOX 和 DAN 等药物在 HL-60/Har 细胞内的积累,而在 HL-60 细胞中不具有这种作用; 2. 细胞内药物积累增加对细胞抗药性逆转起着重要作用。对于逆转药物的作用机理,许多资料分析认为是药物直接结合 P-糖蛋白,竞争性地抑制细胞膜上依赖 ATP 的泵,导致细胞内药物浓度升高^[8]。不管这些药物结构上出现怎么样的差异,但它们大都具有共同的双芳香环结构并有强的亲脂性,提示这些药物与 P-糖蛋白的结合位点可能存在于脂双层上。Zordan-Nudo 也有类似的推测^[9]。Dieterl^[10]最近报道 CSA 调节多药抗性不仅通过直接与 P-糖蛋白结合,而且间接作用于细胞膜、胞内钙调素或某些靶分子。

使用低剂量 0.5 $\mu\text{mol/L}$ CSA 逆转肿瘤细胞的抗性不曾看到有人报道,但 CSA 对实验性肿瘤细胞的抗性逆转已为研究者接受。CSA 的作用机理还不清楚,但其增强抗性及非抗性细胞对抗肿瘤药物的敏感性说明,不仅仅是作用于 P-糖蛋白一种机制在起作用。

摘要

0.5 $\mu\text{mol/L}$ CSA 与阿霉素联合用药, 可显著增强阿霉素对 HL-60/Har 细胞的毒性。克隆抑制实验证实联合用药时, 克隆形成由阿霉素单独用药的 155 ± 19 降至 19 ± 7 个, 分别是对照的 64% 和 9%, 差异显著 ($P < 0.01$)。CSA 能增加柔红霉素在 HL-60/Har 细胞内的积累。0.1 $\mu\text{g/ml}$ 阿霉素对细胞周期没影响, 与 CSA 合用后, 阻断于 G_2M 期的细胞由 11% 增至 50%。结果显示: 1. CSA 能逆转 HL-60/Har 细胞的多药抗性; 2. 逆转作用是通过增加抗肿瘤药物在细胞内的积累来实现的。

关键词: 抗药性 P-糖蛋白 逆转
环孢菌素 A

参考文献

- [1] Endicott, J. A. and Ling, V. 1987, *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 137-171.
- [2] Mellado, W. and Horwitz, S. B. 1987, *Biochemistry*, 26: 6900-6964.
- [3] Aquion, A., et al. 1988, *Cancer Res.*, 48: 3324-3329.
- [4] Goldberg, H., et al. 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152: 552-558.
- [5] Raderer, M. and Scherthauer, W. 1993, *Cancer*, 72(12): 3553-3563.
- [6] Chambers, S. K. et al., 1988, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 29: 313-319.
- [7] Meador, J., et al., 1987, *Cancer Res.*, 47: 6216-6219.
- [8] Kaye, S. B. 1990, *Cancer Treat Rev.*, 17(suppl A): 37-43.
- [9] Zordon-Nudo, T., et al., 1993, *Cancer Res.*, 53(24): 5994-6000.
- [10] Dietel, M., et al. 1994, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120: 263-271.

REVERSAL OF RESISTANCE TO DOXORUBICIN IN HL-60/HAR CELLS BY CYCLOSPORIN A

WANG Chen-Guang GE Yue-Ping CHEN Zun-Qi
(Guang Zhou Medical College, Guang Zhou 510182)
HE Qi-Yang ZHANG Hong-Qing

(Department of Biology, Beijing Normal University Beijing 100875)

ABSTRACT

Cyclosporins have been shown to sensitive multidrug-resistant cells to chemotherapeutic agents but, generally, have minimal effect on sensitive lines. We studied the effect of cyclosporin A(CSA) on the action of doxorubicin (DOX) against multidrug resistance HL-60 cells based on proliferation in the present of drug and clone formation in soft-agar. The results suggest that CSA significantly enhanced the cytotoxic effects of DOX. Laser flow cytometry studies on single-cell DAN levels indicated the treatment with DAN in the present of CSA had significantly enhanced cellular accumulation and retention of DAN in resistant cells. Treated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DOX for 24 hr had no effect on cells' cycle, but, with the synergism of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DOX and 0.5 μM CSA cells were arrested in G_2M phase 50% higher than 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DOX along 11%. These data indicate that increased drug accumulation played a proportionally greater role in the moderately resistant cell line.

Key Words: Multidrug resistance P-glycoprotein Reversal
Cyclosporin A