

气体干扰等原因常不能明确诊断 PA 部位、左右肺动脉发育程度,亦受检查者手法、患儿体位及肺部情况影响。因此为了准确诊断,常需要采用组合方式影像学检查。

MSCT 能显示大多数心内外病变的存在情况,目前已被作为肺动脉闭锁的诊断基础影像学检查方法^[8]。MSCT 后处理技术中,VR 图像能够任意角度显示 PA 发育程度、闭锁部位、主动脉血管情况、有无侧支血管及其来源,为外科医师选择治疗方式提供立体直观图像信息;MIP 与 MPR 联合应用可以设定适当层厚,多方位显示各种心内外畸形,能准确追踪侧支血管来源并测量心房、心室及血管直径,对于心内畸形及心室发育情况亦能较好显示。MSCT 成像速度快,时间和空间分辨率高,特别是随着后处理技术的不断发展,其图像在显示体动脉侧支供血及左右肺动脉发育情况方面可替代 DSA,但目前 MSCT 尚不能提供血流动力学参数,如三尖瓣反流情况,部分病例仍需行 DSA。

本研究对 9 例 PA 同时采用 UCG、MSCTA 检查,以手术结果及超声典型影像学表现为参照比较分析 MSCT。UCG 对 PA 总检出率为 77.8%,对 2 例肺 PVA 均正确诊断,原因为 UCG 可良好地观察心内瓣膜病变,超声血流图可动态观察不同心动周期通过瓣膜的血流情况;对 7 例 PTA 正确诊断 2 例(28.6%),3 例误诊为 PVA,2 例漏诊。MSCTA 对 PA 诊断准确率为 88.8%,其对 2 例 PVA 1 例正确诊断(图 2C),1 例仅能疑诊;对 7 例 PTA 诊断准确率为 100%。6 例病人存在侧支血管,MSCTA 诊断准确率为 100%,均能显示侧支来源、数量、走行及直径;UCG 对 6 例病

人均漏诊侧支血管,1 例病人 PDA 误诊为侧支血管。有研究者提出 MSCTA 应该作为了解肺动脉发育及侧支血管情况的首选影像学检查方法。本组 MSCTA 漏诊 ASD 1 例、TR 1 例,误诊 PFO 为 ASD 2 例、疑诊 PVA 1 例,而这些都为 UCG 检查所检出,这与 UCG 显示细小心内畸形及心瓣膜的能力优于 MSCT 有关。本组资料表明,MSCT 多维重组技术对充分显示 PA 全貌和伴发的心外血管畸形与体肺侧支循环具有重要的诊断价值,UCG 对细小心内畸形及心瓣膜的显示能力可为 MSCT 提供补充,两者结合应用对包括手术在内的临床治疗具有重要的指导作用。

参考文献

- 1 Burrows PE, Freedom RM, Rabinovitch M, et al. The investigation of abnormal pulmonary in congenital heart disease[J]. Radiol Clin North Am, 1985, 23(4): 689-717
- 2 Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, et al. Heart disease in infants, children, and adolescents, including the fetus and young adult[M]. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 983-997
- 3 黄福光, 黄品同, 等. 胎儿与小儿超声诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 315
- 4 Castaneda AR, Jonas RA, Mayer JE, et al. Cardiac Surgery of the Neonate and Infant[M]. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 215-234
- 5 许闻桥, 刘延玲, 王浩, 等. 超声心动图在肺动脉闭锁合并室间隔缺损术前诊断中的作用. 中华超声影像学杂志, 2003, 12(4): 218-221
- 6 刘玉清. 心血管病影像诊断学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000: 514-526
- 7 凌坚, 宋金松, 刘玉清, 等. 肺动脉闭锁合并室间隔缺损的侧支血管造影分析. 中华放射学杂志, 2000, 34(11): 782-784
- 8 陈艳, 金晶. 64 层螺旋 CT 在肺动脉闭锁合并室间隔缺损诊断中的应用. 放射学实践, 2009, 24(4): 391-395

(收稿: 2010-08-01)

RNA 干扰 MDR1 基因对乳腺癌多细胞球阿霉素敏感性的影响

郑庆玲 顾栋桦 平金良 朱 荣 陈 琦

摘 要 目的 通过 RNA 干扰沉默 MDR1 基因, 探讨后者在乳腺癌多细胞球阿霉素耐药中的作用。**方法** 用 liquid overlay 技术培养获得多细胞球 (multicellular spheroids, MCS), 用脂质体转染法把特异针对 MDR1 基因的双链小 RNA 干扰片段导入

基金项目: 湖州市科技局科技攻关项目 (2008GS07)

作者单位: 313000 浙江省湖州师范学院医学院妇产科教研室 (郑庆玲); 313000 浙江省湖州师范学院附属中心医院病理科 (顾栋桦、平金良); 200032 复旦大学上海医学院病理学系 (朱荣、陈琦)

通讯作者: 顾栋桦, 电子信箱: donghuagu@sohu.com

MCF-7 细胞中,采用台盼蓝拒染法检测阿霉素对 MCF-7 的细胞抑制率,MDR1 mRNA 水平及蛋白水平分别用 RT-PCR 和免疫印迹法检测,用荧光光度计法检测阿霉素在细胞内的蓄积情况。**结果** 多细胞球形成后,阿霉素对 MCF-7 细胞的抑制率明显减少,MDR1 mRNA 及蛋白水平明显升高,阿霉素在细胞内的蓄积量减少;RNA 干扰法能明显抑制 MDR1 基因表达,增加阿霉素在 MCS 细胞中的蓄积,提高阿霉素对 MCS 的细胞抑制率。**结论** 多细胞球的形成可以增强 MCF-7 细胞的阿霉素耐药性, RNA 干扰沉默 MDR1 基因可以部分逆转 MCF-7 多细胞球的阿霉素耐药。

关键词 RNA 干扰 MDR 基因 乳腺肿瘤 球形体 细胞 抗药性 肿瘤

Effect of MDR1 Gene Silencing on Adriamycin Sensitivity of Breast Carcinoma Multicellular Spheroids by RNA Interference. Zheng Qingling, Gu Donghua, Ping Jinliang, Zhu Rong, Chen Qi. Department of Gynaecology and Obstetrics, Huzhou Teachers College, Zhejiang 313000, China

Abstract Objective To investigate the role of MDR1 gene expression in drug resistance of multicellular spheroids of breast carcinoma to Adriamycin (ADM) by RNA interfering technique. **Methods** MCF-7 multicellular spheroids were obtained from liquid overlay technique culture. MDR1-targeted small interfering double-stranded RNAs (SiRNA) were introduced into MCF-7 cells by lipofectamine. Adriamycin resistance was detected with trypan blue exclusion testing. MDR1 mRNA and MDR1 protein levels were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, and Adriamycin accumulation in MCF-7 cells was tested by fluorescence spectrophotometry. **Results** Compared with monolayer cells, MCS showed lower cell inhibitory rate and ADM accumulation in cells after ADM exposure for 24h, and both mRNA and protein level of MDR1 were elevated in MCS obviously. RNA interference markedly inhibited the expressing of MDR1 mRNA and protein, and enhanced the intracellular accumulation of and partially restored sensitivity to ADM in MCF-7 MCS. **Conclusion** Breast carcinoma MCF-7 multicellular spheroids induced resistance to ADM. RNA interference to target MDR1 gene can partially restore sensitivity to ADM in MCS.

Key words RNA interference; MDR; Genes; Breast tumor; Spheroids; Cellular; Drug resistance; Neoplasm

化疗是目前治疗恶性肿瘤的主要方法之一,而肿瘤耐药的出现最终会导致肿瘤化疗的失败,所以更深入地了解肿瘤耐药的机制是推动肿瘤治疗发展的重要基础。目前许多肿瘤耐药相关研究选用的是体外单层培养的细胞模型,而体内的实体肿瘤是存在着细胞与细胞、细胞与基质相互作用的三维细胞群体,因此三维培养的多细胞球 (multicellular spheroids, MCS) 模型更接近实体肿瘤的状态。本研究利用细胞三维培养的方法建立多细胞球模型,观察其耐药表型的变化,并通过 RNA 干扰下调 MDR1 基因的表达,探讨其对乳腺癌 MCF-7 多细胞球阿霉素耐药的影响。

材料与方 法

1. 乳腺癌 MCF-7 细胞单层培养: MCF-7 细胞株购于中科院细胞所,细胞在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司) 培养。

2. MCF-7 多细胞球模型的建立: 按细胞三维培养的方法 (liquid overlay technique)^[1] 获得 MCS, 具体方法简单描述如下: 首先用无血清培养液 RPMI-1640 溶解稀释琼脂糖至 1.5% 浓度, 灭菌后在细胞培养皿上铺一浅层, 冷却凝固后用于细胞接种; 单层贴壁培养的 MCF-7 细胞处于生长对数期时, 用胰酶消化后制成单细胞悬液, 调整细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于上述培养皿中, 轻轻震荡后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 每 24h 半量换液, 培养 3 天后形成大小较一致的 MCS, 直径约 100~150 μm, 用于实验。

3. 细胞生长抑制率的检测: 单层 MCF-7 细胞消化制成单细胞悬液, 调整细胞密度, 接种于 24 孔板中; 三维培养的细胞先取部分多细胞球吹散成单细胞悬液, 细胞计数, 然后按与单层培养细胞相同的细胞密度接种于 1.5% 琼脂糖铺底的 24 孔板中; 各组细胞接种 6h 后用终浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L 的阿霉素 (浙江海正药业有限公司) 作用 24h, 以无阿霉素的细胞培养液为阴性对照; 收集单层细胞及 MCS, 于等体积 0.02% 台盼蓝混合, 显微镜不同视野计数 300 个细胞及活细胞数, 细胞生长抑制率 = $(1 - \text{阿霉素作用组活细胞数} / \text{阴性对照组活细胞数}) \times 100\%$ 。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

4. RT-PCR 检测: Trizol 试剂 (上海生工公司) 提取细胞总 RNA, cDNA 合成按 M-MLV 反转录酶 (美国 Invitrogen 公司) 操作说明书进行, PCR 扩增 MDR1 mRNA, 并以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 做为内参照, 引物由 primer5.0 软件设计, 上海生工公司合成, MDR1 引物: 上游 5'-AAC GGA AGC CAG AAC ATT CC-3', 下游 5'-AGG CTT CCT GTG GCA AAG AG-3', 产物长度 180bp; GAPDH 引物: 上游 5'-AAC GGA TTT GG TCG TAT TG-3', 下游 5'-GGA AGA TGG TGA TGG GAT T-3', 产物长度 208bp; 反应条件: 95℃ 10min 变性; 再 95℃ 30s, 54℃ 1min, 72℃ 1min, 26 个循环, 72℃ 延伸 10min, Taq 酶为美国 Promega 公司产品, PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖电泳分离后, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察。实验重复 3 次。

5. 蛋白免疫印迹检测 (Western blot): 收集细胞, 经 PBS 清

洗后,加入细胞裂解缓冲液,提取总蛋白,蛋白定量按 BCA 试剂盒 (Pierce 公司) 说明书进行。根据蛋白相对分子质量选用合适浓度的胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 变性电泳。电泳完毕,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,加入相应的一抗,37℃ 孵育 1h,洗涤后加入过氧化物酶标记的二抗,37℃ 孵育 1h,最后用 ECL 法试剂盒 (Pierce 公司) 按产品说明书步骤显色。条带用 Pro Analyzer 4.0 软件进行积分吸光度 (IA) 分析,以 β -actin 作为内参。一抗:兔抗人 MDR1 (H-241) 多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,工作浓度 1:1000;鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (Sigma 公司),工作浓度 1:1000;过氧化物酶标记的二抗购于上海鼎国公司,工作浓度 1:2000。实验重复 3 次。

6. RNA 干扰 MDR1 mRNA 的表达:特异针对 MDR1 基因及非特异性阴性对照双链小 RNA (SiRNA) 购于美国 Santa-cruz 公司,转染方法按试剂说明书进行,简单描述如下:细胞生长于 6 孔板至 60%~70% 汇合,用无血清培养液静止 24h,5 μ l 的 SiRNA 于 5 μ l RNA 干扰转染试剂 (Santa cruz 公司,美国) 混合于 190 μ l 的无血清的 RPMI-1640 培养液,静置 30min 后滴加到培养皿中,孵育 6h 后,添加 10% 胎牛血清的培养液继续孵育 24h,弃去培养液重新用 10% 胎牛血清的培养液培养 24h 后,小

心消化细胞成单细胞悬液,再按上述三维培养的方法得到多细胞球用于实验。

7. 荧光光度计法检测细胞内阿霉素的蓄积:收集单层细胞 (monolayer cells)、MCS 及转染后的 MCS,调节至细胞数为 1×10^6 ,加入阿霉素使其终浓度为 10 μ mol/L,孵育 3h,收集细胞,用 PBS 洗 3 次,细胞重悬于 1ml 60% 乙醇: HCl (0.3mol/L) 为 1:1 的抽提液中,用超声充分破膜,高速离心后取上清液,用荧光分光光度计 (850 型,Hitachi 公司) 检测荧光强度,激发波长为 470nm,发射波长为 590nm;同时以不同浓度的阿霉素制作标准曲线,根据曲线方程换算成阿霉素浓度。实验重复 3 次。

8. 统计学处理:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS13.0 软件进行统计学分析,组间比较用 t 检验。

结 果

1. 阿霉素对 MCF-7 细胞单层培养及三维培养的细胞抑制率比较:MCF-7 细胞经三维培养 3 天后形成较为致密的多细胞球体 (图 1),用不同浓度的阿霉素作用 24h,多细胞球体的细胞抑制率明显降低 (图 2)。

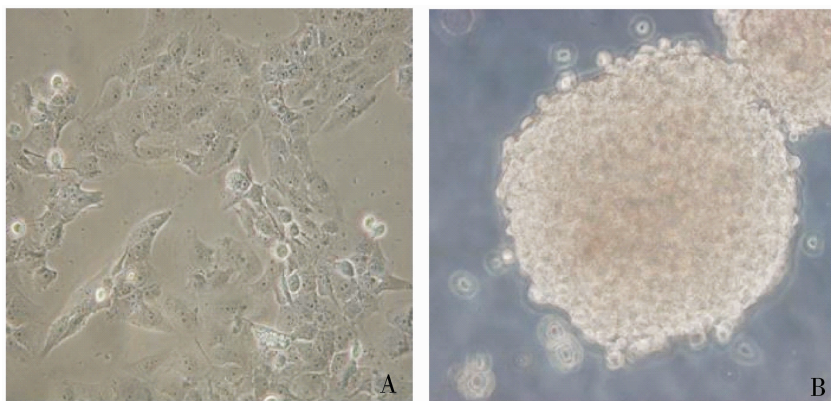


图 1 MCF-7 细胞经单层培养和三维培养后镜下形态观察

A. 单层细胞 (10 $\times$ 20); B. MCS (10 $\times$ 20)

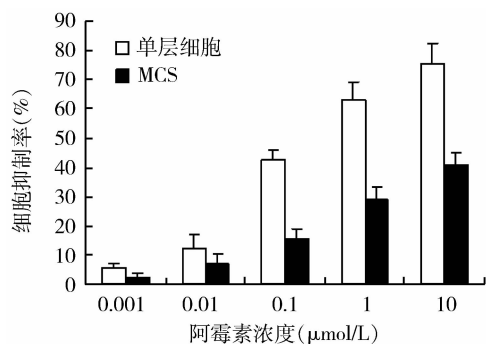


图 2 不同浓度的阿霉素作用 24h 后的细胞抑制率

2. MCF-7 多细胞中 MDR1 的表达:形成多细胞球后 MDR1 的表达升高,MCF-7 细胞中 MDR1 的 mRNA 水平为单层培养组的 8.35 倍 ($P < 0.01$),蛋白水平为单层培养组的 6.17 倍 ($P < 0.01$) (图 3)。

3. RNA 干扰下调 MCF-7 多细胞球体中的 MDR1 的表达:用特异针对 MDR1 基因的干扰序列能有效使 MDR1 基因沉默,MCS 干扰组中用 PCR 方法未检测出明显的 MDR1 mRNA 的表达,而 MCS 干扰对照组与 MCS 未转染组未见明显差别 ($P > 0.05$) (图 4);MCS 干扰组 MDR1 蛋白水平为 MCS 未转染组的 11.72% ($P < 0.01$),MCS 干扰对照组与 MCS 未转染组相比未见明显改变 ($P > 0.05$) (图 5)。

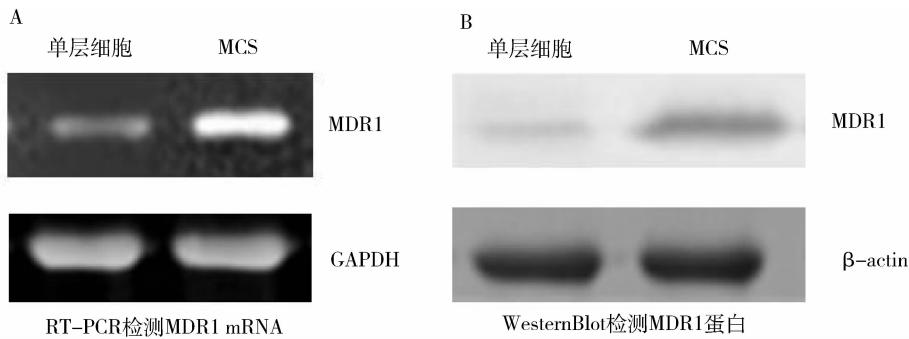


图 3 形成多细胞球后 MDR1 基因的表达变化

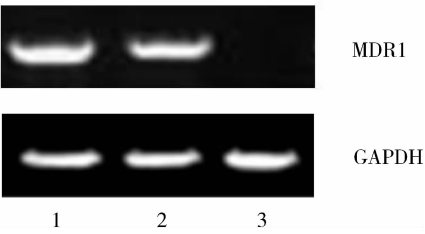


图 4 RT-PCR 检测 RNA 干扰后 MDR1 mRNA 水平

1. MCS 未转染组;2. MCS 干扰对照组;3. MCS 干扰组

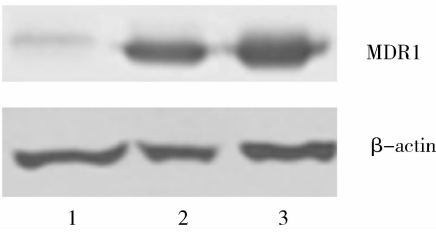


图 5 免疫印迹法检测 RNA 干扰后 MDR1 蛋白水平

1. MCS 未转染组;2. MCS 干扰对照组;3. MCS 干扰组

4. 阿霉素对 RNA 干扰前后的多细胞球的细胞抑制率比较:如图 6 所示,与 MCS 未转染组相比,用 1μmol/L 的阿霉素作用 24h, MCS 干扰对照组的细胞

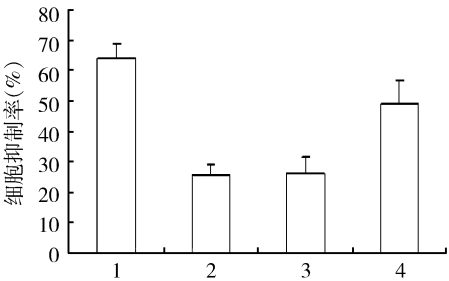


图 6 1μmol/L 的阿霉素作用 24h 后的细胞抑制率

1. 单层培养组;2. MCS 未转染组;
3. MCS 干扰对照组;4. MCS 干扰组

抑制率无明显改变($P>0.05$);MCS 干扰组的细胞抑制率增加了 91.85% ($P<0.01$),但仍然低于单层培养组($P<0.05$)。

5. 荧光光度计法检测细胞内阿霉素蓄积: 10μmol/L 阿霉素作用 3h 后,用荧光光度计法检测,单层培养组、MCS 未转染组、MCS 干扰对照组及 MCS 干扰组的细胞内阿霉素的蓄积浓度分别为 4.94 ± 0.65 、 1.25 ± 0.28 、 1.17 ± 0.49 及 3.62 ± 0.81 nmol/ 10^6 细胞,MCS 干扰组明显高于 MCS 未转染组、MCS 干扰对照组 ($P<0.01$),但低于单层培养组 ($P<0.05$)(图 7)。

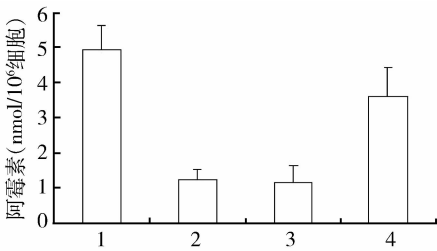


图 7 荧光光度计法检测细胞内阿霉素蓄积

1. 单层培养组;2. MCS 未转染组;
3. MCS 干扰对照组;4. MCS 干扰组

讨 论

体内存在的实体肿瘤是一个三维的多细胞群体,细胞与细胞、细胞与外基质的相互作用以及肿瘤的微环境因素都会影响肿瘤的生物特性;因此,三维培养的多细胞球比单层培养细胞更接近于肿瘤的真实状态。目前研究发现肿瘤细胞形成多细胞球后,降低细胞对多种化疗药物的敏感性,而这种耐受能力的增强并由于药物不易进入到球体内所致,这种耐药现象被称为“多细胞耐药 (multicellular resistance, MCR)”^[2]。多细胞耐药的现象在许多研究中被证实,例如卵巢癌、结肠癌、肺癌等^[3-5];但其机制现在还不十分了解。多细胞球的形成在乳腺癌的耐药中

起着什么样的作用,目前国内还未见报道。

我们的研究发现乳腺癌 MCF-7 细胞株在三维培养的条件下,能形成大小较为一致的多细胞球体,在不同浓度的阿霉素作用下,与单层细胞相比,细胞抑制率明显下降;说明多细胞球的形成能够提高 MCF-7 细胞对阿霉素的耐药能力。多细胞耐药的发生是一个非常复杂的过程,很多因素参与其中,像黏附分子激活、细胞信号通路的改变、细胞周期和凋亡调控的变化等,其中多药耐药基因 1 (multidrug resistance 1, MDR1) 及其产物 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)可能也起着重要的作用^[6]。有研究发现肺癌细胞 INER-51 多细胞球的 P-gp 功能比单层细胞明显增强,减少药物在细胞内的蓄积,从而提高细胞的生存率^[5]。Xing 等人发现在卵巢癌细胞形成多细胞球后 MDR1 表达上调,抑制 MDR1 基因的表达可以恢复细胞对紫杉醇的敏感性^[7]。

我们也观察了 MCF-7 细胞中 MDR1 的表达变化,发现无论从 mRNA 水平还是蛋白水平上,多细胞球体的 MDR1 表达明显高于单层细胞,而且 10 μmol/L 阿霉素作用 3h 后,细胞内阿霉素的蓄积浓度减少了 60.17%。在随后的实验中,我们用 RNA 干扰的方法有效地特异性抑制 MDR1 基因的表达,阿霉素对 MCS 的细胞抑制率增加了 91.85%,10 μmol/L 阿霉素作用 3h 后,细胞内阿霉素蓄积浓度增加 1.9 倍,表明 MDR1 表达的上调在 MCF-7 多细胞球阿霉素耐药中起着重要的作用。但我们也看到抑制 MDR1 基因的表达虽然一定程度上逆转了 MCS 的阿霉素耐药性,但并未恢复到单层细胞的水平;因此,除了 MDR

基因表达上调外,还存在其他的因素影响到乳腺癌多细胞耐药的形成,还有待于进一步研究。

综上所述,我们的结果表明多细胞球的形成可以增强 MCF-7 细胞的阿霉素耐药能力,MDR1 基因表达上调可能是其重要机制,RNA 干扰 MDR1 基因可以部分逆转 MCF-7 多细胞球的阿霉素耐药,其中内在调控机制还有待于深入研究。

参考文献

- 1 Koike C, McKee TD, Pluen A, *et al.* Solid stress facilitates spheroid formation; potential involvement of hyaluronan [J]. *Br J Cancer*, 2002, 75(6):947-953
- 2 郑晨宏,梁后杰,周琪.黏附分子在肿瘤多细胞耐药中的研究进展[J].*肿瘤*,2008,28(7):626-628
- 3 Xing H, Wang S, Hu K, *et al.* Effect of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 on resistance of ovarian cancer multicellular spheroids to anticancer chemotherapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(8):511-519
- 4 Chen Y, Wang Z, Chang P, *et al.* The effect of focal adhesion kinase gene silencing on 5-fluorouracil chemosensitivity involves an Akt/NF-κappaB signaling pathway in colorectal carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(1):195-206
- 5 Ponce de León V, Barrera-Rodríguez R. Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids[J]. *Cancer Cell Int.* 2005, 5(1):20-26
- 6 Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000, 36(2-3):193-207
- 7 Xing H, Wang S, Weng D, *et al.* Knock-down of P-glycoprotein reverses taxol resistance in ovarian cancer multicellular spheroids[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(1):117-122

(收稿:2010-07-03)

组蛋白去乙酰化酶抑制剂与顺铂联用 激活线粒体信号通路诱导口腔鳞癌细胞的凋亡

申俊 柏景坪 王维倩 顾亚军

摘要 目的 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors,HDACIs)与顺铂联合应用对口腔鳞癌细胞的凋亡诱导作用及相关分子机制。**方法** (1)采用 MTS 法首先检测不同浓度的 SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)和顺铂单独作用于口腔鳞癌细胞后,对其生长增生的影响,获得口腔鳞癌细胞对两种药物单独使用的剂量反应。(2)结合前面所得结果,采用流式细胞术及 TUNEL 分别检测低剂量 SAHA(2 μmol/L)及顺铂(4 μg/ml)单独和联合用药后,对口腔鳞癌细胞的凋亡诱导情况。(3)采用 western blotting 的方法观察单独及联合用药情况下 Tca8113 及 κB 两株口腔鳞癌细胞线粒体和胞质内细胞色素 C(cyto-