

雷帕霉素与环孢素 A 对人乳腺癌细胞的耐药逆转作用比较

沈香娣 范兴丽 仇容 陈健 刘丹丹

摘要 **目的** 比较雷帕霉素与环孢素 A 对人乳腺癌细胞的耐药逆转作用。**方法** MTT 法测定人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADR 的耐药倍数。乳腺癌敏感细胞株 MCF-7/S 和耐药细胞株 MCF-7/ADR 各自分为:对照组;加入不同浓度阿霉素;实验组:加入不同浓度的阿霉素+不同浓度的雷帕霉素或者不同浓度的阿霉素+不同浓度的环孢素 A;空白组。MTT 法观察细胞抑制率,并算得半数抑制浓度,得出耐药逆转倍数。用免疫荧光法测得加入阿霉素的 MCF-7/ADR 细胞株在不同浓度的雷帕霉素或者环孢素 A 作用下,细胞内的阿霉素浓度。**结果** (1)MCF-7/ADR 细胞株的耐药倍数为 12.13。(2)对于 MCF-7/S 细胞株,雷帕霉素和环孢素 A 的耐药逆转倍数均为 1。(3)对于 MCF-7/ADR 细胞株,10 μ mol/L 环孢素 A 使阿霉素的 IC₅₀ 显著降低 ($P < 0.05$),逆转倍数为 1.6,并且随着浓度的增加,IC₅₀ 逐渐降低,逆转倍数有逐渐增高的趋势;1 μ mol/L 雷帕霉素使阿霉素的 IC₅₀ 显著降低 ($P < 0.05$),逆转倍数为 1.6,并且随着浓度的增加,IC₅₀ 逐渐降低,逆转倍数有逐渐增高的趋势。(4)10 μ mol/L 的环孢素 A 和 1 μ mol/L 的雷帕霉素,开始增加乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADR 细胞内的阿霉素浓度,并且随着浓度的增加,阿霉素浓度增加。相同浓度的药物作用下,雷帕霉素组的细胞内阿霉素浓度较环孢素 A 高。**结论** 雷帕霉素能逆转 MCF-7/ADR 细胞株的耐药性,且效果较环孢素 A 好。

关键词 雷帕霉素 环孢素 A 乳腺癌 多药耐药 逆转

Comparison About Reverse Effect of Rapamycin and Cyclosporine A on Multidrug Resistance of Human Breast Cancer Cell. Shen Xiang-di, Fan Xingli, Qiu Rong, Chen Jian, Liu Dandan. Zhejiang Medical College, Zhejiang 310053, China

Abstract **Objective** To compare the reverse effect of rapamycin and cyclosporine A on multidrug resistance of human breast cancer cell. **Methods** The drug resistance fold of MCF-7/ADR was detected by MTT. Human breast cancer cells MCF-7/S and MCF-7/ADR were separated to some groups respectively. In control group, ADM of different concentrations were added, and in experiment group, besides ADM of different concentrations, rapamycin or cyclosporine A of different concentrations were added, and in blank group, nothing was added. The inhibition rates were detected by MTT, then IC₅₀ and reverse fold were calculated. Rapamycin or cyclosporine A were added to MCF-7/ADR with ADM, then concentrations of ADM in cells were detected by immunofluorescence. **Results** (1) The drug resistance fold of mcf-7/ADR was 12.13. (2) For MCF-7/S, the reverse fold of rapamycin and cyclosporine A were 1. (3) For MCF-7/ADR, cyclosporine A (10 μ mol/L) and rapamycin (1 μ mol/L) could decrease IC₅₀ of ADM significantly. And as the concentration increasing, IC50 decreased, and reverse fold increased. (4) Cyclosporine A (10 μ mol/L) and rapamycin (1 μ mol/L) could increase the concentration of ADM in MCF-7/ADR cells. With the increasing concentration of drugs, the concentration of ADM in cells increased. The concentration of ADM in cells with rapamycin was higher than that with cyclosporine A of the same concentration. **Conclusion** Rapamycin could reverse the drug resistance of MCF-7/ADR, and had better effect than cyclosporine A.

Key words Rapamycin; Cyclosporine A; Breast cancer; Multi-drug resistance; Reverse

雷帕霉素是丝氨酸-苏氨酸激酶(mTOR)的异性抑制剂,可以通过多种机制抑制和杀伤肿瘤。近来有研究表明 mTOR 信号传导通路还与肿瘤的多药耐药有关^[1]。本研究旨在比较雷帕霉素与环孢素 A 对乳腺癌细胞多药耐药的逆转作用。

材料与方法

1. 细胞株:人乳腺癌敏感细胞株 MCF-7/S 细胞系(上海细胞库);人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADR 细胞系(南京凯基生物发展有限公司)。

2. 仪器和设备:酶标仪(Thermo MK3,美国);荧光酶标仪(FlexStation II,美国);冷冻离心机(Beckman Coulter-Allegro® 64R,德国);细胞培养箱(Heraeus 公司,德国);超净工作台(上海博迅医疗设备厂)。

3. 试剂:雷帕霉素(台州市晟欣医药化工有限公司);盐酸

基金项目:浙江省教育厅科研计划项目(Y200805993)

作者单位:310053 杭州,浙江医学高等专科学校

阿霉素(上海君创生物科技有限公司);环孢素 A(Sigma 公司,美国);MTT(Sigma 公司,美国);RPMI1640(杭州吉诺生物医药技术有限公司);小牛血清(杭州四季青生物公司);DMSO(国药集团化学试剂有限公司);胰酶(杭州吉诺生物医药技术有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德)。

4. 方法:(1)MTT 法测定阿霉素耐药细胞株的耐药倍数:用 MTT 法测定不同浓度阿霉素作用下 MCF-7/ADR 和 MCF-7/S 细胞的增殖率。取对数生长期的 MCF-7/S 细胞、MCF-7/ADR 细胞分别用胰酶消化,调整细胞的浓度至 $1 \times 10^4/\text{ml}$,每孔 $100\mu\text{l}$,接种于 96 孔板中。放置 37°C 、饱和湿度的 5% CO_2 培养箱 24h 后,加入 $25\mu\text{l}$ 不同浓度的阿霉素,终浓度分别为: MCF-7/S 组: 10、100、500、1000、5000、20000、40000ng/ml, MCF-7/ADR 组: 50、500、1000、5000、20000、40000、100000ng/ml,每组设 3 个复孔。药物处理 24h 后,加入 $31.5\mu\text{l}$ 的 MTT($5\text{mg}/\text{ml}$),培养 4h 后,去除培养液,加入 $\text{DM-SO}200\mu\text{l}$,震荡 5min 后,570nm 测定每孔的吸光值。计算细胞存活率:存活率 = 测得吸光度值/空白对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。抑制率 = $1 - \text{增殖率}$ 。根据抑制率,算得半数抑制浓度(IC_{50})。并求得耐药倍数:耐药倍数 = MCF-7/ADR 细胞 IC_{50} /MCF-7/S 细胞 IC_{50} 。(2)MTT 法雷帕霉素与环孢素 A 的耐药逆转作用:取对数生长期的 MCF-7/S 细胞、MCF-7/ADR 细胞分别用胰酶消化,调整细胞的浓度至 $5 \times 10^4/\text{ml}$,每孔 $100\mu\text{l}$,接种于 96 孔板中。放置 37°C 、饱和湿度的 5% CO_2 培养箱 24h 后分组:对照组(加入上述不同浓度的阿霉素),实验组(加入不同浓度的阿霉素 + 不同浓度的雷帕霉素或者不同浓度的阿霉素 + 环孢素 A),空白组。雷帕霉素和环孢素 A 的浓度均采用 0.1、1、10、50、100、200、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (已用 MTT 测定该剂量作用下,MCF-7/S 细胞和 MCF-7/ADR 细胞株的细胞存活率,结果为无显著细胞毒性。数据未提供)。每组设 3 个复孔。药物处理 24h 后,加入 $31.5\mu\text{l}$ 的 MTT($5\text{mg}/\text{ml}$),按 MTT 法测定阿霉素耐药细胞株的耐药倍数中所述方法算得不同浓度雷帕霉素或环孢素 A 作用下的两种细胞株的阿霉素半数抑制浓度(IC_{50})。并求得逆转倍数(reversal fold, RF)。RF = 对照组 IC_{50} /实验组 IC_{50} 。(3)细胞内阿霉素浓度的检测:取对数生长期的 MCF-7/S 细胞、MCF-7/ADR 细胞分别用胰酶消化,调整细胞的浓度至 $1 \times 10^4/\text{ml}$,每孔 $100\mu\text{l}$,接种于 96 孔板中。放置 37°C 、饱和湿度的 5% CO_2 培养箱 24h 后,去除培养基,每孔加入 Hanks 液 $100\mu\text{l}$ 作用 0.5h,然后去除 Hanks 液,分组加入用 Hanks 液配好的药物,作用 1h 后,去除上清,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,然后加入 $150\mu\text{l}$ 的 1% 的 Triton-X100 溶解细胞,充分溶解后,取 $100\mu\text{l}$ 上荧光酶标仪检测(488/560nm),然后再从剩下的溶液中取 $25\mu\text{l}$ 进行蛋白定量测定(BCA 蛋白定量试剂盒,武汉博士德)。细胞内阿霉素浓度 = 阿霉素的量/蛋白的量(ng/ng)。

5. 统计学方法:所有资料采用 SPSS 13.0 软件进行分析。结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 耐药细胞株的耐药倍数:如图 1 和图 2 所示,阿霉素作用 MCF-7/S 和 MCF-7/ADR 的细胞存活率随着剂量的增加而逐渐降低。MCF-7/S 细胞株的阿霉素 IC_{50} 为 $2.40\mu\text{g}$ 。MCF-7/ADR 细胞株的阿霉素 IC_{50} 为 $29.11\mu\text{g}$ 。耐药倍数 = $29.11/2.4 = 12.13$ 。

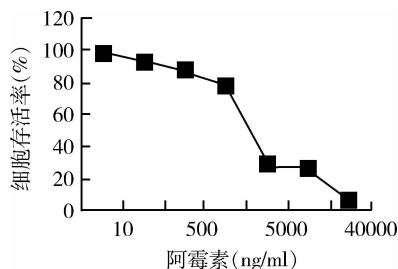


图 1 阿霉素对 MCF-7/S 细胞存活率的影响

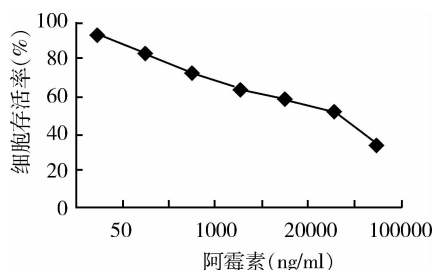


图 2 阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞增殖率的影响

2. 雷帕霉素与环孢素 A 对细胞耐药的逆转作用:(1)环孢素 A 对乳腺癌细胞的耐药逆转作用:如表 1 所示,不同浓度的环孢素 A 对敏感株的细胞 MCF-7/S 阿霉素 IC_{50} 无显著的影响,逆转倍数也都是 1。而对于耐药株 MCF-7/ADR, $10\mu\text{mol}/\text{L}$ 环孢素 A 使阿霉素的 IC_{50} 显著降低($P < 0.05$),逆转倍数为 1.6,并且随着浓度的增加, IC_{50} 逐渐降低,逆转倍数有逐渐增高的趋势。(2)雷帕霉素对乳腺癌细胞的耐药逆转作用:如表 2 所示,不同浓度的雷帕霉素对敏感株的细胞阿霉素 IC_{50} 无显著的影响,逆转倍数均为 1。而对于耐药株 MCF-7/ADR, $1\mu\text{mol}/\text{L}$ 雷帕霉素使阿霉素的 IC_{50} 显著降低($P < 0.05$),逆转倍数为 1.6,并且随着浓度的增加, IC_{50} 逐渐降低,逆转倍数有逐渐增高的趋势。(3)雷帕霉素与环孢素 A 对乳腺癌耐药细胞内阿霉素浓度的影响:如图 3 所示,环孢素 A 在 $10\mu\text{mol}/\text{L}$ 的时候,开始增加乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADR 细胞内的阿霉素浓度,而雷帕霉素在 $1\mu\text{mol}/\text{L}$ 的时候就开始增加了。并且随着雷帕霉素浓度的增加,其增加细胞内阿霉素浓度($\text{ng}/$

ng)的能力也随之增加。

表 1 环孢素 A 对阿霉素 IC₅₀ 的影响及耐药逆转倍数

浓度 (μmol/L)	MCF-7/S		MCF-7/ADR	
	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF
0(对照组)	2.40 ± 0.12		29.11 ± 2.1	
0.1	2.37 ± 0.20	1	29.99 ± 4.68	1
1	2.37 ± 0.33	1	30.15 ± 3.77	1
10	2.29 ± 0.09	1	19.40 ± 2.54 *	1.6 *
50	2.39 ± 0.30	1	16.54 ± 0.98 *	1.8 *
100	2.41 ± 0.10	1	13.66 ± 1.05 *	2.1 *
200	2.39 ± 0.28	1	10.65 ± 0.78 *	2.7 *
500	2.33 ± 0.11	1	5.56 ± 0.29 *	5.2 *

与对照组相比, * P < 0.05

表 2 雷帕霉素对细胞阿霉素 IC₅₀ 和 RF 的影响

浓度 (μmol/L)	MCF-7		MCF-7/ADR	
	IC ₅₀	RF	IC ₅₀	RF
0(对照组)	2.40 ± 0.12		29.11 ± 2.1	
0.1	2.41 ± 0.22	1	29.96 ± 1.55	1
1	2.41 ± 0.09	1	18.45 ± 2.00 *	1.6 *
10	2.39 ± 0.14	1	15.00 ± 1.60 *	1.9 *
50	2.40 ± 0.19	1	10.19 ± 0.37 *	2.9 *
100	2.41 ± 0.07	1	8.33 ± 0.69 *	3.5 *
200	2.39 ± 0.28	1	7.04 ± 0.24 *	4.1 *
500	2.33 ± 0.11	1	2.65 ± 0.17 *	11.0 *

与对照组相比, * P < 0.05

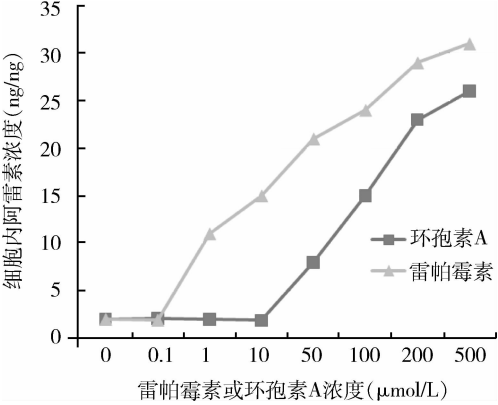


图 3 不同浓度雷帕霉素或环孢素 A 作用下 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素浓度

讨 论

化疗是乳腺癌治疗的主要方法之一,然而多药耐药是乳腺癌化疗失败的主要原因。因此有效逆转肿瘤的多药耐药,是增加乳腺癌治愈率的一个重要手段。环孢素 A 由于有较强的耐药逆转作用已经进入临床试验^[2-4]。

雷帕霉素是 mTOR 特异性的抑制剂,进入细胞于胞质内的 FKBP12 形成复合物,结合 mTOR 并抑制其

功能,从而阻断 mTOR 介导的信号通路,可以通过诱导肿瘤细胞周期停滞于 G₁ 期、诱导 p53 非依赖性的肿瘤细胞凋亡、减少肿瘤血管的生成和密度等多种机制抑制和杀伤肿瘤^[5]。近来有研究发现,雷帕霉素能逆转膀胱癌多药耐药细胞系的耐药性,并且和 mTOR 介导的信号传导通路有关^[1]。另外,也有研究发现,在多药耐药 B 淋巴细胞系中,雷帕霉素能使 P-gp 泵失活,而 P-gp 泵能通过多种机制导致耐药^[6]。而本研究的目的在于探讨雷帕霉素能否逆转乳腺癌的多药耐药,并与环孢素 A 进行比较。本研究的结果表明,MCF-7/ADR 细胞株相比 MCF-7 细胞株,有较高的耐药性(耐药倍数 = 12.13)。而雷帕霉素与环孢素 A 对乳腺癌耐药逆转作用的结果提示雷帕霉素对乳腺癌耐药细胞株具有逆转耐药的作用,而且有效浓度较环孢素 A 小。另外我们还研究了雷帕霉素与环孢素 A 对乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADR 摄取阿霉素的影响。结果显示,雷帕霉素与环孢素 A 均能增加乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADR 对阿霉素的摄取,雷帕霉素的有效浓度较环孢素 A 为低,而且相同浓度下,雷帕霉素的效果比环孢素 A 好。

由上述结果我们可以得出推测,雷帕霉素可以抑制乳腺癌多药耐药细胞株对阿霉素的摄取,逆转乳腺癌耐药细胞株的多药耐药,并且效果较环孢素 A 好。而雷帕霉素逆转多药耐药的具体机制是什么,是否能作为多药耐药药物应用于乳腺癌的化疗,还需要进一步的研究。

参考文献

1 Viktor G, Linda DG, Douglas R, *et al.* Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2002, 62: 6141-6145

2 Becton D, Dahl GV, Ravindranath Y, *et al.* Randomized use of cyclosporin A (CsA) to modulate P-glycoprotein in children with AML in remission; Pediatric Oncology Group Study [J]. Blood, 2006, 107 (4): 1315-1324

3 Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM, *et al.* Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug modulator [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (6): 2320-2326

4 刘玲,范高路. 环孢素 A 对白血病耐药细胞化疗药物敏感性的研究 [J]. 肿瘤基础与临床, 2008, 21 (1): 13-16

5 Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. Mtor: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12 (1): 21-35

6 Pop IV, Pop LM, Ghetie MA, *et al.* Targeting mammalian target of rapamycin to both downregulate and disable the P-glycoprotein pump in multidrug-resistant B-cell lymphoma cell lines [J]. Leuk Lymphoma, 2009, 50 (7): 1155-1162

(收稿:2011-03-04)

(修回:2011-03-11)