

浙江蝮蛇蛇毒成分逆转多药耐药白血病 K562/ADM 细胞耐药性分析

Analysis of the Reversal Effect of Component Extract from Zhejiang Agkistrodon Venomas on Multi-drug Resistant Leukemia Cell K562/ADM
SHENG Xiu-sheng, HE Xu-ying

盛秀胜, 何旭英 (金华职业技术学院医学院, 浙江 金华 321017)

摘要: [目的] 探讨浙江蝮蛇蛇毒提取物逆转 K562/ADM 细胞耐药的作用及机制。[方法] 通过 MTT 法检测不同浓度浙江蝮蛇蛇毒提取物对 K562/ADM 细胞阿霉素(ADM)的 IC_{50} 影响, 分析其逆转耐药活性; 通过实时定量 PCR 法检测浙江蝮蛇蛇毒提取物对 K562/ADM 细胞 MDR1 及 GST- π 耐药基因表达的影响。[结果] 浙江蝮蛇蛇毒提取物呈浓度依赖性地降低 K562/ADM 细胞对 ADM 的 IC_{50} 。实时定量 PCR 法检测结果显示, 浙江蝮蛇蛇毒提取物作用后 K562/ADM 细胞内 MDR1 及 GST- π 基因表达水平有下调趋势, 且随蛇毒提取物浓度增加下调趋势逐渐明显。[结论] 浙江蝮蛇蛇毒提取物具有较强的逆转人白血病 K562/ADM 细胞多药耐药活性作用。

关键词: 蝮蛇蛇毒; K562/ADM 细胞; 逆转; 多药耐药

中图分类号: R737.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)07-0529-04

在白血病治疗中, 化疗是目前最常用的手段, 然而, 化疗过程中产生的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是化疗失败的最主要因素, 严重困扰白血病临床治疗。近年来的研究显示, 蛇毒中含有各种酶类和多种不同生理与药理活性的强碱性蛋白, 对多种肿瘤细胞系具有杀伤和抑制生长的作用^[1-4]。因此, 蛇毒是一类非常有希望的肿瘤治疗药物。我们前期已从浙江蝮蛇蛇毒中分离到一种高纯度的蛋白, 对 K562 白血病细胞的增殖有明显抑制作用^[5]。为分析该纯化蛋白是否具备逆转肿瘤多药耐药活性, 本研究进一步分析其对阿霉素(adriamycin, ADM)耐药株 K562/ADM 细胞凋亡及 MDR 相关基因的影响, 为进一步开发肿瘤多药耐药逆转剂提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

浙江蝮蛇鲜毒冷冻粉由义乌市蛇类研究所提供, 蛇毒成分的分离纯化参考文献^[5]; K562/ADM(人

红白血病阿霉素耐药细胞株) 购自中国医学科学院血液病研究所; RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 盐酸阿霉素(adriamycin, ADM) 购自浙江海正药业股份有限公司。MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自碧云天生物试剂有限公司。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、oligo dT、dNTPs 等购自 Takara; SYBR Mastermix 购自 Toyobo; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 K562/ADM 细胞株的培养及耐药性测定

K562/ADM 细胞在常规培养液中加入 $1\mu\text{g/ml}$ 的 ADM 以维持其耐药性。收集对数生长期的 K562/ADM 细胞, 以 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 $180\mu\text{l}$, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 12h 后。K562/ADM 细胞加入 10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 的不同浓度的 ADM 溶液, 空白对照组加入等体积的 PBS, 每一浓度设 3 个平行孔。细胞与药物作用 48h 后, 按说明书加入 MTT 试剂, 用酶标仪在 570nm 处测定吸光度值(OD 值)。按下列公式计算细胞抑制率(inhibition rate, IR), 抑制率(%) = $(1 - \text{试验组 OD 值} / \text{溶剂对照组 OD 值}) \times 100\%$, 并求出 IC_{50} 值。

收稿日期: 2011-11-02; 修回日期: 2012-03-20
基金项目: 金华市科技局基金项目(2005-1-307)
E-mail: shengsheng117@sina.com

1.3 蛇毒蛋白对 K562/ADM 细胞增殖抑制实验

收集对数生长期的 K562/ADM 细胞,以 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 96 孔培养板中,每孔 $160 \mu\text{l}$, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 12h 后分组:单纯 ADM 组、蛇毒抽提物+ADM 组及空白对照组。单纯 ADM 组:加入 1、4、16、64、256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不同浓度的 ADM;蛇毒抽提物+ADM 组:设 6 个浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 蛇毒提取物,每个浓度组分别加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ADM;空白对照组加入等体积的 PBS。给药体积均为 $20 \mu\text{l}$,每一浓度设 3 个平行孔。细胞与药物作用 48h 后,加入 MTT 试剂检测 OD570nm 吸光度值,并计算抑制率及 IC_{50} 值。实验独立重复 3 次。

1.4 MDR1 及 GST 基因表达分析

收集不同处理的 K562/ADM 细胞,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,DEPC 处理过的蒸馏水溶解。采用德国 EPPENDORF 公司分光光度仪(Biophotometer)检测 RNA 溶液 OD260/OD280 吸光值,计算 RNA 浓度和纯度,OD260/OD280 比值 >1.8 方可用于检测。1%琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。2 μg 总 RNA 以 oligo dT 将 mRNA 逆转录成 cDNA,以 β -actin 作为内参,Real-time PCR 分析目的基因表达。相关引物见表 1。以 $15 \mu\text{l}$ 反应体系进行 Real-time 定量 PCR。Real-time 定量 PCR 检测反应体系包括:1 μl RT 产物,1 $\times$ SYBR Green I Mastermix,0.5 μM 特异前向引物,0.5 μM 特异反向引物。Real-time 定量 PCR 条件为: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 循环。Real-time 定量 PCR 使用 Applied Biosystems 7500 仪器进行。所有反应均设 3 复孔。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即 Ct 值,以 β -actin 作为内参照,采用定量 PCR 中的相对定量法,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示处理组目的基因的表达相对于对照组的倍数,其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参}})_{\text{处理组}} - (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参}})_{\text{对照组}}$ 。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理,方差不齐性的数据比较采用 t 检验及方差分析,方差不齐数据采用非参数 Mann-Whitney U 检验 (两组) 和 Kruskal-Wallis H 检验 (多组), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 相关引物序列

引物	序列 (5'-3')	产物 (bp)
MDR1	正向 CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG	256
	反向 GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA	
GST- π	正向 GACATCAACCAGCCAAGTAAC	138
	反向 CAGCACCTCCATCCAGAAA	
β -actin	正向 CTT CTACAATGAGCT GCG TG	176
	反向 TCATGAGGTAGT CAG TCAGG	

2 结果

2.1 K562/ADM 细胞耐药表型分析

MTT 法检测不同浓度 ADM 对 K562/ADM 细胞的细胞毒作用结果见表 2。经计算 ADM 对 K562/ADM 细胞的 IC_{50} 的均数为 $51.17 \pm 12.36 \mu\text{g}/\text{ml}$, 说明 K562/ADM 细胞株是具有多药耐药表型的稳定耐药细胞株。

表 2 不同浓度 ADM 对 K562/ADM 细胞的抑制作用

组别	OD(570nm)	抑制率(%)
对照组	1.03 ± 0.04	/
ADM ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
10	$0.86 \pm 0.02^*$	17.82
20	$0.68 \pm 0.04^*$	32.67
40	$0.60 \pm 0.05^*$	40.59
80	$0.43 \pm 0.03^*$	57.43
100	$0.32 \pm 0.05^*$	68.32

*: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 蝮蛇蛇毒提取物逆转 K562/ADM 耐药效应分析

以 0.1~3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛇毒提取物分别与 ADM 联用后,结果显示,联用蛇毒提取物后,K562/ADM 细胞对 ADM 的 IC_{50} 随蛇毒提取物浓度增加而逐渐递减。0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度蛇毒提取物即可使 ADM 的 IC_{50} 降低到 16.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$,当蛇毒提取物浓度达 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,ADM IC_{50} 降低到 6.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$,提示蝮蛇蛇毒提取物可不同程度地逆转 K562/ADM 细胞株对 ADM 的耐药性。见图 1、表 3。

2.3 蛇毒提取物对 K562/ADM 细胞 MDR1 及 GST- π 表达的影响

以 β -actin 为内参建立的 Real time PCR 分析 MDR1 及 GST- π 表达,如图 2 所示,MDR1、GST- π 及 β -actin 的 Real-time PCR 产物溶解曲线均为单峰,电泳显示 PCR 产物为单一条带,说明 PCR 能特

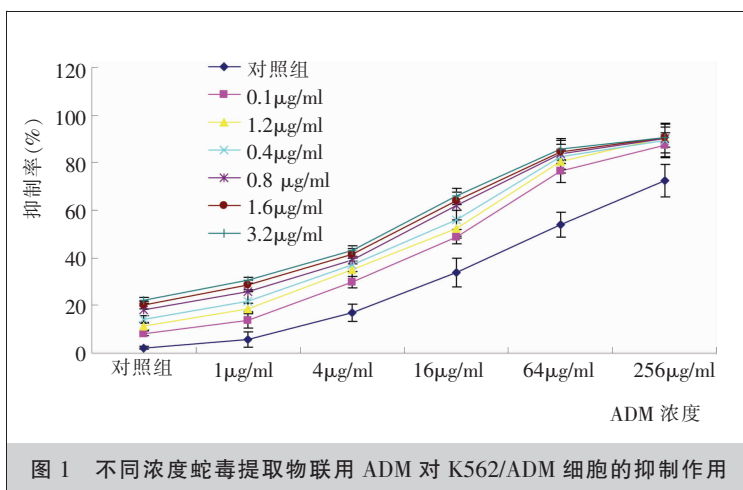


图1 不同浓度蛇毒提取物联用 ADM 对 K562/ADM 细胞的抑制作用

表3 不同浓度蛇毒提取物对 ADM 的 IC₅₀ 影响

蛇毒提取物浓度 (μg/ml)	ADM IC ₅₀ (mg/L)	<i>t</i> [*]	<i>P</i> 值 [*]
对照组	51.17±12.36	—	—
0.1	16.67±1.92*	4.77	0.09
0.2	12.33±1.33*	5.41	0.06
0.4	9.86±2.20*	5.67	0.05
0.8	6.03±1.72*	6.27	0.03
1.6	5.65±1.77*	6.31	0.03
3.2	5.26±1.72*	6.37	0.03

*:与对照组比较。

异扩增目的基因。以相对定量法检测 MDR1 及 GST- π 表达,结果显示,0.1 μ g/ml 蛇毒提取物即可明显下调细胞内 MDR1 及 GST- π 基因表达水平,与对照组相比有显著性差异,且呈剂量依赖性下调 K562/ADM 细胞中 MDR1 及 GST- π 基因的表达。见表 4。

3 讨 论

多药耐药 (multi-drug resistance, MDR) 是造成肿瘤化疗失败的主要原因。近年来,国内外对蛇毒抗肿瘤的研究日趋重视^[6],已证实许多蛇毒具抗肿瘤效应^[7-10],但较少报道逆转耐药的效应。我们前期从浙江蝮蛇蛇毒中分离出一种高纯度的蛋白,已证实其对 K562 白血病细胞的增殖有明显抑制作用^[5]。本研究进一步分析该蛇毒提取物是否具备逆转白血病细胞耐药作用。

我们选择的 K562/ADM 耐药细胞系是由 K562 细胞经过长期的 ADM 诱导和筛选而建立起来的典型的耐药细胞系,不仅对诱导药物 ADM 有很强

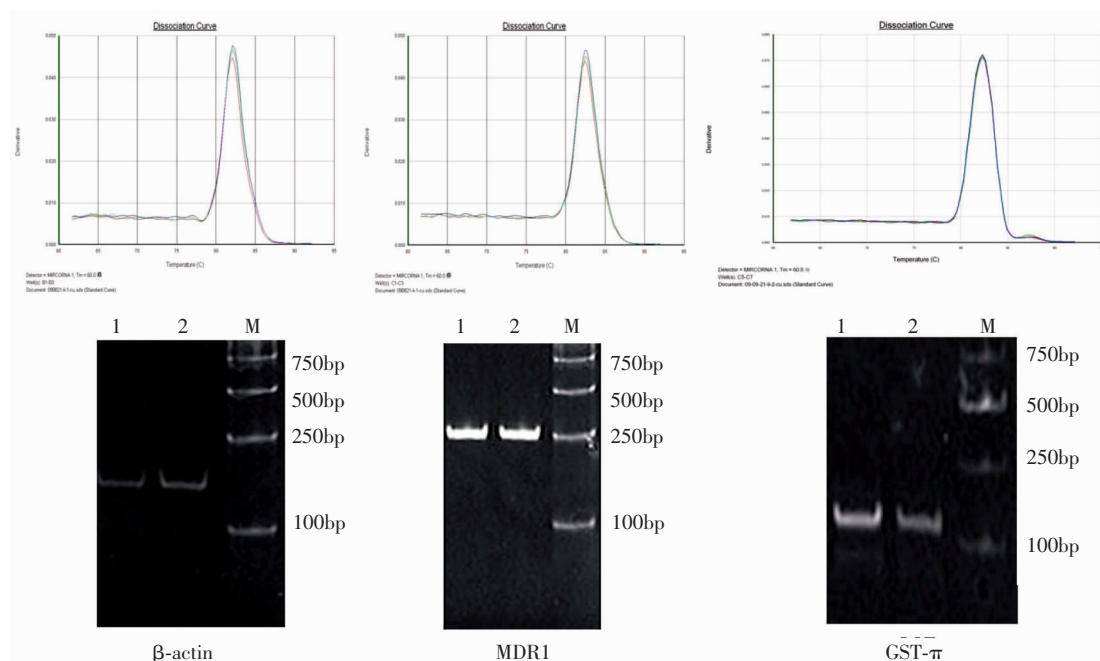


图2 MDR1、GST- π 及 β -actin 溶解曲线及 PCR 产物电泳图

表4 不同浓度蛇毒提取物对 K562/ADM 细胞 MDR1 及 GST- π 表达的影响

基因	对照组	0.1 μ g/ml	0.2 μ g/ml	0.4 μ g/ml	0.8 μ g/ml	1.6 μ g/ml	3.2 μ g/ml
GST- π	1	0.41 $\pm$ 0.11*	0.25 $\pm$ 0.08*	0.19 $\pm$ 0.05*	0.15 $\pm$ 0.04*	0.13 $\pm$ 0.02*	0.12 $\pm$ 0.03*
MDR1	1	0.46 $\pm$ 0.07*	0.31 $\pm$ 0.10*	0.22 $\pm$ 0.05*	0.17 $\pm$ 0.06*	0.16 $\pm$ 0.04*	0.16 $\pm$ 0.08*

*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

的耐药性,而且对其它抗肿瘤药物也具有交叉耐药性^[11]。本研究结果显示,蛇毒提取物处理后,K562/ADM 细胞对 ADM 的 IC₅₀ 随蛇毒提取物浓度加大而逐渐递减。0.8 μ g/ml 蛇毒提取物可使 ADM 的 IC₅₀ 从 51.17 μ g/ml 降低到 6.03 μ g/ml,提示蝮蛇蛇毒提取物可逆转 K562/ADM 细胞对 ADM 的耐药性。

在众多的 MDR 形成机制中,由 MDR1 基因编码产物——跨膜转运糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)是最具代表性、发现最早,也是研究最为深入的^[12]。GST 尤其是 GST- π 其耐药作用已在多种实体瘤中得到证实^[13]。通过 Real-time PCR,本研究进一步探讨蝮蛇蛇毒提取物逆转耐药的机制,结果发现蛇毒提取物对 K562/ADM 细胞 MDR1 及 GST- π 基因表达呈剂量依赖性下调效应,提示蛇毒提取物可能通过下调 MDR1 及 GST- π 基因表达逆转 K562/ADM 耐药。上述结果提示,浙江蝮蛇蛇毒提取物在白血病治疗,尤其是耐药白血病治疗方面的作用,具有较好的药用价值。

参考文献:

- [1] 张及禄,文慧民,孙德军. 蝮蛇毒小分子多肽的分离、纯化及其抗肿瘤作用研究[J]. 中国生化药物杂志,2009,30(4):217-225.
- [2] 朱伟杰,芮景. 蛇毒抗肿瘤细胞凋亡机制的研究进展[J]. 实用全科医学,2007,5(5): 456-457.
- [3] 程勃超,蒋星红,周希平. 蛇毒素成分及临床应用进展

[J]. 中国血液流变学杂志,2007,17(2): 342-344.

- [4] 李晓红,蔡绍晖,任先达. 蛇毒的抗肿瘤活性成分研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2004,20(10): 1938-1941.
- [5] 盛秀胜,张金良. 浙江蝮蛇蛇毒成分的分离及其对 K562 细胞的增殖抑制作用[J]. 肿瘤学杂志,2010,16(8):641-643.
- [6] 张于平. 国内 20 年蛇毒与肿瘤文献分析 [J]. 蛇志,1998,10(2): 20-22.
- [7] Braganca BM,Patel NT,Badrinath PG. Isolation and properties of a cobra venom factor selectively cytotoxic to Yoshida sarcoma cells [J]. Biochim Biophys Acta,1967,136(3):508-520.
- [8] 王锡锋,曹宜生,刘一平,等. 眼镜蛇毒细胞毒素的分离、纯化及其抗癌活性[J]. 中国生化药物杂志,1999,20(3):131-133.
- [9] 杨力建,李扬秋,莫伍兴. 蝮蛇毒联合加温对白血病细胞株的杀灭作用 [J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版),1993,14(4):21-25.
- [10] 董庆华,郑树,吕庆华,等. 浙江蝮蛇毒诱导人白血病 Jurkat 细胞凋亡的体外实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志,2002,22(11):851-853.
- [11] 栾凤君,杨纯正,马建国. 一株人红白血病多药耐药细胞系(K562/A02)的建立及其耐药特性的研究[J]. 中华肿瘤杂志,1993,15(2):101-103.
- [12] Chan GN,Bendayan R. Molecular and functional characterization of P-glycoprotein in vitro [J]. Methods Mol Biol,2011,686:313-336.
- [13] Wang J,Zhang J,Zhang L,et al. Expression of P-gp,MRP,LRP,GST- π and Topo II α and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines [J]. Oncol Rep,2011,26(5):1081-1089.