

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )04-0285-04

## 乳腺癌耐药细胞中 *mdr-1* 与 *mrp* 基因的表达及 $As_2O_3$ 对其表达的影响

孙长滨<sup>1</sup>, 郝立宏<sup>2</sup>, 王秀丽<sup>3</sup>, 孔力<sup>2</sup>( 1. 大连大学医学院组织学与胚胎学教研室, 辽宁大连 116622; 2. 大连医科大学组织学与胚胎学教研室, 辽宁大连 116023; 3. 中科院化学物理研究所, 辽宁大连 116023 )

[ 摘要 ] 目的: 探讨人乳腺癌阿霉素( ADM )耐药细胞系 MCF-7/ADM 的 *mdr-1* 基因和 *mrp* 基因表达, 观察三氧化二砷(  $As_2O_3$  )对上述基因表达的影响。方法: 采用 MTT 法检测  $As_2O_3$  的细胞毒性及非细胞毒性剂量, 应用 RT-PCR 检测 *mdr-1* 基因和 *mrp* 基因的转录表达。结果:  $As_2O_3$  的非细胞毒性剂量为 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 低毒剂量为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ 。 *mdr-1* 基因和 *mrp* 基因在 MCF-7/ADM 细胞中均呈过表达, 而且 *mdr-1* 的基因表达强于 *mrp* 基因, 在 MCF-7/S 细胞中未见表达。  $As_2O_3$  可下调上述基因的表达, 而且  $As_2O_3$  低毒剂量的下调作用强于无毒剂量。结论: 人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞获得阿霉素抗药性, 与 *mdr-1* 基因和 *mrp* 基因过表达有关,  $As_2O_3$  可通过多种机制部分逆转 MCF-7/ADM 细胞的耐药性。

[ 关键词 ] *mdr-1* 基因; *mrp* 基因; 多药耐药;  $As_2O_3$ ; 乳腺肿瘤

[ 中图分类号 ] R737.9 [ 文献标识码 ] A

## The Expression of *mdr-1* and *mrp* Genes in the Human Breast Cancer Cells, and the Effects of Arsenic Trioxide on the Gene Expression

SUN Chang-bin<sup>1</sup>, HAO Li-hong<sup>2</sup>, WANG Xiu-li<sup>3</sup>, KONG Li<sup>2</sup>( 1. Department of Histoembryology, Medical college of Dalian University, Dalian 116622, China; 2. Department of Histoembryology, Dalian Medical University, Dalian 116023, China; 3. Dalian Institute of Chemical and Physics, Academy of Science, Dalian 116023, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the expression of *mdr-1* and *mrp* genes and observe the effects of arsenic trioxide (  $As_2O_3$  ) on the gene expression. **Methods:** The doze of cytotoxicity and non-cytotoxicity of  $As_2O_3$  was examined through MTT assay. The expressions of *mdr-1* and *mrp* genes were studied by RT-PCR method. **Results:** The non-cytotoxic dose of  $As_2O_3$  was 0.2  $\mu\text{mol/L}$  and the low cytotoxic dose was 0.8  $\mu\text{mol/L}$  to MCF-7/ADM cell line(  $P < 0.05$  ). Expression of *mdr-1* and *mrp* genes was positive in MCF-7/ADM cells, and the expression of *mdr-1* was stronger than the *mrp* gene, then the expression of *mdr-1* and *mrp* genes was negative in the MCF-7/S cells; Arsenic trioxide could down-regulate the expression of *mdr-1* and *mrp* genes in MCF-7/ADM and the lowcytotoxic dose of  $As_2O_3$  had more strong effect than the non-cytotoxic dose of  $As_2O_3$ . **Conclusions:** The strong expressions of *mdr-1* and *mrp* genes were responsible for the induced resistance of MCF-7/ADM cells to ADM; Arsenic trioxide reverses partly the multidrug resistance of the MCF-7/ADM cells with more kinds of biologic mechanisms.

[ Key words ] *mdr-1* gene; *mrp* gene; MDR;  $As_2O_3$ ; breast neoplasm; RT-PCR

\* 多药耐药( multidrug resistance, MDR )是恶性肿瘤难以治愈的重要原因之一。MDR 是一个复杂的生物学过程, 影响因素和参与机制众多。目前对乳腺癌 MDR 机制的研究涉及多方面, 主要有肿瘤细胞药物转运膜蛋白过度表达、拓扑异构酶 II( topoisomerase, Topo II )表达下降、谷胱甘肽-S-转移酶( glutathione s-transferases, GST )表达增加、蛋白激酶 C 及其异构酶改变以及 *bcl-2* 等调控基因过度表达等。其中, 膜转运蛋白

过表达与肿瘤 MDR 关系密切, 包括 P 糖蛋白( glycoprotein P-gp )和多药耐药相关蛋白( multidrug resistance associated protein MRP )等, 其蛋白的编码基因分别为 *mdr-1* 和 *mrp*, 尤以 *mdr-1* 基因编码的 P-gp 研究得最为

[ 基金项目 ] 辽宁省教委重点资助项目( 7907111010 )

[ 作者简介 ] 孙长滨( 1957- ), 男, 辽宁省, 大连人, 副教授, 硕士学位, 主要从事神经生物科学和肿瘤耐药机理的研究

[ 通讯作者 ] 孔力

广泛和深入,由此引发的耐药被公认为与肿瘤 MDR 最直接相关,称为典型耐药。药物转运膜泵,在功能上有很大的相似性,即依赖 ATP 提供能量,将化疗药物泵出细胞外,导致细胞内药物浓度降低,从而产生耐药<sup>[1]</sup>。我们曾对三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)影响阿霉素(adriamycin, ADM)耐药乳腺癌细胞系 MCF-7/ADM 细胞的 GST-π 的表达水平做过研究<sup>[2]</sup>,而关于 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 mdr-1 和 mrp 耐药基因的作用未见报道。本实验则利用人乳腺癌阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADM 和敏感细胞株 MCF-7/S,从基因水平探讨膜转运蛋白的表达基因 mdr-1 和 mrp 的表达情况,并观察 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对该基因表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 制剂

阿霉素(ADM)为意大利法玛西亚普强公司的产品;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 为 Sigma 公司产品,用 1.0 mol/L NaOH 溶液配成 1.0 mmol/L 贮存液;噻唑蓝(MTT)华美生物工程公司产品;UNI-Q-10 柱离心式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒为上海生工生物技术公司产品;RNA PCR 试剂盒为大连宝生物工程有限公司产品。

### 1.2 细胞培养

MCF-7/ADM 细胞株和 MCF-7/S 细胞株均购自中国医学科学院天津血液学研究所,MCF-7/S 细胞常规培养于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,在 37℃ 饱和湿度及 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内传代培养,MCF-7/ADM 细胞除上述条件外,还需加入 ADM(1.0 mg/L)以维持其耐药性。

### 1.3 MTT 法测定 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 细胞毒性

实验前 2 周将细胞置于无 ADM 的培养液中培养。取对数生长期细胞接种于 96 孔板,实验组由高至低浓度加入 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液(100 ~ 0.05 μmol/L),对照组则加入等体积 1640 培养液。孵育 48 h 后加入 MTT 液继续培养 4 h,然后加入 DMSO 100 μl/孔,振荡混匀后于全自动酶标仪测定每孔 A<sub>490 nm</sub> 值,取 3 孔平均值计算生长率。生长率(%) = 实验组 A 值/对照组 A 值 × 100%。按 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 药物浓度-生长率绘制剂量效应曲线,确定生长率 > 95% 的药物浓度为该药的非细胞毒性剂量,生长率在 85% ~ 90% 的药物浓度为低毒剂量。

### 1.4 RT-PCR 检测 mdr-1 和 mrp 基因表达

1.4.1 细胞总 RNA 提取:共分 4 组,①无毒剂量组,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 浓度为 0.2 μmol/L;②低毒剂量组,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 浓度为 0.8 μmol/L;③阳性对照组为维持培养的 MCF-7/ADM 细胞;④阴性对照组为 MCF-7/S 细胞。Trizol 裂解细胞后进行总 RNA 提取,操作按 UNI-Q-10 柱离心式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒的说明进行。取 5 μl 总 RNA 样品,测定其在 260 nm 和 280 nm 的吸收峰值以确定 RNA 的质量。

### 1.4.2 PCR 引物的设计与合成

mdr-1, mrp 基因以及内参照 gapdh 基因引物由日本 TaKaRa 公司合成,PCR 引物序列见表 1。

### 1.4.3 逆转录

RT 反应混合物总量 20 μl,包括细胞 RNA 1 μg, 2 μl dNTP (10 mmol/L), 2 μl RT 缓冲液(×10), 200 单位逆转录酶,0.5 μl RNase 抑制剂,4 μl MaCl<sub>2</sub>(25 mmol/L), 1 μl 寡聚 dT(2.5 μmol/L), 加双蒸水至 20 μl。逆转录反应条件: 30℃ 10 min, 50℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min, 终产物 cDNA 于 4℃ 保存。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Primers of genes used in the study

Genes	Primer sequences	Sizes	References
mdr-1	(f) 5'-CCCATCATTTGGAATAGCAGG-3'	157 bp	[ 3 ]
	(r) 5'-GTTCAAACCTTTCGCTCCTGA-3'		
mrp	(f) 5'-GGACCTGGACTTCGTTCTCA-3'	292 bp	[ 4 ]
	(r) 5'-GCCTACTTCTTCAGACCTGC-3'		
gapdh	(f) 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	452 bp	[ 5 ]
	(r) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

f: Forward primers; r: Reverse primer

### 1.4.4 PCR 扩增

PCR 反应体系总量为 50 μl。包括从上述反应中逆转录得到的 10 μl cDNA, 外加 1U Taq 聚合酶, 5'和

3'的引物(0.2) μmol/L, 5 μl 10 × PCR 缓冲液(0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.001% 明胶), 加双蒸水使总体积为 50 μl。每管加 1

滴矿物油以防止蒸发。扩增条件见(表2)。

表2 PCR 扩增条件

Tab. 2 Conditions of PCR for *mdr1* and *mrp* genes in the study

Genes	Pretreatment	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycles
<i>mdr1</i>	95°C, 4 min	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	35
<i>mrp</i>	95°C, 4 min	94°C, 30 s	60°C, 30 s	72°C, 45 s	30
<i>gapdh</i>	95°C, 4 min	94°C, 30 s	(55 ~ 60)°C, 30 s	72°C, 45 ~ 60 s	30 ~ 35

1.4.5 PCR 产物半定量分析

PCR 反应结束后,取 10 μl PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳中进行电泳(70 V, 30 min),电泳结果在紫外投射仪下数码相机拍照,经 Quanti Scan 分析软件包计算各 DNA 电泳条带的灰度值,以目的基因条带和内参照基因 *gapdh* 条带的强度(灰度值)之比,为目的基因的相对表达水平,即 *mdr-1* 灰度值/*gapdh* 灰度值 × 100% 和 *mrp* 灰度值/*gapdh* 灰度值 × 100% 值,据此推断各样品中 *mdr-1* 和 *mrp* 基因表达程度的差异。

1.5 统计学分析

RT-PCR 为 4 次重复实验,以 *t* 检验检测两组间差异的显著性,所有统计学检验均由计算机 SPSS 统计软件包进行。

2 结果

2.1 MTT 法测定 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的细胞毒性

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对耐药细胞 MCF-7/ADM 存在细胞毒性作用,而且毒性作用具有一定的剂量依赖性。通过剂量效应曲线可确定,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的非细胞毒性剂量(生长率 > 95%)为 0.2 μmol/L;而低毒剂量(生长率在 85% ~ 90%)为 0.8 μmol/L。

2.2 *mdr-1*, *mrp* 基因在 MCF-7/ADM 细胞和 MCF-7/S 细胞中的表达

*mdr-1*, *mrp* 基因的 mRNA 在耐药细胞株中均有表达,而在敏感细胞株中未见表达。与内参照基因的表达水平相比较,*mdr-1*, *mrp* 基因相对表达水平分别是 (123.8 ± 4.49)% 和 (269.3 ± 5.26)% ( $\bar{x} \pm s$ ), *t* 检验 (*P* < 0.05, 见图 1), *mdr-1* 基因表达量多于 *mrp* 基因。

2.3 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 MCF-7/ADM 细胞中 *mdr-1*, *mrp* 基因表达的影响

无毒剂量组(0.2 μmol/L)和低毒剂量组(0.8 μmol/L)的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 均能降低 *mdr-1* 和 *mrp* 基因在 MCF-7/ADM 细胞中的表达。低毒剂量组的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 *mdr-1* 和 *mrp* 基因在 MCF-7/ADM 细胞中过表达的下调作用要强于无毒剂量组 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的作用(图 2、表 3)。

图 1 *mdr1*, *mrp* 基因在 MCF-7/S 和 MCF-7/ADM 细胞中的表达

Fig. 1 Expression of *mdr1* and *mrp* genes in MCF-7/S 和 MCF-7/ADM cells

1: *mdr-1* in MCF-7/S cells; 2: *mdr-1* in MCF-7/ADM cells; 3: *mrp* in MCF-7/S cells; 4: *mrp* in MCF-7/ADM cells; M: DNA DL 2 000 marker

图 2 对 MCF-7/ADM 细胞中 *mdr-1*, *mrp* 基因表达的影响  
Fig. 2 Effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on genes expression of *mdr1* and *mrp* in MCF-7/ADM cells

1, 4: Control; 2, 5: 0.2 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 3, 6: 0.8 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; M: DNA DL 2000 marker

3 讨论

*mdr-1* 基因广泛分布于人类正常组织,*mrp* 基因在人体正常组织也有一定的表达,而且具有正常的生理功能。起源于这些组织的肿瘤细胞也常表现出先天的

耐药性,但是 *mdr-1* 和 *mrp* 基因在正常乳腺组织中未见报道。有文献报道,在乳腺癌组织中 *mrp* 阳性率为 56%<sup>[6]</sup>,*mdr-1* 基因编码的 P-gp 表达率为 88.41%<sup>[7]</sup>,术前接受化疗的乳腺癌组织中 *mrp* 和 *mdr-1* 表达明显

高于未受化疗的乳腺癌组织。本实验结果发现,在 MCF-7/S 细胞中未见该基因的表达,而在 MCF-7/ADM 细胞中均有较强的表达,说明乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞的阿霉素抗药性为获得性。

表 3  $As_2O_3$  对 MCF-7/ADM 细胞中 *mdr-1*, *mrp* 基因表达影响的半定量分析  
Tab.3 Relative density analysis of RT-PCR products for the Effects of  $As_2O_3$  on genes expression of *mdr1* and *mrp* in MCF-7/ADM cells( % ,  $\bar{x} \pm s$  )

RD	Control	NC	LC	P
<i>mrp/gapdh</i>	123.8 ± 4.55	106.3 ± 9.11	91.4 ± 4.02	<0.05
<i>mdr-1/gapdh</i>	269.3 ± 4.29	204.0 ± 8.79	178.3 ± 5.03	<0.05

RD: Relative density; NC: non-cytotoxic group 0.2  $\mu\text{mol/L}$   $As_2O_3$ ; LC: low-cytotoxic group 0.8  $\mu\text{mol/L}$   $As_2O_3$

在恶性肿瘤的综合治疗中,化疗占有非常重要的地位,而耐药性是严重影响肿瘤病人化疗效果及生存的主要原因。目前对 MDR 的研究多集中于探讨其发生机制并寻求有效的 MDR 逆转剂。 $As_2O_3$  是一种与巯基具有高度亲和力的原浆毒,已被用于白血病的临床治疗,但是对其逆转肿瘤细胞耐药性的作用及其机制的研究甚少。我们在过去的体外逆转实验结果表明, $As_2O_3$  在非细胞毒性剂量下(0.2  $\mu\text{mol/L}$ )可显著降低人乳腺癌耐药株 MCF-7/ADM 对阿霉素的  $IC_{50}$  值,而且细胞内药物浓度在  $As_2O_3$  作用后明显增加,说明  $As_2O_3$  能提高该细胞对阿霉素的敏感性,具有部分耐药逆转作用。我们在耐药逆转机制的研究中,采用生化方法测定  $As_2O_3$  对谷胱甘肽 S 转移酶(GSTs)的活性和 GST- $\pi$  表达水平的影响,发现  $As_2O_3$  不仅能够降低 GSTs 酶的活性,而且下调 GST- $\pi$  的表达,降低药物代谢速度,提高细胞内药物浓度<sup>[2]</sup>。本文应用半定量 RT-PCR 方法对 MCF-7/S 细胞和 MCF-7/ADM 细胞中的 *mdr-1*,*mrp* 基因表达,以及  $As_2O_3$  对 *mdr-1* 和 *mrp* 基因表达的影响进行检测。结果表明, $As_2O_3$  的肿瘤耐药逆转作用还有其它分子生物学机制参与。

由 *mdr-1* 编码的 P 糖蛋白(P-gp)和由 *mrp* 编码的多药耐药相关蛋白(MRP)同属于 ATP 结合盒式超家族膜转运蛋白成员,二者在结构上有 15% 的同源性,氨基酸同源序列集中于 ATP 结合区。二者的转运机制虽然有所不同,但是都以消耗 ATP 将细胞内的药物排除细胞外,减低细胞毒效应。因此 *mdr-1* 和 *mrp* 又称 ABC(ATP-binding cassette)家族基因<sup>[8-9]</sup>。实验结果证实  $As_2O_3$  可以降低 *mdr-1* 基因和 *mrp* 基因的表达。由此推断,由于 *mdr-1* 和 *mrp* 基因表达降低,导致细胞膜上膜转运蛋白数量的减少,阻止药物外排,从而逆转其耐药性,而且其下调作用随  $As_2O_3$  剂量增加愈加明

显。因此可以得出结论,肿瘤细胞耐药逆转、细胞内药物浓度提高并非单一机制所为,在乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞的耐药机制中有多种因素参与, $As_2O_3$  的耐药逆转机制也是多样复杂的。实验中  $As_2O_3$  作为 MDR 的新型逆转剂,其无毒剂量(0.2  $\mu\text{mol/L}$ )和低毒剂量(0.8  $\mu\text{mol/L}$ )远低于临床治疗中所达到的血浆药物浓度,有较高的临床应用价值。

#### [参考文献]

- [1] 王树滨,杨纯正. 乳腺癌耐药蛋白的研究进展[J]. 国外医学肿瘤分册, 2000, 27(2): 71-72.
- [2] 王秀丽,孔力,赵谨瑶,等.  $As_2O_3$  逆转人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞耐药的机制研究[J]. 中华肿瘤学杂志, 2002, 24(4): 339-343.
- [3] Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, et al. Quantitative analysis of MDR1(multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(18): 7160-7164.
- [4] Abbaszadeyan MR, Futscher BW, Klimecki WT, et al. Analysis of multidrug resistance-protein messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(17): 4676-4679.
- [5] Sidhu SS, Kimber SJ. Hormonal control of H-type alpha(1-2) fucosyl transferase messenger ribonucleic acid in the mouse uterus[J]. Biol Reprod, 1999, 60(1): 147-157.
- [6] 张月星,李明烈,郑颂国. 多药耐药相关蛋白在乳腺癌组织中的表达[J]. 中国癌症杂志, 1998, 8(1): 21-23.
- [7] 曾晓华,周洪伟,余永康,等. 乳腺癌组织中多药耐药基因产物的表达极其相互关系[J]. 重庆医学, 2002, 31(11): 1068-1069.
- [8] Hamada H, Tsuruo T. Purification of the 170-to 180-kilodalton membrane glycoprotein associate with multidrug resistance. 170-to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase[J]. J Biol Chem, 1998, 263(3): 1454-1458.
- [9] Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, et al. Structure and expression of the mRNA encoding the murine multidrug resistance protein(MRP), an ATP-binding cassette transporter[J]. Mol Pharmacol, 1996, 49(6): 962-971.

[收稿日期] 2003-07-30

[修回日期] 2003-10-15