

P-糖蛋白在多药耐药的 K562 细胞转运苯妥英纳与卡马西平中的作用*

陈英辉^{1) 2)} 赵永波^{2) **}

(1) 复旦大学附属金山医院神经内科, 上海 200540; 2) 上海交通大学附属第一人民医院神经内科, 上海 200080)

摘要 研究证实多药转运体与难治性癫痫耐药机制密切相关, P-糖蛋白在其中起重要作用. 本实验主要研究 P-糖蛋白拮抗剂维拉帕米对 P-糖蛋白过表达的 K562 细胞耐药性及细胞内苯妥英纳与卡马西平浓度的影响. 首先建立了 P-糖蛋白高表达的 K562/Dox (阿霉素诱导) 耐药细胞株, 比较耐药细胞株和 P-糖蛋白表达阴性的 K562 细胞株对苯妥英纳和卡马西平的耐药性, 并观察给予维拉帕米后, 耐药细胞内抗癫痫药物的浓度变化. 结果发现苯妥英纳和卡马西平对 K562/Dox 细胞株的半数抑制浓度 (IC₅₀) 明显高于 K562 细胞株; 加入维拉帕米后, 苯妥英纳和卡马西平对 K562/Dox 细胞的 IC₅₀ 明显下降, 逆转倍数分别为 2.5 和 1.5. 进一步研究发现 K562/Dox 细胞内苯妥英纳和卡马西平的浓度均显著少于其药敏 K562 细胞, 仅分别为正常 K562 细胞的 23.6% 和 32.2%. 当加入维拉帕米后, K562/Dox 细胞内抗癫痫药物浓度明显升高 ($P < 0.05$). 因此证明高表达的 P-糖蛋白参与了细胞的药物转运, 在难治性癫痫的耐药机制中扮演重要角色.

关键词 难治性癫痫, P-糖蛋白, 维拉帕米, 多药耐药

学科分类号: R742.1, R971.6

癫痫是一种常见的神经系统疾病. 大约 20%—30% 的癫痫患者经过现有的药物治疗并不能够减轻发作的频率和强度, 被称为难治性癫痫. 近年研究发现难治性癫痫患者脑内特别是血脑屏障部位高度表达多药转运体引起了人们的广泛兴趣. P-糖蛋白 (P-glycoprotein, PGP) 作为一种多药转运体, 为跨膜糖蛋白, 属于 ATP 结合的蛋白质超家族. 这种结构具有能量依赖性的功能, 能将药物和其它疏水性化合物主动转运出细胞. 由此引起的细胞内药物积聚减少可能参与了难治性癫痫的耐药机制. 为此, 我们通过比较 PGP 高表达和 PGP 表达阴性的细胞系对经典抗癫痫药物 (antiepileptic drugs, AEDs) 苯妥英纳 (phenytoin, PHT)、卡马西平 (carbamazepine, CBZ) 的摄取及 PGP 拮抗剂维拉帕米 (verapamil, Ver) 对细胞内药物的影响, 进一步了解 PGP 在难治性癫痫耐药机制中的作用.

1. 材料与方法

1.1 药物与试剂

*国家自然科学基金资助项目 (30370511).

**通信联系人

Tel: 021-63240090 转 4682, Email: zyb62@hotmail.com

收稿日期: 2008-04-22, 接受日期: 2008-07-21

阿霉素(doxorubicin,Dox ,Sigma), 四氮甲基唑蓝 (MTT,Sigma), 卡马西平(Sigma), 苯妥英钠 (Sigma) 维拉帕米(Sigma) , RPMI-1640(Gibco), 抗人 PGP 单克隆抗体 (Santa Cruz), 人白血病细胞株 K562 (中科院血液研究所).

1.2 耐药细胞株 K562/Dox 的诱

人红白血病细胞株 K562 常规培养于 RPMI-1640 完全培养液内(含 15%小牛血清, 青霉素 100U/ml 和链霉素 100 μ g/ml). 取对数生长期 K562 细胞, 加入阿霉素至 10 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时, 离心取细胞, 培养于完全 RPMI-1640 液内. 待细胞恢复生长后, 复用 Dox 处理, 直至细胞获得耐药性后, 用极限稀释法获得抗药细胞克隆, 克隆细胞维持培养于含 0.1 μ g/ml Dox 的培养液中. 耐药细胞系在无药培养 7-28 天时进行检测.

1.3 细胞耐药性试验 (MTT 法)

用 MTT 法进行细胞耐药性试验, 以测得的光密度值对药物浓度的对数作图. 按图用加权回归法求出杀死半数细胞的药物浓度即 IC_{50} . 耐药倍数(resistance factor, RF)= $IC_{50}(K562/Dox)/IC_{50}(K562)$. 用同样方法进行细胞耐药性试验, 在加入抗癫痫药物之前 15min 先加入 Ver 至终浓度 10 μ mol/L (此浓度的 Ver 对 K562 细胞没有杀伤作用). 试验后计算逆转倍数. 逆转倍数(reversal index, RI)=不加逆转剂时的 IC_{50} /加逆转剂时的 IC_{50} .

1.4 PGP 的细胞免疫化学染色

将生长在涂布有 0.1%多聚赖氨酸的玻片上的细胞在冷丙酮(4 $^{\circ}$ C)中固定 10 min, ddH₂O 洗 3 遍, 每次 5min. 然后置于 0.25%Triton X-100 和 5%DMSO-PBS 混合液中孵育 10min, ddH₂O 洗 3 遍, 每次 5min. 置于 1.5%-3%过氧化氢 PBS 液中孵育 15min, 以阻断内源性过氧化物酶和过氧化物酶样物质的活性, ddH₂O 洗 3 遍, 每次 5min. 置于 10%羊血清-PBS 中, 37 $^{\circ}$ C 1h, 除去细胞表面内源性过氧化物酶和过氧化物酶样物质的活性. 加特异性一抗(兔抗人, 1:200), 在湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜, ddH₂O 洗 3 遍, 每次 5min. 加偶联二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔, 1:1000), 37 $^{\circ}$ C 1h, ddH₂O 洗 3 遍, 每次 5min. 再用 0.1mol/L Tris-HCL 缓冲液洗 5min. 入 0.05%DAB+0.05mol/L Tris-HCL 缓冲液, 加 3%过氧化氢 1-2 滴显色, 反应需 5-15min, 显微镜下观察监控呈色反应. 然后切片入 0.05mol/L Tris-HCL 缓冲液终止反应, 洗去非特异性着色. 贴片, 晾干, 透明, 封片, 镜下观察.

1.5 Western blotting

分别取K562 细胞和K562/Dox耐药细胞细胞各 1×10^9 , 提取总蛋白. 制备SDS-PAGE凝胶, 加样电泳, 待溴酚蓝电泳至分离胶底部时结束电泳. 采用湿转法转膜, 将PVDF膜浸入含10 g/L的脱脂奶粉辣根过氧化物酶的TBST封闭液中, 置于水平摇床上, 室温封闭1h, 然后用TBST清洗3次, 每次5 min. 用TBST配制一抗(小鼠抗人 1:500), 将PVDF膜的放入配好的抗体稀释液中, 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST清洗3次, 每次10 min; 放入用TBST配制HRP标记的二抗(羊抗小鼠 1:2000), 室温2 h. 化学显色后将光片采用Bio-Rad2000型凝胶成像系统扫描后, 应用QUANTITY ONE软件进行吸光度分析. 测定灰度值, 代表蛋白的表达量.

1.6 细胞内药物积聚

细胞浓度为 1×10^6 /ml, 加 PHT 和 CBZ 终浓度为 10 μ mol/L, 温育时间: 100min. 取 2ml 样品, 4000r/min, 5min, 弃上清. 4 $^{\circ}$ C, 0.01M PBS 洗 3 次, 弃洗涤液, 加入盐酸浓度为 0.3mol/L 的 50%乙醇溶液 1ml, 振荡 3min, 37 $^{\circ}$ C 消化 18h, 10000r/min, 10min, 100 μ l 上清上 HPLC 柱, 检测药物浓度. 维拉帕米组在加入抗癫痫药前 15min 加入维拉帕米至终浓度 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L. 提取细胞内液, HPLC 检测.

1.7 统计方法

统计学处理采用 SPSS10.0. 各组间细胞内药物浓度结果进行 Independent-samples t 检验分析.

2. 结果

2.1 K562 与 K562/Dox 表达 PGP 的细胞免疫化学染色和 western blotting

细胞染色后在光镜下观察, 结果 K562/Dox 细胞的 PGP 阳性率为 100%, 而 K562 细胞则均为阴性 (图 1). western blotting 的结果与免疫组化结果一致 (图 2). 表明 Dox 诱导了 K562 细胞表达 PGP.

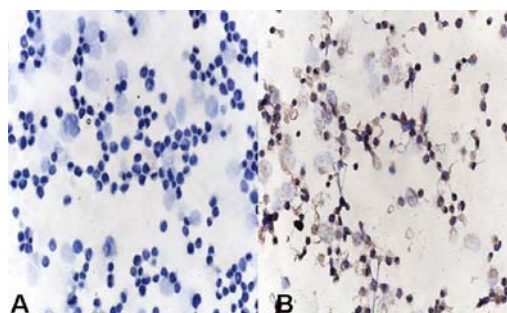


Fig 1. The expression of PGP in K562 and K562/Dox cells
(A) K562 cells (B) K562/Dox cells. (200×)

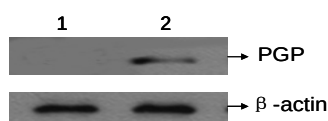


Fig 2. western blotting analysis of PGP expression
(1)K562 cells (2) K562/Dox cells.

2.2 K562/Dox 细胞的耐药性

结果表 1 所示, 证实 PHT 和 CBZ 对 K562/Dox 细胞株的半数抑制浓度分别为 $2011.0 \pm 95.9 \mu\text{g/ml}$ 和 $1503.8 \pm 73.0 \mu\text{g/ml}$, 明显高于 K562 细胞株的 $405.7 \pm 31.8 \mu\text{g/ml}$ 和 $508.5 \pm 36.4 \mu\text{g/ml}$, K562/Dox 对 PHT 和 CBZ 的耐药倍数分别为 4.96 和 2.96, 证实 K562/Dox 细胞株对 PHT 和 CBZ 具有耐药性.

Table1 AEDs resistant in K562 and K562/Dox cell lines

AEDs	IC ₅₀ (μg/ml)		RF
	K562	K562/Dox	
PHT	405.7 ± 31.8	2011.0 ± 95.9	4.96
CBZ	508.5 ± 36.4	1503.8 ± 73.0	2.96

2.3 维拉帕米对 K562/Dox 耐药性的影响

由表 2 可见, 当加入终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米时, K562/Dox 对 PHT 和 CBZ 的耐药性明显下降,

IC₅₀ 分别由 2011.0±95.9μg/ml 和 1503.8±73.0μg/ml, 降到 803.3±48.0μg/ml 和 1000.5±50.0μg/ml, 逆转倍数分别为 2.5 和 1.5. 维拉帕米对 PHT 的逆转效果要高于 CBZ. 而加入维拉帕米后, K562 细胞 IC₅₀ 与对照组相比无明显改变, 表明维拉帕米对 K562 细胞耐药性无影响.

Table 2 Effect of verapamil on multidrug resistant in K562/Dox cell line

AEDs	K562 IC ₅₀ (μg/ml)		K562/Dox IC ₅₀ (μg/ml)		RI
	control	Ver	control	Ver	
PHT	405.7±31.8	382.7±28.3	2011.0±95.9	803.3±48.0	2.50
CBZ	508.5±36.4	496.7±33.3	1503.8±73.0	1000.5±50.0	1.50

2.4 维拉帕米对 K562/Dox 细胞内药物浓度的影响

表 3 所示, K562/Dox 细胞内 PHT 和 CBZ 的浓度均显著少于其药敏 K562 细胞 ($P<0.05$), 仅分别为正常 K562 细胞的 23.6% 和 32.2%, 进一步证实了 K562/Dox 细胞的耐药性. 当加入 5μmol/L 维拉帕米后, K562/Dox 细胞内抗癫痫药物浓度明显升高. 当加入 10μmol/L 的维拉帕米温育时, 与加入 5μmol/L 维拉帕米时相比, K562/Dox 细胞内抗癫痫药物浓度进一步升高 ($P<0.05$), 维拉帕米对 PHT 的作用尤其明显, 基本可使 K562/Dox 细胞内的 PHT 浓度恢复到 K562 细胞水平. 以上结果证实了维拉帕米可以提高耐药的 K562/Dox 细胞内 AEDs 浓度, 而且维拉帕米逆转耐药细胞内药物积聚与维拉帕米浓度正相关.

Table 3. Effect of verapamil on the intracellular AEDs accumulation in K562/Dox cell line

	K562 (μg/1×10 ⁶ cells)	K562/Dox (μg/1×10 ⁶ cells)		
		control	Ver 5 μmol/L	Ver 10 μmol/L
PHT	1.44±0.15	0.34±0.04 [△]	1.15±0.11*	1.35±0.15* [▲]
CBZ	1.21±0.14	0.39±0.06 [△]	0.59±0.09*	0.84±0.10* [▲]

* $P<0.05$ (Compare with the control group); [▲] $P<0.05$ (Compare with the Ver group: 5 μmol/L);

[△] $P<0.05$ (Compare with K562 group).

3. 讨论

在过去的 10 多年中, 尽管不断有新的 AEDs 投入临床应用, 但仍有 30% 左右的癫痫患者对 AEDs 不敏感, 而成为难治性癫痫. 患者不仅对一种 AED 耐受, 而且往往也对其它的 AEDs 也不敏感, 即使这些 AEDs 的作用途径、结构不尽相同, 这种现象被称为多药耐药. 研究发现作用于脑内的多药转运体的表达变化参与了癫痫的耐药机制. 多药转运体是一类 ATP 结合的蛋白质超家族, 它们通过耗能的方式将药物由细胞内泵出到细胞外, 降低了药物对细胞的作用, 从而产生耐药. 多药耐药基因 1 (multidrug resistance gene 1, MDR1) 就是一种参与脑内药物转运的多药转运体基因. 其翻译的蛋白产物为 PGP. 研究已证实为难治性癫痫患者及大鼠难治性癫痫模型脑内, 存在着 PGP 的高表达, 高表达的 PGP 可能是难治性癫痫耐药机制的物质基础^[1-2]. 因此采用适当的方法抑制 PGP 功能或下调 MDR1 表达将有助于克服这种耐药性, 改善难治性癫痫的治疗.

国内外大量研究发现维拉帕米可以逆转高 PGP 表达细胞对化疗药物的耐药性. 在本实验中通过细胞耐药试验证实高 PGP 表达的 K562/Dox 对 PHT 和 CBZ 具有高耐药性, 耐药倍数分别为 4.96 和 2.96. 而加入维拉帕米可以逆转 K562/Dox 对 PHT 和 CBZ 的耐药性, 逆转倍数分别为 2.5 和 1.5. 有报道用选择性钙通道阻滞剂西比灵可以逆转耐苯巴比妥和丙戊酸钠细胞的耐药性, 其结果与我们的类似^[3]. 本实验采用了 PHT 和 CBZ 这两种经典的 AEDs, 目前它们仍被广泛应用在一线临床, 虽然新型 AEDs 的不断出现, 但仍不能完全替代 PHT 和 CBZ. 大量实验证实 PGP 作用的底物包括 PHT 和 CBZ 在内的绝大部分 AEDs, 如苯巴比妥、丙戊酸钠, 甚至一些新的 AEDs 也可被 PGP 转运, 如拉莫三嗪、非氨酯和托吡酯. 目前所知 AEDs 中仅左乙拉西坦被证实不是 PGP 作用的底物^[4]. 有个别研究^[5]发现, 应用十分广泛的 CBZ 就不被多药转运体 PGP 转运: 在离体条件下, 多药转运体表达改变也并不能使 CBZ 水平发生变化. 本实验则发现 PGP 拮抗剂维拉帕米可以逆转耐药细胞对 CBZ 的抗药性, 证实 CBZ 确为 PGP 的作用底物, 这一点也被国外研究所证实^[6]. 我们研究还发现维拉帕米逆转 CBZ 的耐药性程度要低于 PHT, 提示 PGP 可能并不是作用于 CBZ 的唯一转运体, 另有其它转运体参与其耐药. 研究发现多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance associated protein 1, MRP1) 和多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance associated protein 2, MRP2) 可能也参与了 CBZ 和 PHT 的转运^[7]. 另外其他耐药相关蛋白如谷胱甘肽硫转移酶- π 、肺耐药相关蛋白、RLIP76 和拓扑异构酶 II 等都可能参与了耐药过程^[8-10]. 在本研究中采用了人红白血病细胞株 K562, 而没有使用神经源性的细胞系. 原因是 K562 细胞在耐药研究中已被广泛采用, 培养简单, 易于被诱导成耐药细胞, 而且计数准确, 容易定量研究. 因为本实验对细胞定量要求较高. 另外研究^[11]已证实 K562 细胞并不表达另一种多药转运体家族 MRPs, 且用 Dox 诱导的耐药细胞株 K562/Dox 也不表达 MRPs, 因此实验中排除了 MRPs 在 K562/Dox 细胞介导耐药的可能. 虽然采用神经源性的细胞系更加贴近临床, 但培养诱导及定量分析相对困难, 而且有些神经源性的细胞系可能会表达其他多药转运体, 从而影响实验结果.

本实验还进一步用 HPLC 测定了耐药和正常细胞内 AEDs 的浓度, 发现耐药细胞内 AEDs 浓度仅相当正常细胞内的 1/4 左右, 与国外用同位素法测定耐药细胞内 AEDs 浓度的结果一致^[12]. 而给予 Ver 干预后, 可以提高耐药细胞内 AEDs 浓度, 从而更直观的证实 PGP 可以限制 AEDs 进入细胞内. 此方面研究国内尚未见类似报道.

目前已证实有逆转 MDR1 表达作用的药物有钙通道阻滞剂、激素、类固醇、抗雌激素药、抗生素、抗疟药(奎宁和氯喹)、钙调蛋白抑制剂、环孢霉素、抗心律失常药、蛋白激酶抑制剂和表面活性剂等. 其中钙通道阻滞剂维拉帕米是最经典的拮抗剂. 被广泛用于肿瘤的耐药机制的研究, 并作为与其他拮抗剂进行对照的参照物. 研究证实钙离子通道阻滞剂的作用机制可能与在 MDR1 基因的翻译水平上抑制 PGP 的合成及活性有关. 也可能是其受体和 PGP 底物的受体关系密切, 可竞争性结合 PGP 而增加胞内治疗性药物聚集量来实现其逆转作用. 目前 PGP 拮抗剂除了钙离子通道阻滞剂外, 还在进行包括中药在内的各种多药耐药逆转剂及基因水平逆转药物的研究. 有望在不久的将来投入临床应用, 为难治性癫痫的治疗提供帮助. 癫痫耐药机制研究已成为国内外研究热点, 其中多药耐药基因的相关研究占重要地位. 本文通过体外观察钙拮抗剂维拉帕米对 PGP 过表达的 K562 细胞耐药性及细胞内苯妥英钠与卡马西平浓度的影响, 证实高表达的 PGP 参与了细胞的药物转运, 在难治性癫痫的耐药机制中扮演重要角色, 而且有效抑制 PGP 表达和其功能将有助于逆转癫痫耐药. 本研究将有助于了解难治性癫痫的耐药机制, 并对今后临床药物的研究提供思路.

参 考 文 献

1. Loscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301(1):7-14
2. 陈英辉, 赵永波, 马爱梅. 难治性癫痫患者脑内 MDR1 的表达. *中风与神经疾病杂志*, 2006, 23(1):60
3. 吕洋, 王学峰, 晏勇等. 西比灵逆转抗癫痫药诱导的多药耐基因表达. *重庆医学*, 2000, 29(3):193-195
4. Potschka H, Baltes S, Loscher W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Res*, 2004, 58(2-3):85-91
5. Owen A, Pirmohamed M, Tettey JN, *et al*. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 51(4):345-349
6. Weiss J, Kerpen CJ, Lindenmaier H, *et al*. Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(1):262-267
7. Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR- rats. *Epilepsia*, 2003, 44(12):1479-1486
8. Aronica E, Gorter JA, Redeker S. Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia*, 2005, 46(6):849-857
9. Awasthi S, Hallene KL, Fazio V. RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy. *BMC Neurosci*, 2005, 27(6):61
10. Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, *et al*. Vascular colocalization of P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2006, 32(1):51-63
11. 石淑文 郭淑芬. 多药耐药细胞系 K562/HHT 和 K562/VCR 的建立及耐药性逆转的研究. *中华儿科杂志*, 1998, 36(1):15-18
12. Tishler DM, Weinberg KT, Hinton DR, *et al*. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 1995, 36(1):1-6

The role of P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin and carbamazepine in a multidrug resistant K562*

CHEN Ying-Hui^{1),2)}, ZHAO Yong-Bo^{2)*}

(¹⁾Department of Neurology, Jinshan hospital of Fudan university, Shanghai 200540, (²⁾ Department of Neurology, First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China)

Abstract A series of researches concerning the relationship between multidrug transporters and drug resistance in medically intractable epilepsy have been done. There is accumulating evidence demonstrating that P-glycoprotein (PGP) is a candidate to cause AEDs resistance. In this study, we investigated the effect of PGP

inhibitor-verapamil on the intracellular AEDs accumulation in a MDR(multidrug resistant) K562. The multidrug resistance (overexpression of PGP) cell line K562/Dox was established and the intracellular PHT and CBZ accumulation in multidrug resistant cell line and non- multidrug resistant cell line was observed. After PGP inhibitor-verapamil was applied to the two cell lines, the concentration change of PHT and CBZ in MDR cell was observed. The results were found, compared with non-MDR cell line K562, which IC_{50} was significantly increased in MDR cell line K562/Dox after PHT and CBZ was applied; verapamil could decrease significantly the level of IC_{50} in MDR cell line K562/Dox, and the reversal index were 2.5 and 1.5. The concentration of PHT and CBZ in MDR cell line K562/Dox was lower than that in non-MDR cell line K562, and verapamil significantly enhanced the concentration of PHT and CBZ in MDR cell line K562/Dox($P<0.05$). It is obvious that overexpression of PGP are concerned with drug resistance of medically intractable epilepsy.

Key words medically intractable Epilepsy, P-glycoprotein, verapamil, multidrug resistant

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30370511)

**Corresponding author.

Tel: 86-021-63240090-4682, Email: zyb62@hotmail.com

Received: April 22, 2008

Accepted: July 21, 2008

Available online: August 19, 2008