

## 化疗药物对甲状腺未分化癌耐药基因表达的影响

郑旭琴<sup>1</sup>,徐书杭<sup>2</sup>,崔岱<sup>1</sup>,王晓东<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029;<sup>2</sup>江苏省中西医结合医院内分泌科,江苏 南京 210028)

**[摘要]** 目的:评价阿霉素和顺铂化疗药物对甲状腺未分化癌耐药相关基因 MDR1 和 MRP1 表达的影响。方法:分别用阿霉素和顺铂诱导人甲状腺未分化癌耐药细胞 HTh74/DOX 和 HTh74/DDP。利用荧光定量 RT-PCR 检测耐药细胞中 MDR1 和 MRP1 的表达情况,并观察 MDR1 和 MRP1 抑制剂联合阿霉素或顺铂对耐药细胞进行干预的疗效。结果:HTh74/DOX 细胞与亲代相比高表达 MDR1 而 MRP1 基因上调不明显;HTh74/DDP 细胞与亲代相比高表达 MRP1 基因而 MDR1 基因上调不明显,且 HTh74/DOX 对顺铂缺乏交叉耐药,HTh74/DDP 对阿霉素缺乏交叉耐药。MDR1 和 MRP1 抑制剂分别能部分恢复 HTh74/DOX 和 HTh74/DDP 对阿霉素和顺铂的敏感性。结论:不同化疗药物可能上调不同 ABC 跨膜转运蛋白耐药相关基因而导致甲状腺未分化癌细胞耐药性增强。临床可能通过检测各种 ABC 跨膜转运蛋白或基因的表达量来预测不同化疗药物的疗效,并选用适当 ABC 跨膜转运蛋白抑制剂联合化疗药物进行个体化治疗方案的制定。

**[关键词]** 甲状腺未分化癌;化疗药物;多耐药基因 1;多耐药相关蛋白 1

**[中图分类号]** R736.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)12-1680-04

### Expression of MDR1 and MRP1 in anaplastic thyroid carcinoma cell line HTh74 after chemotherapeutical drug intervention

ZHENG Xu-qin<sup>1</sup>, XU Shu-hang<sup>2</sup>, CUI Dai<sup>1</sup>, WANG Xiao-dong<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the correlation of doxorubicin and cisplatin intervention with the expression levels of MDR1 and MRP1 in anaplastic thyroid carcinoma cell line HTh74. **Methods:** Doxorubicin resistant cells (HTh74/DOX) and cisplatin resistant cells (HTh74/DDP) were obtained by treating the HTh74 cell with doxorubicin or cisplatin for 6 months respectively. Fluorescent quantitative RT-PCR was adopted to detect the transcription of MDR1 and MRP1 in HTh74/DOX and HTh74/DDP. **Results:** Compared to their parental HTh74 cell, HTh74/DOX cell expressed high level of MDR1 and low level of MRP1, HTh74/DDP expressed high level of MRP1 and low level of MDR1. HTh74/DOX cells lacked cross resistance to cisplatin, and HTh74/DDP cells lacked cross resistance to doxorubicin. Inhibitors of MDR1 or MRP1 partly restored the toxicity of doxorubicin or cisplatin on the resistant cells respectively. **Conclusion:** Different chemotherapeutics increase the expression of different ABC transporters to enhance the drug resistance. Detecting the expression of ABC transporters can be used to predict the effect of chemotherapeutic drugs in clinical. The proportionate inhibitor of ABC transporter combined with chemotherapeutic drugs may be effective in individual treatment.

**[Key words]** anaplastic thyroid carcinoma; chemotherapeutical drug; multidrug resistance gene 1; multidrug resistance-associated protein 1

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1680-1683]

甲状腺未分化癌预后很差,一经诊断平均仅几

个月的生存期<sup>[1-2]</sup>。阿霉素和顺铂是甲状腺未分化癌化疗的主要药物,但耐药蛋白诱导的多药耐药常影响临床化疗疗效。目前,已鉴别出多种不同基因编码的耐药蛋白,但并非所有的蛋白都与这两类化疗药

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81102032)

\*通讯作者, E-mail: drwangxd@vip.163.com

物耐药密切相关<sup>[3-4]</sup>。本研究拟通过观察阿霉素和顺铂在体外诱导甲状腺未分化癌细胞株 HTh74 耐药后其多药耐药基因 (multidrug resistance gene, MDR1) 和多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance protein, MRP1) 的表达情况, 评价 MDR1 和 MRP1 与阿霉素和顺铂药物的相关程度, 为临床预测化疗药物疗效, 指导临床化疗药物的选择提供一定的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人甲状腺未分化癌细胞株 HTh74 (德国柏林洪堡大学 Derwahl 教授馈赠), 培养于 10% 胎牛血清的 Ham F12 培养基。阿霉素、顺铂、MK571、维拉帕米 (Sigma 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

细胞株 HTh74 培养于 10% 胎牛血清的 Ham F12 培养基。

#### 1.2.2 甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测甲状腺肿瘤细胞增殖率

甲状腺肿瘤细胞以  $2 \times 10^3$  个/ml 的密度接种于 96 孔板, 细胞贴壁后予无血清培养基培养 24 h, 再予各浓度的阿霉素和顺铂, 或联合 MDR1 抑制剂维拉帕米  $10 \mu\text{mol/L}$  或 MRP1 抑制剂 MK571  $10 \mu\text{mol/L}$ , 培养 48 h 后, MTT 法检测各孔吸光度值。每组设 6 个复孔, 重复 3 次, 同时设溶剂对照组 (0.01% 乙醇)。

#### 1.2.3 耐药细胞的培养

使用药物浓度递增的方法将培养液中的阿霉素从浓度 0.001 mg/ml 增加到 0.500 mg/ml, 顺铂从浓度 0.001 mg/ml 增加到 1.000 mg/ml。

#### 1.2.4 实时荧光定量 RT-PCR

提取亲代 HTh74 细胞、阿霉素耐药细胞 (HTh74/DOX) 和顺铂耐药细胞 (HTh74/DDP) 细胞的 RNA, oligodT 为引物逆转录合成 cDNA, 应用 MDR1、MRP1 和  $\beta$ -actin 引物探针进行实时荧光 PCR。每份 cDNA 标本重复采用实时定量 PCR 技术检测 3 次。反应条件: 预变性  $94^\circ\text{C}$  5 min, 变性  $94^\circ\text{C}$  30 s, 退火 30 s, 延伸  $72^\circ\text{C}$  30 s, 共 25~30 个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。在延伸的过程中搜集荧光信号。荧光定量 RT-PCR 扩增结果采用 FTC2000 荧光 PCR 仪自带的实时荧光定量 PCR 分析程序分析 Ct 值, 以 18 S RNA 为内参照计算 MDR1 和 MRP1 的

相对表达强度。各引物序列如下: MDR1 (产物 253 bp, 下同) 上游 5'-GCCTGGCAGCTGGAAGACAAAT-AC-3', 下游 5'-ATGGCCAAAATCACAAGGGTTAGC-3'; MRP1 (238 bp) 上游 5'-ACCCCTCTCTGTTTAAAG-TGTT-3', 下游 5'-AAGCAGATGTGGAAGTACTGGT-3'; 18S RNA (110 bp) 上游 5'-CTCAACACGGGA-AACCTCAC-3', 下游 5'-CGCTCCACCAACTAAGAA-CG-3'。

### 1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 11.5 软件包进行分析, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 统计学分析组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。半数抑制浓度 (IC50) 使用 GraphPad Prism 5 软件进行作图得出。

## 2 结果

### 2.1 阿霉素和顺铂耐药细胞的获得

经过 6 个月的剂量递增培养, HTh74 细胞能分别稳定地生长在含 0.5 mg/ml 阿霉素或 1.0 mg/ml 的顺铂培养基中。大部分细胞分别能在高浓度的阿霉素或顺铂中存活下来。表 1 是经过计算得出的 IC50 和耐药指数, HTh74 亲代对阿霉素的 IC50 是  $(1.8 \pm 0.14) \mu\text{g/ml}$ , HTh74/DOX 对阿霉素的 IC50 是  $(153.53 \pm 16.43) \mu\text{g/ml}$ , 耐药指数是 85。HTh74 亲代对顺铂的 IC50 是  $(3.07 \pm 0.25) \mu\text{g/ml}$ , HTh74/DDP 对顺铂的 IC50 是  $(8.75 \pm 0.96) \mu\text{g/ml}$ , 耐药指数是 2.85。

### 2.2 HTh74/DOX 和 HTh74/DDP 缺乏交叉耐药

HTh74/DOX 而对顺铂的 IC50 是  $(2.76 \pm 0.62) \mu\text{g/ml}$ , 耐药指数是 0.90, 而 HTh74/DDP 对阿霉素的 IC50 是  $(1.24 \pm 0.21) \mu\text{g/ml}$ , 耐药指数是 0.69 (表 1)。

### 2.3 耐药基因的表达

HTh74/DOX 细胞与亲代细胞相比高表达 ABC 家族跨膜蛋白基因 MDR1, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 而 MRP1 基因上调不明显, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); HTh74/DDP 细胞与亲代细胞相比高表达 MRP1, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 MDR1 基因上调不明显, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。HTh74/DOX 细胞与 HTh74/DDP 细胞相比高表达 MDR1, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 而 HTh74/DDP 细胞高表达 MRP1, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

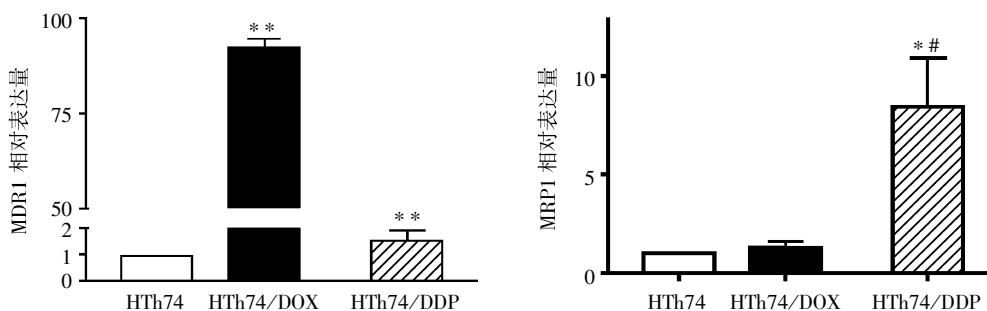
### 2.4 MDR1 和 MRP1 抑制剂对化疗药物的敏感性的影响

表 1 甲状腺未分化癌细胞对化疗药物的敏感性

Table 1 Sensitivity of anaplastic thyroid carcinoma cell lines to chemotherapeutics drugs

药物	HTh74	HTh74/DOX		HTh74/DDP	
	IC50 (μg/ml)	IC50 (μg/ml)	RI	IC50 (μg/ml)	RI
阿霉素	1.80 ± 0.14	153.53 ± 16.43*	85.00	1.24 ± 0.21*#	0.69
阿霉素+维拉帕米	-	2.04 ± 0.60#	1.13	-	-
顺铂	3.07 ± 0.25	2.76 ± 0.62 <sup>Δ</sup>	0.90	8.75 ± 0.96*	2.85
顺铂+MK571	-	-	-	3.55 ± 0.72 <sup>Δ</sup>	1.16

与 HTh74 组相比, \**P* < 0.05; 与单用阿霉素的 HTh74/DOX 组相比, #*P* < 0.05; 与单用顺铂的 HTh74/DDP 组相比, <sup>Δ</sup>*P* < 0.05。



与 HTh74 组比较, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01; 与 HTh74/DOX 组比较, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01。

图 1 实时荧光定量 RT-PCR 检测亲代和耐药细胞中 MDR1 和 MRP1 的表达情况

Figure 1 Real-time RT-PCR analysis of mRNA expression of MDR1 and MRP1 in HTh74 and HTh74 resistant cells

随着阿霉素浓度的增加,联合维拉帕米组的细胞存活率明显比单用阿霉素组下降。MDR1 抑制剂维拉帕米能增加 HTh74/DOX 对阿霉素敏感性,使 HTh74/DOX 对阿霉素的 IC50 降至 (2.04 ± 0.60) μg/ml (*P* > 0.05),与亲代对阿霉素的 IC50 相近。随

着顺铂浓度的增加,联合 MK571 组的细胞存活率明显比单用顺铂组下降。MRP1 抑制剂 MK571 能增加 HTh74/DDP 对顺铂的敏感性,使 HTh74/DDP 对顺铂的 IC50 降至(3.55 ± 0.72) μg/ml (*P* < 0.05, 图 2, 表 1)。

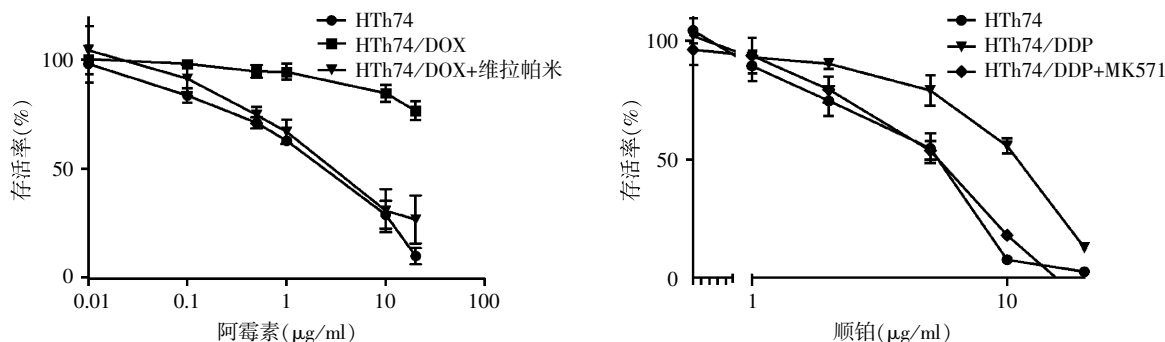


图 2 阿霉素或顺铂单独或联合维拉帕米或 MK571 对甲状腺未分化癌细胞存活率的影响

Figure 2 The effects of doxorubicin or cisplatin alone or combined with verapamil or MK571 on anaplastic thyroid carcinoma cell viability

### 3 讨论

肿瘤患者临床化疗失败,是多重复杂机制共同作用的结果。其中,ABC 转运蛋白的表达或功能异常是肿瘤产生多耐药的重要机制之一<sup>[5]</sup>。目前研究表明耐药基因表达量与临床肿瘤耐药间有密切联系,不合适的化疗药物作用后还可引起肿瘤多药耐药基因表达量的增加。甲状腺未分化癌是高度耐药

的一种肿瘤,临床上主要选择阿霉素和顺铂治疗,但疗效存在个体差异<sup>[6-8]</sup>。目前研究多是检测临床肿瘤标本中的耐药基因表达率与化疗疗效的关系,或利用基因芯片高通量研究肿瘤耐药基因表达与不同化疗药物作用的关系。然而,除了肿瘤本身表达耐药基因能引起化疗药物耐药,使用化疗药物也可能诱导肿瘤细胞表达更多的耐药基因和蛋白,针对耐药基因与化疗药物之间的精确定量研究能进一步揭示肿

瘤耐药的机制。

本研究采用浓度递增法分别得到阿霉素和顺铂耐药细胞<sup>[9]</sup>,利用实时荧光定量 RT-PCR 发现甲状腺未分化癌细胞株 HTh74 亲代表达耐药基因 MDR1 和 MRP1,通过与阿霉素或顺铂共培养后,该耐药细胞 HTh74/DOX 和 HTh74/DDP 分别高表达 MDR1 和 MRP1 基因,证实了 ABC 转运蛋白家族 MDR1 和 MRP1 有其相对特异的作用底物<sup>[10]</sup>。临床上或可以通过检测用药前后 MDR1 和 MRP1 的表达量预测阿霉素类和顺铂类药物的疗效。本研究还显示 MDR1 和 MRP1 抑制剂维拉帕米和 MK571 分别能部分恢复阿霉素和顺铂耐药的甲状腺未分化癌细胞对化疗药物的敏感性。维拉帕米和 MK571 主要是分别与 MDR1 和 MRP1 竞争结合,抑制其跨膜泵作用,使抗癌药物细胞外排降低,提高肿瘤细胞药物浓度而逆转耐药。化疗药物联合 ABC 转运蛋白抑制剂治疗肿瘤是国内外研究的热点之一<sup>[11-12]</sup>,体外和动物实验显示了联合治疗的效果,但这些抑制剂因其较多的不良反应,还未投入临床使用。新型的不良反应小、效果好的抑制剂不断被发现<sup>[13-14]</sup>,但临床疗效还有待进一步的研究和探索。研究还发现耐药细胞缺乏交叉耐药,可能的原因是耐药细胞 ABC 转运蛋白表达量的不同,对化疗药物的敏感性不同<sup>[15]</sup>。

本研究仅观察了一种甲状腺分化癌细胞株 HTh74 中阿霉素和顺铂药物干预后的耐药基因表达情况,还需要进一步筛选更多化疗药物干预多种甲状腺未分化癌细胞株后表达均有量效关系的耐药基因。同时需要在临床上监测化疗前后甲状腺未分化癌组织中耐药基因的变化,为临床制定个体化治疗方案,选择特异敏感性药物提供有力的工具。

#### [参考文献]

[1] Are C, Shaha AR. Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches [J]. *Ann Surg Oncol*, 2006, 13(4): 453-464

[2] Brignardello E, Gallo M, Baldi I, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: clinical outcome of 30 consecutive patients referred to a single institution in the past 5 years [J]. *Eur J Endocrinol*, 2007, 156(4): 425-430

[3] Kudoh K, Ramanna M, Ravatn R, et al. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray [J]. *Cancer*

*Res*, 2000, 60(15): 4161-4166

[4] Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(2): 129-137

[5] Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2008, 73(5): 592-604

[6] Siironen P, Hagstrom J, Maenpaa HO, et al. Anaplastic and poorly differentiated thyroid carcinoma: therapeutic strategies and treatment outcome of 52 consecutive patients [J]. *Oncology*, 2011, 79(5-6): 400-408

[7] Orita Y, Sugitani I, Amemiya T, et al. Prospective application of our novel prognostic index in the treatment of anaplastic thyroid carcinoma [J]. *Surgery*, 2011, 150(6): 1212-1219

[8] Akaiishi J, Sugino K, Kitagawa W, et al. Prognostic factors and treatment outcomes of 100 cases of anaplastic thyroid carcinoma [J]. *Thyroid*, 2011, 21(11): 1183-1189

[9] Zheng X, Cui D, Xu S, et al. Doxorubicin fails to eradicate cancer stem cells derived from anaplastic thyroid carcinoma cells: characterization of resistant cells [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(2): 307-315

[10] Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7496-7511

[11] Genoux-Bastide E, Lorendeau D, Nicolle E, et al. Identification of xanthenes as selective killers of cancer cells overexpressing the ABC transporter MRP1 [J]. *Chem Med Chem*, 2011, 6(8): 1478-1484

[12] Shen T, Kuang YH, Ashby CR, et al. Imatinib and nilotinib reverse multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the efflux activity of the MRP7 (ABCC10) [J]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7520

[13] Zhao XQ, Xie JD, Chen XG, et al. Neratinib reverses ATP-binding cassette B1-mediated chemotherapeutic drug resistance *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* [J]. *Mol Pharmacol*, 2012, 82(1): 47-58

[14] Caceres G, Robey RW, Sokol L, et al. HG-829 is a potent noncompetitive inhibitor of the ATP-binding cassette multidrug resistance transporter ABCB1 [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4204-4213

[15] Supino R, Mariani M, Prosperi E, et al. Lack of cross-resistance of a doxorubicin-resistant B16 melanoma line with 4'-deoxy-4'-iodo-doxorubicin [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1988, 21(3): 251-254

[收稿日期] 2012-06-07