

• 论 著 •

负载抗原 DC 与 CIK 共培养逆转肝癌细胞多药耐药性研究^{*}徐巧元¹, 杨志祥^{2△}, 罗 阔²

(1. 重庆市第五人民医院肿瘤科 400062; 2. 重庆市人民医院肿瘤科 400013)

摘要:目的 研究负载抗原的树突状细胞(DC)联合细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)对肝癌细胞株 HepG2/ADM 多药耐药性的逆转作用。方法 HepG2/ADM 细胞冻融抗原冲击 DC, 联合 CIK 细胞与 HepG2/ADM 细胞共培养, 以未负载抗原的 DC-CIK 作为阴性对照, 以未经共培养处理的 HepG2/ADM 细胞作为空白对照。采用流式细胞仪在细胞处理后不同时间点检测 HepG2/ADM 细胞内罗丹明-123(R-123)浓度和阿霉素(ADM)浓度, 采用 Western blot 检测细胞内 P-糖蛋白(P-gp)水平。结果 与 DC-CIK 共培养相比, 负载抗原的 DC-CIK 共培养能够明显抑制 HepG2/ADM 细胞内 R-123 的外排, 提高细胞内 ADM 浓度, 同时降低细胞内 P-gp 水平($P < 0.05$)。结论 经抗原冲击的 DC 和 CIK 共培养可明显抑制 HepG2/ADM 细胞内 R-123 的外排, 提高细胞内 ADM 浓度, 抑制 P-gp 表达, 从而有效逆转肝癌细胞多药耐药性。

关键词: 细胞因子诱导的杀伤细胞; 树突状细胞; 多药耐药性; P-糖蛋白; HepG2/ADM 细胞株

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.13.006 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2016)13-1758-02

Reversion of CIK combined with antigen-loaded DC on multidrug resistant hepatocarcinoma HepG2/ADM cells^{*}XU Qiaoyuan¹, YANG Zhixiang^{2△}, LUO Kuo²

(1. Department of Oncology, the Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China;

2. Department of Oncology, Chongqing People's Hospital, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To analyze the reversal effects of antigen-loaded dendritic cells (DC) and cytokine-induced killer cells (CIK) on multidrug resistance of hepatocarcinoma line HepG2/ADM cells. **Methods** DC were impacted with HepG2/ADM cell lysates and were co-cultured with CIK. Intracellular concentration of rhodamine-123(R-123) and adriamycin(ADM) were determined by flow cytometry, and the expression of P-glycoprotein(P-gp) was detected by Western blot. **Results** Compared with non-antigen-loaded DC-CIK, antigen-loaded DC-CIK remarkably increased the intracellular concentration of R-123, and increased the concentration of ADM, as well as decreased the expression of P-gp($P < 0.05$). **Conclusion** Antigen-loaded DC-CIK could increase the concentration of intracellular ADM, and decrease the expression of P-gp, thus could reverse multidrug resistance of hepatocarcinoma cells.

Key words: cytokine-induced killer cell; dendritic cell; multidrug resistance; P-glycoprotein; HepG2/ADM cell

肝癌是消化系统最常见恶性肿瘤之一, 具有复发率高、致死率高等特点, 严重威胁人类健康。目前, 治疗肝癌的主要方法包括手术结合放化疗和肝动脉介入化疗等, 但疗效欠佳, 可能与肝癌细胞多药耐药性(MDR)有关。因此, 探索如何逆转肝癌细胞 MDR 十分重要。近年来, 细胞介导的过继免疫治疗已成为治疗肿瘤的重要辅助治疗方法, 其中细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)和树突状细胞(DC)应用最为广泛^[1]。研究报道, 阿霉素(ADM)耐药人白血病细胞株 K562/ADM 来源的 DC 与 CIK 体外共培养后, 能显著抑制耐药细胞株的增殖活力, 提高细胞内 ADM 含量, 下调 P-糖蛋白(P-gp)及其编码基因 *mdr-1* 基因的表达, 提示 DC-CIK 细胞免疫治疗可有效逆转肿瘤细胞 MDR, 同时为解决肝癌化疗耐药问题提供了新的思路^[2]。

1 材料与方法

1.1 细胞系 采集健康志愿者外周血, 经多种细胞因子诱导后制备 DC 及 CIK。HepG2 肝癌细胞株购自重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 以 $0.8 \mu\text{g/mL}$ ADM 诱导制备多药耐药细胞株 HepG2/ADM。

1.2 试剂 RPMI-1640 培养液、10%胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 人淋巴细胞分离液为购自英国 TBS 公司; 二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)、罗丹明-123 购自美国 Ameresco 公司; 蛋白提取试剂盒、浓度检测试剂盒、十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶配试剂盒购自碧云天生物技术

有限公司; P-gp 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 内参 β -actin 抗体购自博奥森生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 抗原的制备 HepG2/ADM 细胞贴壁生长于含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中; 消化、离心后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)将细胞悬液浓度调整为 1×10^8 个/毫升, -80°C 、 37°C 反复冻融 3 次, 再于冰浴中超声波破碎细胞, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤后存 4°C 保存备用。

1.3.2 罗丹明-123(R-123)外排实验 将处于对数生长期的 HepG/ADM 细胞以 2×10^4 个/升的浓度接种于 24 孔板内, 每孔终体积为 1 mL。培养 24 h 后, 弃上清, 加入 R-123 至终浓度为 5 mg/L, 分别加 DC-CIK 或 Ag-DC-CIK, 继续培养 0、0.5、1、2 h 后, 收集上清, 用流式细胞仪(激发波长 560 nm, 发射波长 540~660 nm)检测 R-123 激发的荧光强度, 以荧光强度值表示细胞内 R-123 浓度。

1.3.3 Western blot 检测 提取各组细胞总蛋白, 测定浓度后进行 SDS-PAGE 电泳。将聚偏氟乙烯(PVDF)膜于 TBST 溶液(含 5%脱脂奶粉)封闭 1 h, 加入 P-gp 抗体(1:500), 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二

^{*} 基金项目: 重庆市渝中区科技计划项目(20120225)。

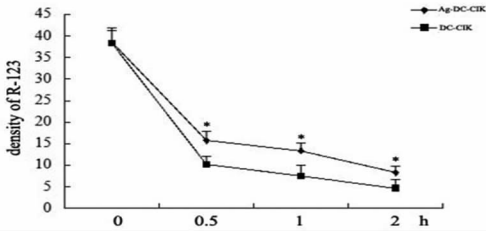
作者简介: 徐巧元, 女, 副主任医师, 主要从事肿瘤综合治疗的研究。 $\triangle$ 通讯作者, E-mail: yzhixiang122@tom.com。

抗,室温孵育 1 h,底物化学发光显色后进行曝光显影。经 Chemi DocXRS 化学发光成像系统检测,计算相对吸光度:相对光密度值(OD 值)=P-gp OD 值/ β -actin OD 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

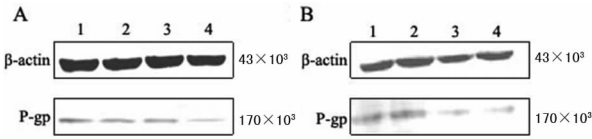
2.1 HepG2/ADM 细胞内 R-123 浓度检测 各时间点 HepG2/ADM 细胞内 R-123 检测结果见图 1。在相同时间点,Ag-DC-CIK 共培养组 HepG2/ADM 细胞内 R-123 浓度高于 DC-CIK 共培养组($P < 0.05$)。



注:与 DC-CIK 共培养组比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养对 HepG2/ADM 细胞内 R-123 浓度的影响

2.2 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 检测 各时间点 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 检测结果见图 2。相同时间点 Ag-DC-CIK 共培养组 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 水平低于 DC-CIK 共培养组($P < 0.05$)。



注:图 A 为 Ag-DC-CIK 共培养组细胞内 P-gp 检测结果;图 B 为 DC-CIK 共培养组细胞内 P-gp 检测结果;1 为空白对照,2 为处理 24 h,3 为处理 48 h,4 为处理 72 h。

图 2 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养对 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 水平的影响

3 讨 论

肿瘤化疗疗效受药物药代动力学、肿瘤细胞分裂和增殖方式,以及肿瘤微环境等因素影响,其中肿瘤细胞 MDR 是导致治疗失败的最主要原因^[3]。MDR 的形成与药物转运、药物代谢、药物靶点、凋亡基因等因素的异常改变有关。mdr-1 基因编码的 P-gp 能将细胞代谢产物、外源性脂溶性物质等泵出细胞外,维持细胞内环境稳定,但 P-gp 水平升高也可导致肿瘤患者化疗效果差、预后差、复发率高^[4-5]。P-gp 属于跨膜蛋白,是三磷酸腺苷(ATP)结合盒式蛋白(ABC)转运蛋白超家族成员,能够将亲脂类化疗药物泵出细胞外,从而诱导细胞产生耐药性,因此寻找有效的 MDR 逆转剂一直是研究的热点^[6]。

肝癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤,目前主要的治疗手段包括手术、放疗和肝动脉介入化疗等,但由于受肝癌细胞 MDR 的影响,化疗的疗效不尽人意,因此寻求新的治疗策略以逆转肝癌细胞 MDR 十分重要。目前,逆转肿瘤细胞 MDR 的方法包括化学药物抑制剂处理、胶体微粒给药、生物免疫途径、基因治疗、中药治疗等,其中细胞免疫治疗近年来成为研究热点^[7]。CIK 具有强大的广谱杀瘤效应,DC 具有强大的抗原呈递作用,可有效诱导细胞因子的生成。DC 与 CIK 共培养可通过细胞毒性作用与分泌细胞因子,激活获得性免疫系统,进而杀伤肿瘤细胞^[8]。P-gp 具有 ATP 依赖性生物膜泵功

能,能将细胞内的药物泵至细胞外而诱导细胞 MDR 的产生。研究表明,DC 可竞争性抑制 P-gp,DC-CIK 共培养后分泌的多种细胞因子可改变细胞膜脂质结构,从而影响 P-gp 功能,抑制药物外排,逆转耐药性。R-123 为阳离子荧光染料,常用于检测耐药细胞对药物的转运功能^[9]。本研究结果显示,相较于 DC-CIK 共培养组,Ag-DC-CIK 共培养可明显抑制 HepG2/ADM 细胞内 R-123 的外排,提高细胞内 R-123 浓度($P < 0.05$),亦即提高细胞内 ADM 浓度,逆转了耐药性。Western blot 检测结果显示,经抗原冲击的 Ag-DC-CIK 共培养能明显降低细胞内 P-gp 水平($P < 0.05$),说明细胞内 R-123 荧光强度增加,ADM 浓度增加与 P-gp 水平降低有关。

目前,肿瘤疫苗成为肿瘤治疗的研究热点。负载有特异性抗原的 DC 与 CIK 共培养,可通过分泌多种细胞因子,调节免疫系统而杀伤肿瘤细胞^[10]。本研究采用抗原致敏的 DC-CIK 降低肝癌细胞内 P-gp 的表达、增加细胞内 ADM 浓度,进而逆转 MDR,为肝癌的综合治疗指出了新的研究方向。

参考文献

- [1] 刘鹏英,陈龙邦. CIK 细胞联合多西紫杉醇对肺腺癌耐药细胞 SPC-A1/DTX 的体内外杀伤作用的实验研究[J]. 中国免疫学杂志,2008,24(12):1079-1083.
- [2] 蒋东霞,杨晓博,赵婷茹,等. CIK 细胞体外逆转多药耐药性的研究[J]. 河南医学研究,2008,17(1):20-22.
- [3] Feng X,Zhao L,Gao S,et al. Increased fucosylation has a pivotal role in multidrug resistance of breast cancer cells through miR-224-3p targeting FUT4[J]. Gene,2015,15(15):1514-1520.
- [4] Liu Z,Duan ZJ,Chang JY,et al. Sinomenine sensitizes multidrug-resistant colon cancer cells (Caco-2) to doxorubicin by downregulation of MDR-1 expression[J]. PLoS One,2014,9(6):98560.
- [5] Oliveira Rodrigues FF,Dos Santos RE,de Oliveira AL,et al. Prognostic assessment of polymorphisms of the MDR-1 and GSTP1 genes in patients with stage II and III breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy[J]. Breast J,2012,18(2):185-187.
- [6] Khan M,Maryam A,Mehmood T,et al. Enhancing activity of anticancer drugs in multidrug resistant tumors by modulating P-glycoprotein through dietary nutraceuticals[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2015,16(16):6831-6839.
- [7] Pan QZ,Wang QJ,Dan JQ,et al. A nomogram for predicting the benefit of adjuvant cytokine-induced killer cell immunotherapy in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep,2015,5(18):9202-9208.
- [8] Zhao X,ji CY,Liu GQ,et al. Immunomodulatory effect of DC/CIK combined with chemotherapy in multiple myeloma and the clinical efficacy[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(10):13146-13155.
- [9] Qiu JG,Zhang YJ,Li Y,et al. Trametinib modulates cancer multidrug resistance by targeting ABCB1 transporter[J]. Oncotarget,2015,6(17):15494-15509.
- [10] Shah AH,Bregy A,Herodes DO,et al. Dendritic cell vaccine for recurrent high-grade gliomas in pediatric and adult subjects: clinical trial protocol[J]. Neurosurgery,2013,73(5):863-867.