

人血白蛋白增强顺铂对 MCF7 细胞的耐药作用

谭波宇, 韦鸿雁, 陈丽, 刘文, 邓楠

(湖南师范大学附属第一医院, 湖南省人民医院药学部, 湖南长沙 410002)

摘要: [目的] 探讨人血清白蛋白(HSA) 联用顺铂 (DDP) 对 MCF7 细胞耐药的影响。[方法] 不同浓度 DDP 干预 MCF7 细胞 72h, CCK8 检验细胞增殖抑制率。选用 DDP 的 IC_{50} 浓度分别与 10、20 $\mu\text{mol/L}$ HSA 联用, 进一步检测联合用药对 MCF7 细胞的增殖抑制率。样品分为空白对照组、顺铂组、HSA 组、顺铂联合 HSA 治疗组 (10 或 20 $\mu\text{mol/L}$)。各组处理 MCF7 细胞 72h, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和免疫印迹法检测 ERCC1 mRNA 和蛋白表达。[结果] DDP 联用 10 或 20 $\mu\text{mol/L}$ HSA 对 MCF7 的增殖抑制率分别为 (50.97 $\pm$ 1.50)%、(45.15 $\pm$ 2.10)%, 单独用药组 DDP 对 MCF7 的增殖抑制率为 (55.60 $\pm$ 5.20)%。qRT-PCR 和 Western blot 检测表明 DDP 联用 HSA (20 $\mu\text{mol/L}$) 显著增强 ERCC1 mRNA 和蛋白的表达。[结论] DDP 联合使用高浓度 HSA 可通过上调 ERCC1 表达诱导化疗药物耐药。

关键词: 人血清白蛋白; 顺铂; 耐药; MCF7; ERCC1

中图分类号: R73 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2018)04-0316-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2018.04.A013

Human Albumin Enhances Cisplatin Resistance to MCF7 Cells

TAN Bo-yu, WEI Hong-yan, CHEN Li, et al.

(The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410002, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of human serum albumin (HSA) combined with cisplatin (DDP) on the resistance of MCF7 cells. [Methods] MCF7 cells were intervened with DDP at different concentrations, and the inhibition rate of cell proliferation was examined by CCK8 after 72h treatment. The IC_{50} concentration of DDP was selected to be combined with 10 or 20 $\mu\text{mol/L}$ HSA respectively, and the inhibition rate of MCF7 cell proliferation by combined administration was further detected. The samples were divided into blank control group, DDP group, HSA group, DDP combined with HAS (10 or 20 $\mu\text{mol/L}$) treatment group. Each group treated MCF7 cells for 72h and the expression of ERCC1 were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot. [Results] DDP combined with 10 or 20 $\mu\text{mol/L}$ HSA on MCF7 proliferation inhibition rate were (50.97 $\pm$ 1.50)% and (45.15 $\pm$ 2.10)% respectively. The inhibition rate of DDP alone was (55.60 $\pm$ 5.20)%. qRT-PCR and Western blot assays showed that DDP combined with HSA (20 $\mu\text{mol/L}$) significantly enhanced ERCC1 mRNA and protein expression. [Conclusion] DDP combined with high concentration of HSA can induce resistance to chemotherapeutic drugs by up-regulation of ERCC1 expression.

Key words: human serum albumin; cisplatin; drug resistance; MCF7; ERCC1

中晚期乳腺癌患者推荐可用含顺铂(cisplatin, DDP)的联合用药方案进行辅助化疗^[1], 然而顺铂可通过多种机制导致耐药。人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)常被误认为是滋补品, 癌症患

者经常使用 HSA 增强自身免疫力。国内外调查研究发现, 临床 40%~90% 白蛋白的应用无科学循证证据支持^[2,3]。过度使用 HSA 对化疗药物会产生何种影响目前尚不清楚。本文将探讨人血白蛋白联合化疗药物 DDP 对乳腺癌细胞 MCF7 耐药的影响, 为临床合理用药提供参考。

收稿日期: 2017-07-24; 修回日期: 2017-09-21

基金项目: 湖南省药学会科研资助项目生物专项 (xy2015007)

通讯作者: 韦鸿雁, E-mail: weihy2001@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 细胞培养基、胎牛血清、96 孔板、细胞培养瓶、6 孔板等均购于美国 Gibco 公司。人血清白蛋白购自美国 Sigma 公司, 顺铂购自江苏恒瑞制药有限公司。RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒、SYBR Green 定量试剂盒均购自日本宝生物有限公司, Cell Counting Kit(CCK8)、DMSO、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、RIPA(强)细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、5×SDS 蛋白上样缓冲液、PVDF 膜、预染蛋白质分子量标准液、与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗、考马斯亮蓝染色液、丽春红染色液等均购自碧云天生物试剂公司。ERCC1 和 β -actin 兔抗人抗体购于美国 Abcam 公司。ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司, 氯化钠、十二烷基磺酸钠、氢氧化钠、异丙醇等购自上海生物工程有限公司; 冰醋酸、叠氮钠、95%乙醇等购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞系 MCF7 购于上海中科院细胞库。乳腺癌细胞系 MCF7 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 同时加用 0.01mg/ml 胰岛素, 在 37℃ 恒温培养箱中通入 5%CO₂ 培养。

1.3 细胞增殖抑制实验

收集对数生长期 MCF7 细胞, 在 96 孔板中每孔加入 200 μ l 细胞悬液, 铺板使细胞密度为 5000 个/孔。5%CO₂、37℃ 条件下孵育 24h, 分别用不同浓度 DDP (0、0.625、1.25、2.5、5、10 μ mol/L)、DDP+HSA (10 μ mol/L 或 20 μ mol/L) 干预 MCF7 细胞 72h, 按照说明书用 CCK8 检测顺铂及白蛋白对 MCF7 增殖抑制率的影响。

1.4 荧光定量 PCR 检测 ERCC1 基因的表达

将 MCF7 细胞按每孔 5×10⁴ml 接种在 6 孔板, 按空白对照组、DDP、DDP+HSA(10 μ mol/L 或 20 μ mol/L)、高浓度 HSA (20 μ mol/L) 实验分组加药培养 72h。ABI7500 实时 PCR 系统检测 SYBR Green 荧光实时定量 PCR。用看家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内标。ERCC1 上游引物为 5'-CATCG-CCGCATCAAGAGA-3', 下游引物为 5'-TTGGGGT-CTCAGGTTGTGTTT-3'。GAPDH 上游引物为 5'-GTCTTCACCACCATGGAGAAGG-3', 下游引物为 5'-

GGCAGGTCAGGTCCACCACTGA-3'。用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 计算 mRNA 相对 GAPDH 表达情况。

1.5 Western blot 试验

将 MCF-7 细胞按每孔 5×10⁴ml 接种在 6 孔板, 按上述分组干预 72h。倒掉培养基, 4℃预冷 PBS 冲洗 2~3 遍, 按照说明书的操作加入强细胞裂解液(RIPA), 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1mmol/L。在冰上放置 20min, 使裂解液和细胞充分接触, 然后用细胞刮剥离细胞, 裂解细胞获得细胞总蛋白。10 000~14 000g 离心 3~5min, 取上清, 用碧云天 BCA 蛋白浓度检测试剂盒绘制蛋白浓度标准曲线并定量。加入 5×蛋白上样缓冲液混匀后 100℃煮沸 5min, 期间震荡混匀 2~3 次; 以初始电压为 8V/cm 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 样本进入分离胶后, 电压增至 15V/cm 继续电泳, 在目的蛋白泳动至距胶下缘时结束电泳; 电泳结束后, 取下分离胶, 在转膜缓冲液中浸泡 10min 左右, 从负极到正极依次放置海面垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海面垫, 放置好后 70V 恒流压转膜 1h。转膜结束后用丽春红染色 5min(于脱色摇床上摇), 观看转膜效果, 裁剪目的蛋白和内参所在位置的膜, 清水洗去丽春红。清水洗后的 PVDF 膜放入含 5%脱脂奶粉的 TBST 中室温下封闭 2h, 用含 2%脱脂奶粉的 TBST 对 ERCC1(1:2000)和内参 β -actin(1:1000)进行稀释, 4℃摇床过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 洗膜结束后 TBST 1:5000 稀释二抗, 室温孵育 1h; TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 进行化学发光检测, 等体积混合化学发光试剂 A 和 B, 与 PVDF 膜共孵育 5min。然后将膜移至另一保鲜膜上, 去尽残液, 包好, 放入 X 光片夹中。在暗室中, 将 1×显影液和定影液分别放入塑料盘中; 在红光中取下 X 光片, 打开 X 光片夹, 将 X 光片放在 PVDF 膜上, 在暗盒内曝光根据情况选择曝光时间, 显影过程密切关注条带情况, 满意即停止显影, 清水漂洗胶片后放入定影液中, 清水漂洗后晾干胶片; 扫描胶片后用凝胶图像分析系统分析 ERCC1 和内参 β -actin 的光密度值, 以 ERCC1/ β -actin 的比值作为目的蛋白的表达量。

1.6 数据统计分析

所有参数均用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 用 SPSS 22.0 软件进行处理组与对照组间独立样本 *t* 检验, 用 GraphPad Prism 5 软件画图。P<0.05 表示有统计

学差异。

2 结果

2.1 单独 DDP 和 DDP 联用 HSA 对 MCF7 细胞增殖抑制的影响

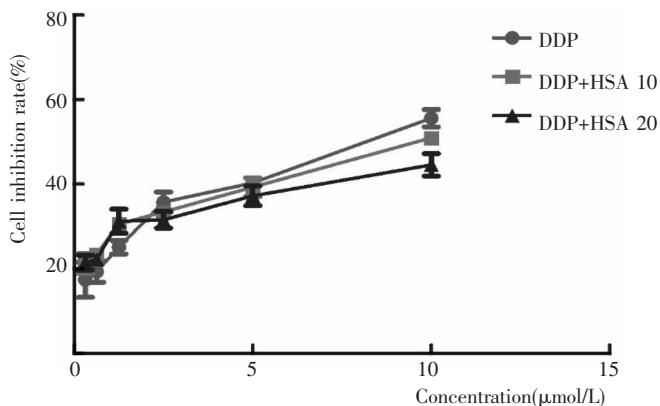
不同浓度 DDP(0~10 μ mol/L)对 MCF7 细胞增殖具有抑制作用,DDP 的 IC₅₀ 值为 5 μ mol/L。选用 5 μ mol/L DDP 联合 HSA 进行下一步实验。结果发现 5 μ mol/L DDP 联用 10 μ mol/L HSA 对 MCF7 的增殖抑制率为 (50.97 $\pm$ 1.50)%,5 μ mol/L DDP 联用 20 μ mol/L HSA 对 MCF7 的增殖抑制率是(45.15 $\pm$ 2.10)%,联合用药组的增殖抑制率明显低于单独用药组 DDP(55.60 $\pm$ 5.20)%(Figure 1)。

2.2 qRT-PCR 检测单独 DDP 及高浓度 HSA、DDP 联用 HSA 对 MCF7 细胞 ERCC1 mRNA 表达的影响

顺铂联用 20 μ mol/L HSA 可显著促进 ERCC1 mRNA 的表达,与空白对照组相比达 2 倍以上,具有统计学差异($P<0.05$)。顺铂联用 10 μ mol/L HSA 也可轻度上调 ERCC1 mRNA 的表达,但是未达到统计学差异。单独应用 DDP 及高浓度 HSA 对 ERCC1 的表达无显著影响(Figure 2)。

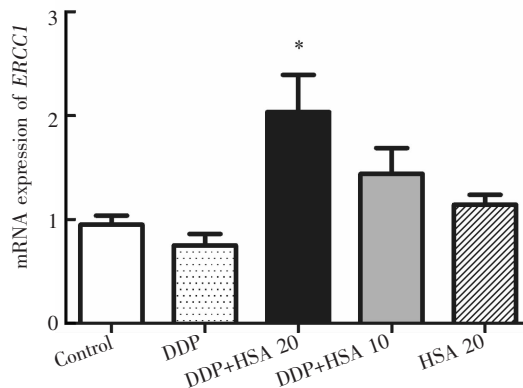
2.3 Western blot 检测单独用 DDP 及高浓度 HSA、DDP 联用 HSA 对 MCF7 细胞 ERCC1 表达的影响

顺铂联用 20 μ mol/L HSA 可显著上调 ERCC1 蛋白表达,与空白对照组相比具有统计学差异($P<0.05$)。



Note:DDP+HSA 10;IC₅₀ concentration of DDP combined with 10 μ mol/L HSA; DDP+HSA 20;IC₅₀ concentration of DDP combined with 20 μ mol/L HSA.

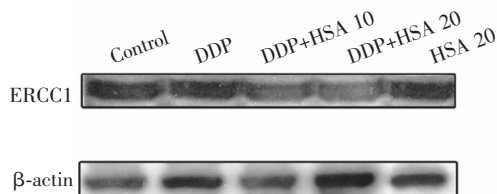
Figure 1 Proliferation inhibition effect of different concentrations of DDP and DDP combined with HSA on MCF7 cells($\bar{x}\pm s$,n=3)



Note: *: $P<0.05$.

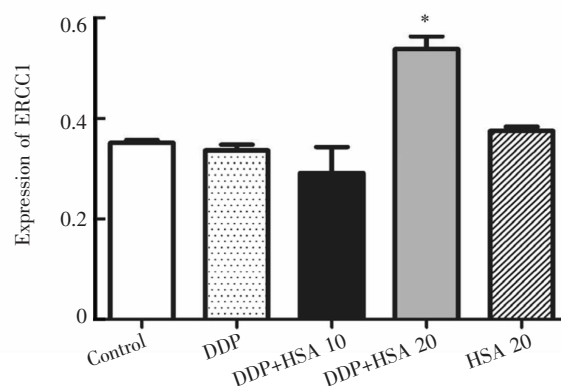
Figure 2 Effect of DDP,high concentration of HSA and DDP combined with HSA(10 μ mol/L or 20 μ mol/L) on mRNA expression of ERCC1 in MCF7 cells($\bar{x}\pm s$,n=3)

顺铂联用 10 μ mol/L HSA、单独应用顺铂及高浓度 HSA 对 ERCC1 的蛋白表达无显著影响(Figure 3)。



Note: *: $P<0.05$.

Figure 3 Effect of DDP,high concentration of HSA and DDP combined with HSA on protein expression of ERCC1 in MCF7 cells($\bar{x}\pm s$,n=3)



3 讨论

人血清白蛋白(HSA)这一血浆制品应用于临床已有 80 多年的历史,主要用于抢救危重症患者因失血过多、创伤和大面积烧伤等引起的休克、脑水肿及大脑损伤导致的颅内压增高,防治低蛋白血症以及肝硬化或肾病引起的水肿和腹水、癌症术后恢复等疾病^[4,5]。根据美国医院联合会的《人血白蛋白、非蛋白胶体及晶体溶液使用指南》,只有严重低蛋白血症($\leq 20\text{g/L}$)、血容量不足合并低蛋白血症、全身严重浮肿,尿量偏少且利尿效果不理想的情况下才有指征补充 HSA^[6]。但是,HSA 的滥用现象普遍存在。在大多数情况下 HSA 常被误认为是滋补品用于癌症或者重症患者。由于白蛋白从血浆中提取,安全风险高,价格昂贵,频繁使用 HSA 增加了药物不良反应,也增加了患者的经济负担^[7]。

顺铂为金属铂类络合物,属周期性非特异性抗肿瘤药。在细胞低氯环境中迅速解离,以水合阳离子的形式与细胞内生物大分子结合(主要靶点为 DNA)形成链间、链内交联或蛋白质 DNA 交联,从而破坏 DNA 的结构和功能。根据药品说明书,化疗药物顺铂与人血白蛋白结合率可高达 90%。胡文兵等^[8]报道,在体外模拟生理条件下,顺铂与血清白蛋白反应既能形成链内交联复合物,又能诱导二硫键的断裂。化疗药物顺铂和 HSA 联合使用可能会发生相互作用,进而导致顺铂在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程中的一个或若干个环节发生改变^[9]。并且顺铂和 HSA 结合后,可对铂类药物的药效、耐药性产生显著影响^[10]。

对化疗药物的多药耐药是乳腺癌治疗失败的主要原因。据报道,在修复顺铂—DNA 复合物中切除修复交叉互补基因(excision repair cross complementing1, *ERCC1*) 表达水平与肿瘤细胞中顺铂耐药水平密切相关。该基因的表达及其编码的蛋白表达变化可提示肿瘤对 DDP 的敏感程度,对以铂类为基础化疗的三阴性乳腺癌患者的预后具有显著的预测作用^[11,12]。*ERCC1* 的表达增高与用铂类化疗治疗乳腺癌患者的不良结局具有显著相关性,可作为个体化用药的生物标志物^[11]。

本研究发现顺铂联合人血白蛋白对乳腺癌细胞 MCF7 增殖抑制作用减弱,并且白蛋白剂量依赖性

增强顺铂对 MCF7 的抑制作用;顺铂与 $20\mu\text{mol/L}$ 白蛋白共同作用于 MCF7 细胞 72h,耐药基因 *ERCC1*mRNA 和蛋白表达均增高,与对照组相比具有统计学差异。这提示顺铂与过量白蛋白的联合使用可使 MCF7 对化疗药物敏感性降低,*ERCC1* 表达上调导致乳腺癌细胞 MCF7 对顺铂耐药。Yang 等^[13]也发现过量人血白蛋白可减弱顺铂对非小细胞肺癌的化疗作用,人血白蛋白联用顺铂可上调 *ERCC1*。此外研究发现,顺铂可能通过 JNK 等蛋白磷酸化导致耐药^[14]。当然这需要在临床进一步观察和验证。

综上所述,由于国内目前缺少基于循证医学依据的白蛋白使用指南作为指导,临床上在实际使用中存在很大的随意性,带来一系列安全隐患。顺铂联合高浓度白蛋白治疗中晚期乳腺癌患者,可能通过上调 *ERCC1* 表达,导致治疗失败。因此临床使用人血清白蛋白应严格把握指征,以避免药物不良反应发生或治疗失败,降低医疗费用负担。

参考文献:

- [1] Committee of guidelines of Chinese society of clinical oncology. Guidelines of Chinese society of clinical oncology (CSCO) Breast cancer 2017.V1[M].Beijing:People's Medical Publishing House,2017.17. [中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 乳腺癌诊疗指南 2017.V1[M].北京:人民卫生出版社,2017.17.]
- [2] Zhou T,Lu S,Liu X,et al. Review of the rational use and adverse reactions to human serum albumin in the People's Republic of China [J]. Patient Prefer Adherence,2013,7: 1207-1212.
- [3] Caraceni P,Tufoni M,Bonavita ME. Clinical use of albumin[J]. Blood Transfus,2013,11(Suppl 4):s18-s25.
- [4] Valerio C,Theocharidou E,Davenport A,et al. Human albumin solution for patients with cirrhosis and acute on chronic liver failure;beyond simple volume expansion[J]. World J Hepatol,2016,8(7):345-354.
- [5] Roberts I,Blackhall K,Alderson P,et al. Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients[DB/OL]. Cochrane Database Syst Rev,2011 (11):CD001208.
- [6] Vermeulen LC Jr,Ratko TA,Erstad BL,et al. A paradigm for consensus. The University Hospital Consortium guidelines for the use of albumin,nonprotein colloid,and crystalloid solutions[J]. Arch Intern Med,1995,155(4):373-379.

- [7] Talasaz AH, Jahangard-Rafsanjani Z, Ziaie S, et al. Evaluation of the pattern of human albumin utilization at a university affiliated hospital [J]. Arch Iran Med, 2012, 15(2): 85-87.
- [8] Hu WB, Liu JA, Xiong SX, et al. Study on interactions between anticancer drug cisplatin and human serum albumin [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2009, 30(3): 97-98. [胡文兵, 刘健安, 熊少祥, 等. 抗肿瘤药物顺铂和血清白蛋白的相互作用研究 [J]. 质谱学报, 2009, 30(3): 97-98.]
- [9] EL Baiomy MA, El Kashef WF. ERCC1 expression in metastatic triple negative breast cancer patients treated with platinum-based chemotherapy[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(2): 507-513.
- [10] Fang TT, Cao KM, Cheng LJ, et al. Protein interaction in the mechanism of platinum anticancer drugs[J]. Scientia Sinica Chimica, 2017, 47(2): 200-219. [房田田, 曹开明, 程岚军, 等. 铂类抗肿瘤药物与蛋白质的作用机理[J]. 中国科学: 化学, 2017, 47(2): 200-219.]
- [11] Palomba G, Atzori F, Budroni M, et al. ERCC1 polymorphisms as prognostic markers in T4 breast cancer patients treated with platinum-based chemotherapy[J]. J Transl Med, 2014, 12(10): 272.
- [12] Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, et al. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology[J]. Chem Rev, 2006, 106(6): 2224-2248.
- [13] Yang Z, Zhou T, Cheng Y, et al. Weakening impact of excessive human serum albumin (eHSA) on cisplatin and etoposide anticancer effect in C57BL/6 mice with tumor and in human NSCLC A549 cells[J]. Front Pharmacol, 2016, 7(1): 434.
- [14] Yan D, An G, Kuo MT. C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(11): 2013-2019.

《中国肿瘤》编辑部关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。

使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿。

《中国肿瘤》网址: <http://www.chinaoncology.cn>

如有任何问题,请与编辑部联系! 联系电话:0571-88122280。