

## N 糖基取代的沙利度胺新衍生物对人鼻咽癌细胞 耐药逆转作用研究\*

易文渊 徐波 李敏\*\* 李中军 崔景荣

(北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

**摘要** 肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是化疗失败的主要原因, 发展新型的耐药逆转剂是克服肿瘤细胞耐药的重要策略之一. 首先采用浓度梯度递增法诱导建立对紫杉醇(Taxol, TAX)耐药的人鼻咽癌(KB)细胞耐药株(KB/TAX), 再通过细胞毒性检测、流式细胞仪分析、Western blotting 和 RT-PCR 等方法鉴定耐药细胞株的特征, 研究沙利度胺新衍生物邻苯二甲酰亚氨基葡萄糖苷(STA-35)对该耐药细胞株的耐药逆转作用与可能的分子机制. 实验结果表明, KB/TAX 细胞对多种化疗药物产生抗性, 对 TAX 的耐药指数达 73.1. 与亲本细胞相比, 耐药细胞内 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的功能与表达均增强、多药耐药基因 *mdr1* 表达量增加. N 糖基取代的沙利度胺新衍生物 STA-35 可显著抑制 KB/TAX 细胞及其亲本 KB 生长, 与 TAX 联合应用时可降低 KB/TAX 细胞对 TAX 的耐药指数. 此外, STA-35(5~20  $\mu\text{mol/L}$ )可浓度依赖地提高 KB/TAX 细胞中罗丹明 123 的蓄积量、抑制 P-gp 的表达, 但对 *mdr1* 基因表达无明显作用. 研究表明, N 糖基取代的沙利度胺新衍生物 STA-35 能够逆转 KB/TAX 细胞对 TAX 的耐药性, 可能的分子机制与其抑制 P-gp 功能和蛋白质表达相关.

**关键词** 沙利度胺, 多药耐药性, 紫杉醇, 鼻咽癌细胞, P-糖蛋白

**学科分类号** R979.1

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00307

肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是化疗失败的主要原因, 发展新型的耐药逆转剂是克服肿瘤细胞耐药的重要策略之一. 沙利度胺(thalidomide, TLD)又名反应停, 曾被广泛用于治疗早孕反应, 但由于其强烈的致畸胎的副作用而在世界范围内被禁用. 近年来, 随着沙利度胺的抗血管生成作用和抗炎作用的发现, 人们逐渐重视其在肿瘤、炎症领域的研究应用价值. 特别是多种沙利度胺衍生物表现出了较好的生物学活性, 而毒副作用也得到了较大的改善<sup>[1]</sup>. 值得一提的是, 最新研究发现, 沙利度胺及其类似物对难治性、复发性和多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的治疗效果良好, 显示了该类化合物的广泛应用前景<sup>[2]</sup>. 沙利度胺的基本化学结构为邻苯二甲酰亚胺(图 1), 目前已知的沙利度胺类似物的结构改造主要集中在 N 端取代和苯环上的取代两种, 这些衍生物在提高药效、降低不良反应方面均有长足的进步. 例如, 在邻苯二甲酰亚胺的苯环 5 位上进行羟基取代, N 端进行苯基取代得到的衍生物 5HPP-33 被证明具有抑制 TNF- $\alpha$

活性和抑制微管蛋白聚合的药理作用<sup>[3,4]</sup>. 糖化学研究表明, 糖基在邻苯二甲酰亚胺的吸收转运过程中发挥着重要作用<sup>[5,6]</sup>, 目前尚无 N 端糖基取代的沙利度胺衍生物的研究报道. 因此, 我们设计、合成了一类新的沙利度胺衍生物, 即 N 端糖基取代的邻苯二甲酰亚胺(STA-35, 图 1), 并研究其抗癌活性以及对肿瘤细胞多药耐药性的逆转作用.

鼻咽癌是常见的头颈部恶性肿瘤, 临床上以放射治疗为主, 但对于晚期、局部复发、转移的病例, 化疗仍为治疗的主要手段. 紫杉醇(taxol, TAX)是目前治疗头颈部鳞癌最为有效的单药之一<sup>[7]</sup>, 与顺铂等药联合也表现出良好的治疗效果<sup>[8]</sup>. 但 TAX 在肿瘤治疗中产生的多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象影响了它的药效. 为深入研究耐药机

\* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2004AA2Z3783).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-82801161, E-mail: limin@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2008-04-28, 接受日期: 2008-08-19

制, 筛选有效的耐药逆转剂, 有必要建立鼻咽癌紫杉醇的耐药细胞系, 为新型耐药逆转剂的研究提供细胞模型. 本研究首先采用浓度梯度递增法诱导建立对 TAX 耐药的人鼻咽癌(KB)细胞耐药株(KB/TAX), 再通过细胞毒性检测、流式细胞仪分析、Western blotting 和 RT-PCR 等方法鉴定耐药细胞株的特征, 研究 N 糖基取代的沙利度胺新衍生物邻苯二甲酰亚氨基葡萄糖苷(STA-35)对该耐药细胞株的耐药逆转作用与可能的分子机制.

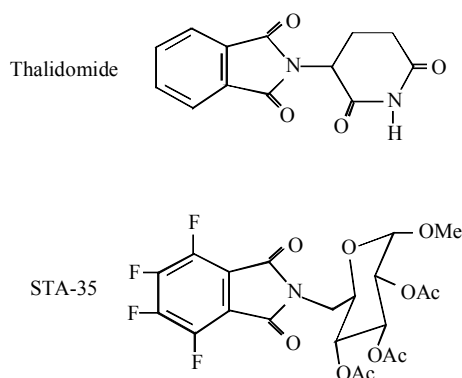


Fig. 1 Chemical structure of thalidomide and STA-35

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

RPMI 1640 培养基为 GIBCO 公司产品; 罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)、罗丹明 123(rhodamine 123, Rh123)、Trizol 试剂、鼠抗人  $\beta$ -actin 单抗, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品; 鼠抗人 P-gp 单抗为 Santa Cruz 公司产品; RT-PCR 试剂盒(ReverTra-Plus™)为日本 TOYOBO 公司产品; 阿霉素(doxorubicin, ADM)为深圳万乐药业有限公司产品; 紫杉醇(taxol, TAX)为美国百时美施贵宝公司产品; 长春碱(vinblastine, VIN)为 Cellomics 公司产品; 硼替佐米(PS341, bortezomib)为北京大学医学部药学院李润涛教授合成、惠赠.

化合物 STA-35: 1-O-甲基-6-去氧-6-四氟代邻苯二甲酰亚氨基-2, 3, 4-三乙酰- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(1-O-methyl-6-deoxy-6-tetrafluorophthalimido-2, 3, 4-tri-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside), 由北京大学医学部药学院李中军教授设计并合成. 该化合物分子式为  $C_{21}H_{19}O_{10}NF_4$ , 分子质量为 521.38, 溶解于有机溶剂, 实验中用 10% DMSO 的 PBS 溶解为  $10^{-2}$  mol/L 的储备液, 临用前用 PBS 稀释到所需浓度.

### 1.2 细胞培养与耐药细胞株的诱导

人鼻咽癌细胞株 KB (human nasopharyngeal carcinoma KB cells)由本室保存, 培养在含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液中(链霉素、青霉素浓度均为 100 U/ml), 置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的培养箱里, 以含 0.25%胰蛋白酶的消化液消化传代.

以 KB 细胞为亲本细胞, 采用 TAX 浓度梯度递增的方法进行诱导. 在对数生长期的细胞培养液中加入 TAX, 初始浓度为 2 nmol/L, 细胞大量死亡, 生长缓慢. 待细胞恢复稳定生长且在相同 TAX 浓度下持续培养传代 3 次以上, 逐级增加药物浓度, 直至细胞可在含 120 nmol/L TAX 的培养液中稳定生长, 即得到 KB/TAX 耐药细胞株. 在脱离 TAX 体外冻存 3 个月后, 耐药性维持冻存前水平. 实验前 2 周撤药, 用无药培养基培养.

### 1.3 SRB 法测定细胞对药物的敏感性

取对数生长期的 KB 和 KB/TAX 细胞接种于 96 孔板, 细胞密度为  $4 \times 10^4/\text{L}$ , 每孔 180  $\mu\text{l}$ . 培养 24 h 后加入不同抗肿瘤药物, 继续培养 48 h 后弃上清, 每孔加入 200  $\mu\text{l}$  10%三氯乙酸(TCA)溶液,  $4^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 固定. 再次弃上清, 蒸馏水冲洗 5 次, 加入 0.4% SRB 溶液 100  $\mu\text{l}$ /孔, 室温孵育 10 min. 然后弃去 SRB, 用 1%醋酸冲洗 5 次, 晾干. 待 96 孔板完全干燥后, 每孔加入 200  $\mu\text{l}$  10 mmol/L Tris 溶液, 室温震荡溶解, 酶标仪 540 nm 波长下测定吸光度值(A). 计算生长抑制率, 抑制率(%) = (对照孔平均 A 值 - 加药孔平均 A 值) / 对照孔平均 A 值  $\times 100\%$ <sup>[9]</sup>. 以药物浓度为横坐标, 生长抑制率为纵坐标绘制浓度效应曲线, 由回归方程计算出两种细胞的半数抑制浓度( $IC_{50}$ ), 并得到 KB/TAX 细胞的耐药指数(resistance index, RI), 即两种细胞  $IC_{50}$  比值(耐药细胞  $IC_{50}$  / 亲本细胞  $IC_{50}$ ).

### 1.4 流式细胞术测定 Rh123 在细胞中的蓄积

取  $1 \times 10^6$  个对数生长期 KB 和 KB/TAX 细胞制成单细胞悬液, 加入 Rh123, 使其终浓度为 500 nmol/L, 避光  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 冷 PBS 清洗离心 2 次, 在流式细胞仪上检测细胞荧光强度. 观察 STA-35 对 KB/TAX 细胞中 Rh123 浓度的影响时, 则用不同浓度的 STA-35 (5 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 KB/TAX 细胞 24 h, 收集细胞, 重复上述操作, 检测细胞内 Rh123 荧光强度.

### 1.5 Western blotting 检测 P-gp 表达

收集 KB 和 KB/TAX 细胞加入蛋白裂解液

(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 50 mg/L Aprotinin, 50 mg/L Leupeptin, 50 μmol/L PMSF), 置于冰上裂解 40 min, 4°C 12 000 g 离心 30 min. 取上清, 用考马斯亮蓝蛋白质定量法测定蛋白质浓度. 制备好的样品置于 65°C 水浴变性 10 min. 取 50 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE, 并电转至 NC 膜上, 3% BSA/TBST(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 50 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 室温封闭约 1.5 h. 一抗 (Anti-P-gp McAb 1 : 200, Anti-β-actin McAb 1 : 2 000) 用 1.5% BSA/TBST 稀释后 4°C 孵育膜过夜. TBST 洗膜后室温摇床二抗 (HRP-goat anti-mouse IgG, 1 : 15 000) 孵育 1 h. 再次 TBST 洗膜, ECL 染色曝光显影. 研究药物对细胞 P-gp 蛋白表达的影响时, 采用不同浓度的 STA-35(5~20 μmol/L) 处理 KB/TAX 细胞 24 h, 收集细胞, 按上述方法进行检测. 显色条带可通过 ImagineJ 软件进行灰度扫描分析, 半定量分析 P-gp 蛋白表达量.

### 1.6 RT-PCR 检测 *mdr1* mRNA 表达

用 Trizol 分别提取 KB 和 KB/TAX 细胞的总 RNA, UV 分光光度计定量 RNA 浓度. 使用 RT-PCR 试剂盒 (ReverTra-Plus™, 日本 TOYOBO 公司) 进行实验. RT 反应加入总 RNA 1 μg, 反应体系 20 μl, 反应条件为 42°C 60 min, 85°C 5 min, 终止. 取 1 μl RT 反应产物进行 PCR, 反应体系 25 μl. *mdr1* 引物<sup>[10]</sup>: 上游引物 5' GCTCAGAGTT-TGCAGGTACC 3', 下游引物 5' TCCACCACCC-TGTTGCTGTA 3'. 内参 GAPDH 引物: 上游引物 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3', 下游引物 5' TCCTTCCAATGTGTTCTGGCA 3'. PCR 反应条件: 98°C 10 s, 56°C 30 s, 68°C 25 s, 30 循环. 取 5 μl 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, EB 染色 20 min, 凝胶成像仪 (UVP, USA) 拍照记录. 观察药物对 *mdr1* mRNA 表达的影响时, 首先采用不同浓度的 STA-35(5~20 μmol/L) 处理 KB/TAX 细胞 24 h, 收集细胞, 再按上述方法进行检测.

## 2 结 果

### 2.1 KB/TAX 耐药细胞株的鉴定

**2.1.1 KB/TAX 细胞的细胞敏感性与耐药指数.** SRB 检测结果表明(表 1), TAX 对 KB 和 KB/TAX 细胞生长的抑制作用具有明显差异,  $IC_{50}$  分别为  $(0.004 \pm 0.001) \mu\text{mol/L}$  和  $(0.277 \pm 0.009) \mu\text{mol/L}$ . KB/TAX 细胞的耐药指数  $RI$  为 73.1. 此外,

KB/TAX 细胞对 VIN 和 ADM 的敏感性也有所降低,  $RI$  分别为 3.8 和 2.0, 而对 PS-341 无明显的交叉耐药性,  $RI$  仅为 1.3. 两种细胞的增殖速度存在明显差异, KB/TAX 细胞的生长较 KB 细胞缓慢, 但二者细胞周期各阶段分布无明显改变(结果未显示).

**Table 1 The multidrug resistance indexes of KB/TAX cells**

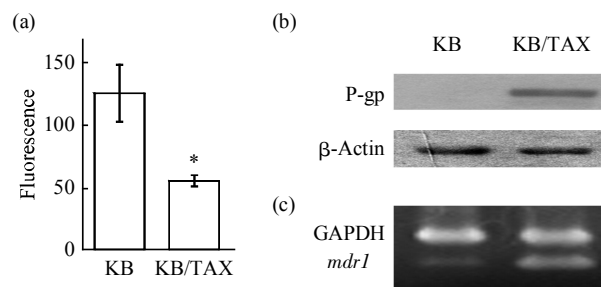
Drugs	$IC_{50}(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		RI
	KB	KB/TAX	
TAX	$0.004 \pm 0.001$	$0.277 \pm 0.009^{***}$	73.1
VIN	$0.130 \pm 0.033$	$0.499 \pm 0.050^{***}$	3.8
ADM	$2.408 \pm 0.372$	$4.703 \pm 0.154^{**}$	2.0
PS-341	$0.136 \pm 0.025$	$0.172 \pm 0.078$	1.3

$IC_{50}$  values were determined by SRB assay.  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs KB group,  $n=3$ .

### 2.1.2 P-gp 功能与表达的变化.

Rh123 是 P-gp 的转运底物, 细胞内 Rh123 荧光的强弱与 P-gp 的功能成反比关系. 采用流式细胞技术分别检测两种细胞内 Rh123 的荧光强度, 结果显示(图 2a), KB/TAX 细胞中 Rh123 的荧光强度低于 KB 细胞, 表明 KB/TAX 细胞的 P-gp 功能强于亲本细胞.

Western blotting 检测结果显示, 两种细胞的 P-gp 蛋白表达不同(图 2b). 亲本 KB 细胞中 P-gp 蛋白水平极低, 几乎观察不到条带, KB/TAX 细胞中 P-gp 蛋白含量较高, 可观察到明显的条带. 基因 *mdr1* 表达的变化类似于 P-gp 蛋白表达的改变(图 2c).

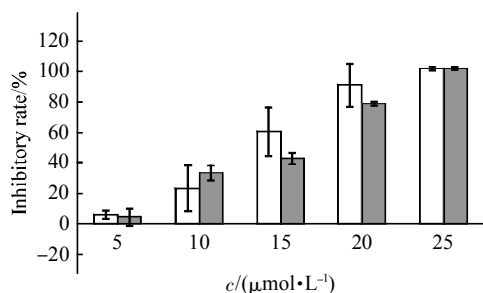


**Fig. 2 Determination of the activity and expression of P-gp and *mdr1* in KB and KB/TAX cells**

(a) The accumulation of Rh123 in KB and KB/TAX cells by cytometry analysis,  $n=3$ ,  $^{*}P < 0.05$  vs KB group. (b) The expression of P-gp in KB and KB/TAX cells by Western-blotting. (c) The expression of *mdr1* in KB and KB/TAX cells by RT-PCR.

## 2.2 STA-35 对 KB/TAX 细胞耐药性的逆转作用

**2.2.1** STA-35 对 KB 和 KB/TAX 细胞的生长抑制作用. 如图 3 所示, STA-35 对 KB 和 KB/TAX 细胞均有生长抑制作用, 并在所测浓度范围内具有浓度依赖性. STA-35 对两种细胞的  $IC_{50}$  值分别为  $(11.3 \pm 4.8) \mu\text{mol/L}$  和  $(14.4 \pm 0.8) \mu\text{mol/L}$ , RI 为 1.27, 说明 STA-35 对 KB 和 KB/TAX 细胞的生长抑制作用近似, KB/TAX 细胞对 STA-35 没有表现出耐药性.



**Fig. 3** Cytotoxic activity of compound STA-35 on KB and KB/TAX cells  
□: KB; ■: KB/TAX.

### 2.2.2 STA-35 对 KB/TAX 细胞的耐药逆转作用.

为了检测 STA-35 对 KB/TAX 细胞的耐药逆转作用, 我们首先检测较低浓度 STA-35 ( $2.5 \mu\text{mol/L}$  和  $5 \mu\text{mol/L}$ ) 对 KB/TAX 细胞的生长作用, 抑制率均小于 5%. 当这两个浓度的 STA-35 分别与 TAX 联用时, KB/TAX 细胞对 TAX 的  $IC_{50}$  值明显降低, 使耐药指数分别降低了 35% 和 40% (表 2).

**Table 2** Reversal of drug resistance on KB/TAX cells by low cytotoxic concentration of STA-35

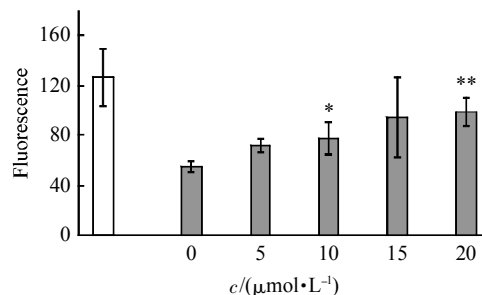
Group	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		RI
	KB	KB/TAX	
TAX	$0.004 \pm 0.001$	$0.277 \pm 0.009$	73.1
TAX+STA-35( $2.5 \mu\text{mol/L}$ )	-	$0.181 \pm 0.006^{***}$	45.3
TAX+STA-35( $5 \mu\text{mol/L}$ )	-	$0.168 \pm 0.002^{***}$	42.1

$^{***}P < 0.001$  vs TAX alone group in KB/TAX cells.

## 2.3 STA-35 逆转 KB/TAX 细胞耐药性的机制研究

**2.3.1** STA-35 对 KB/TAX 细胞中 Rh123 蓄积的影响. Rh123 蓄积实验显示(图 4), 未加入 STA-35 时, KB/TAX 细胞中 Rh123 的荧光强度明显低于 KB 细胞. 当 STA-35 加入细胞后, KB/TAX 细胞对 Rh123 的蓄积能力增强, 且随 STA-35 浓度的升高, Rh123 的荧光强度逐渐增大. 以上结果表明, STA-35 能够浓度依赖地增加 Rh123 在 KB/TAX 细

胞中的蓄积, 抑制 P-gp 对药物外排的功能, 从而增加细胞内药物的浓度, 提高细胞对化疗药物的敏感性.



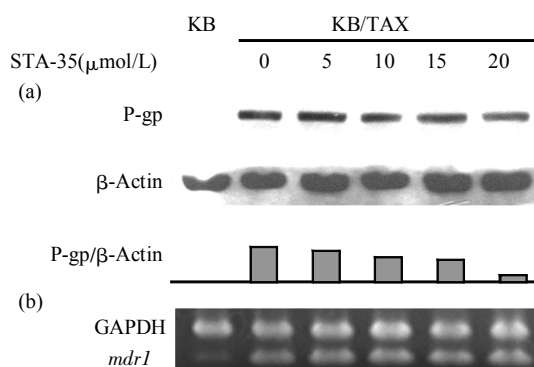
**Fig. 4** Effect of STA-35 on Rh123 accumulation in KB/TAX cells

$n=3$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs control (KB/TAX cells treated with  $0 \mu\text{mol/L}$  STA-35). □: KB; ■: KB/TAX+STA-35.

### 2.3.2 STA-35 对 KB/TAX 细胞 P-gp 表达的影响.

如图 5a 所示, KB 细胞中未见 P-gp 显色条带, 而 KB/TAX 细胞可见 P-gp 显色条带. 当 STA-35 作用于 KB/TAX 细胞 24 h 后, P-gp 的表达随着 STA-35 浓度的增大而逐渐减小. 图 5 中条带下方的柱状图为实验的半定量结果, 即使用 ImageJ 软件对条带进行扫描, 得到的每个样品 P-gp 条带灰度值与  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值, 比值越小即 P-gp 的表达越少. 该实验结果说明, STA-35 能够浓度依赖地减少 P-gp 的表达, 从而影响 P-gp 的功能.

**2.3.3** STA-35 对 KB/TAX 细胞 *mdr1* 基因表达的影响. 如图 5b 所示, KB 细胞中 *mdr1* 的表达量极少, 而 KB/TAX 细胞中 *mdr1* 表达明显. 给予 KB/TAX 细胞不同浓度的 STA-35 ( $5 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ ) 24 h 后, *mdr1* 扩增条带没有显著变化, 表明该浓度范围内的 STA-35 对 KB/TAX 细胞中 *mdr1* 表达没有明显的抑制作用.



**Fig. 5** The effect of STA-35 on the expression of P-gp and *mdr1* gene in KB/TAX cells

### 3 讨 论

多药耐药性(MDR)是化疗失败的主要原因之一<sup>[11]</sup>,其产生机制复杂.其中,膜转运蛋白尤其是P-gp的过表达导致肿瘤细胞对抗肿瘤药物外排增加,是MDR形成的主要原因.以P-gp为靶点的肿瘤MDR逆转剂的研究一直以来备受关注<sup>[12]</sup>.P-gp位于细胞膜上,由*mdr1*基因表达调控,相对分子质量在170~180 ku之间.它具有复杂的膜转运功能,能够将疏水亲脂性药物如秋水仙碱、阿霉素等转运到肿瘤细胞外,使细胞内药物浓度低于杀伤浓度,从而导致耐药性.P-gp对药物的特异性很小,能运输结构不同的底物,因此当肿瘤细胞受到化疗药物诱导,增加P-gp的表达后,还能对结构和作用机制不同的药物产生耐药性.目前,已发现的P-gp抑制剂包括钙离子拮抗剂、钙通道阻滞剂、类固醇制剂、免疫抑制剂、表面活性剂、抗生素等,但由于这些药物毒副作用过大等原因,很难广泛应用于临床治疗,因此寻找低毒高效的P-gp抑制剂是MDR研究的热点之一.我们采用TAX浓度梯度诱导、建立了耐药细胞系KB/TAX.检测结果显示,KB/TAX细胞对TAX的耐药指数为73.1,同时也对ADM和VIN具有交叉耐药性.同时,KB/TAX细胞生长较亲本细胞缓慢,但细胞周期分布无明显变化,停药体外冻存3个月后,耐药特性与冻存前相比没有显著变化.此外,KB/TAX细胞中P-gp活性显著增强,P-gp表达、*mdr1*基因表达显著提高,推测其耐药机制与P-gp过度表达有关.由此,我们认为KB/TAX细胞株可作为筛选P-gp抑制剂的有效工具.

沙利度胺具有良好的抗血管生成和抗炎作用,应用于类风湿性关节炎和麻风结节性红斑的治疗,同时也对部分血液系统恶性肿瘤和实体瘤有抑制作用.近几年,沙利度胺已用于多发性骨髓瘤的临床治疗,并取得了较好的疗效.而且,沙利度胺还常与地塞米松联合作用于难治性多发性骨髓瘤,降低地塞米松的给药剂量,并提高治疗效果<sup>[13~15]</sup>.此外,沙利度胺类似物也具有抗肿瘤和抗多药耐药性的药理作用<sup>[16,17]</sup>,例如来那度胺(CC-5013)具有比沙利度胺更强的血管生成抑制和免疫调节作用.Richardson等<sup>[18]</sup>报道CC-5013与地塞米松连用,对初治多发性骨髓瘤和难治性多发性骨髓瘤均有很好效果,不良反应轻,耐受性好.Dimopoulos等<sup>[19]</sup>报道的两项Ⅲ期临床试验(MM-009, MM-010)中,

CC-5013和地塞米松联合使用治疗复发及顽固性多发性骨髓瘤,得到的总体缓解率明显高于单独使用地塞米松的对照组,MM-009试验中分别为61.2%和22.8%( $P < 0.001$ ),MM-010试验中分别为57.9%和21.7%( $P < 0.001$ ).目前已出现的沙利度胺类似物的结构改造主要集中在N端取代和苯环上的取代两种,N端取代基的种类繁多,但未见糖基取代的报道.我们首次设计、合成了一系列N端糖基取代的沙利度胺类似物,研究发现,该系列化合物之一STA-35对KB和KB/TAX细胞有着近似的生长抑制作用,耐药指数约为1.27,即KB/TAX细胞对STA-35基本不耐药.此外,STA-35在非细胞毒性剂量下(2.5  $\mu\text{mol/L}$ 和5  $\mu\text{mol/L}$ ),可显著降低耐药细胞对TAX的耐药指数,分别达35%和40%,表明STA-35具有逆转KB/TAX细胞耐药的作用.STA-35可浓度依赖性地促进KB/TAX细胞中Rh123蓄积量增加,说明STA-35逆转耐药作用可以与抑制KB/TAX细胞中P-gp的活性有关.此外,STA-35降低P-gp蛋白表达的事实也进一步证明了以上推论.但STA-35并不改变KB/TAX细胞中*mdr1*基因的表达,此现象与其他相关研究的报道并非一致.例如,Fujita等<sup>[20]</sup>报道PS-341能够同时降低P-gp和*mdr1*基因的表达,发挥逆转MCF-7/ADR细胞对TAX、ADM的耐药作用.STA-35逆转KB/TAX细胞耐药作用机制有待进一步深入研究.

综上所述,沙利度胺新衍生物STA-35可显著抑制KB/TAX细胞及其亲本细胞KB生长,与TAX联合应用时可降低KB/TAX细胞对TAX的耐药指数,表明该化合物能够逆转KB/TAX细胞对TAX的耐药性.而且,STA-35可浓度依赖地提高KB/TAX细胞中Rh123的蓄积量、抑制P-gp的表达,表明其逆转肿瘤细胞耐药的机制可能与其抑制P-gp功能和蛋白质表达相关.此外,我们的实验研究还丰富了沙利度胺衍生物的种类与生物学活性,为研发新型化疗药物与化疗增敏剂提供了实验依据.

### 参 考 文 献

- 1 Rajkumar S V, Hayman S R, Lacy M Q, *et al.* Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*, 2005, **106** (13): 4050~4053
- 2 Lokhorst H M, Schmidt-Wolf I, Sonneveld P, *et al.* Thalidomide in induction treatment increases the very good partial response rate before and after high-dose therapy in previously untreated multiple

- myeloma. *Haematologica*, 2008, **93**(1): 124~127
- 3 Hashimoto Y. Novel biological response modifiers derived from thalidomide. *Curr Med Chem*, 1998, **5**(3): 163~178
  - 4 Inatsuki S, Noguchi T, Miyachi H, *et al.* Tubulin-polymerization inhibitors derived from thalidomide. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15**(2): 321~325
  - 5 Hashimoto Y. Structure development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorg Med Chem*, 2002, **10**(3): 461~479
  - 6 Lindhorst T K. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. 72
  - 7 Forastiere A A, Shank D, Neuberg D, *et al.* Final report of a phase II evaluation of paclitaxel in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: an Eastern Cooperative Oncology Group trial (PA390). *Cancer*, 1998, **82**(11): 2270~2274
  - 8 陈 龙, 张 强, 张 红. 紫杉醇、顺铂诱导化疗联合放疗对晚期鼻咽癌疗效观察. *现代肿瘤医学*, 2005, **13**(5): 656~658  
Chen L, Zhang Q, Zhang H. *Modern Oncology*, 2005, **13**(5): 656~658
  - 9 徐 波, 邢 丞, 李 敏, 等. 藤黄新酸抑制肝癌细胞生长的机制研究. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(5): 503~508  
Xu B, Xing C, Li M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(5): 503~508
  - 10 Atkinson D E, Greenwood S L, Sibley C P, *et al.* Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, **285**(3): 584~591
  - 11 Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem*, 2006, **13**(16): 1859~1876
  - 12 Gottesman M M, Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett*, 2006, **580**(4): 998~1009
  - 13 Aragon-Ching J B, Li H, Gardner E R, *et al.* Thalidomide analogues as anticancer drugs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*, 2007, **2**(2): 167~174
  - 14 Palumbo A, Facon T, Sonneveld P, *et al.* Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood*, 2008, **111**(8): 3968~3977
  - 15 Rajkumar S V, Hayman S, Gertz M A, *et al.* Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*, 2002, **20**(21): 4319~4323
  - 16 Li P K, Pandit B, Sackett D L, *et al.* A thalidomide analogue with *in vitro* antiproliferative, antimetabolic, and microtubule-stabilizing activities. *Mol Cancer Ther*, 2006, **5**(2): 450~456
  - 17 Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, *et al.* Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*, 2000, **96**(9): 2943~2950
  - 18 Richardson P G, Schlossman R L, Weller E, *et al.* Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*, 2002, **100**(9): 3063~3067
  - 19 Dimopoulos A, Weber D, Chen C, *et al.* Evaluating oral lenalidomide (Revlimid) and dexamethasone versus placebo and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Haematologica*, 2005, **90** (Suppl 2): 160
  - 20 Fujita T, Washio K, Takabatake D, *et al.* Proteasome inhibitors can alter the signaling pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Int J Cancer*, 2005, **117**(4): 670~682

## Reversal Effect of A Novel N-sugar Substituted Thalidomide Analogue on Multidrug Resistant Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells\*

YI Wen-Yuan, XU Bo, LI Min\*\*, LI Zhong-Jun, CUI Jing-Rong

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract** One major problem to successful treatment of cancer is the development of resistance by tumor cells to multiple chemotherapeutic drugs, a phenomenon named multidrug resistance (MDR). Searching for the novel chemotherapeutical agents is one of the important strategies for overcoming MDR. By using a cytotoxicity assay, flow cytometry analysis, Western-blotting and RT-PCR, a drug (Taxol, TAX) resistant human nasopharyngeal carcinoma KB cell line (KB/TAX) was established by addition of the drug to the cell cultures gradually, then a novel N-sugar substituted thalidomide analogue (STA-35) was investigated for its reversal effect on MDR of KB/TAX cells and possible mechanism. The results showed that KB/TAX cells were resistant to several chemotherapeutical agents, and the relative resistance to TAX was 73.1. Compared with parental KB cells, the function and protein expression of P-glycoprotein (P-gp), as well as *mdr1* gene in the KB/TAX cells were remarkable reduced. Moreover, both KB and KB/TAX cells were sensitive to STA-35, the relative resistance to TAX on KB/TAX cells was decreased by the addition of STA-35. Furthermore, STA-35 (5 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$ ) was capable to reduced the activity of P-gp by increasing the accumulation of rhodamine 123, decreasing P-gp expression in KB/TAX cells in a dose dependent manner, but had no effect on the *mdr1* gene expression. These results suggest a potential action of STA-35 as MDR reversing agent, and one of the possible mechanisms could be the suppression of P-gp function and protein expression.

**Key words** thalidomide, multidrug resistance, TAX, KB cell, P-glycoprotein

---

\*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2004AA2Z3783).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-82801161, E-mail: limin@bjmu.edu.cn

Received: April 28, 2008 Accepted: August 19, 2008