

X 连锁凋亡抑制蛋白反义寡核苷酸逆转 K562 细胞及难治性癫痫大鼠对卡马西平和苯妥英钠耐药性*

陈英辉¹⁾ 王乃东²⁾ 祖衡兵¹⁾ 洪震^{3)**}

(¹⁾ 复旦大学附属金山医院神经内科, 上海 200540; (²⁾ 青岛大学医学院附属医院, 青岛 266003;

(³⁾ 复旦大学附属华山医院神经科, 上海 200040)

摘要 凋亡在癫痫发生机制中起重要作用, 但其在难治性癫痫耐药机制中的作用尚不清楚. 为研究 X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)反义寡核苷酸对 K562/Dox(阿霉素诱导)耐药细胞及难治性癫痫大鼠耐药性的影响, 首先建立耐药的 K562/Dox 细胞株, 比较 XIAP 在耐药细胞株和正常 K562 细胞株的表达情况, 观察转染 XIAP 反义寡核苷酸后, 线粒体膜电位变化以及对卡马西平和苯妥英钠耐药性的影响. 另外, 建立慢性杏仁核点燃癫痫模型, 筛选出耐药组和药物敏感组, 通过侧脑室注射 XIAP 反义寡核苷酸, 对照组注射生理盐水. 观察其对各组大鼠后放电阈值(after discharge threshold, ADT)、后放电时程(after discharge duration, ADD)等电生理指标的影响. 结果发现, XIAP 在 K562/Dox 耐药细胞上的表达明显高于正常 K562 细胞, XIAP 反义寡核苷酸转染 K562/Dox 耐药细胞后, XIAP 的表达明显下降. 导致了 K562/Dox 细胞线粒体跨膜电位的下降, 而且对苯妥英钠和卡马西平的耐药性明显下降, IC_{50} 分别由 $(1\ 978.2 \pm 90.3)$ mg/L 和 $(1\ 875.6 \pm 83.2)$ mg/L, 降低到 $(1\ 123.5 \pm 54.2)$ mg/L 和 $(1\ 084.5 \pm 60.6)$ mg/L, 逆转倍数分别为 1.76 和 1.73. 同时动物实验发现, 耐药组大鼠在给予 XIAP 反义寡核苷酸后, ADT 明显高于对照组($P < 0.05$), ADD 时程也明显缩短. 上述结果证明, XIAP 在耐药的 K562/Dox 细胞株存在高表达, 下调 XIAP 在 K562/Dox 细胞株表达可以改善 K562/Dox 对卡马西平和苯妥英钠的耐药性. 而且下调 XIAP 表达可以协助 AEDs 改善耐药大鼠的电生理活动, 提示 XIAP 参与了难治性癫痫的耐药.

关键词 X 连锁凋亡抑制蛋白, 耐药, 凋亡, 反义寡核苷酸, 难治性癫痫

学科分类号 R742.1, R971.6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00709

大约 30%左右的癫痫患者对现有的抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)产生耐药性, 发作不能被很好地控制. 多药耐药性在其中扮演重要角色. 癫痫多药耐药性(multidrug resistance, MDR)包括特异性和非特异性的机制. 研究发现, 凋亡参与了癫痫的发生机制, 但对于凋亡在难治性癫痫耐药机制中的作用, 目前尚不清楚. X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是目前最有效的 caspase 抑制物, 它通过调节凋亡途径的最后步骤, 可以阻断各种刺激引起的凋亡. 因此, 我们在耐药的 K562/Dox 细胞株及难治性癫痫大鼠模型上, 观察 XIAP 反义寡核苷酸对其耐药性的影响, 了解 XIAP 在癫痫耐药机制中的作用.

1 材料与方法

1.1 耐药细胞株 K562/Dox 的诱导

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 100 U/ml 和链霉素 100 mg/L). 取对数生长期 K562 细胞, 加入阿霉素(doxorubicin, Dox)至 10 mg/L, 37°C 放置 2 h, 离心取细胞, 培养于完全 RPMI-1640

* 上海市自然科学基金项目(09ZR1405500), 上海市卫生局局级科研项目(2008-80)和复旦大学生物医学研究院开放课题(2007)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-62489999, E-mail: zhong@shmu.edu.cn

收稿日期: 2009-11-30, 接受日期: 2010-01-25

液内。待细胞恢复生长后, 复用 Dox 处理, 直至细胞获得耐药性(MTT 法检测)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 mg/L Dox 的培养液中。耐药细胞系在无药培养 7~28 天时进行检测。

1.2 反义寡核苷酸的合成及转染

XIAP 的反义寡核苷酸, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。为了提高反义寡核苷酸的稳定性, 对其进行全硫代修饰。序列如下: 反义序列, 5' GCTGAGTCTCCATATTGCC 3', 错义序列, 5' GGCTCTTTGCCCACTGAAT 3'。反义寡核苷酸的转染按照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书进行操作。取对数生长期 K562/Dox 细胞, 用无血清、无抗生素培养基洗 2 遍, 然后用上述培养液将细胞浓度调至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 按每孔 5×10^5 个细胞接种于 24 孔培养板。将 XIAP 反义寡核苷酸加入无血清、无抗生素培养液稀释, 使其终浓度为 900 nmol/L。将 Lipofectamine™ 2000 和无血清、无抗生素培养液室温孵育 5 min 后, 与 XIAP 反义寡核苷酸混合, 室温孵育 20 min, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 转染后 6 h 每孔加入 20% 体积小牛血清。分别于转染后 24 h 取出细胞。

1.3 Western blotting

实验分反义链组、错义链组、耐药对照组和正常 K562 细胞组。取细胞 1×10^9 个, 提取总蛋白。制备 SDS-PAGE, 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 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 1 h, 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 膜放入配好的抗体稀释液中, 4℃ 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 1:2 000), 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, 代表蛋白质的表达量。

1.4 RT-PCR

细胞总 RNA 用 Trizol 法提取。采用 MBI Fermentas 公司的逆转录试剂盒进行 cDNA 合成。XIAP 与 β -actin 引物均由上海赛百盛生物公司合成, 序列从相关资料中获得并在 GenBank 中进行核对, 各自序列如下: XIAP 正向 5' ggt gat aaa gta

aag tac ttc act gt 3', 反向 5' tca gta gtt ctt acc aga cac tcc tca a 3', 产物为 187 bp。 β -actin 正向 5' cct cgc ctt tgc cga tcc 3', 反向 5' gga tct tca tga ggt agt cag tc 3', 产物约 620 bp。PCR 反应循环参数为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 28 次, 总延伸 5 min。反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 采用美国 GeneGenius 凝胶电泳成像系统测出目的基因和 β -actin 的表达强度, 以同一标本 β -actin 的产物积分光密度值校正各自目的基因的积分光密度值, 并按公式“相对值=目的基因表达强度/ β -actin 表达强度”计算出相对值。

1.5 JC-1 检测线粒体膜电位和细胞耐药性试验(MTT 法)

实验分反义链组、对照组。采用 6 孔培养板, 每孔接种 1×10^6 细胞, 寡核苷酸终浓度为 900 nmol/L, 寡核苷酸转染步骤同前, 于转染后 48 h, 收集 1×10^6 细胞, PBS 洗 1 次, PBS 重悬细胞, 加入 JC-1 (终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$), 37℃ 平衡 30 min, PBS 洗 2 次, 再用 PBS 重悬细胞, 滴片, 荧光显微镜下观察。

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)= $IC_{50}(\text{K562/Dox})/IC_{50}(\text{K562})$ 。试验后计算逆转倍数。耐药逆转倍数=对照组 IC_{50} /实验组 IC_{50} 。

1.6 杏仁核点燃癫痫动物模型的建立

250~300 g 的 SD 大鼠, 雄性, 共 32 只。购自复旦大学医学院动物中心。按照 Goddard 方法^[1], 建立大鼠杏仁核点燃模型。刺激参数为 400 μA 单向方波, 波宽 1 ms, 频率为 60 Hz, 每次持续 1 s, 每日 1 次, 共 20 天。大鼠点燃后的惊厥行为按照 Racine 的标准分为 6 级。连续出现 3 次 V 级发作, 视为点燃大鼠。

1.7 后放电阈值(ADT)的测定和药物筛选

大鼠杏仁核点燃成功后, 大发作后 24 h, 将刺激强度从 20 μA 起始, 每次递增 20 μA , 刺激间隔时间为 1 min, 直至出现后放电, 此时电流强度即为点燃后 ADT。确定点燃后, 在 ADT 测定 24 h 后进行药物筛选, 腹腔内注射苯妥英钠(phenytoin, PHT) (75 mg/kg)。给药后 1 h 测定用药后 ADT。所有动物均每周检测 1 次, 重复共 3 次。1 周后腹腔

注射卡马西平(carbamazepine, CBZ)(30 mg/kg), 重复上述步骤. PHT 和 CBZ 有效鼠标准为每次用药后 ADT 较前增高 100% 的大鼠; 耐 PHT 和 CBZ 点燃鼠标准为与每次用药后 ADT 较前不增高或仅增高 20% 的大鼠.

1.8 XIAP 反义寡核苷酸对耐药大鼠 ADT 和 ADD 的影响

动物腹腔给抗癫痫药前 1 h, 先给予 XIAP 反义寡核苷酸(2 mg/kg)侧脑室注射, 然后在给予抗癫痫药后 1 h 测定 ADT. 侧脑室注射等量生理盐水替代 XIAP 反义寡核苷酸作为对照组. 耐药大鼠每日都给予一次恒流刺激杏仁核. 记录脑电变化、后放电时程(ADD). 后放电时程是指刺激后杏仁核 EEG 波幅至少为刺激前的两倍和频率在 1 Hz 以上的放电持续的时间.

1.9 统计方法

统计学处理采用 SPSS10.0, 样本间进行 Paired-samples *t* 检验或 Independent-samples *t* 检验分析.

2 结 果

2.1 XIAP 反义寡核苷酸对 K562/Dox 细胞上 XIAP 的表达影响

Western blot 结果显示, 与 K562 组相比, XIAP 蛋白在 K562/Dox 组的表达明显升高(图 1). XIAP 反义寡核苷酸转染 K562/Dox 耐药细胞后, 与耐药 K562/Dox 细胞组和错义链组相比较, XIAP 蛋白表达降低 ($P < 0.01$).

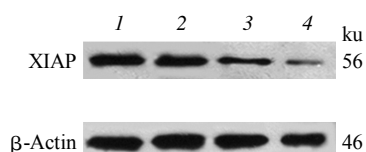


Fig. 1 Western blotting analysis of XIAP expression

1: Group of K562/Dox; 2: Group of mismatch oligonucleotides; 3: Group of antisense oligonucleotides; 4: Group of K562.

2.2 XIAP 反义寡核苷酸对 K562/Dox 细胞上 XIAPmRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示与耐药 K562/Dox 细胞对照组相比较, XIAP 反义寡核苷酸转染后, K562/Dox 细胞上的 XIAPmRNA 表达明显降低, 与对照组相比有统计学意义($P < 0.01$, 图 2).

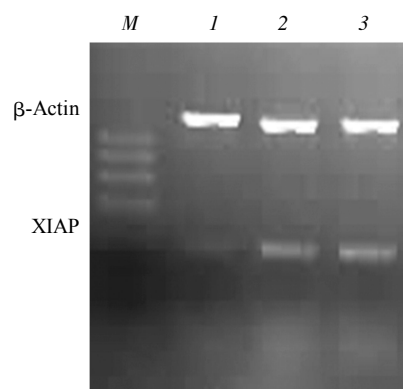


Fig. 2 RT-PCR analysis of XIAP expression

M: DNA marker; 1: Group of antisense oligonucleotides; 2: Group of mismatch oligonucleotides; 3: The control group.

2.3 XIAP 的反义寡核苷酸对 K562/Dox 细胞线粒体膜电位的影响

研究结果: 在荧光显微镜下观察, 在 XIAP 反义寡核苷酸作用后, 经 JC-1 染色, K562/Dox 细胞胞浆荧光由红色转变为绿色, 而对照组细胞胞浆仍呈现红色荧光, 提示 XIAP 的反义寡核苷酸引起了 K562/Dox 细胞线粒体跨膜电位的下降(图 3).

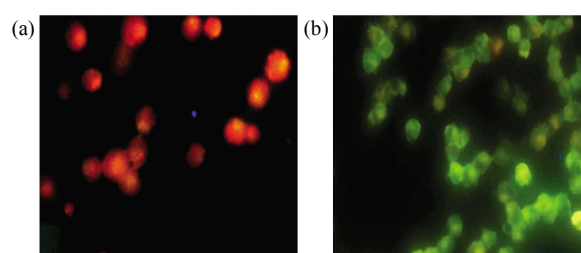


Fig. 3 Effect of XIAP AS ODNs on mitochondrial membrane potential

(a) The control group. (b) Group of antisense oligonucleotides.

2.4 XIAP 的反义寡核苷酸对 K562/Dox 耐药性的影响

研究结果: 用 MTT 法进行细胞耐药性试验, 当 XIAP 反义寡核苷酸转染后, K562/Dox 对 PHT 和 CBZ 的耐药性明显下降, IC_{50} 分别由 $(1\ 978.2 \pm 90.3)$ mg/L 和 $(1\ 875.6 \pm 83.2)$ mg/L, 降到 $(1\ 123.5 \pm 54.2)$ mg/L 和 $(1\ 084.5 \pm 60.6)$ mg/L, 逆转倍数分别为 1.76 和 1.73. 证明 XIAP 反义寡核苷酸逆转了 K562/Dox 的耐药性.

Table 1 Effect of XIAP AS ODNs on drug resistance of K562/Dox cells

AEDs	$IC_{50}(K562)/(mg \cdot L^{-1})$	$IC_{50}(K562/Dox)/(mg \cdot L^{-1})$		RI
		Control	XIAP AS ODNs	
PHT	489.6 ± 45.2	1 978.2 ± 90.3	1 123.5 ± 54.2	1.76
CBZ	564.3 ± 50.2	1 875.6 ± 83.2	1 084.5 ± 60.6	1.73

2.5 药物筛选结果

32 只大鼠中, 点燃 24 只. 点燃的 24 只大鼠中, 共有 6 只大鼠 6 次 PHT、CBZ 试验 ADT 不增高或仅增高 20%, 归入耐药组; 6 只动物 6 次用

药后 ADT 增高 100%以上, 归入药物敏感组.

2.6 XIAP 反义寡核苷酸对耐药大鼠 ADT 的影响

由表 2 所示, 给予 AEDs 后, 药物敏感组的 ADT 明显升高, 升幅达 98.6%, 远远高于耐药组. 耐药组大鼠在给予 XIAP 反义寡核苷酸后, ADT 由(149.3 ± 22.4)提高到(209.0 ± 30.1), 升高了 40.0%, 而对照组在给予 AEDs 后, 仅由(158.3 ± 31.4)提高到(190.2 ± 37.4), 升幅仅为 20.2%. 给予 AEDs 后, XIAP 反义寡核苷酸组 ADT 明显高于对照组 ($P < 0.05$).

Table 2 Effect of XIAP AS ODNs on ADT in drug resistant rats

Group(n=6)		Before AEDs treatment (μA)	After AEDs treatment (μA)	Percentage increase(%)
Group of drug resistance	XIAP AS ODNs	149.3 ± 22.4	209.0 ± 30.1*	40.0*
	Control	158.3 ± 31.4	190.2 ± 37.4	20.2
Group of drug sensitivity		153.7 ± 26.0	305.3 ± 41.6	98.6

* $P < 0.05$ (Compare with the control group).

2.7 XIAP 反义寡核苷酸对耐药大鼠杏仁核点燃进程的影响

研究结果: 耐药组大鼠在给予 XIAP 反义寡核苷酸后, 相对于对照组 ADD 的(87.4 ± 17.6) s, XIAP 反义寡核苷酸组的 ADD 仅为(65.5 ± 15.7) s, 时程明显缩短($P < 0.05$).

3 讨 论

最新的流行病学调查显示, 我国难治性癫痫病人不少于 100 万. 难治性癫痫预后差, 常伴有智能障碍和或神经缺损症状, 致残率和致死率都很高, 严重威胁患者的身体健康和生活质量. 因此了解难治性癫痫的耐药机制并寻找有效的治疗方法十分必要. 难治性癫痫的一个重要特征是多药耐药性, 即患者对大部分 AEDs 抵抗, 尽管这些药物有不同作用机制, 这种现象可能由多种机制所介导. 研究发现, 多药耐药的共同机制包括所谓的“泵”和“非泵”性耐药, 泵性耐药由胞膜蛋白引起, 通过将药物由细胞浆或细胞器中泵出, 使细胞内药物浓度降低^[2-3], 非泵性耐药可能与细胞抗凋亡防御机制的激活有关^[4-5].

细胞凋亡是由多种因子介导的细胞主动死亡的过程, 对机体或组织维持内环境的稳定和生物体的生长发育、生命周期、衰老死亡都有着重要的作用. 大量研究发现凋亡在病理状态下依然扮演重要

角色^[6]. 在化疗药物耐药性的研究中发现, 凋亡参与了耐药机制并起着重要作用. 凋亡通路的紊乱、促进凋亡因子的抑制、凋亡抑制因子过表达以及凋亡基因的表达失控都会导致细胞对药物的抵抗^[7-8].

XIAP 是凋亡抑制蛋白家族中抑制活性最强的一种. XIAP 基因位于 Xq24-25, 含有 497 个氨基酸, XIAP 的 N 端有 3 个 BIRs 结构域: BIR1、BIR2 和 BIR3, BIR 结构域具有典型的锌指结构, 有利于 XIAP 参与蛋白质 - 蛋白质以及蛋白质 - DNA 相互作用, 在 C 端有 1 个具有泛素连接酶 E3 活性的 RING 结构域^[9], 它通过调节凋亡途径的最后步骤, 可以阻断各种刺激引起的凋亡. 它既可以通过直接与激活的 caspase-3、caspase-7 和 caspase-9 结合并抑制其活性, 抑制细胞凋亡的线粒体途径, 即凋亡的内源型途径, 也可以通过 NF- κ B 途径, 激活一些抑凋亡基因的表达, 而抑制细胞表面受体介导的凋亡, 即凋亡的外源型途径^[10-11].

本研究将 XIAP 转染入耐药的 K562/Dox 细胞, 观察其对凋亡及抗癫痫药物耐药性的影响. 发现 XIAP 反义寡核苷酸转染 K562/Dox 耐药细胞后, XIAP 的表达明显下降. XIAP 的反义寡核苷酸引起了 K562/Dox 细胞线粒体跨膜电位的下降, 而且逆转了 K562/Dox 对苯妥英钠和卡马西平的耐药, 逆转倍数分别为 1.76 和 1.73. 同时活体实验发现,

耐药大鼠在给予 XIAP 反义寡核苷酸后, 其 ADT 较前升高了 40.0%, 而对照组仅升高了 20.2%, 提示 XIAP 反义寡核苷酸提高了耐药大鼠对抗癫痫药的敏感性. 而且发现 XIAP 反义寡核苷酸组 ADD 明显低于对照组($P < 0.05$). 以上提示 XIAP 在难治性癫痫耐药机制中起重要作用. 动物实验及人类癫痫研究均证实, 凋亡在癫痫发病机制中起重要作用, 与凋亡相关的蛋白质和基因尤其是促凋亡因子参与了癫痫的发生和发展^[12-14]. 在癫痫发生过程中大量正常神经元死亡, 神经胶质细胞增生, 破坏了原有的正常神经结构, 甚至影响了神经传导通路. 但随着长期的癫痫发作以及癫痫灶附近长期的异常放电, 凋亡扮演的角色可能发生了改变, 抗凋亡相关的蛋白质发生了异常表达. 我们近期研究也发现在难治性癫痫大鼠脑内存在抗凋亡因子如 XIAP 的高表达. 但对于其具体作用机制尚不清楚. 有研究显示, 在难治性癫痫耐药机制中起重要作用的多药转运体 P-糖蛋白(P-glycoprotein, PGP)具有凋亡抑制作用, PGP 可延迟凋亡级联反应, 保护耐药细胞免于细胞毒性药物、自由基、放射线等诱导的多种形式 caspase 依赖型凋亡, 其主要通过对 caspase-3 和 caspase-8 的激活, 但并不抑制耐药细胞发生 caspase 非依赖型凋亡^[15], 这与 XIAP 作用途径相一致. 是否 PGP 抗凋亡作用与 XIAP 存在联系需要进一步研究.

临床上难治性癫痫的耐药机制是极其复杂的, 其涉及基因、环境等各方面因素. 所幸的是, 现在我们可以从分子水平来重新审视疾病的病理机制. 通过研究动物模型和癫痫患者脑组织的凋亡情况, 初步探讨凋亡与难治性癫痫耐药性的关系. 从而进一步了解难治性癫痫的耐药机制, 为临床治疗提供新的理论依据.

参 考 文 献

- [1] Goddard G V. The kindling model of epilepsy. *Trends Neurosci*, 1983, **6**(1): 275-279
- [2] 陈英辉, 赵永波. P-糖蛋白在多药耐药的 K562 细胞转运苯妥英钠与卡马西平中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(12): 1425-1429
- Chen Y H, Zhao Y B. *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35** (12): 1425-1429
- [3] Kubota H, Ishihara H, Langmann T, *et al*. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*, 2006, **68**(3): 213-228
- [4] Pakunlu R I, Cook T J, Minko T. Simultaneous modulation of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense by MDR1 and BCL-2 targeted antisense oligonucleotides enhances the anticancer efficacy of doxorubicin. *Pharm Res*, 2003, **20**(3): 351-359
- [5] Minko T, Dharap S S, Pakunlu R I, *et al*. Molecular targeting of drug delivery systems to cancer. *Curr Drug Targets*, 2004, **5** (4): 389-406
- [6] Mirabella M, Di Giovanni S, Silvestri G, *et al*. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain*, 2000, **123**(1): 93-104
- [7] Amantana A, London C, Iversen P, *et al*. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**(6): 699-707
- [8] Shi R X, Ong C N, Shen H M. Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Res*, 2005, **65**(17): 7815-7823
- [9] Yang Y, Fang S, Jensen J P, *et al*. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, 2000, **288**(5467): 874-877
- [10] Deveraux Q L, Roy N, Stennicke H R, *et al*. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, 1998, **17**(8): 2215-2223
- [11] Srinivasula S M, Hegde R, Saleh A, *et al*. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 2001, **410**(6824): 112-116
- [12] Heo K, Cho Y J, Cho K J, *et al*. Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. *Neurosci Lett*, 2006, **398**(3): 195-200
- [13] Schindler C K, Pearson E G, Bonner H P, *et al*. Caspase-3 cleavage and nuclear localization of caspase-activated DNase in human temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, **24**(5): 1023-1028
- [14] Henshall D C, Simon R P. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, **25**(12): 1557-1572
- [15] Ruth A C, Roninson I B. Effects of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer Res*, 2000, **60**(10): 2576-2578

Antisense Oligonucleotides of XIAP Reverse Resistance to Phenytoin and Carbamazepine in K562 Cells and Rats of Intractable Epilepsy*

CHEN Ying-Hui¹⁾, WANG Nai-Dong²⁾, ZU Heng-Bing¹⁾, HONG Zhen^{3)**}

¹⁾ Department of Neurology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540;

²⁾ The Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003;

³⁾ Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract There is accumulating evidence that apoptosis plays a key role in genesis of epilepsy, but the relationship between apoptosis and drug resistance in medically intractable epilepsy is not clear. The effect of XIAP antisense oligonucleotides on drug resistance in K562/Dox cells and rats of intractable epilepsy was investigated. The multidrug resistance cell line K562/Dox was established, and the expression of XIAP in K562/Dox cells and normal K562 cells was observed. After XIAP antisense oligonucleotides was transiently transfected into K562/Dox cells, mitochondrial membrane potential was assessed using JC-1. At the same time, antiepileptic drugs resistant in K562/Dox cells was measured by MTT. In addition, the model of intractable epilepsy was established by kindling of amygdale in rats. After XIAP antisense oligonucleotides was applied to PHT-CBZ resistant rats by lateral ventricle, after discharge threshold(ADT) and after discharge duration(ADD) was observed. The results showed that the expression of XIAP was significantly increased in K562/Dox cells compared with K562 cells. After XIAP antisense oligonucleotides was transiently transfected into K562/Dox cells, the expression of XIAP was regulated down, and mitochondrial membrane potential of K562/Dox cells was decreased. Moreover, XIAP down-regulation could increase the sensitivity of K562/Dox cells to antiepileptic drugs. The level of IC_{50} was decreased significantly in K562/Dox cells, and the reversal index were 1.76 and 1.73, respectively. Furthermore, animal studies found that, compared with control group, ADT was significantly higher ($P < 0.05$) and ADD shortened in PHT-CBZ resistant rats after XIAP antisense oligonucleotides was applied. It is obvious that the expression of XIAP was significantly increased in drug resistant K562/Dox cells. Down-regulation of XIAP could reverse the drug-resistance of K562/Dox cells, and improve the electrophysiological activity in PHT-CBZ resistant rats. These findings indicate that XIAP is involved in multidrug resistance in medically intractable epilepsy.

Key words X-linked inhibitor of apoptosis protein, drug resistance, apoptosis, antisense oligonucleotides, intractable epilepsy

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00709

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Shanghai (09ZR1405500), The Research Projects of Shanghai Municipal Health Bureau (2008-08) and The Open Funds of Institutes of Biomedical Sciences Fudan University (2007).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-62489999, E-mail: zhong@shmu.edu.cn

Received: November 30, 2009 Accepted: January 25, 2010