

小檗胺对多药耐药 K562/Adr 细胞作用的研究

董庆华 郑 树 徐荣臻 吕庆华 何立明

摘要 目的 研究小檗胺诱导人白血病 K562/Adr 细胞凋亡及逆转多药耐药的作用及机理。方法 采用 MTT 法测 IC_{50} 值,流式细胞仪 Annexin V FITC-PI 法检测细胞凋亡发生率,PI 染色法检测凋亡峰及细胞周期,同时以 FCM 检测 Caspase-3、P-GP 蛋白表达及细胞内药物积聚能力,RT-PCR 法检测 *mdr-1* 基因表达。结果 小檗胺能抑制人白血病 K562/Adr 细胞生长且呈剂量依赖关系,并能诱导细胞凋亡,使 Caspase-3 蛋白表达及细胞药物外排能力增加,同时降低 *mdr-1* 基因 mRNA 和蛋白表达水平。结论 小檗胺能激活 Caspase-3 以诱导人白血病 K562/Adr 细胞凋亡,同时能通过降低 *mdr-1* 表达逆转多药耐药。

关键词 小檗胺;凋亡;多药耐药

Study on Effect of Berbamine on Multidrug Resistance Leukemia K562/Adr Cells DONG Qing-hua, ZHENG Shu, XU Rong-zhen, et al *Cancer Institute, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou (310009)*

Objective To study the effect and mechanism of berbamine on the apoptosis of multidrug resistant leukemia K562/Adr cells and in reversing the drug resistance. **Methods** IC_{50} value of K562/Adr cell was determined with MTT method, cell apoptosis rate was analyzed by flow cytometry with Annexin V FITC-PI assay, with the peak and cell cycle detected by PI staining. At the same time, flow cytometry was also used in determining Caspase-3, P-GP protein expression and drug accumulating capacity in cells, and RT-PCR method was used to analyze the gene expression of *mdr-1*. **Results** Berbamine could inhibit human leukemia K562/Adr cell growth in dose-dependent manner, it could also induce cell apoptosis, increase the protein expression of Caspase-3 and the drug excretion capacity of cells, reduce the mRNA and protein expression levels of *mdr-1* gene. **Conclusion** Berbamine could activate Caspase-3 to induce human leukemia K562/Adr cell apoptosis, and by reducing *mdr-1* gene expression to reverse its multidrug resistance.

Key words berbamine; apoptosis; multidrug resistance

小檗胺是一种双苄基异喹啉生物碱类化合物,具有抗氧化、免疫抑制、升高白细胞等多种临床作用^[1,2],细胞学研究多集中于小檗胺对细胞内游离钙浓度的作用上^[3,4],有少量研究其对肿瘤细胞的增殖抑制作用及逆转多药耐药作用^[5,6],但其作用机理仍不甚清楚。本实验观察小檗胺对人白血病 K562/Adr 细胞凋亡诱导、逆转多药耐药作用并对其作用机理进行探讨。

材料与方法

1 药物及试剂 高纯度小檗胺为辽宁抚顺制药厂化学合成产品(分子式为 $C_{37}H_{40}N_2O_6$, 分子量为 609),MTT、Rhodamine 123 及碘化丙啶(PI)为 Sigma

公司产品,RPMI 1640 为美国 Hyclone 公司产品,Annexin V FITC-PI 试剂为法国 Immunotech 公司产品,Cytoperm-cytofix 试剂盒、Caspase-3-PE、P-GP-PE 及同型阴性对照鼠 IgG-PE 为美国 Pharmingen 公司产品。

2 细胞系及培养 K562/Adr 细胞由本所自建,于 10% 小牛血清、5% CO_2 、37℃ 孵箱中常规培养。

3 主要仪器 Wallac 酶标仪;BD FACSCan 流式细胞仪;PE 公司 2400PCR 仪。

4 IC_{50} 值测定 采用 MTT 法。对数生长期细胞接种于 96 孔培养板内,6 复孔。每孔 3×10^4 /ml 细胞,加入不同浓度的小檗胺,总体积 200 μ l,培养 48h 后,每孔加入 1mg/ml MTT 工作液 50 μ l,37℃ 放置 4h,离心 2 000r/min,5min,弃上清,每孔加入 150 μ l DMSO,震荡溶解结晶,在 570nm 波长比色,求出半数抑制浓度 IC_{50} 。正常对照采用健康人外周血 Ficol 分离液分离的单个核血细胞。

5 细胞凋亡检测 1×10^5 /ml 细胞悬液 1ml 用

基金项目 浙江省科技厅资助课题(No. 021108218-4),浙江省中医药管理局资助课题(No. 2002Y006)

作者单位 浙江大学附属第二医院肿瘤研究所(杭州 310009)

通讯作者 郑 树, Tel 0571-87027427, Fax 0571-87214404,

E-mail zhengshu@zju.edu.cn

万方数据

PBS 洗 2 次后,加入缓冲液 490 μ l、Annexin-V 5 μ l 和碘化丙锭 (PI) 5 μ l,暗处冰上反应 10min,上机检测,CellQuest 软件分析。另取 2×10^6 细胞,70% 冰乙醇固定,24h 后 PBS 洗 2 次,加入 200 μ l RNase A (1mg/ml),37 $^{\circ}$ C 水浴 30min,再加 PI 染色液避光反应 30min,上机检测,MultiCycle 软件分析细胞周期和亚二倍体峰。

6 Caspase-3 表达流式检测 取 2×10^6 细胞用 PBS 洗 2 次,按试剂盒说明书破膜固定后 Caspase-3-PE 染色 20min,同时用鼠 IgG1-PE 设立阴性同型对照。PBS 洗后上机检测。CellQuest 软件分析。

7 P-GP 表达流式检测 取 2×10^6 细胞用 PBS 洗 2 次,P-GP-PE 染色 20min,同时设立鼠 IgG1-PE 阴性同型对照和 K562 敏感株细胞对照。PBS 洗后上机检测。CellQuest 软件分析。

8 细胞 MDR-1 表达检测 采用 RT-PCR 法,用 Trizol 提取细胞 RNA,mdr-1 基因上游引物为 5'-CCCAGCATTGCAATAGCAGG-3',下游引物为 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTCA-3',扩增片段大小为 156bp, β -actin 上游引物为 5'-TTCCAGCCTTC-CTTCCTGGG-3',下游引物为 5'-TTGCGCTCAGGAG-GAGCAAT-3',扩增片段为 223bp,逆转录后 PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min,95 $^{\circ}$ C 30s;60 $^{\circ}$ C 45s;72 $^{\circ}$ C 45s;72 $^{\circ}$ C 5min 共 29 个循环,1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

9 细胞内药物积聚实验 细胞制成 2×10^6 /ml 悬液,加入终浓度 5 μ g/ml 的 Rhodamine123,37 $^{\circ}$ C 保温 30min,细胞洗 2 次后,37 $^{\circ}$ C 再保温 10min,细胞洗 1 次后立即上机检测细胞荧光强度。

结 果

1 小檗胺细胞毒作用 见图 1。小檗胺能明显抑制 K562/Adr 细胞生长,且有剂量依赖关系。随着药物作用浓度从 5 μ g/ml 增加到 75 μ g/ml,细胞生长抑制率由 3.4% 增加到 81.9%,在此作用浓度范围内小檗胺对健康人外周血淋巴细胞无明显细胞毒作用。小檗胺作用 48h K562/Adr 细胞 IC₅₀ 值为 (21.9 $\pm$ 0.5) μ g/ml。

2 细胞凋亡 正常 K562/Adr 细胞自发凋亡率低,约 9.5%。小檗胺 10 μ g/ml 作用 2 天后,凋亡发生率略有升高,为 12.6%;20 μ g/ml 作用 2 天后,凋亡发生率升高为 63.1%。

3 细胞周期变化 正常 K562/Adr 细胞 G₀/G₁ 期细胞百分率为 36.0%,S 期细胞百分率为 44.2%,G₂/M 期细胞百分率为 19.8%;小檗胺 10 μ g/ml 作用

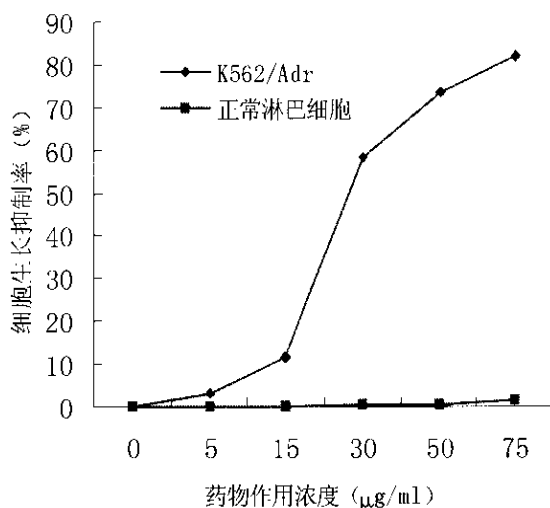


图 1 不同浓度小檗胺对 K562/Adr 细胞和正常淋巴细胞的生长抑制作用

48h 后各期细胞百分率变化不大,但是出现凋亡峰,比率为 5.3%;小檗胺 20 μ g/ml 作用后 S 期细胞百分率明显降低为 30.7%,同时 G₂/M 期细胞百分率增高为 28.9%,凋亡峰比率增高为 20.5% (图略)。

4 Caspase-3 蛋白表达变化 正常 K562/Adr 细胞 Caspase-3 蛋白表达量为 1.25%,加小檗胺 10 μ g/ml 作用 48h 后,表达量增高为 6.14%;20 μ g/ml 作用后表达量增高为 16.70%。

5 P-GP 蛋白表达变化和细胞内药物积聚变化 见图 2。正常 K562 敏感株细胞 P-GP 蛋白表达荧光值为 31.23, K562/Adr 细胞 P-GP 蛋白荧光表达值为 139.20,加小檗胺 10 μ g/ml 作用 48h 后,荧光表达值降低为 103.97,20 μ g/ml 作用后荧光表达值进一步降低为 70.20。正常 K562 敏感株细胞内 Rhodamine 123 荧光表达值为 203.41, K562/Adr 细胞内荧光表达值

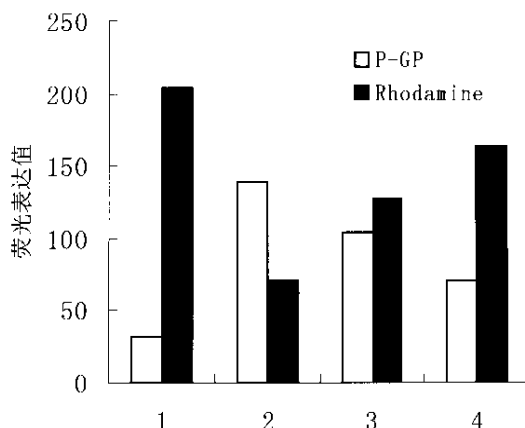


图 2 不同浓度小檗胺对 K562/Adr 细胞 P-GP 表达和细胞内药物积聚作用

注: 1: K562 敏感株细胞对照; 2, 3, 4: K562/Adr 用 0、10、20 μ g/ml 作用 48h

为 70.54, 加小檗胺 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h 后, 细胞内 Rhodamine 123 荧光表达值增高为 126.64, $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用后荧光表达值进一步增高为 162.74。

6 *mdr-1* 基因表达变化 见图 3。RP-PCR 结果表明, K562/Adr 细胞 *mdr-1* 基因 mRNA 表达水平随着小檗胺药物浓度的增加而降低。



图 3 不同浓度小檗胺作用 48h 对 K562/Adr 细胞 *mdr-1* 表达影响

注: 1-4 为 β -actin; 5-8 为 *mdr-1*; 5: K562 对照; 2, 6: 小檗胺 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h; 3, 7: 小檗胺 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h; 4, 8: 小檗胺 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h

讨 论

小檗胺于 1980 年左右作为一种升高白细胞的药物进行研究, 早期研究主要集中在对机体免疫功能的影响及其临床疗效上, 后来研究发现小檗胺具有抗肿瘤、抗氧化作用^[1], 是一种钙调蛋白拮抗剂^[2,3]。

小檗胺抗肿瘤作用主要表现在抑制肿瘤细胞增殖, 而且此方面的研究很少, 其作用机理不明^[5]。我们研究发现, 小檗胺能以剂量依赖关系抑制人白血病 K562/Adr 细胞的增殖, 同时增加细胞凋亡率, 使细胞 S 期比率明显降低, G_2/M 期细胞增高, 表明小檗胺对 K562/Adr 细胞增殖抑制作用是通过诱导细胞凋亡, 使细胞增殖阻滞于 G_2/M 期。研究表明随着小檗胺作用浓度增加, 活化 Caspase-3 蛋白表达增加, 提示小檗胺能激活 Caspase 酶系来诱导细胞凋亡。

有研究表明, 小檗胺逆转多药耐药性的作用与维拉帕米 (VRP) 相仿, 如对 MCF-7/Adr 细胞有明显增敏作用, 且作用呈剂量依赖关系^[4]。此外, 小檗胺能增加多药耐药细胞内药物积聚^[6]。但小檗胺逆转多药耐药性的作用机理未见报道。我们研究证实小檗胺能增加 K562/Adr 细胞内 Rhodamine 123 的积聚, 同时用 RT-PCR 方法证明小檗胺可降低 *mdr-1* 的 mRNA 表达, 流

式细胞检测亦表明小檗胺降低 P-GP 蛋白表达, 这些作用均呈剂量依赖关系。多药耐药 *mdr-1* 基因蛋白表达产物 P-GP 是一种 170KD 大小的膜蛋白, 能将抗肿瘤药泵出细胞外, 造成细胞内药物浓度降低, 细胞毒作用降低或完全消失, 细胞产生耐药^[7]。研究结果提示小檗胺逆转多药耐药性的作用是通过降低 *mdr-1* 表达来实现的。

小檗胺 $75\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h 对正常人淋巴细胞没有明显毒性, 而且能诱导白血细胞凋亡, 逆转多药耐药性, 可能是一种有前途的治疗白血病的药物。

参 考 文 献

- 1 句还松, 韩哲武. 小檗胺的抗氧化作用. 中国药理学报 1990; 11(6): 539—541.
Ju HS, Han ZW. Antioxidant effect of berberine. Acta Pharmacol Sin 1990; 11(6): 539—541.
- 2 李柏岩, 付兵, 赵艳玲, 等. 小檗胺对培养的 Hela 细胞内游离钙浓度的作用. 中国药理学报 1999; 20(11): 1011—1014.
Li BY, Fu B, Zhao YL, et al. Effects of berberine on intracellular calcium concentration in cultured Hela cells. Acta Pharmacol Sin 1999; 20(11): 1011—1014.
- 3 李柏岩, 乔国芬, 赵艳玲, 等. 小檗胺对 ATP 诱导的培养平滑肌及心肌细胞内游离钙动员的影响. 中国药理学报 1999; 20(8): 705—708.
Li BY, Qiao GF, Zhao YL, et al. Effects of berberine on ATP-induced $[Ca^{2+}]$ mobilization in cultured vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes. Acta Pharmacol Sin 1999; 20(8): 705—708.
- 4 田晖, 潘启超. 对苯基异喹啉类生物碱粉防己碱与小檗胺逆转多药耐药性的比较研究. 药学学报 1997; 32(4): 245—250.
Tian H, Pan QC. A comparative study on effect of two bisbenzylisoquinolines, tetrandrine and berberine, on reversal of multidrug resistance. Acta Pharm Sin 1997; 32(4): 245—250.
- 5 朱希伟. 小檗胺抗肿瘤作用的实验研究. 中西医结合杂志 1986; 10(10): 611—613.
Zhu XW. Experimental study on the anti-tumor action of berberine in mice. 1986; 10(10): 611—613.
- 6 何玲, 刘国卿. 多种中草药单体对脑微血管内皮细胞内罗丹明 123 积累的影响. 中国药理学报 2002; 23(7): 591—596.
He L, Liu GQ. Effects of various principles from Chinese herbal medicine on rhodamine 123 accumulation in brain capillary endothelial cells. Acta Pharmacol Sin 2002; 23(7): 591—596.
- 7 Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Ann Rev Biochem 1989; 58: 137—171.

(收稿 2003-03-18 修回 2004-06-16)