

复方浙贝药物血清影响 K562/A02 细胞积聚 外排功能和细胞凋亡研究

郑 智 李冬云 陈信义

摘要 目的 观察复方浙贝药物血清对 K562/A02 细胞积聚外排功能和细胞凋亡的影响。方法 Wistar 雄性大鼠 40 只,分为空白对照组(血清组)、含阿霉素(ADR)血清组及含复方浙贝颗粒高[8 g/(kg·d)]、中[4 g/(kg·d)]、低[2 g/(kg·d)]剂量血清组。用流式细胞仪定量检测不同时间药物血清干预后的 K562/A02 细胞内 ADR 和罗丹明 123(Rh123)浓度;Annexin-V/PI 双染法检测 K562/A02 细胞早期凋亡率。结果 复方浙贝药物血清不同剂量组均能减缓 K562/A02 细胞内 ADR 和 Rh123 荧光下降速度,其中高剂量组作用最明显,中剂量组次之,低剂量组较弱;K562/A02 细胞早期凋亡率依次为:中剂量组 24.60%、高剂量组 11.21%、低剂量组 5.71%、空白组 1.40%。结论 复方浙贝颗粒体外能够抑制 K562/A02 细胞对药物的外排功能,并能够诱导细胞凋亡。

关键词 复方浙贝颗粒;多药耐药;K562/A02 细胞;凋亡

Study on the Compound Fritillaria thunbergii Miq Particles to the Subcellular Accumulation Ability and Inducing Apoptosis of K562/A02 Cells ZHENG Zhi, LI Dong-yun, and CHEN Xin-yi *Oncology and Hematology Department of Dongzhimeng Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100700)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of the Compound Fritillaria thunbergii Miq Particles (CFMP) to the sub-cellular accumulation ability and inducing the apoptosis of K562/A02 cells, explore the mechanism of the CFMP reserve the multi-drug resistance of K562/A02 cells. **Methods** Forty Wistar male rats were divided into the blank-serum group, the adriamycin (ADR) containing serum group, the CFMP high dose [8 g/(kg·d)] group, the CFMP medium dose [4 g/(kg·d)] and the CFMP low dose [2 g/(kg·d)] group. The effects of different time of drug contained serum on sub-cellular accumulation of ADR and Rh123 were quantitative detected by flow cytometry. Cells apoptosis induced by different concentrations of CFMP contained serum were detected by flow cytometry with Annexin-V/PI staining method. **Results** Different concentrations of CFMP contained serum can inhibit the descend trend of the ADR and Rh123 fluorescence accumulation curve of K562/A02 cells with dose-dependence. The high-dose group showed superior inhibition than the other. Annexin-V/PI staining method exhibited that the rate of apoptosis of K562/A02 cells in blank-serum group was 1.40%. Different concentrations of CFMP contained serum induced the apoptosis of K562/A02 cells showed a dose-dependent manner, that is medium dose group presented 24.60% apoptosis, high dose group presented 11.21% apoptosis, and low dose group presented 5.71% apoptosis. **Conclusion** CFMP can inhibit the descend trend of the ADR and Rh123 fluorescence accumulation curve of K562/A02 cells, induce the apoptosis of K562/A02 cells to achieve the reverse intention of multi-drug resistance.

KEYWORDS compound Fritillaria thunbergii Miq Particles; multi-drug resistance; K562/A02 cells; apoptosis

前期临床研究已经证实^[1],在难治性(耐药性)急性白血病化疗期使用复方浙贝颗粒饮片能够提高临床缓解率。为探讨其效应机制,我们选择以阿霉素

(ADR)诱导的人红白血病耐药细胞系 K562/A02 为研究对象,采用血清药理学的方法,观察了复方浙贝含药血清对 K562/A02 细胞积聚外排功能和细胞凋亡影响。

材料与方 法

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 30672691)

作者单位:北京中医药大学东直门医院肿瘤血液科(北京 100700)

通讯作者:陈信义, Tel:010-84013127, E-mail: chenxinyi0729@so-

hu.com

1 材料

1.1 细胞株及动物 人红白血病耐药细胞系(K562/A02)购于中国医学科学院血液学研究所;Wistar

大鼠,雄性,体重(250±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2007-0001;饲养条件为温度 22~23℃,湿度 50%~55%。

1.2 仪器与试剂 全自动酶标仪 450, Bio-Rad; CO₂ 培养箱 BB5060, Heraeus; 流式细胞仪(FACS) Calibur E4242, Bio-Rad; RPMI 1640 培养基, GIBCO 产品; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司产品; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均为 Sigma 产品。盐酸阿霉素(ADR), 深圳万乐药业有限公司产品; 复方浙贝颗粒(浙贝母、汉防己、川芎)由北京康仁堂药业有限公司制备并提供; Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(Centre-bio), 购自北京创根胜泰生物科技有限公司。

2 方法

2.1 药物血清制备 Wistar 雄性大鼠 40 只, 按体重随机分为 5 组, 每组 8 只, 即空白对照组(血清组)、含 ADR 血清组和复方浙贝颗粒高、中、低剂量含药血清组。实验前大鼠禁食不禁水 12 h, 复方浙贝颗粒高、中、低剂量组分别按 8 g/(kg·d)、4 g/(kg·d)、2 g/(kg·d)、剂量分别相当成人临床给药剂量的 14 倍、7 倍和 3.5 倍), 0.1 mL/10 g 生理盐水稀释灌胃, 对照组给予 0.1 mL/10 g 生理盐水灌胃, 每天 2 次, 连灌 1 周。ADR 血清组按 2 mg/kg 剂量, 0.1 mL/10 g 腹腔注射, 隔日 1 次, 连续 1 周。于末次灌胃后 1 h 在无菌条件下自腹主动脉采血, 4℃下静置过夜, 3 500 r/min 离心 30 min, 分离血清, 将同组血清混匀, 0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤, 56℃灭活 30 min, 置 -20℃冰箱保存备用。

2.2 细胞培养 K562 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37℃、含 5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱内培养, 2~3 天换液 1 次; 将 K562/A02 细胞置于含 ADR 10 μg/mL, 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 以维持其耐药性, 余条件同上, 实验检测前 1 周停用 ADR。

2.3 积聚外排实验 将对数生长期的 5×10⁵/mL K562/A02 细胞分成 4 组与 ADR (4 mg/L) 37℃, 摇床温育 120 min, 用 PBS 洗 2 次, 然后分别加入高、中、低剂量含药血清和空白血清孵育 15 min 后,

经过 0、15、30、60 及 120 min 时点, 收集细胞, 用流式细胞仪(FCM)测定细胞内 ADR 荧光强度(激发波长 488 nm, 发射波长 575 nm), 以 ADR 相对荧光强度表示 ADR 浓度, 根据不同时间的荧光强度变化绘制曲线。Rh123 检测同上法。

2.4 细胞凋亡检测 将对数生长期的 1×10⁶/mL K562/A02 细胞分成 4 组, 分别加入高、中、低剂量复方浙贝颗粒含药血清和空白血清, 培养 96 h 后, 通过 FCM 对其进行凋亡测试: 采用 Annexin-V/PI 双染法, 收集细胞, 每组 1×10⁶, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。用 PBS 洗 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min。用 200 μL 的 1×孵育缓冲液(Binding buffer)重悬细胞。分别加入 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啉(propidium iodide), 4℃下孵育 25~30 min, 避光并振动。加入 300 μL 孵育缓冲液重悬细胞, 上 FACS 检测。

2.5 统计学方法 各分组所得计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 软件处理数据, 采用 ANOVA 方差分析。

结 果

1 各组不同时间段 K562/A02 细胞内 ADR 荧光强度比较(表 1) 在相同条件下经 ADR 作用后, 复方浙贝颗粒各剂量组的 K562/A02 细胞内 ADR 的荧光强度均高于空白对照组, 并显示复方浙贝颗粒能减缓 K562/A02 细胞内 ADR 荧光强度下降的速度。其中, 在 30、60、120 min 时间点高、中剂量组与空白对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2 各组不同时间段 Rh123 荧光强度比较(表 2) 在相同条件下经 Rh123 作用后, 复方浙贝颗粒各剂量组的 K562/A02 细胞内 Rh123 的荧光强度均高于空白对照组, 并显示复方浙贝颗粒能减缓 K562/A02 细胞内 Rh123 荧光强度下降的速度; 其中, 高、中剂量明显($P < 0.001$), 低剂量组次之($P < 0.01$)。

3 各组 K562/A02 细胞早期凋亡率比较 空白对照组的早期凋亡率为 1.40%, 复方浙贝颗粒高剂量组早期凋亡率为 11.21%, 中剂量组早期凋亡率最高为 24.60%, 低剂量组早期凋亡率为 5.71%。

表 1 各组不同时间段 K562/A02 细胞内 ADR 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	K562/A02 细胞内 ADR 荧光强度				
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
空白对照	3	18.98±0.96	16.28±1.37	13.77±0.78	10.32±0.84	10.42±0.40
复方浙贝颗粒高剂量	3	24.75±1.30*	20.27±0.69*	16.42±1.01*	14.58±0.68*	14.10±0.17*
中剂量	3	23.99±1.21	19.61±1.16	16.26±0.81*	14.03±0.55*	13.10±0.29*
低剂量	3	20.88±1.00	17.15±1.62	14.72±1.19	11.17±1.00	10.75±0.38

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$

表 2 各组不同时间段 K562/A02 细胞内 Rh123 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Rh123 荧光强度				
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
空白对照	3	2.84 ± 0.63	1.80 ± 1.14	1.72 ± 1.25	1.71 ± 0.59	1.79 ± 0.49
复方浙贝颗粒高剂量	3	7.93 ± 0.57**	6.17 ± 0.67**	5.39 ± 0.36**	5.60 ± 0.86**	4.79 ± 0.89**
中剂量	3	6.43 ± 0.84**	5.02 ± 0.63**	5.21 ± 0.69**	4.45 ± 0.45**	4.90 ± 0.62**
低剂量	3	2.36 ± 0.93	2.28 ± 0.52	2.42 ± 0.53*	2.30 ± 0.47*	2.05 ± 0.50*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$

讨 论

白血病细胞多药耐药 (MDR) 的产生严重影响了化疗效果,是化疗失败的主要原因^[2]。国内外迄今为止还没有一种安全、有效的多药耐药逆转剂用于临床。复方浙贝颗粒由浙贝母、汉防己、川芎组成,在体外实验中也证实从浙贝母、汉防己、川芎中提取的有效成分能够增加白血病细胞内抗癌药物浓度,下调多药耐药相关蛋白基因及与耐药相关的细胞膜转运蛋白 P 糖蛋白 (Pgp) 高表达^[3,4]。临床表明,复方浙贝颗粒能有效逆转白血病多药耐药,且能降低抗癌药物特有的不良反应^[5]。因此,本实验选用 Pgp 高表达的耐阿霉素人红白血病耐药细胞系 (K562/A02, 耐药倍数 110 倍) 为研究对象,采用复方浙贝母颗粒含药血清体外培养细胞,以影响多药耐药细胞积聚外排功能和诱导凋亡为作用靶点,通过流式细胞术研究复方浙贝母颗粒逆转多药耐药的机制。

本结果发现,复方浙贝母含药血清能明显增强白血病多药耐药 K562/A02 细胞内 ADR 和 Rh123 荧光含量,能减缓 K562/A02 细胞内 ADR 和 Rh123 荧光含量下降速度。说明复方浙贝颗粒含药血清可增加 K562/A02 细胞内的药物浓度,减少药物外排,实现其逆转 K562/A02 细胞耐药的作用。并且在两种荧光药物中,Rh123 是多药耐药蛋白 Pgp 特异性作用底物,而 ADR 则能嵌入细胞 DNA,主要分布于细胞核,在细胞质中也有分布,所以在 K562/A02 细胞内这两种药物的荧光强度不同,其转运方式也不尽相同。因此,本实验也证明复方浙贝颗粒含药血清不仅能通过抑制 Pgp 功能,而且可能通过其他途径逆转多药耐药。

现代研究表明,肿瘤多药耐药细胞不但具有药物外排泵作用,并且具有抗凋亡作用,这种抗凋亡作用也是导致多药耐药的重要原因^[6-8]。细胞凋亡是一种受基因控制的程序性细胞死亡过程,分启动、效应及降解 3 个阶段,而每个阶段又是包含若干分子事件参与的多个过程。在本实验中,经 Annexin V/PI 双染法检测发现,复方浙贝颗粒含药血清能明显诱导 K562/A02 细胞凋亡,揭示了复方浙贝颗粒可通过诱导白血病细

胞凋亡而实现其逆转白血病多药耐药作用。复方浙贝颗粒是否能通过其他机制逆转多药耐药,其在体内的作用机制如何仍有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 李冬云,叶需智,田劭丹,等. 浙贝及其配方颗粒治疗难治性急性白血病临床疗效观察[J]. 中医药学刊, 2006,24(8):1449-1450.

Li DY, Ye PZ, Tian SD, et al. Clinical observation of Zhejiang fritillaria bulb and fomula granule in the refractory leukemia[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2006,24(8):1449-1450.

[2] Hirose M, Hosoi E, Hamano S, et al. Multidrug resistance in hematological malignancy[J]. Med Invest, 2003,50(3-4):126-135.

[3] 李冬云,陈信义,刘瑞娟. 单味中药成分逆转白血病多药耐药基础研究评述[J]. 中国中医药信息杂志, 2004,11(11):951-953.

Li DY, Chen XY, Liu RJ. Review on basic study of reversing multidrug resistance with composition of single Chinese drug in leukemia[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2004,11(11):951-953.

[4] 李峨,陈信义,王书芝. 九种中药活性成分抗耐药肿瘤细胞体外研究[J]. 北京中医药大学学报, 2004,27(2):24-26.

Li E, Chen XY, Wang YZ. In vitro research on the effects against drug-resistant tumor cells of nine active components of traditional Chinese drugs[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2004,27(2):24-26.

[5] 李冬云,田劭丹,叶需智,等. 复方浙贝颗粒辅助化疗提高难治性急性白血病临床疗效研究[J]. 北京中医, 2007,26(2):72-74.

Li DY, Tian SD, Ye PZ, et al. A clinical study on improving the treatment of refractory AL by taking the complex granule of Zhejiang fritillaria bulb and receiving adjuvant chemotherapy[J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2007,26(2):72-74.

[6] Johnstone RW, Ruefli AA, Tainton KM. A role for P-glycoprotein in regulating cell death[J]. Leuk Lym Phoma, 2000,38(1-2):1-11.

[7] Gyorgy Hasko, Edwin A, Deitch, et al. Inhibitors of ATP-binding cassette transporters suppress interleukin-12 p40 production and major histocompatibility complex II up-regulation in macrophages[J]. Pharmacology, 2002,301(1):103-110.

[8] Lo MY, Kim HT. Chondrocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide requires caspase activation but not mitochondrial pore transition[J]. J Orthop Res, 2004, 22(5): 1120-1125.

(收稿:2008-10-20 修回:2009-07-06)