

岩舒注射液克服人乳腺癌 MCF-7 细胞多药耐药性的实验研究

李海燕¹ 陈 阳² 何琪杨²

摘要 目的 观察岩舒注射液能否克服人乳腺癌 MCF-7 细胞的多药耐药性。**方法** 使用人乳腺癌 MCF-7 和耐多柔比星的 MCF-7/DOX 细胞进行实验。采用 MTT 法检测岩舒注射液对细胞增殖的影响,流式细胞术检测岩舒注射液处理后细胞内多柔比星的荧光强度变化,免疫印迹方法检测岩舒注射液处理后凋亡相关蛋白和 P-糖蛋白的表达变化。**结果** 岩舒注射液处理耐药和敏感细胞的抑制率相近,没有明显的交叉耐药性($P > 0.05$)。原药 1/16 浓度的岩舒注射液能明显地引起两种细胞凋亡。5 nmol/L 多柔比星和 1/256、1/128 浓度的岩舒注射液合用处理 MCF-7/DOX 耐药细胞,细胞的存活率分别从 86.8% 降低至 74.6% ($P < 0.05$) 和 71.6% ($P < 0.01$),具有明显的增效作用。此外,岩舒注射液还能增加多柔比星在耐药细胞内的积聚。免疫印迹检测显示:岩舒注射液处理使耐药细胞 P-糖蛋白表达水平下降。**结论** 岩舒注射液能够克服人乳腺癌 MCF-7 细胞的多药耐药性,其机制是降低 P-糖蛋白的表达。

关键词 多药耐药性;岩舒注射液;抗肿瘤作用;多柔比星;中药药理

Mechanisms of Yanshu Injection for Overcoming Multidrug Resistance in Breast Carcinoma MCF-7 Cells: an Experimental Research LI Hai-yan¹, CHEN Yang², and HE Qi-yang² 1 East District, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (101100), China; 2 Institute of Medicinal Biotechnology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing (100050), China

ABSTRACT Objective To investigate the mechanism of Yanshu Injection (YI) for overcoming multidrug resistance in breast carcinoma MCF-7 cells. **Methods** Human breast carcinoma MCF-7 cells and doxorubicin-resistant MCF-7/DOX cells were treated with YI. Its inhibition on the cell proliferation was detected by MTT assay. The fluorescence intensity of doxorubicin was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis related protein and P-glycoprotein were examined by immunoblotting after treated by YI. **Results** The inhibitory action of YI on MCF-7/DOX cells was similar to that of MCF-7 cells, indicating no cross resistance ($P > 0.05$). 1/16 YI could obviously induce the apoptosis of MCF-7 cells and DOX cells. 1/256 YI + 5 nmol/L doxorubicin and 1/128 YI + 5 nmol/L doxorubicin could reduce the survival rate of MCF-7/DOX resistant cells from 86.8% to 74.6% ($P < 0.05$) and 71.6% ($P < 0.01$) respectively, showing obvious synergistic effect. Besides, the accumulation of doxorubicin was increased after treated by YI in the MCF-7/DOX cells. Results of immunoblotting indicated that reduction of P-glycoprotein expression was detected in MCF-7/DOX cells after exposure to YI. **Conclusion** YI could overcome the multidrug resistance in breast carcinoma MCF-7 cells possibly through reducing the expression of P-glycoprotein.

KEYWORDS multidrug resistance; Yanshu Injection; antitumor action; doxorubicin; Chinese medical pharmacology

肿瘤的耐药性是临床化疗的难题,肿瘤除了对传

统的细胞毒药物产生耐药性外,对目前治疗效果良好的抗肿瘤靶向药物,经过 6~12 个月的治疗后也能产生耐药性。对临床常用的细胞毒药物引起的耐药性,如研究最多的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)介导的耐药性,是将抗肿瘤药物外排到细胞外^[1,2]。而抗肿瘤靶向药物的耐药性,原因更为复杂。如针对靶标 BRAF(V600E)的抗肿瘤新药威罗菲尼(vemu-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273553)

作者单位:1.北京中医药大学东直门医院东区(北京 101100);

2.中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所以(北京 100050)

通讯作者:何琪杨, Tel: 010-63131856, E-mail: heqiyang@

imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.03.0324

rafenib),对部分含该突变靶标的结肠癌患者无效。其原因是治疗过程中反馈激活表皮生长因子受体通路引起耐药性^[3]。

针对上述耐药性的困境,除了发展逆转耐药性的单一化学结构的药物外,从多组分作用的中药中发现克服耐药性的药物,也是十分重要的研究方向。笔者在以前的实验中,已经报道了中药紫龙金具有明显的逆转耐药性的作用^[4]。本实验选取岩舒注射液(Yanshu injection, YI)进行研究。YI是由苦参、土茯苓等多味中药组成的复方制剂,已经广泛地应用于临床的抗肿瘤治疗。该中药具有抑制肿瘤细胞增殖、镇痛、使其他肿瘤药物增效减毒、增加机体免疫力、改善造血功能、提高肿瘤患者的生活质量等多种药理作用^[5]。不过,尚未见其影响肿瘤耐药性的报道。为此,本实验利用表达 P-gp 蛋白的人乳腺癌 MCF-7 耐药细胞,观察 YI 对耐药性的影响,为其进一步的临床应用提供实验依据。

材料与方法

1 细胞株及细胞培养 人乳腺癌 MCF-7 敏感细胞和耐 DOX 的 MCF-7/DOX 细胞,引自美国国立癌症研究院。细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,培养条件为 5% CO₂,培养温度为 37 ℃。

2 药物 YI 由苦参、土茯苓等多种药材组成,含苦参总碱 ≥ 18 mg/mL,由山西振东制药有限公司生产,批号为 20120520。多柔比星(doxorubicin, DOX)购自美国 Sigma 公司。

3 试剂及仪器 试剂:噻唑蓝(MTT)、以及二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Sigma 公司。鼠抗 P-gp 蛋白抗体(C219)购自美国 Calbiochem 公司。鼠抗 p53 抗体、兔抗 actin 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。兔抗 PARP-1 抗体、兔抗 caspase-3 抗体、兔抗 cleaved caspase-9 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。1640 培养基购于美国 Invitrogen 公司。胎牛血清购于天津灏海生物制品科技有限责任公司。

仪器:细胞培养箱(日本三洋公司)、倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)、低温离心机(美国 Sigma 公司)、DU800 可见紫外分光光度计(美国 Beckman 公司)、Hoefer TE70X 蛋白转膜系统(美国 Hoefer 公司)、Chemilmager 5500 凝胶成像仪以及微孔板酶标仪(美国 Bio-RAD 公司)BD FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD Bioscience 公司)。

4 方法

4.1 YI 单独或合用对细胞的抑制作用 采用

MTT 法进行,具体参考文献[4]的方法。3×10³ 个/孔细胞接种于 96 孔板,24 h 后,YI 单药实验使用原药稀释倍数为(1/512、1/256、1/128、1/64、1/32、1/16、1/8、1/4)浓度处理细胞 72 h。在合用实验中,1/256、1/128 浓度的 YI 和 5、10 nmol/L DOX 合用处理细胞 72 h。由于本实验采用的 YI 是混合物,不好计算具体的药物浓度,按照原液稀释倍数作为药物浓度进行实验。实验重复 3 次。增殖抑制率(%)=[1-(实验组 OD 值-阴性对照组 OD 值)]/(空白对照组 OD 值-阴性对照组 OD 值)×100%。

4.2 细胞内 DOX 的积聚变化 DOX 经流式细胞仪 488 nm 激光激发后发出的荧光可以在 FL3 通道被检测,利用此特点可以检测细胞内 DOX 的含量,并根据 DOX 含量的变化,判断 YI 逆转细胞多药耐药性的作用。对数生长期的细胞以 3×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,24 h 后加 1/256 或 1/128 浓度的 YI 处理,同时加入终浓度为 5 nmol/L DOX,37 ℃ 继续培养 1 h。PBS 清洗 2 次,消化收集细胞,用无血清培养基重新悬浮细胞,使用流式细胞仪测定 DOX 的荧光强度变化。

4.3 免疫印迹方法 按参考文献[4]的方法进行实验,实验重复 3 次。在检测 YI 引起凋亡信号通路变化的实验中,所用的 YI 浓度为 1/16,检测 PARP-1、caspase-3、caspase-9、p53 的表达变化。在合用对细胞凋亡影响的实验中,10、20 nmol/L 的 DOX 单独处理或与 1/256 浓度的 YI 合用,检测 PARP-1、caspase-3 的表达变化。在 YI 对 MCF-7/DOX 细胞 P-gp 影响的实验中,分别使用 1/256、1/128 浓度的 YI 处理 24、48、72 h,然后检测 P-gp 蛋白的含量变化。

4.4 统计学方法 使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,对细胞抑制作用的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,YI 与 DOX 合用组与单独 DOX 处理组的成活率差异比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。药物协同作用使用 Calcsyn 软件分析,联合指数(CDI) > 1,则药物合用具有拮抗作用,CDI < 1 表明药物合用具有协同作用。

结 果

1 YI 对 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞增殖的影响(图 1) 使用相同浓度梯度的药物处理 MCF-7 敏感细胞和耐药细胞 72 h,MTT 法检测结果表明:MCF-7/DOX 对 YI 没有交叉耐药性。在含有 1/8 浓度的 YI 条件培养下,抑制率分别为(25.54 ± 2.55)% 和(31.61 ± 7.70)%,在 1/64 ~ 1/8 浓度范围内,MCF-

7/DOX 比 MCF-7 细胞对 YI 更为敏感。统计学分析表明, YI 对 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞的增殖抑制作用无统计学意义($P > 0.05$)。

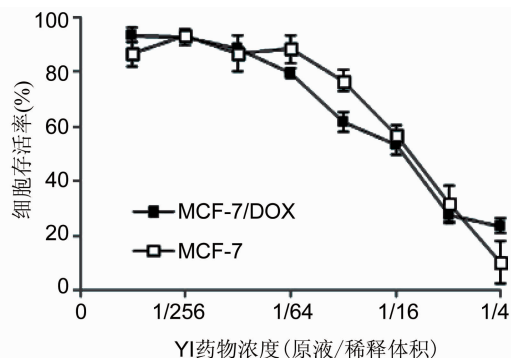
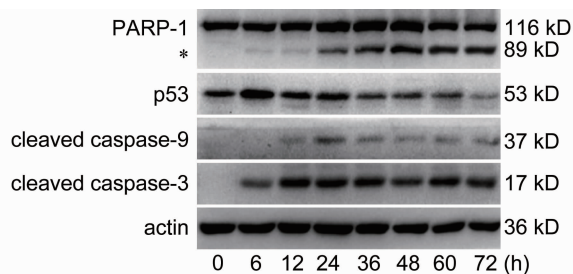


图1 YI 对 MCF-7 和 MCF-7/DOX 耐药细胞增殖的影响

2 YI 诱导 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞的凋亡信号通路(图 2,3) 用 1/16 的 YI 分别处理 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞 72 h, 每 12 h 收集蛋白, 免疫印迹方法检测 YI 作用细胞后凋亡标志分子 PARP-1、caspase-3 和 caspase-9, 以及调控因子 p53 的变化。结果如图 2、3 所示, YI 能够诱导 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞凋亡, 在 6 ~ 12 h 检测到凋亡相关蛋白 caspase-3 和 caspase-9 切割活化, 12 ~ 24 h PARP-1 被明显切割。值得注意的是, YI 引起 MCF-7/DOX 耐药细胞 caspase-9 切割片段比 MCF-7 敏感



注: * 表示细胞凋亡时 PARP-1 蛋白被 caspase-3 切割形成的片段;图 3、5 同

图2 YI 诱导 MCF-7 细胞凋亡信号通路电泳图

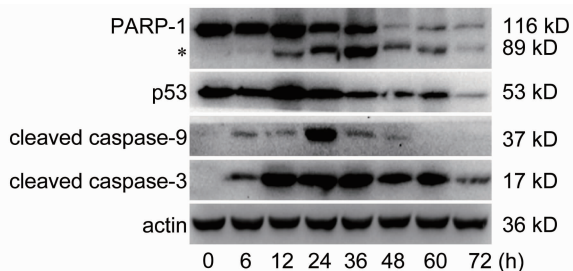
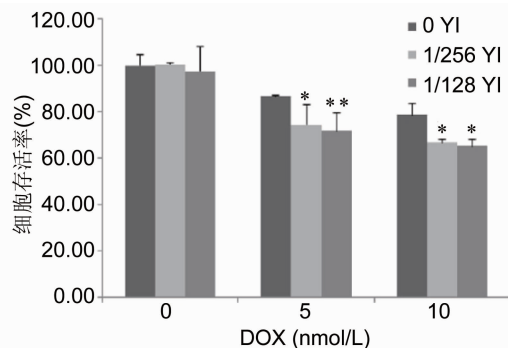


图3 YI 诱导 MCF-7/DOX 耐药细胞凋亡信号通路电泳图

细胞更早, 引起 caspase-3 和 PARP-1 的切割也更显著(图 3), 提示 MCF-7/DOX 比 MCF-7 对 YI 更为敏感。用 YI 处理细胞后 p53 上升并不显著。

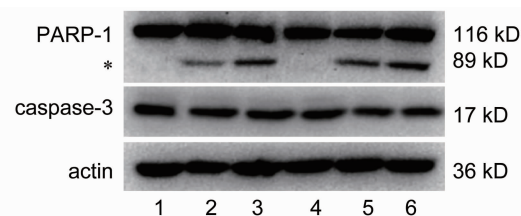
3 YI 与 DOX 对 MCF-7/DOX 耐药细胞增殖的影响(图 4) 1/256 和 1/128 浓度的 YI 单独处理 MCF-7/DOX 耐药细胞, 没有明显的抑制作用(存活率 $> 90\%$)。用上述浓度的 YI 和 5 nmol/L 或 10 nmol/L DOX 合用处理 MCF-7/DOX, 细胞的存活率分别从 86.8% 降低至 74.6% ($P < 0.05$) 和 71.6% ($P < 0.01$), 从 78.6% 降低至 66.9% ($P < 0.05$) 和 65.2% ($P < 0.05$), 药物协同作用 CDI 值均为 0.85。



注: 与 DOX 单药组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 YI 与 DOX 合用对 MCF-7/DOX 耐药细胞增殖的影响

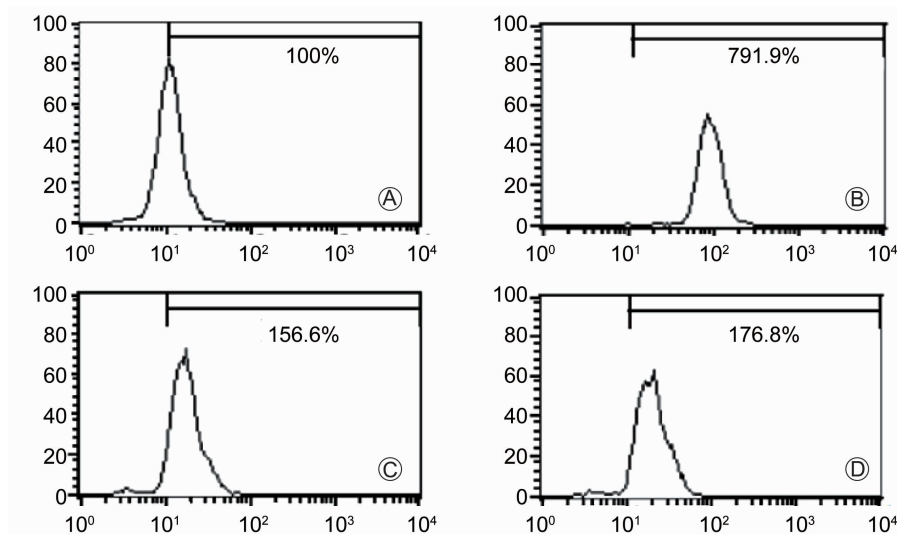
4 YI 与 DOX 合用对 MCF-7/DOX 凋亡的影响(图 5) 用 1/256 YI 与 DOX 合用处理细胞 48 h 后, 免疫印迹法检测凋亡信号通路相关蛋白 PARP-1 和 caspase-3 的切割情况如图 5 所示, 经 YI 与 DOX 合用处理的细胞 PARP-1 的切割比 DOX 单药处理的细胞更显著, caspase-3 也略微下降。



注: 1 为对照组; 2 为 10 nmol/L DOX; 3 为 20 nmol/L DOX; 4 为对照组; 5 为 1/256 YI + 10 nmol/L DOX; 6 为 1/256 YI + 20 nmol/L DOX

图5 YI 与 DOX 合用对 MCF-7/DOX 凋亡的影响

5 YI 处理 MCF-7/DOX 耐药细胞增加细胞内 DOX 含量(图 6) 用 5 nmol/L DOX 处理 MCF-7 敏感细胞和耐药细胞 1 h, 敏感细胞中 DOX 的含量是耐药株细胞(以 100% 计算)的 791.9%, 相差近 8 倍, 表明该

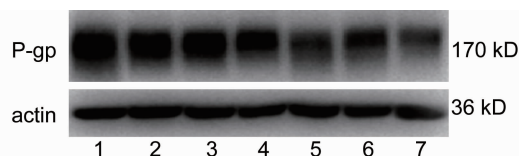


注:A 为 MCF-7/DOX 细胞;B 为 MCF-7 细胞;C 为 1/256 浓度的 YI 处理 MCF-7/DOX 细胞;D 为 1/128 浓度的 YI 处理 MCF-7/DOX 细胞;图中横坐标为细胞内 DOX 的荧光强度(以对数值表示),纵坐标为细胞数(个)

图 6 YI 处理 MCF-7/DOX 耐药细胞增加细胞内 DOX 的含量图

方法能判别耐药性的变化。用 1/256 或 1/128 浓度的 YI 和 5 nmol/L DOX 共同处理耐药细胞 1 h 后,细胞的 DOX 含量分别增加了 56.6% 和 76.8% (以单独 DOX 处理组作为 100% 计算)。

6 YI 对 MCF-7/DOX 细胞中 P-gp 蛋白表达的影响(图 7) 用 1/256、1/128 浓度的 YI 处理 MCF-7/DOX 细胞,免疫印迹法检测 P-gp 蛋白表达随处理时间增加而逐渐降低;具有时间和浓度的相关性,尤其处理 72 h 后表达降低更为明显。



注: 1 为对照组;2 为 1/256 浓度 YI 处理 24 h; 3 为 1/256 浓度 YI 处理 48 h; 4 为 1/256 浓度 YI 处理 72 h; 5 为 1/128 浓度 YI 处理 24 h; 6 为 1/128 浓度 YI 处理 48 h; 7 为 1/128 浓度 YI 处理 72 h

图 7 YI 对 MCF-7/DOX 细胞中 P-gp 蛋白表达电泳图

讨 论

本实验证实了 YI 具有逆转多药耐药性的作用,单独使用对多药耐药细胞没有交叉耐药性,且与 DOX 合用时具有协同作用。进一步的研究观察到 YI 引起 P-gp 表达降低。本研究结果为临床使用 YI 治疗产生耐药性的肿瘤提供了实验依据。

在解决肿瘤耐药性中形成了几种策略:一是逆转策

略,加上一种能特异抑制于外排泵蛋白功能的药物,从而增加抗肿瘤药物的毒性。但由于能起外排泵作用的蛋白多达 40 多种,给研究带来了困难。就 P-gp 蛋白而言,已经报道有大量的药物具有逆转耐药性的作用,但至今还没有出现防治肿瘤耐药性的药物出现,可能与此复杂性有关^[2]。二是克服策略,使用一种没有交叉耐药性的药物治疗出现耐药性的肿瘤。本实验结果表明耐药细胞对 YI 没有交叉耐药性,可以看作是此类策略的应用。

罗丹明 123 是 P-gp 的底物,很多研究作为检测逆转耐药性的指标。在笔者以前对复方中药紫龙金的实验中,就使用了罗丹明 123 进行检测^[4]。在另外的研究中,笔者也观察到单一成分苦参碱能增加罗丹明 123 在耐药细胞中的积聚。但使用 YI 未能观察到积聚变化,直接使用 DOX 才检测到逆转作用,推测该注射液中存在干扰罗丹明 123 的化合物。因此,在评价含有多种成分的中药作用多药耐药性时,建议慎重选择合适的评价指标。

YI 对多种癌细胞如:肝癌 SGC2790、HepG2 和 Bel-7402 细胞,胃癌 SGC-7901 细胞、大肠癌 LoVo 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞均有具有生长抑制和诱导凋亡的作用,其诱导凋亡机制可能与直接杀伤肿瘤细胞、阻滞细胞周期、降低线粒体膜电位有关^[6-8]。临床报道,YI 与其他化疗药物联合应用能够增强疗效、减毒、抑制癌痛、有效改善生活质量,且具有改善恶性胸腔积水和提高人体免疫力的功能^[9,10]。YI 含有多种有效组分,根据目前的结果,除了苦参碱外,推测还存

在其他的具有克服肿瘤细胞多药耐药性,引起细胞凋亡的组分。

目前,国际上发展网络药理学,强调多药标联合作用治疗疾病,提供疗效,降低不良反应,符合中医药的作用特征,显示了中药治疗肿瘤具有重要的理论与实用价值。本实验证明 YI 与细胞毒化疗药物多柔比星具有协同作用,从一个方面说明 YI 组方的合理性。鉴于目前抗肿瘤靶向药物也出现明显的耐药性,根据本实验结果,探讨 YI 与抗肿瘤靶向药物合用治疗肿瘤值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] Sherkhar MP. Drug resistance: challenges to effective therapy [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2011, 11(5): 613-623.
- [2] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 48-58.
- [3] Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR [J]. Nature,

2012, 483(7387): 100-103.

- [4] 邹珊珊,徐榕,何琪杨.复方中药紫龙金克服肿瘤细胞多药耐药性的机制[J].中国中西医结合杂志,2010,30(6):601-606.
- [5] 许进秀,陈泽涛.岩舒注射液治疗肿瘤研究进展[J].中国中医药信息杂志,2006,13(10):94-96.
- [6] 李芮,杜健鹏,侯仰韶,等.复方苦参注射液对 SGC27901、HepG2 和 BEL7402 肿瘤细胞作用的实验研究[J].肿瘤研究与临床,2006,18(1):8-12.
- [7] 许进秀,陈泽涛,王爱蓉,等.岩舒注射液诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制[J].中华肿瘤防治杂志,2007,14(16):1210-1214.
- [8] 康旭,洗沛中,许庆文.复方苦参注射液(岩舒注射液)对大肠癌细胞凋亡的实验研究[J].中国中药杂志,2004,29(9):129-131.
- [9] 游捷,单孟俊,赵慧,等.中西医结合治疗 91 例老年晚期非小细胞肺癌疗效观察[J].中国中西医结合杂志,2012,32(6):774-778.
- [10] 庄海峰,任金贤,周郁鸿.复方苦参注射液联合顺铂胸腔内注射治疗恶性血液病并发胸腔积液 24 例[J].中国新药杂志,2012,21(9):1013-1015.

(收稿:2013-02-01 修回:2013-11-30)

第九届全国中西医结合围手术期医学专题研讨会征文通知

中国中西医结合学会围手术期专业委员会定于 2014 年 5 月 16—18 日在北京市举办“第九届全国中西医结合围手术期医学专题研讨会”,以“中西医结合围手术期的安全管理”为主题,邀请我国相关领域院士、著名专家作专题报告,通过学术探讨和经验交流,回顾围手术期中西医结合医学发展历程,探讨围手术期安全管理的新理论和新发展,推动围手术期中西医结合医学的发展,现征文如下。

征文内容 (1)围手术期中西医结合医学的发展趋势与展望;(2)围手术期快速康复与营养支持的研究进展;(3)围手术期 VTE 的预防及合理抗凝治疗;(4)围手术期麻醉过程的安全管理;(5)中西医结合在临床专科围手术期的研究进展;(6)中西医结合围手术期的其他相关内容。

征文要求 (1)论文内容真实可靠,具备科学性、先进性、实用性。(2)全文 3 000 字以内,需附 400 字左右中文摘要。(3)用 E-mail 传送论文电子版至 zhengxia256@126.com (请注明“中西医结合”字样)。(4)来稿免收审稿费,请务必注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编和联系电话,是否同意参加大会交流。(5)论文截稿日期:2014 年 5 月 1 日。

联系方式 (1)联系人:叶志东,联系电话:13910682488,E-mail: yezhidong@yahoo.com,地址:北京市朝阳区樱花东街 2 号(邮编 100029)中日友好医院 A 栋 13 层心血管外科。(2)联系人:曹立幸,联系电话:020-81887233-31226,传真:020-81874903,E-mail: weishoushuqixiangmu@126.com,地址:广东省广州市越秀区大德路 111 号(邮编 510120)广东省中医院东区 12 楼 20 房。