

温郁金醇提物对人耐长春新碱胃腺癌细胞 SGC-7901 皮下移植瘤的逆转作用及对 P 糖蛋白表达的影响

蔡利军 宋淑萍^Δ 吕 宾 孟立娜

摘要 **目的** 通过建立人耐长春新碱胃腺癌细胞 SGC-7901 (vincristine-resistant gastric cancer SGC-7901 cells, SGC-7901/VCR) 裸鼠皮下移植瘤模型探讨温郁金醇提物逆转人胃癌多药耐药的作用及可能机制。**方法** 运用四甲基偶氮唑蓝法 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法对 SGC-7901/VCR 耐药性进行鉴定, 50 只 BALB/c 裸小鼠, 采用组织块法建立人胃癌 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤模型, 2~3 周后选取瘤体大小相近裸鼠 36 只, 按随机数字表法分为模型组, 长春新碱 (vincristine, VCR) 组, 温郁金低、高剂量组及温郁金低、高剂量联合 VCR 组, 共 6 组, 每组 6 只。模型组给予生理盐水腹腔注射 10 mL/kg, 2 天 1 次; VCR 组给予腹腔注射 VCR 0.28 mg/kg, 2 天 1 次; 温郁金低、高剂量组分别给予灌胃相应药物 1.4、2.8 g/kg, 1 天 1 次, 1 次 0.2 mL; 温郁金低、高剂量联合 VCR 化疗组分别给予低、高剂量温郁金 (1.4、2.8 g/kg) 联合 VCR (0.28 mg/kg, 2 天 1 次); 各组均为 14 天。观察各组瘤体生长情况, 计算抑瘤率, 同时采用免疫组化及蛋白印迹法 (Western blot) 检测瘤体 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的定位及表达。**结果** SGC-7901/VCR 对 VCR、阿霉素 (ADM)、5-氟尿嘧啶 (5-FU) 及顺铂 (DDP) 均有一定耐药性, 其中对 VCR 耐药性最强。SGC-7901/VCR 脱药培养后增殖活性明显增强, 各组荷瘤裸鼠随着时间的延长, 肿瘤体积逐渐增大, 以温郁金高剂量联合 VCR 组体积最小。与模型组、VCR 组比较, 温郁金高剂量联合 VCR 组较瘤体明显缩小 ($P < 0.05$), 其抑瘤率 (51.56%) 明显增高, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 检测显示: 与模型组比较, VCR 组灰度值升高 ($P < 0.05$), 温郁金高剂量组、温郁金低、高剂量联合 VCR 组中 P-gp 的相对表达量均明显减低 ($P < 0.05$)。与 VCR 组比较, 温郁金低、高剂量组及温郁金低、高剂量联合 VCR 组 P-gp 的灰度值均降低 ($P < 0.05$)。免疫组化显示: 与模型组比较, 温郁金高剂量组、温郁金低、高剂量联合 VCR 组 P-gp 的表达积分均降低 ($P < 0.05$); 与 VCR 组比较, 温郁金低、高剂量组及温郁金低、高剂量联合 VCR 组 P-gp 的表达积分均明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 温郁金可逆转 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤对 VCR 的耐药性, 其作用机制可能与下调 P-gp 的表达有关, 提示温郁金可能作为一种基于 P-gp 的多药耐药逆转剂。

关键词 温郁金; 胃癌; 多药耐药; 移植瘤; P-糖蛋白

Reversal Effect of *Curcuma Wenyujin* Extract on SGC-7901/VCR Induced Subcutaneous Transplanted Tumor in Nude Mice and Its Effect on the Expression of P-glycoprotein CAI Li-jun, SONG Shu-ping, LU Bin, and MENG Li-na Department of Digestive Disease, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006), China

ABSTRACT **Objective** To explore the reversal effect of multidrug resistance of *Curcuma Wenyujin* (CW) and its possible mechanism by establishing Vincristine-resistant gastric cancer SGC-7901 cells (SGC-7901/VCR) induced subcutaneous transplanted tumor in nude mice. **Methods** First we identified the resistance of SGC-7901/VCR by using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The SGC-7901/VCR induced subcutaneous transplanted tumor model was established in 50 BALB/c nude mice by tissue block

基金项目: 浙江省教育厅科研项目 (No.Y201119889)

作者单位: 浙江中医药大学附属第一医院消化内科 (杭州 310006)

^Δ 现在浙江大学医学院附属邵逸夫医院重症监护室 (杭州 310016)

通讯作者: 吕 宾, Tel: 13906515409, E-mail: lvbin@medmail.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1347

method. After 2–3 weeks 36 mice with similar tumor size were selected and divided into 6 groups by random digit table, i.e., the model group, the Vincristine (VCR) group, the low dose CW group, the high dose CW group, the low dose CW combined VCR group, and the high dose CW combined VCR group, 6 in each group. Normal saline was intraperitoneally injected to mice in the model group at 10 mL/kg, once per 2 days. VCR was intraperitoneally injected to mice in the VCR group at 0.28 mg/kg once per 2 days. CW at 1.4 and 2.8 g/kg was administered to mice in the low and high dose CW groups by gastrogavage, 0.2 mL each time, once daily. CW at 1.4 and 2.8 g/kg was administered by gastrogavage and VCR was intraperitoneally injected at 0.28 mg/kg, once per 2 days to mice in the low dose CW combined VCR group and the high dose CW combined VCR group. All medication lasted for 14 days. The tumor growth was observed. The inhibition rate was calculated. Meanwhile, the positioning and expression of P-glycoprotein (P-gp) were detected by immunohistochemistry and Western blot. Results SGC-7901/VCR had strong resistance to VCR, Adramycin (ADM), fluorouracil (5-FU), and Cisplatin (DDP), especially to VCR. Proliferation activities of SGC-7901/VCR were significantly enhanced after drug elution. The tumor volume gradually increased as time went by. The tumor volume was the minimum in the high dose CW combined VCR group. The tumor volume was obviously reduced in the high dose CW combined VCR group with obviously reduced with increased inhibition rate of 51.56%, when compared with that of the model group and the VCR group ($P < 0.05$). Western blot test showed that, when compared with the model group, the gray level of P-gp in the VCR group increased ($P < 0.05$), and the relative expression of P-gp in the high dose CW group, the low dose CW combined VCR group, and the high dose CW combined VCR group significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the VCR group, the gray level of the P-gp decreased in the low dose CW group, the high dose CW group, the low dose CW combined VCR group, and the high dose CW combined VCR group ($P < 0.05$). Results of immunohistochemistry showed that, when compared with the model group, expression scores of P-gp in the high dose CW group, the low dose CW combined VCR group, and the high dose CW combined VCR group decreased with statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the VCR group, expression scores of P-gp were obviously lowered in the low dose CW group, the high dose CW group, the low dose CW combined VCR group, and the high dose CW combined VCR group ($P < 0.05$). Conclusions CW could reverse the drug resistance of SGC-7901/VCR subcutaneous transplanted tumor. And its mechanism might be related to down-regulating the expression of P-gp, suggesting that CW could be used as a kind of multidrug resistance reversal agent based on P-gp.

KEYWORDS *Curcuma wenyujin*; gastric cancer; multidrug resistance; transplanted tumor; P-glycoprotein

胃癌在我国发病率占消化系统肿瘤首位,占癌症病死率 1/4^[1]。虽然手术及新辅助化疗在恶性肿瘤治疗领域取得了很大的进步,但总体疗效仍不尽人意。据美国癌症协会提供的统计资料显示,有 >90% 的肿瘤患者的死因或多或少与耐药有关^[2,3]。肿瘤多药耐药 (multi-drug resistance, MDR) 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物出现耐药的同时,对其他结构和作用机制不同的抗肿瘤药物产生交叉耐药性,是导致化疗失败的主要原因。因此,肿瘤 MDR 相关研究的成功与否,直接关系到恶性肿瘤患者化疗的疗效及预后,其意义非常重大^[4,5]。本研究前期发现温郁金提取物体外具有较强的抗胃癌活性,其中以醇提取物最强,其体外最大抑制率达到 73.1%,细胞形态学检查见典型的凋

亡改变,流式细胞仪测得典型的凋亡峰^[6]。其对胃癌的多药耐药是否也有一定的抑制作用,其机制如何?本研究主要通过人耐长春新碱胃腺癌细胞 SGC-7901 (vincristine-resistant gastric cancer SGC-7901 cells, SGC-7901/VCR) 耐药性的鉴定并建立人胃癌 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤模型,探讨温郁金逆转人胃癌多药耐药的作用及 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 表达的关系。

材料与方法

1 细胞株 人胃癌 SGC-7901 (编号 TCHu 46) 购自中国科学院上海细胞所并由浙江中医药大学附属第一医院中心实验室保存,长春新碱多药耐药细胞株

SGC-7901/VCR 购自上海天呈科技有限公司。

2 动物 50 只 4~6 周龄 BALB/c 裸小鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体重 (18 ± 2) g, 由中国科学院上海动物研究所提供, 动物合格证号: SCXK (沪) 2012-0002。浙江中医药大学动物实验与研究中心 SPF 级饲养区: 室温 $22 \sim 24$ °C、湿度维持在 40%~60%、噪音 < 50 dB。

3 药物 温郁金产于浙江温州瑞安, 由浙江中医药大学附属第一医院制剂中心代购, 将温郁金 500 g 洗净晾干, 机械粉碎后, 加 95% 乙醇 10 倍量, 充分混匀搅拌, 浸泡 30 min 后, 回流提取 2 次, 第 1 次 1.5 h, 第 2 次 1 h, 提取上层乙醇浸提液, 合并浸提液放置于旋转蒸发仪中加热真空抽吸 (水浴设温度为 60 °C, 旋转蒸发仪速度为 50 r/min), 直到没有乙醇蒸发出为止, 将所有获得的醇提取物置于烘箱中 8 h, 蒸发其中的水分及乙醇, 流浸膏加纯化水配置成 500 mL, 生药含量 1 g/mL。

4 主要试剂及仪器 注射用硫酸长春新碱 (vincristine, VCR, 浙江海正药业股份有限公司, 批号: 120902), 注射用盐酸多柔比星 (Adramycin, ADM, 浙江海正药业股份有限公司, 批号: 120502), 5-氟尿嘧啶注射液 (Fluorouracil, 5-FU, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 1208281), 注射用顺铂 (Cisplatin, DDP, 德州德药制药有限公司, 批号: 120608), 盐酸维拉帕米注射液 (Verapamil, VP, 上海禾丰制药有限公司, 批号: 111001), 鼠抗人 MDR 抗体 (美国博士德公司)。

5 细胞培养 将人胃癌细胞用含 10% 热灭活新生牛血清的 RPMI 1640 培养基于 5% CO_2 、 37 °C 条件下培养, SGC-7901/VCR 细胞的培养液中含有 $0.1 \mu\text{g/mL}$ VCR 以稳定其耐药表型。

6 人胃癌 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤模型的制备 参照文献[7, 8]。SGC-7901/VCR 细胞在不含 VCR 的培养液中, 稳定传代 2 周后, 取处于对数生长期的细胞, 常规胰蛋白酶消化制备单细胞悬液。用生理盐水重悬细胞, 计数调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。取 4~6 周龄 BALB/c 裸鼠 6 只, 雌雄各半。常规消毒裸鼠右侧前肢近背部, 用 1 mL 微量注射器吸取人胃癌耐药细胞 SGC-7901/VCR 单细胞悬液, 确定针头位于裸鼠右侧前肢近背部皮下后, 注入 0.2 mL 制备好的单细胞悬液, 细胞数约为 2×10^6 个。细胞接种术后酒精棉球压迫穿刺点 30 s。独立送风隔离笼内 SPF 条件下, 恒温恒湿饲养。经过 18~20 天的潜伏期后, 可见接种部位逐渐长大, 待裸鼠皮下肿瘤生长至

0.8~1.2 cm 时, 选择肿瘤生长旺盛且无溃破的荷瘤裸鼠, 脱颈椎处死, 皮肤予 1% 碘伏、75% 酒精消毒用眼科剪剪开皮肤, 沿移植瘤包膜剥离皮下肿瘤组织, 将剥离的移植瘤块于无菌条件下, 用生理盐水冲洗表面的血污, 去除坏死组织和纤维组织。取肿瘤边缘新鲜实质的肿瘤组织, 用眼科剪剪成约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小的组织块, 将裸鼠用 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后, 在超净台用手术刀切开裸鼠右侧前肢近背部皮肤, 将上述肿瘤组织块接种于裸鼠右侧前肢近背部, 并用手术缝合线缝合切口。第 2 代裸鼠均于移植后约 7 天出瘤, 至大约 3 周, 移植瘤直径约为 0.5 cm, 呈瘤率 100%。荷瘤裸鼠随机抽取 2 只送病理以证实造模成功 (图 1), 前期预实验提示造模成功率 100%。

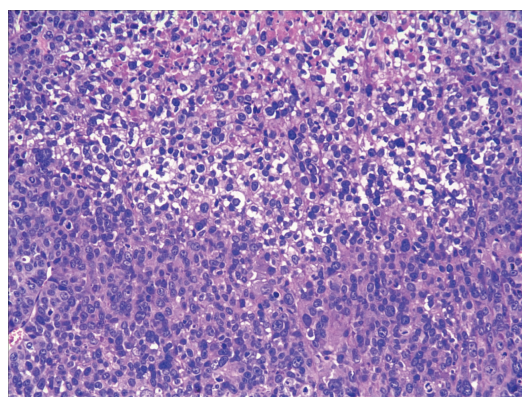


图 1 造模后移植瘤组织病理图 (HE, $\times 100$)

7 动物分组及干预方法 裸鼠共 50 只, 接种后约 3 周, 选择瘤体直径约 0.5 cm、肿瘤生长良好、无自发性出血坏死、瘤周无感染病灶的荷瘤裸鼠共 36 只为实验模型。采用随机数字表法将荷瘤鼠分为模型组、VCR 组、温郁金低剂量组、温郁金高剂量组、温郁金低剂量联合 VCR 组及温郁金高剂量联合 VCR 组, 共 6 组, 每组 6 只。参照《药理实验方法学》^[9]“人和动物按体表面积折算的等效剂量比率表”计算给药量。模型组给予生理盐水腹腔注射 10 mL/kg , VCR 组给予腹腔注射 VCR 0.28 mg/kg , 2 天 1 次; 温郁金低、高剂量组分别给予灌胃相应药物 1.4、2.8 g/kg (分别相当于成人临床剂量的 1、2 倍), 1 天 1 次, 1 次 0.2 mL; 温郁金低、高剂量联合 VCR 组给予低、高剂量温郁金 (灌胃 1.4、2.8 g/kg) 联合 VCR (腹腔注射 0.28 mg/kg , 2 天 1 次), 各组均为 14 天。

8 观测指标及检测方法

8.1 人胃癌 SGC-7901/VCR 株耐药性的鉴定 采用四甲基偶氮唑蓝法 (methyl thiazolyl tetrazoli-

um,MTT)检测。选择对数生长期 SGC-7901、SGC-7901/VCR 细胞,加入适量 0.25%胰酶消化,使贴壁细胞脱离,用各自的完全培养基制成单细胞悬液,24 h 后,实验组细胞加入 100 μL 含 VCR、ADM、5-FU、DDP 的完全培养基,使药物终浓度分别为 VCR (SGC-7901 组浓度为 0.04、0.02、0.01、0.005、0.0025 μg/mL; SGC-7901/VCR 组浓度为 200、100、5、0.8、0.4 μg/mL)、ADM (浓度均为 40、4、0.4、0.04、0.004 μg/mL)、5-FU (SGC-7901 组浓度为 1 000、100、10、1、0、1 μg/mL; SGC-7901/VCR 组浓度为 1 250、125、12.5、1.25、0.125 μg/mL)、DDP (浓度分别为 3、1.5、0.75、0.375、0.1875 μg/mL);用自动酶标仪在波长 490 nm 处测定每孔的吸光度值(A),计算细胞生长抑制率。抑制率(%)=[(阴性对照组A-空白对照组A)-(实验对照组A-空白对照组A)]/(阴性对照组A-空白对照组A)×100%。使用 SPSS 软件计算 IC₅₀及耐药指数。IC₅₀为细胞抑制率为 50%时所需的药物浓度,耐药指数=IC₅₀(SGC-7901/VCR)/IC₅₀(SGC-7901)。

8.2 各组移植肿瘤生长情况 游标卡尺测量裸鼠移植瘤的长径(a)和短径(b),按下面公式计算肿瘤体积(V): $V=1/2\times a\times b^2$,每2天测量1次(共8次),绘制肿瘤生长曲线。

8.3 各组瘤体大体观察及抑瘤率比较 末次给药后次日,脱颈椎处死动物,剖取瘤体组织大体观察并称重,计算抑瘤率,抑瘤率(%)=(对照组瘤重-治疗组瘤重)/对照组瘤重×100%。

8.4 Western blot 法检测 P-gp 的表达情况 按照 Bradford法提取各组标本的蛋白,调节样品蛋白浓度为 40 μg/μL,灌胶,上样,转膜,P-gp 一抗用封闭液以 1:1 000 稀释,4℃层析柜中孵育 3 h 或过夜;一抗孵育完毕后,用 TBS-T 缓冲液洗脱 3 次×10 min;将 P-gp 二抗用封闭液以 1:10 000 稀释,室温孵育 1~2 h;用 TBS-T 缓冲液洗脱 3 次×10 min;曝光,用凝胶成像系统(ChemiDoc XRS system)分析目的条带的面积、宽度、灰度值。

8.5 免疫组化测定移植瘤中 P-gp 的表达 采用丹麦 DAKO 公 EnVisionTM 二步法。P-gp 为以细胞浆或胞膜表达为主,呈棕黄色颗粒状染色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。显微镜先在 100 倍视野下确定 5 个染色明显区域,再在 200 倍视野下记录每个区域一个视野内的阳性细胞数,取其平均值。根据文献[10],采用如下的评分标准:以细胞浆或胞膜表达颗粒的着色深浅及着色的阳性细胞数进行评分,阳性

染色深度:未见染色为 0 分,轻度染色为 1 分(染成浅黄色),中度染色为 2 分(染成棕黄色),深度染色为 3 分(染成棕褐色),≥1 分为表达阳性。阳性细胞数记分:0%~1%为 0 分,2%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,76%~100%为 4 分,根据阳性染色深度和阳性细胞数两项指标计分。

9 统计学方法 数据应用 SPSS 17.0 统计软件包分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,计数资料用 Fisher 精确检验法,等级资料用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 人胃癌 SGC-7901/VCR 耐药性比较(表 1) SGC-7901/VCR 对 VCR、ADM、5-FU、DDP 均有一定耐药性,其中对 VCR 耐药性最强,达 5 584.789 倍。

表 1 SGC-7901/VCR 细胞株耐药性比较				
组别	n	IC ₅₀ (μg/mL, $\bar{x}\pm s$)		耐药指数
		SGC-7901	SGC-7901/VCR	
VCR	3	0.019±0.000	106.110±3.008	5 584.789
ADM	3	0.255±0.026	5.700±0.610	22.353
5-FU	3	3.335±0.267	20.712±5.097	6.210
DDP	3	0.778±0.152	1.059±0.101	1.361

2 各组移植瘤的生长情况比较(图 2) 从移植瘤的生长曲线可以看出,随着时间的延长,移植瘤的体积逐渐增大,以温郁金高剂量联合 VCR 组体积最小。

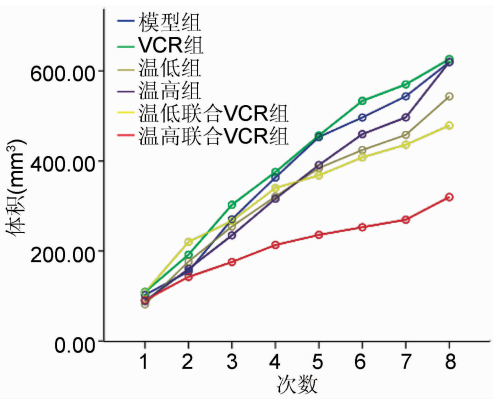


图 2 各组瘤体生长曲线图

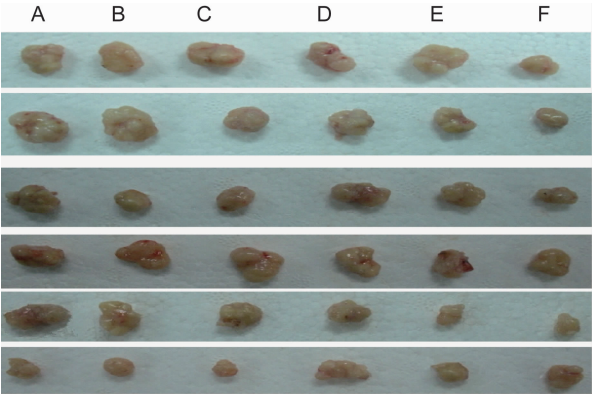
3 各组移植瘤瘤体大体观察及抑瘤率比较(表 2,图 3) 裸鼠皮下移植瘤呈圆形或椭圆形,实质表面可见丰富的血管网,部分可见结节状突起,其中可见 3 只裸鼠移植瘤表面有破溃,脓液,后自愈。瘤体解

剖后,肿块表面覆一薄层包膜,与周围组织边界清楚,易于剥离。切面呈鱼肉状,瘤体较大者切开中央有小片坏死区,较小者均为实质性,无坏死。与模型组及 VCR 组比较,温郁金高剂量联合 VCR 组瘤重均减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$),余各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组及 VCR 组比较,温郁金高剂量联合 VCR 组抑瘤率增高(51.56%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组裸鼠瘤重及抑瘤率比较

组别	<i>n</i>	瘤重(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)
模型	6	0.64 ± 0.25	—
VCR	6	0.59 ± 0.31	7.81
温郁金低剂量	6	0.52 ± 0.31	18.75
温郁金高剂量	6	0.48 ± 0.12	25.00
温郁金低剂量联合 VCR	6	0.44 ± 0.24	31.25
温郁金高剂量联合 VCR	6	0.31 ± 0.09* Δ	51.56* Δ

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与 VCR 组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A 为模型组;B 为 VCR 组;C 为温郁金低剂量组;D 为温郁金高剂量组;E 为温郁金低剂量联合 VCR 组;F 为温郁金高剂量联合 VCR 组

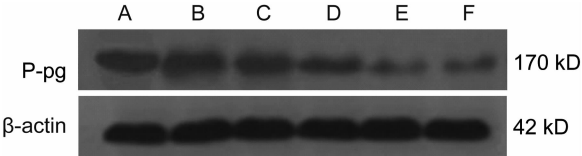
图 3 移植瘤大体观图

4 各组移植瘤中 P-gp 灰度值比较(表 3,图 4)与模型组比较,VCR 组灰度值升高($P < 0.05$),温郁金高剂量组、温郁金低剂量联合 VCR 组及温郁金高剂量联合 VCR 组中 P-gp 的灰度值明显减低($P < 0.05$);

表 3 各组 P-gp 灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	P-gp 灰度值
模型	6	1.017 ± 0.060
VCR	6	1.373 ± 0.199*
温郁金低剂量	6	0.877 ± 0.015 Δ
温郁金高剂量	6	0.607 ± 0.047* Δ
温郁金低剂量联合 VCR	6	0.367 ± 0.021* Δ
温郁金高剂量联合 VCR	6	0.330 ± 0.010* Δ

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与 VCR 组比较, $\Delta P < 0.05$

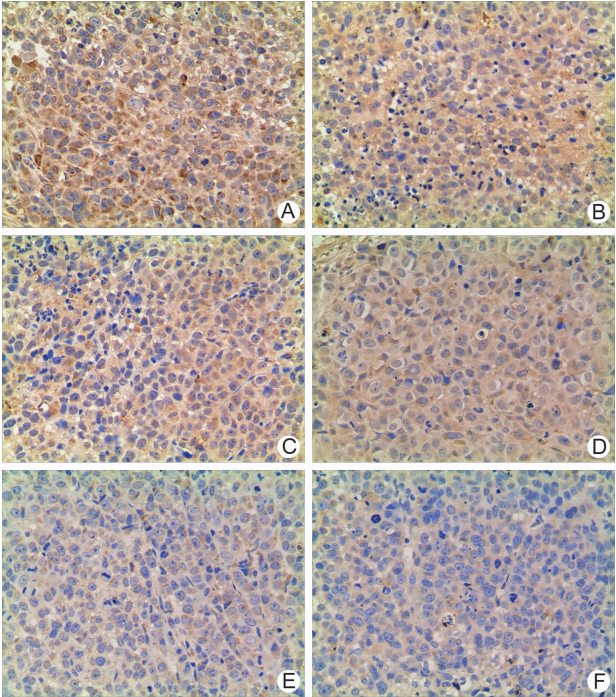


注:A 为模型组;B 为 VCR 组;C 为温郁金低剂量组;D 为温郁金高剂量组;E 为温郁金低剂量联合 VCR 组;F 为温郁金高剂量联合 VCR 组

图 4 各组移植瘤 P-gp 表达图

与 VCR 组比较,温郁金低、高剂量组、温郁金低剂量联合 VCR 组及温郁金高剂量联合 VCR 组 P-gp 的灰度值均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

5 各组移植瘤中 P-gp 的表达比较(表 4,图 5) P-gp 以细胞浆或胞膜表达为主,呈棕黄色颗粒状染色。模型组、VCR 组着色深染,呈棕褐色,温郁金低、高剂量组着色较浅,呈棕黄色,而温郁金联合 VCR 组着色浅淡,呈淡黄色。与模型组比较,温郁金高剂量组、温郁金低剂量联合 VCR 组及温郁金高剂量联合 VCR 组 P-gp 的表达积分降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),VCR 组及温郁金低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$);与 VCR 组比较,温郁金低、高剂量组及温郁金低、高剂量联合 VCR 组 P-gp 的表达积分明



注:A 为模型组;B 为 VCR 组;C 为温郁金低剂量组;D 为温郁金高剂量组;E 为温郁金低剂量联合 VCR 组;F 为温郁金高剂量联合 VCR 组

图 5 各组移植瘤中 P-gp 表达 (EnVisionTM 二步法,×200)

表 4 各组移植瘤中 P-gp 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	P-gp 表达
模型	6	7.67 $\pm$ 0.82
VCR	6	8.50 $\pm$ 2.07
温郁金低剂量	6	5.83 $\pm$ 2.58 Δ
温郁金高剂量	6	5.25 $\pm$ 1.78 $^{* \Delta}$
温郁金低剂量联合 VCR	6	4.42 $\pm$ 1.10 $^{* \Delta}$
温郁金高剂量联合 VCR	6	3.04 $\pm$ 1.17 $^{* \Delta}$

注:与模型组比较, $^{*}P < 0.05$; 与 VCR 组比较, $\Delta P < 0.05$

显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

尽管近几年来胃癌的全世界的发病率及病死率呈下降趋势,但在东亚^[2,11,12],特别是我国,胃癌的发病率及病死率在整个恶性肿瘤仍占居前列(城市第3位,农村第1)^[1],进展期胃癌患者的化疗在整个胃癌的治疗中占了重要的地位。尽管近年来多种新药的应用以及化疗方案不断规范化及调整,已经为进展期胃癌的临床治疗提供了更多的有效手段,如顺铂、奥沙利铂,紫杉醇类,5-FU 衍生物如希罗达,爱斯万(S-1)等已越来越多应用于胃癌临床治疗中,有文献报道,胃癌联合化疗有效率约40%~60%^[13]。虽然手术及新辅助化疗在恶性肿瘤治疗领域取得了很大的进步,但总体疗效仍不尽人意,临床上缺乏有效的逆转胃癌多药耐药的药物选择。

MDR 由多种途径诱导,形成机制相当复杂,分为经典和非经典 MDR 两大类机制。与细胞膜有关的经典的药物转运耐药机制^[14]涉及到 ABC(ATP binding cassette)型膜载体蛋白家族,该家族至少有 50 种蛋白质,有一些 ABC 转运蛋白能将抗肿瘤药物排出细胞外,从而降低细胞内药物浓度,使细胞产生耐药,包括:(1)P-糖蛋白;(2)MDR 相关蛋白(MRP);(3)肺耐药相关蛋白(LRP);(4)乳腺癌耐药蛋白(BCRP)。其中有 P-gp 介导的 MDR 是目前研究最为广泛和深入的耐药机制。P-gp 是由 MDR1 基因编码的一种 ATP 依赖跨膜转运蛋白,P-gp 是 MDR1 基因过度表达的产物,由 Juliano RL 等^[15]在 1976 年发现,人类正常组织中有不同程度的 P-gp 表达,而几乎所有类型的肿瘤中均有表达。P-gp 主要位于细胞膜,小部分位于内质网和高尔基体,P-gp 是分子量为 170kD 的一个跨膜蛋白,由 1 280 个氨基酸组成,其中 1 220 个氨基酸构成 2 个串联重复序列,另 60 个氨基酸构成两者之间的连接区。在细胞膜内侧,P-gp 含有两个 ATP 结合结构域。目前已经得到的 3.8 埃分辨率的 P-gp 晶体结构 X 射线衍射图显示,P-gp 有一个约

6 000埃的内部空腔,空腔内部具有不同的药物结合位点,其结合具有立体异构专一性,主要通过疏水作用相结合。此空腔具有向胞浆和脂质双分子层内部小叶开放的开口,药物通过细胞膜扩散进入细胞后,可进入此开口,然后结合在 P-gp 上的 ATP 水解释放能量,引起 P-gp 的构象变化,使 P-gp 面向膜外侧的区域打开,将药物排出细胞^[16,17]。

温郁金又名黑郁金,主产于浙江温州瑞安一带,为姜科植物温郁金(*Curcuma wenyujin* Y.H. Chen et C.Ling)的干燥块根^[18],始载于《新修本草》,具有活血止痛、行气解郁、凉血、利胆退黄的功效。本课题前期研究显示其具有良好的抗胃癌活性,同时对胃癌也具有一定的化学预防作用^[19-21]。本研究通过建人胃癌 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤模型,观察温郁金逆转人胃癌 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤对 VCR 的耐药作用及对 P-gp 表达的影响。

研究发现 SGC-7901/VCR 具有较强的耐药性,对 VCR、ADM、5-FU、DDP 均有一定耐药性,其中对 VCR 耐药性最强达 5 584.789 倍,SGC-7901/VCR 脱药培养后增殖活性明显增强,与文献报道相似,是一种胃癌多药耐药的理想细胞模型,可用于肿瘤逆转药物或成分的筛选。裸鼠皮下移植造模成功率 100%,经过 2 周给药后,而温郁金联合 VCR 干预组较之模型组比较瘤体明显缩小,其中以温郁金高剂量联合 VCR 组体积最小,与 VCR 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),其抑癌率为 51.56%,与模型组及 VCR 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),揭示人常规剂量温郁金及 VCR 对人胃癌 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤无明显抑制作用,而联合 VCR 组可明显抑制移植瘤的生长,提示温郁金可逆转 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤对 VCR 的耐药性或增强 VCR 的细胞毒性。

Western blot 检测发现 P-gp 表达是在相对分子量 170kD 处呈现印迹,各组细胞蛋白在上样量相同的条件下,VCR 组条带显色最强,模型组其次,温郁金及联合组相对较弱($P < 0.05$),免疫组化见 P-gp 以胞浆或胞膜表达为主,呈棕黄色颗粒状染色。高剂量温郁金及温郁金联合 VCR 可以减低 P-gp 的表达,而且高剂量温郁金联合 VCR 能够通过协同 VCR 下调 P-gp 的表达。提示 VCR 刺激可能增强 P-gp 表达,增加细胞耐药性,而高剂量温郁金组及温郁金联合 VCR 组均能下调 P-gp 表达,其中以温郁金联合 VCR 组下调明显,与 VCR 组及模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示其作用机制可能与下调 P-gp 表达

有关,温郁金可能作为一种基于 P-gp 的多药耐药逆转剂。

本研究发现人常规剂量温郁金及 VCR 对人胃癌 SGC-7901/VCR 皮下移植瘤无明显抑制作用,而联合用药可明显抑制移植瘤的生长,高剂量温郁金联合 VCR 可明显抑制瘤体的生长($P < 0.05$),但低剂量温郁金联合 VCR 差异无统计学意义($P > 0.05$),可能与本次实验的给药时间(14 天)有关,适当延长给药时间将可能更有价值。但温郁金除了影响药物泵经典蛋白 P-gp 外,是否还影响其他膜转运蛋白如多药耐药相关蛋白、乳腺癌耐药相关蛋白及肺耐药相关蛋白等仍需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张思维,陈万青,郑荣寿,等. 2003 ~ 2007 年中国癌症死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(3): 171 - 178.
- [2] Ferlay JL, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893 - 2917.
- [3] Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, et al. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice[J]. Reprod Toxicol, 1998, 12(4): 457 - 463.
- [4] Gottesman MM, Tito F, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters [J]. Nature Rev Cancer, 2002, 2(1): 48 - 58 .
- [5] Hait WN, Yang JM. Clinical management of recurrent breast cancer: development of multidrug resistance (MDR) and strategies to circumvent it [J]. Semin Oncol, 2005, 32(6 Suppl 7): S16-S21.
- [6] 徐毅,吕宾,丁志山,等. 不同温郁金提取物抑制胃癌细胞 SGC27901 增殖和诱导凋亡的实验研究[J]. 浙江医学, 2004, 26(7): 503 - 505.
- [7] 司徒镇强,吴军正主编. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版社, 2000: 16 - 187.
- [8] 那迪. 人胃癌裸鼠模型的建立及应用[J]. 实用肿瘤学杂志, 2007, 21(6): 565 - 569.
- [9] 魏伟,吴希美,李元建主编. 药理实验方法学[M]. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [10] Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor differentiation [J]. Hepatology, 1999, 29(3): 688 - 696.
- [11] Guggenheim DE, Shah MA. Gastric cancer epidemiology and risk factors [J]. J Surg Oncol, 2013, 107(3): 230 - 236.
- [12] Shin A, Kim J, Park S. Gastric cancer epidemiology in Korea [J]. J Gastr Cancer, 2011, 11(3): 135 - 140.
- [13] GASTRIC (Global Advanced/Adjuvant Stomach Tumor Research International Collaboration) Group, Paoletti X, Oba K, et al. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis [J]. JAMA, 2010, 303(17): 1729 - 1737.
- [14] Stein U, Walther W. Cytokine-mediated reversal of multidrug resistance [J]. Cytotechnology, 1998, 27(1 - 3): 271 - 282.
- [15] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 455(1): 152 - 162.
- [16] Aller SG, Yu J, Ward A, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding [J]. Science, 2009, 323(5922): 1718 - 1722.
- [17] Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein [J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(1): 1 - 6.
- [18] 雷载权主编. 中药学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001: 200 - 201.
- [19] 何必立,吕宾,徐毅,等. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中医药学刊, 2006, 24(9): 1741 - 1743.
- [20] 徐磊,吕宾,俞林峰. 温郁金提取液对化学致癌剂致大鼠胃癌的预防作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(24): 2589 - 2592.
- [21] Lu B, Xu L, Yu L, et al. Extract of *Radix Curcumane* prevents gastric cancer in rats [J]. Digestion, 2008, 77(2): 87 - 91.

(收稿: 2013 - 06 - 30 修回: 2014 - 07 - 22)