温郁金逆转胃癌 SGC7901/VCR 多药耐药性机制的研究

戴金锋 蔡利军 陈超英 俞 瑾 吕 宾

摘要 目的 探讨温郁金正丁醇提取物(*Curcuma Wenyujin* n-Butyl alcohol extract, CWNAE)逆转 SGC7901/VCR 细胞株多药耐药性(multi-drug resistance,MDR)的机制。**方法** 将 SGC7901/VCR 细胞与不同浓度的 CWNAE 及维拉帕米(Verapamil, VP)共培养 24 h 后加入阿霉素作用 1、2、4 h,以未干预的 SGC7901/VCR 为空白组,以单纯阿霉素干预组为对照组,采用流式技术检测 CWNAE 对胞内 ADM 浓度的影响。细胞处理同前,不予阿霉素干预,以未干预的 SGC7901/VCR 为对照组,采用 Western blot 研究 CWNAE 对 SGC7901/VCR 细胞中 P-gp、GCS 及 LRP 蛋白表达的影响。免疫组化进一步说明 CWNAE 对 P-gp 定位及表达量的影响。**结果** 与 ADM 组比较, W80、W40、W20 及 VP10 组荧光表达比例明显升高,差异有统计学意义 (均$P<0.05$)。SGC7901/VCR 细胞中 P-gp、GCS 及 LRP 的相对表达量明显高于不耐药株,差异有统计学意义(P 均 <0.05),而 80、40 μg/mL CWNAE 及 10 μg/mL *VP* 均可明显下调前两者的表达,但不影响 LRP 的表达。免疫组化证实 P-gp 主要表达在细胞膜及胞浆内,细胞核膜上亦有表达,CWNAE 可以下调上述所有部位的 P-gp。**结论** CWNAE 通过抑制 P-gp 及 GCS 的表达逆转 SGC7901/VCR 细胞株 MDR,对 LRP 无明显影响,考虑 CWNAE 有潜力成为逆转高表达 P-gp 及 GCS 细胞株 MDR 的药物。

关键词 胃癌;温郁金; 多药耐药性;P 糖蛋白;肺耐药相关蛋白

Study on the Mechanism of Reversal Effect of *Curcuma Wenyujin* on MDR of SGC7901/VCR

DAI Jin-feng, CAI Li-jun, CHEN Chao-ying, YU Jin, and LU Bin *Department of Digestive Disease, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053), China*

ABSTRACT Objective To study the mechanism of reversal effect of *Curcuma Wenyujin* n-Butyl alcohol extract (CWNAE) on multiple drugs resistance (MDR) of SGC7901/VCR cells. Methods SGC7901/VCR cells were co-culured with different concentrations CWNAE (80, 40, and 20 μg/mL) and Verapamil (VP, 10 μg/mL) for 24 h, and then acted with Adriamycin (ADM) for 1, 2, and 4 h, respectively. SGC7901/VCR cells with no intervention were taken as the vehicle control group. SGC7901/VCR cells treated with ADM alone were taken as the control group. The effect of CWNAE on intracellular ADM concentration was detected by flow cytometry (FCM). Cells were treated as mentioned before without any intervention of ADM. SGC7901/VCR with no ADM intervention were taken as the control group. The effect of CWNAE on the expression of P-glycoprotein (P-gp), lung resistance protein (LRP), and glucosylceramide synthase (GCS) was studied by Western blot. The effect of CWNAE on the location and expression quantity of P-gp was further illustrated by immunohistochemistry (IHC). Results Compared with the ADM group, the expression ratio obviously increased in the W80, W40, W20, and VP10 groups with statistical difference (all $P<0.05$). The comparative expression quantity of P-gp, GCS, and LRP in SGC7901/VCR cells was obviously higher than that of non-MDR with statistical difference (all $P<0.05$). The expression quantity of P-gp and GCS could be obviously down-regulated by 80 and 40 μg/mL CWNAE, and 10 μg/mL VP, with no effect on the expression of LRP. Results of IHC proved that P-gp was

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科(杭州 310053)

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

DOI: 10.7661/CJIM.2014.12.1507

mainly expressed on the cytomembrane or in the plasma, and it was also expressed on the nuclear membrane. P-gp in different locations could all be down-regulated by CWNAE. Conclusions CWNAE could reverse the MDR of SGC7901/VCR cell line probably by inhibiting the expression of P-gp and GCS. CWNAE had no effect on LRP that also highly expressed on SGC7901/VCR. So we supposed that CWNAE could become a potential drug to reverse MDR of highly expressed P-gp and GCS.

KEYWORDS gastric cancer; *Curcuma Wenyujin*; multi-drug resistance; P-glycoprotein; lung resistance protein

调查显示近年来胃癌发病率仍居世界第二位,更是第二大癌症死因[1]。据美国癌症协会提供的统计资料显示,90%以上的肿瘤患者的死因多与耐药有关[2]。温郁金,性味辛、苦、寒,归肝心肺经,有活血止痛、行气解郁、清心凉血、利胆退黄的功效,属于浙江道地药材[3]。温郁金提取物中的许多单体有较好的逆转肿瘤多药耐药的作用[4-6],由于肿瘤多药耐药机制较复杂,单体作用靶点相对较少,而目前多认为多靶点药物的作用更好[7],故本实验采用温郁金正丁醇提取物(*Curcuma Wenyujin* n-Butyl alcohol extract, CWNAE)观察其逆转肿瘤多药耐药性的效果。

材料与方法

1　人胃癌细胞株　人胃癌 SGC7901 细胞株购自中科院上海细胞所并由浙江省中医院中心实验室保存,人胃癌 SGC7901/VCR 多药耐药细胞株购自上海天呈科技有限公司(货号 TC-2195,批号 2011122113408)。

2　材料及试剂　温郁金,浙江中医药大学制药厂提供;注射用硫酸长春新碱(Vincristine, VCR, 1 mg/支,浙江海正药业股份有限公司,批号:110801);注射用盐酸多柔比星(Adriamycin, ADM, 10 mg/支,浙江海正药业股份有限公司,批号:110101)、盐酸维拉帕米注射液(Verapamil, VP,上海禾丰制药有限公司,5 mg/2 mL,产品批号:111201B)。RPMI 1640 及 PBS(杭州科易生物技术有限公司, 500 mL/瓶,生产批号分别为 20130312 和 20130320)、0.25% 含 EDTA 及不含 EDTA 的胰蛋白酶(吉诺生物医药技术有限公司);P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)一抗(博士德,美国)、β-actin 一抗(Cell Signaling,美国)、抗鼠二抗(Jaskson,美国)、肺相关耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)一抗、葡萄糖神经酰胺合成酶(Glucosylceramide synthase, GCS)一抗、抗兔二抗(Proteintech,美国)、RIPA 裂解液(北京普利莱基因有限公司),三羟甲基氨基甲烷(Tris, Ameresco, 美国)、十二烷基硫酸钠(SDS, Ameresco,美国)、甘氨酸(Ameresco,美国),过硫酸铵(APS, Ameresco,美国)、Tween20(Ameresco,美国)、30%丙烯酰胺溶液(Bio-Rad,美国)、牛血清白蛋白(BSA)标准品(Bio-Rad,美国)、蛋白浓度测定 BCA 试剂盒(北京普利莱基因有限公司)、蛋白 marker(Bio-Rad, 美国)、TEMED(Andybio, 美国)、ECL 液(Bio-Rad,美国);小鼠二步法检测试剂盒(中杉金桥)、DBA 试剂盒(Sigma,美国)。

3　仪器　生物学安全台(SW-Ⅱ-A/B3,上海上净净化设备有限公司),流式细胞仪(BD Falcon,美国),免疫印迹检测系统(Bio-Rad,美国),凝胶成像系统 ChemiDoXRS(Bio-Rad,美国),多功能全波长酶标仪系统(BioTek,美国),倒置生物显微镜(XPS-18, COIC,韩国)。

4　CWNAE 的制备及稀释　取温郁金生药 1.5 kg洗净晾干,采用机械粉碎法粉碎后用24 L 正丁醇浸泡,充分混匀搅拌,室温下静置 24 h 后,小心抽取上层正丁醇浸提液 5 L,并将其液放置在旋转蒸发仪中加热真空抽吸(水浴温度 60 ℃,旋转蒸发仪速度 50 r/min),待无正丁醇蒸发出来时,在药渣中再加入正丁醇 5 L,重复上述操作 8 次,将所获得的所有正丁醇提取物置于烘箱中烘烤 8 h,除去其中的水分及残留的正丁醇,最终获得黏稠的棕黑色 CWNAE 150 mL,以每小瓶 10 mL 分装后灭菌,每毫升含生药 10 g,置于 -80 ℃冰箱储存备用。使用前称取一定质量的 CWNAE,先予 DMSO 助溶,母液浓度为 100 mg/mL,采用 22 μm 过滤器除菌,再用 PBS 稀释至640 μg/mL分装存储于 -20 ℃,使用时经 1640 培养基稀释至所需浓度。

5　细胞培养　SGC7901/VCR 及 SGC7901 细胞用含 10% 胎牛血清及 RPMI 1640 培养基于 5% CO_2、37 ℃ 下培养;SGC7901/VCR 细胞的培养液中含有 0.1 μg/mL VCR 以稳定其耐药表型。

6　流式细胞技术检测 SGC-7901/VCR 胞内 ADM 荧光表达　取对数生长期的 SGC-7901/VCR 细胞以 8 ~10 ×10^3 个/孔接种于 48 孔板上。细胞分

6 组:空白对照组、ADM 组、W80 组、W40 组、W20 组及 VP10 组。ADM 组加入 ADM,W80、W40、W20 组分别加 ADM 及 80 μg/mL、40 μg/mL、20 μg/mL CWNAE,VP10 组加 ADM 与 10 μg/mL VP,每组 3 个孔,24 h 后去原培养液,除空白对照组外各加入 0.5 μg/mL ADM。每组中的 3 个孔分别避光培养 1、2、4 h 后收集细胞,PBS 漂洗 3 次,用流式细胞仪检测细胞内 ADM 荧光强度,激发波长 488 nm,接收波长 575 nm。

7 Western blot 法检测 SGC7901/VCR 中 P-gp、LRP 及 GCS 表达 细胞分 5 组,分别为 SGC7901 组、SGC7901/VCP 组、VP10 组、W40 组、W80 组。SGC7901 组为未经干预的 SGC7901 细胞,SGC7901/VCP 组为未经干预的 SGC7901/VCR 细胞,VP10 组加入 10 μg/mL VP,W40、W80 组加入 80 μg/mL、40 μg/mL CWNAE,药物作用 24 h,提取总蛋白,BCA 蛋白定量方法测样品蛋白浓度。蛋白样品内加入 5 × 上样缓冲液,并于 100 ℃水浴中煮 5 min,置于 -80 ℃保存。在 10 %分离胶及 5 %浓缩胶上以每孔 30 μg 蛋白量上样后进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,后使用 Bio-Rad 蛋白转移装置夹板转膜。封闭液中室温孵育 1 ~2 h;分别加入 P-pg、LRP 及 GCS 一抗 4 ℃过夜,1 × TBST 洗膜 3 次;加入二抗,室温孵育膜 1 h。同前洗膜 3 次。用 ECL-PLUS 化学发光试剂盒检测,以凝胶成像系统 ChemiDoXRS 曝光摄像,并用 Quantity One 软件测量条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量,蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/相应 Actin 灰度值。

8 免疫组化测定 P-gp 蛋白的表达 制备培养爬片,实验分组同 Western Blot,每组设 2 个复孔,药物作用 24 h 后按以下步骤进行实验:PBS 漂洗 2 次,1 min/次;冷丙酮固定 10 min;PBS 漂洗 3 次,5 min/次;0.5% triton-100 透膜 20 min;PBS 漂洗 3 次同前;0.3% H_2O_2 去离子水孵育 30 min;PBS 漂洗 3 次同前;10%胎牛血清封闭 30 min;PBS 漂洗同前;P-gp 一抗(1∶200)4 ℃过夜;鼠二抗 37 ℃孵育 20 min;DAB 显色,待镜下观察到棕黄色颗粒形成时以流水冲洗 10 min,再以苏木精复染 30 s ~2 min,再流水冲洗 10 min;以 85% ~90% ~100%乙醇及 100%二甲苯脱水,各 5 min;倒置显微镜下观察。

9 统计学方法 数据应用 SPSS 17.0 统计软件包分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 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。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

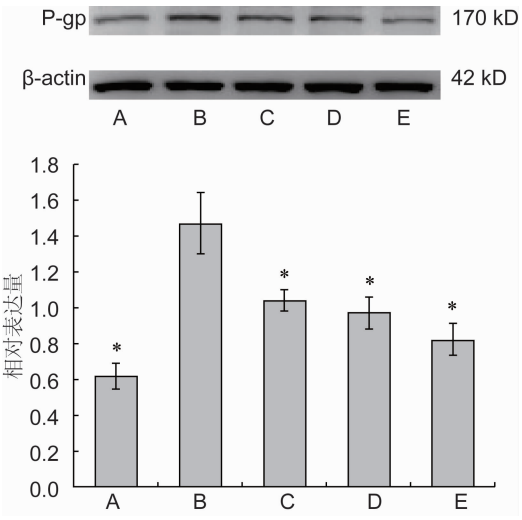
1 SGC-7901/VCR 胞内 AMD 荧光表达结果比较(表 1) 与 ADM 组比较,W80、W40、W20 及 VP10 组荧光表达比例明显升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),但 4 组作用差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组细胞 1、2、4 h 胞内 ADM 荧光表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	*n*	不同时间点 ADM 荧光表达		
		1 h	2 h	4 h
空白对照	3	0.20 ±0.12	0.45 ±0.17	0.45 ±0.17
ADM	3	18.60 ±10.28	77.85 ±7.79	89.65 ±2.48
W80	3	72.95 ±11.14 *	90.85 ±6.64 *	93.90 ±4.73 *
W40	3	69.25 ±11.83 *	89.90 ±7.16 *	95.35 ±3.06 *
W20	3	71.75 ±3.52 *	88.90 ±7.74 *	93.80 ±3.70 *
VP10	3	64.15 ±7.68 *	89.80 ±3.46 *	95.90 ±1.73 *

注:与 ADM 组同期比较,* $P < 0.05$

2 SGC-7901/VCR P-gp、LRP 及 GCS 蛋白表达比较(图 1 -3) 与 SGC7901/VCR 组比较,VP10、W40 及 W80 组 GCS、P-gp 表达均降低($P < 0.05$),但 W40 及 W80 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),LRP 在各组间表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为 SGC7901 组;B 为 SGC7901/VCR 组;C 为 VP10 组;D 为 W40;E 为 W80 组;与 SGC7901/VCR 组比较,* $P < 0.05$;图 2 -4 同

图 1 各组 P-gp 蛋白表达比较

3 SGC7901/VCR 中 P-gp 蛋白表达(图 4) P-gp 阳性呈棕黄色颗粒,SGC-7901 及 SGC-7901/VCR 细胞株均有表达,SGC-7901/VCR 细胞株 P-gp

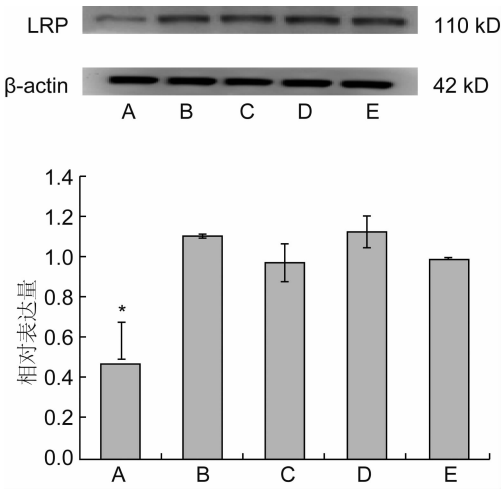


图 2　各组 LRP 蛋白表达比较

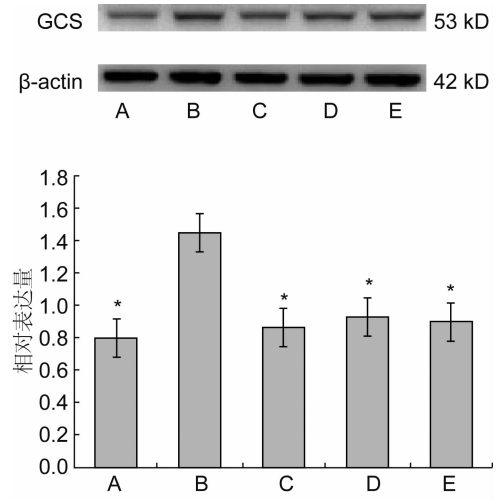


图 3　各组 GCS 蛋白表达比较

表达明显高于 SGC-7901 株，其表达以细胞浆或胞膜表达为主，核膜上也有表达。经温郁金及 VP 处理后 P-gp 的表达均减少。

讨　论

王茵萍等[8]及林一帆等[9]均认为从瘀论治是治疗胃癌的重要方法之一。温郁金作为活血化瘀类药物，前期实验也证明其在抗肿瘤中有一定的作用[10]，而多药耐药是肿瘤发展中的一个阶段，到达该阶段必然需要长时间多因素的作用，久病必瘀，故活血化瘀在多药耐药阶段仍是主要治疗方法之一。目前关于温郁金及其提取物如姜黄素、榄香烯等逆转肿瘤多药耐药的研究已有许多，多集中于 P-gp、MRP 的研究，尚无 LRP 及 GCS 的研究[21]。

近年来 GCS 被证实其在凋亡过程中扮演了重要的角色。其产物葡糖神经酰胺（glucosylceramide，

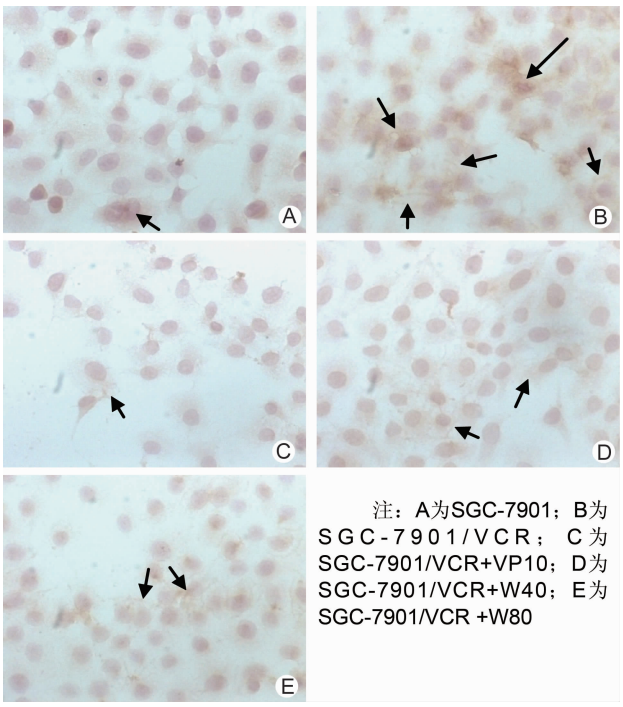


图 4　各组 P-gp 蛋白表达比较　（免疫组化，×400）

GlcCer）有抗凋亡作用，同时它又可以将尿嘧啶双磷酸葡萄糖转化为神经酰胺，后者是促凋亡物质，故 GCS 的异常可以导致凋亡与抗凋亡的平衡，在肿瘤多药耐药中起了一定的作用[11]。本实验中也证实多药耐药株中 GCS 表达明显升高，故考虑 CWNAE 逆转胃癌耐药的其中一个机制就是下调多药耐药株 GCS 的表达实现的。

CWNAE 处理后 SGC7901/VCR 胞内阿霉素荧光浓度明显增高。影响胞内药物浓度的一般机制主要是细胞屏障作用加强，抵抗药物入胞，药物外排泵及胞内分解药物的酶功能加强或数量增多[12,13]。其中药物泵属于经典的多药耐药机制[14]。P-gp 研究最广泛，但 LRP 比 P-gp 更易在恶性肿瘤中表达。多药耐药相关蛋白（multiple resistance protein，MRP）在多数组织中都表达，但是表达水平都不高。本实验中 SGC7901/VCR 耐药株表面 P-gp 及 LRP 都表达增加，而 CWNAE 及 VP 可明显下调 P-gp 的表达，但对于 LRP 无明显影响。考虑 P-gp 及 LRP 的机制不同所致，前者属于 ATP 依赖的盒式转运蛋白（ATP-binding cassette transporter，ABC transporter）家族成员，主要作用是在药物进入胞内后结合在 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[15]。LRP 耐药谱较经典耐药蛋白 P-gp 广泛，能够介导对顺铂、卡铂、烷化剂等一些P-gp 不能介导的药物耐受[16]，这些药物的一些共同特点是以

DNA 为靶点,这也暗示 LRP 可能主要通过核靶点屏蔽机制引起 MDR[17],它作为核孔复合物(nuclear pore complex, NPC)参与细胞质与细胞核间物质交换的调控,另一方面与细胞质中的囊泡运输有关。研究发现 LRP 与顺铂(cis-platinum,DDP)敏感性有关,与 ADM、足叶乙甙(etoposide)、VCR 无关[18,19]。本实验 SGC7901/VCR 多药耐药细胞株主要对 VCR、ADM 耐药,同时对 DDP 也有一定耐药性,但同样高表达 LRP,考虑与前面提到的 LRP 在组织比较容易表达相关。

综上所述可得出结论:温郁金能有效逆转人胃癌细胞株 SGC7901/VCR 的多药耐药性,其机制主要是下调了 P-gp 及 GCS,对 LRP 无明显作用,P-gp 表达的下降有效地增加了胞内化疗药物的浓度,GCS 表达下降则促进了相关化疗药物诱导的细胞凋亡。临床实践中温郁金有较多的应用,并无明显的不良反应,故 CWNAE 有望成为逆转高表达 P-gp 和 GCS 的肿瘤的多药耐药性的治疗药物。

参 考 文 献

[1] Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M, et al. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980 – 2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype [J]. Eur J Cancer, 2014, 50(7): 1330 – 1344.

[2] American Cancer Society. Cancer facts and figures: 1988. American Cancer Society, 1988 [OL]. http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978 – 1 – 4757 – 2093 – 8_21.

[3] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典临床用药须知[M].北京:中国医药科技出版社, 2010:728.

[4] Limtrakul P, Anuchapreeda S, Buddhasukh D. Modulation of human multidrug resistance (MDR)-1 gene by natural curcuminoids [J]. BMC Cancer, 2004, 4(1): 13.

[5] Cole SP, Bhardwai G, Genach TH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line[J]. Science, 1992, 258(5088): 1650 – 1654.

[6] Park SY, Kim DS. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease[J]. J Nat Prod, 2002, 65(9): 1227 – 1231.

[7] Zimmermann GR, Lehár J, Keith CT. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts[J]. Drug Discov Today, 2007, 12(1 – 2): 34 – 42.

[8] 王茵萍,邹移海, 潘华峰,等. 活血化瘀防治胃癌的效应与抗新生血管生成的关系[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2005, 13(3): 187 – 188.

[9] 林一帆,王承利,王阳,等.加味四君子汤对 MNNG 诱导大鼠胃癌与癌前病变的预防作用[J]. 沈阳部队医药, 2006, 19(4): 219 – 220.

[10] 蔡利军,吕宾,倪桂宝,等.温郁金对人胃癌裸鼠原位移植瘤生长转移的抑制作用及对 COX-2 和 VEGF 表达的影响[J]. 中医药学刊, 2006, 26(10): 1843 – 1846.

[11] Stein U, Walther W. Cytokine-mediated reversal of multidrug resistance [J]. Cytotechnology, 1998, 27(1 – 3): 271 – 282.

[12] Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer[J]. Mol Biotechnol, 2010, 46(3): 308 – 316.

[13] Chen YT, Feng B, Chen LB. Update of research on drug resistance in small cell lung cancer chemotherapy[J]. As Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3577 – 3581.

[14] Kartal Yandim M, Apohan E, Baran Y. Therapeutic potential of targeting ceramide/glucosylceramide pathway in cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 71(1): 13 – 20.

[15] Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, et al. Overexpression of a M(r)110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistance [J]. Cancer Res, 1993, 53(7): 1475 – 1479.

[16] 陈龙, 左国庆.膜糖蛋白介导的肿瘤多药耐药机制研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(14): 1606 – 1608.

[17] Lzquierdo MA, Shoemaker RH, Flens MJ, et al. Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels human cancer cell lines [J]. Int J Cancer, 1996, 65(2): 230 – 237.

[18] Ikeda K, Oka M, Narasaki F, et al. Lung resistance-related protein gene expression and drug sensitivity in human gastric and lung cancer cells[J]. Anticancer Res, 1998, 18(4C): 3077 – 3080.

[19] Pohi G, Fillpits M, Suchomel RW, et al. Expression of lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer [J]. Anticancer Res, 1999, 19(6B): 5051 – 5053.

(收稿:2013 – 07 – 22 修回:2014 – 09 – 01)

中国中西医结合杂志