

[文章编号] 1000-4718(2008)03-0591-03

补肾化痰解毒方药物血清对肺癌 A549/DDP 细胞的耐药逆转及 MRP 表达的影响*

曹勇, 李亮, 钟安朴, 许林利, 陈璐

(暨南大学医学院中医系, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨补肾化痰解毒方药物血清对肺癌细胞耐药逆转作用及机制。方法: 采用 MTT 及流式细胞术, 分别观察补肾化痰解毒方药物血清对肺癌 A549/DDP 耐药细胞的细胞毒作用和多药耐药相关蛋白(MRP)表达的影响。结果: 补肾化痰解毒方药物血清对肺癌耐药细胞有一定的杀伤作用, 能增强顺铂(DDP)对肺癌敏感细胞和耐药细胞的杀伤作用, 显著降低 MRP 的表达($P < 0.01$), 但对维拉帕米(VRP)的协同逆转作用不明显。结论: 补肾化痰解毒方药物血清具有增效和耐药逆转作用, 其机制可能与其抑制肺癌耐药细胞 MRP 的表达有关。

[关键词] 补肾化痰解毒方; 肺肿瘤; 多药耐药相关蛋白质类

[KEY WORDS] Bushen huayujiedu recipe; Lung neoplasms; Multidrug resistance associated proteins

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

补肾化痰解毒方是我们临床中治疗肺癌的有效方剂, 具有补肾、化痰、解毒之功, 实验研究表明补肾化痰解毒方水煎浓缩剂荷瘤动物药物血清具有抑瘤和化疗增效作用, 并能抑制肺癌耐药细胞 A549/DDP 肺耐药蛋白(lung resistance-related protein, LRP)的表达和耐药细胞钙通道活性^[1]。为了进一步明确补肾化痰解毒复方对肺癌耐药细胞的耐药逆转及作用机制, 对补肾化痰解毒方采用水煎醇提, 以肺癌耐药细胞 A549/DDP 为模型, 采用 MTT 及流式细胞术, 分别观察补肾化痰解毒方药物血清对肺癌耐药细胞 A549/DDP 的细胞毒作用, 及其对肺癌耐药细胞 A549/DDP 多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein, MRP)表达的影响, 以探讨补肾化痰解毒复方对肺癌耐药细胞的耐药逆转作用及其机制, 以便更好地指导临床应用补肾化痰解毒复方治疗肺癌和耐药逆转。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 药物 补肾化痰解毒方醇提取物的制备: 取中药补肾化痰解毒方(由中药肉桂、补骨脂、莪术、大黄、全瓜蒌、葶苈子、粉防己组成)饮片粉碎后用 90% 乙醇溶液浸泡, 3 h 后回流过滤, 再将残渣提取 2 次, 合并提取液, 置沸水浴中挥发乙醇浓缩至膏稠状, 然后溶于含 2% 二甲基亚砜(DMSO)0.05 mol/L pH6.5 磷酸缓冲液中, 制成每毫升相当于 2 g 原生药的溶液, 装入灭菌瓶, 置 4 °C 冰箱备用。顺铂(cisplatin, DDP), 锦州九泰药业有限公司生产, 批号: 050502; 青霉素, 哈药集团制药总厂生产, 批号: 0101002; 链霉素, 华北制药股份有限公

司生产, 批号: 0101002; 维拉帕米(verapamil, VRP), 上海禾丰制药有限公司生产, 批号: 4E12001。

1.2 动物 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 中山大学实验动物中心提供, 合格证号: NO. 0008555, SCXK(粤)2004-0011, 粤监证字 2004A086。

1.3 瘤株 Lewis 肺癌, 由广州中医药大学肿瘤研究所提供; 人肺腺癌细胞系 A549; 由南方医科大学药理教研室饶进军博士惠赠; 人肺腺癌耐药细胞系 A549/DDP, 由第三军医大学新桥医院呼吸病研究所吴国明教授惠赠。

1.4 主要试剂 RPMI-1640 细胞培养液, Gibco; 胎牛血清, 杭州四季青; 胰蛋白酶, Amersco 公司; 噻唑蓝(MTT), Sigma; DMSO, Sigma; 鼠抗人多药耐药相关蛋白单克隆抗体 MRP; 进口, 北京中杉金桥生物技术有限公司分装; FITC 标记山羊抗小鼠 IgG, 进口, 北京中杉金桥生物技术有限公司分装。

1.5 主要仪器设备 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 酶标免疫检测仪, Thermo Labsystems; CO₂ 孵箱, Thermo Forma; 96 孔平底细胞培养板, Corning; FACSCalibur 流式细胞仪, Beckman-Coulter 公司; 倒置显微镜, Nikon; 电子天平(FA2004 型), Sartorius。

2 方法

2.1 荷瘤动物药物血清制备 取健康 C57/6J 小鼠, 体重 20-22 g, 接种 Lewis 肺癌造模, 24 h 后随机分为补肾化痰解毒方大、中、小剂量组和模型空白对照组, 共 4 组, 每组 20 只。补肾化痰解毒方大剂量组、中剂量组、小剂量组分别按 30 g/kg、20 g/kg、10 g/kg 灌胃给药(分别为临床成人日用量的 19.0 倍、12.8 倍和 6.4 倍), 模型空白对照组以等容积的生理盐水

[收稿日期] 2007-06-15 [修回日期] 2007-10-26

* [基金项目] 广东省科技计划资助项目(No. 73062); 广州市科技计划项目(No. 2007Z3-E5091); 暨南大学自然科学基金资助项目(No. 692001)

E-mail: tcaoy@163.com

灌胃,每天1次,连续10 d,末次灌胃1 h,腹主动脉采血,无菌分离血清,经56 °C 30 min 灭活处理后,用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,置-20 °C 保存备用。

2.2 对肺癌 A549/DDP 耐药细胞的耐药逆转作用 MTT 法,取已配成 2 × 10⁵ 细胞悬液的肺癌 A549、A549/DDP 细胞,100 μL/孔(每孔细胞数为 2 × 10⁴)接种于 96 孔培养板中,37 °C、5% CO₂ 培养 24 h,至细胞生长旺盛贴壁后,去掉培养液,换成不含胎牛血清的培养液。而后将细胞分为中药组、模型空白对照组、中药加 DDP 组及 DDP 对照组,另设 RPMI - 1640 培养液(含 10% 胎牛血清)不加药物和细胞只加 MTT 的调零孔组。中药组加入 20 μL 终浓度为 10% 的不同剂量组含中药兔血清;中药加 DDP 组同时加入 20 μL 终浓度 10% 的不同剂量组含中药兔血清和恒定浓度为 1 mg/L 的 DDP 各 20 μL;模型空白对照组加入终浓度为 10% 的模型空白对照组血清 20 μL;DDP 对照组只加入终浓度为 1 mg/L 的顺铂 20 μL,每一剂量均重复 5 孔,每孔终体积为 200 μL,不足部分以无血清的 RPMI - 1640 培养液。各组加样后继续培养 48 h,每孔再加入 5 g/L 的 MTT(Hanks 液配制)液 20 μL 培养 4 h,1 000 r/min 离心 5 min,小心吸去各孔中上清,每孔再加入 DMSO 200 μL,微量振荡器振荡 10 min 或混匀静置 5 min,用酶标仪测 A₅₇₀各孔吸光值,列公式计算肺癌细胞在各种浓度下的细胞生长抑制率、逆转倍数。

细胞生长抑制率 = (1 - 剂量组 A₅₇₀ 平均值/空白对照组 A₅₇₀ 平均值) × 100%。

耐药逆转倍数 = 逆转剂加抗癌药物组细胞死亡率/ 抗癌药物组细胞死亡率。

2.3 对肺癌 A549/DDP 耐药细胞 MRP 表达的影响 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测术,参照徐萌等^[2]方法。取已配成 1 × 10⁹ cells/L 细胞悬液的肺癌 A549/DDP 细胞 3 mL,接种于 25 mL 培养瓶,37 °C、5% CO₂ 培养 24 h,至细胞生长旺盛贴壁后,去掉培养液,换成不含胎牛血清的培养液。而后将细胞分为荷瘤动物含药补肾化痰解毒复方血清大剂量组、中剂量组和小剂量组及荷瘤动物模型血清组、A549/DDP 组(耐药对照组)。大、中、小剂量组分别加入 300 μL 终浓度为 10% 的不同剂量组含中药荷瘤动物血清;模型组加入终浓度为 10% 的荷瘤动物模型血清 300 μL,耐药对照组加入 10% 胎牛血清 300 μL,每瓶终体积为 3 mL,不足部分加以 RPMI - 1640 培养液。免疫荧光染色及检测:各组加样后继续培养 4 h,用 PBS (pH7.2)洗涤 2 次,1 000 r/min 离心,每次 10 min,用 PBS 稀释细胞浓度调至 1 × 10⁹ cells/L,取 1 mL 加入刻度试管中,同时加入 20 倍稀释的鼠抗人特异性第 I 抗体即 MRP 单抗 QCRL - 1(1:20),在 37 °C 恒温水浴中孵育 30 min,PBS 离心洗涤 2 次,去尽上清液体,加入 FITC 标记的 II 抗(1:80),在 37 °C 恒温水浴中孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次以除去未结合的多余抗体,200 目筛过滤后,检测时设阴性对照(以 PBS 代替 I 抗),在流式细胞仪上检测 FITC 在受 488 nm 氩离子激光激发的荧光强度,得出细胞群体在各时期 MRP 蛋白的表达率。

3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计

软件包进行 t 检验。

结 果

1 补肾化痰解毒方药物血清对 A549/DDP 的耐药逆转作用

结果如表 1 所示,补肾化痰解毒方药物血清对肺癌敏感细胞 A549 的杀伤作用较弱,DDP 的杀伤作用较强。当补肾化痰解毒方药物血清大、中、小剂量组分别与 DDP 合用时,明显提高了 DDP 对 A549 的杀伤作用,尤其是大剂量组合用 DDP 后较为显著(P < 0.05)。补肾化痰解毒方药物血清大、中、小剂量组加 DDP 的细胞死亡率分别是 DDP 组的 1.32 倍、1.05 倍和 1.03 倍。而补肾化痰解毒方药物血清对肺癌耐药细胞 A549/DDP 有一定的杀伤作用,大剂量组比较明显,是 DDP 组的 1.18 倍;当补肾化痰解毒方药物血清大、中、小剂量组分别与 DDP 合用时,对耐药细胞的杀伤作用更加明显,尤其是大剂量组合用 DDP 后较为显著(P < 0.01),细胞死亡率分别是 DDP 组的 1.99 倍、1.30 倍和 1.01 倍。表明补肾化痰解毒方药物血清对肺癌敏感细胞的杀伤作用不明显,但对肺癌耐药细胞有一定的杀伤作用,能增强 DDP 对肺癌敏感细胞和耐药细胞的杀伤作用,具有增效和耐药逆转作用。

表 1 补肾化痰解毒方药物血清对 A549/DDP 的耐药逆转作用

Tab 1 Reversal effect of Bushen huayu jiedu recipe drug - serum on multidrug - resistance in A549/ DDP cells ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Group	A549	A549/DDP	Drug - resistance reversal multiple
	Cell death rate(%)	Cell death rate(%)	
Control	-	-	-
DDP	39.09 ± 7.23	12.64 ± 5.14	-
High dose	1.52 ± 0.79	14.91 ± 8.32	1.18
Medium dose	1.09 ± 0.17	6.36 ± 2.63	0.50
Low dose	0.58 ± 0.09	3.74 ± 1.02	0.30
High dose + DDP	51.63 ± 6.83 [△]	25.17 ± 2.29 ^{△△}	1.99
Medium dose + DDP	41.04 ± 3.73	16.45 ± 1.99	1.30
Low dose + DDP	40.09 ± 5.02	12.76 ± 3.25	1.01

[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01 vs DDP group.

2 补肾化痰解毒方药物血清对 A549/DDP 细胞 MRP 表达的影响

结果如表 2 所示,模型组肺癌耐药细胞 MRP 荧光值显著高于耐药组细胞(P < 0.01),表明荷瘤动物血清对肺癌耐药细胞耐药蛋白 MRP 的表达有促进作用。与耐药细胞组相比,补肾化痰解毒方药物血清小剂量组肺癌耐药细胞 MRP 荧光值显著低于耐药组(P < 0.01)。表明补肾化痰解毒方药物血清对肺癌耐药细胞耐药蛋白 MRP 的表达有抑制作用。

3 补肾化痰解毒方药物血清与维拉帕米 (VRP) 合用对 A549/DDP 细胞 MRP 表达的影响

结果如表 3 所示,VRP 组 MRP 荧光值显著低于耐药组 A549/DDP 细胞(P < 0.01),表明 VRP 有显著降低 A549/DDP 细胞 MRP 的荧光值作用。当补肾化痰解毒方药物血清与 VRP 合用时,大、中、小剂量组对肺癌耐药细胞 A549/DDP 耐药蛋白 MRP 的荧光值无明显降低作用(P > 0.05),说明补肾

化痰解毒复方药物血清与 VRP 合用,协同 VRP 降低 A549/DDP 细胞 MRP 荧光值的作用不明显。

表 2 补肾化痰解毒方药物血清对 A549/DDP 细胞 MRP 表达的影响

Tab 2 Effect of Bushen huayu jiedu recipe drug - serum on MRP expression in A549/DDP cells($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	MRP fluorescence tite(%)
Model	38.31 ± 3.62
Drug - resistance	28.42 ± 5.37 ^{△△}
High dose	24.17 ± 3.58 ^{△△}
Medium dose	28.72 ± 4.25 ^{△△}
Low dose	14.27 ± 4.77 ^{△△▲▲}

^{△△} $P < 0.01$ vs model group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs drug - resistance group.

表 3 补肾化痰解毒方药物血清与 VRP 合用对 A549/DDP 细胞 MRP 表达的影响

Tab 3 Effect of Bushen huayu jiedu recipe drug - serum combined with verapamil on MRP expression in A549/DDP cells($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	MRP fluorescence tite(%)
Drug - resistance	28.42 ± 5.37
VRP	19.23 ± 1.84 ^{△△}
High dose + VRP	19.77 ± 5.82
Medium dose + VRP	23.17 ± 4.21
Low dose + VRP	19.83 ± 3.37

^{△△} $P < 0.01$ vs drug - resistance group.

讨 论

研究表明,化疗药物对肺癌疗效的降低,主要是肺癌细胞对化疗药物产生耐药性(multidrug resistance, MDR)所致,积极寻求有效的肺癌化疗耐药逆转方法是肺癌研究的热点。研究发现钙离子通道阻滞剂维拉帕米、钙调蛋白阻滞剂氯丙嗪、免疫抑制剂环孢素 A 及抗激素类药物如他莫昔芬等具有多药耐药逆转功能,但是有的毒副作用较大以及在临床中作用不明显而未能推广应用。然而一些中药单体及活性成分如汉防己甲素(TTD)、蝙蝠葛碱与蝙蝠葛苏林碱、浙贝母碱、川芎嗪(TMP)、 β -榄香烯乳剂、鸦胆子乳油、冬凌草甲素、补骨脂素、苦参碱、槲皮素、姜黄素、大黄酸/大黄素、人参皂苷单体 Rb1 等,以及中药复方都有逆转肿瘤多药耐药的作用^[3,4],从而为肿瘤耐药逆转提供了一种新的研究途径。

该研究显示,补肾化痰解毒方药物血清对肺癌敏感细胞 A549 的抑制作用较弱,对耐药细胞 A549/DDP 有一定的杀伤作用,尤其是大剂量组比较明显,当补肾化痰解毒方药物血清大、中、小剂量组分别与 DDP 合用时,能明显提高 DDP 对 A549 和 A549/DDP 的杀伤作用,表明补肾化痰解毒方药物血清对肺癌敏感细胞的抑制作用不明显,但对肺癌耐药细胞有一定的杀伤作用,且能增强 DDP 对肺癌敏感细胞和耐药细胞的杀伤作用,具有增效和耐药逆转作用。这也说明了补肾化

痰解毒方药物血清对 DDP 的增敏增效可能是通过逆转耐药细胞的耐药性实现的。

肿瘤 MDR 的形成与 P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP)、肺耐药相关蛋白(LRP)、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)、拓扑异构酶(TOPO),以及细胞膜离子通道、蛋白激酶 C(PKC)等多因素相关^[5],而参与肺癌耐药的耐药相关基因主要是 MDR1、GST- π 、MRP 等。并且研究发现,在非小细胞肺癌中均有不同程度的 MRP 过度表达,MRP 的表达水平高低与肺癌对化疗药物的敏感性和预后相关,以及与患者生存期、复发、转移密切相关^[6-8]。MRP 介导的 MDR 在肿瘤细胞多药耐药中的作用与 P-gp 相似,是依赖于 ATP 的药物外排泵。将药物主动转入亚细胞器或间接影响药物分布,降低核内药物浓度,使药物对 DNA 靶点的绝对浓度下降,并可改变胞浆及细胞器的 pH 值及通过囊泡转运和胞吐作用将药物排出细胞外,使药物到达其作用部位的浓度减少及药物活性成分脱离其作用部位和胞内药物浓度下降,从而使细胞产生耐药性^[9]。该研究结果显示,补肾化痰解毒方药物血清具有明显抑制肺癌 A549/DDP 耐药细胞 MRP 的表达,表明补肾化痰解毒方药物血清可通过降低化疗药物在耐药细胞内的浓度和分布,从而发挥对肺癌 A549/DDP 耐药细胞的耐药逆转,其具体作用机制有待于深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] 曹 勇,张 丹,郑广娟,等. 补肾化痰解毒方对肺癌耐药细胞的耐药逆转及机制研究[J]. 山东中医杂志, 2004,23(2):100-103.
- [2] 徐 萌,李金瀚. 肺癌耐药发生和细胞周期改变的流式细胞术分析[J]. 中华肿瘤杂志,2000,22(9):385-387.
- [3] 刘雪强,陈信义,刘昌海,等. 中药肿瘤多药耐药逆转剂的研究进展[J]. 中医药学刊,2006,24(10):1826-1829.
- [4] 戴春岭,符立梧. 肿瘤多药耐药逆转剂的研究进展[J]. 中国药理学通报,2005,21(5):513-518.
- [5] 宋现让,魏 玲,王兴武,等. 骨软组织肉瘤中耐药相关蛋白表达及与化疗耐药的相关性[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(10):2012-2017.
- [6] 单根法,钟 弘,张辅贤. 原位分子杂交检测肺癌组织 MRP 基因表达及意义[J]. 中华肿瘤杂志,2000,22(1):27-29.
- [7] 李青山,吕喜英,胡建功,等. MRP、P-gp 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 临床肺科杂志,2003,8(5):387-389.
- [8] 郝 军,王 妍,李庆昌,等. MRP 在非小细胞肺癌和正常肺组织中表达及其预后意义的研究[J]. 中国肺癌杂志,2005,8(1):32-36.
- [9] Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of XR11576, a novel, orally active, dual inhibitor of topoisomerase I and II[J]. *Anticancer Drugs*, 2002,13(1):15-28.