

大黄素逆转肿瘤细胞多药抗药性的作用

姜晓峰, 甄永苏*

(中国医学科学院·中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 研究中药成分大黄素的核苷转运抑制活性和对肿瘤细胞多药抗药性的逆转作用。方法: 采用 $[^3\text{H}]$ 胸苷掺入法测定核苷转运抑制作用, 采用 MTT 法检测细胞毒作用, 采用流式细胞术测定 P-糖蛋白的功能和表达。结果: 大黄素能抑制小鼠艾氏腹水癌细胞对 $[^3\text{H}]$ 胸苷的跨膜转运, 其 IC_{50} 为 $9.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。大黄素能增强抗癌药物 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素和氨甲蝶呤对人肝癌 BEL-7402 细胞的细胞毒作用并能部分逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/Adr 对阿霉素的抗药性。大黄素增加罗丹明 123 在 MCF-7/Adr 细胞中的蓄积并减少其外排, 长时间作用降低了 P-糖蛋白的表达。结论: 大黄素逆转抗药性的作用与抑制核苷转运、降低 P-糖蛋白的功能和表达相关。大黄素作为抗肿瘤生化调节剂用于逆转肿瘤细胞多药抗药性的作用值得进一步研究。

关键词 大黄素; 多药抗药性; 核苷转运抑制剂

肿瘤细胞产生的多药抗药性 (multidrug resistance, MDR) 是肿瘤化疗的主要障碍, 它可促使肿瘤细胞对多种结构类型和作用机理不同的药物同时产生抗药性, 从而大大降低抗肿瘤药物的疗效^[1]。在我们进行天然来源核苷转运抑制剂的研究中^[2]发现茶多酚、丹酚酸 A 等核苷转运抑制剂能够抑制肿瘤细胞的核苷酸合成补救途径, 体外能增强抗肿瘤药物对肿瘤细胞的杀伤, 体内能协同抗肿瘤药物抑制肿瘤生长并延长荷瘤动物的存活期, 从而显示用核苷转运抑制剂作为生化调节剂用于肿瘤联合化疗的前景。本研究发现中药成分大黄素有核苷转运抑制活性, 它能增强抗癌药物的细胞毒作用, 对肿瘤细胞的抗药性也有逆转作用。

材料与 方法

药品和试剂 大黄素购自中国药品生物制品检定所, 蓝四唑 (MTT) 和罗丹明 123 (Rh123) 为 Sigma 产品, 丝裂霉素 C (MMC) 为日本协和公司产品, 氨甲蝶呤 (MTX)、5-氟尿嘧啶 (5-FU) 及阿霉素 (ADR) 均系国产。ZM-0424 鼠抗人 Pgp 单抗和 ZF-0309 FITC 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自中山生物工程公司。

细胞和细胞培养 艾氏腹水癌细胞 (EAC) 在小鼠腹腔中传代, 每周一次。人肝癌 BEL-7402 细胞, 人乳腺癌 MCF-7 细胞及其抗阿霉素的多药抗药性细胞 MCF-7/Adr 均用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37°C , 5% CO_2 中培养。

核苷转运测定^[3] 取小鼠腹腔中生长 6 d 的 EAC 细胞, 用生理盐水洗一次, 加入试管 (细胞数 $7 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$), 与药物作用 5 min, 加入 0.1 ml 含 $3.7 \times 10^4 \text{ Bq}$ 的 $[^3\text{H}]$ 胸苷, 30 s 后立即将细胞抽滤在玻璃纤维膜上, 加 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 0.1 ml, 烘干后加闪烁液在 Beckman 液闪仪上检测。

MTT 法^[4] 按 Scudiero 报道的方法测定药物对肿瘤细胞的细胞增殖抑制作用。

药物联合作用评价^[3] 两药相互作用指数 CDI 计算公式为 $\text{CDI} = \text{AB}/(\text{A} \times \text{B})$, 根据吸光度计算, AB 为两药联用组与对照组的比值, A, B 是药物单独作用组与对照组的比值, 当 $\text{CDI} < 1$ 时两药有协同作用。

细胞对 Rh123 的蓄积和外排测定^[5] 取对数生长期细胞消化制成细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的悬液。在蓄积实验中加入 $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 Rh123 和药物, 37°C 培养 45 min 后待测。在外排实验中加入 $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 Rh123 在 37°C 培养 45 min 后, 用冰冷无血清 RPMI 1640 培养液洗 3 次, 加入药物培养 45 min 以后待测。各样品在 $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ 处测定荧光强度。

收稿日期: 1998-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870941)

* 联系人 Tel: (010) 63010985, Fax: (010) 63017302,

E-mail: zhenys@public.bta.net.cn

细胞中 P_{gp} 表达的测定^[5] 对数生长期细胞与药物作用 72 h 后消化制成细胞浓度为 $3 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的悬液, 加入一抗 ZM-0424(1: 400), 4℃避光反应 30 min, 用加 1% 小牛血清的 PBS 洗 3 次后加入二抗 ZF-0309(1: 1000), 4℃避光反应 30 min, PBS 洗 3 次后测定细胞荧光强度。

结 果

1 大黄素的抑制核苷转运作用

大黄素能抑制 [³H] 胸苷在 EAC 细胞中的跨膜转运, $\text{IC}_{50} = 9.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 大黄素增强抗癌药物的细胞毒作用

MTT 法测试大黄素对 BEL-7402 细胞的细胞毒作用, $\text{IC}_{50} = 73.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。大黄素在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时对细胞无明显杀伤作用, 但与抗癌药物 5-FU, MMC 和 MTX 合用时, 合并用药组的细胞毒作用与相应单独用抗癌药物的相比有显著差异, $P < 0.01$, CDI 均小于 0.85(图 1), 表明大黄素与抗癌药物有协同作用。

3 大黄素逆转 MCF-7/Adr 细胞的抗药性

用 MTT 法测定, 大黄素对敏感性 MCF-7 细胞和抗药性 MCF-7/Adr 细胞的细胞毒作用 IC_{50} 分别为 $66.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $64.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素与阿霉素合用, 在 MCF-7 细胞对阿霉素的 IC_{50} 影响不大, 而在 MCF-7/Adr 细胞则使阿霉素的 IC_{50} 由 $24.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至 $9.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2), 表明大黄素部分逆转了 MCF-7/Adr 细胞的抗药性。

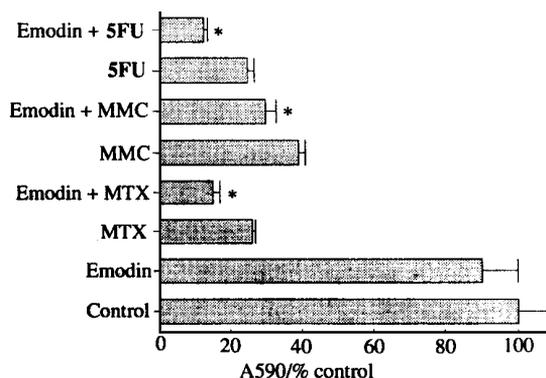


Fig 1 Emodin potentiates the inhibitory effect of 5-FU, MMC and MTX on hepatoma BEL-7402 cells (e modin $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5-FU $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; MMC $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; MTX $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). * CDI < 0.85, $P < 0.01$ compared with antitumor drug alone.

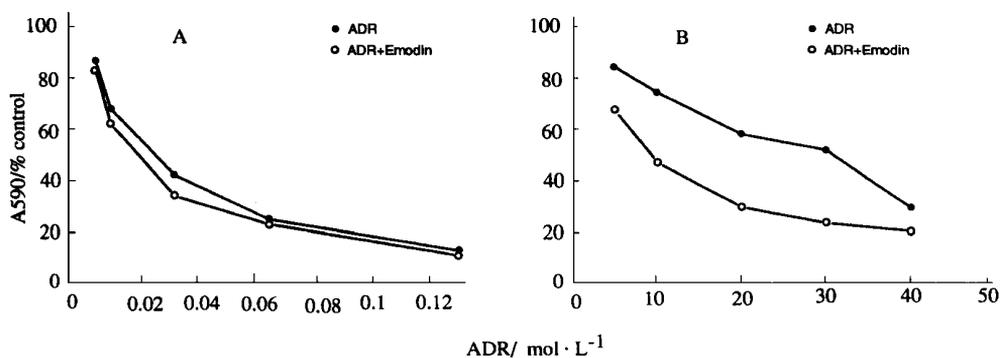


Fig 2 Effects of emodin on the inhibition of proliferation by ADR in MCF-7 (A) and MCF-7/Adr cells (B). MTT assay; Emodin $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

4 大黄素对 Rh123 在 MCF-7/Adr 细胞中蓄积和外排的影响

如图 3 所示, 在蓄积和外排实验中, 对照组的 Rh123 荧光强度都很低。与 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素合用后波峰明显右移, 荧光强度增加。表明大黄素增加了 Rh123 在 MCF-7/Adr 细胞中的蓄积并减少其

外排。

5 大黄素对 MCF-7/Adr 细胞中 P_{gp} 表达的影响

MCF-7/Adr 细胞经 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大黄素作用 72 h 后, 细胞的荧光强度降低, 波峰左移(图 4), 表明大黄素降低了 P_{gp} 的表达。

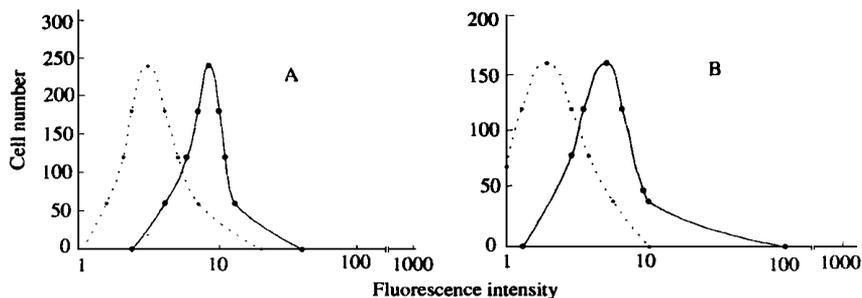


Fig 3 Effects of emodin on the intracellular Rh123 accumulation and efflux from MCF-7/Adr cells. (A) accumulation experiment; (B) efflux experiment. • - - • Control; • - • Emodin.

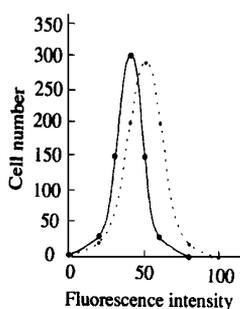


Fig 4 Effect of emodin on the expression of Pgp in MCF-7/Adr cells. • - - • Control; • - • Emodin.

讨 论

肿瘤细胞的多药抗药性是肿瘤化疗的一大障碍,因此研制能逆转多药抗药性的化疗增效剂是肿瘤研究的一大热点。已发现合成药物维拉帕米能通过增加胞内药物浓度来逆转抗药性,但毒副作用限制了其应用^[6]。从天然产物中已发现了一些逆转抗药性的成分,其中具有钙离子通道拮抗作用的双苄基异喹啉生物碱研究较多^[7]。

大黄素是常用中药大黄的主要成分,已报道大黄素对小鼠黑色素瘤、艾氏腹水癌和 P388 白血病等移植性肿瘤有一定抑制作用^[8,9]。大黄素还能抑制人肺癌 A549 细胞的分裂并对细胞有杀伤作用^[10],与抗癌药物合用对癌基因 HER2/neu 过度表达的人肺癌细胞有协同杀伤作用^[11]。本文首次报道大黄素有逆转多药抗药性的作用,因此大黄素作为新结构类型的 MDR 逆转剂值得进一步研究。

MCF-7/Adr 细胞是多药抗药性基因 *mdr1* 扩增, *Pgp* 过度表达的抗药性细胞。大黄素增加了 Rh123 在该细胞内的蓄积,减少其外排,长时间作用减少了 *Pgp* 的表达,因此抑制 *Pgp* 的表达和功能从

而提高胞内药物浓度是大黄素逆转多药抗药性的机理之一。文献报道 MCF-7/Adr 细胞中核苷转运载体的表达量较 MCF-7 细胞高^[12],大黄素能抑制肿瘤细胞的核苷转运,因此推测它逆转肿瘤细胞多药抗药性的作用与其核苷转运抑制活性相关。抗生素 C3368-B 作为核苷转运抑制剂同样能逆转肿瘤细胞的多药抗药性^[13],这提示以肿瘤细胞的核苷转运为作用靶点可能为研制新型抗肿瘤生化调节剂特别是逆转多药抗药性药物提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 Wang L, Yang CH, Horwitz SB, *et al.* Reversal of the human murine multidrug resistance phenotype with megestrol acetate. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994, 34: 96
- 2 Zhen YS, Su J, Xue YC, *et al.* Novel nucleoside transport inhibitors of natural origin. *Adv Exp Med Biol*, 1994, 370: 779
- 3 粟俭,甄永苏,戚长菁,等. 真菌产生的新核苷转运抑制剂增强药物的抗肿瘤活性. *药理学*, 1994, 29: 656
- 4 Scudiero DA, Shoemaker RH, Paul KD, *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 1988, 48: 4827
- 5 Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, *et al.* Quercetin potentiates the effect of Adriamycin in a multidrug resistance MCF-7 human breast cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994, 34: 459
- 6 Ford JM, Hait W. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev*, 1990, 42: 155
- 7 田晖,潘启超. 双苄基异喹啉生物碱粉防已碱与小檗胺逆转多药抗药性的比较研究. *药理学*, 1997, 32: 245
- 8 路铭,陈琼华. 中药大黄的生化研究 XXIX. 蒽醌衍生物对小鼠 P388 白血病的抑制作用. *中国药科大学*

- 学报, 1989, 20: 155
- 9 陈琼华, 赵永荃, 李电东. 中药大黄的综合研究 IX. 大黄酸和大黄素对小鼠移植性肿瘤的影响. 药学报, 1966, 3: 363
 - 10 陈家, 吴中亮, 杨晖, 等. 大黄素对人肺癌 A-549 细胞杀伤作用的研究. 中草药, 1991, 22: 543
 - 11 Zhang L, Hung MC. Sensitization of HER-2/neu-overexpressing non-small cell lung cancer cells to chemotherapeutic drugs by tyrosine kinase inhibitor emodin. *Oncogene*, 1996, 12: 571
 - 12 Morgan PF, Fine RL, Montgomery P, et al. Multidrug resistance in MCF-7 human breast cancer cells is associated with increased expression of nucleoside transporters and altered uptake of adenosine. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1991, 29: 127
 - 13 戴洁, 甄永苏. 来源于真菌的新核苷转运抑制剂逆转肿瘤细胞多药抗性和对凋亡的抗性. 中国药杂志, 1995, 30(增刊): 69

REVERSAL OF MULTIDRUG RESISTANCE BY EMODIN IN CANCER CELLS

Jiang Xiaofeng(Jiang XF) and Zhen Yongsu(Zhen YS)

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100050)

ABSTRACT **AIM:** In search of antitumor biochemical modulators from traditional Chinese herbal medicines, emodin has been found to be active. The goal of present study is to investigate the effects of emodin on the nucleoside transport and multidrug resistance in cancer cells. **METHODS:** Nucleoside transport inhibition was determined by [³H]thymidine incorporation assay. The cytotoxicity to cancer cells was determined by MTT assay. The pump-efflux activity and the expression of P-glycoprotein were examined by flow cytometric assay. **RESULTS:** Emodin was active in the inhibition of nucleoside transport, with an IC₅₀ value of 9.9 μmol·L⁻¹. Emodin markedly enhanced the cytotoxicity of 5-FU, MMC and MTX against human hepatoma BEL-7402 cells and partly reversed the multidrug resistance in human breast cancer MCF-7/Adr cells. Emodin inhibited P-gp pump-efflux activity and reduced the expression of P-gp in MCF-7/Adr cells. **CONCLUSION:** These findings provide a biological basis for the application of emodin as a biochemical modulator to potentiate the effects of antitumor drugs and reverse the multidrug resistance in cancer cells.

KEY WORDS emodin; multidrug resistance; nucleoside transport inhibitor