

# 甲基莲心碱对乳腺癌 MCF-7/Adr 细胞 MDR 逆转的研究

黄程辉, 曹培国

The Study of Neferine on Multidrug Resistance Reversing of the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7/Adr

HUANG Cheng-hui, CAO Pei-guo

Department of Oncology, The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of neferine (Nef) on the proliferation, intracellular ADM concentration and the expression of mdr-1/P-gp in human breast cancer cell line MCF-7/Adr. **Methods** MTT method was used to observe cell proliferation. High performance liquid chromatography was used to detect intracellular ADM concentration. RT-PCR and Western-blotting were used to detect mdr-1/P-gp expression. **Results** The inhibiting rate and intracellular ADM concentration of 10 $\mu$ g/ml Nef adding ADM group were significantly higher than those of ADM group ( $P < 0.01$ ). The inhibiting rate and intracellular ADM concentration of 20 $\mu$ g/ml Nef adding ADM group were significantly higher than those of 5 $\mu$ g/ml verapamil adding ADM group and 10 $\mu$ g/ml Nef adding ADM group ( $P < 0.01$ ). The mdr-1 mRNA and P-gp expression of 10 $\mu$ g/ml Nef adding ADM group was significantly lower than those of 60 $\mu$ g/ml ADM group ( $P < 0.01$ ). The mdr-1 mRNA and P-gp expression of 20 $\mu$ g/ml Nef adding ADM was significantly lower than that of 10 $\mu$ g/ml Nef adding ADM group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Neferine can inhibit the proliferation of human breast cancer cell line MCF-7/Adr. Neferine can improve the intracellular ADM concentration. Neferine can reduce mdr-1 mRNA and P-gp expression and consequently reverse MDR.

**Key words:** Neferine; Multidrug resistance; P-glycoprotein; MCF-7/Adr cell line

**摘要:** **目的** 探讨甲基莲心碱 (Neferine, Nef) 对耐药人乳腺癌细胞增殖, 细胞内 ADM 积聚浓度及 mdr-1/P-gp 表达的影响。 **方法** 采用 MTT 法测定细胞毒作用, 高效液相色谱法测定细胞内 ADM 积聚浓度, RT-PCR 技术及蛋白质印迹技术检测 mdr-1/P-gp 表达。 **结果** 10 $\mu$ g/ml Nef + ADM 组细胞的抑制率及细胞内 ADM 积聚浓度比 ADM 组高 ( $P < 0.01$ ); 20 $\mu$ g/ml Nef + ADM 组细胞抑制率及细胞内 ADM 积聚浓度较 5 $\mu$ g/ml 异博定 + ADM 组及 10 $\mu$ g/ml Nef + ADM 组均高 ( $P < 0.01$ )。 10 $\mu$ g/ml Nef + ADM 组 MCF-7/Adr 细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达比 ADM 组明显下降 ( $P < 0.01$ )。 20 $\mu$ g/ml Nef + ADM 组细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达较 10 $\mu$ g/ml Nef + ADM 组明显下调 ( $P < 0.01$ )。 **结论** Nef 能抑制耐药人乳腺癌细胞增殖。 Nef 能增加 MCF-7/Adr 细胞内 ADM 积聚浓度。 Nef 通过降低耐药人乳腺癌细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 的表达逆转 MDR。

**关键词:** 甲基莲心碱; 多药耐药; P-糖蛋白; MCF-7/Adr 细胞

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2007)05-0351-04

## 0 引言

统计表明, 90% 以上肿瘤患者死因都与多药耐药 (Multidrug resistance, MDR) 有关, MDR 是导致肿瘤化疗失败的主要因素之一。文献报道大部分难治/复发白血病和许多实体瘤 (如乳腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、头颈部肿瘤等) 及其转移灶细胞

mdr-1/P-gp 表达增加。尤其是 MDR 患者高表达。肿瘤 MDR 逆转已成为肿瘤化疗亟待解决的问题。中药抗白血病历史悠久, 其有效成分在与化疗联合应用的过程中有着较好的减毒增效作用。我们既往研究发现甲基莲心碱 (Neferine, Nef) 具有化疗增敏作用<sup>[1]</sup>。本研究以 MCF-7/Adr 细胞株为研究对象, 探讨甲基莲心碱对耐阿霉素人乳腺癌细胞株的逆转作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

收稿日期: 2006-05-15; 修回日期: 2006-06-14

作者单位: 410013 长沙, 中南大学湘雅三医院肿瘤科

作者简介: 黄程辉 (1975-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤耐药机制及其逆转研究

阿霉素 (Adriamycin, ADM): 意大利 Pharmacia and Upjohn 公司产; 异博定 (Verapamil): 上海禾丰制药有限公司产; Nef: 由华中科技大学同济医学院药理学教研室惠赠; 噻唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司; P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-170) 单抗: 购自美国 NeoMarkers 公司; Trizol: 购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒: 购自美国 MBI 公司; 化学发光检测试剂购自美国 PERCE 公司。mdr1 及  $\beta$ -actin 上、下游引物均由上海申友生物技术有限责任公司合成。

## 1.2 实验细胞

MCF-7/Adr 细胞由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。在  $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  浓度 ADM 中培养维持其耐药性, 脱 ADM 半月后进行实验。所有的细胞均接种于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养体系中, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、体积分数为 5% 的  $\text{CO}_2$ 、95% 湿度的条件下培养, 每隔 3~4 天传代 1 次。

## 1.3 实验方法

1.3.1 MTT 法测定 Nef 对 MCF-7/Adr 细胞的增殖抑制 对数生长期的 MCF-7/Adr 细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔含  $5 \times 10^4$  个细胞, 每组设 4 个复孔, 分阴性对照组、实验组和阳性对照组。阴性对照组不加任何药物, 实验组加入不同浓度的 Nef 和 (或) 浓度为  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$  ADM, 阳性对照组加入  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  异博定和  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$  ADM。各组加样培养 72h 后, 再加入  $12.07 \text{ nmol}/\text{L}$  的 MTT  $20 \mu\text{l}/\text{孔}$ , 培继续培养 4h 后吸弃上清, 加 DMSO  $100 \mu\text{l}/\text{孔}$  终止反应并使甲臞颗粒充分溶解, 全自动酶标仪 (EXL 800UV 型, 美国 Bio-Tek 公司)  $570 \text{ nm}$  波长检测各孔 OD 值, 取各组均值, 重复 3 次实验。以下面的公式计算细胞毒性及逆转倍数。细胞毒性 (死亡率) (%) =  $(1 - \text{不同处理组 OD}_{570} / \text{阴性对照组 OD}_{570}) \times 100\%$ , 逆转倍数 =  $\text{逆转剂加抗癌药物组细胞毒性} / \text{抗癌药物组细胞毒性}^{[2]}$ 。

1.3.2 HPLC 测定 MCF-7/Adr 细胞内 ADM 积聚浓度<sup>[3]</sup> 取对数生长期的 MCF-7/Adr 细胞按上述分组加入相应浓度的药物后培养 1h, 1h 后除阴性对照组外各组均加入浓度为  $9.6 \mu\text{g}/\text{ml}$  的 ADM 标准品。混匀后继续培养, 于 1、3h 各取 1ml (含  $1.0 \times 10^6$  个细胞) 细胞制成细胞悬液, 置  $-20^\circ\text{C}$  冰冻保存。测定前室温融解样本, 以 40 HZ 超声波破碎细胞 1min, 离心  $4000 \text{ r}/\text{min} \times 30 \text{ min}$ , 取上清以 HPLC 测定细胞内 ADM 含量。

1.3.3 逆转录 PCR 法检测 mdr-1 mRNA 的半定量表达 按上述方法分组处理 MCF-7/Adr 细胞 48h 后, 每组取  $1 \times 10^6$  个细胞, Trizol 提取总 RNA

后合成 cDNA 条件。PCR 扩增条件:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5min 后进入 PCR 循环,  $94^\circ\text{C}$  30s,  $55^\circ\text{C}$  60s,  $72^\circ\text{C}$  70s, 28 个循环后再  $72^\circ\text{C}$  10min。PCR 产物电泳后在凝胶图像处理仪 (Eagle Eye Still Video System, 美国 Stratagene 公司) 上扫描半定量, 将 mdr-1 cDNA/ $\beta$ -actin cDNA 的光密度比值作为 mdr-1 mRNA 的相对表达水平。

1.3.4 Western 印迹法检测 P-gp 的半定量表达 取各组待测蛋白  $60 \mu\text{g}$  点样,  $98 \text{ V}$  恒压电泳 5h 后  $4^\circ\text{C}$   $120 \text{ mA}$  恒流转膜。以  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  浓度的 P-gp 一抗孵育 NC 膜 70min, TBS 洗膜液洗膜 10min  $\times 3$  次,  $1:200$  浓度的二抗孵育 60min, 洗膜 10min  $\times 3$  次, 用化学发光试剂反应 5 min, 发光成像仪取像。所测 P-gp/ $\beta$ -actin 条带的灰度面积比值来表示 P-gp 的半定量值。

## 1.4 统计学方法

实验结果资料为计量资料, 采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间两两比较采用方差分析及  $t$  检验。实验资料均经 SPSS 11.0 进行统计处理。

## 2 结果

### 2.1 Nef 对 MCF-7/Adr 细胞增殖的影响

用 Nef、异博定及 ADM 处理 MCF-7/Adr 细胞 72h 后,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  Nef + ADM 组 MCF-7/Adr 细胞的死亡率比 ADM 组高, OD 值明显变小, 有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  Nef + ADM 组与  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  异博定 + ADM 组对 MCF-7/Adr 细胞的抑制率大致相等, 两处理组对 MCF-7/Adr 细胞耐药的逆转倍数均为 1.5 左右, 无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  Nef + ADM 组 MCF-7/Adr 细胞的死亡率比  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  异博定 + ADM 组及  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  Nef + ADM 组均高, 且前者逆转倍数较后两处理组大 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

### 2.2 Nef 对 MCF-7/Adr 细胞内 ADM 积聚浓度的影响

用  $9.6 \mu\text{g}/\text{ml}$  ADM、Nef、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  异博定处理 MCF-7/Adr 细胞 1h 和 3h 之后用 HPLC 检测细胞内 ADM 的含量, 结果表明处理 1h 和 3h 后 Nef + ADM 组和异博定 + ADM 组比纯 ADM 组显著升高 ( $P < 0.01$ )。处理 1h 和 3h 之后  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  Nef + ADM 组较  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  异博定 + ADM 组 MCF-7/Adr 细胞内 ADM 积聚浓度稍升高, 但无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  Nef + ADM 组较  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  异博定 + ADM 组 MCF-7/Adr 细胞内 ADM 积聚浓度明显升高 ( $P < 0.01$ ), 结果见表 2。

### 2.3 Nef 对 MCF-7/Adr 细胞株 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达的影响

表 1 Nef 对 MCF-7/ ADR 细胞株增殖抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	OD 值	死亡率 (%)	逆转倍数
无药细胞组	1.04 ± 0.02	-	-
ADM 组 (60μg/ml)	0.54 ± 0.01	46.76 ± 3.12	-
Nef (10μg/ml) + ADM (60μg/ml) 组	0.26 ± 0.01	73.46 ± 9.14	1.51 ± 0.01
异博定 (5μg/ml) + ADM (60μg/ml) 组	0.29 ± 0.01	72.37 ± 9.17	1.48 ± 0.02
Nef (20μg/ml) + ADM (60μg/ml) 组	0.18 ± 0.02	89.35 ± 6.23	2.86 ± 0.03

注:与 ADM 组比较,  $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ ;与 比较,  $P < 0.01$

表 2 Nef 对 MCF-7/ ADR 细胞 ADM 积聚浓度的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞 ADM 积聚浓度(μg/ml, n=6)	
	1h	3h
无药细胞组	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
ADM 组 (9.6μg/ml)	0.18 ± 0.04	0.26 ± 0.03
异博定 (5μg/ml) + ADM (9.6μg/ml) 组	0.64 ± 0.02	1.17 ± 0.04
Nef (10μg/ml) + ADM (9.6μg/ml) 组	0.91 ± 0.12	1.21 ± 0.03
Nef (20μg/ml) + ADM (9.6μg/ml) 组	1.81 ± 0.08	2.58 ± 0.04

注:与 ADM 组比较,  $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ ;与 比较,  $P < 0.01$

用 Nef、5μg/ml 异博定及 60μg/ml ADM 处理 MCF-7/ ADR 细胞 48h 之后检测其 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达。10μg/ml Nef + ADM 组和 5μg/ml 异博定 + ADM 组 MCF-7/ ADR 细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达比 60μg/ml ADM 组明显下调 ( $P < 0.01$ )。10μg/ml Nef + ADM 组 MCF-7/ ADR 细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达和 5μg/ml 异博定 + ADM 组的表达无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。20μg/ml Nef + ADM 组 MCF-7/ ADR 细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达较 10μg/ml Nef + ADM 组明显下调 ( $P < 0.01$ ), 见表 3, 图 1、2。

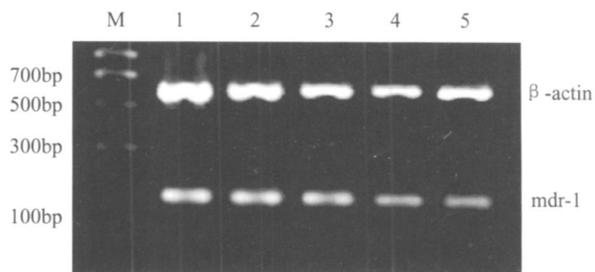
表 3 Nef 对 MCF-7/ ADR 细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	mdr-1/ -actin cDNA 光密度值 (n=4)	P-gp/ -actin 半定量值 (n=3)
无药细胞组	0.93 ± 0.03	1.53 ± 0.23
ADM 组 (60μg/ml)	0.86 ± 0.04	1.11 ± 0.01
Nef (10μg/ml) + ADM (60μg/ml) 组	0.40 ± 0.03	0.73 ± 0.01
异博定 (5μg/ml) + ADM (60μg/ml) 组	0.58 ± 0.02	0.77 ± 0.02
Nef (20μg/ml) + ADM (60μg/ml) 组	0.20 ± 0.03	0.37 ± 0.01

注:与 ADM 组比较,  $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ ;与 比较,  $P < 0.01$

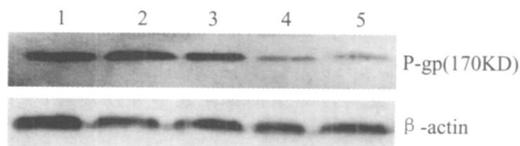
### 3 讨论

多种机制参与肿瘤 MDR 形成, 其中较重要并且研究得较深入的是 mdr-1 基因及其编码的 P-gp 过度表达导致的 MDR。控制肿瘤耐药基因高表达是解决 MDR 的关键<sup>[4,5]</sup>。理想的逆转剂应该对正常的组织无毒性或低毒性, 药物在体内能达到体外试验的有效逆转浓度, 有稳定而较长的半衰期, 能主动代谢。相继发现了异博定、环孢菌素等多种耐药



M: Marker; 1: 无药细胞组; 2: 60μg/ml ADM 组; 3: 10μg/ml Nef + ADM 组; 4: 5μg/ml 异博定 + ADM 组; 5: 20μg/ml Nef + ADM 组

图 1 mdr-1 基因 PCR 产物电泳图



1: 无药细胞组; 2: 60μg/ml ADM 组; 3: 10μg/ml Nef + ADM 组; 4: 5μg/ml 异博定 + ADM 组; 5: 20μg/ml Nef + ADM 组

图 2 P-gp 的 Western 印迹

逆转剂, 但它们因具有心血管毒性、免疫抑制、肾毒性等严重毒性和不良反应而使其临床应用受到限制<sup>[6]</sup>。MCF-7/ ADR 细胞是体外采用阿霉素诱导建立的耐药乳腺癌细胞株, 具有高表达 mdr-1/ P-gp 及 GST- 等 MDR 特点, 已成为研究 MDR 逆转的重要细胞模型。

Nef 系睡莲科植物莲的成熟种子绿色胚芽中提取出来的一种双苄基异喹啉生物碱, 现代药理研究证实它具有钙通道阻滞剂样的作用。本实验结果显示, 10μg/ml Nef + ADM 组与 5μg/ml 异博定 + ADM 组细胞抑制率大致相等, 逆转倍数均为 1.5 左右。但 20μg/ml Nef + ADM 组对 MCF-7/ ADR 细胞的抑制率较异博定 + ADM 组明显增加, 显示出 Nef 较强的抑制功效。P-gp 作为一种能量依赖性外排泵, 可主动把细胞内化疗药物泵出, 使细胞内药物浓度下降。大量研究表明, 钙拮抗剂通过竞争性抑制 P-gp 的外排而逆转 MDR。MCF-7/ ADR 细胞经不同浓度 Nef 处理 1h 和 3h 后, 细胞内 ADM 积聚浓度较 5μg/ml 异博定 + ADM 组明显升高, 表明 Nef

# 肿瘤相关抗原在人大肠癌中的表达

冯 慧<sup>1</sup>, 伊德林<sup>1</sup>, 曾 艳<sup>1</sup>, 刘芙蓉<sup>2</sup>, 方 瑾<sup>2</sup>, 宋今丹<sup>2</sup>

## Expression of Tumor-associated Antigen in Colorectal Carcinoma

FENG Hui<sup>1</sup>, YI De-lin<sup>1</sup>, ZENG Yan<sup>1</sup>, LIU Fu-rong<sup>2</sup>, FANG Jin<sup>2</sup>, SONG Jin-dan<sup>2</sup>

1. Department of Biochemistry, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China; 2. Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University

**Abstract :Objective** This study was designed to evaluate the expression and its significance of colorectal carcinoma-associated antigen LEA in colorectal carcinoma cells through the comparison of a new monoclonal antibody (ND-1) and anti-CEA monoclonal antibody. **Methods** Expression of LEA and CEA in colorectal carcinoma cells was detected with immunocytochemistry and flow cytometry. The specificity of LEA and CEA in colorectal cancer cells was analyzed by ELISA, and to detect the expression of LEA in colorectal cancer tissues with immunohistochemical method. **Results** Flow cytometry detection showed that positive peak mean fluorescence intensity was gradually decreasing in the expression of LEA in CCL-187, CX-1, CCloneA and CCL-229, and stronger than that of CEA ( $P < 0.01$ ). LEA was highly expressed in the well differentiated colorectal cancer cells of CCL-187 and CX-1, and its expression amount in low invasive cell lines of CCL-187 and CX-1 was higher than high invasive ones of CCloneA and CCL-229 ( $P < 0.01$ ). ELISA analysis revealed that monoclonal antibody ND-1 had stronger specific binding activity to

the colorectal carcinoma cell lines as compared to the CEA ( $P < 0.01$ ). The expression of LEA was decreased following the drop of tumor differentiation degree ( $P < 0.01$ ) and exhibited higher selectivity in well differentiated colorectal cancer ( $P < 0.01$ ). CEA had similar selectivity in well,

收稿日期:2006-05-09;修回日期:2006-09-05  
基金项目:国家科技部中试开发基金资助项目;沈阳市科学技术计划基金资助项目(1032043-1-01-05)  
作者单位:1. 110034 沈阳医学院生物化学教研室;  
2. 中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室  
作者简介:冯慧(1964-),女,硕士,教授,主要从事医学细胞生物学研究

能减弱耐药细胞的“药泵”功能,增加细胞内 ADM 积聚浓度从而逆转耐药。本研究发现 20μg/ml Nef 明显降低 MCF-7/Adr 细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 半定量表达,和阳性对照组异博定 + ADM 组及 10μg/ml Nef + ADM 组比较具有显著统计学的差异,在基因转录及蛋白表达两种不同水平下调 mdr-1/P-gp 表达,从分子水平体现了其较强的耐药逆转功效。此外叶祖光等<sup>[7]</sup>研究发现 Nef 有明显的增强长春新碱诱导人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞的凋亡作用。对 K562/A02 细胞 MDR 研究发现,Nef 通过降低 K562/A02 细胞 mdr-1/P-gp 表达,降低 K562/A02 细胞内谷胱甘肽的含量,下调 K562/A02 细胞 GST- mRNA 转录和蛋白表达等途径逆转 MDR<sup>[8,9]</sup>。以上表明,Nef 可以通过多种途径逆转耐药肿瘤细胞 MDR,为临床作为逆转剂的应用开发提供了有力的理论依据。

### 参考文献:

[1] 黄程辉,谢兆霞,秦忆,等. 甲基莲心碱对难治/复发急性白血病细胞增殖及 P-糖蛋白表达的影响[J]. 中国医师杂志,2005, 7(9):14-16.

[2] 李大成,屈艺,刘柏林,等. 三种中药制剂 Ams-11、Fw-13、Tul-17 逆转肿瘤细胞多药耐药性的研究[J]. 华西医科大学学报, 1998, 29(1):16-20.  
[3] 刘树业,陈秀琴,张志友. 血液和组织中抗癌药物阿霉素的紫外-HPLC 分析[J]. 2002, 22(1):57-59.  
[4] Kim DH, Lee NY, Sung WJ, et al. Multidrug resistance as a potential prognostic indicator in acute myeloid leukemia with normal karyotypes[J]. Acta Haematol, 2005, 114(2):78-83.  
[5] Lee JJ, Swain SM. Development of novel chemotherapeutic agents to evade the mechanisms of multidrug resistance (MDR) [J]. Semin Oncol, 2005, 32(S7):22-26.  
[6] Davidson A, Dick G, Pritchard Jones K, et al. EVE/cyclosporin (etoposide, vincristine, epirubicin with high dose cyclosporin) chemotherapy selected for multidrug resistance modulation [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(18):2422-2427.  
[7] 叶祖光,王金华,孙爱续,等. 粉防己碱、甲基莲心碱和蝙蝠葛碱增强长春新碱诱导人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞凋亡[J]. 药学报, 2001, 36(2):96-99.  
[8] 肖希斌,谢兆霞,秦群. 甲基莲心碱抑制 K562/A02 细胞 GST- 的表达[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2005, 26(5):428-431.  
[9] 林秀梅,谢兆霞,秦群. 甲基莲心碱、红霉素对 K562/A02 细胞内谷胱甘肽的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2004, 29(3): 284-286.

[编辑:贺文]

