

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.10.004

• 基础研究 •

膈下逐瘀汤逆转裸鼠移植瘤MDR-1表达的实验

崔同建¹, 华杭菊², 张桂枫¹, 陈峥¹, 戴永美¹, 陈静波¹, 郑建萍¹

Experiment of Diaphragmatic Stasis Expelling Decoction Reversing MDR-1 Expression in Transplantation Tumor in Nude Mice

CUI Tongjian¹, HUA Hangju², ZHANG Guifeng¹, CHEN Zheng¹, DAI Yongmei¹, CHEN Jingbo¹, ZHENG Jianping¹

1. Department of Oncology Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou Provincial Clinical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2. Department of Oncology Medicine, People's Hospital of Fujian



Abstract: Objective To investigate the effects of diaphragmatic stasis expelling decoction on the multi-drug resistance gene expression in transplantable tumor cells in nude mice bearing cell line HCT-8/5-Fu. **Methods** MTT was applied to confirm the drug resistance of human colonic carcinoma cell line HCT-8/5-Fu and the cross resistance towards other chemotherapy drugs, such as VCR, VP-16 and DDP. The model of transplantable tumor in nude mice with stable drug resistance was established by planting resistant cell line HCT-8/5-Fu into the right armpit of BABL/c nude mice without thymus. A total of 28 nude mice were randomly divided into four groups: control group, diaphragmatic stasis expelling decoction group (DSED group), 5-Fu group and diaphragmatic stasis expelling decoction plus 5-Fu group (DSED+5-Fu group). The control group received an intragastric administration of 0.9% sodium chloride solution and others received an intraperitoneal injection of 5-Fu or an intragastric administration of traditional Chinese medicine. Drug delivery was lasted for 14 days before the mice were executed. The growth of transplantable tumors in nude mice in all groups was observed. MDR-1 expression in all tumor tissues was detected by RT-PCR. **Results** Tumor inhibition rates of DSED+5-Fu group, DSED group and 5-Fu group were 54.9%, 32.4%, and 7.0% respectively ($P < 0.01$). RT-PCR results showed that the expression amounts of MDR-1 mRNA in DSED+5-Fu group and DSED group were obviously less than that in control group ($P < 0.01$). The expression amount of MDR-1 mRNA in 5-Fu group was increased slightly compared with the control group with no statistical significance. **Conclusion** Diaphragmatic stasis expelling decoction has inhibitory effect on the growth of transplantable tumor in nude mice with multi-drug resistance to colon carcinoma. The mechanism may be related to diaphragmatic stasis expelling decoction reversing MDR-1 mRNA expression of transplantable tumor in nude mice, therefore to enhance the sensitivity to drugs of tumor cells.

Key words: Nude mice; HCT-8/5-Fu; MDR-1; Diaphragmatic stasis expelling decoction (DSED)

摘要: 目的 探讨膈下逐瘀汤对HCT-8/5-Fu裸鼠移植瘤多药耐药基因MDR-1表达的影响。**方法** MTT法确认人结肠腺癌细胞HCT-8/5-Fu的耐药性及对其他化疗药VCR、VP-16、DDP的交叉耐药性后,将耐药细胞HCT-8/5-Fu接种于BALB/c无胸腺裸鼠右腋下,建立耐药性稳定的裸鼠移植瘤模型。移植瘤裸鼠模型随机分为四组:空白对照组(对照组)、5-Fu组、膈下逐瘀汤组(DSED组)、膈下逐瘀汤+5-Fu组(DSED+5-Fu组)。其中对照组予0.9%氯化钠溶液灌胃给药,其余组予腹腔注射5-Fu和(或)中药灌胃。连续给药14天后颈椎脱臼处死裸鼠。观察各组裸鼠移植瘤生长情况;RT-PCR法检测各瘤组织MDR-1 mRNA表达。**结果** 膈下逐瘀汤+5-Fu组、膈下逐瘀汤组、5-Fu组对裸鼠移植瘤的抑瘤率分别为54.9%、32.4%和7.0% ($P < 0.01$)。RT-PCR结果显示膈下逐瘀汤+5-Fu组及膈下逐瘀汤组MDR-1 mRNA的表达量与对照组相比明显下降 ($P < 0.01$), 5-Fu组与对照组相比MDR-1 mRNA表达量略有升高,但差异无统计学意义。**结论** 膈下逐瘀汤对大肠癌多药耐药裸鼠移植瘤生长具有抑制作用,其机制可能与膈下逐瘀汤通过逆转耐药移植瘤多药耐药基因表达,增强肿瘤细胞对药物的敏感度。

关键词: 裸鼠; HCT-8/5-Fu; MDR-1; 膈下逐瘀汤

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-10-25; 修回日期: 2014-03-03

作者单位: 1. 350001 福州, 福建省立医院肿瘤内科
福建医科大学省立临床医学院; 2. 福建省人民医院脑病肿瘤内科

作者简介: 崔同建 (1962-), 男, 硕士, 主任医师, 主要从事肿瘤内科的研究

0 引言

大肠癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率近年来呈逐年上升趋势,在我国已居恶性肿瘤发病率的第3位^[1]。大肠癌治疗早期以手术治疗为主,但对于晚期及术后复发转移的患者化疗

仍为主要治疗方法^[2]。以5-Fu为基础的FOLFOX、FOLFIRI方案为晚期大肠癌常用国际标准化疗方案,但是肿瘤细胞对这些高选择、多靶点的化疗药存在多药耐药性,肿瘤细胞的多药耐药是化疗失败的主要原因。因此寻找高效低毒的多药耐药逆转剂是当前肿瘤化疗亟待解决的难题。膈下逐瘀汤出自清代王清任《医林改错》,具有活血化瘀,行气止痛之功。现代研究表明,膈下逐瘀汤能够抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、提高抑瘤率、提高肿瘤晚期患者生活质量的作用^[3-5]。本实验通过建立耐药性稳定的HCT-8/5-Fu裸鼠移植瘤模型,观察膈下逐瘀汤对耐药移植瘤MDR-1 mRNA的表达,为膈下逐瘀汤逆转恶性肿瘤耐药,提高化疗效果提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人结肠腺癌细胞HCT-8/5-Fu、HCT-8细胞购买于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 实验动物

BALB/C-nu/nu裸小鼠(4~6周),雄性,体重17~21 g,共28只,购于上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:SCXK(沪)2012-0002。饲养于福建中医药大学实验动物中心屏障环境,饲料、饮水机垫料、笼具均经高压蒸汽灭菌后使用。

1.3 实验药物

膈下逐瘀汤主方组成为:五灵脂、当归、牡丹皮、赤芍、乌药、延胡索、甘草、香附、红花、枳壳、川芎、桃仁等纯中药材,购于福建省立医院,按照常规煎药方法水煎两次,合并两次水煎药,浓缩至1 g/ml中药浓缩液。氟尿嘧啶(5-Fu)、长春新碱(VCR)、依托泊苷(VP-16)、顺铂(DDP)均购于福建省立医院。

1.4 实验试剂

RPMI 1640培养液、胰蛋白酶、胎牛血清、MTT液购于美国Gibco公司。RT-PCR试剂盒购于日本TaKaRa公司。MDR-1、 β -actin引物由GenBank数据库中获得基因序列:MDR1基因引物序列为(扩增产物大小为:144 bp):上游引物5'-TCGCTGCTATTATCCATGGAACATT-3',下游引物5'-TGCTGATGATCAGAGTACTGTTGGG-3',内参照 β -actin引物序列为(扩增产物大小为:157 bp):上游引物5'-GAGAGGGAAAATCGTGCGTGACA-3',下游引物5'-ACCCAAGAAGGAAGGCTGGAAAC-3'。

1.5 实验方法

1.5.1 细胞培养

将人结肠腺癌耐药细胞HCT-8/5-Fu、敏感细胞HCT-8用RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清、100 u/ml青霉素、100 μ g/ml的链霉素)常规细胞培养。耐药培养体系中加入终浓度为2.0 mg/L的5-Fu以维持耐药细胞的耐药性。皮下接种前2周,耐药细胞停用5-Fu,进行常规细胞培养。

1.5.2 MTT检测细胞耐药性

取对数生长期贴壁细胞HCT-8、HCT-8/5-Fu,0.25%胰酶消化、离心后,经细胞计数板计数后调至 1×10^5 /ml的细胞悬液。接种于96孔培养板中,每孔加入100 μ l上述细胞悬液,孵育24 h后分别加入5种不同浓度的VCR、5-Fu、DDP、VP-16四组化疗药,每种化疗药设5个复孔,设不加化疗药物的实验对照组和不加细胞的空白对照组。再次孵育24 h,弃上清液,每孔再次加入10 μ l 5 mg/ml MTT液,孵育4 h。弃上清液,每孔加入100 μ l DMSO,均匀振荡10 min。用酶联仪OD570 nm处测各孔的吸光值。计算抑制率、耐药倍数。SPSS16.0计算药物半数抑制浓度(IC_{50}),抑制率(%)=(对照组OD值-实验组OD值)/对照组OD值 $\times 100\%$,耐药倍数=耐药细胞 IC_{50} /敏感细胞 IC_{50} 。

1.5.3 裸鼠移植瘤模型的建立及给药

将对数生长期HCT-8/5-Fu细胞 4×10^7 /ml接种于28只裸小鼠右腋下,12天后,肿块平均体积为100 mm³,将上述裸鼠随机分为四组:对照组、5-Fu组、膈下逐瘀汤组、膈下逐瘀汤+5-Fu组,四组均每天给药1次,连续给药14天后颈椎脱臼处死裸鼠,给药剂量及途径,见表1。接种后第3、6、9、12天、给药后第3、6、9、12天及处死,当天用游标卡尺测量每组裸鼠移植瘤长径(a)、短径(b),计算瘤体体积。肿瘤体积计算:V=a \times b²/2。末次给药24 h后,剥离瘤体组织。称瘤重,计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.5.4 RT-PCR检测MDR-1 mRNA的表达 用Trizol法提取移植瘤总RNA。内参照采用 β -actin基因,引物为根据Gibco公司说明书配置20 μ l的反应体系。采用1 μ l进行PCR扩增。扩增条件为95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共35个循环,72 $^{\circ}$ C再延伸5 min。扩增产物大小为144 bp。取PCR扩增产物上样于2%琼脂糖凝胶电泳(80V,3 min)。凝胶图像系统扫描成像,扩增条带用Quantity One软件分析,用MDR-1与 β -actin灰度比值表示MDR-1基因表达水平。

表1 各组给药方案

Table1 Dosage regimen in each group

| Groups | n | Experimental drug | Route of administration | Time (days) |
|------------|---|-------------------|--|-------------|
| Control | 7 | Normal saline | Gastric gavage | 14 |
| 5-Fu | 7 | 5-Fu | Intraperitoneal injection | 14 |
| DSED | 7 | DSED | Gastric gavage | 14 |
| DSED +5-Fu | 7 | DSED +5-Fu | Intraperitoneal injection+Gastric gavage | 14 |

Notes: DSED: diaphragmatic stasis expelling decoction

1.6 统计学方法

采用SPSS16.0统计软件进行分析, 计量资料用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药细胞HCT-8/5-Fu多药耐药性的确立

HCT-8/5-Fu细胞株具有多药耐药特性, 5-Fu对耐药细胞的耐药倍数41.94。见表2。同时该耐药细胞对结果不同、机制各异的化疗药VCR、DDP和VP-16均产生不同程度的耐药性。符合肿瘤细胞对一种化疗药产生耐药性后, 对机制不同、结构各异其他化疗药产生交叉耐药的特性。

表2 HCT-8、HCT-8/5-Fu组细胞对化疗药物的敏感度 ($\bar{x}\pm s$)

Table2 Sensitivity to chemotherapy drugs in two groups ($\bar{x}\pm s$)

| Groups | IC ₅₀ (umol/L) | | Resistance index (RI) |
|--------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | HCT-8 | HCT-8/5-Fu | |
| 5-Fu | 4.5±0.14 | 188.73±0.31 ^a | 41.94 |
| DDP | 2.56±0.04 | 11.44±0.35 ^a | 4.47 |
| VCR | 1.59±0.01 | 8.33±0.27 ^a | 5.24 |
| VP-16 | 1.37±0.04 | 9.74±0.34 ^a | 7.11 |

Notes: ^a: $P<0.01$, compared with HCT-8

2.2 各组瘤体的生长情况

裸鼠右腋下接种HCT-8/5-Fu, 观察裸鼠接种部位变化。刚接种时裸鼠接种部位肿胀, 第三天可看到米粒大小的小结节、质硬、可移动, 肿块逐日增大, 与周围组织粘连, 肿块表面可见丰富的血管网分布。各组裸鼠肿瘤的生长曲线, 见图1。

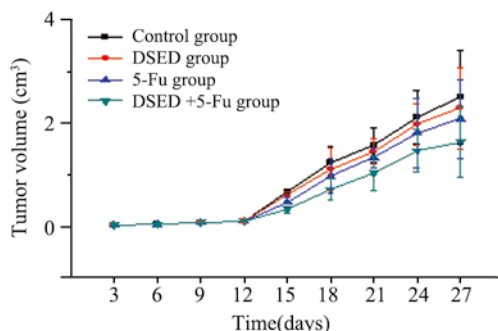


图1 裸鼠肿瘤生长曲线

Figure1 Growth curves of the tumor in nude mice

2.3 肿瘤抑制率

给药14天后颈椎脱臼处死裸鼠。剥取瘤组织称瘤重, 见表3。

表3 各组裸鼠平均瘤重、抑瘤率 ($\bar{x}\pm s$)

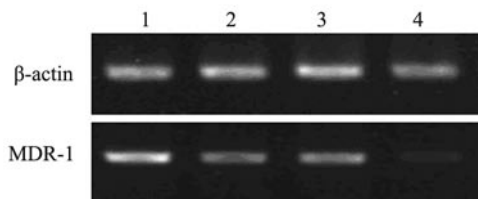
Table3 Average tumor weight and inhibition rates in all groups ($\bar{x}\pm s$)

| Groups | Weight (g) | Inhibition rates(%) |
|------------|------------------------|---------------------|
| Control | 3.51±0.53 | 0 |
| 5-Fu | 3.26±0.26 ^a | 7 |
| DSED | 2.37±0.53 ^b | 32.4 |
| DSED +5-Fu | 1.58±0.31 ^b | 54.9 |

Notes: ^a: $P>0.05$, compared with 5-Fu and DSED group; ^b: $P<0.03$, compared with control group

2.4 多药耐药基因MDR-1 mRNA表达情况

RT-PCR结果显示, 与对照组、5-Fu组相比, 膈下逐瘀汤+5-Fu组及膈下逐瘀汤组裸鼠移植瘤中MDR-1 mRNA表达量均显著降低 ($P<0.01$), 5-Fu组MDR1 mRNA的表达与对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$), 见图2、表4。



1: 5-Fu group; 2: DSED group; 3: control group; 4: DSED +5-Fu group

图2 RT-PCR检测瘤组织内MDR-1及β-actin的表达

Figure2 Expression of MDR1 and β-actin in all groups detected by RT-PCR

表4 各组裸鼠移植瘤MDR-1mRNA的相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table4 MDR-1mRNA expression in all groups of transplantation tumor in nude mice ($\bar{x}\pm s$)

| Groups | n | MDR-1 mRNA |
|------------|---|-------------------------|
| DSED +5-Fu | 7 | 4.62±0.27 ^a |
| DSED | 7 | 9.36±0.31 ^a |
| 5-Fu | 7 | 23.97±0.04 ^b |
| Control | 7 | 22.38±0.35 |

Notes: ^a: $P<0.01$, compared with control group; ^b: $P>0.05$, compared with control group

3 讨论

多药耐药是化疗失败的主要原因, 肿瘤多药耐药是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药产生耐药后, 同时对一些未接触过的结构和机制各异的抗肿瘤药产生交叉耐药现象^[6]。目前逆转MDR-1的化学药物主要为针对MDR-1的编码产物P-gp的逆转剂, 共包括3代, 第一代环孢素、维拉帕米和奎尼丁等。第二代主要有: 右维拉帕米、右尼古地平、Psc833和Vx710。第三代包括苯甲酰亚胺衍化物和

环丙基二苯并环庚烷物质等,此外还包括免疫逆转MDR-1、基因技术逆转MDR-1、核酶逆转MDR等逆转方法。这些逆转剂等因存在心脏毒性、肾脏毒性、肝毒性、免疫功能抑制等不良反应而限制了其临床应用^[7]。中医药由于不良反应小而受到广大学者的关注,现代分子生物学研究表明丹皮、姜黄素、三七、毛冬青等^[8-11]对耐药均有不同程度的逆转作用。针对西药单体靶点单一的特点,我们力图寻找多靶点、多途径、高效低毒的复方中药逆转化疗耐药,提高化疗效果。

本实验先用MTT法检测耐5-Fu人结肠腺癌细胞HCT-8/5-Fu的耐药性,结果显示,本细胞株对5-Fu具有良好的耐药性,耐药倍数为41.94。通过对DDP、VP-16、VCR的三种结构及机制不同的化疗药进行耐药性分析,结果显示耐药细胞对三种化疗药均产生不同程度的耐药性。符合肿瘤细胞对一种化疗药产生耐药性后,对机制不同、结构各异其他化疗药产生交叉耐药的特性^[12],明确了体外诱导人结肠耐药细胞HCT-8/5-Fu耐药性稳定的特点。通过造模裸鼠耐药人结肠腺癌移植瘤,药物干预后结果显示:膈下逐瘀汤+5-Fu组肿瘤抑制率54.9%高于膈下逐瘀汤组及5-Fu组肿瘤抑制率,差异具有统计学意义。而膈下逐瘀汤+5-Fu组肿瘤抑制率与膈下逐瘀汤组相比,差异具有统计学意义($P<0.01$)。从而说明膈下逐瘀汤能够提高化疗有效率,与化疗药合用对大肠癌耐药裸鼠移植瘤生长具有抑制作用。

RT-PCR检测MDR-1 mRNA表达,结果发现,膈下逐瘀汤+5-Fu组和膈下逐瘀汤组的逆转和翻译水平显著下降,初步证实膈下逐瘀汤通过逆转MDR-1基因的表达,增强肿瘤细胞对药物的敏感度。

综上所述,膈下逐瘀汤对大肠癌多药耐药裸鼠移植瘤生长具有明显抑制作用,能够减缓肿瘤体积分的增长,抑制肿瘤生长,其机制可能为通过逆转MDR-1的表达而提高肿瘤细胞对药物敏感度。但同时,耐药问题与Bcl-2蛋白、肺耐药蛋白、谷胱甘肽S转移酶(GSTs)、拓扑异构酶II(Topo II)等多种因素有关,下一步我们将更加完善其他耐药指标的检测,以进一步明确耐药机制及其发挥祖国医学逆转恶性肿瘤耐药的临床应用。

参考文献:

[1] Wang JH, Li SR. Retrospective analysis of colorectal cancer screening and early diagnosis in China:1994-2005[J].Wei Chang Bing Xue, 2006, 11(4): 245-50.[王继恒,李世荣.我国结直肠癌

筛查和早期诊断十年回顾:1994-2005[J].胃肠病学,2006,11(4):245-50.]

[2] Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, et al. Recent advances in cancer therapy: an overview[J].Curr Pharm Des, 2010, 16(1):3-10.

[3] Huang YR,Zhou H,Fei XY, et al. Influence of GXZY decoction on expression and regulation of cancer gene bax,bcl-2,P53of human hepatocarcinoma cell[J].Zhong Xi Yi Jie He Gan Bing Za Zhi,2008, 18(6): 355-6,366.[黄廷荣,周虹,费新应,等.膈下逐瘀汤加减对人肝癌细胞bax、bcl-2、P53基因表达调控的影响[J].中西医结合肝病杂志,2008,18(6): 355-6, 366.]

[4] Lian YY, Zhao JR, Ren R, et al.Experimental study of decoction for removing blood stasis in diaphragm combined with cyclophosphamide on inducing apoptosis of Hca-f liver cancer mice[J]. Shan Xi Zhong Yi,2010,26(3):50-1,56. [连媛媛,赵金茹,任蕊,等.膈下逐瘀汤联合环磷酰胺诱导Hca-f肝癌小鼠细胞调亡的实验研究[J].山西中医,2010,26(3): 50-1, 56.]

[5] Zhang BN. Infradiaphragmatic Stasis-Expelling Decoction for survival quality of advanced pancreatic cancer [J].Liaoning Zhong Yi Za Zhi 2008, 35(10): 1518-9. [张宝南.膈下逐瘀汤对晚期胰腺癌生存质量的影响[J].辽宁中医杂志,2008,35(10): 1518-9.]

[6] Kim IJ, Bae YT, Kim SJ, et al. Determination and prediction of P-glycoprotein and multidrug-resistance-related protein expression in breast cancer with double-phase technetium-99m sestamibi scintimammography. Visual and quantitative analyses[J]. Oncology, 2006, 70(6): 403-10.

[7] Liao SL, Wang P. Research progress on multidrug resistance mechanism of cancer cells and its reversal agents[J].Guo Wai Yi Yao Kang Sheng Su Feng Ce, 2008, 29(1):7-11. [廖绍兰,王平.肿瘤多药耐药机制就逆转剂的研究进展[J].国外医药抗生素分册,2008,29(1): 7-11.]

[8] Sun HJ, Wang XQ, Yu LM, et al. The study of Paeonol for MDR's reverse action[J].Jie Pou Ke Xue Jin Zhan, 2000, 6(1):59-62.[孙慧君,王晓琦,于丽敏,等.丹皮酚对MDR逆转作用的研究[J].解剖科学进展,2000,6(1): 59-62.]

[9] Lu WD, Fu ZX, Tan Y, et al. Curcumin reverses multidrug resistance in HCT-8/VCR nude mice xenograft[J].Di San Jun Yi Da Xue Xue Bao,2011,33(4):376-80. [卢伟东,傅仲学,覃勇,等.姜黄素逆转结肠癌裸鼠移植瘤多药耐药研究[J].第三军医大学学报,2011,33(4): 376-80.]

[10] Shi YQ, Tian TD. Experiment of Panax Notoginseng Saponins reversing multi-resistance of K56/VCR cells in vitro[J]. Zhongguo Zhong Yi Yao Ke Ji, 2005, 12(5):292-4.[史亦谦,田同德.三七皂甙体外逆转K56/VCR细胞多药耐药的实验研究[J].中国中医药科技,2005,12(5): 292-4.]

[11] Zhao ZY. Influence of Llexonin on the cytotoxic effect of daunorubicin on leukemia cells[J]. Hunan Zhong Yi Za Zhi, 2003, 19(5):53.[赵早云.毛冬青甲素影响柔红霉素对白血病细胞的细胞毒作用研究[J].湖南中医杂志,2003,19(5): 53.]

[12] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(3): 273-86.

[编辑:黄园玲;校对:周永红]