文章编号:1000-5404(2006)11-1231-03

论著

常用抗肿瘤药物对KBV200耐药细胞株增殖抑制作用及苦参碱的耐药逆转研究

陈鸿雁[1], 王 驰[2], 余晓燕[1], 沈 娜[1], 张潜英[1], 蒋纪恺[3] (重庆医科大学:[1]附属第一医院耳鼻咽喉科, [2]基础医学院化学教研室, 重庆 400016; [3]汕头大学医学院分子生物学实验室, 汕头 515031)

提 要: 目的 探讨5种常用抗肿瘤药长春新碱、阿霉素、平阳霉素、顺铂、环磷酰胺对KBV200耐药细胞株的增殖抑制作用及苦参碱的耐药逆转作用。**方法** 以喉癌KBV200耐药细胞株为研究对象,采用MTT法观察5种抗肿瘤药物对其增殖抑制作用;并采用MTT法观察苦参碱对KBV200耐药细胞株的耐药逆转作用。**结果** 长春新碱、平阳霉素、环磷酰胺对KBV200耐药细胞株的增殖抑制作用差,而阿霉素和顺铂对KBV200耐药细胞株的抑制作用好;当苦参碱浓度大于200 μg/ml时对KBV200耐药细胞株具有直接抑制作用;苦参碱逆转KBV200耐药细胞株对长春新碱、阿霉素耐药的作用较强,逆转KBV200耐药细胞株对平阳霉素、顺铂、环磷酰胺的耐药作用较弱。**结论** KBV200耐药细胞株对长春新碱、平阳霉素、环磷酰胺3种药物有不同程度耐药;苦参碱能逆转KBV200耐药细胞株对长春新碱、阿霉素的耐药。

关键词: 抗肿瘤药物;KBV200细胞株;耐药逆转;苦参碱
中图法分类号: R282.71; R73-354; R979.1 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of 5 chemotherapeutic agents on KBV200 cell line and reverse effect on multidrug resistance of Matrine

CHEN Hong-yan[1], WANG Chi[2], YU Xiao-yan[1], SHEN Na[1], ZHANG Qian-ying[1], JIANG Ji-kai[3] ([1]Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital, [2]The Preclinical Medicine College, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, [3]Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of 5 chemotherapeutic agents including vincristine, adriamycin, pingyangmycin, cisplatin, cyclophosphamide on the KBV200 cell line and to study the reverse effect on the multidrug resistance of Matrine. **Methods** MTT assay was used to investigate the inhibition ability of 5 drugs on the cell line and the reverse effect on the multidrug resistance of Matrine. **Results** Vincristine, pingyangmycin, cyclophosphamide had less inhibitory effects than adriamycin, cisplatin on the KBV200 cell line. Matrine had the ability to reverse the multidrug resistance of the cell line to vincristine, adriamycin. **Conclusion** KBV200 cell line is multidrug-resistant to vincristine, pingyangmycin, cyclophosphamide. Matrine can enhance the sensitivity of KBV200 to the vincristine, adriamycin.

Key words: chemotherapeutic agent; KBV200 multidrug resistance cell line; reversion of multidrug resistance; Matrine

肿瘤细胞对化疗药物产生耐药是肿瘤治疗失败的重要因素之一。肿瘤细胞对多种药物产生耐药的原因相当复杂。据美国癌症协会统计,每年癌症患者约49万例死亡,其中61%与肿瘤内在性耐药有关,33%与肿瘤获得性耐药有关[1]。因此,研究逆转肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR)有重要的临床意义。目前国内外学者正积极寻找高效、低毒、作用靶点广泛的肿瘤耐药逆转剂。中药对肿瘤耐药的逆转是目前研究的热点。本实验采用MTT法,研究了临床常用的5种抗肿瘤药对KBV200细胞的抑制作用以及中药苦参碱对耐药细胞的逆转作用。

1 材料与方法

1.1 KBV200耐药细胞株

KBV200耐药细胞株是以KB细胞为亲本,通过诱变剂甲基磺酸酯刺激,然后在培养液中加入浓度递增的长春新碱(vincristine, VCR)诱导而得,在VCR浓度为200 nmol/L时生长良好,故取名KBV200。采用含10%小牛血清、青霉素、链霉素各100 U/ml的RPMI1640细胞培养液,在37 ℃饱和湿度5% CO_2孵箱中常规培养,每3~4天换液传代培养。实验前使用的KBV200细胞脱离VCR培养3个月。

1.2 药品与试剂

苦参碱(MW=248.36,纯度99.9%)由日本大正制药公司惠赠;小牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料研究所,56 ℃加热30 min灭活,-20 ℃存放备用,临用前37 ℃融化;

作者简介:陈鸿雁(1963-),女,重庆市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事头颈肿瘤方面的研究。电话:13101293395
通讯作者:蒋纪恺,E-mail:JKjiang@stu.edu.cn
收稿日期:2006-03-08;修回日期:2006-03-29

RPMI1640 培养液重蒸水配制，调节 pH 值为 7.2，过滤除菌，4 ℃保存备用；青链霉素用无菌生理盐水配制成为 1×10^5 U/ml，-20 ℃存放，临用前由 RPMI1640 培养液稀释成 100 U/ml；MTT（四甲基偶氮唑盐）购自北方同正生物制品公司；5 种抗肿瘤药物及维拉帕米均为国产。长春新碱：购自上海华联制药有限公司，规格 1 mg/支；阿霉素：购自浙江海正药业股份有限公司，规格 10 mg/瓶；平阳霉素：购自天津太和制药有限公司，规格 8 mg/支；顺铂：购自德州德药制药有限公司，规格 20 mg/支；环磷酰胺：购自江苏恒瑞医药股份有限公司，规格 0.1 g/瓶。

1.3 MTT 法测定抗肿瘤药物药物抑制 KBV200 耐药细胞株生长作用的药效方法

取对数生长期 KBV200 耐药细胞稀释至 $(1.5\sim2)\times10^5$/ml，于 96 孔细胞培养板中培养 1 d，加药，继续培养 4 d，弃去培养液，每孔加 0.5 mg/ml 的 MTT 20 μl 培养液，培养 4 h，弃去培养液，每孔加二甲基亚砜（DMSO）150 μl，待溶解后于 BIO-RAD Model 450 型酶标仪 570 nm 处测吸光度值[D(570)]，并计算肿瘤存活率，从而预测抗肿瘤药物对某种肿瘤细胞的抑制作用。

肿瘤细胞抑制率（%）=[1 - 实验孔 D(570)/对照孔 D(570)]×100% 。

细胞增殖抑制率大于或等于 50% 表示药物敏感检测阳性，即细胞对抗肿瘤药物敏感；反之，若抑制率小于 50%，则表示肿瘤细胞对抗肿瘤药物耐药。

1.4 用 MTT 法测定 5 种抗肿瘤药物对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用

处理组中加入不同浓度的抗肿瘤药物（各种药物浓度见结果），对照组除不含抗肿瘤药物外其他条件完全一致。

1.5 MTT 法测定苦参碱对 KBV200 耐药细胞株的逆转作用

1.5.1 苦参碱对 KBV200 耐药细胞株的直接抑制作用 收集 KBV200 耐药细胞，加入不同浓度的苦参碱，观察其对细胞的抑制作用。

1.5.2 苦参碱对 KBV200 耐药细胞株的逆转作用 选择对细胞无直接损害作用的苦参碱浓度，与不同浓度的抗肿瘤药物联合使用，观察其对 KBV200 耐药细胞株的逆转作用。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 5 种常用抗肿瘤药物对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用

2.1.1 长春新碱、平阳霉素、环磷酰胺对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用 长春新碱在 0.5、1.0、1.5 μg/ml 时，对 KBV200 耐药细胞株抑制作用较弱，抑制率分别为 12.8%、13.3% 及 14.0%。当浓度升高至 2.0 μg/ml 时，其抑制率增加到 47.01%，但继续增加浓度抑制率变化不大。

平阳霉素浓度为 5、10、15 μg/ml 及 20 μg/ml 时，其抑制率较低，分别为 14.02%、13.90%、15.01%、16.00%，而当浓度高达 25 μg/ml 时，抑制率明显上升为 70.00%，故低浓度平阳霉素对 KBV200 耐药细胞的抑制作用差。

环磷酰胺对细胞抑制率较低，在低浓度（1、2、3 μg/ml）时，仅为 12.2%、13.4%、14.8%，当浓度为 4 μg/ml 和 5 μg/ml 时，抑制率才缓慢上升为 26.9% 及 30.2%。

2.1.2 阿霉素、顺铂对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用 阿霉素对于 KBV200 耐药细胞株的抑制作用呈较明显浓度依赖关系，见图 1。顺铂对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用呈较明显浓度依赖关系，见图 2。

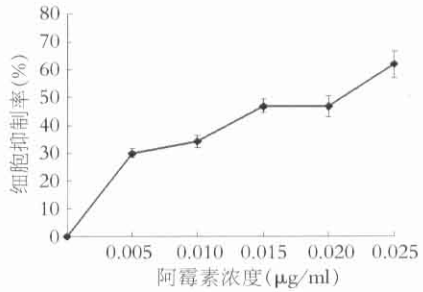


图 1 阿霉素对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用

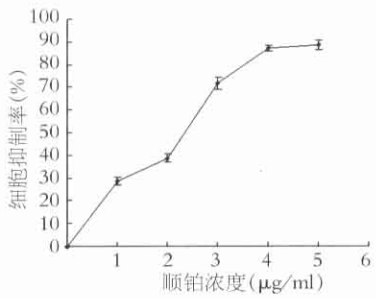


图 2 顺铂对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用

2.2 MTT 法测定苦参碱对 KBV200 耐药细胞株的直接抑制作用

苦参碱浓度为 100 μg/ml 时，对细胞生长无抑制作用；苦参碱浓度为 200 μg/ml 以上时，对细胞生长有明显的抑制作用，见图 3。

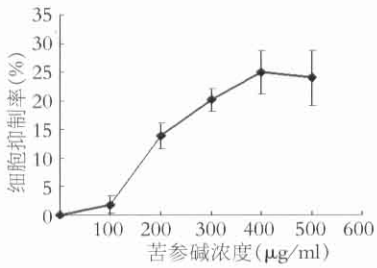


图 3 苦参碱对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用

2.3 MTT 法测定苦参碱（100 μg/ml）逆转 5 种肿瘤药物对 KBV200 细胞的耐药作用

2.3.1 苦参碱逆转 KBV200 耐药细胞株对长春新碱、阿霉素的耐药作用 苦参碱能逆转 KBV200 耐药细胞株对长春新

碱、阿霉素的耐药，且随着 VCR 和阿霉素浓度的增加，其逆转作用更明显，见图 4、5。

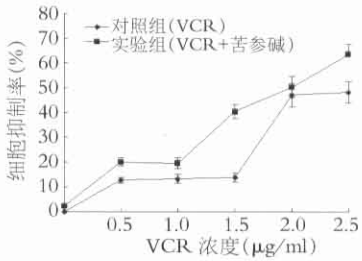


图 4　苦参碱逆转 KBV200 耐药细胞株对长春新碱的耐药作用

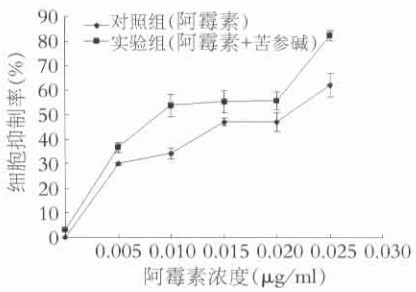


图 5　苦参碱逆转 KBV200 耐药细胞株对阿霉素的耐药作用

2.3.2　苦参碱逆转 KBV200 耐药细胞株对平阳霉素、顺铂、环磷酰胺的耐药作用　　苦参碱对于平阳霉素、顺铂、环磷酰胺均无增效作用。

3　讨论

自 1946 年 gillmant 和 phillips 报道氮芥类药物治疗造血系统肿瘤以来，化疗已成为恶性肿瘤治疗的三大手段之一。长春新碱、阿霉素、平阳霉素、顺铂、环磷酰胺等是临床常用抗肿瘤药物，但目前抗肿瘤药物治疗的总有效率仅为 14%。阻碍化疗取得更好疗效的原因很多，多药耐药(multidrug resistance，MDR)是主要原因之一。肿瘤细胞的多药耐药性是指肿瘤一旦对某种化疗药物产生耐药性，就同时对其他结构上无关、作用机制各异的药物也产生交叉耐药性，是一种特殊的广谱耐药现象，是临床化疗失败的重要原因，其发生机制主要有：①细胞膜蛋白异常；②酶表达异常；③其他因素；如细胞凋亡相关基因如 bcl-1、c-myc、突变 P-53 等，均与耐药性的发生有一定关系[2]。

本实验通过 MTT 法，以长春新碱诱导的 KBV200 耐药细胞为研究对象，探讨了临床常用 5 种抗肿瘤药物对该细胞的抑制作用。结果表明，KBV200 细胞对不同药物的敏感性变化较大，长春新碱、平阳霉素、环磷酰胺对 KBV200 细胞抑制作用较弱，有不同程度耐药，而阿霉素及顺铂作用较强。实验中还显示 VCR 浓度在 2.0 μg/ml 时，其抑制率最高，为 47.01%，若继续增加浓度其抑制率变化不大。而在本实验前期研究显示，低浓度 5-Fu(20 μg/ml)对细胞抑制作用与高浓度 5-Fu 对细胞抑制作用相似，因此肿瘤药物抑制细胞的作用并非都随药物浓度增高而增加。实验表明，药物敏感实验在肿瘤化疗中具有重要临床指导意义，可以为合理选用化疗药物及选择药物的剂量浓度提供依据，避免化疗的盲目性，减低毒副作用，提高化疗的有效率。

在长期的临床实践及实验研究中，人们逐渐发现化疗与中医药联合应用能提高临床疗效，优于单纯西药治疗。中医药和中西医结合在治疗肿瘤中的作用归结为减毒增效。苦参碱是豆科槐属植物苦参中提取的主要成分，是我国传统中草药，近年来发现苦参碱具有体外抗肿瘤的作用，可抑制肿瘤细胞增殖和转移、促进凋亡、诱导肿瘤细胞分化[3]。研究表明，苦参碱对肝癌、脑胶质瘤、白血病细胞具有增殖抑制作用[4]。本实验结果显示，苦参碱在浓度大于 200 μg/ml 时，对 KBV200 细胞具有直接的抑制作用。李旭芬等[5]发现苦参碱在 1.5 mg/ml 浓度时，对 K562 及其敏感多药耐药细胞株 K562/vin、K562/dox 的抑制率分别为 77.88%、69.4%、69.1%，并具有诱导凋亡作用。本研究显示，100 μg/ml 苦参碱能逆转 KBV200 细胞对长春新碱、阿霉素的耐药，而且随着长春新碱和阿霉素浓度的增加，其逆转作用更明显，因此苦参碱提高了 KBV200 细胞对长春新碱和阿霉素的敏感性。文献[6]报道，苦参碱不仅在体外，而且在体内均有抑制肿瘤细胞增殖的作用，其作用机制有诱导分化、抑制转移、影响细胞周期和端粒酶等。因此，苦参碱可能成为一种理想的耐药逆转制剂。但其作用机制尚不明确，需进一步研究，以期更好地为临床提供理论基础。

参考文献：

[1] LANKAS G R, WISE L D, CARTWRIGHT M E, *et al*. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice[J]. Roprod Toxicol, 1998, 12(4): 457-463.

[2] STAVROVSKAYA A A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells[J]. Biochemistry (Mosc), 2000, 65(1): 95-106.

[3] ZHANG L P, JIANG J K, TAM J W, *et al*. Effects of Matrine on proliferation and differentiation in K-562 cells[J]. Leuk Res, 2001, 25(9): 793-800.

[4] 刘小珊，蒋纪恺，张　彦，等. 苦参碱对人白血病 K562 细胞胞内酪氨酸蛋白磷酸化的影响[J]. 中华实用中西医杂志，2004，4(17)：3030-3031.

[5] 李旭芬，张苏展，郑　树，等. 苦参碱对 K562 及其多药耐药细胞 K562/vin、K562/dox 的诱导凋亡作用[J]. 实用癌症杂志，2000，15(6)：566-568，609.

[6] 陈伟忠，林　勇，谢渭芬. 苦参碱抗肿瘤机制的研究进展[J]. 肿瘤学杂志，2002，8(1)：4-6.

(编辑　栾　嘉)