文章编号:1000-5404(2012)13-1281-04

论著

汉防己碱对肝癌 Hep3b 细胞生长的双向作用

蒋心惠[1],黄开顺[2],滕永真[2],何百成[1],周岐新[1] (400016 重庆,重庆医科大学:药学院药物分析教研室[1],生命科学院[2])

[摘要] **目的** 考察汉防己碱(tetrandrine,Tet)对肝癌 Hep3b 和 Hep3b/5-Fu 细胞生长的影响。**方法** 采用体外细胞培养,结合流式细胞术、MTT 和 Western blot 方法研究 Tet(0.33~1.0 μg/ml)对肝癌 Hep3b 及 Hep3b/5-Fu 细胞生长的作用特点。**结果** Tet 在 0.33~1.0 μg/ml 时呈浓度依赖性降低 Hep3b 细胞存活率;0.5 和 1.0 μg/ml 显著提高 5-Fu 对 Hep3b 细胞的 IC_{50},但降低 5-Fu 对 Hep3b/5-Fu 细胞的 IC_{50};0.33 μg/ml 的 Tet 明显增加 cDDP 对 Hep3b/5-Fu 细胞的 IC_{50},而 0.5 和 1.0 μg/ml 显著降低 cDDP 对 Hep3b/5-Fu 细胞的 IC_{50}($P<0.01$)。1.0 μg/ml 的 Tet 作用 48 h 后使 Hep3b 细胞中的 P-gp 和 MRP1 表达明显上调($P<0.05$)。Tet 单用对 Hep3b 细胞生长有一定抑制作用,高浓度 Tet 逆转 Hep3b/5-Fu 细胞对 5-Fu 耐药和增强 cDDP 对 Hep3b/5-Fu 细胞生长的抑制作用,但低浓度分别促进 Hep3b 细胞和 Hep3b/5-FU 细胞对 5-Fu 和 cDDP 耐药。**结论** Tet 对 Hep3b 和 Hep3b/5-Fu 细胞生长呈浓度相关的双向作用,其促进耐药细胞发展的机制至少与提升 P-gp 和 MRP1 表达有关。

[关键词] 汉防己碱;肝癌 Hep3b 细胞;逆转耐药性;促进耐药
[中图法分类号] R73-361; R735.7; R979.19 [文献标志码] A

Dualistic effects of tetrandrine on growth in human hepatoma 3b cells

Jiang Xinhui[1], Huang Kaishun[2], Teng Yongzhen[2], He Baicheng[1], Zhou Qixin[1] ([1]Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, [2]College of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of tetrandrine (Tet) on the growth in human hepatoma 3b (Hep3b) cells. **Methods** Flow cytometry, MTT assay, and Western blotting were used to investigate the effects of Tet (0.33 to 1.0 μg/ml) on the growth of Hep3b and Hep3b/5-Fu cells. **Results** Tet resulted in a decreased survival rate of Hep3b cells in a dose-dependent manner. Tet of 0.5 and 1.0 μg/ml significantly increased the IC_{50} of 5-fluorouracil (5-Fu) to Hep3b cells, whereas reduced the IC_{50} of 5-FU to Hep3b/5-Fu cells. Tet of 0.33 μg/ml significantly increased the IC_{50} of Cisplatin (cDDP) to Hep3b/5-Fu cells, but that of 0.5 and 1.0 μg/ml significantly reduced its IC_{50} to Hep3b/5-Fu cells. Treatment of 1.0 μg/ml Tet for 48 h obviously resulted in an up-regulation of P-gp and MRP1 in the Hep3b cells ($P<0.05$). Our results indicated that Tet exerted inhibitory effect on Hep3b growth, and it at high concentration reversed the resistance of Hep3b/5-Fu cells to 5-Fu and enhanced the cytotoxic effect of cDDP on these Hep3b/5-Fu cells. **Conclusion** Tet shows a dose-related dualistic effects on the growth of Hep3b and Hep3b/5-Fu cells, which might be related with the up-regulating of P-gp and MRP1.

[**Key words**] tetrandrine; Hep3b cells; reversal of drug resistance; accelerate drug resistance

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071462). Corresponding author: Zhou Qixin, Tel:86-23-68485161, E-mail: cqzhouqx@yahoo.com.cn

研究表明,因恶性肿瘤死亡的患者中有 90% 以上存在耐药现象[1]。因此对肿瘤耐药现象及其治疗方法的研究具有同样的重要性。近年来有大量关于汉防己碱(tetrandrine,Tet)抗肿瘤作用的报道。He 等[2]发现 Tet 对包括人乳腺癌 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231、人结肠癌 HCT116 和 SW460、人前列腺癌 PC3 和 DU145 等多种人肿瘤细胞株作用的 IC_{50} 为 1~5 μmol/L;Tet 与阿霉素、长春新碱、顺铂等抗肿瘤药物联合使用有协同作用或逆转肿瘤耐药[3-5]。研究[6]报道,盐酸小檗碱除具抗肿瘤作用外,在一定浓度下能促进培养

[基金项目] 国家自然科学基金(81071462)
[通信作者] 周岐新,电话:(023)68485161,E-mail: cqzhouqx@yahoo.com.cn

的肿瘤细胞耐药性产生和耐药基因表达。有鉴于此，有必要对Tet的抗肿瘤作用进行系统审视和评价。因此，本实验以体外培养的人肝癌Hepb3b细胞敏感株和耐药株为对象，研究Tet单用或与其他抗肿瘤药合用对肿瘤细胞生长的影响，以获得Tet作为抗肿瘤药物或肿瘤多药耐药逆转剂用于临床治疗各类肿瘤的可靠实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Hep3b和Hep3b/5-Fu肝癌细胞系（重庆市肝病研究所提供），P-gp、MRP1、LRP鼠抗人单抗（购自New Marker公司），Trizol Reagent试剂盒（Gibco Company，USA），NBS（杭州四季青生物工程材料有限公司），完全RPMI1640细胞培养基（HyClone，USA），四甲基偶氮唑蓝（MTT）（Sigma Company，USA），碘化丙啶（PI）（Sigma Company，USA），5-氟尿嘧啶（5-Fu）（Sigma Company，USA），顺铂（cDDP）（山东齐鲁制药厂），汉防己碱（Tet）（中国药品生物制品检定所，>98%），胰酶细胞消化液（Beyotime，碧云天生物技术研究所），细胞冻存用DMSO（Sigma Company，USA），实验用水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

细胞培养板（Costar，USA），SW CJ-2FD型超净工作台（苏净集团安泰公司），CO_2细胞培养箱（Thermo Forma，USA），TE2000-U倒置相差显微镜（Nikon，Japan），流式细胞仪（Becton Dickson FACScan，USA），TDZ5-WS多管架自动平衡离心机（长沙湘仪离心机仪器有限公司），TCS-SP2型激光共聚焦扫描显微镜（Leica，Germany），E201型pH计（上海展宁电光技术有限公司），酶联免疫分析仪（SUNRISE TECAN，奥地利），LDZX-40BI型立式自动电热压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂），WSZ-261-79电热恒温水浴箱（北京医疗器械设备厂），BP 211D分析天平（Germany，Sartorius company）。

1.2 细胞培养及形态学观察

细胞在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱中培养。培养液为含10%热灭活NBS的完全RPMI1640细胞培养基。用0.125%胰蛋白酶/0.02% EDTA消化传代。

取生长状态良好的Hep3b/5-Fu细胞和Hep3b细胞消化后置六孔板中，在细胞生长达50%融合时在相差显微镜下观察细胞的形态变化并照相。

1.3 汉防己碱单用、联合5-Fu或cDDP对Hep3b与Hep3b/5-Fu细胞生长的影响

取100 μl对数生长期Hep3b与Hep3b/5-Fu细胞5×10^5/ml分别接种于96孔板中，培养24 h后培养基改为含不同浓度Tet（0.33、0.50、1.00 μg/ml）的培养液120 μl，每一浓度种3个复孔，继续培养24 h后，再分别加入含不同浓度5-Fu的培养基，使5-Fu的终浓度分别为166.7、83.33、27.78、8.333 μg/ml。或加入含不同浓度的cDDP的培养基，使cDDP终浓度分别为1.67、5.56、16.67、33.33 μg/ml。继续培养48 h后，加MTT（1 mg/ml）20 μl，置于37℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中继续培养4 h后取出，离心弃去上清液，于残留物中加入二甲亚砜（DMSO）150 μl，置于摇床振摇15 min，使生成的甲瓒充分溶解，上酶联免疫分析仪，于570 nm波长处测定每孔的光密度值，计算存活率。

$$存活率=\frac{实验孔光密度值}{对照孔光密度值}\times100\%$$

1.4 Tet对细胞耐药相关蛋白表达的影响

采用Western blot法分别检测P-糖蛋白（P-gp）、多药耐药相关蛋白（MRP1）及肺耐药相关蛋白（LRP）的表达水平。方法简述如下：取Hep3b/5-Fu及Hep3b细胞接种于100 ml培养瓶中，培养24 h后，加入含不同浓度Tet（0.33、0.50 μg/ml和1.00 μg/ml）的培养液，继续培养48 h后用预冷的PBS漂洗2次，倾倒干净残余液体后，每10^6细胞加入0.2 ml RIPA和2 μl PMSF。其余操作按照说明书进行。重复3次，结果使用灰度扫描的方法比较得出相对比。

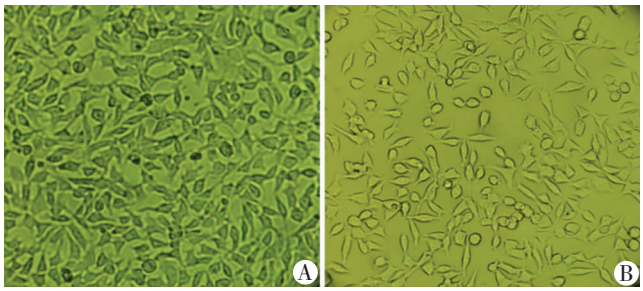
1.5 统计学方法

两组比较采用t检验方法。

2 结果

2.1 细胞形态比较

相差显微镜下见Hep3b细胞为梭形，排列紧密，大小均匀，贴壁生长。与Hep3b细胞相比，Hep3b/5-Fu细胞形态无明显变化，但细胞生长变慢（图1）。



A：Hep3b细胞；B：Hep3b/5-Fu细胞

图1 培养2 d后Hep3b和Hep3b/5-Fu细胞形态 （相差显微镜 ×400）

2.2 Tet对Hep3b与Hep3b/5-Fu细胞存活率的影响

表1显示，在0.33～1.00 μg/ml浓度范围内，Tet对培养的Hep3b细胞呈浓度依赖杀伤作用；1.00 μg/ml使细胞的存活率下降至64%左右。但所用Tet浓度对Hep3b/5-Fu细胞无明显杀伤作用。

表1 Tet对Hep3b与Hep3b/5-Fu细胞存活率的影响 [$n=6$，($\bar{x}\pm s$)%]

Tet浓度	Hep3b	Hep3b/5-Fu
0.33 μg/ml	82.87±6.89	106.3±4.28
0.50 μg/ml	85.37±6.43	118.3±6.51
1.00 μg/ml	63.77±3.41	123.05±10.34

2.3 Tet对5-Fu抑制Hep3b和Hep3b/5-Fu细胞生长的影响

表2显示，Tet 0.50和1.00 μg/ml明显增加5-Fu对Hep3b细胞作用的IC_{50}，而Tet 1.00 μg/ml明显降低5-Fu对Hep3b/5-Fu

细胞生长的 IC_{50} 值。结果提示,Tet 0.50 和 1.00 μg/ml 可减弱 5-Fu 对人肝癌细胞 Hep3b 对的生长抑制作用,但增强 5-Fu 对耐药 Hep3b/5-Fu 细胞的生长抑制作用($P<0.01$)。

表 2 Tet 对 5-Fu 抑制 Hep3b 与 Hep3b/5-Fu 细胞生长的 IC_{50} 影响($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tet 浓度	Hep3b	Hep3b/5-Fu
0 μg/ml	231.71 ± 10.32	301.91 ± 16.53
0.33 μg/ml	224.92 ± 11.20	345.50 ± 36.87
0.50 μg/ml	277.41 ± 15.38[a]	297.92 ± 20.47
1.00 μg/ml	479.83 ± 25.39[a]	4.73 ± 1.25[a]

a:$P<0.01$,与 0 μg/ml 比较

2.4 Tet 对 cDDP 抑制 Hep3b 与 Hep3b/5-Fu 细胞生长的影响

表 3 显示,Tet 有呈浓度依赖性提升 cDDP 对 Hep3b 细胞作用的 IC_{50} 值,但统计学上无意义。Tet 低浓度(0.33 μg/ml)显著增加 cDDP 对 Hep3b/5-Fu 细胞的 IC_{50},但高浓度(0.50 ~ 1.00 μg/ml)则显著降低 IC_{50}。结果提示,Tet 可促进敏感的 Hep3b 和耐药的 Hep3b/5-Fu 细胞对 cDDP 的耐药;但高浓度的 Tet 则显著增强 cDDP 对 Hep3b/5-Fu 细胞的生长抑制作用($P<0.01$)。

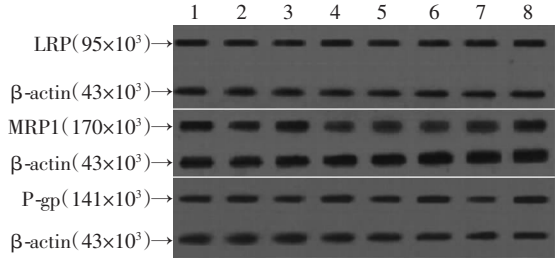
表 3 Tet 对 cDDP 抑制 Hep3b 和 Hep3b/5-Fu 细胞生长的 IC_{50} 影响($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tet 浓度	Hep3b	Hep3b/5-Fu
0 μg/ml	4.68 ± 1.04	25.73 ± 5.32
0.33 μg/ml	4.97 ± 0.87	43.93 ± 3.61[a]
0.50 μg/ml	5.60 ± 1.25	15.50 ± 2.35[a]
1.00 μg/ml	5.21 ± 1.42	0.52 ± 0.36[a]

a:$P<0.01$,与 0 μg/ml 比较

2.5 Tet 对 Hep3b 和 Hep3b/5-Fu 细胞耐药相关蛋白表达的影响

当无 Tet 存在时 3 种耐药基因蛋白在 Hep3b 细胞中的表达均高于 Hep3b/5-Fu 细胞;其中 P-gp 表达量明显高于 Hep3b/5-Fu 细胞。Tet 作用 48 h 后使 Hep3b 细胞 3 种耐药基因表达均呈下降趋势,但与未用 Tet 组相比无明显差异。Tet 作用 48 h 后使 Hep3b/5-Fu 细胞除 LRP 基因外的其他 2 个基因表达上调;其中,0.33 μg/ml 使 P-gp 表达显著上调,1.00 μg/ml 使 P-gp 和 MRP1 的表达均明显上调($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 2 和表 4。



1:Hep3b;2:Hep3b + 0.33 μg/ml Tet;3:Hep3b + 0.50 μg/ml Tet;4:Hep3b + 1.00 μg/ml Tet;5:Hep3b/5-Fu;6:Hep3b/5-Fu + 0.33 μg/ml Tet;7:Hep3b/5-Fu + 0.50 μg/ml Tet;8:Hep3b/5-Fu + 1.00 μg/ml Tet

图 2 Tet 对 Hep3b 和 Hep3b/5-Fu 细胞耐药相关蛋白表达影响

表 4 Tet 作用于 Hep3b 和 Hep3b/5-Fu 细胞 48 h 后 3 种耐药基因蛋白质的表达($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tet 浓度	检测指标	Hep3b	Hep3b/5-Fu
0 μg/ml	p-gp	1.050 ± 0.327	0.554 ± 0.153
	MRP1	0.844 ± 0.120	0.601 ± 0.102
	LRP	0.698 ± 0.127	0.681 ± 0.051
0.33 μg/ml	p-gp	1.028 ± 0.370	0.950 ± 0.100[b]
	MRP1	0.791 ± 0.114	0.735 ± 0.244
	LRP	0.617 ± 0.102	0.585 ± 0.023
0.50 μg/ml	p-gp	0.601 ± 0.138	0.635 ± 0.229
	MRP1	0.633 ± 0.320	0.605 ± 0.125
	LRP	0.588 ± 0.085	0.619 ± 0.136
1.00 μg/ml	p-gp	0.840 ± 0.022	0.942 ± 0.177[a]
	MRP1	0.712 ± 0.194	0.895 ± 0.161[a]
	LRP	0.646 ± 0.149	0.697 ± 0.014

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 Hep3b 细胞比较

3 讨论

众所周知,天然产物是抗肿瘤药物的重要来源[7],而植物源性的抗肿瘤有效成分及其人工半合成品早已用于临床肿瘤疾病的治疗[8-9]。Tet(亦称粉防己碱,汉防己甲素)是中药防己(Stephaniae Tetrandrae)根的生物碱。该生物碱除具有明显扩血管、降压、防治脑损伤等作用外,尚有显著体外抗实验性肿瘤活性和逆转肿瘤耐药作用[2-5]。所报道的有效抗肿瘤作用浓度范围(以 IC_{50} 计)一般在 1 ~ 5 μmol/L 之间(相当于 0.62 ~ 3.11 μg/ml)。然而该药在给予后是否能在靶组织达到安全有效的浓度是至关重要的。我们的前期工作发现,Tet 胃肠道吸收差;家兔灌胃给予后吸收量不足 10%。静脉给予后家兔血中能达到的最大安全浓度为 1 μg/ml[10]。为此,本研究采用 Tet 在家兔血中能达到的安全浓度,研究了其对人肝癌 5-Fu 敏感株(Hep3b)和耐药株(Hep3b/5-Fu)生长的作用特点。

本研究发现 Tet 0.33 ~ 1.00 μg/ml 单用呈浓度依赖性抑制 Hep3b 细胞增殖,但抑制强度较弱,1 μg/ml 仅使细胞存活率降至(63.77 ± 3.41)%;但单用对 Hep3b/5-Fu 细胞增殖不仅无明显抑制作用,反而有提升细胞存活率的趋势。提示 Tet 单用在体内能达到的安全浓度对 Hep3b5-Fu 敏感株和耐药株细胞显示完全不同效应:对前者轻度抑制,对后者可能有轻度促进生长作用。Tet 与 5-Fu 或 cDDP 合用实验显示,0.5 和 1.0 μg/ml 显著提高 5-Fu 对 Hep3b 细胞的 IC_{50},而 1.0 μg/ml 显著降低 5-Fu 对 Hep3b/5-Fu 细胞的 IC_{50};Tet 对 cDDP 抑制 Hep3b 细胞 IC_{50} 无明显影响,但 0.33 μg/ml 明显增加 cDDP 对 Hep3b/5-Fu 细胞的

IC_{50},而0.5和1.0 μg/ml显著降低cDDP对Hep3b/5-Fu细胞的IC_{50}。上述实验结果清楚地显示Tet与其他化疗药物合用对敏感和耐药的肿瘤细胞均存在与浓度相关的双向作用,即低浓度有促进肿瘤细胞耐药,而高浓度有逆转肿瘤细胞耐药的作用。汉防己碱的此种浓度相关性双向作用可能在具有抗肿瘤活性的某些植物源性药物中具有普遍意义。台湾学者报道,小檗碱明显抑制人肝癌HepG2细胞增殖和甲胎蛋白表达,但同时也使与小檗碱接触24 h的3株人肝癌细胞、2株胃癌细胞和2株结肠癌细胞的多药耐药转运体(PGP-170)表达上调,染料rhodamine 23在细胞中的保留时间缩短,以及使胃和结肠癌细胞对其后使用的抗肿瘤药紫杉醇敏感性降低[6,11]。

为了探讨Tet促进肿瘤细胞耐药现象的机制,我们采用Western blot技术,研究了不同浓度Tet处理Hep3b和Hep3B/5-Fu细胞48 h后,其耐药基因蛋白P-gp、MRP1和LRP表达。结果显示,3种耐药蛋白在Hep3b细胞中的基础表达高于Hep3b/5-Fu细胞;经不同浓度Tet作用后,Hep3b细胞表达3种耐药蛋白能力均成下降趋势,但Tet 0.33和1.0 μg/ml使Hep3b/5-Fu细胞的P-gp和MDR1蛋白表达明显增加;Tet对2种细胞的LRP表达量无明显影响。结果提示,P-gp和MRP1的表达与Hep3b细胞耐药发展有关,而LRP可能无明显关系。

P-gp和MRP1表达上调是许多实体瘤产生耐药性的重要分子基础。Jin等[12]报道,对5-Fu诱导而耐药的人原发性肝癌Bel 7402细胞MRP表达明显增加;生前用卡铂治疗的肺癌和非肺癌患者,其正常肺组织细胞中MRP3的表达也明显高于未接触卡铂的对照组[13]。提示P-gp和MRP表达增强确实是肿瘤细胞产生耐药的重要机制之一。我们的研究发现,3种耐药蛋白在Hep3b细胞中的正常基础表达比Hep3b/5-Fu细胞高,这一现象耐人寻味。我们的解释是,耐药细胞和敏感细胞对耐药基因的基础表达水平并不代表它们接触化疗药物后的诱导表达情况。细胞真实耐药性体现在对正在接触的药物不敏感和被诱导表达耐药基因蛋白的潜能。有关这一令人困惑的现象和解释尚需更多的实验依据。

总之,本研究发现,使用Tet在家兔体内能达到的安全血药浓度处理肿瘤细胞,出现肿瘤耐药逆转或促进肿瘤耐药的双向结果。考虑到本实验中促进肿瘤耐药与使用低浓度Tet有关,而大多数已有报道的Tet抗肿瘤有效浓度多超过1.0 μg/ml。因此,我们认为,把Tet作为潜在临床抗肿瘤药或肿瘤耐药逆转药值得商榷。

参考文献:

[1] Longley D B, Johnston P G. Molecular mechanisms of drug resistance [J]. J Pathol, 2005, 205(2): 275 - 292.

[2] He B C, Gao J L, Zhang B Q, *et al*. Tetrandrine inhibits Wnt/β-catenin signaling and suppresses tumor growth of human colorectal cancer [J]. Mol Pharmacol, 2011, 79(2): 211 - 219.

[3] Wei J, Liu B, Wang L, *et al*. Synergistic interaction between tetrandrine and chemotherapeutic agents and influence of tetrandrine on chemotherapeutic agent-associated genes in human gastric cancer cell lines [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60(5): 703 - 711.

[4] 孙瑜, 贺克俭. 汉防己甲素、雷洛昔芬及其联合应用逆转人肝癌耐药细胞株多药耐药性的研究[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(33): 8071 - 8073.

[5] 叶琳, 王驰, 谢明均, 等. 粉防己碱对喉癌耐药细胞株Hep-2/ADM多药耐药逆转作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1205 - 1208.

[6] Lin H L, Liu T Y, Lui W Y, *et al*. Up-regulation of multidrug resistance transporter expression by berberine in human and murine hepatoma cells[J]. Cancer, 1999, 85(9): 1937 - 1942.

[7] Cragg G M, Grothaus P G , Newman D J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents[J]. Chem Rev, 2009, 109(7): 3012 - 3043.

[8] Koehn F E, Carter G T. The evolving role of natural products in drug discovery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(3): 206 - 220.

[9] Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2): 143 - 148.

[10] Jiang X H, Yang J Q, Li N, *et al*. The pharmacokinetical study of plant alkaloid tetrandrine with a simple HPLC method in rabbits[J]. Fitoterapia, 2011, 82(6): 878 - 882.

[11] Lin H L, Liu T Y, Wu C W, *et al*. Berberine modulates expression of mdr1 gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel[J]. Br J Cancer, 1999, 81(3): 416 - 422.

[12] Jin J, Huang M, Wei H L, *et al*. Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel (7402)[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(6): 1029 - 1034.

[13] Shen H, Xu W, Chen Q, *et al*. Tetrandrine prevents acquired drug resistance of K562 cells through inhibition of mdr1 gene transcription [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(5): 659 - 665.

(**收稿**:2011-11-03;**修回**:2011-12-27)

(编辑 张 维)