文章编号:1000-5404(2012)17-1711-04

论著

汉防己碱对白血病K562细胞生长的促进耐药作用

蒋心惠[1],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(Tet)对白血病K562细胞生长的影响。**方法** 采用体外细胞培养,即在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中培养,培养液为含10%热灭活NBS的完全RPMI1640细胞培养基。待K562细胞与药物作用48 h后,收集并处理细胞,结合MTT和Western blot法研究Tet对K562细胞生长的作用特点。**结果** Tet在0.33~1.00 μg/ml仅使K562及K562/ADM细胞的存活率降低至75%~80%,低浓度Tet(0.33 μg/ml)使阿霉素(ADM)和顺铂(cDDP)对K562细胞生长的IC_{50}增加($P<0.01$),1.0 μg/ml Tet则降低IC_{50},使ADM对K562/ADM细胞的IC_{50}增加,cDDP的IC_{50}无明显变化。0.33 μg/ml Tet有提升2种细胞的P-gp和MRP1表达的作用($P<0.05$)。Tet各浓度对LRP表达无明显影响。**结论** Tet对K562及K562/ADM细胞生长抑制作用具浓度依耐性,低浓度具加速耐药的作用,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;白血病K562细胞;逆转耐药性
[中图法分类号] R733.7; R963; R979.1 [文献标志码] A

Promotion effect of tetrandrine on multidrug resistance in human leukemia K562 and K562/ADM cells

Jiang Xinhui[1], 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 effect of tetrandrine (Tet) on the growth of human leukemia K562 and K562/ADM cells. **Methods** The K562 and K562/ADM cells were cultured in RPMI1640 containing 10% newborn bovine serum (NBS) under the condition of 37 ℃ and 5% CO_2. MTT assay and Western blot analysis were used to investigate the effect of Tet on the growth of K562 and K562/ADM cells after the cells were treated with Tet for 48 h. **Results** Tet (0.33 – 1.0 μg/ml) decreased the survival of K562 and K562/ADM cells to 75% – 80%. The low dose of Tet (0.33 μg/ml) significantly increased the IC_{50} of doxorubicin (ADM) on K562/ADM cells and the IC_{50} of cisplatin (cDDP) on K562 cells ($P<0.01$), whereas the 1.0 μg/ml of Tet reduced the IC_{50} of cDDP on K562 cells ($P<0.01$). The IC_{50} of cDDP on K562/ADM cells was not affected. The expression of P-gp and multidrug resistance-related protein 1 (MRP1) was significantly increased by 0.33 μg/ml of Tet in K562 and K562/ADM cells ($P<0.05$). The expression of lung resistance-related protein (LRP) in K562 and K562/ADM cells was not affected by varied concentrations of Tet. **Conclusion** The growth inhibition of K562 and K562/ADM cells by Tet is in a dose-dependent manner. Low dose Tet (0.33 μg/ml) promotes the drug resistance of K562 and K562/AMD cells to doxorubicin and cisplatin, and the mechanism is related to the upregulation of P-gp and MRP1.

[**Key words**] tetrandrine; K562 cell; reversal of 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[1]表明,恶性肿瘤死亡的患者中有90%以上存在耐药现象,因此对肿瘤耐药现象与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。K562为人的白血病细胞系,由Lozzio等[2]于1975年从1例处于原始细胞危象中的慢性粒细胞白血病急变(红白血病变)患者的胸水中分离得到的癌细胞建株而成。因其在受到多种因子的诱导时,具有多向分化潜能以及其他一些特性,常被用于白血病诊断、治疗的体外研究。由于K562细胞为悬浮细胞且生长旺盛,其生长特点相对于

[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

贴壁生长的其他细胞有其特殊性，为了综合考察 Tet 对各类肿瘤细胞的作用，我们选用其作为受试对象来进行 Tet 的抗肿瘤特性研究，以期获得 Tet 作为抗肿瘤药物或肿瘤多药耐药（MDR）逆转剂用于临床治疗肿瘤性疾病的可靠实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

白血病 K562 和 K562/ADM 细胞系（重庆医科大学临床检验诊断实验室提供），盐酸阿霉素（ADM，北京华奉联博科技有限公司），P-糖蛋白（P-gp）、多药耐药蛋白 1（MRP1）、肺耐药相关蛋白（LRP）鼠抗人单抗（New Marker 公司），TRIzol Reagent 试剂盒（Gibco），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），四甲基偶氮唑蓝（MTT）、碘化丙啶（PI）（Sigma），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%），细胞冻存用二甲亚砜（DMSO，Sigma），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），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, 德国），E201 型 pH 计（上海展宁电光技术有限公司），显微镜（重庆光电仪器有限公司），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。取生长状态良好的 K562 细胞和 K562/ADM 细胞消化后置 6 孔板中，在细胞生长达 50% 时在相差显微镜下观察细胞的形态变化并照相。

1.3 Tet 对 K562 和 K562/ADM 细胞株的作用

取 100 μl 对数生长期 K562 与 K562/ADM 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、1.0 μg/ml）的培养液 150 μl，每一浓度种 3 个复孔，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[D(570)]，计算存活率。

$$存活率=\frac{实验孔\ D(570)}{对照孔\ D(570)}\times100\%$$

1.4 Tet 联合使用 ADM 或 cDDP 对 K562 与 K562/ADM 细胞株的作用

取 100 μl 对数生长期 K562 与 K562/ADM 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、1.0 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的 ADM 或 cDDP 的培养基，使阿霉素的终浓度分别为 6.53、3.27、1.09、0.363 μg/ml，cDDP 终浓度分别为 1.67、5.56、16.7、33.3 μg/ml。继续培养 48 h 后，加 MTT（1 mg/ml）20 μl，置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱中继续培养 4 h，取出，离心弃去上清液，于残留物中加入 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[D(570)]，计算存活率，得到 IC_{50} 值。

1.5 Tet 对 P-gp、MRP1 及 LRP 表达的影响

采用 Western blot 法分别检测 P-gp、MRP1 及 LRP 的表达水平。取对数生长期的 K562/ADM 细胞及 K562 细胞分别接种于 100 ml 的培养瓶中，培养 24 h 后，加入不同浓度（0.33、0.50、1.0 μg/ml）的 Tet 溶液，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。

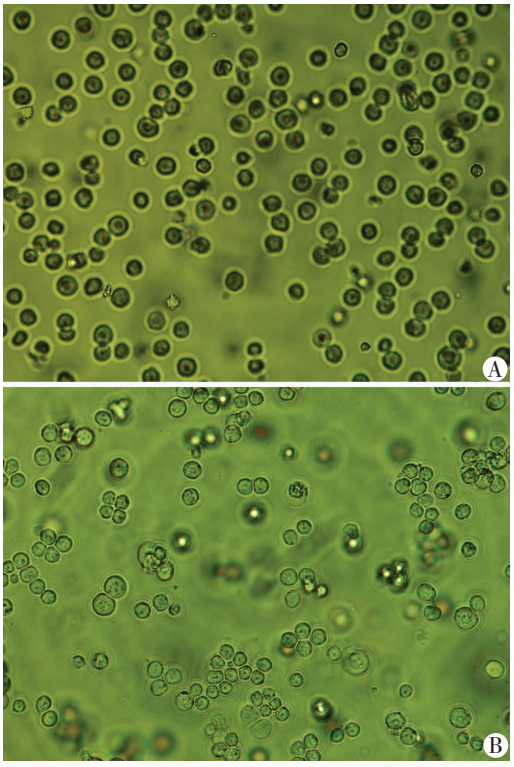
1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 细胞形态比较

相差显微镜下见 K562 敏感细胞株为圆球形，大小均匀，悬浮生长。加入阿霉素诱导耐药培养一段时间后，细胞形态改变。细胞获得耐药性后，大体形态改变，生长速度变慢（图 1）。



A：K562 细胞；B：K562/ADM 细胞

图 1 相差显微镜观察 K562 和 K562/ADM 细胞形态变化 （×200）

2.2 Tet 对 K562 和 K562/ADM 细胞存活的作用

Tet 对 K562 与 K562/ADM 细胞株的生长抑制作用结果见表 1。0.33～1.0 μg/ml Tet 仅使 K562 细胞存活率降低到 80% 左右，且无明显浓度-效应关系；0.33 μg/ml Tet 对 K562/ADM 细胞存活率似无明显影响，高浓度（0.50～1.0 μg/ml）也仅使细胞存活率降低到 70%～80%（$P<0.01$）。提示，单独使用 Tet 很难有效抑制 K562 和 K562/ADM 细胞的生长。

表 1　Tet 对 K562 和 K562/ADM 细胞存活率的影响[$n=6$，($\bar{x}\pm s$)%]

细胞	0.33 μg/ml	0.50 μg/ml	1.0 μg/ml
K562	81.99±2.36	82.70±1.86	80.46±1.95
K562/ADM	91.47±3.52	72.76±2.61[a]	82.94±3.82[a]

a：$P<0.01$，与 0.33 μg/ml Tet 比较

2.3 Tet 对 ADM 抑制 K562 和 K562/ADM 细胞生长的影响

Tet 与 ADM 同时作用于 K562 与 K562/ADM 细胞时的 IC_{50} 值见表 2。0.33、0.50 μg/ml Tet 使 ADM 对 K562/ADM 细胞抑制的 IC_{50} 增加（$P<0.01$），但 1.00 μg/ml Tet 似有降低 K562/ADM 细胞的 IC_{50}，但无显著性（$P>0.05$）。Tet 各浓度均有提升 ADM 对 K562 细胞 IC_{50} 值的作用，但无显著性（$P>0.05$）。提示，低浓度 Tet 可能有提升 K562/ADM 细胞对 ADM 耐药或促进 K562 细胞耐药发展的作用。

表 2　Tet 对 ADM 抑制 K562 和 K562/ADM 细胞生长的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

细胞	0 μg/ml	0.33 μg/ml	0.50 μg/ml	1.0 μg/ml
K562/ADM	4.68±0.23	5.09±0.54	7.50±0.85[a]	3.93±0.29
K562	2.75±0.38	3.25±0.42	3.01±0.53	3.44±0.64

a：$P<0.01$，与 0 μg/ml Tet 比较

2.4 Tet 对 cDDP 抑制 K562 和 K562/ADM 细胞生长的影响

Tet 对 cDDP 抑制 K562 与 K562/ADM 细胞生长的 IC_{50} 值见表 3。低浓度 Tet（0.33 μg/ml）明显提升 cDDP 对 K562 的 IC_{50} 值，而 0.50、1.0 μg/ml 明显降低 cDDP 对 K562 的 IC_{50} 值（$P<0.01$）。Tet 各浓度对 cDDP 抑制 K562/ADM 的 IC_{50} 无明显变化。提示，Tet 0.33 μg/ml 可能促进 K562 对 cDDP 的耐药发展，但 0.50、1.0 μg/ml 与 cDDP 有协同性抑制 K562 细胞增殖的作用。

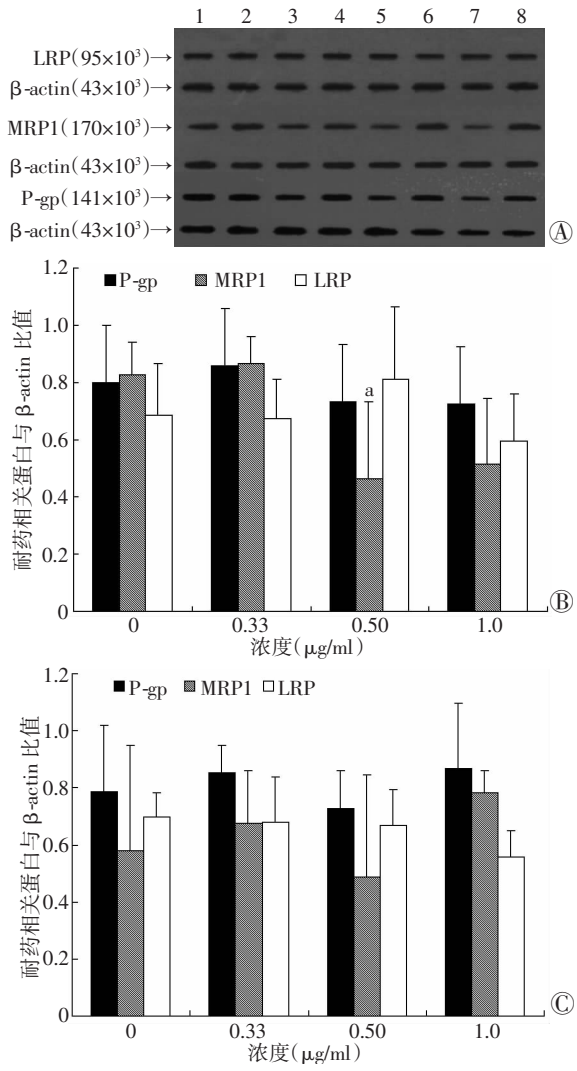
表 3　Tet 对 cDDP 抑制 K562 和 K562/ADM 细胞生长的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

细胞	0 μg/ml	0.33 μg/ml	0.50 μg/ml	1.0 μg/ml
K562/ADM	22.75±1.96	23.06±1.94	25.74±2.61	22.97±2.19
K562	12.24±1.28	24.65±1.83[a]	8.43±1.04[a]	2.89±0.52[a]

a：$P<0.01$，与 0 μg/ml Tet 比较

2.5 Tet 对 K562 和 K562/ADM 细胞耐药相关蛋白表达的影响

采用 Western blot 法分析不同浓度的 Tet 作用于 K562/ADM 及 K562 细胞 48 h 后，细胞耐药相关蛋白表达，结果见图 2。K562 细胞中 P-gp 和 MRP1 表达量较高，但与 K562/ADM 细胞相比，二者无显著性差异（$P>0.05$）；0.33 μg/ml Tet 有提升两类细胞中 P-gp 和 MRP1 表达的趋势，但与对照组（0 μg/ml Tet）相比无显著性（$P>0.05$）；0.50 μg/ml Tet 明显降低 K562 细胞中 MRP1 的表达（$P<0.05$），对 K562 细胞中 P-gp 和 K562/ADM 细胞中 P-gp 和 MRP1 的表达也有降低趋势；1.0 μg/ml Tet 对 K562 表达 P-gp 和 MRP1 呈降低趋势，但对 K562/ADM 表达 P-gp 和 MRP1 则呈增加趋势。Tet 对 2 种细胞表达 LRP 的影响较小，提示 K562 和 K562/ADM 细胞表达 LRP 较少受 Tet 的影响。



A：Western blot 测定结果　1：K562，2：K562＋0.33 μg/ml Tet，3：K562＋0.50 μg/ml Tet，4：K562＋1.0 μg/ml Tet，5：K562/ADM，6：K562/ADM＋0.33 μg/ml Tet，7：K562/ADM＋0.50 μg/ml Tet，8：K562/ADM＋1.0 μg/ml Tet；B：Tet 对 K562 细胞中 3 种蛋白表达的影响　a：$P<0.05$，与 0 μg/ml 比较；C：Tet 对 K562/ADM 细胞中 3 种蛋白表达的影响

图 2　Tet 对 3 种多药耐药相关蛋白在 2 种细胞株中表达的影响

3 讨论

众所周知，天然产物是抗肿瘤药物的重要来源[3]，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。Tet(亦称粉防己碱,汉防己甲素)是中药防己(staphaniae tetrandrae)根的生物碱,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[4-11]。以往报道的有效抗肿瘤作用浓度范围(以 IC_{50} 计)一般为1~5 μmol/L(相当于0.623~3.11 μg/ml)。然而该药在体内是否能在靶组织达到安全有效的浓度是至关重要的。我们前期研究[12]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。为此,本实验采用 Tet 在家兔血中能达到的安全浓度,研究了其对人白血病阿霉素敏感株(K562)和耐药株(K562/ADM)生长的作用特点。

在实验浓度范围内(0.33~1.0 μg/ml)Tet 仅使 K562 和 K562/ADM 细胞的存活率降低至75%~80%。狄凯军等[13]报道不同浓度 Tet 与 K562 细胞共培养5 d,发现1.0 μg/ml Tet 使 K562 存活细胞数减少10%左右,2 μg/ml 减少30%,5 μg/ml 减少60%。王珏琼等[14]也报道了类似结果,证明1.0 μg/ml Tet 使 K562 和 K562/AO2 增殖降低10%。这些结果提示使用在家兔血液中能达到的 Tet 可能最大安全浓度很难有效地抑制 K562 细胞的生长。相反,本实验结果显示低浓度 Tet(0.33~0.50 μg/ml)使 ADM 对 K562/ADM 细胞抑制的 IC_{50} 增加,1.0 μg/ml 则降低 IC_{50};不同浓度 Tet 使阿霉素对 K562 细胞抑制的 IC_{50} 具增加趋势。因此,Tet 在动物血液中能够达到的最大安全浓度(0.33~1.0 μg/ml)主要是加快 K562 细胞对阿霉素耐药,而对 K562/ADM 细胞呈提升耐药趋势。

0.33 μg/ml Tet 也提升 cDDP 对 K562 细胞抑制的 IC_{50},0.50~1.0 μg/ml 则降低其 IC_{50};Tet 各浓度对 cDDP 抑制 K562/ADM 细胞的 IC_{50} 无明显变化。该结果进一步提示 Tet 对肿瘤细胞作用和影响抗肿瘤药对肿瘤细胞作用的复杂性,即低浓度(小于1.0 μg/ml)时的作用与高浓度(大于1.0 μg/ml)的作用效果及作用机制可能完全不一样。

MDR 相关蛋白的表达显示,0.33 μg/ml Tet 有提升 K562 和 K562/ADM 细胞表达 P-gp 和 MRP1 作用,这与低浓度 Tet 提升 ADM 对 K562 和 K562/ADM 细胞 IC_{50} 结果一致。Shen 等[6]报道,Tet 2 μg/ml 能明显降低 ADM 诱导的 K562 细胞耐药基因 MDR1 和 P-gp 表达。显然,逆转 ADM 诱导的耐药基因表达(高浓度)所需的 Tet 浓度很难在健康家兔体内达到。Tet 各浓度对 K562 和 K562/ADM 细胞中 LRP 表达无明显影响,以及2株细胞的 LRP 基础表达几乎相同,提示 K562 细胞耐药发展可能与 LRP 无密切关系。这与 Tet 作用于肝癌 Hep3b 的敏感和耐药细胞的研究结果有明显差别[15],提示 Tet 作用于不同的肿瘤细胞时其作用机制可能有所不同。同时,要将 Tet 作为抗肿瘤药物或抗肿瘤药物多药耐药的逆转剂尚需进一步研究。

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] Lozzio C B, Lozzio B B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome[J]. Blood, 1975, 45(3): 321-334.

[3] 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.

[4] Cai X H, Wang S, Chen B A. research advances on the pharmacological effects of tetrandrine[J]. Chin J Nat Med, 2011, 9(6): 473-480.

[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] 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.

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

[8] 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.

[9] 慕建宁, 马小红, 李玢, 等. 粉防己碱对宫颈癌细胞周期影响及其机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(11): 2191-2193.

[10] 刘锦裕, 李永生, 谢恩杰, 等. 粉防己碱逆转膀胱癌耐药株 BIU-87/ADM 凋亡抗性的作用[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1932-1934.

[11] 杨旭, 刘风玲. 粉防己碱在逆转肿瘤化疗多药耐药性中的作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(15): 1942-1944.

[12] 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.

[13] 狄凯军, 周建平, 章静波. 粉防己碱诱导人红白血病细胞凋亡的研究[J]. 解剖学报, 2002, 33(5): 530-533.

[14] 王珏琼, 陈宝安, 程坚, 等. 5-溴汉防己甲素与汉防己甲素对 K562/A02 细胞多药耐药性逆转作用的比较[J]. 癌症, 2008, 27(5): 491-495.

[15] 蒋心惠, 黄开顺, 滕永真, 等. 汉防己碱对肝癌 Hep3b 细胞生长的双向作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(13): 1281-1284.

(**收稿**:2012-02-08;**修回**:2012-03-07)

(编辑 张 维)