基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0897-03

解毒化瘀药对白血病 K562/A02 耐药细胞 mdr1 耐药基因、核因子 κB 信号影响的研究

马武开，姚血明，唐 芳，王 莹，黄 颖，安 阳，黄礼明
（贵阳中医学院第二附属医院血液风湿科，贵阳 550003）

【摘 要】目的：探讨解毒化瘀药含药血清对白血病 K562/A02 细胞 mdr1 耐药基因、核因子κB（Nuclear factor kappa B，NF-κB）信号基因表达的影响。方法：采用半定量逆转录聚合酶链反应法检测解毒化瘀药含药血清处理后 K562/A02 细胞 mdr1 基因的表达；Western blot 法检测 NF-κB/P65、NF-κB/P50、IκBα 的表达。结果：解毒化瘀药含药血清能够降低 K562/A02 耐药细胞NF-κB/P65、NF-κB/P50、IκBα 表达，降低 mdr1 耐药基因的表达。结论：解毒化瘀药对 K562/A02 细胞的耐药逆转作用可能是通过阻断 NF-κB 信号通路，影响 mdr1 耐药基因的表达起作用的。

【关键词】白血病；多药耐药；K562/A02 细胞；核因子 κB 信号；解毒化瘀药
【中国图书分类法分类号】R557 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-11

The expressions of multidrug resistance gene1 (mdr1) and NF-κB of leukemia K562/A02 cell and the intervention function research of Jeduhuayu Chinese herbal serum

MA Wu-kai, YAO Xue-ming, TANG Fang, WANG Ying, HUANG Ying, AN Yang, HUANG Li-ming
(Department of Blood and Rheumatism Immunity, the Second Affiliated Hospital, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】*Objective*: To discuss the influence of Jieduhuayu Chinese herbal serum on the expression of multidrug resistance gene1 (Mdr1) of leukemia K562/A02 cell and the expression of NF-κB (nuclear factor kappa B). *Methods*: Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method was used to examine the expression of Mdr1 gene after K562/A02 cell receiving the treatment of Jieduhuayu Chinese herbal serum; Western blotting technology was used to examine of the expressions of NF-κB/P65, NF-κB/P50, and IκBα. *Results*: The expressions of NF-κB/P65, NF-κB/P50, and IκBα and the expression of multidrug resistance gene1 of leukemia K562/A02 cell could be decreased by Jieduhuayu Chinese herbal serum. *Conclusion*: Jieduhuayu Chinese herbal serum can reverse multidrug resistance in leukemia cell by blocking NF-κB signal pathway, and influence the expression of multidrug resistance gene1 (mdr1).

【Key words】leukemia; multidrug resistance; K562/A02 cell; nuclear factor kappa B pathway; Jieduhuayu Chinese herbal medicine

白血病细胞的多药耐药（Multidrug resistance，MDR）是指白血病细胞在接触一种抗恶性肿瘤药后，产生了对多种结构不同、作用机制各异的其他抗恶性肿瘤药物的耐药性，已成为化疗失败，造成白血病复发和难治的主要原因。在白血病细胞的耐药机制中，核因子 κB（Nuclear factor kappa B，NF-κB）信号通路与肿瘤细胞的发生、增殖、分化、凋亡及耐药有密切关系，是 MDR 信号转导途径中的主要信号分子，在白血病细胞表达与耐药有关的因素中可能起关键的调控作用。NF-κB 是一种重要的核转录因子，属于受调蛋白水解酶依赖的受体信号转导通路。抗肿瘤药物在杀伤肿瘤细胞的同时也激活 NF-κB，NF-κB 进入细胞核内与 κB 位点结合，诱导NF-κB 调控（Multidrug resistance gene1，mdr1）基因表达[1]。NF-κB 通过引起 MDR 基因表达增加介导细胞耐药，并在 mdr1 启动子区域的第 1 个外显子确定了 1 个 NF-κB 的结合点，提示 mdr1可能是 NF-κB 的下游基因[2]，激活状态的 NF-κB 与mdr1 中的 NF-κB 结合点结合促进 mdr1 的转录[3]。在前期的研究中发现解毒化瘀药能够抑制白血病 K562/A02 细胞凋亡，下调 p-gp 表达，逆转 MDR[4]，本研究采用血清药理学方法和分子生物学技术研究解毒化瘀药含药血清对人白血病耐药细胞系 K562/A02 细胞 NF-κB 信号的影响，探讨解毒化瘀药对 K562/A02 耐药逆转机制。

作者介绍：马武开（1967-），男，主任医师，博士，研究方向：中西医结合防治血液病。
通信作者：黄礼明，男，教授，Email：walker55@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30860353）；贵州省高层次人才科研特助项目。

1　材料与方法

1.1　解毒化瘀方水煎浓缩剂的制备

解毒化瘀方（药物由青黛、山慈姑、蚤休、虎杖、莪术、川芎、丹参、补骨脂等组成）饮片置煎煮容器内，加相当于药材量 5~8 倍的冷水浸泡 1~2 h，煮沸 30 min 过滤，浓缩成每毫升含生药 1 g 的药液，冷却后装入无菌药瓶，置 4℃ 冰箱备用。

1.2　含药血清的制备[5]

新西兰大白兔 10 只（购自贵阳中医学院动物实验中心，普通级，合格证号：20090013）灌服解毒化瘀方水煎液（按高剂量 12 g 生药/kg 灌服，即正常成人用量的 2 倍），每日 1次，连续 3 d，于末次给药后 2 h 无菌条件下心脏取血，分离血清，组内血清混合，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，置-20℃保存备用。正常兔血清制备：灌药前 1 d 取兔血，分离血清，方法同前。

1.3　主要试剂和仪器

主要试剂：RPMI1640 培养粉（美国 GIBCO）、胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司）、MTT 粉（北京天港邦定生物医学科技有限公司）、RNA 提取试剂盒（天根生化）、RT-PCR 试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司）、上样缓冲液（天根生化）、电泳缓冲液（生物工程上海有限公司）。主要仪器：超净工作台（中国苏州），CO_2 培养箱（美国 NAPCO），通用酶标仪（BIO-TEX 美国），PCR 梯度循环仪（美国）、紫外可见分光光度计（日本岛津）、凝胶成像分析系统（美国 GE Healthcare）、电泳仪（江苏常州无线电元件四厂）、倒置显微镜（日本 Olypmpus-LY70）。

1.4　细胞培养

将 K562 细胞和 K562/A02（购自中国医学科学院血液学研究所）接种于 25 ml 培养瓶，加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液，在 37℃、5% CO_2 条件下无菌培养，取对数生长期细胞，2~3 d 传代 1 次，更换细胞液。

1.5　MTT 检测解毒化瘀药含药血清的细胞毒作用[6]

将白血病 K562 及 K562/A02 细胞悬液 1×10^6 个/ml 加入 96 孔板中，每孔 100 μl，适应性的培养 12 h 后，实验组用各浓度含药血清培养（共10个浓度），以不含药正常培养的K562 和 K562/A02 细胞为对照组，另外设调零孔，最终每孔为 200 μl。37℃，5% CO_2 孵育 48 h，每孔加入 5 mg/ml 的MTT 磷酸缓冲液 20 μl，在同样条件下继续培养 4 h，离心（1 000 r，5 min），弃上清，每孔加 DMSO 150 μl，振荡 10 min，使结晶物充分溶解，用酶标仪检测，计算各组细胞毒性，重复试验 3 次。并根据回归方程求出半数抑制浓度（IC_{50}）和耐药细胞的耐药倍数。计算方法：细胞生长抑制率=（1-实验组OD值-调零孔OD值）/对照组 OD 值-调零孔 OD 值）×100%。耐药倍数（细胞生长抑制率为 50%药物浓度耐药倍数）=耐药细胞 IC_{50}/敏感细胞 IC_{50}。

1.6　解毒化瘀药含药血清对 mdr1 的表达影响

采用 RT-PCR 法，按试剂盒说明书提取细胞 RNA，紫外分光光度计测定 RNA 纯度（A_{260}/A_{280}>1.7），进行 RNA 定量。PCR 引物序列正义链 5'-CTTTCTCAAGGACCACCGCAT-3'，反义链 5'-CAATCCATGGCAGCCAGC TGC-3'，基因片段为 393 bp；β-acting 正义链：5'-CGCTGCGCTGGTCGACA-3'，反义链：5'-GTCAGGCACGATTTCCCGCT-3'，目的基因长度为619 bp（由上海Sangon公司合成）。PCR条件：94℃预变性5 min，60℃复性1 min，72℃延伸1 min，38个循环，以β-acting测定作为内参照。取PCR产物10 μl在15 g/L琼脂糖凝胶中电泳，紫外灯下观察条带，并用吸光度扫描仪扫描、照相，照片经 Bandscan5.0软件进行分析并读取吸光度值，取mdrl/β-acting 吸光度比值进行半定量分析，各标本重复3次，取平均值。

1.7　解毒化瘀药含药血清对 K562/A02 细胞 NF-κB 信号的影响

采用 Western blot 法检测经解毒化瘀含药血清处理后 K562/A02 耐药细胞株 NF-κB/P65、NF-κB/P50、IκBα 的表达，并设 K562 敏感细胞作为对照。将预冷至 4℃的裂解缓冲液加入经PBS漂洗K562/A02、K562细胞中，冰上作用30 min，12 000 r 离心 15 min 后，取上清液保存于-20℃；蛋白变性后上样，SDS-PAGE 凝胶电泳分离，通过电转移法将蛋白质转移至固相载体 PVDF 膜上，在含 5%脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭，加入一抗（兔抗人 NF-κB/P65 及 NF-κB/P50 单克隆抗体，兔抗人 Iκbα 多克隆抗体反应，4℃孵育过夜，洗膜后加入二抗（辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG，稀释度为 1:10 000，37℃作用 40 min，增强型底物化学发光法（ECL），暗室曝光，观察结果，重复试验 3 次。

1.8　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS15.0 统计软件进行分析，组间计量资料统计采用单因素方差分析，如方差齐采用 *SNK* 检验，如方差不齐则用 *Dunnett's* 检验，$P<0.05$ 表示差异有统计意义。药物浓度与细胞生长抑制率采用一元线性回归相关分析。

2　结　果

2.1　解毒化瘀药含药血清浓度的选择

将解毒化瘀药含药血清按 1(1:17)、2(1:15)、3(1:13)、4(1:11)、5(1:9)、6(1:7)、7(1:5)、8(1:3)、9(1:1)、10(原液)调为 10 个不同梯度浓度剂量，分别加入 K562/A02 细胞，根据解毒化瘀含药血清对 K562/A02 细胞生长抑制作用的一元线性回归分析求得到 IC_{50} 为>3 g 生药/kg 体重。本试验低剂量组采用 0.5 g 生药/kg 体重含药血清，中剂量组采用 1.5 g 生药/kg 体重含药血清，高剂量组采用 3 g 生药/kg 体重含药血清（见图 1）；干扰素参照文献[3]采用 500 U/L。

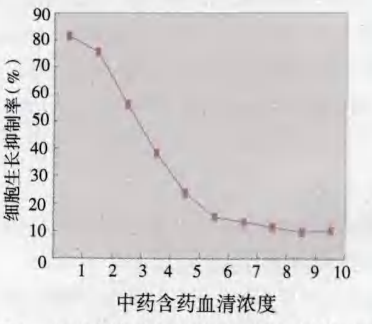


图 1　含药血清对 K562/A02 细胞生长抑制曲线

2.2 K562/A02 细胞耐药倍数

在 K562、K562/A02 细胞培养液中分别加入不同浓度柔红霉素，培养 72 h 后，柔红霉素对 2 种细胞产生了不同的抑制作用，根据自动酶标仪检测 K562 细胞 IC_{50} 浓度 OD 值为（0.123±0.041）μmol/L，K562/A02 细胞 IC_{50} 浓度约为（0.922±0.252）μmol/L，求得 K562/A02 细胞耐药倍数为 7.496 倍。

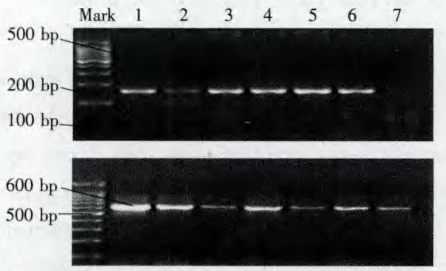
2.3 解毒化瘀药含药血清对 mdr1 mRNA 表达水平的影响

RT-PCR 方法检测各实验组的 mdr1 mRNA 的表达，结果显示 K562 细胞未见阳性条带；K562/A02 细胞牛血清组、兔血清组可见阳性条带，经中药高剂量、中剂量、低剂量含药血清和干扰素处理后 mdr1 mRNA 条带均变浅（见图 1、2）。mdr1/β-actin cDNA 灰度比值 mdr1 mRNA 结果显示：①K562/A02 细胞 mdr1 mRNA 水平较 K562 细胞高（$P<0.01$）；②经高、中、低剂量含药血清和干扰素处理后 K562/A02 细胞 mdr1 mRNA 水平降低（$P<0.01$）（见表 1）。

表 1 解毒化瘀药含药血清对 mdr1 mRNA 表达水平的影响（n=3）

组 别	cDNA/B-actin灰度比值
含药血清高剂量	0.46 ± 0.23
含药血清中剂量	0.43 ± 0.26
含药血清低剂量	0.93 ± 0.06
干扰素对照组	0.80 ± 0.13
空白兔血清组	1.05 ± 0.05
空白牛血清组	1.05 ± 0.01
K562组	0.00 ± 0.00

注：与 K562 细胞相比较，$P<0.01$；与 K562/A02 细胞未加药组相比较，$P<0.01$



注：1、2、3 分别为中药低、中、高剂量组；4 为干扰素组；5 为空白兔血清组；6 为空白牛血清组；7 为 K562 细胞组（目的片段为 157 bp）

图 2 解毒化瘀药含药血清对 mdr1 mRNA 表达的影响

2.4 解毒化瘀药对 K562/A02 细胞 NF-κB 信号干预的影响

结果显示 K562 则未见阳性条带，牛血清组和兔血清组 K562/A02 细胞 P65、P50 和 IκBα 条带明显变细，加用解毒化瘀含药血清处理后 P65、P50 和 IκBα 条带明显增粗，其表达均有不同程度下降，以高、中剂量组最明显，P65、P50 表达下降高于干扰素组（P<0.05），IκBα 下降与干扰素组相当（P>0.05），其比值见表 2、图 3。

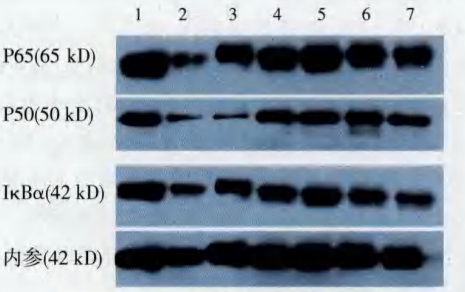
3 讨 论

白血病细胞 mdr1 基因及其产物 p-gp 过度表达导致细胞内药物外排增加，降低白血病细胞内化疗药物浓度，白血病细胞由此逃避化疗药物的杀伤而产生耐受现象。NF-κB 参与白血病细胞耐药的途径是由于化疗药物激活 NF-κB 的转录，导致 mdr1 及其产物 p-gp 表达增加，使细胞对化疗药物产生耐药性，抑制其转录活性则可以增加白血病细胞的凋亡从而逆转耐药。

表 2 解毒化瘀药对 K562/A02 细胞 NF-κB 信号表达的影响（n=3）

组别	P65/β-actin	P50/β-actin	IκBα/β-actin
K562细胞	0.41 ± 0.35	0.31 ± 0.19	0.09 ± 0.03
空白牛血清组	1.13 ± 0.17	1.01 ± 0.04	0.85 ± 0.15
空白兔血清组	1.05 ± 0.02	1.00 ± 0.03	0.86 ± 0.49
干扰素组	0.56 ± 0.13*	0.83 ± 0.06	0.45 ± 0.22*
中药低剂量组	0.88 ± 0.08#	1.17 ± 0.28	0.52 ± 0.17#
中药中剂量组	0.71 ± 0.11*	0.66 ± 0.12*	0.41 ± 0.03*
中药高剂量组	0.41 ± 0.13*★	0.47 ± 0.24*★	0.32 ± 0.04*★

注：与牛血清组比较，*，$P<0.01$；#，$P<0.05$；与干扰素组比较，★，$P<0.05$



注：泳道 1 为空白牛血清组；泳道 2 为 K562 细胞组；泳道 3 为干扰素组；泳道 4 为空白兔血清组；泳道 5 为中药低剂量组；泳道 6 为中药中剂量组；泳道 7 为中药高剂量组

图 3 K562/A02 细胞 NF-κB 信号转导蛋白表达

根据白血病细胞 MDR 的发生和演变过程，本课题组在前期的研究中提出了导致白血病 MDR 中医病理基础为“毒蕴血瘀”[7]。并对 25 例难治/复发急性白血病患者进行血液流变学指标检测，结果显示，与普通患者相比，难治/复发急性白血病患者全血粘度、全血还原度、红细胞压积、红细胞电泳均明显升高，解毒化瘀药对难治/复发白血病患者全血粘度、红细胞压积等各项指标均有明显改善作用[8]。在此理论指导下，以传统中医辨证理论为基础，结合现代药理研究结果，辨病辨证相结合，组成解毒化瘀方（药物由青黛、蚤休、虎杖、莪术、川芎、丹参等组成），通过体外血清药理研究证实，在常规剂量下解毒化瘀药能够抑制白血病 K562 细胞的增殖作用[4]；在无细胞毒浓度剂量下能够提高白血病 K562/A02 耐药细胞内的柔红霉素浓度，下调 p-gp 的表达而减少药物外排，使其对柔红霉素的敏感性显著增高[4]。

本研究显示 mdr1 耐药基因在 K562/A02 细胞中成高表达，加用解毒化瘀含药血清处理后，高、中剂量组和干扰素对照组能够明显降低 mdr1 耐药基因在 K562/A02 细胞中的表达，空白对照组和兔血清组对表达无影响。说明解毒化瘀药中药复方含药血清能下调 mdr1 基因的表达，从而逆转耐药。进一步的研究显示，K562/A02 耐药细胞 NF-κB 信号基因呈高表达，在 K562 则未见表达，加用解毒化瘀含药血清处理

基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0900-04

ApoB/ApoA1 比值和 hs-CRP 与胰岛素抵抗的相关性研究

王邦琼[1]，罗 蓉[2]，李启富[1]，蒋袁娟[1]，刘洲君[1]，钟 立[1]，程庆丰[1]，青 华[1]
（1. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科，重庆 400016；2. 重庆医科大学附属第一医院体检中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：比较载脂蛋白 B（Apolipoprotein B，ApoB）/载脂蛋白 A1（Apolipoprotein A1，ApoA1）比值（ApoB/ApoA1 比值）和超敏 C 反应蛋白（High sensitive C-reactive protein，hs-CRP）与胰岛素抵抗（Insulin resistance，IR）的相关性。方法：纳入 426 例非糖尿病个体，测定体重、身高、血压、腰围、空腹血浆葡萄糖（Fasting plasma glucose，FPG）、血清胰岛素（Fasting insulin，Fins）、血脂和 hs-CRP 等，计算 IR 指数（HOMA-IR），并以 HOMA-IR 上四分位为切点分为 IR 组与非 IR 组。结果：IR 人群 ApoB/ApoA1 比值和 hs-CRP 较非 IR 人群有显著差异（$P<0.01$）。校正性别、年龄和腰围后，线性回归分析发现 ApoB/ApoA1 比值仍是HOMA-IR 的主要影响因素[B(95%CI):0.27(0.06~0.48)，$P=0.013$]；而 hs-CRP 与 HOMA-IR 的关系无统计学意义。控制性别、年龄后，高 ApoB/ApoA1 比值人群发生 IR 的危险较低 ApoB/ApoA1 比值人群增加 2.17 倍[OR(95%CI):2.17(1.33~3.54)，$P=0.002$]，而高 hs-CRP 人群发生 IR 的危险较低 hs-CRP 人群增加 1.78 倍[OR(95%CI):1.78(1.09-2.92)，$P=0.021$]。结论：在非糖尿病人群中，与 hs-CRP 相比，ApoB/ApoA1 比值是更好的 IR 预测指标。

【关键词】载脂蛋白 B/载脂蛋白 A1 比值；超敏 C 反应蛋白；胰岛素抵抗
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-03-16

Comparison of the associations of ApoB/ApoA1 ratio and high-sensitive C-reactive protein with insulin resistance

WANG Bang-qiong[1], LUO Rong[2], LI Qi-fu[1], JIANG Yuan-juan[1], LIU Zhou-jun[1], ZHONG Li[1], CHENG Qing-feng[1], QING Hua[1]
(1. Department of Endocrinology; 2. Medical Examination Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To compare the associations of Apolipoprotein B/Apolipoprotein A1 ratio (ApoB/ApoA1 ratio) and high sensitive C-reactive protein(hs-CRP) with insulin resistance(IR). *Methods*: 426 non-diabetes Chinese were recruited. Weight, height, blood pressure, waist circumference, fasting plasma glucose (FPG), fasting serum insulin (Fins), blood lipids and hs-CRP were measured. HOMA index (HOMA-IR) was calculated. IR was defined as the upper quartile of HOMA-IR. *Results*: ApoB/

作者介绍：王邦琼(1983-)，女，硕士，研究方向：胰岛素抵抗。
通信作者：罗 蓉，女，副教授，Email：firefly-1314@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30700271）。

后，P65、P50 和 IκBα 的表达均有不同程度下降，以高、中剂量组最明显，P65、P50 表达下降高于干扰素组（$P<0.05$），IκBα 下降与干扰素组相当（$P>0.05$），说明解毒化瘀药对 K562/A02 细胞的耐药逆转作用可能是通过阻断 NF-κB 信号通路，影响 mdr1 耐药基因的表达起作用的。

参 考 文 献

[1] Byeong H C, Chang G K, Yoongho L, et al. Curcumin down-regulates the multidrug-resistance mdr1b gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF-κB pathway[J]. Cancer Letters, 2008, 259(1): 111-118.
[2] Bentims-Ati M, Barbu V, Fillet M, et al. NF-kappa B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells[J]. Oncogene, 2003, 22(1): 90-97.
[3] Ogretmen B, Safa A R. Negative regulation of mdr1 promoter activety in MCF-7, but not in multidrug resistant MCF-7/Adr, cells by Cross-coupled NF-kappa B/p65 and c-Fos transcription factors and their interaction with the CAAT region[J]. Biochemistry, 1999, 38(3): 2189-2199.
[4] 马武开，张惠臣. 解毒化瘀药含药血清对白血病 K562/A02 细胞耐药逆转作用的研究[J]. 国际中医中药杂志，2007，29(4)：195-197.
[5] 方文贤，宋崇顺，周立孝. 医用中药药理学[M]. 第 1 版. 北京：人民卫生出版社，1998.960.
[6] 司徒镇强，吴军正主编. 细胞培养[M]. 第 2 版. 陕西：世界图书出出版社，2007.127.
[7] 马武开，黄礼明. 白血病多药耐药的中医病因病机探讨[J]. 浙江中医杂志，2006，41(9)：518.
[8] 马武开，张惠臣. 中西医结合治疗难治/复发急性白血病临床研究[J]. 中国中医药信息杂志，2009，16(5)：73-74.

（责任编辑：冉明会）