维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0967-03

粉防己碱对喉癌耐药细胞株 KBV200 耐药逆转作用的研究

叶 琳,陈鸿雁

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究天然有效成分粉防己碱(Tetrandrine,TET)对喉癌耐药细胞株 KBV200 的耐药逆转作用。方法:本研究以喉癌耐药细胞株 KBV200 为研究对象,采用粉防己碱逆转 KBV200 对常用抗肿瘤药物阿霉素的多药耐药作用,以经典逆转剂维拉帕米(Verapamil,VRP)为对照组,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定其对实验细胞的增殖抑制率。结果:低毒剂量的粉防己碱能逆转实验细胞株对阿霉素的多药耐药(Multidrug resistance,MDR)作用,逆转指数为 22.96;维拉帕米逆转指数为 9.31。结论:低毒浓度的天然药物粉防己碱能逆转喉癌耐药细胞株 KBV200 对阿霉素的耐药作用,其逆转效果优于经典逆转剂维拉帕米。

【关键词】粉防己碱;维拉帕米;KBV200 细胞系;多药耐药

【中国图书分类法分类号】R73-354 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-07

Reversal effect of tetrandrine on multidrug resistance of the KBV200 cell line

YE Lin, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliate Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the reversal effect of tetrandrine on multidrug resistance of KBV200 cell line in order to provide experimental data for clinical individual chemotherapy. *Methods*: MTT reduction assay was used to investgate the inhibition of Adriamycin on KBV200cell line, and the reversal effects of Tetrandrine and Verapamil on the cell line. *Results*: Verapamil and Tetrandrine had the reveral effects on the cell line, and the reversal indexes of Tetrandrine and Veramil were 22.96 and 9.31, respectively. *Conclusion*: KBV200 cell line was multidrug resistance to Adriamycin but Tetrandrine had reversal effects on its multidrug resistance.

【Key words】 Tetrandrine; Verapamil; KBV200 cell line; Multidrug resistance

化疗是临床肿瘤治疗的主要方法之一,而 MDR 的产生导致肿瘤细胞对化疗药物敏感性下降,严重影响了化疗的效果。近年,MDR 逆转剂的研究已成为热点。天然药物作为多药耐药逆转剂由于其不良反应少,毒性低的特点,在我国及其它亚洲国家广泛应用。研究发现天然成分 TET 具有极强的体外逆转 MDR 的作用,其体外逆转 MDR 的活性是维拉帕米的 10 倍[1],能逆转乳腺癌、膀胱癌和骨肉瘤等耐药细胞株的耐药性[2]。但其在头颈肿瘤的研究鲜有报道。本实验选用粉防己碱,以经典逆转剂 VRP 为对照,研究并比较其对喉癌耐药细胞株 KBV200 MDR 耐药逆转的影响,为临床合理应用提供试验室依据。

作者介绍:叶 琳(1982-),女,硕士,研究方向:头颈部肿瘤。

通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。

1 材料和方法

1.1 细胞系和培养条件

喉癌耐药细胞株 KBV200 细胞株由重庆医科大学医学超生工程研究所惠赠。

细胞培养条件:于含 10%新生牛血清的 RPMI1640 培养基中,37℃ 5%CO_2 饱和湿度条件下常规培养。

1.2 试剂

RPMI1640 培养基(GIBco U.S.A.);新生牛血清(购自杭州四季青生物工程材料研究所);粉防己碱(重庆医科大学药学院王驰副教授惠赠);四甲基偶氮唑盐(MTT)(购自北方同正生物制品公司);维拉帕米及阿霉素均为国产。

1.3 仪器和设备

二氧化碳孵箱(美国 LRBODEL CO_2 INCUBATOR);超净工作台(苏州净化设备厂);倒置显微镜(重庆光学仪器厂 XSZ-D2);酶标仪(美国 BIO-RAD Model 450 型酶标仪);Varian 600C 型直线加速器(购自美国);光学显微镜(Olympus)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 试剂的配置

细胞培养液：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 1×10^5U/ml，-20℃存放，临用前由 RPMI1640 培养液稀释成 100U/ml。

小牛血清：56℃水浴，30min 灭活，分装后于 -20℃保存。

粉防己碱：溶于 0.1N HCl 中，制成原液，-20℃保存，用时用无菌生理盐水稀释，加入反应体系的容剂量不影响培养液的 pH 值。

1.5 粉防己碱、维拉帕米对实验细胞株无毒浓度筛选

采用 MTT 法测定，回归分析得出，2 种药物对实验细胞株抑制率小于 10%的药物浓度（方法参见参考文献[3]）。

1.6 体外细胞毒试验

细胞增殖动力学以 MTT 法检测。将处于对数生长期的 2 种细胞分别以 2×10^4 个 /ml 浓度接种于 96 孔培养板，每孔终体积 200μl。上述条件下培养 24h，小心吸尽每孔培养液。实验组Ⅰ分别加入不同浓度的阿霉素、实验组Ⅱ分别加入不同浓度的阿霉素加 TET，阿霉素终浓度为 0.005、0.01、0.015、0.02、0.025（μg/ml）5 种，TET 终浓度为无毒剂量（0.5μg/ml），实验组Ⅲ分别加入上述终浓度的阿霉素和 VRP，VRP 终浓度为无毒剂量；对照组Ⅰ为不加细胞仅含培养液的空白对照，对照组Ⅱ、Ⅲ为不加药物仅加细胞的阴性对照，以上述条件培养 48h 后，每孔加 5mg/ml MTT 液 20μl，37℃ 继续孵育 4h，终止培养，吸弃上清液，每孔加 150μl DMSO，振荡 10min 结晶物充分溶解。由空白孔调零后，以酶标仪检测 490nm 处的光吸收值（A）。

细胞存活率（IC）：实验组平均 A 值 / 阴性对照组平均 A 值

根据线性方程求半数抑制浓度 IC_{50}。

逆转指数（RI）=IC_{50}（阿霉素）/IC_{50}（阿霉素 + 逆转剂）

1.7 统计学处理

数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计学用 t 检验方法。以 SPSS11.0 统计学软件分析。

2 结 果

2.1 MTT 法测定 TET、VRP 对 KBV200 耐药细胞株的无毒剂量筛选

经过 MTT 法测定，回归分析得出 TET、VRP 对细胞抑制率小于 10%时的药物浓度分别为 0.5μg/ml、12.5μg/ml。以此浓度药物分别与 KBV200 细胞共同孵育，测定细胞的生长曲线，结果显示：加药组的生长曲线与对照组的生长曲线相近似，表明在此浓度下，TET、VRP 对细胞无毒性，如图 1。

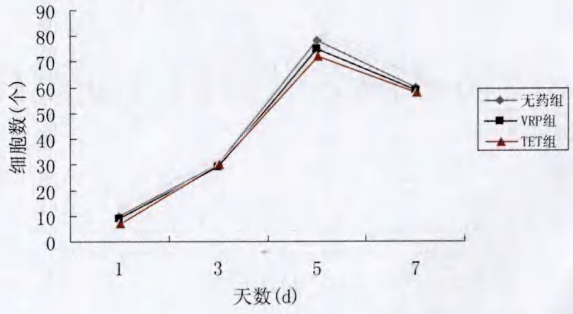


图 1 药物无毒剂量筛选

2.2 实验组Ⅰ阿霉素对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用

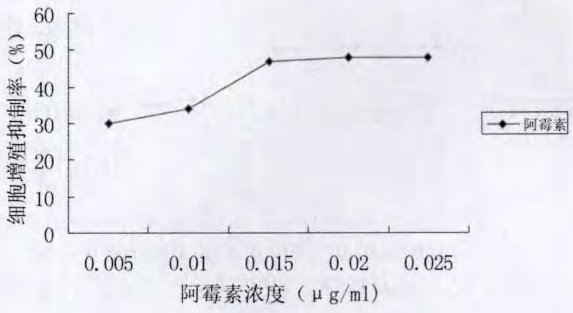


图 2 阿霉素对 KBV200 耐药细胞株的抑制作用

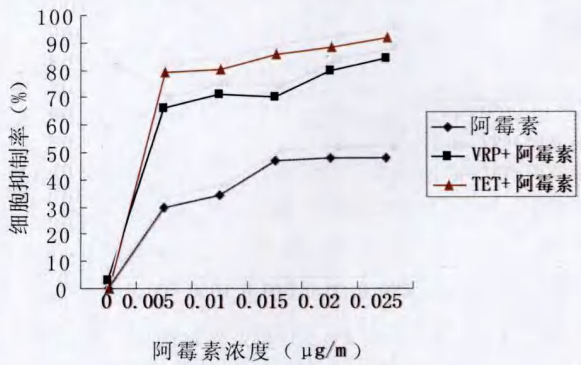


图 3 TET、VRP 的逆转作用

实验浓度的阿霉素对于 KBV200 耐药细胞株的抑制作用呈较明显浓度依赖关系，但其抑制率低于 50%，如图 2。

2.3 用 MTT 法测定 VRP（12.5μg/ml）和 TET 逆转 KBV200 细胞对阿霉素的耐药作用（实验组Ⅱ、Ⅲ）

VRP 能逆转实验细胞株对阿霉素的耐药作用，使细胞抑制率增至 60%以上，TET 能逆转实验细胞株对阿霉素的耐药作用，逆转作用随阿霉素浓度的

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 VRP 和 TET 逆转 KBV200 细胞对阿霉素的耐药作用

	单用阿霉素	VRP	TET
IC_{50}(ng/ml)	18.076	1.941	0.787
逆转指数(RI)	-	9.31	22.96

递增而加强,加入实验无毒剂量的 TET 后阿霉素对 KBV200 的抑制率增加至 80%以上优于 VRP,其逆转指数为 22.98 是经典逆转剂 VRP 的 2.47 倍,结果见图 3 和表 1($P<0.05$)。

3 讨 论

MDR 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生抗药性的同时,对其它结构和作用机理不同的抗肿瘤药物也产生交叉抗药性,其发病机制复杂,多药耐药基因 -1 (mdr-1) 编码的 P- 糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)高表达是产生 MDR 最主要的原因之一[4]。研究表明,目前多药耐药的逆转包括以下策略:使用化疗增敏剂、药物化学修饰、反义技术、载体技术等。

VRP 等钙通道阻滞剂是最早发现能逆转肿瘤多药耐药的药物之一,被认为是经典的逆转剂,但其毒性大、逆转指数较低[5],限制了它在临床上的进一步应用。

TET 是是防己科植物粉防己(Stephania tetrandra S.Moore)的主要活性成分。资料表明粉防己碱具有多种生物学效应,在治疗纤维化、门静脉和肺动脉高压,免疫机能调节及肿瘤防治等方面具有很好的应用前景[6]。研究表明,TET 能明显增强柔红霉素(DNR)和长春新碱(VCR)杀伤白血病细胞的能力,10^{-6}mol/L 的 TET 增加化疗药物 DNR、VCR 杀白血病细胞的作用为 30%左右,并随着化疗药物浓度的升高,促杀伤效应逐渐增强,TET 对白血病细胞的促杀伤作用,只有在化疗药物存在的情况下才表现出来,其本身对白血病和正常细胞无毒性作用,不直接破坏细胞,这种作用称为"促杀伤效应"。TET、VRP 对癌细胞均有化疗增效作用,但 VRP 能明显增强 DNR 和 VCR 对正常细胞的毒性作用,而同样剂量的 TET 对正常细胞促杀伤效应不显著[7,8]。

本实验以 VRP 为对照,研究低毒剂量的 TET 逆转喉癌耐药细胞株 KBV200 对阿霉素的耐药作用,结果显示:

(1)TET 能有效体外逆转喉癌耐药细胞株对阿霉素的耐药,低度剂量的 TET(0.5 μg/ml)将阿霉素对实验细胞株的抑制率从 30% ~ 48.03%提高到 80% ~ 91.76%,使其 IC_{50} 从 18.076ng/ml 下降到 0.787 ng/ml,逆转指数为 22.96。

(2)TET 逆转作用优于 VRP,实验 VRP 浓度为 12.5 μg/ml 是 TET 实验浓度的 25 倍,但其逆转指数为 9.31,仅为 TET 的 40.5%。

(3)TET 随化疗药物剂量的增加其"促杀伤效应"增强。

虽然 TET 表现有钙通道阻滞作用,但与 VRP 不同,其逆转 MDR 作用一般认为与钙拮抗作用无关。有文献报道[9],TET 能直接抑制 P-gp 的外泵功能,增加细胞内药物浓度,以逆转多药耐药,但并不能降低已表达的 P-gp 数量。

现有的研究结果表明 TET 逆转作用较强是非常具有开发前景的新一代 MDR 逆转剂。但其对于非 P-gp 介导的其他机制 MDR 是否有效,还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Fu LW,Deng ZA,Pan QC,et al. Screening and discovery of novel MDR modifiers from anturally occurring bisbenzylisoquinoline alkaloids[J]. Anticancer Res,2001;21(4A):2273-2280.

[2] Choi SU,Park SH,Kim KH,et al. The bisbenzylisoquinolineal alkaloids tetrandine and fan gchinoline,ehance the cytotoxicity of multidrug resistance related drugs,Aamodulation of P-glycoprotein[J]. Anticancer Drugs,1998;9(3):255.

[3] 王天晓,张凤春,杨晓红,等,敏药碱 -G 逆转肿瘤细胞多药耐药的作用和机制研究[J]. 中国药理报,2005;21(5):184-186.

[4] Gottesman MM,Pastan L,Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance[J]. Curr Opin Genet Dev,1996;6(5):6-10.

[5] Donna M,Bradshaw,Robert J,et al. Clinical relevance of transmembrane drug as a mechanism of multidrug resistance[J]. Journal of Clinical Oncology,1998;16(11):3674.

[6] Choi SU,Park SH,Kim KH,et al. The bisbenzylisoquinolineal alkaloids,tetrandine and fan gchinoline,ehance the cytotoxicity of multidrug resistance related drugs,Aamodulation of P-glycoprotein[J]. Anticancer Drugs,1998;9(3):255.

[7] 许文林,敖忠芳,陈玉心,等.汉防己甲素对柔红霉素和长春新碱增效作用的实验研究[J]. 中华血液学杂志,1994;15(5):256-257.

[8] 许文林,敖忠芳,陈宝安,等.汉防己甲素逆转血液系统肿瘤细胞多药耐药的临床研究[J]. 中华内科杂志,2001;40(9):631-633.

[9] 王 进, 沈靖南. 粉防己碱逆转骨肉瘤细胞系多药耐药性的研究[J]. 实用临床医学,2005;6(7):7-10.

(责任编辑:谭乐勤)