维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0411-05

苦参碱逆转人肝癌细胞株 QGY/CDDP 多药耐药性的实验研究

胥雄阳,何 松

(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨中药苦参碱(Mat)对 QGY 人肝癌细胞及其耐药细胞株 QGY/CDDP 的细胞生物学作用和可能的耐药逆转作用机制。方法:MTT 法检测苦参碱对两细胞的半数抑制浓度(IC_{50} 值)并培养 Mat 作用的 QGY/CDDP 细胞。比较 3 组细胞在细胞生长曲线、倍增时间、细胞周期、化疗药物耐药及逆转和细胞内 CDDP 含量的差别。免疫细胞化学法测定 3 组细胞 P-gp、MRP、Bax 蛋白的表达。结果:苦参碱可抑制 QGY 及其耐药细胞株 QGY/CDDP 的生长,无交叉耐药性。Mat 作用的 QGY/CDDP 细胞与 QGY 及其耐药细胞株 QGY/CDDP 在生物学特性方面表现出一定的差异,细胞的 P-gp、MRP、Bax 蛋白表达发生变化,降低 QGY/CDDP 细胞 P-gp、MRP 蛋白表达,增加了 Bax 蛋白的表达,增强 CDDP 对 QGY/CDDP 细胞的毒性,其逆转耐药倍数为 1.9 倍。结论:低毒剂量的苦参碱可增强 CDDP 对 QGY/CDDP 细胞的毒性,具有部分逆转人肝癌耐药细胞 QGY/CDDP 的耐药作用。

【关键词】肝癌细胞;多药耐药性;苦参碱

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-17

Experimental study of matrine to reverse drug-resistance of human multidrug-resistance hepatocellular carcinoma cell

XU Xiong-yang, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the biologic roles and potential reverse mechanisms of matrine in human hepatocellular carcinoma cell line QGY and QGY/CDDP. *Methods*: The MTT assay was used to detect the IC50s of QGY and QGY/CDDP cells, and QGY/CDDP cell were cultivated with matrine. The distinctions of three groups were compared in cell's appearance, growth curve, doubling time, cell cycle, drug-resistance of chemotherapeutics and CDDP contents of intra-cells. Immunocytochemical method was applied to detect the expression of P-gp, MRP and Bax. Results: Matrine could inhibit the growth of QGY and QGY/CDDP cells with no cross drug-resistance. There were some biological differences among QGY, QGY/CDDP and Mat-QGY/CDDP cells. The expressions of P-gp and MRP were decreased; Bax expression was increased, CDDP's toxic effect on QGY/CDDP cells was enhanced, and the drug sensitivity was elevated in Mat-QGY/CDDP cells. *Conclusion*: Matrine at lower toxic-dose could enhance the toxicity of CDDP *on* QGY/CDDP cells, and partly effective in reversing the drug-resistance in human multidrug-resistant hepatocellular carcinoma QGY/CDDP cells.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Multidrug resistance; Matrine

肝癌为我国常见恶性肿瘤之一,恶性程度高,发现时多为晚期,治疗手段多为化疗和手术后辅助化疗,疗效差,预后不佳。肿瘤多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)指肿瘤细胞对某种化疗药物产生耐药性的同时,对其它结构无关、作用机理各异的药物也产生交叉耐药性,是临床肿瘤化疗失败的主要原因[1],因此,寻找多药耐药逆转剂(Reversal agents, RAA)成为目前研究的热点,已发现的 RAA 有维拉帕米、环孢霉素 A、三苯氧胺等,由于本身的药理作用,当作为 RAA 时,出现严重的毒副作用,临床应用受到限制。因此在天然药物中寻找高效、低毒、价廉的 RAA 显得尤为重要。近年来对苦参碱的研究较为广泛,已有的研究表明苦参碱具有明确的抗人肝癌细胞作用[2],本实验进一步研究苦参碱对人肝癌耐药细胞的抑瘤作用及耐药逆转的可能机制。

作者介绍:胥雄阳(1970-),副主任医师,硕士,研究方向:肝癌的靶向治疗。

通讯作者:何 松,男,副教授,E-mail:hedoctor65@sina.com。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 药品和试剂

苦参碱(Matrine,广州白云山明兴制药有限公司),顺铂(CDDP,云南个旧生物制药厂),5-氟尿嘧啶(5-FU,西南药业股份有限公司),长春新碱(VCR,深圳万乐药业有限公司),丝裂霉素、氨甲喋呤(MMC,MTX,江苏恒瑞医药股份有限公司),噻唑兰(MTT)为 Sigma 公司产品,RPMI1640 培养液为 Gibco/BRL 公司产品,小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品,小鼠抗人 P-gp 及即用型 SABC 试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,小鼠抗人 MRP、Bax 及即用型 SABC 试剂盒购于北京中杉生物工程有限公司。

1.2 细胞培养

QGY 细胞和 QGY/CDDP 细胞均在含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液中、37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下,0.1%的胰酶传代消化培养。人肝癌细胞株 QGY 和人肝癌耐药细胞株 QGY/CDDP 均由重庆医科大学病理生理教研室汤为学教授惠赠,已证实 QGY/CDDP 人肝癌耐药细胞株具有较稳定的多药耐药性[3]。

1.3 MTT 法检测苦参碱对 QGY 和 QGY/CDDP 肝癌细胞的抑制作用和 Mat 作用的 QGY/CDDP 细胞培养

分别取对数生长期的亲本和耐药肝癌细胞,制备成浓度为 5×10^4 个 /ml 的细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 180μl,培养箱培养过夜,分别加入不同终浓度的苦参碱(0.25g/L、0.5g/L、1.0g/L、2.0g/L)每孔 20μl,继续培养 72h,加入 5mg/ml MTT10μl,再孵育 4h,离心弃上清,加入 200μl 甲基亚砜,微量震荡仪震荡 10min,自动酶标读数仪以 570nm 波长测定其吸光值,按下式计算抑制率:抑制率(%)=(1- 实验组 OD 值)/ 对照组 OD 值 × 100%;根据中效方程式计算药物的中效浓度(IC_{50}):fa/fu=(D / Dm)m;fa 为抑制率,fu(存活率)=1-fa,D 为药物浓度,Dm 为中效浓度即抑制率为 0.5 时所需药物浓度,m 为斜率。实验重复 3 次。确定苦参碱对 QGY 和 QGY/CDDP 肝癌细胞的半数抑制浓度(IC_{50})。

选择抑制率约为 10%的苦参碱浓度作用于 QGY/CDDP 细胞,37℃、5%CO_2 培养箱培养 7d,制备成 Mat 作用的 QGY/CDDP 细胞以备下阶段实验使用。

1.4 QGY、QGY/CDDP、Mat 作用的 QGY/CDDP 细胞的细胞生长曲线和群体倍增时间测定

取生长状态良好的细胞制备细胞悬液(5×10^3 个 /ml),接种至 6 孔板中(1ml/ 孔),接种 21 孔,分别于接种后第 1、2、3、4、5、6、7d,每天取 3 孔进行细胞记数,结果取均数,以培养时间为横坐标,细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线,按 Patterson 公式计算细胞倍增时间,Td=tlg2/lg(Nt-N0),Td:倍增时间;t:细胞数由 N0 增至 Nt 所需时间;N0:接种时细胞数;Nt:培养 th 细胞数。

1.5 流式细胞术测定 QGY 细胞、QGY/CDDP 细胞和 Mat 作用的 QGY/CDDP 细胞的细胞周期分布

细胞经 RPMI1640 培养液培养 24h 后,胰酶消化、离心,冷 PBS 洗 2 次,预冷的 70%的乙醇固定 24h 以上,加碘化丙啶(PI)染色 30min,用 FACScan Becton Dickinson 流式细胞仪作流式细胞分析,实验结果经计算机处理,计算出不同细胞的细胞周期分布。

1.6 观察 QGY、QGY/CDDP 和 Mat 作用后的 QGY/CDDP 细胞对 CDDP、MMC、5-FU、VCR、MTX 的耐药性检测

取对数生长期的 QGY 和 QGY/CDDP、Mat 作用后的 QGY/CDDP 肝癌细胞,调整细胞浓度为 5×10^4 个 /ml,加入 96 孔板,每孔 180μl,各分为 3 组。过夜培养后分别加入实验药物各 20μl:CDDP、MMC、5-FU、VCR、MTX,参照各药临床用药血峰浓度,设 5 个试验浓度,即 1/4、1/2、1、4、10PPC 倍血峰浓度,另设不加药的对照组,每试验浓度设 3 个复孔。继续孵育 24h,加 MTT 和 DMSO,上酶标仪,在波长 570nm 处测定光密度(OD)值,计算细胞抑制率。公式:细胞抑制率 =(1-实验组 OD/ 对照组 OD)× 100%,计算每一药物浓度的抑制率。实验重复 3 次。根据中效方程式计算出各种抗癌药物的半数抑制浓度(IC_{50})及耐药指数(Resistance index,RI):RI = 耐药细胞 IC_{50}/ 亲本细胞 IC_{50};计算逆转倍数:逆转倍数 = 耐药细胞 IC_{50}/ 逆转细胞 IC_{50}。

1.7 等离子体原子发射光谱仪(ICP)测定 QGY、QGY/CDDP 和 Mat 作用后的 QGY/CDDP 细胞内顺铂含量

(1)样品处理和 ICP 法测定:将各组肝癌细胞接种于是 250ml 培养瓶中,培养 24h 后分别加入 CDDP100μg/ml,培养 2h 后撤药,收集 2×10^7 个细胞,离心后各组细胞经 PBS 洗涤 2次后,加入去离子水 1ml,-20℃反复冻融 3~5 次,置镜下观察无完整细胞,悬浮于 5%HNO_3 中,细胞样品置 140℃电热鼓风干燥箱中加热至透明,定容后用等离子体原子发射光谱仪测定顺铂含量(检测波长为 299.796nm);(2)结果计算及分析:加入 5%HNO_3 制备含 CDDP 0~0.5μg/μl 系列溶液,测定其原子发射光谱,得回归方程为 y=1 703.38x+182.243(r=0.999 9,n=5),计算样品内 CDDP 的含量。

1.8 免疫细胞化学法分别测定 QGY、QGY/CDDP 和 Mat 作用后的 QGY/CDDP 细胞 P-gp、MRP、Bax 蛋白表达

1.8.1 细胞培养和免疫组化 将细胞浓度调整为 1×10^5 个 /ml,每片载玻片滴加细胞悬液 0.5ml,爬片培养 24h 后,多聚甲醛固定。按 P-gp、MRP、Bax 试剂盒步骤进行测定。

1.8.2 图像分析和统计处理 光镜下以恒定倍数,选取一定视野摄像,将图片输入计算机,采用成都金盘 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统,测定各组细胞阳性蛋白表达单位面积的光密度值即 IOD/μm^2(面密度)值,用平均 IOD/μm^2 反映蛋白质含量。

1.9 统计学方法

数据均用统计软件包 SPSS10.0 版本分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两样本均数比较采用成组 t 检验,不同处理组率的比较采用 χ^2 检验,显著性水平以 $P<0.05$ 判断。

2 结 果

2.1 苦参碱对 QGY 和 QGY/CDDP 肝癌细胞的抑

维普资讯 http://www.cqvip.com

制作用

如表 1 所示，苦参碱对 QGY 和 QGY/CDDP 肝癌细胞均有抑制作用，呈浓度依赖性，且亲本细胞较耐药细胞敏感。2 组细胞的 IC_{50}（$P>0.05$），QGY/CDDP 肝癌细胞对苦参碱无耐药性，结果见表 1。

2.2 细胞生长曲线、群体倍增时间和细胞周期分布

QGY 和 QGY/CDDP 肝癌细胞及 Mat 作用的 QGY/CDDP 肝癌细胞群体倍增时间各不相同，分别为 39.96h、53.50h、58.58h，Mat 作用的 QGY/CDDP 肝癌细胞较 QGY/CDDP 肝癌细胞倍增时间延长。3 组细胞的细胞周期有着明显不同，与亲本细胞相比，耐药细胞的 G_0/G_1 期所占比例增加，S 期比例减少，G_2/M 期所占比例减少，$P<0.05$，差别有显著性意义；Mat 作用的耐药细胞与耐药细胞比较，G_0/G_1 期所占比例进一步增加，S 期比例减少，G_2/M 期比例减少，$P>0.05$，差别无显著性意义，结果见表 2、图 1。

2.3 苦参碱对 QGY/CDDP 耐药肝癌细胞化学药物

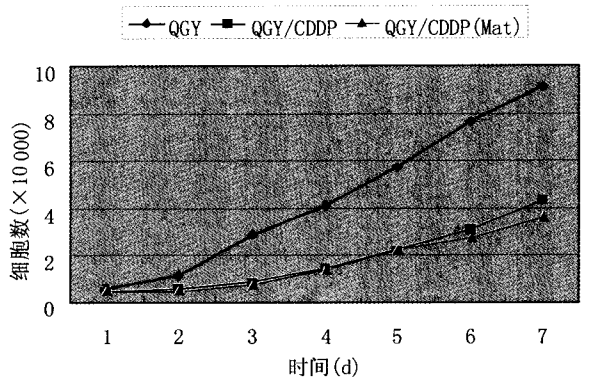


图 1 QGY、QGY/CDDP 和 QGY/CDDP(Mat)细胞的生长曲线

作用的逆转作用

QGY/CDDP 耐药肝癌细胞对 5 种常用化学药物存在不同程度的耐药性，具有多 MDR 特征。经 Mat 作用的 QGY/CDDP 细胞对化学药物的耐药性均不同程度发生逆转，结果见表 3。

2.4 细胞内顺铂含量的测定

QGY 细胞内顺铂含量为（5.698 7±0.006 5）μg/（2×10^7）个，QGY/CDDP 细胞内顺铂含量为（2.837 4±0.011 3）μg/（2×10^7）个，Mat 作用后的 QGY/CDDP细胞内顺铂含量为（3.820 2±0.003 6）μg/（2×10^7）个，说明经 Mat 作用后的 QGY/CDDP 细胞内顺铂含量较 QGY/CDDP 细胞增加，但低于 QGY 细胞内顺铂含量，$P<0.01$（QGY:QGY/CDDP），$P<0.05$[QGY/CDDP:QGY/CDDP(Mat)]，差别有显著性意义。

2.5 P-gp、MRP、Bax 蛋白表达

表 2 QGY、QGY/CDDP 和 QGY/CDDP(Mat)细胞的周期分布

细胞株	细胞周期(%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
QGY	56.71	31.16	12.13
QGY/CDDP	68.24*	21.58*	10.18
QGY/CDDP(Mat)	70.01*	20.03*	9.96

*$P<0.05$（与 QGY 细胞比较），$P>0.05$（QGY/CDDP 与 Mat-QGY/CDDP 比较）

表 1 苦参碱对 QGY 和 QGY/CDDP 肝癌细胞的抑制作用（$\bar{x}\pm s$）

细胞	苦参碱(g/L)(n=3)				IC_{50}(g/L)
	0.25	0.5	1.0	2.0	
QGY 抑制率(%)	16	33	65	90	0.66±0.06*
QGY/CDDP 抑制率(%)	12	23	57	86	0.82±0.07*

*$P>0.05$

表 3 QGY、QGY/CDDP 和 Mat 作用后的 QGY/CDDP 耐药细胞的药物敏感性

药物	半数抑制浓度 IC_{50}（μg/ml）			耐药指数(RI)	逆转倍数
	QGY	QGY/CDDP	QGY/CDDP(Mat)		
CDDP	0.924	13.258	6.978	14.35	1.9
5-FU	5.280	24.646	22.244	4.67	1.108
VCR	0.475	3.563	2.375	7.50	1.5
MMC	0.246	1.112	0.794	4.52	1.4
MTX	1.016	6.424	6.298	6.32	1.02

维普资讯 http://www.cqvip.com

QGY 细胞胞膜、胞浆的 P-gp、MRP、Bax 蛋白表达均为阴性；QGY/CDDP 细胞的胞膜、胞浆的 P-gp、MRP 蛋白表达为阳性，胞浆 Bax 蛋白表达为阴性；Mat 作用后的 QGY/CDDP 细胞胞膜、胞浆的 P-gp 和 MRP，以及胞浆的 Bax 蛋白表达均为阳性。结果见表 4 和图 2。

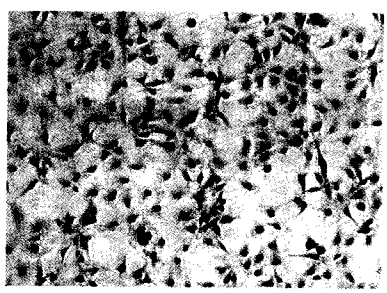
3 讨 论

苦参碱具有抗肿瘤增殖、诱导分化、诱导凋亡、抗转移和逆转 MDR 作用，通过作用钙离子通道、酪氨酸激酶、蛋白激酶 C、端粒酶、癌基因及抑癌基因、细胞周期基因和凋亡分化基因等靶点，发挥抗肿瘤作用[4,10]。苦参碱对 QGY 肝癌细胞和 QGY/CDDP 耐药肝癌细胞具有抑制作用，两者无显著性差异。

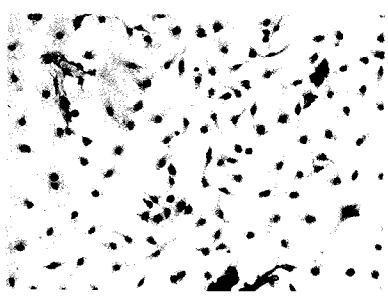
QGY 和 QGY/CDDP 肝癌细胞在细胞生长曲线、群体倍增时间和细胞周期分布上具有明显不同，

表 4 QGY 和 QGY/CDDP、QGY/CDDP(Mat)肝癌细胞相关蛋白的表达(IOD/μm^2)($\bar{x} \pm s$)

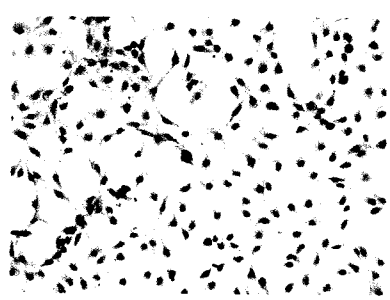
细胞	P-gp	MRP	Bax
QGY	-	-	-
QGY/CDDP	0.069 ± 0.008	0.065 ± 0.015	-
QGY/CDDP(Mat)	0.052 ± 0.021	0.057 ± 0.013	0.075 ± 0.019



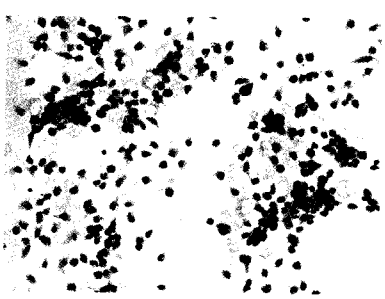
a..QGY 细胞 1×100（Bax）



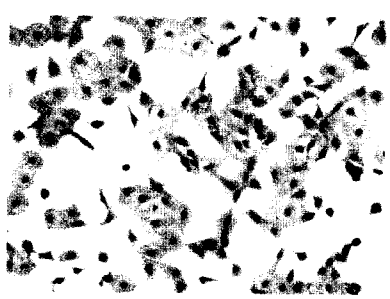
b. QGY 细胞 1×100（MRP）



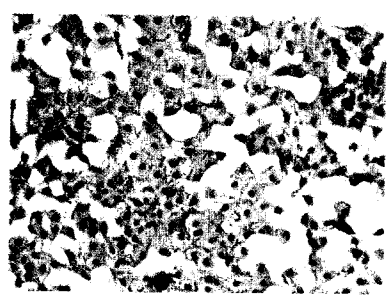
c. QGY 细胞 1×100（P-gp）



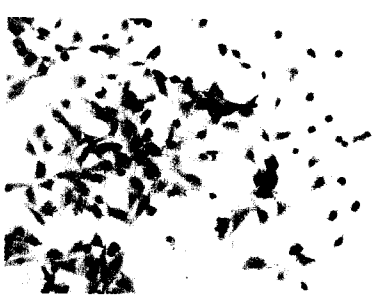
d. QGY/CDDP 细胞 1×100（Bax）



e. QGY/CDDP 细胞 l 1×100（MRP）



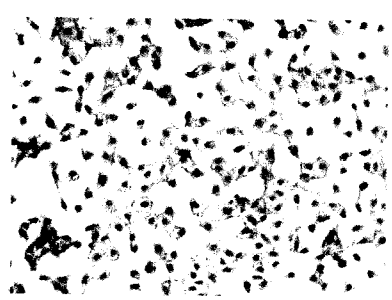
f. QGY/CDDP 细胞 1×100（P-gp）



g. QGY/CDDP 细胞（Mat） 1×100（Bax）



h. QGY/CDDP(Mat)细胞 1×100(MRP)



I. QGY/CDDP(Mat)细胞 1×100（P-gp）

图 2 P-gp、MRP、Bax 蛋白在 QGY、QGY/CDDP、QGY/CDDP(Mat)中的表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

耐药细胞的群体倍增时间大于亲本细胞，延长了13.54h，在细胞周期分布上耐药细胞的S期和G_2/M期比例减少。而Mat作用后的QGY/CDDP肝癌细胞保持了耐药细胞的生物学特性，与亲本细胞比较具有显著性差异，与耐药细胞比较群体倍增时间进一步延长，S期和G_2/M期比例减少，说明低毒剂量苦参碱作用QGY/CDDP肝癌细胞后，QGY/CDDP肝癌细胞的生物学特性在原有的基础上发生了一定程度的改变，生长受到抑制，但无显著性差异。与亲本细胞相比较，QGY/CDDP肝癌细胞对化疗药物CDDP、MMC、5-FU、VCR、MTX存在不同程度的耐药性，经低毒剂量的苦参碱作用后，耐药肝癌细胞的P-gp、MRP蛋白表达下调，Bax蛋白表达上调，导致细胞内顺铂含量增加，促凋亡因子增加，表现出对化学药物的耐药性发生不同程度逆转，尤其对CDDP、MMC、VCR逆转明显。P-gp、MRP蛋白是能量依耐性药物外排泵[5]，本实验通过免疫细胞化学技术检测发现，QGY细胞无P-gp、MRP蛋白表达，QGY/CDDP细胞出现P-gp、MRP蛋白表达，而低毒剂量苦参碱作用后QGY/CDDP细胞的P-gp、MRP蛋白表达下调，提示细胞内CDDP蓄积增加可能与P-gp、MRP蛋白相关。Bax蛋白属于Bcl-2家族，高表达的Bax可活化Cytc并通过Apaf-1(细胞凋亡蛋白酶活化因子)至caspase途径诱导细胞凋亡[6]，Mat作用后的QGY/CDDP肝癌细胞出现Bax蛋白表达，与Mat作用于HepG2肝癌细胞的实验一致[7]，提示耐药肿瘤细胞耐药逆转可能与Bax蛋白表达促进凋亡相关。李贵海等的小鼠体内实验研究亦证实苦参碱具有逆转肿瘤耐药性，其机制与下调P_{170}、LRP、TOPOⅡ的表达率相关[8]。

苦参碱具有抗肿瘤作用，但较高浓度的Mat(500~1 000mg/L)对正常人肝细胞有显著不良影响，而低浓度250mg/L的Mat则对正常人肝细胞无明显损害作用[9]。本实验采用低浓度200mg/L的Mat作用于QGY/CDDP耐药肝癌细胞，并对其化疗药物的耐药性产生了一定程度的逆转。因此，是否可以在化疗间隙期使用低浓度Mat，以达到抑制肿瘤细胞增殖和逆转可能存在的耐药性，有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 杨纯正. 肿瘤耐药研究的若干问题[J]. 中华医学杂志，2001；25(9)：793-800.

[2] 金艳书，吴学敏，娄金莉.苦参碱对人肝癌细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡的影响[J]. 中国临床康复，2006；10(3)：107-109.

[3] 杨俊霞，汤为学.人肝癌顺铂耐药细胞系的建立及其生物学特征[J]. 癌症，2002；21(8)：872-876.

[4] 胥雄阳，何 松. 苦参碱抗肿瘤作用机制的研究进展[J].重庆医科大学学报，2007；32(z1)：54-56.

[5] Huh HJ，Park CJ，Jang S，et al. Prognostic significance of multidrug resistence genel(MDR1)，multidrug resistence-related protein(MRP) and lung resistence protein(LRP) Mrna expression in acute leukemia[J]. J Korean Med Sci，2006；21(2)：253-258.

[6] Adams JM，Corg S. The Bcl-2 protein family：arbiters of cell survival[J]. Science，1998；281(45)：1322.

[7] 司维柯，陈 安.苦参碱诱导人肝癌细胞系HepG2凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报，2001；23(7)：816-820.

[8] 李贵海，王 玫，孙付军，等.苦参碱逆转小鼠S_{180}肿瘤细胞获得性多药耐药基因相关表达产物过度表达的研究[J]. 中药材，2006；29(1)：40-42.

[9] 范瑞芳，龚晓兵，程向东.苦参碱对体外培养人肝细胞影响及其剂量关系[J]. 肿瘤学杂志，2005；11(2)：123-125.

[10] 陈鸿雁，王 驰，余晓燕，等.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[J]. 第三军医大学学报，2006；28(11)：1231-1233.

(责任编辑：谭乐勤)