维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)04-0424-04

人参总皂甙逆转 K562/A02 细胞对 DOX 耐药性的研究

王 利[1], 唐宗山[1], 黄宗干[1], 王亚平[2]

(1. 重庆医科大学临床学院血液科;2. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人参总皂甙(Total saponins panax ginseng,TSPG)对人红白血病耐药细胞系 K562/A02 耐药性影响及作用机制。方法:MTT 法测定 TSPG 作用后 K562/A02 细胞对阿霉素(DOX)的药物敏感变化。免疫组化法检测 TSPG 作用后 K562/A02 细胞 mdr-1 基因产物 P-gp 及凋亡调控基因产物 bcl-2 的表达。RT-PCR 法检测 TSPG 作用后 K562/A02 细胞 mdr-1 mRNA 表达。结果:TSPG 能增强 DOX 对 K562/A02 细胞的毒性作用,逆转效率与浓度相关。TSPG 作用后 P-gp 表达下降有显著差异($P<0.01$),bcl-2 表达变化无显著差异($P>0.05$)。TSPG 作用后 K562/A02 细胞 mdr-1 mRNA 表达降低有显著差异($P<0.01$)。结论:TSPG 能部分逆转 K562/A02 细胞的耐药性,机制主要是下调 mdr-1 mRNA 表达,导致产物 P-gp 减少;与 bcl-2 蛋白表达变化无显著相关。

【关键词】人参总皂甙;细胞系,K562;抗药性;mdr-1;bcl-2

【中国图书分类法分类号】R733.73 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-01-03

Reversing drug resistance of human erythroleukemia cell line K562/A02 on DOX by total saponings Panax ginseng

WANG Li, et al

(*Department of Hematology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical Universitry*)

【Abstract】 *Objective*: To research the effect of total saponins Panax ginseng (TSPG) on the drug resistance of human erythroleukemia drug resistant cell line K562/A02 and its mechanism. *Methods*: The sensitivity of TSPG-treated K562/A02 cells to anticancer drugs was determined by MTT assay. Immunohistochemistry method was used to measure mdr-1 gene product P-gp and apoptosis regulation gene product bcl-2 expression. RT-PCR technique was used to examine mdr-1 mRNA expression. *Results*: In non-toxic dosages, TSPG strengthened the toxicity effect of doxorubicin on K562/A02 cells, while the reversing effect of TSPG was related to its concentration. Decrease in P-gp expression in K562/A02 cells was marked ($P<0.01$) after 3 days of TSPG (150μg/ml)application to K562/A02 cells, but the change in bcl-2 protein expression was insignificant ($P>O.05$)after 3 days of TSPG(150μg/ml)treatment. Decrease in mdr-1 mRNA expression was significant ($P<0.01$)after 24 hours of TSPG(150μg/ml) treatment. *Conclusion*: TSPG partly reverses the drug resistance of K562/A02 cells. The main mechanism by which TSPG reverses the drug resistance of K562/A02 cells is decreasing the expression of mdr-1 mRNA, which then decreases P-gp, the product of mdr-1 mRNA. The relationship between be 1-2 protein expression and the mechanism by which TSPG reverses the drug resistance of K562/A02 cells is not clear.

【Key words】 Total saponins Panax ginseng;Cell line,K562;Drug resistance;mdr-1;bcl-2

化学治疗在白血病治疗中仍起重要作用,但复发和耐药是导致化疗失败的主要原因。多药耐药(multidrug resistance,MDR)[1]是耐药的主要形式,寻找低毒、高效的 MDR 逆转剂是 MDR 研究目标。以维拉帕米为代表的钙通道阻滞剂(Calciu-Channel Block,CCB)[2]和环孢菌素 A 是目前公认的耐药逆转剂,因其有效剂量毒副作用大而影响了临床应用。因此,寻找高逆转效力、低钙通道阻滞活性、低毒性的 CCB,是当前研究焦点。人参总皂甙(total saponins panax ginseng,TSPG)是人参有效成分,已发现 TSPG 有低钙通道阻滞活性[3],不同剂量能刺激骨髓造血,减轻化疗药物的副作用等功能,因此对其进行逆转研究很有必要。本研究以人红白血病耐药细胞株 K562/A02 为 MDR 细胞模型,采用 MTT

作者介绍:王 利(1973-),女,博士生,
主要研究方向:血液系统疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

法、免疫组化法、RT－PCR 法检测 TSPG 作用前后耐药肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，耐药基因 mdr－1 产物 P－gp 和 mdr－1 mRNA 表达水平，凋亡调控基因产物 bcl－2 的表达水平，从而探讨人参总皂甙逆转 MDR 的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

人红白血病耐药细胞株 K562/A02 由中国医学科学院血液病研究所提供；阿霉素(Doxorubicin)购自 FARMITALIA CARLO ERBA(ITALY)公司；TSPG：由重庆医科大学组胚教研室惠赠，重庆中药研究所提纯，纯度 95%，RPMI 1640 培养液配成不同浓度，过滤除菌备用。PCR 引物：mdr－1 5′ CCCATCATTGCAATAGCAGG，3′ GTTCAAACTTCTGCTCCTCA，扩增产物 157bp；β_2－微球蛋白 5′ ACCCCCACTGAAAAAGATGA，3′ ATCTTCAAACCTCCATGATG，扩增产物 114bp；均由上海生工生物工程公司合成。抗 bcl－2 单抗(深圳晶美)；抗 P－170 单抗(JSB－1)及免疫组化试剂盒购自福州迈新生物公司。自动酶标光度仪：美国 BIO－RAD，型号：2550；PCR 扩增仪：gene cyclerTM(日本)。图像分析仪：北航病理图像分析软件 CM－2000B。

1.2 细胞培养

将 K562/A02 耐药细胞培养于 RPMI－1640 培养液(含 10%胎牛血清，1μl/ml 阿霉素)内，37℃，5%CO_2 孵箱培养 3～5 天换液。实验前至少 2 周开始脱离阿霉素培养。K562 敏感细胞培养于 RPMI－1640 培养液(含 10%小牛血清)内，37℃，5%CO_2 孵箱培养 2～4 天换液。

1.3 药物敏感性试验

MTT 法检测细胞的药物敏感性，方法参照文献[4]，稍作改进。绘制剂量反应曲线：剂量取对数，细胞抑制率换算成概率单位，使曲线直线化，以直线回归法求出回归方程，计算 IC50 对数值，查反对数表得到 IC50 值。耐药倍数＝IC50A/IC50C，逆转倍数＝IC50A/IC50B，相对逆转效率＝(IC50A－IC50B)/(IC50A－IC50C)，A：K562/A02，B：K562/A02(TSPG)，C：K562。

1.4 免疫组化法检测

TSPG 对 K562/A02 细胞 bcl－2 蛋白、P－糖蛋白表达的影响，方法参考试剂盒，稍作改进。结果判定[5]：以细胞膜、细胞浆出现棕黄色颗粒状着色为阳性，未着色为阴性，根据着色强度分为三级：弱＋(棕黄色染色)，中＋＋(深棕色染色)，强＋＋＋(深棕色染色，呈斑块状遍布整个细胞)，共计数 1000 个细胞，由图像分析仪得出结果。

1.5 RT－PCR 检测 mdr－1 mRNA 表达水平

取对数生长期 K562/A02 细胞分成对照组和试验组(TSPG 作用组)，重复 3 次，37℃、5%CO_2 孵箱培养 24h。采用 Tripure 试剂提取总 RNA，逆转录合成 cDNA，按下列条件进行 PCR 扩增：1 个循环：94℃ 5 min；30 个循环：94℃ 1min，55℃ 1 min，72℃ 2min；1 个循环：72℃ 10 min。3%琼脂糖凝胶电泳，70V 电泳 30min。图像分析仪分析各条带光密度值，用实验组光密度值/同组内对照光密度值比值表示 mdr－1 mRNA 表达水平。

1.6 统计学处理

采用方差分析，直线回归，秩和检验，χ^2 检验等方法，均用 SAS6.12 软件处理，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 TSPG 对 K562/A02 细胞的直接抑制作用

TSPG 浓度分别为 50μg/ml、100μg/ml、150μg/ml 时对 K562/A02 细胞无明显抑制作用($P>0.05$)。150μg/ml 的 TSPG 对 K562/A02 细胞抑制率为 2.82%，当 TSPG 浓度达到 200μg/ml 时抑制率为 13.31%($P<0.05$)。因此，将 TSPG 150μg/ml 视为无毒剂量界限，进行下一步实验。

2.2 TSPG 对 K562/A02 细胞的逆转作用

TSPG 浓度分别为 50μg/ml，100μg/ml，150μg/ml，逆转 K562/A02 细胞对 DOX 的耐药作用随浓度增加而增加。与 DOX 浓度也相关，DOX 浓度低于 20μg/ml 时对细胞抑制作用与浓度正相关，在 20μg/ml 时达最高，浓度增至 45μg/ml 时抑制作用变化不明显(表 1)。K562/A02 的 IC50 值比 K562 明显增高，TSPG 作用后不同程度下降，与浓度负相关。计算可得 K562/A02 细胞的耐药倍数为 49.83 倍(表 2)。

逆转倍数随着 TSPG 浓度的增加而增加，TSPG150μg/ml 时最高，为 4.67 倍。故选用此浓度进行进一步实验。

2.3 TSPG 对 K562/A02 细胞 P－gp、bcl－2 蛋白表达的影响

K562 细胞 P－gp 表达阴性，K562/A02 细胞和 TSPG 150μg/ml 作用 3 天的 K562/A02 细胞均有 P－gp 表达，TSPG 150μg/ml 作用 3 天后 P－gp 表达阳性程度降低，主要表现为阴性细胞数增多，强阳性细胞数减少，与 K562/A02 组比较有显著差异($P=0.0001$)。

K562/A02 细胞 bcl－2 表达阳性，TSPG 150μg/ml 作用 3 天后 bcl－2 表达阳性程度降低，与 K562/A02 组比较无显著性差异($P>0.05$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同浓度 TSPG 与 DOX 对 K562/A02 细胞的抑制率(%)

DOX 浓度(μg/ml)	0	0.1	1	10	20	45
K562 组	0	40.09	86.80	87.34	96.50	97.40
K562/A02 组	0	0.50	7.75	44.10	89.99	93.02
TSPG50μg/ml 作用组 *	0	0.40	12.55	67.14	94.29	94.10
TSPG100μg/ml 作用组 **	0.28	0.60	17.28	66.88	92.25	98.81
TSPG150μg/ml 作用组 ***	2.8	13.45	40.64	77.00	92.65	96.51

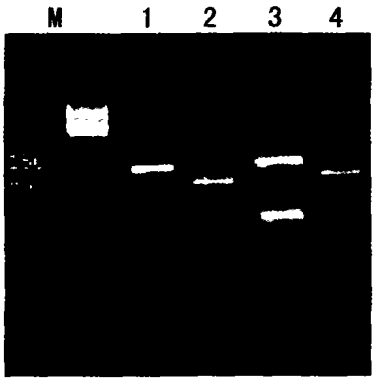
*, **, *** 各组与 K562/A02 组比较均有显著差异($P<0.05$)

表 2 TSPG 对 K562/A02 细胞耐药性的逆转作用

	K562	K562/A02	K562/A02 (TSPG50μg/ml)	K562/A02 (TSPG100μg/ml)	K562/A02 (TSPG150μg/ml)
IC50(μg/ml)	0.120	5.980	4.138	3.248	1.281
逆转倍数			1.45	1.84	4.67
相对逆转效率(%)			31.43	46.63	80.19

2.4 TSPG 对 K562/A02 细胞 mdr-1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果如图 1 通过图像分析系统,得到各条带光密度值,由此计算可得 mRNA 定量值,对照组 6.14,TSPG150μg/ml 组 2.08,与对照组比较有显著差异($P<0.01$)。



M:标准(marker) 1,3 带:mdr-1 mRNA
2,4 带:同组 β_2-微球蛋白内标(β_2-microglobin)
1,2 实验组:TSPG150μg/ml(treated group:TSPG150μg/ml)
3,4 对照组:K562/A02 细胞系(control group:K562/A02 Cell line)

图 1 RT-PCR 结果

3 讨 论

K562/A02 耐药细胞系[6]是用阿霉素以浓度梯度法对 K562 细胞进行长期诱导筛选获得的一株多药耐药细胞系,对阿霉素耐药倍数为 96 倍,对其他结构及药理机制不同的抗癌药物具有程度不同的交叉耐药,而对非 MDR 药物如 Ara-C 基本无耐药性。K562/A02 细胞的耐药特点是 P-gp 表达且表型稳定,在无药条件下传 20 代后,P-gp 仍稳定表达。用 P-gp 逆转剂 CsA 和 VRP 只是部分逆转耐药性,提示该细胞系可能存在 P-gp 以外的耐药机制。已有研究表明钙通道阻滞剂(CCB)对 MDR 有逆转作用,CCB 的钙拮抗活性程度与 MDR 逆转作用无相关。TSPG 与 P-gp 逆转剂 VRP 等具有程度不同的钙通道阻滞活性,因此,选用以 P-gp 表达为主要机制的多药耐药细胞系,是进行 TSPG 逆转作用研究的理想模型。实验中发现,K562/A02 细胞与 K562 细胞形态上无明显区别,K562/A02 细胞有一定的贴壁趋势,细胞涂片瑞氏染色后显微镜下观察,K562/A02 细胞核异型性更明显,多核、巨核、核分裂相更易见。本研究中 K562/A02 脱药 3 周后对阿霉素耐药倍数为 49 倍,与文献报道差异较大,分析可能原因为:(1)脱药时间长短不同;(2)检测方法不同,文献报道系采用[^{3}H]TdR 掺入法,本研究采用 MTT 法;(3)K562 来源不同,传代次数不同是否会影响细胞对药物的敏感性,有待研究。结果表明,无毒剂量下,TSPG 能增强阿霉素对 K562/A02 细胞的毒性作用,随着 TSPG 浓度增加,逆转作用增加,而对 K562 细胞无上述作用,表明 TSPG 部分逆转了 K562/A02 细胞的耐药性。

多药耐药的发生机制主要有:(1)膜转运蛋白超家族:P-gp、MDR 相关蛋白(MRP)、肺耐药蛋白(LRP)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)[7]等介导的 MDR;(2)酶介导机制:谷胱甘肽硫转移系统(GSH/GST)功能增强、拓扑异构酶 2(TOPOⅡ)活性下降;(3)细胞凋亡受抑制,bcl-2 等介导[8]。一般认为 MDR 是多机制引起的,其中,P-gp 介导的 MDR 是血液系统肿瘤多药耐药的主要机制[9]。P-gp 是 mdr-

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 基因的产物，目前检测 mdr－1 基因表达主要从 mRNA 水平和蛋白水平进行。本研究采用免疫组化法检测 P－gp 蛋白表达量，结果显示：K562 细胞 P－gp 表达率极低，而 K562/A02 细胞 P－gp 阳性率很高，这与本细胞株耐药特点一致。用 TSPG150μg/ml 作用 72h，K562/A02 细胞 P－gp 表达阳性程度下降，提示 TSPG 逆转耐药是通过下调 mdr－1 基因产物 P－gp 实现的。采用 RT－PCR 法检测 mdr－1 mRNA 表达，结果显示 K562/A02 细胞 mdr－1 mRNA 表达阳性，TSPG 150μg/ml 作用 24h K562/A02 细胞 mdr－1 mRNA 量减少。RT－PCR 与免疫组化结果一致，表明 TSPG 逆转 K562/A02 的耐药机制，是通过下调 mdr－1 mRNA 表达水平，使产物 P－gp 产量减少，导致耐药细胞对抗肿瘤药物外排减少，从而增加抗肿瘤药物对肿瘤细胞的毒性作用。

多种因素参与调控的细胞凋亡抑制是 MDR 主要机制之一，其中起关键作用的调控因素是 Bcl－2 基因及其产物。Bcl－2 基因最初从 B 细胞淋巴瘤中分离鉴定出来，激活的 Bcl－2 定位于 $18q^{21}$ 上。其产物 bcl－2 是一种 26Kda 的蛋白质分子，定位在膜上。bcl－2 与多种肿瘤耐药有关，bcl－2 表达是肾癌耐药细胞系耐药的主要机制[10]，在进展期和晚期慢性淋巴细胞白血病中 bcl－2 高表达[11]。Bcl－2 与以往大部分癌基因的功能不同，主要是抑制细胞程序性死亡，从而使细胞寿命延长[12]。转基因实验表明，Bcl－2 基因可以延长带瘤小鼠的存活期，Bcl－2 基因的表达不仅能保护肉瘤和淋巴瘤细胞在缺乏生长因子时的程序性死亡，也能防止去除生长因子时神经元细胞和 c－myc 基因介导的程序化细胞死亡，抑制秋水仙碱等诱导的程序化细胞死亡。Bcl－2 可抑制动物卵母细胞核的凋亡，而无 Bcl－2 表达或极低水平表达的细胞生存期缩短[13]。本研究结果表明 TSPG 对 K562/A02 细胞的 bcl－2 蛋白表达阳性程度无显著影响，提示 TSPG 逆转 K562/A02 细胞对阿霉素的耐药性不是通过下调 bcl－2 蛋白表达实现的。这一结果并不能断定 TSPG 的逆转作用与影响 K562/A02 细胞凋亡无关，因为 bcl－2 只是参与细胞凋亡调控的一条途径，TSPG 是否通过其他途径如 P53、c－myc 等影响细胞凋亡，则需要进行相关研究。

目前已发现多种中药具有逆转 MDR 作用。进行逆转 MDR 研究的中药大都有钙通道阻滞活性，主要是针对 P－gp 介导的 MDR 的逆转作用。国内有人应用川芎嗪处理 HL－60/VCR 细胞，使耐药细胞对多种化疗药物敏感性增加，逆转作用通过下调 P－gp 表达实现[14]。潘启超等[15]对多种中药单体逆转 MDR 作用进行了筛选试验，发现粉防己碱、蝙蝠葛碱、莲心碱和人参总皂甙 Rb1 在 BEL－7402 细胞对 VCR 的体外增敏作用有类似 VRP 逆转 MDR 的作用，认为粉防己碱逆转 MDR 的机制与逆转肿瘤细胞的凋亡抗性有关。研究还发现，汉防己甲素、苦参碱、多种双苄基异喹啉生物碱有部分逆转 MDR 能力。由此可见，中药确有逆转 MDR 的可行性。本研究发现大剂量 TSPG 对肿瘤细胞生长有抑制作用，无毒剂量下可逆转 K562/A02 细胞对阿霉素的耐药性。我们既往研究发现小剂量人参总皂甙可刺激骨髓造血。这种对肿瘤细胞有抑制作用，对正常造血有促进作用的新型药物必将有广阔的应用前景。目前多数研究仅限于实验室阶段，与临床应用还有距离，还需深入广泛的进行研究，选择出逆转效率高、毒副作用低、临床应用效果良好的新型逆转剂。

参 考 文 献

[1] Flens MJ, Zamsn GJR, Van der valk P, et al. Tissue distribution of multidrug resistance protein[J]. Am J Pathol, 1996; 148(4): 1237－1247.

[2] Futscher BW, Foley NE, Gleason－Guzman MC, et al. Verapamil suppresses the emergence of P－glycoprotein－mediated multi－drug resistance[J]. Int J Cancer, 1996; 66(4): 520－525.

[3] 开 丽，王中峰，肖家思，等. 人参二醇组皂甙对大鼠皮层神经元钙通道的影响[J]. 中国药理学通报，1998; 14(1): 53－56.

[4] 鄂 征，主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995; 436－437.

[5] 李 羲，郭先健，钱桂生，等. 人肺腺癌细胞株中 P－gp 表达与抗药程度关系[J]. 第三军医大学学报，1996; 18(5): 534－535.

[6] 栾凤君，杨纯正，马建国，等. 一株人红白血病多药耐药细胞系的建立及其耐药特性的研究[J]. 中华肿瘤杂志，1993; 15(2): 101－103.

[7] Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, et al. A human placenta－specific ATP－binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved : in multidrug resistance[J]. Cancer Res, 1998; 58 (23): 5337－5339. (下转第 435 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

活性被抑制,导致 Tg 表达及甲状腺激素合成障碍,从而达到治疗甲亢的目的。总之,本研究提示血 Tg 变化和 Fra8q22 表达频率可能存在一定的相关关系,但结果仍不能反映二者之间存在线性相关关系。因而关于二者的确切关系以及血清 Tg 水平的变化是否还受其它因素的影响尚有待进一步研究和探讨。

参 考 文 献

[1] Berger. Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile site. Cytogenet [J]. Cell Genet, 1985;40:490.

[2] 陈立男,王志春,李洪胜,等.^{131}I 治疗前后甲亢症患者的染色体畸变[J].哈尔滨医科大学学报,1995;4:8.

[3] 詹喜焱,代 军,胡 绍.治疗剂量的^{131}I 对甲亢患者淋巴细胞染色体影响的研究[J].中国优生与遗传杂志,1999;7(3):51.

[4] 胡玲佳,谢光洁,陈朝辉,等.抗癫痫药物对淋巴细胞微核率的影响[J].中华医学遗传学杂志,1992;9(1):13.

[5] 陈振军,王知权.稳定性染色体畸变在早先照射研究中的生物学意义[J].国外医学放射医学核医学分册,1991;15(4):154.

[6] Smeets DF. The most common fragile site is 3p14[J]. Hum Genet, 1990;72:215.

[7] Yunis JJ, Soreng AL. Consititutive fragile site and cancer [J]. Science, 1993;226:1199.

[8] Arvedimento VE, Lauro RD, Monticelli A. Mapping of human thyroglobulin gene on the long arm of chromosome 8 by in situ hybridization[J]. Hum Genet, 1989;71:163.

(上接第 427 页)

[8] Reed JC. Bcl-2 family proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies[J]. Semin Hematol, 1997; 34 (4 suppl5) :9-19.

[9] Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies[J]. J Intern Med, 2000;247(5):521-534.

[10] Scholtoma JM, Romijn JC, van Stoenbruggo GJ, et al. Inhibition of apoptotic proteins causes multidrug resistance in renal carcinoma cells[J]. Anticancer Res, 2001;21(5): 3161-3166.

[11] Consoli U, Santonocito A, Stagno F, et al. Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2002;116(4):774-780.

[12] Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogones: regulators of cell death[J]. Blood, 1992;80(4) :879-886.

[13] Yang E, Korsmeyer JS. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl2family and cell death[J]. Blood, 1996;88(2): 386-401.

[14] 梁 蓉,杨平地,陈协群,等.川芎嗪对白血病 HL-60/VCR 细胞多药耐药的逆转及其机制研究[J].中华血液学杂志,1999;20(6):323-324.

[15] 潘启超,田 晖.多种中药单体逆转肿瘤多药耐药性[J].科学通报,1995;40(20):1901-1904.