DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.019

文章编号: 1000-5404(1999)11-0825-03

人参皂甙单体 Rb1对多药耐药细胞系 K562/HHT的耐药逆转作用

史曦凯[1],张翼军[1],赵春景[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]血液科;[2]药剂科,重庆 400038)

【提要】 目的:探讨中药钙离子通道拮抗剂人参皂甙单体 Rb1,对白血病多药耐药细胞系(K-562/HHT)的耐药逆转作用。方法:药物敏感试验采用四唑氮盐(MTT)比色试验法。结果:Rb1在 0~80μmol/L浓度范围内对 K562/HHT未见明显毒性作用;20μmol/L、40μmol/LRb1耐药逆转倍数分别为 4.4、7.9倍。结论:Rb1可以逆转 K562/HHT的多药耐药性,并呈剂量依赖性。

关键词 多药耐药;耐药逆转;钙离子通道拮抗剂;人参皂甙 Rb1

中图法分类号 R915.5;R977 文献标识码 A

肿瘤产生多药耐药(Multidrug resistance, MDR)时常有 P-gp的过度表达,这种 P-gp糖蛋白是一种能量泵,可主动将细胞内药物泵出,使细胞内药物减少,产生对多种化疗药物的耐药性,涉及的药物包括蒽环类、长春碱类,表鬼臼素类等多类化疗药物,上述药物均是白血病化疗的常用药物,研究 MDR的逆转无疑对提高白血病的疗效有着重要意义。大量研究表明,钙离子拮抗剂通过竞争性抑制 P-gp外排药物而逆转 MDR。传统的钙拮抗剂,均需较大剂量才能达到逆转 MDR的效果。但大剂量产生的毒性限制了它的临床应用。多种中草药具有钙拮抗剂活性,毒副作用也较低,有临床研究推广价值,人参皂甙单体 Rb1是其中之一。人参皂甙单体 Rb1系三七总甙,人参二醇甙的主要成份,分子式为 $C_{54}H_{92}O_{23}H_2O$。近年的实验研究表明 Rb1对钙离子通道有阻滞活性[1]。本研究旨在探讨其对白血病多药耐药细胞系(K-562/HHT)的耐药逆转作用,并与典型药物 VER比较,观察逆转作用强度。

1 材料

1.1 细胞系

K562/S,k562/HHT由中国医学科学院血液学研究所血液病医院细胞培养室馈赠。

1.2 药物与试剂

高三尖杉酯碱(HHT北京协和药厂)。异博定(VER连云港制药厂)。人参皂甙单体 Rb1(卫生部药品生物制品检验所)。上述药物均用生理盐水配成工作母液,临用时用 RPMI 1640培养液配成相应浓度应用液。

RPMI 1640培养液(美国 Sigma公司)。MTT(美国 Sigma公司)。

2 实验方法

2.1 K562/S与 K562/HHT细胞培养[2]

K562/S悬浮于含 10%小牛血清的 RPMI-1640培养基中长期培养;K562/HHT则在含 0.2μg/ml HHT诱导耐药的 RPMI-1640培养基中长期培养,试验前 2 d,更换成无 HHT的培养液培养并进行试验。

2.2 四唑氮盐(MTT)比色试验[3]

试验分成四组:①药物受试组:药物+细胞+培养基。②细胞对照组(阴性对照组):细胞+培养基。③空白组:培养基。④VER作为阳性对照组。以上各组一式三份进行试验。药物受试组分别为:A组 5~6种浓度的 HHT;B组 5~6种浓度的 HHT加不同浓度的 Rb1或 8μmol的 VER(各 50μl)。

以生长良好的 5×10^4/ml培养细胞 100μl接种于 96孔培养板,加入相应浓度的 HHT、Rb1或 VER,每孔终体积 200μl。将培养板移入 CO_2孵箱中,在 37℃、5% CO_2及饱和湿度条件下,培养 4 d。第 4天后,每孔加入 MTT溶液(5 mg/ml)20μl,37.0℃ 4 h终止培养,离心(1000 rpm,5 min),弃去孔内培养液,每孔加入 150μl DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,540 nm波长在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。

$$细胞存活率=\frac{药物受试组光吸收值}{细胞对照组光吸收值}\times 100\%$$

空白组用于光吸收值调零

2.3 统计学分析

IC_{50}应用加权线性回归方法计算,结果以 $\bar{x}\pm s$表示,不同药物间的比较应用完全随机设计的方差分析。$P<0.05$为相差

基金项目:重庆市科委基金资助项目

作者简介:史曦凯,男,34岁,主治医师,讲师,硕士

收稿日期:1999-01-15;修回日期:1999-05-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

显著, $P < 0.01$为相差非常显著。以上统计学计算机程序由中国医学科学院血液学研究所提供,程序名分别是 POMS-36, POMS-17。

$$\text{耐药倍数} = \frac{\text{耐药株 } IC_{50}}{\text{敏感株 } IC_{50}}$$

$$\text{逆转倍数} = \frac{\text{耐药株 } IC_{50}}{\text{耐药株加逆转剂 } IC_{50}}$$

3 结果

3.1 Rb1, VER, HHT, 对 K562/S, K562/HHT 的毒性作用

Rb1在(0~80)μmol/L浓度范围内, VER浓度在 8μmol/L时,均对 K562/S, K562/HHT 未见明显毒性作用,细胞存活率 97%~100%。

HHT对 K562/S, K562/HHT的 IC_{50}值分别为: (4.70±0.14)μg/L, (447.72±12.34)μg/L, K562/HHT耐 HHT倍数约 95倍。

3.2 Rb1与 VER加 HHT对 K562/S的杀伤效应

40μmol/L Rb1联合 HHT作用于 K562/S, IC_{50}: (4.08±0.06)μg/L; 8μmol/LVER联合 HHT作用于 K562/S, IC_{50}: (4.09±0.04)μg/L;二者与单用 HHT相比无显著性差异($P > 0.05$),见图 1。

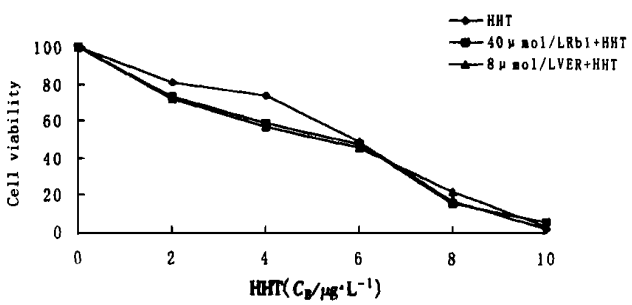


图 1 Rb1+ HHT对 K562/S的杀伤效应 (n= 3)

Fig 1 Killing effect of Rb1+ HHT on K562/S (n= 3)

3.3 RB1与 VER对 K562/HHT耐药性的逆转效应

20μmol/L, 40μmol/L两种浓度 Rb1加 HHT,作用于 K562/HHT,细胞存活曲线见图 2, IC_{50}分别为(101.1±5.47)μg/L, (56.36±2.47)μg/L,与不加 Rb1时 HHT对 K562/HHT杀伤效应相比,存在非常显著性差异($P < 0.001$)。两种浓度的 Rb1之间也存在非常显著性差异($P < 0.01$), Rb1浓度越高,联合的 HHT对细胞的杀伤就越强。

8μmol/L VER加 HHT作用于 K562/HHT,由 MTT法得细胞存活曲线, IC_{50}(23.1±0.95)μg/L,显著提高了 HHT的杀伤作用($P < 0.001$)。比较两种浓度的 Rb1与 VER,联合 HHT对 K562/HHT的杀伤效应也存在非常显著的差异($P < 0.001$)。逆转倍数分别为 4.4, 7.9, 19.4倍。

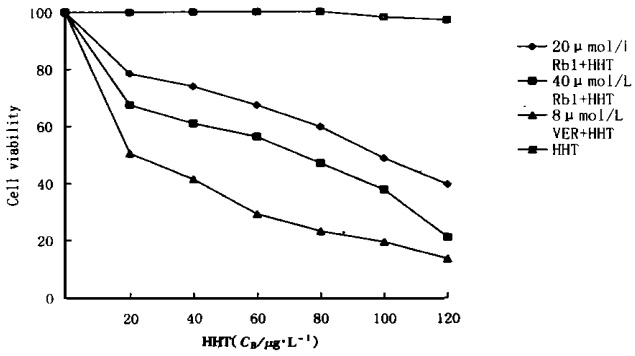


图 2 Rb1对 K562/HHT的耐药逆转作用 (n= 3)

Fig 2 Reversing effect of Rb1 on K562/HHT (n= 3)

4 讨论

K562/HHT是利用源于自然界的抗肿瘤药物 HHT,经体外长期培养诱导 K562细胞所产生的多药耐药细胞株,表达 P-GP阳性,其对 HHT, DOX, VCR, DNR存在交叉耐药性,我们的实验表明其对 HHT的耐药性是 K562/S的 95倍,耐药性稳定。Rb1作用于 K562/HHT可以使 HHT的 IC_{50}下降, 40μmol/L的 Rb1使 K562/HHT IC_{50}由(447.72±12.34)μg/L降至(56.36±2.47)μg/L,显著增强了 HHT对 K562/HHT的杀伤。Rb1作用于 K562/S后, HHT的 IC_{50}无显著变化,即不影响 HHT对 K562/S杀伤效应,这说明 Rb1对 K562多药耐药细胞的耐药性有逆转作用。两种不同浓度的 Rb1逆转浓度有一定差异, 20μmol/L, 40μmol/L的 Rb1加 HHT IC_{50}分别为(101.1±5.47)μg/L, (56.36±2.47)μg/L,逆转倍数分别为 4.4倍, 7.9倍。说明 Rb1剂量越大,逆转能力越强。有实验显示(1~10)μmol/L VER对 K562/S, K562/HHT无明显毒性,当浓度大于 10μmol/L时,毒性则明显增加[4]。我们选定 8μmol/L VER作逆转能力对照。8μmol/L VER的逆转倍数为 19.4倍,与 40μmol/L Rb1逆转浓度相比,二条细胞存活曲线及 IC_{50}存在着显著性差异,提示在目前的 Rb1浓度水平,体外逆转转能力弱于 VER。筛选低毒性、高逆转效应、低钙阻滞活性的钙拮抗剂(CCB)作为 MDR逆转剂是目前研究的重要方向。许多中草药具有这一特性,如潘启超等研究发现汉防已甲素,蝙蝠葛碱,多种双卞基异喹啉生物碱逆转能力强于 VER,毒性及钙拮抗活性均较低,被认为具有很好的临床应用前景[5]。本试验显示,人参皂甙单体 Rb1在达到 80μmol/L时亦未见其对 K562/S, K562/HHT有毒性作用,即血液学毒性较

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

低;通过兔急性毒性试验显示,人参皂甙单体 Rb1 IC_{50}达 1054 mg/kg[6],用药安全范围较大;在我们设定的 Rb1浓度下,Rb1体外逆转能力弱于接近细胞毒性浓度的 VER,但由于它的较低的毒性和钙拮抗活性,以及随剂量增大,MDR逆转活性增强的特点,可以在今后的动物或临床试验中,通过加大 Rb1的用药剂量,提高疗效,或与 VER联合应用减少 VER的用药剂量,达到最佳的逆转效果.

参考文献

[1] 钟国赣,李云义,江　岩,等. Rb1对 B型钙离子通道的阻滞作用及其机理的单通道分析 [J].白求恩医科大学学报, 1992, 2(18): 129- 132.

[2] 韩俊领,严文伟,钱其军,等. K562和 L1210耐高三尖杉酯碱细胞系的建立及其耐药机制的初步研究 [J].中华医学杂志, 1994, 7(74): 424- 426.

[3] Denese C, Larissa Belov, Mary W, *et al*. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells [J]. Leukemic Res, 1992, 12 (62): 1165- 1170.

[4] 韩俊领,严文伟,钱其军,等. 异博定与它莫希芬联合逆转高三尖杉酯碱耐药的体外研究 [J].中华血液学杂志, 1997, 3(18): 143- 147.

[5] Pan Q C, Tan H. Reversal of multidrug resistance by various principles from Chinese herbal medicine[J]. Chin Sci Bull, 1996; 3 (41): 410- 419.

[6] 雷伟亚.人参皂甙的动物毒性研究 [J].中草药, 1986, 1 (3): 15- 18.

(编辑　冷怀明)

The reverse effects of Ginseng Saponin Rb1 on multidrug resistance of human leukemic cell line K562/HHT *iv vitro*

SHI Xi-kai, ZHANG Yi-jun, ZHAO Chun-jing (Blood Bank, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To study the reverse effects of Ginseng Saponin Rb1 on the multi-drug resistance of human leukemic cell line K562/HHT *in vitro*. Methods: Cytotoxic effects were determined with MTT colorimetry. Results: Saponin Rb1 in the concentration range of 0~ 80μmol/L showed notoxic effects on the cells of human leukemic cell line K562/HHT and when the concentration was increased to 20μmol/L and 40 μmol/L, the reverse effects on the multidrug resistance of the leukemic cells were increased by 4.4 and 7.9 fold respectively. Conclusion: Ginseng Saponin Rb1 is able to reverse the multidrug resistance of the cells of human leukemic cell line K562/HHT in a dosage-dependent manner *in vitro*.

Key words durg resistance; calcium channel blocker; Ginseng Saponin Rb1

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net