

蟾酥逆转人白血病 K562/DOX 细胞多药耐药的实验研究

王珏莲¹, 古学奎², 刘安平², 陈志雄², 蓝海² (1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨传统中药蟾酥逆转人白血病 K562/DOX 细胞多药耐药性(MDR)的作用。**方法** 采用中药血清药理学方法制备蟾酥含药血清, 以 MTT 法分别检测蟾酥含药血清联合柔红霉素, 或单用蟾酥含药血清处理后, 不同时段作用于 K562/DOX 细胞的抑制率; 实时荧光定量 PCR 法检测蟾酥含药血清对 K562/DOX 细胞的 Bcl-2 mRNA 表达。**结果** 与空白对照组比较, 蟾酥对 K562/DOX 细胞均有抑制作用; 蟾酥组 Bcl-2 mRNA 表达降低。**结论** 蟾酥可能通过下调 MDR1 表达水平进而逆转 K562/DOX 细胞的耐药性。

关键词: K562/DOX 细胞; 蟾酥; Bcl-2 基因

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0280-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.010

Experimental Studies on Venenum Bufonis in Reversing Multidrug Resistance of Human Leukemia Cell Line K562/DOX

WANG Juelian¹, GU Xuekui², LIU Anping², CHEN Zhixiong², LAN Hai² (1. The First Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of Venenum Bufonis on reversing the multidrug resistance of human leukemia cell line K562/DOX. **Methods** Serum containing Venenum Bufonis was prepared firstly, and then was applied alone or together with Daunorubicin for the culture of human leukemia cell line K562/DOX. After treatment for some time, the inhibition ratio of K562/DOX was detected by MTT assay, and Bcl-2 mRNA expression in K562/DOX was examined by real-time fluorescent quantitation PCR. **Results** In comparison with the control group, Venenum Bufonis had an inhibition on K562/DOX and decreased the Bcl-2 mRNA expression. **Conclusion** Venenum Bufonis can down-regulate the MDR1 expression level, and thus reverse the multidrug resistance of human leukemia cell line K562/DOX.

Keywords: K562/DOX cells; Venenum Bufonis; Bcl-2 gene

急性白血病(Acute Leukemia, AL)是起源于造血干细胞的克隆性疾病, 是血液系统的恶性肿瘤。在白血病的治疗和研究领域中, 越来越多的新药出现和不同化疗方案的设计, 使白血病的治疗取得了很大的进展。但肿瘤细胞的多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)会导致化疗失败, 大多数体外耐药

逆转剂效果不明显, 无法解决 MDR。近些年来, 中药逆转肿瘤细胞耐药性的作用引起了人们的重视, 有临床研究^[1]表明, 传统中成药六神丸能够通过诱导细胞凋亡, 降低耐药基因的表达来逆转白血病细胞多药耐药。但对于六神丸中起关键作用的有效成分并未阐明, 对逆转白血病多药耐药的途径仍有待进

收稿日期: 2013-12-14

作者简介: 王珏莲, 女, 本科生, 研究方向: 中西医结合临床。Email: 1518338319@qq.com。通讯作者: 蓝海, 副主任中医师, 研究方向: 血液病的中西医结合基础与临床。Email: 13711782243@163.com。

基金项目: 广东省中医药管理局资助项目(20121216); 广东省科技发展计划资助项目(2012b03180019)。

一步探讨。

本研究通过观察六神丸的组成成分蟾酥对白血病耐药细胞的增殖和 BCL-2 mRNA 表达的影响,探讨其逆转 K562/DOX 细胞的作用机制,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人红白血病耐阿霉素细胞株 K562/DOX 细胞,购自广州市达安科技生物有限公司。

1.2 药物及试剂 六神丸,雷允上药业有限公司,批号:20040895;蟾酥,广州宝芝林大药房;柔红霉素,大连美仑生物技术有限公司,批号:20023698;DNA 聚合酶, TaKaRa 公司,批号:2021256; Trizol, TaKaRa 公司,批号:20110288; BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒, 博彩生物公司,批号:20110430; RPMI1640 培养液,北京北方生物技术研究所,批号:2020220;小牛血清,北京华埠力特生物技术研究所,批号:20110286。

1.3 动物 纯种成年新西兰大白兔 20 只,雄性,体质量 2~3 kg,由广州中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2009-0002。

1.4 主要仪器 PCR 仪,德国 SENSO 公司;凝胶成像系统,上海培清科技有限公司。酶标板、培养瓶,美国 Coring 公司;CO₂ 培养箱、HH-W21-600S 水浴箱,上海悦丰仪器仪表有限公司;离心沉淀机,北京医用离心机厂;HY-5 回旋振荡器,上海悦丰仪器仪表有限公司;COIC 倒置相差显微镜,广州达安基因公司。

1.5 含药血清的制备^[2] 将 12 只新西兰大白兔,随机分为空白对照组,六神丸组(13.125 mg·kg⁻¹),蟾酥组(0.933 mg·kg⁻¹),柔红霉素组(5 μg·mL⁻¹),共 4 组,每组 3 只。药物用生理盐水配成相应的浓度,六神丸组、蟾酥组每次灌胃 20 mL,空白对照组给予等量生理盐水,柔红霉素组给予耳尖静脉注射,每次 2 mL,每天给药 1 次,连续 3 d,最后 1 d 每隔 2 h 给药 1 次,连续 3 次,末次给药 1 h 后,无菌条件下心脏采血,离心机离心后分离血清,不灭活,在超净工作台上用 0.22 μm 微孔过滤器滤过除菌,于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.6 K562/DOX 细胞培养和实验分组^[3] 人红白血病耐阿霉素细胞株(K562/DOX 细胞)在培养过程中加阿霉素 1 mg·L⁻¹ 维持耐药性,用 RPMI 1640 培养液,将 K562/DOX 细胞株接种于 75 mL 的培养瓶中,加入含有 15 % 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,在

37 ℃、5 % CO₂ 条件下无菌培养,取处于对数生长期的细胞,2~3 d 传代 1 次,培养 1 周后用于实验。将细胞分为空白对照组、柔红霉素组、蟾酥组、六神丸组,在培养基中分别加入含药血清,使加入含药血清的体积占整个培养体系的 15 %。

1.7 MTT 法测定细胞抑制率 取培养的 K562/DOX 细胞,调整细胞数为 1 × 10⁵ mL⁻¹,将调整后的细胞悬液 100 μL 加入 96 孔的酶标板中,然后按照上述分组分别加入药物 100 μL,培养 24, 48, 72 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 20 μL,继续培养 4 h 后,去上清,每孔加入 DMSO 100 μL,室温振荡 10 min,上酶标免疫测定仪检测,于 490 nm 波长处测定吸光度(OD)值。计算细胞增殖抑制率,细胞抑制率 = (OD_{空白组} - OD_{对照组}) / OD_{空白组} × 100 %,每次同一浓度设 5 个复孔,以上实验重复 3 次。

1.8 K562/DOX 细胞 Bcl-2 mRNA 的表达 取药物作用 24 h 后的 K562/DOX 细胞,采用 Sybrgreen 染料法,以 β-actin 为内参基因,测定 Bcl-2 mRNA 在不同处理细胞中的表达量。提取总 RNA(提取按 TaKaRa 公司 Trizol 试剂盒说明书操作),实验通过实时荧光定量 PCR 的方法,引物溶解后使用普通 PCR 反应进行条件探索及优化,按照试剂说明书配好反应体系,上机进行 Real Time PCR 扩增和检测。整个过程进行全程荧光信号收集,绘制溶解曲线。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理方法 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 六神丸和蟾酥含药血清对 K562/DOX 细胞抑制率的影响 同时段空白对照组与蟾酥组,六神丸组及柔红霉素组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明所有含药血清对白血病 K562/DOX 细胞均有一定的抑制作用。其中,六神丸组与蟾酥组抑制作用更明显。在 72 h 内,六神丸组与蟾酥组比较,抑制率具有非常显著性差异($P < 0.01$);说明,随着时间推移,蟾酥组对白血病 K562/DOX 抑制作用更明显,蟾酥及六神丸对 K562/DOX 细胞作用有时间依赖性;而蟾酥组与柔红霉素组比较,24 h 内柔红霉素组抑制率更高,差异有统计学意义($P < 0.01$),但 48 和 72 h 后,两者抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$),说明随着时间推移,蟾酥与柔红霉素对 K562/DOX 细胞抑制作用相当,结果见表 1。

2.2 六神丸和蟾酥含药血清对 K562/DOX 细胞 Bcl-2

表 1 六神丸、蟾酥含药血清作用下 K562/DOX 细胞的吸光度与抑制率($n=5$)

Table 1 Comparison of growth inhibition of the K562/DOX cells and Automatic ELISA'OD. in various groups

组 别	剂量 /mg·kg ⁻¹	时间 /h	OD 值	抑制率 /%
空白对照组	-	24	0.1773 ± 0.02364	
		48	0.4762 ± 0.02474	
		72	0.8567 ± 0.02089	
六神丸组	13.125	24	0.0880 ± 0.02168	50.40
		48	0.3280 ± 0.03564	31.10
		72	0.6540 ± 0.27931	23.60 ^{△△}
蟾酥组	0.933	24	0.08232 ± 0.01734	53.07 [*]
		48	0.3325 ± 0.02588	30.10 [*]
		72	0.6733 ± 0.38472	21.40 ^{**}
柔红霉素组	5 μg·mL ⁻¹	24	0.1933 ± 0.02988	72.33 ^{△△}
		48	0.3519 ± 0.02266	26.20
		72	0.6333 ± 0.0.2793	26.07

注：与同时段空白对照组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与同时段蟾酥组比较，^{△△} $P<0.01$ 。

mRNA 表达的影响 见表 2。与空白对照组比较，所有含药血清对 Bcl-2 mRNA 表达均呈下降趋势；蟾酥组下降更明显，蟾酥组与六神丸组比较，差异有统计学意义($P<0.01$)，说明蟾酥具有抑制K562/DOX 细胞 Bcl-2 mRNA 表达的作用，可能是六神丸中主要的作用成分。

表 2 六神丸和蟾酥含药血清对 K562/DOX 细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响($n=4$)

Table 2 Comparison of mRNA level of gene Bcl-2 in various groups

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Bcl-2 RNA 拷贝数
空白对照组	-	1.3839 ± 0.005312
柔红霉素组	5 μg·mL ⁻¹	1.0737 ± 0.001236
六神丸组	13.125	0.8211 ± 0.01344
蟾酥组	0.933	0.5912 ± 0.01399 ^{△△}

注：与蟾酥组比较，^{△△} $P<0.01$ 。

3 讨论

急性白血病患者的 MDR 是导致化疗失败的主要原因^[4]。近年来，对于 MDR 的研究主要集中于 P—糖蛋白(Permeability glycoprotein, P-gP)介导的经典多药耐药途径，认为由 MDR1 编码的 P-gP 能够利用水解 ATP 释放的能量将疏水亲脂性药物泵出细胞外，导致细胞内药物浓度降低而耐药，因此，诸多研究者致力于开发具有抑制 P-gP 活性从而逆转 MDR 的药物。目前，已发现多种物质在体外能够有效抑制 P-gP 的药物转运泵功能，但药物在临床试验中表现

出明显的剂量限制性毒性作用，甚至一些药物在体内难以达到逆转所需的血药浓度，从而使其临床应用受到制约。因此，国内外的学者正在积极研究高效、低毒、作用靶点广泛的肿瘤耐药逆转剂^[5-6]。

白血病细胞 MDR 现象的产生除了 P-gP 介导的经典 MDR 途径外，非 P-gP 介导的 MDR 途径及阻止肿瘤细胞发生凋亡的途径与临床 MDR 也有密切的关系。目前，关于多药耐药性现象的机理学说有三：(1)P-gP 介导的 MDR1 的 mRNA 表达过高；(2)非 P-gP 介导的 MDR1、BCL-2 的 MRNA 表达过高；(3)肿瘤细胞凋亡受阻^[7-8]。

六神丸中含有雄黄、蟾酥、牛黄、麝香、冰片、珍珠 6 味中药，具有清热解毒、消肿散结的功效，近年来六神丸在治疗白血病方面受到了广泛的重视。中医学认为白血病在治疗上取六神丸的清热解毒、消肿散结之功效，采用六神丸^[9]治疗慢性粒细胞白血病总有效率可达 90.48 %，研究表明，六神丸具有明显促进白血病细胞 HL-60 凋亡的作用，能下调凋亡相关基因 Bcl-2、C-myc mRNA 表达水平，上调 Bax mRNA 表达水平^[10]。在较高浓度时，六神丸可直接杀伤白血病细胞；在较低浓度时，可激发机体的免疫机能，有利于白血病的治疗。由此可见，采用具有清热解毒作用的中药来逆转白血病多药耐药是可行的。但六神丸的主要作用成分尚未阐明，且其改善耐药的途径及靶点尚不清楚。为此，我们拟选用蟾酥为研究对象，研究其应用在降低白血病多药耐药基因的表达、促进白血病耐药细胞的凋亡、提高对白血病耐药细胞的杀伤能力等方面的作用。

本实验结果显示，柔红霉素作用后，K562/DOX 细胞的抑制率没有发生明显的变化，而蟾酥与六神丸应用后细胞的抑制率明显升高。RT-PCR 结果显示，柔红霉素、蟾酥、六神丸组作用于 K562/DOX 细胞时，与对照组相比 Bcl-2 表达见明显差异；而以蟾酥组下降更明显，与六神丸组比较差异显著($P<0.01$)，说明蟾酥有抑制 K562/DOX 细胞 Bcl-2 mRNA 的作用。

综上，我们认为蟾酥有逆转白血病细胞耐药的作用。六神丸对 K562/DOX 细胞的耐药逆转作用可能是通过蟾酥直接或间接地降低该细胞 BCR-2 基因的表达，进而提高细胞内化疗药物的浓度，达到促进细胞凋亡的作用。而其成分可能是蟾酥，至于其全面的作用机理，还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 史哲新, 杨文华, 汤毅, 等. 六神丸逆转白血病多药耐药作用及相关机制研究[J]. 天津中医药大学学报, 2007, 26(1): 11-13.
- [2] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 206.
- [3] 严永清. 中药现代研究的思路与方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 341.
- [4] 李玉莹, 马武开. 中医药逆转白血病多药耐药细胞的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 10(5): 906.
- [5] Bustamante J, Caldas LE, Garcia M, et al. Disruption of mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by PSC 833 and CsA in multidrug-resistant lymphoid leukemia[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 199(1): 44-51.
- [6] Thomas H, Coley HM. Overcoming the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein[J]. Cancer Control, 2003, 10(2): 159-169.
- [7] 王玮, 岑建农, 李建勇. 急性白血病中 MDRI MRP Bcl-2 基因表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2003, 30(7): 470-473.
- [8] 马晓军, 任红波, 叶蕾. Bcl-2、Bax 在急性白血病表达中的研究进展[J]. 中国临床医学, 2005, 12(5): 955-957.
- [9] 戴锡孟, 徐芳. 六神丸诱导白血病细胞凋亡及调控凋亡相关基因的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2003, (6): 431.
- [10] 戴锡孟, 徐芳. 六神丸诱导白血病细胞凋亡及 BCL-2 相关基因的实验研究[J]. 陕西中医杂志, 2004, 30(7): 41-44.

(编辑: 宋威)

鼠尾草酸对人结肠癌细胞增殖抑制作用及增强其对 5-氟尿嘧啶敏感性的研究

江红娟¹, 金闰秀², 叶强¹(1. 浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014; 2. 宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: **目的** 研究鼠尾草酸(carnosic acid, CA)抑制人结肠癌细胞 SW480 增殖和增强化疗药物 5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)敏感性的作用及机制。**方法** 结晶紫染色法检测 CA 对 SW480 增殖的抑制作用, 流式细胞技术分析和 MTT 法检测 CA 和 5-FU 联合使用对人结肠癌细胞 SW480 凋亡和细胞活力的影响。采用 β -catenin 荧光素酶报告基因(TOP-Flash)检测 CA 作用后 SW480 细胞内 β -catenin 活性改变。不同浓度 CA 处理 SW480 后, Western blot 检测 β -catenin 蛋白质表达水平变化, RT-PCR 法检测其下游基因 Cyclin D1 和 P-gp(P-glycoprotein)的 mRNA 表达水平变化。**结果** CA 对人结肠癌 SW480 细胞增殖有抑制作用, 且 CA 能够增强 5-FU 对结肠癌细胞凋亡和细胞活力的影响。CA 处理后细胞内 β -catenin 转录活性明显降低, Western blot 法和 RT-PCR 法结果显示 CA 下调了 β -catenin 的蛋白水平及下游基因 Cyclin D1 和 P-gp mRNA 表达。**结论** CA 能够抑制人结肠癌 SW480 细胞增殖和增强 5-FU 的抗肿瘤效果, 其机制可能与抑制 β -catenin 活性并下调其下游基因 Cyclin D1 和 P-gp 表达有关。

关键词: 鼠尾草酸; 结肠癌; 5-氟尿嘧啶; 细胞增殖; 细胞凋亡; β -catenin

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0283-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.011

Studies on Carnosic Acid in Suppressing Proliferation of Human Colon Cancer Cells and Enhancing Their Chemosensitivity to 5-Fluorouracil

JIANG Hongjuan¹, JIN Guixiu², YE Qiang¹(1. Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014 Zhejiang, China; 2. Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315211 Zhejiang, China)

Abstract: **Objective** To investigate the antitumor effects and underlying mechanism of carnosic acid(CA) on the proliferation of human colon cancer SW480 cells and their chemosensitivity to 5-fluorouracil(5-FU). **Methods** The anti-proliferation effect of CA on SW480 cells was determined by crystal violet staining. Fluorescence activated cell

收稿日期: 2013-10-19

作者简介: 江红娟, 女, 硕士, 药师, 研究方向: 肿瘤药理。Email: tigergirl@126.com。通讯作者: 叶强, 主管药师, 研究方向: 临床药理学。Email: yht20020517@qq.com。