

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.05.04

ERK 信号通路参与至真方逆转人大肠癌多药耐药细胞 HCT-8/VCR 耐药作用机制的研究

梁 伟¹, 陈志霞², 王慧君¹, 王松坡¹

¹上海交通大学附属第一人民医院 中医科,上海 200080;

²斜土社区卫生服务中心,上海 200032)

摘要:[目的]探讨至真方是否通过影响 ERK 通路活性,下调 P-gp 蛋白及 ERK、MDR1 mRNA 表达,逆转人大肠癌多药耐药细胞 HCT-8/VCR 多药耐药。[方法]细胞增殖-毒性检验 CCK-8(cell counting kit-8)法鉴定 HCT-8/VCR 细胞株的多药耐药性及存活率;流式细胞仪测定细胞内罗丹明 123(Rh123)的平均荧光强度;Real-time PCR 及 Western blot 检测 ERK、p-ERK、P-gp 的基因和蛋白的表达。[结果]HCT-8/VCR 为多药耐药细胞;至真方含药血清可明显抑制 HCT-8/VCR 细胞生长;HCT-8/VCR 细胞经 8%、16%、32%至真方含药血清干预 48 h 后,细胞内 Rho123 外排减少,波峰右移,细胞内荧光强度明显增强 ($P < 0.01$);HCT-8/VCR 细胞 ERK、MDR1 mRNA 的表达水平均有所下降,且呈浓度依赖性;p-ERK 表达较用药前 (0.764 ± 0.001) 明显下降 ($P < 0.01$),分别为 (0.513 ± 0.002)、(0.498 ± 0.001)、(0.471 ± 0.12);ERK 表达较用药前 (0.771 ± 0.204) 分别下降至 (0.437 ± 0.004)、(0.413 ± 0.002)、(0.398 ± 0.001), ($P < 0.01$)。P-gp 表达较用药前 (0.94 ± 0.014) 下降至 (0.701 ± 0.01)、(0.663 ± 0.01)、(0.508 ± 0.02), ($P < 0.01$)。[结论]至真方可逆转人大肠癌多药耐药细胞株 HCT-8/VCR 的耐药作用,其机制与降低 P-gp 外排功能、降低 ERK 通路活性、下调 P-gp 蛋白及基因表达有关。

关键词:大肠癌;多药耐药;至真方;ERK 通路;P-糖蛋白

中图分类号:R735.3

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2015)05-0315-06

Research on the role of ERK signaling pathway in the reversing effect of Zhizhen Recipe on multidrug resistance in human colorectal cancer cell lines

LIANG Wei¹, CHEN Zhi-xia², WANG Hui-jun¹, WANG Song-po¹

¹Department of TCM, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China; ²Xietu Community Health Service Center, Shanghai 200032, China)

Corresponding author: WANG Song-po, E-mail, 13386259791@163.com

Abstract:[Objective] To investigate the role of ERK signaling pathway in the reversing effect of Zhizhen Recipe on multidrug resistance in human colorectal cancer cell lines. [Methods] CCK-8 assay was used to detect the drug resistance of HCT-8/VCR cells and apoptosis rate. FCM was used to detect intracellular concentration of Rho123. Real-time PCR and western blot were adopted to detect the protein levels and gene levels of ERK, P-ERK and P-gp. [Results] Compared with sensitive cells, HCT-8/VCR appeared multidrug resistant. The drug-serum containing Zhizhen Recipe significantly inhibited the growth of HCT-8/VCR cells. After treatment with 8%, 16% and 32% of the drug serum for 48 hours, the discharge of intracellular Rho123 by HCT-8/VCR decreased, wave crest was shifted to right, and intracellular fluorescence intensity was strengthened. The expression of ERK and DR1 mRNA decreased, which was correlated to the concentration. Compared with before treatment, expression of p-ERK was markedly decreased respectively from (0.764 ± 0.001) to (0.513 ± 0.002), (0.498 ± 0.001), and (0.471 ± 0.12) ($P < 0.01$). The expression of ERK was decreased respectively from (0.771 ± 0.204) to (0.437 ± 0.004), (0.413 ± 0.002), and (0.398 ± 0.001) ($P < 0.01$). The expression of P-gp was markedly decreased respectively from ($0.94 \pm$

收稿日期:2014-12-03

基金项目:上海市中医药事业发展三年行动计划资助(No:ZYSNXD-CC-HPGC-JD-006)

作者简介:梁 伟,女,硕士研究生

通讯作者:王松坡, E-mail, 13386259791@163.com

0.014) decreased to (0.701 ± 0.01) , (0.663 ± 0.01) , and (0.508 ± 0.02) ($P=0.000$). [**Conclusion**] Drug-serum containing Zhizhen Recipe could reverse the MDR of colon cancer cells. The possible mechanism was by inhibiting the efflux function of P-gp, reducing the activity of ERK pathway, and down regulating the expression of P-gp protein and gene.

Key words: Zhizhen Recipe; colorectal cancer; MDR; ERK

化疗是是大肠癌的主要治疗方法之一,而肿瘤多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是大肠癌化疗失败的重要原因。MDR是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物出现耐药的同时对其他结构不同、作用靶位不同的抗肿瘤药物也产生耐的现象^[1]。多项研究表明,ERK通路的过度激活与许多肿瘤的化疗耐药性存在明显正相关,其作用机制可能是通过调控耐药相关基因和蛋白的表达^[2-5]。至真方系已故国医大师张镜人教授治疗胃肠肿瘤的经验方,临床证实有良好的化疗增效作用,本实验用至真方含药血清干预人大肠癌多药耐药细胞系 HCT-8/VCR,研究其对 HCT-8/VCR 内 ERK 通路的影响,为临床上至真方辅助治疗大肠癌提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

注射用长春新碱(VCR)及顺铂(CDDP)购自深圳万乐药业有限公司,5-氟尿嘧啶(5-FU)、表阿霉素(EP)购自法码西亚普强公司,RPMI1640培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒购自日本 DOJINDO 公司,BCA 蛋白浓度试剂盒购于上海碧云天公司,

羊单克隆抗体 P-gp、羊单克隆抗体 ERK、羊单克隆抗体 p-ERK、FITC 标记的兔抗羊 IgG 均购于美国 cell signal 公司,ERK 抑制剂 U0126 购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞株及细胞培养

人大肠癌敏感细胞株 HCT-8 与人大肠癌多药耐药细胞株 HCT-8/VCR 由中南大学湘雅医学院中心实验室提供。复苏后的 HCT-8 及 HCT-8/VCR 细胞株培养于含 10% 胎牛血清及 100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,其中 HCT-8/VCR 的培养基中加入 1 000 ng/ml VCR 维持耐药性,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度孵箱中培养。实验前 1 周撤药培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 至真方含药血清制备

至真方:由黄芪、女贞子、制香附、薏苡仁、石见穿、野葡萄藤、藤梨根等组成,由本院制剂室按既定工艺制备成含生药 4 g/ml 的浓缩液,4 °C 冰箱保

存,根据《药理实验方法学》^[6]的折算系数换算法计算 SD 大鼠灌胃剂量。SD 大鼠 40 只,随机分为中药组(低、中、高剂量组)、空白对照组,每组 10 只,中药组分别以 4 ml/kg 体重/日,8 ml/kg 体重/日,16 ml/kg 体重/日三个剂量灌胃,空白对照组灌服等量的生理盐水,共 3 d。采血前 12 h 禁水不禁食,末次灌胃 2 h 后,腹主动脉采血,无菌分离血清,0.22 μm 微孔滤膜过滤,56 °C 水浴 30 min 灭活,体积分数 0.5 乙醇沉淀,-20 °C 冰箱保存备用。

1.4 CCK-8 法确定 HCT-8/VCR 细胞系的耐药性

取对数生长期的 HCT-8 及 HCT-8/VCR 细胞以 5×10^3 个细胞/ml 浓度集中于 96 孔板,每孔 100 μl,过夜后分别加入 5 种浓度梯度的化疗药物 VCR、5-FU、CDDP、EP,每孔设 3 个复孔,孵育 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,40 min 用酶标仪后测定各孔 OD 值(测定波长 450 nm,参比波长 650 nm)。细胞抑制率 = $(1 - \text{实验组 OD 值} / \text{空白对照组 OD 值}) \times 100\%$,实验重复 3 次,取平均值,用 SPSS18.0 软件计算各化疗药物对细胞的半数抑制浓度(IC50),求得细胞耐药指数,公式为:耐药指数(resistance index, RI) = 耐药细胞 IC50/亲本细胞 IC50 × 100%。

1.5 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞的毒性作用及有效浓度的筛选

取对数生长期细胞,分组为:空白对照组(只加 RPMI-1640),空白血清组及含药血清低、中、高剂量组(将血清用 1640 培养液稀释,体积分数分别为 2%、4%、8%、16%、32%、64%),方法同 1.4。以 SPSS 18.0 软件计算含药血清和体积分数,确定含药血清实验浓度。

1.6 流式细胞术(Flow cytometry, FCM)测定 P-gp 外排功能

取对数生长期的 HCT-8 及 HCT-8/VCR 细胞,实验分为 7 个组:HCT-8 组,HCT-8/VCR + 8% 含药血清组,HCT-8/VCR + 16% 含药血清组,HCT-8/VCR + 32% 含药血清组,HCT-8/VCR + 空白血清组,HCT-8/VCR 阴性对照组,HCT-8/VCR 阳性对照组(维拉帕米浓度为 10 μmol/L),至真方含药血清作用 48 h,阳性药作用 24 h,将细胞消化、离心,调整细胞密度到 5×10^6 ,每组细胞各分为 2

组,加入 Rh123 染液 $5 \mu\text{mol/L}$, 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中继续培养 60 min ,以未加 Rh123 的细胞做标准对照,检测 Rh123 作用后细胞内 Rh123 荧光强度,用 Cellquestplot 软件分析数据,实验重复 3 次,取平均值为最终结果。

1.7 真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞 ERK 及 MDR1 mRNA 表达的影响

采用 Real-Time PCR 检测,以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于培养皿中,分为 6 组:HCT-8/VCR 阴性对照组,HCT-8/VCR+空白血清组,HCT-8/VCR+8%含药血清组,HCT-8/VCR+16%含药血清组,HCT-8/VCR+32%含药血清组,HCT-8/VCR+U0126(浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$),至真方含药血清作用 48 h ,U0126 作用 12 h 后,按试剂盒说明书操作进行总 RNA 的抽提,RNA 逆转录及 PCR 反应,共计 45 个循环。PCR 仪测定 CT 值(扩增量达到阈值的循环数)。各引物序列片段长度见表 1。

表 1 引物序列及长度

基因	序列	长度
β -actin	5'TGACGTGGACATCCGCAAAG3'	228 bp
	5'CTGGAAGGTGGACAGCGAGG3'	
ERK	5'TGCTCATCAACACCACCTGC 3'	108 bp
	5' GCGTAGCCACATACTCCGTC3'	
MDR1	5'AGCCAATGCCTATGACTTTATC3'	190 bp
	5'AACCACTGCTTCGCTTTCTG3'	

待测样本 mRNA 相对表达量的计算采用以下公式: $\Delta C_T = (\text{待测样本 mRNA } C_T \text{ 值} - \text{该样本 } \beta\text{-actine mRNA } C_T \text{ 值}) - \Delta \Delta C_T = [(C_T \text{ 样本内参} - C_T \text{ 样本}) - (C_T \text{ 内参} - C_T \text{ 待测})]$ 。待测样本 mRNA 相对表达量 $= 2^{-\Delta \Delta C_T}$ 。

1.8 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞 P-gp 和 ERK、p-ERK 蛋白表达的影响

Western Blot 检测。分组及药物干预同 PCR 检测。按照蛋白抽提试剂盒说明分别抽提细胞质蛋白及核蛋白,并采用 BCA 蛋白浓度试剂盒行蛋白含量检测。每孔配制含 $30 \mu\text{g}$ 总蛋白作 SDS-PAGE 电泳,转膜后分别加入羊单克隆抗体 P-gp(1:1 500)、ERK(1:250)、p-ERK(1:250) 4°C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次。随后加入 HRP 标记的与一抗相对应二抗(1:1 000), 37°C 孵育 1 h ,显色定影之后,用 Quantity-one 图像处理系统分析目标蛋白条带的灰度值,蛋白表达量用灰度比值表示,每组实验重复 3 次。

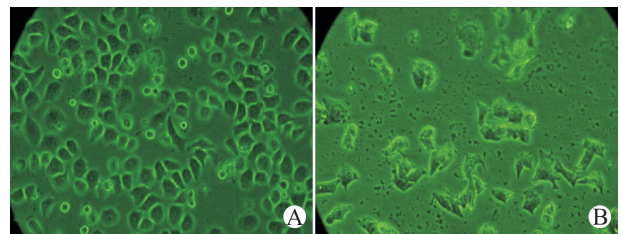
1.9 统计学处理

全部数据经 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较使用单因素方差分析,组间多重比较用 SNK-q 检验分析,判断统计学意义以双侧 $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 HCT-8/VCR 细胞多药耐药性测定

细胞形态观察:光学显微镜下(图 1),HCT-8 细胞呈上皮样单层排列贴壁生长,细胞大小不一,为不规则多变形,细胞边界清楚,颜色均匀;HCT-8/VCR 细胞同样呈上皮样单层排列贴壁生长,细胞大小不一,但细胞体积稍增大,以圆形和卵圆形居多,边界清楚,颜色不均匀,细胞核颜色明显加深。CCK-8 结果显示人大肠癌耐药细胞系 HCT-8/VCR 对 VCR 呈现耐药性,耐药指数为 70.38。同时 HCT8/VCR 对 5-FU、CDDP、EP 也表现为交叉耐药,耐药指数分别为 20.65、5.64、4.65。见表 2。



A: HCT-8 细胞; B: HCT-8/VCR 细胞。

图 1 光学显微镜下观察细胞形态(倒置显微镜 $\times 200$)

表 2 HCT-8 与 HCT-8/VCR 细胞对不同化疗药物的敏感性 $\bar{x} \pm s$

	例数	IC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)		抗药性指数
		HCT-8	HCT-8/VCR	
VCR	3	0.13 ± 0.11	$9.15 \pm 0.44^{1)}$	70.38
5-FU	3	3.11 ± 0.26	$64.21 \pm 0.67^{1)}$	20.65
CDDP	3	0.67 ± 0.13	$3.78 \pm 0.32^{1)}$	5.64
EP	3	0.78 ± 0.23	$3.63 \pm 0.24^{1)}$	4.65

与 HCT-8 比较, $^{1)} P < 0.01$ 。

2.2 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞剂量-效应关系及有效作用浓度

CCK-8 结果显示(图 2),2%、4%的高、中、低剂量含药血清组与空白血清组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);体积分数大于 8%时,高、中、低含药血清组与空白血清组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),呈浓度递增趋势,体积分数大于 8%时,高、中剂量组比较差异性不显著($P > 0.05$)。计算至真方中剂量含药血清 IC₁₀ 为 4.0%,IC₂₀ 为 11.7%,

IC₅₀ 为 64%。根据以上结果,选择 IC₅₀ 以下,IC₂₀ 左右体积分数的含药血清作为实验浓度,即中剂量 8%、16%、32% 体积分数。

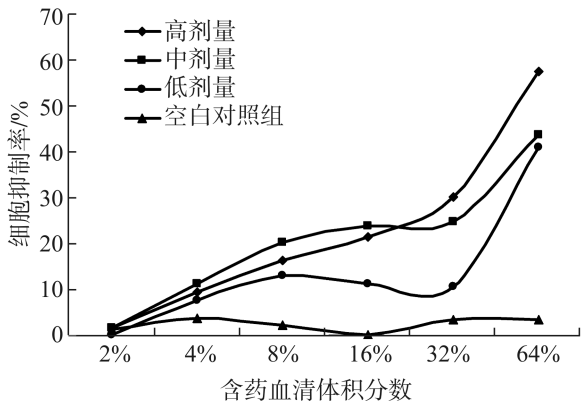


图2 不同浓度至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞的剂量-效应曲线

2.3 至真方含药血清对 P-gp 功能的影响

流式细胞仪测定细胞内 Rh123 的平均荧光密度显示:以 HCT-8 内荧光强度为 100% 计,耐药细胞 HCT-8/VCR 内的平均荧光强度为 (22.82 ± 0.768)% (P < 0.01) (表 3、图 3),波峰出现左移(图 4),表明耐药细胞内 Rho123 摄入减少, HCT-8/VCR 细胞 P-gp 外排功能增强。

经不同体积分数的至真方含药血清干预后,大肠癌耐药细胞内 Rho123 的积聚明显增加,可见波峰逐渐右移(图 5), HCT-8/VCR + 含药血清(8%、16%、32%)组和 HCT-8/VCR + VRP 组平均荧光强度分别为 (187.15 ± 0.03)%、(245.64 ± 0.07)%、(281.98 ± 0.08)%、(323.16 ± 0.04)%,显著高于空白血清组 (P < 0.01) (表 3、图 3)。表明至真方含药血清能使细胞内的 Rho123 蓄积增多, P-gp 外排功能减弱。

表3 不同浓度至真方含药血清对 P-gp 外排功能的影响(FCM)

组别	例数	平均荧光强度
HCT-8	3	100.00
HCT-8/VCR	3	22.82 ± 0.768
HCT-8/VCR + 空白血清组	3	25.67 ± 1.12
HCT-8/VCR + 8% 含药血清组	3	187.15 ± 0.03 ¹⁾
HCT-8/VCR + 16% 含药血清组	3	245.64 ± 0.07 ¹⁾
HCT-8/VCR + 32% 含药血清组	3	281.98 ± 0.08 ¹⁾
HCT-8/VCR + VRP	3	323.16 ± 0.04 ¹⁾

与空白血清组比较,¹⁾ P < 0.01。

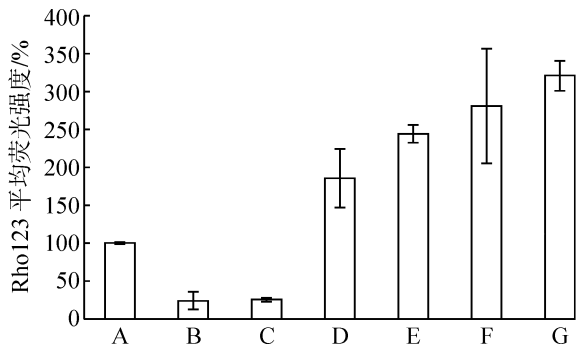


图3 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞 P-gp 外排功能的影响

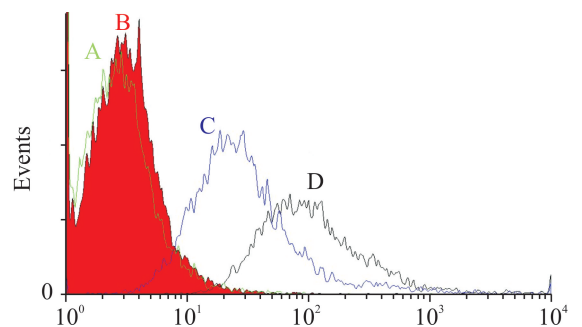


图4 HCT-8 及 HCT-8/VCR 细胞 P-gp 外排功能

图4 HCT-8 及 HCT-8/VCR 细胞 P-gp 外排功能

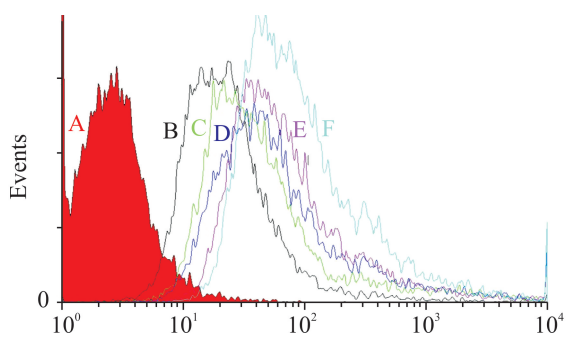


图5 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞 P-gp 外排功能的影响(FCM)

图5 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞 P-gp 外排功能的影响(FCM)

2.5 至真方对 ERK 及 MDR1 mRNA 基因表达水平的影响

Real-Time PCR 结果显示,经 8%、16%、32% 至真方含药血清作用后 ERK 基因的 2^{-ΔΔCT} 值分别为 (0.307 ± 0.16)、(0.158 ± 0.21)、(0.082 ± 0.03),

经 ERK 抑制剂 U0126 作用后 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值下降至 (0.056 ± 0.11) ; 同样含药血清作用后, MDR1 基因 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值分别为 (0.328 ± 0.03) 、 (0.204 ± 0.13) 、 (0.133 ± 0.45) , 经过 U0126 作用 24 h 后 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值下降至 (0.076 ± 0.04) ; Real-Time PCR 结果可见至真方含药血清可明显下调 ERK、MDR1 mRNA 表达并在一定范围内成浓度依赖性(图 6)。

2.6 至真方含药血清对 ERK、P-gp 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示: 经 8%、16%、32% 至真方含药血清处理后, HCT-8/VCR 细胞 p-ERK 表达较用药前 (0.764 ± 0.001) 明显下降 $(P < 0.01)$, 分别为 (0.513 ± 0.002) 、 (0.498 ± 0.001) 、 (0.471 ± 0.12) ; ERK 蛋白表达较用药前 (0.771 ± 0.204) 分别下降至 (0.437 ± 0.004) 、 (0.413 ± 0.002) 、 (0.398 ± 0.001) , $(P < 0.01)$; P-gp 蛋白表达较用药前 (0.94 ± 0.014) 下降至 (0.701 ± 0.01) 、 (0.663 ± 0.01) 、 (0.508 ± 0.02) , $(P = 0.000)$ 。其中 32% 含药血清与阳性对照 U0126 比较无明显统计学差异 $(P > 0.05)$ 。说明至真方含药血清可下调 ERK 蛋白和 P-gp 的表达, 下降呈浓度依赖性(图 7)。

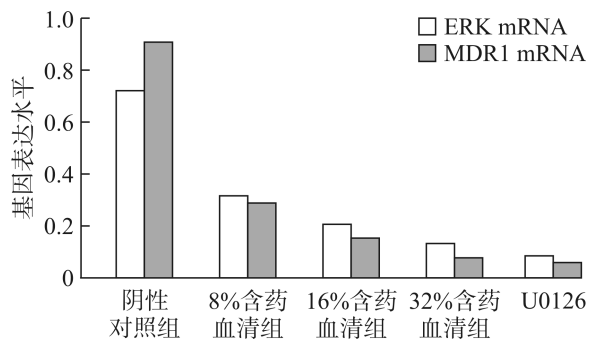
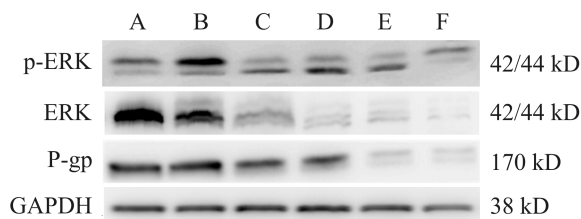


图 6 实时定量 PCR 产物的定量分析



A: HCT-8/VCR; B: HCT-8/VCR+空白血清组; C: HCT-8/VCR+8%含药血清组; D: HCT-8/VCR+16%含药血清组; E: HCT-8/VCR+32%含药血清组; F: HCT-8/VCR+U0126 组。

图 7 各组 p-ERK、ERK、P-gp 的表达

3 讨论

大肠癌是临床上常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率在我国乃至世界上呈逐年上升趋势^[7-8]。目前治疗仍以手术为主, 手术后及失去手术机会或

转移性大肠癌采用化疗、放疗等综合治疗。尽管新的化疗药物和联合用药方案不断更新, 效果仍不令人满意。其中非常重要的原因即是肿瘤细胞多药耐药性(multidrug resistance, MDR)。

大肠癌的多药耐药涉及 P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP)等多种机制, 其中, P-gp 介导的多药耐药至关重要^[9-10]。越来越多的研究证实 P-gp 的表达调控与 ERK 通路密切相关。WEN-JING LIAN^[11]等研究发现敲除 MCF7 细胞中的 BMP6 基因可明显增加肿瘤细胞对多柔比星的耐药性, 其机制则是通过激活 ERK 信号通路、上调 MDR1/P-gp 表达引起。在抑制 ERK 信号传导逆转大肠癌多药耐药的研究^[12]中, 采用 VCR 分别诱导大肠癌细胞株(SW480、HCT-8、Colo205、Lovo 细胞)耐药, 细胞内 P-gp 表达水平均显著升高, 采用 ERK 抑制剂 PD98059 作用后 ERK 活性下降, P-gp 表达水平下降, 从而逆转耐药。曾四元等^[13]研究发现 ERK 的表达在宫颈癌耐药组与敏感组的表达差异有统计学意义, 且其表达与 P-gp 表达呈正相关, 推测宫颈癌的耐药与 ERK 通路激活有关。

MDR 的逆转剂一直是肿瘤研究中的热点, 包括化学逆转以及基因水平的逆转等。由于化学逆转剂的安全性及疗效尚难肯定^[14], 而基因治疗研究多为体外实验及动物体内研究, 均尚未应用于临床^[15]。然而中药在阻断肿瘤细胞复杂的信号传导过程中体现多环节、多层次及多靶点性的优势, 故从中药中筛选有效的 MDR 逆转剂已成为近年的研究热点。

至真方是“国医大师”张镜人的经验方, 由黄芪、女贞子、薏苡仁、石见穿、野葡萄藤、藤梨根等组成。方中黄芪, 补元气, 壮脾胃, 固后天之本; 女贞子, 补肝肾, 安五脏, 固先天之本; 两药相和, 共为君药。薏苡仁, 其功效为健脾去湿化浊; 石见穿, 其功效为活血化痰, 清热利湿, 散结消肿; 共为臣药, 君臣共奏驱邪扶正之效。藤梨根清热解毒, 祛风除湿, 利尿止血。野葡萄藤, 舒筋活血, 清热解毒, 两药共为佐使。全方健脾补肾、活血化痰、通络解毒, 共奏扶正祛邪之效。

前期实验研究发现, 至真方含药血清能够明显逆转 HCT-8/VCR 的多药耐药性, 其机制可能与降低 NF- κ B 的活性、下调 P-gp 及上调 Caspase-3 活性诱导细胞凋亡有关^[16-18]。本研究以人大肠癌敏感细胞 HCT-8 与耐药细胞 HCT-8/VCR 为研究对象, 首先 CCK-8 测定 HCT-8/VCR 细胞的多药耐药性, 筛选出含药血清的实验浓度为中剂量 8%、16%、32% 体积分数, 继以实验浓度的至真方进行干预。流式细胞仪测定细胞内 Rh123 的平均荧光密度, 结果显示, HCT-8/VCR 细胞 Rh123 摄入较 HCT-8

少($P < 0.01$),表明 P-gp 外排功能较强;至真方含药血清干预后,HCT-8/VCR 细胞内 Rh123 的积聚明显增加($P < 0.01$),P-gp 外排功能减弱。Real-Time PCR 结果显示,不同体积分数的至真方含药血清均对 ERK、MDR1 mRNA 表达均有一定的抑制作用,两者趋势相同,与空白血清组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),并随含药血清体积分数升高两者表达量逐渐降低。

ERK 被磷酸化而激活是 ERK 通路发挥功能的前提,通过对 Western blot 实验结果分析发现,随着含药血清体积分数升高,HCT-8/VCR 细胞中 p-ERK 表达量逐渐减少,条带逐渐变浅。其中 32% 含药血清与阳性对照 U0126 比较无明显统计学差异($P > 0.05$),表明至真方功能与之相似,可通过抑制 ERK 通路磷酸化而阻止该通路的异常激活。进一步实验结果发现至真方含药血清在影响 ERK 通路活性的同时也能下调 ERK 及下游蛋白 P-gp 表达的量,下降呈浓度依赖性。

流式细胞仪测定细胞内 Rh123 的平均荧光密度,结果显示,HCT-8/VCR 细胞 Rh123 摄入较 HCT-8 少($P < 0.01$),表明 P-gp 外排功能较强;至真方含药血清干预后,HCT-8/VCR 细胞内 Rh123 的积聚明显增加($P < 0.01$),P-gp 外排功能减弱。由此可见,至真方能够降低 ERK 的活性、下调 P-gp 的表达并抑制 P-gp 的外排功能。

综上所述,我们的实验表明至真方可下调 ERK 及 P-gp 在基因蛋白水平上的表达。基于已证实的 ERK 对 P-gp 的调控作用,我们推测至真方对 MDR 的逆转作用在一定程度上是通过抑制了 ERK 通路进而减少 P-gp 表达,从而提高大肠癌多药耐药细胞内化疗药物的浓度逆转多药耐药。然而,至真方通过 ERK 通路对 P-gp 调控的具体靶点尚需进一步探索。此外,我们的研究只限于 HCT-8/VCR 细胞系,至真方是否可以逆转大肠癌的其他耐药细胞的耐药性以及体内效果如何尚待进一步研究。

参考文献

- [1] GILLET J P, GOTTESMAN M M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 596:47—76.
- [2] OCHI N, TAKIGAWA N, HARADA D, et al. Src mediates ERK reactivation in gefitinib resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Experimental Cell Research*, 2014, 322:168—177.
- [3] FAN D P, ZHANG Y M, HU X C, et al. Activation of AKT/ERK confers non-small cell lung cancer cells resistance to vinorelbine[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7:134—143.
- [4] BUONATO J M, LAZZARA M J. ERK1/2 Blockade Prevents Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells and Promotes Their Sensitivity to EGFR Inhibition[J]. *Cancer Research*, 2013, 74:309—319.
- [5] ZHAO B X, SUN Y B, WANG S Q, et al. Grape Seed Procyanidin Reversal of P-glycoprotein Associated Multi-Drug Resistance via Down-regulation of NF- κ B and MAPK/ERK Mediated YB-1 Activity in A2780/T Cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e71071.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982:202—204.
- [7] AHMEDIN J D, FREDDIE BRAY, MELISSA M, et al. Global Cancer Statistics[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61:69—90.
- [8] 王赛特. 大肠癌已成为第二大常见肿瘤[N]. 解放日报, 2008-4-22(13).
- [9] WOODLAND C, KOREN G, WAINER I W, et al. Verapamil metabolites: potential P-glycoprotein-mediated multidrug resistance reversal agents[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81:800—805.
- [10] TAKARA K, SAKAEDA T, OKUMURA K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12:273—286.
- [11] LIAN W J, LIU G, LIU Y J, et al. Downregulation of BMP6 enhances cell proliferation and chemoresistance via activation of the ERK signaling pathway in breast cancer[J]. *Oncology Reports*, 2013, 30:193—200.
- [12] 姚凡, 金锋, 樊华, 等. ERK 信号传导抑制逆转大肠癌多药耐药的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 32(5):290—291.
- [13] 曾四元, 江维, 梁美蓉, 等. 宫颈腺癌组织 ERK 1/2 和 p16^{INK4} 及 P-gp 表达与耐药相关性分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(19):1508—1512.
- [14] PEREZ-TOMAS R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anticancer drug treatment[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13:1859—1876.
- [15] 刘福军, 高国兰. SiRNA 干扰与卵巢癌多药耐药的关系[J]. *实用癌症杂志*, 2009, 24(2):216—217.
- [16] 孙玉舫, 孔令春, 陈志霞. 至真方对人大肠癌多药耐药细胞株 HCT-8/VCR 的增殖抑制及凋亡诱导作用[J]. *世界中医药*, 2010, 5(4):285—288.
- [17] 张旭, 蔡松柏, 陈志霞, 等. 至真方对人大肠癌多药耐药细胞株 HCT-8/VCR 中核因子- κ B 及 P 糖蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2011, 19(6):389—393.
- [18] 陈志霞, 孔令春, 孙玉舫, 等. 至真方对人大肠癌细胞株 HCT-8/VCR 多药耐药的逆转作用及 P-gp 表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(7):1242—1246.