

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.08.01

从 NF- κ B 信号通路研究至真方对 HCT-8/VCR 细胞多药耐药的影响及机制

王慧君, 孔令春, 梁 伟, 王松坡

(上海交通大学附属第一人民医院 中医科, 上海 200080)

摘要:[目的]观察至真方含药血清对人大肠癌耐长春新碱细胞株 HCT-8/VCR 多药耐药的影响,并从 NF- κ B 信号通路探讨其作用机制。[方法]用 8%、16%、32% 体积分数的至真方含药血清干预人大肠癌敏感细胞株 HCT-8 与耐长春新碱细胞株 HCT-8/VCR, CCK8 法检测细胞多药耐药性及存活率; ELISA 法检测 NF- κ B 活性; AnnexinV/PI 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blot 检测 NF- κ B/p65、I κ B- α 和 Caspase-3 蛋白的表达。[结果]体积分数 >8% 时,高、中、低剂量含药血清组对 HCT-8/VCR 细胞的抑制率与空白血清组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),且呈浓度递增趋势;8%、16%、32% 体积分数的中剂量组至真方含药血清作用于 HCT-8/VCR 细胞 24 h 后, NF- κ B 活性较 HCT-8/VCR 阴性对照组明显降低 ($P < 0.01$);至真方含药血清可促进 HCT-8/VCR 细胞凋亡,且在一定范围内细胞凋亡率呈浓度依赖性;经至真方含药血清处理后, HCT-8/VCR 细胞 NF- κ B/p65 蛋白表达较用药前明显下降 ($P < 0.05$), I κ B- α 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$)。[结论]至真方含药血清可降低 HCT-8/VCR 细胞 NF- κ B 的活性,一定程度上逆转了大肠癌细胞的多药耐药,其机制可能与抑制该通路分子开关 I κ B- α 的磷酸化,下调 NF- κ B/p65 蛋白的表达,从而上调通路下游的 Caspase-3 蛋白的表达,诱导 HCT-8/VCR 细胞凋亡有关。

关键词: 大肠癌;多药耐药;至真方;NF- κ B;细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-038X(2015)08-0519-06

The effect of Zhizhen formula on multidrug resistance in human colorectal cancer cell lines and its mechanism via NF- κ B signaling pathway

WANG Hui-jun, KONG Ling-chun, LIANG Wei, WANG Song-po

(Department of Traditional Chinese Medicine, The First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

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

Abstract:[Objective] To investigate the effect of serum containing Zhizhen formula in reversing multidrug resistance and regulating the NF- κ B signaling pathway. [Methods] Different concentrations of serum containing Zhizhen formula were used in treating HCT-8 and HCT-8/VCR cells. Cell counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the multidrug resistance and survival rate of HCT-8/VCR cells. The cell apoptosis was detected by using flow cytometry with AnnexinV/PI double staining. Expression of NF- κ B/p65, I κ B- α and Caspase-3 were determined by Western Blot techniques from the protein levels. [Results] The HCT-8/VCR cell inhibition rate of high, medium and low doses groups were significantly higher than that of blank control group ($P < 0.01$), and showed a trend of increasing concentration. The activity of NF- κ B was decreased 24 hours after 8%, 16%, and 32% (volume fraction) of the serum was given compared to that of blank control group ($P < 0.01$). The serum containing Zhizhen Formula induced apoptosis in a dose-dependent manner under certain conditions. NF- κ B/p65 protein expression decreased obviously ($P < 0.05$),

收稿时间: 2015-03-10

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: 王慧君, 在读硕士研究生, 主要从事消化道肿瘤中医药干预及机制研究

通讯作者: 王松坡, E-mail: 13386259791@163.com

I κ B- α protein expression was obviously up-regulated ($P < 0.05$) and Caspase-3 protein expression significantly raised ($P < 0.05$) after treated with the serum containing Zhizhen Formula. [Conclusion] Serum containing Zhizhen Formula can down-regulate the activity of NF- κ B, and partly reverse multidrug resistance in HCT-8/VCR, which may be related to inhibiting the pathway molecular switch I κ B- α predominate phosphorylation, decreasing NF- κ B/p65 protein expression, thus increasing Caspase-3 protein expression, inducing the cell apoptosis of HCT-8/VCR cells.

Key words: colorectal cancer; multidrug resistance; Zhizhen formula; NF- κ B; cell apoptosis

肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)是导致化疗失败的主要原因之一。MDR的机制是复杂多样的,近年来国内外研究发现,凋亡通路受阻是多药耐药的另—重要机制^[1],并且凋亡途经上的有关因子或基因,如 bcl-2 基因、核转录因子(NF- κ B)等,都参与了肿瘤细胞的耐药。激活 NF- κ B 信号通路能抑制肿瘤细胞凋亡,降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[2-3]。本实验用至真方含药血清对人大肠癌耐长春新碱细胞株 HCT-8/VCR 进行干预,研究其对 HCT-8/VCR 内 NF- κ B 活性及该通路下游凋亡相关蛋白 Caspase-3 的影响,结合检测对该细胞的凋亡诱导作用,以期寻找出 NF- κ B 信号通路 with 细胞凋亡在至真方逆转大肠癌多药耐药机制中的关系,为临床上至真方辅助治疗大肠癌提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞株 清洁级 SD 大鼠(200~250 g,雌雄各半)40 只,体重为 250~300 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。人大肠癌敏感细胞株 HCT-8 及人大肠癌耐长春新碱细胞株 HCT-8/VCR,由湘雅医学院中心实验室提供。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(含青霉素、链霉素各 100 U/ml)中,37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱培养。其中 HCT-8/VCR 中加入 1 000 ng/ml 的长春新碱(VCR)以维持其耐药性。所有实验均在停用 VCR 培养 2 周后,取对数生长期的细胞进行。

1.1.2 药品与试剂 至真方由黄芪、女贞子、薏苡仁、石见穿、野葡萄藤、藤梨根、制香附组成,以上饮片购自上海雷允上药店,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℃ 保存。注射用长春新碱(VCR)及顺铂购自深圳万乐药业有限公司,5-氟尿嘧啶及表阿霉素购自法码西亚普强公司,NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082(CAS 号 19542-67-7)购自美国 Sigma 公司。CCK8(cell counting kit-8)试剂盒购自日本 DOJINDO 公司,细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒购自上海碧云天科技有限公司,NF-p65 活性检测试剂盒购自德国 Cayman 公司,

Alexa[®] Fluor488 AnnexinV/PI 凋亡试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。兔单克隆抗体 NF- κ B/p65 (#4764)、鼠单克隆抗体 I κ B- α (#4814)、兔单克隆抗体 β -actin (#8457)购自美国 cell signal 公司;兔多克隆抗体 Caspase-3(ab32042)购自美国 abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 至真方含药血清的制备 SD 大鼠,40 只,雌雄各半,随机分为中药组(低、中、高剂量组)、空白对照组,每组 10 只。根据《徐叔云药理实验方法学》的折算系数换算法计算 SD 大鼠灌胃剂量,中药组分别以 4, 8, 16 ml/(kg·d) 的剂量灌胃给药。给药 3 d,第 4 天灌胃后 1 h 取血。离心 3 000 rpm,10~20 min,取上清,于 56℃ 灭活,-20℃ 保存。

1.2.2 HCT-8/VCR 细胞株多药耐药性的鉴定 CCK8 法测定 HCT-8/VCR 对 VCR、CDDP、5-FU 及 EP 的耐药性。取对数生长期细胞以 5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板,培养过夜后参照抗肿瘤药物的血浆高峰浓度(VCR: 0.5 μ g/ml; CDDP: 3 μ g/ml; 5-Fu: 10 μ g/ml; EP: 0.34 μ g/ml) 设 5 种浓度梯度进行干预,每一浓度设 6 个复孔。培养 72 h 后,按 CCK-8 试剂盒说明操作,酶联免疫检测仪测定吸光度,计算相对抑制率,计算 50% 细胞生长抑制时的药物浓度(IC₅₀),计算耐药指数,公式为:耐药指数(resistance index, RI) = 耐药细胞 IC₅₀/亲本细胞 IC₅₀ × 100%。实验重复 3 次。

1.2.3 至真方含药血清实验浓度筛选 取对数生长期的 HCT-8/VCR 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%),按 CCK-8 试剂盒说明操作,酶联免疫检测仪测定吸光度,计算相对抑制率。以 SPSS 软件计算含药血清体积分数,确定含药血清实验浓度。

1.2.4 ELISA 检测 NF- κ B 活性 细胞核蛋白抽提、蛋白浓度测定及 NF- κ B 活性检测均按试剂盒说明操作。分组为:HCT-8、HCT-8/VCR(含药血清组 8%、16%、32%)、空白血清组、阴性对照组(加入

生理盐水)、阳性对照(BAY11-7082 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$)。各组设 3 个复孔,在阳性对照正常显色的前提下,计算各组样本于波长 450 nm 吸光度的平均值并进行比较。

1.2.5 AnnexinV/PI 流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期的 HCT-8 及 HCT-8/VCR 细胞,同上分组,各组收集总细胞数约 10^6 个。用 PBS 清洗细胞 2 次, 1500 rpm 离心 5 min ,按 Alexa[®] Fluor488 AnnexinV/PI 凋亡试剂盒操作,送流式细胞仪检测。

1.2.6 Western blot 检测 NF- κ B/p65、I κ B- α 和 Caspase-3 蛋白的表达 取对数生长期的 HCT-8 及 HCT-8/VCR 细胞,同上分组,按照蛋白抽提试剂盒说明分别抽提细胞浆蛋白及核蛋白,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,转膜后分别加入一抗体(NF- κ B、I κ B- α 和 Caspase-3 稀释度分别为 $1:1500$ 、 $1:1000$ 、 $1:500$,以抗体稀释液配制), 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($1:1000$), 37°C 孵育 1 h 。显色定影之后,用 Quantity-one 图象处理系统分析目标蛋白条带的灰度值,蛋白表达量结果以灰密度比值(目的蛋白/ β -actin)表示。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计处理软件进行数据分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组使用单因素方差分析,组间多重比较用 SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCT-8/VCR 细胞多药耐药性的鉴定

CCK-8 法检测结果显示:HCT-8 细胞和 HCT-8/VCR 细胞对 VCR 的 IC₅₀ 分别为 ($0.13 \pm$

0.03) $\mu\text{g/ml}$ 和 (9.54 ± 0.23) $\mu\text{g/ml}$,HCT-8/VCR 的耐药指数(RI)为 73.38 。同时 HCT-8/VCR 对 5-FU、CDDP、EP 均有不同的程度的交叉耐药。提示 HCT-8/VCR 细胞具有多药耐药性。见表 1。

表 1 HCT8、HCT-8/VCR 细胞对不同种类化疗药物的敏感性 $\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 例数 | IC ₅₀ | | RI |
|------|----|------------------|-----------------------|---------|
| | | HCT-8 | HCT-8/VCR | |
| VCR | 3 | 0.13 ± 0.03 | $9.54 \pm 0.23^{1)}$ | 73.38 |
| 5-FU | 3 | 3.30 ± 0.32 | $67.71 \pm 0.16^{1)}$ | 20.52 |
| CDDP | 3 | 0.76 ± 0.24 | $5.03 \pm 0.13^{1)}$ | 6.61 |
| EP | 3 | 0.86 ± 0.07 | $3.79 \pm 0.11^{1)}$ | 4.40 |

与 HCT-8 组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞的抑制率及实验浓度的确定

CCK-8 结果显示:体积分数为 2% 、 4% 时,高、中、低剂量含药血清组干预 HCT-8/VCR 细胞 24 h 后,细胞生长抑制率与空白血清组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);体积分数 $> 8\%$ 时,高、中、低剂量含药血清组与空白血清组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),抑制率呈浓度递增趋势,且高、中剂量组比较两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。故本实验采用中剂量至真方含药血清作为实验剂量。见表 2。

根据以上结果计算至真方中剂量含药血清 IC₁₀ 为 3.4% 、IC₂₀ 为 9.2% 、IC₅₀ 为 64% ,根据实验结果 2% 、 4% 含药血清抑制率与空白血清差异无统计学意义,因此选择 IC₅₀ 以下,IC₂₀ 左右体积分数的含药血清作为实验浓度,即: 8% 、 16% 、 32% 。

表 2 不同浓度血清对 HCT-8/VCR 细胞的抑制率 $\%$, $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 例数 | 含药血清体积分数 | | | | | |
|-------|----|-----------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 2% | 4% | 8% | 16% | 32% | 64% |
| 空白血清组 | 3 | 1.23 ± 0.05 | 3.73 ± 0.09 | 1.12 ± 0.02 | 3.43 ± 0.06 | 2.77 ± 0.05 | 2.85 ± 0.04 |
| 低剂量组 | 3 | 0 | 7.03 ± 0.06 | $13.88 \pm 0.01^{1)}$ | $11.19 \pm 0.07^{1)}$ | $20.83 \pm 0.02^{1)}$ | $39.75 \pm 0.07^{1)}$ |
| 中剂量组 | 3 | 2.53 ± 0.03 | 11.10 ± 0.11 | $21.00 \pm 0.06^{1)}$ | $23.69 \pm 0.04^{1)}$ | $31.59 \pm 0.06^{1)}$ | $55.03 \pm 0.93^{1)}$ |
| 高剂量组 | 3 | 1.08 ± 0.04 | 9.46 ± 0.04 | $17.18 \pm 0.04^{1)}$ | $21.35 \pm 0.05^{1)}$ | $38.28 \pm 0.04^{1)}$ | $56.68 \pm 0.06^{1)}$ |

与空白血清组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞 NF- κ B 活性的影响

用 ELISA 法检测 NF- κ B DNA 结合活性,结果

显示 HCT-8/VCR 细胞的 NF- κ B DNA 结合活性明显高于 HCT-8 细胞($P < 0.05$),提示 NF- κ B 在耐药细胞的高表达可能与其耐药特性有关;不同浓度至

真方含药血清作用于 HCT-8/VCR 细胞 12 h、24 h 后, NF- κ B 活性较 HCT-8/VCR 阴性对照组明显降低 ($P < 0.01$), 在一定范围内呈浓度依赖性 (见表 3), 其中 32% 至真方含药血清作用于 HCT-8/VCR 细胞 24 h 后, NF- κ B 活性较作用 12 h 明显降低 ($P < 0.01$); 16%、32% 至真方含药血清作用

HCT-8/VCR 细胞 12 h 后, NF- κ B 活性与 BAY11-7082 阳性对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); HCT-8/VCR + 空白血清组与 HCT-8/VCR 阴性对照组比较, NF- κ B 活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。根据以上实验统计结果, 确定 24 h 为最佳实验时间点。

表 3 至真方含药血清作用 HCT-8/VCR 细胞 6 h、12 h、24 h 后 NF- κ B 活性

$\bar{x} \pm s$

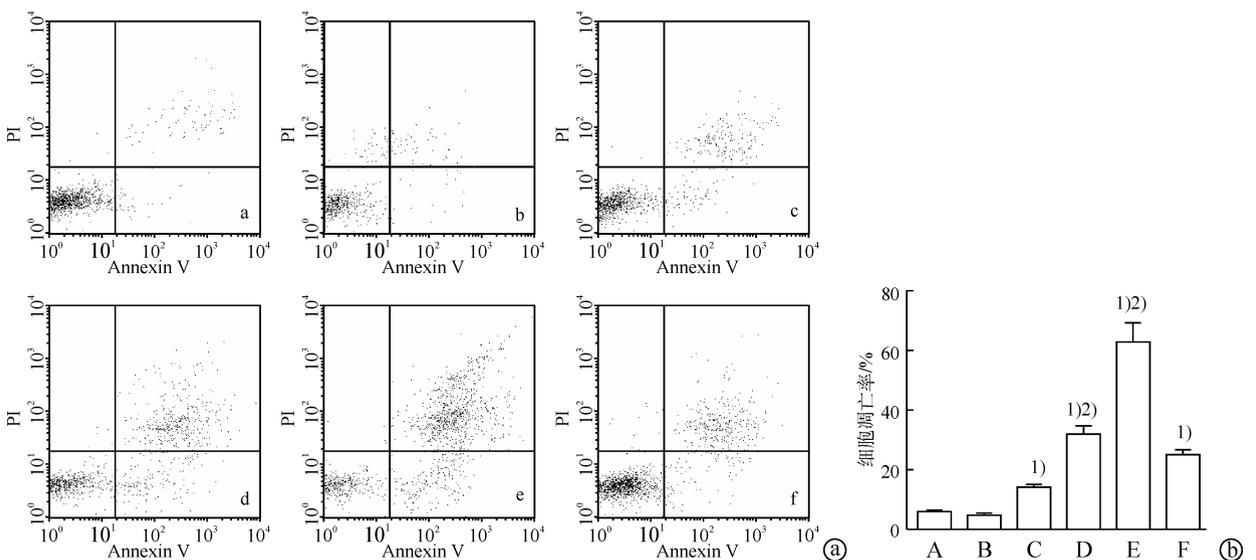
| 组别 | 治疗时间 | | |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 6 h | 12 h | 24 h |
| HCT-8 组 | 3.547 ± 0.120 ¹⁾ | 3.666 ± 0.066 ¹⁾ | 3.534 ± 0.120 ¹⁾ |
| HCT-8/VCR 阴性对照组 | 3.940 ± 0.101 | 3.977 ± 0.086 | 3.863 ± 0.055 |
| HCT-8/VCR + 空白血清组 | 4.088 ± 0.088 | 3.845 ± 0.077 | 3.923 ± 0.125 |
| HCT-8/VCR + 8% 含药血清组 | 3.930 ± 0.099 | 3.400 ± 0.140 ²⁾ | 3.457 ± 0.091 ²⁾ |
| HCT-8/VCR + 16% 含药血清组 | 3.814 ± 0.086 | 3.043 ± 0.082 ²⁾ | 2.946 ± 0.066 ²⁾ |
| HCT-8/VCR + 32% 含药血清组 | 3.652 ± 0.085 ¹⁾ | 3.017 ± 0.084 ²⁾ | 2.868 ± 0.079 ²⁾ |
| HCT-8/VCR + BAY11-7082 阳性对照组 | 3.322 ± 0.301 ²⁾ | 3.105 ± 0.126 ²⁾ | 2.730 ± 0.042 ²⁾ |

与 HCT-8/VCR 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.4 至真方含药血清作用 24 h 后 HCT-8/VCR 细胞凋亡率变化

流式细胞仪检测结果表明, 至真方含药血清可促进 HCT-8/VCR 细胞凋亡。8% 含药血清组, 16% 含药血清组, 32% 含药血清组, BAY11-7082 阳性对照组细胞凋亡率分别为 (13.64 ± 0.73)%, (31.62 ± 2.78)%, (62.90 ± 6.52)%, (24.67 ±

1.69)%, 明显高于凋亡率为 (5.74 ± 0.12)% 的阴性对照组 ($P < 0.01$), 且在一定范围内细胞凋亡率呈浓度依赖性。其中 16% 含药血清组, 32% 含药血清组对 HCT-8/VCR 细胞的凋亡率较 BAY11-7082 阳性对照组明显升高 ($P < 0.01$)。空白血清组的细胞凋亡率为 (4.37 ± 0.29)%, 与阴性对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。



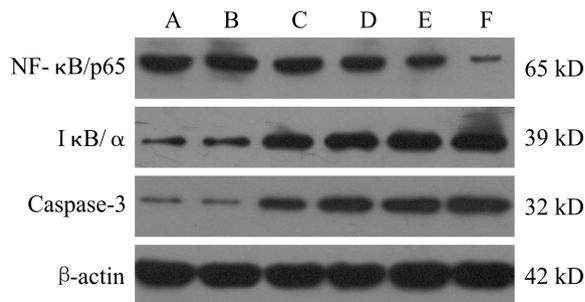
A: 阴性对照组; B: 空白血清组; C: 8% 含药血清组; D: 16% 含药血清组; E: 32% 含药血清组; F: BAY11-7082 阳性对照组。

与阴性对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 BAY11-7082 阳性对照组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度至真方含药血清作用 HCT-8/VCR 细胞 24 h 后的细胞凋亡率

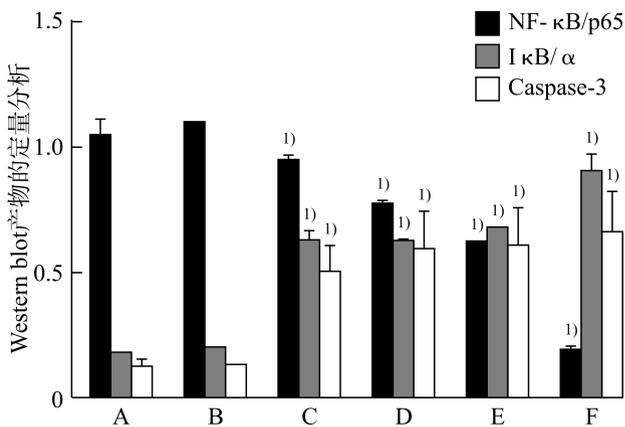
2.5 至真方含药血清对 NF- κ B/p65、I κ B- α 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

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 NF- κ B/p65 蛋白表达较用药前 (1.041 ± 0.063) 明显下降 ($P < 0.05$),分别为 (0.945 ± 0.018)、(0.779 ± 0.003)、(0.627 ± 0.001); I κ B- α 蛋白表达较用药前 (0.191 ± 0.001) 明显上调 ($P < 0.05$),分别为 (0.632 ± 0.034)、(0.627 ± 0.003)、(0.682 ± 0.000); Caspase-3 蛋白表达较用药前 (0.132 ± 0.024) 明显上调 ($P < 0.05$),分别为 (0.508 ± 0.100)、(0.597 ± 0.145)、(0.608 ± 0.147); NF- κ B 通路抑制剂 BAY11-7082 组处理 24 h 后,NF- κ B/p65 表达降至 (0.201 ± 0.009), I κ B- α 表达升至 (0.907 ± 0.060), Caspase-3 表达升至 (0.661 ± 0.158)。提示至真方含药血清可下调 NF- κ B/p65 蛋白的表达,并呈浓度梯度下降,可上调 I κ B- α 、Caspase-3 蛋白的表达。结果见图 2、图 3。



A: 阴性对照组; B: 空白血清组; C: 8% 含药血清组; D: 16% 含药血清组; E: 32% 含药血清组; F: BAY11-7082 阳性对照组。

图 2 各组 NF- κ B/p65、I κ B- α 、Caspase-3 的表达



A: 阴性对照组; B: 空白血清组; C: 8% 含药血清组; D: 16% 含药血清组; E: 32% 含药血清组; F: BAY11-7082 阳性对照组。

与阴性对照组比较, $^{1)} P < 0.05$ 。

图 3 Western blot 产物的定量分析

3 讨论

对于大肠癌的治疗,化疗依然占据重要地位,特别是对于不能进行手术或姑息性手术患者,化疗则为延长患者生存期的主要治疗措施之一。大肠癌细胞原发性或继发性多药耐药(multidrug resistance, MDR)是化疗失败的主要原因。因此探寻多药耐药的产生机制及有效逆转策略成为大肠癌治疗过程中亟待解决的问题之一。

MDR 的产生是一个多机制、多途径、多环节的过程,目前发现 MDR 与各种膜蛋白的外排泵作用引起的细胞内化疗药物浓度下降、各种酶的作用、凋亡机制的修饰及信号通路异常^[4]等相关。NF- κ B 是一种在体内广泛存在的多向性转录因子,除参与炎症、免疫和应激等诸多生物学过程中的基因调节,还在细胞增殖和凋亡相关基因调控中起关键作用,与多药耐药也密切相关^[5]。典型的 NF- κ B 以 p50-p65 异源二聚体组成,静息状态下,NF- κ B 与抑制性蛋白 I κ B- α 结合,以无活性的状态存在于胞浆中。当 NF- κ B 活化后即与 I κ B- α 解离,并转位到细胞核内,与特异的 κ B 序列结合,发挥其转录调控作用^[6]。有研究证实突变型 I κ B- α 抑制 NF- κ B 活性对耐药胃癌细胞株 mdrl 的表达有直接抑制作用,并促使耐药胃癌细胞凋亡^[7]。亦有研究发现木蝴蝶素能够抑制 MCF7/ADR 细胞

NF- κ B 结合活性与下调 NF- κ B 蛋白表达,减少细胞 G2/M 期阻滞,以逆转 P-gp 介导的 MCF7/ADR 细胞多药耐药^[8]。

中药在阻断肿瘤细胞复杂的信号传导过程中体现出多环节、多层次及多靶点作用的优势,在逆转肿瘤 MDR 的研究中倍受关注。至真方是已故“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、制香附组成。方中黄芪大补元气、壮脾胃,以固后天之本,女贞子补肝肾、安五脏,以固先天之源,黄芪、女贞子两药相和,先后天同补,共为君药;薏苡仁健脾祛湿化浊,石见穿通络活血消癥,共为臣药;藤梨根清热解暑、除湿化浊,野葡萄藤舒筋活血、清热解毒,制香附气血同理,共为佐使药。全方健脾补肾、活血化浊、解毒通络,共奏扶正祛邪之效。

本研究从 NF- κ B 信号通路进一步探讨至真方逆转大肠癌多药耐药机制。CCK8 测定 HCT-8/VCR 细胞的多药耐药性,筛选出至真方含药血清的实验浓度为中剂量 8%、16%、32% 体积分数。BAY11-7082 是 NF- κ B 通路的特异蛋白抑制剂,它可以抑制 I κ B- α 的磷酸化及其降解,并且可以抑制 p65/p50 进入细胞核^[9],故本实验选用该试剂做为

阳性对照。不同浓度含药血清干预 HCT-8/VCR 细胞 24 h 后,含药血清组 NF- κ B 活性较 HCT-8/VCR 阴性对照组明显降低($P < 0.01$),一定范围内呈浓度依赖性;16%、32%含药血清组对 HCT-8/VCR 细胞的凋亡率分别为 $(31.62 \pm 2.78)\%$ 、 $(62.90 \pm 6.52)\%$,较 BAY11-7082 阳性对照组 $(24.67 \pm 1.69)\%$ 明显升高($P < 0.01$),提示至真方含药血清逆转大肠癌细胞的多药耐药可能与抑制 NF- κ B 通路、解除细胞凋亡的受抑制状态有关。进一步采用 Western blot 检测至真方含药血清对 HCT-8/VCR 细胞 NF- κ B/p65、I κ B- α 和 Caspase-3 蛋白表达的影响,实验证明 8%、16%、32%至真方含药血清处理 24 h 后,HCT-8/VCR 细胞 NF- κ B/p65 蛋白表达较用药前 (1.041 ± 0.063) 明显下降($P < 0.05$),并且呈浓度梯度下降;I κ B- α 蛋白表达较用药前 (0.191 ± 0.001) 明显上调($P < 0.05$),Caspase-3 蛋白表达较用药前 (0.132 ± 0.024) 明显上调($P < 0.05$),说明至真方含药血清可下调 NF- κ B/p65、上调 I κ B- α 、Caspase-3 蛋白的表达。

综上所述,至真方含药血清逆转大肠癌细胞多药耐药的机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路分子开关 I κ B- α 的磷酸化,下调 NF- κ B/p65 蛋白的表达,从而上调通路下游的 Caspase-3 蛋白的表达,诱导 HCT-8/VCR 细胞凋亡有关。

另外,由于至真方成分多样,笔者发现至真方含药血清组 HCT-8/VCR 细胞的凋亡率较 NF- κ B 信号通路的特异性抑制剂 BAY11-7082 组明显升高,但对于该通路的关键蛋白的调控却不及 BAY11-7082,提示至真方可能同时通过其它的通路或因子诱导大肠癌多药耐药细胞的凋亡。因此,至真方逆转大肠癌细胞的多药耐药可能是一个多环节、多靶

点的作用总和,值得我们进一步探讨。

参考文献

- [1] SARASWATHY M, GONG S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31:1397-1407.
- [2] SUI H, PAN S F, SHI X L, et al. Zuo Jin Wan reverses P-gp-mediated drug-resistance by inhibiting activation of the PI3 K/Akt/NF- κ B pathway[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:279-279.
- [3] 李俊霖, 韩少良, 杨文军, 等. NF- κ B 在肿瘤化疗耐受和肿瘤治疗中的应用[J]. 温州医学院学报, 2011, 41(4):400-402.
- [4] WU Q, YANG Z, NIE Y, et al. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches[J]. Cancer Lett, 2014, 347:159-166.
- [5] 刘海楠, 陈雷, 高彦宏. NF- κ B 国外最新研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(4A):159-160.
- [6] 隋华, 付晓伶, 潘树芳, 等. PI3 K/Akt/NF- κ B 通路调控 ABCB1/P-gp 介导的人结肠癌细胞多药耐药的研究[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(2):106-111.
- [7] 陈庆, 陈虎, 郑海, 等. 抑制核转录因子 κ B 活性对 SGC7901/VCR 细胞 mdrl 表达及凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(8):1066-1068.
- [8] ZHU L, ZHAO L, WANG H, et al. Oroxylin A reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of MCF7/ADR cells by G2/M arrest[J]. Toxicol Lett, 2013, 219:107-115.
- [9] CHEN Y J, CHANG L S. Simvastatin induces NF- κ B/p65 down-regulation and JNK1/c-Jun/ATF-2 activation, leading to matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) but not MMP-2 down-regulation in human leukemia cells[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 92:530-543.