

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2016.02.01

西黄丸含药血清通过 P 糖蛋白途径逆转肝癌细胞 多药耐药的体外研究

李桂芝¹, 戴一², 黄仁宝³, 童铸廷⁴, 姚梦群⁴, 仲飞⁴

¹武警安徽省总队医院 肿瘤科,安徽 合肥 230061;

²安徽新华学院药学院,安徽 合肥 230088;

³安徽中医药大学第一附属医院 肿瘤科,安徽 合肥 230031;

⁴安徽医科大学第一附属医院 肿瘤科,安徽 合肥 230022)

摘要:[目的]探讨西黄丸含药血清对多药耐药人肝癌细胞株 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞耐阿霉素作用的影响及机理。[方法]制备西黄丸含药血清;BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞分别用西黄丸含药血清、阿霉素及二者联合处理;MTT 法检测细胞增殖;Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞术检测细胞凋亡;荧光酶标仪测定细胞内阿霉素的荧光强度;Western-blot 法检测细胞 P-糖蛋白(P-gp)的表达。[结果]西黄丸含药血清联合不同浓度阿霉素处理 24 h 后,BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞增殖抑制率和凋亡率高于单用同浓度阿霉素组,比较差异有统计学意义($P<0.05$);西黄丸含药血清联合不同浓度阿霉素处理 12 h 后,BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞内阿霉素的荧光强度高于单用同浓度阿霉素组,比较差异有统计学意义($P<0.05$);西黄丸含药血清处理 12 h 后,BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞 P-gp 蛋白表达水平降低,较对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。[结论]西黄丸含药血清显著逆转 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞的耐阿霉素作用,其机制可能与西黄丸含药血清下调细胞多药耐药蛋白 P-gp 表达相关。

关键词:西黄丸;多药耐药;肝细胞癌;P 糖蛋白

中图分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2016)02-0083-05

In vitro study on the reversal effect of serum containing Xihuang pill on the multidrug-resistance of hepatic cancer cells via P-glycoprotein pathway

LI Gui-zhi¹, DAI Yi², HUANG Ren-bao³, TONG Zhu-ting⁴,
YAO Meng-qun⁴, ZHONG Fei⁴

(¹Department of Oncology, Hospital of Armed Police of Anhui Province, Hefei 230061, China; ²Pharmacy School, Anhui Xinhua College, Hefei 230088, China; ³Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ⁴Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Corresponding author: ZHONG Fei, E-mail: zhong_fei@126.com

Abstract: [Objective] To investigate the reversal effects and mechanisms of serum containing Xihuang pill on adriamycin resistance of the multidrug-resistant hepatic cancer cells including the human hepatocellular carcinoma BEL-7404/Adr cell and HepG2/Adr cell. [Methods] Serum containing Xihuang pill was prepared. BEL-7404/Adr cell and HepG2/Adr cell were treated with serum containing Xihuang pill, adriamycin, or their combinations. The proliferation and apoptosis of cells were analyzed by MTT assay and flow cytometry (Annexin V-FITC/PI double staining assay). Intracellular accumulation of adriamycin was measured by the detection of fluorescence intensity of cell lysates using microplate reader. The protein expres-

收稿日期:2015-08-10

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重点项目(No:KJ2012 A163)

通讯作者:仲飞, E-mail: zhong_fei@126.com

sions of P-gp was detected by Western blot. [Results] The growth inhibition rate and apoptosis rate of the BEL-7404/Adr cell and HepG2/Adr cell treated with the combination of serum containing Xihuang pill and adriamycin were higher compared with the cells treated with adriamycin alone ($P < 0.05$). Intracellular accumulation of adriamycin was significantly enhanced and the protein expression of P-gp decreased by the treatment of serum containing Xihuang pill ($P < 0.05$). [Conclusion] Serum containing Xihuang pill reverses the multidrug-resistance of the human hepatocellular carcinoma BEL-7404/Adr cell and HepG2/Adr cell, and the P-glycoprotein pathway may be involved in the effect.

Key words: Xihuang pill; Multidrug-resistance; hepatocellular carcinoma; P-glycoprotein

肿瘤细胞耐药性产生的重要机制是瘤细胞高表达多药耐药蛋白 P-糖蛋白(P-gp),该蛋白可以排出肿瘤细胞内蓄积的药物,降低药物对瘤细胞的抑制作用,从而导致瘤细胞对多药耐药,是化疗失败的重要原因^[1]。因而,P-gp 途径是逆转肿瘤化疗耐药的重要靶点,寻找针对该途径的耐药逆转剂是研究的重要方向。

西黄丸是抗癌经典名方,由牛黄、麝香、乳香和没药等 4 味中药组成,有消坚化结、解毒散痛的功效。临床研究表明,该方对多种实体肿瘤具有一定疗效,而且对人体不良反应较小,是非常实用的抗肿瘤药物^[2-3]。我们认为,有必要探讨西黄丸与现代抗肿瘤药物联合作用的效果与机制,这是充分开发西黄丸应用潜力的重要途径。

本研究采用人肝细胞癌耐阿霉素细胞株 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞作为肿瘤多药耐药的体外研究模型,考察了西黄丸含药血清对上述细胞系耐药性的影响,以及 P-gp 途径在其中的作用,旨在寻找安全有效的化疗耐药逆转剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞系 4 只 28~30 周龄健康日本大耳白兔购自安徽医科大学实验动物中心,每只质量 2.2~2.5 kg,雌雄各半;人肝细胞癌耐阿霉素细胞株 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.1.2 主要药物与试剂 西黄丸为北京同仁堂科技发展股份有限公司产品;阿霉素(Adr)购于法玛西亚普强(中国)有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒为美国 YEASEN 公司产品;鼠抗人 P-gp、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.1.3 主要仪器 流式细胞仪为 BD FACSCalibur 型;Elx-800 型酶标仪(BIO-TEK 仪器公司);WD-9413 A 型凝胶成像分析系统(杭州汇尔仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞系培养 BEL-7404/Adr、HepG2/Adr 细胞株在饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱内培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,待其贴壁生长至 70%~80% 融合时,胰酶消化传代。

1.2.2 西黄丸含药血清的制备 参考相关文献^[4],西黄丸高、中、低剂量组兔用药量分别为每日每千克体重 32、16、8 g,约相当于成人每日每千克体重用药量的 24、12、6 倍。制备过程简述如下:西黄丸经双蒸水漂洗干燥、超微粉碎、超声震荡等程序制备药物混悬液;将日本大耳白兔随机分入高、中、低剂量组和空白对照组,每组 2 只;各组动物分别按预定剂量灌胃,空白对照组以等量生理盐水灌胃,连续 4 d,最后一次灌胃前禁食 12 h,灌胃后 1 h 乙醚麻醉,颈动脉采血,无菌分离血清,56℃ 半小时灭活,合并同组动物血清,0.22 μ m 微孔滤膜过滤后 -20℃ 保存备用。

1.2.3 MTT 法体外药物敏感实验 取待测细胞制成浓度为 5×10^6 /L 单细胞悬液,加入 96 孔培养板内,每孔 200 μ l,24 h 细胞贴壁后,加入不同药物和(或)血清溶液 100 μ l(对照组加不含药物的细胞培养液),每组设 3 复孔。培养 24 h 后每孔加入 MTT 液(5 g/L)25 ml,继续培养 3 h,弃上清,每孔加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min,于 570 nm 波长条件下用酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度值。增殖抑制率 = (1 - 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值),结果以每组 3 孔的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 取待测细胞制成细胞悬液,PBS 液洗涤 2 次,重悬于 200 μ l 结合缓冲液。按 Annexin V-FITC/PI 双染色凋亡检测试剂盒说明书加入 FITC 标记的 Annexin V 10 μ l 和碘化丙啶(PI)5 μ l,混匀,避光反应 15 min,加入 300 μ l 结合缓冲液,避光反应 1 h 后上流式细胞仪检测,每次读取 10^4 个细胞,Cell Quest 软件将全部细胞分为四群:存活细胞(Annexin V-PI⁻)、早期凋亡细胞(Annexin V + PI⁻)、凋亡后继发坏死细胞(Annexin V + PI⁺) 和坏死细胞(Annexin V-PI⁺)。计

算细胞凋亡率(%)=(早期凋亡细胞+凋亡后继发坏死细胞)/10 000×100%。

1.2.5 荧光酶标仪测定细胞内 Adr 含量 待测细胞 1×10^5 /孔密度培养于 96 孔细胞培养板,分为 Adr+含药血清组和 Adr+对照血清组,前者加入西黄丸含药血清预处理 4 h 后,再加入不同浓度 Adr 共处理 8 h,后者则先用对照组血清预处理 4 h 后再加 Adr 共处理 8 h。处理后细胞 PBS 液洗涤 3 次,终止反应,超声裂解后离心取上清,溶于盐酸-乙醇溶液,置于黑色 96 孔培养板中用荧光酶标仪测定 Adr 荧光强度,激发波长和发射波长分别 470 nm 和 580 nm。根据荧光强度标准曲线计算 10^6 个细胞内 Adr 含量,具体过程参见相关文献^[5]。

1.2.6 Western-blot 法检测细胞 P-gp 表达 待测细胞 1×10^6 /孔密度培养于 96 孔细胞培养板,每孔 1 ml 培养过夜,分别加入西黄丸含药血清和对照血清,处理 12 h 后,收集细胞 PBS 液洗涤终止反应,常规方法裂解细胞、提取总蛋白、测定蛋白浓度后进行 Western-blot 操作。凝胶成像分析系统检测 P-gp 与 β -actin 蛋白条带灰度的比值为 P-gp 蛋白的相对含量。

1.3 统计学处理

所有实验独立重复 3 次,统计软件 SPSS 11.0 处理测定结果数据。2 组均数比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞的增殖与凋亡

本研究首先考察了高、中、低剂量组西黄丸含药血清对 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 增殖的影响,结果见图 1。处理 24 h 后,高剂量西黄丸含药血清可以抑制上述耐药细胞株的增殖,较对照组差异有统计学意义($P < 0.01$);中、低剂量西黄丸含药血清则未见上述抑瘤作用。

本研究考察了对所用细胞株不具备细胞毒性的

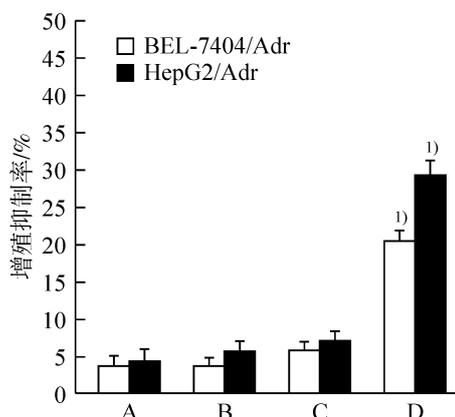
低剂量组西黄丸含药血清对 Adr 抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的影响,结果见图 2。可见,二者联合处理时,当 Adr 浓度为 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 时,联合组 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞增殖抑制率和凋亡率都显著高于单用同浓度 Adr 组,比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 细胞内 Adr 含量

如图 3 所示,BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞分别以不同浓度 Adr 加低剂量组含药血清或对照血清处理 12 h 后,含药血清组细胞内 Adr 含量高于同浓度 Adr+对照血清组,比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

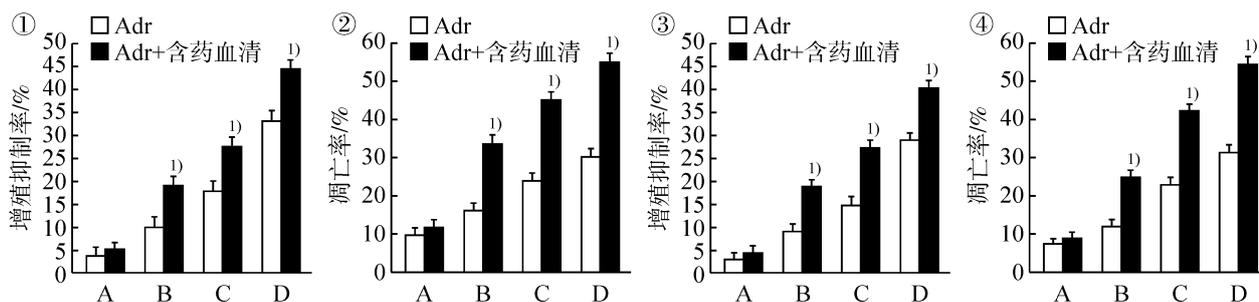
2.3 细胞 P-gp 蛋白表达水平

低剂量组西黄丸含药血清和对照血清分别处理细胞 12 h 后,BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞 P-gp 表达情况如图 4 所示,含药血清处理后细胞 P-gp 蛋白条带密度较对照血清组为低(图 4A),目标蛋白条带与内参条带灰度的比值作为半定量指标也显示了同样的趋势(图 4B)。



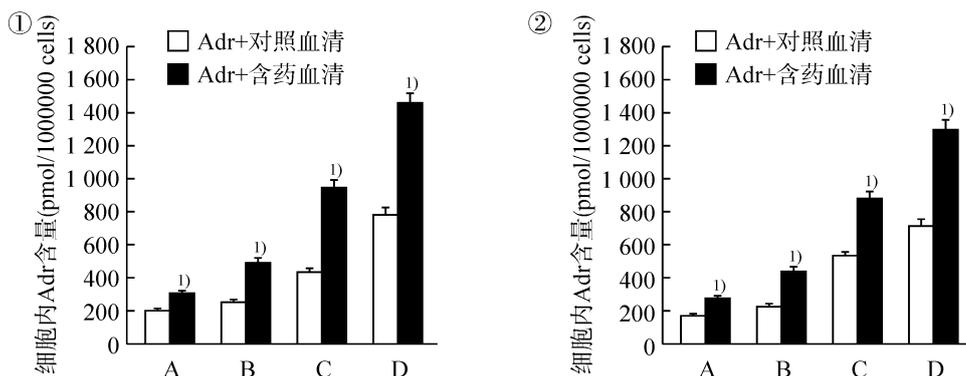
A 为对照组,B、C、D 分别为低、中、高剂量西黄丸含药血清组;与 A 组比较,^{D)} $P < 0.01$ 。

图 1 西黄丸含药血清对 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 增殖的影响



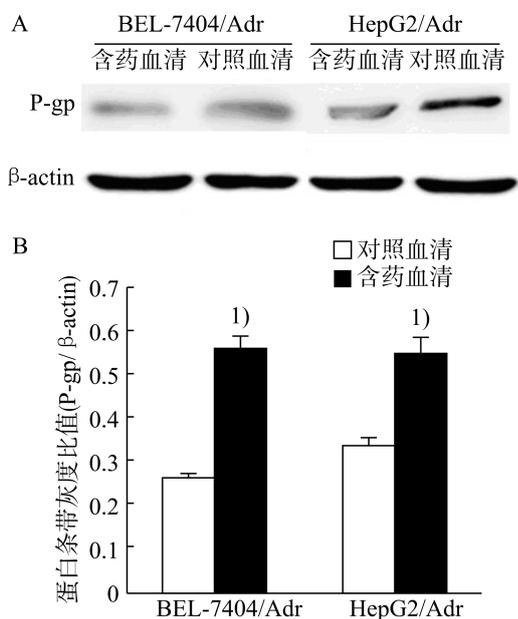
①、②:BEL-7404/Adr 细胞;③、④:HepG2/Adr 细胞;A、B、C、D 组 Adr 浓度分别为 1、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$;与单用 Adr 组比较,^{D)} $P < 0.01$ 。

图 2 西黄丸含药血清对 Adr 抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的影响



①: BEL-7404/Adr 细胞; ②: HepG2/Adr 细胞; A、B、C、D 组 Adr 浓度分别为 1、2.5、5、10 μmol/L; 与同浓度 Adr+对照血清组比较, ^D P < 0.01。

图3 西黄丸含药血清对细胞内 Adr 含量的影响



与对照血清组比较, ¹⁾ P < 0.01。

图4 西黄丸含药血清对 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

3 讨论

西黄丸始载于清代名医王洪绪所著《外科证治全生集》, 历代医家用其治疗乳岩、瘰疬、痰核、肺癆等, 积累了丰富的用药经验, 是中医药抗肿瘤的代表性方剂。近期临床研究表明, 西黄丸与化疗药物联用治疗某些恶性肿瘤取得较好效果^[2-3], 但其中的机制尚缺乏深入的研究。

中药复方研究的难点之一在于其组成复杂, 难以确定其药效成分。血清药理学方法是解决这个难题的有效途径, 先用中药复方灌服动物, 继而采集动物血液、分离血清, 将这种含有药物成分的血清作为中药复方药效成分的代表进一步行药理学研究, 同时制备正常血清做对照^[6]。

本研究首先参照相关文献制备了西黄丸含药血清, 继而考察其对肝细胞癌多药耐药的细胞株 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞增殖的影响, 结果发现仅高剂量含药血清对两细胞株有明显的增殖作用, 而中、低剂量组西黄丸含药血清对所用细胞株不具备细胞毒性。接下来, 本研究考察了低剂量组西黄丸含药血清对 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞耐药性的影响, 结果发现低剂量组西黄丸含药血清联合 Adr 处理后, 两细胞株的增殖抑制率、凋亡率均较单用同浓度 Adr 明显升高(见图 2), 说明西黄丸含药血清有逆转肿瘤细胞耐药的效应, 为西黄丸与化疗联合应用提供了一定的理论根据。

肿瘤细胞发生多药耐药的机制非常复杂, 其中, 以 P-gp 为代表的某些药物转运蛋白表达增高、功能活跃, 从而排出肿瘤细胞内的药物, 导致所谓“药物转运性耐药”是化疗耐药的经典机制^[7]。本研究中, 西黄丸含药血清联合不同浓度 Adr 处理 12 h 后, BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞内 Adr 蓄积量显著高于同浓度 Adr 联合对照血清组, 说明西黄丸逆转耐药是通过影响药物在肿瘤细胞内外的转运, 增加了化疗药物在瘤细胞内的蓄积。进一步用 Western blot 法检测细胞 P-gp 的表达, 结果说明西黄丸含药血清确实可以降低 P-gp 在 BEL-7404/Adr 细胞和 HepG2/Adr 细胞的表达。至此, 可以推测, 抑制 P-gp 表达, 降低其功能是西黄丸逆转肿瘤细胞多药耐药的重要机制。

总之, 本研究应用血清药理学方法在体外探讨了抗癌名方西黄丸对多药耐药的肝癌细胞株耐药性的影响及其机制, 初步结果说明西黄丸确实可以逆转肿瘤细胞耐药, 其机制可能和抑制耐药瘤细胞 P-gp 途径相关。

本次实验采用高脂饲料诱导大鼠 NASH 模型, 8 周后肝组织苏木精-伊红染色显示存在明显的肝细胞脂肪变性, 肝索结构紊乱, 可见弥漫性、混合性的空泡及气球样改变, 油红染色大鼠肝组织可见大量脂滴, 模型构建成功。罗格列酮是噻唑烷二酮类 (TZDs) 药物, 可提高周围组织如肝脏、骨骼肌和脂肪组织等对胰岛素的应答反应 (敏感性), 从而改善胰岛素抵抗。本实验以此为对照药, 研究苓桂术甘汤对 NASH 大鼠 DGAT2、PKC ϵ 的影响。研究结果显示, 模型组大鼠肝组织 DGAT2/PKC ϵ 蛋白及相应 mRNA 含量均较正常组升高, 提示二者参与了 NASH 大鼠模型中的脂代谢紊乱和 IR, 苓桂术甘汤组、罗格列酮组均能降低大鼠肝组织 DGAT2、PKC ϵ 的 mRNA 和蛋白含量, 提示二者可能从基因和蛋白层面上通过下调 DGAT2、PKC ϵ 的表达, 调节脂质代谢, 改善胰岛素抵抗, 苓桂术甘汤可能有噻唑烷二酮类药物的作用。

综上所述, 苓桂术甘汤可能是通过下调肝组织 DGAT2、PKC ϵ mRNA 和蛋白的表达水平, 对肝内脂质代谢和胰岛素抵抗起到了调节和改善作用, 从而达到治疗 NASH 的目的, DGAT2/PKC ϵ 有可能成为治疗 NASH 的新靶点。

参考文献

- [1] ANGULO P. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346:1221-1231.
- [2] BRUNT E M. Nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24:3-20.
- [3] 刘莹. 茵陈蒿汤及其拆方治疗非酒精性脂肪性肝病的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2013.
- [4] CHEN H C, SMITH S J, LADHA Z, et al. Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109:1049-1055.
- [5] JORNAYVAZ F R, BIRKENFELD A L, JURCZAK M J, et al. Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108:5748-5752.
- [6] MONETTI M, LEVIN M C, WATT M J, et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DAGT in the liver [J]. *Cell Metab*, 2007, 6:69-78.
- [7] SAMUEL V T, LIU Z X, WANG A, et al. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117:739-745.
- [8] KUMASHIRO N, ERION D M, ZHANG D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *PNAS*, 2011, 108: 16381 - 16385.
- [9] 柳涛, 杨丽丽, 张莉, 等. 不同治法复方防治非酒精性单纯性脂肪肝的效应差异[J]. *中西医结合学报*, 2012, 10(10):1120-1126.
- [1] ANGULO P. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346:1221-1231.
- [2] BRUNT E M. Nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24:3-20.
- [3] 刘莹. 茵陈蒿汤及其拆方治疗非酒精性脂肪性肝病的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2013.
- [4] CHEN H C, SMITH S J, LADHA Z, et al. Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109:1049-1055.
- [5] JORNAYVAZ F R, BIRKENFELD A L, JURCZAK M J, et al. Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108:5748-5752.
- [6] MONETTI M, LEVIN M C, WATT M J, et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DAGT in the liver [J]. *Cell Metab*, 2007, 6:69-78.
- [7] SAMUEL V T, LIU Z X, WANG A, et al. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117:739-745.
- [8] KUMASHIRO N, ERION D M, ZHANG D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *PNAS*, 2011, 108: 16381 - 16385.
- [9] 柳涛, 杨丽丽, 张莉, 等. 不同治法复方防治非酒精性单纯性脂肪肝的效应差异[J]. *中西医结合学报*, 2012, 10(10):1120-1126.

(上接第 86 页)

参考文献

- [1] LI C, SUN B Q, GAI X D. Compounds from Chinese herbal medicines as reversal agents for P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumours [J]. *Clin Transl Oncol*, 2014, 16:593-598.
- [2] 洪日, 吴永强, 吴越. 西黄丸辅助治疗中晚期乳腺癌的疗效观察[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6):1120-1123.
- [3] 沈雁鸣. 西黄丸联合西医治疗乳腺癌随机平行对照研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(3):127-128.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社. 2 版, 2006:117-120.
- [5] 孙华, 刘耕陶. 五味子果仁醇提取物含药血清逆转肿瘤多药耐药及抑制耐药糖蛋白(P-gp)的作用[J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(12):1130-1135.
- [6] 陈宁, 宋冬雪, 凌娜, 等. 中药血清药理学方法的研究进展[J]. *北京联合大学学报*, 2014, 28(1):40-43.
- [7] SU S, CHENG X, WINK M. Natural lignans from *Arctium lappa* modulate P-glycoprotein efflux function in multidrug resistant cancer cells[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22:301-307.