

复方藤梨根制剂体外对 MDR 细胞株 K562/ ADR 和 K562/ VCR 细胞积聚和外排阿霉素 (ADR) 的影响研究

郭 勇 谢长生 冯正权(杭州 310006 浙江中医学院附属医院)

摘要 目的:探讨复方藤梨根制剂(FFTLG)对肿瘤化疗增敏的作用机理。方法:以 MTT 法观察 FFTLG 对 MDR 细胞的逆转作用,以 FCM 技术测定 FFTLG 作用 MDR 细胞后对阿霉素的积聚和外排影响。结果:10 mg/ml 和 20 mg/ml 的 FFTLG 对 K562/ ADR 的逆转倍数是 7.53 和 10.31 倍($P < 0.05$);20 mg/ml 的 FFTLG 对 K562/ VCR 的逆转倍数是 6.18 倍;10 mg/ml 和 20 mg/ml 的 FFTLG 可增加 K562/ ADR 和 K562/ VCR 细胞内 ADR 的积聚分别是 77.6%、80.1%和 50.9%、45.2%,且可减少 ADR 的外排。结论:FFTLG 通过增加 MDR 细胞内的 ADR 积聚及减少外排机制而实现对化疗的增敏作用。
关键词 多药耐药;复方中药;作用机制

The study of effects on accumulation and efflux of intracellular adriamycin with FFTLG for multidrug resistant cell lines K562/ ADR and K562/ VCR in vitro

Guo Yong, Xie Changshang, Feng Zhengquan (*The attach hospital of zhejiang college of TCM, Hangzhou 310006*)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the mechanism of enhance sensitivity for chemotherapy of cancer with FFTLG. **METHOD:** Using tetrazolium dye assay, reversal effect of FFTLG on multidrug resistant cell lines K562/ ADR and K562/ VCR. The accumulation and efflux of intracellular adriamycin were assayed by FCM. **RESULTS:** The reversal times of 10 mg/ml and 20 mg/ml FFTLG were 7.53 and 10.31 in K562/ ADR ($P < 0.05$), respectively; that of 20 mg/ml is 6.18 in K562/ VCR. The accumulation

国家中医药管理局课题(编号:95C015),获浙江省中医药科技进步二等奖

of intracellular ADR in 10 mg/ml and 20 mg/ml FFTLG were 77.6%, 80.1% and 50.9%, 45.2% for K562/ADR and K562/VCR, respectively. The efflux of ADR were reduced. **CONCLUSION:** The mechanism of enhancing the sensitivity of FFTLG for the motherapy of cancer is to increase accumulation and decrease efflux of intracellular ADR in MDR cells.

KEY WORDS multidrug resistance, compound Chinese medicine, mechanism

肿瘤细胞的多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象长期以来是肿瘤化疗过程中的一个棘手问题,是恶性肿瘤治疗中的一大障碍。复方藤梨根制剂(FFTLG)为复方中药制剂,我们前期临床发现它对部分恶性肿瘤的化疗有一定的增敏作用,但其增敏作用机制尚不清楚,为此我们进行研究,主要观察该制剂对耐药细胞积聚和外排阿霉素(ADR)的影响程度,结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 K562:人红白血病细胞株(敏感株),由浙江大学肿瘤研究所提供;K562/ADR:由K562细胞株经ADR抗药诱导得到,由浙江大学肿瘤研究所提供;K562/VCR:由K562细胞株经VCR抗药诱导得到,由浙江大学肿瘤研究所提供。

1.1.2 药物:速溶性阿霉素(Adriamycin, ADR):意大利FARMITALIA CARLO ERBA公司产品;硫酸长春新碱(Vincristine, VCR):杭州民生药厂产品;维拉帕米(Verapamil, VER):江苏盐城新曹制药厂产品;复方藤梨根制剂(FFTLG):由浙江中医学院制剂室提供。

1.1.3 主要试剂:RPMI-1640培养基:GIBCOBRL公司产品;小牛血清:上海华美生物工程公司产品;四氮甲基唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-Htetrazolium bromide, MTT]:Sigma产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器设备:二氧化碳孵箱:BB16型,上海Heracus公司产品;倒置显微镜:Olympus PH-2型,日本OLYMPUS公司产品;比色计:VICTOR 1420 MULTILABEL COUNTER,芬兰WALLAC公司产品;流式细胞仪:FACScan,美国BECTON DICKINSON公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:细胞K562、K562/ADR、K562/VCR常规培养于RPMI-1640完全培养液中(含15%小牛血清,青霉素100^u/ml,链霉素100^u/ml)。

1.2.2 细胞抗药性试验-MTT法^[1]取对数生长期细胞接种于96孔培养板内,每孔 1×10^4 (100ul/孔),分别加入抗癌药

或FFTLG、VER(100ul/孔),置于二氧化碳孵箱中,37℃,培养72h后,每孔加入1mg/ml的MTT 50ul,再5%CO₂,37℃置6h,平板离心机2000rpm离心,倾去上清液,每孔加入二甲亚砜100ul,微量振荡器振荡,待蓝色结晶完全溶解后,用VICTOR 1420 MULTILABEL COUNTER比色计570nm波长处比色,求出半数抑制浓度IC₅₀及抗药倍数(Resistant Factor, RF)。 $RF = IC_{50}(\text{抗药细胞株}) / (敏感细胞株)$ 。

1.2.3 细胞抗药性逆转试验方法与细胞抗药性试验相同,只是在加入抗癌药物前15min分别加入VER(6ug/ml或3ug/ml)、FFTLG 2.5-20mg/ml,分别计算逆转倍数(Reversal Index, RI) $[RI = IC_{50}(\text{逆转剂}) / IC_{50}(\text{阴性对照})]$,实验重复3次。

1.2.4 细胞内药物的积聚^[2]将 1×10^6 /ml细胞与ADR(10ug/ml),37℃,摇床温育120min,以PBS洗2次,收集细胞,配成 1×10^6 /ml细胞悬液,用FACScan流式细胞仪(FCM)测定细胞内ADR荧光强度,以其荧光强度任意单位表示相对细胞内ADR浓度,实验重复三次。

1.2.5 FFTLG对细胞内药物积聚的影响实验步骤与测定细胞内药物的积聚试验基本相同,只是在加入ADR前15min,加入各种浓度的逆转剂。

1.2.6 FFTLG对细胞内药物外排的影响将 1×10^6 /ml细胞与ADR(10ul/ml),37℃,摇床温育120min,用PBS洗2次,加入FFTLG后,分别在0min、15min、30min、60min、90min时点,用FCM测定细胞内ADR荧光强度,方法同上。

1.2.7 统计学处理:均数比较用t检验。

2 结果

2.1 K562/ADR及K562/VCR细胞株的耐药特性

表1.示K562/ADR和K562/VCR耐药株对蒽环类(ADR)和植物碱类(VCR)2种主要MDR药物的抗药性,以及FFTLG的细胞毒性,其中VCR的抗药性很强,两株耐药细胞的IC₅₀均大于50ug/ml,耐药倍数(Resistant Factor, RF)大于8197倍。对ADR的抗药性,K562/ADR耐药株为90.34倍,K562/VCR耐药株为42.24倍。而FFTLG对三株细胞的IC₅₀均约在40mg/ml左右(生药浓度),无耐药性。

表1 K562/ADR及K562/VCR耐药株的抗药性

细胞株	IC ₅₀			RI(倍数)		
	+ ADR(ug/ml)	+ VCR(ug/ml)	+ FFTLG(ug/ml)	+ ADR	+ VCR	+ FFTLG
K562	0.058 ± 0.014	0.0061 ± 0.0001	43.92 ± 4.92	-	-	-
K562/ADR	5.24 ± 0.070	>50	41.10 ± 1.73	90.34	>8197	-
K562/VCR	2.45 ± 0.99	>50	42.91 ± 2.43	42.24	>8197	-

RF = IC₅₀(耐药株)/IC₅₀(敏感株)

表 2 FFTLG 对 K562 细胞株的逆转作用

浓度 (mg/ml)	IC ₅₀ (ug/ml)		RI(倍数)	
	+ ADR	+ VCR	+ ADR	+ VCR
0	0.058 ± 0.014	0.0061 ± 0.0001	1.0	1.0
2.5	0.047 ± 0.008 ^Δ	0.0061 ± 0.0006 ^Δ	1.23	1.0
5.0	0.047 ± 0.003 ^Δ	0.0059 ± 0.0006 ^Δ	1.23	1.03
10.0	0.045 ± 0.001 ^Δ	0.0060 ± 0.0006 ^Δ	1.29	1.02
20.0	0.049 ± 0.006 ^Δ	0.0059 ± 0.0005 ^Δ	1.18	1.03
VER 3ug/ml	0.050 ± 0.018 ^Δ	0.0059 ± 0.0002 ^Δ	1.16	1.03
VER 6ug/ml	0.056 ± 0.005 ^Δ	0.0053 ± 0.0004 ^Δ	1.04	1.15

^Δ P>0.05

RI = IC₅₀(逆转剂) / IC₅₀(阴性对照)

2.2 FFTLG 和 VER 对 K562 细胞株的影响

表 2 中不同浓度的 FFTLG:0.2.5.5.10.20(mg/ml) 及 VER:3.6(ug/ml) 浓度对敏感株 K562 的 ADR 和 VCR 毒性作用的影响不明显,与 0 孔比较,无统计学意义(P>0.05)。

2.3 FFTLG 和 VER 对耐药细胞 K562/ADR 的逆转作用

表 3 所示,低浓度(2.5 及 5 mg/ml)的 FFTLG 对 K562/ADR 耐药株的逆转作用不明显(P>0.05),而在 10 mg/ml、20 mg/ml 浓度时,对 K562/ADR 耐药株的 ADR 抗药性有明显的逆转作用,其 IC₅₀ 分别为 0.74ug/ml 和 0.54ug/ml,逆转倍数(RI)分别在 7.53 倍和 10.31 倍,与阴性对照(0 孔)比较,差异显著(P<0.05),而阳性对照,VER 3ug/ml、6ug/ml 浓度也显示了相似的逆转作用,但 FFTLG 和 VER 对 VCR 抗药性均无明显逆转作用,其半数抑制浓度均 IC₅₀>50ug/ml。

2.4 FFTLG 和 VER 对 K562/VCR 耐药株的逆转效果

表 4 示 FFTLG 在 10 mg/ml、20 mg/ml 浓度时对 K562/VCR 耐药株的 ADR 抗药性有不同程度的逆转作用,其逆转倍数分别达 1.88 倍和 6.18 倍,其中 20 mg/ml 浓度时逆转作用明显,与阴性对照组比较,具有统计学意义(P<0.05),在低浓度(2.5.5 mg/ml)时均无逆转效果,而阳性对照组 VER 在 3ug/ml 和 6ug/ml 浓度均对 ADR 抗药性有明显的逆转作用(P<0.05),尤其在 6ug/ml 浓度时,逆转倍数达 27.80 倍,具有很好的逆转效果。但它们对 VCR 抗药性除 VER 在 6ug/ml 时有 >4.24 倍的逆转倍数外,其它均无明显逆转作用,其 IC₅₀均大于 50ug/ml。

2.5 FFTLG 对细胞内药物积聚的影响

表 5 反映了 3 株细胞在加入 FFTLG 10 mg/ml、20 mg/ml 及阳性对照 VER 6ug/ml 后测定的细胞内 ADR 荧光强度,10 mg/ml、20 mg/ml 组对 K562 细胞内 ADR 的积聚无明

显改变(P>0.05),而对 K562/ADR 及 K562/VCR 耐药株摄取 ADR 的能力有明显的增加(P<0.05),而且 6ug/ml 的维拉帕米对 K562/ADR 及 K562/VCR 耐药株积聚 ADR 的增强作用更加明显(P<0.05)。该结果与 MTT 法测定的逆转效果和对 ADR 的耐药情况基本相符,即 K562 及 K562/VCR、K562/ADR 细胞内积聚 ADR 的能力与其对 ADR 的耐药性相一致。

2.6 FFTLG 对 K562、K562/ADR、K562/VCR 细胞外排 ADR 的影响

表 3 FFTLG 对 K562/ADR 耐药株的逆转作用

浓度 (mg/ml)	IC ₅₀ (ug/ml)		RI(倍数)	
	+ ADR	+ VCR	+ ADR	+ VCR
0	5.57 ± 0.24	>50	1.0	-
2.5	4.84 ± 0.22	>50	1.15	-
5.0	5.19 ± 1.65	>50	1.07	-
10.0	0.74 ± 0.08*	>50	7.53	-
20.0	0.54 ± 0.06*	>50	10.31	-
3ug/ml	0.69 ± 0.28*	>50	8.07	-
6ug/ml	0.46 ± 0.13*	>50	12.11	-

P>0.05

表 4 FFTLG 对 K562/VCR 耐药株的逆转作用

浓度 (mg/ml)	IC ₅₀ (ug/ml)		RI(倍数)	
	+ ADR	+ VCR	+ ADR	+ VCR
0	2.78 ± 0.90	>50	1.0	-
2.5	3.17 ± 1.01	>50	-	-
5.0	2.90 ± 0.18	>50	-	-
10.0	1.48 ± 0.86	>50	1.88	-
20.0	0.45 ± 0.20*	>50	6.18	-
3ug/ml	0.26 ± 0.28*	>50	10.69	-
6ug/ml	0.10 ± 0.07*	>50	27.80	>4.24

* P<0.05

表 5 FFTLG 对细胞内 ADR 积聚的影响

浓度 (mg/ml)	细胞内 ADR 浓度(相对荧光强度)			细胞内 ADR 的积聚(%)	
	K562	K562/ADR	K562/VCR	K562/ADR	K562/VCR
0	191.97 ± 28.33	86.34 ± 24.94	105.79 ± 6.77	-	-
10	199.16 ± 18.98	153.30 ± 17.13 [Ⓢ]	159.61 ± 11.69 [Ⓢ]	77.6	50.9
20	171.24 ± 22.64	155.53 ± 6.32 [Ⓢ]	153.63 ± 9.19 [Ⓢ]	80.1	45.2
VER	229.88 ± 13.82	192.67 ± 7.21 [Ⓢ]	213.70 ± 24.54 [Ⓢ]	123.2	102.0

P<0.05

表 6 FFTLG 对 K562 细胞外排 ADR 的影响

时 间	空白组	+ FFTLG1 (10 mg/ ml)	+ FFTLG2 (20 mg/ ml)	+ VER (6ug/ ml)
0	244.47 ± 1.92	252.43 ± 44.47	237.56 ± 34.29	242.64 ± 28.02
15'	244.25 ± 2.23	249.25 ± 45.37	226.48 ± 18.10	241.34 ± 15.37
30'	237.04 ± 6.22	241.02 ± 42.95	228.69 ± 30.55	230.24 ± 27.19
60'	231.59 ± 7.85	234.97 ± 41.29	229.75 ± 30.19	229.75 ± 30.19
90'	217.36 ± 0.88	222.04 ± 27.44 [#]	223.56 ± 30.44 [#]	223.56 ± 30.44 [#]
残留	88.9 %	89.00 %	89.85 %	92.14 %

[#] P > 0.05 与空白组对照,下同

表 7 FFTLG 对 K562/ ADR 细胞外排 ADR 的影响

时 间	空白组	+ FFTLG1 (10 mg/ ml)	+ FFTLG2 (20 mg/ ml)	+ VER (6ug/ ml)
0	63.98 ± 1.22	64.48 ± 2.62	74.82 ± 4.42	68.52 ± 0.66
15'	61.87 ± 2.29	64.13 ± 1.85	77.18 ± 6.21	67.18 ± 0.83
30'	56.99 ± 6.22	61.46 ± 0.49	70.94 ± 7.66	64.94 ± 1.39
60'	54.37 ± 1.34	58.69 ± 0.79	69.26 ± 5.28	63.86 ± 2.59
90'	50.68 ± 1.51	60.01 ± 0.83 ^{**}	69.07 ± 5.69 ^{**}	63.24 ± 2.60 ^{**}
残留	79.20 %	93.10 %	92.30 %	92.30 %

^{**} P < 0.01

表 8 FFTLG 对 K562/ VCR 细胞外排 ADR 的影响

时 间	空白组	+ FFTLG1 (10 mg/ ml)	+ FFTLG2 (20 mg/ ml)	+ VER (6ug/ ml)
0	103.66 ± 6.75	107.86 ± 5.93	105.06 ± 6.15	109.89 ± 5.61
15'	100.48 ± 8.46	104.35 ± 4.87	108.26 ± 2.49	106.74 ± 7.38
30'	94.09 ± 5.87	97.46 ± 3.83	98.09 ± 4.72	101.00 ± 7.99
60'	88.97 ± 6.92	93.10 ± 6.97	94.46 ± 7.77	97.86 ± 9.27
90'	81.39 ± 0.70	91.34 ± 9.48 [#]	91.34 ± 7.80 [*]	96.15 ± 11.4 [*]
残留	78.50 %	82.20 %	86.90 %	87.50 %

^{*} P < 0.05

表 6、7、8 示 FFTLG 及阳性对照 VER 对 K562 细胞外排 ADR 的影响很小,对 K562/ ADR 和 K562/ VCR 细胞外排 ADR 具有不同程度的影响,且对 K562/ ADR 的影响较 K562/ VCR 细胞略大。在 0 mg/ ml、10 mg/ ml、20 mg/ ml 浓度的 FFTLG 和 6ug/ ml VER 的影响下,K562/ ADR 细胞外排 90 min,细胞内残留的阿霉素(以相对荧光强度表示)分别为 79.20%、93.10%、92.30%和 92.30%(P < 0.05),而在 K562/ VCR 细胞则分别残留 78.50%、82.20%、86.90%和 87.50%(P > 0.05)。

3 讨论

化疗是恶性肿瘤的主要治疗手段之一,但多药耐药性(MDR)的产生往往是导致化疗失败的重要原因,引起 MDR 的机理比较复杂,但 mdr1 基因及其产物 Pgp 的过度表达是其主要原因之一^[6,7]。

Pgp 是一种跨膜糖蛋白,属于 ATPase 蛋白超家族成员,可降低细胞毒药物在细胞内的积聚和滞留,而使肿瘤细胞获得多药抗药性^[8],自 Tsuruo 等(1981 年)首次报导 verapamil 能逆转肿瘤细胞的耐药以来,已发现许多药物在体外具有逆转 MDR 作用,但目前真正能较好应用于临床的逆转剂尚不多见。

中医药治疗恶性肿瘤具有悠久的历史,特别是在肿瘤的综合治疗中的作用日渐引起了人们的兴趣。临床广泛应用的复方中药对化疗增敏、减毒作用机制一直不清。本文研究的复方藤梨根制剂(藤梨根、水杨霉根、虎杖根、党参、白术

等)是作者的经验方,长期的临床实践,发现它对恶性肿瘤的化疗有增敏作用,为探索其机制,本文研究了 FFTLG 在体外 MDR 细胞对化疗药物的增敏作用,证明具有一定的逆转 MDR 作用。

K562/ ADR 和 K562/ VCR 耐药细胞株具有较好的 MDR 特性,取半数抑制浓度(IC₅₀)以下的 FFTLG 4 个浓度组,观察其对耐药细胞抗药性的逆转程度,并以 VER 作为阳性对照。实验结果显示 10 mg/ ml、20 mg/ ml FFTLG 可部分逆转 K562/ ADR 耐药细胞对 ADR 的抗药性,逆转倍数(RI)分别为 7.08 倍、10.01 倍,与维拉帕米相似;而对耐药细胞 K562/ VCR 抗药性,仅 20 mg/ ml 浓度具有一定的逆转作用,RI 为 6.18 倍(P < 0.05),由于 2 株细胞 VCR 均表现很高的耐药性(均 IC₅₀ > 50ug/ ml),FFTLG 对该细胞株的 VCR 抗性无明显逆转作用,与 VER 作用相似。

阿霉素具有自发荧光特性^[3,4,9,10],流式细胞仪可直观检测阿霉素相对含量,且灵敏、准确、能定量。本实验用该技术,直接测定细胞内阿霉素(ADR)的荧光强度,以了解 FFTLG 对 K562 及其耐药株积聚和外排 ADR 的影响。实验数据显示其耐药性为:K562/ ADR > K562/ VCR > K562(荧光强度之比为 86.34:105.79:191.97),加用 FFTLG 后可明显增加耐药细胞内 ADR 的积聚,具有逆转 MDR 作用。FFTLG 对耐药细胞外排 ADR 的影响,以对 K562/ ADR 耐药株作用明显(P < 0.01),可减缓 K562/ ADR 和 K562/ VCR (20 mg/ ml 组 P < 0.05)细胞外排加 ADR,但对 K562 细胞外

排 ADR 则无明显影响($P > 0.05$)。

由于 MDR 机理复杂,MDR 细胞 K562/ADR 和 K562/VCR 除 P-gp 介导的机制外,胡汛等^[5]报导尚有其它原因导致 MDR,实验结果也证实了这一点,实验中选用的 K562/ADR、K562/VCR 耐药株在原有抗药性基础上,又经 1 年多抗癌药物的不断冲击,强化繁育,获得的耐药倍数较建株时报导的要高^[5,11,12],但用阳性对照维拉帕米作逆转试验时逆转倍数反而要低^[10],是否提示在与化疗药物的不断接触过程中,发生非 P-gp 耐药机制的机会就增多,并且这与临床上多次化疗后易产生耐药,尤其是治疗后复发的病人,再次化疗效果更差,两者之间,是否具有相关性,有待于进一步研究探索。

综上,复方藤梨根制剂(FFTLG)可增强 MDR 细胞内 ADR 的积聚,减少 ADR 的外排,部分逆转 K562/ADR 和 K562/VCR 耐药株的多药抗药性是对化疗增敏的机制之一,该生物学事件可能与抑制 mdrl 基因功能有关(即对 mdrl 基因转录、表达的影响)。(另文报告)

参考文献

- 1 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method.* 1983;65:55.
- 2 胡汛,陈万源,郑树. K562r 细胞对阿霉素的摄取、外排及阿霉素在细胞内的分布. *中国癌症研究进展*. 昆明:云南科技出版

社,1994:201.

- 3 刘超,黄一微,谢彦晖,等. K562/Adm 多药耐药细胞株生物学特征的进一步研究. *癌症*,1995;14:415.
- 4 郑国强,韩复生,刘叙仪,等. 流式细胞分析在阿霉素耐药性研究中重要作用. *中华医学检验学杂志*,1997;20,17. 5 胡汛,潘锦荣,郑树. P-糖蛋白的过度表达不能完全解释 MDR 细胞株 K562/DOX 的抗癌性. *中华肿瘤杂志*,1995;17:85.
- 6 Biedler JL. Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer* 1992;70 suppl,1799-1809.
- 7 Goldstein LJ. Clinical reversal of drug resistance. *Curr Probe Cancer* 1995;19:65.
- 8 Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385.
- 9 Tanaka S, Aizawa K, Katayanagi N, et al. Flowcytometric analysis of early steps in development of adriamycin resistance in a human gastric cancer cell line. *Jan J Cancer Res.* 1994;85:86.
- 10 Mechetner EB, Roninson IB. Efficient inhibition of P-glycoprotein mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:5824.
- 11 曹江,胡汛,潘锦荣,等. MDRI 反义 RNA 表达质粒的构建及在 MDR 细胞抗药机理研究中的应用. *中华医学杂志*. 1995;9:557.
- 12 胡汛,陈万源,郑树,等. 多药耐药性细胞株 K562 的流式细胞仪分析. *中国癌症杂志*. 1993;3:41.