

板蓝根高级不饱和脂肪酸对耐药肝癌细胞株 BEL-7404/ ADM 逆转作用实验

侯华新 黎丹戎¹ 韦长元¹ 秦 箫 姜 颢² 唐东平¹ (南宁 530021 广西医科大学化学教研室;¹ 广西肿瘤防治研究所;² 广西医科大学 98 级研究生)

摘要 目的:板蓝根高级不饱和脂肪酸对肝癌耐药细胞株 BEL-7404/ ADM 耐药逆转作用及机制研究。方法:MTT 法观察药物对细胞的生长抑制作用;免疫组化法检测细胞 P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药相关蛋白(MRP)的表达;采用高效液相色谱法(HPLC)测定细胞内 ADM 的浓度。结果:耐药肝癌细胞株 BEL-7404/ ADM 对多种化疗药物产生多药耐药性,耐药细胞 P-gp 和 MRP 的阳性率显著高于亲本细胞($P < 0.01$);板蓝根高级不饱和脂肪酸在非细胞毒剂量时与 ADM 合用后能逆转 BEL-7404/ ADM 对 ADM 的耐药性;ADM 与板蓝根高级不饱和脂肪酸合用时,其细胞内 ADM 的含量较单独使用明显增高。结论:肝癌细胞株 BEL-7404/ ADM 对多种化疗药物具有多药耐药性,其多药耐药性与 P-gp 和 MRP 过量表达有关;板蓝根高级不饱和脂肪酸在非细胞毒剂量时能逆转 BEL-7404/ ADM 对 ADM 的耐药性,其逆转作用可能与降低 P-gp 药物外排功能,增加细胞内药物浓度有关。

关键词 肝癌细胞 多药耐药 板蓝根高级不饱和脂肪酸 阿霉素

The reverse roles of unsaturated fatty acids from *Isatis tinctoria* L on human multidrug resistant hepatocellular carcinoma cell BEL-7404/ ADM

Hou Huaxin, Li Danrong, Wei Changyuan *et al* (Guangxi Medical University Nanning 530021)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the reverse roles and mechanisms of the unsaturated fatty acids from *Isatis tinctoria* L on human multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell BEL-7404/ ADM. **METHOD:** BEL-7404/ ADM sensitivity to multianticancer agent was evaluated by MTT assay. The expressions of P-gp and MRP were detected by immunohistochemical method. The content of ADM in cells was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **RESULTS:** the human multidrug-resistant hepatocarcinoma cell line BEL-7404/ ADM showed the drug resistance to ADM, MMC and hydroxycamptothecin. The expressions of P-gp and MRP in BEL-7404/ ADM were significantly higher than those in BEL-7404 ($P < 0.01$). The unsaturated fatty acids from *Isatis tinctoria* L in noncytotoxic concentration had reverse role to ADM for BEL-7404/ ADM cells. When ADM coupled with the unsaturated fatty acids, the ADM accumulation in cells increased significantly. ($P < 0.01$) **CONCLUSION:** BEL-7404/ ADM cells is a multidrug resistant model, which multidrug resistance is related with over-expression of P-gp and MRP. The unsaturated fatty acids from *Isatis tinctoria* L can reverse the resistance of BEL-7404/ ADM, and the reverse role may be related with the increase of anticancer agents content in cells.

KEY WORDS Hepatocarcinoma cell Unsaturated fatty acids from *Isatis tinctoria* L Multidrug resistant Adriamycin

肝癌在我国是一种常见的恶性肿瘤,其治疗方法主要有手术、化疗及生物治疗。目前对多数中晚期患者主要采用局部灌注化疗,但总的来说疗效不理想,其中重要原因之一是肝癌患者对化疗产生抗药性。因此寻找一种理想的耐药逆转剂成为提高疗效的关键。目前,国内外对逆转剂的研究主要为无心血管毒副作用的钙通道阻滞剂和参照逆转剂性质及分子结构特点,从天然药物中筛选活性物质^[1]。本研究从

板蓝根中,提取出具有脂溶性和水溶性结构的高级不饱和脂肪酸,对其逆转机制和作用作了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 人肝癌亲本细胞 购自上海肿瘤研究所,耐药细胞株 BEL-7404/ ADM 购自广州中山医科大学,由广西肿瘤防治研究所传代保存。盐酸阿霉素(ADM)、丝裂霉素(MMC)为浙江海正药业股份有限公司产品;环磷酰胺(CTX)为山西泰盛

本课题为:中国-丹麦科技合作协议 Danida 资助项目(AM9:3);广西科技厅(桂科攻 9919040)资助课题;广西教育厅科研资助项目,桂 1999[383]-5。

制药有限公司产品;5-FU为天津氨基酸公司人民制药厂产品;顺铂(DDP)为山东制药厂产品;羟基喜树碱(HCPT)为武汉黄石飞云制药有限公司;异博定(VRP)为江苏兴化制药厂产品。高级不饱和脂肪酸为本课题组成员在丹麦工作期间分离得到,经核磁共振分析:它是一组3个高级不饱和脂肪酸,每个高级不饱和脂肪酸含有约20个碳原子,1~3个烯键。其在薄层色谱中(展开剂为1:1乙酸乙酯-石油醚)呈单一斑点, R_f 值0.58^[2]。该产品难溶于水,用5%的乙醇溶液配制不同的工作浓度。

1.2 小鼠抗人 P_{gp} 、多药耐药相关蛋白(MRP)及即用型SABC试剂盒均购于武汉博士得生物工程有限公司。

1.3 MTT 法检测细胞的抗药性^[3]

分别取对数生长期的亲本细胞和耐药细胞,胰酶消化混悬均匀,调整细胞浓度为 1×10^4 / ml,加入96孔板,每孔100 μ l,37℃ 5%CO₂ 培养箱培养过夜,分别加入含不同浓度的各种化疗药物、板蓝根高级不饱和脂肪酸的培养液,各实验组设3个平行孔,空白对照为5%的乙醇溶液。继续培养48h后,每孔加入2mg/ml MTT10 μ l,再孵育4h。弃上清,加入100 μ l二甲基亚砜,振荡,在490nm处测定其吸光值,按下式计算抑制率。

抑制率(%) = $\frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100$

以药物浓度对数为横轴,抑制率为纵轴绘制浓度效应曲线,确定半数抑制浓度(IC₅₀)。按下式计算耐药指数:

耐药指数 RI = $\frac{\text{耐药细胞 IC}_{50}}{\text{亲本细胞 IC}_{50}}$

1.4 免疫组织化学测定细胞MDR、 P_{gp} 的表达

将亲本细胞和耐药细胞消化混悬均匀,调整细胞浓度为 1×10^6 / ml,每片滴加细胞悬液0.5ml,固定。按MDR、 P_{gp} 试剂盒步骤进行测定。

1.5 HPLC 法测定细胞内 ADM 的含量^[4]

实验分为3组:①组耐药细胞加入终浓度为5 μ g/ml ADM;②组耐药细胞加入终浓度为5 μ g/ml ADM和5 μ g/ml VRP(异博定);③组耐药细胞加入终浓度为5 μ g/ml ADM及100 μ g/ml 高级不饱和脂肪酸(为无细胞毒作用浓度)。将耐药细胞接种于25ml培养瓶中,24h后,按上述分组加入药物,37℃ 5%CO₂ 培养箱培养2h后,撤药。各组细胞经蒸馏水洗涤3次后,加入500 μ l H₂O, -20℃反复冻融3~5次,置镜下观察无完整细胞,16000转/min离心15min,上清液用HPLC仪测定ADM的含量。

1.6 实验结果采用方差分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 板蓝根高级不饱和脂肪酸对 BEL-7404 和 BEL-7404/ADM 细胞的抑制作用

如表1所示,板蓝根高级不饱和脂肪酸对细胞的抑制作用呈浓度依赖性,且亲本细胞对板蓝根高级不饱和脂肪酸略为敏感。虽然板蓝根高级不饱和脂肪酸对BEL-7404细胞和BEL-7404/ADM细胞有一定的抑制作用,但其抑制率低于常用化疗药物。

2.2 BEL-7404 和 BEL-7404/ADM 细胞的药物敏感性

将亲代细胞和耐药细胞分别与不同浓度的ADM、MMC、HCPT、5-FU、CTX、DDP作用48h,测出其耐药倍数。发现BEL-7404/ADM细胞表现多药耐药性。对ADM、MMC、HCPT有明显抗药性,耐药倍数分别为100.03、41.42、90.65;对5-FU、CTX、DDP抗药性不明显,耐药倍数分别为9.41、1.50、8.09。

表1 板蓝根高级不饱和脂肪酸对肝癌耐药细胞与亲本细胞抑制作用

细胞	板蓝根高级不饱和脂肪酸(μ g/ml) ($n=3$)				
	31.3	62.5	125	500	1000
亲本细胞抑制率(%)	8.61	12.8	26.4	40.2	81.7
耐药细胞抑制率(%)	6.5	10	15	35.6	78.6

表2 BEL-7404 和 BEL-7404/ADM 细胞的抗药性($n=3$)

药物	IC ₅₀ (μ g/ml)		耐药倍数
	BEL-7404/ADM	BEL-7404	
ADM	5.06 $\pm$ 0.015	0.05 $\pm$ 0.002	100.03
MMC	30.24 $\pm$ 0.008	0.73 $\pm$ 0.005	41.42
HCPT	74.33 $\pm$ 0.043	0.82 $\pm$ 0.054	90.65
5-FU	16.27 $\pm$ 0.017	1.73 $\pm$ 0.011	9.41
CTX	0.03 $\pm$ 0.002	0.02 $\pm$ 0.001	1.50
DDP	7.98 $\pm$ 0.015	0.98 $\pm$ 0.015	8.09

2.3 BEL-7404 和 BEL-7404/ADM 细胞 MRP、 P_{gp} 表达

由表3可见BEL-7404/ADM的 P_{gp} 阳性染色率为68.8%,BEL-7404的阳性染色率为3.4%,两者有显著差异($P < 0.01$)。同时BEL-7404/ADM的MRP阳性染色率为53%,BEL-7404的MRP阳性染色率为2%,两者有显著差异($P < 0.01$)。MRP、 P_{gp} 均表现为膜上和胞浆染色。

表3 P_{gp} 、MRP在 BEL-7404 和 BEL-7404/ADM 细胞中的表达($n=3$)

细胞类型	细胞染色阳性率	
	P_{gp}	MRP
BEL-7404	3.40 $\pm$ 0.03	2.00 $\pm$ 0.04
BEL-7404/ADM	68.79 $\pm$ 3.35	53.5 $\pm$ 4.02
P	< 0.01	< 0.01

2.4 细胞内阿霉素的含量

经ADM及无细胞毒性浓度的板蓝根高级不饱和脂肪酸联合作用的BEL-7404/ADM细胞内ADM含量较单独ADM作用时明显增加($P < 0.01$),并与ADM及异博定联合作用时BEL-7404/ADM细胞内ADM含量相近。结果见表4。

表4 细胞内阿霉素 ADM 含量($n=3$)

作用药物	细胞内 ADM 含量(ng)	P 值
ADM	0.39 $\pm$ 0.02	
VRP + ADM	1.32 $\pm$ 0.03	0.01
不饱和脂肪酸 + ADM	1.28 $\pm$ 0.04	0.01

3 讨论

肝癌化学治疗最大障碍之一是肿瘤细胞对药物的耐受性。且大多数肿瘤细胞在接触一种抗癌药物产生耐药的同时,也对其他结构和作用机理不同的药物产生交叉耐药,称之为多药耐药性(MDR)。肿瘤细胞耐药的原因是复杂的,但

其 MDR 基因过度表达产生的 P_{gp} 是最主要的原因。 P_{gp} 是一种能量依赖性药物转出泵,可使化疗药物从癌细胞内泵出细胞外,从而使药物在细胞内积蓄浓度下降,药物对细胞毒性降低,导致化疗失败^[5]。目前,在临床上使用的异博定能增加细胞内药物的积累而逆转细胞 MDR^[6],但严重的心血管毒副作用使其在病人身上很难达到有效的血药浓度,因此寻找低毒、有效 MDR 逆转剂是肝癌化疗中急需解决的问题。

本研究表明 BEL-7404/ADM 细胞均过度表达 MRP 和 P_{gp} ,除了对 ADM 产生耐药外,对 MMC、HCPT、5-FU 产生交叉耐药,BEL-7404/ADM 细胞具有典型 MDR 细胞特征。采用无细胞毒性浓度的板蓝根高级不饱和脂肪酸能使 BEL-7404/ADM 细胞内 ADM 的积累增加 3 倍,与异博定的效果相当,提示板蓝根高级不饱和脂肪酸能特异性阻断 P_{gp} 的药物外排机制,使 MDR 细胞内药物积累增加,药物浓度增加而逆转 MDR。

已有实验证明,逆转 MDR 的化合物必须具有亲脂性或既有具有亲脂性又具有水溶性结构^[7]。MDR 泵能从细胞内泵出多种脂溶性物质。同时 MDR 泵也能被多种亲脂性物质所竞争性抑制。而本实验所采用的板蓝根高级不饱和脂肪酸完全符合逆转 P_{gp} 介导的多药耐药性化合物的理化特征。其逆转机制可能是与化疗药物竞争 P_{gp} 上的结合位

点,从而降低化疗药物的外流,增加细胞内化疗药物的积累。使耐药细胞恢复对化疗药物的敏感性。板蓝根高级不饱和脂肪酸与化疗药物联合应用为提高肝癌的化疗效果展示了广阔的应用前景。

参考文献

- 1 夏薇,敖忠芳,朱广荣.一种有效的肿瘤耐药逆转剂 - 汉防己甲素逆转白血病耐药的实验研究.南京医科大学学报,1995,15(3):543.
- 2 秦箐,贺海平,Soren BC,等.中药板蓝根中高级不饱和脂肪酸的分离鉴定及免疫活性成分的研究.中国现代医学杂志,2001;11(1):15.
- 3 温汉平,王小宁,孙华蕴.肿瘤细胞体外药敏试验 MTT 分析法.中华肿瘤杂志,1993,15(6):470.
- 4 唐东平,黎丹戎,李力等.HPLC 测定细胞中阿霉素及其在筛选耐药逆转剂中的应用.肿瘤防治研究,1998;25(1):27.
- 5 王宝成,郭军,狄剑实,等.肝癌多药耐药细胞株建立及其多药耐药机理研究.肿瘤防治研究,1997,24(5):263.
- 6 符立梧,潘启超.逆转 P -糖蛋白介导的多药耐药化合物的理化特性.癌症,1996,15(6):475.
- 7 Ramu A, Glaubiger D, Weintraub H. Differences in lipid composition of Doxorubicin-sensitive and resistant P388 cell. Cancer Treat Rep, 1984, 68:637.