

- [3] 薛惟建, 杜小英, 李德华. 东北贯众素的抗肿瘤作用及对 DNA 的损伤效应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1988, 2(2): 150-151.
- [4] SU Y T, CHANG H L, SHYUE S K, et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(2): 229-241.
- [5] 陈海霞, 刘明华, 李茂, 等. 皂角刺总黄酮粗提物与纯化物体外抗肿瘤活性研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 101-102.
- [6] ZHOU D N, RUAN J L, CAI Y L, et al. Three new polyphenols from the rhizomes of *Arachniodes exilis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(5/6): 559-563.
- [7] REN W Y, QIAO Z H, WANG H W, et al. Flavonoids: promising anticancer agents [J]. *Med Res Rev*, 2003, 23(4): 519-534.
- [8] ZHU P P, LI N N, LIANG J, et al. Progress in study on composition and bioactivities of flavonoids [J]. *Bev Ind(饮料工业)*, 2012, 15(3): 13-15.

收稿日期: 2014-11-05

miR-363 对顺铂耐药乳腺癌细胞的作用及机制

吕晓皓, 王蓓*, 陈建彬, 叶荆(浙江中医药大学附属第一医院乳腺病中心, 杭州 310006)

摘要: 目的 研究 miR-363 对顺铂耐药乳腺癌细胞的作用及机制。方法 采集以顺铂为主要化疗药物的中晚期乳腺癌患者血清, 用定量 PCR 法检测化疗前和化疗后血清标本 miR-363 的表达水平。构建顺铂抵抗 MCF-7 细胞系(MCF-7-R), MTT 法检测不同浓度顺铂对 MCF-7 及 MCF-7-R 细胞活力的影响。在 MCF-7-R 细胞中转染 miR-363, MTT 法检测 miR-363 是否能提高顺铂对 MCF-7-R 的杀伤活性。利用生物信息学、定量 PCR 及 Western blot 方法验证 miR-363 是否调节 MCF-7-R 细胞中 Mcl-1 的表达。构建 Mcl-1 真核表达载体, MTT 法检测 Mcl-1 表达载体转染对 miR-363 联合顺铂治疗 MCF-7-R 疗效的影响。结果 中晚期乳腺癌患者顺铂治疗后血清 miR-363 水平相较化疗前显著下降。MTT 结果表明相同浓度顺铂对 MCF-7-R 的杀伤活性显著低于 MCF-7 细胞, 且 miR-363 转染能显著提高顺铂对 MCF-7-R 的杀伤活性。生物信息学、定量 PCR 及 Western blot 结果表明 miR-363 转染可显著降低 MCF-7-R 细胞中 Mcl-1 的表达。miR-363 联合顺铂在 Mcl-1 表达载体转染后对 MCF-7-R 细胞的杀伤活性显著低于未转染 Mcl-1 表达载体的 miR-363 联合顺铂组。结论 MiR-363 能增强耐顺铂乳腺癌细胞对顺铂杀伤作用的敏感性。

关键词: miR-363; Mcl-1; MCF-7-R; 顺铂

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)09-1041-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.003

Effect and Mechanism of miR-363 on Cisplatin-treated Breast Cancer Cells

LYU Xiaohao, WANG Bei*, CHEN Jianbin, YE Jing(Center of Breast Disease, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the role and mechanism of miR-363 on cisplatin-resistant breast cancer cells. **METHODS** Collected the serum from the advanced breast cancer patients who were treated with cisplatin-based chemotherapy. Then the expression of miR-363 in breast cancer patients' serum was detected before or after chemotherapy using qPCR analysis. Constructed the cisplatin-resistant MCF-7 cell line, the cytotoxicity of cisplatin to MCF-7 cell line and MCF-7-R cell line was measured by MTT assay. Transfected the MCF-7-R cells with miR-363 to determine whether the transfection of miR-363 enhanced cytotoxicity of cisplatin to MCF-7-R cells. Confirmed whether the expression of Mcl-1 was regulated by miR-363 using bioinformatics, qPCR and Western blot. Constructed the Mcl-1 expression vector, and detected the cytotoxicity of cisplatin combining with the cotransfection of miR-363 and Mcl-1 expression vector by MTT assay. **RESULTS** MiR-363 levels were significantly decreased in advanced breast cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy. MiR-363 levels were also lower in MCF-7-R cells than in MCF-7 cells. Exogenous miR-363 significantly overcame cisplatin resistance in MCF-7-R cells, whereas miR-363 knockdown increased the cell viability during cisplatin treatment. It was demonstrated that miR-363 directly

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2010KYA149)

作者简介: 吕晓皓, 女, 博士, 主治医师 Tel: (0571)87070921
Tel: (0571)87070921 E-mail: jhwbei@126.com

E-mail: lxa616@126.com

*通信作者: 王蓓, 女, 主任医师

targeted to Mcl-1, and the downregulation of miR-363 resulted in upregulation of Mcl-1. miR-363 decreased cisplatin resistance of MCF-7-R cells, partly by targeting Mcl-1. **CONCLUSION** Downregulation of miR-363 increases drug resistance in cisplatin-treated MCF-7 by downregulating Mcl-1.

KEY WORDS: miR-363; Mcl-1; MCF-7-R; cisplatin

乳腺癌是危害妇女健康的发病率最高的恶性肿瘤之一, 在女性群体中乳腺癌患者死亡率在所有癌症患者中居于前列^[1]。尽管现在乳腺癌的早期排查和诊断技术有了很大的提高, 但是目前对乳腺癌的治疗手段仍十分局限, 化疗是目前治疗乳腺癌特别是中晚期乳腺癌的主要手段。顺铂是一种治疗包括乳腺癌在内的多种肿瘤的化疗药物, 然而肿瘤细胞对顺铂的耐药性已经成为制约化疗疗效的主要因素^[2]。microRNA 是一组非编码 RNA, 通过与靶基因 mRNA 3'UTR(mRNA 3'非编码区)结合诱导 mRNA 的降解及转录抑制来调节靶基因的表达^[3]。近期的研究发现 microRNA 与肿瘤细胞的化疗药物抵抗有关^[4-5], 然而 microRNA 调节肿瘤耐药的分子机制至今仍不十分清楚。有文献报道 miR-363 的低表达是乳腺癌的特征之一, 乳腺癌细胞通过下调 miR-363 的表达上调多种肿瘤基因的水平^[6]。本研究探讨 microRNA-363(miR-363)是否能提高顺铂对顺铂抵抗乳腺癌细胞的杀伤活性。

1 材料

1.1 患者资料

选取 30 例 2012 年 6 月—2014 年 6 月中晚期乳腺癌患者顺铂治疗前和顺铂治疗 1 个疗程后的血液标本, 患者年龄 44~76 岁(平均年龄 63.5 岁), 标本来自浙江中医药大学附属第一医院, 并取得患者的知情同意。

1.2 细胞培养

MCF-7 细胞购于美国 ATCC, 培养在 DMEM 培养基中, 加入 10%胎牛血清, 培养在 37 °C 恒温箱中, 通过 5%二氧化碳。MCF-7-R 细胞(顺铂抵抗 MCF-7 细胞)的构建方法: 将 MCF-7 细胞首先用 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂培养 3 个月, 之后将顺铂浓度每 3 周提高 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最后将 MCF-7 细胞培养在 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂中, MCF-7-R 细胞在顺铂中培养的时间>12 个月^[7]。

1.3 试剂

顺铂和噻唑蓝(MTT)均购于美国 Sigma-Aldrich; DMEM 培养基、胎牛血清均购于美国 Gibco; RIPA 细胞裂解液, 兔抗人 Mcl-1 和兔抗人

β -actin 均购于美国 Cell Signaling。Trizol 逆转录试剂盒, pcDNA3.1, LipofectamineTM 2000(批号: 11668030)购于美国 Invitrogen; SYBR Green 试剂, 限制性内切酶 HindIII、EcoRI 均购于日本 TaKaRa; PVDF 膜(美国 Millipore); BCA 试剂盒、ECL 试剂盒(批号: NCI4106)购于美国 Pierce; 所有 PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2 方法

2.1 定量 PCR(qPCR)检测 miR-363 和 Mcl-1 的表达

在患者血清, MCF-7 细胞或 MCF-7-R 细胞中用 Trizol 提取总 RNA。miR-363 的逆转录采用特异性茎环引物法^[8]。miR-363 逆转录引物序列: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCA GTTGAGTACAGATG -3'。将该逆转录产物作为模板, 将 U6 作为内参, 用 SYBR Green 试剂盒进行定量 PCR, miR-363 的相对表达由 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算^[9]。miR-363 定量 PCR 上游引物: 5'-ACACTCCAGCT GGGAATTGCACGGTATCCA-3', 下游引物: 5'-TG GTGTCGTGGAGTCG -3'。U6 定量 PCR 上游引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', 下游引物: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。Mcl-1 基因的定量检测以 cDNA 作为模板, 将 GAPDH 作为内参。Mcl-1 上游引物: 5'-TGGCTAAACACTTGAAGACC-3', Mcl-1 下游引物: 5'-GGAAGAACTCCACA AACCC-3'。GAPDH 上游引物: 5'-CCACTCCTCC ACCTTTG-3', GAPDH 下游引物: 5'-CACCACCC TGTTGCTGT-3'。

2.2 质粒构建

将由上述步骤得到的 cDNA 作为模板, 用 PCR 法扩增 Mcl-1 基因的 cDNA 全长序列(NM_001197320.1)。引物如下: 正向引物: 5'-GAGAAG CTTGCCACTTCTCACTTCCGCT-3'(AAGCTT 为 HindIII 酶切位点), 反向引物: 5'-TGGAATTCAT AATCCTCTTGCCACTTGC-3'(GAATTC 为 EcoRI 酶切位点)。将 PCR 扩增产物通过酶切位点与 pcDNA3.1 连接后构建成 pcDNA3.1-Mcl-1 重组真核表达质粒。

2.3 瞬时转染

人 miR-363 模拟物(5'-AAUUGCACGGUAU

CCAUCUGUA-3')-2'-甲氧基化修饰的 miR-363 阻断序列 (miR-363 inhibitor, 5'-UACAGAUGG AUACCGUGCAAUU-3') 以及阴性对照序列 (NCO, 5'-GCAUUAGUCAGCAACUUGAUCU-3') 由上海吉玛公司合成。当细胞密度长到铺满 80% 培养板时用 Lipofecta mine™ 2000 按照说明书步骤将 miR-363(50 pmol·mL⁻¹), miR-363 inhibitor (50 pmol·mL⁻¹), NCO(50 pmol·mL⁻¹), pcDNA3.1-Mcl(2 μg·mL⁻¹), pcDNA3.1(2 μg·mL⁻¹) 转染入 MCF-7-R 细胞中, 培养 24 h。

2.4 Western blot 试验

收集细胞, 用冰预冷生理盐水洗 2 次, 用 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白质。提取液蛋白质浓度用 BCA 试剂盒定量。将蛋白提取液用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离, 将电泳分离胶通过电转方法将蛋白质转到 PVDF 膜上, 用 Mcl-1 或 β-actin 单克隆抗体孵育过夜, 之后再用带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h, 蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光。

2.5 MTT 法检测细胞活力

将 MCF-7 或 MCF-7-R 细胞按每孔 5×10³ 接种在 96 孔板上。孵育 12 h 后, 将 miR-363 和(或不加)pcDNA3.1-Mcl-1 转染到细胞中, 孵育 24 h。之后再加 6 μmol·L⁻¹ 顺铂培养 48 h。细胞杀伤活性用 MTT 法检测^[10]。结果用实验组与对照组的 OD 值比值表示。

2.6 统计学方法

实验重复 3 次, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 SPSS 13.0 统计分析软件进行处理, *P* 值计算采用非配对双边 *t* 检验以及单因素方差分析, *P*<0.05 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 顺铂治疗诱导 miR-363 表达的下调和 Mcl-1 表达的上调

乳腺癌患者在用顺铂化疗后血清中的 miR-363 表达水平的平均值显著低于化疗前(*P*<0.05), 结果见图 1。为了进一步明确 miR-363 表达水平和顺铂治疗的关系, 在体外检测 MCF-7 和 MCF-7-R 细胞 miR-363 的表达水平, 结果见图 2, MCF-7-R 细胞的 miR-363 水平显著低于 MCF-7 细胞。而与此相反的是, MCF-7-R 细胞的 Mcl-1 表达水平显著高于 MCF-7 细胞, 结果见图 3。这些结果提示顺铂治疗可诱导 miR-363 表达的下调和 Mcl-1 表达的上调。

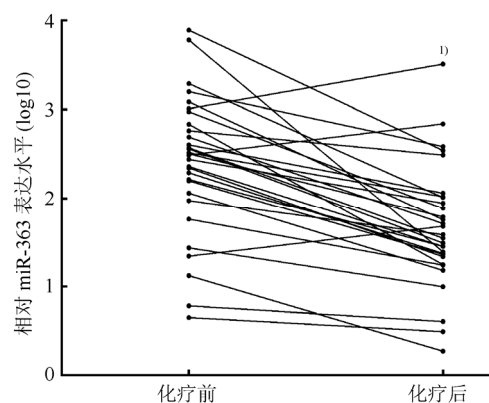


图 1 顺铂化疗前和化疗后 miR-363 在血清中的表达水平 (*n*=30)

与化疗前比较, ¹⁾*P*<0.05。

Fig. 1 miR-363 level in advanced breast cancer patients before cisplatin treatment and after cisplatin treatment(*n*=30) Compared with before chemotherapy group, ¹⁾*P*<0.05.

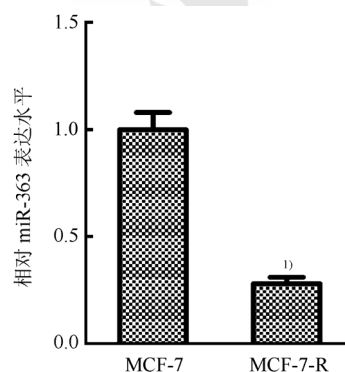


图 2 MCF-7 和 MCF-7-R 细胞 miR-363 的相对表达水平 (*n*=3, $\bar{x} \pm s$)

与 MCF-7 细胞相比, ¹⁾*P*<0.05。

Fig. 2 miR-363 relative expression level in MCF-7 or MCF-7-R cells (*n*=3, $\bar{x} \pm s$)

Compared with MCF-7 cells, ¹⁾*P*<0.05.

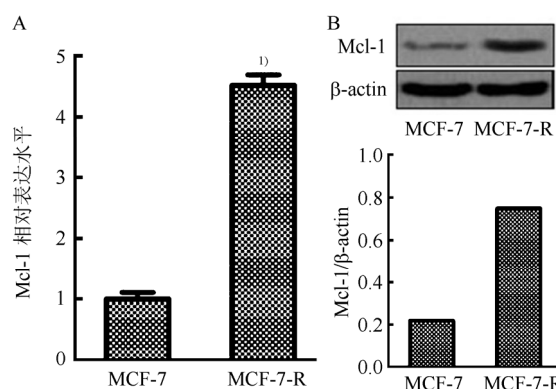


图 3 MCF-7 和 MCF-7-R 细胞 Mcl-1 的相对表达水平 (*n*=3, $\bar{x} \pm s$)

A-mRNA 表达水平; B-蛋白表达水平; 与 MCF-7 细胞相比, ¹⁾*P*<0.05。

Fig. 3 Mcl-1 relative expression level in MCF-7 or MCF-7-R cells(*n*=3, $\bar{x} \pm s$)

A-mRNA expression level; B-protein expression level; compared with MCF-7 cells, ¹⁾*P*<0.05.

3.2 miR-363 增强顺铂对 MCF-7-R 细胞的杀伤活性
顺铂能显著抑制 MCF-7 细胞的细胞活力, 但 MCF-7-R 细胞对顺铂治疗有明显的抵抗作用, 结果见图 4。进一步研究发现 miR-363 能显著增强顺铂($6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 MCF-7-R 细胞的杀伤活性, 而 miR-363 阻断剂能进一步减弱顺铂对 MCF-7-R 细胞的杀伤活性, 结果见图 5。

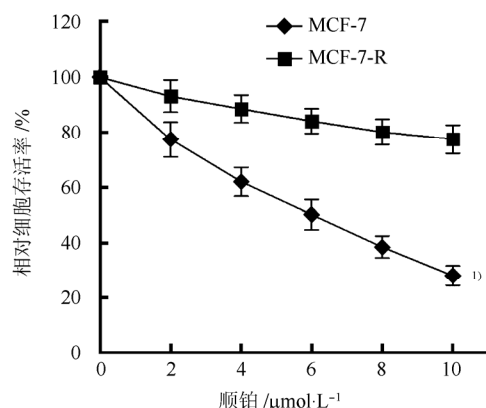


图 4 不同浓度顺铂对 MCF-7 和 MCF-7-R 细胞的杀伤活性 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与 MCF-7-R 细胞相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 4 The viability inhibition of MCF-7 and MCF-7-R cells treated with different cisplatin ($n=3$, $\bar{x} \pm s$) Compared with MCF-7-R cells, $^{1)}P<0.05$.

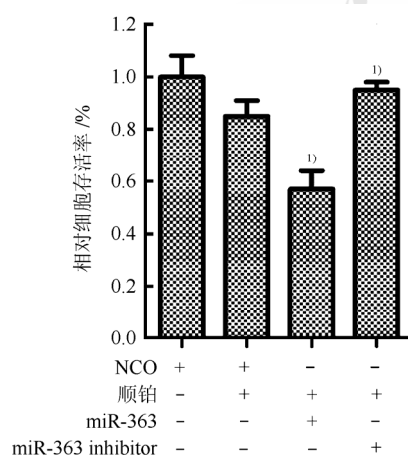


图 5 miR-363 或 miR-363 阻断剂对顺铂杀伤 MCF-7-R 细胞活性的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与 NCO+顺铂组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 5 The effect of miR-363 or miR-363 inhibitor on cisplatin dependant cell death in MCF-7-R cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$) Compared with NCO plus cisplatin group, $^{1)}P<0.05$.

3.3 miR-363 靶向抑制 Mcl-1 的表达

用 TargetScan Human 6.2 软件 (<http://www.targetscan.org/>) 预测 miR-363 的靶位点, 结果发现 Mcl-1 可能是 miR-363 的靶位点, Mcl-1 mRNA 3'-UTR 上 miR-363 的靶位点序列为 GUGCAAU,

位于 Mcl-1 mRNA 3'-UTR 的第 12 到第 18 个核苷酸序列。为了验证这一预测靶点, 笔者将 miR-363 转染入 MCF-7-R 细胞, 结果发现转染后 MCF-7-R 细胞的 Mcl-1 表达无论在 mRNA 水平上还是蛋白质水平上均显著下降, 见图 6。这些结果提示 miR-363 靶向于 Mcl-1, 且外源性 miR-363 可显著降低 MCF-7-R 细胞 Mcl-1 的表达水平。

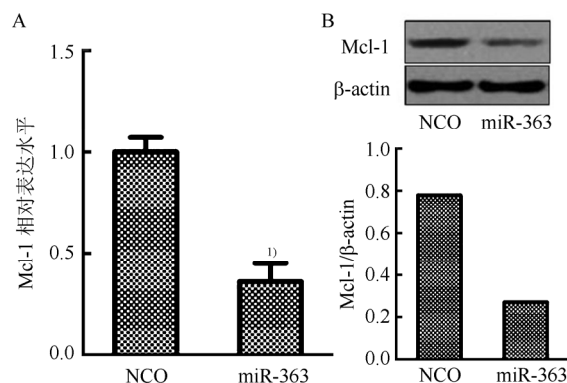


图 6 MCF-7-R 细胞中 miR-363 对 Mcl-1 表达水平的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-mRNA 表达水平; B-蛋白表达水平; 与 NCO 细胞相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 6 The effect of miR-363 on Mcl-1 regulation in MCF-7-R cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-mRNA expression level; B-protein expression level; compared with NCO cells, $^{1)}P<0.05$.

3.4 miR-363 对顺铂杀伤 MCF-7-R 细胞的增效作用依赖于 Mcl-1 的下调

将重组 pcDNA3.1-Mcl-1 质粒和 miR-363 共转染到 MCF-7-R 细胞中, 由于重组 pcDNA3.1-Mcl-1 质粒不包含 3'-UTR, 所以 miR-363 不能抑制外源性 Mcl-1 的表达。另外, 而在培养体系中加入顺铂也不影响 MCF-7-R 细胞外源性 Mcl-1 的表达, 见图 7。MTT 检测结果发现, pcDNA3.1-Mcl-1 转染后, miR-363 联合顺铂对 MCF-7-R 细胞的杀伤活性显著降低。另外, 转染 pcDNA3.1-Mcl-1 亦能减弱顺铂单治疗组对 MCF-7-R 细胞的杀伤活性, 见图 8。这些表明 miR-363 对顺铂杀伤 MCF-7-R 细胞的增效作用依赖于 Mcl-1 的下调。

4 讨论

中晚期乳腺癌患者在化疗中, 往往会出现肿瘤细胞耐药的情况^[11], 而 microRNA 被报道和化疗药物抵抗有关。如 miR-634 可以增强紫杉醇对鼻咽癌细胞的杀伤活性^[12], miR-942 则通过下调 ISG12a 的表达减弱 TRAIL 对肝癌细胞的凋亡诱导效应^[13]。本研究首先检测中晚期乳腺癌患者在用顺铂治疗前和治疗后血清 miR-363 的表达水平,

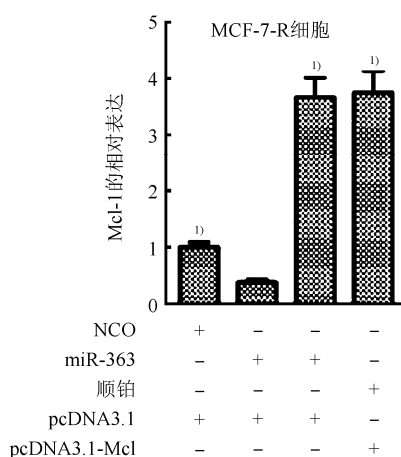


图7 pcDNA3.1-Mcl-1 转染导致 Mcl-1 的强制性表达, 且不受 miR-363 调控($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与 miR-363+pcDNA3.1 组比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 7 The forced expression of Mcl-1 induced by pcDNA3.1-Mcl-1, which is not regulated by miR-363($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with miR-363+pcDNA3.1 group, $^{1)}P<0.05$.

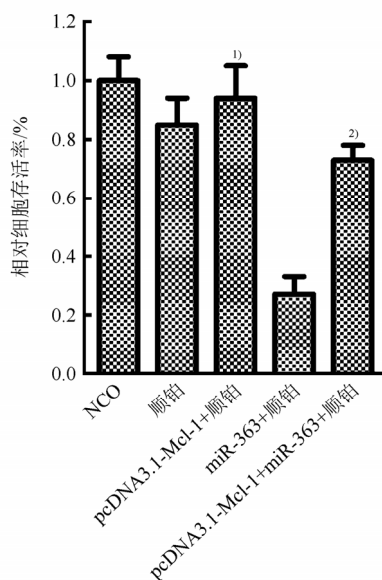


图8 pcDNA3.1-Mcl-1 阻断 miR-363 对顺铂杀伤 MCF-7-R 细胞的增效作用($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与顺铂组比较, $^{1)}P<0.05$; 与 miR-363+顺铂组比较, $^{2)}P<0.05$ 。

Fig. 8 pcDNA3.1-Mcl-1 blocked the synergism of miR-363 to cisplatin-induced viability inhibition in MCF-7-R cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with cisplatin group, $^{1)}P<0.05$; compared with miR-363+cisplatin group, $^{2)}P<0.05$.

结果发现顺铂治疗会逐渐诱导患者 miR-363 表达的下降, 表明 miR-363 的下调可能和顺铂药物抵抗有关。因此本实验构建了顺铂抵抗的乳腺癌细胞系, 即 MCF-7-R 细胞系。检测 MCF-7-R 细胞和普通 MCF-7 细胞 miR-363 表达的差异, 结果发现

miR-363 在 MCF-7-R 细胞中的表达水平显著低于在 MCF-7 细胞中的表达水平, 提示 miR-363 可能有降低乳腺癌细胞对顺铂抵抗力的作用。进一步的实验也证明了转染 miR-363 可提高顺铂对药物抵抗乳腺癌细胞的杀伤活性。

Bcl-2 蛋白家族中的抗凋亡蛋白成员对肿瘤的发展和化疗药物抵抗至关重要^[14], 而 Mcl-1 是 Bcl-2 抗凋亡蛋白家族中的一个重要成员, 有文献报道 Mcl-1 在多种肿瘤细胞中均高表达, 而且 Mcl-1 在肿瘤细胞产生耐药性的过程中发挥重要的作用^[15-16]。因此利用一些 Mcl-1 的特异性抑制剂, 可以减弱肿瘤细胞的耐药性^[17]。本研究发现相比于 MCF-7 细胞, MCF-7-R 细胞的 Mcl-1 表达显著升高。利用生物信息学, 发现 Mcl-1 可能是 miR-363 的靶点, MCF-7-R 细胞 miR-363 表达的下调可能是其 Mcl-1 上升的原因。因此, 将 miR-363 转染入 MCF-7-R 细胞, 发现转染后 MCF-7-R 细胞 Mcl-1 的表达下降。更为重要的是, 利用 Mcl-1 表达载体在 MCF-7-R 细胞中强制表达 Mcl-1 蛋白后, miR-363 对顺铂杀伤 MCF-7-R 细胞的增效作用丧失, 证明了 miR-363 对顺铂杀伤 MCF-7-R 细胞的增效作用依赖于 Mcl-1 的下调。综上所述, 本研究提供了一个利用 miR-363 克服乳腺癌细胞顺铂抵抗的新策略, miR-363/Mcl-1 通路在顺铂的耐药机制中发挥重要的作用。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] GALLUZZI L, VITALE I, MICHELS J, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1257. Doi: 10.1038/cddis.2013.428.
- [3] BAO B, ALI S, KONG D, et al. Anti-tumor activity of a novel compound-CDF is mediated by regulating miR-21, miR-200, and PTEN in pancreatic cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17850. Doi: 10.1371/journal.pone.0017850.
- [4] XIE Q, CHEN X, LU F, et al. Aberrant expression of microRNA 155 may accelerate cell proliferation by targeting sex-determining region Y box 6 in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2012, 118(9): 2431-2442.
- [5] ZHANG Y, WEI W, CHENG N, et al. Hepatitis C virus-induced up-regulation of microRNA-155 promotes hepatocarcinogenesis by activating Wnt signaling [J]. Hepatology, 2012, 56(5): 1631-1640.
- [6] NAKANO K, MIKI Y, SASANO H, et al. Identification of androgen-responsive microRNAs and androgen-related genes in breast cancer [J]. Anticancer Res, 2013, 33(11): 4811-4819.
- [7] XU N, SHEN C, LUO Y, et al. Upregulated miR-130a increases drug resistance by regulating RUNX3 and Wnt signaling in cisplatin-treated HCC cell [J]. Biochem Biophys, Res Commun, 2012, 425(2): 468-472.

- [8] CHEN C, RIDZON D A, LEE D H, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): e179.
- [9] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] TONG S J, LIU J, WANG X, et al. MicroRNA-181 promotes prostate cancer cell proliferation by regulating DAX-1 expression [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(4): 1296-1300.
- [11] XIA C, YE F, ZHUANG Z, et al. Liver kinase B1 enhances chemoresistance to gemcitabine in breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. Oncol Lett, 2014, 8(5): 2086-2092.
- [12] PENG X, CAO P, CAO K, et al. MiR-634 sensitizes nasopharyngeal carcinoma cells to paclitaxel and inhibits cell growth both *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6784-6791.
- [13] LIU N, ZUO C, ZHU H, et al. miR-942 decreases TRAIL-induced apoptosis through ISG12a downregulation and is regulated by AKT [J]. Oncotarget, 2014, 5(13): 4959-4971.
- [14] CHEN L, BOURGUIGNON L Y. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells [J]. Mol Cancer, 2014(13): 52. Doi: 10.1186/1476-4598-13-52.
- [15] MOJSA B, LASSOT I, DESAGHER S. Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein [J]. Cells, 2014, 3(2): 418-437.
- [16] PALVE V, MALLICK S, GHASIAS G, et al. Overexpression of Mcl-1 splice variant is associated with poor prognosis and chemoresistance in oral cancers [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111927. Doi: 10.1371/journal.pone.0111927.
- [17] AKAGI H, HIGUCHI H, HIBI T, et al. Suppression of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) enhances chemotherapy-associated apoptosis in gastric cancer cells [J]. Gastric Cancer, 2013, 16(1): 100-110.

收稿日期: 2014-12-27

克白颗粒抗白癜风的体内外药效研究

王薇¹, 康斯丹¹, 王跃鑫¹, 黄巧玲¹, 胡毅翔², 余陈欢² (1. 杭州市第三人民医院药剂科, 杭州 310003; 2. 浙江省医学科学院浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310013)

摘要: 目的 研究克白颗粒抗白癜风的体内外药效, 并对克白颗粒进行安全性评价。方法 采用血清药理学实验方法检测克白颗粒含药血清对小鼠黑色素瘤细胞 B16f10 增殖能力的影响; 选取 50 只健康豚鼠随机分成正常对照组、模型对照组及克白颗粒高、中、低剂量(9.04, 4.52, 2.26 g·kg⁻¹·d⁻¹)组, 每组 10 只, 除正常对照组外, 其余各组采用化学脱色法连续涂抹 7% H₂O₂ 50 d, 制备实验性白癜风豚鼠模型, 肉眼观察各给药组对实验性白癜风豚鼠模型的疗效, 检测豚鼠血液中酪氨酸酶(TRY)、胆碱酯酶(CHE)、单胺氧化酶(MAO)、丙二醛(MDA)的含量; 长期毒性实验对克白颗粒进行安全性评价。结果 血清药理学实验表明克白颗粒含药血清能够显著促进 B16f10 细胞的体外增殖。造模后, 模型组豚鼠血清 MDA、MAO 含量显著升高($P<0.05$), CHE、TRY 含量显著降低($P<0.05$ 或 0.01); 与模型对照组比较, 克白颗粒高剂量显著降低血清中 MDA 含量($P<0.01$), 高、中剂量显著降低 MAO 的含量($P<0.05$)、显著升高 CHE 的含量($P<0.05$), 但对 TRY 含量无显著影响。长期毒性实验结果显示克白颗粒对 SD 大鼠脏器重量无显著影响。结论 克白颗粒显示出良好的抗白癜风效果, 其作用机制可能与调节血液中 CHE、MAO、MDA 含量、促进黑色素细胞增殖有关。

关键词: 克白颗粒; 白癜风; 血清药理学; 动物模型

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)09-1046-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.004

Anti-vitiligo Effects of Kebai Particles on Leucoderma *in Vitro* and *in Vivo*

WANG Wei¹, KANG Sidan¹, WANG Yuexin¹, HUANG Qiaoling¹, HU Yixiang², YU Chenhuan² (1. Department of Pharmacy, the Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310003; 2. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the anti-vitiligo effects of Kebai particles *in vitro* and *in vivo* and evaluate the safety of Kebai particles. **METHODS** The effects of Kebai particles on mouse melanoma cells B16f10 proliferation *in vitro* was tested by serum pharmacology method. Long term toxicity test were carried out to evaluate the safety of Kebai particles. 50 guinea pigs were randomly divided into 5 groups: normal control group, model control group, high, middle and low dose group

基金项目: 浙江省中西医结合学会科研基金项目(2013LYZD019)

作者简介: 王薇, 女, 硕士, 中药师 Tel: (0571)86737209 E-mail: 57701277@qq.com