

消岩汤对耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞多药耐药基因调控作用的研究

张莹¹, 贾英杰¹, 李小江¹, 杨佩颖¹, 张欣¹, 朱津丽¹, 梁燕², 王蕾²

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193

摘要: **目的** 探讨具有“扶正解毒祛瘀”作用的中药复方消岩汤对耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞多药耐药基因 (MDR) 的表达产物 P 糖蛋白 (P-gP) 及其 mRNA 表达水平的影响。**方法** 选择耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞系作为获得性耐药模型, 给予消岩汤含药血清, 采用 Western Blotting 免疫印迹法及 RT-PCR 技术检测 MDR 的表达产物 P-gP 的含量及其 mRNA 表达水平。**结果** 与对照组比较, 随着消岩汤含药血清药物浓度的增加, P-gP 蛋白表达逐渐减弱 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 经不同浓度消岩汤含药血清作用后, A549/DDP 细胞中的 MDR1 基因的 mRNA 水平均有所下降 ($P < 0.05$), 且随着药物浓度的增加, 基因表达抑制作用越明显。**结论** 消岩汤逆转肺癌耐药的可能机制为通过抑制细胞膜上 P-gP 及其基因的表达而阻止细胞对顺铂的输出, 从而聚集细胞内的药物浓度达到有效逆转肺癌耐药的效果。

关键词: 中药; 消岩汤; 肺癌; A549 细胞; 顺铂; 多药耐药

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)06-0507-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.006

Regulation function of Xiaoyan Decoction on multidrug resistance of lung adenocarcinoma A549/DDP cell with cisplatin resistance in human gene

ZHANG Ying¹, JIA Ying-jie¹, LI Xiao-jiang¹, YANG Pei-ying¹, ZHANG Xin¹, ZHU Jin-li¹,
LIANG Yan², WANG Lei²

1. The First Hospital Affiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To study the Chinese materia medica compound (Xiaoyan Decoction) against lung adenocarcinoma A549/DDP cell multidrug resistance (MDR) in human gene expression product of P glycoprotein (P-gP) and its mRNA expression level influence, to find Xiaoyan Decoction target resistant to chemotherapy, to overcome the drug resistance in lung cancer research foundation laid. **Methods** The choice of model as acquired resistance to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma A549/DDP cell line, the application of serum pharmacology method, using Western blotting and RT-PCR technique for the detection of Xiaoyan Decoction on MDR of A549/DDP cell gene expression product of P-gP and its effect on mRNA expression level. **Results** Compared with the normal saline group, with the serum drug concentration of Xiaoyan Decoction increased and the expression of P-gP protein decreased gradually ($P < 0.05$); Compared with the saline group, serum was treated with different concentration of Xiaoyan Decoction after the action of MDR1 gene in A549/DDP cells and the mRNA levels were decreased, and with the increase of drug the concentration, the more obvious inhibition of gene expression was observed ($P < 0.05$). **Conclusion** The possible mechanism of Xiaoyan Decoction reversal of drug resistance in lung cancer is obtained by inhibiting the expression of P-gP on the cell membrane and its gene and the cell output to cisplatin could be prevented, thus the aggregation of the intracellular drug concentration effectively could reverse the effect of drug resistance in lung cancer.

Key words: Chinese materia medica; Xiaoyan Decoction; lung cancer; A549 cell; Cisplatin; multidrug resistance

多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是影响肺癌联合化疗中的核心成分, 其中顺铂是当前对肺癌患者单剂化疗及联合化疗效率最高的药物之一, 肿瘤化疗疗效及预后的主要因素之一。铂类药物是

收稿日期: 2014-08-06

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划 (青年基金项目) (12JCQNJC07500); 天津市高等学校科技发展基金计划项目 (20110223)

作者简介: 张莹 (1977—), 女, 天津市人, 副主任医师, 从事中西医结合肿瘤临床及科研工作。

Tel: (022) 27432431 E-mail: zhangyingzhongyi@sina.com

探讨顺铂的多药耐药对肺癌化疗具有相当大的指导意义。P 糖蛋白 (P-gP) 是由两个多药耐药基因编码, 其中多药耐药基因-1 (MDR-1) 与肿瘤细胞的 MDR 相关。本研究从国内外肺癌研究的关注热点和难点——化疗耐药入手, 应用 Western Blot 免疫印迹法及 RT-PCR 技术, 研究探寻具有“扶正解毒祛瘀”作用的中药复方消岩汤对肺癌耐药模型的耐药逆转作用机制。探索消岩汤药物血清对耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞 MDR-1 及其表达产物 P-gP 表达水平的影响, 发现消岩汤逆转化疗耐药的作用靶点, 寻找临床疗效可靠且副作用小的化疗耐药逆转剂, 从而为攻克肺癌耐药奠定一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 药物

消岩汤由黄芪 10 g、西洋参 10 g、姜黄 10 g、郁金 10 g、蕲蛇 10 g、夏枯草 10 g 等 8 味中药组成, 规格 100 mL/瓶, 由本院制剂室生产。水煎浓缩剂制备方法参照[1]。将消岩汤于旋转蒸发器上浓缩成相当于原生药材 1.5 g/mL 的药液, 冷却装入灭菌药瓶, 置 4 °C 冰箱备用。

1.2 动物与分组

SPF 级健康 BalB/C 雄性裸鼠, 60 只, 4~6 周龄, 体质量 18~20 g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK-(军) 2014-0004。

1.3 主要试剂与仪器

RPMI1640 培养基 (Hyclone 公司), 新生胎牛血清 (Hyclone 公司), Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad), Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad), PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad), Eppgradient s PCR 仪 (eppendorf 公司), ABI7500 fast 荧光定量 PCR 仪 (Life Technologies 公司), FluorChem FC2 Imaging System (Alpha Innotech), AlphaView 系统软件 (Alpha Innotech) 等。

1.4 细胞系

人肺腺癌细胞系 A549 由天津医科大学基础实验中心提供; 耐顺铂 (DDP) 肺腺癌细胞系 A549/DDP 购自上海博谷生物科技有限公司。

1.5 A549 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

体外复苏、培养 A549 细胞, 在细胞的对数生长期收集细胞。1 000 r/min 离心 5 min, PBS 溶液

洗涤两次, 离心弃上清, 离心管外周以冰袋维持温度在 4 °C 左右, 以此保持瘤细胞的活性。用生理盐水稀释, 调整细胞浓度到 5×10^6 cell/mL。小鼠随机分为消岩汤高、低剂量组和对照组, 每组 20 只。在各组中每只小鼠右前腋下皮下接种 0.2 mL。待所有裸小鼠的皮下肿瘤的平均直径达到约 5 mm 时开始 ig 给药, 每次给药间隔 24 h。小鼠给药剂量分别为 40、20 g/kg, 对照组给予等容量生理盐水。10 d 后眼眶取血法采血。

1.6 含药血清的制备

末次给药 1 h 后, 小鼠称质量, 眼眶取血法采血, 8 000 r/min 离心 15 min, 取淡蓝色血清于 2 mL EP 管中, 标识组别; 14 000 r/min 高速离心 5 min, 重复 2 次。分别提取上清, 分装, 56 °C 水浴灭活 30 min, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, -20 °C 保存。

1.7 细胞传代与培养

参照笔者摸索的实验方法^[1]。

1.8 对 A549/DDP 细胞耐药基因 P-gP 表达的影响

组织样品加适量预冷的蛋白裂解液 RIPA, 匀浆, 14 000 r/min 离心 15 min, 上清转入新管。BCA 法测定蛋白含量。用 PBS 调至等浓度, 加 6 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水浴 5 min 备用。取 100 μ g 处理好的样品, 按《分子克隆》方法进行 SDS-PAGE 电泳, 积层胶 6%, 分离胶 8%, 胶厚 0.75 mm。胶于转移液 (含甲醇 15%) 中平衡 10 min; 从下至上分别放置滤纸、胶、PVDF 膜 (0.45 μ m)、滤纸, 夹子夹好放入倒好转移液的转移槽中, 250 mA 转膜 90 min。将膜取出, 放入含 5% 脱脂奶粉的 PBST, 室温封闭 2 h。取出膜, 对应一抗按照抗体说明书稀释, 室温结合 2 h; PBST 洗 3 次, 每次 10 min; 二抗 1:10 000 稀释, 室温结合 1 h; 分别用 PBST 和 PBS 各洗 3 次, 每次 10 min。等比例混合显色基质 A 液和 B 液, 均匀滴加膜上, 静置 1 min, 放入暗箱成像。

1.9 对 A549/DDP 细胞耐药基因表达的影响

提取样本总 RNA, 用 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (Gene Copoeia Cat. No. AORT-0050) 进行反转录, 实验操作按产品说明书进行, 将 RNA 模板、试剂盒组分以及 RNase-free Water 溶解并置于冰上备用。用 ABI7500 Fast 荧光定量 PCR 仪, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。

1.10 统计学方法

使用 SPSS 11.0 软件进行统计。计量资料比较采用单因素方差分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 P-gP 蛋白印迹分析

A549/DDP 细胞经不同浓度含药血清作用 72 h 后收集细胞提取总蛋白，Western Blot 检测 P-gP 蛋白表达量的变化，结果表明，与对照组比较，随着消岩汤含药血清药物浓度的增加，P-gP 蛋白表达逐渐减弱 ($P < 0.05$)，说明消岩汤能够抑制多药耐药蛋白的表达，且随着药物浓度的增加，蛋白表达抑制的越明显，且与剂量呈负相关。电泳图见图 1，结果见表 1。

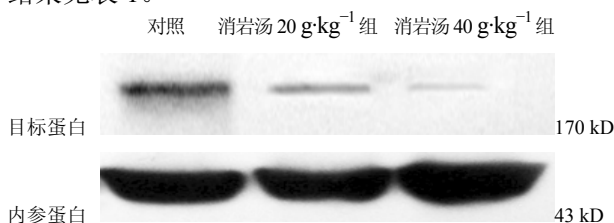


图 1 P-gP 蛋白表达量

Fig.1 Expression of P-gP protein

表 1 消岩汤对 A549/DDP 细胞 P-gP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1 Effect of Xiaoyan Decoction on P-gP expression in A549/DDP cells ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	P-gP	内参	比值
对照	—	120 948±1 579	825 361±2 632	0.146 54
消岩汤	40	4 742±108*	992 121±2 257	0.004 78
	20	25 817±421*	772 545±3 063	0.033 42

与对照组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.2 基因 MDR1 的相对表达量分析

基因 MDR1 在 3 组中的扩增曲线图及熔解曲线图说明扩增产物特异性好，实验结果有效。在 A549/DDP 细胞被各组不同的含药血清作用 72 h 后收集细胞提取总 RNA，RT-PCR 检测与 MDR1 的 mRNA 表达变化，实验重复 3 次。结果表明，与对照组比较，经不同浓度消岩汤含药血清作用后，A549/DDP 细胞中的 MDR1 基因的 mRNA 水平均有所下降，且随着药物浓度的增加，基因表达抑制作用越明显 ($P < 0.05$)。说明不同浓度的消岩汤均可通过调节相关基因的转录而调节对应蛋白的表达，且与剂量呈负相关。

表 2 消岩汤对 MDR1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 2 Effect of Xiaoyan Decoction on MDR1 mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MDR1 mRNA
对照	—	28.17±6.47
消岩汤	40	15.54±3.21*
	20	20.43±5.53*

与对照组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

目前全世界的肺癌发病率与死亡率均高居恶性肿瘤首位。在肺癌的综合治疗中，化疗占有重要的地位，尽管新的化疗药物不断问世，化疗方案日趋完善，但肿瘤细胞的 MDR 严重限制化学药物的治疗效果。据统计，90%以上接受化疗的肿瘤患者，其死亡与耐药有关^[2]，因此对 MDR 的产生机制、检测方法、逆转方法的研究一直是肿瘤治疗领域的热点。

消岩汤是在“解毒祛瘀，扶正抗癌”中医肿瘤治则基础上依据现代药理研究开发出的院内制剂，具有多种抗肿瘤活性，是治疗非小细胞肺癌的良好辅助用药^[3-4]。其中黄芪、西洋参滋阴益气，扶正以驱邪，姜黄、郁金行气解郁、活血祛瘀，伍以蕲蛇搜剔络脉中之瘀毒，夏枯草、生牡蛎、白花蛇舌草相伍以清热解毒、软坚散结，全方祛邪而不伤正，全面调节机体的阴阳平衡。前期研究证实消岩汤可改善小鼠生活质量，拮抗恶病质，并能够抑制肿瘤生长；消岩汤含药血清对 A549 及 A549/DDP 均有生长抑制作用，且能增强顺铂对肺癌敏感细胞和耐药细胞的杀伤作用，具有耐药逆转作用，并且能够诱导肺癌耐药细胞的凋亡^[1,5]。P-gP 是由多药耐药基因编码的一种能量依赖性药物排出性膜泵，它与化疗药结合后再与 ATP 结合，通过 ATP 供能将细胞内药物泵到细胞外使药物浓度不断下降，从而导致耐药性产生^[6]。P-gP/MDR1 的过表达是肿瘤产生 MDR 的主要机制，因此抑制 P-gP 的表达或者功能成为克服肿瘤 MDR 的最直接的方法。本研究证实消岩汤能够显著抑制 P-gP 及其 mRNA 表达，并且与剂量呈负相关。表明具有“解毒祛瘀，扶正抗癌”作用的中药复方消岩汤逆转肺癌耐药的可能机制为通过抑制细胞膜上 P-gP 及其基因的表达而阻止细胞对顺铂的输出，从而聚集细胞内的药物浓度达到有效逆转肺癌耐药的效果。

参考文献

- [1] 张莹, 贾英杰, 杨洁, 等. 消岩汤药物血清对 A549/DDP 多药耐药逆转作用的研究 [J]. 天津中医药, 2010, 27(4): 335-336.
- [2] Longley D B, Johnston P G. Molecular mechanism of drug resistance [J]. *J Pathol*, 2005, 2059(2): 275-292.
- [3] 贾英杰, 史福敏, 贾彦焘, 等. 消岩汤剂治疗晚期非小细胞肺癌临床研究 [J]. 天津中医药, 2004, 21(2): 108-110.
- [4] 贾英杰, 张莹, 孙一予, 等. 消岩汤不同时段参与化疗治疗非小细胞肺癌临床疗效观察 [J]. 天津中医药大学学报, 2006, 25(3): 164-165.
- [5] 张莹, 贾英杰. 消岩汤药物血清对 A549/DDP 细胞凋亡的诱导作用 [J]. 中医研究, 2011, 24(5): 19-21.
- [6] Wartenberg M, DOnmez F, Ling F C, *et al.* Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells [J]. *FASEB J*, 2001, 15(6): 995-1005.