

• 药理与临床 •

吴茱萸碱逆转 K562/Adr 细胞多药耐药的实验研究

李晓朋, 冯子强, 石雪萍, 李 静*

重庆医科大学基础医学院, 组织学与胚胎学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

摘要: 目的 探讨吴茱萸碱 (evodiamine, EVO) 对白血病 K562 细胞及其耐药株 K562/Adr 的增殖、细胞周期及多药耐药性 (MDR) 的影响。方法 用细胞增殖毒性检测试剂盒 (CCK-8) 检测 EVO 和/或柔红霉素 (DNR) 对细胞增殖的影响, 并计算耐药指数 (RI) 和逆转倍数 (RF); 流式细胞仪检测 EVO 和/或 DNR 对 K562 及 K562/Adr 细胞周期的影响; 流式细胞仪检测 K562 及 K562/Adr 细胞内 DNR 的荧光强度; 定量 PCR 检测 K562 及 K562/Adr 细胞中 MDR1 基因的表达; Western blotting 检测 K562 及 K562/Adr 细胞中 MDR1、BCRP 蛋白的表达。结果 EVO、DNR 作用于 K562 和 K562/Adr 细胞后, 细胞增殖受到抑制, 且呈剂量和时间依赖性; 与 K562 细胞相比, K562/Adr 细胞对 DNR 的 RI 为 30.54, K562/Adr 细胞对 EVO 的 RI 为 19.09。当 EVO (0.125 $\mu\text{mol/L}$) 与不同浓度 DNR 联合作用后, 能使 DNR 对 K562/Adr 细胞的 IC_{50} 明显下降, DNR+EVO 对 K562/Adr 细胞的 RF 为 12.07; EVO、DNR 单独或联合作用于 K562 及 K562/Adr 细胞后, 能够使 K562/Adr 细胞 BCRP、MDR1 蛋白及 mRNA 表达水平明显下降。结论 EVO 能有效逆转白血病 K562/Adr 细胞对 DNR 的耐药现象, 而这种作用可能与 EVO 通过减少细胞膜上多药耐药蛋白 MDR1 的表达有关。

关键词: 吴茱萸碱; K562/Adr 细胞; 多药耐药性; MDR1; BCRP

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)12-2123-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.018

Experimental study of evodiamine on reversing multidrug resistance of K562/Adr cells

LI Xiao-peng, FENG Zi-qiang, SHI Xue-ping, LI Jing

Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To study the effect of evodiamine (EVO) on the proliferation, cell cycle, and multidrug resistance (MDR) of leukemia K562 and K562/Adr cells. **Methods** The effect on the proliferation was detected by CCK-8 kit and/or daunorubicin (DNR). The resistance index (RI) and reversal fold (RF) were calculated. The effect of EVO on cell cycle was tested by flow cytometry; Flow cytometry was used to check the fluorescence intensity of DNR. The expression of MDR1 gene in leukemia K562 and K562/Adr cells was detected by q-PCR. The expression of MDR1 and BCRP proteins in leukemia K562 and K562/Adr cells were detected by Western blotting. **Results** CCK-8 test results showed that the proliferation of K562 and K562/Adr cells induced by EVO and DNR was inhibited in a dose and time dependent manner. The RI of DNR on K562/Adr cells was 30.54, the RI of EVO on K562/Adr cells was 19.09, compared with K562 cells; The RF of DNR + EVO on K562/Adr cells was 12.07. The expression of BCRP and MDR1 protein of K562/Adr cells was significantly decreased in K562/Adr cells induced by EVO and DNR. **Conclusion** Therefore EVO can effectively reverse the DNR resistance in K562/Adr cells, which may be related to reduce the expression of MDR1 on cell membrane.

Key words: evodiamine; K562/Adr cells; multidrug resistance; MDR1; BCRP

收稿日期: 2015-10-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271368)

作者简介: 李晓朋, 硕士研究生。Tel: 15123222906 E-mail: 819926409@qq.com

*通信作者 李 静, 硕士研究生导师, 副教授。Tel: 13370762980 E-mail: lijingyangyang@126.com

白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病，是血液科常见恶性肿瘤之一。目前，化疗是治疗白血病的主要手段，但由于白血病治疗中原发性耐药及继发性耐药的产生，极大地影响了患者的化疗效果。多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 是指肿瘤细胞对一种药物具有耐药性的同时，对其他结构不同、作用靶点不同的抗肿瘤药物也具有耐药性^[1-2]。目前，如何克服 MDR 已成为白血病治疗中最大的技术难题。

吴茱萸碱 (evodiamine, EVO) 是从吴茱萸 *Euodiae Fructus* 中提取的吲哚类生物碱。国外学者 Ogasawara 等^[3-5] 研究发现，EVO 有明显抗肿瘤侵袭及抗肿瘤转移作用。农丽等^[6] 发现 EVO 能逆转肺癌耐药细胞株 A549/DDP 的耐药性，增加耐药细胞对顺铂 (DDP) 的敏感性。本研究以白血病 K562 细胞及其耐药株 K562/Adr 细胞为实验对象，初步探讨 EVO 对肿瘤细胞 MDR 的影响及可能机制，为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

EVO 购自南京泽朗医药科技有限公司 (批号 ZL20131015, HPLC 检测质量分数大于 98%)，取二甲基亚砜 (DMSO) 将 EVO 充分溶解，配制成 100 μmol/L 的储存液，-20 °C 保存。实验前用 RPMI 1640 完全培养液 (含 10% 胎牛血清) 稀释成所需浓度 (DMSO 终体积分数 < 0.1%)。RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); Cell Counting Kit-8 (重庆鼎国生物技术有限公司); 柔红霉素 (DNR, 南京泽朗医药科技有限公司, 质量分数 ≥ 98%); DMSO (重庆鼎国生物技术有限公司)。

1.2 细胞株

人白血病 K562 细胞为重庆医科大学干细胞与组织工程研究室冻存; K562/Adr 细胞购自上海博谷生物科技有限公司。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖

取处于对数生长期的 K562 及 K562/Adr 细胞，调整细胞密度为 1×10^5 个/mL，接种于 96 孔板，接种量为每孔 100 μL。将细胞分为空白组、对照组和药物组。空白组只加入 RPMI 1640 完全培养基 (DMSO 终体积分数 < 0.1%)，对照组加入含等量细胞的 RPMI 1640 完全培养基，药物组分别加入不同浓度的 EVO 或 DNR，药物量为每孔 100 μL，每一

浓度设 6 个平行复孔。在 CO₂ 恒温细胞培养箱中培养 24、48、72 h。作用结束后，加入 CCK-8 试剂 10 μL，培养 2.5 h 后，用酶标仪检测吸光度 (A) 值，计算药物对 K562 及 K562/Adr 细胞的增殖抑制率，实验重复 3 次，从而筛选出 EVO 和 DNR 最适作用时间和浓度。采用直线回归方法计算药物的半数抑制浓度 (IC₅₀)，通过公式计算出各药物的耐药指数 (RI)。

增殖抑制率 = (1 - 药物组 A 值) / 对照组 A 值

RI = 药物对耐药细胞株 IC₅₀ / 药物对亲本细胞株 IC₅₀

采用直线回归法计算出细胞存活率 > 90% 时，EVO 的药物浓度。将非细胞毒剂量的 EVO 和不同浓度的 DNR 联合作用于 K562 和 K562/Adr 细胞，CCK-8 检测细胞增殖活性，计算 EVO + DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞的 IC₅₀ 值。通过公式计算出逆转倍数 (RF)。

RF = 不加逆转剂时药物 IC₅₀ / 加逆转剂时药物 IC₅₀

2.2 形态学观察

取处于对数生长期的 K562 及 K562/Adr 细胞，接种于细胞培养瓶中。将细胞分为对照组和加药 (EVO、DNR、EVO + DNR) 组。K562 细胞加药浓度为 DNR 0.1 μmol/L、EVO 3.7 μmol/L、EVO 0.125 μmol/L + DNR 0.142 μmol/L，K562/Adr 细胞加药浓度为 DNR 3.1 μmol/L、EVO 70.6 μmol/L、EVO 0.125 μmol/L + DNR 0.258 μmol/L。根据上述药物浓度，向加药组细胞加入各药物，对照组加入等量完全培养基，将细胞培养瓶放入 CO₂ 恒温细胞培养箱中培养 48 h。作用结束后，取出细胞，在倒置显微镜 (200×) 下观察各组细胞状态，随机选取 3 个视野观察并进行拍照。

2.3 细胞周期实验

取处于对数生长期的 K562 及 K562/Adr 细胞，接种于细胞培养瓶中。细胞分组及用药情况同“2.2”项。根据上述药物浓度，向加药组细胞加入各药物，对照组加入等量完全培养基，将细胞培养瓶放入 CO₂ 恒温细胞培养箱中培养 48 h。收集各组细胞，用 PBS 溶液洗涤 3 次，以 2 000 r/min 离心 5 min，收集 5×10^5 个细胞，用流式细胞仪测定各组细胞周期分布比例。

2.4 荧光实验

取处于对数生长期的 K562 及 K562/Adr 细胞，接种于细胞培养瓶中。将细胞分为对照组、DNR 组和 DNR + EVO 组。K562 细胞加药浓度为 DNR 0.1

$\mu\text{mol/L}$ 、EVO $0.125 \mu\text{mol/L}$ +DNR $0.142 \mu\text{mol/L}$ 。K562/Adr 细胞加药浓度为 DNR $3.1 \mu\text{mol/L}$ 、EVO $0.125 \mu\text{mol/L}$ +DNR $0.258 \mu\text{mol/L}$ 。根据上述药物浓度，向各组细胞分别加入各药物，对照组加入等量完全培养基，将细胞培养瓶放入 CO_2 恒温细胞培养箱中培养 48 h。收集细胞，PBS 洗涤细胞 3 次，以 $2\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min，收集 5×10^5 个细胞，用流式细胞仪测定各组细胞内 DNR 荧光强度。

2.5 RT-PCR 实验

取处于对数生长期的 K562 及 K562/Adr 细胞，接种于细胞培养瓶中，分为对照组、EVO 组、DNR 组、EVO+DNR 组。K562 细胞加药浓度为 DNR $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、EVO $3.7 \mu\text{mol/L}$ 、EVO $0.125 \mu\text{mol/L}$ +DNR $0.142 \mu\text{mol/L}$ ，K562/Adr 细胞加药浓度为 DNR $3.1 \mu\text{mol/L}$ 、EVO $70.6 \mu\text{mol/L}$ 、EVO $0.125 \mu\text{mol/L}$ +DNR $0.258 \mu\text{mol/L}$ 。各组加入相应浓度药物后，将细胞培养瓶放入 CO_2 恒温细胞培养箱中培养 48 h 后收集细胞，用 Trizol 法提 RNA，并测定浓度。用 Takara 试剂盒进行逆转录，用 Quant one step QRT-PCR 试剂盒进行实验，并且统计数据，进行表达差异分析。

2.6 Western blotting 实验

取处于对数生长期的 K562 及 K562/Adr 细胞，接种于细胞培养瓶中，细胞分组及用药情况同“2.5”项。各组加入相应浓度药物后，将细胞培养瓶放入

CO_2 恒温细胞培养箱中培养 48 h，收集细胞，提取总蛋白。用蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度，用 BCA 方法定量蛋白。各取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白，进行 SDS-PAGE 电泳，电转到 PDVF 膜，5% 脱脂奶粉封闭 2 h，一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜，TBST 缓冲液漂洗，二抗室温孵育 1.5 h，TBST 缓冲液漂洗后用 ECL 系统显影，运用 Quantity One 图像分析软件测得条带的吸光度值，以各组的条带和内参条带吸光度比值为相对表达量，比较各组间差异。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件对所得数据进行统计处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间采用两因素方差分析和单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 EVO 对细胞增殖及耐药逆转情况的影响

3.1.1 EVO 和 DNR 对细胞增殖的影响及 RI 采用 CCK-8 法，经酶标仪 490 nm 波长分别检测 EVO、DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞增殖的影响，发现对照组细胞体外生长活跃，加药组细胞增殖受到抑制，且呈剂量依赖性，见图 1。根据 CCK-8 结果，计算各组药物作用 48 h 的 IC_{50} ，EVO 对 K562 和 K562/Adr 细胞的 IC_{50} 分别为 3.7025 、 $70.6875 \mu\text{mol/L}$ ，DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞的 IC_{50} 分别为 0.102 、 $3.116 \mu\text{mol/L}$ 。DNR 的 RI 为 30.54 ；EVO 的 RI 为 19.09 。

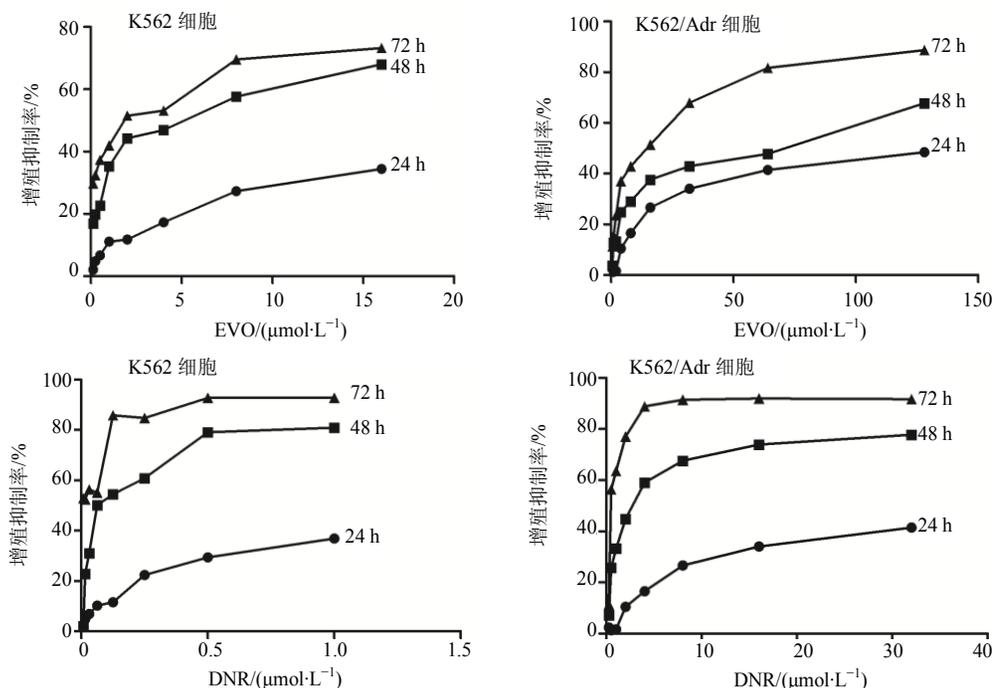


图 1 EVO 和 DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibition of EVO and DNR on proliferation of K562 and K562/Adr cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.1.2 EVO 对 DNR 的 RF CCK-8 检测发现, 当 EVO 浓度 $<0.125 \mu\text{mol/L}$ 时 K562 和 K562/Adr 细胞的存活率均 $>90\%$, 因此 $0.125 \mu\text{mol/L}$ 为 EVO 非细胞毒剂量。将 $0.125 \mu\text{mol/L}$ 的 EVO 与不同浓度 DNR 联用后, 能使 DNR 对 K562/Adr 细胞的 IC_{50} 明显下降 ($0.258 \mu\text{mol/L}$), 但对 K562 细胞的 IC_{50} 却没有明显变化 ($0.142 \mu\text{mol/L}$)。在 K562/Adr 细胞中, EVO 对 DNR 的 RF 为 12.07。

3.2 EVO 对细胞形态的影响

倒置显微镜观察结果显示, 将对照组与药物组 (EVO、DNR、EVO+DNR) 细胞培养 48 h 后, 分别拍照。K562 细胞: 对照组细胞生长状况良好, 而药物组 (EVO、DNR、EVO+DNR) 细胞数目明显减少, 且 EVO+DNR 组减少数量明显多于 EVO、DNR 组。K562/Adr 细胞: 对照组细胞生长良好, 而药物组 (EVO、DNR、EVO+DNR) 细

胞数目明显减少, EVO+DNR 组细胞减少的数量明显多于 EVO、DNR 组。但 EVO+DNR 使 K562/Adr 细胞减少数量少于其使 K562 细胞减少的数量。见图 2。

3.3 EVO 对 K562 及 K562/Adr 细胞细胞周期的影响

EVO、DNR 单用及联合应用作用于 K562 细胞 48 h 后, 流式细胞仪检测结果显示, EVO 和 DNR 组细胞周期没有明显变化, 与对照组相比无统计学意义; EVO+DNR 组 G_2/M 期、S 期细胞比例增加, G_0/G_1 期细胞比例减少, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。EVO、DNR 单用及联合应用作用于 K562/Adr 细胞 48 h 后, 流式细胞仪检测结果显示, EVO 和 DNR 组细胞周期也没有明显变化, 与对照组相比无统计学意义; EVO+DNR 组 G_2/M 期、S 期细胞比例增加, G_0/G_1 期细胞比例减少, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。见表 1。

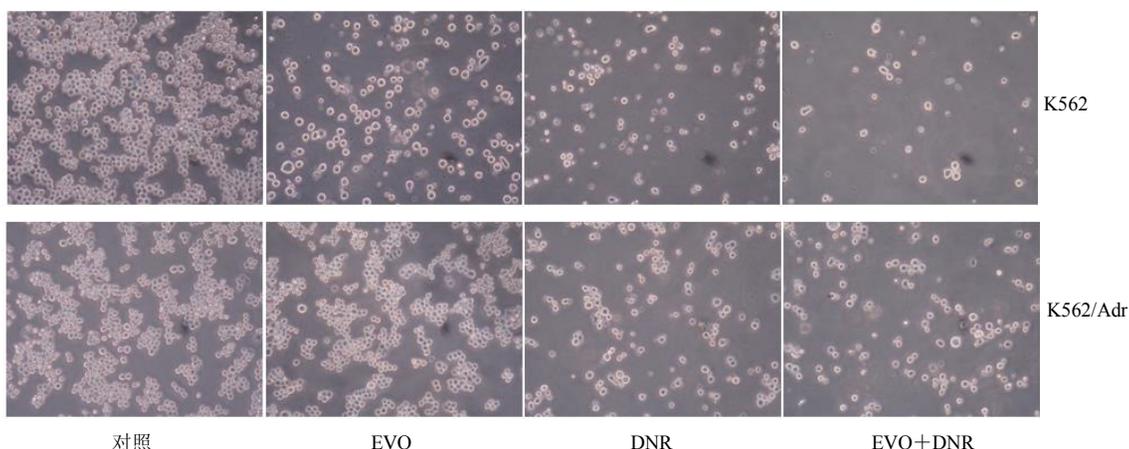


图 2 EVO 和 DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞形态的影响

Fig. 2 Effects of EVO and DNR on morphology of K562 and K562/Adr cells

表 1 EVO 和 DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of EVO and DNR on cell cycle of K562 and K562/Adr cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	K562			K562/Adr		
	G_0/G_1	G_2/M	S	G_0/G_1	G_2/M	S
对照	73.29 ± 2.74	8.18 ± 3.67	18.53 ± 0.93	71.12 ± 0.25	8.97 ± 1.66	19.91 ± 0.28
EVO	$72.17 \pm 0.88^\#$	$7.47 \pm 2.06^\#$	$20.36 \pm 1.18^\#$	$68.86 \pm 0.62^\#$	$8.86 \pm 1.24^\#$	$22.19 \pm 1.23^\#$
DNR	$72.44 \pm 2.57^\#$	$7.72 \pm 4.08^\#$	$19.83 \pm 6.65^\#$	$69.79 \pm 1.62^\#$	$7.45 \pm 3.01^\#$	$22.76 \pm 1.85^\#$
EVO+DNR	$67.41 \pm 0.45^{**}$	$10.57 \pm 1.44^{**}$	$22.02 \pm 0.98^{**}$	$65.92 \pm 0.28^*$	$9.84 \pm 1.14^{**}$	$24.24 \pm 0.18^*$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 EVO+DNR 组比较: $^\#P < 0.05$, 下同

$^{**}P < 0.01$ vs control group, $^\#P < 0.05$ vs EVO + DNR group, same as below

3.4 EVO 对细胞摄取 DNR 的影响

流式细胞仪检测结果显示, 对 K562 细胞, EVO+DNR 组细胞内荧光阳性率增高, 与对照组相比差异非常显著 ($P < 0.01$); 对 K562/Adr 细胞,

EVO+DNR 组细胞内荧光阳性率明显增高, 与对照组相比差异非常显著 ($P < 0.01$); 经 EVO+DNR 联合作用后的 K562/Adr 细胞内 DNR 荧光阳性率增强较 K562 细胞更为明显。见图 3。

3.5 EVO 对 K562 及 K562/Adr 细胞 MDR1 基因和 MDR1、BCRP 蛋白表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, EVO、DNR 单独及联合应用作用于 K562、K562/Adr 细胞 48 h 后, 与对照组

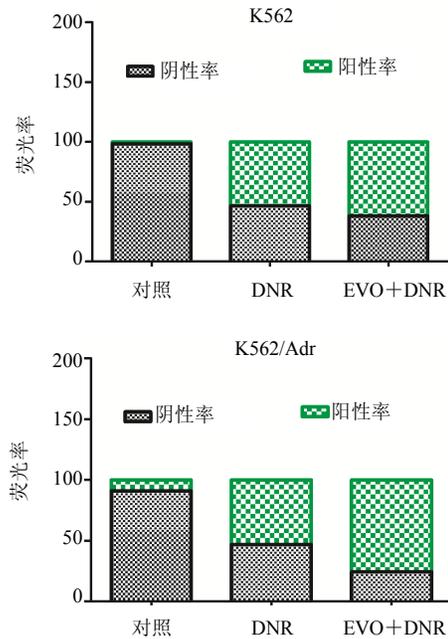


图 3 EVO 对 K562 和 K562/Adr 细胞摄取 DNR 的影响
Fig. 3 Effect of EVO on DNR uptake of K562 and K562/Adr cells

相比较, EVO 组、DNR 组及 EVO+DNR 组 K562/Adr 细胞内 MDR1 基因的表达均逐渐降低 ($P < 0.01$), 但给药组间相比差异无统计学意义; 各组 K562 细胞中 MDR1 基因几乎不表达。见图 4。Western blotting 检测结果显示, K562/Adr 细胞中, 各组 BCRP、MDR1 蛋白表达水平均有所下降, 其中 EVO+DNR 组的 MDR1、BCRP 蛋白表达水平的下降较 EVO、DNR 组更为明显 ($P < 0.01$); K562 细胞中, 各组 MDR1 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.01$), BCRP 蛋白表达水平略微下降 ($P < 0.05$), 见图 5。

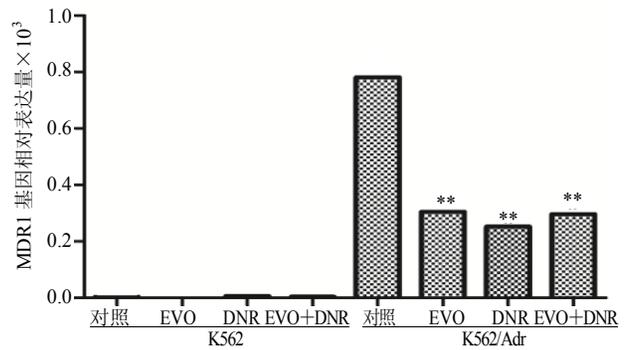


图 4 EVO 和 DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞 MDR1 基因表达的影响
Fig. 4 Effects of EVO and DNR on MDR1 gene expression of K562 and K562/Adr cells

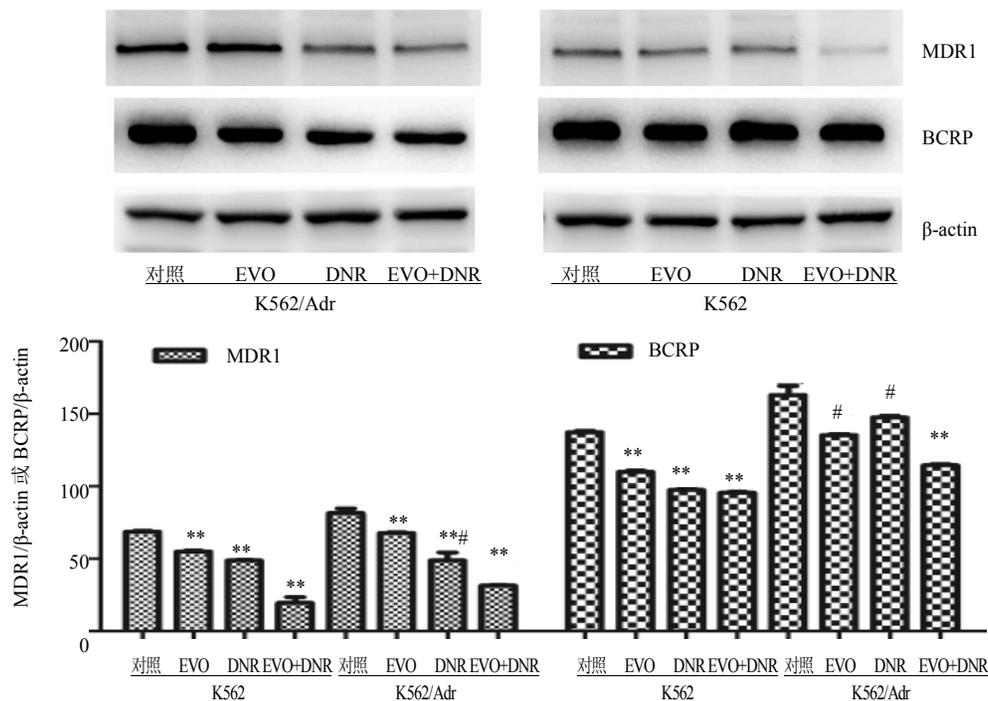


图 5 EVO 和 DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞 MDR1 和 BCRP 蛋白表达的影响
Fig. 5 Effects of EVO and DNR on MDR1 and BCRP protein expression of K562 and K562/Adr cells

4 讨论

白血病作为我国 10 种高发恶性肿瘤之一，由于其分型和预后分层复杂，因此治疗方法并非千篇一律，需要结合每个病人细致的分型和预后分层制定治疗方案。目前白血病治疗的主要手段之一就是化疗，而白血病对化疗的先天耐药及获得性耐药，是化疗失败的主要原因。

本实验中，选择 K562 和 K562/Adr 细胞作为研究对象，加入不同浓度的 DNR 作用不同时间，并用 CCK-8 法检测 DNR 对 K562 和 K562/Adr 细胞增殖的影响。实验结果表明，DNR 能有效抑制 K562 和 K562/Adr 细胞的增殖，并呈剂量和时间依赖性。值得注意的是 DNR 对 K562 细胞的 IC_{50} 为 0.102 $\mu\text{mol/L}$ ，而 DNR 对 K562/Adr 细胞的 IC_{50} 为 3.116 $\mu\text{mol/L}$ 。上述结果表明，K562/Adr 细胞对 DNR 有耐药作用，通过计算得出 K562/Adr 细胞对 DNR 的 RI 为 30.54。

肿瘤 MDR 逆转剂是世界各国学者研究的热点，目前正尝试从天然药物中探索天然的肿瘤 MDR 逆转剂^[7-8]，众多学者将视线转向了中药吴茱萸。EVO 是从吴茱萸中提取的吲哚类生物碱。外国学者研究发现，EVO 作用于多种离体肿瘤细胞株，发现有明显抗侵袭以及抗转移作用，包括对黑色素瘤细胞、宫颈癌细胞、A549/DDP 肺癌细胞均有抑制作用。Wang 等^[9]发现 EVO 在乳腺癌细胞中能逆转耐药。本实验采用了 CCK-8 法检测 EVO 对 K562 和 K562/Adr 细胞增殖的影响。实验结果表明，EVO 能有效抑制 K562 和 K562/Adr 细胞的增殖，并呈剂量和时间依赖性，EVO 对 K562 细胞的 IC_{50} 为 3.702 5 $\mu\text{mol/L}$ ，而对 K562/Adr 细胞的 IC_{50} 为 70.687 5 $\mu\text{mol/L}$ 。通过计算得出 K562/Adr 细胞对 EVO 的 RI 为 19.09。同时发现用非细胞毒性剂量的 EVO (0.125 $\mu\text{mol/L}$) 与不同浓度的 DNR 联合作用于 K562/Adr 细胞后，DNR 对 K562/Adr 细胞的 IC_{50} 值明显降低，RF 为 12.07。结果提示，EVO 在体外具有增强 DNR 的增殖抑制效应的作用。进一步应用倒置显微镜来观察药物 (DNR、EVO、EVO+DNR) 作用于 K562 和 K562/Adr 细胞后的细胞形态变化，发现对照组细胞生长良好，而药物组细胞数目明显减少。与单独使用 EVO 或 DNR 比，EVO+DNR 组细胞减少更明显。同时，因为 DNR 是一种荧光物质^[10]，可通过荧光显微镜观察 K562 和 K562/Adr 细胞对 DNR 的摄取情况。DNR 作用于 K562 和 K562/Adr

细胞 2、6、12 h 后，随着时间推移，细胞内荧光强度不断增强。但在同一作用时间下，联合用药组比单独 DNR 组荧光强度增强更为明显。流式细胞仪检测荧光阳性率的结果与荧光显微镜下观察结果一致，结果表明 EVO 可促进 DNR 进入细胞内，而进入细胞内的 DNR 增多，可增强 DNR 对细胞的增殖抑制作用。经流式细胞仪检测细胞周期也发现，联合用药后可将细胞周期阻滞在 G_2/M 期和 S 期，从而进一步抑制了细胞增殖。

耐药的产生涉及机制较为复杂，是一个多基因参与的过程^[11]。近年来对化疗药物耐药性机制的研究发现，耐药的原因主要是肿瘤细胞膜上存在大量的多药耐药基因蛋白^[12]。目前的研究公认的白血病化疗药物引发的多药耐药性最常见和最主要的机制是 ABC 转运体超表达^[13-15]。ABC 转运蛋白超家族是一种膜结合蛋白，有 8 个亚家族，其中 ABCB、ABCC、ABCG 3 个亚家族与肿瘤细胞的 MDR 密切相关，研究较为清楚的有 ABCB1 (MDR1)、BCRP、MRP 等。MDR1 与 BCRP 是一种由多药耐药基因表达的多药耐药蛋白，它们属于 ATP 能量依赖性跨膜蛋白，可通过其膜泵功能将其作用底物如各种化疗药物“泵出”细胞外，使药物不能有效地到达其作用靶点而引起组织对药物的耐药现象。本实验经 RT-PCR 检测发现，EVO+DNR 处理的 K562/Adr 细胞内 MDR1 基因的表达明显下调。同时用 Western blotting 检测经过各组药物处理的 K562 及 K562/Adr 细胞中 BCRP、MDR1 蛋白的表达，发现在单独使用 EVO 或者 DNR 的时候 BCRP、MDR1 蛋白的表达较对照组有微弱降低，而联合用药的时候二者降低非常明显。因此推测，EVO 可能通过降低 K562/Adr 细胞 MDR1 mRNA 的表达，使细胞膜上 MDR1 蛋白的表达量减少，继而降低 MDR1 介导的细胞内化疗药物的外排能力，使细胞内药物的浓度升高而发挥逆转作用。

综上所述，EVO 能有效逆转白血病 K562/Adr 细胞对 DNR 的耐药作用，而这种作用可能与 EVO 通过减少细胞膜上多药耐药蛋白 MDR1 的表达有关。更加深入的机制有待进一步的研究探明。

参考文献

- [1] 刘海峰. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1096-1102.
- [2] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1 mediated multidrug resistance in

- cancer chemotherapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(3): 273-286.
- [3] Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Inhibitory effects of evodiamine on *in vitro* invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(8): 917-920.
- [4] Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(6): 720-723.
- [5] Ogasawara M, Suzuki H. Inhibition by evodiamine of hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of tumor cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(4): 578-582.
- [6] 衣丽, 伍钢, 戴晓芳, 等. 吴茱萸碱逆转人肺癌细胞株 A549/DDP 耐药机理的实验研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(6): 487-492.
- [7] 施叶叶, 马程遥, 苗筠杰, 等. 中药多靶点逆转白血病多药耐药机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(7): 1230-1235.
- [8] 张莹, 王蕾. 中药逆转肺癌多药耐药的研究新进展 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(6): 686-689.
- [9] Wang S P, Wang L, Shi Z, *et al.* Evodiamine synergizes with Doxorubicin in the treatment of chemoresistant human breast cancer without inhibiting P-glycoprotein [J]. *PLoS One*, 2014, 5(9): e97512.
- [10] 龚玉萍, 王燕婷, 陈芳源, 等. 柔红霉素在耐药细胞株 K562/ADR 内的异常分布 [J]. *中华肿瘤*, 2015, 23(8): 184-186.
- [11] Juliana E L, Kyle-Cezar F, Leite D F P, *et al.* Expression and activity of multidrug resistance protein 1 in a murine thymoma cell line [J]. *Immunology*, 2005, 114(4): 468-475.
- [12] Eckford P D, Sharom F J. P-glycoprotein (ABCB1) interacts directly with lipid-based anti-cancer drugs and Platelet-activating factors [J]. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84(6): 1022-1033.
- [13] Gottesman M M, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 48-58.
- [14] Deeley R G, Cole S P. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1) [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(4): 1103-1111.
- [15] Robey R W, Polgar O, Deeken J, *et al.* ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 39-57.