

• 药理与临床 •

汉防己甲素联合紫杉醇逆转脑胶质瘤 C6/MDR 细胞耐药及其机制研究

王 宏, 郭晓远, 吴国建, 陈陆旭*

东南大学附属中大医院, 江苏 南京 210009

摘要:目的 评价汉防己甲素联合紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 逆转耐药型脑胶质瘤 (C6/MDR) 细胞多药耐药的可行性, 并探讨可能的耐药逆转机制。方法 通过非耐药型脑胶质瘤 C6 和耐药型脑胶质瘤 C6/MDR 细胞系作对比, 以体外细胞毒性为指标, 采用 MTT 法分别考察 PTX、汉防己甲素、PTX+汉防己甲素抑制 C6 和 C6/MDR 细胞增殖作用差异; 以细胞摄取能力为指标, 借助 HPLC 和流式细胞仪技术分别测定 PTX 和荧光探针罗丹明 123 (R123) 在 2 种细胞内的含量, 评价汉防己甲素促 C6/MDR 细胞摄取 PTX 和 R123 的能力; 以细胞凋亡率为指标, 采用 AnnexinV-PE/7-AAD 一步染色法定量 PTX、汉防己甲素、PTX+汉防己甲素干预后的 2 种细胞凋亡率; 采用 P-糖蛋白 (P-gp) 抗体结合试剂盒和 Pgp-Glo™ 分析系统分别考察汉防己甲素对 C6/MDR 细胞 P-gp 表达以及 P-gp ATP 酶活性的影响。结果 汉防己甲素+PTX 对 C6/MDR 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀, 以 PTX 浓度计) 为 (5.88±0.43) nmol/L; 在 10 μmol/L 汉防己甲素的干预下, C6/MDR 细胞内的 PTX 和 R123 累积量相比 PTX 组分别提高 9.4 倍和 12.3 倍, 凋亡率相应提高了 2.3 倍; 这种汉防己甲素介导的耐药逆转机制可能与降低 C6/MDR 细胞 P-gp 表达、刺激细胞内 P-gp ATP 酶活性有关。结论 汉防己甲素联合紫杉醇在体外具有逆转 C6/MDR 细胞耐药的潜力。

关键词: 汉防己甲素; 紫杉醇; 脑胶质瘤; C6/MDR 细胞; 逆转多药耐药; P-糖蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)11-2584-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.015

Combination of tetrandrine and paclitaxel overcomes multidrug resistance on C6/MDR glioma cells

WANG Hong, GUO Xiao-yuan, WU Guo-jian, CHEN Lu-kui

Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of tetrandrine combined with paclitaxel (PTX) in multidrug resistance reversal on C6/MDR glioma cells, and explore the potential molecular mechanisms. **Methods** Through the comparison of non-resistant glioma C6 cells and drug-resistant glioma C6/MDR cells, the cytotoxicity against C6/MDR (or C6) cells were assayed by MTT method. The intracellular accumulation of PTX and Rhodamine 123 (R123) were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and flow cytometry, respectively. The cell apoptosis induction of C6/MDR (or C6) cells was detected by AnnexinV-PE/7-AAD staining method after various intervention of PTX, tetrandrine, and PTX + HfA. P-glycoprotein (P-gp) expression and P-gp ATPase activity were evaluated through P-gp antibody binding assay kit and Pgp-Glo™ assay systems, respectively. **Results** The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of tetrandrine + PTX against C6/MDR cells were (5.88±0.43) nmol/L. The C6/MDR intracellular accumulation of PTX and R123 were increased by 9.4-fold and 12.3-fold in the presence of 10 μmol/L tetrandrine. Accordingly, the apoptosis rate of C6/MDR cells treated with tetrandrine + PTX was 2.3-fold higher than PTX treatment. The tetrandrine-mediated multidrug resistance reversal was involved with the downregulation of P-gp expression and the stimulation of P-gp ATPase activity. **Conclusion** The combination of tetrandrine and PTX had a potential of overcoming multidrug resistance on C6/MDR glioma cells *in vitro*.

Key words: tetrandrine; paclitaxel; glioma; C6/MDR cells; multidrug resistance reversal; P-gp

脑胶质瘤是一种最常见的原发性颅内肿瘤, 现阶段临床的主要治疗手段仍限于手术切除辅助化疗或放疗^[1]。化疗的目的在于清除手术未能移除浸润到脑实质细胞但尚未形成离岛的残留肿瘤细胞, 因

收稿日期: 2017-12-04

基金项目: 南京市科技发展计划项目 (2017sc512018)

作者简介: 王 宏 (1984—), 男, 住院医师, 专业方向为神经胶质瘤临床科研相关的治疗及分子机制研究。

Tel: 13915995611 E-mail: xnwanghong@126.com

*通信作者 陈陆旭 (1972—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 专业方向为神经胶质瘤临床科研相关的治疗及分子机制研究。

Tel: 18761886190 E-mail: neuro_clk@hotmail.com

此在综合性治疗方案中占据非常重要的地位^[2]。然而,化疗导致的多药耐药(multidrug resistance, MDR)往往成为手术后脑胶质瘤复发和死亡的主要因素^[3]。一般认为,MDR的发生与抗肿瘤药物通过细胞膜时和转运蛋白跨膜区的结合,引发药泵蛋白的ATP酶活性,进而激活药泵将胞内药物转运出胞外等一系列机制有关。这类依靠ATP提供能量进行胞吐药物的蛋白统称为ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporters, ABC transporters),诸如紫杉醇(paclitaxel, PTX)、阿霉素、蒽醌类等抗肿瘤药物都是ABC转运蛋白的底物。目前公认的肿瘤耐药的主要因素是细胞膜上转运蛋白的存在,包括熟知的P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein, MRAP)以及乳腺癌多药耐药相关蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)等,这些蛋白介导的耐药机制支撑着药物膜泵假说^[4-6]。

近年来,多种中药活性成分/组分在逆转肿瘤多药耐药方面均取得了值得关注的成果。譬如,汉防己(汉防己甲素)、五味子(五味子甲素)、人参(人参皂苷Rh₂)、雷公藤(雷公藤醇酯)等中药中的有效成分联合化疗药物在逆转多种肿瘤细胞耐药方面均表现出独特的优势^[7-10]。Qu等^[11]通过将人参皂苷Rh₂和依托泊苷联用,显著地改善了耐药乳腺癌MCF-7细胞对化疗药物抵抗的现象,其机制可能与人参皂苷Rh₂下调了P-gp的表达量有关。相比人参皂苷Rh₂的高成本和繁琐的提取工艺,Su等^[12]则选用了更为价廉易得的汉防己甲素(tetrandrine)作为潜在的肿瘤耐药逆转剂,联合PTX在治疗荷耐药型食道癌裸鼠模型中表现出非常明显的协同抗肿瘤效应。这种由汉防己甲素带来的抗耐药性肿瘤疗效增强作用不仅与干扰肿瘤细胞的耐药微环境有关,其本身也具有一定的抗肿瘤活性。有研究显示,汉防己甲素能够显著诱导多种肿瘤细胞凋亡、引起自噬、阻断离子通道、产生胞内活性氧分子(ROS)^[13-14]。但是汉防己甲素能否联合经典化疗药物PTX协同逆转脑胶质瘤C6/MDR细胞的多药耐药尚不明确,其潜在的分子机制也研究甚少。因此,本研究围绕汉防己甲素联合PTX对C6/MDR细胞的体外抗肿瘤作用、细胞摄取、细胞凋亡及耐药机制等评价设计的合理性和有效性,为临床脑胶质瘤化疗所致耐药问题提供一种新的解决方法。

1 材料

1.1 仪器

411 水套式CO₂细胞培养箱(美国Thermo Fisher公司);1260系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司);ME系列分析天平(美国Mettler-Toledo公司);SpectraMax i3x多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);Guava easyCyte系列微毛细管细胞流式分析仪(美国Millipore公司);Luminex液相芯片系统(美国Thermo Fisher公司);TG16W台式高速离心机(湖南星科仪器有限公司);Avanti J-26 XP高速冷冻离心机(美国Beckman公司);Pgp-Glo™分析系统(美国Progenia公司);ebioscience P-gp抗体结合试剂盒(美国Thermo Fisher公司);Milli-Q纯水系统、0.22、0.45、0.80 μm混合膜(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

汉防己甲素(批号20172942-2,质量分数>98%,西安四叶草生物技术有限公司);泰素(紫杉醇注射液,含PTX 1 mg/mL,货号KGA8222,江苏凯基生物技术股份有限公司);GIBCO DMEM培养基(美国Thermo Fisher公司);HyClone™系列青霉素、链霉素及胎牛血清(美国Thermo Fisher公司);含EDTA的0.25%胰酶、Hepes、谷氨酰胺、MTT细胞增殖试剂盒、细胞用DMSO(江苏凯基生物技术股份有限公司);BCA蛋白分析试剂盒(美国Thermo Fisher公司);维拉帕米(Verp)、RIPA强裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);罗丹明123(R123,江苏凯基生物技术股份有限公司);除特殊说明外,其他所用试剂均为分析纯。

1.3 细胞

鼠源胶质瘤C6细胞、鼠源多药耐药型脑胶质瘤C6/MDR细胞,购于赛齐生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 细胞培养

鼠源多药耐药型脑胶质瘤C6/MDR细胞,构建方式为经典的PTX浓度递增结合短期大剂量诱导法,直至半数抑制浓度(IC₅₀)与非耐药型C6细胞呈显著性差异($P<0.05$)。培养方法为无菌操作下将C6/MDR细胞悬浮液分散于含12%胎牛血清、1%双抗、10 mmol/L Hepes、3%谷氨酰胺的DMEM培养液中,置于细胞培养箱中培养,隔天换液,细胞密度长至80%左右时用含EDTA的0.25%胰酶消化、传代。本研究选用非耐药型C6细胞作为对照,

其培养方式与 C6/MDR 细胞相同。

2.2 药液制备

2.2.1 PTX 溶液制备 泰素为 PTX 市售制剂（内含 1 mg/mL PTX，辅料为 50% 聚氧乙烯蓖麻油-50% 乙醇），加药前用不完全培养基稀释成 0.01、0.10、1.00、2.00、5.00 $\mu\text{mol/L}$ PTX 溶液。

2.2.2 汉防己甲素溶液制备 取适量汉防己甲素溶于乙醇后，用不完全培养基稀释成 0.1、1.0、10.0、20.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素溶液。

2.2.3 汉防己甲素+PTX 溶液制备 取适量汉防己甲素溶于乙醇后，用不完全培养基稀释后按摩尔比与泰素混合，汉防己甲素+PTX（摩尔比 10:1）浓度设定为（0.1+0.01）、（1.0+0.10）、（10.0+1.00）、（20.0+2.00）、（50.0+5.00） $\mu\text{mol/L}$ ；汉防己甲素+PTX（摩尔比 5:1）、汉防己甲素+PTX（摩尔比 20:1）溶液按相应浓度配制。

2.3 PTX 含量测定方法^[15]

色谱柱为 Diamohsile C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm ），流动相为甲醇-水（75:25），体积流量为 1 mL/min，柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ ，检测波长为 227 nm，进样量为 10 μL 。

2.4 统计学方法

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间统计学比较采用 One-Way ANOVA 法检验。

2.5 细胞毒性考察

将处于对数生长期的 C6/MDR 和 C6 细胞以 5×10^3 个/mL 密度接种于 96 孔板，细胞培养箱中培

养至 60% 密度后，移除孔内培养基，加入“2.2”项配制的汉防己甲素、PTX、汉防己甲素+PTX 及不完全培养基，对照组为含有相应乙醇量的不完全培养基。孵育 48 h 后，每孔加入 20 mL 5 mg/mL MTT 的 PBS 溶液，继续避光孵育 4 h，吸弃培养液，加入 200 μL DMSO，多功能酶标仪振摇 3 min 后记录 490 nm 处吸光度（A）值。计算细胞的存活率、药物的半数抑制浓度（IC₅₀）和耐药逆转指数。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

$$\text{耐药逆转指数} = \text{PTX 对 C6 细胞的 IC}_{50} / \text{联合给药后 PTX 对 C6/MDR 细胞的 IC}_{50}$$

由表 1 可见，相比于 C6 细胞，汉防己甲素能够显著增强 PTX 对 C6/MDR 的细胞毒作用。PTX 对 C6 细胞的 IC₅₀ 为（24.56±3.15）nmol/L，加入 5~20 倍（摩尔比）的汉防己甲素后，体外对 C6 细胞的细胞毒性未获显著性提升。而 PTX 对 C6/MDR 细胞的 IC₅₀ 为（42.69±2.38）nmol/L，显著高于非耐药细胞株，但当 PTX 与 5 倍摩尔浓度的汉防己甲素联用后，PTX 对 C6/MDR 细胞的 IC₅₀ 下降为（14.29±1.84）nmol/L，显著低于 PTX 单用时的 IC₅₀（ $P < 0.01$ ），随着汉防己甲素与 PTX 摩尔比增加为 10:1 时，PTX 对 C6/MDR 细胞的 IC₅₀ 进一步下降至（5.88±0.43）nmol/L，显著低于 PTX 单用时的 IC₅₀（ $P < 0.01$ ）；继续加大汉防己甲素的量，IC₅₀ 未见明显下降。当汉防己甲素与 PTX 摩尔比为 10:1 时，耐药逆转指数为 4.17，结果提示汉防己甲素能够协同 PTX 逆转 C6/MDR 细胞的多药耐药。

表 1 汉防己甲素与 PTX 对耐药和非耐药型人脑胶质瘤细胞毒活性评价（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

Table 1 Cytotoxicity of tetrandrine and PTX against C6/MDR and C6 cells（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

组别	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)		逆转指数
	C6 细胞	C6/MDR 细胞	
汉防己甲素	4 353.85±47.28	4 818.23±38.54	—
PTX	24.56± 3.15	42.69± 2.38	—
汉防己甲素+PTX（5:1）	22.97± 2.54	14.29± 1.84**	1.72
汉防己甲素+PTX（10:1）	26.36± 1.38	5.88± 0.43**	4.17
汉防己甲素+PTX（20:1）	19.73± 2.39	5.73± 0.72**	4.29

除汉防己甲素组外其他各组的 IC₅₀ 均指 PTX 的 IC₅₀，与 PTX 组比较：** $P < 0.01$

IC₅₀ is represented by concentration of PTX, except tetrandrine group; ** $P < 0.01$ vs PTX group

2.6 细胞摄取

2.6.1 胞内 PTX 测定 将处于对数生长期的 C6/MDR 和 C6 细胞以 5×10^4 个/mL 密度接种于 24 孔板，细胞培养箱中培养至 80% 密度后，移除孔内

培养基，分别加入“2.2”项配制的 1 $\mu\text{mol/L}$ PTX、10 $\mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素+1 $\mu\text{mol/L}$ PTX、100 $\mu\text{mol/L}$ Verp+1 $\mu\text{mol/L}$ PTX，孵育 2 h 后，0.5 mL 冰 PBS 洗涤细胞 3 次，加入 120 μL RIPA 裂解液 37 $^{\circ}\text{C}$ 下

孵育 10 min 裂解细胞, 裂解液 $12\ 000\times g$ 离心 10 min, 取 100 μL 上清液, 加入等量甲醇, 涡旋振荡 5 min, $12\ 000\times g$ 离心 10 min, 取上清液采用“2.3”项方法检测 PTX 含量。另取上清液 20 μL , 用 BCA 试剂盒测蛋白含量。计算 PTX 胞内摄取量。

PTX 胞内摄取量 = 胞内 PTX 浓度 / 细胞蛋白含量

由表 2 可见, C6 细胞与 PTX 孵育 2 h 后, PTX 胞内摄取量为 $(13.63\pm 2.35)\ \mu\text{g}/\text{mg}$, 但是无论是汉防己甲素还是经典 P-gp 抑制剂 Verp 的加入, 均未能显著提高 C6 细胞对 PTX 的摄取量。而 C6/MDR 细胞经 PTX 处理后, PTX 胞内摄取量仅为 $(2.16\pm 0.38)\ \mu\text{g}/\text{mg}$, 但与 10 倍摩尔浓度的汉防己甲素联合给药后, C6/MDR 细胞对 PTX 的摄取量迅速提升 9.4 倍, 与单用 PTX 组比较差异显著 ($P<0.01$), 甚至略高于 100 倍摩尔浓度 Verp 所带来的摄取增强效应。通过 2 种细胞系和 3 个给药组的结果对比分析, 提示汉防己甲素具有促 PTX 跨耐药型脑胶质瘤细胞膜的能力。

表 2 汉防己甲素对耐药和非耐药型人脑胶质瘤细胞摄取 PTX 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 2 Effect of tetrandrine on cellular uptake of PTX in C6/MDR and C6 cells cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	PTX 摄取量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1})$	
	C6 细胞	C6/MDR 细胞
PTX	13.63 ± 2.35	2.16 ± 0.38
汉防己甲素+PTX (10:1)	15.33 ± 2.19	$20.30\pm 3.43^{**}$
Verp+PTX (100:1)	14.24 ± 1.36	$18.62\pm 2.14^{**}$

与 PTX 组比较: $^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs PTX group

2.6.2 胞内 R123 半定量法 将处于对数生长期的 C6/MDR 和 C6 细胞以 5×10^4 个/mL 密度接种于 24 孔板, 细胞培养箱中培养至 80% 密度后, 移除孔内培养基, 分别加入不完全培养基、5 $\mu\text{mol/L}$ R123、10 $\mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素+5 $\mu\text{mol/L}$ R123 及 100 $\mu\text{mol/L}$ Verp+5 $\mu\text{mol/L}$ R123, 分别孵育 2 h 后, 0.5 mL 冰 PBS 洗涤细胞 3 次, 用不含 EDTA 胰酶消化收集细胞悬浮液, 立即采用细胞流式仪测定样品荧光强度。计算胞内 R123 含量 (胞内 R123 含量 = 给药组荧光强度 - 对照组荧光强度)。

由表 3 结果可见, C6 细胞与 R123 孵育 2 h 后, 每 5 000 个细胞中荧光强度为 $4\ 829.29\pm 298.81$, 分别加入汉防己甲素和经典 P-gp 抑制剂 Verp 均未能显著提高其胞内的荧光强度。对于 C6/MDR 细胞,

表 3 汉防己甲素对耐药和非耐药型人脑胶质瘤细胞摄取 R123 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 Effect of tetrandrine on cellular uptake of R123 in C6/MDR and C6 cells cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	R123 摄取量(每 5 000 个细胞中荧光强度)	
	C6 细胞	C6/MDR 细胞
R123	$4\ 829.29\pm 298.81$	552.34 ± 63.36
汉防己甲素+R123	$5\ 194.29\pm 381.01$	$6\ 793.78\pm 437.93^{**}$
Verp+R123	$4\ 928.22\pm 420.02$	$7\ 028.25\pm 537.95^{**}$

与 R123 组比较: $^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs R123 group

同等细胞数量的荧光强度仅为 552.34 ± 63.36 , 但加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的汉防己甲素后, 荧光强度迅速提升 12.3 倍, 与单用 R123 比较差异非常显著 ($P<0.01$), 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Verp 所带来的摄取增强效应相当。通过 PTX 胞内定量分析以及 R123 胞内半定量荧光分析结果, 进一步证实了汉防己甲素有潜在的抑制 P-gp 生理功能的作用。

2.7 细胞凋亡

将处于对数生长期的 C6/MDR 和 C6 细胞以 1×10^5 个/mL 密度接种于 12 孔板, 细胞培养箱中孵育 24 h 后移除培养液, 分别加入 1 mL 1 $\mu\text{mol/L}$ PTX、10 $\mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素+1 $\mu\text{mol/L}$ PTX、100 $\mu\text{mol/L}$ Verp+1 $\mu\text{mol/L}$ PTX 孵育 6 h, 相同方法设置不完全培养基为对照组。0.5 mL 冰 PBS 洗涤细胞 3 次, 用不含 EDTA 胰酶消化、含有胎牛血清的 PBS 缓冲液 (1:9) 终止消化并收集细胞悬浮液, 取 100 μL 细胞悬液于 96 孔板中, 加入 100 μL Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒, 避光孵育 15 min, 立即采用流式细胞仪检测细胞凋亡。

由图 1 和表 4 可见, C6 细胞与 PTX 孵育 6 h 后, 能够诱导 $(38.29\pm 4.71)\%$ 的细胞进入凋亡程序, 加入汉防己甲素或者 Verp 后, 细胞凋亡率未见明显提高。而在 C6/MDR 细胞中, PTX 组的细胞凋亡率仅为 $(19.90\pm 2.11)\%$, 但当 10 $\mu\text{mol/L}$ 的汉防己甲素与 PTX 联用后, 细胞凋亡率显著升高至 2.3 倍, 与单用 PTX 组比较差异显著 ($P<0.01$), 甚至略高于 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Verp 所带来的凋亡诱导增强效应。结果提示, 汉防己甲素联合 PTX 给药能够显著增强耐药型脑胶质瘤细胞凋亡诱导能力。

2.8 P-gp 表达

将处于对数生长期的 C6/MDR 和 C6 细胞以 5×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔板, 细胞培养箱中孵育 24 h

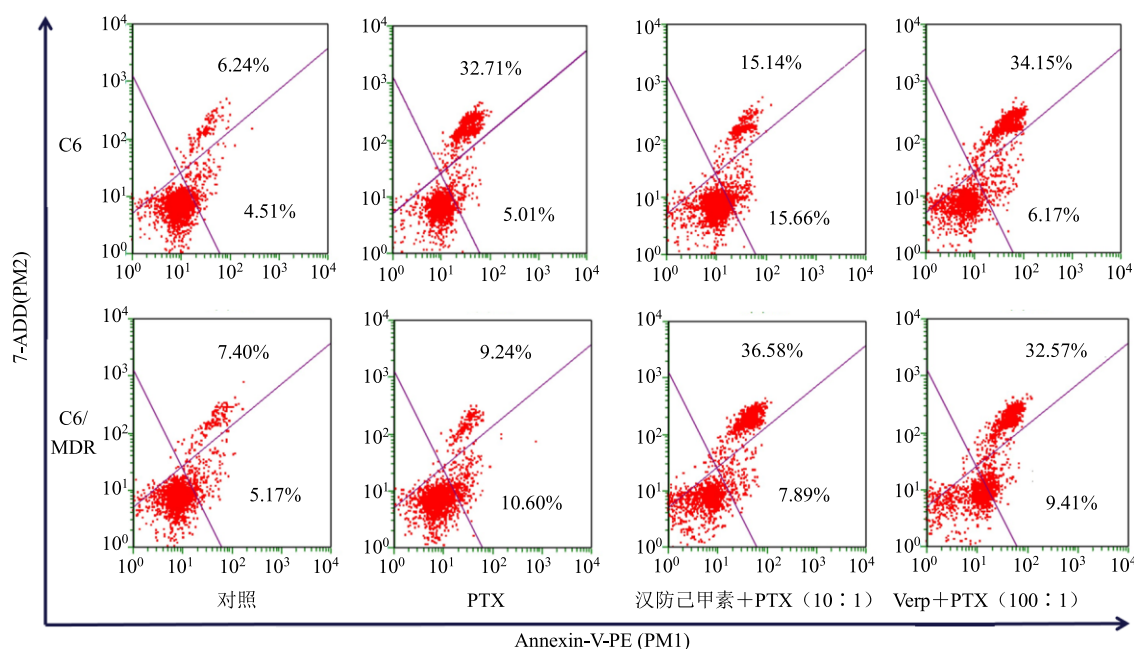


图 1 汉防己甲素和 PTX 对 C6 细胞和 C6/MDR 细胞凋亡的影响

Fig 1 Effects of tetrandrine and PTX on apoptosis of C6 and C6/MDR cells

表 4 汉防己甲素与 PTX 对耐药和非耐药型人脑胶质瘤细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Effects of tetrandrine and PTX on apoptosis rate of C6/MDR and C6 cells cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	早期+晚期凋亡率/%	
	C6 细胞	C6/MDR 细胞
对照	9.94 ± 0.74	11.34 ± 1.69
PTX	38.29 ± 4.71	19.90 ± 2.11
汉防己甲素+PTX (10:1)	31.84 ± 5.36	46.63 ± 3.72**
Verp+PTX (100:1)	42.33 ± 3.35	40.11 ± 5.49**

与 PTX 组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs PTX group

后移除培养液, 分别加入 2.0 mL 1 $\mu\text{mol/L}$ PTX、10 $\mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素+1 $\mu\text{mol/L}$ PTX、100 $\mu\text{mol/L}$ Verp+1 $\mu\text{mol/L}$ PTX 孵育 4 h。0.5 mL 冰 PBS 洗涤细胞 3 次, 消化收集细胞, 1 000 $\times g$ 离心 5 min 后 PBS 重悬。分别加入 20 μL 抗人 CD243 (ABCB1) PE 溶液和等量小鼠源 IgG2ak 对照 PE 溶液, 继续孵育 30 min, 随后样品立即采用流式细胞仪记录抗体 (P-gp-PE) 的荧光强度, 以此表示 P-gp 的表达水平^[11,16]。

由图 2 和表 5 可见, 未经药物处理的 C6 细胞和 C6/MDR 细胞的 P-gp-PE 荧光强度分别为 29.18 ± 2.14 和 168.24 ± 13.59 , 两者差异具有显著性 ($P < 0.01$)。当用 PTX 处理 C6/MDR 细胞后, P-gp-PE 的荧光强度未见明显变化。汉防己甲素+PTX 组处理 C6/MDR

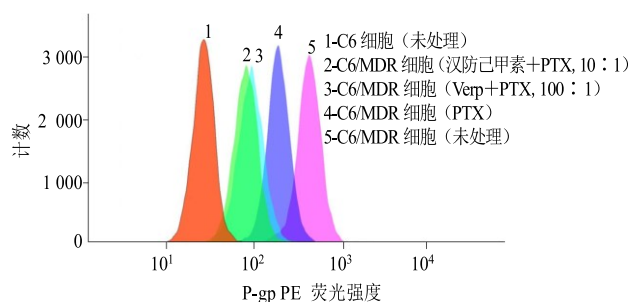


图 2 汉防己甲素与 PTX 对耐药和非耐药型人脑胶质瘤细胞 P-gp 表达的影响

Fig 2 Effects of tetrandrine and PTX on expression of P-gp of C6/MDR and C6 cells cells

表 5 汉防己甲素与 PTX 对耐药和非耐药型人脑胶质瘤细胞 P-gp 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Effects of tetrandrine and PTX on expression of P-gp in C6/MDR and C6 cells cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	P-gp-PE 荧光强度
C6 细胞 (未处理)	29.18 ± 2.14
C6/MDR 细胞 (未处理)	168.24 ± 13.59 ^{##}
C6/MDR 细胞 (PTX 处理)	159.29 ± 23.12
C6/MDR 细胞 (汉防己甲素+PTX, 10:1)	85.27 ± 10.42**
C6/MDR 细胞 (Verp+PTX, 100:1)	142.23 ± 17.25

与 C6 细胞 (未处理) 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 C6/MDR 细胞 (未处理) 组比较: ** $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs C6 cells group; ** $P < 0.01$ vs C6/MDR cells group

细胞后, P-gp-PE 的荧光强度下降至 85.27 ± 10.42 , 明显低于未处理组 ($P < 0.01$), 但 $100 \mu\text{mol/L}$ Verp 与 PTX 联用未能显著降低 C6/MDR 细胞 P-gp 的表达。结果提示, $10 \mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素抑制 P-gp 的机制可能与 Verp 有所不同, 此浓度下的汉防己甲素能够显著抑制 P-gp 的表达。

2.9 P-gp ATP 酶活性

本实验以 Verp 为阳性对照, 以不同浓度的汉防己甲素为测试组, 采用 Pgp-Glo™ 分析系统 (试剂盒) 评价上述 2 种化合物对 P-gp ATP 酶的活性的影响。首先, 按照说明书制备 P-gp 膜, 在 96 孔板内加入 $50 \mu\text{L}$ 试剂盒内专用缓冲液和 $50 \mu\text{L}$ P-gp 膜, 再分别加入不完全培养基, $2 \mu\text{mol/L}$ PTX, 1 、 10 、 20 、 $50 \mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素, $100 \mu\text{mol/L}$ Verp, $100 \mu\text{mol/L}$ 原钒酸钠 (细胞 ATP 酶抑制剂), 混合完毕后细胞培养箱中孵育 $5 \sim 10 \text{ min}$, 再加入 $25 \mu\text{L}$ Mg-ATP, 继续孵育 40 min 后加入试剂盒内专用 ATP 检测试剂, 用液相芯片系统测定相对光单位 (RLU), 而 ΔRLU ($\Delta\text{RLU} = \text{RLU}_{\text{原钒酸钠}} - \text{RLU}_{\text{测试组}}$) 则反映化合物对 P-gp ATP 酶活性的影响^[11,16]。由于原钒酸钠属于广谱性胞内 ATP 酶抑制剂, 能够无选择性抑制胞内各种磷酸酶, 因此测试组若能够刺激 P-gp ATP 酶活性, 那么体现在 ΔRLU 值方面即为正值, 反之则为负值。

由表 6 可见, 空白组和 PTX 组的 ΔRLU 均在 $10\ 000$ 以下, 且二者并无显著性差异。而 1 、 10 、 20 、 $50 \mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素的 ΔRLU 值则显著高于空白组 ($P < 0.01$), 其中 10 、 20 、 $50 \mu\text{mol/L}$ 汉防己甲素对 P-gp ATP 酶活性的刺激干扰作用类似于 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 Verp。结果表明一定浓度下的汉防己

甲素能够与 Verp 一样通过刺激 P-gp ATP 酶活性来干扰 P-gp 正常的生理功能。

3 讨论

脑胶质瘤在手术切除过程中很难清除完全, 因此残存的肿瘤细胞只能通过化疗手段二次清除。但是数个疗程后, 耐药的肿瘤细胞以及乏氧区的肿瘤细胞逐渐对化疗药物失敏, 这也是临床化疗失败的主要原因, 抗肿瘤研究工作者们长期致力于寻找一种安全可靠的多药耐药逆转剂。现阶段已有报道, 诸如 Verp、环孢素 A 等均具有确切的 P-gp 抑制作用, 在细胞和动物水平均表现出一定程度的耐药逆转效应^[17-18]。但是 Verp 主要通过刺激 P-gp ATP 酶活性的机制来逆转耐药, 起效浓度较高, 且其本身也是一种降血压的药物, 因此该类药物与化疗药物联用对抗多药耐药也存在其他毒副作用的风险。同样地, 环孢素 A 本身也是一种免疫抑制剂, 将其与化疗药物联合使用时, 化疗患者机体的免疫功能将有可能遭受进一步的伤害, 因此该类方案实用性非常有限。

许多中药虽然直接杀伤肿瘤细胞的效应不明显, 但是在抗肿瘤过程中与化疗药物协同优势却非常突出。诸如人参、汉防己、五味子等中药的有效成分毒性较低, 对耐药型肿瘤细胞的耐药蛋白作用明显, 在促进化疗药物杀伤耐药肿瘤细胞方面有较大潜力^[19]。本研究选用汉防己中的汉防己甲素作为潜在的 P-gp 抑制剂和化疗药物 PTX 联合给药, 在体外抑制 C6/MDR 细胞增殖方面表现出明显的协同抗肿瘤效应, 此外, 通过考察汉防己甲素+PTX (摩尔比) 和逆转指数之间的影响得知, $10:1$ 及以下的比例能够最大程度地发挥 2 药的协同抗肿瘤作用, 因此后续研究均以汉防己甲素/PTX ($10:1$) 作为药物组合比例。通过 2 种细胞系和不同给药组的干预, 观察到 PTX 对敏感株细胞的凋亡诱导现象非常明显, 但是汉防己甲素或者 Verp 的引入对其无显著性影响, 表明 PTX 与耐药逆转剂联用对敏感株细胞系的凋亡诱导无促进作用; 与此不同的是, PTX 对耐药株细胞的凋亡诱导作用则不明显, 只有当 10 倍浓度汉防己甲素或者 100 倍浓度 Verp 与其联用, 才能显著提高细胞凋亡率, 提示耐药逆转剂主要通过提高 C6/MDR 细胞的凋亡来增强细胞毒性的。

为了证实汉防己甲素促 PTX 体外抗肿瘤效果增强的作用与提高其细胞摄取有关, 本研究考察了汉防己甲素加入前后 PTX 被 C6/MDR 细胞摄取的

表 6 汉防己甲素对 P-gp ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 6 Effects of tetrandrine on activity of P-gp ATPase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\Delta\text{RLU}/(\times 10^3)$
空白	—	5.26 ± 0.54
PTX	2	7.29 ± 3.01
汉防己甲素	1	$12.83 \pm 1.18^{**}$
	10	$46.24 \pm 3.19^{**}$
	20	$48.25 \pm 5.10^{**}$
	50	$44.24 \pm 3.04^{**}$
Verp	100	$48.13 \pm 4.15^{**}$

与空白组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

量。通过定量考察等量细胞内的 PTX 含量发现, 汉防己甲素能够显著增强 PTX 的胞内聚集。为进一步证实汉防己甲素是通过干预 P-gp 功能来促进药物摄取, 本研究还以 R123 (一种经典的 P-gp 底物) 为荧光探针考察汉防己甲素加入前后 C6/MDR 细胞内的荧光强度, 结果进一步证实了汉防己甲素对 P-gp 功能的干预作用。此外, 为进一步阐明汉防己甲素逆转耐药的具体分子机制与抑制 P-gp 表达和刺激 P-gp ATP 酶活性有关, 本研究设置了 PTX、汉防己甲素+PTX、Verp+PTX 3 个实验组, 利用 P-gp 抗体染色和 P-gp ATP 酶分析试剂盒检测 P-gp 表达量以及 P-gp ATP 酶的活性, 结果表明汉防己甲素与 Verp 的耐药机制有所不同, 前者既可刺激 P-gp ATP 酶活性, 又能下调 P-gp 表达降低, 通过“双管齐下”的方式干扰 P-gp 的功能, 保证了 PTX 在耐药细胞内能够高效长时地聚集, 进而提高了抗肿瘤疗效。

综上所述, 本课题针对临床常见的脑胶质瘤耐药问题, 通过体外抗肿瘤、细胞摄取和耐药逆转机制等实验初步证实了汉防己甲素联合 PTX 逆转 C6/MDR 细胞多药耐药的有效性。下一步, 本课题组将继续优化 PTX 和汉防己甲素的联合给药方式, 考察体内外结果是否具有较高的关联性, 并从体内水平评价联合治疗的安全性和应用转化能力, 为临床应对肿瘤耐药问题提供更丰富的解决方案和治疗思路。

参考文献

- [1] Agrawal N S, Miller R J, Lal R, *et al.* Current studies of immunotherapy on glioblastoma [J]. *J Neurol Neurosurg*, 2014, 1(1): 1000104.
- [2] Stern J I, Raizer J J. Chemotherapy in the treatment of malignant gliomas [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, 6: 755-767.
- [3] Gao Z, Zhang L, Sun Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance [J]. *J Control Release*, 2012, 162(1): 45-55.
- [4] Kirtane A R, Kalscheuer S M, Panyam J. Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(13/14): 1731-1747.
- [5] Fletcher J I, Haber M, Henderson M J, *et al.* ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2): 147-156.
- [6] He C, Lu K, Liu D, *et al.* Nanoscale metal-organic frameworks for the co-delivery of cisplatin and pooled siRNAs to enhance therapeutic efficacy in drug-resistant ovarian cancer cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(14): 5181-5184.
- [7] 沈小玲, 胡英杰, 禹志领, 等. 中药逆转 P-糖蛋白介导的肿瘤多药耐药的研究进展 [J]. *中国天然药物*, 2009, 7(6): 465-475.
- [8] 汤涛, 董伟, 张婧, 等. 中药单体成分逆转肿瘤多药耐药的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 792-797.
- [9] 李晓朋, 冯子强, 石雪萍, 等. 吴茱萸碱逆转 K562/Adr 细胞多药耐药的实验研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(12): 2123-2129.
- [10] 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.
- [11] Qu D, Wang L, Liu M, *et al.* Oral nanomedicine based on multicomponent microemulsions for drug-resistant breast cancer treatment [J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(4): 1268-1280.
- [12] Su X, Gao C, Shi F, *et al.* A microemulsion co-loaded with Schizandrin A-docetaxel enhances esophageal carcinoma treatment through overcoming multidrug resistance [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 10-19.
- [13] Li X, Su B, Liu R, *et al.* Tetrandrine induces apoptosis and triggers caspase cascade in human bladder cancer cells [J]. *J Surg Res*, 2011, 166(1): e45-51.
- [14] Liu W, Kou B, Ma ZK, *et al.* Tetrandrine suppresses proliferation, induces apoptosis, and inhibits migration and invasion in human prostate cancer cells [J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(5): 850-853.
- [15] Zhang C, Qu G, Sun Y, *et al.* Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of N-octyl-O-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(9): 1233-1241.
- [16] Mo R, Jin X, Li N, *et al.* The mechanism of enhancement on oral absorption of paclitaxel by N-octyl-O-sulfate chitosan micelles [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(20): 4609-4620.
- [17] Zhang H, Jiang W, Liu R, *et al.* Rational design of metal organic framework nanocarrier-based codelivery system of doxorubicin hydrochloride/verapamil hydrochloride for overcoming multidrug resistance with efficient targeted cancer therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(23): 19687-19697.
- [18] Joshi P, Vishwakarma R A, Bharate S B. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 273-292.
- [19] Zhou B, Xiao X, Xu L, *et al.* A dynamic study on reversal of multidrug resistance by ginsenoside Rh₂ in adriamycin-resistant human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Talanta*, 2012, 88: 345-351.