

丹参酮 II_A 对阿霉素耐药人乳腺癌细胞的多药耐药逆转作用及机制研究

宁玉明¹, 潘一帆¹, 李范珠²

1. 杭州市富阳区妇幼保健院, 浙江 杭州 311400

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311400

摘要: 目的 研究丹参酮 II_A 对阿霉素耐药人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 的多药耐药逆转作用及相关机制。方法 分别用丹参酮 II_A、阿霉素、阿霉素联合丹参酮 II_A 处理人乳腺癌 MCF-7 细胞和 MCF-7/ADR 细胞, 采用 MTT 法检测细胞增殖率; 流式细胞术检测丹参酮 II_A 干预后 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积量的变化; 检测丹参酮 II_A 干预后 MCF-7/ADR 细胞三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 消耗量的变化; 采用 qRT-PCR、Western blotting 法检测丹参酮 II_A 干预后 MCF-7/ADR 细胞 ATP 结合转运蛋白 B1 (ATP-binding cassette transporter B1, ABCB1)、ABCG2 和 ABCC1 基因和蛋白表达的变化。结果 丹参酮 II_A 显著抑制 MCF-7 及 MCF-7/ADR 细胞增殖 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性; 丹参酮 II_A 能够逆转 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药性 ($P < 0.05$), 增加 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素的蓄积 ($P < 0.05$), 减少 MCF-7/ADR 细胞的 ATP 消耗 ($P < 0.05$), 显著下调 ABCC1 和 ABCG2 基因和蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 丹参酮 II_A 能够通过调控 ABCG2、ABCC1 介导的转运, 逆转 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药性。

关键词: 丹参酮 II_A; 阿霉素; 乳腺癌; 多药耐药; ABC 转运蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)22-6890-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.014

Reversal effect and mechanism of tanshinone II_A on multidrug resistance of doxorubicin-resistant human breast cancer cells

NING Yu-ming¹, PAN Yi-fan¹, LI Fan-zhu²

1. Hangzhou Fuyang Women and Children Hospital, Hangzhou 311400, China

2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To study the reversal effect of tanshinone II_A on multidrug resistance of doxorubicin-resistant human breast cancer cells MCF-7/ADR and related mechanisms. **Methods** Human breast cancer MCF-7 cells and MCF-7/ADR cells were respectively treated with tanshinone II_A, doxorubicin, doxorubicin + tanshinone II_A, cell proliferation rate was detected by MTT method; Doxorubicin accumulation in MCF-7/ADR cells after tanshinone II_A intervention was detected by flow cytometry; Change of adenosine triphosphate (ATP) consumption in MCF-7/ADR cells after tanshinone II_A intervention was detected; qRT-PCR and Western blotting were used to detect ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1), ABCG2 and ABCC1 genes and protein expressions in MCF-7/ADR cells after tanshinone II_A intervention. **Results** Tanshinone II_A significantly inhibited the cell proliferation of MCF-7 and MCF-7/ADR cells ($P < 0.05$), with dose-dependent; Tanshinone II_A reversed the multidrug resistance of MCF-7/ADR cells ($P < 0.05$), increased the accumulation of doxorubicin in MCF-7/ADR cells ($P < 0.05$), reduced the ATP consumption of MCF-7/ADR cells ($P < 0.05$), down-regulated the expressions of ABCC1 and ABCG2 genes and proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone II_A can reverse the multidrug resistance of MCF-7/ADR cells by regulating the transport mediated by ABCG2 and ABCC1.

Key words: tanshinone II_A; doxorubicin; breast cancer; multidrug resistance; ABC transporter

乳腺癌是全世界女性最常见的癌症之一, 也是女性癌症死亡的主要原因^[1]。化疗是治疗乳腺癌的主要临床手段之一。自 20 世纪 30 年代后期引入化

疗以来, 已经有 200 多种化合物被批准用于肿瘤治疗。然而癌细胞不断发展的多药耐药性严重限制了化疗药物的作用, 显著降低了其临床疗效。乳腺癌

收稿日期: 2021-06-17

基金项目: 杭州市科技计划项目 (20171226Y187)

作者简介: 宁玉明 (1976—), 女, 博士, 研究方向为药物新剂型及药物临床应用研究。Tel: 13968190002 E-mail: cndnym@163.com

细胞的耐药性往往具有多重机制,其中基因表达导致的多药耐药最受关注,特别是三磷酸腺苷结合盒(adenosine triphosphate-binding cassette, ABC)家族成员如 ABCB1、ABCG2 和 ABCC1 的过表达,增加了细胞毒性药物的外排,导致化疗药物细胞内积累减少,疗效降低甚至发生耐药。因此,抑制或下调 ABC 转运蛋白的表达成为逆转多药耐药的策略之一^[2-3]。自 1981 年第 1 个 ABCB1 抑制剂维拉帕米被报道以来,多种 ABC 转运体抑制剂相继被研究开发,但由于其亲和力较低、药物间不可预测的相互作用和毒性,很少用于临床常规治疗^[2,4-5]。此外,大多数已被报道的 ABC 转运蛋白抑制剂在体内并没有表现出预期的抗癌效果^[6]。因此,开发新型 ABC 转运蛋白抑制剂的研究仍在进行中。

阿霉素属于蒽环类药物,是目前治疗乳腺癌最有效的化疗药物之一^[7]。心脏毒性是其主要不良反应之一。阿霉素是 ABCB1、ABCG2 及 ABCC1 的反应底物^[8-9]。丹参酮 II_A 是丹参的脂溶性有效成分,《中国药典》2020 年版将其作为丹参提取物的质量控制指标之一^[10-12]。丹参酮 II_A 具有心血管保护、抗肿瘤的作用^[13-20]。研究发现,丹参酮 II_A 可以增加阿霉素在阿霉素耐药人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 中的蓄积,提示丹参酮 II_A 可能有逆转人乳腺癌获得性多药耐药的作用^[21]。本研究考察丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药逆转作用及相关机制,以为乳腺癌治疗提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株

人乳腺癌 MCF-7 细胞及 MCF-7/ADR 细胞由浙江大学药学院应晓英研究员惠赠。

1.2 药品与试剂

丹参酮 II_A (批号 I14010E8, 质量分数≥98%)、盐酸维拉帕米 (批号 K1417048, 质量分数≥99%) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 盐酸阿霉素 (批号 1050-C190901, 质量分数≥98%) 购自浙江海正药业股份有限公司; ABCG2 选择性抑制剂 Ko143 (质量分数≥98%)、二甲基亚砜 (DMSO)、Triton X-100、cocktail 蛋白酶抑制剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司; DMEM 培养基 (批号 10566-016)、0.25%胰酶-0.02%EDTA、胎牛血清、双抗购自美国 Gibco 公司; HBSS、PBS 购自杭州吉诺生物制品有限公司; MTT 购自美国 Amresco 公司; 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 检

测试试剂盒、RIPA 裂解液 (批号 P0013)、PMSF (批号 ST506)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 P0015) 购自碧云天生物技术有限公司; BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 CW0014S) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; TRIzol® Reagent 购自英国 Invitrogen 公司; The first strand cDNA synthesis kit 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; GoTaq® Qpcr Master Mix 购自美国 Promega 公司; 引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成; ABCB1 单克隆抗体 (批号 ab170904)、ABCC1 单克隆抗体 (批号 ab180960)、ABCG2 单克隆抗体 (批号 ab108312) 购自英国 Abcam 公司; GAPDH 单克隆抗体 (批号 E021010-01) 购自美国 ImmunoWay 公司; 山羊抗兔抗体 (926-68071)、山羊抗鼠抗体 (926-32210) 购自美国 LI-COR 公司; 其他试剂购自国药集团有限公司, 均为分析纯或色谱纯。

1.3 仪器

CP225D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); Mill-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 倒置显微镜 (Nikon 公司); 低温离心机、5% CO₂ 培养箱、生物安全柜、Nano Drop 分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SpectraMax M2 酶标仪、FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 MD 公司); PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); qRT-PCR 仪、蛋白质电泳及电转移装置 (美国 Bio-Rad 公司); 奥德赛红外荧光成像分析系统 (美国 LI-COR 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7 细胞用含 10%胎牛血清、1%双抗、1% L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, MCF-7/ADR 细胞另加入 1.840 μmol/L 盐酸阿霉素维持耐药性。当细胞融合度达到 80%~90%, 用胰酶消化后传代。

2.2 MTT 法考察丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞存活率的影响

取对数生长期的 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞, PBS 漂洗 2 次, 胰酶消化后, 1000 r/min 离心 5 min, 用 DMEM 培养基重悬, 以 1×10⁴/mL 接种于 96 孔板, 培养 24 h。吸去培养基, 每孔加入 150 μL 终浓度为 0.034、0.170、0.340、0.680、1.700、3.400、17.000、34.000、68.000 μmol/L 的丹参酮 II_A 溶液, 另设空白组加入不含药物的培养基, 孵育 48 h, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL MTT 溶液 (0.5 mg/mL),

继续培养 4 h, 弃去上清液, 加入 150 μL DMSO, 摇床振摇 10 min, 用多功能酶标仪测定 570 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 MTT 法考察丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞阿霉素敏感性的影响

取对数生长期的 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞, PBS 漂洗 2 次, 胰酶消化后, 1000 r/min 离心 5 min, 用 DMEM 培养基重悬, 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, 培养 24 h。吸去培养基, 每孔加入 150 μL 终浓度为 0.023、0.230、2.300、11.499、22.998、45.996、91.993、183.986 $\mu\text{mol/L}$ 的阿霉素溶液, 或各浓度阿霉素联合丹参酮 II_A (0.034、0.340 $\mu\text{mol/L}$)、各浓度阿霉素联合盐酸维拉帕米 (2.200 $\mu\text{mol/L}$)、各浓度阿霉素联合 Ko143 (1.065 $\mu\text{mol/L}$), 继续孵育 48 h。按“2.2”项下方法测定 A 值, 并计算半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀)、耐药逆转倍数及耐药指数。

$$\text{耐药逆转倍数} = \text{阿霉素 IC}_{50} / \text{联合用药 IC}_{50}$$

$$\text{耐药指数} = \text{MCF-7 细胞 IC}_{50} / (\text{MCF-7/ADR 细胞 IC}_{50})$$

2.4 流式细胞术检测丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积的影响

MCF-7/ADR 细胞以 $3 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板, 培养 24 h。吸去培养基, PBS 漂洗 1 次, 设置对照组、丹参酮 II_A (0.034、0.340 $\mu\text{mol/L}$) 组、维拉帕米 (2.200 $\mu\text{mol/L}$) 组和 Ko143 (1.065 $\mu\text{mol/L}$) 组, 各给药组加入 1 mL 含相应药物的 DMEM 培养基, 预孵育 1 或 3 h, 弃去培养基, 另加入 1 mL 含 18.400 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素的上述各培养基继续孵育 4 h, 对照组只加入含 18.400 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素的培养基, 吸去培养基, PBS 洗 3 次, 用 250 μL 胰酶消化 2 min 后, 加入 DMEM 培养基终止消化, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 冰 PBS 吹匀, 1000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次, 过 70 μm 滤膜, 加至 96 孔板, 采用流式细胞仪测定阿霉素荧光强度。

2.5 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ATP 消耗的影响

取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 24 孔板, 培养 48 h, PBS 洗 3 次, 设置对照组、丹参酮 II_A (0.340、1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组和维拉帕米 (2.200 $\mu\text{mol/L}$) 组, 各组加入 0.5 mL 含相应药物的 DMEM 培养基, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 48 h。按 ATP 检测试剂盒说明书处理细胞, 用酶标仪化学发光模块检测相对光单位

值, 通过 ATP 标准曲线换算成 ATP 浓度, 用 BCA 蛋白试剂盒检测每孔细胞蛋白水平校正 ATP 浓度。

2.6 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞相关基因表达的影响

MCF-7/ADR 细胞以 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 6 孔板, 2 mL/孔, 培养 48 h, 吸去培养基, PBS 漂洗 2 次, 设置对照组、丹参酮 II_A (0.340、1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组和维拉帕米 (2.200 $\mu\text{mol/L}$) 组, 各组加入 1.5 mL 含相应药物的 DMEM 培养基, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 48 h。PBS 洗 3 次, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
ABCB1	F: CCGCTGTTTCGTTTCCTTTAG R: CTTCCTTTGCTCCTCCATTGC
ABCC1	F: GCTGTGAAGACCCAGGAGAG R: AAGCACCAGGAAACCACTTG
ABCG2	F: TTTAGAGAGGCGAGGGGTTT R: GGCTCAGTGGAGATGGTGTC
GAPDH	F: TACTCAGCACCAGCATCACC R: CAAATTCCACGGCACAGTC

2.7 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞相关蛋白表达的影响

MCF-7/ADR 细胞以 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 25 cm² 培养瓶, 4 mL/瓶, 培养 48 h 后, 吸去培养基, PBS 漂洗 2 次, 设置对照组、丹参酮 II_A (0.340、0.680、1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组和维拉帕米 (2.200 $\mu\text{mol/L}$) 组, 各组加入 4 mL 含相应药物的 DMEM 培养基, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 48 h。收集细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 150 μL RIPA 裂解液 (含 cocktail 蛋白酶抑制剂及 PMSF), 于冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min, 于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 牛血清蛋白封闭 1~2 h, 分别加入 ABCB1、ABCG2、ABCC1 抗体 (1:1000) 和 GAPDH 抗体 (1:5000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜; 加入荧光二抗 (1:5000), 室温避光孵育 2 h, TBST 缓冲液漂洗 5 次, 8 min/次, 采用红外荧光成像分析系统扫描。

2.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student's *t* 检验对

两组之间的数据进行比较；采用 ANOVA 对多组之间的数据进行比较，post-hoc 采用 Tukey 比较。

3 结果

3.1 丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞存活率的影响

如图 1 所示，丹参酮 II_A (17.000、34.000、68.000 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 MCF-7 细胞 48 h 后，MCF-7 细胞存活率明显降低；丹参酮 II_A (0.680、1.700、3.400、17.000、34.000、68.000 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 MCF-7/ADR 细胞 48 h 后，MCF-7/ADR 细胞存活率明显降低。因此后续丹参酮 II_A 分别选取不高于 0.340、3.400 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 进行实验。

3.2 丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞阿霉素敏感性的影响

如表 2 所示，阿霉素分别作用于 MCF-7 和

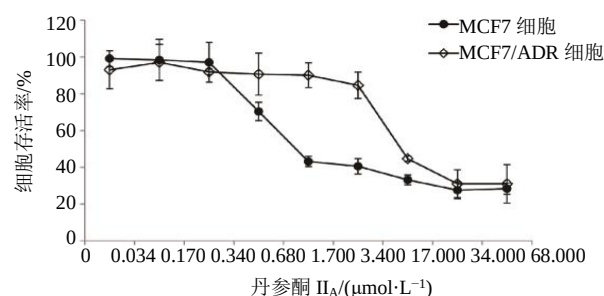


图 1 丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of tanshinone II_A on proliferation of MCF-7 and MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

MCF-7/ADR 细胞 48 h 后，IC₅₀ 值分别为 (1.799 ± 0.109) $\mu\text{mol/L}$ 和 (34.865 ± 2.383) $\mu\text{mol/L}$ ，表明 MCF-7/ADR 细胞具备耐药性。与阿霉素组比较，ABCB1 经典抑制剂维拉帕米、ABCG2 选择性

表 2 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药逆转作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of tanshinone II_A on reversing MDR in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MCF-7 细胞		MCF-7/ADR 细胞		耐药指数
		IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	逆转倍数	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	逆转倍数	
阿霉素	—	1.799 ± 0.109	1.000	34.865 ± 2.383	1.000	19.384
丹参酮 II _A	0.034	1.933 ± 0.039	0.931	23.670 ± 0.127*	1.473	12.245
	0.340	1.611 ± 0.051	1.117	13.890 ± 0.495**	2.510	8.622
维拉帕米	2.200	1.782 ± 0.040	1.010	8.046 ± 0.506**	4.333	4.515
Ko143	1.065	1.933 ± 0.051	1.075	26.807 ± 3.960*	1.301	13.868

与阿霉素组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs doxorubicin group

抑制剂 Ko143 及丹参酮 II_A 均能引起 MCF-7/ADR 细胞阿霉素的 IC₅₀ 值显著降低 ($P < 0.05$)，0.034、0.340 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞多药耐药的逆转倍数分别为 1.473、2.510 倍。维拉帕米、Ko143 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞活性的影响已在前期实验经过考察，本研究中所用浓度均为无毒剂量。结果提示丹参酮 II_A 可显著增强 MCF-7/ADR 细胞对阿霉素的敏感性。

3.3 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积的影响

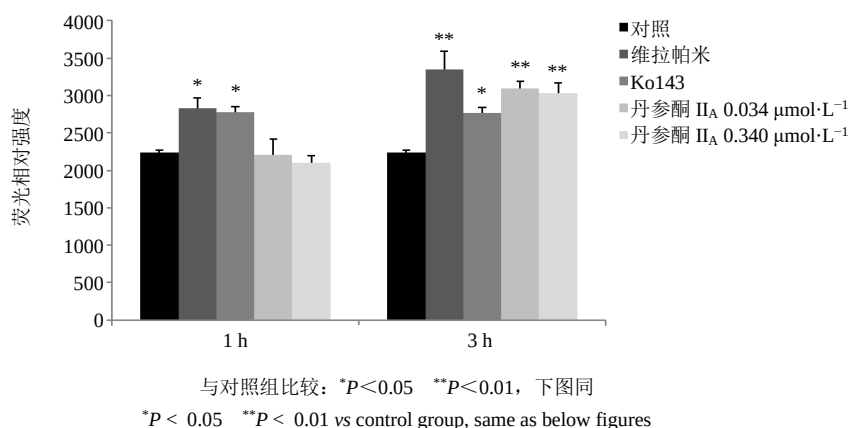
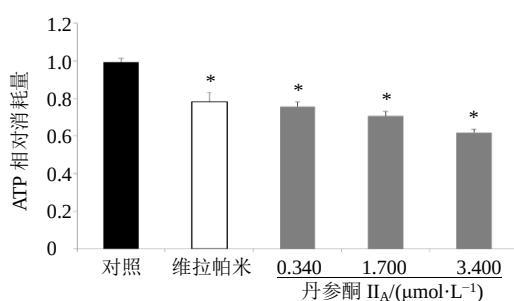
如图 2 所示，孵育时间为 1 h 时，维拉帕米、Ko143 均能显著增加 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积 ($P < 0.05$)，丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积作用不明显。当孵育时间延长至 3 h 时，各给药组 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积量均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)，维拉帕米对 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积作用最明显，Ko143 的作用最弱，结果与多药耐药逆转实验基本一致。

3.4 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ATP 消耗的影响

ABC 转运蛋白利用 ATP 作为能量来源介导转运，细胞内 ATP 消耗结果见图 3，丹参酮 II_A (0.340、1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 处理 MCF-7/ADR 细胞后，胞内 ATP 消耗量显著降低 ($P < 0.05$)，呈剂量相关性，提示丹参酮 II_A 可能对包括 ABCB1 在内的多种 ABC 转运蛋白均有抑制作用。

3.5 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 基因表达的影响

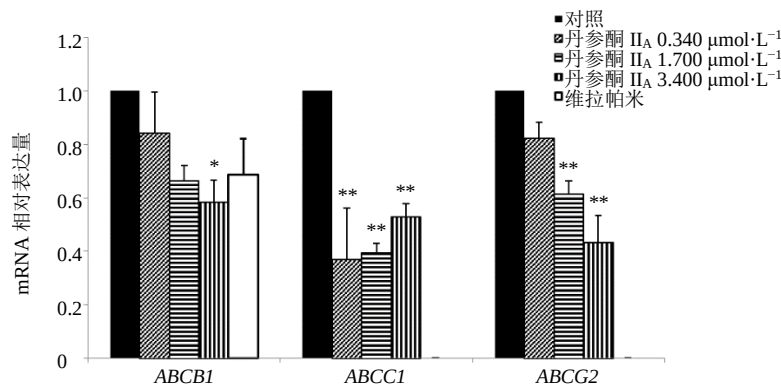
如图 4 所示，与对照组比较，丹参酮 II_A (3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组 MCF-7/ADR 细胞 ABCB1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，丹参酮 II_A (0.340、1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组 MCF-7/ADR 细胞 ABCC1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)，丹参酮 II_A (1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组 MCF-7/ADR 细胞 ABCG2 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)，提示丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞多药耐药的逆转作用可能与下调

图 2 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞内阿霉素蓄积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effect of tanshinone II_A on accumulation of doxorubicin in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 3 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞内 ATP 消耗的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of tanshinone II_A on consumption of ATP in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ABCG2 和 ABCC1 mRNA 表达有关。

3.6 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,丹参酮 II_A (0.340、0.680、1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组 MCF-7/ADR 细胞 ABCG2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),丹参酮 II_A (1.700、3.400 $\mu\text{mol/L}$) 组 MCF-7/ADR 细胞 ABCC1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ABCB1 蛋白表达无明显影响,提示丹参酮 II_A 逆转 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药作用与抑制 ABCG2 和 ABCC1 蛋白表达有关。

图 4 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ABCB1、ABCG2 和 ABCC1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of tanshinone II_A on expressions of ABCB1, ABCG2 and ABCC1 mRNA in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

随着我国对中医药传承创新发展的重视,探索中药联合化疗药物的疗效及作用机制将是抗肿瘤的发展方向之一。研究表明,丹参酮 II_A 对阿霉素诱导的心脏毒性具有保护作用^[17];阿霉素与丹参酮 II_A 可协同抑制肝癌 HepG2 细胞^[22];丹参酮 II_A 具有一定的多药耐药逆转作用,可通过下调结肠癌细胞

ABCB1 表达从而增强 5-氟尿嘧啶的抗癌活性^[23];丹参酮 II_A 能够通过抑制胎盘 ABCB1 的表达而降低其外排功能^[24],降低 ABCB1、DNA 拓扑异构酶 II (topoisomerase II, TOPO II) 的表达逆转小鼠 Lewis 肺癌获得性多药耐药性 (耐阿霉素)^[25]。丹参酮 II_A 对人 ER 阴性乳腺癌细胞具有多药耐药逆转作用,其作用机制可能与下调多药耐药基因 ABCG2 表达

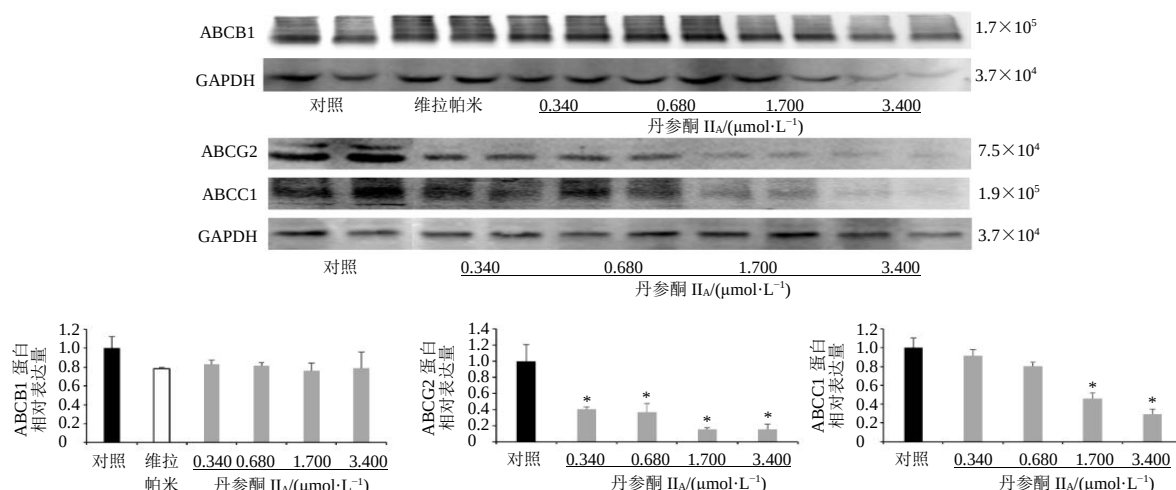


图 5 丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ABCB1、ABCG2 和 ABCC1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of tanshinone II_A on expressions of ABCB1, ABCG2 and ABCC1 protein in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

有关^[26]。丹参酮 II_A 可通过抑制 ABCC1 的活性增强阿霉素对耐药胃癌细胞的抗癌作用^[27]。本研究通过联用丹参酮 II_A 与阿霉素, 考察其对 MCF-7/ADR 细胞多药耐药的逆转作用及机制。

本研究发现, 丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞具有一定的抗肿瘤活性, 并且丹参酮 II_A 联合阿霉素能够有效逆转 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药性。维拉帕米是 ABCB1 转运蛋白的底物, 能够与抗癌药物竞争 ABCB1 转运蛋白, 抑制其外排, 从而逆转多药耐药^[28], Ko143 是 ABCG2 的抑制剂^[29], 因此在 MCF-7/ADR 细胞耐药逆转实验中分别选择维拉帕米和 Ko143 作为阳性对照药物, 结果显示, 维拉帕米的耐药逆转倍数最高, Ko143 的耐药逆转倍数最低, 而丹参酮 II_A 的逆转倍数介于二者之间。阿霉素摄取实验结果与耐药逆转实验基本一致, 提示阿霉素虽然是多种 ABC 转运蛋白的底物, 但 MCF-7/ADR 细胞对其耐药的最主要原因可能是 ABCB1 介导的转运作用, 丹参酮 II_A 逆转 MCF-7/ADR 细胞阿霉素耐药的主要作用机制可能与其竞争性抑制 ABCB1 对阿霉素的外排作用有关, 但也不排除丹参酮 II_A 对多种 ABC 转运蛋白均有一定的综合下调作用。

为了进一步探讨丹参酮 II_A 逆转 MCF-7/ADR 细胞多药耐药的作用机制, 考察丹参酮 II_A 对 MCF-7/ADR 细胞 ABCB1、ABCG2、ABCC1 基因和蛋白表达的影响, 发现 MCF-7/ADR 细胞中 ABCB1、ABCG2、ABCC1 基因和蛋白表达显著升高, 丹参酮 II_A 对 ABCC1 和 ABCG2 mRNA 和蛋白表达均有明显

的下调作用, 但对 ABCB1 的下调作用不明显。对于 ABCB1 介导的调控, 推测丹参酮 II_A 可能发挥了维拉帕米类似的与抗癌药物竞争 ABCB1 引起外排抑制的作用。以上研究表明, 丹参酮 II_A 能够通过调控多种 ABC 转运体尤其是 ABCG2 和 ABCC1 基因和蛋白表达, 逆转 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药性。

丹参酮 II_A 是中药丹参中天然的抗肿瘤成分^[30], 本研究表明, 丹参酮 II_A 对于有效逆转化疗中出现的多药耐药现象提供了一种新的策略, 其有可能作为一种潜在化疗增敏剂用于治疗乳腺癌, 对于肿瘤的临床治疗具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Gottesman M M, Lavi O, Hall M D, *et al.* Toward a better understanding of the complexity of cancer drug resistance [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 85-102.
- [3] Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(12): 2903-2909.
- [4] 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.
- [5] Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, *et al.* Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil [J]. *Cancer Res*, 1981, 41(5): 1967-1972.
- [6] Yin Q, Shen J N, Zhang Z W, *et al.* Multifunctional

- nanoparticles improve therapeutic effect for breast cancer by simultaneously antagonizing multiple mechanisms of multidrug resistance [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(7): 2242-2252.
- [7] Shi Y H, Bieerkehazhi S, Ma H. Next-generation proteasome inhibitor oprozomib enhances sensitivity to doxorubicin in triple-negative breast cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(5): 2347-2355.
- [8] Chen T, Wang C Y, Liu Q, et al. Dasatinib reverses the multidrug resistance of breast cancer MCF-7 cells to doxorubicin by downregulating P-gp expression via inhibiting the activation of ERK signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(1): 106-114.
- [9] 刘源, 倪渐凤芳, 刘丽娜, 等. 丹参酮 II_A 抑制胃癌细胞的阿霉素耐药 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(12): 2208-2214.
- [10] Jiao J W, Wen F. Tanshinone II_A acts via p38 MAPK to induce apoptosis and the down-regulation of ERCC1 and lung-resistance protein in cisplatin-resistant ovarian cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(3): 781-788.
- [11] Li G B, Shan C Y, Liu L, et al. Tanshinone II_A inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117440.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 77.
- [13] Liu Z P, Wang J J, Huang E W, et al. Tanshinone II_A suppresses cholesterol accumulation in human macrophages: Role of heme oxygenase-1 [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(2): 201-213.
- [14] Hong H J, Liu J C, Chen P Y, et al. Tanshinone II_A prevents doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through Akt-dependent pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 157(2): 174-179.
- [15] Chan P, Liu J C, Lin L J, et al. Tanshinone II_A inhibits angiotensin II-induced cell proliferation in rat cardiac fibroblasts [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(2): 381-394.
- [16] Hong H J, Liu J C, Cheng T H, et al. Tanshinone II_A attenuates angiotensin II-induced apoptosis via Akt pathway in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(12): 1569-1575.
- [17] Jiang B H, Zhang L, Wang Y C, et al. Tanshinone II_A sodium sulfonate protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(7): 1538-1544.
- [18] Gao J, Yang G Q, Pi R B, et al. Tanshinone II_A protects neonatal rat cardiomyocytes from adriamycin-induced apoptosis [J]. *Transl Res*, 2008, 151(2): 79-87.
- [19] Weng Y S, Wang H F, Pai P Y, et al. Tanshinone II_A prevents Leu27IGF-II-induced cardiomyocyte hypertrophy mediated by estrogen receptor and subsequent Akt activation [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(8): 1567-1591.
- [20] Zhang Y, Jiang P, Ye M, et al. Tanshinones: Sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10): 13621-13666.
- [21] 吴春霞, 樊晨星, 王秀艳, 等. 丹参酮 II_A 对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响及相关机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1657-1663.
- [22] Kan S D, Cheung W M, Zhou Y L, et al. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by tanshinone II_A in HepG2 human hepatoma cells [J]. *Planta Med*, 2014, 80(1): 70-76.
- [23] Su C C. Tanshinone II_A potentiates the efficacy of 5-FU in Colo205 colon cancer cells *in vivo* through downregulation of P-gp and LC3-II [J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(3): 555-559.
- [24] Wang C, Li H Y, Zhou K Y, et al. Sodium tanshinone II_A sulfonate and sodium danshensu open the placental barrier through down-regulation of placental P-glycoprotein in mice: Implications in the transplacental digoxin treatment for fetal heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(3): 1331-1333.
- [25] 何欣, 曾柏荣, 刘华. 丹参酮 II_A 对小鼠 Lewis 肺癌获得性多药耐药及相关酶系影响的实验研究 [J]. 中医药导报, 2010, 16(9): 89-91.
- [26] 敬静, 郑鸿, 王静, 等. 丹参酮 II_A 对人 ER 阴性乳腺癌细胞的生长抑制和多耐药逆转作用 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2007, 38(3): 391-395.
- [27] Xu Z Y, Chen L, Xiao Z G, et al. Potentiation of the anticancer effect of doxorubicin drug-resistant gastric cancer cells by tanshinone II_A [J]. *Phytomedicine*, 2018, 51: 58-67.
- [28] 叶玲, 叶娟, 鲁继光, 等. 共载多西他赛和维拉帕米脂质体逆转肿瘤耐药性的研究 [J]. 药学报, 2020, 55(5): 1035-1041.
- [29] Westover D, Ling X, Lam H, et al. FL118, a novel camptothecin derivative, is insensitive to ABCG2 expression and shows improved efficacy in comparison with irinotecan in colon and lung cancer models with ABCG2-induced resistance [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 92.
- [30] 孙环宇, 许晴, 张燕欣, 等. 丹参类制剂及丹参活性成分改善脑循环作用机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1496-1500.

[责任编辑 李亚楠]