

自噬对苯丙素苷逆转耐药作用的影响

马 强, 常宗宏, 邓尚新, 王 维, 王彪猛

兰州军区兰州总医院 消化科, 兰州 甘肃 730050

摘 要: **目的** 探讨自噬对苯丙素苷(PPG)逆转大肠癌耐药株 LoVo/Adr 细胞耐药作用的机制。**方法** MTT 法检测 PPG 对 LoVo/Adr 细胞增殖及耐药性的影响; Western-blotting 检测 P-糖蛋白(P-gp)的表达; 流式细胞术测定阿霉素(ADR)在 LoVo/Adr 细胞中的摄入; 单丹磺酰尸胺(MDC)染色后在荧光显微镜下观察细胞自噬体及通过流式细胞仪定量分析自噬率; ATP 检测试剂盒测定细胞内的 ATP 水平。**结果** 80、160 mg/L 的 PPG 可抑制 LoVo/Adr 细胞增殖, 20、40 mg/L 的 PPG 无明显细胞毒作用; 20、40 mg/L 的 PPG 对 ADR 的逆转倍数分别为 5.31 和 7.51 倍, 加入自噬特异抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)后, 2 组的逆转倍数分别增至 11.84 和 19.25 倍; 20、40 mg/L 的 PPG 及 5 mmol/L 的 3-MA 均不影响 P-gp 的表达; 20、40 mg/L 的 PPG 作用于 LoVo/Adr 细胞后, 细胞内 ADR 荧光强度显著增加($P < 0.01$), 联合 3-MA 后, 细胞内 ADR 的荧光强度进一步增加; 在荧光显微镜下, LoVo/Adr 细胞很少或几乎没有点状绿色荧光, 自噬率为 $(3.17 \pm 0.52)\%$, 20、40 mg/L 的 PPG 作用后, 均可见大量点状绿色荧光即自噬体分布于胞浆及核周, 自噬率分别升至 $(45.82 \pm 5.47)\%$ 、 $(76.23 \pm 8.28)\%$ ($P < 0.01$); 当 3-MA 与 PPG 合用时, 自噬泡的数量较单用 PPG 明显减少, 自噬率分别降至 $(24.87 \pm 2.43)\%$ 、 $(39.56 \pm 4.64)\%$ ($P < 0.05$); 对照组 LoVo/Adr 细胞中 ATP 的浓度为 (1.92 ± 0.23) nmol/mg, 20、40 mg/L 的 PPG 作用后, 细胞内 ATP 的水平分别下降至 (0.97 ± 0.14) 、 (0.63 ± 0.13) nmol/mg; 联合 3-MA 后, 细胞内 ATP 水平分别进一步降至 (0.58 ± 0.12) 、 (0.33 ± 0.10) nmol/mg。**结论** PPG 具有诱导大肠癌耐药 LoVo/Adr 细胞自噬和逆转耐药的特性, 这种特性与 PPG 降低细胞 ATP 水平, 激活自噬、抑制 ATP 依赖性 P-gp 的外泵功能有关; 同时抑制自噬可导致细胞内 ATP 水平进一步降低, 加重抑制 P-gp 功能, 提高 PPG 的逆转作用。

关键词: 苯丙素苷; 大肠癌; 多药耐药; 逆转多药耐药; 自噬

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)02-0238-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.016

Effect of autophagy on reversing multidrug resistance of phenylpropanoid glycosides

MA Qiang, CHANG Zong-hong, DENG Shang-xin, WANG Wei, WANG Biao-meng

Department of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of autophagy on the reversing multidrug resistance (MDR) of phenylpropanoid glycosides (PPG) for cocorectal carcinoma resistant strains LoVo/Adr. **Methods** The effects of PPG on cell proliferation and MDR in LoVo/Adr were measured by MTT assay and the expression of P-glycoprotein (P-gp) was determined by Western-blotting. The uptake of adriamycin (ADR) in LoVo/Adr cells was detected by flow cytometry (FCM); Autophagosomes were tested by MDC staining and fluorescence microscope. Autophagic rate was measured by FCM and the ATP level of cells was measured by ATP assay kit. **Results** PPG at high concentration (80 and 160 mg/L) inhibited the proliferation of cells while PPG at low concentration (20 and 40 mg/L) had no cytotoxicity to cells. Reverse fold of PPG on ADR was 5.31 and 7.51 respectively when PPG was 20 and 40 mg/L, and significantly increased to 11.84 and 19.25 respectively after adding the autophagic inhibitor 3-MA. The expression of P-gp was not affected by PPG (20 and 40 mg/L) or 3-MA (5 mmol/L). The fluorescence intensity of ADR was increased ($P < 0.01$) after treatment with PPG (20 and 40 mg/L) on LoVo/Adr respectively, and after PPG combined with 3-MA, the intensity was further increased. Under fluorescence microscopy green fluorescence dots were rarely observed in LoVo/ADR cells, and the autophagic rate was $(3.17 \pm 0.52)\%$. The green fluorescence dots (autophagosomes) which distributed in cytoplasm and around the nucleus appeared abundantly in the LoVo/ADR

收稿日期: 2013-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81374019)

作者简介: 马 强(1969—), 男, 医学博士后, 副主任医师, 主要从事大肠癌疾病基础及临床防治研究工作。

Tel: 13919069328 E-mail: maqiang.45@163.com

cells after the treatment with PPG (20 and 40 mg/L) and the autophagic rate increased to $(45.82 \pm 5.47)\%$ and $(76.23 \pm 8.28)\%$ ($P < 0.01$), respectively. The quantity of autophagosomes was more significantly decreased after the treatment with PPG combined with 3-MA than with PPG alone. The autophagic rates decreased to $(24.87 \pm 2.43)\%$ and $(39.56 \pm 4.64)\%$ ($P < 0.05$), respectively. The ATP level was (1.92 ± 0.23) nmol/mg in LoVo/Adr cells and declined to (0.97 ± 0.14) and (0.63 ± 0.13) nmol/mg, respectively when PPG was 20 and 40 mg/L. The ATP levels were further declined to (0.58 ± 0.12) and (0.33 ± 0.10) nmol/mg, respectively after the treatment with PPG combined with 3-MA. **Conclusion** PPG could induce autophagy and reversing MDR of the LoVo/ADR cells and this character might be related with decreasing the level of ATP in cells, activating autophagy, and inhibiting the ATP-dependent efflux function of P-gp by PPG. Autophagic inhibition promotes the reverse efficiency of PPG by decreasing the level of ATP and inhibiting the function of P-gp further.

Key words: phenylpropanoid glycosides; colorectal carcinoma; multidrug resistance; reversing multidrug resistance; autophagy

苯丙素苷 (phenylpropanoid glycosides, PPG) 是从我国西北植物马先蒿中提取的化合物, 具有抗病毒、抗血小板凝集、抗氧化、抑制肿瘤生长活性^[1-2]。前期研究^[3]发现, 高质量浓度 (80~160 mg/L) PPG 具有抗肿瘤作用, 低质量浓度 (20~40 mg/L) PPG 具有逆转大肠癌多药耐药 (MDR) 的特性。自噬为新发现的一种细胞死亡形式, 与肿瘤耐药的关系越来越引起人们的关注^[4-5]。近期研究表明一些具有逆转多药耐药作用的化合物如雷帕霉素, 同时可引起肿瘤细胞的自噬现象^[6], 但自噬与药物的逆转特性之间的关系尚不清楚。本实验旨在观察 PPG 是否诱导大肠癌多药耐药 LoVo/Adr 细胞发生自噬, 以及通过调控细胞自噬观察 PPG 逆转活性的变化, 探讨其发生机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

PPG [洋丁香苷 (acteoside), 亦称毛蕊花糖苷 (verbascoside), 质量分数 >98%] 从红纹马先蒿 *Pedicularis striata* Pall. 中提取得到^[7], 由兰州大学有机化学实验室贾忠建教授分离鉴定并惠赠。

RPMI 1640, Gibco 公司产品; 小牛血清, 杭州四季青生物制品研究所; 3-甲基腺嘌呤 (3-MA)、单丹磺酰尸胺 (MDC)、阿霉素 (ADR)、噻唑蓝 (MTT), Sigma 公司产品; P-糖蛋白 (P-gp) 单克隆抗体, Santaeruze 公司; ATP 检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞

大肠癌耐药株 LoVo/Adr 细胞由本实验室传代保存; LoVo/Adr 细胞株由本课题组采用阿霉素浓度递增法, 诱导大肠癌 LoVo 细胞株 (引自美国 ATCC), 历经 8 个月、传代 55 次连续培养, 成功构建^[8]。

1.3 仪器

二氧化碳电热温孵箱, 日本太阳株式会社; 低

温离心机, Dupont 公司; 超净工作台, 上海阳光实验仪器有限公司; FACS—420 型流式细胞仪, 美国 Coulter 公司, 荧光倒置显微镜, Nikon; Model680 酶标仪和垂直式电泳仪和湿转装置, 美国 Biorad 公司。

2 方法

2.1 PPG 对 LoVo/Adr 细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测质量浓度为 20、40、80、160 mg/L 的 PPG 对 LoVo/Adr 细胞增殖的影响。取对数生长期的 LoVo/Adr 细胞, 用 RPMI 1640 培养基制备成单细胞悬液, 分别接种至 96 孔板 (200 μ L/孔, 约 1×10^5 /孔), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 加入不同质量浓度的 PPG (设 3 个复孔), 再培养 24 h 后, 每孔加入 2 mg/L MTT 20 μ L 继续培养 4 h, 弃上清液, 加入二甲基亚砷 150 μ L/孔, 室温下, 将平板置于微孔板振荡器上充分振荡 5 min, 使结晶物溶解。酶标仪测定每孔的吸光度 (A) 值。计算细胞存活率。

存活率 = 实验孔 A 值 / 对照孔 A 值

2.2 PPG 对 LoVo/Adr 细胞耐药性的影响

用 PPG 小于 IC₁₀ (细胞存活率 >90%) 的质量浓度 20、40 mg/L 进行耐药逆转实验。实验分为对照组、PPG 20 mg/L 组、PPG 40 mg/L 组、PPG 20 mg/L+3-MA 组、PPG 40 mg/L+3-MA 组。细胞接种及实验步骤同“2.1”项, 在加入 ADR 终质量浓度为 0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56、5.12 mg/L 的 9 个梯度同时加入相应质量浓度的 PPG 及 5 mmol/L 的 3-MA, 以药物浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制质量浓度-效应曲线, 确定 ADR 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 和逆转倍数 (逆转前 IC₅₀ 值/逆转后 IC₅₀ 值)。

2.3 Western-blotting 检测 P-gp 的表达

实验分为对照组、PPG 20 mg/L 组、PPG 40 mg/L 组、3-MA (5 mmol/L) 组。用 RPMI 1640 培

养基制备成单细胞悬液, 根据分组加入相应终质量浓度的 PPG 和 3-MA, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 收集细胞, 加入适量裂解液提取蛋白, 用考马斯亮蓝法测定蛋白量, 并定量使各组蛋白浓度一致, 上样进行 SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭一抗, 4 °C 孵育过夜, 次日加入二抗孵育 1 h, 以 β -actin 作为内参照, TBST 室温洗膜 5 min 共 3 次, DAB 显色照相。用 Bio-Rad 图像分析系统照相, 用 Quantity One 软件分析, 以相应蛋白条带的灰度值/ β -actin 蛋白条带的灰度值表示相对蛋白表达量, 实验重复 3 次。

2.4 流式细胞仪测定 ADR 在 LoVo/Adr 细胞中的摄入

取对数生长期的 LoVo/Adr 细胞, 分别在含 ADR (5.0 mg/L)、ADR (5.0 mg/L) + PPG (20 mg/L)、ADR (5.0 mg/L) + PPG (40 mg/L)、ADR (5.0 mg/L) + PPG (20 mg/L) + 3-MA (5 mmol/L) 和 ADR (5.0 mg/L) + PPG (40 mg/L) + 3-MA (5 mmol/L) 的 RPMI 1640 培养基中孵育 60 min, 然后经胰酶消化, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 终止细胞代谢; 洗涤后, 调整细胞浓度为 2×10^7 /L, 立即用流式细胞仪检测, 测定 3 000 个细胞内 ADR 被激发的相对荧光强度 (激发波长 488 nm, 发射波长 575 nm), 以荧光任意单位表示 ADR 的量, 计算机分析结果。

2.5 PPG 对 LoVo/Adr 细胞自噬的影响

MDC 是一种荧光染料, 作为自噬体的示踪剂可选择性地聚集于细胞自噬囊泡 (AVs) 中, 可以根据细胞内荧光颗粒的变化来推断自噬的发生, 含点状绿色荧光的细胞即发生自噬的细胞。实验分为对照组、PPG 20 mg/L 组、PPG 40 mg/L 组、PPG 20 mg/L + 3-MA 组和 PPG 40 mg/L + 3-MA 组, 取对数生长期 LoVo/Adr 细胞, 消化后以每孔 6×10^4 个细胞加入至 24 孔板 (150 μ L/孔) 中, 各组细胞加用相应药物 (3-MA 终浓度为 5 mmol/L) 培养 24 h, 胰酶消化, PBS 洗 2 次后, 加入 0.1 mmol/L MDC, 37 °C 培养箱孵育 2 h, 在荧光显微镜下进行观察和摄片, 荧光显微镜加用 488 nm 发射滤片和 570 nm 阻断滤片。同时上流式细胞仪, 以 488 nm 激发波长测定 3 000 个细胞, MDC 阳性细胞率为即自噬率, 检测用 Cellquest 软件分析资料。

2.6 细胞内 ATP 水平的测定

实验分为对照组、PPG 20 mg/L 组、PPG 40

mg/L 组、PPG 20 mg/L + 3-MA (5 mmol/L) 组和 PPG 40 mg/L + 3-MA (5 mmol/L) 组。取对数生长期细胞, 铺 6 孔板, 培养 24 h 后向每组细胞加入相应浓度的药物, 作用 48 h 后, 吸弃培养液, 向 6 孔板中加入细胞裂解液, 裂解后 4 °C、1 200 $\times g$ 离心 5~10 min, 取上清, 根据试剂盒说明书配制标准曲线及 ATP 检测工作液, 加 100 μ L ATP 检测工作液到检测孔内, 室温放置 5 min, 然后再向检测孔内加入 50 μ L 的样品或者标准品, 间隔 2 s 后用酶标仪测定荧光值。根据标准曲线, 计算出样品中 ATP 的浓度。

2.7 数据处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用 SPSS 统计软件进行方差分析或 t 检验。

3 结果

3.1 PPG 对 LoVo/Adr 细胞增殖的影响

LoVo/Adr 细胞在 PPG 20~160 mg/L 4 个倍质量浓度范围内存活率见表 1。PPG 质量浓度为 80、160 mg/L 时有抑制细胞增殖的作用, 且随着剂量增加, 抑制作用增强, 具有量效关系。PPG 质量浓度为 20、40 mg/L 时 LoVo/Adr 细胞存活率均 > 90%, 说明此质量浓度对 LoVo/Adr 细胞无明显毒性作用, 选择此质量浓度观察逆转效果。

表 1 PPG 对 LoVo/Adr 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of PPG on survival rate of LoVo/Adr cells
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞存活率 / %
对照	—	97.45 $\pm$ 4.17
PPG	20	96.12 $\pm$ 3.23
	40	92.04 $\pm$ 3.20
	80	67.89 $\pm$ 2.87**
	160	34.96 $\pm$ 2.14**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.2 PPG 对 LoVo/Adr 细胞 ADR 耐药性的影响

PPG 可不同程度地降低 ADR 对 LoVo/Adr 细胞的 IC₅₀ 值, PPG 为 20、40 mg/L 时对 ADR 的逆转倍数分别为 5.24 和 7.51 倍, 随着 PPG 剂量增加, 逆转倍数增加。加入自噬特异性抑制剂 3-MA 后, 2 组的逆转倍数分别增至 11.84 和 19.25 倍, 说明抑制自噬可显著提高 PPG 逆转耐药活性。结果见表 2。

表 2 PPG 对 LoVo/Adr 细胞耐药性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of PPG on drug resistance of LoVo/Adr cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	ADR 的 IC_{50} 值 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	逆转倍数
对照	—	3.08 ± 0.40	—
PPG	20	$0.58 \pm 0.13^{**}$	5.31
	40	$0.41 \pm 0.10^{**}$	7.51
PPG+3-MA	20	$0.26 \pm 0.09^{**\Delta}$	11.84
	40	$0.16 \pm 0.05^{**\#}$	19.25

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 PPG 20 mg/L 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$;

与 PPG 40 mg/L 组比较: $^{\#}P < 0.05$

$^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs PPG 20 mg/L group;

$^{\#}P < 0.05$ vs PPG 40 mg/L group

3.3 PPG 对 LoVo/Adr 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

当 PPG 的质量浓度为 20、40 mg/L、3-MA 浓度为 5 mmol/L 时, 对 P-gp 蛋白的表达均没有影响, 说明逆转耐药与 P-gp 表达无关, 结果见图 1 及表 3。

3.4 PPG 对 LoVo/Adr 细胞摄入 ADR 的影响

20、40 mg/L 的 PPG 作用于 LoVo/Adr 细胞后, 可以显著提高细胞中 ADR 的量 ($P < 0.05$), 分别联合 3-MA 后, ADR 的摄入增加更为显著, 说明 PPG 抑制了 P-gp 的外排功能, 联合自噬抑制剂后, 对 P-gp 的外排功能抑制更为明显。结果见表 4。

3.5 PPG 对 LoVo/Adr 细胞自噬的影响

在荧光显微镜下, 对照组 LoVo/Adr 细胞很少

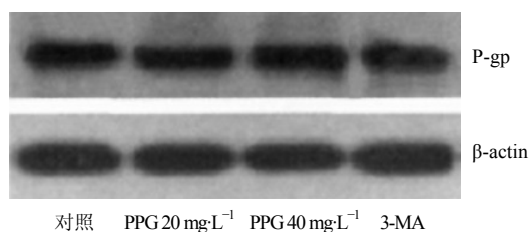


图 1 PPG 对 LoVo/Adr 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of PPG on protein expression of P-gp in LoVo/Adr cells

表 3 LoVo/Adr 细胞中 P-gp 表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Expression of P-gp in LoVo/Adr cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	P-gp / β -actin
对照	—	0.95 ± 0.15
PPG	20	0.91 ± 0.12
	40	0.87 ± 0.13
3-MA	5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.93 ± 0.11

表 4 LoVo/Adr 细胞内 ADR 荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3\ 000$)

Table 4 Fluorescence intensity of ADR in LoVo/Adr cells ($\bar{x} \pm s, n = 3\ 000$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	荧光强度
ADR	5.0	2.04 ± 0.70
ADR+PPG	5.0+20	$2.68 \pm 0.93^{*}$
	5.0+40	$2.89 \pm 1.01^{*}$
ADR+PPG+3-MA	5.0+20+5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$3.42 \pm 1.07^{*\Delta}$
	5.0+40+5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$3.67 \pm 1.14^{*\#}$

与 ADR 组比较: $^{*}P < 0.05$; 与 PPG 20 mg/L 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$;

与 PPG 40 mg/L 组比较: $^{\#}P < 0.05$

$^{*}P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs PPG 20 mg/L group;

$^{\#}P < 0.05$ vs PPG 40 mg/L group

或几乎没有点状绿色荧光分布, PPG 20、40 mg/L 组均可看到 LoVo/Adr 细胞中点状绿色荧光即自噬体分布于胞浆及核周, 说明 PPG 可诱导细胞自噬; 当 3-MA 与 PPG 合用时, 自噬泡的数量较 PPG 组减少, 说明 3-MA 在一定程度上能够抑制 PPG 诱导的细胞自噬, 结果见图 2。通过流式细胞仪对各组细胞自噬率进行定量分析, 结果与荧光显微镜下观察基本一致: 对照组 LoVo/Adr 细胞自噬率很低, 仅为 $(3.17 \pm 0.52)\%$, PPG 20、40 mg/L 组自噬率分别为 $(45.82 \pm 5.47)\%$ 和 $(76.23 \pm 8.28)\%$, 均较对照组显著增高 ($P < 0.01$), PPG 联合 3-MA 后, 相应各组的自噬率降低至 $(24.87 \pm 2.43)\%$ 和 $(39.56 \pm 4.64)\%$ ($P < 0.01$), 说明 PPG 可诱导细胞发生自噬, 自噬抑制剂 3-MA 可抑制 PPG 诱导的自噬现象。

3.6 PPG 对 LoVo/Adr 细胞内 ATP 水平的影响

对照组 LoVo/Adr 细胞中 ATP 的浓度为 (1.92 ± 0.23) nmol/mg, 20、40 mg/L PPG 作用 24 h 后, 细胞内 ATP 的水平分别下降至 (0.97 ± 0.14) 、 (0.63 ± 0.13) nmol/mg ($P < 0.05$), 当联合 3-MA 阻断 PPG 引起的自噬作用后, 细胞内 ATP 水平进一步降低, 分别降低至 (0.58 ± 0.12) 、 (0.33 ± 0.10) nmol/mg ($P < 0.05$)。

4 讨论

化疗是大肠癌治疗的主要手段之一, 而多药耐药 (MDR) 的产生则是化疗中最大的难点, 寻找高效、毒副作用小的 MDR 的逆转剂具有十分重要的意义。马先蒿在我国西北称“土人參”, 具有活血、健脾胃、安神益气等功效, PPG 为从中分离的天然产物, 前期研究发现 PPG 具有逆转大肠癌 MDR 的

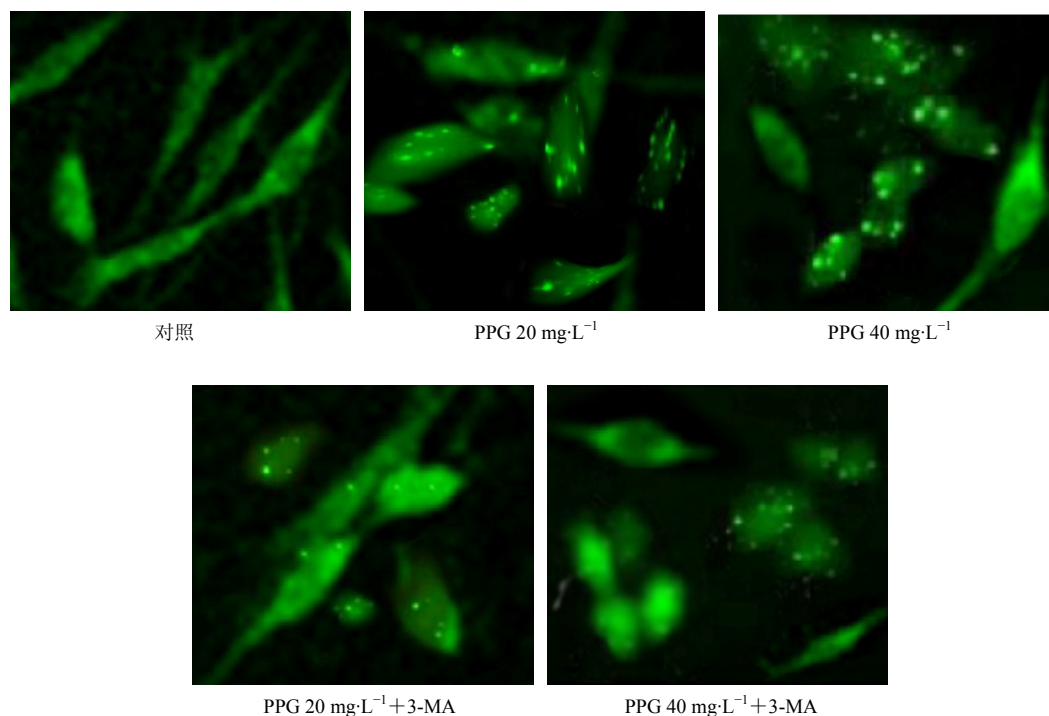


图2 荧光显微镜下观察细胞自噬体形成

Fig. 2 Fluorescence microscopy of formation of autophagosomes in cells

特性。本实验结果也表明 20、40 mg/L PPG 具有逆转 LoVo/Adr 细胞对 ADR 的耐药性。

P-gp 是耐药细胞膜上过度表达的一种跨膜大分子糖蛋白,由 *mdr1* 基因编码,相对分子质量为 170 000,主要功能是在细胞膜上形成一个通道,水解 ATP 获得能量,将已进入胞内的药物泵出胞外,使细胞内药物浓度降低,免遭化疗药物的杀伤^[9-10]。

本研究结果表明,PPG 作用于大肠癌耐药 LoVo/Adr 细胞后,并未改变 P-gp 蛋白的表达,说明 PPG 不是通过降低 P-gp 的表达而逆转耐药。进一步观察 PPG 对耐药细胞中 ADR 摄入的影响,发现 PPG 可引起 ADR 在耐药细胞中的明显蓄积,并且呈浓度依赖性。本研究证实 PPG 逆转耐药不是通过抑制 P-gp 的表达,而是抑制 P-gp 的外泵功能,导致药物在细胞内蓄积发挥逆转作用。

PPG 除了具有逆转 MDR 的活性外,本研究结果表明,当 PPG 质量浓度为 20~40 mg/L 时并未引起大肠癌 LoVo/Adr 细胞的死亡,而是在荧光显微镜下观察到细胞出现大量的自噬小体,说明 PPG 诱导了细胞自噬现象。细胞自噬过程是细胞在遇到应激时,将细胞质内多余的蛋白和细胞器隔离到自噬体中并与溶酶体结合降解过程,一方面通过自噬降

解自身的物质,清除损伤的大分子和细胞器,为细胞提供能量,促进细胞生存;另一方面当细胞面对过多的应激而产生过强的自噬作用时,导致细胞死亡即自噬性死亡^[11]。根据本研究结果初步推测 PPG 诱导细胞自噬的意义在于促使细胞在细胞毒性药物应激状态下存活,对细胞起到保护作用。

PPG 诱导的细胞自噬与 PPG 逆转耐药活性之间的关系是本研究的主要研究目的之一,用自噬特异抑制剂 3-MA^[12]抑制耐药细胞自噬后,发现 PPG 逆转活性明显增强,耐药细胞死亡显著增多,与国外文献报道一致^[13]。进一步说明 PPG 诱导的自噬对肿瘤细胞起到了保护作用,降低了 PPG 的逆转作用。

P-gp 蛋白把化疗药物泵出细胞的过程中需要降解细胞内 ATP,给自身提供能量,进一步测定了细胞内 ATP 水平,结果发现,PPG 可引起 LoVo/Adr 细胞内的 ATP 水平降低。一方面细胞内 ATP 水平下降,可诱导自噬发生,细胞通过自噬体包裹细胞浆成分或者细胞器在溶酶体作用下进行降解,通过降解氨基酸、游离脂肪酸等合成 ATP 提供能量;另一方面细胞内 ATP 水平下降,可导致 ATP 依赖性 P-gp 的外泵功能抑制,这可能是 PPG 同时引起自噬和逆转耐药的原因。当 PPG 诱导的自噬被抑制后,

细胞内 ATP 的水平进一步降低, 加重抑制 P-gp 外排功能, 从而使 PPG 逆转活性进一步提高。PPG 降低细胞内 ATP 水平机制尚不清楚, 需进一步探讨。

综上所述, PPG 具有诱导 LoVo/Adr 细胞自噬和逆转耐药的特性, 抑制自噬可导致细胞内 ATP 水平进一步降低, 加重抑制 P-gp 功能, 提高 PPG 的逆转活性。

参考文献

- [1] 李 忌, 郑 耘, 郑荣梁, 等. 苯丙素甙化合物的抗癌活性 [J]. 中国药学杂志, 1995, 30(5): 269-270.
- [2] 刘 婕, 许 浚, 张铁军. 苯丙素苷类化合物防治神经退行性疾病的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 62-66.
- [3] 马 强, 张方信, 吕志诚. 苯丙素甙化合物逆转大肠癌 LoVo/Adr 细胞多药耐药性 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(22): 1569-1571.
- [4] Kong D, Ma S, Liang B, *et al.* The different regulatory effects of p53 status on multidrug resistance are determined by autophagy in ovarian cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2012, 66(4): 271-278.
- [5] Bristol M L, Emery S M, Maycotte P, *et al.* Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy? [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344(3): 544-552.
- [6] Zaytseva Y Y, Valentino J D, Gulhati P, *et al.* mTOR inhibitors in cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(1): 1-7.
- [7] 康金国, 贾忠建. 藜生马先蒿化学成分研究 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 1997, 33(1): 71-76.
- [8] 马 强, 张振书, 张亚历, 等. 结肠癌细胞多药耐药模型 LoVo/Adr 的建立及其耐药相关基因的表达 [J]. 中华消化杂志, 2002, 22(7): 412-415.
- [9] Sharom F J. The P-glycoprotein multidrug transporter [J]. *Essays Biochem*, 2011, 50(1): 161-178.
- [10] Breier A, Gibalova L, Seres M, *et al.* New insight into p-glycoprotein as a drug target [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(1): 159-170.
- [11] Choi A M, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7): 651-662.
- [12] Kimmelman A C. The dynamic nature of autophagy in cancer [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(19): 1999-2010.
- [13] Ahn J H, Lee M. Suppression of autophagy sensitizes multidrug resistant cells towards Src tyrosine kinase specific inhibitor PP2 [J]. *Cancer Lett*, 2011, 310(2): 188-197.