

贝母素乙增强阿霉素对胃癌多药耐药裸鼠移植瘤的抑制作用及其机制研究

王云飞^{1,2}, 顾政一^{2*}, 聂勇战³, 韩亚楠³, 魏彦玲³, 金治安³

1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

3. 第四军医大学西京消化病医院 肿瘤生物学国家重点实验室, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 研究贝母素乙逆转胃癌细胞多药耐药性(MDR), 增强化疗药物对胃癌多药耐药裸鼠移植瘤的抑制作用, 探讨其作用机制。方法 制备胃癌耐药 SGC7901/VCR 细胞株裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分组后, ip 给药, 每2天给药1次, 共给药6次。治疗期间观察裸鼠体质量, 游标卡尺测量移植瘤体积。治疗结束后处死裸鼠, 称取肿瘤质量, 计算抑瘤率; Western blotting 检测药物治疗后移植瘤耐药相关蛋白 P-糖蛋白(P-gp)、Cleaved Caspase-3 表达水平。结果 治疗期间联合用药组移植瘤体积小于模型组, 差异显著($P < 0.01$)。治疗结束后处死裸鼠, 称取移植瘤的质量, 联合用药组移植瘤质量和抑瘤率显著低于模型组($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示联合用药组 P-gp 表达水平较模型组降低, Cleaved Caspase-3 表达升高。结论 贝母素乙可以增强胃癌耐药细胞移植瘤对阿霉素的敏感性, 能够显著抑制胃癌耐药移植瘤的生长, 其机制可能与降低肿瘤组织中 P-gp 表达和升高 Cleaved Caspase-3 的表达相关。

关键词: 贝母素乙; 胃癌多药耐药; 移植瘤; 阿霉素; P-糖蛋白; Cleaved Caspase-3

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)05-0686-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.017

Effect of peiminine on enhancing anti-tumor activity of adriamycin on multi-drug resistance of gastric cancer xenografts in nude mice and its mechanism

WANG Yun-fei^{1,2}, GU Zheng-yi², NIE Yong-zhan³, HAN Ya-nan³, WEI Yan-ling³, Jin Zhi-an³

1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

3. State Key Laboratory of Cancer Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To investigate the effect of peiminine (PMI) on reversing the multi-drug resistance (MDR) of gastric cancer cell and enhancing the antitumor activity of adriamycin (ADR) on SGC7901/VCR cell xenograft and to explore its functional mechanisms. **Methods** The model of SGC7901/VCR cell line xenograft on athymic mice was established, and the mice were randomized to groups with ip injection of different drugs once every other day, for six times in all. The tumor volume and the body weight of mice were measured during the drug therapy. The mice were sacrificed after the last administration. The tumors were weighed and then the inhibitory rate was calculated. Western blotting was employed to detect the expression of P-glycoprotein (P-gp) and Cleaved Caspase-3. **Results** During the treatment, the tumor volume of mice in PMI + ADR group was decreased significantly compared with the control group ($P < 0.01$). At the end of the treatment the mice were sacrificed and the tumor weight was measured. The tumor weight and inhibitory rate of mice in PMI + ADR group were obviously decreased compared with the control group ($P < 0.05$). The expression of P-gp in tumor of mice in ADR + PMI group was decreased. On the contrary, the expression of Cleaved Caspase-3 was increased. **Conclusion** The PMI is able to enhance the sensitivity of drug resistance on gastric cancer cell to adriamycin and its mechanism may be related to decreasing the expression of P-gp and increasing the expression of Cleaved Caspase-3 in tumor tissues.

Key words: peiminine; multi-drug resistance of gastric cancer; xenograft; adriamycin; P-glycoprotein; Cleaved Caspase-3

收稿日期: 2013-11-23

作者简介: 王云飞 (1985—), 女, 在读硕士, 研究方向为新药研究与开发。E-mail: wyy169630@126.com

*通信作者 顾政一, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为新药研究与开发。E-mail: zhengyi@xj.cninfo.net

胃癌是一种最常见的恶性肿瘤,严重威胁着人类的健康和生命。胃癌的发病率居高不下,致死率也位于癌症死亡率的第2位^[1]。外科手术和化疗仍是胃癌临床治疗的主要方案,然而肿瘤细胞多药耐药(multidrug resistance, MDR)的特性,使化疗药物的疗效大幅降低,导致多数患者的化疗以失败告终^[2]。所以研究和开发新的肿瘤多药耐药逆转剂是提高化疗药物疗效,延长患者生存期的关键所在。

贝母是百合科(Liliaceae)贝母属 *Fritillariae* L. 植物的干燥鳞茎,具有清热润肺、化痰止咳、散结消痈等功效,用于肺热燥咳、阴虚劳咳等症状^[3],其主要有效成分为生物碱类化合物^[4]。近年来研究发现贝母生物碱类提取物具有新的药理作用,如镇痛、抗炎、诱导分化作用等^[5-8],本课题组前期研究筛选出贝母素乙具有体外逆转胃癌细胞多药耐药作用^[9-10]。本实验利用胃癌多药耐药 SGC7901/VCR 细胞系,制备裸鼠移植瘤模型,以贝母素乙为研究对象,观察贝母素乙与阿霉素联合应用在体内对 SGC7901/VCR 移植瘤的影响,探讨其作用机制,为贝母素乙进一步研究及应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞系及实验动物

人胃癌多药耐药细胞系 SGC7901/VCR 由第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室提供。BALB/c (nu/nu) 雄性裸鼠,4~6 周龄,体质量 18~20 g, SPF 级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司;饲养于第四军医大学实验动物中心,SPF 屏障系统洁净层流架,温度(25±1)℃,相对湿度 40%~60%,垫料、食物、水等均经过灭菌处理。

1.2 药品及试剂

贝母素乙由新疆维吾尔自治区药物研究所提取(质量分数>95%)。RPMI 1640 培养基、0.25%胰酶、胎牛血清(Gibco 公司)。DMSO (Sigma 公司)。注射用硫酸长春新碱(批号 130201)、阿霉素(批号 02130102)(浙江海正股份有限公司)。P-糖蛋白(P-gp)一抗(Santa Cruz),Cleaved Caspase-3 (cell signaling technology),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、山羊抗兔(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

细胞培养箱, Varioskan Flash 酶标仪(Thermo scientific),凝胶电泳仪,转膜,显影系统(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,SGC7901/VCR 细胞培养液中加入 1 μg/mL 的硫酸长春新碱维持耐药性,每 2~3 天换液或传代 1 次。

2.2 移植瘤动物模型的制备

0.25% 胰酶消化对数生长期胃癌耐药 SGC7901/VCR 细胞株,收集到离心管中,无菌磷酸盐缓冲盐(PBS)离心洗涤 2 次,细胞计数后,调整细胞浓度为 5×10⁶/mL,悬浮于 PBS 中。用带 6 号针头的注射器,接种于裸鼠右后肢皮下部位,每个接种部位注射细胞悬液 0.2 mL (约 1×10⁶ 个细胞)。接种完成后,在 SPF 级饲养室饲养,定期观察小鼠饮食、活动、体质量及皮下肿瘤组织生长变化。

2.3 贝母素乙联合阿霉素逆转胃癌耐药的体内实验

待皮下肿瘤结节长至直径 0.8~1.0 cm 时,将动物随机分为模型组(生理盐水)、阿霉素组(2 mg/kg)、联合用药组(贝母素乙 3 mg/kg 和阿霉素 2 mg/kg)。各组 ip 给药,每 2 天给药 1 次,给药 6 次,共计 12 d。药物治疗期间观察裸鼠生存状况、体质量及移植瘤生长情况,游标卡尺测量肿瘤结节的长度和宽度,计算肿瘤体积(肿瘤体积=0.5×长径×短径²)^[11],绘制生长曲线。

给药结束后脱颈处死裸鼠,剥离瘤体,称取瘤质量,计算肿瘤生长抑制率(抑瘤率)^[12]。瘤体迅速冷冻于液氮罐中,保存备用。留取肝、肾、心、肺等脏器用福尔马林固定后,进行病理组织切片及 HE 染色,观察药物对各组织的毒副作用。

抑瘤率=[模型组瘤体积(质量)-给药组瘤体积(质量)]/模型组瘤体积(质量)

2.4 Western blotting 检测耐药蛋白 P-gp 和 Cleaved Caspase-3 的表达

取液氮中保存的肿瘤组织适量,加含 1%蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 1 mL,在匀浆器中匀浆后提取总蛋白,并用 BCA 法测定所得蛋白样品浓度,确定蛋白电泳的上样体积。蛋白样品中加入 1/4 体积 5×上样缓冲液,在沸水中煮 5 min。使用 6%和 12% SDS-PAGE 凝胶电泳完成后,用半干法转至 PVDF 膜。10%脱脂牛奶封闭 2 h,用 P-gp(1:3 000)、Caspase-3 (1:1 000)一抗孵育过夜。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、山羊抗兔(1:3 000)二抗室温孵育 1 h,增强化学发光(ECL)试剂盒显影成像。

2.5 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 裸鼠移植瘤建模情况

胃癌耐药 SGC7901/VCR 细胞株接种于裸鼠皮下后, 潜伏期为 5~7 d, 然后在接种部位缓慢长出肿瘤结节, 后期瘤体生长逐渐加快, 可见移植瘤内部血管分布, 说明建模成功。经过 15 d 后瘤体直径长至 0.8~1.0 cm, 开始分组给药治疗。

3.2 对裸鼠体质量和移植瘤体积的影响

药物治疗期间观测裸鼠体质量、肿瘤生长情况, 绘制肿瘤生长曲线。各组动物给药期间体质量变化趋势相同, 组间差异不显著。联合用药组裸鼠

移植瘤生长较缓慢, 治疗结束时, 肿瘤平均体积为 $(0.66 \pm 0.42) \text{ cm}^3$, 显著低于模型组肿瘤平均体积 $(1.96 \pm 0.48) \text{ cm}^3$ ($P < 0.01$), 而阿霉素组肿瘤平均体积为 $(0.96 \pm 0.65) \text{ cm}^3$, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 提示贝母素乙能够增强阿霉素体内杀死肿瘤细胞的作用。与模型组比较, 移植瘤体积的抑制率, 也由单独使用阿霉素治疗的 51.03%, 上升到联合用药组的 66.33%。结果见表 1、2 和图 1。

给药结束测定各组动物瘤质量, 结果联合用药组移植瘤质量为 $(0.42 \pm 0.17) \text{ g}$, 与模型组比较显著降低 ($P < 0.05$), 抑瘤率为 50.59%。阿霉素组肿瘤质量为 $(0.49 \pm 0.20) \text{ g}$, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 抑瘤率为 42.35%。结果见表 2。

表 1 荷瘤裸鼠给药期间体质量变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Changes of body weight of nude mice bearing xenografts during treatment ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	体质量 / g					
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
联合用药	24.1 ± 1.2	23.4 ± 1.3	22.6 ± 1.2	21.5 ± 1.3	19.8 ± 1.5	19.0 ± 1.8
阿霉素	23.8 ± 2.5	20.6 ± 2.0	20.1 ± 1.6	19.2 ± 1.5	18.3 ± 1.5	17.8 ± 1.6
模型	24.6 ± 0.9	23.0 ± 1.5	22.1 ± 1.7	21.6 ± 2.4	20.5 ± 2.6	20.1 ± 2.4

表 2 荷瘤裸鼠移植瘤体积、质量及抑瘤率 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Tumor volume, weight, and inhibitory rate of transplanted tumor in nude mice bearing xenografts ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	肿瘤体积 / cm^3	体积抑制率 / %	肿瘤质量 / g	质量抑制率 / %
模型	1.96 ± 0.48	—	0.85 ± 0.16	—
阿霉素	0.96 ± 0.65*	51.03	0.49 ± 0.20*	42.35
联合用药	0.66 ± 0.42**	66.33	0.42 ± 0.17*	50.59

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

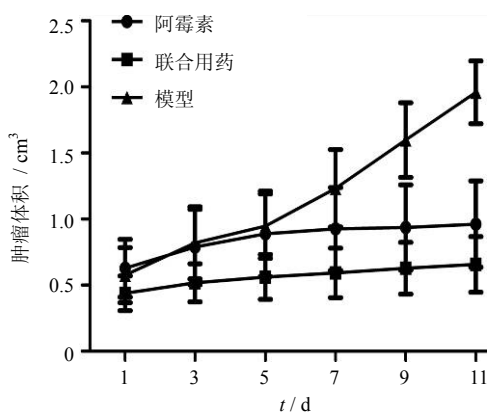


图 1 荷瘤裸鼠皮下移植瘤生长曲线

Fig. 1 Growth curve of transplanted tumor in nude mice bearing xenografts

3.3 裸鼠脏器病理切片 HE 染色

处死裸鼠, 解剖时肉眼观察, 给药组与模型组比较无明显病变。心、肝、肺、肾等各组织病理切片的 HE 染色结果也无显著差异。

3.4 Western blotting 检测 P-gp 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达

阿霉素组 P-gp 和 Cleaved Caspase-3 的表达与模型组比较没有明显变化。而联合用药组的 P-gp 表达与模型组比较明显降低, 同时 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达显著升高。结果见图 2。

4 讨论

学者对晚期胃癌单独或联合使用化疗药物的应答率进行了研究, 得出的结论是现有化疗药物和化疗

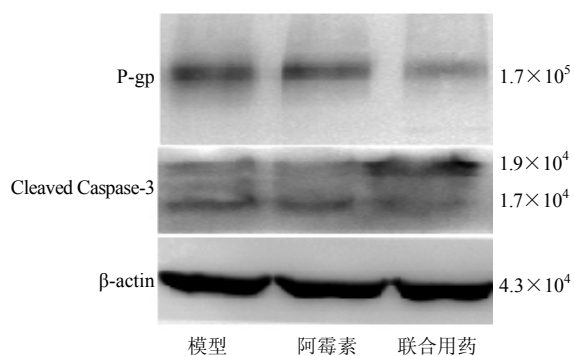


图 2 各组荷瘤裸鼠移植瘤组织 P-gp 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达

Fig. 2 Protein expression of P-gp and Cleaved Caspase-3 of transplanted tumor in nude mice bearing xenografts in each group

方案的有效率仍然不高^[13]。克服肿瘤细胞的 MDR，是从根本上提高化疗药物有效率的关键所在。近年来，为了寻找高效低毒的肿瘤耐药逆转剂，许多国内外学者将研究焦点从化学药物转移到中药及中药提取物对肿瘤多药耐药的作用，发现姜黄素、青蒿琥酯、蟾毒灵等具有逆转 MDR 的作用^[14-18]，而且能够多机制、多靶点地提高化疗药物的抗癌作用^[19]。

本课题组前期研究表明，贝母素乙在体外能够显著提高 SGC7901/VCR 细胞对化疗药物的敏感性和细胞内阿霉素的浓度，其机制可能与减少药物外排和诱导细胞凋亡相关。本实验制备胃癌耐药 SGC7901/VCR 细胞裸鼠异种移植瘤模型，以阿霉素单用或与贝母素乙联合应用，观察贝母素乙对裸鼠移植瘤的影响，为进一步研究贝母素乙逆转胃癌耐药的作用及机制提供实验依据。研究结果显示，药物治疗期间，贝母素乙联合阿霉素对 SGC7901/VCR 裸鼠移植瘤具有抑制作用，与模型组比较，差异具有显著性 ($P < 0.01$)，且抑瘤率明显高于阿霉素单独用药组，提示贝母素乙具有阿霉素增敏作用。

为探讨贝母素乙对胃癌耐药移植瘤的逆转作用的机制，本实验应用蛋白免疫印迹技术，检测各治疗组移植瘤 P-gp 和 Cleaved Caspase-3 的表达。P-gp 是经典的耐药分子，它以能量依赖性的将药物泵出细胞外，并减少药物转运入细胞内，使细胞内蓄积的药物减少，还可促使药物在细胞内发生再分布，积聚到与药物作用无关的细胞器内，进一步降低作用靶点部位的药物浓度^[20]。P-gp 还能够抑制 Caspase-3 的裂解激活，从而抑制了依赖 Caspases 的

细胞凋亡。本实验结果显示，贝母素乙能够使 P-gp 的表达降低，Cleaved Caspase-3 的表达升高，提示贝母素乙逆转胃癌耐药移植瘤的作用机制可能与降低 P-gp 表达，激活 Cleaved Caspase-3 有关。

参考文献

- [1] Zhang D X, Fan D M. New insights into the mechanisms of gastric cancer multidrug resistance and future perspectives [J]. *Further Oncol*, 2010, 6(4): 527-537.
- [2] Zhang D X, Fan D M. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007, 7(10): 1369-1378.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] Zhou J L, Xin G Z, Shi Z Q, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(45): 7109-7122.
- [5] Xu F Z, Xu S Z, Wang L J, et al. Antinociceptive efficacy of verticinone in murine models of inflammatory pain and paclitaxel induced neuropathic pain [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(9): 1377-1382.
- [6] Pae H O, Hyuncheol O H, Choi B M, et al. Differentiation-inducing effects of verticinone, an isosteroidal alkaloid isolated from the bulb of *Fritillaria ussuriensis*, on human promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(11): 1409-1411.
- [7] Wang D D, Wang S, Chen X, et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolates from Bulbus of *Fritillaria wabuensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 189-193.
- [8] Wang D D, Zhu J Y, Wang S, et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolates from Bulbus of *Fritillaria Cirrhosae* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1290-1294.
- [9] 顾政一, 张 裴, 聂勇战, 等. 5 种生物碱胃癌多药耐药逆转剂的筛选及机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1151-1156.
- [10] 张 裴, 顾政一, 孙玉华, 等. 贝母素乙逆转 SGC7901_VCR 细胞株多药耐药的初步研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2012, 35(4): 452-456.
- [11] Gyemant N, Engi H, Schelz Z, et al. *In vitro* and *in vivo* multidrug resistance reversal activity by a Betti-base derivative of tylosin [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(2): 178-185.
- [12] Xu Y, Zhi F, Xu G M, et al. Overcoming multidrug-resistance *in vitro* and *in vivo* using the novel

- P-glycoprotein inhibitor 1416 [J]. *Biosci Rep*, 2012, 32(6): 559-566.
- [13] Kubota T, Weisenthal L. Chemotherapy sensitivity and resistance testing: to be “standard” or to be individualized, that is the question [J]. *Gastric Cancer*, 2006, 9(2): 82-87.
- [14] Koo J Y, Kim H J, Jung K O, *et al*. Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells *in vitro* and shows synergism with 5-fluorouracil [J]. *J Med Food*, 2004, 7(2): 117-121.
- [15] 曹林娟, 韩艳秋, 孟学民. 单味中药及其有效成分逆转白血病多药耐药性的研究进展 [J]. *中草药*, 2008, 39(1): 144-148.
- [16] Efferth T, Davey M, Olbrich A, *et al*. Activity of drugs from traditional Chinese medicine toward sensitive and MDR1- or MRP1-overexpressing multidrug-resistant human CCRF-CEM leukemia cells [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, 28(2): 160-168.
- [17] Yallapu M M, Maher D M, Sundram V, *et al*. Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth [J]. *J Ovarian Res*, 2010, 3: 11.
- [18] 李 森, 雷 宇, 林 霖, 等. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(3): 228-232.
- [19] Thangapazham R L, Sharma A, Maheshwar R K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin [J]. *AAPS J*, 2006, 8(3): 443-449.
- [20] Stavrovskaya A A, Stromskaya T P. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells [J]. *Biochemistry*, 2008, 73(5): 592-604.