

·综述·

活血化瘀类中药逆转多药耐药作用的研究概况

雷宇, 李森, 林霖, 马永钢*

南开大学药学院, 天津 300071

摘要 肿瘤的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是肿瘤化疗失败的主要原因之一。中草药以其多成分, 多作用机制的优势在我国肿瘤临床治疗方面获得了广泛的应用, 其中活血化瘀类中药是常用的一类药物, 目前已经发现该类中药对肿瘤细胞的多药耐药具有逆转作用。现就 MDR 的发生机制和活血化瘀类中药制剂逆转 MDR 的研究作一综述。

关键词 肿瘤; 多药耐药; 逆转剂; 活血化瘀类中药

中图分类号: R979.1 R730.52 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0135-04

Advances in studies on reversion of multidrug resistance of tumors by the blood activating stasis removing drugs of traditional Chinese medicine

LEI Yu, LI Sen, LIN Lin, MA Yong-gang*

College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071

Abstract Multidrug resistance of tumors (MDR) is one of the main reasons for the failure of chemotherapy. Chinese herbal medicine was widely used in Chinese clinical cancer therapy because of its advantages of multi-component, multi-mechanism. The Blood Activating Stasis Removing Drugs of traditional Chinese medicine is commonly used, and its reversal activity on the tumor cells has been observed. In this review, the current research progress on the mechanism of multiple drug resistance and reversion by the Blood Activating Stasis Removing Drugs are described.

Key word tumors; MDR; MDR reversal agents; blood activating stasis removing drugs

恶性肿瘤严重威胁人类健康, 是导致人类死亡的三大疾病之一, 化疗是肿瘤治疗的重要方法, 而肿瘤细胞的多药耐药极大地限制了化疗的效果, 甚至使化学药物作用完全丧失^[1], 是化疗失败的重要原因。肿瘤的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 指肿瘤细胞在接触某种化疗药物后, 对该药物出现耐药的同时, 对其他结构各异、作用机制不同的抗肿瘤药物亦产生交叉耐药的现象。据美国癌症协会估计, 90% 以上肿瘤患者死于不同程度的耐药^[2], 因此, 有关多药耐药以及逆转多药耐药的研究已成为国内外肿瘤药物学研究的热点。

1 肿瘤多药耐药的发生机制

形成 MDR 的机制很复杂, 目前, 研究认为的

主要机制有细胞对药物的外排增加、减少药物的摄入、抑制细胞凋亡、增强修复损伤的能力、药物代谢酶活性增强等等。其中, 肿瘤细胞对药物外排的增加是主要的机制。细胞外排主要通过细胞膜上转运蛋白的功能而发挥作用, 如 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)^[3]、多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP)、乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 等。

1.1 P-gp 介导的 MDR

P-gp 是 1976 年由 Juliano^[4] 等首次在有 MDR 表型的中国仓鼠卵巢细胞膜上观察到的一种与耐药程度呈正相关的高分子糖蛋白。P-gp 是由 MDR1 基因编码的一种跨膜糖蛋白, 相对分子质量为

收稿日期: 2010-01-12

基金来源: 国家自然科学基金资助项目 (30950014); 天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目 (08JCYBJC25900)

作者简介: 雷宇 (1986—), 女, 山西运城人, 南开大学药学院硕士研究生, 从事肿瘤相关的分子与药理方面的研究; Tel: (022) 23504542 E-mail: leiyu19860709@163.com

* 通讯作者 马永钢, 男, Tel: (022) 23506290 E-mail: mayonggang@nankai.edu.cn

170 000。P-gp 由 2 个完全相同的单体构成, 每个单体由 1 280 个氨基酸组成, 包括 6 个跨膜区域和 1 个 ATP 结合位点。跨膜区作为膜通道有利于药物转运, 而 ATP 结合点与能量供应有关。P-gp 具有能量依赖性药物排出泵功能, 属于典型的 ABC (ATP binding cassette) 转运蛋白超家族成员。P-gp 介导的 MDR 被认为是经典的耐药机制, 当化疗药物经浓度梯度进入细胞, P-gp 则能够结合药物分子, 同时, ATP 结合到 ATP 结合位点上, ATP 水解产生能量导致蛋白结构的改变, 从而能将药物从细胞内运输至细胞外, 降低细胞内药物浓度, 从而导致肿瘤细胞形成 MDR^[5,6]。

1.2 MRP 介导的 MDR

MRP 是 1992 年由 Cole^[7]等首次在人小细胞肺癌 H69AR 耐药细胞系中发现的另一种转运蛋白, 其相对分子质量为 190 000。MRP 主要分布在细胞膜上, 也可分布于细胞质中, 几乎存在于所有组织。与 P-gp 类似, MRP 也属于 ABC 转运蛋白超家族成员, 也具有能量依赖性药物排出泵的功能, 它们在分子结构上具有一定程度上的序列同源性。但是, MRP 与 P-gp 转运底物明显不同, MRP 不能独立转运未经修饰的化疗药物, 只能识别和转运与谷胱甘肽 (GSH) 耦合后的药物, 如阿霉素、柔红霉素和顺铂 (DDP) 等。在谷胱甘肽转移酶 (GST) 的作用下, 药物首先与 GSH 结合, 然后由 MRP 转运出胞外。MRP 转运的步骤可能为: GSH 合成 → GSH 与药物耦合 → MRP 将药物泵出细胞外^[8]。

1.3 BCRP 介导的 MDR

BCRP 是 1998 年由 Doyle^[9]等从人乳腺癌耐药细胞系 MCF-7/AdrVP 中发现的, 故命名为乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP), 但并非乳腺癌细胞所特有。BCRP 参与耐药性的分子机制与 P-gp 和 MRP 基本相似, 即依赖 ATP 获得能量主动外排化疗药物, 使细胞内药物的浓度降低, 导致肿瘤细胞的 MDR。BCRP 也是 ABC 转运蛋白超家族成员, BCRP 蛋白分子上有 6 个跨膜区和 1 个 ATP 结合位点^[10]。研究发现, 不仅乳腺癌, 在肺癌、绒毛膜癌、卵巢癌、宫颈癌等耐药性细胞系中都有 BCRP 的高表达^[11]。

2 活血化瘀类中药逆转肿瘤多药耐药的研究

由于大量的肿瘤患者死于不同程度的耐药, 肿瘤的多药耐药已经成了导致化疗失败的主要原因之

一, 肿瘤多药耐药逆转剂已经从最初的第一代发展到第三代, 主要分为钙离子通道阻滞剂、钙调蛋白抑制剂、环孢素类及其衍生物、抗心律失常药 (奎尼丁、胺碘达隆)、抗疟药、激素类、蛋白激酶抑制剂、P-gp 单克隆抗体、抗生素类、GST 耗竭剂等。但由于化学逆转剂能够增加抗肿瘤药物对机体关键组织如骨髓等毒害作用, 因此难以实现临床应用。

在国内, 中草药在肿瘤的治疗中得到了广泛的应用, 中药除了具有抑制肿瘤生长的作用外, 还具有逆转肿瘤多药耐药的活性^[12]。其中活血化瘀类中药又是具有肿瘤多药耐药逆转功能的中药中很重要的一种。

2.1 川芎

川芎为伞形科蒿本属植物川芎的根茎, 中医认为, 川芎具有止痛、理气、活血的功效, 是中药中一味重要的理血药。研究表明, 川芎根茎的化学成分主要含有苯酞衍生物、生物碱、酚酸类, 还含有苯丙素、萜醌、萜、甾醇类等化合物^[13,14]。其中川芎嗪 (tetramethylpyrazine, TMP) 是川芎的有效物质之一, 川芎嗪是一种生物碱, 大量研究表明, 川芎嗪具有显著的逆转肿瘤多药耐药的作用, 且毒性低, 价格低廉, 具有重要的理论与实际应用价值。

Wang X B^[15] 等利用 MTT 法检测细胞的生长抑制效应可知, 浓度为 600 mmol/L 的 TMP 能够逆转肝癌细胞 BEL-7402/ADM 的 MDR, 且逆转倍数为 9.23 倍。利用流式细胞仪检测到 TMP 作用后的 BEL-7402/ADM 细胞内阿霉素 (ADM) 荧光强度是无 TMP 作用的 BEL-7402/ADM 细胞的 (163.78±39.5) % ($P < 0.01$); 利用高效液相色谱技术检测到 TMP 作用后的 BEL-7402/ADM 细胞内阿霉素 (ADM) 荧光强度是无 TMP 作用的 BEL-7402/ADM 细胞的 (126.73±28.72) % ($P < 0.01$)。研究还发现, TMP 可显著下调耐药细胞的多药耐药基因 MDR1, MRP2, MRP3 和 MRP5 的 mRNA 水平和这些基因表达的蛋白质水平, 这表明: TMP 能够有效逆转 BEL-7402/ADM 细胞的 MDR, 它的逆转机制与降低 P-gp, MDR1, MRP2, MRP3 和 MRP5 等转运蛋白的表达有关。

2.2 姜黄

姜黄是植物姜黄的根茎, 性味辛、苦, 温, 具有破血行气, 通经止痛的功效。姜黄素是从姜黄中分离提取的一种具有广泛生物活性的酚类色素。有

研究表明,姜黄素可以下调多种肿瘤细胞中多药耐药基因 MDR1 的表达,增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,逆转多种肿瘤多药耐药。

靳胜^[16]等研究观察姜黄素对急性早幼粒细胞白血病细胞系 HL60/ADR 以及乳腺癌细胞系 MCF-7/ADR 多药耐药 (MDR) 的逆转。研究利用 MTT 法观察细胞的生长抑制效应,流式细胞仪检测凋亡以及细胞内阿霉素浓度,RT-PCR 以及 Western Blot 检测 P-gp、MRP 和 Bcl-2 蛋白表达。研究发现,加入姜黄素后耐药细胞系逆转指数分别为 4.18 (HL60/ADR) 和 3.39 (MCF-7/ADR),与单纯应用阿霉素相比有显著差异;流式细胞仪检测显示有明显的促凋亡作用,耐药细胞系内的 ADM 浓度明显升高;RT-PCR 以及 Western Blot 检测发现姜黄素对上述耐药细胞系的 MRP 以及 Bcl-2 表达有抑制作用。研究认为,姜黄素可以作为多药耐药的逆转剂应用于 MDR 逆转。王磊^[17]等采用 MTT 法测定药物的体外杀伤作用,应用流式细胞术测定细胞内罗丹明浓度。研究发现姜黄素不增加阿霉素对膀胱癌 BU-87 细胞系的细胞毒性作用 ($P>0.05$);而对于 BU-87/ADR,姜黄素明显增加阿霉素细胞毒性 ($P<0.05$),逆转指数为 4.0。姜黄素明显抑制 P-gp 的药物外排作用可能是关键因素。

2.3 大黄

大黄是蓼科大黄属掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf.、药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎。具有攻积滞、清湿热、泻火、凉血、祛瘀、解毒等功效。大黄素 (emodin, EM) 是大黄的主要有效成分之一,属于蒽醌类衍生物,近年研究发现,大黄素可抑制多种肿瘤细胞增殖诱导肿瘤细胞凋亡并逆转肿瘤细胞多药耐药性。

方志强^[18]等研究探讨了大黄素对人胆管癌多药耐药细胞 QBC₉₃₉/ADM 的耐药逆转作用。利用细胞生长周期、采用流式细胞术 (FCM) 检测凋亡率,以免疫组织化学 (SP) 法检测 P-gp。研究发现阿霉素 (ADM)、紫杉醇分别与 EM 联合作用于人胆管癌多药耐药细胞 QBC₉₃₉/ADM 的凋亡率比单独作用有显著提高。细胞周期分布显示:ADM、紫杉醇分别与 EM 联合作用于人胆管癌多药耐药细胞 QBC₉₃₉/ADM,使 QBC₉₃₉/ADM 阻滞于 G₂/M 期

的细胞数明显增加。EM 和紫杉醇联合作用后,人胆管癌多药耐药细胞 QBC₉₃₉/ADM 中 P-gp 的表达由 72.00% 降低到 46.00% ($P<0.01$)。因此认为 EM 对 QBC₉₃₉/ADM 细胞的多药耐药性有逆转作用。

2.4 莪术

莪术是单子叶植物姜科蓬莪术或温郁金的干燥根茎,具有活血化瘀等功效,主治行气破血,消积止痛等。榄香烯是从莪术中提取出的抗癌新药,其抗癌疗效确切、毒副作用小、抗癌谱广,具有广阔的应用前景。研究表明,榄香烯不仅可以直接抑制肿瘤细胞的生长,而且还具有逆转肿瘤多药耐药的功效。其逆转耐药性作用主要与抑制核苷转移、降低 P-gp 的功能和表达有关,榄香烯对 MDR1 基因高表达的耐药肿瘤细胞有较强的杀伤作用,并且长期使用榄香烯作用于肿瘤细胞也未能诱导 MDR1 mRNA 的高表达及其蛋白产物 P-gp 的大量产生^[19]。

陈春美^[20]等研究探讨了榄香烯对人胶质瘤细胞 U251/ADM 耐药性的逆转作用。实验以 MTT 法检测药物的细胞毒性和耐药细胞逆转倍数,并形态学观察,以流式细胞仪分析细胞周期和细胞内 ADM 药物积累变化,并以 RT-PCR 和流式细胞免疫学方法结合检测基因 MDR1、蛋白 MRP、DNA 拓扑异构酶 II a (TOPO II a) 和谷胱甘肽转移酶 π (GST- π) 的基因和蛋白水平表达变化。研究发现,榄香烯能显著降低 ADM 对胶质瘤细胞耐药株 U251/ADM 细胞的 IC₅₀,从 0.915 mg/L 到 0.051 mg/L,明显增加细胞内药物浓度,联合榄香烯浓度的增加,G₀/G₁ 期细胞减少,G₂/M 期细胞增加。MDR1、MRP 和 *gst- π* 基因表达均显著下降 ($P<0.05$),TOPO II a 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。研究认为,榄香烯具有逆转 U251/ADM 细胞耐药性的作用,可能与抑制耐药基因 MDR1、MRP 和 *gst- π* 的表达有关。

2.5 丹皮

丹皮,又称牡丹皮,为毛茛科植物牡丹干燥根皮。具有清热凉血,活血散瘀等功效,丹皮酚是从丹皮中分离提取出的有效成分之一,丹皮酚具有钙拮抗作用,并且还有抗炎、抗变态、解热镇痛和降压等作用且毒副作用小。

孙慧君^[221]等证实丹皮酚能提高细胞内化疗药

物的浓度,非细胞毒性剂量下降低化疗药物阿霉素(ADM)、柔红霉素(DAU)、等长春新碱(VCR)及长春花碱(VLB)对肿瘤多药耐药细胞株K562/ADM细胞的 IC_{50} ,但对细胞P-gp的表达没有影响,表明丹皮酚具有抑制P-gp的转运活性,逆转人红白血病细胞株K562/ADM细胞MDR作用。

近年来,肿瘤多药耐药的机制已经了解的更加深入,其发生与ABC转运蛋白家族、Topo II、GST、蛋白激酶C(PKC)、细胞凋亡、DNA损伤修复及体内环境等众多因素有关。化学逆转剂往往只针对其中的一种机制,而难以达到理想的治疗效果。中药具有多组分、多靶点、多阶段性作用特点,可以针对肿瘤多药耐药的多种机制进行有效的逆转。是很有希望的新型逆转剂的来源。但是目前对于中药逆转肿瘤细胞多药耐药的具体有效成分、作用机制的了解还不够深入全面,并且缺乏客观精确的评价中药在体内的逆转效率的方法。所以,对于中药逆转肿瘤的多药耐药还需要更为深入细致的研究。

参考文献:

- [1] 朱荣鑫,张赛龙,金永生. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1): 5-10.
- [2] 杨纯正. 肿瘤细胞耐药基因研究进展 [J]. 中国肿瘤, 1996, 5: 15-17.
- [3] Liu C X, Xiao P G, Peng Y, *et al.* Challenges in research and development of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1):1-28.
- [4] Juliano R L, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455: 152-162.
- [5] Loo T W, Clarke D M. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 44332-44338.
- [6] Ambudkar S V, Kim I W, Sauna Z E. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1) [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 27: 392-400.
- [7] Cole S P, Bhardwaj G, Gerlach J H, *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line [J]. *Science*, 1992, 258: 1650-1654.
- [8] Eid H, Ming F I, Nitiators E, *et al.* MRP expression of testicular cancers and its clinical relevance [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20: 4019-4022.
- [9] Doyle L A, Yang W, Abruzzo L V, *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15665-15670.
- [10] Doyle L A, Ross D D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 7340-7358.
- [11] Jia P, Wu S, Li F, *et al.* Breast cancer resistance protein-mediated topotecan resistance in ovarian cancer cells [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2005, 15: 1042-1048.
- [12] 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.
- [13] 肖培根. 新编中药志 [M]. 第1卷. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [14] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京:学苑出版社, 1998.
- [15] Wang X B, Wang S S, Zhang Q F, *et al.* Inhibition of tetramethylpyrazine on P-gp, MRP2, MRP3 and MRP5 in multidrug resistant human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23: 211-215.
- [16] 靳胜,陈书恩,张曼,等. 姜黄素逆转HL60/ADR及MCF-7/ADR的多药耐药研究 [J]. 重庆医学, 2010, 39: 21-23.
- [17] 王磊,柯红,王一羽,等. 姜黄素逆转P糖蛋白介导的膀胱肿瘤多药耐药的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20: 707-708.
- [18] 方志强,张萍,米志坚,等. 大黄素对人胆管癌多药耐药细胞QBC939/ADM的耐药逆转作用 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3: 31-33.
- [19] 王宝成,郭军,歌剑时,等. 榄香烯乳剂与肿瘤多药耐药的基础研究 [J]. 中国肿瘤临床, 1996, 23: 143-146.
- [20] 陈春美,杨卫忠,王春华,等. 榄香烯对人脑胶质瘤U251/ADM耐药细胞株多药耐药性的逆转作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23: 601-603.
- [21] 孙慧君,王晓琦,于丽敏. 丹皮酚对MDR逆转作用的研究 [J]. 解剖科学进展, 2000, 6: 59-62.