

注射用黄芪多糖对耐顺铂人肺腺癌细胞 A549/DDP 耐药逆转作用研究

张莹, 贾英杰, 李小江, 朱津丽, 张欣, 张丽丽

天津中医药大学第一附属医院 肿瘤科, 天津 300193

摘要: 目的 探讨注射用黄芪多糖药物血清在体外对耐顺铂 (DDP) 人肺腺癌 A549/DDP 细胞株的耐药逆转作用。方法 通过建立小鼠肿瘤模型, 运用血清药理学方法, 以人肺腺癌敏感细胞 A549 和耐药细胞 A549/DDP 为研究对象, 采用细胞毒实验 (MTT) 方法, 探讨注射用黄芪多糖对耐顺铂人肺腺癌细胞 A549/DDP 的耐药逆转作用。结果 注射用黄芪多糖药物血清高、中、低剂量组分别与 DDP 合用时对 A549/DDP 细胞的耐药逆转倍数分别为 1.24、1.41、1.34; 且中、高剂量组与阳性对照 DDP 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 注射用黄芪多糖能明显增加 A549/DDP 耐药细胞对 DDP 的敏感性, 提高细胞死亡率, 具有耐药逆转作用。

关键词: 注射用黄芪多糖; 肺癌; A549/DDP; 耐药性

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)06-0417-03

Resistance reversal effect of astragalus polysaccharides for injection on cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP

ZHANG Ying, JIA Ying-jie, LI Xiao-jiang, ZHU Jin-li, ZHANG Xin, ZHANG Li-li

The First Hospital Affiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To investigate the resistance reversal effect of the drug serum of astragalus polysaccharides for injection (API) *in vitro* on cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP. **Methods** The model of tumor-bearing mice was established, and using serum pharmacology method and taking human lung adenocarcinoma sensitive cell A549 and drug-resistant cell A549/DDP as the research objects, the resistance reversal effect of API on cisplatin-resistant human adenocarcinoma cells A549/DDP was studied in cell toxicity experiment by MTT method. **Results** The resistance reversal multiples of high-, mid-, and low-dose groups of API drug serum to A549/DDP cells were 1.24, 1.41, and 1.34, respectively; The data in mid- and high-dose groups had significant difference ($P < 0.05$) compared with DDP (positive control) group. **Conclusion** API could obviously increase the sensitivity of A549/DDP cells on DDP and improve the cell mortality. API has the resistance reversal effect.

Key words: astragalus polysaccharides for injection; lung cancer; A549/DDP; resistance

目前全世界的肺癌发病率与死亡率均高居恶性肿瘤首位。在肺癌的综合治疗中, 化疗占有重要的地位, 尽管新的化疗药物不断问世, 化疗方案日趋完善, 但肿瘤细胞的多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 严重限制化学药物的治疗效果。据统计, 90% 以上接受化疗的肿瘤患者, 其死亡与耐药有关^[1], 因此对 MDR 逆转方法的研究一直是肿瘤治疗领域的热点。目前国内外还没有一种逆转药物或方法在临床被广泛接受, 因此, 很多学者看好在中药领域寻找对多药耐药的逆转药物。本研究以耐顺铂 (DDP) 人肺腺癌细胞系 A549/DDP 及其亲代细胞系 A549 为研究对象, 探讨注射用黄芪多糖含药血清对化疗药物多药耐药的逆转作用, 为该药在肺癌

的临床应用提供重要的实验依据。

1 材料

1.1 药物

注射用黄芪多糖 (API, 0.25 g/支), 天津赛诺制药有限公司生产, 批号 091105。

1.2 动物

雄性 KM 种小鼠 40 只, 体质量 (21.36 ± 1.22) g。

1.3 瘤株

S₁₈₀ (腹水瘤) 瘤株, 由天津市医药科学研究所提供。

1.4 仪器

超净工作台 (苏州净化设备公司); BB5060UVCO₂ 细胞培养箱 (德国 Heraeus 公司);

收稿日期: 2012-10-07

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划 (青年基金项目) (12JCQNJC07500); 天津市高等学校科技发展基金计划项目 (20110223)

作者简介: 张莹 (1977—), 女, 天津市人, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合肿瘤临床及科研工作。

Tel: (022)27432431 E-mail: zhangyingzhongyi@sina.com

纯水器 (Millipore 公司); 台式低温高速离心机 (Heracus 公司); Model680 酶联免疫分析仪 (Bio-RAD 公司); 恒温水浴箱 (北京医疗设备厂)。

1.5 试剂

RPMI1640 培养基、新生胎牛血清、RPMI1640 完全培养液 (pH7.1)、PBS 液、MTT 试剂、胰蛋白酶、丙酮酸钠、葡萄糖、 NaHCO_3 等。

1.6 细胞系

人肺腺癌细胞系 A549、耐 DDP 人肺腺癌细胞系 A549/DDP 均购自中国科学院肿瘤研究所。

2 方法

2.1 荷 S₁₈₀ 肿瘤小鼠模型制备

小白鼠适应性饲养 3 d 后, 称体质量, 根据随机数目表数列为 API 高、中、低剂量组及模型组, 共 4 组, 每组 10 只。体外复苏、培养 S₁₈₀ 细胞, 在细胞的对数生长期收集细胞。1 500 r/min 离心 5 min, D-Hank's 溶液洗涤 2 次, 离心弃上清, 离心管外周以冰袋来维持温度在 4 °C 左右, 以此来保持瘤细胞的活性。用生理盐水稀释, 调整细胞浓度到 1×10^6 /mL。每只小鼠右前腋下皮下接种 0.2 mL^[2]。

2.2 给药方法与剂量

小鼠于接种 S₁₈₀ 肿瘤细胞 24 h 后, API 高、中、低剂量组分别 ip 给予注射用黄芪多糖 100、50、25 mg/kg; 模型组 ip 0.5 mL 生理盐水。每次给药间隔 24 h, 连续 14 d。

2.3 药物血清制备

末次给药 1 h 后小鼠称体质量, 眼眶取血法采血, 无菌分离血清, 经 56 °C, 30 min 灭活处理后, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, 置 -20 °C 保存备用。

2.4 细胞复苏

从液氮罐中取出冻存管, 迅速放入 37 °C 水浴中, 令其迅速融化, 2 000 r/min 离心 3 min 后用无菌吸管吸出所有上清, 沉淀物用含血清培养液混悬, 吸出细胞悬液, 用适量培养液稀释后, 转入无菌培养瓶培养, 次日更换培养液, 继续培养。

2.5 细胞的收集与冻存

收集对数生长期细胞, 在收集前 24 h 换液一次, 用胰酶消化制成细胞悬液, 离心, 弃上清, 加入冻存液, 以 1×10^6 /mL 密度混悬细胞。将细胞悬液转至冻存管, 标记好后置于 -4 °C 冰箱 60 min, 转至 -20 °C 冰箱 120 min, 然后放入 -80 °C 低温冰箱中暂存, 最后置于液氮罐中长期保存。

2.6 细胞培养

参照刘文哲等^[3]介绍的方法并加以改进。复苏后的 A549、A549/DDP, 分别接种于 50 mL 培养瓶, 加入 RPMI-1640 培养液 6 mL, 置于 37 °C、饱和湿度、含 5% CO_2 和 95% 空气的 CO_2 孵箱中无菌培养, A549/DDP 细胞则在 2 $\mu\text{g/mL}$ DDP 诱导的 RPMI-1640 培养基中培养, 试验前 2 d, 更换成无 DDP 的培养基培养, 以保持细胞株的耐药性。细胞换液时间为 2~3 d。

2.7 细胞传代

倒置显微镜下观察到细胞长满时, 进行细胞传代。吸去培养瓶中的旧培养液, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 用量以刚没过细胞层为宜, 弃去消化液, 倒置显微镜下观察到贴壁细胞收缩、细胞间隙变大、细胞由贴壁的多角形变为圆形后, 倾去胰蛋白酶溶液, 加入含血清 RPMI-1640 培养液, 以终止胰蛋白酶的消化作用。加入 2~3 mL Hanks 液, 轻轻转动培养瓶, 弃去 Hanks 液, 加入完全培养液, 用吸管取培养液轻轻吹打瓶壁细胞, 使其脱离瓶壁形成单细胞悬液, 用细胞计数板在显微镜下计细胞数, 取实验所需细胞量分装入新培养瓶, 添加培养液至适量, 以 1/10、1/20 的细胞传代, 每 2~3 天传代 1 次, 试验时取对数生长期细胞。

2.8 细胞悬液的制备

取对数生长期 A549、A549/DDP 细胞, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶液消化, PBS 洗涤 2 次, 离心, 弃上清, 用 RPMI-1640 培养液配制成 2×10^5 /mL 细胞悬液, 用于实验。

2.9 MTT 法检测注射用黄芪多糖药物血清对 A549 及 A549/DDP 的细胞毒作用

取已配成 2×10^5 /mL 细胞悬液的 A549、A549/DDP 细胞, 100 μL /孔 (每孔细胞数为 2×10^4) 接种于 96 孔平底培养板中, 37 °C、5% CO_2 培养 24 h, 至细胞生长旺盛贴壁后, 去掉培养液, 换成不含胎牛血清的培养液。而后将细胞分为 API 含药血清高、中、低剂量组, 荷瘤动物模型血清组 (模型组), DDP 组, DDP 加 API 高、中、低剂量组, 另设 RPMI-1640 培养液 (含 10% 胎牛血清) 不加药物和细胞只加 DMSO 的调零孔组。API 高、中、低剂量组分别加入 20 μL 终体积浓度为 10% 的各剂量组含药荷瘤动物血清; DDP 加 API 高、中、低剂量组同时加入 20 μL 终体积浓度 10% 的各剂量组含药荷瘤动物血清和恒定质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 DDP

各 20 μ L; 模型组加入终体积浓度为 10% 的荷瘤动物模型血清 20 μ L; DDP 组只加入终质量浓度为 1 μ g/mL 的 DDP 20 μ L, 每一剂量均重复 5 孔, 每孔终体积为 200 μ L, 不足部分加以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液。各组加样后继续培养 48 h, 每孔再加入 20 μ L MTT (5 mg/mL) 培养 4 h, 小心吸去各孔中上清, 每孔再加入二甲基亚砷 (DMSO) 200 μ L, 混匀静置 5 min, 用酶标仪在 550 nm 处检测各孔吸光度值 (A), 用下列公式计算细胞在各种浓度下的细胞死亡率及耐药逆转倍数。

细胞死亡率 = $1 - \text{药物组 } A \text{ 值} / \text{空白对照组 } A \text{ 值}$

耐药逆转倍数 = $\text{逆转剂加抗癌药物组细胞死亡率} / \text{抗癌药物组细胞死亡率}$

2.10 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

注射用黄芪多糖荷瘤动物含药血清对肺癌敏感细胞 A549 杀伤作用比 DDP 弱; 注射用黄芪多糖荷瘤动物含药血清高、中、低剂量组加 DDP 的 A549 细胞死亡率分别是 DDP 组的 1.11 倍 (38.20%/34.43%)、1.05 倍 (36.01%/34.43%) 和 1.01 倍 (34.82%/34.43%), 高剂量组细胞死亡率较高; 高、中、低剂量组注射用黄芪多糖均能明显增加 A549/DDP 耐药细胞对 DDP 的敏感性, 提高细胞死亡率, 耐药逆转倍数分别为 1.24、1.41 和 1.34; 且中剂量和高剂量组与阳性对照 DDP 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

4 讨论

根据肿瘤细胞的耐药特点, 耐药可分为原药耐

表 1 注射用黄芪多糖药物血清对 A549 及 A549/DDP 的细胞毒作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Cytotoxicity of API drug serum on A549 and A549/DDP cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别		细胞死亡率/%		耐药逆 转倍数
		A549	A549/DDP	
DDP	—	34.43±8.67	20.25±4.29	—
黄芪多糖	低剂量组	11.54±3.79	18.66±3.18	—
	中剂量组	16.61±4.38	16.30±3.77	—
	高剂量组	18.72±5.21	17.25±3.94	—
黄芪多糖+DDP	低剂量组	34.82±8.02	25.09±5.42**	1.24
	中剂量组	36.01±8.73	28.55±5.67*	1.41
	高剂量组	38.20±9.42	27.21±6.05*	1.34

与 DDP 组比较, ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P > 0.05$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P > 0.05$ vs DDP group

药 (PDR) 和多药耐药 (MDR) 两大类。原药耐药指仅对诱导药物产生耐药性而对其他药物不产生交叉耐药性; 多药耐药指肿瘤细胞对某种化疗药物产生耐药性时, 对其他结构上无关、作用机制各异的各种化疗药物也产生交叉耐药性。MDR 是肿瘤细胞产生的一种特殊的耐药现象, 是导致多种化疗药物治疗失败的重要原因。

铂类药物是肺癌化疗方案中的核心成分, 因此探讨铂类药物的多药耐药对肺癌的化疗具有相当大的指导意义。近 10 年来, 在肺癌对铂类药物耐药的问题上, 人们进行了广泛而深入的研究。研究已经证明, 肺腺癌耐药发生率高于鳞癌, 并且应用 DDP 诱导建立的肺腺癌多药耐药细胞系 A549/DDP 具有代表性^[4]。

笔者前期研究采用 MTT 法增殖动力学实验对实验用 A549/DDP 细胞耐药性进行了鉴定, 结果显示 A549/DDP 细胞耐药倍数为 11.09。证实此肺腺癌细胞系 A549/DDP 相对于其亲本细胞系 A549, 确实对传统化疗药 DDP 产生明显的耐药性, 因此认为该细胞是一株生长良好的耐药系^[2]。

注射用黄芪多糖是应用现代分子生物学技术提取黄芪中的有效部位, 作为国家中药二类新药, 国家药监局批准的以特征指纹图谱控制产品质量的中药注射剂, 用于倦怠乏力、少气懒言、自汗、气短、食欲不振属气虚证因化疗后白细胞减少, 生活质量降低, 免疫功能低下的肿瘤患者。本研究表明注射用黄芪多糖的干预能增强化疗药 DDP 对 A549/DDP 细胞的敏感性, 使 DDP 对耐药细胞的杀伤性增大, 具有耐药逆转作用。该研究成果为注射用黄芪多糖对肺癌耐药提供了有效的实验依据, 可为临床提供高效的多药耐药逆转措施, 使肺癌患者得到更有效的治疗。

参考文献

- [1] Longley D B, Johnston P G. Molecular mechanism of drug resistance [J]. *J Pathol*, 2005, 2059(2): 275-292.
- [2] 张莹, 贾英杰, 杨洁, 等. 消岩汤药物血清对 A549/DDP 多药耐药逆转作用的研究 [J]. *天津中医药*, 2010, 27(4): 335-336.
- [3] 刘文哲, 李金瀚, 胡义德, 等. 顺铂诱导人肺腺癌 A549 细胞系多重抗药性的形成 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 1999, 6(1): 13-16.
- [4] Kawai H, Kiura K, Tabata M, et al. Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy [J]. *Lung Cancer*, 2002, 36(3): 305-314.