

- 理学通报), 2003, 16(2): 141-144.
- [2] Jaberansari M T, Baxter G F, Muller C A, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition enhances a subthreshold stimulus to elicit delayed preconditioning in pig myocardium [J]. *Am Coll Cardiol*, 2001, 37(7): 1996-2001.
- [3] Leesar M A, Stoddard M F, Dawn B, *et al.* Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty [J]. *Circulation*, 2001, 103(24): 2935-2941.
- [4] Tissier R, Souktani R, Parent de Curzon O, *et al.* Pharmacological delayed preconditioning against ischaemia-induced ventricular arrhythmias: effect of an adenosine A₁ receptor agonist [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(7): 1532-1538.
- [5] Shen J, Wang J, Zhao B, *et al.* Effects of EGB761 on nitric oxide and oxygen free radical, myocardial damage and arrhythmia in ischemic-reperfusion injury *in vivo* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1406(3): 228-236.
- [6] Varga E, Bodi A, Ferdinandy P, *et al.* The protective effect of EGB761 in isolated ischemic-reperfused rat heart: a link between cardiac function and nitric oxide production [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, 34(5): 711-717.
- [7] Chen X, Liu L Y, Li Z F. Cardiovascular protective effects and NO-mediated cerebrovasorelaxant effects of extract of *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 1998, 78: 692-695.
- [8] Kubota Y, Tanaka N, Umegaki K, *et al.* *Ginkgo biloba* extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level [J]. *Life Sci*, 2001, 69(20): 2327-2336.
- [9] Mei D A, Elliott G T, Gross G J. KATP channels mediate late preconditioning against infarction produced by monophosphoryl lipid A [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(6 Pt2): H2723-2729.
- [10] Qiu Y, Rizvi A, Tang X L, *et al.* Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(6 Pt 2): H2931-2936.

黄连解毒汤 70% 醇提物对小鼠 S₁₈₀ 细胞 MDR 相关因子表达的逆转作用

李贵海, 孙付军, 董 学, 李晓晶, 杨书斌

(山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

摘 要:目的 观察黄连解毒汤 70% 醇提物对小鼠多药耐药 (MDR) 基因表达产物 P₁₇₀、肺耐药蛋白 (LRP) 和拓扑异构酶 I (TOPO I) 的影响, 明确其干预 MDR 的分子生物学基础, 指导临床应用其逆转 MDR 的产生。方法 模拟临床 PFC 方案, 建立小鼠 S₁₈₀ 肿瘤细胞 MDR 在体模型, 同时给予黄连解毒汤 70% 醇提物 10 d, 流式细胞仪荧光检测 P₁₇₀、LRP、TOPO I。结果 黄连解毒汤 70% 醇提物明显逆转 S₁₈₀ 肿瘤细胞 MDR 相关基因表达产物 P₁₇₀、LRP、TOPO I 的过度表达。结论 黄连解毒汤 70% 醇提物可通过逆转相关生物活性物质的过度表达, 逆转化疗诱发的肿瘤 MDR 的产生。

关键词: 黄连解毒汤 70% 醇提物; 肿瘤多药耐药; P₁₇₀; LRP; TOPO I

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)07-1050-03

Reversion of 70% ethanolic extract from Huanglian Jiedu Decoction on mice S₁₈₀ cell MDR relative factor expression

LI Gui-hai, SUN Fu-jun, DONG Xue, LI Xiao-jing, YANG Shu-bin

(Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Key words: 70% ethanolic extract from Huanglian Jiedu Decoction; multi-drug resistance of tumour; P₁₇₀; LRP; TOPO I

黄连解毒汤主要由黄连、黄芩、黄柏和栀子 4 味药组成, 为清热解暑代表方。现代药物学研究证实, 该方含有小檗碱、黄连碱、甲基黄连碱、药根碱、黄柏碱、掌叶防己碱、蝙蝠葛碱等多种生物碱^[1]。生物碱是一类有广泛生物学效应的中药成分, 近年来国内

学者对其干预肿瘤细胞多药耐药 (MDR) 的研究做了大量工作, 但大多限于体外实验, 而体外细胞培养难以客观模拟临床化疗所致 MDR 的在体环境。本研究在建立了小鼠 S₁₈₀ 肿瘤 MDR 在体模型的基础上^[2,3], 观察黄连解毒汤 70% 醇提物对小鼠 S₁₈₀ 肿

收稿日期: 2007-01-06

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y2005C57)

作者简介: 李贵海 (1959—), 男, 研究员, 从事中药抗肿瘤作用及机制的研究, 在本领域发表论文数十篇。

Tel: (0531) 82949803 Fax: (0531) 82968473 E-mail: guihai99@163.com

瘤细胞 MDR 相关分子生物活性物质表达或活性的影响,以探讨其干预化疗 MDR 的作用和作用机制。

1 材料

1.1 药品:黄连解毒汤 70% 醇提取物由本院植化室杨书斌教授协助制备。制备方法:黄连 6 g、黄柏 6 g、黄芩 6 g、栀子 6 g,粉碎,70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,浓缩得干膏 5.7 g,含小檗碱 6.06%、黄芩苷 6.43%、栀子苷 5.48%,研磨为细粉配成 10、5 mg/mL 的混悬液备用。注射用顺铂:山东齐鲁制药厂产品,批号 01111611;环磷酰胺 (CTX):上海华联制药有限公司产品,批号 030703;5-氟尿嘧啶 (5-Fu):天津金耀氨基酸有限公司产品。

1.2 动物:昆明种小鼠,由山东大学实验动物中心提供,合格证号:鲁动质字 200210023;小鼠 S₁₈₀腹水型瘤种鼠:由山东医科大学药物所药理室提供。

1.3 试剂:碘化丙啶 (PI) 为美国 Sigam 公司产品,多药耐药基因 (MDR1) 表达产物 P₁₇₀、DNA 拓扑异构酶 I (TOPO I)、肺耐药蛋白 (LRP)、异硫氢酸荧光素 (FITC) 标记的单克隆抗体 IgG₁及免疫阴性对照品 IgG₁-FITC 均为美国 Pharmingen 公司产品,由北京岳泰生物公司提供。

1.4 仪器:FACScan 型流式细胞仪,美国 BD 公司产品;梅特勒 GB—303 电子天平,美国梅特勒公司产品。

2 方法

2.1 小鼠 S₁₈₀肿瘤细胞耐药模型的建立及小鼠分组:18~22 g 昆明种小鼠,模拟临床化疗 PFC 方案,无菌抽出 3 只 S₁₈₀小鼠腹水,由无菌 NS 稀释至含瘤细胞 1×10⁶/mL,摇匀,每只小鼠 ip 接种 0.2 mL,接种 24 h 后,开始 ip 给予顺铂 3 mg/kg,每周 1 次;ig CTX 和 5-Fu 各 3 mg/kg,每天 1 次^[2,3],连续 4 周 (两周时一对一传代一次)。获得 S₁₈₀小鼠 MDR 模型,无菌抽取化疗诱导 4 周的小鼠腹水,无菌 NS 稀释至含瘤细胞 1×10⁶/mL,每鼠接种 0.2

mL,并取各化疗诱导 4 周的模型小鼠腹水 2 mL,入肝素抗凝试管中,1 500 r/min 离心 5 min,去除上清液,由 pH 7.4 PBS 液漂洗,离心洗脱 3 次,以 70% 乙醇 1.0 mL 固定,4 ℃ 保存。小鼠接种耐药 S₁₈₀细胞液 24 h 后,随机分为模型对照组、黄连解毒汤 70% 醇提取物 100、50 mg/kg 组。每组 14 只,模型对照组 ig 给予凉开水 0.2 mL/10 g,黄连解毒汤 70% 醇提取物组分别 ig 给予黄连解毒汤混悬液 100、50 mg/kg,连续 10 d,于末次给药 24 h 后,无菌抽出腹水,入肝素抗凝试管中,1 500 r/min 离心 5 min,去除上清液,由 pH 7.4 PBS 液漂洗,离心洗脱 3 次,以 70% 乙醇 1.0 mL 固定,4 ℃ 保存备测。

2.2 MDR 表达产物 P₁₇₀、TOPO I、LRP 表达的检测:取 70% 乙醇固定的小鼠 S₁₈₀细胞,由 pH 7.4 PBS 液稀释后,1 500 r/min 离心 5 min,再次洗脱 1 次,并调整细胞浓度为 1×10⁶/mL,摇匀,取细胞悬液 500 μL,加入各自相对应的 FITC 标记的鼠抗人的单克隆抗体 IgG₁工作液 20 μL,另各取一支阴性对照抗 IgG₁-FITC,37 ℃ 避光反应 30 min 后,由流式细胞仪荧光检测。仪器的检测变异系数<2%,测定 1×10⁴个细胞的 P₁₇₀、TOPO I、LRP 3 种相关生物分子的表达,激发光波长均为 488 nm。黄连解毒汤 70% 醇提取物对 MDR 表达产物 P₁₇₀、TOPO I、LRP 过度表达的抑制率按公式计算。

抑制率=(模型组表达率-给药组表达率)/模型组表达率×100%

3 结果

3.1 黄连解毒汤 70% 醇提取物对 S₁₈₀小鼠 MDR 模型 MDR 表达产物 P₁₇₀过度表达的影响:诱导 4 周和再传代 10 d 后模型对照组小鼠 S₁₈₀肿瘤细胞肿瘤 MDR 相关基因 P₁₇₀表达无显著性差异,提示诱导后的耐药小鼠 S₁₈₀细胞的基因表达较为稳定。黄连解毒汤 70% 醇提取物明显逆转对耐药小鼠 S₁₈₀细胞耐药基因 P₁₇₀过度表达。见表 1。

表 1 黄连解毒汤 70% 醇提取物对 MDR 模型小鼠 S₁₈₀细胞 P₁₇₀、TOPO I、LRP 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of 70% ethanolic extract of Huanglian Jiedu Decoction on expression of P₁₇₀, TOPO I, and LRP in MDR mice S₁₈₀ cell ($\bar{x}\pm s$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物	P ₁₇₀		LRP		TOPO I	
			表达率/%	抑制率/%	表达率/%	抑制率/%	表达率/%	抑制率/%
诱导 4 周	—	9	24.01±7.48	—	70.21±21.75	—	22.57±12.38	—
模型对照	—	11	28.12±9.79	—	67.65±25.42	—	24.45±14.35	—
黄连解毒汤	100	10	5.52±2.61***	80.37	6.86±3.39***	89.86	6.18±3.78***	74.72
70%醇提取物	50	10	9.16±3.67***	67.43	10.76±6.28***	84.09	8.58±4.10***	64.91

与模型对照组比较:***P<0.001
***P<0.001 vs model control group

3.2 黄连解毒汤 70% 醇提物对 S₁₈₀ 小鼠 MDR 模型 MDR 表达产物 LRP 过度表达的影响: 经化疗诱导 4 周后传代 10 d 的小鼠耐药 S₁₈₀ 肿瘤细胞 LRP 表达率与诱导 4 周比较无明显变化, 而给予黄连解毒汤 70% 醇提物明显逆转了耐药 S₁₈₀ 肿瘤细胞 LRP 的过度表达, 与模型对照组比较差异极显著 ($P < 0.001$), 见表 1。

3.3 黄连解毒汤 70% 醇提物对 S₁₈₀ 小鼠 MDR 模型 MDR 表达产物 TOPO II 表达的影响: 黄连解毒汤 70% 醇提物显著逆转由化疗诱导后的获得性耐药小鼠 S₁₈₀ 细胞 TOPO II 的过度表达, 而诱导后传代 10 d 的模型对照组与诱导后 4 周时其表达率无明显差异, 提示黄连解毒汤 70% 醇提物可能通过逆转 TOPO II 的过度表达, 干预化疗引起的 MDR, 见表 1。

4 讨论

肿瘤化疗获得性 MDR 的发生, 可见到肿瘤细胞 MDR 基因、耐药蛋白过度表达, 肿瘤细胞 TOPO II 等相关酶活性增加等表现。耐药基因和耐药蛋白的过度表达时, 可将化疗药物经跨膜转运排出细胞并阻止药物进入细胞核, 使化疗药物不能发挥细胞毒性作用^[4~6]; TOPO II 活性增强, 增强 DNA 修复能力, 拮抗化疗药物的细胞毒性^[6], 还原性谷胱甘肽酶活性增加, 与化疗药物结合, 阻止化疗药物作用于肿瘤细胞, 而产生耐药性。中药生物碱具有干预和逆转肿瘤 MDR 的作用^[7]。

本研究应用模拟临床肿瘤患者临床化疗诱导小鼠 S₁₈₀ 细胞表达产生耐药性, 观察了黄连解毒汤

70% 醇提物体内给药对肿瘤细胞耐药相关生物活性物质 P₁₇₀、LRP、TOPO II 表达的影响, 结果显示黄连解毒汤 70% 醇提物可以明显逆转小鼠 S₁₈₀ 细胞耐药基因 MDR 的表达产物 P₁₇₀、肺耐药蛋白 LRP 过度表达, 抑制细胞拓扑异构酶 II (TOPO II) 的活性。提示黄连解毒汤 70% 醇提物可以抑制肿瘤细胞 MDR 的产生, 其干预机制可能是通过对耐药基因和耐药蛋白表达的调控, 相关酶活性的影响而实现的。

References:

- [1] Zheng H Z, Dong Z H, She J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中医药现代研究) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1997.
- [2] Xu L J, Wang Z M, Sun F J, et al. Establishing mice model of multidrug resistance of tumor induced by combined-chemotherapy [J]. *Lab Anim Comp Med* (实验动物与比较医学), 2005, 25(4): 215-217.
- [3] Yin G P, Gu Q, Chen M, et al. Establishing of mouse ascites model induced with S₁₈₀ cell line to obtain multi-drug resistance gene expression [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 2001, 5(21): 282-285.
- [4] Ha M H, Tsuruo T. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(3): 1454-1458.
- [5] List A F. Non-p-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance [J]. *Semin Hematol*, 1997, 34(4): 20-24.
- [6] Ballatori N, Reber J F. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione [J]. *Semin Liver Dis*, 1998, 18(4): 377-387.
- [7] Sun F J, Wang N, Li G H, et al. Effect of matrin on the expression of P₁₇₀, LRP and TOPO II of obtained multi-drug resistance of mouse S₁₈₀'s tumour cell [J]. *J Chin Mater Med* (中药材), 2004, 27(11): 838-840.

沙苑子抗肿瘤活性部位体内外筛选

刘春宇¹, 顾振纶², 杜崇民¹, 杨吉成^{3*}

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215123;
3. 苏州大学 细胞和分子生物学教研室, 江苏 苏州 215123)

沙苑子为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. ex Bunge 干燥成熟的种子, 具有温补肝肾、固精、缩尿、益肝明目的功能。药理研究表明沙苑子提取物具有改善血液流变学指标、降低

血压、调节血脂、抑制血小板聚集、保护肝脏、增强免疫功能、抗炎、镇痛及调节中枢神经系统等作用^[1]。近年来, 本课题组对沙苑子的有效成分和药理活性进行了深入研究, 实验证明沙苑子黄酮具有较好的保肝、

收稿日期: 2006-12-10

基金项目: 江苏省高校自然科学基金研究项目 (06KJB360105); 苏州市社会发展科技项目 (SS0515)

作者简介: 刘春宇, 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药有效成分及药理作用研究。

Tel: (0512) 65221518 E-mail: chunyu1998@msn.com

* 通讯作者 杨吉成 Tel: (0512) 65880107 E-mail: yangjicheng@suda.edu.cn