

抑制作用,具有显著性差异 ( $P < 0.05, 0.01$ ),且呈现出一定剂量依赖关系;加入 *L*-NAME 抑制酶活性后,气管的收缩明显升高,收缩率从  $(95.3 \pm 13.7)\%$  升高到  $(124.3 \pm 22.5)\%$ ,且有显著性差异。加入 *L*-NAME 后,贝母辛组 3 个剂量均未能抑制气管平滑肌的收缩,与 *L*-NAME + DMSO 组比较无显著性差异。结果见表 7。

表 7 *L*-NAME 对贝母辛舒张豚鼠气管平滑肌的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 7 Effect of *L*-NAME on relaxation of peimisine on tracheal smooth muscle of guinea pig  
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	<i>C</i> (mmol · L <sup>-1</sup> )	收缩率/ %
DMSO	-	95.3 ± 13.7
<i>L</i> -NAME + DMSO	0.1	127.9 ± 6.1 <sup>***</sup>
贝母辛	0.023	90.5 ± 10.2
	0.046	70.8 ± 20.6 <sup>*</sup>
	0.092	44.7 ± 29.4 <sup>**</sup>
<i>L</i> -NAME + 贝母辛	0.1 + 0.023	124.3 ± 22.5 <sup>*</sup>
	0.1 + 0.046	112.2 ± 22.8
	0.1 + 0.092	110.8 ± 24.4

与 DMSO 组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$

<sup>\*</sup>  $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs DMSO group

#### 4 讨论

彭泽贝母已经被确定为国产贝母属植物在江西的新分布,彭泽贝母中贝母辛的量远高于市售川贝母和浙贝母,目前已经建立了贝母的定量测定方法<sup>[3]</sup>,可作为彭泽贝母的特征化学成分之一,为建立可靠的彭泽贝母质量标准提供了指标选择。

贝母的平喘作用机制一般认为与其松弛支气管平滑肌,减轻气管、支气管痉挛,改善通气状况有关。支配气道平滑肌的神经主要有肾上腺素能神经和胆碱能神经,以及非肾上腺素能非胆碱能神经。兴奋支气管肾上腺素能受体,抑制胆碱能神经或阻断 M 受体均可引起支气管平滑肌舒张。因此本实验从兴奋或抑制受体的角度出发,研究贝母辛在舒张气管平滑肌上的作用,从而进一步揭示贝母辛的作用靶受体和机制。从结果可知,贝母辛通过作用于 M 受体、兴奋受体和拮抗内钙释放,促进生成和释放 NO 从而达到舒张气管平滑肌,实现平喘的作用。

离体气管法是筛选平喘药常用的实验方法。豚鼠气管对药物的反应较其他动物气管的反应更敏感,且更接近于人的气管,因此豚鼠的气管是离体实验常用的标本。由于离体实验脱离了正常的生理环境,所得出的结论也有一定的局限性,所以在以后的研究中,本课题组将从整体实验出发,更全面充分地考察贝母辛的作用机制。

致谢:军事医学科学院放射与辐射医学研究所吕秋军教授对本实验的大力支持。

#### 参考文献:

- [1] 张治针,范崔生. 江西彭泽贝母化学成分的研究 [J]. 中草药, 1994, 25(1): 48.
- [2] 李惠萍,白春学,吴淦桐,等. 溴化异丙托品和沙丁胺醇舒张气管平滑肌叠加作用的离体研究 [J]. 中国临床药理学与治疗, 2004, 9(1): 96-98.
- [3] 黄兴发. 泽贝母化学成分及贝杏甘口含片的研究 [D]. 南昌:江西中医学院, 2004.

## 正常人外周血单个核细胞对雷公藤内酯醇的耐药特征和机制的研究

张文娟,涂胜豪\*,胡永红,方赫

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 中西医结合科,湖北 武汉 430030)

**摘要:**目的 探讨正常人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)对雷公藤内酯醇(trip-tolide, TP)的耐药特征和机制。方法 采用递增 TP 剂量的浓度梯度诱导法使 PBMC 产生耐药。MTT 比色法测定细胞对药物的敏感性及耐药指数(resistance index, RI),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法分别检测正常对照组和耐药组 PBMC 中多药耐药相关基因(multidrug resistance gene, MDR1)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)和肺耐药蛋白(lung resistance-related protein, LRP)的表达。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上清液中 IL-1 的量。结果 和正常细胞组相比,耐药组细胞的群体倍增时间延长 2.7 h, RI 是 1.99,并且 MDR1 mRNA、MRP mRNA、LRP mRNA 表达量明显增加 ( $P < 0.01$ )。TP 能显著抑制正常组 PBMC 分泌 IL-1 ( $P < 0.05$ ),但对耐药组的抑制作用不明显 ( $P > 0.05$ )。结论 TP 体外持续诱导可使正常人 PBMC 产生耐药,其耐药性的产生涉及多个相关基因的表达,这可能是导致类风湿关节炎(RA)病人临床服用雷公藤

\* 收稿日期:2008-08-07

作者简介:张文娟(1982—),女,湖北省武汉市人,硕士,主要从事风湿病方面的研究。Tel: 13720161213 E-mail: zwj221@163.com

\* 通讯作者 涂胜豪 Tel: (027) 83663379 E-mail: shtu@tjh.tjmu.edu.cn

一段时间后产生耐受的原因之一。

关键词:雷公藤内酯醇;外周血单个核细胞(PBMC);白细胞介素-1(IL-1);耐药性

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)04-0601-05

长久以来,雷公藤一直作为治疗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的有效药物之一。然而临床发现,在RA的治疗过程中,部分患者在服用雷公藤一段时间后会出对药物敏感性降低的现象。除了患者的个体差异、疾病本身特点等因素外,导致抗风湿药物失效的根本原因尚未完全清楚,但细胞的耐药性可能是一个重要原因。本实验以雷公藤的主要活性成分之一的雷公藤内酯醇为研究对象,尝试用浓度梯度递增法<sup>[1-4]</sup>建立正常人外周血单个核细胞(PBMC)对雷公藤内酯醇(triptolide, TP)的耐药模型,旨在研究PBMC的耐药特性及耐药机制,试图探讨雷公藤治疗RA疗效下降的原因。

## 1 材料

1.1 研究对象:随机选取21名汉族健康成人志愿者(面向本院公开招募),男性9名,女性12名,年龄21~30岁,平均26.1岁。均无自身免疫性疾病病史和家族患病史。所有志愿者参加实验时未发现各种急、慢性疾病。每名志愿者抽取肘静脉血10 mL,用来进行细胞培养。

1.2 试剂:淋巴细胞分离液(天津TBD),RPMI-1640培养基(Hyclone)、胎牛血清(Hyclone)、植物血凝集素(phytohemagglutinin, PHA) L-1668(Sigma),人重组白介素-2(interleukin-2, IL-2)(Sigma),脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Sigma)。雷公藤内酯醇(triptolide, TP,又名雷公藤甲素)(福建省医学科学研究所,质量分数为98.5%以上),以二甲基亚砷(DMSO)(Sigma)助溶,磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,配制成10 μg/mL的贮存液。人IL-1 ELISA预包被试剂盒(达科为公司),RT-PCR试剂为Formentas、TOYOBO公司产品,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.3 仪器:UV1101核酸分析仪(德国,Biometra),Eppendorf梯度PCR仪,北京市六一仪器厂电泳仪,凝胶成像分析系统(英国,UVP公司),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),CO<sub>2</sub>培养箱(美国,SHEL-LAB),ELX800全自动酶标测试仪(美国,Bio-Tek Instruments),LG16—W型高速离心机(北京医用离心机厂),Sigma低温高速离心机,Olympus倒置显微镜等。

## 2 方法

2.1 PBMC的分离和培养:取健康志愿者肝素抗凝血10 mL,加入等体积室温PBS,吸取淋巴细胞分离液10 mL分置于4个试管中,试管倾斜约45°,将稀释血液各约5 mL在距液面上1 cm处缓慢注入,以2 000 r/min离心20 min,液体分为4层,用毛细吸管轻吸出灰白色的PBMC悬液,将悬液用5倍体积的RPMI1640洗涤2次,依次以2 000、1 500 r/min离心10 min,用含10%灭活胎牛血清的RPMI1640完全培养基10 mL(含100 U/mL的IL-2、20 μg/mL的PHA,只在前3 d加PHA刺激增殖,始终加IL-2维持培养)定容细胞,加入培养瓶,调整细胞终浓度为1 × 10<sup>6</sup>/mL,放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。

2.2 建立耐药细胞:采用浓度梯度倍增法诱导建立耐药细胞。首先分别向生长有PBMC的培养瓶内加入不同浓度的TP,培养1周后观察细胞死亡情况。选择可将80%的细胞杀死的药物浓度(ID<sub>80</sub>)作为耐药细胞培养的起始浓度;然后将PBMC置于含有ID<sub>80</sub>药物的完全培养基(含100 U/mL的IL-2、20 μg/mL的PHA)中培养,48 h后更换含药物的培养液继续培养,药物浓度10倍递增;依此类推,共经过7个质量浓度(0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10、100 ng/mL)、约15 d的培养,终止药物培养后更换为无药培养基继续培养1周后备用。

2.3 细胞生长曲线的绘制及倍增时间的测定:分别取生长状态良好的PBMC、耐药的PBMC,记为PBMC组和PBMC/TP组,制备成单细胞悬液(1 × 10<sup>5</sup>/mL),接种至24孔板中,每孔1 mL,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每天取3个复孔,MTT法检测各孔吸光度值(A<sub>490</sub>),连续观察7 d。以培养时间为横坐标,细胞的A<sub>490</sub>为纵坐标绘制生长曲线。根据Patterson公式计算细胞倍增时间 $[T_d = T \times \lg 2 / \lg(N_t / N_0)]$ ,其中T<sub>d</sub>为细胞倍增时间,T为细胞由N<sub>0</sub>增至N<sub>t</sub>所需时间,N为细胞数。

2.4 MTT药敏实验:用MTT法检测PBMC、PBMC/TP对TP的敏感性。分别取对数生长期的细胞制成单细胞悬液(5 × 10<sup>4</sup>/mL),接种至96孔板中,每孔体积为200 μL,即细胞终浓度为1 × 10<sup>4</sup>/mL,分别加入质量浓度为0.01、0.1、1、10、100 ng/mL的TP,

每个药物质量浓度设 6 个复孔,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下,培养 24 h 后,加入 MTT 20 μL/孔,继续孵育 4 h,离心 (1 000 r/min, 5 min),吸弃孔内培养液,加入 DMSO 100 μL/孔,振荡 10 min,于全自动酶标仪测波长 490 nm 处 A<sub>490</sub>。以不含胎牛血清的 RPMI1640 作为空白对照。计算细胞存活率 (存活率 = 实验孔 A<sub>490</sub>/对照孔 A<sub>490</sub> × 100%)。以药物质量浓度的对数为横坐标,存活率为纵坐标绘制浓度效应曲线。用 SPSS 软件进行曲线拟合,计算抑制 50% 细胞生长的浓度 (IC<sub>50</sub>) 及耐药指数 (RI, RI = 耐药细胞 IC<sub>50</sub>/亲本细胞 IC<sub>50</sub>)。

2.5 RT-PCR 检测细胞耐药相关基因 MDR1、MRP、LRP mRNA 的表达:分别取生长状态良好的 PBMC 和 PBMC/TP,参照说明书提取细胞总 RNA,用核酸分析仪检测 RNA 的浓度和纯度,取 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值在 1.8~2.0 的 RNA 进行实验,引物由上海生物工程技术有限公司合成,引物设计见表 1。在 25 μL 反应体系中取 5 μg 的 RNA 逆转录合成 cDNA 单链进行 PCR 扩增,扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min;MDR1:94 ℃ 变性 50 s,56 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 1 min,72 ℃、10 min;MRP:94 ℃ 变性 50 s,54 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 1 min,72 ℃、10 min;LRP:94 ℃ 变性 1 min,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min;-actin1 (北京奥科生物技术有限责任公司):94 ℃ 变性 1 min,59 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,72 ℃、7 min;-actin2:94 ℃ 变性 50 s,56 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 1 min,72 ℃、10 min;扩增的循环数分别为 33、32、31、33、32 个循环。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像分析仪上进行吸光度扫描,进行电泳条带分析,以目的条带与 -actin 的相对积分吸光度值表示结果。

2.6 ELISA 检测细胞因子:分别取生长状态良好的 PBMC 和 PBMC/TP,每份标本分 2 组,分别加

表 1 PCR 引物序列和产物长度

Table 1 Primer sequence and product length of PCR

引物名称	引物序列	引物长度/bp
MDR	上游-5'-CCATCATTCGCAATAGCA-3'	157
	下游-5'-GTTCAAACCTTCTGCTCTCTGA-3'	
MRP	上游-5'-GGGAATTCTGGGACTGGAAATGTACAG-3'	276
	下游-5'-CGGGATCCAGGAATATGCCCCGACTTC-3'	
LRP	上游-5'-GTCTTCGGCCTGACTGGTGTCTG-3'	240
	下游-5'-CTTGCCGCTCTCTGGGGTCTT-3'	
-actin1	上游-5'-AACTGGGACGACATGGAGAA-3'	288
	下游-5'-ATACCCCTCTGATAGTGGCA-3'	
-actin2	上游-5'-ACACTGTGCCATCTACGAGGGG-3'	366
	下游-5'-ATGATGGAAGTTGAAAGGTAAGTTCCTGGAT-3'	

LPS (终质量浓度 1 μg/mL) 和 LPS + TP (终质量浓度 5.4 ng/mL) 进行处理,继续培养 48 h 后离心收集培养上清液,保存于 -70 ℃ 冰箱待检。用人 IL-1 ELISA 试剂盒检测上清液中 IL-1 的量,采用以下步骤操作。加样本和 Cytokine standard:加 100 μL 稀释后的 Cytokine standard 入标准品孔,加 100 μL 样品入样品孔,加 100 μL Standard diluent buffer 入空白对照孔。每孔加入 50 μL 稀释后的 Biotinylated antibody。盖上封板膜,室温 (18~25 ℃) 孵育 3 h。洗板:扣去孔内液体,每孔加 300 μL 1 × 冲洗缓冲液,停留 1 min,弃去孔内液体,重复 3 次,最后 1 次在滤纸上扣干。加酶:每孔加 100 μL Streptavidin-HRP,室温避光孵育 20 min。重复洗板步骤加底物:每孔加入 100 μL TMB,盖上封板膜,室温避光孵育 10~30 min。终止反应:迅速每孔加入 100 μL Stop solution 终止反应。读板:10 min 内在 450 nm 波长处读值。

2.7 统计学处理:所有数据均采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用配对 *t* 检验。

### 3 结果

3.1 生长曲线和倍增时间:绘制细胞生长曲线,按公式计算,得到 PBMC 和 PBMC/TP 的群体倍增时间分别为 (17.32 ± 3.18) h 和 (20.02 ± 2.77) h,耐药细胞倍增时间延长 2.7 h,两者差异有统计学意义 (*P* < 0.05),耐药细胞的生长速度比亲本细胞缓慢。细胞生长曲线见图 1。

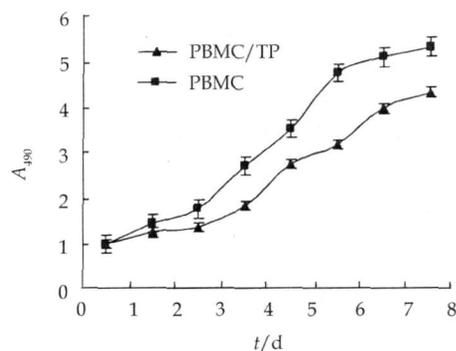


图 1 PBMC 和 PBMC/TP 生长曲线 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 6)

Fig. 1 Growth curve of PBMC and PBMC/TP ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 6)

3.2 细胞对 TP 的敏感性:根据 MTT 的结果绘制浓度效应曲线,用 SPSS 软件求出回归方程,计算得到 TP 对 PBMC、PBMC/TP 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 (18.67 ± 0.35)、(37.17 ± 1.38) ng/mL,两组间差异显著 (*n* = 6, *P* < 0.05),RI 为 1.99 倍,PBMC/TP 对

TP 产生了较明显的耐药。

3.3 TP 对耐药相关基因表达的影响:图 2 分别为各组 MDR1、MRP、LRP mRNA RT-PCR 电泳图;表 2 为凝胶成像分析 MDR1、MRP、LRP mRNA 相对表达

量的比较。与 PBMC 正常细胞相比,耐药细胞中,MDR1 mRNA、MRP mRNA、LRP mRNA 表达量明显增加,与正常 PBMC 细胞相比有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

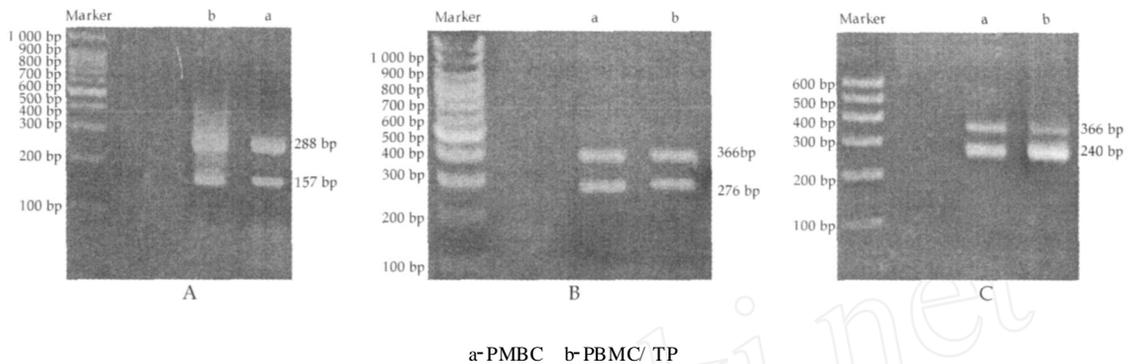


图 2 MDR1 (A)、MRP (B) 及 LRP (C) mRNA RT-PCR 电泳图

Fig. 2 mRNA RT-PCR Electrophoregram of MDR1 (A), MRP (B), and LRP (C)

表 2 PBMC 和 PBMC/TP 耐药相关基因 mRNA 相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Table 2 Comparison between relative expression of mRNA in PBMC and PBMC/TP ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

细胞	MDR1	MRP	LRP
PBMC	0.30 ± 0.14	0.59 ± 0.02	2.88 ± 0.19
PBMC/TP	0.41 ± 0.16**	0.65 ± 0.03**	16.12 ± 3.49**

与 PBMC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs PBMC group

3.4 TP 对 PBMC、PBMC/TP 分泌 IL-1 的影响:如表 3 所示,TP、LPS 同时作用时正常组 PBMC 分泌 IL-1 的量较单用 LPS 刺激时明显下降,两者间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而耐药组细胞 TP 处理组与无 TP 处理组间 IL-1 分泌量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。从 TP 所致的 IL-1 的下降幅度看,正常组 PBMC 降幅为 29.67%,耐药组降幅为 8.86%,提示耐药组 TP 对 PBMC 分泌 IL-1 的抑制作用要弱于正常组。

表 3 TP 对 PBMC、PBMC/TP 分泌 IL-1 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Table 3 Effect of TP on IL-1 secreted by PBMC and PBMC/TP ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

组别	IL-1 / (pg · mL <sup>-1</sup> )		降幅/ %
	LPS	LPS + TP	
PBMC	22.28 ± 26.91	15.67 ± 19.35*	29.67
PBMC/TP	48.67 ± 102.45	44.36 ± 97.52	8.86

与相应 LPS 组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs LPS group

### 4 讨论

多药耐药发生的机制比较复杂,根据细胞内药物的作用靶点大致将多药耐药归为以下几类:(1)多

药耐药基因(MDR1)的过度表达,该基因编码的 P-gp,是一种相对分子质量为  $1.7 \times 10^8$  的胞膜糖蛋白,具有能量依赖的跨膜药物外排泵功能,它可以把进入细胞内的药物泵出胞外,使细胞内药物聚积下降,使细胞毒作用减弱或消失,从而能够在降低了的药物环境中得以生存,而产生耐药性<sup>[5-10]</sup>。人类 MDR 家族是由 MDR1 和 MDR3 组成的,并相应的编码了各自的 P-gp。MDR1 和 MDR3 同源性较高<sup>[11]</sup>,但两者的作用并不相同。转基因实验证明,MDR3 与细胞的耐药性没有明显相关,是 MDR1 在起主要作用,它能交叉抵抗若干在结构和功能上并不相关的亲脂类药物<sup>[12]</sup>。(2)非 P-gp 的多药耐药,耐药性由多药耐药性相关蛋白(MRP)介导。MRP 基因是由 Cole 等从一株人小细胞肺癌 MDR 细胞 H69AR 克隆出来的一种耐药基因<sup>[13]</sup>。(3)肺耐药蛋白的多药耐药,耐药性由肺耐药蛋白介导。LRP 引起 MDR 的机制为:通过穹隆介导使以细胞核为靶目标的化疗药物不能经核孔进入胞核,或把已经进入细胞核的药物转运至胞浆;另一方面将胞浆中的药物转运至囊泡,降低胞核内的药物浓度使其不能发挥细胞毒效应,再经胞吐机制排至细胞外<sup>[14]</sup>。(4)非典型的多药耐药,耐药性由拓扑异构酶的表达改变而引起。另外,最近研究发现,大部分化疗药物杀伤肿瘤是通过诱导细胞凋亡,因此凋亡耐受是一种新型的耐药机制。

目前,作为治疗失败的原因之一,耐药在肿瘤和抗感染的治疗中已得到足够重视,研究非常多,但 RA 的治疗中却刚刚被认识。研究发现,RA 患者经常伴有获得性激素耐药。且 RA 患者与健康者的

淋巴细胞对激素敏感性相似<sup>[15]</sup>。如果对用于 RA 治疗的缓解病情抗风湿药(甲氨蝶呤,DMARD)存在耐药,可导致治疗效果不佳或治疗失败<sup>[16]</sup>。

本实验结果显示,用浓度梯度递增法<sup>[1-4]</sup>建立 PBMC 对 TP 的耐药模型,RI 为 1.99。PBMC/TP 组细胞生长速度减慢,倍增时间延长,同时,通过 RT-PCR 的方法检测得到 PBMC/TP 组 MDR1、MRP 和 LRP 的平均表达水平明显高于 PBMC 组。说明耐药与 MDR1、MRP 和 LRP 表达水平相关,提示 MDR1、MRP 和 LRP 的过度表达可能是导致耐药的机制之一。研究发现,多药耐药发生机制中细胞内药物浓度减低的主要机制是细胞能主动将进入细胞内的药物排出细胞外、改变药物在细胞内的分布和改变细胞核和细胞浆之间的转运,与 MDR1、MRP 和 LRP 等表达增强有关<sup>[1,2]</sup>,这与本实验的结果是一致的。

同时,用 ELISA 试剂盒检测相应细胞上清液中 IL-1 的量。IL-1 是 RA 中的促炎性细胞因子,在关节局部的炎症、滑膜的增生、血管翳的形成、骨与软骨的侵蚀破坏中发挥着重要作用。目前,IL-1 受体拮抗剂(IL-1Ra)治疗 RA 已取得了可喜的疗效<sup>[17]</sup>。传统中药雷公藤作为能改善 RA 病情的药物,其药理作用的分子机制之一即是能下调 IL-1 等促炎性细胞因子的表达<sup>[18]</sup>,调节细胞因子网络失衡状态。本实验结果显示,TP 能显著抑制正常组 PBMC 分泌 IL-1,但对耐药组的抑制作用不明显,提示耐药组 TP 下调促炎性细胞因子 IL-1 表达的能力明显减弱,耐药组 PBMC 对 TP 的敏感性显著下降,这可能是由于 PBMC 对 TP 产生了耐药性所致。

原发性或继发性耐药是炎症疾病和肿瘤治疗失败的重要原因,但在 RA 的治疗过程中却少有人注意到抗风湿药物耐药的问题,深入研究药物耐药与风湿性疾病之间的关系,对治疗方案的选择、提高临床疗效具有重要意义。本研究从分子机制角度揭示了耐药性与抗风湿药物之间的关系,但这一结论是通过健康人 PBMC 的体外实验获得,不能完全模拟 RA 患者的体内过程,还有待大规模的临床研究来验证。

参考文献:

[1] Sood A K, Buller R E. Drug resistance in ovarian cancer: from the laboratory to the clinic [J]. *Obster Gynecol*, 1998, 92: 312-319.

[2] Coukos G, Rubin S C. Chemotherapy resistance in ovarian cancer: new molecular perspectives [J]. *Obstet Gynecol*, 1998, 91: 783-792.

[3] Yang X, Pag M. P-glycoprotein expression in ovarian cancer cell line following treatment with cisplatin [J]. *Oncol Res*, 1995, 7: 619-624.

[4] Yang L Y, Trujillo J M. Biological characterization of multi-drug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 3128-3225.

[5] Marie J P, Zittoun R, Sikic B I. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and *in vitro* drug sensitivity [J]. *Blood*, 1991, 78(3): 586-592.

[6] Cornwell M M, Tsuruo T, Gottesman M M, et al. ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KB cells [J]. *FASEB J*, 1987, 1: 51-54.

[7] Safa A R, Glover C J, Meyers M B, et al. Vinblastine photoaffinity labeling of a high molecular weight surface membrane glycoprotein specific for multidrug-resistant cells [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(14): 6137-6140.

[8] Akiyama S, Cornwell M M, Kuwano M, et al. Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analog [J]. *Mol Pharmacol*, 1988, 33(2): 144-147.

[9] Choi K, Chen C, Krieglner M, et al. An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the mdr1 (P-glycoprotein) gene [J]. *Cell*, 1988, 53: 519-529.

[10] Bonafonte M T, Romagnoli P A, Mcnair N, et al. Cryptosporidium parvum: effect of multi-drug reversing agents on the expression and function of ATP-binding cassette transporters [J]. *Exp Parasitol*, 2004, 106(3-4): 126-134.

[11] Nooter K, Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer [J]. *Br J Cancer*, 1991, 63(5): 663-669.

[12] Kamimoto Y, Gatmaitan Z, Hsu J, et al. The function of Gp170, the multidrug resistance gene product, in rat liver canalicular membrane vesicles [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(20): 11693-11698.

[13] 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.

[14] Izquierdo M A, Scheffer G L, Flens M J, et al. Major vault protein LRP-related multidrug resistance [J]. *Eur J Cancer*, 1996, 32A(6): 979-984.

[15] Borowski L, Lopes R, Gonzalez T, et al. Is steroid resistance related to multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatoid arthritis? [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2007, 7(6): 836-844.

[16] Van der Heijden J W, Dijkmans B A, Scheper R J, et al. Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs from bench to bedside [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3(1): 26-34.

[17] 倪朝辉, 李凡. IL-1 及其受体拮抗剂与类风湿关节炎 [J]. *国际免疫学杂志*, 2004(2): 94-96.

[18] Lin N, Sato T, Ito A. Triptolide, a novel diterpenoid triepoxide from *Tripterygium wilfordii* Hook. F., suppresses the production and gene expression of pro-matrix metalloproteinases 1 and 3 and augments those of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in human synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(9): 2193-2200.