

## 消岩汤对耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞多药耐药相关蛋白的调控作用

张莹<sup>1</sup>, 贾英杰<sup>1\*</sup>, 李小江<sup>1</sup>, 孔凡铭<sup>1</sup>, 杜梦楠<sup>2</sup>, 齐晓玉<sup>2</sup>

1. 天津中医药大学第一附属医院 肿瘤科, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:** **目的** 探讨消岩汤含药血清对耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞多药耐药相关蛋白 1 (MRP1)、肺耐药蛋白 (LRP) 及其 mRNA 表达水平的影响, 发现消岩汤对化疗耐药的作用靶点, 为肺癌化疗耐药的临床治疗提供理论基础。**方法** A549 裸鼠皮下移植瘤模型 ip 给予等量生理盐水, 2 mg/kg 顺铂, 消岩汤低、高剂量 (20、40 g/kg) 获得含药血清, 选择耐顺铂人肺腺癌 A549/DDP 细胞系作为获得性耐药模型, 采用 Western blotting 免疫印迹法及 RT-PCR 技术, 检测各组含药血清作用下 A549/DDP 细胞多药耐药基因 MRP1、LRP 及其产物 MRP1、LRP 蛋白的表达水平。**结果** 与对照组相比, 随着血清中药物浓度的增加, 消岩汤低、高剂量组 LRP 与 MRP1 蛋白表达逐渐减弱 ( $P < 0.05$ )。LRP 及 MRP1 mRNA 水平也有所下降 ( $P < 0.05$ ), 且随着药物浓度的增加, 基因表达抑制越明显。**结论** 不同浓度的消岩汤含药血清对 MRP1、LRP 及其 mRNA 表达均具有不同程度的抑制作用, 且浓度越高, 抑制作用越明显, 即与剂量呈正相关, 揭示消岩汤逆转肺癌耐药可能与抑制 MRP1 和 LRP 蛋白功能有关。

**关键词:** 消岩汤; 肺癌; 多药耐药; 多药耐药相关蛋白 1; 肺耐药蛋白

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)13-2717-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.13.020

## Research of Xiaoyan Decoction on multidrug resistance of lung adenocarcinoma A549/DDP cell with cisplatin resistance in human gene

ZHANG Ying<sup>1</sup>, JIA Ying-jie<sup>1</sup>, LI Xiao-jiang<sup>1</sup>, KONG Fan-ming<sup>1</sup>, DU Meng-nan<sup>2</sup>, QI Xiao-yu<sup>2</sup>

1. The First Hospital Affiliated to Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

2. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To study the Xiaoyan Decoction serum influence the expression level of lung adenocarcinoma that cisplatin-resistant of A549/DDP cell multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), lung resistance-related protein (LRP), MRP mRNA, and LRP mRNA, to find out Xiaoyan Decoction's target to the chemotherapy resistance, and to lay foundation for the clinical of reversing lung cancer chemotherapy resistance. **Methods** The A549 nude mice hypodermic tumor model was given an equal amount of saline, 2 mg/kg of cisplatin, low and high doses of Xiaoyan Decoction (20, 40 g/kg), and then the serum was gain. The cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma A549/DDP cell line was chosen as acquired drug-resistance model, Xiaoyan Decoction on MDR of A549/DDP cell gene expression product of multidrug resistance-associated protein 1, lung resistance-related protein and its effect on mRNA expression level was detected by Western blotting and RT-PCR technique. **Results** Compared with the control group, the expression of MRP1 and LRP protein decreased gradually ( $P < 0.05$ ) as the serum drug concentration of Xiaoyan Decoction increased. The level of LRP mRNA and MRP1 mRNA in low and high doses of Xiaoyan Decoction group also decreased, and much more obvious inhibition of gene expression was observed as the increasing of drug concentration. **Conclusion** Different serum drug concentration of Xiaoyan Decoction can differently control the expression of MRP1, LRP protein, MRP1 mRNA, and LRP mRNA, with the increasing of serum drug concentration, the decreasing of expression level, namely positive-correlated to the dose, which indicates that Xiaoyan Decoction Reversal of the lung cancer drug resistance the might related to the MRP1 and LRP.

**Key words:** Xiaoyan Decoction; lung cancer; multi-drug resistant; MRP1; LRP

收稿日期: 2016-10-11

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); 国家自然科学基金青年项目 (81403220)

作者简介: 张莹 (1977—), 女, 天津市人, 副主任医师, 研究方向为中医药抗肿瘤研究。Tel: (022)27986513 E-mail: zhangyingzhongyi@sina.com

\*通信作者 贾英杰, 男, 主任医师, 博士, 研究方向为中西医结合肿瘤学。Tel: (022)27986556 E-mail: jiayingjie1616@sina.com

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(multidrugresistance, MDR)严重限制化学药物的治疗效果。铂类药物是肺癌联合化疗方案中的核心部分,其中顺铂是对目前肺癌患者单制剂及联合用药化疗效率最高的药物之一,探讨顺铂的多药耐药对于肺癌化疗具有相当大的指导意义。多药耐药相关蛋白(MRP)、肺耐药蛋白(LRP)作为介导多药耐药的近端机制蛋白,在肺癌MDR研究中占据非常重要的地位。

消岩汤应用于肺癌的临床治疗已有10余年,临床疗效确切,对肺癌化疗具有增效减毒的作用<sup>[1-2]</sup>,由生黄芪、太子参、郁金、姜黄、白花蛇舌草、夏枯草、生牡蛎等组成,方中生黄芪、太子参益气健脾、补肺养阴,郁金、姜黄活血化瘀,白花蛇舌草、夏枯草等清热解毒,诸药相伍,共奏扶正解毒祛瘀之功。本研究从国内外肺癌研究的关注热点和难点——化疗耐药入手,采用Western blotting免疫印迹法及RT-PCR技术,探索具有扶正解毒祛瘀作用的中药复方消岩汤对肺癌耐药模型的耐药逆转作用机制。通过检测消岩汤含药血清对耐顺铂人肺腺癌A549/DDP细胞MRP1、LRP蛋白及其mRNA表达的影响,以期发现消岩汤逆转化疗耐药的作用靶点,寻找临床疗效可靠且副作用小的化疗耐药逆转剂,为攻克肺癌化疗多药耐药奠定一定的研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品

消岩汤(太子参、生黄芪、白花蛇舌草、蜂房等共计140g)水煎液,规格100mL/瓶,由天津中医药大学第一附属医院制剂室提供。消岩汤水煎液由天津中医药大学中药提取室严格按回流提取法进行提取,最终浓缩成为质量浓度相当于生药材1.5g/mL的药液<sup>[3]</sup>,冷却装入灭菌药瓶,置4℃冰箱备用。

### 1.2 动物

SPF级健康BalB/C雄性裸鼠,80只,4~6月龄,体质量18~20g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物许可证号SCXK-(军)2014-0004。

### 1.3 细胞

人肺腺癌A549细胞由天津医科大学基础实验中心提供;耐顺铂(DDP)肺腺癌A549/DDP细胞购自上海博谷生物科技有限公司和天津柳叶峰医药

技术开发有限公司。

### 1.4 试剂与仪器

RPMI 1640培养基、新生胎牛血清(Hyclone公司);All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒(Gene Copoeia公司);Mini-Protean 3电泳系统、Mini Trans-Blot Module电泳转印芯、PowerPac Basic Power Supply基础电泳仪(Bio-Rad公司);Epgredients PCR仪(Eppendorf公司);ABI7500 fast荧光定量PCR仪(Life Technologies公司);FluorChem FC2成像分析系统、AlphaView系统软件(Alpha Innotech公司)。

### 1.5 细胞培养

细胞复苏、传代与培养参照文献报道方法<sup>[4]</sup>。复苏后的人肺腺癌A549、A549/DDP细胞,分别接种于50mL培养瓶,加入RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清,青霉素、链霉素各100U/mL)6mL,置于37℃、饱和湿度、含5%CO<sub>2</sub>的孵箱中无菌培养,A549/DDP细胞则在2μg/mL DDP的RPMI 1640培养基中诱导培养,实验前2d,更换成无DDP的培养基培养。

### 1.6 A549裸鼠皮下移植瘤模型的建立

体外复苏、培养A549细胞,在对数生长期收集细胞。1000r/min,离心5min,PBS溶液洗涤2次,离心弃上清,离心管外周以冰袋维持温度在4℃左右,以此来保持细胞活性。用生理盐水稀释,调整细胞浓度到5×10<sup>6</sup>个/mL。80只裸鼠按照随机数字法随机分为4组,每组20只,在各组中每只裸鼠右前腋下sc接种0.2mL。待所有裸鼠的皮下肿瘤的平均直径达到约5mm时开始给药,每次给药间隔24h。顺铂组ip给予2mg/kg顺铂,消岩汤低、高剂量组分别ig给予消岩汤水煎液20、40g/kg<sup>[2]</sup>,对照组小鼠ig给予40g/kg生理盐水。连续给药10d后眼眶取血法采血。

### 1.7 消岩汤含药血清的制备

末次ig给药1h后,小鼠称定体质量,眼眶取血法采血,8000r/min,离心15min,取淡蓝色血清于2mLEP管中,标识组别。14000r/min,高速离心5min,重复2次。分别提取上清,分装,56℃水浴灭活30min,用0.22μm微孔滤膜滤过除菌,-20℃保存。

### 1.8 Western blotting法检测消岩汤对A549/DDP细胞LRP和MRP1蛋白表达的影响

取对数生长期A549/DDP细胞(2×10<sup>5</sup>个/mL)2mL于25cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中,贴壁生长24h后,

PBS 洗涤 2 遍, 每细胞培养瓶加细胞培养液 8 mL 及相应的含药血清 2 mL, 每组设 3 个复瓶。药物作用 24 h 后, PBS 洗涤 2 遍, 加 1 mL 胰酶消化细胞, 收集细胞于 15 mL 离心管, 1 000 r/min, 离心 5 min, 小心弃去上清。收集全部细胞后, 在 15 mL 离心管中加入 1 mL 4℃ 预冷的 PBS, 长吸管反复吹打至单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 小心弃去上清, 再重复以上步骤 2 次, 得到不含培养液的细胞。

细胞加适量预冷的蛋白裂解液 (RIPA) 裂解, 匀浆以 14 000 r/min, 离心 15 min, 上清转入新管。BCA 法测定蛋白量。用 PBS 将蛋白样品调至等浓度, 加 6×SDS 上样缓冲液, 沸水浴 5 min 备用。

SDS-PAGE 电泳: 取 100 μg 处理好的样品, 进行 SDS-PAGE 电泳, 积层胶 6%, 分离胶 8%, 胶厚 0.75 mm。电泳结束后, 胶于转移液 (含甲醇 15%) 中平衡 10 min; 从下至上分别放置滤纸、胶、PVDF 膜 (0.45 μm)、滤纸, 夹子夹好放入倒好转移液的转移槽中, 250 mA 转膜 90 min。将膜取出, 放入含 5% 脱脂奶粉的 PBST, 室温封闭 2 h。对应一抗按照抗体说明书稀释, 室温结合 2 h; PBST 洗 3 次, 每次 10 min; 二抗 1:10 000 稀释, 室温结合 1 h; 分别用 PBST 和 PBS 各洗 3 次, 每次 10 min。等比例混合显色基质 A 液和 B 液, 均匀滴加膜上, 静置 1 min, 放入暗箱成像。

### 1.9 RT-PCR 法检测消岩汤对 A549/DDP 细胞 LRP 和 MRP1 基因表达的影响

A549/DDP 细胞经不同浓度含药血清作用 24 h 后收集细胞, 提取样本总 RNA, 用 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录, 实验操作按产品说明书进行, 将 RNA 模板、试剂盒组分以及 RNase-free Water 溶解并置于冰上备用。用 ABI7500 Fast 荧光定量 PCR 仪检测, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行数据的相对定量分析。

### 1.10 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件, 单因素方差分析法 (ANOVA) 进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 消岩汤对 A549/DDP 细胞 MRP1 和 LRP 蛋白表达的影响

A549/DDP 细胞经不同浓度含药血清作用 24 h 后收集细胞提取总蛋白, Western blotting 检测 MRP1 和 LRP 蛋白表达量的变化。结果表明, 与对照组比较, 随着消岩汤含药血清中药物浓度的增加, MRP1

和 LRP 蛋白的表达均逐渐减弱 ( $P < 0.05$ , 图 1、2), 说明消岩汤能够抑制多药耐药相关蛋白的表达, 且随着药物浓度的增加, 蛋白表达的抑制作用越明显, 与药物剂量呈正相关。

### 2.2 消岩汤对 A549/DDP 细胞 LRP 和 MRP1 基因表达的影响

MRP1 基因在各实验组中的扩增曲线图及溶解

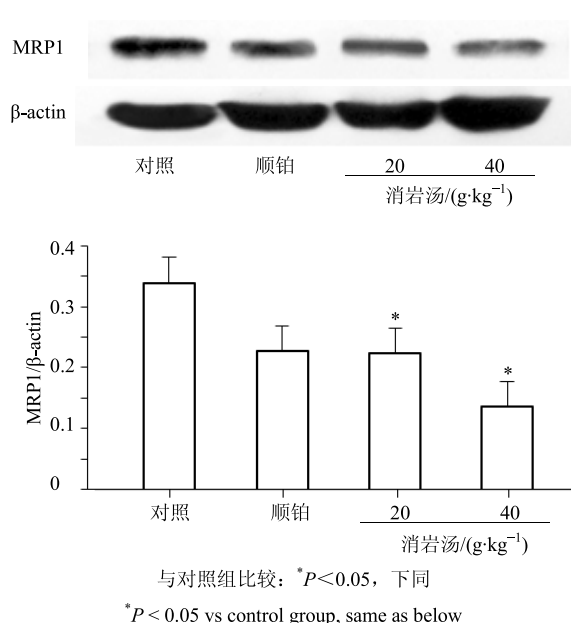


图 1 消岩汤对 A549/DDP 细胞 MRP1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Fig. 1 Effect of Xiaoyan Decoction on MRP1 expression in A549/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

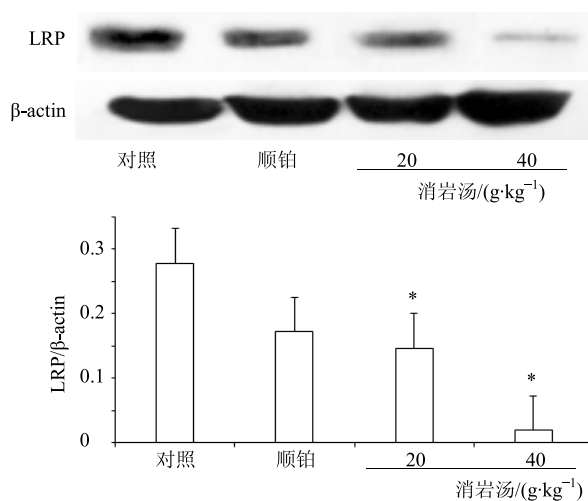


图 2 消岩汤对 A549/DDP 细胞 LRP 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Fig. 2 Effect of Xiaoyan Decoction on LRP expression in A549/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

曲线图说明扩增产物特异性好,实验结果有效。A549/DDP 细胞被各组含药血清作用 24 h 后收集细胞提取总 RNA, RT-PCR 检测 MRP1 和 LRP 的 mRNA 表达变化, 实验重复 3 次。结果(表 1)表明, 与对照组比较, 经不同浓度消岩汤含药血清作用后, A549/DDP 细胞中的 MRP1 和 LRP 基因的 mRNA 水平均有所下降, 且随着药物浓度的增加, 基因表达抑制的越明显 ( $P < 0.05$ )。说明消岩汤低、高剂量均可通过调节相关基因的转录而调节对应蛋白的表达。

表 1 消岩汤对 A549/DDP 细胞 MRP1 和 LRP 基因 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 1 Effect of Xiaoyan Decoction on MRP1 and LRP mRNA expression in A549/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	MRP1	LRP
对照	0	23.01 ± 4.57	24.29 ± 3.75
顺铂	0.002	21.72 ± 3.94	19.80 ± 2.77
消岩汤	20	15.41 ± 3.28*	15.64 ± 2.43*
	40	9.51 ± 2.78*	8.67 ± 1.21*

### 3 讨论

目前全世界的肺癌发病率与死亡率均高居恶性肿瘤首位<sup>[5]</sup>。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<sup>[6]</sup>, 因此对 MDR 的产生机制、检测方法、逆转方法的研究一直是肿瘤治疗领域的热点。许多专家学者致力于寻找 MDR 逆转剂, 相继开发出 tariquidar XR9576, zosuquidar LY335979 等逆转剂, 但这些药物毒副作用非常明显, 效果并不理想, 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。

中医学认为化疗药物易伤及人体正气, 正气亏虚, 更易感受邪气。气虚不能行血, 使毒瘀更甚, 从而导致了化疗的多种副作用, 包括多药耐药性的产生。具有“扶正解毒祛瘀”功效的中药复方消岩汤, 在配合放化疗或单独应用在稳定患者肿瘤病灶、抗远端转移等方面均有良好疗效, 同时在改善证候、提高生存质量、提高免疫功能和改善化疗的毒副作用等方面也有良好作用, 是治疗肺癌良好

的辅助用药<sup>[7-8]</sup>。

前期研究证实消岩汤可改善小鼠生活质量, 拮抗恶病质, 并能够抑制肿瘤生长。消岩汤含药血清对 A549 及 A549/DDP 均有生长抑制作用, 且能增强顺铂对肺癌敏感细胞和耐药细胞的杀伤作用, 具有耐药逆转作用, 并且能够诱导肺癌耐药细胞的凋亡<sup>[4,9-10]</sup>。

MRP 是 ATP 结合盒子超家族转运蛋白成员, 其基因位于 16 号染色体 P13.1 带上, 由长度 6.5 kb 的碱基组成, 该基因编码 1 531 个氨基酸组成的蛋白质, 相对分子质量为 19 000<sup>[9]</sup>。MRP 主要定位于质膜上, 能引起一系列不溶于水的药物的耐受, 减少细胞内药物的蓄积, 增加药物的排出。作为药物泵, 能够识别和转运与谷胱甘肽结合的底物, 逆浓度梯度排出不溶于水的化合物, MRP 过度表达会使肿瘤对多种药物产生耐药性<sup>[11]</sup>。LRP 系人类主要穹隆蛋白复合物, 位于 16 号染色体 P13 区 1 带与 P11 区 2 带之间, 相对分子质量为 110 000, 是与聚泡相关联的细胞微粒体。LRP 使胞质中的药物吸入运输囊泡, 通过胞吐方式排出细胞外, 从而导致细胞内药物浓度下降<sup>[12]</sup>。LRP 导致耐药的另一机制是将药物从细胞核转移至细胞质, 从而降低细胞核内靶点药物浓度<sup>[13]</sup>。因此, 通过抑制 MRP1、LRP 的表达和功能很有可能成为逆转肺癌 MDR 的有效方法。本研究证明消岩汤能够抑制 LRP、MRP1 的表达, 且呈剂量依赖性, 表明具有“解毒祛瘀、扶正抗癌”作用的中药复方消岩汤逆转肺癌耐药的可能机制为抑制 MRP1 的功能, 改变细胞内药物浓度及通过干扰 LRP 蛋白功能, 升高核内药物浓度, 从而逆转 MDR。

#### 参考文献

- [1] 杨佩颖, 李小江, 孔凡铭, 等. 消岩汤对 Lewis 肺癌小鼠化疗后骨髓抑制的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1567-1571.
- [2] 张欣, 贾英杰, 杨佩颖. 消岩汤对肺腺癌 A549 实体瘤小鼠肿瘤细胞凋亡干预机制的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2261-2265.
- [3] 杨佩颖, 许文婷, 刘宏根, 等. 消岩汤对 A549/DDP 细胞自噬及耐药蛋白的影响研究 [J]. 天津中医药, 2016, 33(6): 358-362.
- [4] 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): 334-336.
- [5] Parkin D M, Bray F B, Pisani P. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.

- [6] Longley D B, Johnston P G. Molecular mechanism of drug resistance [J]. *J Pathol*, 2005, 2059(2): 275-292.
- [7] 贾英杰, 史福敏, 贾彦焘, 等. 消岩汤剂治疗晚期非小细胞肺癌临床研究 [J]. 天津中医药, 2004, 21(2): 108-110.
- [8] 贾英杰, 张莹, 孙一予, 等. 消岩汤不同时段参与化疗治疗非小细胞肺癌临床疗效观察 [J]. 天津中医药大学学报, 2006, 25(3): 164-165.
- [9] 张莹, 贾英杰, 杨洁, 等. 消岩汤药物血清对A549/DDP 细胞凋亡的诱导作用 [J]. 中医研究, 2011, 24(5): 19-21.
- [10] 李小江, 贾英杰, 于建春, 等. 消岩汤剂拆方配伍对肺腺癌 A549 细胞 survivin 和 caspase-3 表达的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3436-3439.
- [11] Elshkieh A A K, Greupink R, Wortelboer H M, *et al.* Interaction of immunosuppressive drugs with human organic anion transporter (OAT)1 and OAT3, and multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 and MRP4 [J]. *Transl Res*, 2013, 162(6): 398-409.
- [12] 马秦榕, 郑锦花, 钟玲玲, 等. 肺腺癌患者胸水中肿瘤耐药相关基因蛋白的表达及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(7): 3193-3195.
- [13] Wang J, Zhang J, Zhang L, *et al.* Expression of P-gp, MRP, LRP, GST- $\pi$  and Topo II  $\alpha$  and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5): 1081-1089.