

川芎挥发油调控 P-糖蛋白协同替莫唑胺的胶质瘤治疗作用及机制

吴海霞, 刘姗姗, 胡鹏翼*, 李 菁, 钟 钰, 郑 琴*, 杨 明

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 研究川芎挥发油体内配伍替莫唑胺对 C6 胶质瘤大鼠抗肿瘤效果及作用机制。**方法** 制备 C6 胶质瘤大鼠模型, 对比替莫唑胺单独给药、川芎挥发油与替莫唑胺配伍给药后大鼠的体质量、生存状态、肿瘤体积的变化及抑瘤率; HPLC 法测定替莫唑胺单独给药、川芎挥发油与替莫唑胺配伍给药后, 替莫唑胺在胶质瘤 U87-MG 细胞内、外液中的浓度, 并进行统计学分析; Western blotting 法研究替莫唑胺单独给药、川芎挥发油与替莫唑胺配伍给药后对 U87-MG 细胞 P-糖蛋白(P-gp)表达的影响。**结果** 与替莫唑胺单独给药比较, 川芎挥发油与替莫唑胺配伍给药后大鼠肿瘤体积显著减小 ($P < 0.05$), 与川芎挥发油用量呈正相关, 同时配伍组大鼠体质量上升趋势更快, 生存状态较好。川芎挥发油可以促进替莫唑胺进入 U87-MG 细胞内液中, 且随着挥发油浓度的增加, 促进作用越强。其中 $6.25 \times 10^{-3} \mu\text{L/mL}$ 川芎挥发油可显著增加替莫唑胺在细胞内液中的蓄积 ($P < 0.05$)。Western blotting 实验结果表明, 与替莫唑胺组比较, 替莫唑胺和 3.125×10^{-3} 、 $6.250 \times 10^{-3} \mu\text{L/mL}$ 川芎挥发油配伍后, 可极显著降低 P-gp 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$)。**结论** 川芎挥发油可通过下调 P-gp 蛋白的表达, 促进替莫唑胺进入胶质瘤细胞内, 发挥协同抗肿瘤作用。

关键词: 川芎; 替莫唑胺; 胶质瘤; 协同作用; P-糖蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5492-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.016

Effects and mechanism of *Ligusticum chuanxiong* volatile oil in combination with temozolomide in treatment of glioma by regulating P-gp protein

WU Hai-xia, LIU Shan-shan, HU Peng-yi, LI Jing, ZHONG Yu, ZHENG Qin, YANG Ming

Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective To investigate the anti-tumor effect of *Ligusticum chuanxiong* volatile oil in combination with temozolomide (TMZ) in the treatment of glioma, and illuminate its possible mechanism. **Methods** After C6 glioma animal model was successfully finished, changes of body weight, survival status, tumor volume, and the tumor inhibition rate of rats were detected in the TMZ group and the compatibility group of the volatile oil of *L. chuanxiong* and TMZ. The concentration of TMZ in the internal and external fluids of U87-MG cells was measured by HPLC after the administration of TMZ and the combination of volatile oil of *L. chuanxiong* and TMZ, and the differences of the content were analyzed statistically. Western blotting was used to study the effects of TMZ monotherapy, *L. chuanxiong* volatile oil and TMZ on the expression of P-gp protein of U87-MG cells. **Results** Compared with TMZ group, the tumor volume of rats in the compatibility group was significantly decreased ($P < 0.05$), which was positively correlated with the amount of volatile oil. At the same time, the weight gain of the rats in the compatibility group was increased and the survival status was better. Volatile oil of *L. chuanxiong* can promote the entry of TMZ into U87-MG cells, and with the increase concentration of volatile oil, the

收稿日期: 2019-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (8176140533); 江西省自然科学基金项目 (20171BAB205093); 江西省博士后项目 (2017KY08); 江西省卫生厅项目 (2016A012); 江西中医药大学双一流学科项目 (JXSYLXK-ZHYAO091)

作者简介: 吴海霞 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为药剂学。Tel: 18270858429 E-mail: 1663860940@qq.com

***通信作者** 胡鹏翼 (1982—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中药跨膜转运及药物新剂型与新技术。

Tel: (0791)87118658 E-mail: hpy820515@126.com

郑 琴 (1973—), 女, 教授, 博士, 主要从事药物跨膜转运研究及中药新型给药系统的设计。

Tel: (0791)87118658 E-mail: zhengqin912006@163.com

promoting effect was stronger. Volatile oil at $6.25 \times 10^{-3} \mu\text{L/mL}$ can significantly increase the accumulation of TMZ in the internal fluid ($P < 0.05$). Western blotting analysis showed that P-gp expressions of cells treated with combination treatment with TMZ ($20 \mu\text{g/mL}$) and volatile oil [(3.125×10^{-3}) , $(6.25 \times 10^{-3}) \mu\text{L/mL}$] were markedly down-regulated ($P < 0.01$), when compared with TMZ group.

Conclusion The volatile oil of *L. chuanxiong* can promote TMZ entry into glioma cells and then enhance TMZ-induced anticancer efficiency *in vivo* by inhibiting P-gp expression.

Key words: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; temozolomide; glioma; synergistic effect; P-gp

胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤，据文献报道，中国脑胶质瘤年发病率为 3~6 人/10 万人，年死亡人数达 3 万人。胶质瘤为浸润性生长，和正常脑组织没有明显界限，难以完全切除，对放疗、化疗不甚敏感，非常容易复发，至今仍是全身肿瘤中预后最差的肿瘤之一。将抗肿瘤药物与引经药联合使用，增加治疗药物靶区的浓度，是提高脑胶质瘤治疗效果的有效手段。王南卜等^[1-2]发现 β -细辛醚、冰片、苏合香挥发油、麝香酮均可促进替莫唑胺 (TMZ) 进入人胶质瘤 U251 细胞内，增强 TMZ 抑制肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡的作用，其机制可能是降低 P-糖蛋白 (P-gp)、多耐药基因 1 (MDR1) 的表达。Duan 等^[3]发现冰片可提高抗肿瘤药物顺铂的脑组织瘤区转运，其中下调紧密连接相关蛋白-1 (ZO-1)、F-actin 的基因及蛋白表达可能是其重要的作用机制之一。邢燕梅^[4]证实天然冰片是通过激活 Raf/MEK/ERK/MAPKs 信号转导通路，进而调控下游相关紧密连接蛋白 Claudin-5、ZO-1、F-actin 的基因、蛋白表达和分布，从而调节脑血屏障 (BBTB) 的通透性。

川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 辛散温通、气香走窜，能上行巅顶、下行血海、旁达四末、外彻皮肤，既能活血化瘀，又能行血中气滞、疏散风邪，为血中之气药。吴霜霜等^[5]分析了脑肿瘤中药用药规律，结果除全蝎和茯苓外，川芎的使用频率最高。含有川芎的中药复方在临床上也常用于脑胶质瘤的治疗，如脑瘤散、自拟脑瘤康^[6]、自制胶质瘤方^[7]、川芎三白汤^[8]、涤痰化瘀通窍汤^[9]、补阳还五汤^[10]、平瘤合剂^[11]等。这些研究提示，川芎可能具有促进配伍成分透血脑屏障 (BBB) /BBTB，提高脑内、瘤内药物治疗浓度的作用。本课题组前期研究了川芎挥发油 (VO) 中的 3 个入脑成分藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 BBB 的调节作用，发现这 3 个成分可抑制 BBB 上 P-gp 蛋白的外排作用，增加配伍药物芍药苷、天麻素跨膜转运量^[12]。基于此，本研究制备 C6 胶质瘤大鼠模型，对比 TMZ 单给药、VO 与 TMZ 配伍给药后，模型大鼠的体质量

变化、生存状态、肿瘤体积的变化及抑瘤率，从药效学的角度研究 VO 是否具有提高配伍药物抗胶质瘤的作用；对比 TMZ 单给药、VO 与 TMZ 配伍给药后，TMZ 在胶质瘤细胞 U87-MG 内、外液中的浓度，Western blotting 法研究 VO 与 TMZ 配伍给药后对 U87-MG 细胞中外排蛋白 P-gp 表达的影响，阐明其作用机制。

1 材料

1.1 药品及试剂

TMZ，批号 K19A9B58889，源叶生物科技有限公司；VO，批号 20170614，其中总内酯质量分数为 50.27%，藁本内酯质量分数为 30.67%，陕西昊辰生物科技有限公司；聚山梨酯-80，Solarbio 公司；ECM 基础培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素双抗，Sciencell 公司；Ham's F-12K 培养基、马血清，美国 Hyclone 公司；FBS，美国 Gibco 公司；胰蛋白酶、二甲基亚砜 (DMSO)、Hanks 缓冲液、固体石蜡、树胶、磷酸盐缓冲液 (PBS)、 $4 \times$ 蛋白上样缓冲液、 $0.22 \mu\text{m}$ PVDF 膜、 1.5 mol/L Tris-HCl pH 8.8、 1 mol/L Tris-HCl pH 6.8、 $10 \times$ 电转液、 $5 \times$ Tris 甘氨酸电泳缓冲液、牛血清白蛋白 (BSA)、 $20 \times$ TBS、彩虹 245 plus 广谱蛋白 Marker，Solarbio 公司；P-gp 抗体 (Abcam 公司)；GAPDH 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 辣根酶标记山羊抗兔 IgG，北京中杉金桥生物技术有限公司；化学发光剂、BCA 试剂盒，天根生化科技有限公司；二甲苯、无水乙醇、甲醛均为西陇科学股份有限公司产品。

1.2 仪器

AE31 倒置生物显微镜，麦克奥迪实业集团有限公司；01220 数显恒温水浴锅，常州国华电器有限公司；SW-CJ-2FD 超净工作台，苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；Forma 3111 二氧化碳恒温培养箱，Thermo Electron 公司；3-18K 离心机，德国 Sigma 公司；Agilent1260 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；多功能酶标仪，Thermo 公司；冰箱，青岛海尔股份有限公司；脑立体定向仪，德国 Kopf 公司；电动牙科钻，美国 Foredom 公司；微量注射

泵, 美国 KD Scientific 公司; RM2255 型包埋机、EG1150H 型切片机、HI1210 型摊片机、HI1220 型烘片机均为德国莱卡公司产品; BX43 型光学显微镜, 日本 Olympus 公司; A-35 型刀片, 日本 Feather 公司; DNP-9052 电热恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; GL-6250A 磁力搅拌器、TS-8 脱色摇床, 海门其林贝尔仪器制造有限公司; 1645050 电泳电源、1658001 垂直电泳槽, BioRad 公司; Chemiscope 6000 Pro 荧光及化学发成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司。

1.3 细胞及动物

大鼠 C6 胶质瘤细胞, 上海中乔新舟生物科技有限公司; U87-MG 细胞, 北京北纳创联生物技术研究院; SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 220~240 g, 南京君科生物科技有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (沪) 2013-0016, 由江西中医药大学实验动物中心按 SPF 级动物标准饲养。

2 方法

2.1 细胞培养及处理

C6 细胞加入适量含有 15% 马血清、2.5% FBS 的 Ham's F-12K 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。取对数期细胞, 常温下经 0.25% 胰酶消化, 吹打细胞制成细胞悬液, 将细胞转置于离心管中, 细胞计数板计数, 用台盼蓝排斥实验确定细胞存活率, 需存活率 > 95%。离心管中剩余细胞以 1 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 调整细胞密度为 7×10^7 个/mL 用于接种。U87-MG 细胞培养基为含 10% FBS 的 DMEM, 培养方法同 C6 细胞。

2.2 大鼠脑胶质瘤模型的制备

术前 12 h 大鼠禁食、不禁水, 用 10% 水合氯醛 (3.5 mg/kg) ip 麻醉, 俯卧固定于大鼠脑立体定位仪, 剃去头部皮毛, 酒精进行术区消毒, 以内眦连线与头部正中矢状面交点位置右移 3 mm, 向后做约 1.5 cm 的纵向切口, 分离皮下组织与骨膜, 充分暴露颅骨。据 Batker 法确定右尾状核靶点, 于冠状缝与正中矢状线交点前 1.0 mm、中线右 3.0 mm 处用电钻钻一小孔, 不可伤及硬脑膜及脑组织。25 μ L 微量注射器吸取已准备好的待用 C6 细胞悬液 15 μ L (约 1×10^6 个细胞), 放置于微量注射泵上, 沿电钻钻开的骨孔缓慢垂直进针至硬膜下 6.0 mm, 1.0 min 后再回退 1.0 mm (距硬膜下 5.0 mm)。将注射速度设置为 1.5 μ L/min, 10 min 推注完毕, 需再留针 5 min, 使细胞充分沉积, 再缓慢退针, 退针速度为 2

μ L/min, 骨孔用骨蜡进行封闭。缝合切口后用碘伏再次消毒皮肤。

2.3 大鼠分组与给药

大鼠接种 C6 细胞 2 周后, 随机抽取 5 只, 取瘤区脑组织做病理切片, 判断模型复制是否成功。若镜下见梭形细胞呈浸润性生长, 细胞异型性明显, 核分裂相易见, 肿瘤微血管丰富, 中心有明显的出血及栅栏状坏死, 表明造模成功。随机将制备成功的模型大鼠分为模型组 (给予双蒸水)、TMZ 组 (25 mg/kg)、TMZ+VO 低剂量组 (TMZ/VO 2.5, 25 mg/kg+2.5 mg/kg)、TMZ+VO 高剂量组 (TMZ/VO 5, 25 mg/kg+5 mg/kg), 每组 15 只, ig 给药, 连续给药 5 d, 给药体积为 10 mL/kg。

2.4 大鼠生存状况观测

从造模第 1 天开始至给药结束后, 每日观察、记录大鼠的精神状况、活动情况、体质量变化、行为改变等生存质量情况。

2.5 大鼠肿瘤病理学研究

将给药后的大鼠每组取 3 只, 10% 水合氯醛过量麻醉, 颈椎脱臼处死, 取脑, 生理盐水清洗干净, 固定于 10% 甲醛固定液中 2 d, 石蜡包埋、切片 (厚度为 3 μ m), HE 染色, 光学显微镜下观察肿瘤的形态学变化。

2.6 大鼠胶质瘤体积及抑瘤率测定

各组大鼠给药后 10% 水合氯醛麻醉, 仰卧位固定, 以横膈肌处为起点, 将胸部皮毛、肌肉组织剪开, 切开纵膈肌, 将两侧肋骨剪断, 用止血钳夹住前胸肋骨剑突向上翻起, 以便暴露心脏, 用镊子将心脏固定, 将灌注针从左心室插入主动脉弓起始部, 用止血钳固定心脏及针头, 剪开右心耳, 先用 300 mL 37 °C 生理盐水进行快速灌注, 再用 200 mL 4% 多聚甲醛固定液 20 min 内匀速灌注。灌注完毕后, 开颅, 将脑组织完整取出, 在 4% 多聚甲醛溶液内固定 1 周。将肿瘤组织从脑内完整的剥离取出, 称质量, 并测量肿瘤短径 (a) 和长径 (b), 计算肿瘤体积 (V) 及肿瘤体积抑制率, 肿瘤体积抑制率 > 30%, 表明肿瘤对药物敏感。

$$V = a^2 \times b \times \pi / 6$$

$$\text{肿瘤体积抑制率} = (V_{\text{模型}} - V_{\text{治疗}}) / V_{\text{模型}}$$

2.7 U87-MG 细胞分组与给药

取 U87-MG 细胞制成细胞悬液, 调整为 $2.0 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 待细胞融合至 80% 后, 分为 TMZ 组 (20 μ g/mL)

和 TMZ+VO 低、中、高浓度 ($20\text{ }\mu\text{g/mL}+1.5625\times 10^{-3}$ 、 3.125×10^{-3} 、 $6.25\times 10^{-3}\text{ }\mu\text{L/mL}$) 组, 移液枪吸尽每个孔中的培养液, 分别加入 2 mL 相应溶液。培养 24 h 后, 收集培养上清液即为细胞外液。胰酶 $200\text{ }\mu\text{L}$ 对贴壁细胞进行消化, 消化 5 min, $1\text{ }200\text{ r/min}$ 离心 5 min, 超声 3 min, $1\text{ }200\text{ r/min}$ 离心 5 min 后取上清液即为细胞内液。吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的细胞内、外液, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 醋酸乙酯, 涡旋 5 min 后, 再以 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液采用 HPLC 检测。

2.8 HPLC 测定细胞内、外液中 TMZ 水平

2.8.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Kinetex NB-C₁₈ 柱 ($100\text{ mm}\times 3.0\text{ mm}$, $2.6\text{ }\mu\text{m}$); 流动相乙腈-0.1%甲酸水 1:9, 体积流量 1 mL/min ; 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$, 检测波长为 329 nm 。

2.8.2 方法学考察

(1) 专属性考察: 精密吸取 TMZ 对照品、Hanks 液、细胞内液及细胞外液样品, 按“2.7”项下方式进行处理, 在“2.8.1”项下色谱条件下进样 $5\text{ }\mu\text{L}$ 进行检测, 考察专属性。TMZ 在此液相条件下, 保留时间为 5.5 min 左右, Hanks 溶液对 TMZ 的测定无干扰。

(2) 精密度试验: 取适量的 TMZ 对照品储备液, 制成质量浓度为 1.25、5、10、 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 溶液, 按“2.8.1”项下色谱条件进样测定, 连续进样 6 次, 测定其峰面积, 结果 TMZ 的峰面积 RSD 分别为 2.17%、0.76%、0.86%、1.05%, 表明仪器的精密度良好。

(3) 回收率试验: 取 TMZ 对照品溶液, 加双蒸水配制成低、中、高 3 个质量浓度; 取 TMZ 对照品溶液, 加 Hanks 液配制成低、中、高 3 个不同质量浓度溶液, 按“2.7”项下处理方法进行操作, 平行配制 3 份, 按“2.8.1”项下色谱条件, 精密进样 $5\text{ }\mu\text{L}$, 测定峰面积, 计算回收率和 RSD 值。结果 TMZ 低、中、高浓度的回收率分别为 83.0%、85.3%、85.1%, RSD 值分别为 2.34%、4.66%、4.28%。表明回收率良好。

2.9 Western blotting 法检测 P-gp 蛋白表达

U87-MG 细胞制成细胞悬液, 以 1.0×10^6 个/mL 接种于 25 cm^2 培养瓶中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养, 细胞生长融合至 90% 后, 分为对照组、TMZ 组 ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$) 和 TMZ+VO 低、中、高浓度 ($20\text{ }\mu\text{g/mL}+1.5625\times 10^{-3}$ 、 3.125×10^{-3} 、

$6.25\times 10^{-3}\text{ }\mu\text{L/mL}$) 组。药物作用 8 h 后, RIPA 法裂解并提取蛋白, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 Western blotting 法检测 P-gp 蛋白表达, 灰度分析使用 Image J 软件进行分析。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 2 组间结果比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 大鼠的体质量变化及生存状态分析

结果见图 1, 造模前各组大鼠体质量无统计学差异, 造模后当天给予充足饲料, 第 2 天观察大鼠已开始自行觅食、饮水。术后大鼠食物和水的摄入较术前均有减少。模型组大鼠术后出现精神状态萎靡不振, 毛发不整洁、黯淡无光, 反应迟钝, 活动量减少, 聚集成堆等表现, 个别伴有腹泻等症状, 体质量下降明显; 7~14 d 大鼠暴躁易怒, 攻击力增强, 多数有明显的脑部肿起, 部分出现眼眶周围出血、鼻出血、偏瘫等颅内高压的症状。TMZ、TMZ/VO 2.5 和 TMZ/VO 5 组大鼠术后 14 d 内精神状态及颅内高压症状表现与模型组相同, 连续给药 5 d 后, 部分大鼠头部的肿起逐渐消失, 毛发光泽度较模型组光亮; 14 d 后给药组大鼠体质量有缓慢上升的趋势, TMZ/VO 2.5 和 TMZ/VO 5 组大鼠给药后体质量比模型组及 TMZ 组大鼠上升更快, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$)。

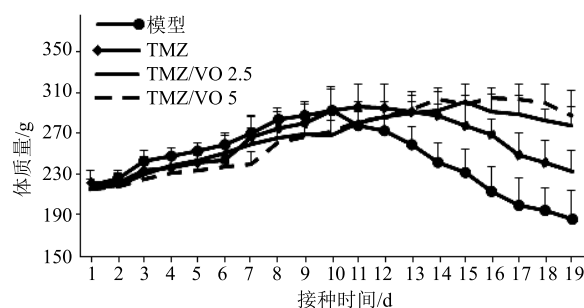


图 1 各组大鼠体质量变化

Fig. 1 Changes of body weight of rats in each group

3.2 大鼠脑胶质瘤形态学变化

HE 染色结果见图 2, 模型组大鼠肿瘤细胞排列非常紧密, 细胞体积较大, 可见裸核, 核体积大, 核浆的比例有所增加, 有大量的异型性细胞增殖, 并向脑组织呈浸润性生长, 多见不成熟新生血管, 病灶中心部位坏死灶和出血。TMZ、TMZ/VO 2.5 和 TMZ/VO 5 组大鼠脑组织中肿瘤体积明显缩小,

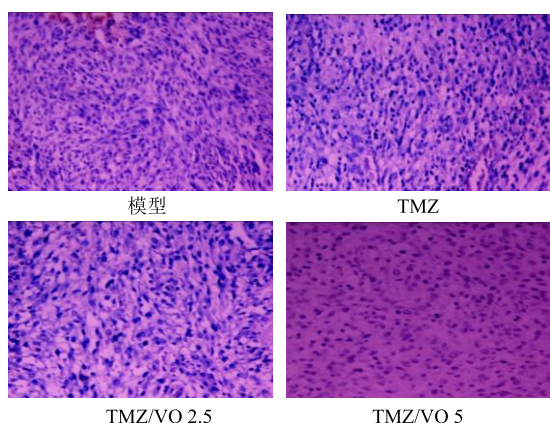


图 2 大鼠脑胶质瘤 HE 染色 ($\times 200$)
Fig. 2 HE staining of rat glioma ($\times 200$)

TMZ/VO 2.5 和 TMZ/VO 5 组大鼠脑胶质瘤细胞排列紧密程度显著轻于模型组, 与 TMZ 组比较细胞密度也略有降低。

3.3 大鼠肿瘤体积及其抑制率

连续给药 5 d 后, 与模型组比较, TMZ、TMZ/VO 2.5 和 TMZ/VO 5 组大鼠脑胶质瘤体积明显减小 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 3。TMZ、TMZ/VO 2.5、TMZ/VO 5 组大鼠肿瘤抑制率分别为 55.23%、63.56%、74.66%, 所有给药组肿瘤体积抑制率均 $> 30\%$, 表明肿瘤对治疗敏感。TMZ/VO 5、TMZ/VO 2.5 组与 TMZ 组比较差异显著 ($P < 0.05$), 提示与 VO 配伍后可以提高 TMZ 的抗肿瘤效果, 且呈剂量依赖性, 表明 VO 增强 TMZ 抗肿瘤效果与给药剂量有关。

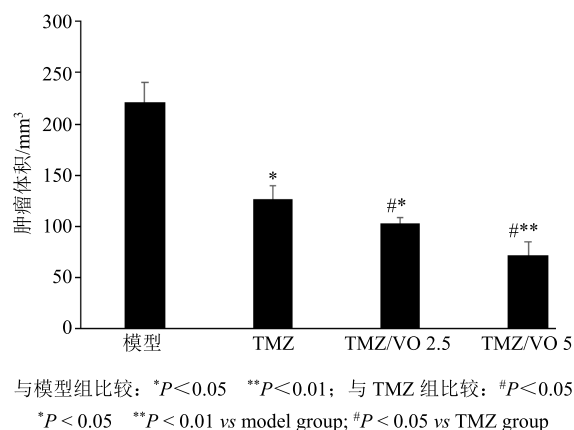


图 3 各组大鼠肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 3 Changes of tumor volume in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.4 VO 对 U87-MG 细胞内、外液中 TMZ 浓度的影响

表 1 结果可以看出, VO 可以促进 TMZ 进入 U87-MG 细胞内液中, 且随着 VO 浓度的增加, 促进作用越强。其中 VO $6.25 \times 10^{-3} \mu\text{L/mL}$ 可显著增加 TMZ 在细胞内液中的蓄积 ($P < 0.05$)。

3.5 TMZ 配伍 VO 对 U87-MG 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

U87-MG 细胞分别经空白 Hanks 液、TMZ、不同浓度 VO 配伍 TMZ 处理后, 细胞膜上 P-gp 蛋白表达情况见图 4。结果发现, 与对照组比较, TMZ 对 P-gp 蛋白表达无显著影响。与 TMZ 组比较, TMZ 与 VO 3.125×10^{-3} 、 $6.250 \times 10^{-3} \mu\text{L/mL}$ 配伍后可显

表 1 VO 对 TMZ 在 U87-MG 细胞内、外液中浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of VO on concentration of TMZ in internal and external of U87-MG cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度	TMZ/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
		外液	内液	内液/外液
TMZ	$20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.18 ± 0.27	8.74 ± 0.63	2.76 ± 0.24
TMZ + VO	$20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} + 1.5625 \times 10^{-3} \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.60 ± 0.33	10.57 ± 1.55	2.95 ± 0.54
	$20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} + 3.125 \times 10^{-3} \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.59 ± 0.25	10.09 ± 1.14	2.82 ± 0.36
	$20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} + 6.250 \times 10^{-3} \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.39 ± 0.21	$11.84 \pm 0.55^{**}$	$3.51 \pm 0.39^{*}$

与 TMZ 组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

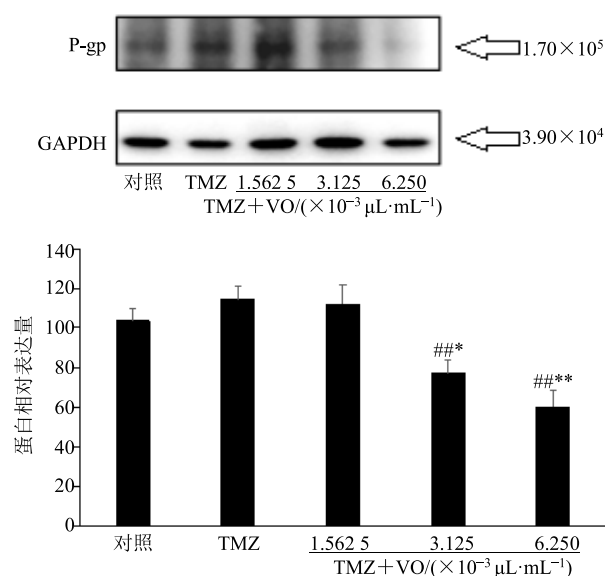
$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs TMZ group

著降低 P-gp 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明 VO 通过抑制外排蛋白 P-gp 蛋白表达, 增加 TMZ 进入胶质瘤细胞膜内的浓度, 从而提高胶质瘤的治疗效果; 同时该抑制作用与 VO 用量呈正相关, 用量越大, 抑制作用越强。

4 讨论

脑胶质瘤是最常见的颅内恶性原发性脑肿瘤,

致死率高, 由于其浸润性生长, 和正常脑组织没有明显界限, 手术难完全切除, 对放疗、化疗不甚敏感, 因此脑胶质瘤至今仍是全身肿瘤中预后最差的肿瘤之一。研究者利用肿瘤表面特异性高表达的受体作为药物递送系统作用靶点构建一级靶向^[13-15]给药系统, 以及在一级靶向的基础上增加脑靶向的二级靶向^[16-18]。虽然临床前实验结果显示了这些靶向



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 TMZ 组比较: ^{##} $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs TMZ group

图 4 TMZ 配伍 VO 对 U87-MG 细胞 P-gp 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of TMP and VO on P-gp expression in U87-MG cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制剂的优越性,但由于系统的合成制备相对来说比较复杂,可控性差,存在安全性等诸多问题^[19],可能会限制其在体内的应用及向临床的转化。中医药在治疗脑肿瘤时常常配伍使用芳香开窍药,利用芳香开窍药对 BBB/BBTB 的调节作用可提高配伍药物的疗效,并随着该作用机制的逐渐阐明,现已广泛与化学药物联用发挥协同作用,成为治疗脑肿瘤的有效途径。目前研究较多的芳香开窍药如 β -细辛醚、冰片、苏合香挥发油、麝香酮等,被发现能增加配伍药物抗胶质瘤的效果^[2]。

川芎可提高酸枣仁皂苷 A 和天麻苷元在脑组织中的浓度,并延缓其在脑组织中的代谢^[20-21]。川芎中的川芎嗪可以通过降低咬合蛋白 (occludin)、闭合小环蛋白 (ZO-1) 表达从而增加 BBB 的通透性^[22]。川芎嗪的转运受到 P-gp 的外排作用,但与其他药物配伍使用时,川芎嗪能通过抑制 P-gp 的表达来促进药物透过 BBB^[23-24]。VO 中的 3 个入脑成分藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 可抑制 BBB 上 P-gp 蛋白的外排作用,增加配伍药物芍药苷、天麻素跨膜转运量,同时还可以抑制 ZO-1 和 Claudin-5 蛋白的表达,增加 BBB 的通透性,从而增加配伍药物的跨膜转运。由于胶质瘤的治疗同时受到

BBB/BBTB 生物屏障作用及外排蛋白耐药性的影响,推测川芎可能同样有协同配伍药物治疗胶质瘤的作用^[12,25-26]。

基于此,本研究制备了 C6 胶质瘤大鼠模型,连续给药 5 d 后, TMZ、TMZ/VO 2.5 和 TMZ/VO 5 组部分大鼠头部的肿起逐渐消失,毛发光泽度较模型组更加光亮;各给药组大鼠体质量有缓慢上升的趋势, TMZ/VO 2.5 和 TMZ/VO 5 组大鼠比模型组及 TMZ 组体质量上升更快,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。另外,与 TMZ 组比较, TMZ/VO 2.5、TMZ/VO 5 组大鼠肿瘤体积显著减小 ($P < 0.05$),提示 VO 配伍 TMZ 给药时,可以增强 TMZ 的药效,提高脑胶质瘤的抑制率,且呈剂量依赖性。

TMZ 及 VO 对胶质瘤细胞活性的影响较大,预试验时, TMZ 20 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞存活率为 97.85%、而浓度增加到 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率降至 77.64%;而 VO 6.25 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{L/mL}$ 配伍 TMZ 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率为 73.70%,当 VO 增加到 12.5 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{L/mL}$ 时,细胞存活率降为 52.65%,为保证细胞存活率,用于检测细胞内、外液中 TMZ 的浓度, VO 在体外细胞实验时浓度选择比体内实验时低很多。HPLC 检测 TMZ 配伍 VO 对细胞内外 TMZ 含量的影响,结果显示 VO 可以促进 TMZ 细胞进入 U87-MG 细胞内液中,且随着 VO 浓度的增加,促进作用越强。其中 VO 6.25 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{L/mL}$ 可显著增加 TMZ 在细胞内液中的蓄积 ($P < 0.05$)。Western blotting 实验结果表明, VO 通过抑制外排蛋白 P-gp 蛋白表达,增加 TMZ 进入胶质瘤细胞膜内的浓度,从而提高胶质瘤的治疗效果;同时该抑制作用与 VO 用量呈正相关,用量越大,抑制作用越强。

本研究探讨了 VO 通过抑制 P-gp 蛋白表达,促进 TMZ 进入胶质瘤细胞内部,从而发挥协同增效的作用,为临床脑胶质瘤的治疗提供一定的实验和理论基础,但其协同机制是否与紧密连接蛋白以及其他转运蛋白有关,仍有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Wang N B, Zhang Q X, Ning B L, *et al.* β -Asarone promotes Temozolomide's entry into glioma cells and decreases the expression of P-glycoprotein and MDR1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.083.
- [2] 王南卜, 张芹欣, 宁百乐, 等. 4 种开窍药促进替莫唑

- 胺进入 U251 细胞及减低耐药性的对比研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2206-2209.
- [3] Duan M M, Xing Y M, Guo J Q, *et al.* Borneol increases blood-tumour barrier permeability by regulating the expression levels of tight junction-associated proteins [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(12): 3009-3018.
- [4] 邢燕梅. MAPKs 信号转导通路在天然冰片调控体外 BTB 通透性中的作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [5] 吴霜霜, 阮善明, 戚益铭, 沈敏鹤辨证治疗脑肿瘤用药规律分析 [J]. 中医杂志, 2015, 56(2): 108-111.
- [6] 陈 萍, 张玉芝, 唐由君. 脑瘤康治疗脑胶质细胞瘤 34 例 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(4): 361-362.
- [7] 孟 捷. 中医药治疗脑部胶质瘤的体会 [J]. 内蒙古中医药, 2003, 22(1): 44.
- [8] 赖世忠. 脑瘤的中医治疗体会 [J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(24): 3351.
- [9] 王黎军, 范宏宇. 涤痰化痰通窍汤治疗脑部肿瘤 34 例 [J]. 中医杂志, 2005, 46(8): 611.
- [10] 石怀芝. 补阳还五汤加减在脑胶质瘤治疗中的应用 [J]. 北京中医药, 2007, 26(2): 113-114.
- [11] 曹振健, 杨炳奎, 霍介格. 平瘤合剂治疗颅内胶质细胞瘤的临床观察 [J]. 山东中医杂志, 2005, 24(2): 78-79.
- [12] Hu P Y, Liu D, Zheng Q, *et al.* Elucidation of transport mechanism of paeoniflorin and the influence of ligustilide, senkyunolide I and senkyunolide A on paeoniflorin transport through MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 1-13.
- [13] Huang R Q, Ke W L, Han L, *et al.* Targeted delivery of chlorotoxin-modified DNA-loaded nanoparticles to glioma via intravenous administration [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(9): 2399-2406.
- [14] Chen Z, Deng J, Zhao Y, *et al.* Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system: Enhanced cellular uptake *in vitro* and improved pharmacokinetics in rats [J]. *Int J Nanomed*, 2012, doi: 10.2147/IJN.S33541.
- [15] Zhao B J, Ke X Y, Huang Y, *et al.* The antiangiogenic efficacy of NGR-modified PEG-DSPE micelles containing paclitaxel (NGR-M-PTX) for the treatment of glioma in rats [J]. *J Drug Target*, 2011, 19(5): 382-390.
- [16] Jiang Y, Lv L Y, Shi H H, *et al.* PEGylated polyamidoamine dendrimer conjugated with tumor homing peptide as a potential targeted delivery system for glioma [J]. *Colloids Surf B Biointerf*, 2016, 147: 242-249.
- [17] Luo B, Wang S, Rao R, *et al.* Conjugation magnetic PAEEP-PLLA nanoparticles with lactoferrin as a specific targeting MRI contrast agent for detection of brain glioma in rats [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2016, 11(1): 1-11.
- [18] Li L, Di X S, Zhang S W, *et al.* Large amino acid transporter 1 mediated glutamate modified docetaxel-loaded liposomes for glioma targeting [J]. *Colloids Surf B Biointerf*, 2016, 141: 260-267.
- [19] 李剑峰, 蒋 晨. 脑胶质瘤靶向药物递送系统 [J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(5): 573-582.
- [20] 王 平, 王 晨, 楼一层. 冰片、川芎对复方舒郁健脑方剂透过血脑屏障的作用研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(5): 21-23.
- [20] 郑 琴, 刘嘉宇, 傅声玲, 等. 川芎对天麻苷元大鼠脑内药动学的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(5): 263-266.
- [21] 王 艳. 川芎嗪对体外血脑屏障模型通透性的影响及部分作用机制 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2013.
- [22] 李金辉, 朱振洪, 葛立军, 等. 体外血脑屏障的构建及川芎嗪与葛根素合用对 P-gp 基因表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2118-2121.
- [23] 杨 雯, 周惠芬, 杨洁红, 等. 川芎嗪在 Caco-2 细胞单层模型的转运特征及对 P-糖蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 581-585.
- [24] 胡鹏翼, 刘 丹, 郑 琴, 等. 川芎活性成分对天麻素在 MDCK-MDR1 细胞上跨膜转运的影响及机制 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(14): 39-45.
- [25] Zheng Q, Tang Y, Hu P Y, *et al.* The influence and mechanism of ligustilide, senkyunolide I, and senkyunolide A on echinacoside transport through MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(3): 426-435.