

## 黄芪甲苷逆转人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 对阿霉素多药耐药的体外研究

岳贵娟, 王成祥, 于梦琦, 秦楠坤, 问莹, 张婉乔, 赖晓静, 郭宇瑛, 马群\*  
北京中医药大学中药学院, 北京 102488

**摘要:** 目的 探讨黄芪甲苷对耐药人乳腺癌细胞 MDA-MB-231/DOX 多药耐药的逆转作用。方法 以噻唑蓝 (MTT) 法测定黄芪甲苷的细胞毒性及其处理前后乳腺癌细胞对阿霉素的敏感性或耐药性变化。采用乙醇注入法-硫酸铵梯度法构建共载阿霉素-黄芪甲苷的脂质体 (LPs-DOX/AS), 并评价其对乳腺癌细胞多药耐药的逆转作用, 采用流式细胞术测定 LPs-DOX/AS 对细胞凋亡的影响。结果 黄芪甲苷在实验浓度范围内对乳腺癌细胞无明显细胞毒性; 与黄芪甲苷联用后, 阿霉素对 MDA-MB-231、MDA-MB-231/DOX 细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值均下降 ( $P < 0.05$ ), 并且对耐药细胞的干预效果更明显 ( $P < 0.01$ )。脂质体包载后的 LPs-DOX/AS-IV 比游离 DOX/AS-IV 对 2 种乳腺癌细胞的  $IC_{50}$  值均下降 ( $P < 0.05$ ), 同样对耐药株的效果更明显 ( $P < 0.01$ )。经 LPs-DOX/AS-IV 处理的耐药株细胞凋亡率也显著高于游离药物组 ( $P < 0.05$ )。结论 黄芪甲苷对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 对阿霉素多药耐药具有很好的逆转作用, 黄芪甲苷与阿霉素联用及其脂质体共递送体系的开发可以有效逆转或增敏乳腺癌的多药耐药。

**关键词:** 黄芪甲苷; 阿霉素; 乳腺癌; 耐药性; 阿霉素-黄芪甲苷脂质体; 逆转作用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)20-5237-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.016

## *In vitro* study of astragaloside IV on reversing multidrug resistance of human breast cancer cell MDA-MB-231 to doxorubicin

YUE Gui-juan, WANG Cheng-xiang, YU Meng-qi, QIN Nan-kun, WEN Ying, ZHANG Wan-qiao, LAI Xiao-jing, GUO Yu-ying, MA Qun

School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract: Objective** To investigate the reversal effect of astragaloside IV on multidrug resistance of MDA-MB-231/DOX in breast cancer cells. **Methods** The cytotoxicity of astragaloside IV and sensitivity or drug resistance of breast cancer cells to doxorubicin (DOX) before and after treatment were determined by MTT assay. Liposome co-delivery system containing doxorubicin and astragaloside IV (LPs-DOX/AS) was constructed by ethanol injection-ammonium sulfate gradient method. The reversal effect of LPs-DOX/AS on multidrug resistance of breast cancer cells was determined by MTT method. The effect of LPs-DOX/AS on apoptosis was determined by flow cytometry. **Results** Astragaloside IV had no significant cytotoxicity to breast cancer cells in the experimental concentration range. After combined with astragaloside IV, the  $IC_{50}$  values of DOX on MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DOX cells decreased ( $P < 0.05$ ), and the intervention effect on drug-resistant cells was more significant ( $P < 0.01$ ). Compared with free DOX/AS-IV, the  $IC_{50}$  values of LPs-DOX/AS-IV on both breast cancer cells decreased ( $P < 0.05$ ), and the effect on drug-resistant strains was more significant ( $P < 0.01$ ). The apoptosis rate of drug-resistant strains treated with LPs-DOX/AS-IV was also significantly higher than that of free drug group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Astragaloside IV has reversal effect on multidrug resistance of human breast cancer cell MDA-MB-231 to doxorubicin. The combination of astragaloside IV and doxorubicin and its liposome co-delivery system can effectively reverse or sensitize multidrug resistance in breast cancer.

**Key words:** astragaloside IV; doxorubicin; breast cancer; drug resistance; LPs-DOX/AS; reversal effect

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是三阴性乳腺癌 (three negative breast cancer, TNBC) 化疗方案中常用的基础药物之一, 但其易产生耐药、较窄的治疗窗口、严重肾毒性等阻碍了其临床应用<sup>[1]</sup>。其耐

收稿日期: 2019-12-02

作者简介: 岳贵娟, 博士, 从事新型给药系统与创新药物研究。E-mail: shanzhongyue1899@163.com

\*通信作者 马群, 博士生导师, 研究员, 从事新型给药系统与创新药物研究。E-mail: maqun99@163.com

药性多表现为多药耐药 (multidrug resistance, MDR), 主要由 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 介导<sup>[2-3]</sup>。P-gp 由多药耐药基因 (mdr1) 编码, 可作为“药泵”逆浓度梯度将药物泵出细胞外而产生耐药性<sup>[4]</sup>。因此, 抑制 P-gp 转运蛋白和调节多药耐药性是逆转 MDR 的重要策略。于是研究者们尝试将化疗增敏剂与其联用或共输送, 以逆转肿瘤耐药, 促进肿瘤细胞凋亡, 从而提高 DOX 抗肿瘤效果。黄芪甲苷 (astragaloside IV, AS-IV) 是从黄芪中提取的一种天然化合物, 是黄芪中活性很强的苷类成分, 具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗肿瘤等广泛的药理作用<sup>[5]</sup>。研究表明, AS-IV 对 DOX 具有协同抗肿瘤效果, 对肝癌、胃癌 MDR 均有一定逆转作用<sup>[6-7]</sup>。AS-IV 通过下调 mdr1 和 P-gp 的表达水平来逆转耐药, 是一种潜在的 P-gp 介导的 MDR 逆转剂<sup>[8-9]</sup>。因此, 本研究采用 AS-IV 作为 DOX 的化疗增敏剂, 通过体外实验探讨 AS-IV 对 DOX 多药耐药的逆转作用, 以期对 DOX 与 AS-IV 的联合使用提供实验依据, 为实现两药共递送的靶向脂质体创新药物剂型研究奠定基础, 为临床治疗 TNBC 化疗耐药提供新的有效策略。

## 1 材料

### 1.1 细胞

MDA-MB-231 乳腺癌细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司, MDA-MB-231/DOX 耐药细胞株购自上海钰博生物科技有限公司。

### 1.2 试剂

胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司; 0.25%胰蛋白酶、RPMI 1640 培养基、青霉素-链霉素、磷酸盐缓冲液 PBS 均购自 Mediatech Inc 公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Amresco 公司; AS-IV 原料药 (批号 FY13080913)、盐酸阿霉素 (批号 FY2384RK139) 和盐酸维拉帕米 (VRP, 批号 FY284801339) 的质量分数均 >98%, 均购自南通飞宇生物科技有限公司; S100 大豆卵磷脂购自德国 Lipoid 公司; 胆固醇 (质量分数 >95%) 购自北京百灵威科技有限公司, 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒购自北京拜耳迪生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo 公司); ELX-800 型酶标仪 (美国 Biotek 公司); DM2000 型倒置显微镜 (Leica 公司); 微量振荡器 (金坛市荣华仪器制造有限公司); HH-S6 型恒温水浴锅 (北京科伟永

兴仪器有限公司); 台式低速离心机 (北京京立离心机有限公司); RE-5203 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); XHF-DY 型高速分散器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); ZNCL-BS 型恒温加热磁力搅拌器 (上海越众仪器设备有限公司); FD-1C-80 型冻干机 (北京博医康实验仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 AS-IV 对 MDA-MB-231 细胞活性的影响

MDA-MB-231、MDA-MB-231/DOX 耐药细胞均用含 10%胎牛血清的完全培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。将对数生长期 MDA-MB-231 细胞制成密度为 1.5 × 10<sup>3</sup>/mL 的细胞悬液, 接种在 96 孔板中, 每孔 200 μL, 培养 24 h。待细胞贴壁后, 各实验组分别加入 5 μL 不同质量浓度的 AS-IV 溶液, 使终质量浓度分别为 100、50、30、10、3、1、0.3、0.1、0.03 μg/L, 对照组和空白组 (无细胞) 各加入 5 μL 含 4% DMSO 的培养液。继续培养 72 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液各 20 μL, 37 °C 孵育 4 h, 小心吸掉每孔中溶液, 加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定各孔在 490 nm 处的吸光度 (A) 值。实验重复 3 次, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件计算 AS-IV 对 MDA-MB-231 细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 和抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.2 AS-IV 对 DOX 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

将对数生长期的 MDA-MB-231、MDA-MB-231/DOX 细胞制成密度为 1.5 × 10<sup>4</sup>/mL 的细胞悬液, 分别接种在 96 孔板中, 每孔 200 μL, 培养 24 h。细胞贴壁后, 各实验组分别加入 5 μL DOX、DOX + VRP (P-gp 抑制剂)、DOX + 不同质量浓度 AS-IV (20、10、5、3、1、0.5 μg/mL), 对照组和空白组分别加入 5 μL 含 4% DMSO 的培养液。培养 72 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液各 20 μL, 37 °C 孵育 4 h, 小心吸掉每孔中溶液, 加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定各孔在 490 nm 处的 A 值。实验重复 3 次, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件计算各组 MDA-MB-231、MDA-MB-231/DOX 细胞增殖抑制率、IC<sub>50</sub> 及 AS-IV 对 2 种乳腺癌细胞的增敏或逆转倍数。

$$\text{增敏或逆转倍数} = \text{使用 AS-IV 前 IC}_{50} / \text{使用 AS-IV 后 IC}_{50}$$

### 2.3 AS-IV 与 DOX 联用的比例优化

将对数生长期 MDA-MB-231 细胞制成密度为  $1.5 \times 10^4/\text{mL}$  的细胞悬液, 接种在 96 孔板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h。细胞贴壁后, 各实验组分别加入 5  $\mu\text{L}$  DOX 与 AS-IV 混合药液, 其中 DOX 质量浓度为 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (接近其  $\text{IC}_{50}$ ), DOX 与 AS-IV 浓度比分别为 1:0、1:1、1:2、1:3、1:4, 对照组和空白组分别加入含 5  $\mu\text{L}$  含 4% DMSO 的培养液。培养 72 h 后, 每孔加入 5  $\text{mg}/\text{mL}$  MTT 溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h, 小心吸掉每孔中溶液, 加 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定各孔在 490 nm 处的 A 值。实验重复 3 次, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件计算 DOX 对 MDA-MB-231 细胞的抑制率。

根据参考文献<sup>[10]</sup>及预实验结果, 以 8  $\text{mg}/\text{mL}$  磷脂乙醇溶液、磷脂-胆固醇(10:1)、AS-IV-磷脂(1:5)、DOX-AS-IV (1:3) 工艺条件, 采用乙醇注入法-硫酸铵梯度法构建共载 DOX-AS-IV 的脂质体给药系统。分别精密称取 AS-IV、磷脂、胆固醇适量共同溶解于无水乙醇中作为油相, 精密称取硫酸铵适量溶解于水中作为水相, 在超声条件下将油相匀速缓慢地注入到水相中, 形成脂质体乳液, 以超滤膜去除游离药物后, 即得 AS-IV 脂质体 (LPs-AS), 同法制备空白脂质体 (LPs)。精密称取盐酸 DOX 适量溶解于水中, 将 DOX 水溶液加到 LPs-AS 中, 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 30 min, 并磁力搅拌, 用超滤膜去除游离药物后, 即得 DOX-AS-IV 脂质体 (LPs-DOX/AS)。

### 2.4 LPs-DOX/AS 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

将对数生长期 MDA-MB-231、MDA-MB-231/DOX 细胞制成密度为  $1.5 \times 10^4/\text{mL}$  的细胞悬液, 分别接种在 96 孔板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h。细胞贴壁后, 游离 DOX/AS 组和 LPs-DOX/AS 组分别加入相应药液 5  $\mu\text{L}$ , 对照组和空白组分别加入 5  $\mu\text{L}$  含 4% DMSO 的培养液。培养 72 h 后, 每孔加入 5  $\text{mg}/\text{mL}$  MTT 溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h, 小心吸掉每孔中溶液, 加 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定各孔在 490 nm 处的 A 值, 实验重复 3 次, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件计算各组 MDA-MB-231、MDA-MB-231/DOX 细胞的  $\text{IC}_{50}$ 。

### 2.5 LPs-DOX/AS 对 MDA-MB-231/DOX 耐药细胞凋亡的影响

将对数生长期 MDA-MB-231/DOX 细胞制成密度为  $2.0 \times 10^6/\text{mL}$  的细胞悬液, 分别接种在 6 孔

板中, 每孔 2 mL。培养 24 h 后, 分别加入各脂质体药物 2  $\mu\text{L}$  (DOX 最终浓度为 0.4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 继续培养 12 h。收集细胞 (包括原培养液中悬浮细胞), 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 PBS 重悬细胞并计数。取 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液 ( $5 \times 10^6$  个细胞), 加入 10  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 轻轻混匀, 避光放置 10 min, 加入 5  $\mu\text{L}$  碘化丙啶 (PI), 避光、室温反应 10 min, 放置于冰上, 样品在 1 h 内用流式细胞仪检测。

### 2.6 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 21.0 统计软件, 采用方差分析 LSD 检验, 比较组间差异。

## 3 结果

### 3.1 AS-IV 对 MDA-MB-231 细胞活性的影响

MTT 实验结果表明 AS-IV 对 MDA-MB-231 细胞的增殖有一定的抑制作用。当细胞增殖抑制率小于 10% 时, 可认为无细胞毒性, 因此  $\text{IC}_{10}$  即为无毒的药物浓度。AS-IV 质量浓度为 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 抑制率为 9.47%, 并且随着药物质量浓度增高, 对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用逐渐增强, 呈浓度相关性。随着药物质量浓度的增高, A 值逐渐降低,  $\text{IC}_{50}$  为  $(33.83 \pm 1.46) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 见表 1。因此, 当 AS-IV 浓度不高于 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对 MDA-MB-231 细胞无细胞毒性作用, 并且在探讨 AS-IV 逆转作用时实验浓度应控制在  $\text{IC}_{50}$  值以下。

### 3.2 AS-IV 对 DOX 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

与单用 DOX 相比, AS-IV 联用后, DOX 对 MDA-MB-231 亲本细胞的  $\text{IC}_{50}$  均有不同程度的下

表 1 AS-IV 对 MDA-MB-231 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Effect of AS-IV on MDA-MB-231 cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

AS-IV/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	抑制率/%
0.03	6.230 0 $\pm$ 1.366 2
0.10	5.910 0 $\pm$ 1.558 3
0.30	4.390 0 $\pm$ 3.612 5
1.00	3.890 0 $\pm$ 2.271 1
3.00	9.480 0 $\pm$ 2.674 6
10.00	27.440 0 $\pm$ 3.383 0
30.00	45.500 0 $\pm$ 1.222 0
50.00	55.260 0 $\pm$ 4.712 9
100.00	71.400 0 $\pm$ 2.299 1

降。5 μg/mL AS-IV 组的增敏效果最好，增敏倍数为 1.82，但在 AS-IV 安全用药浓度下，3 μg/mL 和 1 μg/mL AS-IV 对 DOX 依然具有较好的增敏效果 ( $P < 0.05$ )，增敏倍数分别为 1.62、1.66，质量浓度降至 0.5 μg/mL 时无明显增敏作用。说明 AS-IV 能够提高 MDA-MB-231 细胞对 DOX 的敏感性，对 DOX 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖具有协同作用。见表 2。

单用 DOX 对 MDA-MB-231/DOX 耐药细胞的 IC<sub>50</sub> 为 (5.311 0 ± 0.123 7) μmol/L，与 MDA-MB-231 细胞相比，其耐药倍数为 13.31。与 AS-IV 联用后，各组 DOX IC<sub>50</sub> 均明显下降 ( $P < 0.05$ 、0.01)，10 μg/mL AS-IV 组的 IC<sub>50</sub> 最低，逆转倍数为 3.37，呈浓度相关性。说明 AS-IV 具有对 MDA-MB-231/DOX 耐 DOX 的逆转作用。见表 3。

表 2 AS-IV 对 DOX 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的协同效果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Synergistic effect of AS-IV to DOX on MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )	增敏倍数
DOX	0.399 0 ± 0.032 2	
DOX + 5 μmol/L VCR	0.141 1 ± 0.028 4**	2.83
DOX + 20 μg/mL AS-IV	0.284 0 ± 0.020 8*	1.40
DOX + 10 μg/mL AS-IV	0.281 3 ± 0.012 3*	1.42
DOX + 5 μg/mL AS-IV	0.218 8 ± 0.021 7**	1.82
DOX + 3 μg/mL AS-IV	0.246 1 ± 0.018 8*	1.62
DOX + 1 μg/mL AS-IV	0.240 8 ± 0.013 5*	1.66
DOX + 0.5 μg/mL AS-IV	0.311 3 ± 0.023 3	1.28

与 DOX 组相比: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ，下表同  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs DOX group, same as below tables

表 3 AS-IV 对 MDA-MB-231/DOX 细胞耐 DOX 的逆转作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Reverse effect of AS-IV to DOX on MDA-MB-231/DOX cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )	逆转倍数
DOX	5.311 0 ± 0.123 7	
DOX + 5 μmol/LVCR	1.031 3 ± 0.016 2**	5.15
DOX + 10 μg/mL AS-IV	1.575 3 ± 0.037 6**	3.37
DOX + 5 μg/mL AS-IV	1.605 0 ± 0.035 0**	3.31
DOX + 3 μg/mL AS-IV	1.855 3 ± 0.032 5**	2.86
DOX + 1 μg/mL AS-IV	2.601 3 ± 0.069 9**	2.04
DOX + 0.5 μg/mL AS-IV	4.533 0 ± 0.195 2*	1.17

### 3.3 AS-IV 与 DOX 联用的比例优化

与单用 DOX (1 : 0) 相比，AS-IV 联用后，各组 DOX 对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用明显提高 ( $P < 0.05$ 、0.01)。当 DOX 与 AS-IV 浓度比为 1 : 3 和 1 : 4 时，抑制率 (分别为 68.08%、69.20%) 相对较高，但二者相比没有统计学差异。考虑到制备脂质体时脂溶性药物较易包裹，而水溶性的 AS-IV 易发生损失，浓度不宜过高，因此可选择二者比例为 1 : 3~1 : 4。见表 4。

表 4 不同浓度配比 DOX 与 AS-IV 对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Inhibition of different concentration ratio of DOX to AS-IV on MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

DOX 与 AS-IV 联用比例	抑制率/%
1 : 0	52.370 0 ± 1.373 6
1 : 1	56.290 0 ± 0.602 2*
1 : 2	60.500 0 ± 1.231 6**
1 : 3	68.100 0 ± 0.464 4**
1 : 4	69.200 0 ± 0.684 3**

与 1 : 0 组相比: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs 1 : 0 group

### 3.4 LPs-DOX/AS 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

与游离 DOX/AS 相比，LPs-DOX/AS 干预后，对 2 种乳腺癌细胞的 IC<sub>50</sub> 均显著下降 ( $P < 0.05$ )，并且对 DOX 耐药细胞的干预效果更明显 ( $P < 0.01$ )。说明所构建的 DOX-AS-IV 脂质体载药体系能够有效增敏 DOX 对亲本细胞系的抑制作用，有效逆转耐药细胞系对 DOX 的耐药性。见表 5。

表 5 LPs-DOX/AS 对肿瘤细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effects of LPs-DOX/AS on proliferation of tumor cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

细胞	组别	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )
MDA-MB-231	DOX/AS	0.277 6 ± 0.003 9
	LPs-DOX/AS	0.238 8 ± 0.007 7*
MDA-MB-231/DOX	DOX/AS	1.984 0 ± 0.049 7
	LPs-DOX/AS	1.031 0 ± 0.001 2**

与 DOX/AS 组相比: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs DOX/AS

### 3.5 LPs-DOX/AS 对 MDA-MB-231/DOX 耐药细胞凋亡的影响

药物干预 12 h 后，利用 Annexin V-FITC 和 PI 进行双染色，采用流式细胞仪技术检测了

MDA-231/DOX 细胞凋亡的情况, 见图 1。从图中可知, LPs-DOX/AS 组细胞凋亡率为 16.5%, 显著高于游离 DOX/AS 组的细胞凋亡率 (11.7%,  $P < 0.05$ ), 说明所构建的脂质体共递送系统对 MDA-231/DOX 细胞凋亡有促进作用。

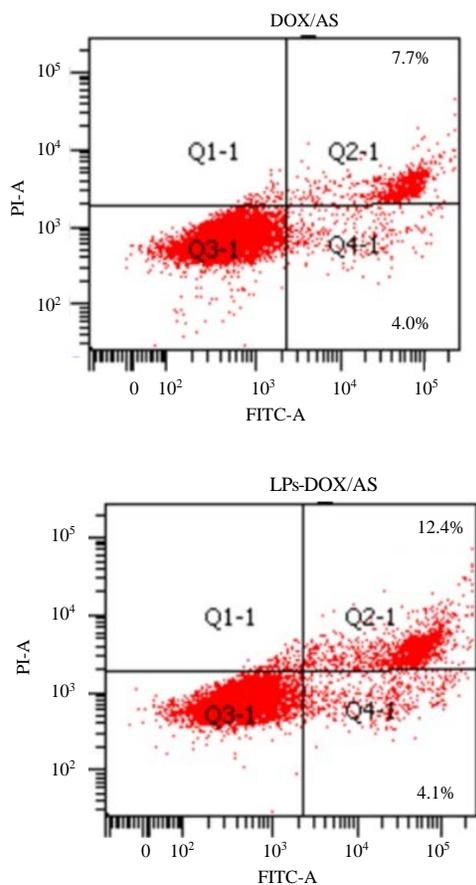


图 1 LPs-DOX/AS 对 MDA-MB-231/DOX 耐药细胞凋亡的影响  
Fig. 1 Effect of LPs-DOX/AS on apoptosis of MDA-MB-231/DOX resistant cells

#### 4 讨论

乳腺癌是世界范围内女性最常见的恶性肿瘤, 全球每年新发乳腺癌病例约 167.1 万, 约 52.2 万患者死于该病<sup>[10]</sup>。特别 20 世纪 90 年代以来, 我国乳腺癌发病率呈快速增长, 是全球平均增长速度的 2 倍多, 城市地区尤为显著<sup>[11]</sup>。DOX 是一种高效的蒽环类抗肿瘤抗生素, 其作用机制主要是通过嵌入方式与 DNA 紧密结合形成 DOX-DNA-拓扑异构酶 II 三元复合物, 从而抑制 DNA 复制和 RNA 转录, 对各种生长周期的肿瘤细胞都有强烈杀伤作用, 常被临床用于多种癌症的治疗<sup>[12]</sup>。同时, 也是由于含蒽环类药物的方案在癌症新辅助化疗或术后辅助治疗中的应用, 使得患者在肿瘤复发转移时常常对其

已经耐药。由于其易产生耐药性及缺乏选择性, 导致 DOX 的临床应用受到严重的限制<sup>[1]</sup>。因此, DOX 等蒽环类药物的耐药现象亟需解决。

中药资源丰富、作用靶点多, 可针对化疗耐药机制复杂的特点, 已报道的具有耐药逆转作用的中药活体成分有大黄素、苦参碱、AS-IV、粉防己碱、川芎嗪、姜黄素、槲皮素等<sup>[13-18]</sup>。目前, 研究者们对 DOX 联合 AS-IV 使用做了很多相关研究, 结果显示 AS-IV 不仅对 DOX 所致心脏毒性、肾脏毒性等不良反应具有显著减毒作用<sup>[19-21]</sup>。田彦璋等<sup>[8]</sup>探讨了 AS-IV 对耐药肝癌细胞株 HepG2/GCS 多药耐药的逆转作用, 结果表明 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AS-IV 可逆转 HepG2/GCS 细胞对 DOX 的耐药性, 逆转倍数为 1.50。杨小娟等<sup>[22]</sup>研究发现 AS-IV 具有增强白血病耐药细胞株 L1210/DDP 对顺铂 (DDP) 敏感性, 逆转 L1210/DDP 细胞株耐药的功效。本研究通过 MTT 细胞实验在乳腺癌细胞中也证明了这一点, AS-IV 安全用药浓度内对 MDA-MB-231 细胞的最大增敏倍数为 1.66, 对 MDA-MB-231/DOX 细胞的逆转倍数可达 2.86, 对耐药株的效果比野生型的更明显。

然而, AS-IV 的水中难溶性以及生物利用度低, 限制了其与 DOX 的联合使用<sup>[23]</sup>。脂质体是内外层均为亲水端、中间带有疏水夹层的囊泡结构, 是一种常用的药物共递送载体, 具有很强的生物相容性, 即可包裹水溶性药物又可包裹水不溶性药物, 通用性强, 是一种良好的药物载体, 常用于药物共递送系统的构建。大量研究显示, 脂质体共载药系统用于多种肿瘤的联合治疗能够取得良好的协同效果, 体现出脂质体在 DOX、多西他赛 (DTX) 等多种常规肿瘤化疗药物共输送中的应用潜力<sup>[24-26]</sup>。文献研究显示空白脂质体孵育 LLT 和 U87 细胞 48 h 后, 细胞存活率变化不明显, 说明脂质体的原材料无细胞毒性<sup>[27]</sup>。本研究引入脂质体系统主要利用了其包合作用, 将溶解性差异的 DOX 与 AS-IV 共载以实现联合应用, 探讨高效脂质体靶向乳腺癌载药系统的可行性。通过比较发现, 脂质体包载后的 DOX/AS-IV 比游离 DOX/AS-IV 对 2 种乳腺癌细胞的协同效果显著增强, 同样对耐药株的效果更明显, 细胞凋亡实验结果也印证了这一结果。

综上所述, 本研究从化疗耐药角度, 通过体外细胞试验证明了 AS-IV 不仅对 DOX 具有协同抗肿瘤效果, 还对人乳腺癌的 DOX 耐药具有很好的逆转作用, 为二者联合使用提供了科学依据。进一步

考察了两药联用时的配比, 并采用生物相容性强、通用性强的脂质体技术构建了 DOX/AS 共递送系统, 实现了二者联合用药。通过体外细胞试验对 LPs-DOX/AS 进行了进一步评价, 结果表明 AS-IV 与 DOX 联用及其脂质体共递送体系的开发可以有效逆转或增敏三阴性乳腺癌的多药耐药, 促进细胞凋亡, 对于乳腺癌临床治疗具有重要意义。课题组后续基于转录组学的研究显示, AS-IV 对 DOX 的逆转耐药机制可能与下调 Wnt、MAPK、Axon guidance 等信号通路有关, 其具体机制尚待进一步研究明确。

#### 参考文献

- [1] Cabeza L, Quesada R O, Arias J L, *et al.* Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10: 1291-1306.
- [2] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update of overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(3): 273-286.
- [3] Chen C Y, Liu N Y, Lin H C, *et al.* Synthesis and bioevaluation of novel benzodipyranone derivatives as P-glycoprotein inhibitors for multidrug resistance reversal agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 118: 219-229.
- [4] Safa A. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators [J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2004, 4(1): 1-17.
- [5] 段立军, 孙博航. 黄芪甲苷的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(5): 410-416.
- [6] 叶青. 黄芪甲苷对胃癌 SGC7901/DDP 细胞多药耐药性的逆转作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [7] 田彦璋, 苗青旺, 赵浩亮, 等. 黄芪甲苷逆转耐药肝癌细胞株 HepG2/GCS 多药耐药的研究 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(7): 778-779.
- [8] Wang P P, Xu D J, Huang C, *et al.* Astragaloside IV reduces the expression level of P-glycoprotein in multidrug resistant human hepatic cancer cell lines [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2131-2137.
- [9] Wang P P, Luan J J, Xu W K, *et al.* Astragaloside IV downregulates the expression of MDR1 in Bel-7402/FU human hepatic cancer cells by inhibiting the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2761-2766.
- [10] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, *et al.* GLOBOCAN 2012v 1. 0, Cancer incidence and mortality worldwide [EB/OL]. [2015-03-24]. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- [11] Fan L, Strasser-Weippl K, Li J J, *et al.* Breast cancer in China [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): 279-289.
- [12] 王汝冰, 刘潇. DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂研究进展 [J]. 海峡药学, 2009, 21(4): 1-5.
- [13] 陈英玉, 李静, 胡建达, 等. 大黄素对 HL-60/ADR 耐药细胞多药耐药逆转作用的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2003, 10(12): 10-12.
- [14] 魏昌晟, 沈义军, 张智. 苦参碱逆转乳腺癌耐药株 MCF-7/ADR 多药耐药与 PI3K/AKT 通道的关系 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(22): 2254-2258.
- [15] 陈晓松, 包明红, 梅晓冬. 粉防己碱对口腔上皮癌多药耐药 KB-MRP1 细胞株多药耐药性的逆转作用 [J]. 癌症, 2007, 26(8): 846-850.
- [16] 马海英, 赵瑾瑶, 金伟, 等. 川芎嗪对转基因多药耐药细胞 K562/MDR 耐药性的逆转作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2009, 35(4): 599-603.
- [17] 赵小静. 阿霉素-姜黄素共输送脂质纳米载药系统抗肝癌研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [18] 袁斐, 白钢钢, 苗筠杰, 等. 中药逆转肿瘤细胞多药耐药的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 875-863.
- [19] 钟飞, 李辉, 周卫华. 黄芪甲苷对大鼠阿霉素心肌细胞凋亡的影响 [J]. 吉首大学学报, 2008, 29(6): 104-105.
- [20] 李丽, 陶辉宇, 陈杰斌. 黄芪甲苷保护阿霉素心肌损伤的抗氧化机制研究 [J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(1): 58-61.
- [21] 蔺莉霞. 黄芪甲苷对阿霉素诱导大鼠 H9C2 心肌细胞凋亡影响的实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [22] 杨小娟, 康意, 刘志强, 等. 基于 p62-NRF2 通路探讨黄芪甲苷对白血病耐药细胞株化疗敏感性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(4): 771-774.
- [23] Gu Y C, Wang G J, Pan G Y, *et al.* Transport and bioavailability studies of astragaloside IV, an active ingredient in *Radix Astragali* [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004, 95(6): 295-298.
- [24] 李井泉; 仰滨臻; 孟婷婷, 等. 肝癌靶向的阳离子脂质体共递送多西他赛和 siRNA 的研究(英文) [J]. 中国药学: 英文版, 2014, 23(10), 667-673.
- [25] 解方园. 共载盐霉素和氯喹的纳米脂质体体外抗肝癌细胞和肝癌干细胞的作用研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [26] Wong M Y, Chiu G N. Simultaneous liposomal delivery of quercetin and vincristine for enhanced estrogen-receptor-negative breast cancer treatment [J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(4): 401-410.
- [27] 李学涛, 王为, 符敏, 等. 穿膜肽修饰表阿霉素与五味子乙素脂质体的处方优选及细胞毒性评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 8-11.