

## 美洲大蠊多肽逆转人肝癌 HepG2/ADM 细胞多药耐药性的作用及机制研究

李彩琳, 吕 鸿, 张鸿翰, 王彦权, 彭 芳\*

大理大学药学院, 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000

**摘要:**目的 探讨美洲大蠊多肽(PAE<sub>2</sub>)逆转人肝癌多药耐药细胞株 HepG2/ADM 的作用及机制。方法 噻唑蓝(MTT)法检测 HepG2/ADM 细胞对不同化疗药物的耐药性以及 PAE<sub>2</sub>联合化疗药物(5-氟尿嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、奥沙利铂)对 HepG2/ADM 细胞增殖的影响;激光共聚焦观察 PAE<sub>2</sub>对 HepG2/ADM 细胞中药物累积的影响;Western blotting 法检测 PAE<sub>2</sub>对 HepG2/ADM 细胞凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X, Bax)、半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase 9, Caspase-9)、DNA 修复酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)表达的影响;qRT-PCR 法检测 PAE<sub>2</sub>对多药耐药蛋白 1(multiple drug resistance 1, MDR1)、乳腺癌耐药相关蛋白(breast cancer resistant protein, BCRP)和酶介导的多药耐药途径中蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)、拓扑异构酶 II(topoisomerase II, Top II)的 mRNA 表达。结果 PAE<sub>2</sub>抑制 HepG2/ADM 细胞增殖,呈时间和剂量相关性。PAE<sub>2</sub>可逆转 HepG2/ADM 对不同化疗药物的耐药性;PAE<sub>2</sub>可上调 HepG2/ADM 细胞中阿霉素水平,呈剂量相关性。PAE<sub>2</sub>可显著上调耐药细胞中 Bax、cleaved Caspase-9 p37 蛋白表达水平( $P < 0.05, 0.01$ ),显著下调 Bcl-2 蛋白表达水平( $P < 0.01$ ),对 cleaved PARP 蛋白表达无显著影响。PAE<sub>2</sub>均显著下调 HepG2/ADM 细胞中 MDR1、BCRP、PKC、Top II mRNA 水平( $P < 0.01$ )。结论 PAE<sub>2</sub>可以通过减少药物外排、促进细胞凋亡、下调耐药蛋白表达等途径逆转 HepG2/ADM 细胞的多药耐药性。

**关键词:** 美洲大蠊多肽; PAE<sub>2</sub>; 肝癌; 多药耐药; HepG2/ADM 细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)01-0152-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.019

## Effect and mechanism of polypeptide from *Periplaneta americana* on reversing multi-drug resistance of hepatocellular carcinoma in HepG2/ADM cells

LI Cai-lin, LYU Hong, ZHANG Hong-han, WANG Yan-quan, PENG Fang

Yunnan Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China

**Abstract: Objective** To investigate the reverse effect of polypeptide from Meizhoudalian (*Periplaneta Americana*) (PAE<sub>2</sub>) on multi-drug resistance of HepG2/ADM cells. **Methods** The drug resistance of HepG2/ADM cells to different chemotherapeutic drugs and effects of PAE<sub>2</sub> combined with chemotherapeutic drugs on proliferation of HepG2/ADM cells were detected by MTT; The influence of PAE<sub>2</sub> on drug accumulation was observed by Laser Scanning Confocal Microscopy; The expression of Bcl-2 associated X (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cysteinyl aspartate specific proteinase 9 (Caspase-9) and poly ADP-ribose polymerase (PARP) were detected by Western blotting; qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of multiple drug resistance 1 (MDR1), breast cancer resistant protein (BCRP), protein kinase C (PKC) and topoisomerase II (Top II). **Results** Growth of HepG2/ADM cells was inhibited by PAE<sub>2</sub> with a time and dose dependent. PAE<sub>2</sub> reversed the multi-drug resistance of HepG2/ADM cells to different chemotherapeutic drugs; Level of doxorubicin in drug-resistant cells was increased by PAE<sub>2</sub> in a dose-dependent manner. Expressions of Bax, cleaved Caspase-9 p37 were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ) and the expression of Bcl-2 was significantly decreased by PAE<sub>2</sub> in HepG2/ADM cells ( $P < 0.01$ ), the expression of cleaved PARP had no changed. Levels of MDR1, BCRP, PKC and Top II mRNA in HepG2/ADM cells were significantly reduced by PAE<sub>2</sub>. **Conclusion** PAE<sub>2</sub> reversed the multidrug resistance of HepG2/ADM cells by reducing drug efflux, promoting cell apoptosis and reducing the expressions of drug-resistant protein.

**Key words:** Meizhoudalian (*Periplaneta Americana*) polypeptide; PAE<sub>2</sub>; hepatocellular carcinoma; multi-drug resistance; HepG2/ADM cells

收稿日期: 2020-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81560600); 云南省应用基础研究重点项目(2017FH001-010)

作者简介: 李彩琳(1993—), 云南曲靖人, 硕士研究生, 研究方向为抗肿瘤药理学。E-mail: 253550890@qq.com

\*通信作者: 彭 芳, 教授, 硕士, 研究方向为抗肿瘤药理学。Tel: (0872)2257392 E-mail: pengfang6556@aliyun.com

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,死亡率位于全球癌症第3位<sup>[1]</sup>。临床治疗采用手术、放化疗、生物疗法以及多种方法的联用。由于肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药性(multi-drug resistance, MDR),从而降低药物疗效,抗肝癌药物的治疗效果无法显著提高。近48年来,多药耐药性成为生物学家重要的攻克目标<sup>[2-3]</sup>。研究表明,细胞产生多药耐药相关蛋白(multi-drug resistance-associated protein, MRP),增加P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达<sup>[4]</sup>,从而促进药物外排<sup>[5-6]</sup>。临床上使用P-gp抑制剂来减少肿瘤细胞对化疗药物的多药耐药性,但由于化疗药物的毒性、药物相互作用等因素疗效并不显著。化学药物逆转多药耐药的作用机制单一、效果不佳,因此寻找高效低毒的药物来逆转肝癌细胞的耐药性尤为重要。

美洲大蠊 *Periplaneta Americana* L. 是蜚蠊科动物体积最大的昆虫,美洲大蠊多肽具有抗炎、镇痛、抗氧化、减轻肝损伤、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[7-10]</sup>。课题组前期研究表明,美洲大蠊粗提物脱脂膏通过促进细胞凋亡、增加细胞内药物聚集,抑制P-gp、MRP、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等表达,从而抑制肿瘤生长、逆转肝癌细胞多药耐药等作用<sup>[11-16]</sup>。PAE<sub>2</sub>是从美洲大蠊中分离得到的具有明确氨基酸系列且效果最优的多肽小分子。本研究采用人肝癌细胞HepG2、多药耐药细胞株HepG2/ADM,分别从细胞内药物累积、细胞生长抑制、MRP和酶介导的MDR途径相关蛋白几个方面探讨PAE<sub>2</sub>逆转HepG2/ADM多药耐药性的作用及机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人肝癌HepG2、HepG2/ADM细胞购自齐氏生物科技有限公司。

### 1.2 药物与试剂

PAE<sub>2</sub>(白色粉末,批号P18267,质量分数98.071%)由大理大学药学院张成桂博士提供,以DMEM培养基配制成相应质量浓度用于后续实验;5-氟尿嘧啶(批号WXBC6532V,质量分数>99%)、青霉素链霉素混合液(批号20190909),购自Sigma公司;阿霉素(批号131102,质量分数98.0%),购自浙江海正药业有限公司;长春新碱(批号SV8300,质量分数≥98.0%)、索拉非尼(批号720N021,质量分数≥99.0%),购自索莱宝公司科技有限公司;

奥沙利铂(批号T0164,质量分数≥99.95%),购自TargetMol公司;环磷酰胺(批号0A355A),购自百特国际有限公司;胎牛血清(FBS,批号2166446),购自美国Gibco公司;DMEM培养基(批号F909FA0001)、多药耐药蛋白1(multiple drugresistance 1, MDR1)、BCRP、蛋白激酶C(proteinkinase C, PKC)、拓扑异构酶II(topoisomerase II, Top II)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物购自上海生工生物工程股份有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白抗体(批号ab6721),购自美国Abcam公司;B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)兔抗多克隆抗体(批号00071452)、半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase 9, Caspase-9)兔抗多克隆抗体(批号000744407)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl 2-associated X, Bax)兔抗多克隆抗体(批号00073304)、DNA修复酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)兔抗多克隆抗体(批号00055579),购自美国Proteintech公司;GAPDH兔抗多克隆抗体(批号072319191203)、cDNA第一链合成试剂盒(批号050720190702)、BCA蛋白测定试剂盒(批号P0010),购自碧云天生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯或实验室常用试剂。

### 1.3 仪器

3111型CO<sub>2</sub>培养箱、SN255939型酶标仪(美国Thermo Fisher公司);TCS SP8型激光共聚焦显微镜(德国徕卡显微系统有限公司);BB16UV/BB5060UV型垂直流超净台(苏州安泰空气技术有限公司);BSA24S型电子分析天平(Sartorius公司);TS100型倒置光学显微镜(Olympus公司);SN255939型酶标仪(Thermo公司);785BR15145型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国Bio-Rad);TD3型台式低速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

HepG2、HepG2/ADM细胞用含10%FBS和1%青霉素双抗的DMEM培养基,HepG2/ADM细胞另加入阿霉素(0.5 μg/L)以维持细胞的耐药性,于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温恒湿培养箱培养。

### 2.2 PAE<sub>2</sub>对HepG2/ADM细胞增殖的影响

取对数生长期的HepG2/ADM细胞,胰酶消化

后,以  $2.5 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板,培养 24 h。分别加入不同质量浓度 (0.1、1、10、100、1000、10 000 g/mL) PAE<sub>2</sub>, 孵育 48 h 后弃去培养基,每孔加入 100  $\mu$ L 含 10% MTT 的培养基,继续培养 4 h,再加入 100  $\mu$ L DMSO,振荡 30 min,待紫色结晶完全溶解后,用全自动酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 (A)。采用 SPSS 软件计算 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞的 5% 抑制浓度 (5% inhibitory concentration, IC<sub>5</sub>)、10% 抑制浓度 (10% inhibitory concentration, IC<sub>10</sub>)、20% 抑制浓度 (20% inhibitory concentration, IC<sub>20</sub>), 分别作为逆转多药耐药实验的低、中、高剂量。

### 2.3 HepG2/ADM 细胞的多药耐药性以及 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞耐药性的逆转作用

实验分为对照组、模型组、PAE<sub>2</sub> (IC<sub>20</sub> = 183.19  $\mu$ g/mL) 组。对照组取对数生长期的 HepG2 细胞,其余 2 组取对数生长期的 HepG2/ADM 细胞,以  $2.5 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板,培养至细胞融合度为 70%。各组加入以 DMEM 培养基配制成相应质量浓度的化疗药物,PAE<sub>2</sub> 组另加入 PAE<sub>2</sub> 溶液,同时设试剂对照组和细胞空白对照组。其中化疗药物质量浓度分别为 5-氟尿嘧啶 (10、20、40、80、160  $\mu$ g/mL)、阿霉素 (0.31、0.63、1.25、2.50、5.00  $\mu$ g/mL)、环磷酰胺 (40、80、160、320、640  $\mu$ g/mL)、长春新碱 (5、10、20、40、80  $\mu$ g/mL)、奥沙利铂 (10、20、40、80、160  $\mu$ g/mL)。培养 48 h 后,每孔加入 20  $\mu$ L MTT,继续培养 4 h,每孔加入 100  $\mu$ L DMSO,振荡 30 min,待紫色结晶完全溶解,采用全自动酶标仪于 570 nm 处测定 A 值,计算细胞的生长抑制率、耐药倍数和逆转倍数<sup>[17]</sup>。

$$\text{生长抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{试剂对照}}) / (A_{\text{细胞空白对照}} - A_{\text{试剂对照}})$$

$$\text{耐药倍数} = \text{耐药细胞 IC}_{50} / \text{敏感细胞 IC}_{50}$$

$$\text{逆转倍数} = \text{耐药细胞 IC}_{50} / \text{PAE}_2 \text{ 处理后耐药细胞 IC}_{50}$$

### 2.4 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞药物累积的影响

实验分为对照组、模型组、索拉非尼 (2.40  $\mu$ g/mL, 以 DMEM 培养基配制成相应质量浓度) 组、PAE<sub>2</sub> 低剂量 (IC<sub>5</sub> = 3.21  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 中剂量 (IC<sub>10</sub> = 22.19  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 高剂量 (IC<sub>20</sub> = 183.19  $\mu$ g/mL) 组。对照组取对数生长期的 HepG2 细胞,其余各组取 HepG2/ADM 细胞,以  $8 \times 10^6$  个/mL 接种于直径 3 cm、含细胞爬片的小皿中,培养 24 h。除对照和模型组外,其余组分别加入对应药物,培养 48 h。PBS 洗涤,加入含阿霉素 (5  $\mu$ g/mL) 的培养基,继续培养 2 h; 用冷 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入 4% 多聚甲醛避

光固定 30 min; 用冷 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min,加入 DAPI 染色 5 min; 用冷 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min; 用抗荧光淬灭封片剂封片,避光保存,次日于激光共聚焦显微镜下拍照观察。镜下 ADM 阳性表达为红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。采用 Image J 6.0 软件计算阿霉素阳性细胞的荧光强度值,荧光强度值越大表明药物含量越高。

### 2.5 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

实验分为对照组、模型组、索拉非尼 (2.40  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 低剂量 (3.21  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 中剂量 (22.19  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 高剂量 (183.19  $\mu$ g/mL) 组。对照组取对数生长期的 HepG2 细胞,其余各组取 HepG2/ADM 细胞,以  $7.5 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板中,培养 24 h。除对照和模型组外,其余组分别加入对应药物,培养 48 h。以 PBS 洗涤后加入 50  $\mu$ L 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,于冰上孵育 30 min,16 100 $\times$ g,离心 5 min,收集上清,采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白的质量浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离,转至 PVDF 膜,以 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入 Bcl-2 (1 : 1500)、Caspase-9 (1 : 800)、Bax (1 : 2000)、PARP (1 : 500)、GAPDH (1 : 5000) 抗体,于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白抗体 (1 : 500),室温孵育 2 h,于凝胶成像仪显影。采用 Image J 6.0 软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白条带与 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

### 2.6 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞多药耐药和酶介导的 MDR 途径相关蛋白 mRNA 水平的影响

实验分为对照组、模型组、索拉非尼 (2.40  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 低剂量 (3.21  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 中剂量 (22.19  $\mu$ g/mL) 组、PAE<sub>2</sub> 高剂量 (183.19  $\mu$ g/mL) 组。对照组取对数生长期的 HepG2 细胞,其余各组取 HepG2/ADM 细胞,以  $2.4 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h。除对照和模型组外,其余组分别加入对应药物,培养 48 h。用 Trizol 试剂提取总 RNA,测定其质量浓度和纯度; 按 cDNA 第一链合成试剂盒说明书操作合成 cDNA; 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增,反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环。引物序列: MDR1 上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游引物 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'; BCRP 上游引

物 5'-TATAGCTCAGATCATTGTCACAGTC-3', 下游引物 5'-GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG-3'; PKC 上游引物 5'-CCCAAACATTGACAAATCCTAACC-3', 下游引物 5'-CAACCAAGGAGGGTACCAGATG-3'; Top II 上游引物 5'-GAAACGGAATCCTTGGTCAGAT-3', 下游引物 5'-TTTCGGCTGCTGCTCTCCTA-3'; GAPDH 上游引物 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 下游引物 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

### 2.7 统计学方法

所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 细胞形态

如图 1 所示, 和 HepG2 细胞相比, HepG2/ADM 细胞大小不等且有明显触角。

### 3.2 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞增殖的影响

如图 2 所示, 选取细胞倍增时间和较小抑制浓度作为后续实验药物剂量, 采用药物作用 48 h 的 IC<sub>50</sub>

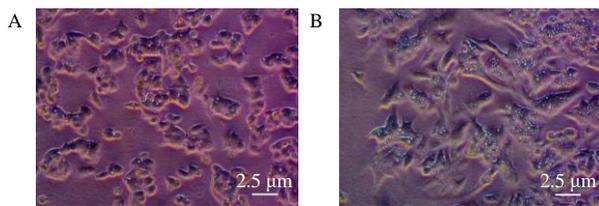


图 1 HepG2 (A) 和 HepG2/ADM (B) 细胞形态 (×200)  
Fig. 1 Morphology of HepG2 (A) and HepG2/ADM (B) cells (×200)

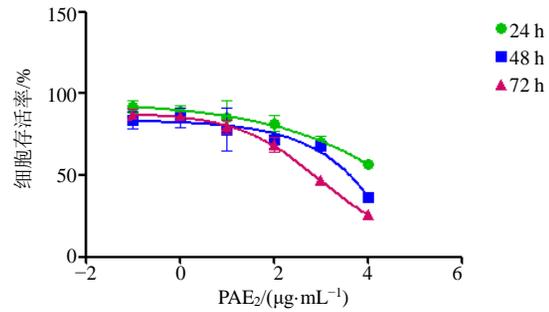


图 2 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 2 Effect of PAE<sub>2</sub> on proliferation in HepG2/ADM cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

(3.21 μg/mL)、IC<sub>10</sub> (22.19 μg/mL)、IC<sub>20</sub> (183.19 μg/mL) 分别作为 PAE<sub>2</sub> 低、中、高剂量。

### 3.3 HepG2/ADM 细胞的多药耐药性以及 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞耐药性的逆转作用

如图 3 所示, 与对照组相比, 化疗药物对 HepG2/ADM 细胞生长的抑制作用较弱, HepG2/ADM 细胞对不同化疗药物均存在耐药性; PAE<sub>2</sub> 联合化疗药物可增强对 HepG2/ADM 细胞生长的抑制作用, HepG2/ADM 细胞对化疗药物的耐药性降低。如表 1 所示, HepG2/ADM 细胞对 5-氟尿嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、奥沙利铂的耐药倍数分别为 2.18、1.87、4.78、3.10、2.00, PAE<sub>2</sub> 对 5-氟尿嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、奥沙利铂的逆转倍数分别为 1.15、1.16、1.25、1.94、1.39。表明 PAE<sub>2</sub> 可逆转 HepG2/ADM 细胞对不同化

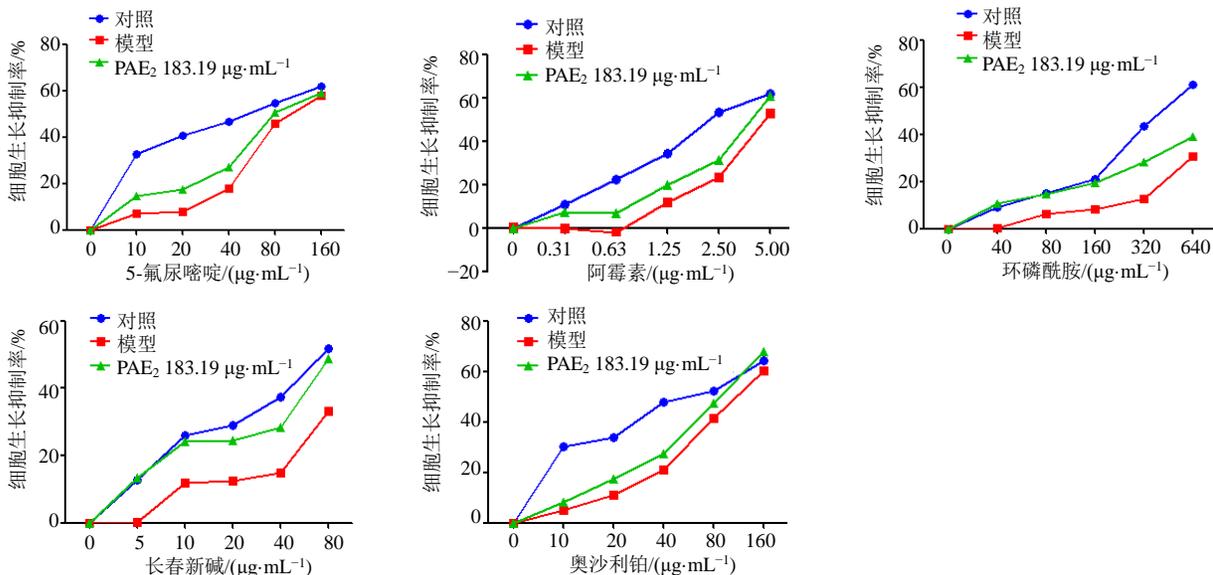


图 3 HepG2/ADM 细胞对不同化疗药物的多药耐药性以及 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞耐药性的逆转作用  
Fig. 3 Multi-drug resistance of HepG2/ADM cells on different chemotherapeutic drugs and effect of PAE<sub>2</sub> on reversing resistance of HepG2/ADM cells

表1 HepG2/ADM 对不同化疗药物的耐药倍数以及 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞耐药性的逆转倍数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Drug resistance index of HepG2/ADM cells on different chemotherapeutic drugs and reverse index of PAE<sub>2</sub> on HepG2/ADM cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

化疗药物	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		PAE <sub>2</sub>	耐药倍数	PAE <sub>2</sub> 逆转倍数
	对照	模型			
5-氟尿嘧啶	52.23 ± 2.83	113.94 ± 8.82 <sup>##</sup>	99.07 ± 6.40 <sup>###</sup>	2.18	1.15
阿霉素	2.56 ± 0.05	4.79 ± 0.24 <sup>##</sup>	4.11 ± 0.60 <sup>###</sup>	1.87	1.16
环磷酰胺	463.94 ± 28.83	2 216.35 ± 507.78 <sup>##</sup>	1 776.89 ± 82.99 <sup>##</sup>	4.78	1.25
长春新碱	77.07 ± 9.38	239.17 ± 23.77 <sup>##</sup>	123.34 ± 10.96 <sup>###</sup>	3.10	1.94
奥沙利铂	57.01 ± 7.16	114.27 ± 0.12 <sup>##</sup>	82.31 ± 5.57 <sup>###</sup>	2.00	1.39

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

疗药物的多药耐药性。

### 3.4 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞药物累积的影响

利用阿霉素自发荧光的特点, 观察阿霉素在细胞中的累积。为了维持细胞耐药性, 用含阿霉素的培养基培养细胞, 因此 HepG2/ADM 细胞荧光强于 HepG2。如图 4 和表 2 所示, 与对照组相比, 其余各组细胞中阿霉素累积水平明显增加 ( $P < 0.05$ 、0.01); 与模型组相比, PAE<sub>2</sub> 中、高剂量组细胞中

表2 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞药物累积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of PAE<sub>2</sub> on drug accumulation of HepG2/ADM cells ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	阿霉素
对照	—	62.13 ± 12.08
模型	—	69.02 ± 7.97 <sup>#</sup>
索拉非尼	2.40	88.24 ± 7.07 <sup>###</sup>
PAE <sub>2</sub>	3.21	71.80 ± 5.26 <sup>##</sup>
	22.19	82.84 ± 4.73 <sup>###</sup>
	183.19	90.50 ± 6.15 <sup>###</sup>

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

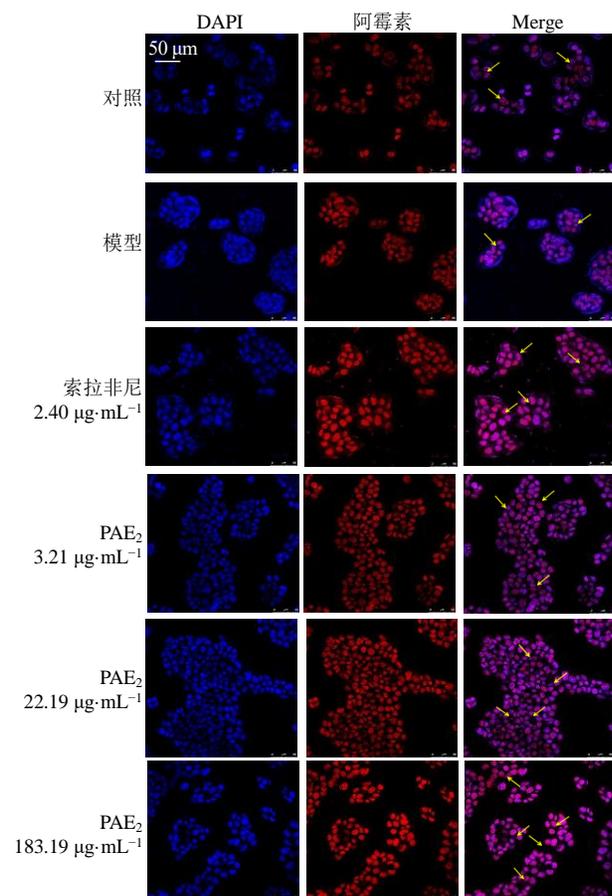


图4 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞药物累积的影响 (×400)

Fig. 4 Effect of PAE<sub>2</sub> on drug accumulation of HepG2/ADM cells (×400)

阿霉素累积水平显著增加 ( $P < 0.01$ )。表明 PAE<sub>2</sub> 可抑制 HepG2/ADM 细胞对药物的外排作用, HepG2/ADM 细胞耐药性减弱。

### 3.5 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 Bcl-2、cleaved Capase-9 p37、cleaved PARP 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), Bax 蛋白表达无显著变化; 与模型组比较, PAE<sub>2</sub> 可显著升高 Bax、cleaved Capase-9 p37 蛋白表达 ( $P < 0.05$ 、0.01), 并降低 Bcl-2 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 呈剂量相关性, 但 cleaved PARP 蛋白表达无显著变化。

### 3.6 PAE<sub>2</sub> 对 HepG2/ADM 细胞多药耐药和酶介导的 MDR 途径相关蛋白 mRNA 水平的影响

如表 3 所示, 与对照比较, 模型组多药耐药相关蛋白 MDR1、BCRP、PKC mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), Top II mRNA 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, PAE<sub>2</sub> 显著下调 MDR1、BCRP、PKC mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ), 显著升高 Top II mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ), 降低 HepG2/ADM 细胞的耐药性。

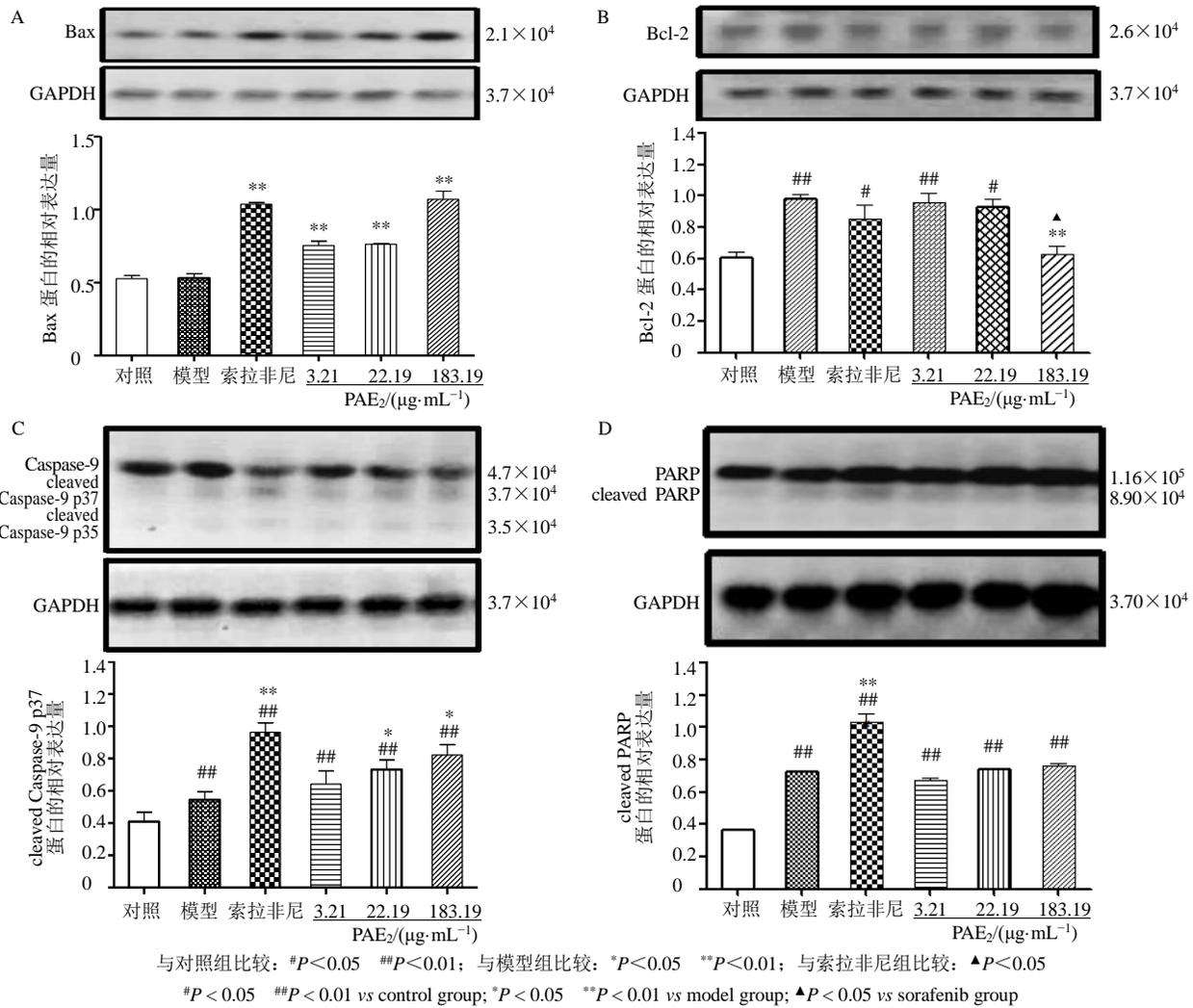


图5 PAE<sub>2</sub>对 HepG2/ADM 细胞 Bax (A)、Bcl-2 (B)、cleaved Capase-9 p37 (C)、cleaved PARP (D) 蛋白表达的影响  
Fig 5 Effect of PAE<sub>2</sub> on expressions of Bax (A), Bcl-2 (B), cleaved Capase-9 p37 (C) and cleaved PARP (D) proteins in HepG2/ADM cells

表3 PAE<sub>2</sub>对 HepG2/ADM 细胞多药耐药和酶介导的 MDR 途径相关蛋白 mRNA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 3 Effect of PAE<sub>2</sub> on mRNA level of multi-drug resistance and enzyme-mediated MDR pathway related proteins in HepG2/ADM cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(μg·mL <sup>-1</sup> )	mRNA 相对表达量			
		<i>MDR1</i>	<i>BCRP</i>	<i>PKC</i>	<i>Top II</i>
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.01
模型	—	35.12 ± 6.95##	3.02 ± 0.56##	445.07 ± 95.58##	0.03 ± 0.01##
索拉非尼	2.40	0.04 ± 0.01####	0.03 ± 0.01####	0.64 ± 0.14####	0.31 ± 0.05####
PAE <sub>2</sub>	3.21	0.16 ± 0.03####	0.25 ± 0.05####	10.48 ± 1.25####	0.36 ± 0.07####
	22.19	0.08 ± 0.01####	0.15 ± 0.02####	0.71 ± 0.08####	0.35 ± 0.08####
	183.19	0.07 ± 0.02####	0.15 ± 0.05####	0.45 ± 0.16####▲	0.21 ± 0.03####

与对照组比较: ##P < 0.01; 与模型组比较: \*\*P < 0.01; 与索拉非尼组比较: ▲P < 0.05

##P < 0.01 vs control group; \*\*P < 0.01 vs model group; ▲P < 0.05 vs sorafenib group

#### 4 讨论

肝癌致死率极高, 由于临床诊断发现较晚, 手术切除疗效不佳<sup>[18]</sup>, 且易对化疗药物产生多药耐药性。5-氟尿嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、

奥沙利铂为临床常用且易产生耐药的化疗药物。5-氟尿嘧啶通过抑制胸腺核苷合成酶, 从而抑制 DNA 合成, 发挥抗肿瘤作用; 阿霉素可抑制 Top I 活性从而干扰转录、抑制 RNA 合成、干扰 DNA 复制, 影

响处于各个周期的细胞；长春新碱可以抑制微管蛋白的聚合从而影响着纺锤微管的形成，使细胞终止于细胞中期，从而影响肿瘤细胞的生长；环磷酰胺是氮芥类抗肿瘤药，经过细胞内磷酸酶水解为氮芥后发挥细胞毒性，杀死肿瘤细胞；奥沙利铂为铂类抗肿瘤药，可与DNA形成交叉连接，抑制DNA的复制和转录。虽然各种化疗药物的作用机制不同，但临床应用表明肿瘤对各种化疗药物均存在耐药性。肝癌的多药耐药一直是临床治疗的一大难题，肝癌的多药耐药是多机制、多因素作用的结果<sup>[19]</sup>。药物产生多药耐药的机制主要包括耐药蛋白介导的MDR（MRP、BCRP、LRP）、酶系统异常导致的MDR（Top II、PKC）、DNA修复机制、微管与微管蛋白异常导致的MDR、凋亡通路受阻等<sup>[20-22]</sup>。化疗药物和生物药逆转肝癌多药耐药的作用机制单一，中药具有多靶点、不良反应小等特点，研究前景广阔。课题组前期研究发现美洲大蠊具有抗肿瘤活性，可逆转肿瘤的多药耐药。本研究通过比较HepG2、耐药细胞HepG2/ADM的形态差异以及HepG2/ADM细胞对5种临床常用化疗药物的耐药性，确定HepG2/ADM细胞的多药耐药作用。在逆转MDR实验中，选择PAE<sub>2</sub>的安全剂量IC<sub>20</sub>与化疗药物联用，确定PAE<sub>2</sub>具有逆转HepG2/ADM细胞多药耐药的作用。由于HepG2/ADM细胞可增加药物外排，本研究利用阿霉素自发红色荧光的特点，采用激光共聚焦观察HepG2/ADM细胞中阿霉素的累积，结果显示，PAE<sub>2</sub>组细胞中红色荧光明显增多，表明PAE<sub>2</sub>减少了药物外排。

细胞凋亡是受多基因控制的细胞自主、有序的死亡，包括抑癌基因p53、Caspase家族、Bcl-2家族等<sup>[7]</sup>。Bax是人体最主要的凋亡基因，属于Bcl-2家族，编码的Bax蛋白可与Bcl-2形成异二聚体，对Bcl-2产生抑制作用。Bcl-2是细胞凋亡中重要的抑制因子，可增强细胞对大多数DNA损伤因子的抵抗性，抑制大多数化疗药物引起的靶细胞凋亡，但对细胞损伤和DNA修复没有影响。Caspase-9是Caspase家族的重要成员，受到凋亡刺激时可生成放大凋亡反应的p37亚基，裂解的Caspase-9进一步加工其他Caspase成员如Caspase-3、Caspase-7，启动Caspase级联，导致细胞凋亡。PARP是一类涉及DNA损伤反应的核蛋白酶家族，由PARP剪切的cleaved PARP被认为是细胞凋亡的一个重要指标<sup>[23-25]</sup>。本研究结果显示，PAE<sub>2</sub>可显著上调HepG2/ADM细胞

Bax、cleaved Caspase-9 p37蛋白表达，显著下调Bcl-2蛋白表达。表明PAE<sub>2</sub>可上调促凋亡蛋白、下调抗凋亡蛋白，加速细胞凋亡。本研究发现与HepG2细胞相比，HepG2/ADM细胞中促凋亡相关蛋白表达水平显著增加，推测这可能是耐药细胞的一种自我保护机制，耐药细胞能量代谢快，通过促进部分细胞凋亡，以获得更多能量，后续研究有待进一步验证。

PKC是一种磷脂依赖性的胞质丝氨酸/苏氨酸激酶，参与细胞内信号转导<sup>[23]</sup>。研究表明，细胞的多药耐药与BCRP、Top II联系密切<sup>[24-25]</sup>。结果显示，PAE<sub>2</sub>显著降低HepG2/ADM细胞中多药耐药相关蛋白（MDR1、BCRP）、酶介导的MDR途径中相关因子（PKC、Top II）mRNA水平，降低HepG2/ADM细胞的多药耐药性。多药耐药阻碍现代医学科学发展，且细胞耐药机制复杂。PAE<sub>2</sub>成分明确、作用靶点多样，本研究从逆转多药耐药的角度为临床克服多药耐药提供了一种新的可能，为其临床研究奠定基础。课题组后续将对多药耐药的体内研究、能量代谢等进一步探究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Li S, Liu X Y, Pan Q, et al. Hepatitis C virus-induced FUT8 causes 5-FU drug resistance in human hepatoma Huh7.5.1 cells [J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 378.
- [2] Elshafie H, Armentano M, Carosino M, et al. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity [J]. *Molecules*, 2017, 22(9): 1435.
- [3] Szakács G, Paterson J K, Ludwig J A, et al. Targeting multidrug resistance in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(3): 219-234.
- [4] Liu H Y, Zhang Z J, Chi X Q, et al. Arsenite-loaded nanoparticles inhibit PARP-1 to overcome multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31009.
- [5] Sanchez-Carranza J N, González-Maya L, Razo-Hernández R S, et al. Achillin increases chemosensitivity to paclitaxel, overcoming resistance and enhancing apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line resistant to paclitaxel (Hep3B/PTX) [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(10): 512.
- [6] Meng Q L, He X Q, Xie G W, et al. MEK inhibitor enhances sensitivity to chemotherapeutic drugs in multidrug resistant hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3089-3095.
- [7] 张丹, 孙玉红, 李茂, 等. 美洲大蠊多肽提取物对荷瘤

- 小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(6): 681-686.
- [8] 欧红利. 美洲大蠊多肽抗肿瘤及免疫调节作用研究 [D]. 大理: 大理大学, 2017.
- [9] 高洁, 沈咏梅, 岳碧松. 美洲大蠊药理作用及其临床疗效的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 203-208.
- [10] 鲍舒洁. 美洲大蠊多肽提取物制备工艺及抗肿瘤作用研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2017.
- [11] 吕鸿, 王瑶, 张蕊, 等. 美洲大蠊多肽 PAP-2 对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(7): 927-931.
- [12] 王瑶, 李婷, 乔婷婷, 等. 美洲大蠊提取物逆转 BEL-7402/5-Fu 多药耐药性的作用及机制研究 [J]. 药学研究, 2017, 36(6): 315-318.
- [13] 乔婷婷, 牛春丽, 彭芳. 美洲大蠊逆转肝癌多药耐药性的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(4): 35-38.
- [14] 刘俊勇, 夏盟恺, 彭芳. 美洲大蠊提取物逆转肝癌耐药性的实验研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(4): 19-23.
- [15] 李婷, 乔婷婷, 刘俊勇, 等. 美洲大蠊提取物逆转 Bel-7402/5-Fu 多药耐药性实验研究 [J]. 大理大学学报, 2017, 16(2): 1-6.
- [16] Zhao Y N, Yang A L, Tu P F, *et al.* Anti-tumor effects of the American cockroach, *Periplaneta americana* [J]. *Chin Med*, 2017, 12: 26.
- [17] Chen J R, Jia X H, Wang H, *et al.* Timosaponin A-III reverses multi-drug resistance in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells via downregulation of MDR1 and MRP1 expression by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(5): 2063-2070.
- [18] 余云霞, 夏嘉文, 熊友香. 中药逆转肝癌多药耐药机制的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(8): 92-97.
- [19] Xie B S, He X X, Guo G H, *et al.* High-throughput screening identified mitoxantrone to induce death of hepatocellular carcinoma cells with autophagy involvement [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(1): 232-237.
- [20] 郑颖, 王刚阳, 陈瑞玲, 等. 骨肉瘤多药耐药的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(33): 6570-6573.
- [21] 王诗琦, 刘克辛. 外排型转运体与肿瘤多药耐药 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 952-957.
- [22] 何社红, 薛聪玲. 谷胱甘肽转移酶- $\pi$  与卵巢癌多药耐药的关系 [J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(4): 320-322.
- [23] Zhao L J, Xu H, Qu J W, *et al.* Modulation of drug resistance in ovarian cancer cells by inhibition of protein kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) with small interference RNA (siRNA) agents [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3631-3636.
- [24] Ma C Y, Yan X, Yin G M, *et al.* Non-targeted metabolomic analysis on multidrug resistance hepatocellular carcinoma cell and reversal effect of annonaceous acetogenins [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164: 489-495.
- [25] 张亮, 隋成旭, 宋磊. 肝癌组织中 p-gp170、GST- $\pi$ 、Topo II 蛋白的表达 [J]. 肿瘤基础与临床, 2014, 27(6): 472-476.

[责任编辑 李亚楠]