

金丝桃苷对耐长春新碱结肠癌 HCT8/VCR 细胞耐药逆转作用

王丽敏*, 杨玉, 张明远, 卢春风, 朱秋双
(佳木斯大学基础医学院, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] 目的:探讨金丝桃苷对耐长春新碱结肠癌 HCT8/VCR 细胞的耐药逆转作用及其可能的作用机制。方法:分别以不同质量浓度(2.5~80 mg·L⁻¹)的金丝桃苷及不同质量浓度(1.25~40 mg·L⁻¹)的长春新碱作用于体外培养的 HCT8 和 HCT8/VCR 细胞 48 h,采用噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞生长抑制率,计算各组细胞金丝桃苷和长春新碱的半数抑制浓度(IC₅₀)及金丝桃苷抑制率为5%的药物浓度;采用非毒性剂量金丝桃苷分别与不同质量浓度(1.25~40 mg·L⁻¹)的长春新碱联合作用 HCT8/VCR 细胞,检测长春新碱的 IC₅₀,计算逆转倍数;采用流式细胞仪检测细胞凋亡率及线粒体膜电位变化,比色法检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3, Caspase-9 蛋白活性的变化。结果:金丝桃苷非细胞毒性剂量为 0.82 mg·L⁻¹。0.82 mg·L⁻¹ 金丝桃苷可使长春新碱对 HCT8/VCR 细胞的 IC₅₀ 从 65.97 mg·L⁻¹ 下降至 9.94 mg·L⁻¹, 逆转倍数为 6.63;与单独用长春新碱组比较,长春新碱与金丝桃苷联合用药组细胞凋亡率, Caspase-3, Caspase-9 蛋白活性均显著提高(P<0.01)。线粒体膜电位检测发现,与单独用长春新碱组及金丝桃苷组比较,长春新碱与金丝桃苷联合用药组低荧光强度相对细胞数所占比率显著提高(P<0.01)。结论:长春新碱与金丝桃苷联合应用后可增强 Caspase-3, Caspase-9 蛋白活性,降低线粒体膜电位,提高 HCT8/VCR 细胞的凋亡率,从而产生耐药逆转作用。

[关键词] 金丝桃苷; 长春新碱; HCT8/VCR 细胞; 多药耐药; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-9; 半数抑制浓度

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)22-0092-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016220092

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1352.056.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 13:52

Reversal Effect of Hyperin on Vincristine-Resistant Colon Cancer HCT8/VCR Cells

WANG Li-min*, YANG Yu, ZHANG Ming-yuan, LU Chun-feng, ZHU Qiu-shuang
(Basic Medical College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the reversal effect of hyperin on vincristine (VCR) -resistant colon cancer HCT8/VCR cells, and its possible mechanism. **Method:** HCT8 cells and HCT8/VCR cells were cultured with hyperin at the concentrations of 2.5-80 mg·L⁻¹ and vincristine at concentrations of 1.25-40 mg·L⁻¹. The inhibitory rate of the cell growth was measured by Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of hyperin and vincristine, as well as non-cytotoxic dose of hyperin were counted. HCT8/VCR cells were treated with hyperin at non-cytotoxic dose with different concentrations of vincristine (VCR, 1.25-40 mg·L⁻¹) to determine IC₅₀ and the reversal multiple in all groups. The apoptotic rate and the changes in mitochondrial membrane potential were evaluated by flow cytometry. The activities of Caspase-3 and Caspase-9 were detected by colorimetric assays. **Result:** Hyperin at the concentration of 0.82 mg·L⁻¹ has no significant cytotoxicity to HCT8/VCR cells. Hyperin at the concentration of 0.82 mg·L⁻¹ decreased the IC₅₀ value

[收稿日期] 20160127(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81301918);黑龙江省自然科学基金项目(H201356)

[通讯作者] *王丽敏,博士,教授,从事中药抗肿瘤研究, Tel:0454-8618576, E-mail: wlmong@163.com

of vincristine to HCT8/VCR cells from $65.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $9.94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, with the reversal multiple of 6.63. The apoptotic rate and Caspase-3 and Caspase-9 activities in combination group were significantly increased compared with vincristine group ($P < 0.01$). The data of mitochondrial membrane potential showed that the percentage of cells in low fluorescence in combination group was increased compared with vincristine group ($P < 0.01$).

Conclusion: Vincristine combined with hyperin could increase Caspase-3 and Caspase-9 protein activities, decrease the mitochondrial membrane potential, and enhance apoptosis rate, so as to reverse the multidrug resistance of HCT8/VCR cells.

[**Key words**] hyperin; vincristine; HCT8/VCR cell; multidrug resistance; Caspase-3; Caspase-9; 50% inhibitory concentration (IC_{50})

结肠癌是一种临床常见的恶性消化道肿瘤,近年来其发病率呈上升趋势。西医学治疗晚期及术后复发结肠癌患者,化疗仍然是重要的治疗手段,但疗效不理想。多药耐药是化疗失败的主要原因,克服多药耐药的方法之一是使用逆转剂,维拉帕米、环孢菌素 A 等是常见的耐药逆转剂,由于存在明显的不良反应,在应用上受到限制,因此寻找低毒高效的逆转剂就成为提高化疗远期疗效的关键^[1]。目前许多学者把目光投向天然药物,探索中医药的肿瘤耐药逆转剂,但这些药物对耐药细胞有细胞毒增效作用,对敏感细胞往往影响不大^[2]。金丝桃苷(hyperin, Hyp)是从贯叶金丝桃^[3]、普通鹿蹄草^[4]、吴茱萸^[5]等中草药中提取出来的一种安全性好的黄酮醇苷类化合物^[6],具有抗炎、镇痛、保护心肌等多种药理作用^[7-8]。目前我国对其抗肿瘤的应用研究还不多,课题组前期研究发现,金丝桃苷具有一定的抗结肠癌作用,并且具有逆转小鼠 S180 肿瘤获得性多药耐药的作用^[9-10]。为进一步探讨金丝桃苷耐药逆转作用,本课题观察金丝桃苷对耐长春新碱结肠癌 HCT8/VCR 细胞增殖及凋亡的影响,探讨其作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌 HCT8 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所;耐长春新碱结肠癌 HCT8/VCR 细胞株购于上海拜力生物科技有限公司。

1.2 药品及试剂 金丝桃苷(北京生物制品研究所,批号 111521-201205),纯度 $\geq 98\%$;长春新碱(上海源叶生物科技有限公司,批号 YY90674),纯度 $\geq 99\%$;噻唑蓝(MTT),罗丹明 123(Rho123)(美国 Sigma 公司,批号分别为 M2128, R8030);二甲基亚砜(DMSO,碧云天生物技术研究,批号 ST038);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3 和 Caspase-9 蛋

白活性检测试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为 C1062, C1115, C1157)。

1.3 仪器 Pas 型流式细胞仪(德国 Partec 公司);ELX-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法测定细胞毒性作用 取对数生长期的亲本细胞 HCT8 和耐药细胞 HCT8/VCR,配成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 $100 \mu\text{L}$,24 h 后待细胞贴壁弃去培养液。实验组分为两组,一组加入金丝桃苷至终质量浓度为 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,另一组加入长春新碱至终质量浓度为 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,同时设不加药物的细胞作为空白组,每个药物质量浓度设 5 个复孔,放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养箱培养 48 h 后,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $10 \mu\text{L}$,继续孵育 4 h,弃去培养液,每孔加入 DMSO $100 \mu\text{L}$,振荡使结晶溶解后,用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔吸光度 A,计算出半数抑制浓度(IC_{50})及耐药倍数(RI),同时测定金丝桃苷对细胞抑制率为 5% 的药物浓度,选取 IC_5 的药物浓度进行逆转研究。每组重复实验 3 次。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{药物组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

$$\text{RI} = \text{IC}_{50\text{耐药细胞}} / \text{IC}_{50\text{亲本细胞}}$$

2.2 MTT 法测定细胞药敏性 取对数生长期耐药细胞 HCT8/VCR,细胞培养、加药、检测同 2.1 项,根据 IC_{50} 求出逆转剂金丝桃苷作用后的逆转倍数。

$$\text{逆转倍数} = \text{IC}_{50\text{耐药细胞加金丝桃苷前}} / \text{IC}_{50\text{耐药细胞加金丝桃苷后}}$$

2.3 流式细胞仪检测细胞的凋亡率 对数生长期 HCT8/VCR 细胞以每瓶 1×10^6 个接种于培养瓶中,细胞贴壁后分别加入长春新碱至终质量浓度为 1.25, 2.5, 5, 10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,同时每组加入金丝桃苷(抑制率为 5% 的药物浓度),并设空白组及不加金丝桃苷的各质量浓度长春新碱组。作用 48 h 后,按 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒的说明,收集约 1×10^5

个细胞重悬于 $1 \times \text{Binding Buffer } 195 \mu\text{L}$ 中,依次加入 Annexin V-FITC $5 \mu\text{L}$ 和 PI $10 \mu\text{L}$,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪检测凋亡率。

2.4 比色法检测 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性 取对数生长期的 HCT8/VCR 细胞,以 1×10^6 个/瓶接种于培养瓶中,设 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 长春新碱组,终浓度为 IC_{50} 的金丝桃苷组, IC_{50} 的金丝桃苷 + $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 长春新碱组,并设空白组,细胞贴壁后分别加入药物。孵育 48 h 后去除培养液,冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,胰蛋白酶消化,离心收集细胞,按照试剂盒说明书操作处理,用酶标仪测定 405 nm 波长处 A,从而表示 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白的活性。

2.5 流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化 取对数生长期 HCT8/VCR 细胞,按 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h。设 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 长春新碱组,金丝桃苷组(抑制率为 5% 的浓度),金丝桃苷(抑制率为 5% 的浓度) + $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 长春新碱组,分别加入药物并设空白组。孵育 48 h 后去除培养液,胰蛋白酶消化,离心收集细胞,将细胞重悬于 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rh123 染色液 1 mL 中制成细胞悬液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光温育 30 min。离心, PBS 冲洗细胞 3 次,重悬细胞,流式细胞仪检测其荧光强度,以低荧光值相对细胞数所占比例作为检测膜通透性变化的指标。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行处理,组间比较采用方差分析后进行 *t* 检验,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 金丝桃苷对细胞毒性的影响 金丝桃苷对 HCT8 和 HCT8/VCR 细胞生长具有抑制作用,随着浓度增加,细胞生长抑制率也相应增加,呈剂量-效应关系。 IC_{50} 分别为 $32.82, 33.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,两者比较差异无统计学意义,说明 HCT8/VCR 细胞对金丝桃苷没有耐药性。金丝桃苷对 HCT8/VCR 细胞抑制率为 5% 的浓度为 $0.82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,因此把 $0.82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为金丝桃苷的最佳逆转浓度。见图 1。

3.2 HCT8/VCR 细胞对长春新碱的耐药倍数及金丝桃苷的耐药逆转作用 长春新碱对 HCT8/VCR 和 HCT8 细胞都存在细胞毒性作用, IC_{50} 分别为 $65.97, 8.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,即 HCT8/VCR 细胞对长春新碱的耐药倍数为 7.96 倍。长春新碱与 IC_{50} 即 $0.82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 金丝桃苷共同作用 48 h 后,对 HCT8/VCR 耐药细胞的 IC_{50} 降低为 $9.94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,金丝桃苷逆转倍数为 6.63。见图 2。

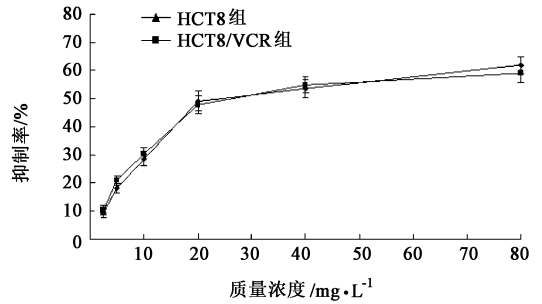


图 1 金丝桃苷对 HCT8 及 HCT8/VCR 细胞生长抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.1 Inhibitory effect of hypericin on growth of HCT8 and HCT8/VCR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

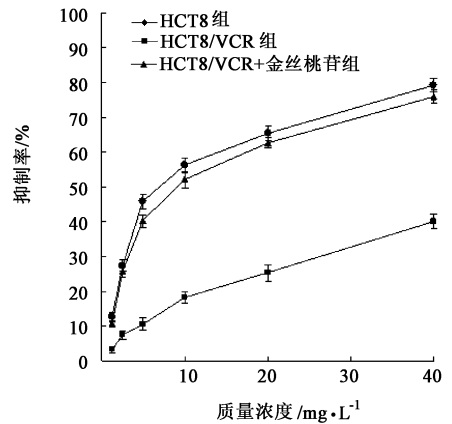


图 2 长春新碱对 HCT8 及 HCT8/VCR 细胞生长抑制作用及金丝桃苷耐药逆转作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.2 Inhibitory effect of vincristine on growth of HCT8 and HCT8/VCR cells and reversing effect of hypericin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 金丝桃苷对细胞 HCT8/VCR 的凋亡率的影响

各质量浓度的长春新碱与 $0.82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的金丝桃苷联合应用作用于耐药 HCT8/VCR 细胞 48 h 后,与单独应用长春新碱组比较,长春新碱与金丝桃苷联合应用后, HCT8/VCR 细胞凋亡率显著提高 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.4 长春新碱与金丝桃苷联用对 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性的影响

单独应用长春新碱时 Caspase-3 和 Caspase-9 A 分别为 (0.191 ± 0.017) 和 (0.178 ± 0.019) ,单独应用金丝桃苷时 Caspase-3 和 Caspase-9 A 分别为 (0.203 ± 0.021) 和 (0.267 ± 0.028) ,长春新碱与金丝桃苷联合用药后 Caspase-3 和 Caspase-9 A 分别提高为 (0.658 ± 0.025) 和 (0.703 ± 0.016) 。与空白组比较,各组药物可不同程度的引起 HCT8/VCR 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性上升,与长春新碱组和金丝桃苷组比较,长春新碱 + 金丝桃苷组 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性升高更显著 ($P < 0.01$)。见图 3。

表 1 长春新碱单独及与金丝桃苷联用对 HCT8/VCR 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of vincristine or its combination with hyperin on apoptosis rate of HCT8/VCR cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	HCT8/VCR	HCT8/VCR + 金丝桃苷
空白	-	3.85 ± 0.15	7.68 ± 0.23
长春新碱	1.25	10.81 ± 0.43 ¹⁾	19.55 ± 0.98 ^{1,2)}
	2.5	15.12 ± 0.98 ¹⁾	24.57 ± 1.18 ^{1,2)}
	5	20.34 ± 1.61 ¹⁾	32.53 ± 1.73 ^{1,2)}
	10	35.27 ± 2.69 ¹⁾	46.87 ± 2.96 ^{1,2)}
	20	45.75 ± 0.48 ¹⁾	60.41 ± 3.82 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与长春新碱单独用药组比较²⁾ $P < 0.01$;金丝桃苷用药均为 0.82 mg·L⁻¹。

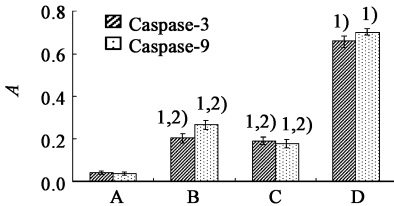


图 3 长春新碱与金丝桃苷单独及联用对 HCT8/VCR 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of vincristine or its combination with hyperin on Caspase-3 and Caspase-9 activities ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 长春新碱与金丝桃苷联用对线粒体膜电位的影响 流式细胞仪分析显示细胞可分为两群,低荧光强度的细胞和高荧光强度的细胞,这表明线粒体膜电位的降低发生在部分细胞,故膜电位的降低以低荧光强度相对细胞数所占比率来表示。与空白组比较,单独应用长春新碱组与金丝桃苷组及联合用药组,低荧光强度相对细胞数所占比率明显升高 ($P < 0.01$)。与单独用长春新碱和金丝桃苷组比较,长春新碱与金丝桃苷联合用药组低荧光强度细胞数所占比率显著提高 ($P < 0.01$)。见图 4。

4 讨论

结肠癌细胞对化疗药物产生耐药是化疗失败的最主要原因,如何成功地逆转耐药,提高化疗效果,对于结肠癌治疗有着积极的意义^[11]。长春新碱是常用的化疗药物,然而治疗中所产生的不良反应,尤其是肿瘤细胞对药物不敏感是导致临床治疗失败的主要原因。本实验结果显示,金丝桃苷能使长春新碱对 HCT8/VCR 细胞 IC₅₀ 从 65.97 mg·L⁻¹ 下降至

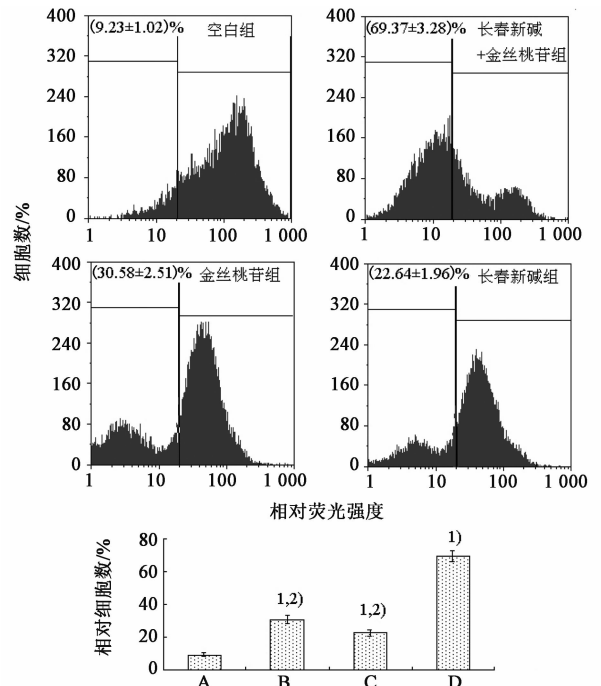


图 4 长春新碱与金丝桃苷单独及联用对 HCT8/VCR 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effects of vincristine or its combination with hyperin on mitochondrial membrane potential ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

9.94 mg·L⁻¹, 逆转倍数为 6.63。说明金丝桃苷能逆转结肠癌 HCT8/VCR 细胞对长春新碱的耐药。

肿瘤细胞多药耐药机制十分复杂,其中抗凋亡机制也起重要的作用^[12],Caspase 是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶,Caspase-9 是细胞凋亡信号转导上游的一个 Caspase。激活的 Caspase-9 可以激活细胞凋亡的关键酶 Caspase-3,从而促进后续的细胞凋亡信号^[13-14]。从结果可看出,与单独用长春新碱组比较,长春新碱与金丝桃苷联合用药组细胞凋亡率,Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性都有所提高。提示金丝桃苷增敏长春新碱诱导凋亡过程中,Caspase 活性增加是非常重要的促进凋亡的因素。

由于细胞发生凋亡时线粒体会发生功能性的变化^[15],表现为膜电位的下降,使得进入线粒体内的罗丹明 123 染料减少,因此通过流式细胞仪所检测到的荧光变弱。实验中使用荧光染料检测了 HCT8/VCR 细胞线粒体膜电位的变化,结果显示,与单独用长春新碱组和金丝桃苷组比较,长春新碱与金丝桃苷联合用药组低荧光强度相对细胞数所占比率明显提高。提示长春新碱联合金丝桃苷可能通过降低线粒体膜电位引起 HCT8/VCR 细胞功能障碍。

综上,金丝桃苷可通过恢复耐长春新碱结肠癌细胞的凋亡敏感性从而达到耐药逆转作用,其逆转机制可能是通过提高 Caspase 蛋白活性,降低线粒体膜电位。提示金丝桃苷具有作为肿瘤耐药逆转剂的潜力,这对于应用中药防止和降低化疗多药耐药的发生,提高临床化疗疗效具有重要意义。此外,金丝桃苷耐药逆转作用是否存在其他机制将在后续研究中进一步探讨。

[参考文献]

[1] Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8):1397-1407.

[2] 肖海娟,许建华,孙珏,等. 中医药逆转肿瘤多药耐药机制研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(6):108-110.

[3] 李艳,曹学丽,付鹏,等. 贯叶金丝桃活性成分及其分离纯化与检测方法的研究进展[J]. *药学进展*, 2008, 32(1):15-20.

[4] 张园园,陈晓辉,金哲史,等. 普通鹿蹄草的化学成分研究 II [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(1):96-98.

[5] 杨志欣,孟永海,王秋红,等. 吴茱萸苦味拆分组分物质基础研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(21):74-77.

[6] 艾国,黄正明,王德文,等. 金丝桃苷对 Wistar 大鼠重复灌胃给药的毒性研究[J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(23):2811-2816.

[7] 林萍,易宏伟,张斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. *中国现代中药*, 2012, 14(10):23-26.

[8] 韩军,宣佳利,胡浩然,等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(1):118-123.

[9] 王丽敏,李爽,张明远,等. 金丝桃苷对人结肠癌 HCT8 细胞生长周期、细胞凋亡及对 caspase 蛋白活性的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(12):3010-3011.

[10] 王丽敏,贾洪岩,张明远,等. 金丝桃苷对小鼠 S180 肿瘤细胞获得性多药耐药相关因子表达的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(6):478-480.

[11] 王开雷,李乐平,靖昌庆. 大肠癌多药耐药逆转的研究进展[J]. *中国现代普通外科进展*, 2010, 13(4):306-310.

[12] Mansilla S, Bataller M, Portugal J. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6(6):589-602.

[13] Nunez G, Benedict M A, Hu Y, et al. Caspases; the proteases of the apoptotic pathway[J]. *Oncogene*, 1998, 17(25):3237-3245.

[14] Kumar S. Caspase function in programmed cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(1):32-43.

[15] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. *Toxicol Lett*, 2004, 149(149):19-23.

[责任编辑 张丰丰]