

二脱甲氧基姜黄素与阿霉素联合应用 对 HL-60/ADR 的生长抑制作用

陈琳, 黄晶晶, 杨仙, 鲁光耀, 刘彩霞, 徐正虹, 黄燕芬*
(浙江中医药大学生命科学学院, 杭州 310053)

[摘要] 目的:研究二脱甲氧基姜黄素(Bdmc)与阿霉素(ADR)联合应用对人白血病多药耐药细胞株(HL-60/ADR)的生长抑制作用。方法:HL-60/ADR细胞 2×10^3 /孔,1,2,4,8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bdmc分别与0.4,0.8,1.6,3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADR同时联合给药,48 h后,MTT法测定两种药物的体外杀伤作用。6,12,24,48 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bdmc分别与0.08,0.2,0.4,1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADR序贯联合给药,48 h后,应用金氏公式进行序贯联合用药效果分析。结果:单独 ADR 0.4,0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制率6.9%,11.8%,同时联合加8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bdmc时,抑制率达到94%以上。1~8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bdmc和0.8~3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADR同时联合作用 HL-60/ADR 细胞可产生单纯相加至增强的协同杀伤效果。序贯给药法中,先给 Bdmc 后给 SDR 结果为协同作用,先给 ADR 后给 Bdmc 实验结果为拮抗作用。结论:Bdmc 与 ADR 同时用药可产生协同作用,二者序贯联合用药仅产生单向协同作用。

[关键词] 白血病; 抗药性; 阿霉素; 二脱甲氧基姜黄素; HL-60/ADR 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0116-04

[doi] 10.11653/syfj2014020116

[收稿日期] 20130604(019)

[基金项目] 浙江省中医药科技计划(2011ZB026);2012年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201210344005);浙江省大学生科技创新项目暨新苗人才计划(2012R410014)

[第一作者] 陈琳,初级检验技师,从事中西医结合基础研究工作,Tel:0571-86613666,E-mail:Chenshuling108@163.com

[通讯作者] *黄燕芬,硕士,副教授,从事中药成分的分离与中药药理研究工作,Tel:0571-86633051,E-mail:hyf3797@126.com

- [4] Kageyama S, Kurokawa M, Shiraki K. Extract of *Prunella vulgaris* spikes inhibits HIV replication at reversetranscription *in vitro* and can be absorbed from intestine *in vivo* [J]. *Antiviral Chem Chemother*, 2000, 11(2):157.
- [5] 徐中伟,周荣耀,王文海,等. 夏枯草注射液对胸膜纤维化形成的机理研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2001, 15(2):49.
- [6] 孙红,袁秉祥,刘波,等. 4种夏枯草提取物对家兔离体胸主动脉的作用[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2005, 26(1):19.
- [7] 孙旭丽,周大兴,陆晓波,等. 夏枯草醇提取物对大鼠离体胸主动脉条件收缩作用的影响[J]. *江西中医学院学报*, 2007, 19(6):69.
- [8] 向德标,刘敏. 夏枯草水提取物对离体蛙心收缩功能的影响[J]. *安徽农业科技*, 2011, 39(2):778.
- [9] 梁健钦,熊万娜,罗远. 夏枯草提取物对大鼠自发性高血压降压作用研究[J]. *中药材*, 2011, 1:99.
- [10] 盛丽,高农,张晓非. 19味中药对淋球菌流行株的敏感性研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2003, 10(4):48.
- [11] Xu H X, Lee S H, Lee S F, et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris* [J]. *Antiviral Res*, 1999, 44(1):43.
- [12] 杨坤,郭昆全,吴海燕,等. 夏枯草口服液在甲状腺功能亢进症患者中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(16):1706.
- [13] 刘敬顺. 夏枯草药理作用实验研究简况[J]. *山西中医*, 2002, 18(2):52.

[责任编辑 聂淑琴]

Inhibitory Effect of Combined Administration of Bisdemethoxy curcumin and Adriamycin on HL-60/ADR Cells

CHEN Lin, HUANG Jing-jing, YANG Xian, LU Guang-yao, LIU Cai-xia, XU Zheng-hong, HUANG Yan-fen*
(Life Science Department, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of combined administration bisdemethoxy curcumin (Bdmc) and adriamycin (ADR) on multidrug resistance HL-60/ADR cells. **Method:** HL-60/ADR cells were simultaneously treated with Bdmc within concentrations (1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and ADR (0.4, 0.8, 1.6, 3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 48 h respectively, the cell density was $2 \times 10^4/\text{hole}$. The inhibitory effect of both drugs on HL-60/ADR cells *in vitro* was evaluated by MTT. Cells were treated sequentially administration Bdmc (6, 12, 24, 48 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and ADR (0.08, 0.2, 0.4, 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The Jin's formula was used to analyze the the inhibitory effect. **Result:** The inhibition is 6.9%, 11.8% when treated only with ADR (0.4, 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), while simultaneously treated with Bdmc (8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) it was over 94%. In simultaneous administration Bdmc (1-8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) combined with ADR (0.8-3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) revealed a simple addition or potentiation effect. In addition, sequential administration of Bdmc followed by ADR had a synergistic effect; in contrast, sequential administration of ADR followed by Bdmc exhibited an antagonistic effect. **Conclusion:** Simultaneous administration of Bdmc and ADR reveals a synergistic effect and sequential administration of Bdmc and ADR exhibits an unidirectional synergistic effect.

[Key words] leukaemia; drug resistance; adriamycin; Bdmc; HL-60/ADR cells

肿瘤细胞产生多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是肿瘤化疗失败的重要原因。阿霉素 (adriamycin, ADR) 在临床上对治疗白血病有良好疗效,但它对心脏和造血系统毒性及白血病细胞易产生 MDR 限制了其临床疗效的提高。联合用药是目前研究抗肿瘤的一个热点,是减缓肿瘤耐药的主要策略之一。

姜黄具有抗肿瘤等多种重要的药理作用,其主要有效成分为姜黄素、脱甲氧基姜黄素和二脱甲氧基姜黄素 (Bdmc)^[1]。有文献报道姜黄素能抵抗阿霉素对正常组织的毒性,长期应用无明显毒副作用,且联合阿霉素能对 HL-60/ADR 的生长有抑制作用^[2]。本实验在体外联合应用 Bdmc 和 ADR,观察它们对多药耐药株 HL-60/ADR 细胞的生长抑制作用,并评价两种药物之间相互作用的效果,以期找到能够逆转 MDR 的安全有效药物。

1 材料

1.1 试剂和药物 ADR 和 MTT (Sigma 公司), RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司),小牛血清 (杭州四季青生物工程公司)。Bdmc (本实验室制备纯度 92% 以上)。溶剂系统二甲基亚砜 (DMSO)。

1.2 细胞株及培养条件 HL-60/ADR 细胞株为

ADR 诱导 HL-60 细胞建立的多药耐药细胞株,由中国医学科学院血液学研究所提供。在阿霉素 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液中稳定生长。试验前 2 周换用无阿霉素的 RPMI 1640 培养液培养。

1.3 仪器 CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司), 酶标仪 (型号 SERIAL RS-232C)。

2 方法

2.1 检测同时联合用药对肿瘤细胞 HL-60/ADR 的杀伤作用 肿瘤细胞悬液 $2 \times 10^3/\text{孔}$ 接种于 96 孔板,药物组每孔加不同浓度的 ADR 和 Bdmc,阴性对照组加等剂量溶剂,每个浓度重复 6 孔,无细胞孔为对照,置 5% CO₂, 37 °C 培养 48 h 后,观察细胞形态学变化,每孔加 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μL , 37 °C 培养 4 h 后终止培养,离心弃上清液,每孔加 150 μL DMSO,振荡 10 min 使结晶物充分溶解。酶标仪检测 A₅₇₀。

抑制率 = (1 - 药物组 A / 对照组 A) × 100%

2.2 检测序贯联合给药对肿瘤细胞的杀伤作用 采用王磊等的方法^[3]。HL-60/ADR 细胞接种于 6 孔板,每孔加不同浓度二脱甲氧基姜黄素 (A 药物),对照组加等量溶剂,37 °C, 5% CO₂ 培养 24 h 后离心去上清,细胞加培养液 2 mL 制成悬液,接种于

96 孔板,每孔 50 μL 。A 药处理过的细胞再分为 A 药对照组,及 AB 序贯组,A 药对照组加等量溶剂,AB 序贯组加不同浓度阿霉素(B 药液)。对照组细胞以同样方法接种后分为阴性对照组及 B 药对照组,前者加等量溶剂,后者加不同浓度的 B 药。每个浓度重复 6 孔,无细胞孔为空白对照,培养 24 h 后,每孔加 MTT,继续培养 4 h 后终止培养,用酶标仪测 A_{570} 。

2.3 数据分析 评价药物体外合用细胞毒性作用是否有协同作用,参照金氏公式^[4]判断: $Q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$,其中 E_{a+b} 为合并用药抑制率, E_a 和 E_b 分别为 A 药和 B 药的抑制率。式中分子代表“实测合并效应”,分母是“期望合并效应”, Q 是两者之比。 Q 值 0.85 ~ 1.15 为单纯相加(+), $Q > 1.15 \sim 2.0$ 为增强(++), $Q < 0.85 \sim 0.55$ 为拮抗(-), $Q < 0.55$ 为明显拮抗(- -)。

3 结果

3.1 ADR 和/或 Bdmc 对 HL-60/ADR 细胞的细胞毒作用 单独给予 ADR 3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 Bdmc 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 24 h 后,显微镜下可见少量活的 HL-60/ADR 细胞,细胞膜完整,光亮透明,部分细胞质饱满

肿胀,可见细胞碎片以及形态不一的细胞。两药联合作用后,镜下罕见活细胞,可见较多的细胞膨胀坏死。

3.2 Bdmc 与 ADR 同时联合用药的抗肿瘤作用 两药同时合用对 HL-60/ADR 细胞的杀伤呈单纯相加至增强作用(表 1)。从表 1 中还可以看出随着 ADR 浓度增高,两药联用的抗肿瘤作用升高,当 ADR 浓度达到 3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制率达到 56.5% 以上,同时再联合 Bdmc 作用加强。表 1 中 ADR 为 1.6, 3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不加 Bdmc,其抑制率为 48.5%, 56.5%, 加 Bdmc 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,其抑制率均提高到 95% 以上。

3.3 Bdmc \rightarrow ADR 序贯联合用药 培养细胞先加 Bdmc 24 h 后,去除 Bdmc 再加 ADR 24 h,联合效果呈单纯相加至协同效应(表 2),随 ADR 浓度提高,其协同作用逐渐下降。

3.4 ADR \rightarrow Bdmc 序贯联合用药 先加 ADR 24 h 后,去除 ADR 再加 Bdmc 24 h,联合效果呈拮抗或单纯相加作用(表 3),其拮抗作用随 ADR 浓度增高逐渐减弱,随 Bdmc 浓度增高似有所增强。提示 ADR 作用后的细胞对 Bdmc 的敏感性下降。

表 1 二脱甲氧基姜黄素与阿霉素联合给药对 HL-60/ADR 细胞的协同抗肿瘤作用 ($n = 6$)

ADR/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/% (Q 值)				
	Bdmc/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				
	0	1	2	4	8
0.0	0.0	2.10	15.90	31.40	46.80
0.4	6.90	42.80(7.8) ⁺⁺	52.20(0.6)	71.30(0.4)	94.20(0.35)
0.8	11.80	49.80(4.58) ⁺⁺	53.90(0.34)	81.50(0.25)	96.70(0.2)
1.6	48.50	61.50(1.2) ⁺⁺	68.70(0.1)	93.20(0.06)	98.70(0.05)
3.2	56.50	81.70(1.36) ⁺⁺	88.10(0.11)	92.80(0.06)	96.40(0.04)

注: + 表示加强; ++ 表示进一步加强(表 2 ~ 3 同)。

表 2 二脱甲氧基姜黄素、阿霉素序贯给药对 HL-60/ADR 细胞的协同抗肿瘤作用 ($n = 6$)

ADR/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/% (Q 值)				
	Bdmc/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				
	0	6	12	24	48
0.0	0.0	5.90	14.80	30.50	49.80
0.08	0.30	9.10(2.05) ⁺⁺	16.80(1.58) ⁺⁺	34.50(1.59) ⁺⁺	63.20(1.8) ⁺⁺
0.2	1.80	10.40(3.56) ⁺⁺	23.10(2.3) ⁺⁺	47.50(2.1) ⁺⁺	60.20(1.58) ⁺⁺
0.4	6.90	19.20(0.69)	30.10(0.37)	49.40(0.29)	59.80(0.21)
1.0	23.4	39.80(0.37)	42.80(0.14)	56.80(0.09)	61.50(0.06)

4 讨论

姜黄素类化合物来源广泛,价格低廉,无毒副作

用,作为一种新型植物来源的癌化学预防药和抗肿瘤药具有良好的应用前景^[5,6]。

表3 阿霉素、二脱甲氧基姜黄素序贯给药对 HL-60/ADR 细胞的协同抗肿瘤作用($n=6$)

ADR/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/% (Q 值)				
	Bdmc/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	0	6	12	24	48
0.0	0.00	18.50	24.80	39.60	45.80
0.08	0.80	12.90(2.87) ^{††}	17.90(3.11) ^{††}	30.40(3.49) ^{††}	33.70(3.38) ^{††}
0.2	3.50	28.90(0.68)	31.60(0.54)	38.50(0.4)	45.50(0.41)
0.4	10.00	58.60(0.37)	70.50(0.33)	64.50(0.19)	55.40(0.14)
1.0	22.50	64.80(0.17)	72.50(0.14)	71.20(0.09)	52.30(0.09)

当前的肿瘤治疗的很多化疗药物不但有毒副作用,还容易产生耐药性,联合用药是目前研究抗肿瘤的一个热点,杜琴等发现白藜芦醇、姜黄素联合使用可增强对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抗癌作用^[7]。

本研究发现 Bdmc 与 ADR 同时合用对 HL-60/ADR 细胞可产生单纯相加致增强的协同杀伤效果,尤其是 Bdmc 与低浓度 ADR 的协同作用更为显著。在临床应用时,如二药同时合用,既产生显著的协同杀伤效果,又能减少 ADR 的用量,避免其毒副作用。这同王磊等人采用姜黄素进行与 ADR 联合应用对 HL-60/ADR 的生长抑制作用的研究结果一致。

联合用药的方式影响药物的效果,同时能减弱药物的毒性,朱建伟等用序贯法观察肉桂对马钱子的减毒作用^[8]。我们在序贯给药时,先给 Bdmc 后给 ADR 可产生协同作用,其原因可能与 Bdmc 阻断细胞周期转化,而 ADR 亦可阻断细胞周期转化,两者有可能产生序贯协同作用。反之,先给 ADR 后给 Bdmc,则低浓度 ADR 与 Bdmc 可产生序贯拮抗效应;而提高 ADR 浓度,其合并效应也仅为相加。其原因可能是由于 ADR 抑制细胞增殖,使细胞处于非增殖状态,而非增殖期细胞对 Bdmc 较为耐受,因此 ADR 作用后的细胞对 Bdmc 的敏感性下降。

传统的多药耐药(MDR)与肿瘤细胞高表达 P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP) 关系密切^[9-11],笔者下一步将对二脱甲氧基姜黄素对耐药细胞的增敏作用及其机制进一步探讨。

[参考文献]

[1] 王伟章,张碧鱼,陈宏远,等. 姜黄素对人肝癌细胞 Sk-hep-1 抗癌作用的研究[J]. 中国中药杂志,2010, 35(4):485.

[2] 王磊,柯红,王一羽,等. 姜黄素与阿霉素联合应用对人白血病耐药细胞株 HL-60/ADR 的生长抑制影响[J]. 肿瘤,2006,26(12):1078.

[3] 王磊,柯红,王一羽,等. 联合应用阿霉素和姜黄素增强人白血病细胞株 HL-60 对阿霉素的敏感性[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):418.

[4] 戴体俊. 合并用药的定量分析[J]. 中国药理学通报,1998,14(5):479.

[5] 曹宏,刁路明,夏东. 姜黄素与顺铂联合对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡作用[J]. 武汉大学学报:医学版,2008,29(2):213.

[6] 薛研,刘宝瑞,慕利梅. 姜黄素和阿霉素联合应用对于人肝癌细胞 SMMC27721 抑制的研究[J]. 肿瘤研究与临床,2002,12(6):372.

[7] 杜琴,胡兵,沈克平,等. 白藜芦醇联合姜黄素对 SMMC-7721 肝癌细胞作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):262.

[8] 朱建伟,闫雪生,刘瑾. 序贯法观察肉桂对马钱子的减毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):245.

[9] LEE E, LIM S J. The association of increased lung resistance protein expression with acquired etoposide resistance in human H460 lung cancer cell lines[J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(11):1018.

[10] Van Den Heuvel E, Bredius R, Van Der Hol T B, BURNETT A K, et al. CD34 related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patient with acute myeloid leukemia (AML) of older age[J]. Ann Hematol, 2007, 86(5):329.

[11] 马纯政,郑玉玲. 豆根管食通口服液对人食管癌细胞多药耐药基因糖蛋白 P-170 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):237.

[责任编辑 聂淑琴]