

# 苦参碱与粉防己碱逆转人 MCF-7 细胞耐药性的作用与机制

李海燕<sup>1\*</sup>, 陈阳<sup>2</sup>, 何琪杨<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学东直门医院东区, 北京 101100;

2. 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**[摘要]** **目的:**探讨中药有效成分苦参碱与粉防己碱合用能否逆转人乳腺癌 MCF-7 细胞的多药耐药性。**方法:**使用人乳腺癌 MCF-7 和耐多柔比星的 MCF-7/DOX 细胞进行研究。采用 MTT 法检测药物对细胞增殖的影响;流式细胞术检测罗丹明 123 荧光强度的变化;Western blot 方法检测 P-糖蛋白的表达变化。**结果:**苦参碱作用耐药和敏感细胞的 IC<sub>50</sub> 相近,耐药细胞对苦参碱没有明显的交叉耐药性;流式细胞术分析发现苦参碱单独处理 MCF-7/DOX 耐药细胞,可以微弱地降低其耐药性,并且与粉防己碱有协同作用;苦参碱与多柔比星合用,可以增加多柔比星对 MCF-7/DOX 耐药细胞的生长抑制作用,且与粉防己碱有协同作用;苦参碱和粉防己碱、多柔比星合用处理细胞, MCF-7/DOX 耐药细胞株 P-糖蛋白表达水平下降。**结论:**苦参碱与粉防己碱合用具有协同作用,能逆转人乳腺癌 MCF-7 细胞的多药耐药性,降低 P-糖蛋白的表达。

**[关键词]** 多药耐药性; 苦参碱; 粉防己碱; 抗肿瘤作用; 多柔比星

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0275-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013180275

## Mechanism of Combination of Matrine and Tetrandrine for Reversal of Multidrug Resistance of Breast Carcinoma MCF-7 Cells

LI Hai-yan<sup>1\*</sup>, CHEN Yang<sup>2</sup>, HE Qi-yang<sup>2</sup>

(1. East Area Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 101100, China;

2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of combination of matrine and tetrandrine for reversal of multidrug resistance of breast carcinoma MCF-7 cells. **Method:** Human breast carcinoma MCF-7 and doxorubicin-resistant MCF-7/DOX cells were treated with matrine, tetrandrine and doxorubicin. The inhibition of drugs on cell proliferation was detected by MTT assays. The fluorescence intensity of Rho123 was detected by flow cytometry. The expression of P-glycoprotein was examined by Western blot. **Result:** The IC<sub>50</sub> value of matrine toward MCF-7/DOX cell lines was similar to that of MCF-7 cells, indicating that the former has non-cross resistance to matrine. Flow cytometry analysis not only showed matrine reverse multi-drug resistance on MCF-7/DOX, but also has synergy effect with tetrandrine. The cell proliferation inhibition of doxorubicin was obviously increased when the combination of matrine with tetrandrine. Furthermore, reduction of P-glycoprotein expression was detected in MCF-7/DOX cells after exposure to matrine or combination with tetrandrine. **Conclusion:** Matrine has synergy effect with tetrandrine on reversal of multidrug resistance and reduction of P-glycoprotein expression in breast carcinoma MCF-7 cells.

**[Key words]** multidrug resistance; matrine; tetrandrine; antitumor action; doxorubicin

**[收稿日期]** 20130412(118)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273553)

**[通讯作者]** \*李海燕,副主任药师,从事中药药理、临床药理等研究, Tel:13261932375, E-mail:Lhy1643@sina.com

肿瘤的多药耐药性是指细胞对化学结构不同、功能及杀伤机制不同的多种药物都具有耐药的现象,这是肿瘤化疗失败的重要原因之一。其中,以位于细胞膜上外排抗肿瘤药物蛋白的超表达是产生耐药性的主要原因。由于具有外排功能的蛋白已经多达 40 多种,导致针对单一外排蛋白逆转耐药性的药物研发至今还没有成功<sup>[1]</sup>。而中药方剂具有多组分、多靶点作用的特点,已经报道许多有效组分具有逆转多药耐药性的作用。因此,对中药方剂或有效组分的合用研究有可能对逆转耐药性药物的研发带来突破。根据上述的设想,本研究以 2 种单一化学结构的中药组分合用,观察其对耐药细胞的作用并初步阐明其作用机制。

苦参碱(matrine, MAT)为豆科植物苦参等中草药活性成分的提取物,具有抗病毒、降低转氨酶、抗炎、抗纤维化、抑制肿瘤、免疫调节、抗心律失常等多种药理作用,具有多靶点作用的特点<sup>[2]</sup>。以苦参碱为主的复方苦参注射液,具有明显的抗肿瘤、镇痛作用,在晚期癌症患者的临床治疗中应用广泛<sup>[3]</sup>。粉防己碱(tetrandrine, TET),又名汉防己甲素,对逆转肿瘤多药耐药性具有较好的效果。TET 除了对 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达的耐药细胞有作用外,对于另一个外排蛋白 MRP 也有作用<sup>[4]</sup>。鉴于多种药物合用提高疗效是目前肿瘤化疗发展的重点方向,文中以 MAT 与 TET 合用,观察其人乳腺癌 MCF-7 耐药细胞的影响和作用机制,从而为临床应用这些药物和发展新型的治疗药物提供实验依据。

## 1 材料及方法

**1.1 仪器** 细胞培养箱(三洋公司, Japan),相差显微镜(Olympus, Japan),低温离心机(Sigma, USA), DU800 可见-紫外分光光度计(Beckman, USA), Hoefer TE70X 蛋白转膜系统(Hoefer, USA),蛋白垂直电泳仪、ChemImager 5500 凝胶成像仪以及微孔板酶标仪(BIO-RAD, USA), BD FACS Calibur 流式细胞仪(BD bioscience, USA)。

**1.2 试剂、抗体** MAT, TET 购于中国药品生物制品检定所, MAT 用 PBS 配置为  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , TET 用 PBS 配置为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  母液,  $0.2 \mu\text{m}$  无菌滤膜。多柔比星(Doxorubicin, DOX)、噻唑蓝(MTT)、罗丹明 123 (Rhodamine123, Rho123) 以及二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Sigma。鼠抗 P-gp 蛋白抗体(C219) 购自 Calbiochem, 兔抗 actin 抗体购自 Santa Cluz Biotechnology。

**1.3 细胞培养方法** 人乳腺癌 MCF-7 细胞及其耐

药株 MCF-7/DOX 细胞来自美国国立癌症研究院。培养细胞使用的培养基为 1640 (Invitrogen, USA), 使用前加入 10% 胎牛血清(天津灏海生物制品科技有限责任公司), 培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**1.4 MTT 法测定药物对细胞的抑制作用** 取对数生长期细胞, 按  $3 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板, 24 h 后, 用不同浓度的药物处理细胞 72 h, 每个浓度设 3 个平行孔。测定前去除培养液, 每孔加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT  $100 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h 后去除 MTT, 每孔加入  $150 \mu\text{L}$  的 DMSO, 震荡 5 min 混匀, 用酶标仪测定  $570 \text{ nm}$  吸光度(A)。将各测试孔的 A 减去本底 A (完全培养基加 MTT, 无细胞), 根据各平行孔的 A 计算平均数, 计算  $\text{IC}_{50}$ 。实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = (\text{加药细胞 } A - \text{本底 } A) / (\text{对照细胞 } A - \text{本底 } A) \times 100\%$$

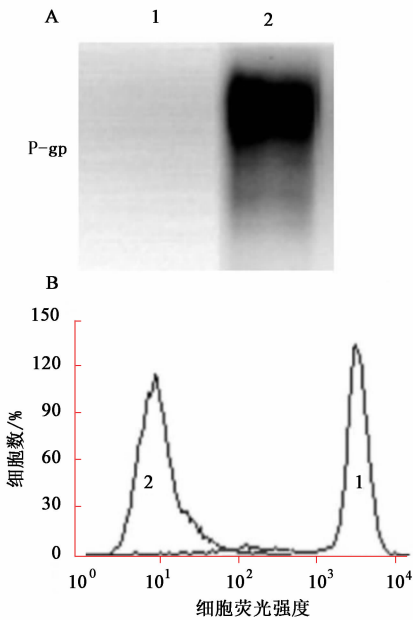
**1.5 细胞内罗丹明 123 的积累变化** 对数生长期的细胞以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 24 h 后加药处理, 同时加入罗丹明 123 终质量浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  继续培养 1 h。PBS 清洗 2 次, 消化收集细胞, 用无血清培养基重新悬浮细胞, 使用流式细胞仪测定罗丹明 123 的荧光强度, 确定肿瘤细胞耐药性的变化。

**1.6 Western blot 实验方法** 收集经处理的细胞, 加入细胞裂解液( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7.5,  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 10% Glycerol,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  glycerophosphate,  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  sodium pyrophosphate,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaF,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.5% Triton X-100, 使用前加入蛋白酶抑制剂 PMSF, Aprotinin 和 Leupeptin, 使其终浓度分别为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 在冰上裂解 30 min, 于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$   $12\ 000 \times g$  离心 5 min, 取上清。测定蛋白浓度, 根据实验需要分装蛋白样品, 加入上样缓冲液( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris·Cl,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油), 沸水浴 5 min。SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 电泳缓冲液( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris,  $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘氨酸, 0.1% SDS), 电泳条件: 积层胶 80 V, 分离胶 160 V。将蛋白转印至 PVDF 膜, 转膜缓冲液( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris,  $192 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘氨酸, 20% 甲醇, pH 8.3)。5% 脱脂奶粉的 PBS-T ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris HCl pH 7.5,  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 0.1% Tween-20) 溶液室温振荡封闭 30 min。一抗过夜。曝光前, 膜上滴加 ECL plus 超敏免疫印迹检测试剂(Millipore, USA), 通过化学发光成像系统捕获图像。

**1.7 统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $IC_{50}$  均为 3 次实验结果的平均值。使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,  $P < 0.05$  为统计学差异有显著性,  $P < 0.01$  为差异极为显著。

## 2 结果

**2.1 MCF-7/DOX 细胞的耐药特征** 经 MTT 法检测人乳腺癌 MCF-7 细胞对 DOX 的  $IC_{50}$  为  $(0.12 \pm 0.23) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而用 DOX 长期 MCF-7 细胞获得的 MCF-7/DOX 耐药细胞, 对 DOX 的  $IC_{50}$  为  $(54 \pm 2.65) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是其亲本的 450 倍, 具有极高的耐药性。Western blot 检测 MCF-7/DOX 的 P-gp 表达明显增加。使用罗丹明 123 对活细胞的耐药性检测, 可以观测到 MCF-7/DOX 中的罗丹明 123 含量明显低于敏感细胞 (图 1)。



1. MCF-7 敏感细胞, 2. MCF-7/DOX 耐药细胞

图 1 耐药细胞的耐药特征

**2.2 MAT 与 TET 对细胞增殖的抑制作用** 使用不同的浓度 MAT 和 TET 分别处理 MCF-7 和 MCF-7/DOX 耐药细胞, MTT 结果显示 MCF-7 对 MAT 的  $IC_{50}$  为  $(1.38 \pm 0.09) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对 TET 的  $IC_{50}$  为  $(17.87 \pm 5.84) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 而 MCF-7/DOX 对 2 种药的  $IC_{50}$  分别为  $(2.02 \pm 0.08) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(26.62 \pm 4.83) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明: MCF-7/DOX 对 MAT, TET 均没有明显的交叉耐药性。

**2.3 MAT 与 TET 抑制耐药细胞外排罗丹明 123 的作用** 由于罗丹明 123 是 P-gp 的底物, 根据活细胞对其的外排作用可判断 P-gp 的功能。用 0.2, 0.5,

$1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  MAT 处理细胞 1 h 后, MCF-7/DOX 对 Rho123 的外排作用分别增强了 20.1%、32.2% 和 48.9%, 说明 MAT 具有一定的逆转 P-gp 蛋白外排底物的作用。用  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TET 与 MAT 合用后, 在 TET 增加 Rho123 外排的基础上, 细胞荧光强度增加了 1.5 倍见图 2。说明 MAT 与 TET 对逆转细胞耐药性具有明显的协同作用。

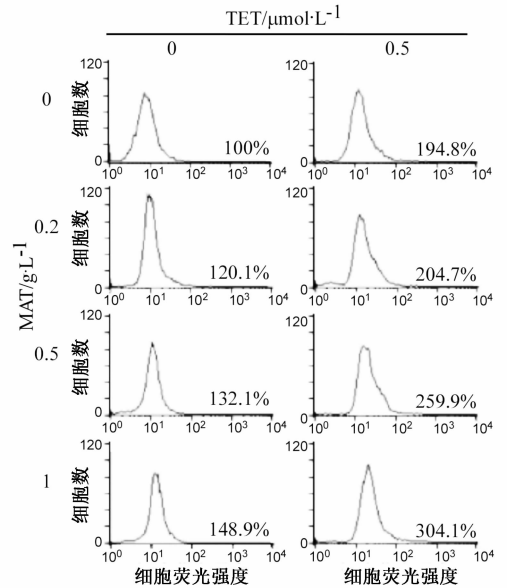


图 2 MAT 和 TET 处理 MCF-7/DOX 耐药细胞后, 对细胞外排罗丹明 123 的影响

**2.4 MAT, TET 与 DOX 合用抑制耐药细胞的增殖作用**  $0.5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  MAT 和  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TET 对 MCF-7/DOX 耐药细胞没有明显的抑制作用 (存活率  $> 90\%$ )。用上述浓度的 MAT 和 TET 分别与  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DOX 合用处理 MCF-7/DOX, 该细胞的存活率从 71.9% 分别降至 38.7% 和 34.2%, 而 3 种药合用后细胞存活率降至 25.4% (图 3)。以上结果说明 MAT 与 DOX 合用后可以增强 DOX 对耐药细胞的抑制作用, 且这一作用与 TET 具有协同作用。值得注意的是, 当用对细胞生长没有明显影响浓度的 MAT 和 TET 两药共同处理细胞后, 细胞生存率同样有所下降 (61.6%), 说明两药对抑制细胞的生长同样具有协同作用。

**2.5 MAT, TET 与 DOX 合用对 P-gp 表达的影响** 与药物合用对 MCF-7/DOX 细胞抑制作用趋势相似, 用 MAT 与 TET 分别与 DOX 合用后 P-gp 表达明显降低, 3 药合用后 P-gp 的含量进一步降低, 见图 4, 说明 MAT 与 TET 的逆转效果在影响 P-gp 蛋白表达也具有协同作用, 这是其逆转耐药性的分子机制。

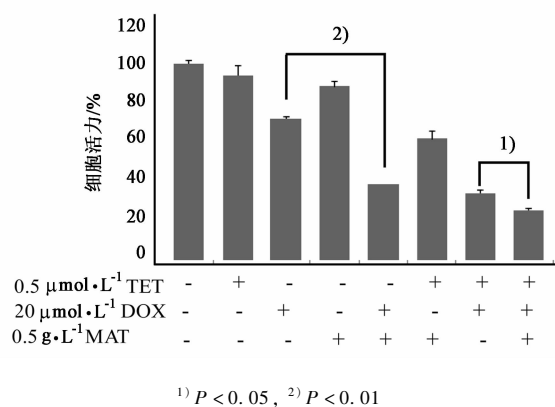


图 3 药物合用对 MCF-7/DOX 耐药细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s$ )

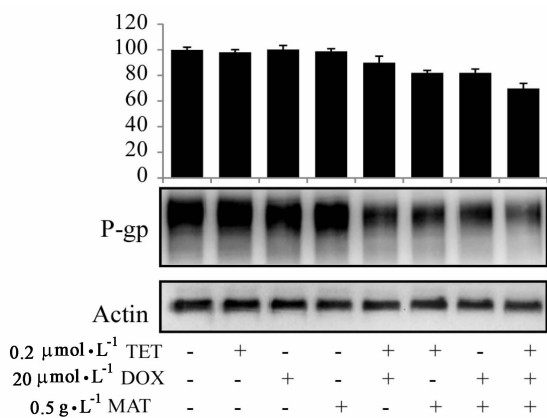


图 4 用 MAT, TET, DOX 合用, MCF-7/DOX 耐药细胞中 P-gp 蛋白的表达变化( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

本研究利用人乳腺癌 MCF-7 和 MCF-7/DOX 多药耐药细胞,证实 MAT 与 TET 合用具有逆转多药耐药性的作用,且 2 药单独使用对 MCF-7/DOX 细胞没有交叉耐药性,合用后具有协同增效作用。对协同作用的机制研究表明:合用能降低 P-gp 的表达。本研究结果为临床相关中药的作用机制和中药研发提供了实验依据。由于 P-gp 是由 *mdr-1* 基因编码产生的跨膜蛋白,通过折叠形成的孔道结构,除了外排多种天然来源的抗肿瘤药物外,还与许多药物在体内的分布和处置有关<sup>[5]</sup>。本文对 2 种中药成分影响 P-gp 表达机制的研究,有助于多种组分被 P-gp 影响的组分深入研究。

近年来, MAT 的抗肿瘤活性受到广泛关注,其对肿瘤细胞的抑制作用是多靶点的,其机制包括抑制肿瘤细胞增殖和诱导分化,抗肿瘤细胞黏附与浸润转移,诱导肿瘤细胞凋亡和自噬,逆转肿瘤细胞的

耐药性以及调节肿瘤宿主免疫功能等<sup>[2]</sup>。而 TET 是天然来源的钙离子通道抑制剂,早期临床被广泛用于高血压、矽肺等疾病的治疗。后来的研究发现具有放射增敏、逆转肿瘤细胞多药耐药性、抗血管生成等抗肿瘤作用。许文林等对 38 例难治性或复发性急性粒细胞白血病患者进行 TET 与抗癌药物的联合治疗,疗效明显<sup>[6]</sup>。与其他逆转药物联合用药,如 TET 联合环孢菌素 A<sup>[7]</sup>,具有明显的协同作用。本研究对该 2 种已经临床使用的中药有效组分的研究,对临床用药也有一定的指导作用。尤其是肿瘤化疗过程中出现耐药性时,可以作为合理用药的理论基础。

目前,国际上发展网络药理学,提出多药点联合作用治疗疾病的新模式<sup>[8]</sup>,符合中药的作用特征。本研究使用 2 种中药有效成分证明其逆转多药耐药性具有协同作用,从一个方面说明中药作用的合理性。鉴于这 2 种中药在临床使用广泛,其合用方式值得深入研究。

### [参考文献]

[1] Gottesman M M, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer; role of ATP-dependent transporters [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1):48.

[2] Chen K G, Sikic B I. Molecular pathways; regulation and therapeutic implications of multidrug resistance[J]. Clin Cancer Res, 2012,18(7):1863.

[3] 刘忠民,徐振萍,寿楠海. 肿瘤多药耐药的中药逆转进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(12):757.

[4] 孙燕. 50 年来我国抗肿瘤药物临床研究的进展 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(18):1695.

[5] 张丽华,陈邦恩,潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展 [J]. 中草药,2009, 40(6):1000.

[6] 彭燕,韩凌,孙静,等. 氧化苦参碱对结肠癌 LoVo 细胞 c-myc, PSMD9, CDK4 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):220.

[7] 马悦,张启伟,王智民,等. 复方苦参注射液研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):342.

[8] 孙付军,聂学斌,李贵海,等. 粉防己逆转获得性多药耐药小鼠 S180 肿瘤细胞 P<sub>170</sub> 过度表达与调控细胞凋亡相关性研究 [J]. 中国中药杂志,2005,30(4):280.

[责任编辑 蔡仲德]