

# 半夏醇提取液逆转多药耐药细胞系 K562/A02 的耐药性

彭向前\*, 冯玮, 张文会  
(聊城大学药学院, 山东 聊城 252059)

**[摘要]** 目的: 观察非细胞毒性浓度(抑制率 $\leq 5\%$ )半夏醇提取液对耐阿霉素的人白血病细胞系 K562/A02 多药耐药性的逆转作用, 并探讨其逆转机制。方法: 将细胞悬液接种于 72 孔培养板中, 细胞数为  $2 \times 10^8$  个/L, 半夏醇提取液(2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 K562/A02 细胞 72 h 后, 采用 MTT 法测定半夏醇提取液的细胞毒性及其对 K562/A02 细胞敏感性的影响, 用流式细胞仪检测非细胞毒性浓度的半夏醇提取液处理后 K562/A02 细胞膜表面糖蛋白 p170 表达的变化与细胞内柔红霉素的浓度, 应用 SPSS 16.0 软件包对实验结果进行统计学处理。结果: 半夏醇提取液对 K562/A02 细胞有一定的细胞毒作用, 其非细胞毒性质量浓度为  $6.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 非细胞毒性浓度半夏醇提取液可显著降低阿霉素对 K562/A02 细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ), 使 K562/A02 细胞的  $\text{IC}_{50}$  由原来的  $(30.9 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  降低至  $(10.1 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其逆转倍数为 3.06 倍; 半夏醇提取液作用于 K562/A02 细胞后, 细胞膜糖蛋白 p170 的表达从 91.21% 下调至 45.12% ( $P < 0.01$ ); 柔红霉素外渗试验显示, 半夏醇提取液作用于 K562/A02 细胞后, 可使细胞内化疗药物的浓度明显增加。结论: 半夏醇提取液可部分逆转多药耐药细胞系 K562/A02 细胞对阿霉素的耐药性, 半夏醇提取液逆转白血病细胞耐药性是通过下调了白血病细胞膜糖蛋白 p170 的表达, 使其将化疗药物泵出细胞外的功能受到了抑制, 从而使化疗药物在白血病细胞内能达到有效浓度, 从而可以杀灭耐药的白血病细胞系。

**[关键词]** 半夏醇提取液; K562/A02 细胞系; 多药耐药

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0157-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1201.013.html>

**[网络出版时间]** 2012-7-11 12:01

## Reversal of Multidrug Resistance in K562/A02 Cell by Alcoholic Extract of *Pinellia ternate*

PENG Xiang-qian\*, FENG Wei, ZHANG Wen-hui

(College of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of alcoholic extract of *Pinellia ternate* at non-cytotoxic concentration (inhibit rate  $\leq 5\%$ ) reversing the multidrug resistant (MDR) leukemia cell lines K562/A02. **Method:** Cells were seeded into 72-well plates at  $2 \times 10^8$ /L with varying concentrations (2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of *P. ternate* for 72 h, MTT colorimetry was used to determine the cytotoxic effect of alcoholic extract of *P. ternate* and the sensibility to adriamycin of K562/A02 cell line. Flow cytometry was used to determine the expressive and functional changes of glycoprotein-170 (p170) on the cell membrane dealt with alcoholic extract of *P. ternate* at non-cytotoxic concentration. And daunorubicin concentration in the cells was detected by flow cytometry. The statistical treatment with SPSS 16.0 was applied to deal with all the experimental data. **Result:** Alcoholic extract of *P. ternate* had definite cytotoxic effect on K562/A02, the non-cytotoxic dose of oxymatrine was  $6.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Non-cytotoxic dose of alcoholic extract of *P. ternate* can significantly decrease the

**[收稿日期]** 20111212(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30771156);山东省自然科学基金项目(2009ZRB01762);山东省高校科技计划项目(J12LM56)

**[通讯作者]** \* 彭向前, 讲师, 医学硕士, 从事临床药理学研究, Tel:0635-8239683, E-mail:pxq8848@126.com

medium inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) value of K562/ADM cell line to adriamycin (ADM). The  $IC_{50}$  was obviously reduced from  $(30.9 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $(10.1 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , alcoholic extract of *P. ternate* at non-cytotoxic concentration could partly reverse MDR of K562/A02 (3.06times), and could descend the expression of p170 from 91.21% to 45.12% ( $P < 0.01$ ). The exosmosis test of daunorubicin showed that intracellular concentration of chemotherapeutics concentration increased evidently. **Conclusion:** Alcoholic extract of *P. ternate* is able to partly reverse MDR of K562/A02 cell line could descend the expression of P170, and can restrain the function of pumping chemotherapeutics out of the cell and enhance the efficient intracellular concentration of chemotherapeutics which can kill leukemia cells of multidrug resistance, and partly reversed MDR of K562/A02.

[**Key words**] alcoholic extract of *Pinellia ternate*; K562/A02 cell line; multidrug resistance

多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是导致白血病化疗失败和不良预后的重要原因,使用逆转剂是克服多药耐药的重要方法。目前发现多种药物(如异搏定、环孢菌素)有逆转 MDR 的作用,但多数逆转剂在体内达到逆转有效浓度时的毒副作用非常明显,因而限制了它们的临床应用<sup>[1-2]</sup>。本实验研究了半夏醇提取液对耐阿霉素的白血病细胞系(K562/A02)多药耐药性的逆转作用,并探讨其逆转 K562/A02 多药耐药性的机制,以期找到一种具有临床价值的逆转剂。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** RPMI 1640(GIBC 公司),阿霉素(Adriamycin, ADM, 意大利法玛西亚普强公司,批号 20060101),四唑盐(MTT, Sigma 公司),二甲基亚砷(DMSO, Sigma 公司),小牛血清(超级新生牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司),柔红霉素(Daunorubicin, DNR, 中国药品生物制品检定所,批号 130559-200501)。试验用干燥的半夏块茎购自安徽省亳州药材市场,并经山东聊城市药品检验所孙明利主任中药师鉴定为天南星科半夏属半夏 *Pinellia ternate*(Thunb.) Breit.。

**1.2 细胞株** K562 敏感细胞系(K562/S)和 K562 多药耐药细胞系(K562/A02)均购自中国医学科学院血液学研究所。

**1.3 仪器** 台式离心机(Sigma 公司),酶标仪(Thermo Electron Corporation),超净工作台(苏净集团安泰公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 SHELLAB 公司),流式细胞仪(Beckman Coulter 公司)电子天平(梅特勒-托利多公司)。

## 2 方法

**2.1 半夏醇提取液的制备** 取干燥的半夏块茎,置 95% 乙醇浸泡 15 d 后,将浸泡液减压浓缩后经无菌薄膜滤器除菌,质量浓度调至  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 6℃ 保存,备用。

**2.2 细胞培养** K562/S 细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,置 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养箱中培养,每 2~3 d 进行换液传代培养。K562/A02 细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,在培养体系中加入质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ADM 维持其耐药性,培养条件同 K562/S 细胞,实验前两周用不含 ADM 的含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。

**2.3 MTT 法检测细胞药敏性** 体外药敏试验采用常规 MTT 法,取对数生长期的 K562/A02 细胞离心弃上清,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞数为  $2 \times 10^8$  个/L,将细胞悬液接种于 72 孔培养板中,200 μL/孔。以 K562/A02 加半夏醇提取液(质量浓度分别为 2.5, 5, 10, 20, 40 μg·L<sup>-1</sup>)为实验组,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 代替半夏醇提取液为对照组,以 K562/S 加 10% 小牛血清的 RPMI 1640 作阴性对照。各组均设 3 个平行实验。置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 72 h 后,加入 MTT 20 μL( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),继续培养 4 h,离心弃上清液,每孔加入 DMSO 200 μL,避光置振荡器上振荡 5 min,用酶标仪测定 570 nm 波长的吸光度(A)。按照公式计算抑制率(inhibit rate)。抑制率 =  $(1 - \text{实验组平均 } A / \text{对照组平均 } A) \times 100\%$ 。确定抑制率 ≤ 5% 的药物浓度为半夏醇提取液的非细胞毒性浓度。

**2.4 药物耐药性逆转** 取对数生长期的 K562/A02 细胞离心弃上清液,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞数为  $2 \times 10^8$  个/L,将细胞悬液接种于 72 孔培养板中,200 μL/孔。加入 5 种质量倍增的 ADM( $1.5, 3, 6, 12, 24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。实验分组:①K562/A02, ②K562/A02 + 非细胞毒性浓度的半夏醇提取液, ③K562/A02 + 异搏定( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。按照 2.3 项 MTT 法分别计算 K562/A02, K562/S 细胞的 ADM  $IC_{50}$ , 并求出逆转倍数。计算公式为:

逆转倍数 = 不加逆转剂的 IC<sub>50</sub>/加逆转剂的 IC<sub>50</sub>

**2.5 细胞膜糖蛋白 p170 检测** 取对数生长期的 K562/A02 细胞和 K562/S 细胞分别离心弃上清,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞数为  $2 \times 10^8$  个/L,将细胞悬液接种于 72 孔培养板中,200  $\mu\text{L}$ /孔。实验加入非细胞毒性浓度的半夏醇提取液工作液(100  $\mu\text{L}$ /孔),用异搏定(10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )作为阳性对照,同时取对数生长期的 K562/A02 细胞和 K562/S 细胞不加逆转剂作为阴性对照,置 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ ,饱和湿度培养箱中培养 96 h,以 1% 多聚甲醛室温固定终止培养的细胞,再加入藻红蛋白标记的 p170 单抗避光作用 30 min,用流式细胞仪分析  $1 \times 10^4$  个细胞的平均荧光强度,采用 CellQuest 软件进行结果分析。各组均设 3 个平行实验。

**2.6 流式细胞仪测定细胞内柔红霉素浓度** 取对数生长期细胞调整细胞浓度为  $2 \times 10^8$  个/L,将细胞悬液接种于 72 孔培养板,200  $\mu\text{L}$ /孔。实验分组:①正常培养 K562/A02 细胞为阴性对照孔;②只加 DNR 孔;③非细胞毒性浓度的半夏醇提取液加 DNR 孔;④异搏定(10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )为阳性对照;DNR 的质量浓度为 10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。置 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养 60 min,离心弃上清液,用 4  $^{\circ}\text{C}$  磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,冰水浴中用 50  $\mu\text{L}$  4  $^{\circ}\text{C}$  PBS 重悬细胞,用流式细胞仪分析  $1 \times 10^4$  个细胞的平均荧光强度,采用 CellQuest 软件进行结果分析。各组均设 3 个平行实验。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 软件包处理,本实验所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验或单因素方差分析。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 半夏醇提取液对 K562/S 细胞和 K562/A02 细胞的细胞毒性** 半夏醇提取液对 K562/S 细胞和 K562/A02 细胞均有抑制作用,随着浓度增加而增大,呈剂量依赖性。半夏醇提取液对 K562/S 细胞的非细胞毒性剂量(抑制率  $\leq 5\%$ )为 6.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;低细胞毒性剂量(抑制率 10% ~ 15%)为 13.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,本实验采用非细胞毒性剂量的半夏醇提取液为最佳逆转浓度。半夏醇提取液对 K562/S 和 K562/A02 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 96.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和 109  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,两者差异没有统计学意义,提示 K562/A02 细胞对半夏醇提取液不具有耐药性。

**3.2 半夏醇提取液对 K562/A02 细胞耐药性的逆转作用** 单用 ADM 作用于 K562/A02 和 K562/S 细

胞的 IC<sub>50</sub> 分别为  $(30.9 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $(1.24 \pm 0.06) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其耐药倍数约为 25 倍。半夏醇提取液对 K562/A02 细胞的逆转倍数见表 1。加入半夏醇提取液(6.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )后,其 IC<sub>50</sub> 平均为 10.1  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,较单用 ADM 组有显著性差异( $P < 0.05$ ),逆转倍数(RF)为 3.06 倍;而加入 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  异搏定后的 IC<sub>50</sub> 平均为 2.4  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与单用 ADM 和加入半夏醇提取液均有显著性差异( $P < 0.05$ )。

表 1 半夏醇提取液对 K562/A02 细胞耐药性的逆转( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

药物分组	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RF
ADM	30.9 $\pm$ 0.11	-
ADM + 半夏醇提取液	10.1 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>	3.06
ADM + 异搏定(VPL)	2.4 $\pm$ 0.12 <sup>1,2)</sup>	12.87

注:与 ADM 组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与半夏醇提取液组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.3 半夏醇提取液对 K562/A02 细胞膜糖蛋白 p170 表达的影响** CellQuest 软件分析发现 K562/A02 细胞在未加半夏醇提取液前其细胞表面糖蛋白 p170 的表达率达到了 91.21%,在加了非细胞毒性剂量的半夏醇提取液后,细胞膜糖蛋白 p170 蛋白表达率随半夏醇提取液作用时间的增长呈现下降趋势,半夏醇提取液作用 96 h 后,细胞膜糖蛋白 p170 蛋白表达率下调至 45.12%,统计学处理有显著性差异( $P < 0.01$ )。表明半夏醇提取液对下调细胞膜糖蛋白 p170 的表达作用非常明显。

**3.4 半夏醇提取液对 K562/A02 细胞内柔红霉素(DNR)蓄积量的影响** 如表 2 所示,作为阴性对照的正常培养的 K562/A02 细胞几乎没有荧光强度的产生,加入 DNR 的 K562/A02 细胞,细胞内有荧光出现,提示有 DNR 在细胞内蓄积;而分别加入非细胞毒性浓度的半夏醇提取液和异搏定后,耐药细胞内 DNR 的蓄积量明显增加,与单用 DNR 组相比有统计学显著性差异( $P < 0.05$ ),异搏定作用于耐药细胞后其 DNR 的蓄积也高于半夏醇提取液( $P < 0.05$ )。

表 2 半夏醇提取液对 K562/A02 细胞内 DNR 蓄积量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

药物分组	细胞内平均荧光强度
K562/A02	1.02 $\pm$ 0.12
K562/A02 + DNR	102.39 $\pm$ 1.02
K562/A02 + DNR + 半夏醇提取液	225.13 $\pm$ 1.01 <sup>1)</sup>
K562/A02 + DNR + 异搏定(VPL)	305.98 $\pm$ 1.22 <sup>1,2)</sup>

注:与单用 DNR 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与半夏醇提取液组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 为天南星科半夏属多年生宿根草本植物, 以块茎入药, 其干燥块茎为常用中药材之一, 有燥湿化痰、降逆止呕等功能<sup>[3]</sup>。近年来国内对半夏的研究已表明半夏具有确切的抗肿瘤作用<sup>[4-9]</sup>。笔者未见关于半夏醇提取液对耐阿霉素的人白血病细胞系 K562/A02 多药耐药性的逆转作用的研究。通过细胞药敏试验发现, 半夏醇提取液能明显抑制 K562/S 和 K562/A02 细胞的生长, 并且 IC<sub>50</sub> 接近, 提示半夏醇提取液是有效的抗肿瘤药, 且 K562/A02 细胞对其不具耐药性; 半夏醇提取液无论对 K562/S 还是对 K562/A02 细胞均有一定的细胞毒性作用, 这种细胞毒性作用呈剂量依赖性, 采用非细胞毒性浓度的半夏醇提取液进行体外研究, 发现半夏醇提取液能部分逆转对阿霉素的耐药性, 其逆转倍数为 3.06 倍。结果表明半夏醇提取液能部分逆转 K562/A02 细胞对 ADM 的耐药性, 提高 K562/A02 细胞对 ADM 的敏感性, 从而初步证明了半夏醇提取液是一种治疗白血病的药物, 同时又是一种耐药逆转剂。呕吐是白血病患者化疗时的主要副反应, 化疗引起的呕吐是病人恐惧化疗的主要因素<sup>[10]</sup>, 而半夏具有降逆止呕的功能, 在白血病联合化疗时, 半夏醇提取液还能显著减轻患者的呕吐。

由多药耐药基因 1 (Mdr-1) 及其编码产物细胞膜糖蛋白 p170 在肿瘤细胞表面的过度表达被认为是介导 MDR 最经典的机制<sup>[11]</sup>。为了进一步观察半夏醇提取液的逆转机制, 运用流式细胞仪对细胞膜糖蛋白 p170 及其功能进行了研究, 经非细胞毒性浓度的半夏醇提取物处理 96 h 后的 K562/A02 细胞膜糖蛋白 p170 的表达率显著下降, 通过 DNR 外渗试验观察显示, 半夏醇提取液作用后, DNR 在白血病细胞内的浓度明显增加。综合以上结果, 我们认为半夏醇提取液逆转 K562/A02 细胞耐药性是通过下调了白血病细胞膜糖蛋白 p170 的表达, 使其将化疗药物泵出细胞外的功能受到了抑制, 从而使化疗药物在白血病细胞内能达到有效浓度, 从而可以杀灭耐药的白血病细胞。本研究实验结果表明半夏醇提

取液在体外可以达到很好的逆转效果, 为临床应用提供了实验基础, 但白血病耐药机制复杂<sup>[12]</sup>, 还需进一步实验探讨其他耐药机制 (如 GST $\pi$  耐药途径), 以便从多方面、多角度、多靶点入手, 在蛋白质及分子水平阐释其作用机制。

#### [参考文献]

- [1] Hme S, Rein D T, Rifflmann M, et al. Anticancer drugs induce mdrl gene expression in recurrent ovarian cancer [J]. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(9):1041.
- [2] 彭向前, 张文会, 李军. 氧化苦参碱逆转多药耐药细胞系 K562/A02 耐药性的研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(19):1127.
- [3] 彭向前, 张文会. 半夏的分生组织培养与快速繁殖技术研究 [J]. *井冈山大学学报*, 2011, 32(2):46.
- [4] 郑国灿. 半夏提取液的抗肿瘤性研究 [J]. *四川中医*, 2004, 22(9):9.
- [5] 付芸, 黄必胜, 李娟, 等. 半夏蛋白抗肿瘤活性组分的提取分离 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(1):45.
- [6] 李娟, 陈科力, 黄必胜, 等. 半夏类药材提取物抗 HeLa 细胞活性研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(2):146.
- [7] 陈芳, 唐瑛, 文晔, 等. 半夏生物碱对人肝癌 Bel-7402 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(10):83.
- [8] 张慈安, 武峰, 毛竹君, 等. 姜半夏乙醇提取物对人胃癌 SGC7901 细胞内 pH 值的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2011, 9(8):894.
- [9] 周成惠, 李春雪, 张镓小, 等. HPLC 测定不同产地掌叶半夏中腺苷的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(3):77.
- [10] 马俊杰. 衣霉素在促进 K562-A02 耐药细胞株凋亡中作用的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [11] 谢长生, 周维顺, 冯正权, 等. 复方三根制剂对 MDR 细胞株 K562/ADR 和 K562/VCR 逆转作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2003, 9(4):26.
- [12] 邓守恒, 李芳, 李林均, 等. 硒化壳聚糖对慢性粒细胞白血病 K562 细胞 bcr/abl 融合基因表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(1):106.

[责任编辑 聂淑琴]