

解毒化痰药含药血清对白血病 HL60/ADR 耐药细胞 NF- κ B 信号靶向干预研究

马武开*, 姚血明, 王莹, 黄颖, 黄礼明
(贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 550003)

[摘要] 目的: 探讨解毒化痰药含药血清对白血病 HL60/ADR 细胞核周因子 κ B(NF- κ B)信号基因表达的影响。方法: 将 HL60/ADR 耐药细胞分为牛血清组、兔血清组、含药血清高、中、低剂量处理组和干扰素对照组,用 Western blot 法检测各组细胞 NF- κ B/p65, NF- κ B/p50, I κ B α 的表达情况。结果: 流式细胞仪检测结果显示非细胞毒作用的解毒化痰药血清能够增加 HL60/ADR 细胞内柔红霉素的浓度。HL60/ADR 耐药细胞 NF- κ B 信号基因呈高表达,HL60 敏感细胞未见表达,加用不同浓度解毒化痰含药血清处理后,p65,p50 和 I κ B α 的表达均有不同程度下降,以高、中剂量组对 p65 的下调作用更明显。结论:解毒化痰药对 HL60/ADR 细胞的耐药逆转作用是通过阻断 NF- κ B 信号通路实现的。

[关键词] 白血病;多药耐药;HL60/ADR 细胞;NF- κ B 信号;解毒化痰药

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0154-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110721.1732.002 **[网络出版时间]** 2011-07-21 17:32

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110721.1732.002.html>

Influence of Drug-containing Serum Prepared for Jiedu Huayu Medicine on Expression of NF- κ B Pathway in Leukemia HL60/ADR Cell

MA Wu-kai*, YAO Xue-ming, WANG Ying, HUANG Ying, HUANG Li-ming

(The Second Affiliated Hospital, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of drug-containing serum prepared for Chinese herbal medicine of Jiedu Huayu on the expression of nuclearfactor- κ ppaB (NF- κ B) of leukemia HL60/ADR cell. **Method:** Western blot was applied for examination the expression of NF- κ B/p65, NF- κ B/p50, I κ B α after HL60/ADR cell receiving the treatment of herbal serum of Jiedu Huayu. **Result:** The expression of NF- κ B/p65, NF- κ B/p50, I κ B α after HL60/ADR cell was decreased by herbal serum of Jiedu Huayu. **Conclusion:** Jiedu Huayu Chinese herbal serum can reverse multidrug resistance in leukemia cell by blocking the expression of NF- κ B pathway in leukemia HL60/ADR cell.

[Key words] leukemia; multi-drug resistance; HL60/ADR cell; NF- κ B pathway; Chinese herbal medicine of Jiedu Huayu

NF- κ B 信号与肿瘤细胞的发生、增殖、分化、凋亡及耐药有密切关系,是多药耐药(MDR)信号转导

途径中的主要信号分子,在白血病细胞表达与耐药有关的因素中可能起关键的调控作用。在前期的临床研究中我们应用解毒化痰中药治疗难治/复发白血病,取得较好临床疗效^[1]。本研究采用血清药理学方法和分子生物学技术研究解毒化痰药含药血清对人白血病耐药细胞系 HL60/ADR 细胞 NF- κ B 信号的影响,探讨解毒化痰药对 HL60/ADR 耐药逆转机制。

[收稿日期] 20101228(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860353),贵州省高层次人才科研特助项目

[通讯作者] *马武开,教授,博士,主要从事中西医结合血液病的临床、教学和科研工作,Tel:13608553702, E-mail:walker55@163.com

1 材料

1.1 细胞株 HL60 细胞和 HL60/ADR, 购自中国医学科学院血液学研究所。

1.2 动物 新西兰大白兔 10 只, 购自贵阳中医学院动物实验中心, 普通级, 合格证号 20090013。

1.3 解毒化癥方水煎浓缩剂的制备 解毒化癥方(药物由青黛 10 g, 山慈姑 15 g, 蚤休 10 g, 虎杖 15 g, 莪术 15 g, 川芎 10 g, 丹参 20 g, 补骨脂 10 g 等组成) 饮片置煎煮容器内, 加相当于药材量 5~8 倍的冷水浸泡 1~2 h, 煮沸 30 min 过滤, 浓缩成每 1 mL 含生药 1 g 的药液, 冷却后装入无菌药瓶, 置 4 °C 冰箱备用。

1.4 试剂和仪器 RPMI 1640 培养粉(美国 GIBCO, 批号 1313945), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 060915), MTT 粉(北京天港邦定生物医学科技有限公司, 批号 20070501)。超净工作台(中国苏州), NAPCO CO₂ 培养箱(美国), BIO-TEX 通用酶标仪(美国), 紫外-可见分光光度计(日本岛津), GE Healthcare 凝胶成像分析系统(美国)、电泳仪(江苏常州无线电元件四厂), LY70 倒置显微镜(日本 Olympus)。

2 方法

2.1 含药血清的制备^[2] 兔 ig 解毒化癥方水煎液(按生药 12 g·kg⁻¹ ig, 相当于正常成人用量的 2 倍), 每日 1 次, 连续 3 d, 于末次给药后 2 h 无菌条件下心脏取血, 分离血清, 组内血清混合, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 置 -20 °C 保存备用。正常兔血清制备: 灌药前 1 d 取兔血, 分离血清。

2.2 细胞培养 将 HL60 细胞和 HL60/ADR 接种于 25 mL 培养瓶, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下无菌培养, 2~3 d 传代 1 次。

2.3 解毒化癥药含药血清的细胞毒作用 将白血病 HL60 及 HL60/ADR 细胞悬液 1×10⁶/mL 加入 96 孔板中, 每孔 100 μL, 适应性的培养 12 h 后, 实验组用各浓度含药血清培养[共 10 个浓度: 将制备的解毒化癥含药血清(1 g·L⁻¹)用 10% 小牛血清稀释为 10 个不同质量浓度的药物血清, 即 1(1:0.02), 2(1:0.04), 3(1:0.06), 4(1:0.08), 5(1:0.1), 6(1:0.2), 7(1:0.4), 8(1:0.6), 9(1:0.8), 10(1:1), 分别加入 HL60/ADR 细胞, 每个浓度设 3 个复孔]。以不含药正常培养的 HL60 和 HL60/ADR 细胞为对

照组, 另外设调零孔, 最终每孔为 200 μL。37 °C, 5% CO₂ 孵育 48 h, 每孔加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 磷酸缓冲液 20 μL, 在同样条件下继续培养 4 h, 离心(1 000 r·min⁻¹, 5 min), 弃上清, 每孔加 DMSO 150 μL, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 用波长为 540 nm 酶标仪检测吸光度(A), 计算各组细胞毒性。并根据回归方程求出半数抑制浓度(IC₅₀)和耐药细胞的耐药倍数。

$$\text{细胞生长抑制率} = [1 - (\text{实验组 } A - \text{调零孔 } A) / (\text{对照组 } A - \text{调零孔 } A)] \times 100\%$$

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

2.4 测定细胞内柔红霉素的浓度 取处于对数生长期的 HL60, HL60/ADR 细胞, 用预冷的 PBS 液洗涤 3 次, 用 10% 牛血清的 RPMI1640 培养液制成 1×10⁶/mL 细胞悬液接种于 24 孔培养板中, 适应性培养 6 h 后, 分别加入低、中、高剂量中药血清 200 μL; 西药对照组加入 α-干扰素(终浓度 500 U·mL⁻¹); 空白对照组和兔血清组分别加入等量 10% 胎牛血清及等量兔血清, 孵育 15 min 后, 加入 10 mg·L⁻¹ 的 DNR, 每孔终体积为 2 mL, 置 37 °C, 5% CO₂ 浓度培养箱培养 90 min, 离心去上清, 用 PBS 液洗涤 2 次, 去除游离的 DNR, 用流式细胞仪(FCM)检测细胞内荧光强度。

2.5 解毒化癥药含药血清对 HL60/ADR 细胞 NF- κ B 信号的影响 采用 Western blot 法检测经解毒化癥含药血清处理后 HL60/ADR 耐药细胞株 NF- κ B/p65, NF- κ B/p50, I κ B α 的表达, 并设 HL60 敏感细胞作为对照。将预冷至 4 °C 的裂解缓冲液加入经 PBS 漂洗 HL60/ADR, HL60 细胞中, 冰上作用 30 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后, 取上清液保存于 -20 °C; 蛋白变性后上样, SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 通过电转移法将蛋白质转移至固相载体 PVDF 膜上, 在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭, 加入一抗(兔抗人 NF- κ B/p65 及 NF- κ B/p50 单克隆抗体, 兔抗人 I κ B α 多克隆抗体反应, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 稀释度为 1:10 000, 37 °C 作用 40 min, 增强型底物化学发光法(ECL), 暗室曝光, 观察结果。

2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计, 两两比较采用方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞毒作用 结果显示含药血清对 HL60/

ADR 细胞的生长抑制作用呈浓度依赖性, 剂量越大, 抑制作用越强(表 1), 当含药血清 $>0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 HL60/ADR 细胞有生长抑制作用, 并呈浓度依赖性。

表 1 不同浓度解毒化痰药血清对 HL60/ADR 细胞生长抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
1	0.02	0.004 ± 0.002	0.163 ± 0.007
2	0.04	0.020 ± 0.011	0.158 ± 0.036
3	0.06	0.026 ± 0.015	0.080 ± 0.047
4	0.08	0.058 ± 0.034	0.038 ± 0.106
5	0.1	0.006 ± 0.004	0.033 ± 0.012
6	0.2	0.027 ± 0.015	0.062 ± 0.048
7	0.4	0.173 ± 0.042	0.116 ± 0.132
8	0.6	0.335 ± 0.020	0.247 ± 0.063
9	0.8	0.471 ± 0.027	0.563 ± 0.085
10	1.0	0.822 ± 0.123	0.829 ± 0.040

表 2 解毒化痰药含药血清对 HL60/ADR 细胞 NF- κ B 信号表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	p65/ β -actin	p50/ β -actin	IKBa/ β -actin
HL60 细胞	-	0.233 ± 0.093	0.273 ± 0.060	0.230 ± 0.348
空白牛血清	-	1.177 ± 0.110	1.357 ± 0.006	1.203 ± 0.176
空白兔血清	-	1.120 ± 0.118	1.247 ± 0.006	1.200 ± 0.010
干扰素 ⁵⁾	500	0.440 ± 0.026 ¹⁾	0.913 ± 0.031 ¹⁾	0.910 ± 0.044 ¹⁾
解毒化痰药血清	0.4	0.533 ± 0.132 ¹⁾	0.880 ± 0.036 ¹⁾	0.940 ± 0.030 ¹⁾
	0.6	0.280 ± 0.020 ¹⁾	0.783 ± 0.050 ²⁾	0.767 ± 0.090 ^{1,3)}
	0.8	0.277 ± 0.025 ^{1,2)}	0.730 ± 0.312 ^{2,3)}	0.707 ± 0.055 ^{1,3)}

注:与牛血清组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与干扰素组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; ⁵⁾ 干扰素浓度单位为 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

NF- κ B 是机体重要的转录因子, 参与多条信号转导通路的调控^[4]。最新研究证实, NF- κ B 信号通路在白血病多药耐药的产生过程中发挥关键作用, 尤其是 NF- κ B 的抗凋亡作用和激活多药耐药基因及其产物 P 糖蛋白(P-gp)表达可能成为化疗诱导白血病细胞耐药的基本机制^[5,6]。抑制 NF- κ B 活性将成为逆转白血病细胞耐药、增强化疗敏感性的一个新措施和理想治疗靶点。

传统中医药逆转 MDR 的研究已有近 20 年的历史, 被证实具有耐药逆转作用的中药活性成分有数十种, 如汉防己甲素、补骨酯素、苦参碱、人参皂苷、槲皮素、丹皮酚、川芎嗪、姜黄素、蝎毒、冬凌草甲素、紫杉醇、贝母甲素等。这些药大多数具有钙通道拮

抗作用, 主要作用机制是抑制 P-gp 的转运功能, 增加细胞内化疗药物的浓度而达到耐药逆转作用。但这些逆转剂大多被证实没有或较少有临床应用前景, 其主要原因是这些药物的作用靶点较单一, 而白血病细胞的耐药常常是多机制共同作用的结果。如胡凯文等报道多数中药皂苷(黄芩苷、栀子苷、芦荟苷、酸枣仁苷、三七苷、芍药苷和人参苷等)在常规剂量下体外对耐药和敏感株不具备杀伤活性, 仅有部分具备极低逆转活性, 大多数不具备耐药逆转作用^[7]。这一结果提示, 中医药逆转多药耐药的机制非常复杂, 使用单一成分逆转耐药的方法受到挑战。中药复方多成分通过多途径协同作用于多个部位和靶点, 集中体现了中医理论的精华, 是逆转白血病多药耐药研究的方向。中医药逆转白血病多药耐药的

3.2 对 HL60/ADR 细胞内柔红霉素的影响 流式细胞仪检测 DNR 蓄积水平结果显示 K562 细胞内药物浓度(荧光强度)为 95.6%, K562/ADM 细胞内药物浓度(荧光强度)为 14.5%, 加不同高、中、低浓度药物血清($0.4, 0.6, 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和干扰素($500 \text{ U} \cdot \text{L}$)处理后荧光强度依次为 21.3%, 51.7%, 82.6% 和 54.4%。经中药处理后的 HL60/ADR 细胞细胞内柔红霉素的浓度较空白牛血清组及敏感细胞高, 并具有剂量依耐性, 中药浓度越大, 细胞内柔红霉素的浓度越高。

3.3 对 HL60/ADR 细胞 NF- κ B 信号干预的影响 结果显示 HL60 则未见阳性条带, 牛血清组和兔血清组 HL60/ADR 细胞 p65, p50, IKBa 条带明显变细, 加用解毒化痰含药血清处理后 p65, p50, IKBa 条带明显增粗, 其表达均有不同程度下降, 以高、中剂量组最明显, p65, p50 表达下降高于干扰素组($P < 0.05$), IKBa 下降与干扰素组相当, 其比值见表 2。

研究要有所突破,首先应从白血病多药耐药机制的研究中获得突破,在既往的研究中,更多的是针对白血病的中医病因病机进行探讨,较少涉及多药耐药的发病原因及机制。根据白血病细胞多药耐药的发生和演变过程,本研究组对白血病多药耐药的中医病因病机进行了探讨,提出了导致其发病的中医“毒蕴血瘀”理论,并初步验证了“毒蕴血瘀”是白血病多药耐药产生的病理基础^[8-9]。在此理论指导下组成解毒化瘀方,药物由青黛、山慈姑、蚤休、虎杖、莪术、川芎、丹参、补骨脂组成,经临床实践证明解毒化瘀药能够提高难治/复发白血病化疗缓解率^[9]。

本研究显示解毒化瘀药含药血清对 HL/ADR 细胞的生长抑制作用呈浓度依赖性,剂量越大,抑制作用越强,流式细胞仪检测结果显示非细胞毒作用的解毒化瘀药含药血清能够增加 HL60/ADR 细胞内柔红霉素的浓度。进一步的研究显示,HL60/ADR 耐药细胞 NF- κ B 信号基因呈高表达,HL60 敏感细胞未见表达,加用不同浓度解毒化瘀含药血清处理后,p65,p50 和 I κ B α 的表达均有不同程度下降,以高、中剂量组对 p65 的下调作用更明显,推测解毒化瘀药对 HL60/ADR 细胞的耐药逆转作用可能是通过阻断 NF- κ B 信号基因,从而逆转耐药。

[参考文献]

[1] 马武开,张惠臣. 中西医结合治疗难治/复发急性白血

病临床研究[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(5):73.

- [2] 方文贤,宋崇顺,周立孝. 医用中药药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:960.
- [3] 马武开,张惠臣. 解毒化瘀药含药血清对白血病 K562/A02 细胞耐药逆转作用的研究[J]. 国际中医中药杂志,2007,29(4):195.
- [4] 马武开,姚宇红,黄礼明. 白血病多药耐药与 NF- κ B 调控机制[J]. 广东医学,2009,30(12):1930.
- [5] Byeong Hyeok Choi, Chang Gun Kim, Yoongho Lim, et al. Curcumin down-regulates the multidrug-resistance *mdr1b* gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF κ B pathway [J]. Cancer Letters,2008,259(1):111.
- [6] Bentims-Ati M, Barbu V, Fillet M, et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells [J]. Oncogene, 2003, 22(1):90.
- [7] 胡凯文,陈信义. 中药活性成分抗耐药肿瘤细胞体外筛选研究[J]. 中国医药学报,1998,13(2):10.
- [8] 马武开. 难治性白血病从毒论[J]. 中国医药学报,2004,19(4):241.
- [9] 马武开,黄礼明. 白血病多药耐药的中医病因病机探讨[J]. 浙江中医杂志,2006,41(9):518.

[责任编辑 聂淑琴]