

## 4'-甲醚-黄芩素对耐药性人绒毛膜癌的耐药逆转作用

李卓<sup>1,2</sup>, 朱利群<sup>2</sup>, 张燕<sup>2</sup>, 徐昌芬<sup>2</sup>, 徐珊<sup>2</sup>(1. 西安医学院第一附属医院 检验科, 陕西 西安 710077; 2. 南京医科大学 基础医学院 细胞生物学教研室, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 研究4'-甲醚-黄芩素(4'-methylether-scutellarein, 4'-M-S)对耐药性人绒毛膜癌的体内耐药逆转作用并探讨其相关作用机制。**方法:** 在BALB/c裸鼠左侧腋窝皮下注射耐药性人绒毛膜癌细胞JAR/VP-16建立耐药性人绒毛膜癌裸鼠皮下移植瘤模型, 瘤体直径至1.0 cm时, 随机分为空白对照组、依托泊苷(etoposide, VP16)化疗组、4'-M-S组和4'-M-S + VP16联合治疗组, 每组10只荷瘤鼠。动态观测各治疗组荷瘤鼠肿瘤生长情况, 并记录存活时间。治疗3周后, 通过光镜、透射电镜观察移植瘤组织形态学改变, 流式细胞术检测移植瘤细胞凋亡率的变化, 用RT-PCR、Western blotting检测并比较4组移植瘤组织中多药耐药基因1(multidrug resistance 1, *MDR1*) mRNA、肺耐药相关蛋白(lung resistance-related protein, *LRP*) mRNA及其产物P-糖蛋白(permeability-glycoprotein, P-gp)和LRP的表达情况。**结果:** 治疗3周后发现, 4'-M-S对耐药性人绒毛膜癌有一定的体内抑制作用, 与VP16联合用药可使裸鼠移植瘤生长明显受抑, 抑瘤率达48.21%, 同时可减轻化疗毒性反应、明显改善荷瘤鼠生活质量, 并显著延长其平均存活时间; 与其他3组相比, 4'-M-S + VP16联合治疗组移植瘤细胞凋亡率显著升高(均 $P < 0.05$ ), 移植瘤组织中*MDR1* mRNA、*LRP* mRNA及其编码蛋白P-gp和LRP表达水平均显著下降(均 $P < 0.05$ )。**结论:** 4'-M-S能有效逆转人绒毛膜癌对化疗药物VP16的耐药性, 其机制可能与4'-M-S诱导细胞凋亡和下调耐药基因*MDR1* mRNA、*LRP* mRNA及相应产物P-gp和LRP的表达有关。

**[关键词]** 绒毛膜癌; 多药耐药; 裸鼠; 多药耐药逆转; 4'-甲醚-黄芩素; 依托泊苷

**[中图分类号]** R737.33; R730.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)02-0182-06

## Reversal effect of 4'-methylether-scutellarein on multidrug resistance of human choriocarcinoma

LI Zhuo<sup>1,2</sup>, ZHU Liqun<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, XU Changfen<sup>2</sup>, XU Shan<sup>2</sup>(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi, China; 2. Department of Cell Biology, College of Basic Medical, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the reversal effect of 4'-methylether-scutellarein (4'-M-S) on multidrug resistance of human choriocarcinoma *in vivo*, and investigate its mechanism. **Methods:** Drug resistant human choriocarcinoma cells were subcutaneously injected into left armpits of BALB/c nude mice to construct the subcutaneous exnograft model. When diameter of the xenografts reached 1.0 cm, the mice were randomly divided into four groups with ten mice in each, namely control group, etoposide (VP16) group, 4'-M-S group and 4'-M-S + VP16 group. After the treatment for three weeks, growths of the exnograft tumors were dynamically observed and survival times of the mice recorded in the various groups, morphological changes of the tumor tissues were observed with optical and transmission electron microscopes and apoptosis rates of the exnograft cells detected with flow cytometry assay. Expression levels of *MDR1* mRNA, *LRP* mRNA and their coding proteins, P-gp and LR, were detected and compared among the four groups with RT-PCR and Western blotting assays respectively. **Results:** After the treatments for three weeks, it was found that 4'-M-S has somewhat inhibitory effect

**[基金项目]** 陕西省教育厅专项科研计划项目(No. 12JK0768); 江苏省高校自然科学基金资助项目(No. 06KJB360067)。Project supported by the Special Scientific Research from the Bureau of Educator of Shaanxi Province (No. 12JK0768), and the Natural Science Foundation of Higher Education of Jiangsu Province (No. 06KJB360067)

**[作者简介]** 李卓(1982-), 女, 陕西延安人, 博士, 主要从事肿瘤生物治疗方面的相关研究, E-mail: lizhuo721@163.com

**[通信作者]** 徐珊(XU Shan, corresponding author), E-mail: xushannjmu@126.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160331.2016.010.html>

on drug-resistant human choriocarcinoma *in vivo*, 4'-M-S + VP16 could apparently inhibit growth of the exnograf tumors in the nude mice with inhibition rate of 48.21%. Meanwhile, toxicity of the chemotherapy was reduced, life quality of mice with the exnograf tumors obviously improved and their mean survival times significantly prolonged. In the 4'-M-S + VP16 group, apoptosis rate of the xenograf cells was significantly increased, and expression levels of *MDR1* mRNA, *LRP* mRNA and their coding proteins, P-gp and LR, in the exnograf tumors significantly decreased comparing with the other three groups (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** 4'-M-S could effectively reverse resistance of the human choriocarcinoma to the chemotherapy drug VP16, which might be related with 4'-M-S inducing apoptosis of the tumor cells and down-regulating expression of *MDR1* mRNA, *LRP* mRNA and their coding proteins, P-gp and LR, in the exnograf tumors.

[ **Key words** ] choriocarcinoma; multidrug resistance; nude mice; reversal of multidrug resistance; 4'-methylether-scutellarein (4'-M-S); etoposide

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 182-187. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.005 ]

肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)是导致人绒毛膜癌化疗失败的主要原因。许多从天然药物中提取的化合物被证实具有逆转肿瘤MDR的作用<sup>[1-8]</sup>,但现有研究大都限于体外细胞实验,而许多具有体外抑瘤效果的化合物在动物体内的作用效应却并不理想<sup>[9]</sup>。4'-甲醚-黄芩素(4'-methylether-scutellarein, 4'-M-S)是本实验室从中药马鞭草有效部位中提取到的抗人绒毛膜癌的有效单体成分,本课题组前期体外细胞实验已证实,4'-M-S对人绒毛膜癌依托泊苷(etoposide, VP16)耐药细胞JAR/VP16具有显著的耐药逆转作用<sup>[10-12]</sup>。本研究以人绒毛膜癌多药耐药细胞JAR/VP16的移植瘤裸鼠模型为研究对象,进一步明确4'-M-S联合VP16治疗耐药性绒毛膜癌的体内协同作用,并从不同方面探讨其可能机制,以期为今后4'-M-S逆转肿瘤多药耐药的临床应用提供实验证据。

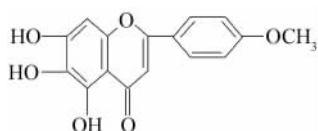
## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

细胞株:人绒毛膜癌耐药细胞株JAR/VP16为本室自建<sup>[11]</sup>。

实验动物: BALB/c 裸鼠, 雌性, 4~6 周龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[动物合格证编号: SCXK(京)2012-0001], 在无特定病原体(SPF)环境下饲养。

4'-甲醚-黄芩素(4'-methylether-scutellarein, 4'-M-S): 由江苏省中医药研究所提供, 纯度为 99%, 4℃ 保存。其结构式如下:



主要试剂: 总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒 RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 购自 TaKaRa 公司, 鼠抗人 P-糖蛋白(permeability-glycoprotein, P-gp)单克隆抗体和鼠抗人肺耐药相关蛋白(lung resistance-related protein, LRP)单克隆抗体均购自 NeoMarkers 公司, HRP 标记羊抗鼠二抗购自北京中山生物技术有限公司。

### 1.2 建立耐药性人绒毛膜癌移植瘤裸鼠模型

收集对数生长期的 JAR/VP16 细胞悬液, 以  $5.0 \times 10^6$  个/0.2 ml 无菌条件下接种于裸鼠左侧腋窝皮下, 瘤体直径达 1.0 cm 以上者认定为移植瘤模型构建成功<sup>[13]</sup>。

### 1.3 动物分组及给药方式

待荷瘤裸鼠瘤体直径达 1.0 cm 时, 使用随机数字表法随机分为 4 组: 空白对照组、VP16 化疗组、4'-M-S 组和 4'-M-S + VP16 联合用药组, 每组 10 只荷瘤鼠。

空白对照组: 生理盐水 0.2 ml/(只·d), 腹腔注射, 每日一次, 连续 3 周; VP16 组: 用生理盐水稀释 VP16, 按 10 mg/(kg·d) 腹腔注射, 每日一次, 连续 5 d; 4'-M-S 组: 用生理盐水稀释 4'-M-S, 按 10 mg/(kg·d) 灌胃给药, 每日一次, 连续 3 周; 联合用药组: VP16 10 mg/(kg·d) + 4'-M-S 10 mg/(kg·d), 给药途径及时间分别与各自单独用药组相同。

### 1.4 计算移植瘤体积

给药后各组动物每隔两日用游标卡尺测量瘤结节的长径(a)和短径(b), 按椭球形体积公式( $V = a \times b^2 / 2$ )计算肿瘤体积并求各组平均值, 并以时间为横坐标、肿瘤体积为纵坐标绘制移植瘤生长曲线图, 同时比较各治疗组的体积抑瘤率。抑瘤率(%) = (空白对照组移植瘤体积 - 治疗组移植瘤体积) / 空白对照组移植瘤体积 × 100%。

1.5 记录荷瘤裸鼠生存时间

记录并比较各组荷瘤鼠实验开始至死亡的生存天数。相对生存时间比率( T/C, % )=( 处理组荷瘤鼠平均生存时间/ 空白对照组荷瘤鼠平均生存时间) × 100%。

1.6 观察移植瘤组织形态学特征

给药 3 周后, 每组以颈椎脱臼法随机处死 4 只荷瘤鼠, 剥取移植瘤。10% 中性甲醛溶液固定部分标本, 常规石蜡切片, 行 H-E 染色, 光学显微镜观察肿瘤组织形态结构; 切取约 1 mm × 1 mm × 1 mm 新鲜瘤组织, 迅速以 2.5% 戊二醛固定, 常规处理后, 透射电镜观察肿瘤组织超微结构; 另取部分标本快速冻存于液氮内待测。

1.7 流式细胞术检测移植瘤细胞凋亡率

取 4 组新鲜瘤组织( 各约 200 mg ), 生理盐水漂洗去除血渍和污物, 搓网、离心, 制成单细胞悬液并调整为  $1.0 \times 10^6$ /ml, 预冷的 75% 乙醇固定, -20 °C 过夜。离心弃上清, 50 μg/ml 碘化丙锭( PI ) 4 °C 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率( % )。

1.8 RT-PCR 检测移植瘤组织内多药耐药基因 *MDR1* mRNA 和 *LRP* mRNA 的表达

用 TRIzol 一步法分别提取 4 组裸鼠移植瘤组织的总 RNA, 按照试剂盒说明书进行 RT-PCR 扩增, 以  $\beta$ -actin 作为内参。*MDR1* mRNA( 170 bp ) 的上游引物序列为 5'-TTCCTTCACCCAGGCAATGA-3', 下游引物序列为 5'-TGGCATAGTCAGGAGCAAATGA-3'。*LRP* mRNA( 400 bp ) 的上游引物序列为 5'-ATGTCA-CAGGGCAAGTTCG-3', 下游引物序列为 5'-AACAC-CGCTGGGAGGTAC-3'。 $\beta$ -actin mRNA( 197 bp ) 的上游引物序列为 5'-GAAATCGTGCCTGACATTA-3', 下游引物序列为 5'-AAGGAAGGCTG-GAAGAGTG-3'。PCR 反应条件: 94 °C 30 s, 54 °C ( *MDR1* ) 或 57 °C ( *LRP* ) 30 s, 72 °C 1 min, 35 个 ( *MDR1* ) 或 30 个 ( *LRP* ) 循环, 72 °C 延伸 1 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶图像分析仪进行表达分析, 以靶基因 mRNA 灰度与内参基因  $\beta$ -actin 灰度比值作为靶基因 mRNA 相对表达量。

1.9 Western blotting 检测 P-gp 和 LRP 蛋白的表达

取 4 组移植瘤组织( 各约 200 mg ), 加蛋白裂解液, 组织匀浆, 高速低温离心( 4 °C, 14 000 × g, 15 min ) 提取上清蛋白, 按常规 Western blotting 实验步骤进行电泳、转膜, 经封闭后加入相应的鼠抗人 P-gp 或 LRP 单克隆抗体( 1:1 000 )、HRP 标记羊抗鼠二抗( 1:1 000 ), 显色。用 Quantity One 4.5.6 软件、以

$\beta$ -actin 为内参进行定量分析, 以目的蛋白灰度/ $\beta$ -actin 灰度比值计算蛋白相对表达量。

1.10 统计学处理

应用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组以上数据比较采用单因素方差分析( One-way ANOVA ), 组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤鼠一般情况

接种肿瘤细胞 8 ~ 10 d 后, 接种部位陆续出现肿瘤结节, 其后肿瘤体积增长较快, 14 d 后肿瘤结节长径达 1.0 cm。分组给药后, VP16 组荷瘤鼠随化疗进程出现拒食、消瘦、反应迟钝等化疗不良反应, 个别伴有腹泻, 随着恶病质的出现及进展, 陆续死亡; 4'-M-S 组荷瘤鼠一般情况好于 VP16 组, 表现反应敏捷, 进食尚可; 4'-M-S + VP16 组荷瘤鼠治疗初期曾一度出现化疗不良反应, 但较 VP16 组轻, 随后进食逐渐正常, 动作活跃, 体质量回升。

2.2 移植瘤生长情况

从肿瘤生长曲线( 图 1 ) 可见各组移植瘤体积随时间进展逐渐增大, 空白对照组和单用 VP16 组移植瘤生长明显快于另外 2 组。治疗 3 周后 VP16 组移植瘤平均体积达  $(4.89 \pm 0.62) \text{ cm}^3$ , 与空白对照组  $(5.29 \pm 0.59) \text{ cm}^3$  差异无统计学意义(  $P > 0.05$  ), 体积抑瘤率仅为 7.45%; 单用 4'-M-S 组移植瘤生长速度稍缓, 平均体积  $(3.54 \pm 0.40) \text{ cm}^3$ , 抑瘤率 33.00%, 与对照组差异无统计学意义(  $P > 0.05$  ); 而 VP16 + 4'-M-S 联合治疗对肿瘤生长的抑制作用明显, 瘤体增长最缓慢, 瘤体平均体积为  $(2.74 \pm 0.58) \text{ cm}^3$ , 抑瘤率达 48.21%, 显著高于空白对照组和 VP16 组(  $P < 0.05$  ), 但与 4'-M-S 组相比无显著差异(  $P > 0.05$  ) ( 表 1 )。

表 1 各治疗方法对肿瘤体积及荷瘤鼠生存时间的影响(  $n = 10$  )

Tab. 1 Effects of different treatments on tumor volume and survival time of the tumor-bearing mice (  $n = 10$  )

Group	Tumor volume ( $V/\text{cm}^3$ )	Inhibition rate ( % )	Survival time( $t/\text{d}$ )	T/C ( % )
Control	$5.29 \pm 0.59$	-	$29.50 \pm 2.08$	100
VP16	$4.89 \pm 0.62$	7.45	$28.80 \pm 2.38$	97.63
4'-M-S	$3.54 \pm 0.40$	33.00	$35.10 \pm 2.36$	118.98
4'-M-S + VP16	$2.74 \pm 0.58^{*\Delta}$	48.21	$39.50 \pm 3.62^{*\Delta}$	133.90

\*  $P < 0.05$  vs Control group,  $\Delta P < 0.05$  vs VP16 group

### 2.3 荷瘤鼠生存时间

空白对照组和 VP16 组荷瘤鼠的生存时间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 4'-M-S 单独用药组荷瘤鼠生存时间延长了 18.98%, 但与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 4'-M-S + VP16 联合治疗组荷瘤鼠生存时间延长了 33.90%, 显著高于空白对照组和 VP16 组 ( $P < 0.05$ ), 但与 4'-M-S 单独用药组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

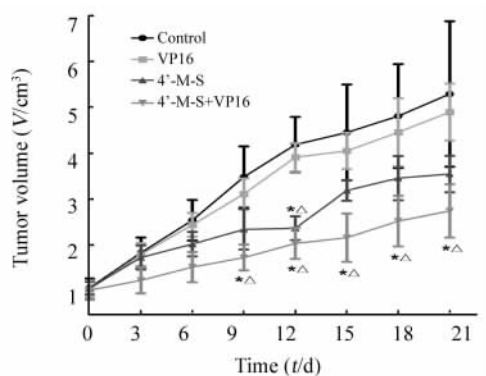


图 1 不同处理组移植瘤体积生长曲线

Fig. 1 Growth curve of xenograft volume in different groups

\*  $P < 0.05$  vs Control group,

Δ  $P < 0.05$  vs VP16 group

### 2.4 移植瘤组织细胞形态学表现

光学显微镜观察(图 2)结果显示,空白对照组移植瘤组织呈巢状或不规则团块状排列,细胞密集,可见多量新生血管;细胞大小不一,呈浸润性生长,核大、深染,核质比大,可见核分裂相。VP16 组与空白对照组相似,细胞增生活跃,中心可见部分坏死灶。4'-M-S 组细胞出现皱缩,体积变小,细胞核固缩、深染,瘤细胞所占比例减少。VP16 + 4'-M-S 联合用药组可见瘤细胞数量减少并进一步固缩,胞质淡红,并见弥漫性坏死灶。

透射电镜观察(图 3)结果显示,空白对照组肿瘤胞质丰富,核大、不规则,核膜界清,染色质分布均匀,核仁明显;VP16 组与空白对照组相似;4'-M-S 组肿瘤细胞皱缩,形态不规则,内质网扩张,细胞核变形,部分核染色质浓集,呈早期凋亡特征;4'-M-S + VP16 组肿瘤胞质出现空泡化,内质网扩张,染色质浓集成片状,沿核膜边缘排列,呈典型凋亡特征。

### 2.5 移植瘤细胞凋亡情况

空白对照组与 VP16 组肿瘤细胞凋亡率相近 [(17.45 ± 0.76)% vs (17.70 ± 0.72)%],  $P > 0.05$ ]; 4'-M-S 组凋亡率为 (22.36 ± 1.03)%, 较空

白对照组及 VP16 组均有显著增加(均  $P < 0.05$ ); 4'-M-S + VP16 组肿瘤细胞凋亡率最高达 (40.75 ± 1.09)%, 与其他 3 组相比差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

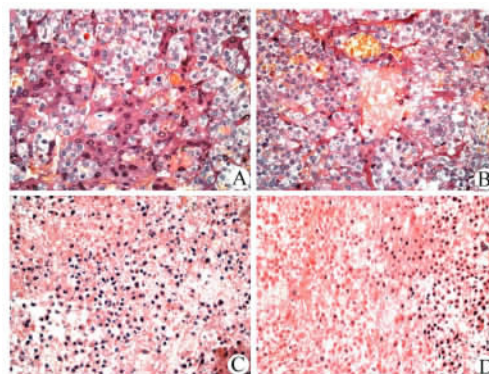


图 2 H-E 染色观察各组移植瘤组织的形态学特征(×400)

Fig. 2 Morphological characteristics of xenograft tissues in different groups by H-E stain(×400)

A: Control group; B: VP16 group;

C: 4'-M-S group; D: 4'-M-S + VP16 group

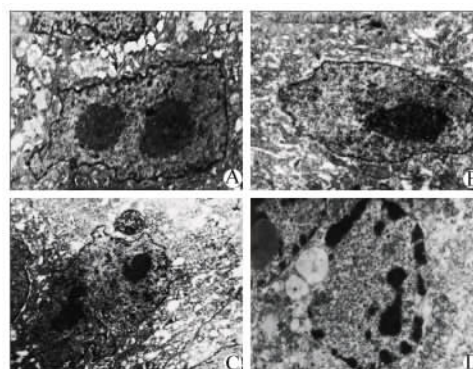


图 3 透射电镜观察各组移植瘤组织中细胞的超微结构特征(×8 000)

Fig. 3 Ultrastructural characteristics of xenograft tissues in different groups by transmission electron microscope(×8 000)

A: Control group; B: VP16 group;

C: 4'-M-S group; D: 4'-M-S + VP16 group

### 2.6 移植瘤组织 *MDR1* mRNA、*LRP* mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果(图 4)表明,在空白对照组与 VP16 组中 *MDR1* mRNA 和 *LRP* mRNA 均有较高表达,分别达 1.75 ± 0.05、1.66 ± 0.05 和 1.64 ± 0.08、1.53 ± 0.13,而且两者在两组间相对表达强度相近(均  $P > 0.05$ )。与空白对照组和 VP16 组相比,4'-M-S 组 *MDR1* mRNA (0.73 ± 0.01) 和 *LRP* mRNA

( $0.55 \pm 0.01$ ) 表达均显著下降(均  $P < 0.05$ ); 4'-M-S + VP16 联合组 *MDR1* mRNA ( $0.23 \pm 0.01$ ) 和 *LRP* mRNA ( $0.18 \pm 0.02$ ) 的表达量下降更多(均  $P < 0.05$ )。

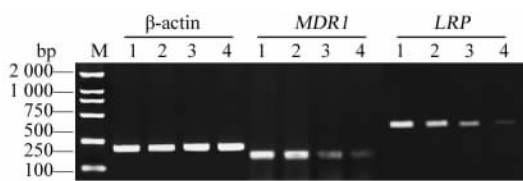


图 4 RT-PCR 法检测不同处理组移植瘤 *MDR1* mRNA 和 *LRP* mRNA 的表达水平

Fig. 4 Expressions of *MDR1* mRNA and *LRP* mRNA in different groups by RT-PCR

M: DNA marker; 1: Control group; 2: VP16 group; 3: 4'-M-S group; 4: 4'-M-S + VP16 group

### 2.7 移植瘤组织 P-gp 和 LRP 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 5)显示,空白对照组和 VP16 组中 P-gp 和 LRP 蛋白均有较高表达。与空白对照组和 VP16 组相比,4'-M-S 组 P-gp ( $0.49 \pm 0.11$  vs  $1.03 \pm 0.12$ 、 $1.10 \pm 0.12$ , 均  $P < 0.05$ ) 和 LRP ( $0.35 \pm 0.08$  vs  $0.93 \pm 0.04$ 、 $0.71 \pm 0.03$ , 均  $P < 0.05$ ) 相对表达量均明显降低,4'-M-S + VP16 组 P-gp ( $0.39 \pm 0.07$ ) 和 LRP ( $0.11 \pm 0.01$ ) 的相对表达量也明显降低(均  $P < 0.05$ ),且联合用药作用较 4'-M-S 单药降低更为明显。

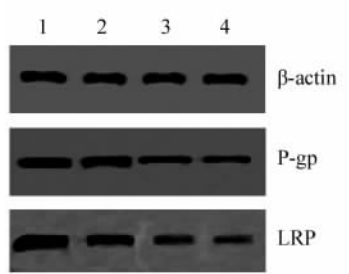


图 5 不同处理组移植瘤组织耐药蛋白 P-gp 和 LRP 的表达

Fig. 5 Expressions of P-gp and LRP proteins in different groups by Western blotting

1: Control group; 2: VP16 group; 3: 4'-M-S group; 4: 4'-M-S + VP16 group

### 3 讨论

肿瘤细胞产生 MDR 是导致化疗失败的重要原因之一,寻找和开发肿瘤 MDR 逆转剂是当前临床

和基础研究中的热点问题之一。作为我国国粹的中草药,因其具有诸多天然优势,是寻找肿瘤 MDR 逆转剂的重要来源,正在受到越来越广泛的关注。4'-M-S 是本课题组从中药马鞭草中提取的一种单体成分,在前期研究<sup>[11]</sup>中成功构建了 JAR/VP16 人绒毛膜癌 VP16 耐药细胞株;采用 4'-M-S 联合 VP16 用药后,发现其体外对耐药细胞株具有明显的协同增敏作用,对 VP16 的耐药逆转倍数为 5.02,逆转率可达 81.19%<sup>[10,12]</sup>。

为此,本研究进一步进行体内实验,结果表明,(1)VP16 组肿瘤体积抑制率仅为 7.45%,表明 VP16 的疗效较差。同时,化疗毒性反应导致荷瘤鼠生活质量较差,加速了荷瘤鼠的死亡,该组荷瘤鼠生存时间最短,仅为( $28.80 \pm 2.38$ )d。(2)4'-M-S 组荷瘤鼠的进食、活动及生存状况均优于空白对照组和 VP16 组,体积抑制率也提高至 33.00%,表明 4'-M-S 体内对耐药性绒毛膜癌有一定的疗效,并验证了其低毒的优点。(3)4'-M-S + VP16 联合用药组观察到:联合治疗可减轻 VP16 的化疗毒副作用,荷瘤鼠存活质量明显改善,平均存活时间达( $39.50 \pm 3.62$ )d;而且联合用药使荷瘤鼠抑瘤率提高至 48.21%,超过了两药单用抑瘤率之和。提示 4'-M-S 和 VP16 联合作用,可能通过协同作用增强肿瘤对化疗药物的敏感性,逆转荷瘤鼠移植瘤对 VP16 的耐药性。此外,组织学观察及流式细胞术检测结果与体外细胞实验结果基本一致,证实 4'-M-S + VP16 联合用药有较强的协同抗肿瘤效应,诱导肿瘤细胞凋亡是原因之一。以上这些发现与前期体外试验得到的结论相一致<sup>[10,12]</sup>。

此外,肿瘤 MDR 的发生往往与 P-gp 和 LRP 等蛋白过度表达有关。其中,P-gp 是 *MDR1* 基因编码的跨膜糖蛋白,为 ATP 依赖性药物“外排泵”,是肿瘤 MDR 的产生机制<sup>[14-15]</sup>,研究<sup>[16-18]</sup>发现,P-gp 的含量和细胞内药物的积聚量及耐药程度呈明显的相关性。LRP 是 1993 年由 Schepers 等<sup>[19]</sup>首先在一株无 P-gp 表达的多药物耐药的非小细胞肺癌细胞株中发现的一种与 MDR 有关的蛋白质,其介导的药物耐受非常广泛,包括一些 P-gp 不能介导的耐药<sup>[20-21]</sup>。基于此,本实验观察了 4'-M-S 体内给药对肿瘤细胞耐药相关活性物质 P-gp 和 LRP 表达的影响。结果表明:4'-M-S 单用及与 VP16 联用,均可显著降低移植瘤组织中耐药基因 *MDR1* 及其产物 P-gp 蛋白的表达,阻止化疗药物经细胞膜转运所致的细胞内药物浓度降低,提高化疗药物的细胞毒性作用,干预 MDR 产生;同时可降低 *LRP* mRNA 及其产物

LRP的表达,阻止化疗药物经囊泡和胞吐机制排出细胞,保持细胞内化疗药物的浓度,提高细胞毒性作用。因此认为,4'-M-S可通过降低P-gp和LRP表达,有效增加化疗药物在细胞内的浓度和积聚,增强对MDR肿瘤细胞的毒性,发挥耐药逆转作用,有可能成为临床治疗绒毛膜癌有效的化疗辅助药物和肿瘤多药耐药逆转剂。

然而,肿瘤MDR是多因素、多机制共同参与的结果,4'-M-S通过诱导细胞凋亡及降低P-gp和LRP蛋白表达而发挥耐药逆转作用仅是其可能机制之一。在今后的研究中还需深入探讨4'-M-S逆转作用的主导机制及其他相关机制,以期为进一步开发和临床应用提供理论依据。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] SUN Y F, WINK M. Tetrandrine and fangchinoline, bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania tetrandra* can reverse multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein activity in multidrug resistant human cancer cells [ J ]. *Phytomedicine*, 2014, 21( 8/9 ): 1110-1119. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.04.029.
- [ 2 ] 魏昌晟,沈义军,张智,等. 苦参碱逆转乳腺癌耐药株 MCF-7/ADR 多药耐药与 PI3K/AKT 通道的关系 [ J ]. *第三军医大学学报*, 2014, 36( 22 ): 2254-2258.
- [ 3 ] LUO S X, DENG W Y, WANG X F, et al. Molecular mechanism of indirubin-3'-monoxime and Matrine in the reversal of paclitaxel resistance in NCI-H520/TAX25 cell line [ J ]. *Chin Med J ( Engl )*, 2013, 126( 5 ): 925-929.
- [ 4 ] ZHANG Y, LIU X, ZUO T, et al. Tetramethylpyrazine reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression and function of P-glycoprotein [ J ]. *Med Oncol*, 2012, 29( 2 ): 534-538. DOI: 10.1007/s12032-011-9950-8.
- [ 5 ] HUANG Y Q, HUANG G R, WU M H, et al. Inhibitory effects of emodin, baicalin, schizandrin and berberine on hefA gene: treatment of *Helicobacter pylori*-induced multidrug resistance [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21( 14 ): 4225-4231. DOI: 10.3748/wjg.v21.i14.4225.
- [ 6 ] LIU D L, BU H, LI H, et al. Emodin reverses gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells via the mitochondrial apoptosis pathway in vitro [ J ]. *Int J Oncol*, 2012, 40( 4 ): 1049-1057. DOI: 10.3892/ijo.2011.1285.
- [ 7 ] SUN M, XU X, LU Q, et al. Schisandrin B: a dual inhibitor of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 [ J ]. *Cancer Lett*, 2007, 246( 1/2 ): 300-307.
- [ 8 ] ZHANG J, ZHOU F, WU X, et al. Cellular pharmacokinetic mechanisms of adriamycin resistance and its modulation by 20(S)-ginsenoside Rh2 in MCF-7/Adr cells [ J ]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165( 1 ): 120-134. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01505.x.
- [ 9 ] WANG Z, RAVULA R, CAO M, et al. Transporter-mediated multidrug resistance and its modulation by Chinese medicines and other herbal products [ J ]. *Curr Drug Discov Technol*, 2010, 7( 1 ): 54-66.
- [ 10 ] 徐珊,罗莉,朱利群,等. 4'-甲醚-黄芩素对绒毛膜癌耐药细胞株多药耐药性的逆转作用研究 [ J ]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33( 11 ): 1061-1073. DOI: 10.3321/j.issn:1000-3282.2006.11.007.
- [ 11 ] 徐珊,朱利群,罗莉,等. 人绒毛膜癌 JAR/VP16 多药耐药细胞株的建立及相关基因表达检测 [ J ]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2006( 7 ): 485-490. DOI:10.3969/j.issn.1007-4368.2006.07.004.
- [ 12 ] 朱利群,徐珊,李卓,等. 4'-甲醚-黄芩素逆转人绒毛膜癌耐药细胞株多药耐药性的相关机制研究 [ J ]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29( 9 ): 1215-1219.
- [ 13 ] 李卓,徐珊,朱利群,等. 多药耐药性人绒毛膜癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立及其生物学特性 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14( 4 ): 347-351. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2007.04.010.
- [ 14 ] CHUFAN E E, SIM H M, AMBUDKAR S V. Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein ( ABCB1 ): recent biochemical and structural studies [ J ]. *Adv Cancer Res*, 2015, 125: 71-96. DOI: 10.1016/bs.acr.2014.10.003.
- [ 15 ] ORLANDI F, CORONNELLO M, BELLUCCI C, et al. New structure-activity relationship studies in a series of N,N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters as potent reversers of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance ( MDR ) [ J ]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21( 2 ): 456-465. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.11.019.
- [ 16 ] ANDERSEN V, SVENNINGSSEN K, KNUDSEN L A, et al. Novel understanding of ABC transporters ABCB1/MDR/P-glycoprotein, ABCC2/MRP2, and ABCG2/BCRP in colorectal pathophysiology [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21( 41 ): 11862-11876. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11862.
- [ 17 ] CHEN Z, SHI T, ZHANG L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette ( ABC ) family in multidrug resistance: A review of the past decade [ J ]. *Cancer Lett*, 2016, 370( 1 ): 153-164. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.
- [ 18 ] POPEDA M, PLUCIENNIK E, BEDNAREK A K. Proteins in cancer multidrug resistance [ J/OL ]. *Postepy Hig Med Dosw ( Online )*, 2014, 68: 616-632 [ 2015-12-01 ]. [http: 134.indexcopernicus.com/abstracted.php? level = 5&ICIC = 1103268](http://134.indexcopernicus.com/abstracted.php?level=5&ICIC=1103268). DOI: 10.5604/17322693.1103268.
- [ 19 ] SCHEPER R J, BROXTERMAN H J, SCHEFFER G L, et al. Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance [ J ]. *Cancer Res*, 1993, 53( 7 ): 1475-1479.
- [ 20 ] KERR E H, FREDERICK P J, EGGER M E, et al. Lung resistance-related protein ( LRP ) expression in malignant ascitic cells as a prognostic marker for advanced ovarian serous carcinoma [ J ]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20( 9 ): 3059-3065. DOI: 10.1245/s10434-013-2878-9.
- [ 21 ] KITAZONO M, OKUMURA H, IKEDA R, et al. Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells [ J ]. *Int J Cancer*, 2001, 91( 1 ): 126-131.

[ 收稿日期 ] 2015 - 12 - 06

[ 修回日期 ] 2016 - 02 - 04

[ 本文编辑 ] 宋关鸿