

新藤黄酸对人乳腺癌耐药细胞体外作用的研究

张 凤, 谢晨烨, 程 卉, 苏婧婧, 李庆林

(省部共建新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 观察新藤黄酸(gambogenic acid, GNA)对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR 的作用。方法 采用 MTT 法观察 GNA、阿霉素(adriamycin, ADR)及两者联用对 MCF-7/ADR 细胞增殖的抑制作用, 采用流式细胞仪观察 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 浓度。结果 GNA 能剂量依赖地抑制 MCF-7/ADR 细胞的生长, 作用 48 h 时, GNA 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} 为 $12.88 \mu\text{mol/L}$; $4 \mu\text{mol/L}$ GNA 可增加 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 的敏感性, 使 ADR 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} 由 $80.22 \mu\text{mol/L}$ 降至 $12.54 \mu\text{mol/L}$; GNA 显著增强 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 的积累, 呈剂量依赖关系。结论 低剂量 GNA 能显著增加 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 的敏感性。

[关键词]乳腺癌; MCF-7/ADR; 多药耐药; 新藤黄酸; 阿霉素

[中图分类号]R285.5 [文献标志码]A [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2014.05.022

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤之一。最新统计数据^[1]表明, 美国乳腺癌新增病例占女性肿瘤新增病例的 29%。在我国, 女性恶性肿瘤发病率占第一位的也是乳腺癌^[2], 其发病率为 42.55×10^{-5} , 并呈现逐年上升的趋势。化疗是治疗乳腺癌的有效手段, 而多药耐药(multi-drug resistance, MDR)是化疗失败的主要原因, 已成为肿瘤治疗的最大障碍。近年来的研究^[3-4]表明, 新藤黄酸(gambogenic acid, GNA)能够特异性地抑制多种肿瘤的增殖, 其中包括人乳腺癌 MCF-7 细胞^[5], 而 GNA 对人乳腺癌多药耐药细胞株作用的报道却很少。本研究选用人乳腺癌多药耐药细胞株 MCF-7/ADR 为研究对象, 研究 GNA 对多药耐药 MCF-7/ADR 细胞株的作用。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌阿霉素耐药细胞 MCF-7/ADR, 购于上海美轩生物科技有限公司。

1.2 药物 GNA(粉针, 质量分数 99.0%, 亮黄色结晶, 批号 20120120101): 由安徽中医药大学新藤黄酸课题组提供; 阿霉素(adriamycin, ADR): 大连美仑生物技术有限公司, 批号 20131112。

1.3 主要仪器 Olympus CKX41 倒置显微镜: 日本 Olypus 公司; 96 孔和 6 孔平底培养板: 美国 Corning costar 公司; SPECTRA max M2e 酶标仪: 美国 Molecular Devices 公司; MCO-175 CO_2 培养箱: 日本三洋公司; JW2502 电子分析天平: 上海精密科学仪器有限公司; LD4-8 型低速离心机: 北京医用离

心机厂; FACS Calibur 流式细胞仪: 美国 Becton Dickinson(贝克曼库尔特)公司。

1.4 主要试剂 RPMI 1640 培养基干粉: Gibco 公司, 批号 08612; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS): 杭州四季青生物工程公司, 批号 110117; 胰蛋白酶: Sigma 公司, 批号 0458; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO): Amresco 公司, 批号 201110108662; 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养 将 MCF-7/ADR 细胞接种于培养瓶中, 培养基为 RPMI 1640(含 10% FBS、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 U/ml、 2.0 g 的 NaHCO_3), 耐药细胞 MCF-7/ADR 加换用 $1.72 \mu\text{mol/L}$ ADR 维持其耐药性。耐药细胞 MCF-7/ADR 于实验前无药培养 3 d, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱, 相对饱和湿度的条件下培养, 细胞呈单纯贴壁生长, 隔日换液。待细胞长至 80%~90% 的密度, 用胰酶/EDTA 消化传代, 每 2~3 d 传代一次。

2.2 MTT 法检测 GNA 体外抗肿瘤活性 MCF-7/ADR 以 3×10^3 /孔接种于 96 孔板, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养液培养, 并设不加细胞只加培养液的空白对照组, 当细胞长至 30% 的融合度时, 换成 RPMI 1640 无血清培养基培养 12 h 后, 实验组分别加不同浓度的 GNA, GNA 终浓度为 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$, 每组均设 6 个复孔, 对照组和空白对照组加入完全培养基, 每组均设 6 个复孔, 在 37°C 、5% CO_2 中培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT $20 \mu\text{l}$, 继续孵育 4 h, 弃去培养液, 加 $150 \mu\text{l}$ DMSO, 振荡至结晶充分溶解, 用酶标仪检测 490 nm 处光密度值(optical density at 490 nm, OD_{490}), 以空白对照组调零, 细胞存活率 = 实验组 OD_{490} /空白对照组 $OD_{490} \times 100\%$ 。计算

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173600)

作者简介: 张凤(1989-), 女, 硕士研究生

通信作者: 李庆林, qinglin-lee@hotmail.com

对细胞生长无影响的药物浓度(显著性水准 $\alpha=0.05$), 用于后续实验。实验重复 3 次, 计算平均半数抑制浓度(the half inhibition concentration, IC_{50})。

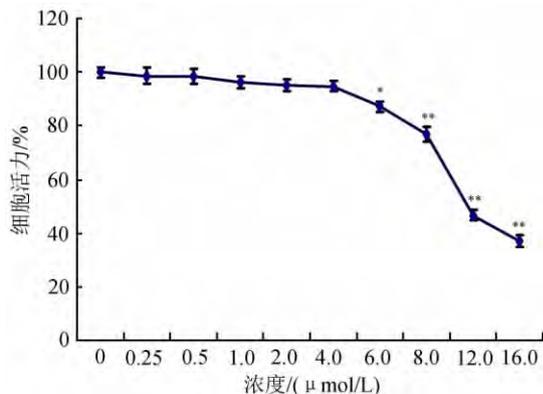
2.3 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 及其联合 GNA 的敏感性测定 将 MCF-7/ADR 以 3×10^3 /孔接种于 96 孔板, 各设 GNA+ADR 联合用药组、ADR 组及空白对照组, 其中 GNA 取低于 IC_{10} 值剂量 ($4 \mu\text{mol/L}$), ADR 以 $100 \mu\text{mol/L}$ 为起始浓度稀释成相应的药物浓度梯度组和一个空白对照组, 每组细胞设 6 个平行孔, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 48 h, MTT 法测定 IC_{50} 值。

2.4 细胞内 ADR 自发荧光强度测定^[6] 将 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞接种于 6 孔培养板中, 待细胞生长至 $50\% \sim 60\%$ 融合时, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液同步化 20 h, 加入相应的药物继续培养 2 h 后, 加入 ADR 至终浓度为 $1.72 \mu\text{mol/L}$, 继续培养 1 h 后消化, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 吹打, 4°C 、 $2\,000 \text{r/min}$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞内 ADR 自发荧光强度, 实验重复 3 次。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。连续型变量用均数(\bar{x})±标准差(s)进行统计学描述。多组均数比较采用单因素方差分析, 均数之间多重比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GNA 对 MCF-7/ADR 细胞增殖的抑制作用 GNA 在 $0.25 \sim 16 \mu\text{mol/L}$ 剂量范围内作用 MCF-7/ADR 细胞 48 h, 可呈剂量依赖地抑制 MCF-7/ADR 细胞增殖, GNA 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} 为 $12.88 \mu\text{mol/L}$ 。见图 1。

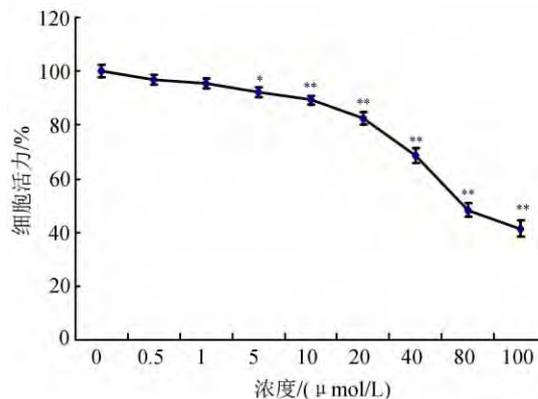


注:与 GNA $0 \mu\text{mol/L}$ 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 不同剂量 GNA 对 MCF-7/ADR 细胞的抑制作用 ($n=3$)

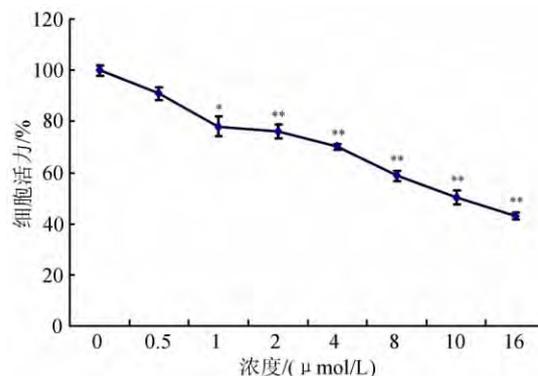
3.2 GNA 和 ADR 联用对 MCF-7/ADR 增殖的影响 图 2 显示, ADR 作用 MCF-7/ADR 细胞 48 h, 可呈剂量依赖地抑制 MCF-7/ADR 细胞的增殖, 其

抑制 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} 为 $80.22 \mu\text{mol/L}$ 。图 3 显示, 不同浓度 ADR 联合 $4 \mu\text{mol/L}$ GNA 作用 MCF-7/ADR 细胞 48 h, ADR 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} 降至 $12.54 \mu\text{mol/L}$ 。结果提示 GNA 增强了 ADR 对 MCF-7/ADR 细胞的抑制作用。



注:与 ADR $0 \mu\text{mol/L}$ 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 不同剂量 ADR 对 MCF-7/ADR 细胞活性的影响 ($n=3$)



注:与 ADR $0 \mu\text{mol/L}$ 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 不同剂量 ADR 与 $4 \mu\text{mol/L}$ GNA 联用对 MCF-7/ADR 增殖的影响 ($n=3$)

3.3 GNA 对 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 浓度的影响 采用流式细胞仪对 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 浓度进行了检测, 结果显示, 经过 $1, 2, 4 \mu\text{mol/L}$ GNA 处理的 MCF-7/ADR 细胞内, ADR 荧光波峰右移, 细胞内荧光明显增强。结果提示 GNA 可增强 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 的蓄积。见图 4 和表 1。

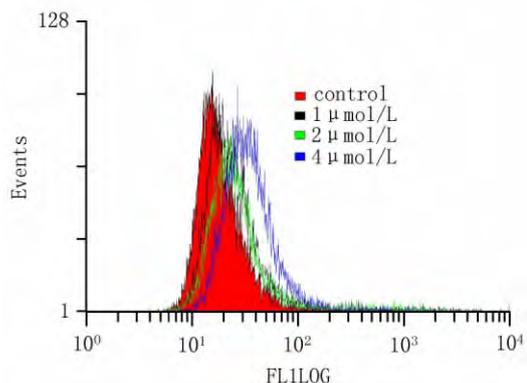


图 4 GNA 对 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 积累的影响

表 1 GNA 对 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 积累的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	荧光强度/%
0 $\mu\text{mol/L}$ GNA	3	58.6 \pm 2.4
1 $\mu\text{mol/L}$ GNA	3	78.5 \pm 2.1**
2 $\mu\text{mol/L}$ GNA	3	83.7 \pm 2.4**
4 $\mu\text{mol/L}$ GNA	3	95.2 \pm 3.6**

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ GNA 比较, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

MDR 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时,对结构和作用机制完全不同的多种抗肿瘤药物产生交叉耐药的现象。MDR 是肿瘤临床化学治疗的一大难点,在乳腺癌的化学治疗中也不例外。MDR 由多种途径诱导,其形成机制相当复杂,其中 P-糖蛋白(permeability-glycoprotein, P-gp)介导的 MDR 是肿瘤细胞产生 MDR 的经典机制,主要表现为 P-gp 高表达,将细胞内化学治疗药物“泵”出细胞外,导致细胞内药物浓度过低。

乳腺癌的治疗主要包括手术、化学治疗、放射治疗和内分泌治疗,其中化学治疗是缓解和治疗乳腺癌的重要辅助性治疗手段。而 MDR 的发生是化学治疗失败的主要原因,是肿瘤治疗的最大障碍,是多种因素多种机制共同作用的结果。

既往研究^[7-9]表明,藤黄中具有抗肿瘤作用的藤黄酸能有效抑制肝癌 SMMC-7721 细胞,胃癌 MGC-803、SGC-7901 细胞,肺癌 SPC-A1 细胞等肿瘤细胞的增殖^[7-9]。1984 年吕归宝^[10]从中药藤黄中分离得到 GNA,根据目前研究表明,GNA 与藤黄酸相比具有作用强、毒性低、稳定性好和抗癌谱广等特点。曲宝玺等^[11]实验表明,GNA 对小鼠白血病 L1210 的抑制作用优于藤黄酸。本实验室近几年来一直观察 GNA 对人肝癌细胞^[12]、鼻咽癌细胞 CNE-1^[13]、人胶质瘤细胞 U251^[14]增殖的抑制作用,并探究其作用机制。

本研究结果表明,GNA 和 ADR 单独应用时均可剂量依赖性地抑制人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 的增殖;当 GNA 与 ADR 联用时,可提高 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 的敏感性;GNA 能明显增加 MCF-7/ADR 细胞内 ADR 含量,并呈现一定的剂量依赖性。因 ADR 是 P-gp 的底物,因此,GNA 对 ADR 的增敏作用可能与 P-gp 有关,但其作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Report of incidence

and mortality in China cancer registries, 2009[J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(1): 10-21.

- [3] 王训翠,朱国旗,程卉,等. 新藤黄酸诱导人胃癌 MGC-803 细胞线粒体途径凋亡的实验研究[J]. 中药材, 2014, 37(1): 95-99.
- [4] 孙美灵,程卉,苏婧婧. 新藤黄酸对人表皮癌细胞 A431 增殖和凋亡的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32(6): 67-70.
- [5] Wang K, Tang Y, Sun M, et al. The mechanism of neogabogic acid-induced apoptosis in human MCF-7 cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2011, 43(9): 698-702.
- [6] Qiao DJ, Tang SJ, Aslam S, et al. UMMS-4 enhanced sensitivity of chemotherapeutic agents to ABCB1-over-expressing cells via inhibiting function of ABCB1 transporter[J]. Am J Cancer Res, 2014, 4(2): 148-160.
- [7] Liu W, Guo QL, You QD, et al. Anticancer effect and apoptosis induction of GNA in human gastric cancer line BGC-823[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(24): 3655-3659.
- [8] Wu ZQ, Guo QL, You QD, et al. GNA inhibits proliferation of human lung carcinoma SPC-A1 cells *in vivo* and *in vitro* and represses telomerase activity and telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the cells. Biol [J]. Pharm Bull, 2004, 27(11): 1769-1774.
- [9] Zhao L, Guo QL, You QD, et al. GNA induces apoptosis and regulates expressions of Bax and Bcl-2 protein in human gastric carcinoma MGC-803 Cells [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(7): 998-1003.
- [10] 吕归宝. 藤黄中新藤黄酸的分离及其结构[J]. 药学报, 1984, 19(8): 636-639.
- [11] 曲宝玺,郝晓阁,李德华. 藤黄 II 号抗癌作用的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 1991, 18(1): 50-52.
- [12] Yan F, Wang M, Li J, et al. Gambogic acid induced mitochondria-dependent apoptosis and referred to Phospho-Erk1/2 and Phospho-p38 MAPK in human hepatoma HepG2 cells [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 33(2): 181-190.
- [13] Yan F, Wang M, Chem H, et al. Gambogic acid mediated apoptosis through the mitochondrial oxidative stress and inactivation of Akt signaling pathway in human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 652(1-3): 23-32.
- [14] Chen HB, Zhou LZ, Mei L, et al. Gambogic acid-induced time- and dose-dependent growth inhibition and apoptosis involving Akt pathway inactivation in U251 glioblastoma cells [J]. J Nat Med, 2012, 66(1): 62-69.

(收稿日期: 2014-09-04)

前列腺炎 I 号对慢性非细菌性前列腺炎大鼠 前列腺组织细胞因子表达的影响

朱 勇^{1,2}, 孙 磊³, 吴云皓¹, 杨 凯¹, 焦刚亮¹, 牛培宁¹, 曾庆琪³

(1. 南京中医药大学研究生院, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省盐城市中医院男科, 江苏 盐城 224000; 3. 江苏健康职业学院, 江苏 南京 210029)

[摘要]目的 探究前列腺炎 I 号治疗慢性非细菌性前列腺炎(chronic nonbacterial prostatitis, CNP)的作用机制。方法 将 70 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组, 模型组, 阳性对照组(前列舒乐颗粒 2.4 g/kg), 前列腺炎 I 号小剂量(10 g/kg)、中剂量(20 g/kg)、大剂量(40 g/kg)组。采用前列腺蛋白注射法复制 CNP 模型。给药 28 d 后, 观察并比较各组大鼠前列腺的组织形态学变化, 以及前列腺组织中白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平。结果 前列腺炎 I 号小、中、大剂量组大鼠前列腺组织的病理分级及前列腺组织中 IL-2 和 IL-6 水平均较模型组显著降低($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$); 前列腺炎 I 号中、大剂量组的作用显著优于前列腺炎 I 号小剂量组($P < 0.01$)。结论 前列腺炎 I 号可剂量依赖地降低 CNP 大鼠前列腺组织的炎症反应程度, 抑制前列腺组织中 IL-2、IL-6 的分泌。

[关键词]慢性非细菌性前列腺炎; 前列腺炎 I 号; 白细胞介素-2; 白细胞介素-6

[中图分类号]R697+.33 [文献标志码]A [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2014.05.023

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是男科最为常见临床疾病之一, 然其病因及发病机制尚不完全明确, 临床治疗效果欠佳, 而中医药治疗 CP 有一定的特色和优势^[1]。前列腺炎 I 号为曾庆琪临床经验方, 对 CP 的治疗有较佳疗效, 并已被申请国家专利^[2]。笔者通过复制慢性非细菌性前列腺炎(chronic

nonbacterial prostatitis, CNP)模型, 观察了前列腺炎 I 号治疗 CNP 的机制, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠 80 只, 体质量(200±20)g, 由江苏大学动物实验中心提供, 生产许可证号 SCXK(苏)2009-0002。

1.2 药物 前列腺炎 I 号: 由萆薢、石菖蒲、乌药、益智仁、威灵仙、冬瓜子、白芷、马鞭草、茯苓、皂角刺、菟丝子、五味子、水蛭组成, 由江苏省中医院制剂部提供; 前列舒乐颗粒: 主要成分为淫羊藿、黄芪、

基金项目:江苏省“六大人才高峰”项目(WS-049)

作者简介:朱勇(1984-),男,硕士,主治医师

通信作者:曾庆琪, zengqq111@126.com

In Vitro Effect of Gambogic Acid on Multidrug-resistant Human Breast Cancer Cells

ZHANG Feng, XIE Chen-ye, CHENG Hui, SU Jing-jing, LI Qing-lin

(Key Laboratory of Xin'an Medicine Jointly Supported by Anhui Province and Ministry of Education, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of gambogic acid (GNA) on multidrug-resistant human breast cancer cells (MCF-7/ADR). **Methods** MTT assay was used to assess the inhibitory effect of GNA, adriamycin (ADR), or a combination of GNA and ADR on the proliferation of MCF-7/ADR cells. Flow cytometry was used to determine the concentration of ADR in MCF-7/ADR cells. **Results** GNA suppressed the proliferation of MCF-7/ADR cells in a dose-dependent manner, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for MCF-7/ADR cells was 12.88 μmol/L at 48 h; GNA increased the sensitivity of MCF-7/ADR cells to ADR at a dose of 4 μmol/L, so that the IC₅₀ of ADR for MCF-7/ADR cells decreased from 80.22 μmol/L to 12.54 μmol/L; GNA also significantly increased the intracellular accumulation of ADR in MCF-7/ADR cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** GNA can significantly increase the sensitivity of MCF-7/ADR cells to ADR at a low dose.

[Key words] breast cancer; MCF-7/ADR; multidrug resistance; gambogic acid; adriamycin