

槐耳浸膏逆转人胃癌耐药细胞多药耐药性的实验研究

徐志远¹,程向东¹,杜义安²,吕航¹,汤加宁¹,张袁骅¹,陈加辉¹

(1.浙江中医药大学附属第一医院,浙江 杭州 310006;

2.浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 体外观察槐耳浸膏对胃癌耐药细胞(SGC-7901/FU)多药耐药性的影响。[方法] CCK-8 法检测 SGC7901/FU 细胞的耐药性;谷胱甘肽(GSH)还原酶循环法检测 SGC-7901/FU 细胞内 GSH 含量的变化;流式细胞仪检测 SGC-7901/FU 细胞的凋亡率。[结果] SGC-7901/FU 细胞内 GSH 含量 $[(13.20 \pm 1.51) \text{ nmol}/10^6 \text{ 细胞}]$ 较 SGC7901 细胞 $[(6.47 \pm 0.85) \text{ nmol}/10^6 \text{ 细胞}]$ 显著增高($P < 0.05$);槐耳浸膏能抑制 SGC7901/FU 细胞增殖,24h、48h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 2.43mg/ml 和 2.04mg/ml;0.1~0.5mg/ml 浓度范围内槐耳浸膏增加 SGC-7901/FU 细胞对 5-Fu、DDP 的敏感性,并降低 GSH 含量;槐耳浸膏与 5-Fu 联用能显著增加 SGC-7901/FU 细胞凋亡率($P < 0.05$)。[结论] 槐耳浸膏能部分逆转 SGC-7901/FU 细胞的耐药性,其机制可能是通过抑制细胞的 GSH 合成、诱导细胞凋亡而实现的。

关键词: 胃肿瘤;化疗耐药;GSH;槐耳

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)02-0129-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.02.B011

An Experimental Study of the Huaier Role in Reversing Multidrug Resistance of Chemo-resistant Gastric Cancer Cells

XU Zhi-yuan¹, CHENG Xiang-dong¹, DU Yi-an², et al.

(1. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China;

2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of huaier on the multidrug resistance(MDR) transformation of chemo-resistant gastric cancer cells(SGC-7901/FU). [Methods] CCK-8 method was used to calculate the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of SGC-7901/FU cells. glutathione reductase recycling assay was used to determine the GSH content of SGC-7901/FU cells. Flow cytometry was used to determine the apoptosis rate of SGC-7901/FU cells. [Results] The level of GSH in SGC-7901/FU cells $[(13.20 \pm 1.51) \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}]$ was significantly higher than that in SGC-7901 cells $[(6.47 \pm 0.85) \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}]$ ($P < 0.05$). Huaier could inhibit the proliferation of SGC-7901/FU cells, the IC_{50} value was 2.43mg/ml and 2.04mg/ml, respectively, after 24h and 48h exposure. The combined used of Huaier, at 0.1~0.5mg/ml concentration, could increase the GSH content and the chemo-sensitivity of SGC-7901/FU cells to DDP and 5-Fu. The value of apoptosis rate increased significantly through simultaneous use of Huaier and 5-Fu ($P < 0.05$). [Conclusion] Huaier could partly reverse the chemoresistance of SGC-7901/FU cells, and the underline mechanism might include inhibition of GSH sythesis and induction of apoptosis.

Subject words: gastric neoplasms; chemoresistance; GSH; Huaier

我国是胃癌高发地区,发病人数约占全球胃癌总数的 46%,化疗在胃癌综合治疗中占有重要地

基金项目: 浙江省中医药重点研究计划(2012ZZ002);浙江省中医药管理局一般项目(2013ZA022,2015ZA090)

通讯作者: 程向东,主任医师,博士;浙江中医药大学附属第一医院胃肠外科,浙江省杭州市上城区邮电路 54 号(310006);E-mail: getfor@vip.sina.com

收稿日期: 2015-11-25; **修回日期:** 2016-01-17

位,而胃癌化疗有效率低,多药耐药(multidrug resistance,MDR)是导致化疗失败的原因之一,也是困扰胃癌治疗疗效的关键性难题。中药在增加化疗敏感性、逆转化疗耐药等方面具有确切的作用,并且由于毒副作用小的特点在临床的应用上具有广阔的前景。我们前期研究已发现槐耳浸膏能显著增加胃癌

细胞对顺铂(DDP)的化疗敏感性^[1],然而槐耳浸膏在逆转胃癌耐药细胞MDR中的作用尚不明确。为此,本课题用槐耳浸膏作用于体外培养的人胃癌耐药细胞SGC-7901/FU,观察其增殖、凋亡及对5-Fu、DDP等敏感性的变化,初步探讨槐耳浸膏对胃癌耐药细胞MDR的逆转效果以及作用机制,以期为进一步临床实验研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株SGC7901购自中国科学院上海细胞库,SGC-7901/FU为SGC7901的多耐药细胞株,用5-Fu逐步诱导其耐药性,为我院肿瘤研究所诱导产生并长期保存;5-Fu购自美南通制药公司;DDP由云南个旧生物药业有限公司提供;GSH检测试剂盒购自南京建成生物工程公司;胎牛血清、RPMI 1640培养基和胰蛋白酶购自Gibco公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)、二甲亚砜(DMSO)购自Sigma公司;槐耳浸膏由启东盖天力药业有限公司提供,将2g槐耳浸膏溶于20ml完全培养基中,用0.22μm微孔滤膜过滤后得到100mg/ml储备液,于-20℃长期储存,临用前解冻,用RPMI 1640培养基稀释到所需浓度^[2]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SGC7901、SGC-7901/FU细胞在含有10%胎牛血清、10 000U/L青霉素和0.1g/L链霉素的RPMI 1640中,置入37℃、5%CO₂的温箱中常规培养传代。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖

取处于指数生长期的MKN45细胞,调整细胞浓度为5×10⁴/ml,以每孔100μl接种于96孔板,培养24h后,弃上清,分别加入含有不同药物浓度的RPMI 1640培养液100μl。根据实验需要继续培养培养24、48h后,以含5g/L MTT的培养液培养4h,弃去培养液,加入150μl的DMSO液,振荡培养板10min,用酶标仪检测吸光值,检测波长为570nm,测量每孔吸收光度值(A)。存活率(fu)=(药物实验组A平均值/细胞对照组A平均值)×100%;抑制率(fa)=1-存活率(fu)。利用中效方程fa/fu=(D/Dm)^m,两边取

对数后呈直线关系:Y=logfa/fu, X=logD, Y=mx+a, logDm=-a/m [其中D为药物剂量,Dm为中效剂量(即抑瘤率为50%时的药物剂量IC₅₀),m为斜率,a为截距]计算出中效抑制浓度。

$$\text{耐药倍数} = \text{IC}_{50}(\text{MCF-7/AMD}) / \text{IC}_{50}(\text{MCF-7})$$

$$\text{逆转倍数} = \text{IC}_{50}(\text{MCF-7/AMD 单用 AMD}) / \text{IC}_{50}(\text{MCF-7/AMD 联用 AMD 和 BSO})$$

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的细胞接种于6孔板,每孔含2×10⁵个细胞,常规条件下培养24h后去上清,加入含有不同浓度槐耳浸膏、5-Fu的培养液2ml。设置空白对照组。继续培养24h后,常规消化、离心收集细胞,制成单细胞悬液。检测凋亡:加入结合缓冲液100μl和FITC标记的Annexin V(20μg/ml)10μl,室温避光30min,再加入PI(50μg/ml)5μl,避光反应5min后,加入结合缓冲液400μl,立即用流式细胞仪进行定量检测。阴性对照组不加Annexin V和PI。根据FITC和PI荧光作双参数散点图,可获得由4个象限组成的双参数图。左下象限为活细胞:Annexin V(-),PI(-);右下象限为早期凋亡细胞FITC(+),PI(-);右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞:FITC(+),PI(+);左上象限为细胞收集过程中产生的坏死细胞。

1.2.4 细胞内GSH含量测定(GSH还原酶循环法)

取对数生长期的细胞以2×10⁸/L接种到25ml培养瓶中,5ml/瓶;细胞贴壁24h后,每一浓度各设3瓶,每瓶加入不同浓度的槐耳1ml;培养24h后收集细胞,加100μl 10mmol/L盐酸;反复冻融3次,破碎细胞;10 000rpm/min离心5min;取上清液100μl加50μl 10%磺基水杨酸混匀,去蛋白;10 000rpm/min离心5min;取上清液按GSH测定试剂盒操作说明;用752分光光度计412nm处、0.5cm光径比色测光密度值(D)。GSH含量(nmol/10⁶细胞)计算公式为:

$$\text{GSH}(\text{nmol}/10^6 \text{ 细胞}) = \frac{\text{测定管D值} - \text{测定空白管D值}}{\text{标准管D值} - \text{空白管D值}} \times \text{标准管浓度}(0.5\text{mmol/L}) / \text{细胞数}(L^{-1})$$

1.2.5 统计学处理

应用SPSS12.0统计软件分析,数据以均数±标准差表示,两组间连续变量的比较采用独立样本t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

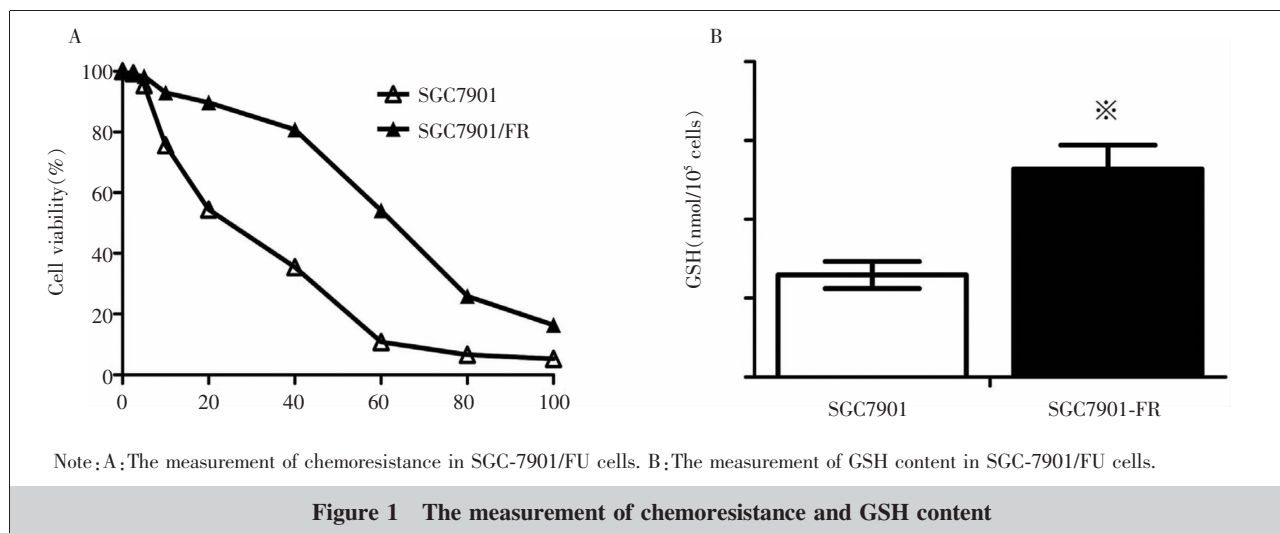


Figure 1 The measurement of chemoresistance and GSH content

2 结果

2.1 SGC-7901/FU 细胞的耐药特性及 GSH 的变化

5、10、20、40、60、80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 5-Fu 作用 48h 对 SGC7901、SGC-7901/FU 细胞均有明显的抑制作用,SGC-7901/FU 的 IC_{50} 值为 $(62.4 \pm 6.47) \mu\text{g/ml}$, 显著高于 SGC7901 ($P < 0.05$) 细胞,SGC-7901/FU 的耐药倍数为 2.6 倍(Figure 1A)。SGC-7901/FU 细胞内 GSH 含量 $[(13.20 \pm 1.51) \text{nmol}/10^6 \text{ 细胞}]$ 较 SGC7901 细胞 $[(6.47 \pm 0.85) \text{nmol}/10^6 \text{ 细胞}]$ 显著增高($P < 0.05$)(Figure 1B)。

2.2 槐耳浸膏对 SGC-7901/FU 细胞增殖的影响

结果显示 1、2、4、8mg/ml 浓度的槐耳浸膏作用 24h 及 48h 时, 均能显著抑制 SGC-7901/FU 细胞增殖($P < 0.05$), 且药物浓度越大、作用时间越长, 抑制率越高, 呈浓度和时间依赖性 (Figure 2), 其作用 24h、48h 的 IC_{50} 值分别为 2.43mg/ml 和 2.04mg/ml。而 0.25、0.5mg/ml 浓度的槐耳浸膏对 SGC-7901/FU 细胞无明显抑制作用。

2.3 槐耳浸膏对 SGC-7901/FU 细胞 MDR 的逆转作用

在 0.1~0.5mg/ml 浓度范围内, 槐耳浸膏对 SGC-7901/FU 细胞增殖无显著抑制作用, 与 5-Fu、DDP 联合用药时, 可使 SGC-

7901/FU 细胞对 5-Fu、DDP 的敏感性增加、 IC_{50} 均明显下降, 5-Fu 和 DDP 逆转倍数分别为 1.23 倍、1.31 倍、1.74 倍、2.07 倍、1.95 倍和 1.21 倍、1.26 倍、1.63 倍、1.35 倍、1.87 倍(Table 1)。

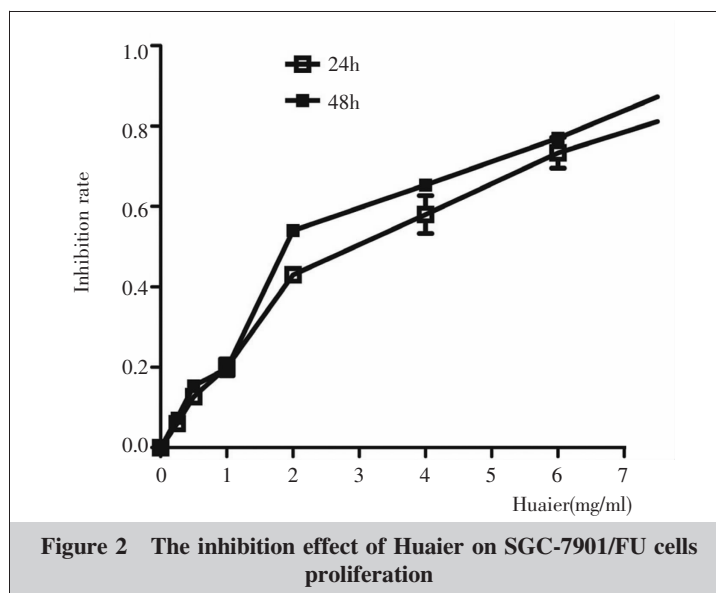


Figure 2 The inhibition effect of Huaier on SGC-7901/FU cells proliferation

Table 1 The reversal role of Huaier on SGC-7901/FU chemotherapeutic resistance

Huaier (mg/ml)	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml})$		Reversal multiple	
	DDP	5-Fu	DDP	5-Fu
0	1.42 $\pm$ 0.21	64.57 $\pm$ 5.51		
0.1	1.17 $\pm$ 0.11	52.12 $\pm$ 1.39	1.21	1.23
0.2	1.12 $\pm$ 0.24	49.19 $\pm$ 2.52	1.26	1.31
0.3	0.87 $\pm$ 0.13	37.18 $\pm$ 2.79	1.63	1.74
0.4	1.05 $\pm$ 0.15	31.12 $\pm$ 1.25	1.35	2.07
0.5	0.76 $\pm$ 0.09	33.08 $\pm$ 2.08	1.87	1.95

2.4 槐耳浸膏对肿瘤细胞内 GSH 合成的影响

0.1、0.2、0.4、0.5mg/ml 浓度槐耳浸膏作用 SGC-7901/FU 细胞 24h 后, 细胞内 GSH 含量分别下降 25.1%、24.1%、34.1% 和 34.4%, 与对照组细胞内 GSH 含量相比较均有显著性差异($P<0.05$)(Figure 3)。

2.5 槐耳浸膏对 SGC-7901/FU 细胞凋亡的影响

流式细胞仪分析结果发现用 10 μ g/ml 的 5-Fu 处理 SGC-7901/FU 细胞时, 如果分别加入 0.2、0.4、0.5mg/ml 浓度槐耳浸膏作用 24h, 细胞凋亡率分别为 2.1 $\pm$ 0.3、4.3 $\pm$ 0.4、8.9 $\pm$ 0.7, 均显著高于对照组($P<0.05$) (Figure 4)。

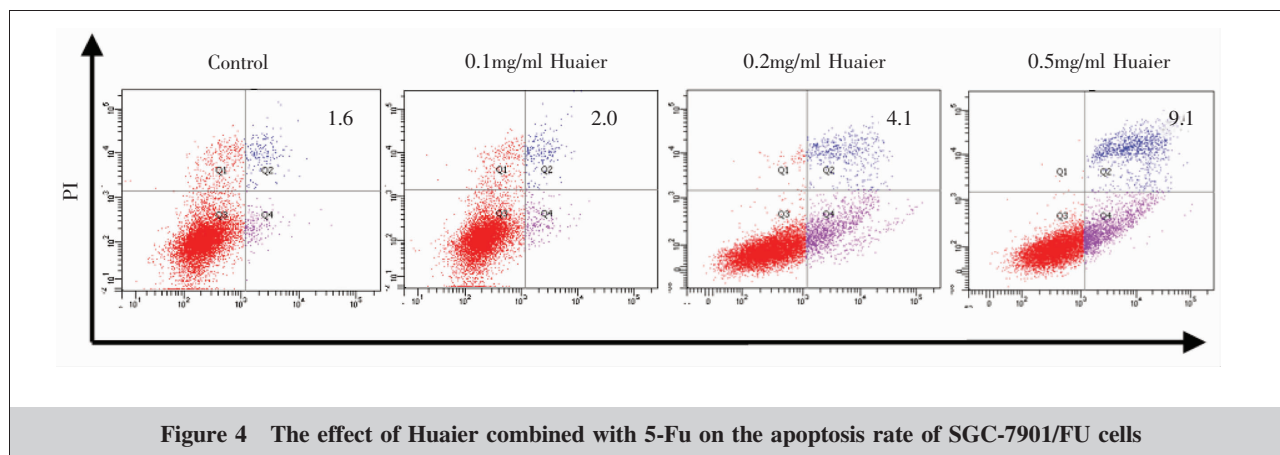
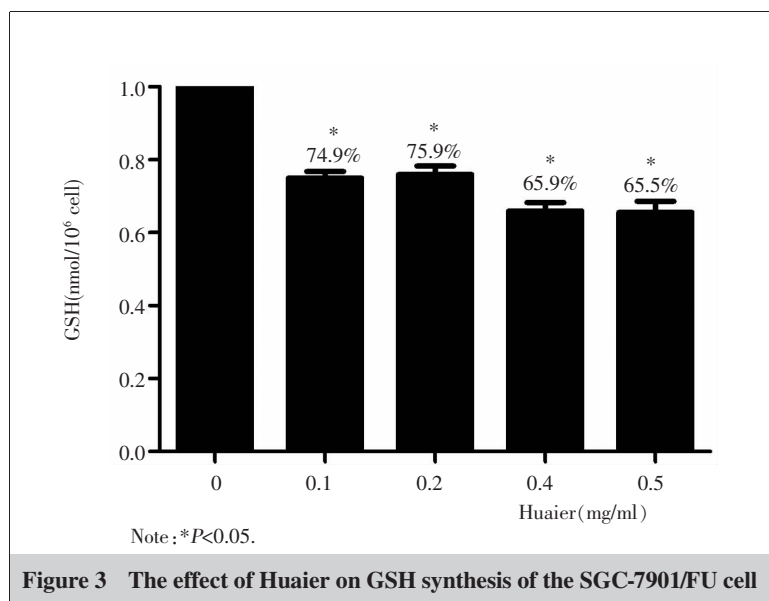
3 讨 论

中药是抗癌新药开发的丰富资源, 体内外研究

均证实部分中药(单体或有效成分)与化疗药物存在协同增效作用。槐耳浸膏为槐耳真菌的热水提取物, 前期研究提示具有较好的抗肿瘤效果, 其机理可能与增强机体免疫功能、直接杀伤肿瘤细胞、诱导肿瘤细胞凋亡及调节细胞周期、逆转化疗耐药等有关。本课题组前期研究已证明槐耳浸膏能抑制胃癌细胞的增殖, 并增加其对顺铂等化疗药物的敏感性^[1], 但它在逆转胃癌化疗耐药中的作用尚不明确。本研究旨在进一步研究槐耳浸膏能否逆转胃癌耐药细胞 SGC-7901/FU 的 MDR。

本研究提示槐耳浸膏能通过直接抑制细胞增殖、增加化疗药物敏感性进而逆转胃癌耐药细胞 SGC-7901/FU 的 MDR。目前, 已有较多的研究报道了槐耳浸膏的抗肿瘤作用, 包括抑制胃癌、肝癌、乳腺癌等细胞的增殖等, 但关于其对耐药细胞增殖的影响研究较少。本研究提示 1~8mg/ml 浓度的槐耳浸膏作用 24h 及 48h 时, 均能显著抑制 SGC-7901/FU 细胞增殖, 且抑制率呈浓度和时间依赖性, 这提示槐耳浸膏对胃癌耐药细胞的增殖也有直接抑制作用。同时, 本研究还显示 0.1~0.5mg/ml 浓度范围的槐耳浸膏对 SGC-7901/FU 细胞增殖无显著抑制作用, 但可使其对 5-Fu、DDP 的敏感性增加。

多药耐药形成机制相当复杂, 主要机制之一是肿瘤细胞对抗癌药物的主动外排。谷胱甘肽解毒系统由谷胱甘肽(GSH)和一系列与其相关的酶如谷胱甘肽转移酶(GSTs)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)构成, 是机体对抗不良环境(如射线、毒性



物质)的天然防御系统。研究表明,在MDR发生过程中,多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein,MRP)通过共转运机制将游离的GSH和化疗药物共同泵出胞外从而加速细胞内药物排出,降低药物浓度,产生对化疗药物的耐药^[3]。许多肿瘤细胞耐药性的获得常伴有细胞内GSH水平的显著升高。本课题组前期研究也发现GSH的表达水平与胃癌根治术后辅助化疗的有效性有关^[4]。本研究进一步研究发现胃癌耐药株SGC-7901/FU中GSH含量显著高于SGC7901细胞。

抑制GSH活性能有效逆转肿瘤化疗耐药^[5]。例如BSO是一种人工合成的氨基酸,它是GSH合成限速酶 γ -谷氨酰-半胱氨酸合成酶(γ -GCS)的强效抑制剂,能阻止了谷氨酸与半胱氨酸合成二肽,进而抑制还原型GSH合成,引起GSH缺乏。同时由于细胞内GSH含量降低,使GST不能催化谷胱甘肽与亲脂性细胞毒药物结合,药物外排减少,从而增强化疗药物的细胞毒性作用,达到逆转MDR效果^[6]。为进一步研究槐耳浸膏逆转胃癌化疗耐药的机制,本研究分析了槐耳浸膏对GSH浓度的影响,结果发现槐耳浸膏在一定浓度范围内能明显降低SGC-7901/FU细胞内GSH含量,而对敏感细胞内GSH含量影响相对较小,这说明槐耳浸膏对耐药的逆转作用与降低细胞内GSH含量有关。

槐耳浸膏增加化疗耐药的机制还可能与诱导耐药细胞凋亡有关。薛丹青等^[7]研究发现槐耳浸膏能诱导乳腺癌细胞耐三苯氧胺MCF-7/R的凋亡进而逆转其三苯氧胺耐药。我们的前期研究提示槐耳浸膏与DDP联用能显著增加胃细胞的凋亡率,并诱导细胞阻滞于G₀/G₁期。本研究提示槐耳浸膏能使SGC-7901/FU细胞凋亡率明显升高和而坏死细胞比例无明显变化,提示槐耳浸膏逆转SGC-7901/FU细胞的耐药性可能与诱导凋亡细胞凋亡有关。

综上所述,槐耳浸膏不仅能直接抑制胃癌耐药细胞SGC-7901/FU的增殖,还能增加其对化疗的敏

感性、逆转MDR,而这种逆转作用可能是通过降低细胞内GSH含量、增强对细胞凋亡而实现的。

参考文献:

- [1] Wang LJ,Xie HX,Xu ZY,et al. The effect of combined used of Huaier and DDP on the proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line MKN45[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine,2015,30(3):868-871. [汪丽菁,谢华夏,徐志远,等.槐耳浸膏增加人胃腺癌细胞MKN45对顺铂敏感性研究[J]. 中华中医药杂志,2015,30(3):868-871.]
- [2] Powell CB,Fung P,Jackson J et al. Aqueous extract of herba Scutellaria barbatae,a chinese herb used for ovarian cancer,induces apoptosis of ovarian cancer cell lines[J]. Gynecol Oncol,2003,91:332-340.
- [3] Liu Y,Zhu Z,Cai H,et al. SKI-II reverses the chemoresistance of SGC7901/DDP gastric cancer cells[J]. Oncol Lett,2014,8(1):367-373.
- [4] Yu P,Cheng X,Du Y. Significance of MDR-related proteins in the postoperative individualized chemotherapy of gastric cancer[J]. J Cancer Res Ther,2015,11(1):46-50.
- [5] Liu SQ,Xu CY,Qin MB. Ginkgo biloba extract enhances chemotherapy sensitivity and reverses-chemoresistance through suppression of the KSR1-mediated ERK1/2 pathway in gastric cancer cells [J]. Oncol Rep,2015,33(6):2871-2882.
- [6] Wu CS,Jin WS,Tai DJ,et al. Effects of BSO on chemosensitivity of gastric carcinoma cell [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui,2013,48(9):1031-1036.[吴成四,金问森,台德军,等.BSO对人胃腺癌SGC7901细胞化疗敏感性的影响[J].安徽医科大学学报,2013,48(9):1031-1036.]
- [7] Xue DQ,Ling LJ,Zhao Y,et al. Experimental study on reversal of drug-resistance of human breast cancer cell line MCF-7 by Huaier fungi extract in vitro[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery,2010,27 (11):1663-1665.[薛丹青,凌立君,肇毅,等.槐耳浸膏体外逆转人乳腺癌细胞MCF-7耐三苯氧胺的研究[J]. 中华实验外科杂志,2010,27(11):1663-1665.]