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],张袁骕[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±1.51) nmol/10^6 细胞]较 SGC7901 细胞[(6.47±0.85) nmol/10^6 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。

主题词: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-yuan[1], CHENG Xiang-dong[1], DU Yi-an[2], 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±1.51)nmol/10^6 cells] was significantly higher than that in SGC-7901 cells [(6.47±0.85)nmol/10^6 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 simutaneous 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

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

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

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%CO_2 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 5×10^4/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 IC_{50}),m 为斜率,a 为截距]计算出中效抑制浓度。

耐药倍数= IC_{50}(MCF-7/AMD)/IC_{50} (MCF-7)

逆转倍数= IC_{50} (MCF-7/AMD 单用 AMD)/ IC_{50} (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 2×10^5 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)

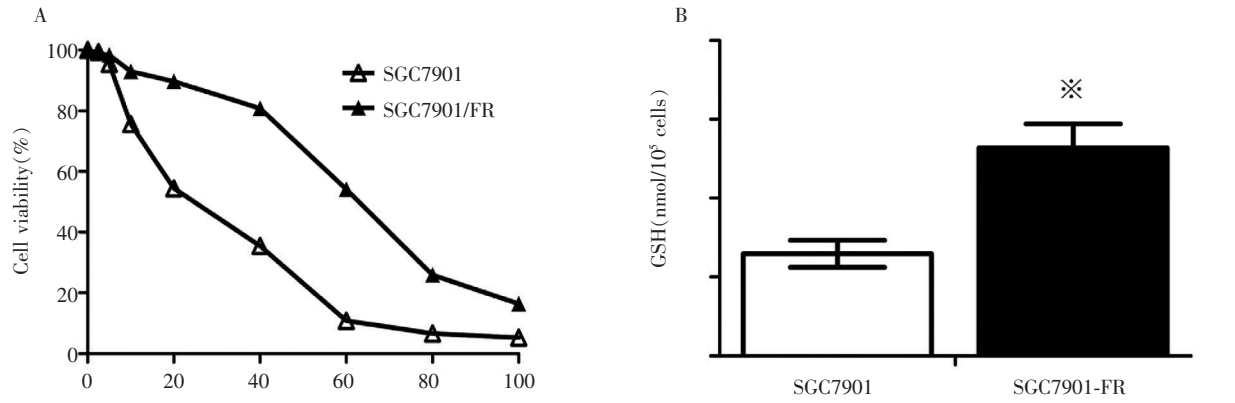
取对数生长期的细胞以 2×10^8/L 接种到 25ml 培养瓶中,5ml/瓶;细胞贴壁 24h 后,每一浓度各设 3 瓶,每瓶加入不同浓度的槐耳 1ml;培养 24h 后收集细胞,加 100μl 10mmol/L 盐酸;反复冻融 3 次,破碎细胞;10 000rpm/min 离心 5min;取上清液 100μl 加 50μl 10%磺基水杨酸混匀,去蛋白;10 000rpm/min 离心 5min;取上清液按 GSH 测定试剂盒操作说明;用 752 分光光度计 412nm 处、0.5cm 光径比色测光密度值(D)。GSH 含量(nmol/10^6 细胞)计算公式为:

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

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。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



Note:A:The measurement of chemoresistance in SGC-7901/FU cells. B:The measurement of GSH content in SGC-7901/FU cells.

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、80μg/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±6.47)μg/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±1.51)nmol/10^6 细胞]较 SGC7901 细胞[(6.47±0.85)nmol/10^6 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)。

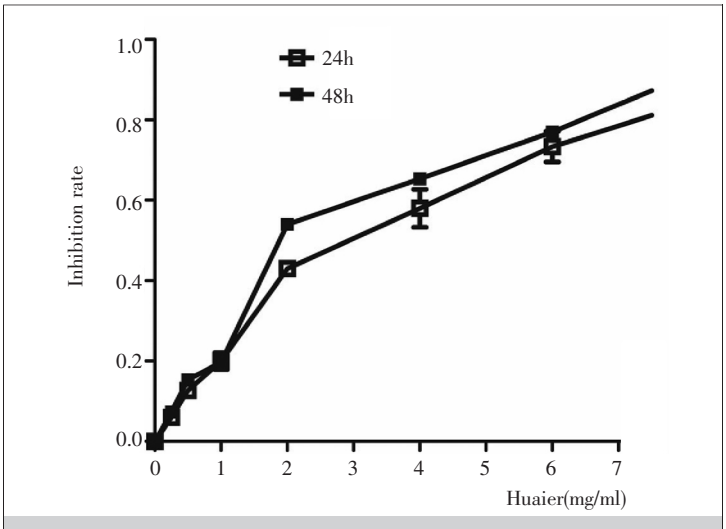


Figure 2 The inhibition effect of Huaier on SGC-7901/FU cells proliferation

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

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

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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 10μg/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±0.3、4.3±0.4、8.9±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

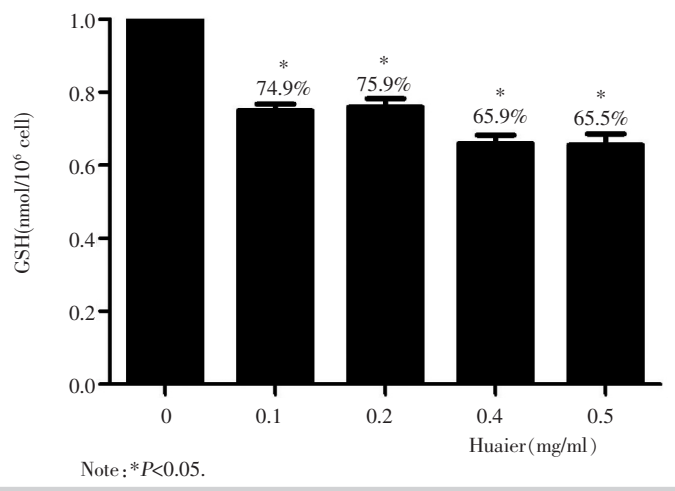


Figure 3 The effect of Huaier on GSH synthesis of the SGC-7901/FU cell

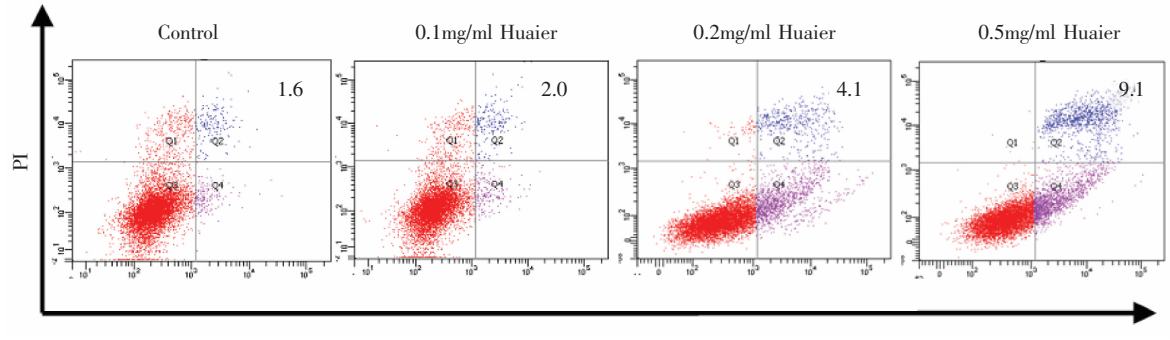


Figure 4 The effect of Huaier combined with 5-Fu on the apoptosis rate of SGC-7901/FU cells

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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 G_0/G_1 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.]

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net