

苦参素通过调控 MRP1 表达提高多柔比星对 人肝癌耐药裸鼠移植瘤的抑制作用^①

冯巍巍¹, 黎梨¹, 黄赞松^{1,2}②, 邓志华², 邓凤莲¹, 廖俊¹, 杨哲¹, 李建基¹

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000 E-mail: 22906547@qq.com;

2. 广西肝胆疾病临床医学研究中心, 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 探讨苦参素(oxymatrine, OM)是否能通过调控多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein1, MRP1)表达提高多柔比星(doxorubicin, DOX)对人肝癌耐药裸鼠移植瘤的抑制作用。**方法** 选用入肝癌多柔比星耐药 HepG2/ADM 细胞在裸鼠腋下接种, 创建裸鼠皮下移植瘤模型。将 20 只雌性裸鼠随机分成 4 组: NS 组(对照组)、OM 组(苦参素组)、DOX 组(多柔比星组)、OM+DOX 组(多柔比星+苦参素组)。药物使用 14 d 后, 取出瘤体, 用公式计算肿瘤体积, RT-PCR 法检测 MRP1 之 mRNA 表达, 免疫组化法检测 MRP1 之蛋白表达, 各组进行对比。**结果** 药物使用 14 d 后, 与 NS 组相比, OM+DOX 组出现 MRP1 mRNA 与蛋白表达降低($P < 0.05$), 抑瘤作用最佳。与 NS 组相比, OM 组也出现 MRP1 mRNA 与蛋白表达降低($P < 0.05$), 抑瘤效果仅次于联合组。然而, 与 NS 组相比, DOX 组的 MRP1 mRNA 与蛋白表达上调($P < 0.05$), 对移植瘤的抑制效果较差, 二者体积对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 苦参素能通过调控 MRP1 mRNA 及蛋白表达, 从而提高多柔比星对人肝癌耐药裸鼠移植瘤的抑瘤作用。

关键词: 苦参素; 多柔比星; 肝肿瘤; 移植, 异种; 小鼠, 裸; MRP1; 抗药性, 肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2018)01-0008-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.01.003

Oxymatrine enhances inhibitory effects of doxorubicin on human drug-resistant hepatocellular carcinoma xenograft in nude mice via regulating MRP1 expression

Feng Weiwei¹, Li Li¹, Huang Zansong¹, Deng Zhihua², Deng Fenglian¹,
Liao Jun¹, Yang Zhe¹, Li Jianji¹

(1. Graduate School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi
E-mail: 22906547@qq.com; 2. Guangxi Clinical Medical Research Center for
Liver and Gallbladder Diseases, Affiliated Hospital of Youjiang Medical
University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi)

Abstract: **Objective** To explore whether oxymatrine can enhance the inhibitory effect of doxorubicin (DOX) on human drug-resistant hepatocellular carcinoma xenograft in nude mice via regulating MRP1 expression. **Methods** The subaxillary skins of nude mice were subcutaneously inoculated with human adriamycin-resistant hepatocellular carcinoma strains HepG2/ADM cells to establish subcutaneously tumor xenograft models in nude mice. Twenty female nude mice were randomly allocated to 4 groups: normal saline control group (NS group), doxorubicin group (DOX group), oxymatrine group (OM group), doxorubicin + oxymatrine group (OM+DOX group). After the use of the drugs for 14 days, the tumor bodies were taken out. The formula method was applied to calculate the tumor volumes, RT-PCR assay was applied to detect MRP1 mRNA levels, and immunohistochemical method was used to measure the protein expressions of MRP1. The obtained

① 基金项目: 广西自然科学基金资助项目(桂财教 2014GXNSFAA118143); 广西科技基地与人才专项(广西肝胆疾病临床医学研究中心研究课题)(桂科 AD17129035); 2017 年度广西医药卫生自筹经费计划课题(桂卫 Z20170224); 2017 年广西研究生教育创新计划项目(桂学位 YCSW2017214); 2016 年广西研究生教育创新计划项目(桂学位 YCSW 201601004); 广西高校右江流域特色民族医药研究重点实验室开放课题(kfkt2016025)

② 通信作者, E-mail: 1019846481@qq.com

measurements were compared among the four groups. **Results** After the use of the drugs for 14 days, the MRP1 mRNA and protein expressions in the OM+DOX group were lower than those in the NS group ($P < 0.05$); the OM+DOX group had the strongest inhibitory effect on tumor xenografts in the four groups. The mRNA and protein expressions in the OM group were lower than those in the NS group ($P < 0.05$); the OM group had the inhibitory effect on tumor xenografts that was second only to the OM+DOX group. Nevertheless, the mRNA and protein expressions in the DOX group were higher than those in the NS group ($P < 0.05$). Comparison of tumor xenografts' volumes between the two groups showed that there was no statistically significant difference ($P > 0.05$), so the DOX group had weaker inhibitory effect on tumor xenografts.

Conclusion Oxymatrine can enhance the inhibitory effect of doxorubicin on human drug-resistant hepatocellular carcinoma xenograft in nude mice via regulating MRP1 mRNA and protein expression.

Key words: oxymatrine; doxorubicin; liver neoplasms; transplantation, heterologous; mice, nude; MRP1; drug resistance, neoplasm

作为全世界常见的高度恶性肿瘤,原发性肝癌进展迅速,预后较差^[1],容易复发与转移。其在全世界肿瘤致死率中高居第二位,发病率则居第六位^[2],在我国发病率逐步提高,致死率也相当高^[3],极具威胁性。尽管现有外科根治手术、肝移植、分子治疗、消融疗法、栓塞疗法、放疗等肝癌治疗手段,但疗效有限^[4]。当前化学治疗依然是肝癌治疗中不可或缺的环节,费用适当,适用性宽泛,易于被患者接受。不过由于耐药性,化疗药疗效一般^[5]。多柔比星(阿霉素)是肝癌治疗中常用的化疗药,不过治疗后易复发,易产生耐药性,另有毒性作用与不良反应,研究新的治疗策略已成为当务之急。通过调控耐药基因来提高化疗药效果可能是治疗肝癌的重要途径之一。苦参素,提纯自我国传统中药苦参与广豆根,数年来已有研究表明其具有治疗肝癌,改善病患生存质量的作用。多药耐药相关蛋白1(MRP1)是一种重要的肝癌耐药蛋白。本研究拟通过建立裸鼠人肝癌皮下移植瘤模型并分组干预,来探讨苦参素是否能通过调控MRP1表达提高多柔比星对人肝癌耐药细胞HepG2/ADM裸鼠皮下种植瘤的抑瘤作用,从而为临床用药提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与实验动物 HepG2/ADM细胞购自广州吉妮欧生物科技有限公司,由本校科研中心保存于液氮中。20只4周大SPF级BALB/c-nu雌裸鼠,来自湖南史莱克景达实验动物有限公司,许可证:SCXK(湘)2016-002,质量12~13g,在SPF级实验室中饲养。

1.2 主要试剂 苦参素注射液:正大天晴药业集团股份有限公司(批号:国药准字H20057480);注射用盐酸多柔比星:深圳万乐药业有限公司(批号:国药准字H44024359);PBS、RPMI-1640细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶消化液来自索莱宝公司,一抗选用博士德生物工程有限公司产品(CATALOG NO. BA0567, LOT NO. 11P91,规格:200 μg/ml,0.1 ml),荧光定量RT-PCR所需的9767、RR036A、RR820A试剂盒、引

物合成选用TaKaRa公司。

1.3 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 HepG2/ADM细胞在含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基中培育、消化、传代后收集指数生长期该细胞,使用PBS调节密度为 1×10^9 /ml,按照每只0.2 ml种植到各鼠右侧或左侧腋下^[6],接种后7 d左右可见瘤体长成,10 d左右其增至约0.6 mm,建模成功,成瘤率100%。

1.4 动物分组及处理 按随机原则,将20只建模后裸鼠平均编入四组:对照组(NS组)、多柔比星组(DOX组)、苦参素组(OM组)、多柔比星+苦参素组(OM+DOX组),采用尾静脉注射法,连续两周,每周连续五天注射。NS组裸鼠给予生理盐水 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;DOX组裸鼠给予DOX $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;OM组裸鼠给予OM $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;OM+DOX组裸鼠给予 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 多柔比星和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 苦参素。用药后第14 d脱颈法处理各裸鼠,取瘤,待用免疫组织化学方法检测的瘤组织用10%甲醛固定,用RT-PCR检测的瘤组织则保存在液氮中。

1.5 计算瘤体积 建模成功后第1 d、3 d、6 d、9 d、12 d、14 d用精密游标卡尺量移植瘤大小。瘤体积(tumor volume, TV)的计算公式为: $TV = 0.5 \times a \times b^2$ (a、b即长、宽)。

1.6 免疫组织化学检测及判定标准 取出部分瘤体使用4%甲醛固定,蜡块包埋与切片后染色。结果判定标准:在细胞质或/和细胞膜出现黄色、棕色或褐色颗粒的细胞为MRP1阳性细胞,每个样本切片在400倍光镜下随机选取1个视野,四组共20个视野,用IPP 6.0(Image-Pro Plus)图像分析系统扫描后,取各自的视野积分光密度值(IOD)进行对比。

1.7 荧光定量RT-PCR检测 mRNA表达 使用9767、RR036A试剂盒提取总RNA并逆转录成cDNA。按RR820A试剂盒说明进行两步法扩增,然后溶解、冷却。MRP1引物由TaKaRa公司设计合成,F:GTCTCGTTAGAGCCCAAAGTGGAA, R:GTTTGAAGTCGGCGCGTA。内参H-GAPDH,F:GCA

CCGTCAAGGCTGAGAAC,R:TGGTGAAGACGC-CAGTGGGA。计算： ΔCt (目标基因 - 内参基因)， $\Delta\Delta Ct$ (样品 ΔCt - 空白对照样品 ΔCt)，结果是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.8 统计学方法 数据用 SPSS 24.0 软件分析，($\bar{x} \pm s$) 代表计量资料，多样本均数比较用 one-way ANOVA；各组两两比较方差齐时用 LSD 法，方差不齐用 Dunnett's T3 法， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。然后运用 GraphPad Prism 5.0 绘图分析。

2 结果

2.1 各组耐药移植瘤体积对比 因方差具有齐性，采用 LSD 法组间两两比较。干预 14 d 后体积对比结果见表 1、图 1、图 2。DOX 组中，单独使用 DOX 对耐多柔比星细胞株移植瘤效果较差，DOX 组与 NS 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，其他组之间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。联合使用 OM 与 DOX 后，OM+DOX 组对肿瘤的生长抑制作用最好；OM 组中，单独使用 OM 的抑制效果次之。这两组抑制效果均明显好于 DOX 组与 NS 组 ($P < 0.05$)。

表 1 干预 14 d 后各组瘤体积比较

组别	用药剂量 (mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	瘤体积 ($\bar{x} \pm s, \text{cm}^3$)
OM 组	100	2.09 ± 0.29 ^{adf}
DOX 组	6	4.18 ± 1.40 ^{bef}
OM+DOX 组	OM 100+DOX 6	0.70 ± 0.08 ^{acd}
NS 组	10	4.17 ± 1.10 ^{cef}
F		17.83
P		<0.05

注：与 NS 组相比，a: $P < 0.05$, b: $P > 0.05$ ；与 OM 组相比，c: $P < 0.05$ ；与 DOX 组相比，d: $P < 0.05$, e: $P > 0.05$ ；与 OM+DOX 组相比，f: $P < 0.05$

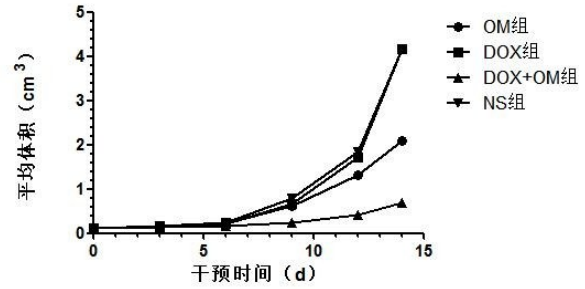


图 2 各组裸鼠瘤体生长曲线

2.2 各组免疫组化结果对比 MRP1 阳性染色多数在肝癌细胞胞浆内(部分在包膜)。染色呈棕黄色或褐色，在组织视野中出现片状、弥漫分布。经过 IPP 6.0 扫描后，取各自的视野积分光密度值(IOD)进行对比。得出 IOD 值后用 GraphPad Prism 5.0 画图对比，后 SPSS 24.0 处理数据。因方差具有齐性，使用 LSD 法，四组之间成对对比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。表 2、图 3、图 4 可见 DOX 组与 NS 组蛋白表达较高，使用 OM 的 OM 组和 OM+DOX 组中 MRP1 蛋白表达明显降低。

表 2 各组 MRP1 蛋白表达积分光密度值 IOD 对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IOD
OM 组	31.41 ± 1.33 ^{acd}
DOX 组	77.83 ± 3.27 ^{abd}
OM+DOX 组	40.40 ± 7.17 ^{abc}
NS 组	63.19 ± 3.40 ^{bcd}
F	119.07
P	<0.05

注：与 NS 组相比，a: $P < 0.05$ ；与 OM 组相比，b: $P < 0.05$ ；与 DOX 组相比，c: $P < 0.05$ ；与 OM+DOX 组相比，d: $P < 0.05$

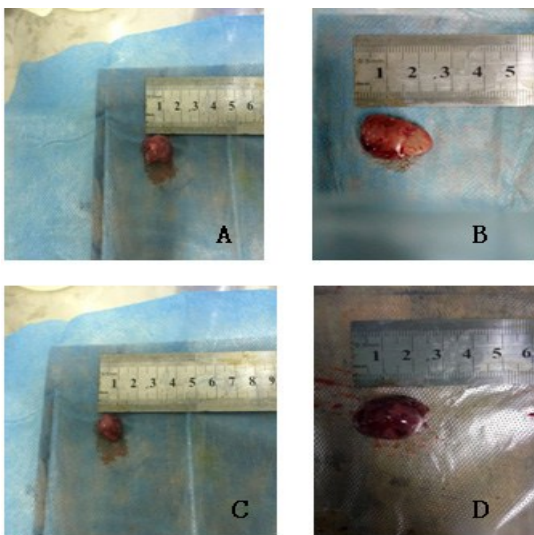


图 1 各组裸鼠移植瘤大小对比

注：A 为 OM 组，B 为 DOX 组，C 为 OM+DOX 组，D 为 NS 组

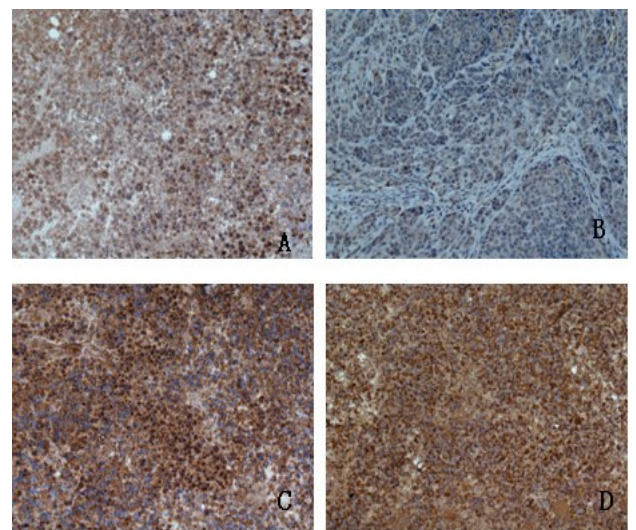


图 3 各组 MRP1 免疫组化图(400 倍光镜下)

注：A 为 DOX+OM 组，B 为 OM 组，C 为 NS 组，D 为 DOX 组

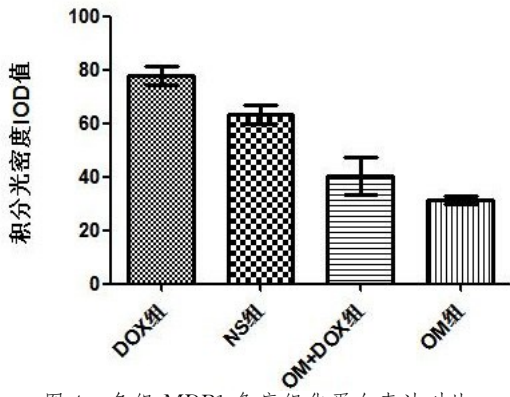


图 4 各组 MRP1 免疫组化蛋白表达对比

2.3 RT-PCR 法检测 MRP1 mRNA 表达结果 方差 不齐用 Dunnett's T3 法, 四组之间两两对比有统计学 意义($P < 0.05$)。表 3、图 5 可见 DOX 组与 NS 组 mRNA 表达较高, 在 OM 组和 OM+DOX 组中, 使用 OM 后可明显降低 MRP1 mRNA 表达。

表 3 MRP1 以内参基因为标准的各组 mRNA 相对表达量对比

组别	mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)
OM 组	0.51 ± 0.01 ^{acd}
DOX 组	1.08 ± 0.02 ^{abd}
OM+DOX 组	0.56 ± 0.02 ^{abc}
NS 组	1.00 ^{bcd}
F	1662.13
P	<0.05

注: 与 NS 组相比, a: $P < 0.05$; 与 OM 组相比, b: $P < 0.05$; 与 DOX 组相比, c: $P < 0.05$; 与 OM+DOX 组相比, d: $P < 0.05$

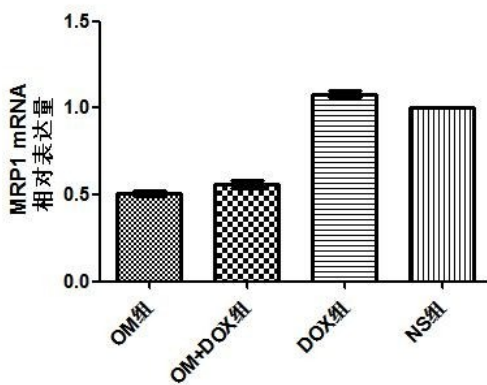


图 5 各组 MRP1 mRNA 相对表达量对比

3 讨论

肝癌患者多在中晚期被发现, 手术机会不大, 唯有 采用化疗方法, 但大多数化疗失败与多药耐药有关。阿 霉素是临床常用的化疗药物, 尽管初期有一定的疗

效, 不过由于毒性作用与不良反应, 加上耐药反应, 且 单独使用阿霉素并不能完全消灭肝癌细胞, 故寻找新的 治疗方案迫在眉睫。

MRP1 耐药蛋白在多种肿瘤中均是重要的耐药指 标, 它是一种跨膜转运蛋白, 主要通过外排泵机制来改 变化疗药在胞内分布情况, 引发耐药。MRP 蛋白在不 同阶段不同类型的肝癌中都出现一定程度的表达^[7]。

通过某些方式调控 MRP 表达可逆转肝癌细胞多 药耐药作用。蒋明东等^[8]发现, 超声造影剂和超声辐 射可有效降低 MRP 在裸鼠 GY/CDDP 细胞株移植瘤 中的表达, 逆转多药耐药。叶家才等^[9]认为, 亚砷酸结 合电离辐射可在 HepG2 细胞中使 MRP1 表达下降, 提高化疗效果。Fouquet 等^[10]发现, SLAMF3 (Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family member 3) 可特异性降低 MRP1 表达, 提高化疗药敏感性。侯华新等^[11]发现, 板蓝根高级不饱和脂肪酸在与多柔 比星联合使用时能降低 MRP 蛋白表达, 逆转多柔比 星耐药株耐药。

苦参可能具有预防肝癌、抗肝癌、逆转多药耐药作 用。我们已进行了较多前期研究, 证实了苦参素可抑 制肝癌细胞增殖, 促其凋亡^[12], 可抑制肝癌血管形 成^[13], 增强化疗药作用, 减少不良反应发生^[14]。但确 切机制还值得探讨。此外, 苦参碱可降低顺铂耐药细 胞 MRP 蛋白表达, 逆转顺铂耐药^[15]。湛学军等^[16]发 现, 苦参素能增强肝癌细胞对 5-Fu 的敏感性。Liu 等 认为, 苦参素可升高 5-FU 效果, 通过激活 caspase 3 抑制肝癌细胞生长, 促进其凋亡^[17-18]。

然而, 迄今为止, 观察使用苦参素在体内或体外对 肝癌耐药细胞株的 MRP1 表达调控作用, 逆转多药耐 药的国内外相关研究均较少。在前期体外研究中, 苦 参素可下调 ABCB1 蛋白表达来逆转 HepG2/ADM 耐 药^[19]。翟宝进等^[6]认为, 耐药株 HepG2/ADM 细胞 成瘤高, 注射至体内后不影响对 ADM 耐药性, 机制与 MRP 表达提高有关。故本体内实验中, 采用人肝癌耐 药株 HepG2/ADM 细胞裸鼠腋下接种法, 建立裸鼠耐 药株皮下移植瘤模型, 进一步观察其对 HepG2/ADM 细胞株的 MRP1 表达调控, 是否具备逆转抗药效果。 实验发现, 与 NS 组相比, OM+DOX 组出现 MRP1 mRNA 与蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 对肿瘤的生长抑 制作用最好; 与 NS 组相比, OM 组也出现 MRP1 mRNA 与蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 对肿瘤的生长抑制 效果仅次于联合组; 然而, 与 NS 组相比, DOX 组的 MRP1 mRNA 与蛋白表达上调 ($P < 0.05$), 对阿霉素 耐药细胞株移植瘤的抑制效果较差, 二者在干预 14 d 后的体积对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。所以, 苦参素可能具有降低 MRP1 表达作用, 部分逆转肝癌

细胞对多柔比星抗药性,提高化疗药抑瘤作用。

总之,本次试验表明,苦参素可能通过减少肿瘤 MRP1 mRNA 与蛋白表达,从而在裸鼠人肝癌耐药移植瘤模型中提高多柔比星对肿瘤生长抑制作用,改变肝癌耐药株细胞抗药性,部分逆转多药耐药。这一研究可能为丰富临床化疗手段与中药提取物逆转化疗耐药提供新思路。

参考文献:

- [1] Oikawa T. Cancer Stem cells and their cellular origins in primary liver and biliary tract cancers[J]. *Hepatology*, 2016,64(2): 645-651.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015,136(5):E359-E386.
- [3] Yi PS, Zhang M, Zhao JT, et al. Liver resection for intermediate hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2016,8(14):607-615.
- [4] Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. *Liver Cancer*, 2012,1(3-4):144-158.
- [5] 冯巍巍,黄桂柳,季科,等. Beclin1 基因在消化道肿瘤发生发展中的作用及其影响因素研究进展[J]. *医学综述*, 2017,23(10):1923-1928.
- [6] 翟宝进,邵泽勇,伍烽,等. 人肝癌多药耐药裸鼠模型的建立及其生物学特性研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(8): 1013.
- [7] 李大帅,陈英,马小菁. HIF-1 α 和 MRP 的表达在肝癌组织中的相关性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(14):2029-2030,2033.
- [8] 蒋明东,向廷秀,李少林,等. 超声造影剂联合超声介导耐药基因反义寡脱氧核苷酸转染裸鼠肝癌细胞逆转多药耐药效应的研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 2011, 20(5): 459-460.
- [9] 叶家才,黄赖机,张秀萍,等. 亚砷酸联合电离辐射作用于肝癌细胞株 HepG2 后对多药耐药基因 MRP1 和凋亡相关基因 caspase 3 表达的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(20):3229-3232.
- [10] Fouquet G, Debuysscher V, Ouled-Haddou H, et al. Hepatocyte SLAMF3 reduced specifically the multi-drugs resistance protein MRP-1 and increases HCC cells sensitization to anti-cancer drugs[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22):32493-32503.
- [11] 侯华新,黎丹戎,韦长元,等. 板蓝根高级不饱和脂肪酸对耐药肝癌细胞株 BEL-7404/ADM 逆转作用实验[J]. *中国现代应用药学*, 2002,19(5):351-353.
- [12] 黄桂柳,黎梨,黄赞松,等. 苦参素促进肝癌 HepG2 细胞凋亡及其分子机制[J]. *右江民族医学院学报*, 2017, 39(1):10-13.
- [13] 赵海亮,黄桂柳,黄赞松,等. 苦参碱抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖及其对 VEGF、MMP-9 表达的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(1):1-5.
- [14] 胡高裕,黄赞松,周喜汉,等. 苦参碱增强顺铂抗人肝癌裸鼠移植瘤作用及其对 survivin/caspase-3 表达的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(9):669-674.
- [15] 胥雄阳,何松. 苦参碱逆转人肝癌细胞株 QGY/CDDP 多药耐药性的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(4):411-415.
- [16] 湛学军,谢大泽,胡银英,等. 苦参素体外抗肝癌及联合 5-氟尿嘧啶增敏作用的实验研究[J]. *江西中医药*, 2016, 47(10):42-45.
- [17] Liu Y, Bi T, Dai W, et al. Oxymatrine synergistically enhances the inhibitory effect of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6):7589-7597.
- [18] Liu Y, Bi T, Dai W, et al. Effects of Oxymatrine on the Proliferation and Apoptosis of Human Hepatoma Carcinoma Cells[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2016, 15(3): 487-497.
- [19] 王炜,黄赞松,周喜汉,等. 苦参素逆转人肝癌细胞株 HepG2/ADM 多药耐药的作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(10):1409-1416.

收稿日期:2017-12-25