

苦参素及 Mir-181a 对人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 裸鼠移植瘤中耐药蛋白 P-gp 的影响

廖俊¹, 张彩灵¹, 黄赞松^{1,2}, 覃小珊^{1,2}, 陈椿¹

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

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

摘要:目的 探讨苦参素(oxymatrine, OM)及 Mir-181a 在体内环境中对人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 裸鼠移植瘤中耐药蛋白 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的影响。方法 选用人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 细胞在裸鼠腋下接种, 创建裸鼠皮下移植瘤模型。将 42 只雌性裸鼠随机分成 6 组(每组 7 只): miR-181a mimic 组、苦参素组、苦参素+miR-181a mimic 组、阿霉素组、mirna mimic NC 组、空白对照组。药物干预 18 d 后, 取出瘤体, 用公式计算肿瘤体积。HE 染色法观察组织的细胞病变情况, 免疫组化及 Western blot 法检测耐药指标 P-gp 蛋白的表达, 实时荧光定量 PCR 检测 P-gp 对应耐药基因 ABCB1 表达的情况。**结果** 药物干预 18 d 后, 与空白对照组相比, miR-181a mimic 组的 P-gp 蛋白及 ABCB1 基因的表达提高, 而苦参素组的 P-gp 蛋白及 ABCB1 基因的表达降低; 与 miR-181a mimic 组相比, 苦参素+miR-181a mimic 组 P-gp 蛋白及 ABCB1 基因的表达降低。**结论** 苦参素在体内环境中不仅可以抑制人肝癌耐药移植瘤的生长, 还可提高人肝癌耐药细胞对化学药物的敏感性, 而 miR-181a 在体内环境中可以促进人肝癌耐药移植瘤的生长, 提高人肝癌耐药细胞的多药耐药性。

关键词: miR-181a; 苦参素; 肝肿瘤; 耐药性; 裸鼠; 移植瘤

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2020)01-0001-01

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.01.006

Effects of oxymatrine and Mir-181a on drug-resistant protein P-gp in nude mice with xenografts of human hepatocellular carcinoma drug-resistant cell line HepG2/ADM

Liao Jun¹, Zhang Cailing¹, Huang Zansong^{1,2}, Qin Xiaoshan^{1,2}, Chen Chun¹

(1. Graduate School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,

Guangxi, China; 2. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities,

Guangxi Clinical Medicine Center for Liver Disease, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of oxymatrine and Mir-181a on drug-resistant protein P-glycoprotein (P-gp) in nude mice with xenograft of human hepatocellular carcinoma drug resistant cell line HepG2/ADM *in vivo*. **Methods** HepG2/ADM cells of human hepatocellular carcinoma drug-resistant cells were inoculated in the axilla of nude mice to create a subcutaneous tumor xenograft model of nude mice. Forty-two female nude mice were randomly divided into 6 groups (seven in each group): miR-181a mimic group, oxymatrine group, oxymatrine+miR-181a mimic group, adriamycin group, mirna mimic NC group, and blank control group. Eighteen days after drug intervention, the tumor was removed and the tumor volume was calculated using a formula. HE staining was used to observe the cytopathological changes of the tissues. Immunohistochemistry and Western blot methods were used to detect the expression of drug resistance index P-gp. Re-

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(桂科 AD17129025); 广西医药卫生自筹经费计划课题(桂卫 Z20170224); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2019220)

第一作者简介: 廖俊(1990-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肝癌的基础及临床研究, E-mail: 1175386033@qq.com

通讯作者简介: 黄赞松(1962-), 男, 医学硕士, 三级教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 广西科协决策咨询专家库专家, 广西高校优秀人才, 研究方向: ①肝癌基础与临床研究; ②幽门螺杆菌致病与耐药机制研究, E-mail: 1019846481@qq.com

al-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of drug resistant gene ABCB1 corresponding to P-gp. **Results** Eighteen days after drug intervention, compared with the blank control group, the expressions of P-gp protein and ABCB1 gene in the miR-181a mimic group increased, while the expressions of P-gp protein and ABCB1 gene in the matrine group decreased; compared with miR-181a mimic group, the expressions of P-gp protein and ABCB1 gene in oxymatrine+miR-181a mimic group was reduced. **Conclusion**

Oxymatrine can not only inhibit the growth of tumors transplant by human liver drug resistant cancer cell in vivo, but also increase the sensitivity of human liver cancer drug resistant cells to chemical drugs, but miR-181a can promote the growth of human liver cancer drug resistant xenograft tumors *in vivo* and improve the multidrug resistance of human liver cancer drug resistant cells.

Key words: miR-181a; matrine; liver neoplasms; drug resistance; nude mice; transplanted tumor

原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)是最常见的恶性肿瘤之一,在世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发表的《全球癌症报告 2018》中,肝癌的死亡率仅次于肺癌和结肠癌^[1];而根据 2019 年国家癌症中心发布的中国最新癌症数据显示:在男性患者中,肝癌的发病率仅次于肺癌及胃癌^[2]。目前肝癌的治疗手段仍以手术切除为主,辅以放化疗和药物治疗,手术复发率较高、预后差。MicroRNA(简称 miRNA)是指广泛存在于动物、植物、病毒中,大小为 18~24 个核苷酸的非编码 RNA 小分子,它主要通过与其靶基因 mRNA 的 3 端非编码区的结合来进行转录后的基因表达调控,从而参与细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等。目前已有研究表明,miR-181a 不仅与多种肿瘤的发生发展密切相关,同时也在肝癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移方面发挥着重要作用^[3]。苦参素,从我国传统中药苦参和广豆根提纯而来,具有抗炎、抗肿瘤等多种药理作用。近年来我们课题组前期研究发现,苦参素能够在体外及体内环境中抑制肝癌细胞的增殖、转移,并改善肝癌细胞的多药耐药性^[4-5]。因此,本研究通过构建人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 裸鼠皮下移植瘤模型,在体内环境中研究苦参素及 miR-181a 在肝癌化疗耐药中的作用,进而探讨苦参素逆转肝癌化疗耐药的机制,为肝癌的分子治疗提供理论和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株 人肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM 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。

1.1.2 实验动物 45 只 SPF 级 BALB/c-nu 雌性裸鼠,4 周龄,质量 12~13 g,购于湖南省长沙市天勤生物科技有限公司,饲养于 SPF 级动物房内,裸鼠饲料、水均经高压灭菌处理并由动物实验室提供。

1.1.3 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、胰蛋白酶消化液来自索莱宝公司,胎牛血清来自 Gibco 公司;miR-181a mimic, mirna mimic NC 购自广州锐博生物技术有限公司;体内转染试剂 Entranster-in vivo 购自英格恩生物公司;兔抗 P-gp、 β -action、辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白 G 购自武汉三鹰生物技术有限公司;高效 RIPA 裂解液购自索莱宝公司;BCA 法蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自上海碧云天公司;底物发光液购自北京全品速生物科技有限公司;人 ABCB1、GAPDH 引物购自上海生工;总 RNA 小量制备试剂盒购自 AxyPrep 公司;逆转录试剂盒购自 Thermo 公司;FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)购自 Roche 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 人肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM 需在阿霉素浓度为 2 μ g/ml 含 10% 胎牛血清的 PRMI-1640 细胞培养液中培养以维持其耐药性,并在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养;细胞贴壁生长于培养基中,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 裸鼠耐药模型建立 购买 45 只 4 周龄 BALB/C 裸鼠(均为雌性),严格饲养在恒温(20 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C)、恒湿(50%~56%)、无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)的空气洁净层流架内;裸鼠盒、空气过滤罩、垫料、饲料和饮水等均经高压蒸气灭菌,并在无菌条件下 2~3 d 左右适时更换。适应性饲养 1 周后,常规消毒,右前肢腋背部皮下接种 HepG2/ADM 细胞,接种细胞数为 1×10^7 个。接种后继续饲养裸鼠,并每天观察裸鼠的饮食、排便、精神状态。接种 7~10 d 后,在接种部位可见米粒大小的结节,触之质硬时为 HepG2/ADM 裸鼠移植瘤构建成功。

1.2.3 实验分组及处理 待肿瘤长至直径 5 mm 时,从 45 只裸鼠中随机选取 42 只,其余 3 只备用,取 42 只雌性裸鼠随机分为 6 组(苦参素组、阿霉素组、miR-

181a mimic 组、苦参素 + miR-181a mimic 组、mirna mimic NC 组、空白对照组), 每组 7 只, 分别瘤内注射; 苦参素, 阿霉素, miR-181a mimic, 苦参素 + miR-181a mimic, mirna mimic NC, PBS, 每两天一次, 共注射 18 d。苦参素组: 每只裸鼠注射苦参素 100 mg/kg; 阿霉素组: 每只裸鼠注射阿霉素 6 mg/kg; miR-181a mimic 组: 取 5 μg miR-181a mimic 溶于 8 μl 体内转染剂 Entranster-in vivo 中, 然后以 PBS 稀释至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每只裸鼠每次注射 0.1 ml; 苦参素 + miR-181a mimic 组: 每只裸鼠注射 0.1 ml 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 miR-181a mimic 和苦参素 100 mg/kg; mirna mimic NC 组: 取 5 μg mirna mimic NC 溶于 8 μl 体内转染剂 Entranster-in vivo 中, 然后以 PBS 稀释至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每只裸鼠每次注射 0.1 ml; 空白对照组: 直接注射 0.1 ml PBS。

1.2.4 观察和测量 接种后每天观察裸鼠的饮食、排便、精神状态。隔天观察并测量成瘤体积大小, 计算 $1/2 \times \text{最长径线}(\text{mm}) \times (\text{最短径线})^2(\text{mm}^2)$ 为瘤体体积(mm^3)。开始给药后, 每次注射前, 重新测量瘤体体积并记录, 根据数据绘制生长曲线。注射结束后, 拉颈法处死裸鼠, 用手术剪和手术刀剥离瘤体, 进行拍照并称取肿瘤重量; 取部分瘤组织作常规固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色后观察组织病理学; 剩余部分瘤组织放置于 -80°C 冰箱, 用作其余实验。

1.2.5 免疫组织化学检测 P-gp 蛋白的表达 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 P-gp 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, 取各组的视野积分光密度值 (IOD) 进行对比。

1.2.6 Western blot 法检测 P-gp 蛋白的表达 提取各组总蛋白, BCA 法检测各组总蛋白浓度并配平, 加入上样蛋白缓冲液后 100°C 加热变性, 按照 SDS-PAGE 凝胶试剂盒制胶, 上样 5 μl , 70 V 电泳, 待溴酚蓝进入分离胶时将电压调为 120 V, 溴酚蓝到达胶的底部时停止电泳 (约 1.5 h); 准备膜与凝胶, 制作转移“三明治”膜, 在电流 0.3 mA 中转膜 1~2 h, 转膜结束后取出 PVDF 膜, 加入封闭液封闭 15 min, 用 TBST 漂洗 3 次, 根据抗体说明书稀释一抗, 将 PVDF 膜与一抗共孵育, 在 4°C 中孵育过夜, 根据抗体说明书稀释二抗, 取出 PVDF 膜, 用 TBST 漂洗 3 次, 将 PVDF 膜与二抗共孵育 1 h, 取出 PVDF 膜, 用 TBST 漂洗 3 次, 最后加入发光液进行曝光。使用 Image J 软件分析各条带灰度值。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测 ABCB1 基因的表

达 使用总 RNA 小量制备试剂盒 (AP-MN-MS-RNA-50G) 和逆转录试剂盒 (K1622) 提取总 RNA 并逆转录成 cDNA。按 4913914001-5 ml 试剂盒说明进行两步法扩增, 然后溶解、冷却。ABCB1 引物由上海生工公司设计合成, F: GATTGCTCACCGCCTGTC-CAC, R: CGTGCCATGCTCCTTGACTCTG。内参 HS-GAPDH, F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT, R: GAAGGCTGGGGCTCATTT。计算: $\text{Ct}(\text{目标基因} - \text{内参基因})$, $\text{Ct}(\text{样品}) - \text{Ct}(\text{空白对照样品})$, 结果是 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

1.3 统计学方法 所有实验均于不同日重复 3 次, 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 以 $(\bar{x} \pm s)$ 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 肿瘤生长情况及裸鼠一般状况 裸鼠成瘤率为 100%, 将肿瘤细胞接种于裸鼠右背近腋部皮下, 15 d 左右可见皮下肿瘤结节, 瘤体长径 5~6 mm, 肿瘤为类圆形, 表面光滑。实验期间各组裸鼠均存活, 且未出现明显异常, 大小便及饮食情况均正常。干预 18 d 后, 各组体积皆为正态分布, 因方差具有齐性, 采用 LSD 法组间两两比较, 阿霉素组、空白对照组及 mirna mimic NC 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 ($P < 0.05$)。表 1、图 1 可见, miR-181a mimic 组对肿瘤的生长促进作用最好, 苦参素 + miR-181a mimic 组的促进效果次之, 苦参素组对肿瘤的生长抑制作用明显, 单独使用阿霉素对人肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM 移植瘤效果较差。

表 1 干预 18 d 后各组移植瘤体积比较 单位: mm^3

组别	瘤体积
miR-181a mimic 组	558.86 \pm 13.32 ^{acdef}
苦参素组	152.57 \pm 3.67 ^{abdef}
苦参素 + miR-181a mimic 组	414.71 \pm 8.90 ^{abcef}
阿霉素组	258.71 \pm 8.77 ^{bed}
mirna mimic NC 组	283.57 \pm 7.64 ^{bed}
空白对照组	275.29 \pm 7.86 ^{bed}
F	259.530
P	< 0.05

注: 表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示; 与空白对照组相比, a: $P < 0.05$; 与 miR-181a mimic 组相对比, b: $P < 0.05$; 与苦参素组相对比, c: $P < 0.05$; 与苦参素 + miR-181a mimic 组相对比, d: $P < 0.05$; 与阿霉素组相对比, e: $P < 0.05$; 与 mirna mimic NC 组相对比, f: $P < 0.05$

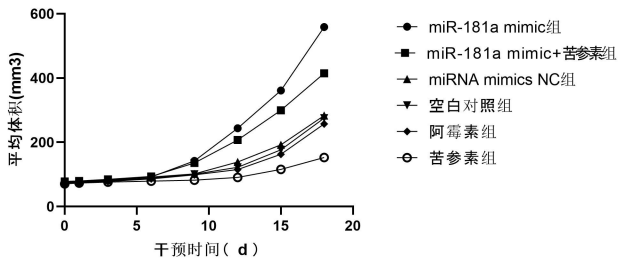


图 1 各组移植瘤体积生长曲线图

2.2 病理学结果及 HE 染色 表面观察形态裸鼠移植瘤和人肝癌组织相似。早期移植组织一般显示为坚硬结节状,随着时间推移,逐步显示为圆形。部分为卵形或不规则形,上面有突起。裸鼠体内未出现转移灶、腹水、胸水。200 倍数光镜下观察 HE 染色。见图 2。所有样本组织结构与细胞形态都没有明显区别,体现为肝癌实体;细胞大小不均,其胞质为嗜碱性,核浆比例增多,核分裂随处可见;一部分肝癌细胞有脂肪变性现象,有小片或大片凝固性坏死。miR-181a mimic 组(见图 2A)与苦参素+miR-181a mimic 组(见图 2B)类似,凝固性坏死较少。miRNA mimics NC 组(见图 2C)、空白对照组(见图 2D)及阿霉素组(见图 2E)出现少量凝固性坏死。苦参素组(见图 2F)出现大片凝固性坏死。结果表明:阿霉素对人肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM 基本无效,苦参素有促进肿瘤组织坏死作用,miR-181a mimic 有抑制肿瘤组织坏死作用。

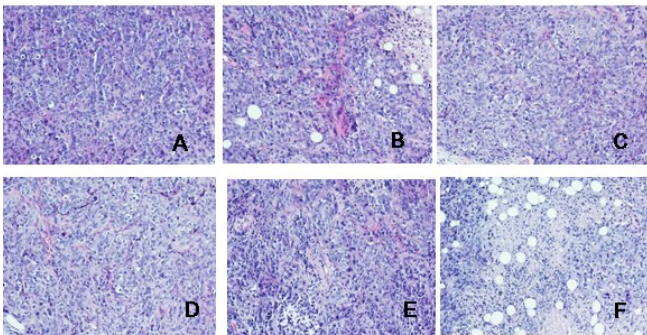


图 2 各组移植瘤石蜡切片 HE 染色表现(200 倍光镜下)

注:A 为 miR-181a mimic 组;B 为苦参素+miR-181a mimic 组;C 为 miRNA mimics NC 组;D 为空白对照组;E 为阿霉素组;F 为苦参素组

2.3 P-gp 蛋白免疫组化结果 P-gp 若呈阳性,染色多数在细胞胞浆内(部分在包膜),颜色呈棕黄色或褐色,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 SPSS 24.0 处理数据。因方差具有齐性,使用 LSD 法,空白对照组与 mirna mimic NC 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($P < 0.05$)。表 2、图 3 可

见 miR-181a mimic 组 P-gp 蛋白表达最高,其次是苦参素+miR-181a mimic 组和阿霉素组,苦参素组中 P-gp 蛋白表达明显降低。

表 2 各组 P-gp 蛋白表达积分光密度值 IOD 对比

组别	IOD
miR-181a mimic 组	198.10±7.74 ^{acdef}
苦参素组	61.02±6.88 ^{abdef}
苦参素+miR-181a mimic 组	152.26±8.70 ^{abcef}
阿霉素组	124.52±4.70 ^{abcdf}
mirna mimic NC 组	98.21±9.34 ^{bcde}
空白对照组	98.45±5.36 ^{bcde}
F	129.564
P	<0.05

注:表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;与空白对照组相比,a: $P < 0.05$;与 miR-181a mimic 组相对比,b: $P < 0.05$;与苦参素组相对比,c: $P < 0.05$;与苦参素+miR-181a mimic 组相对比,d: $P < 0.05$;与阿霉素组相对比,e: $P < 0.05$;与 mirna mimic NC 组相对比,f: $P < 0.05$

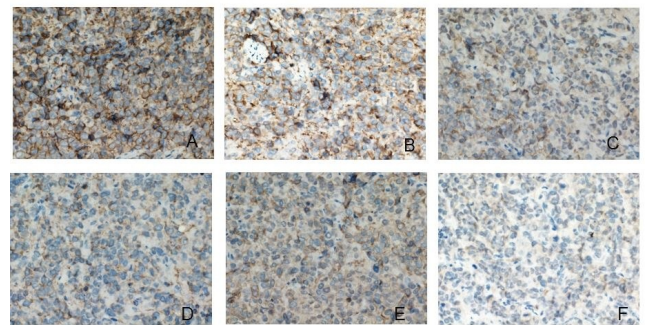


图 3 各组 P-gp 蛋白免疫组化图(400 倍光镜下)

注:A 为 miR-181a mimic 组;B 为苦参素+miR-181a mimic 组;C 为 miRNA mimics NC 组;D 为空白对照组;E 为阿霉素组;F 为苦参素组

2.4 Western Blot 法检测 P-gp 蛋白的结果 曝光后的图片经 Image J 软件进行分析,得出灰度值后用 SPSS 24.0 处理数据,各组内参蛋白 β -action 的表达经统计学分析无显著性差异。因方差具有齐性,使用 LSD 法,空白对照组与 mirna mimic NC 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($P < 0.05$)。图 4、图 5、表 3 可见 miR-181a mimic 组 P-gp 蛋白表达最高,其次是苦参素+miR-181a mimic 组和阿霉素组,苦参素组中 P-gp 蛋白表达最低。

2.5 实时荧光定量 PCR 法检测 ABCB1 mRNA 结果 空白对照组与 mirna mimic NC 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($P < 0.05$)。表 4、图 6 可见 miR-181a mimic 组中 ABCB1 基因表达最高,其次是苦参素+miR-181a mimic 组和阿霉素组,苦参素组中 ABCB1 基因表达最低。

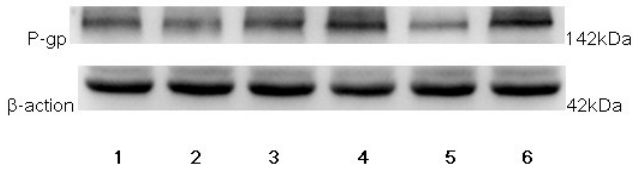


图 4 各组移植瘤中 P-gp 蛋白及 β -action 蛋白的 Western Blot 蛋白印迹图

注:1 为空白对照组;2 为 miRNA mimic NC 组;3 为阿霉素组;4 为苦参素 + miR-181a mimic 组;5 为苦参素组;6 为 miR-181a mimic 组

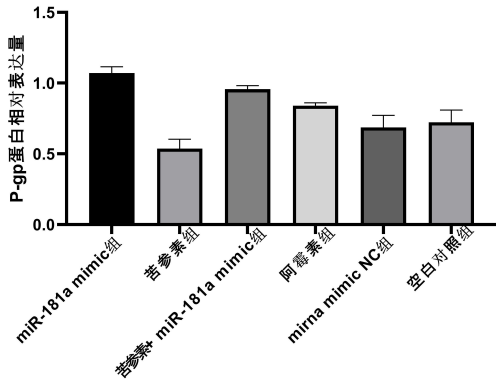


图 5 各组移植瘤中 P-gp 蛋白的相对表达

表 3 各组移植瘤中 P-gp 蛋白相对表达量

组别	相对表达量
miR-181a mimic 组	1.07 ± 0.05 ^{acdef}
苦参素组	0.54 ± 0.07 ^{abdef}
苦参素 + miR-181a mimic 组	0.96 ± 0.03 ^{abcef}
阿霉素组	0.84 ± 0.02 ^{abcd}
miRNA mimic NC 组	0.69 ± 0.09 ^{bcde}
空白对照组	0.72 ± 0.09 ^{bcde}
F	30.292
P	<0.05

注:表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示;与空白对照组相比,a: $P < 0.05$;与 miR-181a mimic 组相对比,b: $P < 0.05$;与苦参素组相对比,c: $P < 0.05$;与苦参素 + miR-181a mimic 组相对比,d: $P < 0.05$;与阿霉素组相对比,e: $P < 0.05$;与 miRNA mimic NC 组相对比,f: $P < 0.05$

3 讨论

肝癌传统的治疗方式主要可分为手术切除、肝移植、局部消融、常规化疗以及综合辅助治疗等。但由于目前大部分的 HCC 患者被诊断出肝癌时已经处于疾病晚期,中位生存期仅为 6~8 个月,因此手术切除后再进行辅助化疗是目前应用最广泛的肝癌根治性治疗方法。常用的化疗药物包括索拉非尼、阿霉素、5-氟尿嘧啶、含铂抗癌药物等,但是这些药物对患者的生存率改善并不明显,主要原因就是多药耐药性的产生。多药耐药现象几乎存在于所有恶性肿瘤中,是指一种肿瘤细胞同时对多种结构和作用机制完全不同的抗肿瘤药物产生交叉耐药性的现象,临床上多分为原发耐药

表 4 各组移植瘤中 ABCB1 mRNA 相对表达量

组别	相对表达量
miR-181a mimic 组	1.72 ± 0.05 ^{acdef}
苦参素组	0.75 ± 0.04 ^{abdef}
苦参素 + miR-181a mimic 组	1.56 ± 0.03 ^{abcef}
阿霉素组	1.32 ± 0.05 ^{abcd}
miRNA mimic NC 组	1.01 ± 0.06 ^{bcde}
空白对照组	1.00 ± 0.00 ^{bcde}
F	248.523
P	<0.05

注:表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示;与空白对照组相比,a: $P < 0.05$;与 miR-181a mimic 组相对比,b: $P < 0.05$;与苦参素组相对比,c: $P < 0.05$;与苦参素 + miR-181a mimic 组相对比,d: $P < 0.05$;与阿霉素组相对比,e: $P < 0.05$;与 miRNA mimic NC 组相对比,f: $P < 0.05$

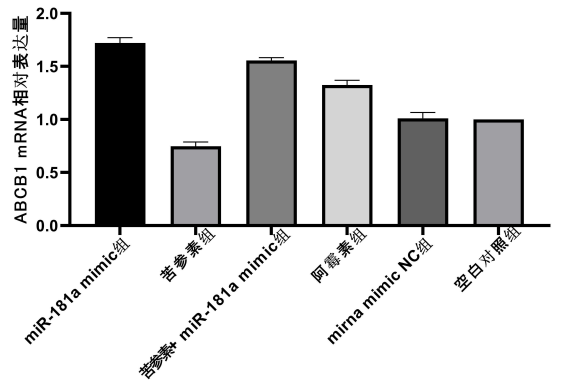


图 6 各组移植瘤中 ABCB1 mRNA 的相对表达

和继发耐药两种。目前认为肿瘤原发耐药与基因遗传学水平的变异密切相关,而继发耐药与不改变 DNA 序列的基因表观遗传学水平的变异密切相关,常见的方式有对组蛋白、非编码 RNA 序列以及 DNA 位点的修饰,其结果往往会影响到相关基因序列的表达,从而影响到继发耐药的产生过程^[6]。关于肿瘤多药耐药,目前研究认为其机制主要有^[7-8]:以耐药相关蛋白的表达等为例的生化耐药,常起因于肿瘤细胞的遗传特性发生生物化学修饰改变所致的;机体在不同病理情况下产生的药理性耐药,常起因于作用于肿瘤细胞的有效药物浓度减少所致的;以及在遗传信息分子因素发生变化产生的细胞凋亡耐药,常起因于不同促抗凋亡基因的异常表达所致的。而后者与临床上使用的诸多化学治疗药物作用原理相关,因此,进一步探索逆转细胞凋亡耐药的有效途径,将会为提高临床化学治疗质量带来希望。

miR-181a 是 miR-181 家族成员之一,其作用机制主要通过与靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区的结合来进行转录后的基因表达调控,从而参与细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等。有研究显示 miR-181a 不仅参与肿瘤的增值、侵袭和转移,还参与多种肿瘤的多药耐药

性的产生,并在不同的肿瘤耐药中具有不同的作用,如 miR-181a 可促进使乳腺癌细胞对阿霉素的耐药性^[9],但在肺癌中 miR-181a 却可以提高肺癌细胞对化疗药物的敏感性^[10]。在肝癌中,已有研究发现 miR-181a 在耐药的肝癌细胞中高表达^[11],Azumi J 等^[12]研究发现 miR-181a 可以通过靶向抑制信号转导因子 RASSF1 来诱导肝癌细胞对索拉菲尼耐药。而我们课题组前期研究已发现 miR-181a 可以通过抑制促凋亡蛋白 Bim 的表达来促进肝癌细胞对阿霉素的耐药性^[13]。苦参素,是从豆科槐属植物苦参中提取分离出的一种生物碱,以氧化苦参碱为主,并含有少量氧化槐果碱。苦参素在体外具有抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖、侵袭和迁移能力的的能力^[14],用于晚期肝癌患者和肝功能严重失代偿无法耐受其他治疗的患者,可改善机体全身状况,延长生命。近年来也有研究表明苦参素有逆转肿瘤 MDR 的作用^[15-16],我们课题组前期研究也发现,苦参素可以通过调控 ABCG2 的表达来提高阿霉素抗人肝癌耐药裸鼠移植瘤的疗效^[17]。

近年研究发现,miR-181a 与肿瘤的发生发展密切相关,并参与多种肿瘤化疗耐药,我们课题组已对苦参素抗肿瘤作用研究多年,发现其具有抗肝癌作用和部分逆转肝癌细胞耐药作用。故本实验以人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 皮下移植瘤裸鼠为研究对象,利用 HE 染色法、免疫组化法、Western-blot 法、实时荧光定量 PCR 法等技术,在体内环境中研究苦参素及 miR-181a 对人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 裸鼠移植瘤中耐药蛋白 P-gp 的影响,从而探讨苦参素及 miR-181a 在肝癌化疗耐药中的作用。实验发现,与空白对照组相比,miR-181a mimic 组的 P-gp 蛋白及 ABCB1 基因的表达提高,而苦参素组的 P-gp 蛋白及 ABCB1 基因的表达降低;与 miR-181a mimic 组相比,加入苦参素的苦参素+miR-181a mimic 组 P-gp 蛋白及 ABCB1 基因的表达降低。所以 miR-181a 在裸鼠体内可能参与调节肝癌细胞对化疗药的敏感性,能够通过促进 P-gp 蛋白的表达而提高其多药耐药性,而苦参素可在裸鼠体内通过抑制 P-gp 蛋白的表达,从而逆转肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 的耐药性。

综上所述,本研究发现,苦参素在体内环境中不仅可以抑制人肝癌耐药移植瘤的生长,还可提高人肝癌耐药细胞对化学治疗药的敏感性,而 miR-181a 在体内环境中可以促进人肝癌耐药移植瘤的生长,提高人肝癌耐药细胞的多药耐药性。这一研究进一步探讨了苦参素逆转肝癌化疗耐药的机制,为肝癌的分子治疗提供理论和实验依据。

参考文献:

[1] Mcguire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzer-

land: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015[J]. Adv Nutr, 2016, 7(2): 418-419.

- [2] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等. 2015年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 1-11.
- [3] Korhan P, Erdal E, Atabey N. MiR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(4): 1304-1312.
- [4] 黄赞松,向发良,周喜汉,等. 苦参素对肝癌细胞 HepG2 细胞增殖和 MicroRNA-122、MicroRNA-21 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3079-3081.
- [5] 冯巍巍,黎梨,黄赞松,等. 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[J]. 右江民族医学院学报, 2018, 40(1): 8-12.
- [6] Meguro M, Mizuguchi T, Kawamoto M, et al. The molecular pathogenesis and clinical implications of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Hepatol, 2011, 2011: 818672.
- [7] Saito Y, Hibino S, Saito H. Alterations of epigenetics and microRNA in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2014, 44(1): 31-42.
- [8] Bae JM, Kim JH, Kang GH. Epigenetic alterations in colorectal cancer: the CpG island methylator phenotype [J]. Histol Histopathol, 2013, 28(5): 585-595.
- [9] Niu J, Xue A, Chi Y, et al. Induction of miRNA-181a by genotoxic treatments promotes chemotherapeutic resistance and metastasis in breast cancer[J]. Oncogene, 2015, 35(10): 1302-1313.
- [10] Braicu C, Gulei D, Cojocneanu R, et al. miR-181a/b therapy in lung cancer: reality or myth? [J]. Mol Oncol, 2019, 13(1): 9-25.
- [11] 卓丽娟,陈虹,吴敏霞,等. 肝癌耐药细胞的形态学及微小 RNA 表达谱分析[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(9): 604-608.
- [12] Azumi J, Tsubota T, Sakabe T, et al. miR-181a induces sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of RASSF1 expression [J]. Cancer Sci, 2016, 107(9): 1256-1262.
- [13] 黄桂柳. MiR-181a 影响肝癌细胞 HepG2/ADM 的多药耐药性及苦参素逆转肝癌耐药作用的研究[D]. 右江民族医学院, 2017.
- [14] 邓通元,黄桂柳,黄赞松,等. 苦参素对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响及机制[J]. 山东医药, 2018, 58(10): 5-8.
- [15] Yan F, Wang X, Ma Q, et al. Expressions of Bim and ERKs in multidrug-resistant hepatic carcinoma cells[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2014, 34(12): 1838-1841.
- [16] 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.
- [17] 邓凤莲,冯巍巍,黄赞松,等. 苦参素通过调控 ABCG2 表达提高阿霉素抗人肝癌耐药裸鼠移植瘤的疗效[J]. 右江民族医学院学报, 2018, 40(6): 541-544, 548.

收稿日期: 2019-11-29; 修回日期: 2019-12-27