

黄芪甲苷对肺癌细胞多药耐药性的逆转作用及机制研究

白 宏 常翠翠 王 亚 别蓓蓓
西安培华学院, 中国·陕西 西安 710125

【摘要】目的: 研究黄芪甲苷对肺癌 A549/DDP 细胞的杀伤作用, 探讨黄芪甲苷逆转肺癌耐药的作用机制。方法: 体外培养肿瘤细胞, 用 MTT 法检测 AST 对 A549/DDP 的细胞毒性和 AST 对细胞抗药性的逆转作用; 用免疫印迹法检测肿瘤细胞内 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的表达情况。结果: AST 对 A549/DDP 细胞生长有抑制作用, AST 在体外能有效逆转 A549/DDP 细胞对 DDP 的耐药性, AST 联合 DDP 处理后细胞内 P-gp 蛋白的表达量显著下调。结论: 黄芪甲苷可以逆转 A549/DDP 细胞的耐药性, 其机制与下调 P-gp 的表达有关。

【关键词】黄芪甲苷; 肺癌; 多药耐药

【基金项目】陕西省教育厅 2020 年度专项科学研究项目 (项目编号: 20JK0818)。

引言

全世界肺癌发病率和死亡率逐年上升。2018 年, 肺癌新发病例占所有癌症病例的 11.6%, 肺癌死亡人数占所有癌症死亡人数的 18.4%。目前, 化疗仍是肺癌患者的主要治疗手段。由于早期的肺癌临床症状并不明显, 这导致肺癌的早期诊断和治疗受到了极大的限制。顺铂 (Cisplatin, DDP) 是一种广泛应用于中晚期肺癌的化疗药物, 然而, 长期使用化疗药物引发的肿瘤多药耐药性 (MDR) 限制了其在临床上的应用。

MDR 的作用机理十分复杂, 主要包括: 药物外排泵 ABC 转运蛋白的过度表达, 药物作用靶点的改变, DNA 修复机制活性增强, 药物解毒、消除酶的活性增强或表达增多, 肿瘤细胞凋亡水平的异常, 肿瘤干细胞等。其中, 药物外排泵 P 糖蛋白 (P-gp) 过量表达是目前研究最多, 并在体外、体内研究中被广泛验证的经典的 MDR 机制。近年来的研究显示, 中药与化疗药物的结合是一种具有中国特色的治疗方法。中药可增加化疗的敏感性, 减少化疗的不良反应。

黄芪是豆科属植物的中药, 其中黄芪甲苷 (AST) 是黄芪的主要活性成分, 研究显示黄芪甲苷具有一定的抗肿瘤作用^[1]。其抗肿瘤机制主要表现在调节机体免疫力、直接对肿瘤细胞产生抑制作用、促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、调节体蛋白和氨基酸代谢等^[2]。有报道显示黄芪甲苷还可以通过减少 P-gp 的表达逆转多药耐药, 提高耐药细胞株对化疗药物的敏感性。

为探索 AST 是否对肺癌多药耐药细胞有类似的作用, 本文选用肺癌耐药细胞株 A549/DDP 细胞为主要研究对象, 初步探索 AST 在体外逆转 A549/DDP 细胞多药耐药的效果及其可能机制, 为黄芪甲苷的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

人肺癌 A549/DDP 细胞购于中国科学院上海细胞研究所, RPMI-1640 培养基购于南京凯基生物科技发展有限公司, 青-链霉素混合液购置于上海碧云天生物技术有限公司, 胎牛血清由杭州四季青生物科技公司提供, 黄芪甲苷来源于南京泽朗医药科技有限公司。DDP 粉剂来源于山东齐鲁制药有限公司, 噻唑蓝 (MTT) 和 DCFH-DA 荧光探针来源于美国 Sigma 公司。全自动酶联免疫检测仪 (ELX800) 购于美国 Bio-Tek 公司。

1.2 细胞培养

将人肺癌 A549/DDP 细胞于含有 1mg/mL DDP 的 RPMI-1640 培养基中进行培养, 并补充 10% 的胎牛血清, 100U/mL 青霉素-链霉素溶液和 1mM L-谷氨酰胺, 常规传代培养并孵育在 37°C, 5% CO₂ 恒温箱中培养, 正式实验前一周传代培养细胞时弃掉 DDP 药物避免对实验的影响, 将处于对数生长期的细胞用于研究。

1.3 检测 AST 对 A549/DDP 的细胞毒性

取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 浆细胞密度调整为 5×10^4 个/L, 以 100 μ L/孔的数量接种到 96 孔板中, 每组设 6 个复孔。实验组加各浓度 AST (10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 80 μ g/ml, 100 μ g/ml), 对照组不加任何药物。将各组细胞置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 24h 后, 每孔加入 100 μ L 的 MTT 溶液 (5g/L), 继续培养 4h 后弃去上清, 每孔再加入 150 μ L 二甲亚砜 (DMSO), 摇匀, 用酶标仪检测样品在 450nm 处的吸光值。

1.4 检测 AST 对 A549/DDP 细胞抗药性的逆转作用

取对数生长期的 A549/DDP 耐药细胞, 调整细胞密度为 5×10^4 个/L, 接种于 96 孔板中, 每组设 6 个复孔。分组如下: (1) DDP 组 (1 μ g/ml); (2) AST (10 μ g/ml) + DDP 组 (1 μ g/ml); (3) AST (20 μ g/ml) + DDP 组 (1 μ g/ml); (4) AST (40 μ g/ml) + DDP 组 (1 μ g/ml); 将各组细胞置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24h 后, 利用 MTT 法检测各组细胞的生长抑制率。

1.5 免疫印迹法检测 P-g 蛋白的含量

将 A549/DDP 耐药细胞按照上述 1.5 相同的方法进行接种, 分组, 给予不同实验因素处理后培养 24h, 消化, 收集细胞, 提取各组细胞总蛋白, 用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转膜, 封闭, 加一抗过夜, 加二抗 1h, 用 Odyssey 红外激光成像系统扫描 NC 膜进行成像, 以每条蛋白电泳带的灰度值表示蛋白表达量, 以 GAPDH 为参照。相对灰度值 = P-g 蛋白灰度值 / GAPDH 灰度值。

1.6 统计学方法

用 Graphpad Prism 7 软件进行数据统计与分析, 统计学数据以均数 \pm 标准差 ($X \pm SD$) 表示, 组间比较采用 T 检验, $P \leq 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 AST 对 A549/DDP 细胞生长的影响

图 1 结果表明, 随着 AST 浓度的上升 (依次为 10 μ g/ml, 20

μg/ml, 40 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml), A549/DDP 细胞的死亡率逐渐升高, 提示 AST 对 A549/DDP 细胞生长有抑制作用, 且抑制效应与其浓度相关。

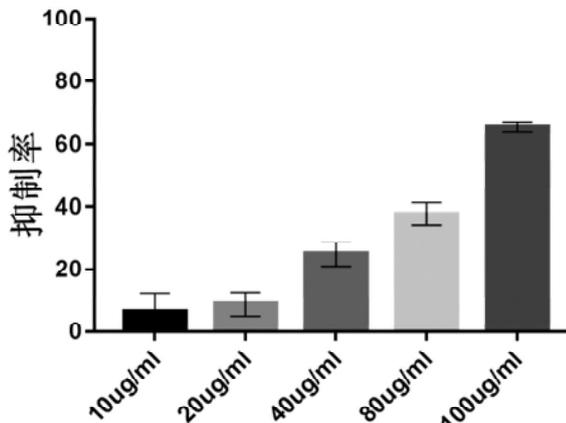


图1 AST对A549/DDP细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 AST对A549/DDP细胞耐药性的逆转作用

图2结果显示, 相较于单独的DDP用药组, 暴露于AST(10 μg/ml, 20 μg/ml, 40 μg/ml)联合DDP组的A549/DDP细胞死亡率明显升高, 抑制率分别为12.97%, 19.87%, 28.28%, 相对逆转倍数分别为1.91, 2.93, 4.17。表明AST在体外能有效逆转A549/DDP细胞对DDP的耐药性。

药物	浓度 (μg/ml)	抑制率 (%)	逆转倍数
DDP	1	6.78 ± 0.51	-
	10+1	12.97 ± 0.62*	1.91
AST+DDP	20+1	19.87 ± 0.46**	2.93
	40+1	28.28 ± 0.53**	4.17

图2 AST对A549/DDP细胞耐药性的逆转作用 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 AST对A549/DDP细胞中P-gp蛋白表达的影响

有研究表明, 细胞膜上高表达的P-gp所引发的药物外排效应是导致细胞产生耐药性的主要原因之一, 本研究通过检测不同

处理组细胞P-gp蛋白水平的变化来检测AST逆转A549/DDP细胞耐药性的机制是否与P-gp蛋白表达水平的改变有关。图3显示1 μg/ml的DDP分别联合10 μg/ml和20 μg/ml的AST处理后, 细胞内P-gp蛋白的表达量显著下调。提示AST可以通过下调P-gp蛋白的表达来增强A549/DDP细胞的化疗作用。

3 讨论

化疗是最广泛应用的治疗方法之一。然而, 化疗的进化压力逐渐诱导MDR, 从而导致化疗的最终失败。耐药细胞会产生一系列的抗凋亡能力, 包括调控药物摄取或排出的几个关键基因的表达, 以及在低氧化还原状态下维持氧化还原稳态的能力增加, 从而耐受毒性药物或逃避凋亡途径。在MDR的多因子中, 膜性P-gp介导的药物外流增强可能是肿瘤MDR的主要原因之一。

肺癌具有高发病率和高死亡率的特点, 非小细胞肺癌占肺癌的85%。化疗是治疗肺癌的一种策略。DDP是一种常见的肿瘤化疗药物, 通过诱导细胞凋亡、自噬和坏死发挥抗肿瘤作用。然而, DDP在肿瘤中的耐药限制了其临床应用。肺癌细胞对DDP的耐药是一个复杂的过程, 涉及多种因素和基因, 包括细胞内药物的积累和失活、DNA损伤修复、自噬和凋亡等机制。探索逆转DDP耐药的途径, 将提高肺癌的治疗水平。

黄芪具有一定的抗肿瘤作用。其抗肿瘤机制主要表现在调节机体免疫力、直接对肿瘤细胞产生抑制作用、促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、调节体蛋白和氨基酸代谢等^[1]。但是, 目前有关黄芪逆转肺癌多药耐药的相关报道与研究较为鲜少。

在本研究中, 数据显示, 相较于单独黄芪和顺铂组, 二者联合用药组中A549/DDP细胞的存活率较低。黄芪甲苷对顺铂抑制耐药细胞有增敏作用, 且呈浓度依赖性。

P-gp的过表达被证实是产生多药耐药的主要原因之一, 许多复发和转移性肿瘤均与P-gp的高表达相关。本研究结果显示AST联合DDP可以显著抑制P-gp的表达, 这表明AST联合DDP治疗对A549/DDP细胞的抗肿瘤效应与P-gp表达和功能的抑制有关。

参考文献:

- [1]曹玉冰.黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J].现代药物与临床, 2017,32(005):954-60.
- [2]张艺,陈丹.黄芪抗肿瘤相关靶基因筛选_生物学_省略_与非小细胞肺癌和乳腺癌预后的关系[J].山东医药,2020,60(06):5-8.
- [3]张乔,张琦,李静.黄芪甲苷抗肿瘤作用研究进展[J].中医药信息,2019,036(001):129-32.

作者简介:

白宏(1990.5—), 女, 汉族, 籍贯: 陕西西安, 学历: 研究生, 职称: 讲师, 研究方向: 抗肿瘤。

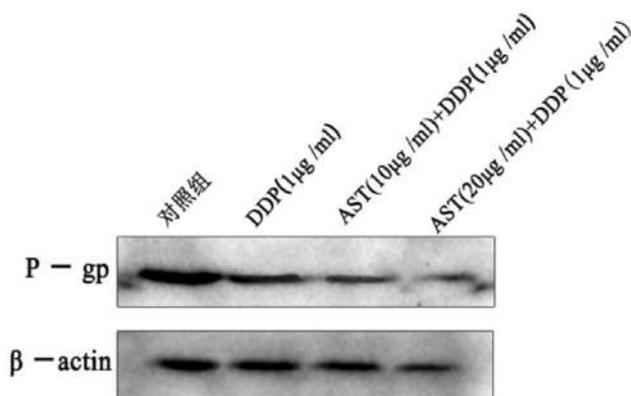


图3 AST和/或DDP对A549/DDP细胞内P-gp表达的影响