

# 盐酸千金藤素逆转 EAC/ADR 细胞多药耐药性的作用及其机制

宋玉成, 夏薇\*, 江金花, 王庆端

(河南省医学科学研究所, 河南 郑州 450052)

**摘要:** 目的 研究盐酸千金藤素对艾氏腹水癌耐药细胞株 EAC/ADR 多药耐药性的逆转作用及其与核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的关系, 探讨其作用机制。方法 MTT 法、小鼠移植瘤模型实验观察盐酸千金藤素体外和体内逆转细胞多药耐药性的作用; Dot-ELISA 法检测细胞核 NF- $\kappa$ B 水平及药物作用后的变化。结果 盐酸千金藤素体外能逆转 EAC/ADR 细胞的耐药性, 逆转倍数为 13 倍; 体内能延长荷瘤小鼠的生存时间, 生命延长率为 75.37%; 并能降低 EAC/ADR 细胞中 NF- $\kappa$ B 的持续性活性及化疗药物对其的激活。结论 盐酸千金藤素具有逆转多药耐药性的作用, 其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 的活性有关。

**关键词:** 盐酸千金藤素; 艾氏腹水癌; 多药耐药性; 核因子  $\kappa$ B; 基因表达; 细胞凋亡

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)03 - 0204 - 04

## Reversal of multidrug resistance in drug-resistant cell line EAC/ADR by cepharanthine hydrochloride and its mechanism

SONG Yu-cheng, XIA Wei\*, JIANG Jin-hua, WANG Qing-duan

(Henan Institute of Medical Science, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract: Aim** To investigate the correlation between reversal effect of cepharanthine hydrochloride (CH) on multidrug resistance (MDR) in drug-resistant cell line EAC/ADR and the nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). **Methods** Cytotoxicity was determined by the tetrazolium (MTT) assay *in vitro*. An EAC/ADR cell homograft model was established to investigate the effect of CH on reversing MDR *in vivo*. The constitutive activity and activation of NF- $\kappa$ B by drugs were measured by Dot-Enzyme-linked Immune Sorbent Assay (Dot-ELISA). **Results** CH was shown to potentiate the cytotoxicity of ADR, a 13-fold reversal effect of resistance was achieved *in vitro*. In mice bearing EAC/ADR cell homografts, CH was found to prolong the survival time of animals bearing tumor. Increase in life span over control was 75.37%. In addition, the constitutive activity of NF- $\kappa$ B and activation of NF- $\kappa$ B by chemotherapy were lowered by CH. **Conclusion** The findings suggest that CH is able to reverse drug resistance and its mechanism may be related to suppressing the constitutive activity and activation of NF- $\kappa$ B by drugs.

**Key words:** cepharanthine hydrochloride; Ehrlich ascites carcinoma; multidrug resistance; NF- $\kappa$ B; gene expression; apoptosis

细胞凋亡抑制在肿瘤细胞多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 的形成中起重要作用。核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 是一个重要的凋亡拮抗因子, 某些抗癌药物在诱导肿瘤细胞凋亡的同时可活化 NF-

$\kappa$ B。NF- $\kappa$ B 转录调控一系列与细胞存活有关基因的表达, 可阻断细胞凋亡的途径, 使肿瘤细胞对化疗药物产生耐药<sup>[1,2]</sup>。防己科千金藤属植物地不容 (*Stephania delavayi* Diels) 的块根中提取分离出的生物碱单体化合物千金藤素, 有逆转 MDR 的作用<sup>[3]</sup>。近年研究表明千金藤素可以抑制 NF- $\kappa$ B 活性<sup>[4]</sup>。但其逆转作用机制是否与抑制 NF- $\kappa$ B 有关, 目前尚未见报道。本研究观察盐酸千金藤素 (cephan-

收稿日期: 2004-04-19.

基金项目: 河南省科技重点攻关项目 (0111020600).

\* 通讯作者 Tel: 86 - 371 - 6912697, Fax: 86 - 371 - 6658201,

E-mail: Vivian\_summer544@sohu.com

thine hydrochloride, CH) 逆转 EAC/ADR 细胞耐药性的作用及其对 NF- $\kappa$ B 活性的影响, 探讨其作用机制。

## 材料与方 法

**药物及试剂** 盐酸千金藤素 (cepharanthine hydrochloride, CH), 河南省医学科学研究所药理室提供, 纯度为 99%, 实验时用生理盐水配成所需浓度; 阿霉素 (adriamycin, ADR), 意大利 Fam italia 公司; 甲基四唑盐 (MTT), 瑞士 Fluka 公司; 苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF), 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT), 3, 3'-二氨基联苯铵四盐酸盐 (DAB), Sigma 公司; 鼠 NF- $\kappa$ B P65 亚基单克隆抗体, Santa Cruz 公司; 羊抗鼠辣根过氧化物酶标 IgG, 北京邦定泰克生物技术公司。

**仪器** 细胞培养箱, FORMA 公司; GL-20G-II 型高速冷冻离心机及 LXJ-II B 型低速大容量多管离心机, 上海安亭科学仪器厂; DG3022 酶联免疫检测仪, 南京华东电子管厂; 岛津 CS-930 薄层扫描仪, 日本岛津公司。

**动物** 昆明种健康小鼠, 体重 (20  $\pm$  2) g,  $\varphi$   $\delta$  兼用, 购自河南省实验动物中心。

**细胞培养** 艾氏腹水癌细胞 (EAC) 为敏感株, 引自中国医学科学院药物研究所。EAC/ADR 细胞为 ADR 长期诱导产生的动物体内多药耐药细胞株<sup>[5]</sup>, 由河南省医学科学研究所药理室建立; 实验时置于含 15% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液中 (内含青霉素 100 u  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 链霉素 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 在 5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}$ C 加湿细胞培养箱内培养。

**MTT 法体外细胞毒试验**<sup>[6]</sup> 取对数生长期 EAC 和 EAC/ADR 细胞, 以细胞数为 2  $\times$  10<sup>5</sup>  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 植入 96 孔细胞培养板, 每孔 160  $\mu$ L, 加入相应浓度的药物, 终体积为 200  $\mu$ L, 培养 48 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h 后, 离心 (2 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 10 min) 弃去孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡 10 min, 使其充分溶解, 酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长处 A 值, 常规计算抑制率、半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)、耐药倍数及逆转倍数。

**细胞核内 NF- $\kappa$ B 活性测定** 采用斑点酶联免疫吸附实验法 (Dot-ELISA) 测定 NF- $\kappa$ B 活性。主要包括两个步骤。(1) 按文献<sup>[7]</sup>方法提取细胞核蛋白。蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法, 定量测定核内蛋白含量。(2) Dot-ELISA 法进行 NF- $\kappa$ B 活性测定<sup>[8]</sup>。取蛋白质样本 2  $\mu$ L 点于圆形硝酸纤维素膜

(直径约 0.8 cm) 中心, 待干透置于多孔培养板孔洞内。加入 1% BSA 37  $^{\circ}$ C 封闭。加入以 1:200 稀释的鼠 NF- $\kappa$ B P65 亚基单克隆抗体, 37  $^{\circ}$ C 3 h。再加入经 1:200 稀释的羊抗鼠辣根过氧化物酶标 IgG, 37  $^{\circ}$ C 2 h。加底物 DAB 溶液 (0.6 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 显色。阳性者呈褐黄色, 无色为阴性。用岛津 CS-930 型薄层扫描仪扫描, 波长 480 nm, 做定量测定。扫描值作为 NF- $\kappa$ B 活性量化值。

**体外逆转耐药性试验** MTT 法体外细胞毒试验观察 CH 逆转 EAC/ADR 细胞耐药性的作用。

**体内逆转耐药性实验**<sup>[9]</sup> 给动物腹腔接种 EAC/ADR 细胞后, 随机分为 4 组: 对照组、ADR 组、CH 组及 ADR 与 CH 合用组, 每组 10 只。接种 24 h 后, 用药组 ip 不同的药物, qd, 连续 7 d, 观察统计各组动物存活时间, 计算生命延长率。

**药物对 EAC/ADR 细胞 NF- $\kappa$ B 活性的影响** 体外实验取对数生长期 EAC 和 EAC/ADR 细胞, 以 RPMI-1640 培养液稀释至细胞数为 1.5  $\times$  10<sup>7</sup>  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 植入细胞培养瓶, 每瓶 1.6 mL, 加入相应浓度药物, 置培养箱内培养, 作用 2 h 后进行 NF- $\kappa$ B 活性测定。体内实验分组, 同体内逆转抗药性实验, 于最后一次 ip 药物 2 h 后, 分别抽取动物的腹水, 收集 2.5  $\times$  10<sup>7</sup> 的 EAC/ADR 细胞, 测定 NF- $\kappa$ B 活性。

**统计学分析** 实验数据应用 SPSS 10.0 分析软件进行统计分析, 统计数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用两样本均数比较的 *t* 检验, 多个样本均数比较的单因素方差分析法, 对统计数据进行分析, 取 *P* = 0.05 为显著性检验水准。

## 结果

### 1 EAC/ADR 细胞的耐药表型

ADR 对 EAC 及 EAC/ADR 细胞的 IC<sub>50</sub> 值, 分别为 (1.10  $\pm$  0.08) 和 (24.4  $\pm$  0.6)  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>。二者比较差异有显著性 (*P* < 0.05), 耐药倍数为 22 倍。

### 2 千金藤素 (CH) 体外逆转耐药性作用

CH 对 EAC 及 EAC/ADR 细胞的直接细胞毒作用较弱。8  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CH 时抑制率为 (18.4  $\pm$  1.0)% 和 (13.5  $\pm$  1.3)%, 4  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CH 时为 (7.8  $\pm$  1.5)% 和 (6.0  $\pm$  1.6)%, 2  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CH 时为 (5.5  $\pm$  1.2)% 和 (4.7  $\pm$  1.9)%。但 CH 能部分降低 EAC/ADR 细胞耐药性水平, 对 EAC 细胞无影响, 4  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CH 与 ADR 合用对 EAC 及 EAC/ADR 细胞的 IC<sub>50</sub> 值分别为 (1.20  $\pm$  0.08) 和 (1.92  $\pm$  0.11)  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 可降低 ADR 对 EAC/ADR 细胞

的 IC<sub>50</sub>值,逆转倍数为 13 倍。

### 3 千金藤素 (CH)体内逆转耐药性作用

ADR 及 CH 单用组不能延长动物存活时间, ADR 1.72 μmol·kg<sup>-1</sup>与 CH 29.43 μmol·kg<sup>-1</sup>合用组实验动物存活时间延长,生命延长率为 75.37%,与对照组相比差异有显著性 (P < 0.05)。结果见表 1。

**Table 1 Effect of cepharanthine hydrochloride (CH) in combination with adriamycin (ADR) on survival time of mice with EAC/ADR**

Group	Dose / μmol·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> (×7 d)	Survival time /d	Increase in life span over control ILS
Control	-	13.4 ± 2.2	-
ADR	1.72	12.6 ± 2.3	-
CH	29.43	14.4 ± 2.3	7.46%
CH + ADR	29.43 + 1.72	23.5 ± 3.0 <sup>△</sup>	75.37%

n = 10,  $\bar{x} \pm s$ . \* P < 0.05 vs control group; <sup>△</sup> P < 0.05 vs ADR group

### 4 千金藤素 (CH)对 EAC/ADR 细胞 NF-κB 活性的影响

EAC 及 EAC/ADR 细胞在无化疗药物诱导的情况下, NF-κB 均呈持续活化状态,但耐药细胞中 NF-κB 活性高于敏感细胞,两者相比差异有显著性 (P < 0.05)。化疗药 ADR 可激活耐药细胞的 NF-κB 活性,对敏感细胞无影响。CH 不但可抑制 EAC/ADR 细胞中 NF-κB 持续性活性,而且可抑制 ADR 对 NF-κB 的激活,但均未被抑制至敏感细胞水平。体内实验荷瘤小鼠 EAC/ADR 细胞核内 NF-κB 呈持续性活化状态, ADR 作用 2 h 后诱导 NF-κB 活化。单用 CH 2 h, NF-κB 活性被抑制 (P < 0.05)。CH 与 ADR 合用 2 h 后,明显抑制 ADR 对 NF-κB 活性的诱导。结果见表 2, 3。

**Table 2 Effect of CH in combination with ADR on NF-κB binding activity in EAC/ADR and EAC**

Group	Concentration / μmol·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> (×2 h)	NF-κB scanning value	
		EAC	EAC/ADR
Control	-	1 581 ± 143	2 713 ± 104 <sup>+</sup>
ADR	21.55	1 663 ± 80	3 613 ± 128 <sup>*</sup>
CH	4	1 572 ± 99	2 014 ± 103 <sup>+</sup>
ADR + CH	21.55 + 4	1 637 ± 91	2 152 ± 119 <sup>+</sup> <sup>△</sup>

n = 9,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>+</sup> P < 0.05 vs control group, CH group and ADR + CH group of EAC cells; <sup>\*</sup> P < 0.05 vs control group of EAC/ADR cells; <sup>△</sup> P < 0.05 vs ADR group of EAC/ADR cells

**Table 3 Effect of CH in combination with ADR on NF-κB binding activity in EAC/ADR cells of mice with EAC/ADR**

Group	Dose / μmol·kg <sup>-1</sup> (×2 h)	NF-κB scanning value
Control	-	2 668 ± 146
ADR	1.72	3 436 ± 209 <sup>*</sup>
CH	29.43	2 108 ± 160 <sup>*</sup>
CH + ADR	29.43 + 1.72	2 189 ± 154 <sup>*</sup> <sup>+</sup>

n = 5,  $\bar{x} \pm s$ . \* P < 0.05 vs control group; <sup>+</sup> P < 0.05 vs ADR group

### 讨论

多药耐药性 (MDR) 的形成机制十分复杂,肿瘤细胞可通过不同途径导致 MDR 的产生。诱导细胞凋亡是化疗药物抗肿瘤的主要机制之一,而凋亡受阻是肿瘤细胞产生耐药性的主要原因之一。肿瘤细胞凋亡传导通路的异常,将为筛选逆转剂提供新的靶点。新近的研究表明, NF-κB 活化在抵抗细胞凋亡中有着重要的作用。它可以上调抗凋亡基因的表达发挥对抗凋亡的功能<sup>[10]</sup>。化疗药物能够诱导 NF-κB 活化,活化的 NF-κB 通过其抗凋亡功能,增加肿瘤细胞对抗化疗药物诱导凋亡的能力,形成肿瘤细胞耐药。抑制 NF-κB 活性,可以增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,从而逆转耐药<sup>[11]</sup>。千金藤素是一种双苄基异喹啉类生物碱<sup>[12]</sup>,具有消炎抑菌、调节免疫功能等作用。近年来国外学者报道其具有逆转 MDR 的作用<sup>[3]</sup>,实验表明千金藤素还可以抑制 NF-κB 活性<sup>[4]</sup>,因此,作者推测千金藤素逆转耐药性的作用与抑制 NF-κB 活性有关。

本研究通过体内和体外逆转实验,证明千金藤素 (CH) 能够逆转 EAC/ADR 对 ADR 的耐药性。4 μmol·L<sup>-1</sup> CH 与 ADR 合用可降低 ADR 对 EAC/ADR 细胞的 IC<sub>50</sub>值,逆转倍数为 13 倍,动物实验也观察到 CH 与 ADR 合用延长了荷 EAC/ADR 小鼠的生存时间。结果与以往的研究一致。同时,本研究还检测了 EAC 及 EAC/ADR 细胞 NF-κB 的活性及药物对其的影响,发现 EAC 及 EAC/ADR 细胞中 NF-κB 均呈持续性活化状态,但耐药株活性明显高于敏感株;化疗药 ADR 可以激活耐药株细胞 NF-κB 活性,对敏感株无影响;CH 不同程度地抑制了耐药细胞中 NF-κB 的持续性活性以及 ADR 诱导的活化。动物实验获得了一致的结果。表明 NF-κB 的持续性活化以及化疗药物的激活,参与了 EAC/ADR 细胞耐药性的形成,CH 逆转多药耐药的机制可能与抑制 NF-κB 活性有关。本实验还观察到 CH

未能完全逆转 MDR, 可能与其仅部分抑制了 NF- $\kappa$ B 活性以及 EAC/ADR 细胞还存在其他耐药机制有关。

CH 如何抑制 NF- $\kappa$ B 活性, 尚需进一步研究。

CH 是从传统中草药地不容中提取出来的生物碱单体化合物, 目前, 在日本临床上用于放、化疗所致白细胞减少的治疗已有 20 余年, 已经有大剂量用药的经验而未发现明显毒副作用的报道, 对该药作进一步研究具有重要意义。

## References

- [ 1 ] Pommier Y, Sordet O, Antony S, *et al.* Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks [ J ]. *Oncogene*, 2004, **23** (16): 2934 - 2949.
- [ 2 ] Arlt A, Schafer H. NF $\kappa$ B-dependent chemoresistance in solid tumors [ J ]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2002, **40**(8): 336 - 347.
- [ 3 ] Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, *et al.* Modulation of multidrug resistance by cepharanthine in fresh human gastrointestinal tumor cells [ J ]. *Oncology*, 1997, **54** (2): 153 - 157.
- [ 4 ] Okamoto M, Ono M, Baba M. Potent inhibition of HIV type 1 replication by an antiinflammatory alkaloid, cepharanthine, in chronically infected monocytic cells [ J ]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998, **14**(14): 1239 - 1245.
- [ 5 ] Wang QD, Liu MJ, Li GD, *et al.* Establishment of multidrug resistance to adriamycin in Ehrlich ascites carcinoma *in vivo* [ J ]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1993, **9**(2): 122 - 128.
- [ 6 ] Marks DC, Belov L, Davey MW, *et al.* The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells [ J ]. *Leuk Res*, 1992, **16** (12): 1165 - 1173.
- [ 7 ] Guo Y, Hu YF, Cheng GF. Induction of NF- $\kappa$ B in mouse peritoneal macrophages by inflammatory irritants [ J ]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, **34**(8): 586 - 589.
- [ 8 ] Guo FK, Li YL, Wu SG. Detection of NF- $\kappa$ B by Sandwich ELISA [ J ]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, **16**(1): 227 - 228.
- [ 9 ] Han R. *Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques* (抗癌药物研究与实验技术) [ M ]. Beijing: Peking Union Medical College and Beijing Medical University Press, 1997. 199 - 203.
- [ 10 ] Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B and cancer: its role in prevention and therapy [ J ]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **64**(5 - 6): 883 - 888.
- [ 11 ] Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B [ J ]. *J Clin Invest*, 2001, **107**(3): 241 - 246.
- [ 12 ] Cui JQ. Summarize of pharmacological function of cepharanthine [ J ]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, **26**(9): 502 - 503.