

圣和散逆转胃癌 SGC 7901/VCR 细胞多药耐药的研究

夏跃胜¹ 王建华¹ 吴永忠² 王 欢³

摘要 目的:探讨中药圣和散逆转胃癌耐药细胞 SGC 7901/VCR 多药耐药的机制。方法:圣和散(浓度 2.5、5 和 10mg/ml)处理胃癌耐药细胞 SGC 7901/VCR,用流式细胞技术检测 P-糖蛋白(P-gp)表达,免疫组织化学 SABC 法及图像分析技术检测 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2(Bcl-2)。结果:实验组 SGC 7901/VCR 细胞 Bcl-2 表达 A 值(121.34 ± 0.16)明显高于对照组(104.37 ± 0.089)($P < 0.05$),Bcl-2 表达减少,P-gp 表达也明显降低。结论:圣和散能逆转胃癌耐药细胞 SGC 7901/VCR 多药耐药,其作用可能与调节 Bcl-2 和 P-gp 表达有关。

主题词 胃肿瘤/中医药疗法 抗药性,多药/中医药疗法 @ 圣和散

Study on Shenghe Powder for Reversion of Multidrug Resistance of SGC 7901/VCR Cells of Gastric Cancer

Xia Yuesheng¹, Wang Jianhua¹, Wu Yongzhong², et al.

(1. The Fifth Staff Hospital, General Rear-Service Department of PLA, Shanxi 044500; 2. Tangdu Hospital of The Forth Military Medical University of PLA)

Objective:To explore the mechanism of Shenghe Powder(SHP) in reversion of multidrug resistance of SGC 7901/VCR cells of gastric cancer. **Methods:**Gastric cancer drug-resistance cells SGC 7901/VCR were treated with SHP at concentrations of 2.5, 5.0 and 10mg/ml. The expression of P-glycoprotein(P-gp) was detected with flow cytometry and B-cell lymphoma/leukemia-2(Bcl-2) protein was examined by immunohistochemical SABC method and imaging analysis. **Results:**In SHP treated group, A value of Bcl-2 in SGC 7901/VCR cells was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 and P-gp was significantly down-regulated. **Conclusion:**SHP can reverse the multidrug resistance of SGC 7901/VCR, which is possibly related with the changes of the expressions of Bcl-2 and P-gp.

Key Words Gastric tumor/TCM therapy; Resistance, multidrug/TCM therapy; @ Shenghe Powder

胃癌多药耐药(MDR)是胃癌化疗失败的主要原因之一^[1],P-糖蛋白(P-gp)是与胃癌MDR相关的主要分子,其表达水平与细胞膜通透性、细胞内药物浓度以及细胞耐药程度密切相关^[2,3]。B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2(Bcl-2)作为目前已知的抑制细胞凋亡最重要的一种基因,当其表达增加时,癌细胞对各种化疗药物所导致的细胞凋亡产生抵抗,同样导致耐药发生^[4,5]。本实验主要观察中药圣和散逆转胃癌 SGC 7901/VCR 耐药细胞MDR的作用。

1 材料

1.1 人胃癌细胞株:SGC 7901/VCR(引自第四军医大学西京医院),常规培养于含 10%胎牛血清,100U/ml 青霉素、50U/ml 庆大霉素的 RPMI1640 培养液中,在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱内传代培养。

1.2 药物与试剂:RPMI1640 细胞培养基(美国 Gibco 公司);噻唑蓝(MTT)、曲拉通(Triton X-100,美国 Sigma 公司);抗 P-gp 单抗(美国 Immunotech 公司);

抗 Bcl-2mAb(美国 Santa Cruz 公司);5-氟脲嘧啶(5-Fu)(山东齐鲁制药厂)。

1.3 主要仪器:流式细胞仪(美国 BD 公司);M₂AS-300 图像分析仪(四川大学)。

2 方法

2.1 药物处理:将中药圣和散(SHP,主要含党参、太子参、玄参、炒白术、薏苡仁、土鳖虫、白花蛇舌草、肉苁蓉、蟾酥、甘草)经多酶乳化流程水提后^[6],喷雾得干燥粉末,取适量磷酸缓冲液(PBS)溶解,上清用 0.22 μm 的滤过膜过滤,配制成浓度 10mg/ml 的药液。

2.2 SHP 逆转细胞MDR的测定:取对数生长期 SGC 7901/VCR 种于 96 孔板,过夜。每孔分别加入 SHP(2.5、5、10mg/ml 分别为 SHP 低、中、高剂量组)与 5-Fu(100nmol/L,5-Fu 组)各 10 μl,同时设空白对照组(不加药物,只加培养液),培养 3 天。加 5mg/ml 的 MTT 20 μl 培养 4 小时,加二甲基亚砜 150 μl 振荡,酶标仪 595nm 处检测吸收光度,计算癌细胞抑制率。癌细胞抑制率 = (1 - 加药组 A₀ 值/对照组 A₀ 值) × 100%。

2.3 P-gp 的测定:待测定细胞加入 PBS 振荡后,离心,弃上清液,加入 1%Triton X-100 摇匀后静置 10 分钟,离心,每管加入 20 μl 抗 P-gp-PE,其中一管加入

基金项目:山西省科技发展计划项目(002059)

1 中国人民解放军总后勤部第五职工医院[现调至:永济市肝胆病医院,山西省永济市中山东街 39 号(044500)]

2 中国人民解放军第四军医大学唐都医院

3 山西中医学院

收稿日期:2005-06-14;修回日期:2005-11-10

20 μ g IgG 2 α PE 作为阴性对照,置 4℃ 冰箱避光孵育 30 分钟,加入 PBS 洗液 0.5ml,振荡后上机。用 Cell Quest 软件分析。

2.4 Bcl-2 测定:在六孔板中每孔均放置 22mm × 22mm 的盖玻片一块,并加入对数生长期 SGC7901/VCR 细胞 5×10^5 个,贴壁 24 小时后换培养液,实验组同时加入 SHP 10mg/ml,继续培养 48 小时,对照组处理方式相同,仅未加 SHP。(1) 免疫组织化学采用 SABC 法,第一抗体 Bcl-2 mAb(工作浓度为 1:100),用 TBS 替代第一抗体作为空白对照。(2) 图像分析通过显微镜和摄像头将免疫组化片输入图像分析仪,对包膜和胞浆内染色强度作区域性测定。采用随机法选取视野,每侧测 100 个细胞,用吸光度 A_0 表示染色强度,用吸光度平均值代表每组阳性细胞的染色强度 A 。

2.5 统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 SHP 对 SGC7901/VCR 抑制率的影响:SHP 低、中、高剂量组和 5-Fu 组 24 小时对 SGC7901/VCR 抑制率分别为:18.3%、34.5%、34.8%和 32.5%;48 小时分别为:33.6%、69.4%、78.0%和 68.5%;72 小时分别为:57.2%、72.1%、79.5%和 61.7%。空白对照组细胞生长活跃,无明显生长抑制现象发生。随着 SHP 浓度增大对 SGC7901/VCR 抑制率明显增强,尤其以 5mg/ml 和 10mg/ml SHP 作用明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 SHP 对 P-gp 表达的影响:SHP 能明显下调 SGC7901/VCR 细胞 P-gp 的表达,且随 SHP 浓度上升而增强。

3.3 SHP 对 Bcl-2 表达的影响:Bcl-2 在 SHP 实验组和对照组 SGC7901/VCR 细胞中几乎均呈现不同程度的阳性反映,Bcl-2 阳性物质主要位于胞质内,但胞膜上也可见少量棕色细颗粒,SHP 实验组和对照组比较,Bcl-2 表达减少,两组阳性细胞 A 值分别为 (121.34 ± 0.16) 和 (104.37 ± 0.089) ,差异有显著性($P < 0.05$)。

4 讨论

多药耐药是指肿瘤对一种化疗药物产生耐药的同时,对结构和作用不同的化疗药物产生交叉耐药性^[7]。其产生主要是因为 *mdr1* 基因编码的 P-gp 表达增加。P-gp 是一种分子量为 170KD 的跨膜糖蛋白,为能量依赖性药物外排泵,能将药物排出细胞外,导致细胞内药物的浓度降低,使药物作用减弱或丧失而获得抗药性。肿瘤化疗失败与 P-gp 的过度表达有关^[3],同时除

P-gp 引起的经典耐药机制外,Bcl-2 可通过抑制肿瘤细胞凋亡途径导致耐药发生。Bcl-2 基因定位于人染色体 18,q21,在细胞凋亡的分子调控中起着重要作用,在胃癌组织中,其表达程度影响着疾病的预后,通过抑制 Bcl-2 表达能明显提高化疗效果,增强胃癌患者远期疗效。因此,寻求低毒有效的逆转 MDR 药物是当前研究的热点。

从中医辨证分析,恶性肿瘤属于中医学“积聚”范畴,肿瘤多药耐药性的产生与人体经过化疗打击后正气亏虚、邪气稽留有关,临床上患者常表现为脾肾亏虚,气血不足,故通过补气养血、健脾补肾等治则来增强化疗效果是中医克服化疗耐药性的主要手段。SHP 以党参、炒白术、薏苡仁健脾益气,太子参、玄参滋阴补肾,培补正气之不足;以土鳖虫破瘀散结,白花蛇舌草、蟾酥解毒消症,肉苁蓉温阳化积,诸药合用,使正气得复,瘀积得消。SHP 是我们近年来用于治疗恶性肿瘤的有效方剂,能明显降低胃癌术后复发与转移率,增强化疗效果^[8]。同时采用多酶乳化流程提取,多糖、小分子多肽等活性成分明显增加^[6],为多靶点、多途径治疗提供了可能。本研究提示,SHP 在浓度 2.5~10mg/ml 时对体外培养的胃癌 SGC-7901/VCR 细胞均有抑制作用,且存在浓度、时间与抑制作用的量-效关系,并能同时降低 P-gp 和 Bcl-2 的表达。由此推测,SHP 增强化疗效果与降低 P-gp 和 Bcl-2 的表达,逆转 MDR 有关。

参考文献

- 1 Chipponi J, Huguier M, Pezet D, et al. Randomized trial of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer. *Am J Surg*, 2004, 187(3): 440~445.
- 2 布立民, 韩英. 逆转胃肠道肿瘤多药耐药的研究进展. *实用癌症杂志*, 2002, 18(1): 105~107.
- 3 Choi JH, Lim HY, Joo HJ, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein 1, P-glycoprotein, and thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant chemotherapy after curative resection. *Br J Cancer*, 2002, 86(10): 1578~1585.
- 4 Yoon KA, Ku JL, Yang JO, et al. Telomerase activity, expression of Bcl-2 and cell cycle regulation in doxorubicin resistant gastric carcinoma cell lines. *Int J Mol Med*, 2003, 11(3): 343~348.
- 5 吴裕. 要重视对消化道肿瘤细胞凋亡的研究. *中华消化杂志*, 1997, 17(3): 127~128.
- 6 夏跃胜. 圣和散对恶性胶质瘤术后放疗预后的影响. *光明中医*, 2005, 20(6): 50~51.
- 7 Baldini N. Multidrug resistance: a multiplex phenomenon. *Nat Med*, 1997, 3(4): 378~380.
- 8 夏跃胜, 王建华, 高潮光. 圣和散对胃癌术后复发、转移率的影响. *中国中西医结合外科杂志*, 1996, 2(6): 402~404.