

● 论 著 ●

小柴胡汤逆转人肝癌细胞 BEL-7402/5-FU 的多药耐药作用*

赵锦燕^{1,2} 刘丽雅^{1,2} 张毓宸^{1,2} 冯健愉^{1,2} 曾建伟^{1,2} 洪振丰^{1,2#}

(1 福建中医药大学中西医结合研究院 福州 350122; 2 福建省老年性疾病重点实验室 福州 350122)

摘要:目的:研究小柴胡汤对 BEL-7402/5-FU 细胞多药耐药的逆转作用,并初步探讨其作用机制。方法:采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT)法检测不同化疗药物以及小柴胡汤对 BEL-7402/5-FU 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀),计算耐药指数和小柴胡汤的逆转倍数;流式细胞仪检测细胞内阿霉素的荧光强度;RT-PCR 检测 mdrl 基因表达;western blot 检测 p-gp 蛋白表达。结果:BEL-7402/5-FU 耐药株对 5-FU 和阿霉素顺铂均具有耐药性,耐药指数分别是 6 501.99 和 31.73;0.5 mg/ml 小柴胡汤和 5-FU、阿霉素联合应用,其逆转倍数分别是 1.66、1.50;1.0 mg/ml 小柴胡汤和 5-FU、阿霉素联合应用,其逆转倍数分别是 3.44、5.58;小柴胡汤增强阿霉素的荧光强度;小柴胡汤降低 mdrl 基因表达和 p-gp 蛋白表达,各个浓度均具有统计学意义。结论:小柴胡汤可以抑制 mdrl 基因编码蛋白产物 p-gp 的表达,增加细胞内化疗药物的浓度,从而逆转了肝癌细胞的多药耐药性。

关键词:肝癌;小柴胡汤;多药耐药;逆转

Xiaochaihu Tang Reverses Multidrug Resistance in Resistant Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line BEL-7402/5-FU

ZHAO Jin-yan^{1,2}, LIU Li-ya^{1,2}, ZHANG Yu-chen^{1,2}, FENG Jian-yu^{1,2}, ZENG Jian-wei^{1,2}, HONG Zhen-feng^{1,2#}

(1Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou350122;

2Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou350122)

Abstract: Objective: To determine the reversal effect of Xiaochaihu tang (XCHT) on the resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-FU and explore its mechanism. Methods: The IC₅₀ of BEL-7402/5-FU cells was examined by MTT and calculated the resistance index (RI) and the reversal folds (RF) of XCHT. Intracellular Adriamycin (ADM) concentration was determined by flow cytometry. RT-PCR and western blot was used to detected the expression of mdrl and p-gp respectively. Results: BEL-7402/5-FU showed resistance to variety of chemotherapeutic drugs, the RI of 5-FU or ADM was 6 501.99 or 31.73.XCHT (0.5 mg/ml or 1.0 mg/ml) combined with 5-FU and ADM, the reversal fold was 1.66 and 1.50 or 3.44 and 5.58. XCHT increased the intracellular concentration of ADM. XCHT down-regulated the mdrl and p-pg expression, and both had significant difference. Conclusion: XCHT can inhibit the expression of p-gp coded by mdrl gene, and increase the intracellular concentration of chemotherapeutic drugs, so as to reverse the multidrug resistance of HCC cells.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Xiaochaihu tang; Multi-drug resistance; Reverses

中图分类号:R96

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.09.001

肝细胞癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC) 是世界上常见的恶性肿瘤之一,其发病率位居癌症中的第 6 位,死亡率位居第 3 位^[1]。在我国,因肝癌死亡的人数每年约 11 万,几乎占全世界肝癌死亡人数的 45%^[2]。化疗是肝癌治疗的一个重要手段,尽管临床上不断推出新的抗癌药物及化疗方案,但疗效却不尽如人意。导致这一现象的主要原因是肝癌细胞对化疗药物产生了耐药性,即多药耐药 (Multidrug Resistance, MDR)。中医药作为我国国粹,因其具有“高效、低毒、多靶点”等特性,被广泛应用于各种肿瘤的治疗。大量的临床资料表明,化疗配合中药治疗肿瘤比单纯化疗或中药治疗具有更好的疗效和更低的不良反应。从天然药物中寻找具有高效低毒的逆转剂成为提高化疗疗效的关键,也是目前研究的热点之一^[3-4]。大量研究表明,小柴胡汤及其加减方被广泛用于防治多种恶性肿瘤^[5-7]。本研究以人肝癌多药耐药细胞株 BEL-7402/5-FU 为研究对象,旨在探讨小柴胡汤对肝癌细胞多药耐药的逆转作用及其

可能的作用机制。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 实验材料 细胞株:人肝癌细胞株 BEL-7402 及人肝癌耐药细胞株 BEL-7402/5-FU 均购自南京凯基生物技术公司。药物:柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、大枣、生姜购自福建省同春药业股份有限公司。参考 2010 版《中国药典》完成小柴胡汤药物配制。柴胡、黄芩、人参、甘草及大枣加水煎煮 2 次,每次 1.5 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩至适量;半夏、生姜用 100 ml 70%乙醇浸泡 24 h,收集提取液,回收乙醇,与上述浓缩液合并,浓缩至相对密度为 1.08~1.10 (60 ℃) 的药液,喷雾干燥,制成干浸膏粉,备用。主要试剂:胎牛血清 (批号:10099-141)、胰酶 (批号:1391607) 和 RPMI-1640 培养液 (批号:C11875500CP) 购自 Life 公司;MTT 购自美国 AMRESCO 公司 (货号:0793);Trizol (批号:9109) 和逆转录试剂盒 (批号:DRR037A) 购自 TaKaRa 公司;阿霉素 (ADM) 购自美国 sigma 公司 (批号:

* 基金项目:国家自然科学基金项目 (编号:81303125)

通讯作者:洪振丰, E-mail: zfhong1953@163.com

D1515);p-gp 抗体购自博奥森公司 (批号:BS-0563R)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞株 BEL-7402 培养于 RPMI1640 培养液,内含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素,置 37 ℃、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养;人肝癌细胞 BEL-7402/5-FU 除上述培养条件外,还需在培养液中加入终浓度 20 μg/ml 5-FU 以维持细胞的耐药性。

1.2.2 两株细胞对化疗药物的敏感性检测 取指数生长期的 BEL-7402 细胞和 BEL-7402/5-FU 细胞胰酶消化后,按 1×10⁵ 个/ml 的密度接种于 96 孔板,培养 24 h,分别用 5-FU 和 ADM 干预,每个浓度设 8 个复孔,并设空白对照组。继续培养 48 h 后,弃上清,加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl 继续培养 4 h 后,弃去上清,每孔加入 100 μl DMSO,震荡溶解沉淀,酶标仪在波长 570 nm 下读取吸光度值,通过 SPSS11.5 软件计算各种化疗药物对 BEL-7402 细胞和 BEL-7402/5-FU 细胞的 50% 抑制率的剂量 (IC₅₀), 计算耐药指数 (RI)。RI=IC₅₀ (BEL-7402/5-FU)/IC₅₀ (BEL-7402)。

1.2.3 小柴胡汤逆转耐药情况 上述同样方法接种细胞,培养 24 h 后,0.5 mg/ml 和 1.0 mg/ml 小柴胡汤分别和不同的化疗药物联合应用,干预 48 h 后,用 MTT 法测定各组 OD 值,计算 IC₅₀ 和逆转倍数 (Reversal Fold) [RF=IC₅₀ 化疗药物 /IC₅₀ (化疗药物 + 小柴胡汤) × 100%]; 相对逆转率 (Relative Reversal Rate, RRR)= [(IC₅₀ 化疗药 in BEL-7402/5-FU -IC₅₀ 化疗药 +XCHT in BEL-7402/5-FU)/ (IC₅₀ 化疗药 in BEL-7402/5-FU -IC₅₀ 化疗药 in BEL-7402)] × 100%。

1.2.4 细胞内阿霉素的蓄积 BEL-7402/5-FU 细胞经接种和小柴胡汤干预 48 h 后,重新消化、离心、细胞计数后,调整细胞浓度至 1×10⁶/ml,取 1 ml 加入 1 mg/ml 的阿霉素 5 μl,在 37℃ 孵育 10 min 后离心 (1 000 rpm, 3 min),除去培养基,再用新鲜培养基洗去细胞外的染料;用 1 ml 新鲜 RPIM1640 培养基重悬,在 37 ℃培养箱中孵育 30 min;离心,弃上清,用预冷的 PBS 清洗 3 遍后,以流式细胞仪 (FACS) 用 488 nm 激发光检测 10 000 个细胞内的荧光强度,计算荧光强度平均值。

1.2.5 RT-PCR 检测 mdrl mRNA 的表达 按上述方法接种细胞,干预 48 h 后,Trizol 法提取细胞中总 RNA。以管家基因 GAPDH 为对照,引物序列利用

Primer 5.0 软件进行设计,扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳,结果用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统进行电泳条带分析,引物序列及扩增产物片段长度:mdrl (228bp)F:5'-CAA GCA CTG AAA GAT AAG AAA GAA-3';R:5'-GAA ACA TCC AGC ATA GGA AAA ATA-3'。

1.2.6 western blot 检测 p-gp 蛋白的表达 实验分组及处理方法同前。各组收集细胞后,使用含有 PMSF 的 Western 和 IP 裂解液 500 μl 裂解细胞,10 000 × g 高速离心 10 min,收集上清后 BCA 法进行蛋白定量。各组样本取 50 μg 蛋白加入上样缓冲液后 100 ℃变性 5 min。SDS-PAGE 上样电泳,条件:浓缩胶电压 80 V,分离胶 100 V。电泳完后进行转膜:100 V 条件下 45 min 将蛋白转移至 PVDF 膜上。常温封闭 120 min 后一抗 4 ℃孵育过夜。然后将 PVDF 膜用 TBS-T (0.05% tween-20) 漂洗 3 次 × 10 min,常温二抗孵育 1 h,再次用 TBS-T 漂洗 3 次 × 10 min。使用 BeyoECL Plus 化学发光试剂处理 PVDF 膜,于化学发光成像系统 ChemiDocXRS+ 下成像。

1.3 统计学处理 所有数据均采用 SPSS11.5 统计学软件进行统计学处理,数据结果用均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间样本的均数比较采用单因素方差分析。P<0.05 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 MTT 法检测药物的敏感性 MTT 法检测抗癌药物对两组细胞的细胞毒作用,对 5-FU 和 ADM 这 2 种化疗药物,BEL-7402 组的 IC₅₀ 分别为:275.3 和 1.97 μM;BEL-7402/5-FU 组细胞较亲本细胞显示出耐药性,其 IC₅₀ 分别为:1.79×10⁶ 和 62.5 μM,其 RI 分别为:6501.99、31.73。通过结果分析可见 BEL-7402/5-FU 细胞除对 5-FU 有很高的耐药性外,对 ADM 也出现交叉耐药,即产生了多药耐药性。见表 1。

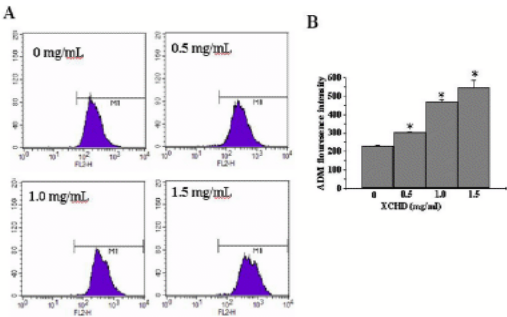
Cell line	IC50	
	5-FU(μ M)	ADM(μ M)
BEL-7402	275.3	1.97
BEL-7402/5-FU	1.79*10 ⁶	62.5
RI	6501.99	31.73

2.2 小柴胡汤对 BEL-7402/5-FU 细胞耐药性的逆转效应 0.5 mg/ml 和 1.0 mg/ml 小柴胡汤与化疗药物 (5-FU 和 ADM) 联合应用 48 h 后,其 RF 分别是 1.66,1.50 和 3.44,5.58, 相对逆转率分别是 39.88,34.11%和 71.34,84.51%。

表 2 小柴胡汤对 BEL-7402/5-FU 细胞的逆转效果

Reversal resistance of 5-FU				Reversal resistance of ADM		
	IC ₅₀ of 5-FU(μM)	RF	RRR(%)	IC ₅₀ of ADM(μM)	RF	RRR(%)
XCHD(0mg/ml)	1.75*10 ⁶			62.5		
XCHD(0.5mg/ml)	1.08*10 ⁶	1.66	39.88	41.79	1.50	34.11
XCHD(1.0mg/ml)	0.52*10 ⁶	3.44	71.34	11.19	5.58	84.51

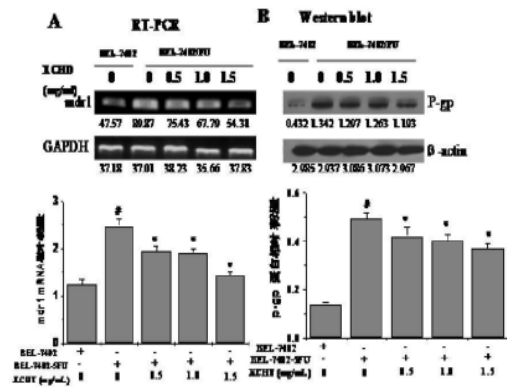
2.3 小柴胡汤对 ADM 在细胞内蓄积的影响 肝癌耐药细胞 BEL-7402/5-FU 经不同浓度小柴胡汤干预后, 细胞内 ADM 荧光强度逐渐增强, 呈剂量依赖。见图 1。



注: 与对照组比较, *P<0.05。

图 1 流式细胞仪检测 ADM 在 BEL-7402/5-FU 细胞内的蓄积

2.4 小柴胡汤对 mdrlmRNA 和 p-gp 蛋白表达的影响 RT-PCR 结果显示, 肝癌耐药细胞 BEL-7402/5-FU 的 mdrl 表达较 BEL-7402 细胞明显上调, 小柴胡汤干预后, mdrl 表达下调, 呈剂量依赖; western blot 结果显示 p-gp 蛋白表达与 mRNA 表达趋势一致。见图 2。



注: 和 BEL-7402 比较, *P<0.05; 和小柴胡汤 0 mg/ml 干预 BEL-7402/5-FU 比较, *P<0.05。

图 2 小柴胡汤对 mdrl 和 p-gp 表达的影响。A: RT-PCR 检测 mdrl 的 mRNA 表达; B: western blot 检测 p-gp 蛋白表达。

3 讨论

化疗是中晚期肝癌治疗的重要手段, 但肝癌化疗的多药耐药现象, 严重阻碍了化疗药物的作用^[8], 影响患者的生存期。肝癌化疗最重要的耐药原因是 mdrl 基因产物 p-gp 的过度表达^[9]。p-gp 是 ATP 依赖

的跨膜糖蛋白, 可将阿霉素等多种药物排至细胞外, 降低细胞内药物的积聚, 产生耐药性^[10]。寻找高效低毒的 MDR 逆转剂是国内外学者研究的热点^[11], 在这方面中草药有着很大的优势, 小柴胡汤作为治疗少阳病的经典方, 广泛用于各种肝脏疾病的治疗。前期研究发现小柴胡汤对肝癌有疗效, 但是具体作用的分子机制, 尤其有无逆转多药耐药的作用, 尚有待进一步的研究。

小柴胡汤是由柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、大枣、生姜 7 味药组成, 是治疗少阳病证的主方, 被誉为“少阳枢机之剂, 和解表里之总方”, 功能疏肝利胆、健脾和胃、降上逆之相火, 契合肝癌病机。中医药传统将小柴胡汤用于具有少阳病证候的发热、恶心呕吐、头晕目眩、黄疸、疟疾等。现代临床研究发现小柴胡汤对于防治食管癌、肺癌、大肠癌、乳腺癌和肝癌均有显著疗效^[5,12-15]。

本研究应用构建成功的肝癌耐药细胞株 BEL-7402/5-FU 和亲本 BEL-7402 细胞观察小柴胡汤的逆转作用。实验结果发现, 与 BEL-7402 细胞相比, 耐药株 BEL-7402/5-FU 具有更高的耐药指数, 小柴胡汤联合化疗药物应用后有部分逆转作用。进一步研究结果表明, 小柴胡汤能够增加化疗药阿霉素在 BEL-7402/5-FU 细胞内的蓄积, 降低 mdrl 基因和 p-gp 蛋白的表达, 提示小柴胡汤具有逆转肝癌多药耐药的作用, 可能是通过降低多药耐药蛋白 p-gp 的表达而实现的。至于其具体的逆转能力及作用机制, 我们将做进一步的探讨。

参考文献

[1]Levin B,Amos C.Therapy of unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med,1995,332(19):1294-1296
[2]孙燕.内科肿瘤学[M].北京:人民卫生出版社,2001.574-575
[3]蒋吉英,丁洁,李进,等.肝癌多药耐药中药逆转剂的研究进展[J].现代肿瘤医学,2009,17(5):962-964
[4]夏薇,秦忠芳,朱广荣.一种有效的肿瘤耐药逆转剂-汉防己甲素逆转白血病耐药的实验研究[J].南京医科大学学报,1995,15(3): 543-546
[5]金航.小柴胡汤预防肝癌的研究[J].国外医学·中医中药分册,1999,21(1):21-23
[6]沈红梅,黄杰.加味小柴胡汤对癌症化疗患者肝功能保护作用的临床观察[J].云南中医中药杂志,2005,26(6):15-16
[7]刘应柯,宫瑾瑾,刘尚岭.加味小柴胡汤对顺铂诱导大鼠肝 BRL 细胞过氧化损伤的保护作用[J].中医研究,2006,19(12):17-18
[8]王永存,余忠华,李芸.多药耐药基因 1 与肝癌[J].海南医学,2011,22(5):133-136
[9]Huesker M,Folmer Y,Schneider M,et al.Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-M DR1 ribozymes[J].Hepatology,2002,36(4pt1):874- 884

(下转第 35 页)

分及呕吐分级。

1.6 统计学方法 采用 SPSS17.0 对数据进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组呕吐分级比较 所有入选患者均顺利完成治疗,无脱落病例。所有患者呕吐分级局限为 1~3 级,无 4、5 级呕吐事件发生。其中,西医治疗组:1 级呕吐 22 例,2 级呕吐 5 例,3 级呕吐 5 例;中西医结合组:1 级呕吐 24 例,2 级呕吐 5 例,3 级呕吐 5 例。中西医结合组患者依从性良好,经充分与患者沟通,患者了解中药可能缓解呕吐后,均顺利接受中药治疗。见表 1。

表 1 两组患者呕吐分级变化比较[例(%)]					
组别	n	有效	稳定	无效	总有效
中西医结合组	34	22 (64.71)	10 (29.41)	2 (5.88)	32 (94.12)*
西医治疗组	32	12 (37.50)	12 (37.50)	8 (25.0)	24 (75.00)

注:与西医治疗组比较,经卡方检验, $\chi^2=6.668\ 5$, * $P<0.05$ 。

2.2 两组生活质量 KPS 评分比较 见表 2。

表 2 两组患者生活质量 KPS 评分比较[例(%)]					
组别	n	提高	稳定	降低	总有效
中西医结合组	34	22 (64.71)	9 (26.47)	3 (8.82)	31 (91.18)*
西医治疗组	32	11 (34.38)	10 (31.25)	11 (34.38)	21 (65.62)

注:两组比较,经卡方检验, $\chi^2=8.237\ 7$, * $P<0.05$ 。

3 讨论

肺癌为第一大恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌占 80% 左右^[9],绝大部分已经无法根治。化疗在晚期 NSCLC 的治疗中扮演重要角色,采用含铂双药方案占多数。化疗药物为药物毒邪,损伤正气,脾胃虚弱,胃失和降则发呕吐。经查阅既往文献,发现有不少文章报道香砂六君子汤加減治疗化疗相关性呕吐取得显著疗效^[6-7],但多数未考虑具体患者的辨证分型,说服力欠佳。中医治疗疾病核心为望闻问切,四诊合参,辨证论治,本研究经过辨证选择,入组患者均为脾胃气虚型,治疗针对性更强。

本研究结果显示,在治疗脾胃气虚型晚期非小细胞肺癌的化疗相关呕吐患者时,香砂六君子汤加減联合西医治疗较单纯西医治疗有优势,同时也提

高患者生活质量。化疗所致相关性呕吐虚症多见,随着病情发展可见因虚致实,虚实夹杂等。笔者认为化疗早期应用中西药结合干预,病症在初期阶段常常可以得到有效控制。患者呕吐情况改善,降低患者对化疗的恐惧,加强患者对于治疗的信心,同时也就提高这类患者的生活质量。脾胃气虚型肺癌化疗呕吐治疗原则为益气健脾,理气化痰,晚期肺癌化疗呕吐急则治其标,益气健脾,兼顾其本,周岱翰教授认为,肺癌的种种症状皆因痰为患^[8],肺癌的治疗离不开治痰。对于治疗晚期肺癌化疗相关性呕吐患者标本兼顾临床上可以选用经典方香砂六君子汤加減。四君子气分之总方也,党参致冲和之气,白术培中宫,茯苓清治节,甘草调五藏,胃气既治,病安从来,然拨乱反正又不能无为而治,必举大行气之品以辅之。则补者不至泥而不行,故加陈皮以利肺金之逆气,半夏以疏脾土之湿气,而痰饮可除也,加木香以行三焦之滞气,缩砂以通脾肾之元气,而赅郁可开也,君得四辅则功力倍宣,四辅奉君则元气大振,相得而益彰矣。本研究病例数较少,分型也单一,但可以提示我们在治疗化疗相关性呕吐时,除常规应用指南推荐药物外,应该望闻问切辨证论治,合理联合中药常常取得佳效,提高晚期肿瘤病人的生活质量,值得临床进一步研究和推广。

参考文献

[1]卢殿荣,卢殿香,殷玉琨,等.顺铂导致化疗相关性恶心呕吐反应的中药防治[J].长春中医药大学学报,2014,30(4):645-647
[2]魏自敏.肿瘤患者化疗呕吐的辨证论治[J].中医临床研究,2011,3(13):87-88
[3]张影,蔡小平,罗银星,等.扶正消瘤丸治疗恶性肿瘤化疗后胃肠道反应 100 例[J].中医研究,2012,25(1):45-46
[4]何江进.半夏泻心汤防治胃肠肿瘤化疗引起的胃肠道反应临床观察[J].中国中医急诊,2010,19(4):581-582
[5]周际昌.实用肿瘤内科学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2005.537-538
[6]章淼,盛文,郭利华,等.加味香砂六君子汤治疗化疗所致迟发性呕吐 20 例疗效观察[J].云南中医中药杂志,2014,35(1):40
[7]张康美.香砂六君子汤合胃复安预防化疗恶心呕吐反应 40 例[J].现代肿瘤医学,2009,17(10):1989
[8]林丽珠.周岱翰教授从痰辨治癌症经验介绍[J].新中医,2006,38(3):14-16

(收稿日期: 2016-08-16)

(上接第 3 页)

[10]Akiyama S,Chen ZS,Kitazono M,et al.Mechanisms for resistance to anticancer agents and the reversal of the resistance [J].Hum Cell, 1999,12(3):95-102
[11]Heike Y,Kasono K,Kunisaki C,et al.Overcoming multi-drug resistance using an intracellular anti-M DR1 sFv [J].Int J Cancer, 2001,92(1):115-122
[12]梁靓靓,殷东风,周立江.小柴胡汤对 Lewis 肺癌小鼠 VEGF 表达

的实验研究[J].中医药学报,2008,3(4):15-17
[13]杜好信,黄种新,姚成才.小柴胡汤对食管癌细胞株 Eca-109 增殖和凋亡的影响[J].光明中医,2014,29(1):51-54
[14]鄢良春,刘青春,赵军宁,等.小柴胡汤在 Caco-2 细胞模型的吸收特性和转运机制研究[J].中国中药杂志,2011,36(8):1087-1090
[15]秦春华,李凤霞.小柴胡汤辅助化疗治疗晚期乳腺癌的近期疗效观察及其对肿瘤标志物的影响 [J]. 中国医院药学杂志,2015,35(15):1420-1438

(收稿日期: 2016-08-14)