

◆ 实验研究论著 ◆

益肺汤逆转裸鼠移植瘤多药耐药实验研究

凌仕良¹, 张小玲¹, 栾智宇², 山广志¹, 刘帆¹

1. 宁波市中医院, 浙江 宁波 315000; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

[摘要] 目的: 研究益肺汤对人肺腺癌耐顺铂细胞 A549/DDP 裸鼠移植瘤多药耐药逆转作用的机理。方法: 建立 A549/DDP 裸鼠移植瘤模型, 分为 6 组, 每组 10 只, 分别以生理盐水 (对照组)、益肺汤低、中、高剂量 (益肺汤低、中、高剂量组)、益肺汤联合顺铂 (联合组)、顺铂 (顺铂组) 进行干预, 观察移植瘤的生长状况, 隔天测量一次瘤块体积, 给药 21 天后, 处死小鼠取瘤组织, 称重, 实时荧光定量 PCR 检测多药耐药蛋白 (MRP) 基因的表达。结果: 对照组的移植瘤体积最大, 增长最快, 与其他组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。联合组与其他药物组比较, 移植瘤体积最小, 抑瘤率最高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。益肺汤低剂量组与中、高剂量组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而后二者比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。益肺汤低剂量组与顺铂组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。q=1.37, 益肺汤与顺铂在抑制肿瘤生长上有协同作用。实时荧光定量 PCR 检测的结果显示, 益肺汤低、中、高剂量组及联合组的 MRP 基因的表达量均低于对照组, 而顺铂组 MRP 基因表达量却高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。联合组、中剂量组及高剂量组三者相互比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 三者与益肺汤低剂量组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 益肺汤能逆转 A549/DDP 移植瘤的多药耐药性, 其逆转机制可能是通过下调 MRP 基因的表达来实现的。

[关键词] 移植瘤; 益肺汤; 逆转; 多药耐药 (MDR); 多药耐药蛋白 (MRP)

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 10-0202-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.10.095

肿瘤的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是化疗失败的主要原因之一, 开发高效安全的 MDR 逆转剂成为当前肿瘤领域研究的热点及难点。研究发现, MDR 的产生机制与肿瘤细胞多药耐药蛋白 (multidrug resistance protein, MRP) 的高表达有直接关系^[1]。MRP 由 Cole SP 等^[2]于 1992 年从小细胞肺癌 H69/AR 耐药细胞系中克隆出的耐药相关基因所编码, 是分子量为 190kD 的能量依赖型“药泵”的跨膜转运蛋白; 能利用 ATP 水解释放的能量将肿瘤细胞内的化疗药物逆浓度梯度泵至细胞外, 使细胞内化疗药物达不到有效作用浓度而产生耐药性^[3]。近年来, 在临床上发现中医药在肿瘤的治疗中可以起到增效减毒的作用, 提高了化疗的疗效, 这可能与中医药逆转肿瘤 MDR 的作用有关。本实验通过建立人肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP 裸鼠移植瘤模型, 探讨益肺汤对肿瘤生长的抑制作用及对 MRP 表达的影响, 从而揭示益肺汤逆转肿瘤多药耐药的作用机制, 并为临床运用此方提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物 人肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP 细胞 (浙江大学基础医学院提供), 常规传代培养, 取对数生长期的细胞用于实验; BALB/c-nu/nu 裸鼠 80 只, 5~6 周龄, 雌性, 在水平式空气层流净化室内 (SPF 级) 繁殖饲养, 室温保持 (25±2)℃ 及相对湿度 40%~60%, 由浙江中医药大学动物实验中心协助饲养。

1.2 药物及试剂 益肺汤药物组成: 红豆杉 8 g, 白术、半夏各 15 g, 茯苓、党参各 20 g, 陈皮、甘草各 6 g。顺铂注射液 (江苏豪森药业股份有限公司); 高糖 DMEM 培养液、胎牛血清及胰蛋白酶 (美国 GIBCO 公司); 台盼蓝 (上海化学试剂总厂); RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司)。

1.3 细胞培养 A549/DDP 细胞以高糖 DMEM 完全培养液 (含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素) 于 37℃、5% CO₂ 培养箱传代培养。

[收稿日期] 2015-01-22

[基金项目] 宁波市医学科技计划项目 (2010A11)

[作者简介] 凌仕良 (1983-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合肿瘤疾病。

1.4 裸鼠移植瘤模型的建立 收集对数生长期的细胞以 PBS 清洗 2~3 次,生理盐水重悬,台盼蓝拒染法计数活细胞大于 95%,调整细胞浓度至 $5 \times 10^7/\text{mL}$,细胞悬液放置于冰上,将此细胞悬液接种于 BALB/c- nu/nu 裸鼠的颈背部皮下,每只接种 0.2 mL 造模^[1]。

1.5 分组及给药 将造模成功的 60 只裸鼠编号,按随机数字分为对照组、顺铂组、益肺汤低剂量组、益肺汤中剂量组、益肺汤高剂量组及联合组 6 组,每组 10 只,各组间小鼠体重及瘤体积差异无统计学意义($P>0.05$)。然后按如下方法开始分组给药:①对照组:灌胃生理盐水每天 0.4 mL/次;②顺铂组:配制成 0.1 mg/mL 的稀释液,按 2 mg/kg 给药,腹腔注射顺铂稀释液 0.4 mL/次,隔天 1 次;③④⑤益肺汤低、中、高剂量组:中药浸泡 30 min,煎煮 2 次,合并煎液,再浓缩使低、中、高剂量组的生药含量分别为 0.7 g/mL、1.4 g/mL、2.8 g/mL,分别灌胃益肺汤低、中、高剂量每天 0.4 mL/次;⑥联合组,灌胃中剂量浓度益肺汤煎剂每天 0.4 mL/次,同时腹腔注射顺铂稀释液 0.4 mL/次,隔天 1 次。共给药 21 天,然后脱颈法处死所有小鼠,取瘤组织。

1.6 观察移植瘤的生长情况 给药开始后,每隔 1 天测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),按下面公式计算肿瘤的体积(V): $a \times b^2/2$,观察至给药 21 天结束,绘制肿瘤生长曲线。脱颈法处死所有小鼠,取瘤组织,称瘤质量,并计算肿瘤抑瘤率 = $[1 - (\text{给药组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重})] \times 100\%$;按文献[4]计算 q 值来判断益肺汤与顺铂合用的效果: $q = E_{1+2} / (E_1 + E_2 - E_1 \times E_2)$,式中 E_{1+2} 表示联合用药组的抑瘤率; E_1 表示中剂量组的抑瘤率, E_2 表示顺铂组的抑瘤率。 q 值在 0.85~1.15 之间:两药作用单纯相加; q 值 >1.15 :两药为协同作用; q 值 <0.85 :两药为拮抗作用。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测 MRP 基因的表达 提取瘤组织总 RNA,然后进行逆转录反应,合成 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 检测相关目的基因 MRP 的表达。目的基因 MRP 的引物序列为:上游引物:5'-TGATGGCTCCGATCCACTCT-3',下游引物:5'-TCCACAGAAAGAATCCTAAGGCA-3'。按照实时荧光定量 PCR 试剂盒的说明书构建反应体系,检测 MRP 基因的表达情况。

1.8 统计学方法 实验数据采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量数据用($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较用单因素方差分析,并经 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组移植瘤的生长情况比较 见表 1。对照组的移植瘤体积最大,增长最快,与其他组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。联合组与其他药物组比较,移植瘤体积最小,抑瘤率最高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。益肺汤低剂量组与中、高剂量组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。而后二者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。益肺汤低剂量组与顺铂组

比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。 $q=1.37$,益肺汤与顺铂在抑制肿瘤生长上有协同作用。

表 1 各组移植瘤的生长情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	平均瘤质量(g)	抑瘤率(%)	平均体积(mm ³)	
			干预前	干预后
对照组	3.96±1.16 ^②	-	301.6±177.0	2651.4±964.7
益肺汤低剂量组	3.32±0.34 ^{①②}	16.16	298.6±169.7	2098.3±255.5 ^①
益肺汤中剂量组	2.64±0.37 ^{①②}	33.33	294.8±151.1	1506.7±257.0 ^①
益肺汤高剂量组	2.52±0.35 ^{①②}	36.36	298.0±159.5	1489.0±383.6 ^①
联合组	1.53±0.35 ^①	61.36	312.0±244.0	985.9±214.8 ^①
顺铂组	3.27±0.72 ^{①②}	17.42	310.0±190.3	2046.7±656.6 ^①

与对照组比较,① $P<0.05$;与联合组比较,② $P<0.05$

2.2 各组多药耐药基因 MRP 的表达比较 见表 2。实时荧光定量 PCR 检测的结果显示,益肺汤低、中、高剂量组及联合组的 MRP 基因的表达量均低于对照组,而顺铂组 MRP 基因表达量却高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。联合组、中剂量组及高剂量组三者相互比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),三者与益肺汤低剂量组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 各组多药耐药基因 MRP 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	平均 MRP 基因表达量
对照组	0.3054±0.03135
益肺汤低剂量组	0.2442±0.07296 ^①
益肺汤中剂量组	0.1020±0.05367 ^{①②}
益肺汤高剂量组	0.0946±0.03568 ^{①②}
联合组	0.1291±0.03536 ^{①②}
顺铂组	0.3769±0.02172 ^①

与对照组比较,① $P<0.05$;与益肺汤低剂量组比较,② $P<0.05$

3 讨论

中医学虽无多药耐药的记载,但对于肿瘤的临床治疗过程中出现的百治无效、缠绵不愈的耐药现象,中医学有着“顽病多痰”的独特认识。益肺汤正是基于“顽病多痰”的学术思想,根据肺癌“正气内虚、痰瘀交结”的病机特点,结合“脾为生痰之源”“肺为贮痰之器”“而痰之本无不在肾”及“肺为娇脏,药宜轻平”的病理性性质,参考现代药理研究总结出来的经验方,长期临床总结表明,该方对非小细胞肺癌化疗的耐药逆转具有一定的疗效。

分析实验结果可得出:一方面,从平均瘤体积和抑瘤率来看,联合组的平均瘤体积最小,抑瘤率最高, q 值 = 1.37,说明益肺汤与顺铂产生了协同效应,显示了中西医结合治疗肿瘤的优势。另一方面,从各组 MRP 基因的表达量来看,益肺汤对人肺腺癌耐顺铂细胞 A549/DDP 的 MRP 基因的表达产生了

抑制作用,虽然益肺汤高剂量组的 MRP 基因表达量最低,但与中剂量组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示益肺汤高剂量组在抑制 MRP 基因表达上与中剂量组相比并没有优势。

综上所述,通过对平均瘤体积、抑瘤率和 MRP 基因表达量的研究表明,益肺汤可能逆转 A549/DDP 移植瘤的多药耐药性,抑制其生长,并与顺铂产生了协同效应,其机制可能是益肺汤抑制了 A549/DDP 移植瘤多药耐药基因 MRP 的表达,增强了顺铂对 A549/DDP 移植瘤的抑制作用。但是肿瘤多药耐药的形成机制是非常复杂的,MRP 基因的过量表达只是其中的机制之一,所以要彻底揭示益肺汤逆转肿瘤多药耐药的作用机制还有很长的路要走,需要后续的进一步研究。

[参考文献]

[1] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpres-

sion of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line [J]. Science, 1992, 258: 1650-1654.

[2] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(3): 273-286.

[3] 陶黎阳,黎渐英.肺癌 A549 耐药裸鼠移植瘤模型的建立[J].中国医药指南,2011,9(7):5-14.

[4] 卢伟东,傅仲学,覃勇,等.姜黄素逆转结肠癌裸鼠移植瘤多药耐药的研究[J].第三军医大学学报,2011,33(4):376-380.

(责任编辑:骆欢欢)

超微补阳还五汤对侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响

田兆华,唐从耀

深圳市龙岗区中医院,广东 深圳 518172

[摘要] 目的:探讨超微补阳还五汤对侧脑室移植神经干细胞(NSCs)存活和分化的影响。方法:采用大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,将动物随机分为正常组、假手术组、模型组、模型加空白移植组、模型加 NSCs 移植组、移植联合中药组,给予不同处理,分别于 1、7、14、28 天处死动物,采用免疫组织化学法观察内源性神经再生情况。结果:正常组和苏醒 2 h 后假手术组动物未见神经功能缺损,造模后各手术组动物都存在有明显神经功能缺损,但神经功能评分差异无统计学意义($P>0.05$)。随着存活时间延长,各组动物积分逐步减少。用药 7 天和 14 天,NSCs 移植联合中药组神经功能缺损积分降低与其它组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。14 天和 28 天时模型加 NSCs 移植组积分降低多于模型组和模型加空白移植组($P<0.05$)。正常组可见少量 BrdU 阳性细胞散在分布于各脑区,但数量少且排列比较稀疏。脑缺血后即可见 BrdU 阳性细胞增加,7 天时达高峰,而且排列紧密,然后逐渐下降,14 天仍高于正常。7 天和 14 天时 NSCs 移植联合中药组阳性细胞数目明显多于同期各组($P<0.05$);7 天时模型加 NSCs 移植组阳性细胞数量多于模型组($P<0.05$)。结论:超微补阳还五汤通过影响侧脑室移植 NSCs 存活和分化,促进内源性神经再生及神经功能恢复。

[关键词] 补阳还五汤;超微;神经干细胞;脑缺血;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 10-0204-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.10.096

Effect of Micropowder *Buyang Huanwu Tang* on Survival and Differentiation of Neural Stem Cells Transplanted into Lateral Ventricle

TIAN Zhaohua, TANG Congyao

Abstract: Objective: To explore the effect of Micropowder *Buyang Huanwu Tang* (MBYHW) on survival and differentiation of

[收稿日期] 2014-11-08

[作者简介] 田兆华 (1981-),男,主治医师,主要从事中西医结合治疗脑血管疾病研究。