

# 冬凌草活性部位逆转 SGC7901/ADR 细胞多药耐药性的体外研究

高巧慧, 许文婷, 谢 婷, 刘瑞媛, 吴 臻, 李发荣\*

药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室,  
陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062

**摘要:**以 SGC7901 和 SGC7901/ADR 为细胞模型, 检测了冬凌草活性部位与化疗药物联用后, 对 SGC7901/ADR 耐药性的逆转效应; 冬凌草活性部位处理细胞后, 检测耐药细胞内阿霉素的蓄积变化、耐药细胞 P-糖蛋白 (P-gp) 的表达水平以及 *mdr1* 基因的表达变化。结果显示, 冬凌草氯仿部位和乙酸乙酯部位可以有效提高化疗药物阿霉素在 SGC7901/ADR 细胞内的蓄积, 降低 P-gp 的表达, 降低 *mdr1* 基因的转录。冬凌草逆转胃癌耐药细胞 SGC7901/ADR 多药耐药性的活性部位是冬凌草氯仿部位和乙酸乙酯部位, 其逆转作用与抑制 P-gp 的表达相关。

**关键词:** 冬凌草; SGC7901/ADR; 多药耐药; P-糖蛋白

中图分类号: R285.5; Q946

文献标识码: A

## Reversal of Multidrug Resistance in SGC7901/ADR Cells by *Rabdosia rubescens*

GAO Qiao-hui, XU Wen-ting, XIE Ting, LIU Rui-yuan, WU Zhen, LI Fa-rong\*

*Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Shaanxi Xi'an 710062, China*

**Abstract:** The effect of *Rabdosia rubescens* on the expression and function of P-glycoprotein (P-gp) in SGC7901/ADR cell was investigated in this study. The potential bio-active extract fractions were selected to carry out experiments in SGC7901/ADR cells. After treatment with chloroform fraction and ethyl acetate fraction of *R. rubescens*, the cell viability was examined by MTT assay, the expression of P-gp in SGC7901/ADR and SGC7901 cells was determined by fluorescent-labeled antibody technique, and the expression of *mdr1* gene was detected by RT-PCR. The experimental results indicated that chloroform fraction and ethyl acetate fraction of *R. rubescens* increased the intracellular accumulation of adriamycin in SGC7901/ADR cells, and decreased the expression of *mdr1* gene and P-gp. Therefore, chloroform fraction and ethyl acetate fraction of *R. rubescens* had effects on reversal of multidrug resistance of SGC7901/ADR cells, and the mechanism was possibly associated with the inhibition of the expression of P-gp.

**Key words:** *Rabdosia rubescens*; SGC7901/ADR; multidrug resistance; P-glycoprotein

P-糖蛋白 (phospho-glycoprotein, P-gp) 是一类能量依赖型膜转运蛋白, 属于 ABC 转运子家族的成员, 由 *mdr1* 基因编码, 能将结构不同且理化性质不同的化合物转运出细胞<sup>[1]</sup>。P-gp 过表达与肿瘤细胞多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 的发生密切相关, 是肿瘤化疗失败的主要原因<sup>[2]</sup>。冬凌草是一类抗肿瘤中药, 已有 30 余年治疗食管癌的历史,

其毒副作用小, 具有抗肿瘤、抗菌消炎等作用<sup>[3]</sup>。本实验室前期实验研究, 以人结肠腺癌 (colon adenocarcinoma, Caco-2) 细胞作为体外筛选模型得出冬凌草氯仿部位 (HC) 和乙酸乙酯部位 (HE) 能较好抑制 P-gp 的药物外排功能<sup>[4]</sup>, 并证实 HC 和 HE 对 MCF-7/ADR 多药耐药性有逆转作用<sup>[5]</sup>, 本研究 HC 和 HE 对 SGC7901/ADR 细胞耐药性的影响, 考察冬凌草提取物对不同来源的耐药肿瘤细胞是否也具有类似的逆转效应, 为冬凌草提取物的深入开发研究提供基础。

收稿日期: 2013-07-18 接受日期: 2013-11-21

基金项目: 陕西省自然科学基金项目 (2012JM4010); 中央高校基本科研费项目 (GK261001001)

\* 通讯作者 Tel: 86-013772053415; E-mail: lifarong@snnu.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.2.1 材料与仪器

### 1.1.1 细胞株

人胃癌敏感细胞株 SGC7901 和耐阿霉素细胞株 SGC7901/ADR 由第四军医大学西京医院消化病研究所惠赠。

### 1.1.2 试剂与仪器

冬凌草购于陕西西安藻露堂大药房,由陕西师范大学生命科学院田先华教授鉴定为唇形科香茶属植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的全草;RPMI1640 培养基(美国 GIBCO);胎牛血清(FBS,美国 Hyclone);四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma);盐酸维拉帕米(Verapamil, VER,天津市中央药业有限公司,批号:120901);罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rho-123, 美国 Sigma);阿霉素(Adriamycin, ADR, 辉瑞制药无锡有限公司,批号:120808601);二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma);mdr1 上游引物:5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3',下游引物:5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'; $\beta$ -actin 上游引物:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游引物:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3',由上海生工生物科技公司合成。流式细胞仪 BD FACSCalibur(美国 BD)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 冬凌草提取物制备

准确称取冬凌草粉 500 g,用 95% 乙醇回流提取 4 h,过滤,重复三次,合并滤液并浓缩得到冬凌草醇提物,然后将醇提物用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇按照上述方法依次复溶回流提取,合并滤液并浓缩得到不同提取部位,石油醚部位(HP)、氯仿部位(HC)、乙酸乙酯部位(HE)和正丁醇部位(HN)。

### 1.2.2 细胞培养

SGC7901 细胞株和 SGC7901/ADR 细胞株均培养于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液中,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养,其中 SGC7901/ADR 培养液中含 ADR 700 ng/mL,实验前两周去药培养。

### 1.2.3 冬凌草不同活性部位对 SGC7901/ADR 的细胞毒性

采用 MTT 比色法<sup>[6]</sup>检测药物对细胞增值的影响,其实验组中 HC 和 HE 终浓度均依次为 1.6、8、

40、200 和 1000  $\mu\text{g/mL}$ ,以不加药物的 SGC7901/ADR 细胞为阴性对照组,以细胞培养液为空白对照组。酶标仪检测 490 nm 处 OD 值,细胞抑制率(%) =  $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白对照组}})] \times 100\%$ ,取抑制率  $\leq 20\%$  的药物浓度为非毒性剂量用于实验。

### 1.2.4 冬凌草不同活性部位对细胞耐药性逆转倍数的测定

参考 Sun 等<sup>[7]</sup>的方法,实验组中 HC 的终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  和 10  $\mu\text{g/mL}$ ,HE 的终浓度为 60  $\mu\text{g/mL}$  和 12  $\mu\text{g/mL}$ 。以 10  $\mu\text{mol/L}$  的 VER 为阳性对照。逆转倍数(RF) = 逆转前抗癌药物 IC<sub>50</sub>值/逆转后(抗癌药物 + 受试药物)IC<sub>50</sub>值。

### 1.2.5 耐药细胞的 ADR 浓度的测定

参照 Ji 等<sup>[8]</sup>的方法,实验组:4 mL SGC7901/ADR 细胞 + 500  $\mu\text{L}$  ADR + 500  $\mu\text{L}$  冬凌草不同活性部位,阴性对照组中以等量 PBS 代替药物,阳性对照组中以 VER 代替药物。收集用不同药物浓度处理的 SGC7901/ADR 细胞和 SGC7901 细胞后,流式细胞仪检测细胞内 ADR 的荧光强度,计算药物作用后的阿霉素蓄积倍数。荧光蓄积倍数 = 实验组的荧光蓄积量/阴性组的荧光蓄积量。

### 1.2.6 耐药细胞 P-gp 糖蛋白表达的测定

参考 Kong 等<sup>[9]</sup>的方法,以终浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的 HC 和 12  $\mu\text{g/mL}$  的 HE 为实验组,以 10  $\mu\text{mol/L}$  的 VER 为阳性对照,以 PBS 为阴性对照。流式细胞仪检测 P-gp 的表达。

### 1.2.7 RT-PCR 法测定细胞 mdr1 基因的表达

收集用不同药物浓度处理的 SGC7901/ADR 细胞和 SGC7901 细胞后,参照黄燕芬等<sup>[10]</sup>的方法,用 mdr1/ $\beta$ -actin 的比值表示 mdr1 基因的相对表达水平。

## 1.3 统计学分析

数据用 SPSS17.0 和 FCS Express V4 软件分析处理,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

# 2 结果与分析

## 2.1 冬凌草提取物的制备

采用溶剂提取法中的回流提取法提取,减压浓缩得到冬凌草总提物,出膏率为 10%。HP、HC、HE 和 HN 的浸膏得率分别为 0.96%、2.46%、0.36% 和

1.62%。

### 2.2 冬凌草不同活性部位对 SGC7901/ADR 的细胞毒性

MTT 比色法结果显示:HC 的 IC<sub>20</sub> 为 50 μg/mL, HE 的 IC<sub>20</sub> 为 60 μg/mL。实验选择对细胞生长抑制率 ≤20% 的药物浓度作为非毒性剂量。

### 2.3 冬凌草不同活性部位对 SGC7901/ADR 细胞耐药性的逆转作用

用 VER、HC 和 HE 处理 SGC7901/ADR 细胞后 ADR 对细胞的生长抑制率,与只用 ADR 处理的细胞生长抑制率相比都有增大,且具有浓度梯度效应,其逆转倍数如表 1 所示。

表 1 HC 和 HE 对 SGC7901/ADR 细胞的逆转倍数 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The reversal index of drug resistance in SGC7901/ADR cells by HC and HE (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

样品 Treatment	半抑制率 IC <sub>50</sub> (μg/mL)	逆转倍数 RF
ADR	19.86 ± 1.23	1.00
10 μmol/L VER	3.73 ± 0.28 **	5.32
50 μg/mL HC	6.06 ± 0.65 **	3.28
10 μg/mL HC	9.25 ± 0.79 **	2.15
60 μg/mL HE	5.63 ± 0.70 **	3.53
12 μg/mL HE	8.29 ± 0.25 **	2.39

注:与 ADR 单用组比, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01  
Note: compare with control ADR group, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

### 2.4 冬凌草不同活性部位对 SGC7901/ADR 细胞内 ADR 蓄积量的影响

实验结果如表 2, SGC7901 细胞内荧光积累量明显大于 SGC7901/ADR 细胞, HC 的蓄积倍数是 2.58 倍, HE 的蓄积倍数为 2.52 倍。

表 2 HC 和 HE 对 SGC7901/ADR 细胞内 ADR 蓄积的影响

Table 2 The effect of HC and HE on the intercellular accumulation of ADR in SGC7901/ADR cells

分组 Group	荧光强度 FS	蓄积倍数 FA
对照 Control	11.45	1.00
SGC7901	35.36	3.09
10 μmol/L VER	39.64	3.46
10 μg/mL HC	29.57	2.58
12 μg/mL HE	28.86	2.52

### 2.5 冬凌草不同活性部位对 SGC7901/ADR 细胞膜 P-gp 表达的影响

FCM 检测结果如表 3。与对照组相比, 10 μg/

mL HC 处理后 P-gp 表达量减少了 17.10%, 12 μg/mL HE 处理后 P-gp 表达量减少了 14.17%。结果表明 HC 和 HE 均能降低 SGC7901/ADR 细胞 P-gp 的表达。

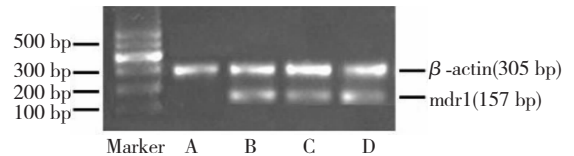
表 3 HC 和 HE 对 SGC7901/ADR 细胞膜表面 P-gp 表达的影响

Table 3 The effect of HC and HE on the expression of P-gp in SGC7901/ADR cells

分组 Group	P-gp 荧光 强度 FS	P-gp 减少 DR (%)
对照 Control	64.79	-
SGC7901	18.07	72.11
10 μg/mL HC	53.71	17.10
12 μg/mL HE	55.61	14.17

### 2.6 冬凌草不同活性部位对 SGC7901/ADR 细胞内 mdrl 基因表达的影响

通过半定量的 RT-PCR 检测 mdrl 基因的表达, 结果如图 1 所示, SGC7901/ADR 细胞经 HC 和 HE 处理 48 h 后, 均可获得 305 bp (β-actin) 和 157 bp (mdrl) 两条带。经过凝胶成像系统分析显示, 用 mdrl 值/β-actin 值反映基因表达水平, mdrl 基因表达分别下降了 59.37% 和 50.01%。



A: SGC7901; B: SGC7901/ADR; C: SGC7901/ADR + 10 μg/mL HC; D: SGC7901/ADR + 12 μg/mL HE

图 1 RT-PCR 检测细胞内 mdrl 基因的表达

Fig. 1 RT-PCR analysis of mdrl mRNA expression

## 3 讨论

本实验中, FCM 检测 SGC7901/ADR 细胞内 ADR 蓄积, 结果表明 HC 作用细胞后, 细胞内 ADR 荧光蓄积量要大于 HE 作用后的荧光量。RT-PCR 检测 HC 和 HE 作用后 SGC7901/ADR 细胞中 mdrl 表达的变化以及细胞总 P-gp 的检测显示: 冬凌草不同活性部位 HC 和 HE 可下调 mdrl 基因和 P-gp 的表达, 其耐药逆转机制与 P-gp 的活性密切相关。

郭娟娟等<sup>[11]</sup>证实, 冬凌草甲素能逆转多药耐药细胞系 K562/A02 的耐药作用, 但其作用机制未深入探讨。经检测, 冬凌草氯仿部位、乙酸乙酯部位和

正丁醇部位均含有冬凌草甲素,但是冬凌草正丁醇部位抑制 P-gp 药物外排作用不明显<sup>[4]</sup>,说明冬凌草中具有逆转 MDR 功能的有效成分不仅仅是冬凌草甲素,可能还有其他成分抑制 P-gp 外排作用,对冬凌草活性部位的组成及其活性成分的确证,尚需进行深入的研究。

#### 参考文献

- 1 Fu D, Arias IM. Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44:461-464.
- 2 Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 2005, 2059:275-292.
- 3 Guo P(郭萍), Li YS(李玉山), Guo YQ(郭远强). Advances in studies on chemical constituents of *Rabdosia rubescens* and their pharmacological activities. *Drug Eva Res* (药物评价研究), 2010, 33:144-147.
- 4 Liu RY(刘瑞媛). Reversal of tumor multidrug resistance by extracts of Herba Rabdosiae Rubescentis. Xi'an: Shaanxi Normal University(陕西师范大学), MSc. 2011.
- 5 Li FR, Fan JF, Wu Z, et al. *Rabdosia rubescens* extracts can reverse the effects of multidrug resistance by MCF-7/Adr cells in vitro. *Pharm Biol*, doi: 10. 3109/13880209. 2013. 784342.
- 6 Situ ZQ(司徒镇强), Wu JZ(吴军正). Cell culture(Third Edition). Xi'an: World Publishing Corporation, 2004. 250-253.
- 7 Sun LR, Li X, Cheng YN, et al. Reversal effect of substituted 1,3-dimethylH-quinoxalin-2-ones on multidrug resistance in adriamycin-resistant K562/A02 cells. *Biomed Pharmacol*, 2009, 63:202-208.
- 8 Ji BS, He L, Liu GQ. Reversal of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by CJX1, an amlodipine derivative, in doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia (K562/DOX) cells. *Life Sci*, 2005, 77:2221-2232.
- 9 Kong XQ, Ge HT, Chen L, et al. Gamma-linolenic acid modulates the response of multidrug-resistant K562 leukemic cells to anticancer drugs. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23:634-639.
- 10 Huang YF(黄燕芬), Dong GX(董改霞), Hong XQ(洪兴球), et al. Studies on reversing MDR of K562/A02 by ramification of curcum in hydrolyzed. *China J Mat Med*(中国中药杂志), 2010, 35:2060-2463.
- 11 Guo JJ(郭娟娟), Pan XL(潘祥林), Feng CW(冯长伟), et al. Study on reversal effects of Oridonin on multidrug resistant cell line K562/A02. *Shanghai Med J*(上海医学), 2002, 25:43-45.

(上接第 1224 页)

- 3 Wang QH, Kuang HX, Yang BY, et al. Esquiterpenes from *Chloranthus japonicas*. *J Nat Prod*, 2011, 74:16-20.
- 4 Wang XC, Wang LL, Ouyang XW, et al. Sesquiterpenes and dimers thereof from *Chloranthus fortunei*. *Helv Chim Acta*, 2009, 92:313-320.
- 5 Masaaki U, Utaka K, Genjiro K, et al. Studies on the constituents of *Chloranthus* spp. III. six sesquiterpenes from *Chloranthus japonicas*. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28:92-102.
- 6 Zeng AH(曾爱华), Luo YM(罗永明). Tudy on chemical constituents of *Sarcandra glabra*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28:292-293.
- 7 Dulcie AM, Kathryn MF. Sesquiterpenoid derivatives from *Cipadessa boiviniana* (Meliaceae). *Biochem Syst Ecol*, 2006, 34:365-369.
- 8 Wang HX, Liu CM, Liu Q, et al. Three types of sesquiterpenes from rhizomes of *Atractylodes lancea*. *Phyto*, 2008, 69:2088-2094.
- 9 Jesus GD, Bertha B, Werner H. Acetylenic and terpenoid constituents of *Boltonia asterozdes*. *Phyto*, 1994, 36:703-707.
- 10 Cui EJ, Park HJ, Wu Q, et al. Sterols from the seed of *Cowpea* (*Vigna sinensis* K.). *J Ppl Iol Chem*, 2010, 53(2):77-81.
- 11 Yan LH(闫利华), Xu LZ(徐丽珍), Zou ZM(邹忠梅), et al. Chemical constituents from stems of *Clematis arandii* (I). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38:340-342.