

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00024

• 专题报道 •

黄芩苷体外抑制氟尿嘧啶耐药肝癌细胞的生长及作用机制

郭霞¹, 郭昱²

1. 河北医科大学第四医院消化内科, 石家庄 050011

2. 河北医科大学第二医院消化内科, 石家庄 050000

[摘要] **目的:**观察黄芩苷体外对氟尿嘧啶(Fu)耐药肝癌细胞株生长的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法:**体外培养人肝癌细胞 BEL-7402 及其耐药细胞 BEL-7402/5-Fu, MTT 法观察黄芩苷作用后细胞增殖情况;流式细胞术测定细胞内罗丹明 123 荧光强度;RT-PCR 检测细胞多重耐药 *MDR1* 基因表达;Western 印迹法检测细胞 P-gp 蛋白表达;应用 Matrigel 模型测定细胞黏附率;荧光免疫技术测定细胞 $\beta 1$ -整合素($\beta 1$ -integrin)和上皮钙黏附素(E-CD)蛋白表达。**结果:**黄芩苷明显抑制肝癌细胞 BEL-7402 及其耐药细胞 BEL-7402/5-Fu 的增殖, IC_{50} 分别为 34.2、36.6 mg/L。5、10 mg/L 黄芩苷能部分逆转耐药细胞对 Fu 的耐药, 逆转倍数分别为 28.6、46.7;5、10 mg/L 黄芩苷增强 BEL-7402 对 Fu 敏感性, 增敏倍数分别为 1.4、2.1。5、10 mg/L 黄芩苷增加耐药细胞内药物积聚, 降低 *MDR1* 基因及 P-gp 蛋白表达, 抑制耐药细胞黏附率, 降低耐药细胞 $\beta 1$ -整合素表达, 促进 E-CD 蛋白表达;且 10 mg/L 黄芩苷效果优于 5 mg/L(P 均 <0.05)。**结论:**黄芩苷体外能抑制肝癌细胞生长及降低细胞黏附性, 并能部分恢复肝癌耐药细胞对 Fu 的敏感性, 这可能与增加细胞内药物浓度、抑制 *MDR1* 基因表达有关。

[关键词] 黄芩苷; 肝肿瘤; 氟尿嘧啶; 抗肿瘤药耐药性

[中图分类号] R 979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0024-06

Inhibitory effect of baicalin on fluorouracil resistant HCC cell line BEL-7402/5-Fu and its possible mechanism

GUO Xia¹, GUO Yu²

1. Department of Gastroenterology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

2. Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000

[ABSTRACT] **Objective:**To investigate the inhibitory effect of baicalin on the fluorouracil (Fu) resistant hepatocarcinoma cell (HCC) BEL-7402/5-Fu and its possible mechanism. **Methods:**Hepatocarcinoma cell line BEL-7402 and Fu-resistant hepatocarcinoma cell line BEL-7402/5-Fu were cultured *in vitro*. The inhibitory effect of baicalin on the BEL-7402/5-Fu cells was assessed by MTT assay; the intracellular rhodamine fluorescence intensity was observed by flow cytometry; the expression of *MDR1* gene was detected by RT-PCR; and the expression of protein P-glycoprotein (P-gp) was analyzed by Western blotting assay. Adhesion assay was conducted using Matrigel model. Expression of beta 1-integrin and E-CD protein was detected by immunofluorescence technique. **Results:**Baicalin inhibited the proliferation of both BEL-7402 and BEL-7402/5-Fu cells, with IC_{50} of baicalin being 34.2 mg/L and 36.6 mg/L, respectively. Baicalin (5 mg/L and 10 mg/L) partially reversed the resistance of BEL-7402/5-Fu to Fu, with the reversal folds being 28.6 and 46.7, respectively. Baicalin (5 mg/L and 10 mg/L) increased the sensitivity of BEL-7402 cells to Fu, with the sensitivity-enhancing folds being 1.4 and 2.1, respectively. Baicalin also increased the concentration of rhodamine and expression of integrin $\beta 1$, inhibited the expression of *MDR1* gene and P-gp, E-CD protein, and reduced the adhesion capacity, with the effect of 10 mg/L baicalin significantly effective than that of 5 mg/L baicalin (all $P<0.05$). **Conclusion:**Baicalin can inhibit the proliferation of BEL-7402/5-Fu *in vitro*, and partially reverse the resistance to Fu, which is attributable to the increased accumulation of intracellular drug concentration, inhibited expression of *MDR1* gene.

[KEY WORDS] baicalin; liver neoplasm; fluorouracil; antineoplastic drug resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1):24-29]

黄芩苷(baicalin)是从唇形科植物黄芩中提取、分离出来的黄酮类化合物,是黄芩的主要有效成分

之一,具有解热、降压、利胆、保肝、镇静、抗菌等药理作用^[1]。国内外研究^[2-4]表明,黄芩苷能够抑制肿瘤

[收稿日期] 2007-10-08

[接受日期] 2007-12-10

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目(072461478D)。Supported by the Key Technology Research and Development Project of the Hebei Province (072461478D)。

[作者简介] 郭霞, 硕士。E-mail: guoxia285@163.com

细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,具有显著的抗肿瘤作用,是目前抗肿瘤研究的热点。我们在前期研究^[5-6]发现,黄芩苷体外能够抑制肝癌 BEL-7402、SMMC-7721 细胞的侵袭与转移,其抑制作用可能与抑制细胞基质溶解相关蛋白 MMP-2 及上皮钙黏附素(E-CD)表达,促进组织基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)、 β 1-整合素(beta 1-integrin)表达有关。

本研究在上述实验的基础上进一步观察黄芩苷体外对氟尿嘧啶(Fu)耐药肝癌细胞株 BEL-7402/5-Fu 增殖及黏附性的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 人肝癌细胞敏感株 BEL-7402 由本室冻存,人肝癌细胞 Fu 耐药株 BEL-7402/5-Fu 由协和医科大学药物研究所惠赠。黄芩苷由四川汉坤植化有限公司提供,纯度 $\geq 95\%$;Fu 为上海旭东海普药业有限公司产品。罗丹明 123 为 Sigma 公司产品,P-gp(P-glycoprotein)单抗为 Lab-Vision 公司产品;TRIzol 试剂盒购自北京赛百胜基因技术有限公司;抗上皮钙黏附素(E-cadherin,E-CD)单抗、抗 β 1-整合素单抗均为 Santa Cruz 公司产品。RT-PCR 扩增系统为美国 Promega 公司产品;Matrigel 基质为美国 Becton Dickinson 公司产品;Alpha 凝胶数字图像分析仪(Alpha IS-1200)为美国 Alpha 公司产品;BioTek-Elx800 酶标仪为美国 BioTek 公司产品。

1.2 肝癌细胞株的培养 人肝癌细胞株 BEL-7402 培养于 RPMI 1640 培养液,内含 10%小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素,置 37℃、CO₂ 体积分数为 5%的恒温密闭式孵箱内培养传代;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 10 μ g/ml Fu,以维持细胞的耐药性,实验前细胞脱药培养 1 周。

1.3 MTT 法测定肝癌细胞对 Fu 及黄芩苷的敏感性 实验前将耐药细胞株 BEL-7402/5-Fu 细胞置于无 Fu 的培养基中培养 1 周。取对数生长期的敏感细胞 BEL-7402 和耐药细胞 BEL-7402/5-Fu,细胞密度 2×10^7 /L,以 0.25%的胰酶和 0.02%EDTA 消化后形成细胞悬液,接种于 96 孔板内。以倍比稀释的方法由高到低分别加入不同浓度的 Fu(1.25、5、10、20、40 mg/L)或不同浓度的黄芩苷(1.25、5、10、20、40、80 mg/L)。药物作用 48 h 后,加入 MTT 溶液(5 mg/ml)10 μ l,继续培养 4 h,弃去各孔内液体,每孔加入 100 μ l 二甲基亚砷,置振荡器上振荡 5 min,充分溶解混匀,室温放置 10 min,于全自动酶标仪上

测定各孔光密度(D_{490})值,每组各设 3 个平行孔,取 3 孔平均值计算细胞生长率和抑制率。细胞生长率=(实验组 D_{490} 值/对照组 D_{490} 值) $\times 100\%$;抑制率=1-细胞生长率。根据测定的各组 D_{490} 值,用 POMS 软件得出各组的半数抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC_{50}),计算耐药细胞的耐药倍数。耐药倍数=耐药细胞的 IC_{50} /敏感细胞的 IC_{50} 。

1.4 黄芩苷对 Fu 作用效果的影响

1.4.1 黄芩苷对 Fu 耐药细胞耐药性的影响 取对数生长期耐药细胞 BEL-7402/5-Fu,随机分为:Fu 单独作用组、Fu+5 mg/L 黄芩苷作用组、Fu+10 mg/L 黄芩苷作用组,药物作用 48 h 后,按 1.3 项下 MTT 法测定各组 Fu 的 IC_{50} 值,计算黄芩苷作用后耐药细胞的逆转倍数。逆转倍数=耐药细胞逆转前 Fu 的 IC_{50} /耐药细胞 Fu 的 IC_{50} 。

1.4.2 黄芩苷对 BEL-7402 细胞 Fu 敏感性的影响 取对数生长期敏感细胞 BEL-7402 细胞,随机分为:Fu 单独作用组、Fu+5 mg/L 黄芩苷作用组、Fu+10 mg/L 黄芩苷作用组,药物作用 48 h 后,按 1.3 项下 MTT 法测定各组 Fu 的 IC_{50} 值,求出黄芩苷作用后敏感细胞的增敏倍数。增敏倍数=敏感细胞干预前 Fu 的 IC_{50} /敏感细胞干预后 Fu 的 IC_{50} 。

1.5 细胞内罗丹明 123 积聚试验 取对数生长期耐药及敏感细胞,分为:敏感细胞 Fu 作用组、耐药细胞 Fu 作用组、耐药细胞 Fu+5 mg/L 黄芩苷作用组、耐药细胞 Fu+10 mg/L 黄芩苷作用组,每组设 3 个平行管。细胞制成 2×10^6 /ml 悬液,加入终浓度 5 μ g/ml 的罗丹明 123,37℃保温 30 min,细胞洗 2 次后,再 37℃保温 30 min,细胞洗 1 次后,立即上机检测各组细胞荧光强度。

1.6 RT-PCR 检测 MDR1(multidrug resistance 1) 基因表达 实验分 3 组:敏感细胞对照组、耐药细胞对照组、耐药细胞黄芩苷(10 mg/L)作用组。

1.6.1 引物设计及合成 MDR1 上游引物:5'-GTA CCC ATC ATT GCA ATA GC-3',下游引物 5'-CAA ACT TCT GCT CCT GAG TC-3'; β -actin 上游引物 5'-AGC CAT GTA CGT TGC TAT CC-3',下游引物 5'-TTG GCG TAC AGG TCT TTG C-3'。引物由北京赛百胜基因技术有限公司合成。

1.6.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取对数生长期的细胞,TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,以 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的质量。取 1 μ g 总 RNA,用 1 μ l 的逆转录酶 M-MLV(20 U/ μ l),建立 20 μ l 反应体系,操作步骤严格按照试剂盒说明进行。

1.6.3 PCR 扩增 加入扩增模板 60 ng,建立如下

反应体系:10×PCR buffer 5 μl,10 mmol/L dNTPs 1 μl,25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μl,MDR1 上、下游引物各 1 μl,经 94℃变性 10 min 后,加入 Taq DNA 酶 1.2 U,94℃变性 40 s,72℃延伸 50 s,共 30 个循环。反应总体积 50 μl。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶数字图像分析仪进行光密度扫描,观察条带的灰度强弱,计算 MDR1 基因相对表达(目的条带的光密度值/β-actin 条带的光密度值)。

1.7 Western 印迹法检测 P-gp 蛋白表达 实验分 4 组:敏感细胞对照组、耐药细胞对照组、耐药细胞低浓度(5 mg/L)黄芩苷作用组、耐药细胞高浓度(10 mg/L)黄芩苷作用组。裂解细胞提取蛋白进行 10% SDS-PAGE,每孔上样量 50 μg,分离后的蛋白质转移至硝酸纤维素膜。滤膜经 5% 脱脂奶粉封闭,按常规方法加一抗及相应二抗,37℃孵育 1 h,显色,密度扫描分析,采用美国 Kodak 公司 ID 数码成像分析系统软件对结果进行定量分析,灰度值以积分光密度值(integral optical density,IOD)表示。

1.8 黄芩苷对肝癌细胞黏附率的影响 实验分 4 组:敏感细胞对照组、敏感细胞黄芩苷(10 mg/L)作用组、耐药细胞对照组、耐药细胞黄芩苷(10 mg/L)作用组。96 孔培养板覆以 Matrigel 100 μg/孔,胶干后,加入预处理的细胞悬液 50 μl(细胞密度 5×10⁵/孔),37℃摇床,作用 30 min;每孔加无血清 RPMI 1640 培养液 150 μl 及 MTT(1 mg/ml)50 μl,37℃继续作用 4 h;弃上清,每孔加入 100 μl 二甲基亚砷原液;10 min 后上酶标仪,在 490 nm 波长下测定 D₄₉₀ 值。细胞黏附率=(试验组 D₄₉₀ 值/对照组 D₄₉₀ 值)×100%。

1.9 黄芩苷对肝癌细胞 β1-整合素和 E-CD 蛋白表达的影响 实验分 4 组:敏感细胞对照组、敏感细胞黄芩苷(10 mg/L)作用组、耐药细胞对照组、耐药细胞黄芩苷(10 mg/L)作用组。取单细胞悬液(密度为 1×10⁶/ml),加入鼠抗人单克隆抗体工作液 0.1 ml,室温孵育 30 min,加入 PBS 10 ml 洗涤 1 次,弃上清,加入羊抗鼠 FITC-IgG 二抗工作液 100 μl,避光室温孵育 30 min,加入 PBS 10 ml,离心 2 min,弃上清以除去未结合的荧光二抗,加入 PBS 0.1 ml 经 500 目铜网过滤后上机检测。采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 EPICS-XL II 流式细胞仪,激发光源为 15 mW 氩离子激光器,激发波长为 488 nm,应用 Expo 32 ADC 进行免疫荧光数据分析,以均值表示蛋白含量。

1.10 统计学处理 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。多组间的均数差异

性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝癌细胞对 Fu 及黄芩苷的敏感性

2.1.1 肝癌细胞对 Fu 的敏感性 以细胞抑制率为纵坐标,Fu 浓度为横坐标作图(图 1)。在相同 Fu 浓度下,BEL-7402/5-Fu 的抑制率低于 BEL-7402 ($P < 0.05$)。Fu 对耐药细胞的 IC₅₀ 为 7 020 mg/L,而对敏感细胞的 IC₅₀ 为 46.2 mg/L,耐药倍数为 152.6。

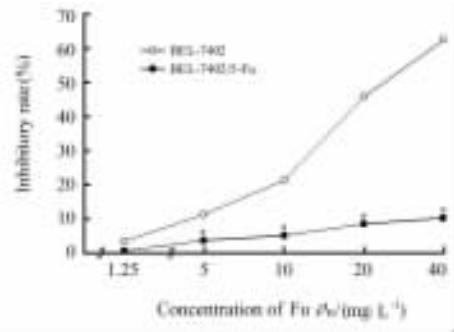


图 1 肝癌细胞对 Fu 的敏感性
Fig 1 Sensitivity of hepatocarcinoma cells to Fu
* $P < 0.05$ vs BEL-7402; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.1.2 肝癌细胞对黄芩苷的敏感性 如图 2 所示,黄芩苷能明显抑制 BEL-7402、BEL-7402/5-Fu 肝癌细胞生长,且随着黄芩苷浓度的增加,肝癌细胞抑制率逐步升高。随着黄芩苷药物浓度由 1.25 mg/L 增加到 80 mg/L,BEL-7402 细胞抑制率由 4.16% 升至 65.28%。比较黄芩苷对 BEL-7402 细胞和 BEL-7402/5-Fu 细胞的抑制作用,二者的 IC₅₀ 值分别为 34.2 mg/L、36.6 mg/L,差异无统计学意义,说明 BEL-7402/5-Fu 细胞对黄芩苷不具耐药性。

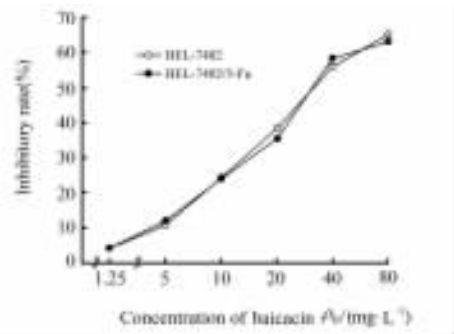


图 2 肝癌细胞对黄芩苷的敏感性
Fig 2 Sensitivity of hepatocarcinoma cells to baicalin
 $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 黄芩苷对 BEL-7402 及 BEL-7402/5-Fu 细胞 Fu IC₅₀ 的影响 如表 1 所示,Fu 单独作用,耐药细胞的 IC₅₀ 为(7 020±187) mg/L,与 5 mg/L 黄芩苷共同作用,耐药细胞 Fu 的 IC₅₀降低为(245±12) mg/L,逆转倍数为 28.6;与 10 mg/L 黄芩苷共同作用后,耐药

细胞 Fu 的 IC₅₀降低为(150±12) mg/L,逆转倍数为 46.7,逆转效果明显好于 5 mg/L 剂量组($P<0.05$)。Fu、黄芩苷共同作用于敏感细胞株,细胞抑制作用明显优于两者单独应用,5 mg/L 黄芩苷的增敏倍数为 1.4,10 mg/L 黄芩苷的增敏倍数为 2.1。

表 1 黄芩苷对 BEL-7402 及 BEL-7402/5-Fu 细胞 Fu IC₅₀ 的影响
Tab 1 Effect of baicalin on IC₅₀ of Fu for BEL-7402 and BEL-7402/5-Fu cells

Baicalin $\rho_B/(mg \cdot L^{-1})$	BEL-7402		BEL-7402/5-Fu	
	IC ₅₀ (mg · L ⁻¹)	Sensitive fold	IC ₅₀ (mg · L ⁻¹)	Reversal fold
0(untreated)	46.2±3.28	1.0	7 020±187	1.0
5	32.9±2.18 *	1.4	245±12 *	28.6
10	22.4±1.96 *△	2.1	150±12 *△	46.7

* $P<0.05$ vs untreated with baicalin; △ $P<0.05$ vs 5 mg/L baicalin group

2.3 黄芩苷对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞内罗丹明 123 积聚的影响 敏感株细胞 Fu 单独作用组细胞内荧光表达值为 282.18±12.8,耐药株细胞 Fu 单独作用组细胞内荧光表达值为 38.45±15.23,Fu+5 mg/L 黄芩苷作用耐药株细胞内荧光表达值为 82.70±6.34,Fu+10 mg/L 黄芩苷作用耐药株细胞内荧光表达值为 180.97±12.45。结果显示黄芩苷能增加耐药细胞内罗丹明 123 的积聚,明显高于单独应用 Fu 组($P<0.05$),且 10 mg/L 黄芩苷作用组效果强于 5 mg/L 组($P<0.05$)。

2.4 黄芩苷对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞 MDR1 基因表达的影响 对 RT-PCR 结果(图 3)进行光密度扫描,结果显示:MDR1 基因在 BEL-7402 敏感细胞呈极微弱表达(0.13±0.02),在 BEL-7402/5-Fu 耐药细胞呈高表达(1.53±0.09),黄芩苷(10 mg/L)后耐药细胞 MDR1 基因的表达明显降低(0.78±0.04),但仍高于敏感细胞组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

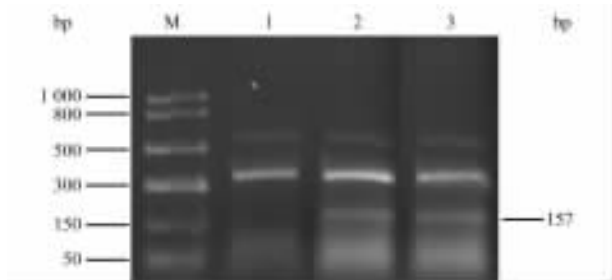


图 3 黄芩苷对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞 MDR1 基因表达的影响

Fig 3 Effect of baicalin on expression of MDR1 in 2 hepatocellular carcinoma cell lines
M: Marker; 1: BEL-7402 control; 2: BEL-7402/5-Fu control; 3: BEL-7402/5-Fu treated with baicalin(10 mg/L)

2.5 黄芩苷对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞 P-gp 蛋白表达的影响 对 Western 印迹结果(图 4)进行定量分析显示:BEL-7402 细胞 P-gp 表达量 IOD 值为 6.47±2.75; BEL-7402/5-Fu 细胞 IOD 值为 28.16±5.37,显著高于敏感细胞($P<0.05$);应用 5 mg/L 黄芩苷后耐药细胞 P-gp 蛋白表达量较对照组显著降低,IOD 值为 22.09±3.23($P<0.05$);应用 10 mg/L 黄芩苷后耐药细胞表达量进一步降低,IOD 值为 14.03±1.98,与 5 mg/L 黄芩苷组相比有统计学差异($P<0.05$)。

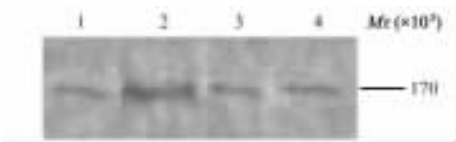


图 4 黄芩苷对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞 P-gp 蛋白表达的影响

Fig 4 Expression of P-gp protein in 2 hepatocellular carcinoma cell lines
1: BEL-7402 control; 2: BEL-7402/5-Fu control; 3: BEL-7402/5-Fu treated with 5 mg/L baicalin; 4: BEL-7402/5-Fu treated with 10 mg/L baicalin

2.6 黄芩苷对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞黏附率的影响 如表 2 所示,BEL-7402 细胞对照组黏附率明显高于黄芩苷(10 mg/L)作用组($P<0.05$); BEL-7402/5-Fu 对照组细胞黏附率明显高于 BEL-7402 对照组细胞($P<0.05$),10 mg/L 黄芩苷作用后明显下降($P<0.05$),但仍然高于 BEL-7402 对照组细胞($P<0.05$)。

2.7 黄芩苷对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞β1-整合素

和 E-CD 蛋白表达的影响 与 BEL-7402 对照组相比,10 mg/L 黄芩苷处理后 BEL-7402 细胞 β 1-整合素表达下降($P<0.05$);BEL-7402/5-Fu 细胞 β 1-整合素表达明显高于敏感细胞($P<0.05$),10 mg/L 黄芩苷处理后其表达明显下降($P<0.05$),但仍高于相应的 BEL-7402 对照组($P<0.05$)。

与 BEL-7402 对照组相比,10 mg/L 黄芩苷处理后 BEL-7402 细胞 E-CD 的表达增加($P<0.05$);BEL-7402/5-Fu 细胞 E-CD 的表达明显低于敏感细胞($P<0.05$),10 mg/L 黄芩苷处理后其表达明显上升($P<0.05$),且高于相应的 BEL-7402 对照组($P<0.05$)。具体数据见表 2。

表 2 黄芩苷(10 mg/L) 对 Fu 敏感及耐药肝癌细胞黏附率、 β 1-整合素和 E-CD 蛋白表达的影响
Tab 2 Effect of baicalin on adhesion and expression of beta 1-integrin,E-CD in 2 hepatocellular carcinoma cell lines

($n=3,\bar{x}\pm s$)

Group	β 1-integrin	E-CD	Adhesion (%)
BEL-7402 control	407.54±20.58	251.72±12.34	84.32±6.74
BEL-7402 treated with baicalin	319.44±15.21 *	376.45±22.36 *	35.63±2.32 *
BEL-7402/5-Fu control	589.72±23.28 *	126.85±12.86 *	149.33±22.45 *
BEL-7402/5-Fu treated with baicalin	351.49±17.88 *△	293.84±22.68 *△	96.58±1.13 *△

* $P<0.05$ vs BEL-7402 control;△ $P<0.05$ vs BEL-7402/5-Fu control

3 讨 论

肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,病程隐匿,病死率高,容易产生耐药^[3-5],使肝癌化疗很不敏感,导致治疗失败和预后不佳。因此,逆转肝癌耐药性是提高肝癌疗效的有力手段。Fu 是消化系统肿瘤首选的化疗药物,因此本研究选用对其耐药的 BEL-7402/5-Fu 肝癌细胞株为研究对象,观察黄芩苷对其生长的影响及可能的作用机制。

本研究结果发现黄芩苷能抑制肝癌细胞增殖,对 Fu 敏感株和耐药株的 IC₅₀ 值接近,提示其对肝癌细胞具有抗肿瘤作用,且对 Fu 耐药肝癌细胞不具有耐药性。进一步研究发现其能够增强 Fu 对耐药肝癌细胞的抑制作用,且 10 mg/L 效果明显强于 5 mg/L,逆转倍数分别为 46.7 和 28.6;且黄芩苷能增强 Fu 对敏感肝癌细胞的抑制作用,5 mg/L 黄芩苷的增敏倍数为 1.4,10 mg/L 黄芩苷的增敏倍数为 2.1。这提示黄芩苷与 Fu 具有协同抗肿瘤作用,且能部分逆转肝癌细胞的 Fu 耐药性。

胞内药物浓度降低在肿瘤耐药中占主导地位,罗丹明的结构与众多抗癌药物的结构有许多相似之处。本研究采用流式细胞仪检测到耐药细胞的胞内罗丹明浓度仅是敏感细胞的 21.1%,提示肝癌耐药细胞的耐药性部分是由于胞内化疗药物被泵出胞外,致细胞毒作用减轻所致。应用黄芩苷可显著增加耐药细胞胞内罗丹明浓度,促进药物在细胞内蓄积。

P-gp 是多药耐药基因 MDR1 编码的膜蛋白,相

对分子质量约为 170 000,在具有多药耐药性的细胞膜上呈现高表达^[7],能将抗肿瘤药物泵出细胞外,造成细胞内药物浓度降低,降低细胞毒作用,诱导细胞耐药^[8-9]。本研究应用 RT-PCR 方法发现肝癌耐药细胞 MDR1 基因 mRNA 呈高表达,Western 印迹分析 P-gp 蛋白亦呈高表达,应用黄芩苷后耐药细胞 MDR1 基因 mRNA 的表达及 P-gp 蛋白的表达均明显降低。结果提示黄芩苷可能通过下调 MDR1 基因,抑制 P-gp 蛋白的表达逆转耐药^[10]。

Uetsuka 等^[11]模拟体内实体瘤环境,在体外以 EMT 实体瘤细胞进行立体球形培养后,细胞对 4-氢过氧化环磷酰胺(4-HC)表现出一定程度的耐药,但在细胞体系中加入可破坏细胞黏附作用的透明质酸后发现细胞对 4-HC 的敏感性恢复。Hazan 等^[12]研究认为,细胞群集时药物敏感性的降低并非仅仅由于药物不易进入所致,还可能与细胞-细胞或细胞-基质的相互作用所致整个细胞群体的耐药表型改变有关。这种耐药现象与细胞间黏附密切相关。

细胞黏附主要由细胞黏附分子家族所介导^[12]。已证明这些黏附分子可通过对细胞周期和凋亡调控,影响细胞对治疗的反应。E-CD 属钙黏附素超家族经典 II 族成员,依赖细胞外 Ca²⁺ 介导同种亲和性的细胞与细胞间的黏附,在相邻细胞间形成钙黏附拉链,参与建立和维持细胞间连接,在同种细胞间起着相互联系、相互制约的作用。它的表达程度及功能活性直接影响着细胞的脱离和再附着。如果 E-CD 介导的黏附功能受损或表达减少,肿瘤细胞连

接松散,易脱落。许多癌组织中均出现 E-CD 的表达缺失或基因突变^[13]。β1-整合素是由 α、β 亚单位通过二硫键形成的二聚体跨膜蛋白,可以同时与细胞外基质成分及细胞骨架结合而形成配体,介导肿瘤细胞的黏附和转移。

本研究结果表明黄芩苷作用后耐药肝癌细胞黏附率明显降低,表明黄芩苷具有抗肝癌细胞黏附的作用,同时发现黄芩苷处理组E-CD表达增多、β1-整合素表达下降。结果提示黄芩苷可能通过促进耐药细胞E-CD表达,抑制 β1-整合素表达,降低细胞与基质的黏附,影响整个细胞群体的耐药表型,部分逆转肝癌细胞的耐药性。

(志谢 本研究得到河北医科大学细胞生物学教研室周娜静,河北省消化病研究所陈雷、申建刚等同志的技术支持和无私帮助,在此一并表示感谢!)

[参 考 文 献]

[1] 张喜平,田 华,程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状[J]. 中国药理学通报,2003,19:1212-1215.

[2] Matsuzaki Y,Kurokawa N,Terai S,Matsumura Y,Kobayashi N,Okita K. Cell death induced by baicalin in human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Jpn J Cancer Res,1996,87:170-177.

[3] 王瑞廷,申兴斌,许 倩,梅爱敏,郝希俊. 黄芩茎叶总黄酮对人宫颈癌 Hela 细胞株体外生长的影响[J]. 山东医药,2005,45:15-16.

[4] Broncel M. [Antiatherosclerotic properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi][J]. Wiad Lek,2007,60 (5-6):294-297.

[5] 郭 昱,姚树坤. 黄芩甙对人肝癌 BEL-7402 细胞系侵袭和转移的影响[J]. 第三军医大学学报,2006,28:594-597.

[6] 郭 昱,姚树坤. 黄芩苷对人肝癌 SMMC-7721 细胞系生物学行为的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12:733-735.

[7] Marchetti S,Oostendorp R L,Pluim D,van Eijndhoven M,van Tellingen O,Schinkel A H,et al. *In vitro* transport of gimatecan (7-t-butoxyiminomethylcamptothecin) by breast cancer resistance protein,P-glycoprotein, and multidrug resistance protein 2[J]. Mol Cancer Ther,2007,6:3307-3313.

[8] Stavrovskaya A A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells[J]. Biochemistry (Mosc),2000,65:95-106.

[9] Li X,Hong L,Zhao Y,Jin H,Fan R,Du R,et al. A new apoptosis inhibitor,CIAPIN1 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1),mediates multidrug resistance in leukemia cells by regulating MDR-1,Bcl-2,and Bax[J]. Biochem Cell Biol,2007,85:741-750.

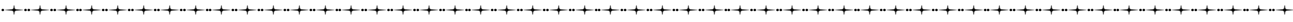
[10] Jin J,Wang F P,Wei H,Liu G. Reversal of multidrug resistance of cancer through inhibition of P-glycoprotein by 5-bromotetrandrine [J]. Cancer Chemother Pharmacol,2005,55:179-188.

[11] Uetsuka H,Haisa M,Kimura M,Gunduz M,Kaneda Y,Ohkawa T,et al. Inhibition of inducible NF-kappaB activity reduces chemoresistance to 5-fluorouracil in human stomach cancer cell line[J]. Exp Cell Res,2003,289:27-35.

[12] Hazan R B,Qiao R,Keren R,Badano I,Suyama K. Cadherin switch in tumor progression[J]. Ann N Y Acad Sci,2004,1014:155-163.

[13] Van Slambrouck S,Hilkens J,Steelant W F. Ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-3-glycero-phosphocholine inhibits cell-cell adhesion through translocation and clustering of E-cadherin and episialin in membrane microdomains[J]. Oncol Rep,2008,19:123-128.

[本文编辑] 贾泽军



• 书 讯 •

《现代创伤骨科学》已出版

本书由黄仲怡等主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0692-9,16 开,定价 200.00 元。

本书是在北京市医学会历年举办的骨科专业继续教育栏目交流的基础上,由一批长期从事骨科创伤临床一线工作、富有实践工作经验的专家执笔撰写。本书侧重于临床应用,每一专题既有各类损伤临床处理的原则,又包含了诊断学、治疗学的新进展与新方法。不仅是临床骨科医师实用、必读的参考书,而且对创伤科、急诊科及其他相关科室医师也有重要的参考价值。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大新华书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>