

- [9] Wang J, Qiao Y, Yang R S, et al. The synergistic effect of treatment with triptolide and mk-801 in the rat neuropathic pain model[J]. *Mol Pain*, 2017, 13: 1744806917746564.
- [10] Wang Y Z, Guo C Y, Zhong H G, et al. In vivo effects of pain relieving plaster on closed soft tissue injury in rabbit ears[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2008, 8: 51.
- [11] Zheng Y N, Yin X F, Huo F Q, et al. Analgesic effects and possible mechanisms of iridoid glycosides from *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo in rats with spared nerve injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173: 204-211.
- [12] Zhu B, Gong N, Fan H, et al. *Lamiophlomis rotata*, an orally available Tibetan herbal painkiller, specifically reduces pain hypersensitivity states through the activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors [J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(4): 835-851.
- [13] Gong N, Fan H, Ma A N, et al. Geniposide and its iridoid analogs exhibit antinociception by acting at the spinal glp-1 receptors[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 84: 31-45.
- [14] Gong N, Xiao Q, Zhu B, et al. Activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors specifically suppresses pain hypersensitivity[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(15): 5322-5334.
- [15] Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation [J]. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1986, 554: 221-233.
- [16] Kou Z Z, Li C Y, Hu J C, et al. Alterations in the neural circuits from peripheral afferents to the spinal cord: possible implications for diabetic polyneuropathy in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats[J]. *Front Neural Circuit*, 2014, 8: 6.
- [17] Zhou C H, Zhang M X, Zhou S S, et al. SIRT1 attenuates neuropathic pain by epigenetic regulation of mGluR1/5 expressions in type 2 diabetic rats[J]. *Pain*, 2017, 158(1): 130-139.
- [18] Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, et al. Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target-evidence from a mouse diabetic neuropathy model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 261-271.
- [19] Kou Z Z, Li C Y, Tang J, et al. Down-regulation of insulin signaling is involved in painful diabetic neuropathy in type 2 diabetes[J]. *Pain Physician*, 2013, 16(2): E71-E83.
- [20] Grote C W, Groover A L, Ryals J M, et al. Peripheral nervous system insulin resistance in ob/ob mice[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1: 15.
- [21] 姚伟伟, 王健, 周凯翔, 等. 8-O-乙酰山栀子苷甲酸通过抑制脊髓背角 JNK 的磷酸化水平改善大鼠炎性痛的研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2017, 33(3): 317-322.
- [22] 仇子钰, 张凉, 王晗, 等. 独一味单体抑制脊髓背角内 AKT-mTOR 信号通路缓解大鼠神经病理性痛[J]. *中国药师*, 2017, 20(11): 1932-1937.

雷公藤内酯醇联合多西紫杉醇对 PC-3/MDR 细胞耐药的体外逆转作用

杨瑜, 陈明*, 朱伟东, 张光远
(东南大学附属中大医院泌尿外科, 江苏南京 210009)

摘要: 目的 研究雷公藤内酯醇联合多西紫杉醇对人前列腺癌 PC-3/多药耐药 (MDR) 细胞耐药的体外逆转作用。方法 将对数生长期的 PC-3、PC-3/MDR 细胞随机分为阴性对照组、多西紫杉醇组、雷公藤内酯醇组、多西紫杉醇-雷公藤内酯醇组 (1:1、1:2、1:3), MTT 法测定各组细胞生长抑制率, HPLC 法检测各组细胞对多西紫杉醇的摄取, 试剂盒法测定给药组细胞 P-gp 表达和 P-gp ATP 酶活性, RT-PCR 法考察雷公藤内酯醇干预对 PC-3/MDR 细胞 *MDR1* mRNA 表达影响。结果 不同浓度雷公藤内酯醇联合多西紫杉醇与 PC-3、PC-3/MDR 细胞孵育后, IC₅₀ 值均显著降低, 其中 3 倍量前者对后者的耐药逆转指数为 9.75。联合用药组细胞所摄取的多西紫杉醇量显著高于多西紫杉醇组, 并呈雷公藤内酯醇剂量依赖性。此外, 高浓度雷公藤内酯醇对 *MDR1* mRNA 表达有明显抑制作用。结论 雷公藤内酯醇可通过抑制 P-gp 表达、激活 P-gp ATP 酶活性、抑制 *MDR1* mRNA 表达等多重机制, 促使多西紫杉醇在体外逆转前列腺肿瘤 PC-3/MDR 细胞耐药。

关键词: 雷公藤内酯醇; 多西紫杉醇; PC-3 细胞; 多药耐药 (MDR)

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)12-2629-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.004

收稿日期: 2018-01-15

作者简介: 杨瑜 (1977—), 男, 主治医师, 从事前列腺肿瘤临床科研相关的治疗及分子机制研究。Tel: 13851940990, E-mail: nj33867@163.com

* 通信作者: 陈明 (1963—), 男, 主任医师, 从事泌尿科临床治疗及发病机制研究。E-mail: chenming@163.com

Synergistic *in vitro* reversal effects of triptolide and docetaxel on drug resistance of PC-3/MDR cells

YANG Yu, CHEN Ming*, ZHU Wei-dong, ZHANG Guang-yuan

(Department of Urology Surgery, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

KEY WORDS: triptolide; docetaxel; PC-3 cells; multidrug resistance (MDR)

前列腺癌在男性癌症中的发病率呈逐年上升趋势,而且死亡率高^[1]。多西紫杉醇为目前治疗前列腺癌的一线化疗药物,但临床应用时常由于肿瘤细胞产生的抗药性,尤其是肿瘤多药耐药(MDR),导致大部分病人产生药物抗性,生存期大大降低^[2-3],其主要原因之一是P-糖蛋白(P-gp)过度表达^[4]。P-gp为存在于细胞膜中的糖蛋白,是一种依赖于ATP的外排泵,能将抗肿瘤药物从肿瘤细胞内排至细胞外,从而降低肿瘤细胞内药物浓度,使其无法达到杀伤肿瘤细胞的有效浓度,进而产生MDR^[5-6],故逆转MDR是当前提高肿瘤化疗效的主要策略^[7-9]。

雷公藤内酯醇是从传统中药雷公藤中分离出的双萜类化合物,具有高效的抗肿瘤、抗炎、抗类风湿等作用^[10-11],可与其他化疗药物协同作用以增强抗肿瘤效应^[12-13],并能抑制耐药的人口腔癌KB肿瘤细胞的多药耐药基因的表达,提高阿霉素耐药细胞对阿霉素的敏感性,具有逆转MDR的潜力^[14-15]。

因此,本研究采用雷公藤内酯醇与多西紫杉醇联合给药,选择人前列腺癌PC-3、PC-3/MDR细胞作为模型,考察两者联用对细胞生长的抑制作用,以及细胞对多西紫杉醇摄取率的差异,用于评价联合用药体外逆转细胞耐药作用。然后,测定不同药物处理组细胞膜表面P-gp表达、胞内P-gp ATP酶活性、耐药基因(MDR1 mRNA)表达,对雷公藤内酯醇逆转PC-3/MDR细胞耐药的机制进行初步研究,以期为相关化疗耐药逆转剂的研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器 岛津LC-20AT高效液相色谱仪,配置SPD-M20A紫外检测器、四元泵、DGU20A5R脱气机、CTO-20AC柱温箱、SIL-20A自动进样器,Lab Solutions工作站(日本岛津公司);Thermo CO₂细胞培养箱(上海旦鼎国际贸易有限公司);流式细胞仪(美国Backman Coulter公司);Image Quant

LAS-4000化学发光成像分析仪(美国GE Healthcare公司);台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);真空干燥箱(天津市华北实验仪器有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);离心超滤管(美国Pall公司);SCIENTZ-10N冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司, Molecular Devices SpectraMax 190)。

1.2 试剂 雷公藤内酯醇、维拉帕米(含量>99%,南京泽朗医药科技有限公司,批号ZL1607502Z、ZL1602071Z);多西紫杉醇(含量>99%,大连美仑生物科技有限公司,批号160702)。胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, SunShine公司);抗人CD243(ABCB1)PE(美国eBioscience公司,85-12-2439-42);P-gp-Glo assay system、逆转录试剂盒(美国Promega公司,V3591);BCA蛋白浓度测定试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);DMEM培养基、胰蛋白酶溶液(美国Gibco公司);二甲基亚砜(南京化学试剂有限公司)。乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);其他试剂均为分析纯;水为Millipore超纯水。

1.3 细胞 PC-3细胞购自中国科学院上海细胞库,PC-3/MDR细胞由东南大学医学院生理学与药理学实验室提供,均采用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养。

2 方法与结果

2.1 体外抑制细胞增殖评价

2.1.1 细胞培养 将PC-3、PC-3/MDR细胞复苏后,置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,于37℃、5%CO₂饱和湿度孵育箱中静置培养,隔天换液,每3~5d传代一次,取对数生长期的细胞用于后续实验。

2.1.2 MTT法测定药物抗增殖作用 收集对数生长期的PC-3、PC-3/MDR细胞,0.25%胰酶消化后加含10%胎牛血清的DMEM培养基调整细胞密度

至 5×10^3 /mL, 每孔 100 μ L, 接种于 96 孔培养板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后取出培养板, 吸弃孔内原培养液; 对照组给予 DMEM 不完全培养基, 给药组分别加入多西紫杉醇及其与不同浓度雷公藤内酯醇 (1 : 1、1 : 2、1 : 3) 1% DMSO 不完全培养基 (各给药组浓度均以多西紫杉醇计算, 分别为 0.01、0.1、1、2、5、10 μ mol/L)、雷公藤内酯醇 1% DMSO 不完全培养基 (浓度以雷公藤内酯醇计算, 分别为 1、2、5、10、20、40 μ mol/L) 的给药药液, 每孔 100 μ L, 每个浓度平行设置 6 个复孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 100 μ L MTT (0.5 mg/mL), 孵育 4 h 后吸去培养基, 每孔加入 150 μ L DMSO, 摇床低速振荡 10 min 后, 酶标仪于 570 nm 波长处检测吸光度值, 按下式计算细胞存活率、协同指数^[16]、逆转指数^[17] (DTX 为多西紫杉醇, TPL 为雷公藤内酯醇)。

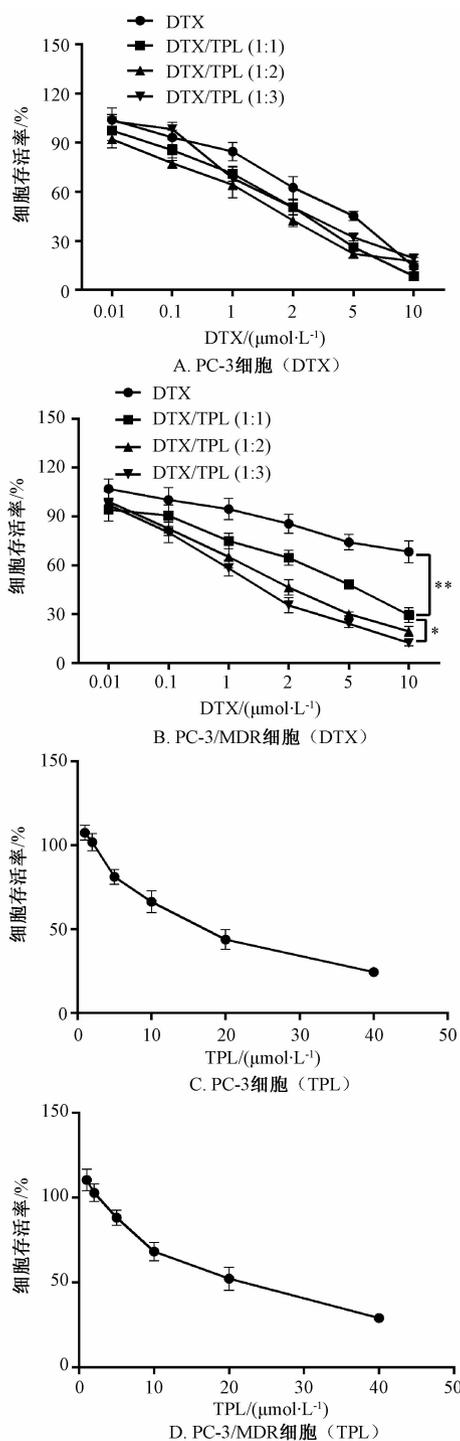
$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组吸光度}}{\text{对照组吸光度}} \times 100\%$$

$$\text{协同指数} = \frac{\text{IC}_{50} \text{DTX (DTX/TPL)}}{\text{IC}_{50} \text{(DTX)}} + \frac{\text{IC}_{50} \text{TPL (DTX/TPL)}}{\text{IC}_{50} \text{(TPL)}}$$

$$\text{逆转指数} = \frac{\text{IC}_{50} \text{(DTX)}}{\text{IC}_{50} \text{(DTX/TPL)}}$$

图 1 显示, 随着药物浓度增大, PC-3、PC-3/MDR 细胞存活率逐渐降低, 均呈剂量依赖性, 再计算其 IC₅₀ 值, 结果见表 1。由表可知, 对于 PC-3 细胞而言, 多西紫杉醇组、雷公藤内酯醇组 IC₅₀ 值分别为 (2.41 \pm 0.32)、(17.24 \pm 2.28) μ mol/L, 两者不同比例 (1 : 1、1 : 2、1 : 3) 组 IC₅₀ 值显著降低, 即具有协同抑制细胞增殖作用, 协同指数分别为 0.85、1.01、1.01, 表明低剂量下联用对非耐药型 PC-3 细胞具有一定的协同作用, 但随其剂量增加该效应逐渐消失; 对于 PC-3/MDR 细胞而言, 多西紫杉醇组 IC₅₀ 值为 (14.24 \pm 3.24) μ mol/L, 相比 PC-3 细胞提高 4.9 倍, 即对多西紫杉醇产生了较强的耐药作用, 而雷公藤内酯醇组 IC₅₀ 值为 (20.36 \pm 3.45) μ mol/L, 两者不同比例 (1 : 1、1 : 2、1 : 3) 组 IC₅₀ 值显著降低, 即具有协同抑制细胞增殖作用, 协同指数分别为 0.65、0.46、0.32, 提示两药联用对于耐药型 PC-3 细胞具有显著的协同作用; 高剂量雷公藤内酯醇对多西紫杉醇的逆转指数达 9.75, 显著增强了药物对 PC-3/MDR 细胞生长的抑制作用, 逆转了 PC-3/MDR 对多西

紫杉醇的耐药作用。



注: DTX 为多西紫杉醇, TPL 为雷公藤内酯醇

图 1 不同比例多西紫杉醇、雷公藤内酯醇对细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effects of different ratios of doxorubicin to triptolide on cell proliferation

2.2 细胞摄取

2.2.1 给药液配制 将多西紫杉醇、多西紫杉醇与不同比例雷公藤内酯醇 (1 : 1、1 : 2、1 : 3) 分

表1 不同比例多西紫杉醇、雷公藤内酯醇对细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Inhibition effects of different ratios of docetaxel to triptolide on cell proliferation ($\bar{x} \pm s$)

组别	PC-3		PC-3/MDR		
	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	协同指数	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	协同指数	耐药逆转指数
多西紫杉醇组	2.41 ± 0.32	—	14.24 ± 3.24	—	—
雷公藤内酯醇组	17.24 ± 2.28	—	20.36 ± 3.45	—	—
多西紫杉醇-雷公藤内酯醇组(1:1)	1.81 ± 0.23	0.85	5.42 ± 0.61	0.65	2.63
多西紫杉醇-雷公藤内酯醇组(1:2)	1.91 ± 0.25	1.01	2.74 ± 0.36	0.46	5.20
多西紫杉醇-雷公藤内酯醇组(1:3)	1.70 ± 0.41	1.01	1.46 ± 0.44	0.32	9.75

别用含 1% DMSO 不完全培养基精密配制成含 5 $\mu\text{mol/L}$ 多西紫杉醇浓度的给药液, 备用。

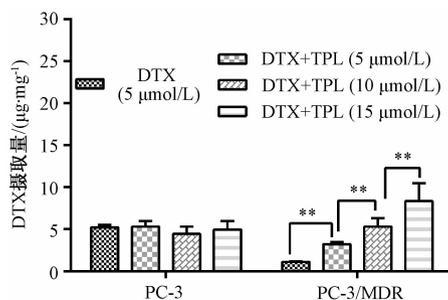
2.2.2 实验操作 PC-3、PC-3/MDR 细胞培养于 24 孔细胞培养板中, 待细胞生长至板壁 80% 密度时移去培养基, 每孔加入 400 μL “2.2.1” 项下药液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下共孵育 6 h, 移去药液, 每孔用 500 μL PBS 洗涤除去残留药液, 连续 3 次, 加入 200 μL 0.1% SDS 裂解液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 min 裂解细胞, 12 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液 20 μL , BCA 试剂盒测定蛋白含有量。另取 100 μL 上清液, 加入 100 μL 冰乙腈, 沉淀蛋白, 涡旋振荡 5 min, 12 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液进行 HPLC 分析, 记录峰面积, 计算细胞摄取量 (U_{DTX}), 公式如下 [Q_{DTX} (μg)、 Q_{protein} (mg) 分别为细胞中多西紫杉醇、蛋白含有量]。

$$U_{\text{DTX}} = \frac{Q_{\text{DTX}}}{Q_{\text{protein}}}$$

2.2.3 多西紫杉醇含有量测定 采用 HPLC 法测定 “2.2.2” 项下细胞裂解液中多西紫杉醇含有量, 色谱条件^[18] 为 Agilent Zorbax-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (60:40); 检测波长 230 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得回归方程为 $Y = 6.3945X - 2.1468$ ($R^2 = 0.9998$), 在 3.25 ~ 650.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 进而计算 Q_{DTX} 。

然后, 数据采用 Graphpad6.1 软件进行 Student t -test 分析, 结果见图 2。由图可知, PC-3 细胞中多西紫杉醇组摄取量为 (5.23 ± 0.3) $\mu\text{g/mg}$, 而与其不同比例 (1:1、1:2、1:3) 雷公藤内酯醇混合组摄取量分别为 (5.34 ± 0.64)、(4.46 ± 0.87)、(4.99 ± 0.97) $\mu\text{g/mg}$, 组间无显著性差异 ($P > 0.05$); PC-3/MDR 细胞中其表面 P-gp 表达水平较高, 多西紫杉醇组细胞对多西紫杉醇的摄取量仅为 (1.14 ± 0.03) $\mu\text{g/mg}$, 与 PC-3 细胞中比

较降低 3.7 倍, 而不同比例 (1:1、1:2、1:3) 雷公藤内酯醇与多西紫杉醇混合组摄取量分别为 (3.23 ± 0.23)、(5.35 ± 1.00)、(8.35 ± 2.13) $\mu\text{g/mg}$, 其中 1:3 比例下摄取量与多西紫杉醇组比较增加 6.3 倍, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。



注: DTX 为多西紫杉醇, TPL 为雷公藤内酯醇。与多西紫杉醇组比较, ** $P < 0.01$

图2 多西紫杉醇细胞摄取

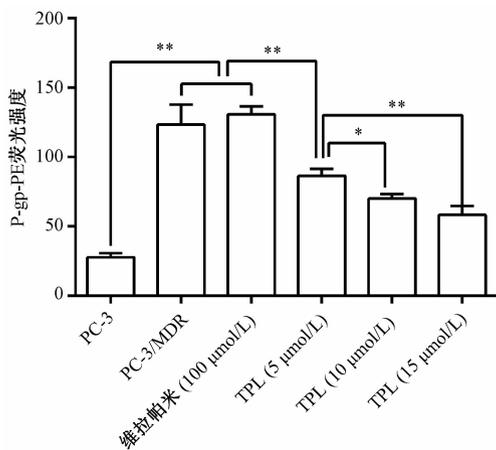
Fig. 2 Cellular uptake of docetaxel

2.3 耐药机制考察

2.3.1 P-gp 表达 选择抗人 CD243 (ABCB1) PE 作为 P-gp 单克隆抗体的 P-gp 抗体结合测定试剂盒, 用于测定 PC-3、PC-3/MDR 细胞中 P-gp 表达。将 PC-3 和 PC-3/MDR 细胞 (1×10^6 /孔) 接种于 6 孔板中, 待细胞密度达 80% 左右时将其分别与维拉帕米 (100 $\mu\text{mol/L}$)、雷公藤内酯醇 (5、10、15 $\mu\text{mol/L}$)、不含 FBS 的培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 8 h, 弃去含药培养基, 将细胞用冰 PBS 洗涤 3 次, 消化收集细胞, 1 000 $\times g$ 离心 5 min 后收集沉淀物。将细胞用 PBS 混悬后, 取 100 μL 分别加入抗人 CD243 (ABCB1) PE 溶液 (5 μL , 0.5 μg) 和小鼠 IgG2a κ 同种型对照 PE 溶液 (5 μL), 在室温下孵育 30 min, 离心后用冰 PBS 洗涤 3 次以除去细胞外荧光, 流式细胞术分析细胞荧光强度, 其大小可反映细胞膜上的 P-gp 表达。

然后, 数据采用 Graphpad6.1 软件进行 Student t -test 分析, 结果见图 3。由图可知, PC-3 细胞中 P-gp 表达较低, 而在 PC-3/MDR 细胞中较高, 而

维拉帕米对其表达无影响，与前期报道一致^[19-20]；雷公藤内酯醇不同浓度组 PC-3/MDR 细胞中 P-gp 表达均低于未处理组，并随着其浓度增高分别降低了 29.8%、43.1%、52.7%，3 组均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。



注：TPL 为雷公藤内酯醇。组间比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

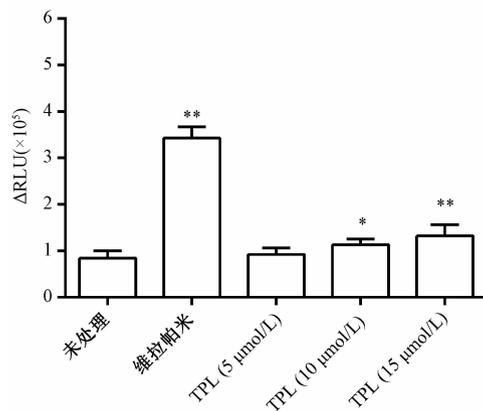
图3 雷公藤内酯醇对 P-gp 表达的影响

Fig. 3 Effect of triptolide on P-gp expression

2.3.2 P-gp ATP 酶活性 由于 P-gp 生物学功能依赖专属 ATP 提供能量，故有些药物可通过激活 P-gp ATP 酶活性来干扰其外排作用，从而减少它与其联用药物的外排作用，达到逆转此类药物耐药作用的目的。本实验采用 P-gp-GloTM 检测试剂盒检测药物对 P-gp ATP 酶活性的影响，按照试剂盒说明书分别设置维拉帕米组 (100 μmol/L)、雷公藤内酯醇组 (5、10、15 μmol/L)、原钒酸钠组 (100 μmol/L，胞内 ATP 酶抑制剂)、未处理组；将药物加到含 5 mmol/L MgATP、25 μg 人重组 P-gp ATP 酶的细胞膜分析液中，37 °C 下孵育 40 min，加入 ATP 检测试剂，反应 20 min 后由 Modulus 单管多模式读取器检测化学发光信号 (RLU)，以 ΔRLU 大小反映 P-gp ATP 酶活性，以 Na₃VO₄ 处理组 RLU 值 (8.92 ± 0.94) × 10⁵ 为基准，计算其他组 ΔRLU，公式为 ΔRLU = RLU_{原钒酸钠} - RLU_{测试组}，若 ΔRLU 高于未处理组，表明测试组对 P-gp ATP 酶有激活作用，反之则有抑制作用^[20-21]。

然后，数据采用 Graphpad6.1 软件进行 Student t-test 分析，结果见图 4。由图可知，未处理组 ΔRLU 为 (0.85 ± 0.15) × 10⁵，即消耗较少，P-gp ATP 酶活性受影响较小；维拉帕米是一种经典的 P-gp 抑制剂，主要通过激活 P-gp ATP 酶活性来增大对其的消耗，故 RLU 较小，而 ΔRLU 较大；

雷公藤内酯醇 5、10、15 μmol/L 组 ΔRLU 分别为 (0.93 ± 0.13) × 10⁵、(1.14 ± 0.18) × 10⁵、(1.33 ± 0.24) × 10⁵，其中 10、15 μmol/L 浓度下与未处理组比较有显著差异 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)。



注：TPL 为雷公藤内酯醇。与未处理组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图4 雷公藤内酯醇对 P-gp ATP 酶活性的影响

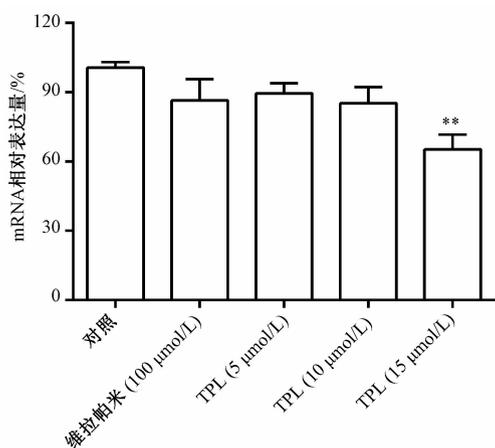
Fig. 4 Effect of triptolide on P-gp ATPase activity

2.3.3 MDR1 mRNA 表达 耐药蛋白和耐药基因共同组成了耐药肿瘤细胞抵抗化疗药物治疗的最重要“防线”^[22]。本实验首先对 PC-3/MDR 细胞进行“2.3.1”项下预处理，然后加入 0.5 mL PBS 充分清洗细胞，消化离心，得细胞密度 2.5 × 10⁶/mL 的悬浮液，再用经典的“异硫氰酸胍-苯酚-氯仿”一步法抽提出细胞总 RNA^[23]。PCR 引物有意链引物 5'-GGGAGCTTAACACCCGACTT-3'，反意链引物 5'-ATTCCCCTGAGAGGACCAAG-3'；参照基因 (GAPDH) 有意链引物 5'-CTGCAGCATCTTCTCCTTCC-3'，反意链引物 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'，再参照逆转录试剂盒说明书进行逆转录制备 cDNA 和 PCR 反应体系，反应条件为 94 °C 变性 15 s，55 °C 退火 30 ~ 40 s，72 °C 延伸 1 min，扩增 30 个循环，最后 72 °C 延伸 5 min。取扩增产物，2% 琼脂糖凝胶 (含 EB) 电泳 (70 V、2 h)，溴化乙锭染色，紫外透射仪下观察，以 MDR cDNA/GAPDH cDNA 比值定量药物对 MDR1 mRNA 的表达影响^[24]。

图 5 显示，维拉帕米主要通过与其 P-gp 竞争结合来减少药泵对多西紫杉醇的外排，故其对 MDR1 mRNA 的影响不大，而高浓度雷公藤内酯醇能显著抑制 MDR1 mRNA 表达。

3 讨论

本实验发现，多西紫杉醇作用于 PC-3/MDR



注：TPL为雷公藤内酯醇。与对照组比较，** $P < 0.01$

图5 雷公藤内酯醇对MDR1 mRNA表达的影响

Fig. 5 Effect of triptolide on MDR1 mRNA expression

细胞时，其 IC_{50} 值显著高于PC-3；将其与雷公藤内酯醇联合作用于PC-3/MDR细胞时，其 IC_{50} 值显著降低，其中高浓度雷公藤内酯醇逆转多西紫杉醇耐药指数高达9.75，并与细胞摄取呈明显的正相关，提示两者联用具有协同杀伤耐药肿瘤细胞的潜力，其机制可能为一方面雷公藤内酯醇抑制肿瘤细胞增长，另一方面它又逆转PC-3/MDR细胞对多西紫杉醇的耐药，而且该成分还可极显著增加多西紫杉醇摄取量。此外，通过测定PC-3/MDR细胞P-gp表达和P-gp ATP酶活性时发现，雷公藤内酯醇可通过降低P-gp表达、增强P-gp ATP酶活性来达到逆转细胞对多西紫杉醇的耐药作用，表明它可能有与维拉帕米相类似的部分作用，即通过竞争性结合P-gp蛋白位点、干扰耐药蛋白酶活性来减少P-gp对多西紫杉醇的外排作用。MDR1 mRNA表达实验进一步证明，高浓度雷公藤内酯醇能在一定程度上抑制耐药基因表达，提示它可能从蛋白、基因水平多重调节耐药环境，提高多西紫杉醇在耐药细胞内的聚集和滞留时间，从而协同杀伤肿瘤细胞。

综上所述，雷公藤内酯醇主要从蛋白、基因水平多重干预PC-3/MDR细胞的耐药环境，在体外具有逆转耐药细胞对多西紫杉醇的耐药能力，而且浓度越高逆转作用越强。今后，将构建PC-3、PC-3/MDR荷瘤小鼠模型，进一步对雷公藤内酯醇和多西紫杉醇联合给药的体内抗前列腺癌活性进行评价，并从分子水平对其逆转PC-3/MDR耐药的机制作进一步评价，以期为临床前列腺癌耐药患者的用药提供参考。

参考文献：

[1] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和
2634

流行趋势分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(4): 330-334.

[2] 王军飞, 张伟, 丁宁, 等. 紫杉醇类前药的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(5): 394-402.

[3] 龙俊任, 熊飞, 董自强. 前列腺癌多药耐药的研究进展[J]. 广东医学, 2010, 31(21): 2871-2873.

[4] 马秉亮, 吴玉林, 刘国卿. P-gp及对抗P-gp介导多药耐药的研究现状[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(1): 14-21.

[5] 方宁, 农晓琳. 肿瘤多药耐药机制研究现状[J]. 实用肿瘤学杂志, 2008, 22(6): 553-556.

[6] 立彦, 王自正. P-gp介导的肿瘤多药耐药逆转研究进展(文献综述)[J]. 放射免疫学杂志, 2005, 18(2): 133-134.

[7] Yuan Z, Shi X, Qiu Y, et al. Reversal of P-gp-mediated multidrug resistance in colon cancer by cinobufagin[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1815-1825.

[8] Bai Z S, Gao M Q, Zhang H J, et al. BZML, a novel colchicine binding site inhibitor, overcomes multidrug resistance in A549/Taxol cells by inhibiting P-gp function and inducing mitotic catastrophe[J]. *Cancer Lett*, 2017, 402: 81-92.

[9] Wang C, Liu Z, Sun Y, et al. A stronger reversal effect of the combination of dasatinib and menadione on P-gp-mediated multidrug resistance in human leukemia K562/Adr cell line[J]. *RSC Adv*, 2017, 7(28): 17227-17235.

[10] 刘明星, 董静, 杨亚江, 等. 雷公藤甲素的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 170-174.

[11] 刘福和, 叶晓莉, 宋倩倩, 等. 雷公藤内酯醇抗肿瘤信号转导机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(4): 727-730.

[12] Qiao Z X, He M, He MU, et al. Synergistic antitumor activity of gemcitabine combined with triptolide in pancreatic cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(5): 3527-3533.

[13] Yan X, Ke X X, Zhao H, et al. Triptolide inhibits cell proliferation and tumorigenicity of human neuroblastoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 791-796.

[14] 王海娟, 张美芝, 刘小菊, 等. 雷公藤内酯醇逆转肿瘤多药耐药研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 229-234.

[15] Li H, Hui L L, Xu W L, et al. Modulation of P-glycoprotein expression by triptolide in adriamycin-resistant K562/A02 cells[J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(2): 485-489.

[16] Li Y, Lin J, Huang Y, et al. Self-targeted, shape-assisted, and controlled-release self-delivery nanodrug for synergistic targeting/anticancer effect of cytoplasm and nucleus of cancer cells[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(46): 25553-25559.

[17] Zhang P R, Zhang J H, Yu M, et al. Triptolide reverses MCF-7/ADR cell resistance by down-regulating P-glycoprotein expression[J]. *Int J Clin Exp Med* 2017, 10(1): 1513-1521.

[18] 柯学, 王长江, 严菲. 滤膜法测定多西紫杉醇脂质体的包封率[J]. 中国现代应用药理学, 2008, 25(4): 314-316.

[19] Jin X, Mo R, Ding Y, et al. Paclitaxel-loaded N-octyl-O-sul-

- fate chitosan micelles for superior cancer therapeutic efficacy and overcoming drug resistance [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11 (1): 145-157.
- [20] Mo R, Jin X, Li N, *et al.* The mechanism of enhancement on oral absorption of paclitaxel by *N*-octyl-*O*-sulfate chitosan micelles[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(20): 4609-4620.
- [21] 梅梅, 张翼, 任金红, 等. 新型紫杉烷化合物 NPB304 及其协同维拉帕米逆转耐药的研究[J]. *药学报*, 2014, 49(9): 1279-1288.
- [22] Chen J J, Liu S P, Zhao J, *et al.* Effects of a novel photoactiva-
- ted photosensitizer on MDR1 over-expressing human breast cancer cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 171: 67-74.
- [23] Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159.
- [24] Wang F, Huang N, Yang Q, *et al.* Reversal of doxorubicin-resistance by *Salvia miltiorrhiza* ligustrazine in the SHG44/doxorubicin glioma drug-resistant cell line[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14 (4): 4708-4714.

牛膝提取物对大鼠骨髓间充质干细胞向髓核样细胞增殖与分化的影响

岳宗进, 于露, 刘汝银, 冯仲锴, 王新立, 王西彬, 鲁花
(河南中医药大学第二附属医院, 河南 郑州 450002)

摘要: 目的 研究牛膝提取物对大鼠骨髓间充质干细胞向髓核样细胞增殖与分化的影响。方法 分离培养原代大鼠骨髓间充质干细胞后, 流式细胞仪检测细胞表面标记物, 分成对照组和牛膝提取物组 (10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。培养14 d后, MTT法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 阿利新蓝法检测葡糖胺聚糖含有量, 实时定量聚合酶链反应 (Real-time PCR)、免疫印迹 (Western blot) 检测细胞中 Sox-9、II型胶原 (Col II)、聚集蛋白聚糖 (Aggrecan) 水平。SIRT1 抑制剂 (尼克酰胺) 处理细胞, MTT法检测细胞增殖, RT-PCR 和免疫蛋白印迹检测 SIRT1、Sox-9 水平。结果 骨髓间充质干细胞表面 CD90 和 CD44 呈阳性表达, 而 CD45 和 CD34 呈阴性表达。与对照组比较, 牛膝提取物可显著促进骨髓间充质干细胞细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 上调细胞葡糖胺聚糖含有量及 Sox-9、Col II、Aggrecan 水平, 以上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖效应。另外, 尼克酰胺可抑制牛膝提取物诱导的骨髓间充质干细胞细胞增殖和 Sox-9 表达升高。结论 牛膝提取物可通过上调 SIRT1 水平来促进骨髓间充质干细胞向髓核样细胞增殖与分化。

关键词: 牛膝提取物; 骨髓间充质干细胞; 髓核样细胞; 增殖; 分化

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)12-2635-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.005

Effects of *Achyranthis bidentatae Radix* extract on the proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells

YUE Zong-jin, YU Lu, LIU Ru-yin, FENG Zhong-kai, WANG Xin-li, WANG Xi-bin, LU Hua
(The Second Hospital Affiliated to Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

KEY WORDS: *Achyranthis bidentatae Radix* extract; bone marrow mesenchymal stem cells; nucleus pulposus-like cells; proliferation; differentiation

腰椎间盘突出是由椎间盘退变引起的一种骨科常见病^[1], 椎间盘退变源于髓核组织退变, 主

要特点为髓核细胞凋亡、细胞数量减少、髓核含水量、蛋白多糖含有量减少等^[2]。骨髓间充质干细