

## 薏苡仁脂干预 MCF-7/DOX 细胞中荧光药物动力学及部分耐药蛋白表达

祝丽欣<sup>1,2</sup>, 唐超园<sup>1</sup>, 俞建东<sup>1</sup>, 陈芝<sup>1</sup>, 熊阳<sup>1\*</sup>

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052)

**摘要:** 本文从薏苡仁脂干预耐药乳腺癌细胞的荧光药物动力学以及对耐药基因和蛋白表达量的影响两方面着手, 研究薏苡仁脂逆转乳腺癌细胞耐药的机制。首先通过建立稳定过表达荧光素酶的人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup>, 应用生物发光成像技术 (bioluminescence imaging, BLI), 实时监测细胞内 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白底物 *D*-荧光素钾的外排动力学过程, 检测薏苡仁脂干预前后 *D*-荧光素钾的胞内动力学变化。结果表明, 与空白组相比, 薏苡仁脂明显减少 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 对 *D*-荧光素钾的外排, 增加胞内累积量。此外, 采用实时定量基因扩增荧光检测系统和蛋白免疫印迹技术, 研究薏苡仁脂干预后 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 中 ABC 转运子的基因及蛋白表达的变化。结果显示, 薏苡仁脂处理后可下调 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞中 P-糖蛋白 (P-gp/ABCB1)、多药耐药相关蛋白 1 (MRP1/ABCC1) 以及乳腺癌耐药蛋白 (BCRP/ABCG2) 等耐药基因和蛋白的表达。最后将薏苡仁脂联合多柔比星对薏苡仁脂逆转乳腺癌耐药效果进行体外评价, 结果证明薏苡仁脂可增强多柔比星抑制 MCF-7/DOX 细胞增殖的作用, 其最佳联合比例为薏苡仁脂:多柔比星=25:1。薏苡仁脂可以通过抑制 ABC 转运蛋白的外排功能和下调 ABC 转运蛋白在肿瘤细胞表达水平, 双管齐下逆转化疗药物多柔比星的肿瘤多药耐药。

**关键词:** 薏苡仁脂; 生物发光成像; 乳腺癌; 多药耐药; *D*-荧光素钾; 外排动力学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0084-06

## Impact of Coix seed oil on fluorescence excretion pharmacokinetics and protein expression in doxorubicin-resistant cells MCF-7/DOX

ZHU Li-xin<sup>1,2</sup>, TANG Chao-yuan<sup>1</sup>, YU Jian-dong<sup>1</sup>, CHEN Zhi<sup>1</sup>, XIONG Yang<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

**Abstract:** This study was designed to explore the mechanism of Coix seed oil (Coix) impact on the drug resistance, bioluminescence imaging (BLI) and the efflux of *D*-luciferin potassium salt, the substrate of ABC transporters, in doxorubicin-resistant breast cancer cells. Multidrug resistance (MDR) gene and protein expression were analyzed in the cells by q-PCR and Western blot. First, in order to investigate the effect of the efflux function by ABC protein, a cell line with overexpressed luciferase was established in MCF-7 cell line. BLI was used to monitor the efflux kinetics of *D*-luciferin potassium salt before and after Coix treatment. The results showed that the efflux of *D*-fluorescein potassium from MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> was lessened when pretreated with Coix, which means that Coix may decrease the efflux of other chemotherapies using ABC transporters. Both of the

收稿日期: 2017-08-11; 修回日期: 2017-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473434, 81774011, 81673607).

\*通讯作者 Tel: 86-571-61768158, E-mail: xyxb@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0782

results of q-PCR and Western blot showed that gene and protein expression of ABC transporters such as ABCG2, ABCC1 and ABCB1 were down-regulated by Coix treatment. The efficacy of Coix reversing MDR was verified with the chemotherapy medication doxorubicin (DOX). MTT assay showed that Coix increased the inhibitory effect of DOX on proliferation of MCF-7/DOX, and the optimal combination of ratio was 25 times that of DOX. The results suggest that Coix may reverse MDR of the substrate of ABC transporters from two aspects, one is to cut down the ABC protein efflux function, and the other is to decrease the quantity of ABC gene and protein expression.

**Key words:** Coix seed oil; bioluminescence imaging; breast cancer; multidrug resistance; *D*-luciferin potassium salt; excretion pharmacokinetics

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 在女性癌症患者中的病死率位列第二, 且人群有逐步年轻化的趋势<sup>[1, 2]</sup>。目前化疗仍是治疗乳腺癌并防止其术后复发的主要手段之一, 但肿瘤细胞对化疗药物产生耐药是肿瘤化疗失败的主要原因, 也是影响临床肿瘤患者预后的重要因素<sup>[3]</sup>。

针对肿瘤多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 的产生过程, 应用 MDR 逆转剂是解决肿瘤 MDR 的主要手段。目前肿瘤 MDR 逆转剂的相关报道较多<sup>[4]</sup>, 环孢菌素 A、异搏定等已进入临床研究, 但逆转效果不明显且临床使用禁忌症多, 毒副作用大<sup>[5]</sup>。而细胞实验、动物实验和临床实践均发现许多中药单味药及复方表现出良好的逆转肿瘤耐药性、增强化疗药物疗效并降低毒性的作用<sup>[6-9]</sup>。

薏苡仁脂是我国具有自主知识产权的新型广谱抗肿瘤中药有效成分, 对正常组织毒性小, 安全性大; 本身具有一定的抗肿瘤作用, 临床上常与卡铂、多西他赛、吉西他滨等化疗药物合用以增加化疗敏感性及降低毒性<sup>[10, 11]</sup>。尽管研究薏苡仁脂逆转效果的报道很多<sup>[12]</sup>, 但其逆转耐药的机制尚未明确, 且大部分局限于对肿瘤细胞的蛋白表达量的研究, 如 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白包括 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp/ABCB1)、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1/ABCC1) 以及乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP/ABCG2) 介导的增强化疗药物外排作用。ABC 转运家族蛋白通过 ATP 结合或水解为各种药物从细胞质转运到细胞外提供能量, ABCG2、ABCC1、ABCB1 都是 ABC 转运蛋白家族成员, 其在肿瘤细胞中的过表达与肿瘤细胞对多种化疗药物的耐药相关。

目前研究 ABC 蛋白外排功能的方法多是采用 ABC 蛋白底物罗丹明等荧光物质, 在不同时间点测定罗丹明的流出情况<sup>[13]</sup>, 无法实时动态的进行, 特

别是无法应用到体内。因此寻找一种体内外均能特异性地实时分析肿瘤细胞内 ABC 转运子底物的动力学过程非常重要。

大量研究发现 *D*-荧光素钾是 ABC 转运子的特异性底物, 其在肿瘤细胞内的动力学 (pharmacokinetics, PK) 直接和 ABC 转运子“药泵”活性相关, 且其进出肿瘤细胞的方式与小分子化疗药物也极为相似, 可作为反映肿瘤细胞药物外排的有效探针<sup>[14]</sup>。同时 *D*-荧光素钾也是萤火虫荧光素酶的特异性底物, 当其进入肿瘤细胞内, 可被事先构建入肿瘤细胞内的荧光素酶氧化, 激发相等摩尔量的光子, 由于荧光素酶仅构建于肿瘤细胞内, 因此利用该方法可以实时定量地表征肿瘤细胞内 ABC 转运子底物的物质量, 可以特异性地体内外实时分析肿瘤细胞内 ABC 转运子底物的动力学过程<sup>[15, 16]</sup>。

因此, 本文中采用过表达荧光素酶报告基因的乳腺癌耐药细胞系为研究对象, 采用基于细胞水平的生物发光成像技术 (bioluminescence imaging, BLI) 研究薏苡仁脂对耐药细胞 ABC 蛋白外排功能的影响, 并结合常用的 q-PCR 和 Western blot 技术同步研究薏苡仁脂对耐药细胞中 ABC 耐药蛋白表达量的影响, 双管齐下研究薏苡仁脂逆转耐药乳腺癌 MDR 的机制。

## 材料与方法

**材料与试剂** 人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/DOX, 四川大学高会乐教授赠送; 多柔比星 (DOX, 海正辉瑞制药公司); 薏苡仁脂 (康莱特注射液, 1412241-2, 浙江康莱特药业有限公司); 0.25% 胰蛋白酶、DMEM 培养液、青/链霉素 (P/S) (Gibco 公司); 新生牛血清 (FBS, Bioind 公司); *D*-荧光素钾 (Science Light 公司); MTT (Sigma 公司); ABCB1、ABCC1、ABCG2 和 GAPDH 一抗、二抗 (Abcam 公司); BCA 试剂盒 (碧云天公司)。

**主要仪器** IVIS 小动物活体成像系统 (美国

Xenogen 公司); 自动酶标仪 (美国 Thermo 公司); 荧光定量 PCR 仪 (德国 Effendorf 公司); 数显式稳压稳流电泳仪、凝胶成像仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

**细胞培养** 将 MCF-7/DOX 细胞用含 1% P/S 和 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 1~2 天换液, 当细胞生长至 80%~90% 丰度时, 用酶消化法进行传代。每月需加入 2 μg·mL<sup>-1</sup> DOX 培养 1 次以维持其耐药性, 实验检测前 1 周需撤药。

**稳转 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞株构建** 取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞胰酶消化, 用 DMEM (10% FBS, 无 P/S) 培养基制成细胞悬液, 每孔 5 000 个细胞滴加于 96 孔板中, 培养过夜。弃去上清液, 每孔按所需的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 加入已稀释的携带萤火虫荧光素酶报告基因或携带绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的慢病毒液 100 μL。加入 polybrene 使每孔的终质量浓度为 5 μg·mL<sup>-1</sup>。转染 8~12 h 后将细胞置于显微镜下观察细胞生长状态和数量, 并更换常规培养基。培养 2~3 天后, 对于携带 GFP 慢病毒液感染的细胞置于荧光显微镜下选择蓝色激发光激发观察胞内绿色荧光的表达; 对于携带萤火虫荧光素酶报告基因慢病毒液感染的细胞则加入 *D*-荧光素钾采用酶标仪检测发光响应值。

**最佳感染 MOI 值的筛选** 操作同稳转 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞株构建实验, 只需设置成不同的 MOI 值组, 分别为 0、10、20、40、60 和 80。

**非饱和底物浓度和最适细胞数量的选择** ① 取对数生长期细胞, 经胰酶消化后制成单细胞悬液, 每孔加入 2×10<sup>4</sup> 个细胞于 96 孔板, 常规培养过夜。精密称取 *D*-荧光素钾, 用 PBS 稀释成 0、2.5、5、10、20、50 和 100 μg·mL<sup>-1</sup> 系列质量浓度的底物工作液。弃上清, 每孔加入底物工作液 100 μL, 立即置于酶标仪, 曝光 30 s, 检测各孔发光响应值。② 将对数生长期的 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞制成不同浓度的细胞悬液, 每孔 100 μL 均匀滴加于 96 孔板中, 常规培养过夜。检测前每孔加入 100 μg·mL<sup>-1</sup> *D*-荧光素钾溶液, 立即置于酶标仪, 曝光 30 s, 检测各孔发光响应值。

**活细胞 BLI 值测定** 取对数生长期细胞按每孔 1×10<sup>4</sup> 个接种于 96 孔黑色底透板中, 常规培养过夜。药物组各孔加入不同质量浓度薏苡仁脂 (1、5、10 和 20 mg·mL<sup>-1</sup>), 对照组各孔加入等量培养液, 每组设 6 个复孔, 转入培养箱中继续培养 24 和 48 h。弃含药培养液, 每孔加入 *D*-荧光素钾 (10 μg·mL<sup>-1</sup>) 培养液 100 μL。迅速放入 IVIS 小动物活体成像系统, 每次检测曝光 2 min, 每隔 5 min 检测 1 次, 记录 90 min 内

BLI 信号。采用 BCA 法测定各组蛋白浓度, 然后将各时间点 BLI 信号以各组蛋白浓度平均化, 即得各处理组的相对生物发光信号值 BLI<sub>rel</sub>。采用 Winnolin5.2 药动学软件绘制 BLI<sub>rel</sub> 与时间的关系图, 按照非隔室模型方法, 求算不同浓度薏苡仁脂处理不同时间后 *D*-荧光素钾在胞内的动力学参数。

**q-PCR** 收集经不同质量浓度薏苡仁脂 (0、1 和 10 mg·mL<sup>-1</sup>) 处理 48 h 的 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞, 加入 1 mL Trizol 裂解细胞, 再加入 0.2 mL 三氯甲烷提取 RNA, 4 °C、12 000 ×g 离心 15 min。小心吸取上清液加入等体积的异丙醇, 剧烈震荡后, 室温静置 15 min, 4 °C、12 000 ×g 离心 10 min。弃去上清液, 加入 1 mL 75% 乙醇清洗 2 次, 4 °C、7 500 ×g 离心 10 min。弃上清, 留少量液体于室温下挥干即得 RNA。按照反转录和 q-PCR 试剂盒进行后续实验操作。

**Western blot<sup>[17]</sup>** 收集经不同质量浓度薏苡仁脂 (0、1 和 10 mg·mL<sup>-1</sup>) 处理 48 h 的 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞, 加入细胞裂解液, 置于冰上振摇 30 min, 4 °C、12 000 ×g 离心 15 min, 取上清液。蛋白定量后各组分别取 50 μg 蛋白与 5× SDS 上样缓冲液混匀, 100 °C 煮沸 5 min。经 8% SDS-PAGE 电泳分离, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 一抗, 4 °C 孵育过夜, 相应二抗室温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 显影, 暗室曝光并分析蛋白表达水平。

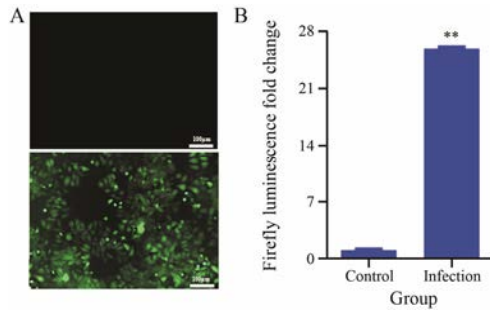
**MTT 法检测细胞生长<sup>[18]</sup>** 取对数生长期 MCF-7/DOX 细胞, 以每孔 1.5×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔板中, 常规培养过夜。DOX 设置不同的浓度梯度, 薏苡仁脂的浓度根据 DOX 的浓度按 25 : 1、50 : 1、100 : 1 和 200 : 1 的比例调整, 对照组各孔加入相同浓度溶剂, 每个浓度设 6 个复孔, 转入培养箱中继续培养 48 h。弃去含药培养液, PBS 轻洗 2 次, 每孔加入 MTT (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) 培养液 100 μL, 4 h 后弃去上清, 每孔加入二甲基亚砷 100 μL, 震荡 10 min。以空白组调零, 490 nm 处测定各孔吸光度 (OD 值)。计算肿瘤细胞增殖率及 IC<sub>50</sub>。

**统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 17.0 统计软件分析, 采用方差分析比较多组间均数, *t* 检验比较两组间均数。以 *P* < 0.05 表示有显著性差异。

## 结果

### 1 稳转 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞株构建

病毒感染组在荧光显微镜下可明显观察到胞内含有绿色荧光 (图 1A), BLI 响应值结果显示病毒



**Figure 1** Expression of green fluorescent protein and firefly luciferase in MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup>. A: GFP expression; B: Firefly luciferase expression.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control

感染组萤火虫荧光素酶表达量是空白组的 25.93 倍 ( $P < 0.01$ , 图 1B), 说明使用慢病毒感染的方式可以成功转染 MCF-7/DOX 细胞株。

## 2 最佳 MOI 值的确定

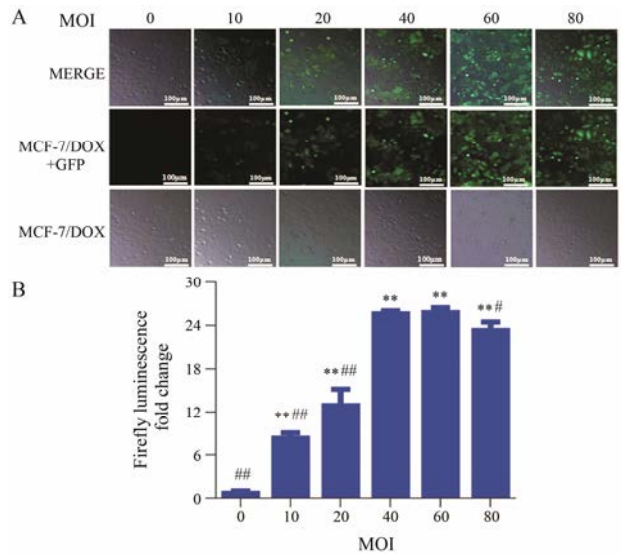
如图 2A 所示, 荧光显微镜下观察到细胞内的绿色荧光随着 MOI 增大明显增加, MOI 为 40 时已有 90% 以上细胞转染成功。BLI 响应值结果基本满足上述规律 (图 2B), 由于慢病毒对于细胞有一定的毒性, 随着 MOI 值的增加, 所加入的慢病毒越多, 对细胞的毒性作用也越强, 故综合考虑选择 MOI 为 40 为最佳感染值。

## 3 非饱和和底物浓度和最适细胞数量的选择

在荧光素底物不饱和条件下, *D*-荧光素钾浓度与发光响应值呈线性相关,  $y = 2.123x + 5.903$  ( $R^2 = 0.947$ ,  $0 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。细胞数量与发光响应值呈线性相关,  $y = 0.002x + 1.081$  ( $R^2 = 0.999$ ,  $0 \sim 2 \times 10^4$  个)。说明实验选用  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  *D*-荧光素钾和每孔  $10^4$  个细胞数量控制在 *D*-荧光素钾的非饱和浓度范围中。

## 4 活细胞 BLI 值测定

不同浓度薏苡仁脂处理细胞 24 h 后, 与对照组相比,  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  薏苡仁脂组能明显延缓胞内 *D*-荧光素钾的消除 ( $P < 0.01$ ),  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  薏苡仁脂组能

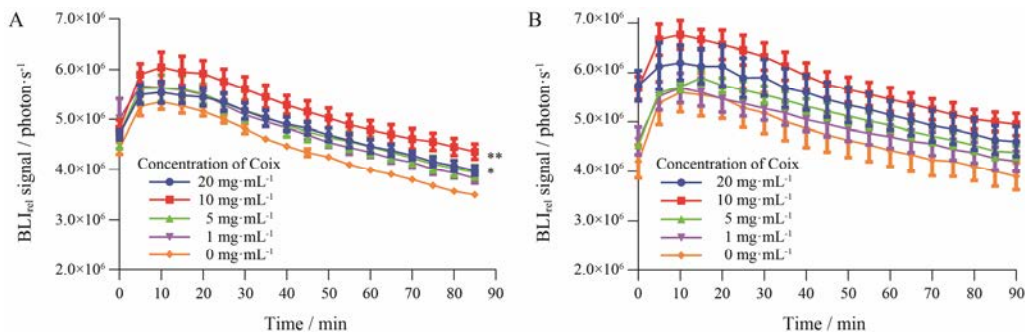


**Figure 2** Expression of green fluorescent protein (GFP) and firefly luciferase in MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> after infection with different multiplicity of infection (MOI). A: GFP expression; B: Firefly luciferase expression.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control (MOI 0); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs MOI 40

延缓胞内 *D*-荧光素钾的消除 ( $P < 0.05$ , 图 3A)。不同浓度薏苡仁脂处理细胞 48 h 后, 与对照组相比, 10 和  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  薏苡仁脂组均能明显延缓胞内 *D*-荧光素钾的消除 ( $P < 0.01$ ),  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  薏苡仁脂组能延缓胞内 *D*-荧光素钾的消除 ( $P < 0.05$ , 图 3B)。不同浓度的薏苡仁脂处理 24 及 48 h 后, 消除速率常数  $K_{\text{luc}}$  随薏苡仁脂浓度升高表现出先降低后升高的趋势, 但均低于对照组, 表明薏苡仁脂处理细胞后, 荧光素从细胞内流出减慢; 药时曲线下面积  $\text{AUC}_{\text{luc}}$  随薏苡仁脂浓度升高表现出先增大后减小, 但均高于对照组, 可见薏苡仁脂促进了细胞对 *D*-荧光素钾的摄取, 使胞内累积量增加 (表 1)。

## 5 耐药基因及蛋白的表达

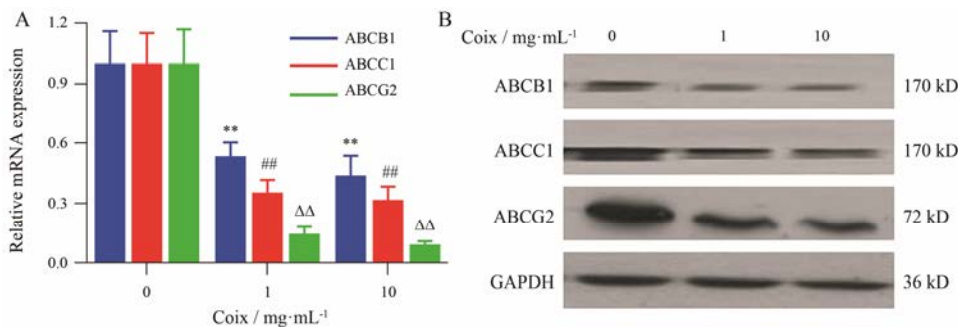
q-PCR 检测结果表明, 与对照组相比, 药物组可明显下调 ABCG2、ABCC1 和 ABCB1 基因的表达 (图 4A)。



**Figure 3** Relative bioluminescence imaging (BLI<sub>rel</sub>) signal photon-time curve of MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> after treatment with different concentration of Coix. A: Treatment with Coix for 24 h; B: Treatment with Coix for 48 h.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control (Coix  $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

**Table 1** Fluorescence excretion pharmacokinetic parameters.  $n=6, \bar{x} \pm s. *P<0.05, **P<0.01$  vs  $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  Coix

Concentration of Coix/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$K_{\text{luc}} (\times 10^{-3})$		$\text{AUC}_{\text{luc}} (\times 10^5)$		$\text{MRT}_{\text{luc}}$	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	$5.60 \pm 0.31$	$4.70 \pm 0.19$	$3\ 775 \pm 71$	$4\ 281 \pm 313$	$39.37 \pm 0.11$	$42.41 \pm 0.08$
1	$5.20 \pm 0.42$	$4.10 \pm 0.77$	$4\ 064 \pm 313$	$4\ 455 \pm 221$	$39.56 \pm 1.76$	$42.84 \pm 0.06$
5	$4.90 \pm 0.19$	$3.80 \pm 0.23^*$	$4\ 112 \pm 168^*$	$4\ 637 \pm 229^*$	$39.88 \pm 0.15$	$42.98 \pm 0.04$
10	$4.40 \pm 0.18^{**}$	$3.30 \pm 0.32^{**}$	$4\ 433 \pm 187^{**}$	$5\ 255 \pm 223^{**}$	$40.18 \pm 0.05$	$42.49 \pm 0.06$
20	$4.70 \pm 0.13^*$	$3.70 \pm 0.28^*$	$4\ 108 \pm 119^*$	$4\ 913 \pm 322^*$	$40.12 \pm 0.09$	$42.57 \pm 0.18$

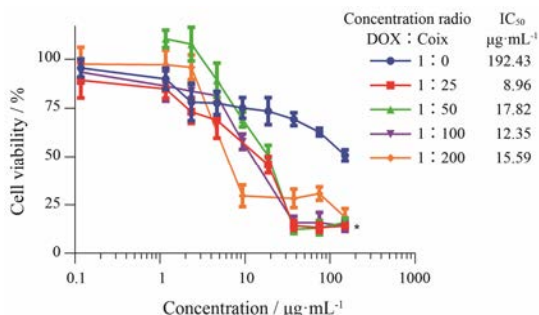


**Figure 4** Expression of drug-resistant genes and proteins (P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1 and breast cancer resistance protein) in MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> cells after treatment with Coix. A: Drug-resistant genes expression; B: Drug-resistant proteins expression.  $n=3, \bar{x} \pm s. **P<0.01$  vs control (ABCB1);  $##P<0.01$  vs control (ABCC1);  $\Delta\Delta P<0.01$  vs control (ABCG2)

Western blot 检测结果表明, 与对照组相比, 药物组可明显下调 ABCG2 蛋白表达, 同时下调 ABCC1 和 ABCB1 蛋白的表达 (图 4B)。提示薏苡仁脂逆转肿瘤细胞耐药性与其影响肿瘤细胞耐药蛋白的活性相关, 各耐药蛋白活性减弱, 与荧光素流出减少的结论相一致。

### 6 MTT 法检测薏苡仁脂联合 DOX 药效

不同药物处理 MCF-7/DOX 细胞 48 h 后, 联合用药组 DOX 的  $\text{IC}_{50}$  小于单用 DOX 组 ( $P<0.05$ ), 说明薏苡仁脂可增强 DOX 抑制耐药乳腺癌细胞增殖的作用, 根据 DOX 的  $\text{IC}_{50}$  值, 其较佳联合比例为 DOX : 薏苡仁脂 = 1 : 25 (图 5)。



**Figure 5** Cell proliferation of MCF-7/DOX for 48 h after treatment with different drugs.  $n=6, \bar{x} \pm s. *P<0.05$  vs control (1 : 0)

### 讨论

BLI 具有操作简便, 结果直观, 灵敏度高的特点。

这种方法在体内同样可以得到运用。作者应用生物发光成像探讨 ABC 蛋白对 *D*-荧光素钾外排影响, 说明 *D*-荧光素钾作为标志物检测薏苡仁脂对肿瘤细胞耐药相关蛋白活性的影响。荧光素酶的发光不需要激发光, 只需要底物荧光素。荧光素在 ATP 和氧气的存在下, 氧化成氧化荧光素的同时产生光子, 生成一个信号。Rudin 等<sup>[9]</sup>研究发现荧光素酶的发光强度同标记的细胞的数量呈正比, 当酶浓度有一定范围和底物达到饱和时, 可以认为只与荧光素酶量直接相关, 即发光强度与标记细胞的数目呈线性相关, 而在荧光素钾浓度不饱和时, 生物发光信号光子量与荧光素钾浓度呈正相关。检测的 BLI 值是在荧光素钾浓度变化的线性范围内, 所以 BLI 值可以代表胞内荧光素钾的浓度。只有在荧光素钾浓度不饱和时, 生物发光信号光子量与荧光素钾的外排才会呈正相关, 本文中线性范围为  $0 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 当测定荧光素钾的外排时, 需要采用不饱和浓度即线性范围内的浓度。而当计算到底有多少被转染的细胞时, 需要加入过饱和的荧光素钾, 这样才能确保所有被转染的细胞都被测定到, 即当底物浓度达到过饱和浓度时, 发光值只与细胞数量有关, 而与加入的 *D*-荧光素钾浓度无关。

有研究表明 *D*-荧光素是萤火虫荧光素酶的内源性底物, 是 ABCG2 转运蛋白的专一性基质。抑制 ABCG2 转运蛋白活性就能够阻止 *D*-荧光素的流出, 增加胞内 *D*-荧光素浓度从而增强生物发光信号; *D*-荧

光素在过表达 ABCG2 的肿瘤细胞亚系中累积显著低于亲代肿瘤细胞<sup>[20, 21]</sup>。本研究中发现薏苡仁脂能明显减少耐药乳腺癌细胞对 D-荧光素钾的外排, 增加胞内累积量, 说明薏苡仁脂能够降低耐药蛋白活性。

国内外研究证明薏苡仁脂可以抑制肿瘤多药耐药基因和蛋白的表达, 与化疗药物联合使用可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 逆转多药耐药性<sup>[22-24]</sup>。q-PCR 和 Western blot 结果显示, 薏苡仁脂处理组 MCF-7/DOX<sup>Fluc</sup> 细胞中 ABCG2、ABCC1 和 ABCB1 的基因水平得以下调, 蛋白量降低。因此, 薏苡仁脂逆转耐药乳腺癌细胞对多柔比星 MDR 的作用, 可能是通过抑制 ABC 转运蛋白的外排功能和下调 ABC 转运蛋白在肿瘤细胞上的表达水平双重作用的结果。

## References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A, et al. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67: 7-30.
- [2] Dong AP, Han LH. Progress in measurement scale of quality of life for patients with breast cancer and its application [J]. Tumor (肿瘤), 2017, 37: 107-116.
- [3] Ji H, Wang BG. The research progress on breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [J]. Anti-tumor Pharm (肿瘤药学), 2013, 3: 326-330.
- [4] Grim J, Jandik P, Slánská I, et al. Low expression of NQO1 predicts pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients treated with TAC regimen [J]. Folia Biol, 2012, 58: 185-192.
- [5] Baguley BC. Multi-drug resistance in cancer [J]. Methods Mol Biol, 2010, 596: 1-14.
- [6] Tang T, Dong W, Zhang J, et al. Research progress on Chinese materia medica monomers reversing multidrug resistance of tumor cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 792-797, 846.
- [7] He LL, Gu KB. Mechanism of Rhizoma Pinelliae extracts against malignant tumor [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2017, 32: 685-687.
- [8] Li XP, Feng ZQ, Shi XP, et al. Experimental study of evodiamine on reversing multidrug resistance of K562/Adr cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2123-2129.
- [9] Li L, Dong Y, Wang L, et al. Preliminary study of the effects of  $\beta$ -elemene on breast cancer stem cells in cell line MCF-7/ADM [J]. Chin Clinic Oncol (临床肿瘤学杂志), 2013, 18: 683-687.
- [10] Huang QD, Zheng L, Chen D, et al. Bioavailability and pharmacokinetics of nanoparticles of Coix seed oil [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2016, 51: 40-45.
- [11] Yao DJ. Clinical efficacy and safety of Kanglaite combined with gemcitabine and cisplatin chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2015, 31: 1494-1496.
- [12] Liu MJ, Qu D, Chen Y, et al. Study on preparation of butyryl galactose ester-modified Coix component microemulsions and their anticancer activity *in vitro* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 2696-2702.
- [13] Lara FA, Pohl PC, Gandara AC, et al. ATP binding cassette transporter mediates both heme and pesticide detoxification in tick midgut cells [J]. PLoS One, 2015, 10: e0134779.
- [14] Huang R, Vider J, Serganova I, et al. ATP-binding cassette transporters modulate both coelenterazine- and D-luciferin-based bioluminescence imaging [J]. Mol Imaging, 2011, 10: 215-216.
- [15] Zhang Y, Bressler JP, Neal J, et al. ABCG2/ABCG2 expression modulates D-Luciferin based bioluminescence imaging [J]. Cancer Res, 2007, 67: 9389-9397.
- [16] Close DM, Hahn RE, Patterson SS, et al. Comparison of human optimized bacterial luciferase, firefly luciferase, and green fluorescent protein for continuous imaging of cell culture and animal models [J]. J Biomed Opt, 2011, 16: 047003.
- [17] Wang M, Cui HX, Sun C, et al. Effect of lupeol on migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 558-562.
- [18] Li N, Shan YY, Wu DZ, et al. Antimetastatic effects of cordycepin and its molecular mechanism in human hepatoma MHCC97H cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1117-1121.
- [19] Rudin D, Li L, Niu N, et al. Gemcitabine cytotoxicity: interaction of efflux and deamination [J]. J Drug Metab Toxicol, 2011, 2: 1-10.
- [20] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. Ca Cancer J Clin, 2009, 59: 225-249.
- [21] Long J, Zhang Y, Yu X, et al. Overcoming drug resistance in pancreatic cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15: 817-828.
- [22] Qu D, Wang L, Liu M, et al. Oral nanomedicine based on multicomponent microemulsions for drug-resistant breast cancer treatment [J]. Biomacromolecules, 2017, 18: 1268-1280.
- [23] Lv PT, Zhou K, Wang Y, et al. Effect of Kanglaite injection associated with Cisplatin in lung adenocarcinoma cells A549 [J]. Chin Tradit Patent Med (中成药), 2011, 33: 393-396.
- [24] Lv PT, Xiao J, Zhou K, et al. Mechanism research on the reversion of multidrug resistance in lung carcinoma cells A549 treated by Coix lacryma-Jobi injection [J]. Chin General Pract (中国全科医学), 2010, 13: 2956-2958.