博士导师新论

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.11.001

重楼对白血病CEM/VCR细胞多药耐药的逆转作用及机制研究

朱大诚,魏佳旭,徐笑明,刘燕,康林之,何家寰
(江西中医药大学,江西 南昌 330004)

摘要:目的 探究重楼对白血病CEM/VCR细胞多药耐药是否具有逆转作用及其逆转耐药性的机制。方法 不同浓度重楼作用CEM/VCR细胞72 h并计算死亡率,选择适宜的重楼逆转剂浓度;MTT比色实验计算低、中、高浓度(0.1、0.5、2.5 μg/mL)长春新碱(Vincristine,VCR)分别作用于重楼处理细胞(以下统称处理组)及未加重楼处理细胞(以下统称未处理组)24、48、72 h后的抑制率及其半数抑制浓度(IC_{50}),并计算两组间耐药的逆转倍数(Reversal index,RI);流式细胞术(Flow cytometry,FCM)检测VCR作用于两组细胞后的凋亡率;RT-qPCR、Western blot检测VCR作用于两组细胞后Bax、Bcl-2、Cyt-c、P-gp、MRP1的mRNA和蛋白表达水平。结果 重楼逆转剂浓度为0.008 μg/mL;VCR作用于处理组的抑制率明显大于未处理组($P<0.05$或$P<0.01$),处理组将VCR作用于细胞24、48、72 h的IC_{50}值由17.32、13.85、6.21 μg/mL降至15.37、2.25、0.62 μg/mL,其逆转倍数分别为1.13、6.16、10.02;流式结果显示,VCR组细胞凋亡率随着药物浓度增加逐渐增大,且相同条件下处理组细胞凋亡率大于未处理组;RT-qPCR、Western blot结果显示,同一时间不同浓度VCR作用下,两组细胞的加药组与对照组比较,均能下调Bcl-2、P-gp、MRP1和上调Bax、Cyt-c基因及蛋白表达($P<0.05$),且这种变化处理组更为显著。结论 重楼可以逆转CEM/VCR细胞的多药耐药性,其可能机制是:①通过下调P-gp、MRP1的表达,降低VCR外排,增加细胞内VCR浓度;②通过下调Bcl-2和上调Bax、Cyt-c的表达,诱导细胞凋亡。

关键词:重楼;CEM/VCR细胞;白血病;逆转;多药耐药
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)11-0001-09

Reversal Effect and Mechanism of Chonglou(Rhizoma Paridis) on Multidrug Resistance of Leukemia CEM/VCR Cells

ZHU Dacheng,WEI Jiaxu,XU Xiaoming,LIU Yan,KANG Linzhi,HE Jiahuan
(Jiangxi University of Chinese Medicine,Nanchang 330004,Jiangxi,China)

Abstract:*Objective* To explore whether Chonglou(Rhizoma paridis) has a reversal effect on multidrug resistance of leukemia CEM/VCR and its reversal mechanism. *Methods* CEM/VCR cells were treated with different concentrations of Chonglou(Rhizoma paridis) for 72 hours,and the mortality rate was calculated,and the appropriate concentration of Chonglou(Rhizoma paridis) reversal agent was selected. MTT colorimetric experiment was used to calculate the inhibitory rate and half inhibitory concentration(IC_{50}) of low,medium and high concentrations(0.1,0.5 and 2.5 μg/mL) of vincristine(VCR) acting on Chonglou(Rhizoma paridis) treated cells(hereinafter referred to as the treated group) and unweighted Chonglou(Rhizoma paridis) treated cells(hereinafter referred to as the untreated group) for 24,48 and 72 hours respectively,and to calculate the reversal index(RI) and reversal multiple(IC_{50}) between the two groups. Flow cytometry(FCM) was used to detect the apoptosis rate after VCR was applied to the two groups of cells. RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of Bax,Bcl-2,Cyt-c,P-gp and MRP1 after VCR acted on the two groups of cells. *Results* The concentration of Chonglou(Rhizoma paridis) reversal agent was 0.008 μg/mL. The inhibition rate of VCR in the treatment group was significantly higher than that in the untreated group($P<0.05$ or $P<0.01$). The IC_{50} value of VCR in the treatment group after 24,48 and 72 hours was reduced from 17.32,13.85 and 6.21 μg/mL to 15.37,2.25 and 0.62 μg/mL,and the reversal multiples were 1.12 respectively. The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of VCR group increased gradually with the increase of drug concentration,and the apoptosis rate of treated group was higher than that of untreated group under the same conditions. The results of RT-qPCR and Western blot showed that the expressions of Bcl-2,P-gp,MRP1-1 and Bax,Cyt-c genes and proteins were down-regulated and up-regulated by VCR with different concentrations at the same time compared with those of the control group($P<0.05$),and this change was more significant in the treatment group. *Conclusion* Chonglou(Rhizoma paridis) can reverse the multidrug resistance of CEM/VCR cells,which may be related to down-regulating the expressions of P-gp and MRP1,reducing the efflux of chemotherapeutic drugs and increasing the intracellular concentration of VCR,down-regulating the expression of Bcl-2 and up-regulating the expressions of Bax and Cyt-c,inducing cell apoptosis.

Keywords:Chonglou(Rhizoma paridis);CEM/VCR cells;leukemia;reverse;multidrug resistance

基金项目:国家自然科学基金项目(81260580);江西省大学生创新创业训练计划项目(S202010412043);江西中医药大学中西医结合一级学科(江西省双一流学科)项目(zxyylxk20220103)
作者简介:朱大诚(1964-),男,江西永新人,教授,博士研究生导师,学士,研究方向:中医药抗肿瘤。

人急性 T 淋巴细胞白血病(Acute T-lymphocytic leukemia,T-ALL)的治疗主要以化疗为主[1],但目前白血病化疗失败及复发的主要原因是多药耐药(Multidrug resistance,MDR)所导致的[2]。MDR 的发生存在多种机制,主要包括:外排泵异常,如 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)及多药耐药相关蛋白(Recombinant multidrug resistance associated protein 1,MRP1)过表达,导致细胞内的有效药物泵出细胞增多,细胞内有效药物浓度降低;控制细胞凋亡相关基因,如 Bcl-2、Bax、Cyt-c 的异常表达,导致凋亡进程受阻而产生耐药等。

重楼(Rhizoma Paridis)为百合科重楼属植物,入药成分是干燥的根茎,有小毒,功效为清热解毒、凉肝定惊、消肿止痛等[3-4],研究表明,重楼及其有效成分对抗肿瘤的作用不但范围广而且毒性较小,在体外实验中对多种肿瘤细胞具有细胞毒性作用[5-6],如卵巢癌[7]、非小细胞癌[8]、结直肠癌[9]、胃癌[10]等,其可能是通过诱导肿瘤细胞的凋亡、逆转肿瘤细胞多药耐药发挥作用。在临床上常将重楼应用于白血病的相关治疗[11],但目前重楼在抗白血病多药耐药方面的研究相对较少,因此本实验研究重楼是否可以逆转 CEM/VCR 细胞的多药耐药,并通过体外分子生物学技术等方法研究其机制,为重楼在临床治疗白血病基础上提供理论根据。

1 材料与仪器

1.1 细胞株

白血病 CEM/VCR 多药耐药细胞株由本研究室建立[12],并用 0.01 μg/mL VCR 保持细胞耐药性,实验前 1 周脱药。

1.2 药品与主要试剂

重楼购自安徽省惠丰国药(产地:云南,批号:190601);VCR 由南京尚书生物有限公司生产(产地:深圳,批号:20190121);含双抗的 RPMI 1640 培养基由凯基生物科技公司提供;新生牛血清由 Dobio 生物有限公司提供;瑞氏-Giemsa 染色液由安徽 Leagene 公司提供;Bcl-2、Bax、Cyt-c、P-gp、MRP1、GAPDH 引物由深圳 BGI 公司提供;Bcl-2、Bax、Cyt-c、P-gp、MRP1 抗体由武汉 ABclonal Technology 公司提供;Anti-beta Actin antinbody 由美国 abcam 公司提供;化学发光 ECL 检测试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒由康为世纪生物科技公司提供。

1.3 仪器与设备

CO_2 培养箱(美国 Thermo Forma);酶标仪(Thermo Fisher);流式细胞分选系统(贝克曼库尔特 MoFloXDP);垂直电泳槽、转移电泳槽、PowerPac™ 通用 Bio-Rad 电泳仪(上海伯乐生命医学有限公司);凝胶成像系统(美国 Protein Simple);实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher,QuantStudio 5)。

2 方法

2.1 重楼提取物制备

精密称取重楼 50 g,干燥粉碎,350 mL 三蒸水混匀浸泡 24 h,80 ℃煎煮 3 h,多层纱布粗过滤并收集滤液,滤渣中加入 250 mL 三蒸水,80 ℃复煎 2 次,每次 2 h,定性滤纸过滤,合并滤液,80 ℃旋转蒸发浓缩并干燥,得到重楼水提物粉末。称取 0.5 g 重楼水提物粉末,加入 5 mL 三蒸水,溶解后滤过除菌,配制为 100 mg/mL 母液,于 4 ℃冰箱密封保存。

2.2 VCR 溶液配置

称取 VCR 1 mg,加入三蒸水 4 mL,溶解后滤过除菌,配制成浓度为 0.25 mg/mL 母液,加入一定比例灭菌三蒸水配制成低、中、高浓度的 VCR 溶液(2、10、50 μg/mL),于 4 ℃冰箱密封保存。

2.3 重楼逆转剂浓度确定

取对数生长期的 CEM/VCR 细胞悬液,调细胞浓度为 1×10^5/mL,接种于 96 孔培养板,分 3 个实验组,每组 3 个复孔,每孔 95 μL 悬液,培养 24 h 后,每组加入不同浓度重楼溶液 5 μL,使终浓度分别为 0.003、0.008、0.01 μg/mL,继续培养 72 h 后,分别进行台盼蓝染色计数,计算得出以上 3 个浓度重楼作用下细胞死亡率分别为 1.64%、4.50%、5.43%,由此选择死亡率低于 5% 的最高浓度 0.008 μg/mL 作为重楼逆转剂浓度。根据以上结果,取对数生长的 CEM/VCR 细胞分为两组,一组用 0.008 μg/mL 重楼干预培养 1 周,中途换液 1 次,即为处理组;另一组在其他条件相同情况下,用灭菌三蒸水干预,即为未处理组。

2.4 MTT 比色实验

将处理组和未处理组细胞的浓度调为 1×10^5/mL,处理组和未处理组各分 5 组,分别为空白组、对照组、药物组(0.1、0.5、2.5 μg/mL VCR),每组 5 个平行孔,除空白组(加 190 μL RPMI 1640)外,其余各组用移液枪加对应 190 μL 细胞悬液于 96 孔板。培养 24 h 后,空白组每孔加 10 μL RPMI 1640,对照组加 10 μL 三蒸水,给药组依次加入 10 μL 不同浓度 VCR,使终浓度分别为 0.1、0.5、2.5 μg/mL。继续培养 24、48、72 h 后,除空白组外,每孔加入 20 μL MTT,培养箱避光 4 h 后离心,吸去上清,每孔加 150 μL 二甲基亚砜,使用酶标仪在 490 nm 波长处检测各孔 OD 值(吸光度值)。计算抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。采用 GraphPad Prism 8.3 软件分析,计算 24、48、72 h 的 IC_{50},RI=未处理组 IC_{50}/处理组 IC_{50}。

2.5 流式细胞术

因为细胞凋亡主要发生在细胞死亡进程的早期,所以后续流式细胞术、RT-qPCR、Western blot 实验选择 24 h 和 48 h 两个时间段进行检测。将两组细胞的密度调为 1×10^5/mL,处理组和未处理组各分 4 组,分别为对照组、药物组(0.1、0.5、2.5 μg/mL VCR),每组用移液枪加对应 950 μL 细胞悬于 24 孔板,培养 24 h 后,对照组加 50 μL 三蒸水,给药组加入不同浓度 VCR 50 μL,使终浓度为 0.1、0.5、2.5 μg/mL,继续培养 24、48 h 后离心收集细胞,PBS(预冷)洗涤,用 500 μL 1×Binding buffer 重悬各组细胞。按照之前调整好的细胞参数,每组加 10 μL PI 和 5 μL Annexin V-FITC 轻柔混匀,25 ℃避光孵育 5 min。流式细胞分选系统检测药物作用于细胞 24、48 h 后的凋亡率。

2.6 RT-qPCR 实验

引物由北京六合生物公司设计与合成,见表 1。

将两组细胞的密度调为 1×10^5/mL,用移液枪加对应 9.5 mL 细胞悬液于 6 孔板,培养 24 h 后,对照组加 500 μL 三蒸水,给药组加入不同浓度 VCR 各 500 μL,使终浓度为 0.1、0.5、2.5 μg/mL,继续培养 24、48 h 后离心收集细胞,按试剂盒操作步骤提取各组 RNA;根据 cDNA 反应体系 42 ℃、15 min,85 ℃、5 min,温度降至 4 ℃,逆转录得 cDNA;按照说明书的扩增条件在 PCR 仪上完成扩增,使用 LightCycler® 96 软件采集扩增数据,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行定量分析。

2.7 Western blot 实验

细胞培养条件和实验分组同实验 2.6,加药培养 24、48 h 后,按试剂盒操作步骤提取各组蛋白后进行蛋白定量分析。制胶后准备好各组蛋白在仪器上电泳,在 80 V 分离蛋白,恒定电

流 200 mA 转膜 1 ~ 2 h,1 × TBST 洗膜,每次 10 min,重复 3 次;用脱脂奶粉(5%)封闭 2 h,1 × TBST 洗膜 10 min,重复 3 次;将已经配好的一抗(1∶800)和内参(1∶2000)加到相对应孵育盒内的 PVDF 膜上,摇床(4 ℃)过夜,结束后洗膜 10 min,重复 3 次。转移至二抗(1∶2000)溶液中孵育 1 h,孵育后 1 × TBST 洗膜 10 min,重复 3 次。对 PVDF 膜进行曝光显影,采集并使用 Image J 读取条带的灰度值,β - actin 作为内参,目的蛋白的半定量表达 = 目的蛋白灰度值/β - actin 灰度值。

表 1 基因引物设计序列

基因名称	基因序列
GAPDH	Forward:5′ - ACCCAGAAGACTGTGGATGG - 3′
	Reverse:5′ - TCAGCTCAGGGATGACCTTG - 3′
P - gp	Forward:5′ - GGAGCCTACTTGGTGGCACATAA - 3′
	Reverse:5′ - TGGCATAGTCAGGAGCAAATGAAC - 3′
MRP1	Forward:5′ - CATTCAGCTCGTCTTGTCCTG - 3′
	Reverse:5′ - GGATTAGGGTCGTGGATGGTT - 3′
Bax	Forward:5′ - CATGGGCTGGACATTGGACT - 3′
	Reverse:5′ - AAAGTAGGAGAGGAGGCCGT - 3′
Cyt - C	Forward:5′ - CTTTGGGCGGAAGACAGGTC - 3′
	Reverse:5′ - TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG - 3′
Bcl - 2	Forward:5′ - CGCCAACATTCTCTCCACAG - 3′
	Reverse:5′ - CTGGGCCAGAGCTACATCTT - 3′

2.8 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件统计分析,数据采用单因素方差进行分析,采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义,$P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 VCR 对两组细胞生长的影响

MTT 实验结果显示,低、中、高浓度 VCR 作用于两组细胞 24、48、72 h 的 OD 值见表 2。随着 VCR 浓度的增加和时间的延长,OD 值逐渐降低,抑制率逐渐增大。当药物浓度为 0.5 μg/mL,作用 48、72 h 后,两组细胞与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$),药物浓度达到 2.5 μg/mL 时,抑制作用更为明显。72 h 处理组及未处理组抑制率分别高达 67.25%、52.37%。相同条件下,处理组细胞抑制率均大于未处理组细胞抑制率。通过 GraphPad Prism 8.3 软件分析计算出未处理组 24、48、72 h IC_{50} 值分别为 17.32、13.85、6.21 μg/mL;处理组分别为 15.37、2.25、0.62 μg/mL;逆转倍数分别为 1.13、6.16、10.02 倍。

3.2 流式细胞术检测细胞凋亡率

低、中、高浓度 VCR 作用于两组细胞后,结果显示:24 h 未处理组与处理组相比,对照组凋亡率平均值分别为 1.86%、2.02%,VCR 低、中、高剂量组凋亡率平均值分别 3.98%、4.91%、10.51%;6.32%、15.06%、25.33%,见插页Ⅰ图 1;而随着药物作用时间延长至 48 h,两组细胞的凋亡率也随之不断增大,未处理组与处理组相比,对照组凋亡率平均值分别为 2.59%、2.93%,VCR 低、中、高剂量组凋亡率平均值分别 6.8%、11.49%、25.55%;21.11%、30.65%、34.74%,见插页Ⅱ图 2。相同条件下处理组凋亡率明显大于未处理组,且两组与各自对照组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 3。

3.3 Bax、Bcl - 2、Cyt - c、P - gp、MRP1 基因转录情况

3.3.1 Bax、Cyt - c 基因转录情况 低、中、高浓度 VCR 作用于两组细胞 24 h 后,Bax、Cyt - c 基因转录水平随着 VCR 浓度增大逐渐升高,呈上升趋势,且在 0.5、2.5 μg/mL 浓度时,差异逐渐明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 4。当给药时间延长至 48 h,Bax、Cyt - c 基因转录水平上调更为明显,且差异呈现更加显著的统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同等条件下,处理组较未处理组 Bax、Cyt - c 基因转录水平更高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 5。

3.3.2 Bcl - 2、P - gp、MRP1 基因转录情况 低、中、高 VCR 作用于两组细胞 24 h 后,Bcl - 2、P - gp、MRP1 基因转录水平与对照组相比有所降低,呈下降趋势,且在 0.5、2.5 μg/mL 浓度时,与对照组相比,差异逐渐明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 6;当给药时间延长至 48 h,Bcl - 2、P - gp、MRP1 基因转录水平下调更为明显,且呈现更加显著的统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 7。同等条件下,处理组较未处理组 Bcl - 2、P - gp、MRP1 基因转录水平更低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.4 Bax、Bcl - 2、Cyt - c、P - gp、MRP1 蛋白表达情况

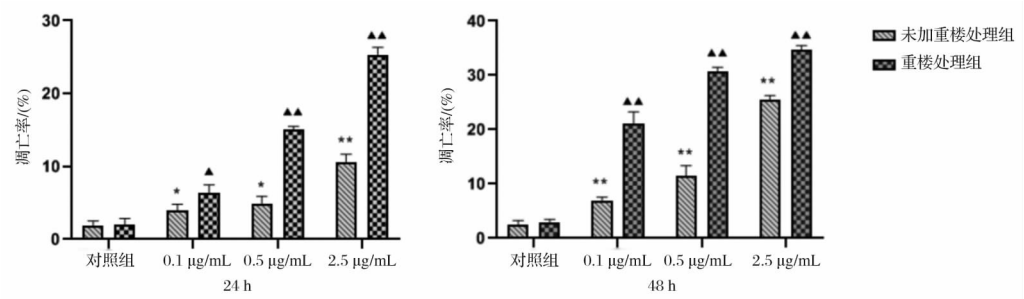
3.4.1 Bax、Cyt - c 蛋白表达情况 Bax、Cyt - c 蛋白表达情况见图 8、图 9,低、中、高浓度 VCR 作用于两组细胞 24 h 后,Bax、Cyt - c 蛋白的表达随 VCR 浓度增加逐渐增强,且在 0.5、2.5 μg/mL 时差异逐渐明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 10;当给药时间到达 48 h,两组细胞 Bax、Cyt - c 蛋白表达增强更为明显,在给药浓度到达 2.5 μg/mL 时,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 11,同等条件下,Cyt - c 蛋白在低、中、高浓度、Bax 蛋白在高浓度时,处理组较未加处理组表达更强,且差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.4.2 Bcl - 2、P - gp、MRP1 蛋白的表达情况 Bcl - 2、P - gp、MRP1蛋白表达情况见图12、图13,低、中、高浓度VCR作

表 2 VCR 对细胞生长的影响

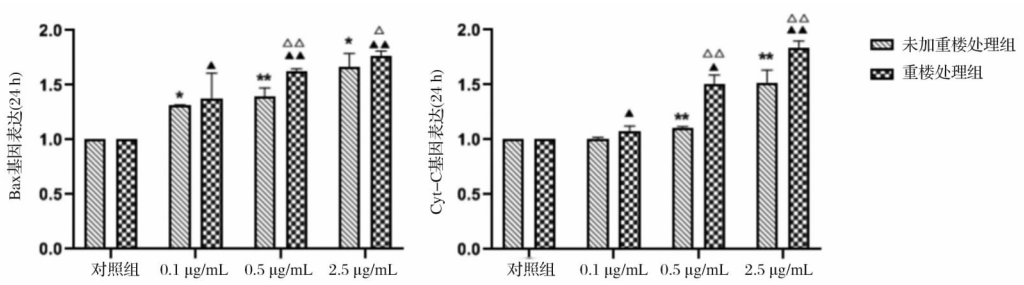
组别	n	OD 值($\bar{x} \pm s$)			抑制率/(%)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
空白组	5	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	-	-	-
对照组	5	(0.95 ± 0.01)	(1.42 ± 0.09)	(1.67 ± 0.08)	-	-	-
		1.02 ± 0.09	1.49 ± 0.12	1.74 ± 0.18	-	-	-
VCR0.1 μg/mL	5	(0.91 ± 0.08) *	(1.28 ± 0.03) *	(1.19 ± 0.04) * *	(4.10)	(10.40)	(28.94)
		0.91 ± 0.03 ▲△	1.17 ± 0.21 ▲▲△△	1.14 ± 0.15 ▲▲△	10.15	21.35	34.28
VCR0.5 μg/mL	5	(0.85 ± 0.05) * *	(1.16 ± 0.04) * *	(1.00 ± 0.07) * *	(10.89)	(18.66)	(40.23)
		0.81 ± 0.02 ▲△△	0.98 ± 0.10 ▲▲△△	0.96 ± 0.10 ▲▲△	19.94	34.36	44.84
VCR2.5 μg/mL	5	(0.80 ± 0.06) * *	(0.99 ± 0.19) * *	(0.80 ± 0.03) * *	(15.89)	(30.42)	(52.37)
		0.75 ± 0.12 ▲▲△	0.88 ± 0.03 ▲▲△	0.57 ± 0.04 ▲▲△△	25.98	40.87	67.25

注:括号为未处理组,无括号为处理组。 * ▲与同一时间对照组比较,$P < 0.05$; * * ▲▲与同一时间对照组比较,$P < 0.01$;△同一浓度处理组与未处理组比较,$P < 0.05$;△△同一浓度处理组与未处理组比较,$P < 0.01$。



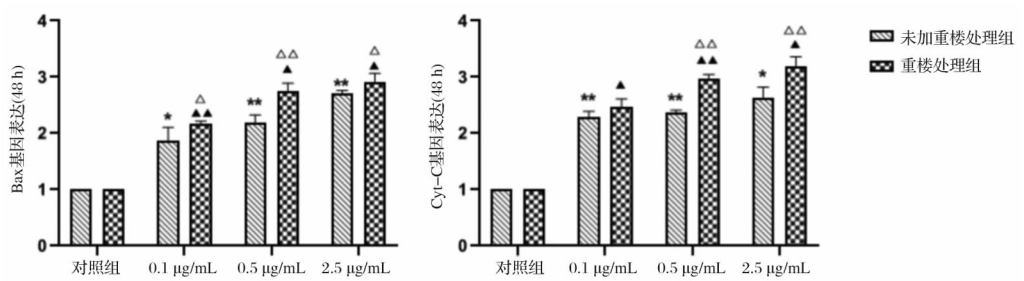
注：＊▲与同一时间对照组比较，$P<0.05$；＊＊▲▲与同一时间对照组比较，$P<0.01$。

图 3　流式细胞术检测 VCR 作用 CEM/VCR 细胞 24 h、48 h 凋亡率



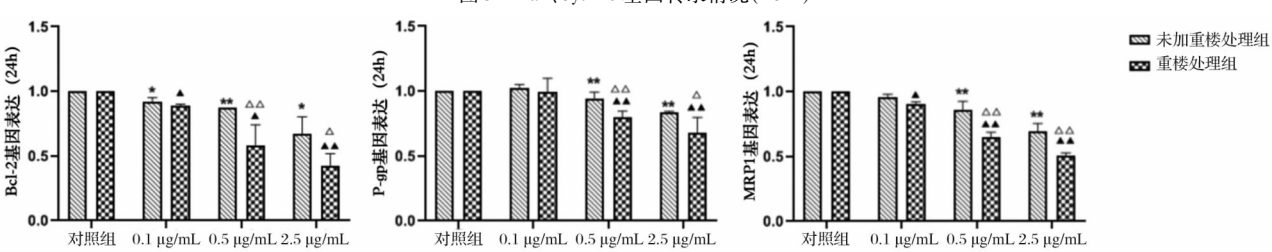
注：不同浓度 VCR 作用下，＊▲与同一时间对照组比较，$P<0.05$；＊＊▲▲与同一时间对照组比较，$P<0.01$；△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.05$；△△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.01$。

图 4　Bax、Cyt－c 基因转录情况(24 h)



注：不同浓度 VCR 作用下，＊▲与同一时间对照组比较，$P<0.05$；＊＊▲▲与同一时间对照组比较，$P<0.01$；△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.05$；△△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.01$。

图 5　Bax、Cyt－c 基因转录情况(48 h)



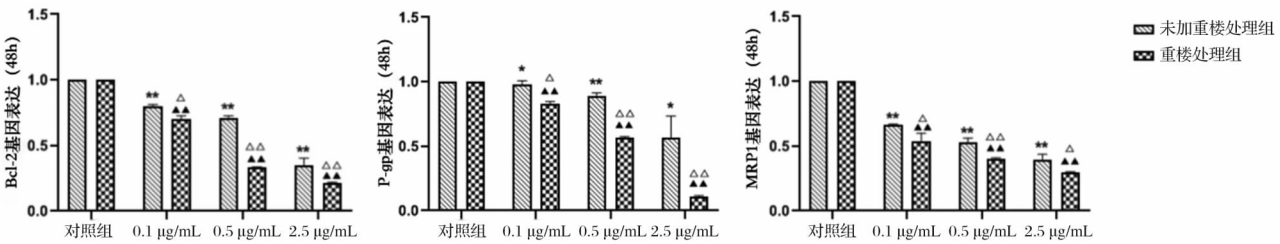
注：不同浓度 VCR 作用下，＊▲与同一时间对照组比较，$P<0.05$；＊＊▲▲与同一时间对照组比较，$P<0.01$；△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.05$；△△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.01$。

图 6　Bcl－2、P－gp、MRP1 基因转录情况(24 h)

用于两组细胞 24 h 后，Bcl－2、P－gp、MRP1 蛋白的表达随 VCR 浓度增加逐渐减弱，呈下降趋势，处理组在 0.5、2.5 μg/mL 时差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），而未处理组在 2.5 μg/mL 时差异逐渐明显（$P<0.05$）（图 14）；当给药时间到达 48 h，未处理组细胞在 0.5、2.5 μg/mL 时，Bcl－2、P－gp、MRP1 蛋白表达减弱更为显著（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），而处理组在低、中、高浓度下，Bcl－2、P－gp、MRP1 蛋白表达均明显减弱（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）见图 15。同等条件下，Bcl－2、P－gp、MRP1 蛋白在 0.5、2.5 μg/mL 浓度时，处理组较未处理组表达更弱，且差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。

4　讨论

白血病细胞产生 MDR 是指在治疗白血病过程当中，抗肿瘤药物长时间作用于白血病细胞后，药物对细胞产生的疗效降低，甚至细胞对那些未接触的其他抗肿瘤药物也会产生耐药[13－14]。白血病多药耐药的产生具有异常复杂的分子作用机制，是由多种因素共同参与所致，包括 P－gp、MRP1 等错误表达介导的药物外排；细胞凋亡水平的异常即 Bcl－2 等凋亡相关基因的过表达等[15]。



注：不同浓度 VCR 作用下，＊▲与同一时间对照组比较，$P<0.05$；＊＊▲▲与同一时间对照组比较，$P<0.01$；△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.05$；△△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.01$。

图 7 Bcl－2、P－gp、MRP1 基因转录情况（48 h）

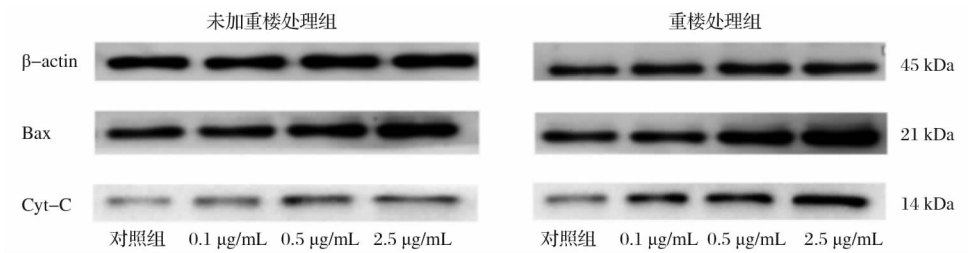


图 8 β－actin、Bax、Cyt－c 蛋白条带图（24 h）

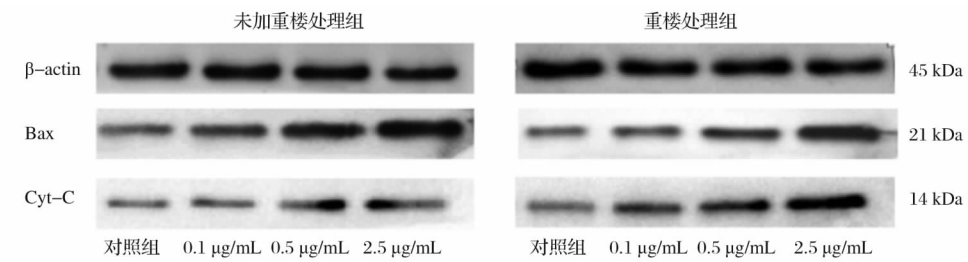
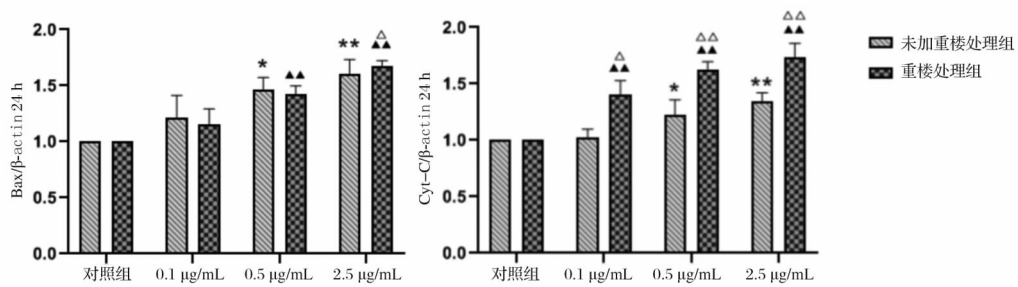
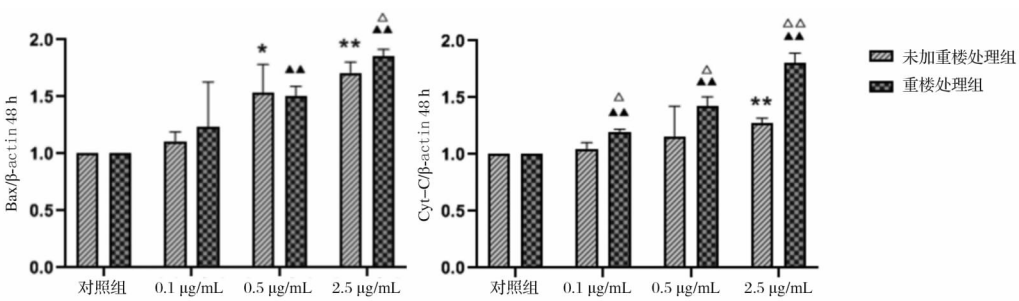


图 9 β－actin、Bax、Cyt－c 蛋白条带图（48 h）



注：不同浓度 VCR 作用下，＊▲与同一时间对照组比较，$P<0.05$；＊＊▲▲与同一时间对照组比较，$P<0.01$；△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.05$；△△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.01$。

图 10 Bax、Cyt－c 蛋白表达柱状图（24 h）



注：不同浓度 VCR 作用下，＊▲与同一时间对照组比较，$P<0.05$；＊＊▲▲与同一时间对照组比较，$P<0.01$；△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.05$；△△同一浓度处理组与未处理组比较，$P<0.01$。

图 11 Bax、Cyt－c 蛋白表达柱状图（48 h）

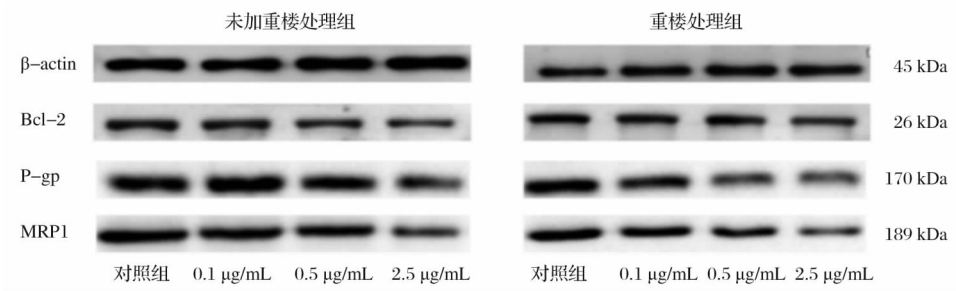


图 12 β-actin、Bcl-2、P-gp、MRP1 蛋白条带图(24 h)

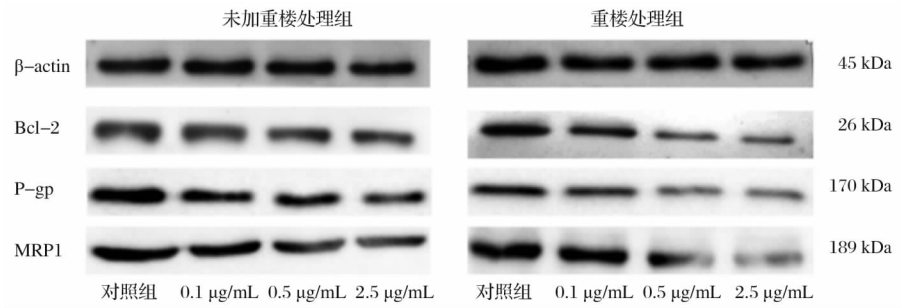
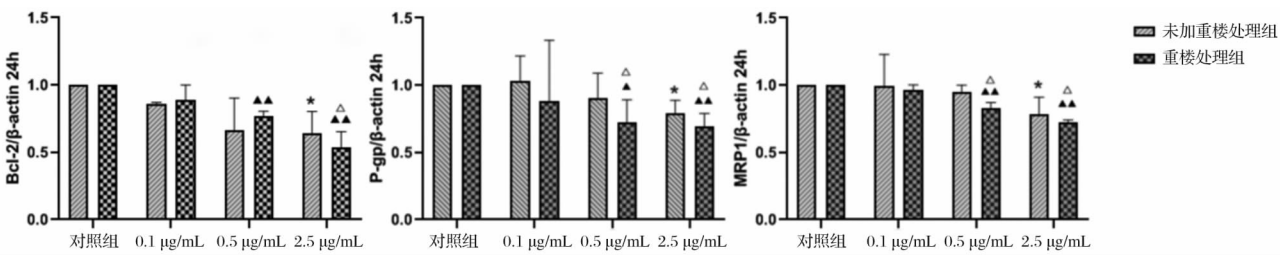
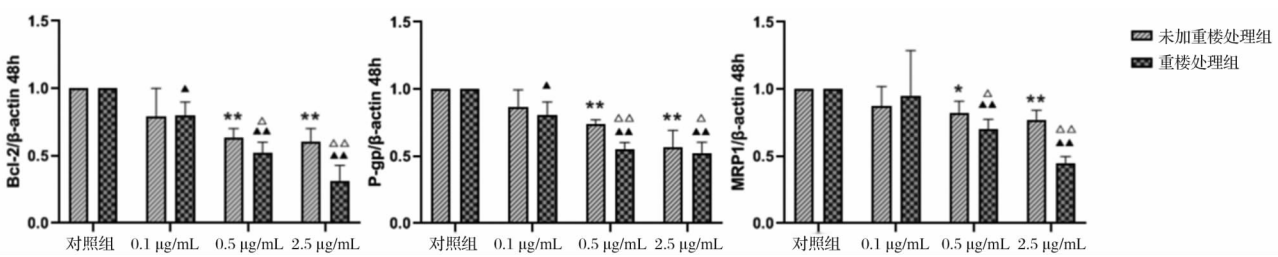


图 13 β-actin、Bcl-2、P-gp、MRP1 蛋白条带图(48 h)



注:不同浓度 VCR 作用下,*▲与同一时间对照组比较,$P<0.05$;**▲与同一时间对照组比较,$P<0.01$;△同一浓度处理组与未处理组比较,$P<0.05$;△△同一浓度处理组与未处理组比较,$P<0.01$。

图 14 Bcl-2、P-gp、MRP1 蛋白表达柱状图(24 h)



注:不同浓度 VCR 作用下,*▲与同一时间对照组比较,$P<0.05$;**▲▲与同一时间对照组比较,$P<0.01$;△同一浓度处理组与未处理组比较,$P<0.05$;△△同一浓度处理组与未处理组比较,$P<0.01$。

图 15 Bcl-2、P-gp、MRP1 蛋白表达柱状图(48 h)

P-gp(多药耐药相关蛋白 MDR1 编码)在药物外排机制中发挥药物外输泵的作用,它是 ABC 转运蛋白超家族成员。P-gp 表达过强,细胞膜对药物外排能力就会增强,细胞内抗肿瘤药物排出增多,胞内药物浓度降低,从而引起 MDR。P-gp 和 MRP1 既为膜转运蛋白,又是能与 ATP 结合的盒式蛋白的糖蛋白,高表达的 MRP1 与 P-gp 发挥相同作用诱发 MDR[16]。目前研究发现,多种中药单体、中药复方等可以通过下调 P-gp、MRP1 表达,进一步逆转白血病多药耐药。王东萍等[17]发现秦巴硒菇提取物联合多柔比星可以上调 BAD、下调 P-gp、BCL-XL、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 等蛋白表达,从而促进 K562/ADR 细胞凋亡、减少细胞内化疗药物外排而发挥作用。LOPES-RODRIGUES V 等[18]研究表明,一种新的姜黄素衍生物可以通过抑制 P-gp 的表达,将细胞周期阻滞于 G2/M 期,并诱导 MDR 慢性髓性白血病细胞系的凋亡。LIN KN 等[19]研究表明,葡萄籽原花青素提取物可以在 HL-60/ADR 细胞中诱导更高的细胞内 ADR 水平,它还可以抑制 Akt 磷酸化,导致 MRP1、MDR1 和 LRP 的下调,并诱导细胞凋亡。

细胞凋亡水平的异常同样也是肿瘤细胞产生 MDR 的主要机制之一,Bax、Cyt-c、Caspase 家族等促凋亡因子的低表达,Bcl-2、IAP 家族、NF-κB 等抗凋亡因子高表达等,都可能引起白血病细胞的 MDR 发生[20]。在细胞对抗凋亡刺激时,Bcl-2 发挥着抑制剂的作用。朱大诚等[21]研究发现,中药蟾酥能够下调 Bcl-2、上调 Bax 的表达,诱导细胞凋亡;下调 P-gp 的表达,减少药物外泵,从而逆转 CEM/VCR 细胞的耐药性。

MISRA R 等[22]联合黄色素和阿霉素(Doxorubicin,DOX)并做成小微米粒,作用于 K562 细胞,发现在姜黄素的作用下,DOX 在胞核中停留的时间延长,Bcl-2 表达减弱,对 K562 细胞的毒性增强,逆转其耐药并协同促进细胞凋亡。林婷等[23]将复方君子汤和 DOX 联合作用于 K562/VCR 细胞,可下调 Bcl-2、上调 Bax 蛋白的表达达到逆转 K562/VCR 细胞的多药耐药。

重楼具有良好的抗白血病药理作用,当中的多种化学成分已被鉴定,例如甾体皂苷类、植物甾醇类、胆甾烷醇类、黄酮类、三萜类、多糖等等[24],活性物质经分析主要是甾体皂苷,其具有治疗肿瘤、抗菌消炎、免疫调节等作用[25]。现有研究发现,重楼皂苷Ⅵ可通过 p38 MAPK 通路,促进 cleaved Caspase-3 与 Bax 蛋白、抑制 Bcl-2 蛋白表达,诱导 THP-1 细胞凋亡[26];陆芹等[27]发现,长柱重楼皂苷作用于白血病 HL-60、K562、KG-1 和 HT-93 细胞,通过活化内源性凋亡通路,促进 Bax、P53、P27 蛋白、抑制 Bcl-2 蛋白表达,有效抑制白血病细胞增殖。

本实验将低、中、高浓度 VCR 同时作用于处理组和未处理组细胞。MTT 实验结果显示,相同条件下,处理组抑制率大于未处理组,逆转倍数最高达 10.02;流式细胞术结果表明,相同条件下,处理组凋亡率明显大于未处理组。以上表明重楼能够使 CEM/VCR 细胞对 VCR 敏感性增强,并诱导细胞凋亡,其可能为一种有效的逆转多药耐药的药物。因此,为进一步探讨重楼作为耐药逆转剂逆转耐药的相关通路,采取 RT-qPCR、Western blot 检测不同浓度 VCR 作用于两组 CEM/VCR 细胞 24 h、48 h 后 Bax、Bcl-2、Cyt-c、P-gp、MRP1 基因转录及蛋白表达情况。结果显示,同一时间不同浓度,处理组和未处理组与各自对照组相比较,均能下调 Bcl-2、P-gp、MRP1 和上调 Bax 与 Cyt-c 基因与蛋白的表达($P<0.05$),且相同作用条件下处理组较未处理组表现更为显著。本实验表明重楼水提物对逆转 CEM/VCR 细胞多药耐药性的作用明显,但其发挥作用的具体有效成分今后还需进一步深入探讨。

综上所述,本实验结果提示重楼作为耐药逆转剂可能是通过抑制细胞表面 P-gp、MRP1 作为药物外排泵的表达,降低化疗药物外排,增加 CEM/VCR 细胞内 VCR 药物浓度;通过下调 Bcl-2,上调 Bax 表达,使 Bcl-2/Bax 的比值下降,促进 Cyt-C 的释放从而诱导细胞凋亡。

参考文献

[1] 张永强,杨珏,饶青,等. 基于网络药理学预测定清片治疗白血病的潜在靶点及其机制研究[J]. 中华中医药学刊,2020,38(11):145-148,275-277.
[2] 闫理想,姜静,史哲新,等. 中药单体逆转白血病多药耐药研究进展[J]. 山西中医,2023,39(1):67-70.
[3] 辛灵怡,杨洋,朱婧,等. 重楼抗肿瘤活性成分分类及作用机制研究进展[J]. 中国药物警戒,2024,21(2):235-240.
[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:271.
[5] 杜泽飞,张国文,孙健玮. 重楼中皂苷类成分抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 云南医药,2024,45(2):73-75.
[6] LI J,JIA J H,ZHU W W,et al. Therapeutic effects on cancer of the active ingredients in rhizoma paridis[J]. Front Pharmacol,2023,14:1095786.
[7] WU Z,YUAN C Y,ZHANG Z H,et al. *Paris* saponins Ⅶ inhibits glycolysis of ovarian cancer *via* the RORC/ACK1 signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol,2023,213:115597.
[8] JIAO Y H,XIN M,XU J J,et al. Polyphyllin II induced apoptosis of NSCLC cells by inhibiting autophagy through the mTOR pathway[J]. Pharm Biol,2022,60(1):1781-1789.
[9] LIANG Y,SUN R L,LIU F Y,et al. Anti-colorectal cancer mechanism of Astragali *Radix*-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma based on network pharmacology and experimental verification[J]. Zhongguo Zhongyao Zazhi,2022,47(3):776-785.
[10] HAN J,KAN J,WANG X G,et al. Polyphyllin I suppresses proliferation and promotes apoptosis of gastric cancer cell by inhibiting stat3 phosphorylation[J]. Transl Cancer Res,2020,9(8):4715-4725.
[11] 鲁振,周明. 常用抗癌中药的临床应用规律初探[J]. 实用中西医结合临床,2023,23(22):122-128.
[12] 朱大诚,陈秀珍,何莲花. 长春新碱诱导的白血病多药耐药细胞株 CEM/VCR 的建立及其生物学特性[J]. 中国现代医学杂志,2014,24(20):10-15.
[13] DOOSTMOHAMMADI A,JOOYA H,GHORBANIAN K,et al. Potentials and future perspectives of multi-target drugs in cancer treatment: the next generation anti-cancer agents[J]. Cell Commun Signal,2024,22(1):228.
[14] 黄晓伟,沈克平,胡兵. 中医药对大肠癌多药耐药作用及机制[J]. 中华中医药学刊,2018,36(4):894-897.
[15] KAPSE-MISTRY S,GOVENDER T,SRIVASTAVA R,et al. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells[J]. Front Pharmacol,2014,5:159.
[16] YANG Q H,TO K K W,HU G L,et al. BI-2865,a pan-KRAS inhibitor,reverses the P-glycoprotein induced multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*[J]. Cell Commun Signal,2024,22(1):325.
[17] 王东萍,葛万文,董莉,等. 秦巴硒菇提取物联合多柔比星抗白血病 K562/ADR 细胞多药耐药的机制研究[J]. 中药药理与临床,2024,40(2):67-72.
[18] LOPES-RODRIGUES V,OLIVEIRA A,CORREIA-DA-SILVA M,et al. A novel curcumin derivative which inhibits P-glycoprotein,arrests cell cycle and induces apoptosis in multidrug resistance cells[J]. Bioorg Med Chem,2017,25(2):581-596.
[19] LIN K N,JIANG Y L,ZHANG S G,et al. Grape seed proanthocyanidin extract reverses multidrug resistance in HL-60/ADR cells *via* inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother,2020,125:109885.
[20] WANG Y J,LI Q,XIAO H B,et al. Chamaejasmin B exerts anti-MDR effect *in vitro* and *in vivo via* initiating mitochondria-dependant intrinsic apoptosis pathway[J]. Drug Des Devel Ther,2015,9:5301-5313.
[21] 朱大诚,陈甜甜,陈秀珍,等. 蟾酥逆转白血病多药耐药细胞 CEM/VCR 的作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(8):1819-1822.
[22] MISRA R,SAHOO S K. Coformulation of doxorubicin and curcumin in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles suppresses the development of multidrug resistance in K562 cells[J]. Mol Pharm,2011,8(3):852-866.
[23] 林婷,廖斌,徐成波,等. 中药复方君子汤联合阿霉素逆转白血病 K562/VCR 细胞多药耐药及诱导凋亡的机制研究[J]. 广州中医药大学学报,2017,34(1):95-100.
[24] 杨远贵,李凡,许洪波,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法结合网络药理学研究滇重楼抗肺癌活性成分[J]. 中成药,2023,45(9):3128-3133.
[25] 罗晓锋,乔锋,周建金,等. 福建七叶一枝花重楼皂苷含量与影响因子分析[J]. 西南林业大学学报(自然科学),2024,44(4):193-200.
[26] 田野,许才明,贾思寻,等. 重楼皂苷Ⅵ诱导急性髓系白血病 THP-1 细胞凋亡机制研究[J]. 免疫学杂志,2020,36(12):1099-1104.
[27] 陆芹,郑云菁,胡昳歆,等. 长柱重楼皂苷抑制急性髓系白血病细胞增殖的机制研究[J]. 中国实验血液学杂志,2019,27(1):7-13.

重楼对白血病 CEM/VCR 细胞多药耐药的逆转作用及机制研究

（正文见 1－7 页）

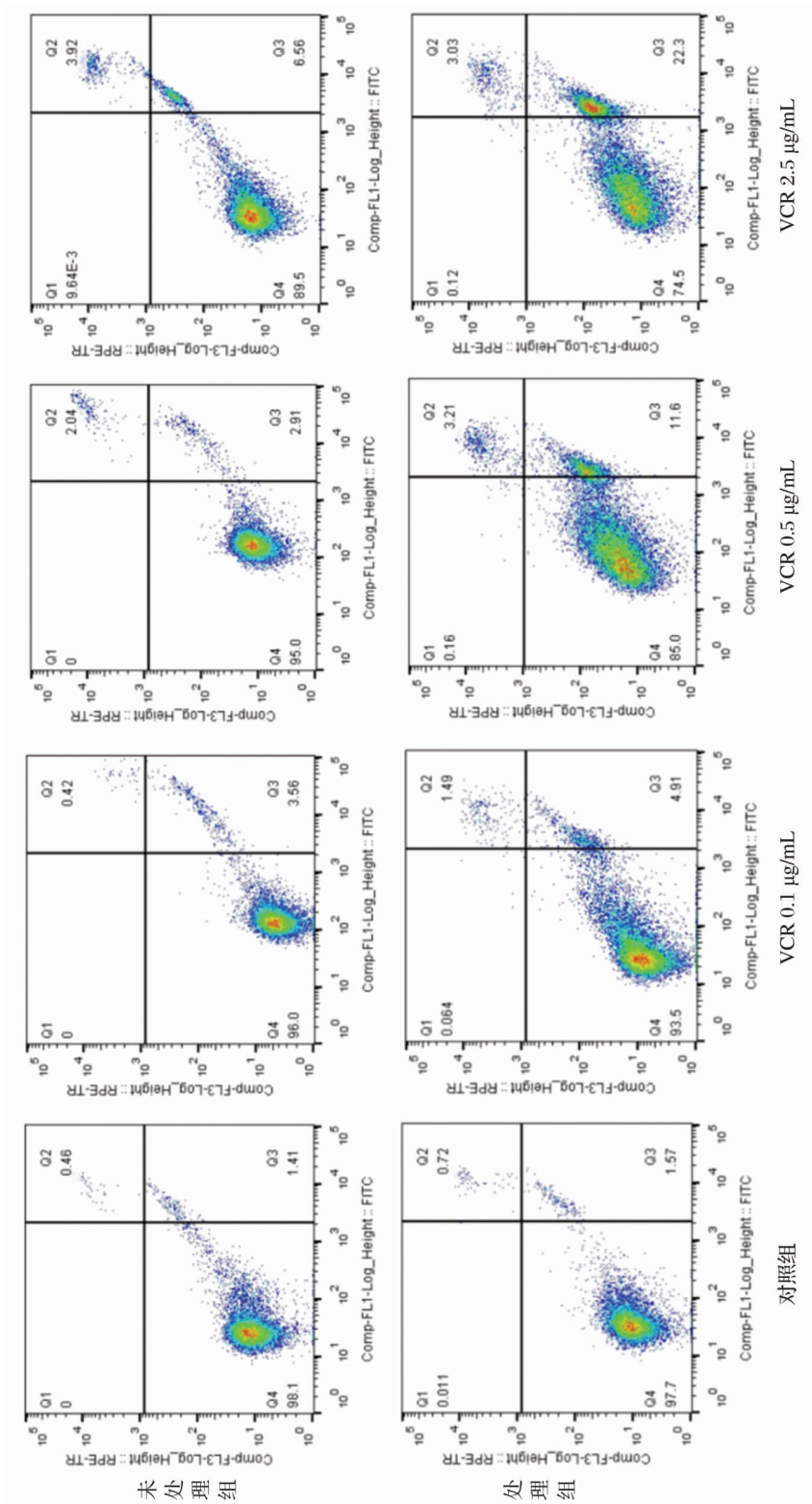


图 1　不同浓度 VCR 作用于两组 CEM/VCR 细胞 24 h 凋亡情况

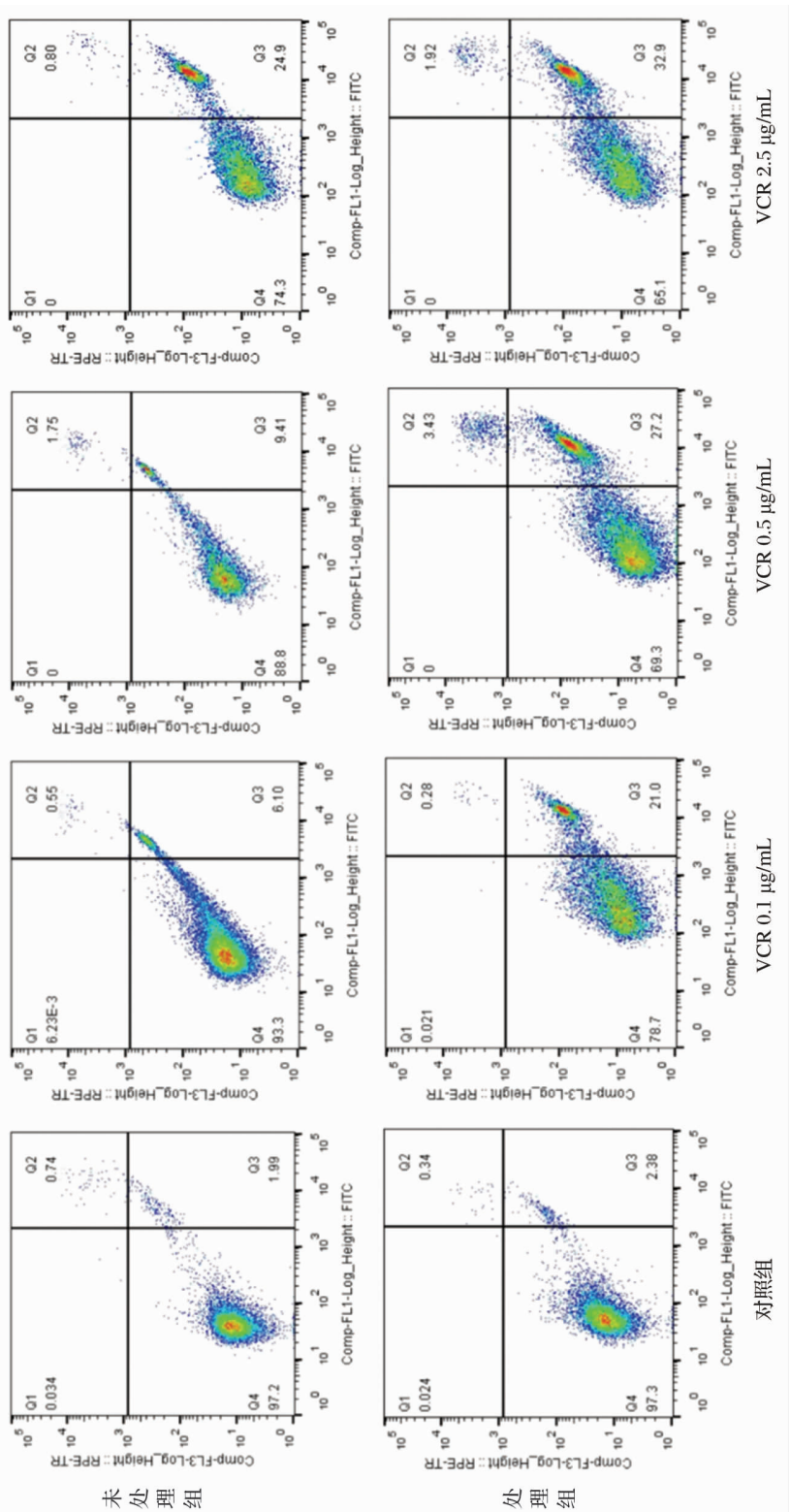


图 2　不同浓度 VCR 作用于两组 CEM/VCR 细胞 48 h 凋亡情况