

乙酰阿地咪逆转肿瘤细胞多药耐药及其机制的研究*

赵晨¹, 郑雪莲², 颜有仪¹, 宋颢³, 李道霞^{1,3}, 杨林¹,
秦勇³, 林勇², 王霞³, 廖林川^{1△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 毒物分析教研室(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院 西部妇幼研究院
分子与转化医学实验室(成都 610041); 3. 四川大学华西药学院 天然药物化学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨乙酰阿地咪体外逆转多药耐药细胞株人乳腺癌耐阿霉素细胞(MCF-7/Adr)以及人非小细胞肺癌耐阿霉素细胞(A549/Adr)的耐药作用及其作用机理。方法 采用乳酸脱氢酶释放法检测乙酰阿地咪与阿霉素共处理 MCF-7、A549、MCF-7/Adr 以及 A549/Adr 细胞的细胞毒作用,以观察增敏和逆转耐药作用;用全功能酶标仪测定乙酰阿地咪与阿霉素共同处理 MCF-7/Adr 和 A549/Adr 细胞后细胞内积累阿霉素的荧光强度,并采用 Western blot 检测细胞膜上多药耐药蛋白 P-糖蛋白(P-gp)表达的变化。结果 乙酰阿地咪能降低 MCF-7/Adr 和 A549/Adr 对阿霉素的耐药性,10 μ mol/L 的乙酰阿地咪对 MCF-7/Adr 和 A549/Adr 逆转倍数分别为 10.8、20.1,其逆转作用与乙酰阿地咪呈剂量依赖关系,且对 MCF-7 和 A549 细胞也具有增敏作用;随着乙酰阿地咪浓度的增加,MCF-7/Adr 和 A549/Adr 细胞内积累阿霉素的荧光强度增加率增加,呈剂量依赖性;经乙酰阿地咪处理的 MCF-7/Adr 和 A549/Adr 细胞 P-gp 蛋白表达水平降低,且降低水平随乙酰阿地咪浓度增加而更明显。结论 乙酰阿地咪可显著逆转肿瘤细胞的多药耐药性,其机理与抑制多药耐药蛋白 P-gp 的表达有关,提示乙酰阿地咪具有潜在的克服肿瘤化疗中多药耐药现象的应用价值。

【关键词】 乙酰阿地咪 阿霉素 多药耐药 逆转作用

DOI:10.13464/j.scuxbyxb.2014.06.003

Reversal Effect and Its Mechanism of (—)-5-N-Acetylardeemin on Adriamycin Resistance in Multidrug-resistant Cancer Cells A549/Adr and MCF-7/Adr ZHAO Chen¹, ZHENG Xue-lian², YAN You-yi¹, SONG Hao³, LI Dao-xia^{1,3}, YANG Lin¹, QIN Yong³, LIN Yong², WANG Xia³, LIAO Lin-chuan^{1△}. 1. Department of Forensic Analytical Toxicology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Molecular and Translational Medicine, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Natural Pharmaceutical Chemistry, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: linchuanliao@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the reversal effect of (—)-5-N-acetylardeemin on adriamycin resistance in multidrug-resistant cancer cells including human breast cancer cells MCF-7/Adr and human non-small cell lung cancer cells A549/Adr *in vitro*. **Methods** The multidrug-resistant cancer cells MCF-7/Adr, A549/Adr and their respective parental cells were treated with different concentrations of (—)-5-N-acetylardeemin and adriamycin individually or in combination. Cell death was detected based on the release of lactate dehydrogenase (LDH) using a cytotoxicity detection kit. Intracellular accumulation of adriamycin was measured by the detection of fluorescence intensity of cell lysates using microplate reader. The expression of P-glycoprotein (P-gp) was evaluated by Western blot. **Results** (—)-5-N-acetylardeemin significantly reversed the adriamycin resistance in MCF-7/Adr and A549/Adr in a dose-dependent manner, and the reversal folds were 10.8 in MCF-7/Adr cells and 20.1 in A549/Adr cells with the treatment of 10 μ mol/L (—)-5-N-acetylardeemin. (—)-5-N-acetylardeemin also enhanced the sensitivity of parental MCF-7 and A549 cells to adriamycin. The fluorescence intensity in both MCF-7/Adr and A549/Adr cells, which reflected the intracellular accumulation of adriamycin, were significantly enhanced by (—)-5-N-acetylardeemin in a dose-dependent manner. The expressions of P-gp in MCF-7/Adr and A549/Adr cells were significantly inhibited by (—)-5-N-acetylardeemin. **Conclusion** (—)-5-N-acetylardeemin could reverse the multidrug resistance in cancer cells through inhibiting the expression of P-gp and enhancing the intracellular accumulation of cytotoxic drug.

【Key words】 (—)-5-N-acetylardeemin Adriamycin Multidrug resistance Reverse effect

肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药(multidrug

resistance, MDR)是导致肿瘤患者临床化学治疗失败的重要原因之一,因此,能否逆转肿瘤细胞多药耐药性直接关系到其治疗效果。而在肿瘤细胞诸多耐药机制中,多药耐药基因 1(MDR1)及其表达产物 P-糖蛋白(P-gp)的过度表达是最主要的多药耐药机

* 国家自然科学基金(No. 81172111)和教育部“新世纪人才支持计划”(No. NCET-11-0349)资助

△ 通讯作者, E-mail: linchuanliao@scu.edu.cn

制,也是逆转多药耐药的重要靶点^[1,2]。近年来,各国科学家对逆转多药耐药试剂进行了广泛而深入的研究,有 30 多种不同的逆转剂进入临床试验^[3],但均因毒副作用大、逆转效果不佳而未获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准。因此,高效低毒的多药耐药逆转剂的发现具有十分重要的意义。乙酰阿地咪[(-)-5-N-acetylardeemin,(-)-NAA]是一种真菌代谢物类似物^[4],存在于多种天然产物中,如产果镰孢菌素^[5]、酪青霉毒素^[6]等。目前国内未见文献报道其药理作用,国外有研究者^[7]发现,乙酰阿地咪可逆转肿瘤细胞多药耐药性,但其逆转多药耐药机制有待进一步研究。阿霉素(adriamycin,Adr)又称多柔比星(doxorubicin)是目前临床上常用的化疗药物,对肿瘤细胞有很强的杀伤力,但因其毒副作用较大和肿瘤细胞易对其产生耐药而限制了它的临床应用^[8]。本研究拟以两种多药耐药细胞株,即人乳腺癌耐阿霉素细胞(MCF-7/Adr)和人非小细胞肺癌耐阿霉素细胞(A549/Adr)为研究对象,探讨乙酰阿地咪对肿瘤细胞阿霉素耐药的逆转作用及其作用机理。

1 材料和方法

1.1 细胞株、主要试剂和仪器

人乳腺癌细胞 MCF-7 和人非小细胞肺癌细胞 A549 购自美国 American Type Culture Collection 公司;MCF-7/Adr 以及 A549/Adr 由本实验室诱导(为前期实验以 MCF-7、A549 为亲本细胞采用浓度递增法构建的 MCF-7 和 A549 耐药株);RPMI-1640 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(Hyclone);乙酰阿地咪(四川大学华西药学院天然药物化学实验室合成,其纯度>99%);注射用盐酸多柔比星(Adr,浙江海正药业);Triton X-100TM(UNICHEN);CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测试剂盒(Promega 公司);抗 P-gp 抗体(Santa Cruz Biotechnology);抗 β -actin 抗体(Protein Tech 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(Santa Cruz 公司);化学发光底物液(Millipore)。Tecan Infinite M200 多功能酶标仪(Tecan 公司);Electrophoresis Power Supply-EPS301 电泳仪和蛋白电泳及转印装置(GE Healthcare 公司);凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司);台式高速冷冻离心机(Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7、MCF-7/Adr、A549 及

A549/Adr 培养于 RPMI-1640 培养基(含 100 mL/L 的胎牛血清,耐药细胞株培养液中含 2 μ mol/L Adr)中,在 5% CO₂、37 °C、饱和湿度下培养,细胞长满 80%时(3~4 d),用 2.5 g/L 胰蛋白酶液消化后进行传代。耐药株细胞在实验前用不含 Adr 培养液培养 7 d。

1.2.2 细胞死亡率的测定 将生长良好的细胞按 1.0×10^5 /mL 分别接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养过夜,培养细胞分为①空白对照组(不加干扰药物);②Adr 组(按作用细胞株不同加入不同浓度 Adr:A549 细胞株加入 Adr 0.3 μ mol/L;A549/Adr 细胞株加入 Adr 10 μ mol/L;MCF-7 细胞株加入 Adr 0.25 μ mol/L;MCF-7/Adr 细胞株加入 Adr 5.0 μ mol/L);③乙酰阿地咪组(按作用细胞株不同加入不同浓度乙酰阿地咪:A549 和 A549/Adr 细胞株,分别加入乙酰阿地咪 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000 μ mol/L;MCF-7 和 MCF-7/Adr 细胞株分别加入乙酰阿地咪 0.156、0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 μ mol/L);④Adr+乙酰阿地咪(包括亚组)合药组;⑤Adr+10 μ mol/L 维拉帕米组(维拉帕米是经典的 MDR 逆转剂^[10],以此作为 MDR 逆转的阳性对照),分别作用于 A549/Adr 和 MCF-7/Adr 细胞株。按分组加入不同浓度药物,每组设 5 个复孔。④组、⑤组加入乙酰阿地咪、维拉帕米 1 h 后,再加入 Adr。加药处理 72 h 后,采用 CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测试剂盒检测 96 孔板内培养液上清中乳酸脱氢酶(LDH)的活性(LDH 释放实验),检测细胞死亡率。操作如下:分别吸取 4 个复孔中细胞培养液上清 50 μ L 至另一新的 96 孔板中(检测细胞培养液上清吸光度 A 值),另 1 复孔则按每 100 μ L 培养液加入 10 μ L 细胞裂解液(90 mL/L Triton X-100),37 °C 条件下裂解 45 min 后,将 50 μ L 裂解孔上清转移至上述 96 孔板中(检测细胞最大释放吸光度值 A₀),然后在上述 96 孔板中加入 50 μ L 反应底物液,加入 50 μ L 终止液,于酶标仪 490 nm 波长处测定 A 值,计算细胞死亡率,并采用 SPSS 软件 Probit 模块计算 Adr 半数杀细胞浓度,即 IC₅₀。

细胞死亡率(%) = $A/A_0 \times 100\%$;耐药倍数 = $IC_{50}(\text{耐 Adr 细胞})/IC_{50}(\text{敏感细胞})$;逆转倍数 = $IC_{50}(\text{Adr 处理组})/IC_{50}(\text{乙酰阿地咪或维拉帕米和 Adr 共同处理组})$ 。

1.2.3 细胞内阿霉素荧光强度测定 将生长良好的 MCF-7/Adr、A549/Adr 细胞按每孔 1.0×10^5 细

胞分别接种于 24 孔板,培养过夜。分组为乙酰阿地咪 10 $\mu\text{mol/L}$ + Adr 5、10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 组和 Adr 30 $\mu\text{mol/L}$ + 乙酰阿地咪 2、5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组后,分组加药,每组设 4 个复孔,同时设立阴性对照组。乙酰阿地咪处理 12 h 后,加入不同浓度 Adr,共同处理 4 h 后,测定细胞内阿霉素的荧光强度。具体操作如下:吸去培养液,用冷 PBS 液(500 μL /孔 $\times$ 4 次)清洗并移去后,加入细胞裂解液(9 mL/L Triton X-100),60 μL /孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下裂解 45 min 后,吸取 50 μL /孔上清液至 Corning 96 孔板中,于全功能酶标仪激发波长和发射波长分别为 470 nm 和 590 nm^[9] 处测定荧光强度(即吸光度 A)。计算公式如下:荧光强度增加率(%) = $(A_{\text{乙酰阿地咪和Adr共同处理组}} - A_{\text{Adr单独处理组}}) / A_{\text{Adr单独处理组}} \times 100\%$ 。

1.2.4 Western blot 检测细胞 P-gp 蛋白的表达
将生长良好的 MCF-7/Adr 细胞、A549/Adr 细胞按 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 分别接种于 6 孔板,每孔 1 mL,培养过夜。分别加入不同浓度乙酰阿地咪,同时设立阴性对照组,处理 24 h 后,用 PBS 液清洗后收集细胞,加入 M2 裂解液裂解细胞以提取细胞总蛋白。测定蛋白浓度后,按常规方法进行 Western blot。操作如下:各取约 50 μg 裂解的细胞样品加入上样缓冲液,煮沸 4 min 后,采用 80 g/L SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳后进行 PVDF 膜转印。然后将膜放入含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBS-T 中(含 1 g/L Tween20 的 PBS 溶液)室温封闭 1 h,加入一抗室温振荡 2 h 并 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,用 PBS-T 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 室温孵育 40 min, PBS-T 洗膜后,加入化学发光底物液,凝胶成像分析系统检测特异性蛋白条带灰度值,以目的条带与 β -actin 灰度值的比值为目的蛋白的相对含量。

1.2.5 统计学方法 各变量均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用 t 检验,多组间的两两比较采用配对 t 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度乙酰阿地咪对 Adr 诱导的细胞毒作用的影响

各组细胞死亡率见表 1、表 2。本实验所选用的乙酰阿地咪浓度(0.156~20.000 $\mu\text{mol/L}$)和 Adr 单独处理细胞,均无明显细胞毒性,即与对照组比较,细胞死亡率差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);

但乙酰阿地咪能增强 Adr 对 A549、A549/Adr、MCF-7 以及 MCF-7/Adr 细胞的细胞毒作用,并且乙酰阿地咪对 Adr 的增敏作用在达到一定浓度后具有剂量依赖性趋势,在 A549 和 MCF-7、A549/Adr 和 MCF-7/Adr 细胞中,分别从 5.000 $\mu\text{mol/L}$ 、2.500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度开始呈剂量依赖关系(P 均 < 0.05)。

表 1 乙酰阿地咪与 Adr 作用于 A549、A549/Adr 细胞诱导的细胞死亡率($n=4$)

Table 1 Cell death induced by increasing concentration of (—)-NAA, Adr, and co-treatment in A549 and A549/Adr cells ($n=4$)

Group	Concentration	Cell death (%)	
		A549	A549/Adr
Control		3.4 $\pm$ 0.4	9.8 $\pm$ 2.3
Adr Δ		8.7 $\pm$ 0.8 $\blacklozenge$	10.3 $\pm$ 0.8 $\blacklozenge$
(—)-NAA	0.625	4.9 $\pm$ 0.9 $\blacklozenge$	10.0 $\pm$ 0.6 $\blacklozenge$
($\mu\text{mol/L}$)	1.250	5.4 $\pm$ 0.4 $\blacklozenge$	9.3 $\pm$ 0.0 $\blacklozenge$
	2.500	4.2 $\pm$ 0.2 $\blacklozenge$	9.4 $\pm$ 1.0 $\blacklozenge$
	5.000	5.0 $\pm$ 0.5 $\blacklozenge$	10.7 $\pm$ 1.1 $\blacklozenge$
	10.000	3.3 $\pm$ 0.3 $\blacklozenge$	8.7 $\pm$ 0.2 $\blacklozenge$
	20.000	3.5 $\pm$ 0.5 $\blacklozenge$	7.5 $\pm$ 2.3 $\blacklozenge$
Adr Δ + (—)-NAA	0.625	13.6 $\pm$ 1.1 $\diamond\diamond$	6.9 $\pm$ 0.8
($\mu\text{mol/L}$)	1.250	12.8 $\pm$ 1.0 $\diamond$	15.2 $\pm$ 4.3
	2.500	13.8 $\pm$ 1.7 $\diamond\diamond$	13.7 $\pm$ 0.1
	5.000	19.9 $\pm$ 2.8 $\diamond\star$	31.6 $\pm$ 2.8 $\star\cdot\diamond\star$
	10.000	39.6 $\pm$ 7.9 $\star\cdot\diamond\star\star$	62.0 $\pm$ 1.5 $\star\cdot\diamond\star\star$
	20.000	66.9 $\pm$ 6.1 $\star\star\cdot\diamond\star$	79.7 $\pm$ 2.4 $\star\star\cdot\diamond\star\star$

Δ Adr 0.300 $\mu\text{mol/L}$ in A549 cells, Adr 10.000 $\mu\text{mol/L}$ in A549/Adr cells; $\blacklozenge P > 0.05$, vs. control group; $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$, vs. Adr group; $\diamond P < 0.05$, $\diamond\diamond P < 0.01$, vs. (—)-NAA alone in the same concentration group; $\star P < 0.01$, $\star\star P < 0.001$, vs. former co-treatment group

表 2 乙酰阿地咪与 Adr 作用于 MCF-7、MCF-7/Adr 细胞诱导的细胞死亡率($n=4$)

Table 2 Cell death induced by increasing concentration of (—)-NAA, Adr, and co-treatment in MCF-7 and MCF-7/Adr cells ($n=4$)

Group	Concentration	Cell death (%)	
		MCF-7	MCF-7/Adr
Control		11.1 $\pm$ 1.4	9.4 $\pm$ 1.2
Adr Δ		19.4 $\pm$ 0.2 $\blacklozenge$	14.4 $\pm$ 2.1 $\blacklozenge$
(—)-NAA	0.156	16.0 $\pm$ 4.1 $\blacklozenge$	8.3 $\pm$ 1.5 $\blacklozenge$
($\mu\text{mol/L}$)	0.625	14.2 $\pm$ 3.2 $\blacklozenge$	9.9 $\pm$ 1.0 $\blacklozenge$
	1.250	12.2 $\pm$ 1.6 $\blacklozenge$	4.2 $\pm$ 0.8 $\blacklozenge$
	2.500	15.0 $\pm$ 0.9 $\blacklozenge$	6.3 $\pm$ 1.6 $\blacklozenge$
	5.000	16.8 $\pm$ 2.6 $\blacklozenge$	8.9 $\pm$ 0.5 $\blacklozenge$
	10.000	17.1 $\pm$ 3.7 $\blacklozenge$	6.3 $\pm$ 0.1 $\blacklozenge$
Adr Δ + (—)-NAA	0.156	31.8 $\pm$ 0.6 $\star$	23.0 $\pm$ 3.8
($\mu\text{mol/L}$)	0.625	37.8 $\pm$ 1.9 $\star$	26.3 $\pm$ 7.2
	1.250	39.9 $\pm$ 1.6 $\star\cdot\diamond$	28.1 $\pm$ 2.1 $\star$
	2.500	40.2 $\pm$ 2.4 $\star\cdot\diamond$	32.9 $\pm$ 1.7 $\star\cdot\diamond\star$
	5.000	70.2 $\pm$ 4.1 $\star\cdot\diamond\star\star$	37.3 $\pm$ 2.7 $\star\star\cdot\diamond\star$
	10.000	86.9 $\pm$ 4.2 $\star\cdot\diamond\star$	55.0 $\pm$ 1.2 $\star\star\cdot\diamond\star\star$

Δ Adr 0.250 $\mu\text{mol/L}$ in MCF-7 cells, Adr 5.000 $\mu\text{mol/L}$ in MCF-7/Adr cells; $\blacklozenge P > 0.05$, vs. control group; $\star P < 0.05$, vs. Adr group; $\diamond P < 0.05$, $\diamond\diamond P < 0.01$, vs. (—)-NAA alone in the same concentration group; $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$, $\# P < 0.001$, vs. former co-treatment group

2.2 乙酰阿地咪对肿瘤细胞 Adr 耐药的逆转作用

见表 3。10 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰阿地咪能够显著降低肿瘤细胞对 Adr 的耐药性,且对敏感细胞株有增敏

表 3 10 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰阿地咪和维拉帕米对 A549、A549/Adr、MCF-7 和 MCF-7/Adr 细胞 Adr 耐药的逆转作用($n=4$)Table 3 Reversal of resistance to Adr in A549, A549/Adr, MCF-7, and MCF-7/Adr cells by 10 $\mu\text{mol/L}$ (–)-NAA and verapamil ($n=4$)

Cell	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)			Resistance fold of Adr group	Reversal fold
	Adr group	(–)-NAA (10 $\mu\text{mol/L}$) + Adr group	Verapamil + Adr group		
A549	1.750 $\pm$ 0.305	0.358 $\pm$ 0.051*		69.7	4.8
A549/Adr	121.936 $\pm$ 2.875	6.060 $\pm$ 0.255**			20.1
A549/Adr	121.936 $\pm$ 2.875		9.154 $\pm$ 0.482**		13.3
MCF-7	1.412 $\pm$ 0.202	0.279 $\pm$ 0.022**		69.9	5.1
MCF-7/Adr	98.639 $\pm$ 1.781	9.114 $\pm$ 0.469**			10.8
MCF-7/Adr	98.639 $\pm$ 1.781		21.361 $\pm$ 0.345**		4.6

* $P<0.05$, ** $P<0.001$, vs. Adr group

作用,对 A549、MCF-7 的增敏倍数为 4.8、5.1,而对 A549/Adr、MCF-7/Adr 的逆转倍数分别为 20.1、10.8。10 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰阿地咪对 A549/Adr 和 MCF-7/Adr 细胞的逆转作用高于 10 $\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米,维拉帕米对 A549/Adr 和 MCF-7/Adr 细胞的逆转倍数分别为 13.3、4.6。虽然 10 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰阿地咪能够显著降低 A549/Adr、MCF-7/Adr 的 IC₅₀,但其耐药程度均未降至敏感细胞水平,表明 10 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰阿地咪能够部分逆转 A549/Adr、MCF-7/Adr 的耐药性。

2.3 乙酰阿地咪对多药耐药株细胞内 Adr 荧光强度累积的影响

结果显示(表 4),与 Adr 单独处理相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 的乙酰阿地咪能够显著增加细胞内累积的 Adr 荧光强度,且随着 Adr 浓度达到一定值后增加效率趋于平稳。不同浓度的乙酰阿地咪与 30 $\mu\text{mol/L}$ Adr 联合处理 A549/Adr、MCF-7/Adr 细胞后,结果显示,随着乙酰阿地咪浓度的增加,细胞内阿霉素的荧光强度增加率明显增加,且呈剂量依赖性($P<0.05$)。

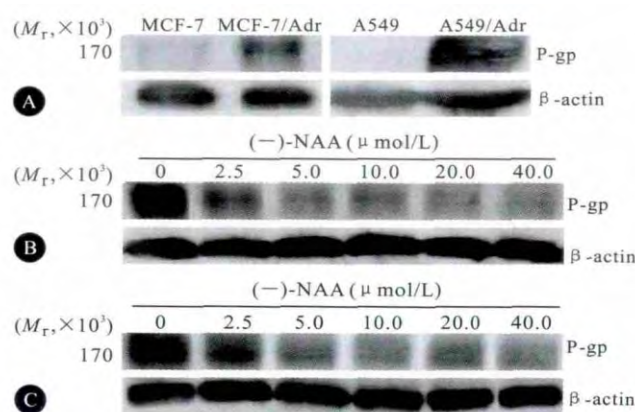
表 4 乙酰阿地咪和 Adr 联合处理对 A549/Adr 和 MCF-7/Adr 细胞内 Adr 荧光强度累积的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)Table 4 Increase of Adr fluorescence intensity in (–)-NAA and Adr co-treated A549/Adr and MCF-7/Adr cells ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Group	Increasing rate (%)	
	A549/Adr	MCF-7/Adr
(–)-NAA Δ + Adr (5 $\mu\text{mol/L}$)	72.7 $\pm$ 0.4*	41.2 $\pm$ 0.2**
(–)-NAA Δ + Adr (10 $\mu\text{mol/L}$)	117.9 $\pm$ 0.9**	62.0 $\pm$ 0.6***
(–)-NAA Δ + Adr (20 $\mu\text{mol/L}$)	120.5 $\pm$ 0.9**	84.2 $\pm$ 0.9***
(–)-NAA Δ + Adr (30 $\mu\text{mol/L}$)	123.4 $\pm$ 1.1***	111.6 $\pm$ 0.9***
(–)-NAA Δ + Adr (40 $\mu\text{mol/L}$)	127.4 $\pm$ 0.9**	131.3 $\pm$ 2.1***
(–)-NAA (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + Adr $\#$	48.3 $\pm$ 1.0*	42.3 $\pm$ 0.5*
(–)-NAA (5 $\mu\text{mol/L}$) + Adr $\#$	65.8 $\pm$ 0.6**	66.3 $\pm$ 1.1**
(–)-NAA (10 $\mu\text{mol/L}$) + Adr $\#$	106.6 $\pm$ 1.1**	117.2 $\pm$ 1.6***
(–)-NAA (20 $\mu\text{mol/L}$) + Adr $\#$	145.9 $\pm$ 1.2**	145.4 $\pm$ 5.6***
(–)-NAA (40 $\mu\text{mol/L}$) + Adr $\#$	236.4 $\pm$ 0.9**	179.4 $\pm$ 1.6***

 Δ : (–)-NAA (10 $\mu\text{mol/L}$); $\#$: Adr (30 $\mu\text{mol/L}$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. Adr alone in the same concentration group; ** $P<0.05$, *** $P<0.01$, vs. former co-treatment group

2.4 乙酰阿地咪对 P-gp 蛋白表达的影响

见附图和表 5。由附图 A 可见,处理前与相应的敏感细胞株比较,A549/Adr 和 MCF-7/Adr 细胞株均高表达 P-gp 蛋白。而经乙酰阿地咪处理 24 h 后,A549/Adr 和 MCF-7/Adr 细胞 P-gp 蛋白的表达水平下降,且随着乙酰阿地咪浓度的增加,P-gp 蛋白表达水平下降越明显,见附图 B 和附图 C。



附图 Western blot 检测 P-gp 蛋白在乙酰阿地咪处理前(A)及处理后(B,C)在 MCF-7、MCF-7/Adr、A549 和 A549/Adr 细胞的表达

Fig The expression of P-gp protein in MCF-7, MCF-7/Adr, A549, and A549/Adr cells detected by Western blot before (A) and after (–)-NAA treatment (B; A549/Adr cells; C: MCF-7/Adr cells)

表 5 不同浓度乙酰阿地咪作用于 A549/Adr、MCF-7/Adr 细胞后,细胞内 P-gp 蛋白的相对表达量($n=3$)Table 5 The relative expression of P-gp protein in A549/Adr, MCF-7/Adr cells induced by (–)-NAA ($n=3$)

(–)-NAA ($\mu\text{mol/L}$)	The relative expression of P-gp	
	A549/Adr	MCF-7/Adr
0	1.000	1.000
2.5	0.633 $\pm$ 0.083*	0.656 $\pm$ 0.037*
5.0	0.314 $\pm$ 0.058***	0.538 $\pm$ 0.012***
10.0	0.312 $\pm$ 0.013*	0.448 $\pm$ 0.025**
20.0	0.286 $\pm$ 0.065*	0.426 $\pm$ 0.019*
40.0	0.180 $\pm$ 0.074**	0.397 $\pm$ 0.027*

* $P<0.001$, vs. 0 $\mu\text{mol/L}$ (–)-NAA group; ** $P<0.05$,*** $P<0.01$, **** $P<0.001$, vs. former co-treatment group

3 讨论

肿瘤细胞多药耐药性一直是阻碍肿瘤治疗的难题,是目前肿瘤治疗研究的重点。普遍认为,多药耐药产生的其中一个主要原因是肿瘤细胞表面过度表达 P-gp 蛋白,该蛋白能够将细胞内药物泵至细胞外,使得细胞内药物浓度降低而达不到有效治疗浓度^[11,12]。因此,P-gp 蛋白表达抑制剂的研究更具有重要意义。

本研究结果显示,乙酰阿地咪具有可作为临床肿瘤细胞多药耐药逆转剂的一些重要特性,如:无毒剂量的乙酰阿地咪对多药耐药细胞株 A549/Adr 和 MCF-7/Adr 的 Adr 耐药性具有不同程度的逆转作用,同时对敏感细胞株也具有增敏效应。无毒剂量的乙酰阿地咪能够降低 P-gp 蛋白对阿霉素的外排作用,使得细胞内药物蓄积浓度显著增加,从而提高药物对肿瘤细胞的杀伤作用。有研究者曾报道^[13],乙酰阿地咪能降低 P-gp 蛋白与抗肿瘤药物(如长春碱、阿霉素)的亲合力,从而降低该蛋白对药物的外排作用。而本实验首次发现无毒剂量的乙酰阿地咪可有效降低细胞表面 P-gp 蛋白的表达水平,这可能是该药物逆转多药耐药的主要机制之一,但乙酰阿地咪抑制 P-gp 蛋白表达的具体机制还有待进一步的研究。

此外,有研究报道,小鼠体内试验^[14]表明,按 300 mg/kg 的剂量经腹腔注射给予小鼠乙酰阿地咪,连续给药 3 d、1 次/d,或 150 mg/kg 的剂量下连续给药 8 d、1 次/d,小鼠均有较好的耐受且体质量并未下降。这与维拉帕米的毒副作用形成鲜明对比,在 150 mg/kg 的剂量下连续给予维拉帕米 3 d 后,小鼠死亡率即可达 40%。在本实验中,我们还发现相同剂量下,乙酰阿地咪逆转耐药的作用明显优于经典的多药耐药逆转剂维拉帕米。这说明,与维拉帕米相比,乙酰阿地咪具有高效、低毒的特点。

综上所述,本研究提示乙酰阿地咪具有显著的逆转多药耐药活性,有可能会成为解决肿瘤化疗中多药耐药现象的一种有力的解决方案,值得进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, *et al.* Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 1989;81(2):116-124.
- 2 Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002;2(1):48-58.
- 3 Peer D, Margalit R. Fluoxetine and reversal of multidrug resistance. *J Cancer Lett*, 2006;237(2):180-187.
- 4 Caballero E, Avendaño C, Menéndez JC. On the fate of the tryptophan stereocenter during the synthesis of hexacyclic analogues of N-acetyldeemin. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998;9(17):3025-3038.
- 5 Kunizo ARAI, Kazutake KIMURA, Taisei MUSHIRODA, *et al.* Structures of fructigenines A and B, new alkaloids isolated from penicillium fructigenum TAKEUCHI. *Chem Pharm Bull*, 1989;37(11):2937-2938.
- 6 Chen WC, Joullié MM. The first total synthesis of roquefortine D. *Tetrahedron Lett*, 1998;39(46):8401-8408.
- 7 Kane SE. Multidrug resistance of cancer cells. *Adv Drug Res*, 1996;28:182-238.
- 8 Lenaz L, Page JA. Cardiotoxicity of adriamycin and related anthracyclines. *Cancer Treat Rev*, 1976;3(3):111-120.
- 9 梁永钜,符立梧,潘启超等. 荧光分光光度法检测裸鼠移植瘤组织中阿霉素浓度. *中国临床药理学杂志*, 2005;21(4):296-298.
- 10 Barattin R, Gerby B, Bourges K, *et al.* Iodination increases the activity of verapamil derivatives in reversing PGP multidrug resistance. *Anticancer Res*, 2010;30(7):2553-2560.
- 11 Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann Rev Biochem*, 1993;62:385-427.
- 12 Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, *et al.* Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999;39:361-398.
- 13 Chou TC, Depew KM, Zheng YH, *et al.* Reversal of anticancer multidrug resistance by the ardeemins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95(4):8369-8374.
- 14 Depew KM, Marsden SP, Zatorska D, *et al.* Total Synthesis of 5-N-Acetyldeemin and Amauromine: Practical Routes to Potential MDR Reversal Agents. *J Am Chem Soc*, 1999;121(51):11953-11963.

(2014-04-09 收稿, 2014-09-15 修回)

编辑 沈进