

4'-甲醚-黄芩素对绒毛癌耐药细胞株 多药耐药性的逆转作用研究*

徐珊¹⁾ 罗莉²⁾ 朱利群²⁾ 李卓²⁾ 仇黎丽²⁾ 陈琪¹⁾ 徐昌芬^{2)**}

¹⁾ 南京医科大学江苏省人类功能基因组重点实验室, 南京 210029;

²⁾ 南京医科大学江苏省生殖医学重点实验室, 南京 210029)

摘要 为探讨马鞭草中 4'-甲醚-黄芩素对人绒毛 JAR/VP16 耐药细胞株的多药耐药逆转作用及可能的逆转机制, 采用四甲基偶氮唑盐比色、透射电镜观察、逆转录多聚酶链反应、流式细胞术、基因芯片以及实时定量 PCR 等方法, 检测到 4'-甲醚-黄芩素对化疗药物具有协同增效作用, 显著逆转耐药细胞对鬼臼乙叉甙 (VP16)、甲氨蝶呤 (MTX) 及更生霉素 (KSM) 的耐药性, 该药物作用后, 耐药细胞超微结构呈现凋亡样改变, 细胞凋亡率增高并出现明显凋亡峰。此外, 耐药细胞中 MDR1、MRP1、MRP2、MRP6、AHR、COMT、FGF2 等耐药相关基因以及 Bcl-2、BFL1、NAIP、p63 等凋亡抑制基因表达降低, 而 Apaf-1、ASC、ATM、Bad、Bak、Bax、BimL 等凋亡促进基因表达升高。上述实验结果表明: 4'-甲醚-黄芩素对绒毛膜癌耐药细胞具有显著的耐药逆转作用, 这种逆转作用可能是通过降低耐药基因表达、促进细胞凋亡实现的。

关键词 4'-甲醚-黄芩素, 绒毛膜癌, 多药耐药, 耐药逆转, 细胞凋亡

学科分类号 R73-3

长期以来临床对于绒毛膜癌的治疗一直以化疗为主, 疗效显著, 甚至可以达到治愈的水平。但是近年来耐药绒毛癌病例不断增多, 极大地限制了临床化疗的疗效, 常常导致化疗失败或化疗后复发^[1,2]。

与大多数耐药性肿瘤一样, 绒毛癌的耐药性也表现为多药耐药, 基于对多药耐药肿瘤产生机制的认识, 人们尝试用化学增敏剂、细胞因子、免疫制剂等逆转肿瘤的多药耐药性, 近年来, 许多学者还将反义 RNA 技术、基因敲除术等用于肿瘤耐药逆转的研究^[3~7], 但所有这些尝试, 或因严重的毒副作用、或因高成本、高技术难度, 都难以应用于临床。深入探讨绒毛癌耐药产生的机制、寻找耐药性绒毛癌的有效逆转剂或逆转方法已成为当前临床治疗绒毛癌的热点课题。

4'-甲醚-黄芩素是中药马鞭草 (*Verbena officinalis* L.) 的有效成分。马鞭草是一味传统中药, 近 10 年来本实验室对其进行了系列研究^[8~13], 首先获得对正常滋养细胞有明显抑制作用的醇提取液, 进而在该提取液中分离、筛选出对恶性滋养细胞——人绒毛膜癌 JAR 细胞有明显增殖抑制作用的有效部位, 并深入探讨了抑制作用机理。在上述

研究基础上, 又从该有效部位中获取了有效的黄酮类化合物——4'-甲醚-黄芩素, 多种研究方法证实该化合物能抑制 JAR 细胞增殖并引起细胞凋亡^[14]。采用剂量递增诱导法成功构建了 JAR/VP16 耐药细胞株, 测定了该细胞的多药耐药性及相关基因表达^[15]。本研究将在前期实验基础上, 进一步探讨 4'-甲醚-黄芩素对耐药性绒毛癌细胞多药耐药性的逆转作用以及该逆转作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及培养液 人绒毛膜癌 JAR 细胞株购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, RPMI-1640 完全培养基含 10% 胎牛血清, 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养, 传代时以 0.25% 胰酶消化。人

*江苏省自然科学基金(BK2003104)和南京医科大学科技创新基金(CX2002002), 江苏省高校自然科学基金(06KJB360067)资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 025-86862904, Fax: 025-86862912

E-mail: cfxu@njmu.edu.cn

收稿日期: 2006-05-09, 接受日期: 2006-07-28

绒毛膜癌 JAR/VP16 耐药细胞株由本文作者自行诱导建立, VP16 维持培养浓度为 1×10^{-3} g/L, 其他培养条件与 JAR 细胞相同。

1.1.2 4'-甲醚-黄芩素. 以反相高效液相色谱法对马鞭草药材进行质量控制^[6], 按现代植物化学分离方法, 从马鞭草醇提取液中, 根据所含成分极性大小, 利用常规系统溶剂法萃取各个部位, 以 JAR 细胞为实验对象, 筛选到有明显抑制作用的氯仿部位, 命名为 C 部位^[7]。C 部位经反复硅胶柱层析, 得到一黄色针晶化合物, 鉴定为黄酮类化合物, 经紫外光谱、氢谱及碳谱分析并结合文献检索, 确定为 4'-甲醚-黄芩素(4'-methylether-scutellarein, 4'-M-S)。全部提取及鉴定工作由江苏省中医药研究院中药化学研究室钱士辉副研究员协助完成。

1.1.3 基因芯片. GE Array Q 系列“肿瘤药物耐受和代谢基因芯片”、“细胞凋亡基因芯片”以及芯片检测试剂盒为美国 SuperArray 公司产品, 由上海康成生物工程有限公司提供。每张芯片有来源于人类的 96 个基因位点以及 3 个负对照、3 个空白点和 10 个管家基因。“肿瘤药物耐受和代谢基因芯片”包含 7 大类肿瘤耐药相关基因; “细胞凋亡基因芯片”包含 11 大类凋亡相关基因。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 4'-甲醚-黄芩素对 JAR/VP16 的耐药逆转作用.

确定逆转的药物浓度: 收集对数生长期的 JAR/VP16 细胞制成单细胞悬液(1×10^6 个/ml), 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l。培养 24 h 后加入 5、10、20、40、80 mg/L 4'-甲醚-黄芩素, 另设不加药物的对照组及不含细胞的空白组, 每组 3 个复孔。培养 48 h 后弃上清, 每孔加入 1 g/L 四甲基偶氮唑盐(MTT) 100 μ l, 继续培养 4 h, 吸净 MTT 液, 每孔加入 0.04 mol/L 盐酸异丙醇 100 μ l, 吹匀后在全自动酶标仪上测定 570 nm 波长的吸光度值(A_{570}), 并计算各浓度的增殖抑制率(IR)。绘制细胞增殖抑制曲线, 选取抑制率 $\leq 20\%$ 的低细胞毒性或无细胞毒性浓度作为耐药逆转浓度。实验重复 3 次。

耐药逆转倍数和逆转率的测定: 按上法接种细胞, 培养 24 h 加入 4'-甲醚-黄芩素及化疗药物。4'-甲醚-黄芩素为上述实验中确定的逆转浓度, 化疗药物为 VP16、MTX、KSM 等 3 种, 均按 1:10 逐级稀释的方式在 $10^{-2} \sim 10^{-7}$ g/L 间分 6 个浓度, 另设对照组及空白组, 每组 3 个复孔。加药后培养 48 h, 测 A_{570} 值, 计算细胞存活率, 按文献

[15]确定 IC_{50} , 实验重复 3 次。按以下公式分别计算逆转倍数和相对逆转率: 逆转倍数 = $IC_{50}A / IC_{50}B$; 相对逆转率 = $(IC_{50}A - IC_{50}B) / (IC_{50}A - IC_{50}C) \times 100\%$ 。其中 $IC_{50}A$ 和 $IC_{50}B$ 分别为 4'-甲醚-黄芩素作用前后 JAR/VP16 细胞对化疗药物的 IC_{50} 值, $IC_{50}C$ 为 JAR 亲本细胞对化疗药物的 IC_{50} 值。

1.2.2 RT-PCR 测细胞 MRP mRNA 的表达水平.

鉴于本文前期实验发现, JAR/VP16 细胞中 MRP 基因较 JAR 细胞显著高表达^[15], 故在此设计 RT-PCR 实验, 以观察 4'-甲醚-黄芩素作用后, JAR/VP16 细胞中 MRP 基因的 mRNA 高水平状态是否被改变。

JAR/VP16 细胞接种 24 h 后, 加入 10 和 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素继续培养 48 h, 同时设对照组, 抽提细胞总 RNA 并检测 MRP 的 mRNA 表达水平, 操作如下:

PCR 引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成, 引物序列为: 上游 5' TTC TCT GCT CTC CTC GAC GG 3'; 下游 5' GCC AGG AGC CTG CCT CTT TT 3', 扩增产物为 225 bp。Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 并进行逆转录, 再以 cDNA 为模板, 在特异性引物引导及 Taq DNA 聚合酶催化下, 对特定的目的靶序列进行扩增。PCR 反应体系内含 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.0 μ l、特异性引物 100 ng、dNTP 200 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 1 μ l, 加无 RNA 酶的水至 20 μ l, 加入逆转录产物 10 μ l、石蜡油 20 μ l, 离心混匀, 置于 PCR 仪上扩增 30 个循环, 变性、退火、延伸所需温度及时间分别为 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 60 s。取 10 μ l PCR 扩增产物反应液在 2%琼脂糖凝胶上电泳(75 V 90 min), 溴化乙锭(EB)染色, 紫外透射仪下照相, 凝胶图像分析仪进行表达分析。

1.2.3 流式细胞术测定细胞周期及细胞凋亡率. 分别取 5、10 和 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用 48 h 的 JAR/VP16 细胞及未加药的 JAR/VP16 细胞各 1×10^5 /ml, Hanker's 液洗 2 次, $1\ 300 \times g$ 离心 5 min, 75%冷乙醇固定过夜。离心弃上清, 0.05 g/L 碘化乙锭(PI) 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min, 上流式细胞仪分析细胞周期及凋亡细胞百分率。

1.2.4 电镜观察细胞超微结构. 收集 5、10、20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用 48 h 的加药组和对照组细胞, $1\ 300 \times g$ 离心 10 min, 25%戊二醛及 1%锇酸固定, 醋酸铀染色, 丙酮梯度脱水, 环氧树脂 1618 包埋, LKB 超薄切片片机切片, JEM1010

电镜观察.

1.2.5 基因芯片检测细胞中耐药及凋亡相关基因的表达变化.

采用 112 点低通量“肿瘤药物耐受和代谢基因芯片”及“细胞凋亡基因芯片”检测 20 mg/L 加药组和对照组耐药及凋亡相关基因表达的差异.

RNA 抽提与检测: 采用 Trizol 一步法抽提细胞总 RNA, 检测样品溶液浓度和纯度, 同时以变性琼脂糖凝胶电泳检测样品完整性.

探针标记: 10 μ l 反转录标记反应混合液(含标记缓冲液 4 μ l, 生物素-16- dUTP 2 μ l, RNase 抑制剂 1 μ l, MMLV 逆转录酶 1 μ l 和 RNase-free 水 2 μ l) 42 $^{\circ}$ C 预热 1 min, 与 10 μ l 退火混合液(含总 RNA 5.0 μ g) 混匀, 42 $^{\circ}$ C 继续孵育 90 min, 加 2 μ l 终止液以终止反应. 标记反应得到的 cDNA 探针溶液于 94 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 迅速放入冰浴中, 即可用于杂交.

芯片杂交: 杂交管中加入 5 ml 灭菌水湿润芯片膜后弃去, 再加 2 ml 60 $^{\circ}$ C 预温的预杂交液(含鲑精 DNA 浓度为 100 mg/L), 温和离心几秒钟后放杂交仪中, 60 $^{\circ}$ C、6 r/min 预杂交 1.5 h, 将变性的 cDNA 探针加入管中, 60 $^{\circ}$ C、6 r/min 杂交过夜. 弃杂交液, 2 $\times$ SSC、1% SDS 洗液及 0.1 $\times$ SSC、0.5% SDS 洗液各洗膜 2 次, 每次 60 $^{\circ}$ C、30 r/min 15 min.

化学发光法检测芯片杂交结果: 弃去最后的洗液, 加入 1.5 ml GEA 封闭液 Q, 置杂交仪中 30 r/min 孵育 40 min. 弃去管中的封闭液, 每张芯片加入 2 ml AP 亲和素, 置杂交仪中轻轻摇动孵育 10 min, 再温和振荡洗膜 3 次. 每管加入 1.0 ml CDP-star 化学发光底物, 室温孵育 2 min, 取出芯片膜, 放在滤纸上吸净多余液体, 用干净的塑料膜包住两面, 驱赶气泡, 用 X 线底片曝光.

杂交结果分析: ScanArray 4000 扫描仪扫描图像, 并用图像分析软件 ScanAlyze 处理以获取原始数据. 再利用 GEMatrix Analyzer 软件对原始数据进行去背景处理及参照管家基因进行校正处理, 计算基因表达的相对丰度, 并得出两个细胞样本的比值, 从而对差异表达的基因进行准确判断, 判断的标准是: 加药组细胞与对照组细胞检测结果比值大于 2.0 或小于 0.5.

1.2.6 实时定量 PCR 对基因芯片结果加以检测.

选择 16 个在 JAR/VP16 细胞用药前后明显差异表达的代表基因, 实时定量 PCR 检测, 以进一步验证基因芯片的检测结果.

引物设计与合成: 所有引物序列均根据 GenBank 发表的基因序列并采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由上海生物工程技术服务有限公司合成. 16 个目的基因及内参 β -actin 的引物序列见表 1.

RNA 抽提与质量检测: 收集 JAR/VP16 对照组细胞及 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用组细胞, 按常规方法进行细胞总 RNA 的抽提与质量检测.

cDNA 合成: 配制退火混合物(总 RNA 5 μ g, 3.5 μ mol/L oligo<dT> 引物 1 μ l, 加无 RNA 酶的水至总体积 10 μ l), 70 $^{\circ}$ C 水浴 3 min, 降至 37 $^{\circ}$ C 放置 10 min; 同时配制 RT 反应液(5 $\times$ RT 缓冲液 4 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 混合液 4 μ l, RNA 酶抑制剂 1 μ l, MMLV 反转录酶 1 μ l), 37 $^{\circ}$ C 恒温 1 min. 加 10 μ l RT 反应液到 10 μ l 退火混合物中, 37 $^{\circ}$ C 水浴 60 min, 加热到 95 $^{\circ}$ C 维持 5 min, 得到的 RT 终溶液即为 cDNA 溶液, 冰浴待用.

以 cDNA 进行实时定量 PCR:

a. 制备用于绘制标准曲线的梯度稀释 DNA 模板.

针对每一个待测基因和内参基因, 选择一个确定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应, 反应体系包括: 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, $MgCl_2$ 溶液 1.5 μ l, 20 μ mol/L 的 PCR 特异引物(1) 0.5 μ l, 20 μ mol/L 的 PCR 特异引物(2) 0.5 μ l, dNTP 混合液 3 μ l, Taq 聚合酶 3 U, cDNA 1 μ l, 加水至总体积 25 μ l. 轻弹管底使溶液混合, 35 个 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C, 1 min; 退火温度下 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min); 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 得到的 PCR 产物与 100 bp DNA Ladder 在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 确定 PCR 产物为单一特异性扩增条带, 再将 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释: 设定 PCR 产物浓度为 1, 分别稀释为 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} 等浓度梯度的 DNA.

b. 进行实时定量 PCR 反应.

梯度稀释的 cDNA 模板以及所有 cDNA 样品分别配制实时定量 PCR 反应体系, 体系配制为: 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, $MgCl_2$ 溶液 3 μ l, dNTP 混合液 3 μ l, Taq 聚合酶 3 U, SybrGreen 终浓度 0.25 $\times$, 20 μ mol/L 的 PCR 特异引物(1) 0.5 μ l, 20 μ mol/L 的 PCR 特异引物(2) 0.5 μ l, cDNA 1 μ l, 加水至总体积 25 μ l, 轻弹管底将溶液混合, 5 000 g 短暂离心, 于实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应. 各目的基因及内参基因的反应条件见表 2.

Table 1 Primer sequences and product size in real time PCR

Number	Gene name	Primer sequences	Annealing temperature/°C	Product size/bp
0	β -actin	5' CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC 3' 5' ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC 3'	57	211
1	MDR1	5' GTG GTG GGA ACT TTG GCT G 3' 5' TAC CTG GTC ATG TCT TCC TCC 3'	57	188
2	MRP1	5' TAT TAC AGG TCC GTG ATA CAG GC 3' 5' AGA GGG GAT CAT CGA AGA GGT A 3'	60	181
3	MRP2	5' CAG TCC CTG CTG TTC GAT ATA C 3' 5' CAG GAA CCA GGA GTT TTT CTG T 3'	57	113
4	MRP6	5' AGC CAG CTA CTC GTC TGT CT 3' 5' CGA GCA TTG TTC TGA GCC A 3'	58	108
5	COMT	5' CTG GCG TGA AGG ACA AGG TC 3' 5' CAG GCC ACA TTC CTC CAA GA 3'	60	161
6	Bcl-2	5' GAA CTG GGG GAG GAT TGT GG 3' 5' CCG GTT CAG GTA CTC AGT CA 3'	57	124
7	NAIP	5' CTG GGC CTA GAT GCA GTT CAG 3' 5' ACG GCT CAT AAG TCA CAA AAG TC 3'	60	139
8	p63	5' CAA GTC CAG AGA GTG GGA CAT 3' 5' CTT CCG AGT GTC TGA AGC CTC 3'	60	293
9	Apaf-1	5' TGT CTG TCA CCA GGG TAC AGT 3' 5' CGT TGT GGC CCC TCA ATT CA 3'	60	140
10	Bad	5' CCC AGA GTT TGA GCC GAG TG 3' 5' CCC ATC CCT TCG TCG TCC T 3'	58	249
11	Bak	5' ATG GTC ACC TTA CCT CTG CAA 3' 5' GAG TCA TAG CGT CGG TTG ATG 3'	60	95
12	Bax	5' GGG TGG TTG GGT GAG ACT C 3' 5' AGA CAC GTA AGG AAA ACG CAT TA 3'	60	191
13	Chk2	5' CAC CCA GGT CTC CGA TGA AC 3' 5' TTG TTG ACA CTC TCA GCA CAC 3'	58	102
14	BimL	5' CAG ATA TGC GCC CAG AGA TAT G 3' 5' GGT CTT CGG CTG CTT GGT AA 3'	62	114
15	Caspase-3	5' ATG GAA GCG AAT CAA TGG ACT C 3' 5' CTG TAC CAG ACC GAG ATG TCA 3'	58	138
16	Caspase-8	5' GGC GGA GGG TCG ATC ATC TAT 3' 5' TGT CCA ACT TTC CTT CTC CCA 3'	62	198

Table 2 Real time PCR conditions

Number	Gene name	Reactive condition				Number of cycle
		Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	
0	β -actin	94°C, 3 min	94°C, 20 s	57°C, 20 s	72°C, 30 s	45
1	MDR1	94°C, 3 min	94°C, 20 s	57°C, 20 s	72°C, 30 s	45
2	MRP1	94°C, 1 min	94°C, 10 s	60°C, 20 s	72°C, 30 s	40
3	MRP2	94°C, 3 min	94°C, 20 s	57°C, 20 s	72°C, 30 s	45
4	MRP6	94°C, 3 min	94°C, 20 s	58°C, 20 s	72°C, 30 s	50
5	COMT	94°C, 1 min	94°C, 10 s	60°C, 20 s	72°C, 30 s	40
6	Bcl-2	94°C, 3 min	94°C, 20 s	57°C, 20 s	72°C, 30 s	45
7	NAIP	94°C, 1 min	94°C, 10 s	60°C, 20 s	72°C, 30 s	40
8	p63	94°C, 1 min	94°C, 10 s	60°C, 20 s	72°C, 30 s	40
9	Apaf-1	94°C, 5 min	94°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 30 s	45
10	Bad	94°C, 3 min	94°C, 20 s	58°C, 20 s	72°C, 30 s	50
11	Bak	94°C, 5 min	94°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 30 s	45
12	Bax	94°C, 5 min	94°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 30 s	45
13	Chk2	94°C, 5 min	94°C, 15 s	58°C, 20 s	72°C, 30 s	50
14	BimL	94°C, 5 min	94°C, 10 s	62°C, 15 s	72°C, 20 s	45
15	Caspase-3	94°C, 5 min	94°C, 15 s	58°C, 20 s	72°C, 30 s	50
16	Caspase-8	94°C, 5 min	94°C, 10 s	62°C, 15 s	72°C, 20 s	45

c. 结果计算.

根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线, 各样品的基因和内参基因的浓度直接由仪器生成, 每个样品的目的基因浓度除以其内参基因浓度, 即为此样品此基因校正后的相对含量.

1.2.7 统计学方法. 实验数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析(ANOVA), 两组均数比较采用 t 检验. $P < 0.05$ 表示各组间差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 4'-甲醚-黄芩素对 JAR/VP16 细胞的耐药逆转作用

5~80 mg/L 共 5 个浓度的 4'-甲醚-黄芩素作用 48 h 后, 对 JAR/VP16 细胞均有一定的增殖抑制作用并呈剂量依赖关系(图 1).

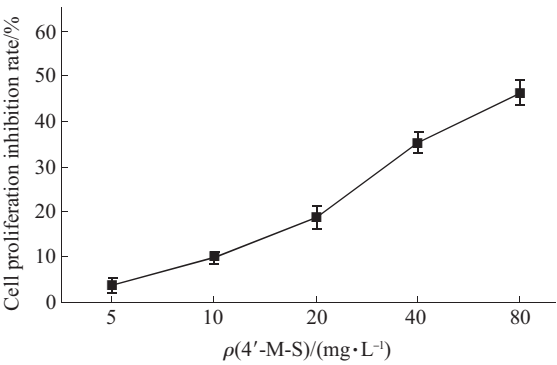


Fig. 1 Inhibitory effect curve of 4'-M-S on proliferation of JAR/VP16 cells

选择细胞增殖抑制率 $\leq 20\%$ 的 5、10、20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素为耐药逆转浓度, 这 3 个浓度的 4'-甲醚-黄芩素对 JAR/VP16 的增殖抑制率分别为 $(3.66 \pm 1.51)\%$ 、 $(9.76 \pm 1.14)\%$ 、 $(18.71 \pm 2.67)\%$; 3 个浓度的药物分别配伍 1×10^{-3} g/L VP16、MTX 和 KSM 作用于 JAR/VP16 细胞 48 h 后, 对细胞增殖的抑制率分别为 $(54.71 \pm 1.87)\%$ 、 $(47.46 \pm 2.04)\%$ 、 $(46.53 \pm 1.55)\%$ 、 $(67.45 \pm 2.20)\%$ 、 $(59.27 \pm 2.19)\%$ 、 $(56.77 \pm 1.84)\%$ 、 $(81.87 \pm 2.79)\%$ 、 $(77.36 \pm 2.62)\%$ 、 $(71.47 \pm 1.71)\%$, 而本文作者的前期实验^[15]可知, 1×10^{-3} g/L VP16、MTX 和 KSM 单独作用于 JAR/VP16 时的增殖抑制率分别为 $(7.38 \pm 0.13)\%$ 、 $(11.39 \pm 0.14)\%$ 、 $(16.67 \pm 0.10)\%$. 数据分析表明, 3 个浓度的 4'-甲醚-黄芩素和化疗药物配伍后对 JAR/VP16 细胞的抑制作用均明显提高, 与两者单独作用之和相比差异显著 ($P < 0.05$), 分别为两者单独作用之和的 2.02~4.96 倍.

加药后 48 h 测 IC_{50} 值(表 3), 计算 5、10、20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素对上述 3 种化疗药物耐药逆转倍数分别为(1.52、1.37、1.30)、(2.05、1.85、1.80)、(5.02、3.67、2.48), 相对逆转率分别为(34.86%、28.30%、24.76%)、(51.83%、48.58%、47.57%)、(81.19%、76.89%、64.08%), 表现出明显的浓度依赖效应.

Table 3 Reversal effects of 4'-M-S on drug resistance of JAR/VP16

Groups	VP16		MTX		KSM	
	$IC_{50}/(mg \cdot L^{-1})^*$	Resistant index	$IC_{50}/(mg \cdot L^{-1})^*$	Resistant index	$IC_{50}/(mg \cdot L^{-1})^*$	Resistant index
JAR	0.03 ± 0.00	—	0.12 ± 0.02	—	0.15 ± 0.02	—
JAR/VP16	2.21 ± 0.31	73.67	2.24 ± 0.73	18.67	2.21 ± 0.43	14.73
JAR/VP16+5 mg/L 4'-M-S	1.45 ± 0.22	48.33	1.64 ± 0.41	13.67	1.70 ± 0.19	11.33
JAR/VP16+10 mg/L 4'-M-S	1.08 ± 0.08	36.00	1.21 ± 0.20	10.08	1.23 ± 0.15	8.20
JAR/VP16+20 mg/L 4'-M-S	0.44 ± 0.01	14.67	0.61 ± 0.03	5.08	0.89 ± 0.02	5.93

* $P < 0.05$.

2.2 4'-甲醚-黄芩素作用后 JAR/VP16 细胞 MRP mRNA 表达改变

RT-PCR 结果表明, 4'-甲醚-黄芩素作用 JAR/VP16 细胞 48 h 后, 细胞中 MRP 的 mRNA 表达水平明显降低, 且降低的幅度与作用浓度密切相

关(图 2), 凝胶图像分析仪分析电泳条带灰度值, 对照组为 49.289, 10 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用组为 36.955, 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用组为 26.619, 两实验组分别比对照组降低 25.02%和 45.99%.



Fig. 2 Influence of 4'-M-S on the expression of MRP mRNA in JAR/VP16 detected by RT-PCR

M: DNA marker; *1*: JAR/VP16; *2*: JAR/VP16 with 10 mg/L 4'-M-S treatment; *3*: JAR/VP16 with 20 mg/L 4'-M-S treatment.

2.3 4'-甲醚-黄芩素对 JAR/VP16 细胞周期及细胞凋亡的影响

5、10、20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用 48 h 后, JAR/VP16 细胞周期 S 期比例略有降低, 而

G0-G1 期与 G2-M 期则略有提高, 但变化均不显著且无药物浓度依赖性. 而 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用后细胞凋亡率则明显升高, 达 19.71%, 与对照组(2.91%)相比差异显著, 且出现一个明显的凋亡峰, 5 和 10 mg/L 4'-甲醚-黄芩素并未引起细胞凋亡率的显著升高, 分别仅为 2.56% 和 3.90% (图 3).

2.4 4'-甲醚-黄芩素作用后细胞超微结构变化

4'-甲醚-黄芩素作用之前, JAR/VP16 细胞胞浆均匀, 细胞核界限清楚, 核质均匀而密集, 核仁清晰. 5、10、20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用 48 h 后, 不同程度地引起细胞超微结构的改变, 并且随着药物浓度的升高, 这种改变越发明显. 具体表现为: 胞质空泡化, 线粒体髓样改变, 内质网扩张, 核变形, 核物质松散并向核膜内侧边缘聚集等. 20 mg/L 浓度下, 还呈现早期凋亡特征并即将形成凋亡小体(图 4).

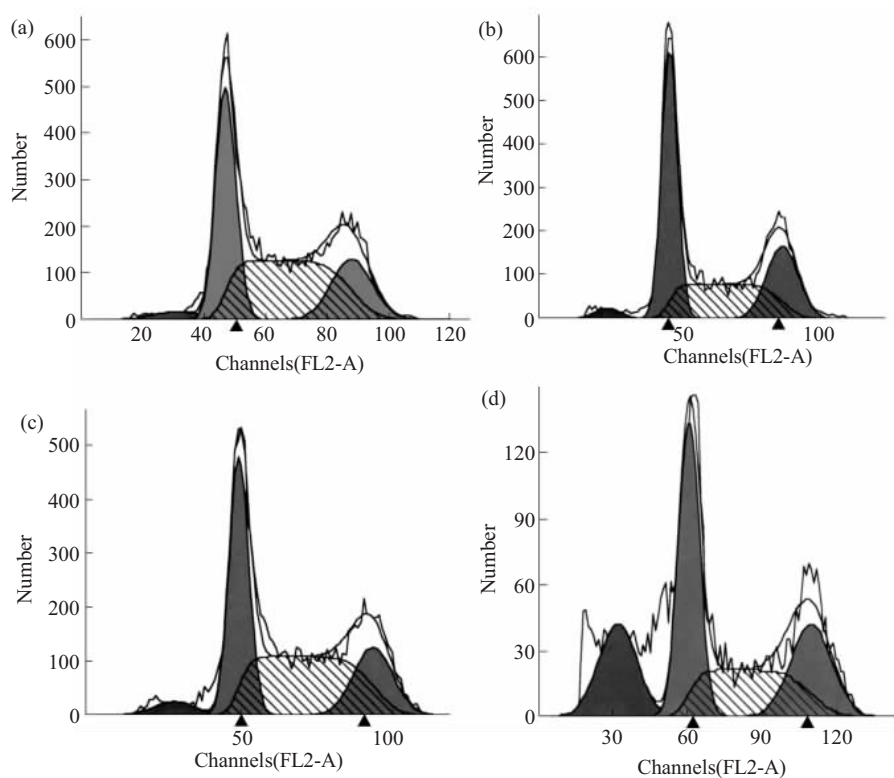


Fig. 3 Flow cytometry analysis on JAR/VP16 untreated or treated by 4'-M-S

(a) JAR/VP16. (b) JAR/VP16+5 mg/L 4'-M-S. (c) JAR/VP16+10 mg/L 4'-M-S. (d) JAR/VP16+20 mg/L 4'-M-S.

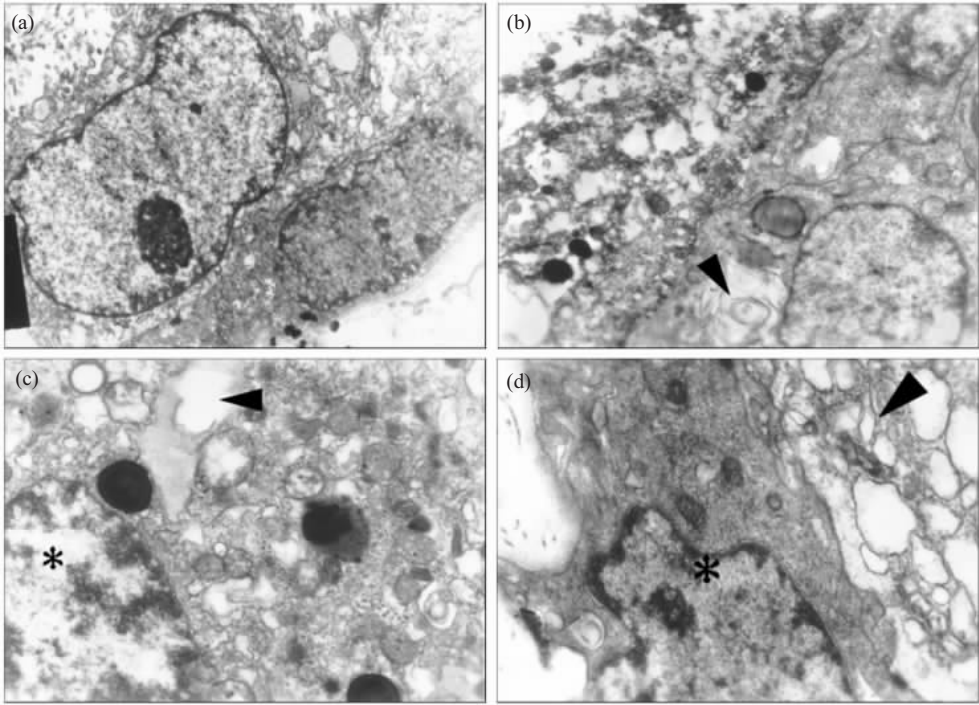


Fig. 4 Transmission electron microscopic observation of JAR/VP16 cells untreated or treated by 4'-M-S (a) JAR/VP16 (control, $\times 8\,000$), abundant plasma, regular nucleus and homogeneous nucleoplasm. (b) JAR/VP16 with 5 mg/L 4'-M-S treatment ($\times 8\,000$), a pulpiform mitochondrion near the nucleus (arrow). (c) JAR/VP16 with 10 mg/L 4'-M-S treatment ($\times 8\,000$), vacuolar cytoplasm (arrow), uneven and marginated nucleoplasm (asterisk). (d) JAR/VP16 with 20 mg/L 4'-M-S treatment ($\times 8\,000$), dilated vesicular endoreticulum (arrow), irregular nucleus and severely marginated nucleoplasm (asterisk).

2.5 4'-甲醚-黄芩素作用后 JAR/VP16 细胞中耐药相关基因及凋亡相关基因表达改变

2.5.1 “肿瘤药物耐受和代谢基因芯片”检测结果. 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用前后的 JAR/VP16 细胞分别与“肿瘤药物耐受和代谢基因芯片”杂交, 杂交结果经数字化处理, 显示 4'-甲醚-黄芩素作用前后共有 48 个差异表达基因, 占芯片靶基因总数的 50.0%, 其中作用后表达下调的基因 24 个 (ratio < 0.5), 表达上调的基因 24 个 (ratio > 2.0). 表达下调的基因中有 4 个基因在用药后的 JAR/VP16 细胞中无表达 (ratio = 0). 结果详见表 4 和表 5.

2.5.2 “细胞凋亡基因芯片”检测结果. 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素作用前后的 JAR/VP16 细胞分别与“细胞凋亡基因芯片”杂交, 检测结果表明, 4'-甲醚-黄芩素作用前后细胞中差异表达的凋亡相关基因共计 53 个, 占靶基因总数的 55.2%, 其中作用后表达下调的基因 28 个, 包括 Bcl-2、NAIP、p63 等凋亡抑制基因. 表达上调的基因 25 个, 包括 Apaf-1、Bad、Bak、Bax、BimL、Chk2、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8、Chk2、TRAIL 等凋亡促进基因. 表达下调的基因中有 13 个基因在

用药后的 JAR/VP16 细胞中无表达 (ratio = 0). 结果详见表 6 和表 7.

2.6 实时定量 PCR 对部分耐药及凋亡基因的检测结果

选择进行实时定量 PCR 检测的 16 个基因中, 有耐药相关基因 5 个、凋亡抑制基因 3 个及凋亡促进基因 8 个. 以梯度稀释的 DNA 模板为标准, 由附带软件 Rotor-Gene 6.0.14 在标准品相对浓度 $10^0 \sim 10^{-4}$ 范围内绘制标准曲线以及扩增曲线. 从标准曲线上读出 2 个待测样品的 CT 值 (cycle threshold), 按公式计算出 2 个样品的基因浓度 (copies). 同样方法得到 2 个样品的内参 β -actin 基因浓度 (copies), 以样品的目的基因浓度除以 β -actin 基因浓度, 即为此样品中该目的基因校正后的相对含量. 表 8 列出了 4'-甲醚-黄芩素作用于 JAR/VP16 细胞前后全部目的基因的含量, 可以清楚地反映 4'-甲醚-黄芩素作用后, 所测的 5 个耐药相关基因和 3 个凋亡抑制基因均不同程度地降低表达, 而 8 个凋亡促进基因则不同程度地升高表达. 此结果与基因芯片检测结果一致.

Table 4 Down-regulated drug-resistant genes in JAR/VP16 treated by 4'-M-S

Position	GenBank ID	Gene symbol	Gene description	Gene definition	Ratio
3	NM000392	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	MRP2	-0.000E-1
8	NM001621	AHR	Aryl hydrocarbon receptor	AHR	-0.000E-1
33	NM000767	CYP2B6	Cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	CYP2B6	-0.000E-1
76	NM013261	PPARGC1	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1	PPARGC1	-0.000E-1
6	NM001171	ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	MRP6	1.122E-2
15	NM000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	4.749E-2
1	NM000927	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	MDR1	6.807E-2
35	NM000770	CYP2C8	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	CYP2C8	1.075E-1
31	NM000499	CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1	1.225E-1
2	NM004996	ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	MRP1	1.974E-1
51	NM001437	ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	ER-beta-cx	2.042E-1
68	NM003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	KBF1	2.361E-1
69	NM002502	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	NFKB2	2.478E-1
28	NM000754	COMT	Catechol-O-methyltransferase	COMT	2.517E-1
84	NM006917	RXRG	Retinoid X receptor, gamma	RXRG	2.559E-1
49	NM000122	ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	XPB	2.579E-1
60	NM000245	MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	Met	3.019E-1
71	NM004556	NFKBIE	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	IKBE	3.034E-1
50	NM000125	ESR1	Estrogen receptor 1	ER alpha	3.063E-1
29	NM004378	CRABP1	Cellular retinoic acid binding protein 1	CRABP1	3.295E-1
61	NM002412	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	MGMT	3.945E-1
78	NM000965	RARB	Retinoic acid receptor, beta	RARB	4.238E-1
83	NM021976	RXRB	Retinoid X receptor, beta	RXR b	4.727E-1
52	NM002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	FGF2	4.783E-1

Table 5 Up-regulated drug-resistant genes in JAR/VP16 treated by 4'-M-S

Position	GenBank ID	Gene symbol	Gene description	Gene definition	Ratio
65	NM017458	MVP	Major vault protein	LRP	3.923E+1
39	NM017460	CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	CYP3A4	3.460E+1
67	NM000015	NAT2	N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)	AAC2	1.940E+1
11	NM000044	AR	Androgen receptor (dihydrotestosterone receptor, testicular feminization, spinal and bulbar muscular atrophy, Kennedy disease)	AR	1.021E+1
45	NM001979	EPHX2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	9.747E+0
34	NM000769	CYP2C19	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	CYP2C19	9.189E+0
16	NM138578	BCL2L1	BCL2-like 1	Bcl-x	8.562E+0
10	NM000038	APC	Adenomatosis polyposis coli	APC	8.001E+0
18	NM007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	BRCA1	7.938E+0
40	NM000777	CYP3A5	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	CYP3A5	7.147E+0
88	NM003839	TNFRSF11A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, activator of NFKB	Rank	6.770E+0
81	NM006509	RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	I-REL	4.001E+0
27	NM001800	CDKN2D	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	p19-INK4D	3.687E+0
53	NM005252	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-Fos	3.464E+0

					Continued
Position	GenBank ID	Gene symbol	Gene description	Gene definition	Ratio
13	NM000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	ATM	3.452E+0
48	NM005235	ERBB4	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	ERBB4	3.139E+0
38	NM000773	CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	CYP2E	3.120E+0
87	NM005420	STE	Sulfotransferase, estrogen-preferring	STE	3.114E+0
63	N59493	MRP1-ESTs	HepG2 partial cDNA, clone hmd5d04m5.	MRP1-ESTs	2.890E+0
55	NM000561	GSTM1	Glutathione S-transferase M1	GSTM1	2.479E+0
72	NM000903	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	DIA4	2.240E+0
14	NM004324	BAX	BCL2-associated X protein	Bax	2.200E+0
90	NM001067	TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha 170 ku	TOP2 alpha	2.130E+0
66	NM002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-Myc	2.017E+0

Table 6 Down-regulated apoptotic genes in JAR/VP16 treated by 4'-M-S

Position	GenBank ID	Gene symbol	Gene description	Gene definition	Ratio
38	NM001279	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	CIDE-A	-0.000E-1
55	NM006092	CARD4	Caspase recruitment domain family, member 4	Nod/CARD4	-0.000E-1
56	NM003946	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	Nop30	-0.000E-1
64	NM003844	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	TRAIL-R/DR4	-0.000E-1
68	NM003790	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	DR3/Apo3	-0.000E-1
69	NM003820	TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	TNFRSF14	-0.000E-1
76	NM001243	TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	CD30	-0.000E-1
77	NM001561	TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	4-1BB	-0.000E-1
80	NM003809	TNFSF12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	TNFSF12/APO3L	-0.000E-1
87	NM001244	TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	CD30L/CD153	-0.000E-1
88	NM003811	TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	4-1BB-L	-0.000E-1
92	NM003300	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	CRAF1	-0.000E-1
94	NM004619	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	-0.000E-1
40	NM003805	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD	7.462E-3
61	NM002947	RPA3	Replication protein A3, 14 ku	RPA3	2.219E-2
8	NM000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	5.397E-2
23	NM033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	ICE	7.323E-2
67	NM003840	TNFRSF10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	TRAIL-R4/ DcR2	8.828E-2
57	NM006825	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	p63	1.383E-1
14	NM004536	BIRC1	Baculoviral IAP repeat-containing 1	NAIP	1.487E-1
9	NM004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1	BFL1	1.493E-1
39	NM014430	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	CIDE-B	1.587E-1
43	NM004402	DFFB	DNA fragmentation factor, 40 ku, beta polypeptide (caspase-activated DNase)	DFF40/CPAN	1.867E-1
44	NM003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	FADD	2.884E-1
75	NM001242	TNFRSF7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7	CD27	3.381E-1
50	NM002341	LTB	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LT-b	3.877E-1
79	NM003701	TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	TRANCE	4.064E-1
60	NM003821	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Cardiac/Rip2	4.332E-1

Table 7 Up-regulated apoptotic genes in JAR/VP16 treated by 4'-M-S

Position	GenBank ID	Gene symbol	Gene description	Gene definition	Ratio
82	NM003807	TNFSF14	Homo sapiens tumor necrosis factor superfamily member LIGHT mRNA	HVEM-L	6.290E+2
90	NM005658	TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	TRAF1	4.192E+2
2	NM013258	ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	Asc	4.756E+1
49	NM000595	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	TNFB/LT	4.120E+1
3	NM000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	ATM	2.640E+1
91	NM021138	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	TRAF3	2.528E+1
1	NM001160	APAF1	Apoptotic protease activating factor	Apaf-1	9.653E+0
74	NM000043	TNFRSF6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	Fas/Apo-1/CD95	8.612E+0
41	NM014326	DAPK2	Death-associated protein kinase 2	DAP-kinase 2	8.526E+0
34	NM012115	CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	Flash	4.813E+0
83	NM003326	TNFSF4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34 ku)	OX40L	4.690E+0
33	NM001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	FLICE	4.640E+0
28	NM004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CPP32	3.619E+0
5	NM001188	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	Bak	3.123E+0
26	NM012114	CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine protease	Caspase 14	3.065E+0
19	NM016252	BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)	Apollon/Bruce	3.043E+0
62	NM004180	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	I-TRAF	2.665E+0
66	NM003841	TNFRSF10C	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain	TRAIL-R3/DcR1	2.550E+0
6	NM004324	BAX	BCL2-associated X protein	Bax	2.437E+0
12	NM004050	BCL2L2	BCL2-like 2	Bcl-w	2.387E+0
36	NM003879	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CASPER/FLIP	2.363E+0
11	NM006538	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BimL	2.350E+0
31	NM032992	CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	Mch2	2.124E+0
4	NM004322	BAD	BCL2-antagonist of cell death	Bad	2.042E+0
58	NM007194	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	CHK2/RAD53	2.001E+0

Table 8 Gene content in JAR/VP16 untreated or treated by 4'-M-S

Gene name	Sample name						Ratio
	JAR/VP16			JAR/VP16+4'-M-S			
	CT value	Copies	Relative gene content	CT value	Copies	Relative gene content	
β-actin	11.25	1.16E-2	—	11.01	1.33E-2	—	
MDR1	9.09	3.79E-2	3.267 2	12.76	4.50E-3	0.338 3	0.103
MRP1	16.93	1.75E-3	0.150 9	19.53	3.65E-4	0.027 4	0.182
MRP2	6.92	2.04E-1	17.586 2	15.69	1.00E-3	0.075 2	0.004
MRP6	10.54	2.05E-2	1.767 2	12.20	7.30E-3	0.548 9	0.311
COMT	16.94	2.87E-4	0.024 7	18.73	9.22E-5	0.006 9	0.279
Bcl-2	14.91	2.86E-3	0.246 6	17.43	6.37E-4	0.047 9	0.194
NAIP	15.52	1.49E-3	0.128 4	18.36	2.49E-4	0.018 7	0.146
p63	17.52	2.97E-4	0.025 6	19.64	7.94E-5	0.006 0	0.234
Apaf-1	24.10	3.68E-5	0.003 2	21.68	1.23E-4	0.009 3	2.906
Bad	13.50	5.54E-3	0.477 6	10.12	4.67E-2	3.511 3	7.352
Bak	15.82	8.37E-5	0.007 2	13.44	4.44E-4	0.033 4	4.639
Bax	27.82	6.14E-5	0.005 3	26.66	1.08E-4	0.008 1	1.528
Chk2	15.68	3.81E-3	0.328 4	14.06	9.73E-3	0.731 6	2.228
BimL	18.73	5.23E-4	0.045 1	17.33	1.19E-3	0.089 5	1.984
Caspase-3	14.14	3.06E-4	0.026 4	10.60	3.35E-3	0.251 9	9.542
Caspase-8	19.71	1.70E-4	0.014 7	17.63	6.03E-4	0.045 3	3.082

3 讨 论

肿瘤多药耐药形成机制异常复杂, 与 P-gp、MRP、LRP、BCRP、Topo II、GST、PKC、细胞凋亡、DNA 损伤修复及机体微环境、激素水平等众多因素有关, 某一肿瘤细胞的多药耐药性可能是由多种机制共同介导的, 不同肿瘤细胞对同一种药物也可能产生不同的耐药机制, 而化学逆转剂往往只针对其中的一种机制, 加之耐药可能涉及全身多系统多组织, 因而达不到理想的逆转效率. 中药具有多靶点、多阶段性特点, 可以针对肿瘤多药耐药的多种机制进行有效逆转, 此外, 多数中药单体或复方, 其自身就具有抗癌作用, 而毒副作用又较小, 因此, 中药逆转肿瘤多药耐药性、增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性研究已受到人们越来越广泛的关注.

已有文献明确指出, 许多化学结构不同、作用靶点各异的抗肿瘤药物均可诱导肿瘤细胞凋亡, 诱导凋亡可以看成是众多化疗药物杀伤肿瘤细胞的共同通路, 因此, 凋亡受抑就有可能是肿瘤细胞产生耐药的机制之一^[18,19], 这比其他关于多药耐药性发生的机制更具有普遍意义, 也更能解释为什么当肿瘤细胞对某一化疗药物产生耐药后, 对另一些从未接触过的、结构功能完全不同的化疗药物也同时产生了耐药性.

从这个思路出发, 用适当的药物促进和诱导耐药细胞凋亡, 应该是逆转肿瘤多药耐药的可行途径. 本文的前期研究发现, JAR/VP16 耐药细胞与 JAR 亲本细胞之间存在凋亡相关基因表达的差异^[5], 表现为耐药细胞中凋亡抑制基因表达升高而凋亡促进基因表达降低, 说明 JAR/VP16 细胞产生耐药性确实与凋亡格局改变有关. 另一前期结果还显示: 4'-甲醚-黄芩素对绒癌 JAR 亲本细胞具有显著的增殖抑制作用, 其作用机制是促进了细胞凋亡^[14]. 为了弄清 4'-甲醚-黄芩素是否对耐药性绒癌细胞也具有同样的凋亡促进作用, 首先测定了 4'-甲醚-黄芩素配伍化疗药物后对抑制耐药细胞增殖的增效作用, 结果显示, 5、10、20 mg/L 药液配伍 VP16、MTX 及 KSM, 对耐药细胞的增殖抑制作用明显高于该化合物与化疗药物单独作用时增殖抑制率之和, 显示了强烈的协同增效作用. 进而探讨其对耐药细胞的耐药逆转作用, 发现联合用药后, 耐药逆转倍数为 1.30~5.02 倍, 相对逆转率为 24.76%~81.19%. 显示该药不仅对造模用化疗药物

VP16 具有有效的耐药逆转作用, 对于另外 2 种化疗药物 MTX 和 KSM 也达到了较高的逆转率, 并且逆转倍数与逆转率均呈现明显的药物浓度依赖关系, 进一步以流式细胞术、超微结构观察、基因芯片及实时定量 PCR 检测等方法证实了 4'-甲醚-黄芩素对耐药性绒癌细胞确实表现出凋亡促进作用, 在超微结构改变上还有显著的浓度效应正相关性. 综合上述实验结果, 判定 4'-甲醚-黄芩素能够有效逆转 JAR/VP16 耐药细胞的多药耐药性, 这种逆转作用的机制之一是改变耐药细胞的凋亡受抑状态、促进细胞凋亡, 而且在 5、10、20 mg/L 3 个浓度中, 以 20 mg/L 的作用最为显著, 提示我们: 在低细胞毒或无细胞毒前提下, 20 mg/L 4'-甲醚-黄芩素应该是今后进一步开展绒癌耐药逆转研究的最佳浓度.

耐药相关基因表达改变与肿瘤耐药性产生以及药物逆转机制的相关性研究也受到日益广泛的关注, 以反义 RNA 技术、反义寡核苷酸技术、核酶技术以及基因敲除术为主导的基因逆转研究已开展得如火如荼, 并取得了一定的进展. 目前研究较多的是 MDR1、MRP1、MRP2、MRP6、BCRP 和 TOP2alpha 等与肿瘤耐药产生及耐药逆转直接相关的基因^[20~22]: Wu 等^[23]的研究发现, 用小干涉 RNA 技术可针对多药耐药基因 MDR1, 抑制其表达, 增加胞内药物积累, 恢复耐药细胞对药物的敏感性, 有效地逆转肿瘤细胞耐药. Kobayashi 等^[24]用带有 RNA 聚合酶 III 启动子的逆转录病毒载体将 6 种抗 MDR1 核酶导入人类耐药性白血病细胞, 结果发现, 这些细胞均不同程度地表现出化疗药物敏感性增加, 同时伴随 MDR1 基因表达降低、其产物 P 糖蛋白含量减少、P 糖蛋白的药物外排泵功能削弱. 此外, 一些与基因转录、细胞周期调控、核苷酸连接、蛋白质磷酸化有关的基因也发挥着不容忽视的作用. Hong 等^[25]的报道显示, 一种转录相关基因 ZNRD1 可以通过对次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 2 基因 (IMPDH2)、Bcl-2 基因及 MDR1 基因的调节, 逆转胃癌 SGC7901/VCR 细胞系对长春新碱的耐药性.

与上述文献研究不同的是, 本文在耐药相关基因表达与 4'-甲醚-黄芩素的耐药逆转作用相关性研究上, 并未针对某一或某些特定的基因, 而是采用基因芯片筛选结合实时定量 PCR 检测的方法, 在 96 个耐药相关基因中筛选到一批差异表达的基因, 包括上述 MDR1、MRP1、MRP2、MRP6、Bcl-2 以及其他一些耐药相关基因, 初步证明 4'-

甲醚-黄芩素对耐药细胞的逆转作用与耐药相关基因表达改变有关。并提示我们, 4'-甲醚-黄芩素逆转绒癌耐药性过程中, 可能是通过特定的途径影响一类基因的表达, 也可能是多途径地改变多种基因表达, 各基因之间可能是一种协调作用、互为影响的关系。

参考文献

- Okamoto T, Goto S. Resistance to multiple agent chemotherapy including cisplatin after chronic low-dose oral etoposide administration in gestational choriocarcinoma. *Gynecol Obstet Invest*, 2001, **52** (2): 139~141
- Atkinson D E, Greenwood S L, Sibley C P, *et al.* Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, **285**: C584~591
- Lo Y L, Liu F I, Yang J M, *et al.* Reversal of multidrug resistance to epirubicin by cyclosporin A in liposomes or intralipid. *Anticancer Res*, 2001, **21** (1A): 445~450
- Teodori E, Dei S, Scapecchi S, *et al.* The medicinal chemistry of multidrug resistance(MDR) reversing drugs. *Farmaco*, 2002, **57** (5): 385~415
- Aouali N, Eddabra L, Macadre J, *et al.* Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, **56** (1): 61~70
- Scala S, Pacelli R, Iaffaioli R V, *et al.* Reversal of adriamycin resistance by recombinant alpha-interferon in multidrug-resistant human colon carcinoma LoVo-doxorubicin cells. *Cancer Res*, 1991, **51** (18): 4898~4902
- Li B, Gou X H, Chen L, *et al.* Construction of the recombinant adenovirus vector carrying antisense multidrug resistance gene. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, **5** (1): 80~84
- 徐昌芬, 卢小东, 焦中秀, 等. 马鞭草提取液对孕早期人滋养层细胞功能影响的研究. *南京医科大学学报*, 1998, **18** (6): 504~508
Xu C F, Lu X D, Jiao Z X, *et al.* *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science)*, 1998, **18** (6): 504~508
- 徐昌芬, 卢小东, 周亚东, 等. 人早孕绒毛滋养层细胞的分离纯化及马鞭草抗早孕机理的初步研究. *解剖学杂志*, 1999, **22** (2): 137~140
Xu C F, Lu X D, Zhou Y D, *et al.* *Chinese Journal of Anatomy*, 1999, **22** (2): 137~140
- 徐珊, 焦中秀, 徐小晶, 等. 马鞭草醇提液对绒毛膜癌 JAR 细胞增殖及表皮生长因子受体表达的影响. *中国药科大学学报*, 2000, **31** (4): 281~284
Xu S, Jiao Z X, Xu X J, *et al.* *Journal of China Pharmaceutical University*, 2000, **31** (4): 281~284
- 徐昌芬, 曾群, 徐珊, 等. 马鞭草醇提液中有效部位的提取及筛选. *交通医学*, 2003, **17** (5): 604
Xu C F, Zeng Q, Xu S, *et al.* *Medical Journal of Communications*, 2003, **17** (5): 604
- 张立平, 夏邦亮, 罗莉, 等. 马鞭草 C 部位诱导人绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡分子机制研究. *中国肿瘤临床*, 2005, **32** (19): 1089~1091
Zhang L P, Xia B L, Luo L, *et al.* *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2005, **32** (19): 1089~1091
- 王家俊, 罗莉, 张立平, 等. 马鞭草 C 部位对人绒毛癌 JAR 细胞 hCG 分泌的影响和作用机制. *中国药科大学学报*, 2004, **35** (6): 569~572
Wang J J, Luo L, Zhang L P, *et al.* *Journal of China Pharmaceutical University*, 2004, **35** (6): 569~572
- Xu S, Chen Q, Xu C F. Effective component from *Verbena officinalis* L. inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma JAR cells. *J Reprod Med*, 2005, **14** (Suppl): 12~18
- 徐珊, 朱利群, 罗莉, 等. 人绒毛膜癌 JAR/VP16 多药耐药细胞株的建立及相关基因表达检测. *南京医科大学学报*, 2006, **26** (7): 485~490
Xu S, Zhu L Q, Luo L, *et al.* *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science)*, 2006, **26** (7): 485~490
- 徐珊, 邓旭坤, 陈斌, 等. 马鞭草药材中齐墩果酸、熊果酸的 RP-HPLC 测定. *南京医科大学学报*, 2006, **26** (3): 165~168
Xu S, Deng X K, Chen B, *et al.* *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science)*, 2006, **26** (3): 165~168
- 徐昌芬, 曾群, 徐珊, 等. 马鞭草提取物的制法和用途. 中国发明专利, ZL 03113474.2. 2004-12-15
Xu C F, Zeng Q, Xu S, *et al.* Extract of *Verbena officinalis* L. and its extraction and use. China patent, ZL 03113474.2. 2004-12-15
- Jia L, Allen P D, Macey M G, *et al.* Mitochondrial electron transport chain activity, but not ATP synthesis, is required for drug-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible novel mechanism of regulating drug resistance. *Br J Haematol*, 1997, **98** (3): 686~698
- Ding Z, Yang X, Pater A, *et al.* Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **270** (2): 415~420
- Laurand A, Laroche-Clary A, Larrue A, *et al.* Quantification of the expression of multidrug resistance-related genes in human tumour cell lines grown with free doxorubicin or doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres. *Anticancer Res*, 2004, **24** (6): 3781~3788
- Lee C H. Reversing agents for ATP-binding cassette (ABC) transporters: application in modulating multidrug resistance (MDR). *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2004, **4** (1): 43~52
- Choi C H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int*, 2005, **5**: 30
- Wu H, Hait W N, Yang J M. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res*, 2003, **63** (7): 1515~1519
- Kobayashi H, Takemura Y, Miyachi H. Novel approaches to reversing anti-cancer drug resistance using gene-specific therapeutics. *Hum Cell*, 2001, **14** (3): 172~184
- Hong L, Qiao T, Han Y, *et al.* ZNRD1 mediates resistance of gastric cancer cells to methotrexate by regulation of IMPDH2 and Bcl-2. *Biochem Cell Biol*, 2006, **84** (2): 199~206

Reversal Effect of 4'-Methylether-scutellarein on Multidrug Resistance of Human Choriocarcinoma JAR/VP16 Cell Line*

XU Shan¹⁾, LUO Li²⁾, ZHU Li-Qun²⁾, LI Zhuo²⁾, QIU Li-Li²⁾, CHEN Qi¹⁾, XU Chang-Fen^{2)**}

¹⁾Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

²⁾Key Laboratory of Reproductive Medicine of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract Several methods, including MTT assay, transmission electron-microscope (TEM), RT-PCR, flow cytometry, gene array and real time PCR, were used to investigate the reversal effect and potential mechanism of 4'-methylether-scutellarein from *Verbena officinalis* L. (VOL) on multidrug resistance of JAR/VP16 cells. 4'-methylether-scutellarein produced a synergistic effect combining with the chemotherapeutics and reversed the resistant phenotype of JAR/VP16 cells. TEM analysis and flow cytometry confirmed apoptotic cell features, containing earlier apoptotic modifications, increased apoptotic cell percentage and typical apoptotic peak, when JAR/VP16 cells exposed to 4'-methylether-scutellarein. The gene array results showed that expression levels of some multidrug resistant genes, *i.e.* MDR1, MRP1, MRP2, MRP6, AHR, COMT and FGF2, were decreased. The expression levels of some apoptosis-promoting genes, *i.e.* Apaf-1, ASC, ATM, Bad, Bak, Bax and BimL, were increased, whereas those of some apoptosis-suppressing genes, *i.e.* Bcl-2, BFL1, NAIP and p63, were decreased upon 4'-methylether-scutellarein treatment. Sixteen genes were selected to be detected by real time PCR, and the results were identical with those of gene array. Taken together, 4'-methylether-scutellarein can efficiently reverse multidrug resistance in JAR/VP16 cells. The potential mechanism may be *via* inhibiting the multidrug resistant gene expressions and/or promoting cell apoptosis.

Key words 4'-methylether-scutellarein, choriocarcinoma, multidrug resistance, reversal of drug resistance, apoptosis

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of the Science and Technology Department, Jiangsu Province (BK2003104), The Creative Foundation of Nanjing Medical University (CX2002002) and The High School Natural Science Foundation of Jiangsu Province (06KJB360067).

**Corresponding author. Tel: 86-25-86862904, Fax: 86-25-86862912, E-mail: cfxu@njmu.edu.cn

Received: May 9, 2006 Accepted: July 28, 2006