

五味子甲素通过 ATP 结合盒转运子 B1 逆转胶质瘤干/祖细胞耐药性研究

魏子龙 狄冲 楼美清 赵耀东

【摘要】 目的 探讨五味子甲素对胶质瘤干/祖细胞耐药性的影响及作用机制。方法 自人胶质瘤细胞系 SHG-44 中分离培养胶质瘤干/祖细胞 SHG-44s, 予五味子甲素 0、12.50、25.00 和 50.00 $\mu\text{mol/L}$ 联合长春新碱 400、800 和 1200 nmol/L , 细胞活性检测试剂盒 CCK-8 细胞毒性实验检测 SHG-44s 细胞增殖活性, 罗丹明 123 染色检测 SHG-44s 细胞泵出药物能力, 实时聚合酶链反应 (PCR) 和 Western blotting 法检测 SHG-44s 细胞 ATP 结合盒转运子 B1 (*ABCB1*) 基因转录和翻译能力。结果 五味子甲素 50 $\mu\text{mol/L}$ 即可抑制 SHG-44s 细胞增殖活性 ($P = 0.001, 0.001, 0.039$), 剔除这一浓度后无论长春新碱浓度为 400、800 或 1200 nmol/L , 联合应用五味子甲素均可抑制 SHG-44s 细胞增殖活性 (长春新碱 400 nmol/L 组: $P = 0.007, 0.001$; 长春新碱 800 nmol/L 组: $P = 0.001, 0.000$; 长春新碱 1200 nmol/L 组: $P = 0.000, 0.000$)。倒置荧光显微镜观察, 五味子甲素 12.50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞可见明显绿色荧光。流式细胞术显示, 随着五味子甲素浓度的增加, SHG-44s 细胞罗丹明 123 染色阳性细胞比例分别为 10.40%、39.20% 和 45.20%。实时 PCR 法显示, 五味子甲素 12.50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞 *ABCB1* 基因表达水平较 0 $\mu\text{mol/L}$ 组降低 ($P = 0.027, 0.006$), 尤以 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组显著 ($P = 0.034$)。Western blotting 法显示, 随着五味子甲素浓度的增加, SHG-44s 细胞 P-糖蛋白表达水平下降。结论 五味子甲素通过抑制胶质瘤干/祖细胞表面已存在的 *ABCB1* 基因编码的 P-糖蛋白泵出药物能力并降低 *ABCB1* 基因转录和翻译能力, 逆转胶质瘤干/祖细胞耐药性。

【关键词】 五味子素; ATP 结合匣式转运子; 神经胶质瘤; 肿瘤干细胞; 药物耐受性; 显微镜检查, 荧光; 流式细胞术; 聚合酶链反应; 免疫印迹法; 肿瘤细胞, 培养的

Study on schizandrin A reversing drug resistance of glioma stem/progenitor cells by ATP binding cassette subfamily B member 1

WEI Zi-long¹, DI Chong², LOU Mei-qing³, ZHAO Yao-dong³

¹Department of Neurosurgery, Shanghai Pudong Hospital, Shanghai 201399, China

²Department of Intensive Care Unit, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu, China

³Department of Neurosurgery, Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China

Corresponding author: ZHAO Yao-dong (Email: zhaoyd@aliyun.com)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of schizandrin A on drug resistance of glioma stem/progenitor cells (GSPCs) and its mechanism. **Methods** Isolate and culture SHG-44s cells from human glioma cell line SHG-44. The SHG-44s cells were treated with different concentrations of schizandrin A (0, 12.50, 25.00 and 50.00 $\mu\text{mol/L}$) and vincristine (400, 800 and 1200 nmol/L). The cell proliferative activity was measured by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Rhodamine 123 staining was used to detect the drug delivery ability of SHG-44s cells. The transcription and translation ability of ATP binding cassette subfamily B member 1 (*ABCB1*) gene of SHG-44s cells was detected by real-time polymerase chain reaction

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2017.06.009

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (项目编号: 201540412); 上海市浦东医院基金资助项目 (项目编号: 201313); 上海市浦东医院 2012 年度优秀人才“南菁奖”项目

作者单位: 201399 上海市浦东医院神经外科 (魏子龙); 221002 徐州医科大学附属医院重症医学科 (狄冲); 200080 上海市第一人民医院神经外科 (楼美清, 赵耀东)

通讯作者: 赵耀东 (Email: zhaoyd@aliyun.com)

(PCR) and Western blotting. **Results** The proliferative activity of SHG-44s cells was inhibited when the concentration of schizandrin A was 50 $\mu\text{mol/L}$ ($P = 0.001, 0.001, 0.039$), so this concentration was removed in the follow-up study. No matter the concentration of vincristine was 400, 800 or 1200 nmol/L , combining with schizandrin A could inhibit the proliferative activity of SHG-44s cells (vincristine 400 nmol/L : $P = 0.007, 0.001$; vincristine 800 nmol/L : $P = 0.001, 0.000$; vincristine 1200 nmol/L : $P = 0.000, 0.000$). Inverted fluorescence microscopy findings showed SHG-44s cells in the group of schizandrin A 0 $\mu\text{mol/L}$ rarely revealed green fluorescence, while SHG-44s cells in the groups of schizandrin A 12.50 and 25.00 $\mu\text{mol/L}$ presented obvious green fluorescence. Flow cytometry showed that with the increasing of schizandrin A concentration, the percentage of positive cells by Rhodamine 123 staining was 10.40%, 39.20% and 45.20%, respectively. Real-time PCR showed that *ABCB1* gene expression levels of SHG-44s cells in schizandrin A 12.50 $\mu\text{mol/L}$ group and 25.00 $\mu\text{mol/L}$ group were significantly decreased comparing with schizandrin A 0 $\mu\text{mol/L}$ group ($P = 0.027, 0.006$), especially in schizandrin A 25.00 $\mu\text{mol/L}$ group ($P = 0.034$). Western blotting showed that the expression level of P-glycoprotein (P-gp) in SHG-44s cells was gradually decreased with the increasing of schizandrin A concentration. **Conclusions** Schizandrin A can inhibit the drug delivery ability of P-gp coded by *ABCB1* gene existing in the surface of GSPCs. It can further reverse the drug resistance of GSPCs by reducing the transcription and translation of *ABCB1* gene.

【Key words】 Schizandrin; ATP-binding cassette transporters; Glioma; Neoplastic stem cells; Drug tolerance; Microscopy, fluorescence; Flow cytometry; Polymerase chain reaction; Immunoblotting; Tumor cells, cultured

This study was supported by Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (No. 201540412), Funded Project of Shanghai Pudong Hospital (No. 201313) and Personnel Training Program "Nanjing Award 2012" of Shanghai Pudong Hospital.

胶质瘤是临床最常见的原发性中枢神经系统肿瘤(约占50%),患者预后较差。尽管随着现代医学的发展,胶质瘤诊断与治疗技术有较大提高,但近20年患者预后并未获得显著改善,成为困扰临床医师的难题。近年来,癌症干细胞(CSCs)假说的提出和胶质瘤干/祖细胞(GSPCs)的发现,为胶质瘤的治疗提供新的切入点^[1]。研究证实癌症干细胞在肿瘤发生、发展、转移和复发中发挥关键作用^[2]。五味子甲素是从五味子果实中分离出来的具有生物活性的木脂素。国内多项研究显示,五味子粗提取物及其有效成分五味子甲素具有逆转肿瘤细胞^[3]特别是结肠癌细胞^[4]和乳腺癌细胞^[5]耐药性的作用。但是对于五味子甲素能否逆转癌症干细胞特别是胶质瘤干/祖细胞耐药性及其作用机制尚不清楚。本研究以胶质瘤干/祖细胞系 SHG-44s 为研究对象,采用细胞活性检测试剂盒(CCK-8)细胞毒性实验、罗丹明 123(Rhodamine 123)荧光染色、实时聚合酶链反应(real time-PCR)和免疫印迹法(Western blotting),探讨五味子甲素对胶质瘤干/祖细胞耐药性的影响及其作用机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 细胞系来源 人胶质瘤细胞系 SHG-44 购自

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,来源于1例32岁女性额叶星形细胞瘤(WHO II~III级)患者,经分离、体外培养、鉴定和扩增,传代129代。

2. 试剂与仪器 (1)主要试剂:五味子甲素和长春新碱购自上海源叶生物科技有限公司。罗丹明123(20 $\mu\text{g/ml}$)由上海碧云天生物技术有限公司提供。DMEM/F12无血清培养基(体积比1:1)、B27培养基添加剂和碱性纤维母细胞生长因子(bFGF, 20 ng/ml)均购自美国Gibco公司。表皮生长因子(EGF, 20 ng/ml)由美国Invitrogen公司提供。免疫试剂I抗工作液中兔抗人CD133单克隆抗体购自美国Bioworld公司,小鼠抗人巢蛋白(Nes)单克隆抗体、兔抗人ATP结合盒转运子B1(ABCB1)单克隆抗体和小鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体均购自美国Abcam公司;工作浓度均为1:1000。山羊抗兔荧光II抗和山羊抗小鼠荧光II抗购自美国Abcam公司,3H-吲哚菁染料Cy3标记的山羊抗兔IgG II抗购自美国BD Biosciences公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠IgG II抗购自美国Miltenyi Biotec公司,工作浓度均为1:2500。二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。CCK-8试剂盒由日本Dojindo化学研究所提供。(2)主要仪器:TCS SP2激光扫描共

聚焦显微镜为德国 Leica 公司产品。XDS-220C 型倒置相差显微镜购自上海蔡康光学仪器有限公司。Nikon ECLIPSE TE2000-U 型倒置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。多功能酶标仪由美国 BioTek 公司提供。FCASCalibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。Odyssey 红外双色激光成像系统由美国 LI-COR 公司提供。

二、实验方法

1. 胶质瘤干/祖细胞分离与培养 将 SHG-44 细胞置于 37 ℃、含 5% 二氧化碳的饱和湿度培养箱中培养,培养基为含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养基,细胞生长至覆盖培养瓶底部表面大部分(> 80%)时,胰蛋白酶消化后传代培养。参考文献[6]方法,将 SHG-44 细胞置于干细胞培养基[含 DMEM/F12 无血清培养基(体积比 1:1)、B27 培养基添加剂(体积比 1:50)、20 ng/ml 碱性纤维母细胞生长因子和 20 ng/ml 表皮生长因子]中培养,以 CD133 免疫磁珠分离克隆出胶质瘤干/祖细胞 SHG-44s,并经免疫组织化学检测鉴定。将 SHG-44s 细胞置于 37 ℃、含 5% 二氧化碳的饱和湿度培养箱中培养,培养基为干细胞培养基。每 3 天半量换液 1 次,7~10 d 传代 1 次,于倒置相差显微镜下观察 SHG-44s 细胞形态,传代 33 代。

2. CCK-8 细胞毒性实验检测 SHG-44s 细胞增殖活性 当干细胞培养基中 SHG-44s 细胞球生长至约 100 个细胞时(通常 4~5 d),以离心半径 5.50 cm、1000 r/min 离心 5 min,弃上清,培养基重悬细胞,吸管反复吹打,制备单细胞悬液。分别予不同浓度五味子甲素(0、12.50、25.00 和 50.00 μmol/L 共 4 组),以细胞密度为 $2 \times 10^3/100 \mu\text{l}$ 接种于 96 孔培养板,每组 3 孔。培养 72 h 后每孔加入 10 μl CCK-8 试剂,37 ℃ 恒温 3 h,于 450 nm 波长处测定光密度值(OD 值)。然后将不同浓度五味子甲素组(0、12.50 和 25.00 μmol/L 共 3 组)进一步分为 3 个亚组,每亚组各 1 孔,分别予以不同浓度长春新碱(400、800 和 1200 nmol/L),共培养 72 h,于 450 nm 波长处测定 OD 值,代表肿瘤细胞增殖活性。每孔重复 3 次,取平均值。

3. 罗丹明 123 荧光染色检测 SHG-44s 细胞泵出药物能力 将处于对数生长期的 SHG-44s 细胞制备成 $100 \times 10^3/\text{ml}$ 的细胞悬液,以细胞密度为 $200 \times 10^3/2 \text{ ml}$ 接种于 6 孔板,分别予以不同浓度五味子甲素(0、12.50 和 25.00 μmol/L),培养 48 h,以离心半径

5.50 cm、2000 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集沉淀细胞,吸管反复吹打,制备单细胞悬液。以 4 ℃ 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤($\times 3$ 次),加入 40 μg 罗丹明 123,于 37 ℃ 孵育 30 min,磷酸盐缓冲液洗涤($\times 2$ 次),流式细胞仪(激发波长 488 nm、发射波长 525 nm)计数 SHG-44s 细胞中荧光染色阳性细胞比例,倒置荧光显微镜观察 SHG-44s 细胞荧光强度。重复实验 3 次,取平均值。

4. 实时聚合酶链反应检测 ABCB1 基因表达变化 将处于对数生长期的 SHG-44s 细胞提取 RNA,逆转录合成 cDNA,进行聚合酶链反应(PCR),ABCB1 基因上游引物(P1)序列:5'-AAGGCCTAATGCCGAACACA-3'、下游引物(P2)序列:5'-GTCTGGCCCTTCTTCACCTC-3',内参照物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物序列:5'-ACGGATTTGCTCGTATTGGG-3'、下游引物序列:5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'。PCR 扩增条件:95 ℃ 10 min;SYBR Green I 荧光染色反应 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共 40 个循环;溶解曲线分析反应 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 15 s,37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。绘制实时 PCR 扩增和溶解曲线,计算目的基因相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,代表 ABCB1 基因表达水平。重复实验 3 次,取平均值。

5. Western blotting 法检测 P-糖蛋白表达变化 将处于对数生长期的 SHG-44s 细胞制备成 $100 \times 10^3/\text{ml}$ 的细胞悬液,以细胞密度为 $200 \times 10^3/2 \text{ ml}$ 接种于 6 孔板,分别予不同浓度五味子甲素(0、12.50 和 25.00 μmol/L),培养 48 h,以离心半径 5.50 cm、2000 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集沉淀细胞,向细胞沉淀中加预冷的含蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)的细胞裂解液 RIPA,0 ℃ 冰浴 5~10 min,冰上超声 2 min,以 $12000 \times g$ 离心 10 min,收集上清液,即为 P-糖蛋白(P-gp)。目标蛋白行十二烷基磺酸钠-聚苯稀酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,以质量分数为 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h,滴加兔抗人 ABCB1 单克隆抗体(1:1000)1 ml,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜($\times 3$ 次),滴加山羊抗兔 IgG II 抗(1:2500)2 ml,孵育 1 h,TBST 洗膜($\times 3$ 次),电化学发光(ECL)显色,Odyssey 红外双色激光成像系统检测目标蛋白电泳条带。重复实验 3 次,取平均值。

6. 统计分析方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm$

表 1 不同浓度五味子甲素组 SHG-44s 细胞增殖活性的比较($\bar{x} \pm s, OD_{450nm}$)

Table 1. Comparison of proliferative activity of SHG-44s cells among different concentrations of schizandrin A ($\bar{x} \pm s, OD_{450nm}$)

Group	N	Proliferation	F value	P value
Schizandrin A 0 $\mu\text{mol/L}$ (1)	3	0.99 \pm 0.03	28.677	0.001
Schizandrin A 12.50 $\mu\text{mol/L}$ (2)	3	1.04 \pm 0.07		
Schizandrin A 25.00 $\mu\text{mol/L}$ (3)	3	0.74 \pm 0.08		
Schizandrin A 50.00 $\mu\text{mol/L}$ (4)	3	0.34 \pm 0.18		

表 2 不同浓度五味子甲素组 SHG-44s 细胞增殖活性的两两比较

Table 2. Paired comparison of proliferative activity of SHG - 44s cells among different concentrations of schizandrin A

Paired comparison	q value	P value	Paired comparison	q value	P value
(1):(2)	0.899	0.145	(2):(3)	5.076	0.054
(1):(3)	4.176	0.062	(2):(4)	11.746	0.001
(1):(4)	10.847	0.001	(3):(4)	6.670	0.039

表 3 不同浓度五味子甲素联合长春新碱亚组 SHG-44s 细胞增殖活性的比较($\bar{x} \pm s, OD_{450nm}$)

Table 3. Comparison of proliferative activity of SHG - 44s cells among different concentrations of schizandrin A and vincristine ($\bar{x} \pm s, OD_{450nm}$)

Group	N	Vincristine 400 nmol/L	Vincristine 800 nmol/L	Vincristine 1200 nmol/L
Schizandrin A 0 $\mu\text{mol/L}$ (1)	3	1.00 \pm 0.02	0.99 \pm 0.01	0.88 \pm 0.03
Schizandrin A 12.50 $\mu\text{mol/L}$ (2)	3	0.73 \pm 0.08	0.54 \pm 0.06	0.42 \pm 0.04
Schizandrin A 25.00 $\mu\text{mol/L}$ (3)	3	0.46 \pm 0.03	0.43 \pm 0.04	0.37 \pm 0.01
F value		92.624	128.599	229.609
P value		0.000	0.000	0.000

表 4 不同浓度五味子甲素联合长春新碱亚组 SHG-44s 细胞增殖活性的两两比较

Table 4. Paired comparison of proliferative activity of SHG - 44s cells among different concentrations of schizandrin A combining with vincristine

Paired comparison	Vincristine 400 nmol/L		Vincristine 800 nmol/L		Vincristine 1200 nmol/L	
	q value	P value	q value	P value	q value	P value
(1):(2)	9.534	0.007	17.338	0.001	24.861	0.000
(1):(3)	19.250	0.001	21.332	0.000	27.438	0.000
(2):(3)	9.716	0.004	3.994	0.041	2.577	0.065

s)表示,采用单因素方差分析,两两比较行SNK-q检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、胶质瘤干/祖细胞增殖活性

以含不同浓度五味子甲素的干细胞培养基培养 SHG-44s 细胞,结果显示,五味子甲素 50 $\mu\text{mol/L}$ 即可抑制 SHG-44s 细胞增殖活性($P = 0.001, 0.001, 0.039$;表 1, 2)。因此,后续的研究剔除五味子甲素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组,以排除自身毒性作用。将不同浓度五味子甲素(0、12.50 和 25.00 $\mu\text{mol/L}$)和长春新碱(400、800 和 1200 nmol/L)共同作用于 SHG-44s 细胞,结果显示,无论长春新碱浓度为 400、800 或 1200 nmol/L,联合五味子甲素均可以抑制 SHG-44s 细胞增殖活性(长春新碱 400 nmol/L 组: $P = 0.007, 0.001$;长春新碱 800 nmol/L 组: $P = 0.001, 0.000$;长春新碱 1200 nmol/L 组: $P = 0.000, 0.000$;表 3, 4)。

二、胶质瘤干/祖细胞泵出药物能力

罗丹明 123 是一种能够穿透细胞膜并在细胞内蓄积的荧光染料,其荧光强度可以反映肿瘤细胞经药泵蛋白泵出药物能力。倒置荧光显微镜观察显示,五味子甲素 0 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞罕见绿色荧光,五味子甲素 12.50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞可见明显绿色荧光(图 1a ~ 1c)。流式细胞术显示,五味子甲素 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、12.50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞罗丹明 123 染色阳性细胞比例逐渐增加,分别为 10.40%、39.20% 和 45.20%(图 2a ~ 2c)。

三、胶质瘤干/祖细胞 ABCB1 基因转录和翻译能力

实时 PCR 法显示,与五味子甲素 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,五味子甲素 12.50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞 ABCB1 基因表达水平降低($P = 0.027, 0.006$),尤以五味子甲素 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组显著($P =$

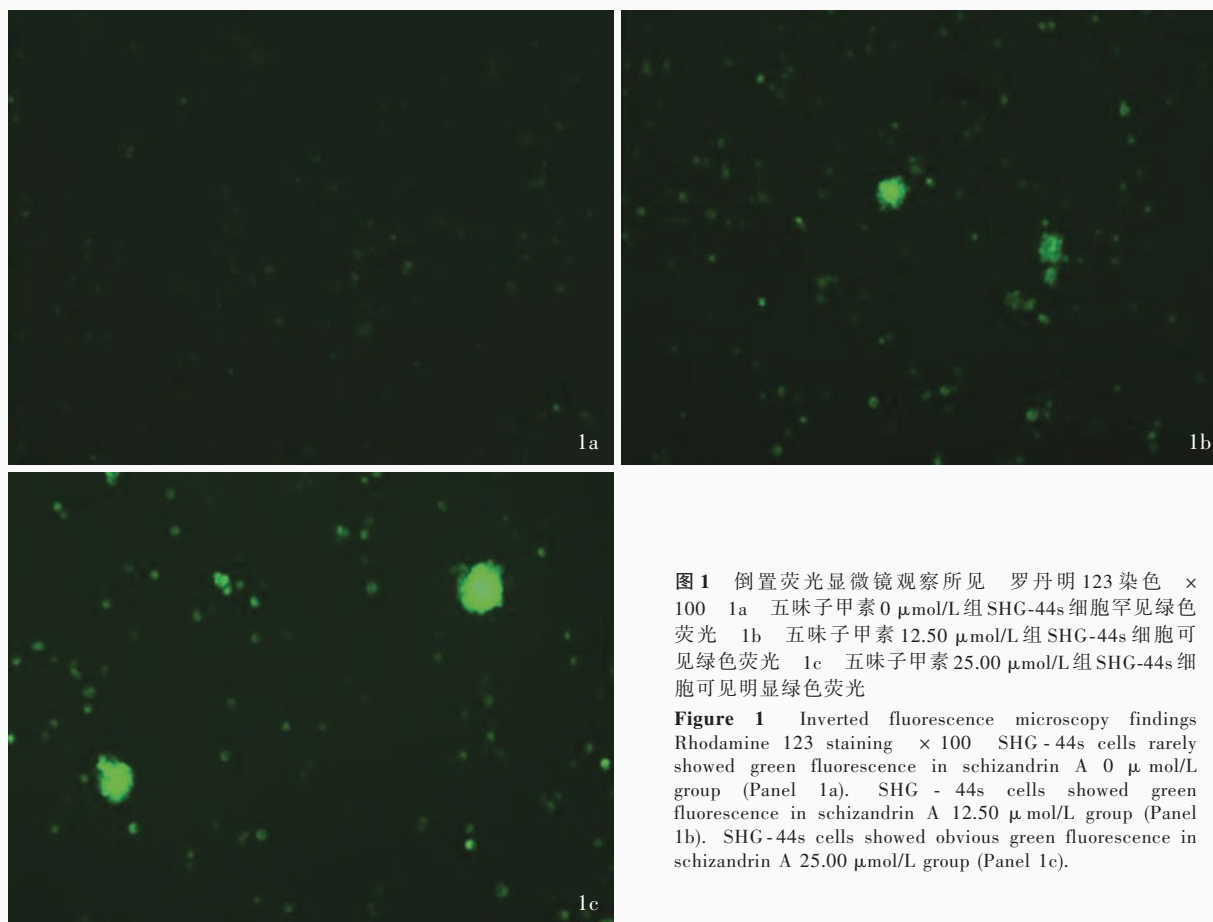


图 1 倒置荧光显微镜观察所见 罗丹明 123 染色 $\times 100$ 1a 五味子甲素 $0 \mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞罕见绿色荧光 1b 五味子甲素 $12.50 \mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞可见绿色荧光 1c 五味子甲素 $25.00 \mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞可见明显绿色荧光

Figure 1 Inverted fluorescence microscopy findings Rhodamine 123 staining $\times 100$ SHG - 44s cells rarely showed green fluorescence in schizandrin A $0 \mu\text{mol/L}$ group (Panel 1a). SHG - 44s cells showed green fluorescence in schizandrin A $12.50 \mu\text{mol/L}$ group (Panel 1b). SHG-44s cells showed obvious green fluorescence in schizandrin A $25.00 \mu\text{mol/L}$ group (Panel 1c).

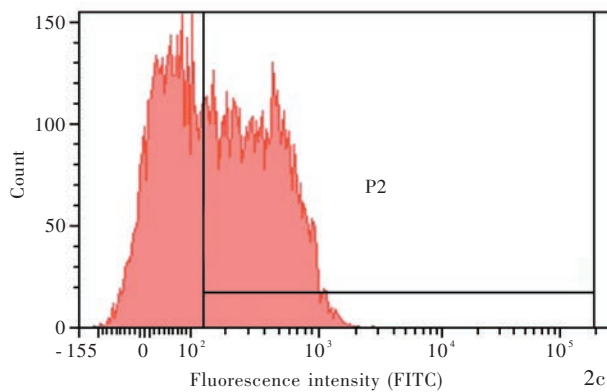
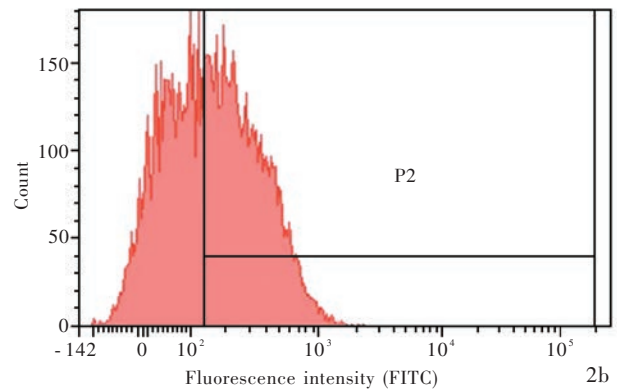
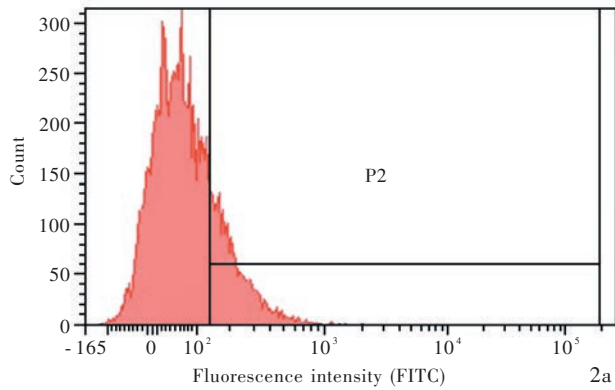
0.034), 表明随着五味子甲素浓度的增加, 对 *ABCB1* 基因的抑制作用逐渐增强 (表 5, 6)。Western blotting 法显示, 随着五味子甲素浓度的增加 (0 、 12.50 和 $25.00 \mu\text{mol/L}$), SHG-44s 细胞 P-糖蛋白表达水平逐渐降低 (图 3)。

讨 论

胶质瘤是临床常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 约占中枢神经系统肿瘤的 50%, 预后较差。随着癌症干细胞理论的提出和研究的深入, 目前认为癌症干细胞是恶性肿瘤复发的根源, 其中重要特征是放射治疗耐受性和多药耐药性 (MDR) [2]。多药耐药性系指细胞对作用不同的药物具有抗药性现象。导致癌症干细胞多药耐药性的原因有多种, 除因其常处于 G_0 期外, 还与 ATP 结合盒 (ABC) 转运蛋白高表达以及凋亡和自噬减弱等机制有关 [7-10]。ABC 转运蛋白是跨膜蛋白, 是介导多药耐药性家族的重要一员, 通过 ATP 释放的能量将药物转运至细

胞外, 避免细胞毒性作用 [11]。目前与多药耐药性有关的 ABC 转运蛋白主要包括乳腺癌耐药蛋白 (BCRP/ABCG2)、多药耐药相关蛋白 (MRP) 和 P-糖蛋白, 是肿瘤多药耐药性中最关键的途径 [12-13], 其中, ABCB1 蛋白介导的多药耐药性机制最为重要。ABCB1 蛋白作为药物泵, 可以将多种药物泵出细胞外, 使细胞内药物蓄积减少, 减轻细胞毒性作用, 从而产生多药耐药性 [14]。

国内多项研究显示, 五味子粗提取物及其有效成分五味子甲素具有逆转耐药性的作用 [3-4], 但是对于五味子甲素能否逆转肿瘤干/祖细胞 (TSPCs) 尤其是胶质瘤干/祖细胞耐药性及其作用机制尚不清楚。本研究结果显示, 低浓度五味子甲素 (0 、 12.50 和 $25.00 \mu\text{mol/L}$) 对 SHG-44s 细胞未产生明显的增殖抑制作用, 当五味子甲素达 $50 \mu\text{mol/L}$ 时方表现出增殖抑制作用, 因此本研究采用低浓度五味子甲素 (0 、 12.50 和 $25.00 \mu\text{mol/L}$) 进行实验。CCK-8 细胞毒性实验显示, SHG-44s 细胞在五味子甲素和长春新



FITC, fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素

图 2 流式细胞术所见 2a 五味子甲素 0 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞罗丹明 123 染色阳性细胞比例为 10.40% 2b 五味子甲素 12.50 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞罗丹明 123 染色阳性细胞比例为 39.20% 2c 五味子甲素 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 组 SHG-44s 细胞罗丹明 123 染色阳性细胞比例为 45.20%

Figure 2 Flow cytometry findings The percentage of positive SHG - 44s cells by Rhodamine 123 staining was 10.40% in schizandrin A 0 $\mu\text{mol/L}$ group (Panel 2a). The percentage of positive SHG - 44s cells by Rhodamine 123 staining was 39.20% in schizandrin A 12.50 $\mu\text{mol/L}$ group (Panel 2b). The percentage of positive SHG - 44s cells by Rhodamine 123 staining was 45.20% in schizandrin A 25.00 $\mu\text{mol/L}$ group (Panel 2c).

表 5 不同浓度五味子甲素组 SHG-44s 细胞 ABCB1 基因表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5. Comparison of ABCB1 expression in SHG - 44s cells among different concentrations of schizandrin A ($\bar{x} \pm s$)

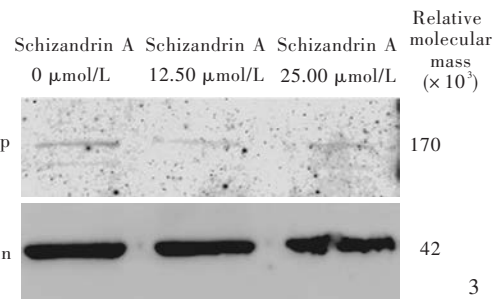
Group	N	ABCB1	F value	P value
Schizandrin A 0 $\mu\text{mol/L}$ (1)	3	1.02 \pm 0.35		
Schizandrin A 12.50 $\mu\text{mol/L}$ (2)	3	0.71 \pm 0.24	4.641	0.021
Schizandrin A 25.00 $\mu\text{mol/L}$ (3)	3	0.57 \pm 0.16		

ABCB1, ATP binding cassette subfamily B member 1, ATP 结合盒转运子 B1

表 6 不同浓度五味子甲素组 SHG-44s 细胞 ABCB1 基因表达水平的两两比较

Table 6. Paired comparison of ABCB1 gene expression in SHG-44s cells among different concentrations of schizandrin A

Paired comparison	q value	P value
(1):(2)	3.443	0.027
(1):(3)	6.077	0.006
(2):(3)	3.365	0.034



P-gp, P-glucoprotein, P-糖蛋白; β -actin, β -肌动蛋白

图 3 Western blotting 法显示, 随着五味子甲素浓度的增加 (0、12.50 和 25.00 $\mu\text{mol/L}$), SHG-44s 细胞 P-糖蛋白表达水平逐渐降低

Figure 3 Western blotting showed that the expression of P-gp in SHG-44s cells was gradually decreased with the increasing of schizandrin A concentration (0, 12.50 and 25.00 $\mu\text{mol/L}$).

碱联合作用下较单纯长春新碱增殖活性明显下降, 表明五味子甲素可以部分逆转 SHG-44s 细胞对化疗药物的耐药性。

多数细胞可以蓄积荧光染料, 如 Hoechst 33342 和罗丹明 123。ABC 转运蛋白如 ABCG2 和 ABCB1

蛋白可以通过泵出药物作用, 将二者像化疗药物一样泵出细胞外而使细胞不着色, 与普通细胞分离。这些不着色的肿瘤细胞称为侧群细胞 (SP 细胞), 研究证实多种肿瘤细胞中均存在侧群细胞 [15]。本研究对不同浓度五味子甲素组 SHG-44s 细胞进行罗丹

明 123 染色, 倒置荧光显微镜观察和流式细胞术显示, 随着五味子甲素浓度的增加, SHG-44s 细胞荧光强度增加、荧光染色阳性细胞比例增加, 表明五味子甲素可以抑制 ABCB1 蛋白泵出药物能力。

本研究采用实时 PCR 和 Western blotting 法对 ABCB1 基因及其编码的 P-糖蛋白表达变化进行检测, 结果显示, 予五味子甲素后 SHG-44s 细胞 ABCB1 基因转录和翻译能力均下降。研究显示, 尼卡地平作为多药耐药基因 ABCG2 的作用底物具有逆转其功能的作用^[13,16]。五味子甲素通过抑制胶质瘤干/祖细胞表面已存在的 ABCB1 基因编码的 P-糖蛋白泵出药物能力并降低 ABCB1 基因转录和翻译能力, 从而发挥逆转胶质瘤干/祖细胞耐药性的作用。尼卡地平与五味子甲素联合作用是否能够进一步提高胶质瘤疗效尚待进一步研究。

综上所述, 五味子甲素可以抑制胶质瘤干/祖细胞表面已存在的 ABCB1 基因编码的 P-糖蛋白泵出药物能力, 还可以通过降低 ABCB1 基因转录和翻译能力, 进一步逆转胶质瘤干/祖细胞的耐药性。

参 考 文 献

[1] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003, 63:5821-5828.

[2] Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*, 2007, 317:337.

[3] Qin XQ, Liang YG, Gao HZ, Qu HY, Dong RH, Wu XW, Li HY, Liu ZY. Reversing mechanism of schizandrin A on multidrug resistance of K562/ADR, HL60/ADR, MCF-7/ADR cell lines. *Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao*, 2011, 27:329-333. [秦小清, 梁宇光, 高洪志, 曲恒燕, 董瑞华, 吴行伟, 李海燕, 刘泽源. 五味子甲素对 K562/ADR, HL60/ADR, MCF-7/ADR 多药耐药逆转机制的研究. *中国药理学通报*, 2011, 27:329-333.]

[4] Jin XD, Xu QL, Zheng XZ, Zhang XD, Liu GL, Sun W. Reversal effect of γ -schizandrin compound on multidrug resistance of human carcinoma of colon cell THC-8307. *Yi Xue Zong Shu*, 2011, 17:1552-1554. [金秀东, 徐秋玲, 郑学芝, 张绪东, 刘桂莲, 孙卫. 复方五味子素 B 逆转多药耐药性人结肠癌细胞 THC-8307. *医学综述*, 2011, 17:1552-1554.]

[5] Li L, Wang T, Xu ZL, Yu Y, Chen W, Chen F. Effects of schizandrin B on reversing multidrug resistance in human breast cancer cells transfected with mdr1 gene. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2005, 85:1633-1637. [李凌, 王毅, 许志良, 俞颖, 陈卫, 陈菲. 五味子乙素对转染多药耐药 1 基因的 MCF-7 细胞的多药耐药逆转作用. *中华医学杂志*, 2005, 85:1633-1637.]

[6] Wang JP, Huang Q, Zhang QB, Dong J, Zhu YD, Wang AD, Lan Q. Isolation and preliminary identification of brain tumor stem cells in human glioma cell line SHG-44. *Zhongguo Zhong*

Liu Lin Chuang, 2005, 32:604-610. [王金鹏, 黄强, 张全斌, 董军, 朱玉德, 王爱东, 兰青. 人脑胶质瘤干细胞 SHG-44s 的克隆及初步鉴定. *中国肿瘤临床*, 2005, 32:604-610.]

[7] Zhang HY, Dou J. Targeted therapeutic strategy aiming at multidrug resistance genes in tumor stem cells. *Sheng Wu Ji Shu Tong Xun*, 2011, 22:269-272. [张洪义, 窦骏. 瞄准肿瘤干细胞多药耐药性基因的靶向治疗策略. *生物技术通讯*, 2011, 22:269-272.]

[8] Zhao YD, Zhang QB, Lou MQ, Huang Q. Research of PTEN mutation in glioma stem/progenitor cells. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2010, 10:646-651. [赵耀东, 张全斌, 楼美清, 黄强. PTEN 在胶质瘤干/祖细胞中变异状态的研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10:646-651.]

[9] Zhao YD, Wei ZL, Zhang QB, Lou MQ, Huang Q. Adenovirus-mediated wild-type PTEN promote glioma stem/progenitor cells autophagy activity. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2013, 13:425-430. [赵耀东, 魏子龙, 张全斌, 楼美清, 黄强. 腺病毒介导野生型 PTEN 促进胶质瘤干/祖细胞自噬活性的实验研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2013, 13:425-430.]

[10] Jeong CB, Kim HS, Kang HM, Lee YH, Zhou B, Choe J, Lee JS. Genome-wide identification of ATP-binding cassette (ABC) transporters and conservation of their xenobiotic transporter function in the monogonot rotifer (*Brachionus koreanus*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2017, 21:17-26.

[11] Donnemberg VS, Donnemberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45:872-877.

[12] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des*, 2006, 12:273-286.

[13] Jin Y, Bin ZQ, Qiang H, Liang C, Hua C, Jun D, Dong WA, Qing L. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135:1369-1376.

[14] Lopes-Rodrigues V, Oliveira A, Correia-da-Silva M, Pinto M, Lima RT, Sousa E, Vasconcelos MH. A novel curcumin derivative which inhibits P-glycoprotein, arrests cell cycle and induces apoptosis in multidrug resistance cells. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25:581-596.

[15] Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Nucleotide binding, ATP hydrolysis, and mutation of the catalytic carboxylates of human P-glycoprotein cause distinct conformational changes in the transmembrane segments. *Biochemistry*, 2007, 46:9328-9336.

[16] Lou M, Zhao Y. Satisfactory therapy results of combining nimustine with nicardipine against glioma at advanced stage. *J Cancer Res Ther*, 2015, 11:1030.

(收稿日期: 2017-05-08)

本期广告目次

替莫唑胺胶囊(天士力制药集团 股份有限公司)	封二
申捷(齐鲁制药有限公司)	封三
恩必普(石药集团恩必普药业有限公司)	封四