

黄连解毒汤中黄酮成分逆转 K562/ADM 多药耐药的实验观察

盛国良¹, 林潇¹, 孙付军², 李贵海^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

〔摘要〕 目的:观察黄连解毒汤中黄酮成分逆转肿瘤多药耐药的作用,探讨本方逆转肿瘤多药耐药的物质基础。方法:以人慢性粒细胞白血病红白血病细胞株 K562 的耐阿霉素(adriamycin,ADM)细胞株(K562/ADM)为细胞系,通过 MTT 实验观察黄芩苷、京尼平苷对 K562/ADM 细胞 ADM 的敏感性的影响,计算细胞增殖抑制率、半数抑制浓度(IC₅₀)及耐药逆转倍数,并对细胞内 ADM 浓度变化进行测定。结果:黄芩苷、京尼平苷均能部分逆转 K562/ADM 细胞。黄芩苷、京尼平苷的 IC₅₀ 值分别为 5.06, 6.74 mg·L⁻¹。黄芩苷、京尼平苷的耐药逆转倍数分别为 1.95,1.46 倍。与相应的对照组相比,K562/ADM 细胞经黄芩苷(50 mg·L⁻¹)、京尼平苷(100 mg·L⁻¹)作用后,细胞内 ADM 的荧光强度高于对照组,其中黄芩苷组提高到 3.6%,京尼平苷组提高到 1.7%。结论:黄连解毒汤逆转肿瘤多药耐药的物质基础可能与其含有的黄芩苷、京尼平苷有关。

〔关键词〕 黄连解毒汤; 黄酮成分; 多药耐药; K562/ADM

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0217-03

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121011.1704.002.html>

〔网络出版时间〕 2012-10-11 17:04

Study on the Flavonoid of Huanglian Jiedu Decoction in Reversing MDR of K562/ADM

SHENG Guo-liang¹, LIN Xiao¹, SUN Fu-jun², LI Gui-hai^{2*}

(1. Shandong Traditional Chinese Medicine University, Ji'nan 250014, China;

2. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To observe the effect on the flavoniod of Huanglian Jiedu decoction, and discuss its material base in reversing multiple-drug resistance (MDR) of cancer so as to provide the theory basis for Huanglian Jiedu decoction in clinical practices. **Method:** MTT assay was adopted to test the sensitivity of baicalin and geniposide to adriamycin (ADM) of K562/ADM, the inhibitory rate was calculated, the value of 50% inhibition concentration (IC₅₀) and the multiple of the reversal of drug resistance as well as the change of the concentration of the intracellular ADM were assayed by using ADM K562/ADM of human chronic myelogenous leukemia (CML) erythroleukemia K562 as cell line. **Result:** Both baicalin and geniposide could partly reverse K562/ADM cell. The value of IC₅₀ of baicalin and geniposide was 5.06 mg·L⁻¹ and 6.74 mg·L⁻¹ respectively. The multiple of the reversal of drug resistance of baicalin and geniposide was 1.95 times and 1.46 times. The fluorescence intensity of the intracellular K562/ADM was higher than the control group, and the fluorescence intensity in the group of baicalin rised to 3.6%, The fluorescence intensity of the group of geniposide rise to 1.7%. **Conclusion:** The material base of the Huanglian Jiedu decoction in reversing MDR of cancer is probably related to its components baicalin and geniposide.

〔Key words〕 Huanglian Jiedu Decoction; flavonoid; MDR of cancer; K562/ADM

〔收稿日期〕 20120426(002)

〔基金项目〕 山东省自然科学基金项目(Y2005C57)

〔通讯作者〕 * 李贵海,研究员,从事中药抗肿瘤研究,Tel:0531-82949803

黄连解毒汤源于唐代《外台秘要》，由黄连、黄芩、黄柏和栀子 4 味药组成，系清热解毒的代表方，具有清热解毒之功效，主治实热火毒证。其主要含有生物碱、黄酮和萜类成分^[1]。我们和其他学者的研究证明生物碱、黄酮和部分萜类物质具有逆转肿瘤细胞多药耐药的作用^[2]。根据黄连解毒汤处方功效和处方药物特点，有实验观察到了黄连解毒汤的 70% 乙醇总提取物，可以明显降低经化疗诱导的耐药小鼠肿瘤细胞耐药基因 P170 和 TOPO II 的表达率，降低率达 50% 以上，同时增强了耐药肿瘤对化疗药物的化疗敏感性^[3]。因此认为黄连解毒汤逆转肿瘤多药耐药是可行的。本文对黄连解毒汤中黄酮成分逆转人慢性粒细胞白血病红白血病细胞株 K562 的耐阿霉素 (adriamycin, ADM) 细胞株 (K562/ADM) 多药耐药进行实验观察，以探讨本方逆转肿瘤多药耐药的物质基础，为临床应用黄连解毒汤逆转肿瘤多药耐药提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞系和培养基 K562/ADM 由山东省医学科学院基础所免疫室提供。RPMI-1640 (GIBCO 产品) 用三蒸水完全溶解，加入规定量的 NaHCO₃ 和 Hepes (华美公司产品)，0.22 μm 微孔滤膜，过滤除菌，4℃ 保存备用。小牛血清购自杭州四季青公司，56℃ 水浴 30 min 灭活，4℃ 保存备用。

1.2 试剂 黄芩苷、京尼平苷由山东省中医药研究院提供 (纯度 >90%)，ADM 系浙江海正药业股份有限公司产品，RPM1640 稀释至 1 g·L⁻¹ 贮存液，-20℃ 保存。MTT、DMSO 购自 Sigma 公司，MTT 以 PBS 溶液配制成 5 g·L⁻¹，0.45 μm 滤器过滤分装，4℃ 避光保存。

1.3 仪器 超净工作台 (苏州净化设备厂产品)，WJ-6C 型 CO₂ 培养箱 (日本 HIRASAWA 公司产品)，Hettch Vniieisal 16R 低温高速离心机 (德国)，ULTRA 型低温冰箱 (日本 SONY 公司产品)，流式细胞仪 (美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及药物处理 K562/ADM 细胞以含 10% 新生牛血清、100 mg·L⁻¹ 青霉素、100 mg·L⁻¹ 链霉素、300 mg·L⁻¹ L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液常规传代培养，在 37℃，5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。定期加入 ADM (1 mg·L⁻¹) 以刺激 mdrl/P-gp 持续高表达。无 ADM 培养基继续培养 2 周后用于实验。

2.2 MTT 实验检测化学药物敏感性^[4] 对数生长

期 K562/ADM 细胞培养液中分别加入 10 mg·L⁻¹ 黄芩苷、20 mg·L⁻¹ 京尼平苷共孵育 72 h 后，以 5 × 10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔板，每孔 100 μL。分别加入 0.2, 0.4, 0.8 mg·L⁻¹ 的 ADM，预留不加药物的阴性对照孔和只加 RPMI1640 培养基的空白对照孔，37℃，5% CO₂ 条件下培养 24, 48, 72 h 后，每孔加 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μL，继续培养 4 h，2 000 r·min⁻¹ 10 min 离心，加二甲亚砜每孔 150 μL，充分震荡，使细胞溶解，酶标仪 (Bio-Rad550) 测定 570 nm 至 630 nm 波长吸光度 (A)。每组 3 个复孔，同时设不加药的阴性对照组和调零孔。测定每孔的 A，计算细胞增殖抑制率、半数抑制浓度 (IC₅₀) 及耐药逆转倍数。

2.3 细胞内 ADM 浓度变化的测定 与 50 mg·L⁻¹ 黄芩苷与 100 mg·L⁻¹ 京尼平苷共培养 72 h 后，K562/ADM 细胞按 1 × 10⁵ 个/mL 密度与 1 mg·L⁻¹ 的 ADM 37℃ 共同孵育 1 h 后，冰浴终止 ADM 作用。冷 PBS (4℃，0.01 mol·L⁻¹ pH 7.4) 洗涤 2 次，再重悬于冷 PBS 中，4℃ 下保存至上样行流式细胞仪检测 (激发波长 488 nm，接收波长 575 nm)。以未经处理的 K562/ADM 细胞为对照。

2.4 统计学处理方法 每组实验重复 3 次，所有数据均用 SPSS 13.0 统计软件分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，百分率比较用 χ^2 检验，组间比较用方差分析 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩苷、京尼平苷对 K562/ADM 细胞 ADM 敏感性的影响 黄芩苷组，京尼平苷组，空白对照组的 K562/ADM 细胞的 IC₅₀ 分别为 5.06, 6.74, 9.85 mg·L⁻¹，耐药逆转倍数为 1.95, 1.46 倍。体外作用 48 h 后，0.2 mg·L⁻¹ ADM 对应的未加中药单体组，黄芩苷组，京尼平苷组的增殖抑制率分别是 (6.61 ± 1.8)%，(48.35 ± 2.26)%，(41.68 ± 1.31)%。而 0.4 mg·L⁻¹ ADM 对应的未加中药单体组，黄芩苷组，京尼平苷组的增殖抑制率分别是 (15.24 ± 2.86)%，(44.2 ± 1.93)%，(45 ± 2.36)%，(表 1)。

表 1 黄芩苷、京尼平苷对 K562/ADM 细胞 ADM 敏感性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	增殖抑制率/%	
		0.2 mg·L ⁻¹ ADM	0.4 mg·L ⁻¹ ADM
空白对照	9.85	6.6 ± 1.8	15.24 ± 2.9
黄芩苷	5.06	48.4 ± 2.3 ¹⁾	44.2 ± 2.0 ¹⁾
京尼平苷	6.74	41.7 ± 1.3 ¹⁾	45.0 ± 2.4 ¹⁾

注：与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 黄芩苷、京尼平苷对 K562/ADM 细胞内 ADM 的影响 利用流式细胞仪检测细胞内阿霉素荧光强度的改变。与相应的对照组比,K562/ADM 细胞经黄芩苷($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、京尼平苷($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)作用后,细胞内 ADM 的荧光强度高于对照组,其中黄芩苷组提高到 3.6%,京尼平苷组提高到 1.7%,说明 K562/ADM 细胞经中药处理后,细胞内 ADM 的蓄积明显增加。见图 1。

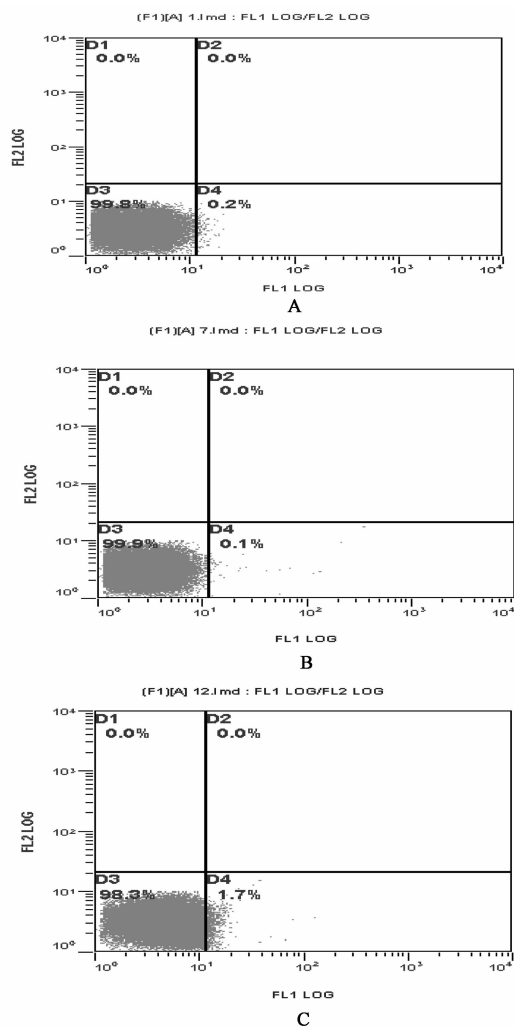
方剂逆转肿瘤多药耐药仍缺乏系统性的基础研究,因此开展中药特别是传统中药方剂逆转肿瘤细胞多药耐药的物质基础研究,对于中药应用于逆转肿瘤多药耐药具有重要意义。本文采用人慢性粒细胞白血病红白血病细胞株 K562 的耐阿霉素(adriamycin, ADM)细胞株 K562/ADM,通过体外细胞培养来观察黄连解毒汤中黄酮成分逆转肿瘤多药耐药的作用,探讨本方逆转肿瘤多药耐药的物质基础,为临床应用黄连解毒汤逆转肿瘤多药耐药提供理论依据。

在本实验中,分别将 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩苷、 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 京尼平苷加入 K562/ADM 细胞培养液中共孵育 72 h 后,黄芩苷、京尼平苷、空白对照组对 K562/ADM 细胞的 IC_{50} 值分别为 $5.06, 6.74, 9.85\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,耐药逆转倍数分别为 1.95,1.46 倍。体外作用 48 h 后, $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ADM 对应的未加中药单体组、京尼平苷和黄芩苷的增殖抑制率分别是 $(6.61 \pm 1.8)\%$ 、 $(41.68 \pm 1.31)\%$ 和 $(48.35 \pm 2.26)\%$ 。而 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ADM 对应的未加中药单体组、京尼平苷和黄芩苷的增殖抑制率分别是 $(15.24 \pm 2.86)\%$ 、 $(45 \pm 2.36)\%$ 和 $(44.2 \pm 1.93)\%$,且细胞内 ADM 浓度比对照组提高,说明黄芩苷及京尼平苷可以提高耐药细胞对化疗药物的敏感性。提示黄连解毒汤逆转肿瘤多药耐药的物质基础可能与其含有的黄芩苷、京尼平苷有关,并为深入研究逆转 MDR 的药物及临床中西医结合治疗白血病提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 洪筱坤,王凌,王智华. 黄连解毒汤中生物碱的多组分分析研究[J]. 上海中医药大学学报,1999,13(2):51.
- [2] 李贵海,孙付军. 不同中药生物碱逆转小鼠 S180 肿瘤多药耐药细胞 MDR、P170 过度表达与调节细胞凋亡的相关性[J]. 中成药. 2006,28(7):101.
- [3] 李贵海,孙付军. 黄连解毒汤醇提物预防给药对 MDR 模型小鼠相关基因表达产物的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(18):1906.
- [4] 杨国武,党琦,李新民,等. 天佛参逆转 K562/ADM 细胞株耐药性的作用及机制探讨[J]. 现代中西医结合杂志,2002,11(19):1865.

[责任编辑 聂淑琴]



A. 空白对照组;B. 黄芩苷 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;

C. 京尼平苷 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图1 黄芩苷、京尼平苷对 K562/ADM 细胞内 ADM 的影响

4 讨论

目前对于中药,特别是突出中医药特色的中药