

补中益气汤含药血清同 siRNA
对 A549/DDP 细胞 MRP 表达影响的比较

井欢¹,唐莹²,于丹³,刘春英^{*}
(辽宁中医药大学,沈阳 110032)

[摘要] **目的:**观察补中益气汤含药血清对人肺腺癌耐顺铂药细胞株(A549/DDP)多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein,MRP)表达的影响,并将结果同小分子干扰RNA(small interfering RNA,siRNA)技术特异性沉默MRP基因相比较。**方法:**采用血清药理学方法制备含药血清,随机对照法将18只SD大鼠分为空白对照组(给生理盐水10 mL·kg⁻¹),补中益气汤高、低剂量组(11.34,2.84 g·kg⁻¹,10 mL·kg⁻¹),每日ig给药1次,连续3 d后制备补中益气汤药含药血清,使用siRNA转染A549/DDP细胞,取处于对数生长期细胞于6孔板中,每孔加40 μL质粒(0.1 g·L⁻¹),24 h后,利用RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)技术检测MRP mRNA的表达和蛋白质印迹法(Western blot)技术检测MRP蛋白表达。实验分组为:空白对照组、补中益气汤含药血清低、高剂量处理组和MRP siRNA处理组。**结果:**与空白对照组相比,补中益气汤含药血清低、高剂量处理组和MRP siRNA处理组的MRP mRNA及蛋白表达均减少,具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**补中益气汤含药血清能降低A549/DDP细胞上的MRP蛋白表达,且同特异性沉默MRP基因后效果类似。

[关键词] 小分子干扰RNA技术;补中益气汤;人肺腺癌耐顺铂药细胞;多药耐药相关蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0150-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014080150

To Compare Effect of Buzhong Yiqi Decoction Serum with
siRNA on MRP Expression of A549/DDP Cells

JING Huan¹, TANG Ying², YU Dan³, LIU Chun-ying^{*}
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[收稿日期] 20131114(023)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072743);辽宁省教育厅项目(2010355)

[第一作者] 井欢,博士,副教授,从事中药免疫调节,中药抗肿瘤相关工作,Tel:024-31207060,E-mail:2974907780@qq.com

[通讯作者] *刘春英,博士,教授,从事中药抗肿瘤作用及机制相关工作,Tel:024-31207061,E-mail:chunying99@163.com

[9] Swaminathan K, Kumar S M, Clemens D L, et al. Inhibition of CYP2E1 leads to decreased advanced glycated end product formation in high glucose treated ADH and CYP2E1 over-expressing VL-17A cells [J]. Biochim Biophys Acta,2013,1830(10):4407.

[10] 周宜强. 帕宋胶囊临床应用举隅 [J]. 世界中医药, 2008,3(5):294.

[11] 周东方,魏峰,周俊英. 腺苷酸激活蛋白激酶在大鼠乙醇性肝病中的表达减少 [J]. 基础医学与临床, 2012,32(10):1154.

[12] Okiyama W, Tanaka N, Nakajima T, et al. Polyenephosphatidylcholine prevents alcoholic liver disease in PPAR alpha-null mice through attenuation of increases in oxidative stress [J]. J Hepatol, 2009, 50(6):1236.

[13] Sid B, Verrax J, Calderon P B. Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(2):200.

[14] Shearn C T, Smathers R L, Jiang H, et al. Increased dietary fat contributes to dysregulation of the LKB1/ AMPK pathway and increased damage in a mouse model of early-stage ethanol-mediated steatosis [J]. J Nutr Biochem, 2013(8):1436.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To compare the effect of Buzhong Yiqi decoction serum with small interfering RNA (siRNA) on the multidrug resistance-associated protein (MRP) expression of A549/DDP lung drug resistance cells. **Method:** Buzhong Yiqi decoction serum was prepared. 18 rats were divided into the blank group (normal saline, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), high ($11.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low ($2.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) dose groups of Buzhong Yiqi decoction. At the end of the 3th day serum was obtained. siRNA was used to silence MRP gene into A549/DDP cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analyses were performed for MRP mRNA, and MRP expression in A549/DDP cells. Cells were randomized into control groups; Buzhong Yiqi decoction lower does groups; Buzhong Yiqi decoction higher does groups, and MRP siRNA groups. **Result:** This study showed that three treatment groups could significantly decreased the MRP mRNA expression, and the expression of MRP at the level of protein ($P < 0.05$). **Conclusion:** These results suggest the Buzhong Yiqi decoction serum could decrease the expression of MRP in A549/DDP cells, and has similar effect with siRNA-mediated specific gene silencing in A549/DDP cells.

[Key words] siRNA; Buzhong Yiqi decoction; A549/DDP cell; MRP

目前肺癌 (carcinoma of the lungs) 的发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[1],严重影响人类健康。由于手术切除率低,应用顺铂进行化疗成为常用治疗方案,但存在有效率不高的问题,主要原因与肿瘤细胞产生耐药性有关^[2]。但随之而来的如头晕、呕吐、厌食、无力等副作用,也常导致化疗失败^[3]。补中益气汤出自金代名医李东垣《脾胃论》,为经典复方,近年来,大量研究发现它在对抗肿瘤化疗副作用,治疗肺癌中具有重要作用^[4]。多药耐药相关蛋白 (MRP) 增多,是导致肺癌耐药的主要参与机制之一^[5],该蛋白的大量表达可作为顺铂耐药发生的标记物。本实验主要观察补中益气汤含药血清对人肺腺癌耐顺铂药细胞 (A549/DDP 细胞) MRP 表达的影响,并将结果同小分子干扰 RNA (siRNA) 技术特异性沉默 MRP 基因相比较,旨在探讨该方药抗肿瘤的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,体重 (200 ± 20) g,购自辽宁中医药大学动物部,动物许可证号 2012-0012 号。

1.2 细胞 人肺腺癌耐顺铂 A549/DDP 细胞购自中国科学院肿瘤医院中心细胞库 (北京)。

1.3 药品与试剂 根据 2010 年版《中国药典》中规定补中益气汤的用药剂量 (黄芪 18 g,白术 9 g,柴胡 6 g,甘草 9 g,人参 6 g,当归 3 g,陈皮 6 g,升麻 6 g),常规煎煮,由辽宁中医药大学附属医院药剂科提供 (计算出大鼠等效剂量为 $0.576 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。RPMI 1640 培养基 (鼎国产品批号 CC0031);胎牛血清 (Hyclone 产品,SH30084.03),siRNA 由北京鼎国公司设计合成;脂质体转染试剂及反转录试剂均购

于北京鼎国公司。

1.4 仪器 凝胶成像分析仪和电转仪 (Bio-Rad 产品);DYY-8C 双稳数显电泳仪 (北京六一仪器厂);荧光定量 PCR 仪 (ABI9700);Q-5000 紫外分光光度计 (Quwell)。

2 方法

2.1 含药血清提取 随机对照法将 18 只 SD 大鼠分为空白对照组 (生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),补中益气汤高、低剂量组 ($11.34, 2.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}, 10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),每日 ig 给药 1 次,连续 3 d,末次给药 1 h 后,动物麻醉状态下,腹主动脉采血,置无菌管,静置 30 min 后,离心,取上清,56 ℃ 水浴灭活,于超净台上过滤除菌,分装, -20 ℃ 冰箱冻存备用。

2.2 细胞培养及设计合成转染 siRNA A549/DDP 细胞采用 10% 胎牛血清培养,放置在含 5% CO_2 , 37 ℃ 饱和湿度的培养箱中保存,胰蛋白酶消化,挑选细胞均处于对数生长期进行传代培养及实验操作。根据碱基互补原则及 siRNA 设计原则,参考 MRP 基因在 GeneBank 中的序列合成 29 个碱基组成的 siRNA,引物序列上游引物:5'-CCTGTCTCAA TCTCCTGCTTCTTCTGCTC-3',下游引物:5'-CTGTCTCAAGAGCAGAAGAAGCAGGAGA-3',排除同源性。取处于对数生长期的 A549/DDP 细胞,按试剂盒说明进行转染实验,实验分组为:空白对照组 (B),补中益气汤含药血清低剂量组 (BL),补中益气汤含药血清高剂量处理组 (BH) 和 MRP siRNA 处理组 (S)。空白对照组细胞正常培养,不转染,加入 10% 空白血清;BL 组在细胞生长至 70% 时更换含 10% 补中益气汤高剂量含药血清的完全培养基;BH 组在细胞生长至 70% 时更换含 10% 补中益气汤低

剂量含药血清的完全培养基;S 组在细胞生长至 70% 时,加入 10% 空白血清,按试剂盒说明方法进行转染。以上每组均培养 24 h 后用于后续实验,用 6 孔板进行操作,每组 3 个复孔,重复 3 次。

2.3 RT-PCR 检测 mRNA 表达 Trizol 一步法分别提取各组细胞的总 RNA,逆转录成 cDNA,PCR 扩增出 MRP 和内参片段。引物序列为 MRP 上游引物:5'-GGACCTGGACTTCGTTCTCA-3',下游引物:5'-CGTCCAGACTTCTTCATCCG-3'; β -actin 上游引物:5'-ACTACCTCATGAAGATCCTGA-3', β -actin 下游引物:5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3'。按试剂盒说明进行 PCR 反应,反应结束后,将 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,于紫外透射仪上观察结果,以 β -actin 为内参照,用反应产物的吸光度与其比值表示该基因相对表达的强度,实验分组为:B 组、BL 组、BH 组和 S 组。实验重复 3 次。

2.4 免疫细胞化学法检测 MRP 蛋白表达 取对数生长期的 A549/DDP 细胞,0.25% 胰酶消化后,接种于置有盖玻片的 24 孔板中,实验分组为:B 组、BL 组、BH 组和 S 组。细胞培养 48 h 后取出盖玻片,4% 多聚甲醛固定,3% H_2O_2 孵育 20 min,山羊血清封闭 30 min,滴加一抗 4℃ 在湿盒中孵育过夜。生物素标记二抗,作用 30 min 后,DAB 显色剂显色,苏木素复染,常规处理后,封片。采用 Quantity One 图像分析软件进行分析,以细胞浆/膜或核中出现粗细一致的棕黄色颗粒作为阳性,随机取 5 个视野,在 400 倍高倍镜下,计数细胞,测出阳性反应细胞的总面积(area)和平均吸光度(A)。实验重复 3 次。

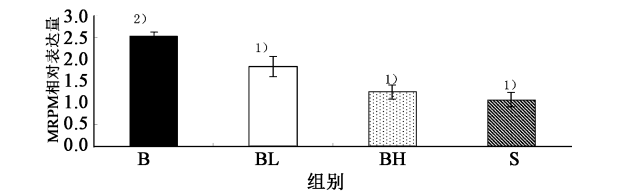
2.5 检测细胞中 MRP 蛋白表达 分别搜集 B 组、BL 组、BH 组和 S 组细胞,按试剂盒说明提取总蛋白,灌制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,常规电泳,转膜,封闭,一抗(1:1 000),4℃ 孵育过夜,二抗(1:2 000),室温孵育 2 h,在暗室发光,扫描图像后,用 Quantity One 软件测定各条带的吸光度分析结果,采用所测的 MRP 条带与 β -actin 吸光度值的比值表示该蛋白的相对表达强度。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件,单因素方差分析方法进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 A549/DDP 细胞 MRP mRNA 表达的影响 将 RT-PCR 检测结果进行单因素方差分析,同 B 组相比,BL 组、BH 组和 S 组差异均差异均有统计学意义($P < 0.05$),参照 B 组,其余 3 组 mRNA 表达强度

均减少,说明高低剂量的补中益气汤含药血清及 siRNA 均可以抑制 MRP mRNA 表达;BL 组同 BH 组比较无显著差别,见图 1。



B. A549/DDP 10% 空白血清组;10% 含药血清
BL. A549/DDP 补中益气汤 2.84 g·kg⁻¹ 组;BH. A549/DDP 补中益气汤 11.34 g·kg⁻¹ 10% 含药血清组;S. MRP siRNA (0.1 g·L⁻¹) 处理组(图 2~4 同);与 B 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 BL 比较²⁾ $P < 0.05$ (图 4 同)

图 1 10% 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞中 MRP mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

3.2 对 A549/DDP 细胞 MRP 蛋白表达的影响

3.2.1 免疫细胞化学法 MRP 蛋白于细胞膜和细胞浆中表达较多,S 组中胞质棕黄色,深染,有大量棕黄色颗粒,表达呈强阳性;其余 3 组仅局部细胞胞质呈棕黄色,表达明显降低且差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明高低剂量的补中益气汤含药血清及 siRNA 均可以抑制 MRP 蛋白表达;BL 组同 BH 组比较无差别,说明补中益气汤含药血清对 MRP 蛋白的抑制作用不呈浓度依赖。具体 A 及蛋白表达情况参见表 1,图 2。

表 1 10% 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞上的 MRP 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	平均吸光度/A
空白对照(B)	38.03 ± 6.74 ²⁾
补中益气汤含药血清低剂量组(BL)	29.05 ± 8.59 ¹⁾
补中益气汤含药血清高剂量组(BH)	25.25 ± 6.37 ¹⁾
MRP siRNA 组(S)	19.74 ± 2.63 ¹⁾

注:与 B 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 BL 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2.2 Western blot 检测 同 B 组相比,BL 组、BH 组和 S 组差异均有统计学意义($P < 0.05$),参照 B 组,其余 3 组 MRP 蛋白表达强度均减少,说明高、低剂量的补中益气汤含药血清及 siRNA 均可以抑制 MRP 表达;BL 组同 BH 组比较无显著差别。具体条带及数值参见图 3,4。

4 讨论

随着现代医学技术的不断发展,人们认识到化疗失败的原因与肿瘤细胞对所应用药物产生耐药有关^[2],经典耐药剂存在毒副作用大之缺点,所以在临床使用率不高。目前已报道了百余种具有免疫调

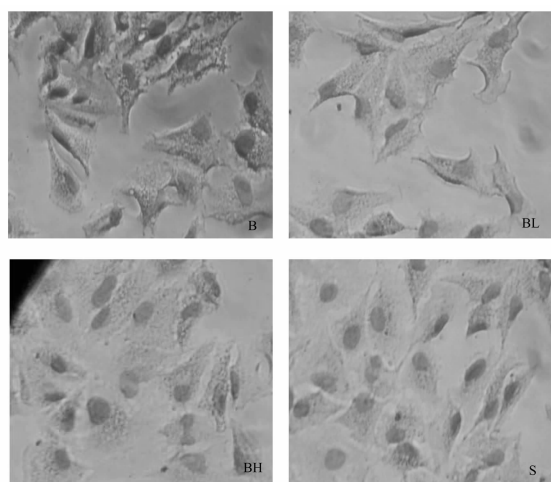


图 2 10% 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞中 MRP 蛋白表达的影响 (×400)

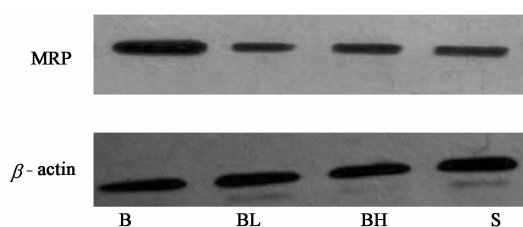


图 3 10% 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞中 MRP 蛋白表达的影响 (Western blot)

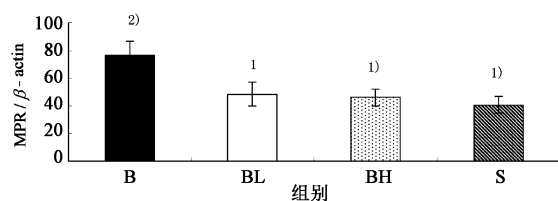


图 4 10% 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞中 MRP 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

节、抗肿瘤等多种生理活性的中药^[6],有的已在临床用于肿瘤心血管等疾病的辅助治疗和康复,已有大量药理和临床应用表明,这些功能确切的物质,其原生药大多属于补益类中药^[7]。补中益气汤作为补益剂的经典方之一,健脾益气,扶正祛邪,具有良好的临床实际效果^[4]。MRP 蛋白的相对分子质量为 170 kD,属于跨膜转运糖蛋白。当细胞内药物浓度升高时,发挥外排作用,依赖 ATP 将部分药物排出体外,降低细胞内药物浓度,导致细胞耐药。作为重要的载体蛋白之一,中药可影响对其表达产生影响^[8-9]。本实验创新使用毒副作用小的补中益气汤为研究对象,研究该复方药物对 MRP 蛋白表达的影响,并将结果同 siRNA 结果相比较,实验结果表明高低剂量的补中益气汤含药血清及 siRNA 均

可以抑制 MRP 的 mRNA 表达,同时补中益气汤含药血清高剂量组同补中益气汤含药血清低剂量组比较并无差别,说明补中益气汤含药血清对 MRP 的 mRNA 的抑制作用不呈浓度依赖。并且高低剂量的补中益气汤含药血清及 siRNA 均可以抑制 MRP 的蛋白表达,补中益气汤含药血清对 MRP 蛋白的抑制作用不呈浓度依赖,与基因结果趋于一致。由此可见,补中益气汤含药血清的作用机制可能与沉默 MRP 后,降低了该蛋白表达,从而减少了药物外排功能有关。本研究结果可为探索肺癌耐药奠定研究基础,具体机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Yamamoto M, Manabe S, Moriyama Y, et al. Long-term remission achieved via combined chemotherapy and radiotherapy in a non-resectable granulocyte colony-stimulating factor producing pleomorphic carcinoma of the lung[J]. Intern Med, 2013,52(19):2259.
- [2] Haeusler G M, Mechinaud F, Daley A J, et al. Antibiotic-resistant gram-negative bacteremia in pediatric oncology patients-risk factors and outcomes[J]. Pediatr Infect Dis J,2013,32(7):723.
- [3] Fang W, Tang S, Liu P, et al. Pd nanosheet-covered hollow mesoporous silica nanoparticles as a platform for the chemo-photothermal treatment of cancer cells[J]. Small, 2012,8(24):3816.
- [4] 胡强,汪宏云,杨勇刚.补中益气汤防治晚期肺癌化疗毒副反应临床观察[J].实用中医药杂志,2008,25(5):271.
- [5] 徐萌.恶性肿瘤化疗及其对策[M].北京:军事医学科学出版社,2002:90.
- [6] Wang X, Ren Z, He Y, et al. A combination of pharmacophore modeling, molecular docking and virtual screening for iNOS inhibitors from Chinese herbs[J]. Biomed Mater Eng, 2013,23(10):1367.
- [7] Ma Lihong. Clinical observation on treatment of postcardiotomic complications with Chinese herbal medicine based on syndrome differentiation with angiocardopathy[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 1999, (4):206.
- [8] 刘佳,侯莉莉,赵翠英.茵黄合剂对雌孕激素共诱导妊娠肝内胆汁淤积症大鼠胆汁酸转运蛋白 MRP2 与 BSEP 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):255.
- [9] 杨娜,隋峰,李沧海,等.大黄酸对 Caco-2 细胞多药耐药蛋白转运体表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):133.

[责任编辑 聂淑琴]