

鬼臼毒素衍生物 YB-1EPN 的抑瘤作用^Δ

华文超*,刘世军#,孙克明,刘宪勇,王伟,张敏(武警山东省总队医院药剂科,济南 250014)

中图分类号 R969.1;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1738-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.03

摘要 目的:研究鬼臼毒素衍生物 YB-1EPN 对耐药型 S180 荷瘤小鼠肉瘤的抑制作用。方法:小鼠一次性腹腔注射 700、560、448、358、287 mg/kg YB-1EPN,连续观察 7 d,记录小鼠毒性反应及死亡数,计算半数致死量(LD₅₀)。KM 小鼠右腋下移植 S180 肉瘤以复制 S180 荷瘤小鼠,采用紫杉醇联合 5-氟尿嘧啶及顺铂的治疗方案(简称 PFC 联合化疗方案)以复制 S180 荷瘤小鼠耐药模型。抽取耐药型 S180 荷瘤小鼠腹水接种于 KM 小鼠腋下以复制耐药型 S180 小鼠实体瘤。两项小实验均分为空白对照(等容生理盐水,灌胃给药)组、依托泊苷(20.00 mg/kg,腹腔给药 1 次)组与 YB-1EPN 高、低剂量(11.42、7.14 mg/kg,灌胃给药,每天 1 次,连续 7 d)组。称小鼠体质量、瘤质量,计算肿瘤抑制率。免疫组化法检测小鼠肿瘤细胞及实体瘤 P-糖蛋白(P-gp)的表达。结果:LD₅₀ 为 395.4~485.29 mg/kg;与空白对照组比较,YB-1EPN 高、低剂量组肿瘤质量减轻,P-gp 表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:YB-1EPN 对耐药型 S180 小鼠实体瘤有较强的抑制作用。

关键词 鬼臼毒素衍生物;YB-1EPN;S180 荷瘤;抑瘤

Inhibitory Effect of YB-1EPN on Resistant Entity S180 Sarcoma and Its Mechanism

BI Wen-chao, LIU Shi-jun, SUN Ke-ming, LIU Xian-yong, WANG Wei, ZHANG Min (Dept. of Pharmacy, Shandong Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Jinan, 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the antitumor effect of podophyllotoxin derivative YB-1EPN on resistant sarcoma entity in S180 tumor-bearing mice. METHODS: Mice were given disposable intraperitoneal administration of 700, 560, 448, 358.4 and 286.72 mg/kg YB-1EPN for consecutive 7 days. Toxic reaction and the number of dead mice were recorded to calculated LD₅₀. S180 tumor-bearing mice model was induced by resistant S180 sarcoma entity transplanted on right axilla of mice. S180 tumor-bearing mice resistant model was induced by paclitaxel combined with fluorouracil and cisplatin plan (called PFC chemotherapy combination plan). The ascites of resistant S180 tumor-bearing mice were collected and vaccinated in axilla of mice to establish S180 sarcoma entity. The model mice were divided into blank control group (constant volume of normal saline), positive control group (etoposide 20.00 mg/kg, i.p.) and YB-1EPN high-dose and low-dose groups (11.42, 7.14 mg/kg, i.g., once a day for consecutive 7 days). The body weight and the weight of tumor were weighed, and the inhibitory rate of tumor was calculated. The expression of P-gp in solid tumor was detected by immunohistochemical method. RESULTS: LD₅₀ was 395.4-485.29 mg/kg; compared with blank control group, the weight of tumor was decreased in YB-1EPN high-dose and medium-dose groups, while the expression of P-gp was attenuated; there was statistical significance ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: YB-1EPN has a strong inhibitory effect on S180 sarcoma in mice.

KEYWORDS Podophyllotoxin derivative; YB-1EPN; S180 tumor-bearing mice; Antitumor effect

多药耐药是肿瘤细胞免受药物攻击的重要细胞防御机制,是肿瘤细胞对一种化疗药物耐药的同时对与其结构无关、作用机制不同的其他药物产生交叉耐药的现象^[1]。本文以 S180 肉瘤直接移植于 KM 小鼠以复制小鼠 S180 荷瘤模型,同时采用临床上常用的紫杉醇联合 5-氟尿嘧啶(5-Fu)及顺铂的治疗方案(简称 PFC 联合化疗方案),模拟肿瘤体内耐药形成过程,在荷瘤小鼠体内进行诱导多药耐药相关因子过度表达,并观察其稳定性,建立适合药物干预肿瘤多药耐药研究的在体细胞模型^[2]。笔者以本课题组新合成的鬼臼毒素衍生物 YB-1EPN 为研究对象,该化合物具有结构新颖、稳定等优势,采用小鼠 ip 不同剂量 YB-1EPN 进行给药,观察 YB-1EPN 的急

毒作用及对耐药型 S180 荷瘤小鼠及其全瘤的作用,以初步探讨其干预化疗多药耐药的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

CX35 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 药品与试剂

YB-1EPN(武警后勤学院药学教研室制备合成,经高效液相分离提纯后,质谱分析鉴定分子质量为 584.57,纯度 > 98%);依托泊苷(VP-16,批号:07112231)、紫杉醇(批号:08091325)均购自江苏恒瑞医药股份有限公司;顺铂(山东齐鲁制药有限公司,批号:1002A);5-Fu(天津金耀生物科技有限公司,批号:0911291)。

1.3 动物与肉瘤

SPF 级 KM 小鼠,♀ ♂ 兼半,体质量 18~22 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(军)2007-004]。小鼠 S180 肉瘤由天津药物研究

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30873363)

* 药师,硕士。研究方向:肿瘤药理学。电话:0531-83197333。

E-mail: bwc316608613@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:药理学。E-mail: Lsj60j@126.com

com

院传代保种。

2 方法

2.1 小鼠急毒实验^[4]

50只小鼠随机均分为5组,即YB-1EPN①、②、③、④、⑤(700、560、448、358、287 mg/kg)组,ig一次性给药,连续观察7d,记录小鼠毒性反应情况及死亡小鼠数。采用寇氏法计算半数致死量(LD₅₀)。

2.2 S180荷瘤小鼠耐药模型的复制及指标的测定

小鼠右腋下移植耐药S180肉瘤以复制S180荷瘤小鼠。采用临床上常用的PFC联合化疗方案,即顺铂3 mg/kg,每周ip给药1次;CTX、5-FU各3 mg/kg,每天ig给药1次,连续给药10周以复制S180荷瘤小鼠。实验分为4组,即空白对照(等体积生理盐水)组、VP-16(20.00 mg/kg)组与YB-1EPN高、低剂量(11.42、7.14 mg/kg)组。VP-16组小鼠于接种后次日1次性ip给药;其余各组小鼠ig给药,每天1次,连续7d。免疫组化法检测小鼠细胞糖蛋白(P-gp)的表达情况。Ipp分析软件分析P-gp表达量的差异。P-gp的表达组织标本经固定、石蜡包埋、4 μm连续切片、柠檬酸缓冲液抗原修复后,行免疫组化染色,滴加1:100(V/V)比例稀释的兔抗P-gp多克隆抗体工作液,4℃过夜。阴性对照使用PBS替代一抗。滴加鼠抗兔IgG二抗工作液,37℃温箱孵育30 min,DAB显色。显微镜下观察、成像系统拍照并对阳性结果进行分析。

2.3 YB-1EPN体内抗肿瘤作用研究

无菌条件下抽取长势良好的耐药型S180荷瘤小鼠腹水,用生理盐水稀释至10⁷ ml⁻¹,接种于小鼠腋下,每鼠接种瘤液0.2 ml以复制耐药型S180小鼠实体瘤。实验分为4组,即空白对照(等体积生理盐水)组、VP-16(20.00 mg/kg)组与YB-1EPN高、低剂量(11.42、7.14 mg/kg)组。VP-16组小鼠于接种后次日1次性ip给药;其余各组小鼠ig给药,每天1次,连续7d。第8天颈椎脱臼处死小鼠,称体质量、瘤质量,计算肿瘤抑制率。抑制率(%)=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%。P-gp表达测定按“2.2”项下方法。

2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠急毒实验结果

预实验测得0%及100%估计致死量(Dn、Dm)分别为200、700 mg/kg。半数致死量(LD₅₀)为395.4~485.29 mg/kg。

3.2 YB-1EPN对S180荷瘤小鼠肿瘤细胞P-gp表达的影响

与阴性对照比较,YB-1EPN高、低剂量组P-gp表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。S180荷瘤小鼠肿瘤细胞P-gp的表达见图1、表1。

3.3 YB-1EPN对耐药型S180小鼠实体瘤的抑制作用

与模型组比较,YB-1EPN高、低剂量组小鼠肿瘤质量减轻,差异有统计学意义($P < 0.01$),小鼠体质量无明显改变。YB-1EPN对耐药型S180小鼠实体瘤的抑制作用见图2、表2。

3.4 YB-1EPN对耐药型S180小鼠实体瘤P-gp表达的影响

与空白对照组比较,YB-1EPN高、低剂量组P-gp表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。耐药型S180小鼠实体瘤P-gp的表达见图3、表3。

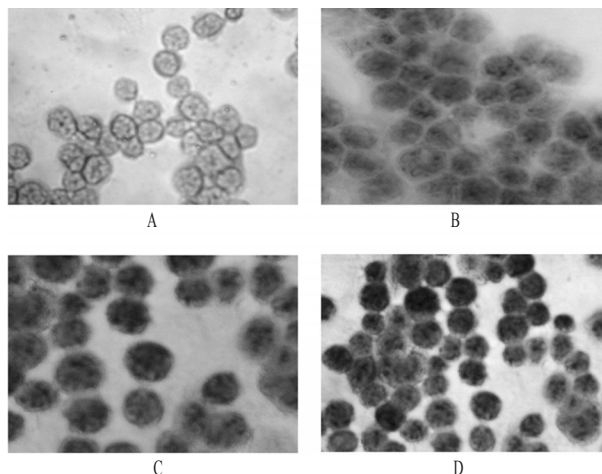


图1 S180荷瘤小鼠肿瘤细胞P-gp的表达

A.空白对照组;B.YB-1EPN低剂量组;C.YB-1EPN高剂量组;D.VP-16组

Fig 1 The expression of P-gp in cancer cells of S180 tumor-bearing mice

A.blank control group; B.YB-1EPN low-dose group; C. YB-1EPN high-dose group; D.VP-16 group

表1 S180荷瘤小鼠肿瘤细胞P-gp的表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 The expression of P-gp in cancer cells of S180 tumor-bearing mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量,mg/kg | P-gp表达量 |
|-------------|----------|----------------|
| 空白对照组 | | 0.016 ± 0.007 |
| YB-1EPN低剂量组 | 7.14 | 0.159 ± 0.002* |
| YB-1EPN高剂量组 | 11.42 | 0.168 ± 0.005* |
| VP-16组 | 20.00 | 0.502 ± 0.080* |

与空白对照组比较: * $P < 0.01$

vs.blank control group: * $P < 0.01$

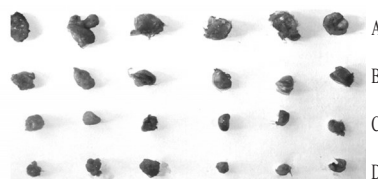


图2 YB-1EPN对耐药型S180小鼠实体瘤的抑制作用

A.空白对照组;B.YB-1EPN低剂量组;C.YB-1EPN高剂量组;D.VP-16组

Fig 2 Inhibitory effect of YB-1EPN on S180 tumor-bearing mice

A.blank control group; B. YB-1EPN low-dose group etoposide; C YB-1EPN high-dose group; D.etoposide group

表2 YB-1EPN对耐药型S180小鼠实体瘤的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Inhibitory effect of YB-1EPN on S180 tumor-bearing mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 体质量,g | 瘤质量,g | 抑制率,% |
|-------------|--------------|--------------|-------|
| 空白对照组 | 21.44 ± 1.55 | 1.58 ± 0.21 | |
| YB-1EPN低剂量组 | 21.24 ± 1.89 | 0.78 ± 0.03* | 50.63 |
| YB-1EPN高剂量组 | 21.14 ± 2.73 | 0.61 ± 0.02* | 61.39 |
| VP-16组 | 19.31 ± 2.30 | 1.02 ± 0.05* | 35.44 |

与空白对照组比较: * $P < 0.01$

vs.blank control group: * $P < 0.01$

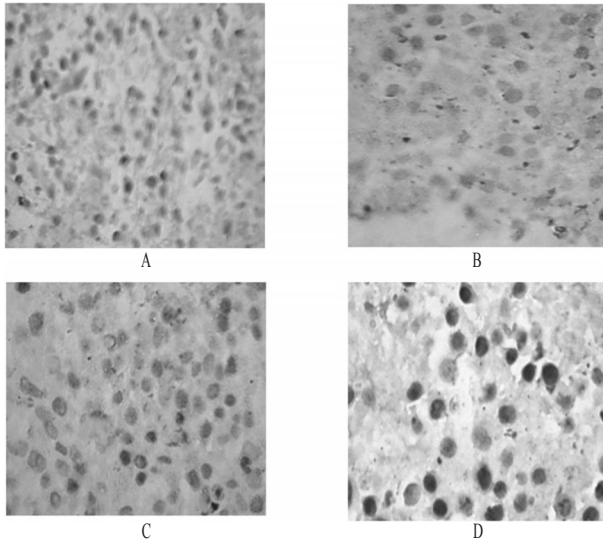


图3 耐药型S180小鼠实体瘤P-gp的表达

A.空白对照组;B.YB-1EPN低剂量组;C.YB-1EPN高剂量组;D.VP-16组

Fig 3 The expression of P-gp in solid tumor of resistant S180 tumor-bearing mice

A.blank control group;B.YB-1EPN low-dose group etoposide;C.YB-1EPN high-dose group;D.etoposide group

表3 耐药型S180小鼠实体瘤P-gp的表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 The expression of P-gp in solid tumor of resistant S180 tumor-bearing mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量,mg/kg | P-gp表达量 |
|-------------|----------|----------------|
| 空白对照组 | | 0.636 ± 0.098 |
| YB-1EPN低剂量组 | 7.14 | 0.365 ± 0.069* |
| YB-1EPN高剂量组 | 11.42 | 0.279 ± 0.078* |
| VP-16组 | 20.00 | 0.619 ± 0.058 |

与空白对照组比较: * $P < 0.01$

vs.blank control group: * $P < 0.01$

4 讨论

化疗是治疗恶性肿瘤的主要手段之一,化疗强度的增加可清除体内肿瘤负荷,有助于提高患者的生存率。肿瘤细胞多药耐药是导致化疗失败的主要原因之一,与肿瘤患者死亡密切相关^[4],而多药耐药的发生,主要以肿瘤细胞多药耐药基因、耐药蛋白过度表达,肿瘤细胞DNA拓扑异构酶TOPO II等相关酶活性增加和肿瘤细胞凋亡下降为表现。耐药基因和耐药蛋白的过度表达将化疗药物经跨膜转运排出细胞并阻止药物进入细胞核,使化疗药物不能发挥细胞毒性作用^[5]。人类基因组中存在两个多药耐药基因。研究表明,只有mdr1基因的表达水平与人体肿瘤细胞耐药有关,耐药的肿瘤细胞mdr1基因上调高表达P-gp可以加速化疗药物经跨膜转运排除细胞,从而阻止药物进入细胞核使化疗药物不能发挥细胞毒作用,进而产生P-gp介导的经典多药耐药性。

前期的研究表明,新合成的YB-1EPN不仅对普通细胞株(如人口腔鳞状上皮癌细胞KB细胞)有较好的抑制作用^[6],而且对多种多药耐药细胞株均有良好的抑制作用^[7-9]。本研究首先复制S180荷瘤小鼠模型,采用临床常见的PFC联合化

疗方案,与空白对照组比较,YB-1EPN高、低剂量组耐药蛋白P-gp明显表达($P < 0.01$)。P-gp是由小鼠的多药耐药基因mdr-1所编码,是由1280个氨基酸组成的跨膜糖蛋白,具有能量依赖性药物外输泵的作用,它表达量的增加说明肿瘤细胞耐药性的获得,提示耐药型S180荷瘤小鼠模型复制成功。

ip YB-1EPN(7.14、11.42 mg/kg),连续7 d,每天1次,对耐药型S180小鼠实体瘤的生长抑制率分别为50.63%和61.39%,高、低剂量与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),说明体内实验中,在实验剂量下YB-1EPN对耐药型S180小鼠实体瘤生长有抑制作用。

本研究中,通过免疫组化方法测定耐药型S180小鼠实体瘤P-gp蛋白表达。结果显示,YB-1EPN有降低P-gp表达的趋势,11.42 mg/kg YB-1EPN能明显下调P-gp的表达($P < 0.01$),说明YB-1EPN的作用机制可能是通过抑制小鼠肿瘤组织中P-gp蛋白表达,从而达到抑制肿瘤生长的目的。

参考文献

- [1] Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Val133 and Cys137 in transmembrane segment 2 are close to Arg935 and Gly 939 in transmembrane segment 11 of human P-glycoprotein[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(18): 18 232.
- [2] 陈强.适合中药研究的小鼠S180肿瘤获得性多药耐药模型的建立及稳定性研究[J]. *中草药*, 2006, 37(11): 1 691.
- [3] 张红卿,连慕兰.细胞生物学实验方法与技术[M].1版.北京:北京师范大学出版社,1992:73.
- [4] Galani E, Skarlos D, Sgouros J, et al. Correlation of MD-R 1 Expression and CA 125 in ovarian cancer [J]. *In Vivo*, 2005, 19(4): 797.
- [5] Shen F, Chu SY, Aimee K. Bence, et al. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324(1):95.
- [6] Calatuzzolo C, Gelati M, Ciusani E, et al. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRF3, MRP5 and GST-pi in human glioma [J]. *J Neurooncol*, 2005, 74(2): 113.
- [7] 毕文超,刘世军,孙克明,等.鬼臼毒素衍生物YB-1EPN对人口腔鳞状上皮癌细胞系增殖的抑制作用研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(47): 4 422.
- [8] Chen H, Bi WC, Cao B, et al. A novel podophyllotoxin derivative (YB-1EPN) induces apoptosis and down-regulates express of P-glycoprotein in multidrug resistance cell line KBV200[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 627(1/3): 69.
- [9] Robinsin LJ, Roberts WK, Ling T, et al. Human Mdr1 protein over-expression relay the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblast[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(37): 11 169.

(收稿日期:2013-09-05 修回日期:2013-10-10)