

金龙胶囊对耐紫杉醇及卡铂卵巢癌 H08910 细胞的逆转及增敏作用

王小毛¹, 黄晶², 石峰³

(1. 赣州市肿瘤医院药剂科, 江西 赣州 341000;

2. 赣州市肿瘤医院妇科, 江西 赣州 341000;

3. 赣州市市立医院药剂科, 江西 赣州 341000)

摘要:目的 探讨金龙胶囊在耐紫杉醇及卡铂卵巢癌 H08910 细胞的逆转作用及对 H08910 的致敏活性。方法 测定两种耐药细胞(卵巢癌 H08910/Paclitaxel、卵巢癌 H08910/Carboplatin)及相应亲本卵巢癌 H08910 细胞的 IC₅₀, 并将其与化疗药物组合的无毒浓度的金龙胶囊联用, 以 XR9576(XR9576 为 P-gp 抑制剂)为阳性对照药, 评估不同浓度(80、160、320 μg/ml)的金龙胶囊对耐紫杉醇的卵巢癌细胞、耐卡铂的卵巢癌细胞及交叉耐药的 H08910 细胞的逆转活性及增敏作用。结果 金龙胶囊在 80、160、320 μg/ml 无毒浓度对 H08910/Paclitaxel 细胞对紫杉醇的耐药 RF 倍数分别为 1.89、2.48 和 4.08, 但活性弱于阳性对照药; 金龙胶囊在 80、160、320 μg/ml 无毒浓度对 H08910/Paclitaxel 细胞对卡铂的交叉耐药有逆转作用。金龙胶囊在 80、160、320 μg/ml 无毒浓度对 H08910/Carboplatin 细胞对紫杉醇的耐药 RF 倍数分别为 1.96、2.16 和 4.11, 但活性弱于阳性对照药; 金龙胶囊在 80、160、320 μg/ml 无毒浓度对 H08910/Carboplatin 细胞对卡铂的交叉耐药也有逆转作用。金龙胶囊在 80、160、320 μg/ml 无毒浓度对 H08910 细胞有增敏作用, 对 Paclitaxel 及阳性对照药表现一定量效关系。结论 金龙胶囊对联合化疗的耐药细胞具有耐药逆转的作用, 并且对化疗药物具有一定的增敏作用。

关键词:金龙胶囊; 紫杉醇; 卡铂; 卵巢癌 H08910 细胞; 逆转; 增敏

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.04.028

文章编号: 1006-1959(2020)04-0094-03

Reversion and Sensitization Effect of Jinlong Capsule on Paclitaxel and Carboplatin-resistant Ovarian Cancer H08910 Cells

WANG Xiao-mao¹, HUANG Jing², SHI Feng³

(1. Department of Pharmacy, Ganzhou Cancer Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi, China;

2. Department of Gynecology, Ganzhou Cancer Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi, China;

3. Department of Pharmacy, Ganzhou Municipal Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

Abstract: Objective To explore the reversal effect of Jinlong capsule on paclitaxel and carboplatin-resistant ovarian cancer H08910 cells and its sensitization activity to H08910. Methods The IC₅₀ of two kinds of drug-resistant cells (ovarian cancer H08910/Paclitaxel, ovarian cancer H08910/Carboplatin) and corresponding parental ovarian cancer H08910 cells were measured. Combined with the non-toxic concentration of Jinlong capsules combined with chemotherapy drugs, XR9576 (XR9576 is a P-gp inhibitor) was used as a positive control drug, and Jinlong capsules of different concentrations (80, 160, 320 μg/ml) were evaluated. Reversal activity and sensitization of paclitaxel-resistant ovarian cancer cells, carboplatin-resistant ovarian cancer cells, and cross-resistant H08910 cells. Results Jinlong capsules at 80, 160, and 320 μg/ml non-toxic concentrations of H08910/Paclitaxel cells resistant to paclitaxel RF folds were 1.89, 2.48, and 4.08, respectively, but the activity was weaker than the positive control drug; Jinlong capsules at 80, 160, 320 μg/ml non-toxic concentrations can reverse the cross-resistance of H08910/Paclitaxel cells to carboplatin. Jinlong capsules at 80, 160, 320 μg/ml non-toxic concentrations of H08910/Carboplatin cells resistant to paclitaxel RF multiples of 1.96, 2.16 and 4.11, respectively, but the activity is weaker than the positive control drug; Jinlong capsule also reversed the cross-resistance of H08910/Carboplatin cells to carboplatin at non-toxic concentrations of 80, 160 and 320 μg/ml. Jinlong Capsules had a sensitizing effect on H08910 cells at non-toxic concentrations of 80, 160 and 320 μg/ml, and showed a dose-effect relationship on Paclitaxel and positive control drugs. Conclusion Jinlong Capsule has the effect of reversing drug resistance of drug-resistant cells combined with chemotherapy, and has certain sensitizing effect on chemotherapy drugs.

Key words: Jinlong capsule; Paclitaxel; Carboplatin; Ovarian cancer H08910 cells; Reversal; Sensitization

卵巢(ovary)是女性器官中最容易发生癌症的器官, 据统计^[1], 我国每年卵巢癌死亡人数高达 11.4 万, 由于缺乏早期症状及筛查手段, 大多数患者确诊时已是中晚期, 预后较差。目前, 卵巢癌的主要疗法包括手术、联合化疗、靶向治疗、激素治疗等, 其中化疗药物中通常以紫杉醇联合铂类药物为主。虽然化疗药物治疗可起到一定效果, 然而多药耐药、化疗引发的不良反应等问题往往使化疗达不到预期效果^[2], 成为困扰肿瘤化疗的关键难

题。因此, 寻找减毒、增效、多靶点抑制多药耐药的辅助治疗方案迫在眉睫。金龙胶囊是一种新型广谱抗癌中成药, 是多种中药有效成分的提取物, 最主要的成分来自鲜金钱白花蛇、鲜蕲蛇和鲜守宫, 经现代制剂工艺加工而成。研究表明^[3,4], 金龙胶囊与化疗药物联合治疗多种器官癌症, 如鼻咽癌、胃癌、大肠癌、卵巢癌、肝癌等均有显著效果。本研究通过建立体外不同耐药细胞模型, 给予金龙胶囊介入, 评价不同浓度金龙胶囊对耐紫杉醇及卡铂卵巢癌 H08910 细胞的逆转作用和细胞增敏作用, 现报道如下。

作者简介: 王小毛(1979.8-), 男, 江西瑞金人, 本科, 副主任药师, 主要从事药理学方面的研究

1 材料与方法

1.1 材料 金龙胶囊(北京建生药业有限公司,批号:161121-019,规格:0.25 g/粒),细胞培养液溶解,0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤,现用现配;注射用卡铂(山东齐鲁制药有限公司,批号:20160801,规格:0.1 g/支);紫杉醇注射液(扬子江药业有限公司,批号:20160729,规格:16.7 ml:100 mg);他立喹达(Cayman Chemical,纯度 $\geq 95\%$)、卵巢癌耐紫杉醇耐药细胞(H08910/Paclitaxel)、卵巢癌耐卡铂耐药细胞(H08910/Carboplatin)及其亲本细胞卵巢癌 H08910 细胞购自中国医学科学院药物研究所;高糖 DMEM (GIBCO 公司);胰蛋白酶(GIBCO 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、链霉素(100 U/ml)、青霉素(100 U/ml)、PBS 液、磷酸溶液购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法 耐紫杉醇耐药细胞 H08910/Paclitaxel,耐卡铂耐药细胞 H08910/Carboplatin 及其亲本细胞卵巢癌 H08910 细胞株接种于含有 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,加入青霉素 100 IU/ml、链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$,培养箱条件为 37℃、5%CO₂,每 48 h 更换培养液 1 次,观察细胞生长情况,当细胞满 80%~90%后,以 1:3 的比例传代。耐药株细胞 H08910/Paclitaxel、H08910/Carboplatin 在 25 nmol/L 紫杉醇、10 nmol/L 卡铂的培养液中进行培养,维持耐药细胞的耐药性,进行试验前一周转移耐药细胞至正常培养液中^[9]。采用 MTT 方法测定金龙胶囊对上述细胞的细胞毒性及其肿瘤多药耐药逆转活性。取对数生长期的敏感及耐药株肿瘤细胞胰酶消化,接种于 96 孔细胞培养板中。24 h 后,加入不同浓度(80、160、320 $\mu\text{g/ml}$)的金龙胶囊(取胶囊总填充物计算金龙胶囊浓度,胶囊总填充物中辅料占比 68.8%)或抗肿瘤药物,以他立喹达(XR9576,非竞争性 P-glycoprotein 抑制剂,作用于 MDR 细胞系,可逆转耐药性)为阳性对照药,每个浓度设 3 个平行孔。培养 72 h,弃原培养液,每孔加入 0.5 mg/ml MTT 液 100 μl 。继续培养 4 h,弃去 MTT 液,每孔加入 DMSO 150 μl ,混合振荡器振荡,于酶标仪 570 nm 波长处测定吸收度(A)。上述实验重复 3 次。细胞存活率(%)=100×给药组/阳性对照药。

1.3 统计学方法 利用 GraphpadPrism 8.0 软件计算 IC₅₀ 值,逆转倍数(RF)=IC₅₀(抗肿瘤药物)/IC₅₀(抗肿瘤药物+逆转剂)。计量资料以($\bar{x}\pm s$)进行描述。

2 结果

2.1 金龙胶囊对卵巢癌 H08910 细胞生长的影响 金龙胶囊作用 72 h 后,对所用到的两对卵巢癌细胞都表现一定的抑制作用,IC₅₀ 值在 1.3~8.6 mg/ml

水平。两种耐药细胞在不同金龙胶囊的作用下具有不同的敏感性,根据实际实验情况进行浓度选择。

2.2 金龙胶囊对 H08910/Paclitaxel 及 H08910 细胞的作用 金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 H08910/Paclitaxel 细胞对紫杉醇的耐药 RF 弱于阳性对照药。金龙胶囊对 H08910/Paclitaxel 细胞对卡铂的交叉耐药有逆转作用,见表 1。

表 1 金龙胶囊对 H08910/Paclitaxel 细胞耐药的逆转作用 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

化合物	IC ₅₀	RF
紫杉醇	34.383±4.271	/
紫杉醇+80 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	18.228±2.083	1.89
紫杉醇+160 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	13.885±1.192	2.48
紫杉醇+320 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	8.435±1.258	4.08
紫杉醇+4 $\mu\text{mol/L}$ 他立喹达	0.815±0.221	42.19
卡铂	3.508±0.217	/
卡铂+80 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	1.052±0.011	3.33
卡铂+160 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	0.985±0.235	3.56
卡铂+320 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	0.742±0.337	4.73
卡铂+4 $\mu\text{mol/L}$ 他立喹达	0.047±0.021	73.39

2.3 金龙胶囊对 H08910/Carboplatin 细胞的作用 金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 H08910/Carboplatin 细胞对紫杉醇的耐药 RF 弱于阳性对照药。金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 H08910/Carboplatin 细胞对卡铂的交叉耐药也有逆转作用,见表 2。

表 2 金龙胶囊对 H08910/Carboplatin 细胞耐药的逆转作用($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

化合物	IC ₅₀	RF
紫杉醇	46.646±5.235	/
紫杉醇+80 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	23.858±3.336	1.96
紫杉醇+160 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	21.587±2.842	2.16
紫杉醇+320 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	11.360±2.153	4.11
紫杉醇+4 $\mu\text{mol/L}$ 他立喹达	0.897±0.521	52.0
卡铂	1.028±0.351	/
卡铂+80 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	0.423±0.116	2.43
卡铂+160 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	0.362±0.109	2.84
卡铂+320 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	0.125±0.087	8.22
卡铂+4 $\mu\text{mol/L}$ 他立喹达	0.014±0.032	73.43

2.4 金龙胶囊对 H08910 细胞的敏感度影响 金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度时对 H08910 细胞有增敏作用,使 H08910 细胞对紫杉醇及卡铂更敏感,而对 Paclitaxel 及 XR9576 表现一定量效关系,见表 3。

表 3 金龙胶囊对 HO8910 细胞的敏感度影响($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

化合物	IC ₅₀	RF
紫杉醇	15.228±2.814	/
紫杉醇+80 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	6.542±1.025	2.33
紫杉醇+160 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	4.323±0.874	3.52
紫杉醇+320 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	2.884±0.752	5.28
紫杉醇+4 $\mu\text{mol/L}$ 他立喹达	1.388±0.052	10.97
卡铂	2.512±1.093	/
卡铂+80 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	1.520±0.424	1.65
卡铂+160 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	1.258±0.516	2.00
卡铂+320 $\mu\text{g/ml}$ 金龙胶囊	0.745±0.233	3.37
卡铂+4 $\mu\text{mol/L}$ 他立喹达	0.089±0.087	28.22

3 讨论

卵巢癌是严重危害妇女的恶性肿瘤之一,临床治疗主要以手术为主,化疗为辅,但随着化疗的进行,在一定程度上产生耐药,致使化疗失败,从而影响了药物的临床疗效^[6]。与药物和功能限制具有单个靶标的化疗药物相比,中国传统药物具有一定的优势,这主要是由于:①复杂的中药成分,可以组合多个靶目标的效果;②能够使心血管系统和免疫系统在化疗过程中发生更少的不良反应;③有些中药的有效成分具有抗癌作用,这为寻找 MDR 逆转剂提供了来源^[7]。

目前国内对金龙胶囊在卵巢癌辅助化疗中的相关研究较少,本研究中建立不同的卵巢癌耐药细胞模型,研究了金龙胶囊对耐紫杉醇及卡铂卵巢癌 HO8910 细胞在不同的药物浓度下的逆转作用和细胞增敏作用,结果表明金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 HO8910/Paclitaxel 细胞对紫杉醇的耐药 RF 值分别为 1.89、2.48 和 4.08,但活性弱于阳性对照药 XR9576。金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 HO8910/Paclitaxel 细胞对卡铂的耐药有逆转作用;金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 HO8910 细胞有增敏作用,对 Paclitaxel 及阳性对照药表现一定量效关系;金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 HO8910/Carboplatin 细胞对紫杉醇的耐药 RF 值分别为 1.96、2.16 和 4.11,但活性弱于阳性对照药 XR9576;金龙胶囊在 80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 无毒浓度对 HO8910/Carboplatin 细胞对卡铂的交叉耐药也有逆转作用。分析原因可能为金龙胶囊是由鲜守宫、鲜金钱白花蛇和鲜蕲蛇组成,药方中鲜守宫为君药,破瘀解毒散结、通经活络而止痛。鲜金钱、白花蛇为臣药,具有搜风通络、降痰解毒、活血止痛的作用,辅助君药可加强破瘀散结、解郁通络之功。鲜蕲蛇为佐使药,具有搜风定痛、通经达络的作用,既可加强君药滋阴破瘀散结功效,又可加强臣药的通络解郁散结力量。全方配伍精当、药性平和,已证实用于治疗多种肿瘤。该药是由现代低温冷冻生化分

离提取,既保持了各有效成分的最大生物活性,又具有安全性好、易消化吸收、剂量小且疗效显著等的临床应用优势和特点,避免了化疗药物毒性大、安全性差的缺点^[8]。有研究表明^[9],其对肿瘤抗癌的作用广泛,涉及肿瘤细胞的生长、转移等多个重要环节,在肿瘤疾病的治疗中逐渐显现出了新的功能和活力。目前有一些临床研究结果表明其在肿瘤临床应用上有可能起到如下的应用:①金龙胶囊能够通过联合化疗药物增强机体对肿瘤的自身免疫力,通过其增加 T 细胞、NK 巨噬细胞、Lak 细胞、巨噬细胞等多种抗肿瘤杀伤细胞的数量或功能,增强与抗恶性肿瘤药物相关的细胞因子活性而有效地达到对抗恶性肿瘤的联合化疗作用^[9]。②金龙胶囊能够作为联合化疗用药,减少联合化疗的不良反应。在化疗药物介入肿瘤治疗中,减少冠状动脉栓塞,减少对胃肠道反应、抑制体内白细胞减少、血小板的数量下降,减少死亡率^[10]。

综上所述,金龙胶囊能够对耐紫杉醇及卡铂卵巢癌 HO8910 细胞起到逆转及增敏作用,有望提高卵巢癌患者术后辅助化疗的疗效,为金龙胶囊抗肿瘤研究提供参考。

参考文献:

- [1]杨欣影. $\alpha 2, 3$ 唾液酸转移酶 III 调节卵巢癌细胞对紫杉醇敏感性的研究[D].暨南大学,2015.
- [2]曲育莹,岳贵娟,李建生,等.金龙胶囊对耐紫杉醇及长春新碱肿瘤细胞株的逆转及增敏作用[J].肿瘤防治研究,2014,41(8):884-887.
- [3]李丹,刘延庆.金龙胶囊抗肿瘤的研究进展[J].湖北中医杂志,2018,40(8):59-62.
- [4]周庆斌,黄喜峰,蒋鹏飞.金龙胶囊联合化疗对胃癌患者生活质量和免疫功能的影响[J].云南中医学院学报,2017,40(6):26-29.
- [5]刘磊,胡春杰,李志杰,等.水飞蓟宾诱导卵巢癌 HO-8910 细胞凋亡增殖及其机制探讨[J].现代生物医学进展,2017,17(20):3811-3815.
- [6]秦贞立,方英姬,黄晓戈.紫杉醇联合卡铂治疗卵巢癌的效果分析[J].实用癌症杂志,2015(2):286-287.
- [7]张晓前,南志宇.金龙胶囊联合洛铂对非小细胞肺癌肝转移患者疗效及免疫功能调节作用的观察[J].中国药物与临床,2018,18(12):76-77.
- [8]李旭辉,惠雪枫,王艳梅,等.中药单体逆转肿瘤细胞多药耐药的作用机制[J].延安大学学报(医学科学版),2019(2):96-99.
- [9]Shi J,Zhang W,He L,et al.Jinlong capsule inhibits migration and invasion in human glioblastoma cells via the modulation of mTOR/S6 signaling pathway[J].Drug Des Devel Ther,2019(13):1023-1032.
- [10]Zeng C,Cai L,Huang Z,et al.The effect of Jinlong capsule on the immune function for intervened patients with primary liver cancer[J].The Chinese-German Journal of Clinical Oncology,2014,13(2):80-83.

收稿日期:2019-12-10;修回日期:2019-12-20

编辑/杜帆