

· 论 著 ·

维拉帕米及艾灸对长春新碱耐药胃癌细胞株 SGC7901 逆转增效作用

王 楠, 宋小骏, 蒋 凤, 谢学建

[摘要] 目的 观察维拉帕米(VPM)及艾灸对小鼠长春新碱(VCR)耐药 SGC7901 胃癌移植后的瘤体重量、抑瘤率及 P-糖蛋白(P-gp)表达的影响,以了解两者对长春新碱耐药逆转增效作用。方法 分别进行不同剂量维拉帕米及艾灸联合不同剂量维拉帕米抗肿瘤耐药的实验。第一组实验将 SD 小鼠分成等渗盐水组、VCR 对照组、VPM 对照组、0.5 mg/kg VPM+VCR 组、1.0 mg/kg VPM+VCR 组、1.5 mg/kg VPM+VCR 组、2.0 mg/kg VPM+VCR 组,,每组 16 只,雌雄各半,所有模型组小鼠在左前肢腋下接种瘤组织,按组给予等渗盐水和不同剂量药物,15 d 后,取出瘤体称重,计算抑瘤率,同时留取瘤体标本,检测多药耐药(MDR)相关蛋白 P-gp 的变化。第二组实验将 SD 小鼠分成等渗盐水组、VCR 对照组、VPM 对照组、艾灸对照组、0.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组、1.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组、1.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组、2.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组,每组 16 只,雌雄各半,所有模型组小鼠在左前肢腋下接种瘤组织,按组给予等渗盐水和不同剂量药物及艾灸,15 d 后,取出瘤体称重,计算抑瘤率,同时留取瘤体标本,检测 MDR 相关蛋白 P-gp 的变化。结果 第一组实验中给予维拉帕米时,等渗盐水组与不同剂量药物组间差异有统计学意义($P<0.05$),随剂量增加瘤体重量下降、抑瘤率增加和蛋白 P-gp 表达下降,但 1.5 mg/kg 和 2.0 mg/kg 时,蛋白 P-gp 值差异无统计学意义。第二组实验中给予维拉帕米和艾灸时,等渗盐水组与不同剂量药物组间差异也有统计学意义($P<0.05$),随剂量增加瘤体重量下降、抑瘤率增加和蛋白 P-gp 表达下降,其中剂量组:1.5 mg/kg 和 2.0 mg/kg 与仅给予维拉帕米组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 维拉帕米和艾灸对小鼠长春新碱耐药 SGC7901 胃癌耐药具有逆转增效作用,在 2.0 mg/kg 维拉帕米、0.5 mg/kg 长春新碱、艾灸联合用药时可达到单用 1.0 mg/kg 长春新碱用药效果。

[关键词] 维拉帕米;艾灸;SGC7901 胃癌;长春新碱;耐药;逆转增效

[中图分类号] R9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2017)06-0587-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.06.007

Reversaland synergisticeffect of verapamil and moxibustion on vincristine resistance in mice with SGC7901 gastric cancer

WANG Nan, SONG Xiao-jun, JIANG Feng, XIE Xue-jian

(Department of Pharmacy, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study is to investigate the effect of verapamil and moxibustion on the tumor inhibitory rate and the tumor weight and the expression of P- glycoprotein after the transplantation of vincristine (VCR) resistant SGC7901 gastric cancer in mice, so as to understand the reversal effect of these two drugs on vincristine resistance. **Methods** In first group SD mice were divided into normal saline group, vincristine control group, Verapamil control group, No. 1 drug group, No. 2 drug group, No. 3 drug group, No. 4 drug group, 16 rats in each group, Half and half on male and female, all mice inoculated with tumor tissue in the left forelimb, and administered with different doses of drugs and moxibustion. On 15 days later, inhibition rate of the tumor

was calculated. At the same time for tumor specimens, changes of MDR related protein P-gp are detected. In second group SD mice were divided into normal saline group, vincristine control group, Verapamilcontrol group, Moxibustion group, No. 1 drug + Moxibustion group, No. 2 drug + Moxibustion group, No. 3 drug + Moxibustion group, No. 4 + Moxibustion drug group, 16 rats in each group, Half and half on male and female, all mice inoculated with tumor tissue in the left forelimb, and

基金项目: 江苏省药学会-奥赛康医院药学科科研基金项目 (201201)

作者单位: 210002 南京,南京军区南京总医院药品科

通信作者: 谢学建, E-mail: njzyxxj2@sina.com

引用格式: 王 楠, 宋小骏, 蒋 凤, 等. 维拉帕米及艾灸对长春新碱耐药胃癌细胞株 SGC7901 逆转增效作用[J]. 东南国防医药, 2017, 19(6): 587-591.

administered with different doses of drugs and moxibustion. On 15 days later, inhibition rate of the tumor was calculated. At the same time for tumor specimens, changes of MDR related protein P-gp are detected. **Results** Only to give the Verapamil treatment, there was significant difference between the Saline group and different dose groups ($P<0.05$), the tumor inhibition rate increased and the tumor weight and protein P-gp decreased along with the increase of the drug dose; At the 1.5 mg/kg and 2.0 mg/kg, there was no significant difference in protein P-gp. To give Verapamil and Moxibustion treatment, there is also a significant difference in the saline group and different dose groups ($P<0.05$), and the tumor inhibition rate increased and the tumor weight and protein P-gp decreased along with the increase of the dose. At the dose group (1.5 mg/kg and 2.0 mg/kg) there were significant differences between the treatment group compared with group of the given only Verapamil ($P<0.05$). **Conclusion** Verapamil and Moxibustion on mice of Vincristine (VCR) resistant SGC7901 gastric cancer has reverse effect, and which effect can be equivalent to one of 1.0 mg/kg VCR when Verapamil is 2.0 mg/kg and VCR is 0.5 mg/kg with Moxibustion therapy.

[**Key words**] Verapamil; Moxibustion; SGC7901 gastric cancer; Vincristine; Drug resistance; Reversal and synergism

近年来针对恶性肿瘤的新化疗药物不断出现, 化疗方案不断改进, 但普遍存在肿瘤多药耐药 (multi-drug resistance, MDR), 一直是治疗失败的主要原因, 也是化疗治疗肿瘤以来一直悬而未决的重要问题。因此, 克服肿瘤细胞多药耐药及增强化疗药物的效果, 将关系到恶性肿瘤患者化疗的疗效及预后。

维拉帕米 (verapamil, VPM) 为钙通道阻滞剂 (钙拮抗剂), 对肿瘤细胞 MDR 表型的具有逆转作用^[1]。Bellamy 等^[2]进一步作了有关的实验, 单用维拉帕米即能逆转耐药细胞对阿霉素的拮抗作用, 能增加细胞内阿霉素的积聚, 细胞内药物浓度的增加是通过细胞对药物外排的减少而实现的。基础研究表明维拉帕米不仅可以与化疗药物竞争细胞膜上 P-170 的结合位点, 而且可在 MDR1 基因的转录水平上抑制 P-170 的表达, 增加肿瘤细胞内化疗药物的浓度, 从而逆转其耐药性^[3-5]。

艾灸在临床报道中能逆转肿瘤耐药, 并能对抗肿瘤药物起到增效减毒作用, 在动物实验中也取得了进展, 为临床上提供了治疗恶性肿瘤患者的一种重要的辅助治疗方法, 但艾灸疗法在恶性肿瘤治疗中的应用尚处于初期阶段, 无论是在临床研究还是实验研究过程中仍然存在一定的问题, 尤其在临床研究中还需进一步规范试验设计, 运用循证医学理论合理评价艾灸治疗恶性肿瘤的疗效^[6-8]; 在动物实验研究中还需进一步深入探讨治疗肿瘤的作用机制, 发挥艾灸疗法在恶性肿瘤治疗中的治疗作用^[9-11]。

本研究以长春新碱 (vincristin, VCR) 诱导的 SGC7901 耐药细胞为研究对象, 研究维拉帕米及艾灸对该耐药细胞移植后瘤体重量、抑瘤率及 P-糖蛋

白 (P-gp) 表达的影响, 为维拉帕米及艾灸的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 小牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程材料研究所; 青霉素、链霉素为国产哈尔滨制药总厂; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自北方同正生物制品公司; 长春新碱及维拉帕米均为国产, 长春新碱为广东岭南制药有限公司, 维拉帕米注射剂为上海禾丰制药有限公司。鼠抗人 P-糖蛋白荧光抗体由晶美生物工程有限公司提供。

1.2 仪器和设备 二氧化碳培养箱: HF151UV 上海力申科学仪器有限公司; 超净工作台: BHC-1000II A/B₃ 苏州安泰空气技术公司; 倒置显微镜: CKX41F 奥林巴斯; 酶标仪: BHP9504 北京滨松光子技术有限公司; 流式细胞仪: 美天旋 MACSQuant。

1.3 方法

1.3.1 耐药细胞株 胃癌细胞株 SGC-7901/VCR 购自上海复祥生物科技有限公司 (采用胃癌 SGC-7901 细胞株, 模拟临床用药特点, 应用高浓度反复间歇诱导的方法, 建立胃癌细胞株 SGC-7901 对长春新碱多药耐药细胞系 SGC-7901/VCR)。将所购 SGC-7901/VCR 细胞在培养液中稳定传代 2 周后, 取处于指数生长期的细胞, 常规胰蛋白酶消化制备单细胞悬液备用。

1.3.2 动物模型制作 取指数生长期 SGC-7901/VCR 细胞, 在 SD 小鼠左前肢腋下皮下注射 SGC-7901/VCR 细胞 $2 \times 10^6 / 0.2 \text{ mL}$, 获得实体瘤, 选取生长良好、呈淡红色、鱼肉状的瘤组织, 置于等渗盐水中切成约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 小块, 备用。取 SD 小鼠在其左前肢腋下接种瘤组织, 同时分组给予等渗

盐水和不同剂量药物及艾灸。等渗盐水组腹腔注射等渗盐水 0.1 mL, 每日 1 次, 连续 15 d。VCR 对照组腹腔注射长春新碱 1.0 mg/kg, 每日 1 次, 连续 15 d (与维拉帕米及艾灸联合应用时长春新碱的剂量为 0.5 mg/kg)。VPM 对照组腹腔注射维拉帕米 1.0 mg/kg, 每日 1 次, 连续 15 d。艾灸组造模开始后, 于接种次日开始施治, 施灸局部剃毛露出皮肤, 使用艾绒制成半米粒大艾炷, 放置于穴位相对部位, 用线香点燃, 连续施治 15 d。中脘穴灸每日 1 壮, 足三里穴则左右穴位每日交替灸各 1 壮。

1.3.3 不同剂量维拉帕米抗肿瘤耐药性的研究

采用上述小鼠模型, 随机分为等渗盐水组、VCR 对照组、VPM 对照组、0.5 mg/kg VPM+VCR 组、1.0 mg/kg VPM+VCR 组、1.5 mg/kg VPM+VCR 组、2.0 mg/kg VPM+VCR 组, 每组 16 只, 雌雄各半。每天观察负瘤小鼠的活动状况、毛色及食欲情况, 每周测量体重。每周测量瘤体体积, 15 d 后颈椎脱臼处死小鼠, 取出瘤体称重, 计算抑瘤率, 同时留取瘤体标本, 置于液氮中, 检测 MDR 相关蛋白 (P-gp) 的变化。

1.3.4 艾灸联合不同剂量维拉帕米抗肿瘤耐药性的研究 采用上述小鼠模型, 随机分为等渗盐水组、VCR 对照组、VPM 对照组、艾灸对照组、0.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组、1.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组、1.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组、2.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组, 每组 16 只, 雌雄各半。每天观察负瘤小鼠的活动状况、毛色及食欲情况, 每周测量体重。每周测量瘤体体积, 15 d 后颈椎脱臼处死小鼠, 取出瘤体称重, 计算抑瘤率, 同时留取瘤体标本, 置于液氮中, 检测 MDR 相关蛋白 P-gp 的变化。

1.4 瘤重及抑瘤率的计算 打开左前肢腋下, 剥离肿瘤, 称重, 并计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = \left[\frac{(\text{等渗盐水组的平均瘤重} - \text{药物组的平均瘤重})}{\text{等渗盐水组的平均瘤重}} \right] \times 100\%$$

1.5 流式细胞仪检测 P-糖蛋白表达 选取剥离后瘤块, 切成小块, 用胰酶消化, PBS 洗涤 2 次, 加入 200 μL PBS 重悬细胞, 取 100 μL 细胞悬液加入鼠抗人 P-gp-PE (1:50) 20 μL , 阴性对照另取 100 μL 悬

液加入鼠抗人-Ig G2b-PE 20 μL , 混匀后静置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 避光 30 min, 用 PBS 洗涤去未结合单抗, 400 μL PBS 重悬细胞, 上机检测。

1.6 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量维拉帕米抗肿瘤耐药性的瘤体重量、抑瘤率及 P-gp 值 瘤体重量: 对照组、药物组与等渗盐水组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); VCR 对照组与 0.5、1.0 和 1.5 mg/kg VPM+VCR 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但与 2.0 mg/kg VPM+VCR 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); VPM 对照组与 1.0、1.5 和 2.0 mg/kg VPM+VCR 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。抑瘤率: 随着 VPM 的剂量增加, VPM+VCR 联合治疗的抑瘤率接近于 VCR 对照组的抑瘤率。P-gp 值: 对照组、药物组与等渗盐水组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 0.5 mg/kg VPM+VCR 组与 1.0 mg/kg VPM+VCR 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 艾灸联合不同剂量维拉帕米抗肿瘤耐药的瘤体重量、抑瘤率及 P-gp 值 瘤体重量: 对照组、药物组与等渗盐水组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); VCR 对照组与 0.5、1.0 和 1.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但与 2.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); VPM 对照组、艾灸对照组与 1.0、1.5 和 2.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。抑瘤率: 随着 VPM 的剂量增加, VPM+VCR+艾灸联合治疗的抑瘤率接近于 VCR 对照组的抑瘤率。P-gp 值: 对照组、药物组与等渗盐水组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 0.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组与 1.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。1.5、2.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组的 P-gp 值分别与对应与未增加艾灸治疗的 1.5、2.0 mg/kg VPM+VCR 组的 P-gp 值差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 不同剂量维拉帕米和长春新碱治疗后的瘤体重量、抑瘤率及 P-gp 值比较

组别	<i>n</i>	瘤体重量(g)	抑瘤率(%)	P-gp 值
等渗盐水组	16	1.493±0.048	—	0.890±0.064
VCR 对照组	16	1.079±0.060 [*]	27.7	0.427±0.040 [*]
VPM 对照组	16	1.365±0.062 [*]	8.6	0.683±0.018 [*]
0.5 mg/kg VPM+VCR 组	16	1.435±0.080 [#]	3.9	0.215±0.019 ^{*#△}
1.0 mg/kg VPM+VCR 组	16	1.211±0.038 ^{*#△}	18.9	0.120±0.018 ^{*#△▲}
1.5 mg/kg VPM+VCR 组	16	1.116±0.031 ^{*#△}	25.3	0.092±0.012 ^{*#△}
2.0 mg/kg VPM+VCR 组	16	1.093±0.032 ^{*△}	26.8	0.094±0.011 ^{*#△}

与等渗盐水组比较,^{*}*P*<0.05;与 VCR 对照组比较,[#]*P*<0.05;与 VPM 对照组比较,[△]*P*<0.05;与 0.5 mg/kg VPM+VCR 组比较,[▲]*P*<0.05

表 2 不同剂量维拉帕米和长春新碱及艾灸治疗后的瘤体重量、抑瘤率及 P-gp 值比较

组别	<i>n</i>	瘤体重量(g)	抑瘤率(%)	P-gp 值
等渗盐水组	16	1.483±0.058	—	0.879±0.057
VCR 对照组	16	1.095±0.053 [*]	26.2	0.426±0.032 [*]
VPM 对照组	16	1.386±0.086 [*]	6.5	0.742±0.016 [*]
艾灸对照组	16	1.364±0.071 [*]	8.0	0.549±0.021 [*]
0.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组	16	1.442±0.067 [#]	2.8	0.208±0.017 ^{*#△}
1.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组	16	1.219±0.049 ^{*#△▲}	17.8	0.120±0.016 ^{*#△◇}
1.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组	16	1.111±0.038 ^{*#△▲}	25.1	0.074±0.012 ^{*#△}
2.0 mg/kg VPM+VCR+艾灸组	16	1.085±0.035 ^{*△▲}	26.8	0.078±0.013 ^{*#△}

与等渗盐水组比较,^{*}*P*<0.05;与 VCR 对照组比较,[#]*P*<0.05;与 VPM 对照组比较,[△]*P*<0.05;与艾灸对照组比较,[▲]*P*<0.05;与 0.5 mg/kg VPM+VCR+艾灸组比较,[◇]*P*<0.05

3 讨论

维拉帕米对人胃癌耐药细胞系 SGC7901/VCR 多药耐药性具有逆转效应,有研究结果表明维拉帕米可以使 SGC7901/VCR 的 *MDR1* 基因表达水平和 P-gp 糖蛋白表达降低,细胞对化疗药物的敏感性明显增加^[12-14];本文的结果显示,维拉帕米与 VCR 配伍使用时,有增效作用,在 2.0 mg/kg 剂量时,与半剂量的 VCR 配伍,基本能达到足剂量 VCR 的效果,再次证明维拉帕米对于 VCR 耐药的 SGC7901 细胞具有逆转增效作用。

艾灸确有调节肿瘤相关免疫的作用,能改善小鼠生存质量,在肿瘤免疫相关指标如细胞因子的表达等多方面证明艾灸具有免疫调节作用^[15]。本文中艾灸在与维拉帕米配伍时在维拉帕米达 1.5 mg/kg 剂量时的降低 P-gp 糖蛋白表达效果明显,但在低剂量组时组间相比无显著性差异,提示艾灸需要与维拉帕米高剂量时配伍能起到好的疗效;由于艾灸所具有的调节免疫的作用,因此首先

表现具有降低 P-gp 糖蛋白的作用,但瘤体重量、抑瘤率暂无改善;由于本实验的动物例数及艾灸的时间所限,可能影响了实验的结果,在后期的实验中将加大动物例数和增加艾灸的时间进一步考察艾灸对肿瘤生长的影响。

从本文结果可以看出维拉帕米和艾灸联合用药具有逆转 SGC7901 细胞 VCR 耐药和增效,但还需要进一步考察两者联合效价,扩大实验样本量,从而提高实验数据的可信性,以进一步验证维拉帕米和艾灸在抗肿瘤方面具有高效疗效的相关特性。

[参考文献]

[1] Fang G, Yang YL, Li JS, *et al.* R-dl-verapamil downmodulates multidrug resistance of KBv200 cells to vincristine and doxorubicin[J]. Acta Pharmacol Sin, 1999, 20(7):647-650.

[2] Bellamy WT, Dalton WS, Kailey JM, *et al.* Verapamil reversal of doxorubicin resistance in multidrug-resistant human myeloma cells and association with drug accumulation and DNA damage [J]. Cancer Res, 1988, 48(22):6365-6370.

- [3] 方刚,侯亚义,杨玉龙,等. R-型维拉帕米逆转肿瘤细胞多药耐药的实验研究[J]. 医学研究生学报, 2000, 13(5): 285-288.
- [4] 平玉杰,赵丽辉,霍伟英,等. 吡柔比星联合维拉帕米膀胱灌注对膀胱癌术后复发的预防效果分析[J]. 中国性科学, 2013, 22(7): 12-14.
- [5] 王飞通,汪正伟,刘小云,等. 维拉帕米对体内外胰腺癌 SW1990 细胞侵袭转移影响及其机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(1): 39-44.
- [6] 徐天舒,王玉娟,李明,等. 麦粒灸后三里穴对环磷酰胺化疗肿瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 江苏中医药, 2013, 45(11): 72-74.
- [7] 张乐,徐腾,廖军,等. 艾灸对肝癌裸鼠移植瘤 PCNA、Cyclin D1、CDK4 表达影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 1001-1003.
- [8] 郝智慧,徐兰凤. 艾灸抗肿瘤作用研究概况[J]. 江苏中医药, 2014, 46(1): 79-81.
- [9] 何娟,刘晓磊,彭文兴. P-糖蛋白介导的肿瘤多药耐药逆转机制研究进展[J]. 中国药房, 2006, 17(3): 218-220.
- [10] 蔡利军,宋淑萍,吕宾,等. 温郁金醇提物对人耐长春新碱胃腺癌细胞 SGC-7901 皮下移植瘤的逆转作用及对 P 糖蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(11): 1347-1353.
- [11] 武兵,庞家秉,韩霞,等. 槲皮素对耐长春新碱 U251/Vin 细胞多药耐药的逆转作用[J]. 中国临床研究, 2014, 27(3): 272-276.
- [12] 张敏娟,张庆瑜,康春生,等. 维拉帕米逆转胃癌细胞系 SGC7901/VCR 多药耐药性的研究[J]. 国际消化病杂志, 2008, 28(2): 166-168.
- [13] 邢璐,崔纯莹,王玉记,等. 疏嘌呤/维拉帕米-介孔氧化硅释药系统的构建及逆转耐药活性研究[J]. 首都医科大学学报, 2015, 36(2): 161-165.
- [14] 梅梅,张翼,任金红,等. 新型紫杉烷化合物 NPB304 及其协同维拉帕米逆转耐药的研究[J]. 药学报, 2014, 49(9): 1279-1288.
- [15] 付铃,万茜,徐天舒. 麦粒灸对 Lewis 荷瘤小鼠 Treg 细胞表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2015, 31(1): 58-60.
- (收稿日期:2017-08-14; 修回日期:2017-10-12)
(本文编辑:叶华珍; 英文编辑:王建东)