

黄芪多糖下调骨肉瘤细胞对阿霉素耐药的可能机制研究

徐进¹ 郑璟² 严力军^{1△}

[摘要] 目的:研究黄芪多糖下调 MG63/ADR 耐药骨肉瘤细胞的耐药机制。方法:检测并计算黄芪多糖对 MG63 骨肉瘤细胞株 IC₅₀ 的影响,将骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 分为 CON 组(未行黄芪多糖及阿霉素处理)、APS 组(仅黄芪多糖处理)、ADR 组(仅阿霉素处理)、A+A 组(黄芪多糖联合阿霉素处理),CCK-8 法检测细胞吸光度,流式细胞仪检测细胞增殖及凋亡。分别采用 RT-PCR 和 Western Blot 法检测四组细胞多药耐药相关蛋白 1(MRP-1)和多药耐药 1(MDR1)基因 mRNA 和蛋白质表达。结果:黄芪多糖体外抑制 MG63 骨肉瘤细胞株 IC₅₀ 为 1.6 mg/mL。APS 组和 CON 组、A+A 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的第 1~7 天吸光度、G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期、增殖指数(PI)、凋亡率、MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达差异无统计学意义($P>0.05$)。骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的第 1~7 天吸光度、S 期、G₂/M 期、PI、MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达低于 APS 组,G₀/G₁ 期和凋亡率均高于 APS 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:黄芪多糖可抑制骨肉瘤细胞增殖并促进凋亡,通过抑制 MRP-1 和 MDR1 基因表达下调 MG63/ADR 耐药骨肉瘤细胞对阿霉素的耐药性。

[关键词] 骨肉瘤;黄芪多糖;耐药;机制

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)11-0006-04

Astragalus Polysaccharide Down-regulates the Drug Resistance Mechanism of Osteosarcoma Cells

XU Jin¹ ZHENG Jing² YAN Lijun^{1△}

¹ Department of Orthopedics, Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441021, Hubei China;

² Department of Ophthalmology, Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441021, Hubei China.

Abstract Objective: To study the mechanism of astragalus polysaccharide down-regulating the drug resistance of MG63/ADR-resistant osteosarcoma cells. **Methods:** CCK-8 method was used to detect the astragalus polysaccharide's IC₅₀ on MG63/ADR-resistant osteosarcoma cells. MG63/ADR-resistant osteosarcoma cells were divided into CON group (without astragalus polysaccharide and doxorubicin treatment), APS group (astragalus polysaccharide treatment), ADR group (doxorubicin treatment), A+A group (astragalus polysaccharide and doxorubicin treatment). The differences in cell absorbance, cell cycle and apoptosis in four groups were detected and compared. RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of multidrug resistance-associated protein-1 (MRP-1) and multidrug resistance-1 (MDR-1) mRNA and protein. **Results:** The astragalus polysaccharide's IC₅₀ on MG63/ADR-resistant osteosarcoma cells 1.6 mg/mL. The day 1-day 7 absorbance, G₀/G₁ phase, S phase, G₂/M phase, PI, apoptosis rate, MRP-1 and MDR1 expressions of MG63/ADR cell in the APS and CON, A+A groups were not statistically significant ($P>0.05$). The day 1-day 7 absorbance, S-phase, G₂/M-phase, proliferation index(PI), MRP-1 and MDR1 gene mRNA and protein expressions in A+A

group were lower than those of APS group, while G₀/G₁ phase and apoptosis rate were higher than the APS group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$).

Conclusion: Astragalus polysaccharides can inhibit the proliferation of osteosarcoma cells and promote apoptosis, and downregulate the resistance of MG63/ADR-resistant osteo-

¹ 湖北省襄阳市湖北文理学院附属医院(襄阳市中心医院)骨科 (湖北 襄阳, 441021)

² 湖北省襄阳市湖北文理学院附属医院(襄阳市中心医院)眼科

[△]通信作者 E-mail: winters100@qq.com

sarcoma cells to doxorubicin by inhibiting the expression of MRP-1 and MDR1 genes.

Keywords: osteosarcoma; astragalus polysaccharide; drug resistance; mechanism

骨肉瘤获得性耐药相关基因包括多药耐药相关蛋白 1(MRP-1)和多药耐药 1(MDR1),可降低肿瘤细胞内化疗药物浓度或抑制化疗药物与靶向基因结合,调控耐药基因提高化疗药物疗效对改善骨肉瘤预后具有重要意义^[1-2]。黄芪多糖为中药黄芪提取物,可抑制多种肿瘤细胞增殖并促进其凋亡,对耐药基因表达具有抑制作用,可提高化疗药物疗效^[3-4]。本研究采用黄芪多糖处理骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR,研究黄芪多糖对骨肉瘤细胞株 MG63/ADR 对阿霉素的耐药性的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 购于上海慧颖生物科技有限公司;MG63 骨肉瘤细胞株购于美国典型培养物保藏中心;胎牛血清、高糖 DMEM 及 CCK-8 试剂盒购于上海碧云天公司;流式细胞仪购于美国赛默飞世尔公司。RNA 及蛋白质提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;引物为大连宝生物工程有 限 公 司 设 计 合 成;MRP-1 和 MDR1 抗 体 购 于 美 国 Santa Cruz 公司。黄芪多糖和阿霉素购于美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 取对数生长期 MG63 骨肉瘤细胞株加入不同浓度黄芪多糖(0.2,0.4,0.8,1.6,3.2,6.4,12.8 mg/mL)处理,检测细胞吸光度并绘图计算黄芪多糖 IC₅₀,根据 IC₅₀ 行后续分组处理。将骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 分为 CON 组(未行黄芪多糖及阿霉素作用,仅加入培养基)、APS 组(1.6 mg/mL 黄芪多糖处理)、ADR 组(16 μmol/mL 阿霉素处理)和 A+A 组(1.6 mg/mL 黄芪多糖及 16 μmol/mL 阿霉素处理)。

1.2.2 细胞吸光度检测 骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 加入 CCK-8 试剂,检测 450 nm 细胞吸光度,每组设 3 组复孔,实验重复 3 次。细胞存活率=(实验组 A₄₅₀ 值-空白对照组 A₄₅₀ 值)/(阴性对照组 A₄₅₀ 值-空白对照组 A₄₅₀ 值),细胞生长抑制率=1-细胞存活率。检测作用前及作用后第 1~7 天吸光度。

1.2.3 细胞增殖及凋亡检测 采用流式细胞仪检测增殖周期及凋亡,增殖指数(PI)=(S+G₂/M)/(G₀/G₁+S+G₂/M)。

1.2.4 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达检测 采用逆转录 PCR(RT-PCR)检测 MRP-1 和

MDR1 基因 mRNA 表达,引物序列及方法参考 Roy 等研究^[5]。采用 Western Blot 法检测 MRP-1 和 MDR1 基因蛋白质表达,分别选择 β-actin 基因 mRNA 和蛋白质表达为内参。Image J 软件计算 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质与 β-actin 相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪多糖对 MG63 骨肉瘤细胞株生长抑制率

黄芪多糖对 MG63 骨肉瘤细胞株生长抑制呈剂量相关性(见图 1),计算 IC₅₀ 为 1.6 mg/mL,选择黄芪多糖 1.6 mg/mL 浓度进行后续实验。

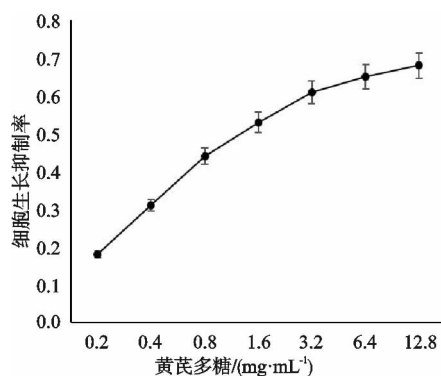


图 1 不同浓度黄芪多糖对 MG63 骨肉瘤细胞株生长抑制率

2.2 细胞吸光度比较

CON 组和 ADR 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 d0-d7 吸光度无明显差异($P > 0.05$),APS 组和 A+A 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的第 1~7 天吸光度均低于 CON 组和 ADR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);A+A 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的第 1~7 天吸光度均低于 APS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 细胞增殖及凋亡率比较

CON 组和 ADR 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 在 G₀/G₁期、S 期、G₂/M 期、增殖指数和凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$),APS 组和 A+A 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 细胞 S 期、G₂/M 期和 PI 均显著低于 CON 组和 ADR 组,G₀/G₁期和凋亡率均显著高于 CON 组和 ADR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。A+A 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 S 期、G₂/M 期和 PI 均低于 APS 组,

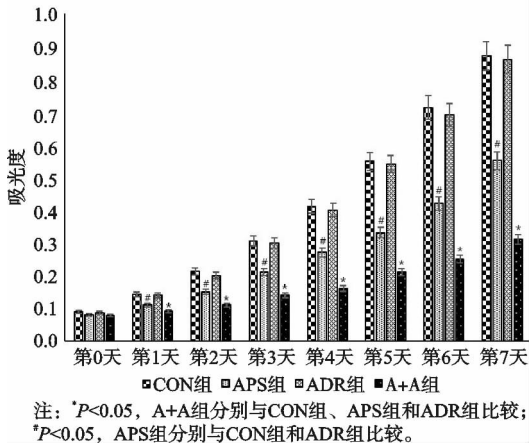


图2 骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 第 0~7 天吸光度比较

表 1 骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 细胞增殖及凋亡比较(̄±s)

组别	例数	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	PI/%	凋亡率/%
CON 组	9	55.1±2.3	31.7±1.6	9.2±0.9	0.45±0.05	19.6±1.4
APS 组	9	59.7±2.4 [#]	29.1±1.3 [#]	8.6±0.7 [#]	0.38±0.03 [#]	22.1±1.6 [#]
ADR 组	9	55.2±2.5	31.5±1.9	9.3±1.1	0.44±0.06	19.7±1.5
A+A 组	9	62.5±2.1 [*]	26.4±1.2 [*]	8.1±0.6 [*]	0.34±0.03 [*]	25.9±1.8 [*]
F		101.378	45.674	81.233	56.744	90.138
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: * P<0.05, A+A 组分别与 CON 组、APS 组和 ADR 组比较; # P<0.05, APS 组分别与 CON 组和 ADR 组比较。

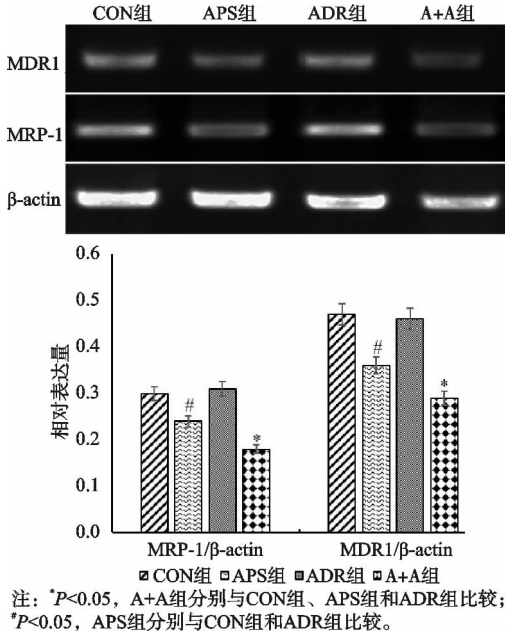


图3 骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 表达比较

3 讨论

3.1 骨肉瘤耐药与 MRP-1 和 MDR1 基因

骨肉瘤对阿霉素原发性及继发性耐药导致患者预后极差,耐药机制主要与耐药基因表达有关,降低耐药基因表达进而提高化疗药物疗效在骨肉瘤治疗中极其重要^[6-7]。MRP-1 及 MDR1 为骨肉瘤化疗最常见的耐药基因,MRP-1 为 ATP 结合超家族转运蛋白成员,

G₀/G₁ 期和凋亡率均高于 APS 组,差异有统计学意义 (P<0.05),见表 1。

2.4 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达比较

CON 组和 ADR 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质差异无统计学意义 (P>0.05),APS 组和 A+A 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达均低于 CON 组和 ADR 组,差异有统计学意义 (P<0.05);A+A 组骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 细胞 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达均低于 APS 组,差异有统计学意义 (P<0.05),见图 3-4。

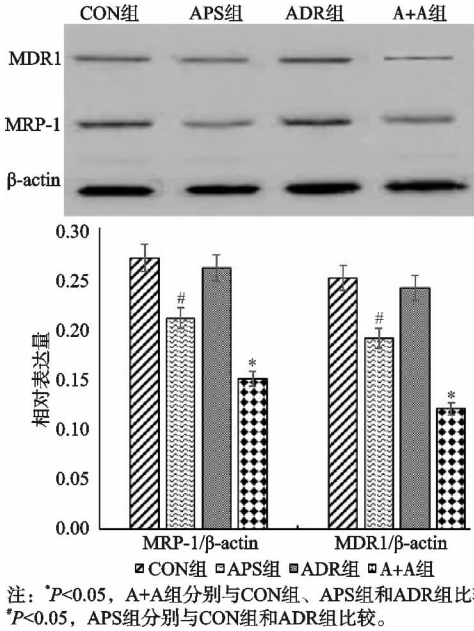


图4 骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 MRP-1 和 MDR1 基因蛋白质表达比较

可逆浓度将细胞内化疗药物泵出细胞外,使化疗药物在细胞内重新分布或将化疗药物与靶点隔离,导致肿瘤细胞产生耐药性^[8-9]。聂晓奇等^[10]采用多药耐药相关蛋白 1 基因小干扰 RNA 抑制 MRP-1 基因表达可逆转大鼠胶质瘤多药耐药细胞株 C6/VP16 对依托泊苷耐药性。MDR1 基因表达产物 P-糖蛋白为 ATP 依赖性泵,可将带正电荷的化疗药物逆浓度泵出细胞外,

降低细胞内化疗药物浓度而产生耐药性^[11]。体外建立骨肉瘤阿霉素耐药细胞株时发现 MDR1 基因表达显著增加^[12]。本研究中均可检测到骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质,证实骨肉瘤阿霉素耐药与性 MRP-1 和 MDR1 基因存在关联。

3.2 黄芪多糖与骨肉瘤耐药性

黄芪多糖通过调节凋亡基因、调控 Bcl-2/Bax 及 Caspase 蛋白酶活性等机制抑制肿瘤细胞增殖及侵袭并诱导肿瘤细胞凋亡,体外实验中发现黄芪多糖对多种肿瘤细胞具有直接的抑制作用^[13-14]。本研究采用不同浓度的黄芪多糖作用于 MG63 骨肉瘤细胞株,发现黄芪多糖对 MG63 骨肉瘤细胞株生长抑制呈剂量相关性(IC₅₀ 为 1.6 mg/mL),表明黄芪多糖自身可抑制骨肉瘤细胞的增殖,为临床上黄芪多糖抗肿瘤治疗提供客观证据。

黄芪多糖可逆转多种肿瘤细胞对化疗药物的耐药性。刘晓滨等^[4]采用黄芪多糖处理 EC109/DDP 顺铂耐药食管癌细胞,发现黄芪多糖可显著抑制细胞增殖并促进凋亡,同时降低 MRP 和 GST- π 基因 mRNA 表达,降低 EC109/DDP 顺铂耐药食管癌细胞对顺铂的耐药性。本研究中骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的第 1~7 天吸光度、S 期、G₂/M 期、PI、MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达低于 APS 组, G₀/G₁ 期和凋亡率均高于 APS 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明黄芪多糖自身对骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 具有抑制增殖及促进凋亡作用,可显著降低骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 的 MRP-1 和 MDR1 基因 mRNA 和蛋白质表达,最终下调骨肉瘤耐阿霉素细胞株 MG63/ADR 细胞对阿霉素的耐药性,提示临床上对阿霉素耐药的骨肉瘤患者可联用黄芪多糖以改善预后。

参考文献

- [1] CHEN R, WANG G, ZHENG Y, et al. Drug resistance-related microRNAs in osteosarcoma: translating basic evidence into therapeutic strategies [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(4): 2280-2292.
- [2] WAN Y, XU L, ZHUO N, et al. The clinical significance of neoadjuvant chemotherapy in improving the drug resistance of osteosarcoma [J]. Minerva Med, 2017, 108(5): 479-481.
- [3] 招志辉, 丘振文, 招远明. 黄芪多糖通过调控 miR-20a/

TGFR2 分子轴降低结直肠癌 HT-29/DDP 细胞的顺铂耐药性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(4): 417-425.

- [4] 刘晓滨, 祁丽, 张文轩. 黄芪多糖逆转 EC109/DDP 食管癌细胞顺铂耐药的可能机制[J]. 癌症进展, 2017, 15(1): 29-31.
- [5] ROY S, KENNY E, KENNEDY S, et al. MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 mRNA and protein expression in non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2007, 27(3A): 1325-1330.
- [6] XIE X, LIU W, DUAN Z, et al. LncRNA NORAD targets miR-410-3p to regulate drug resistance sensitivity of osteosarcoma [J]. Cell Mol Biol, 2020, 66(3): 143-148.
- [7] TAO Y, XIN M, CHENG H, et al. TRIM37 promotes tumor cell proliferation and drug resistance in pediatric osteosarcoma [J]. Oncol Lett, 2017, 14(6): 6365-6372.
- [8] CHEN N, KONG Y, WU Y, et al. CAC1 knockdown reverses drug resistance through the downregulation of P-gp and MRP-1 expression in colorectal cancer [J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0222035.
- [9] ROUNDHILL E A, BURCHILL S A. Detection and characterisation of multi-drug resistance protein 1 (MRP-1) in human mitochondria [J]. Br J Cancer, 2012, 106(6): 1224-1233.
- [10] 聂晓奇, 陈治标, 徐海涛, 等. 逆转大鼠胶质瘤细胞耐药性 MRP1-siRNA 的筛选实验 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2013, 18(3): 154-157.
- [11] TANAKA K, KIGUCHI K, MIKAMI M, et al. Involvement of the MDR1 gene and glycolipids in anticancer drug-resistance of human ovarian carcinoma-derived cells [J]. Hum Cell, 2019, 32(4): 447-452.
- [12] LEE P D, NOBLE-TOPHAM S E, BELL R S, et al. Quantitative analysis of multidrug resistance gene expression in human osteosarcomas [J]. Br J Cancer, 1996, 74(7): 1046-1050.
- [13] YANG S, SUN S, XU W, et al. Astragalus polysaccharide inhibits breast cancer cell migration and invasion by regulating epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(4): 1819-1832.
- [14] SONG J, CHEN Y, HE D, et al. Astragalus polysaccharide promotes adriamycin-induced apoptosis in gastric cancer cells [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 2405-2414.

(收稿日期: 2020-06-17)