

榄香烯联合化疗治疗荷瘤小鼠

邹大伟, 巴 静, 吉阳涛, 路 平

邹大伟, 巴静, 吉阳涛, 中国医科大学附属第一医院检验科
辽宁省沈阳市 110001
路平, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市
110001

辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目, No. 2004D182
通讯作者: 路平, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号,
中国医科大学附属第一医院肿瘤科. jyt00@163.com
电话: 024-83282242

收稿日期: 2007-04-13 修回日期: 2007-09-11

Therapeutic effects of elemene and chemotherapy in tumor-bearing mice

Da-Wei Zou, Jing Ba, Yang-Tao Ji, Ping Lu

Da-Wei Zou, Jing Ba, Yang-Tao Ji, Clinical Laboratory,
the First Affiliated Hospital, China Medical University,
Shenyang 110001, China

Ping Lu, Department of Oncology, the First Affiliated Hos-
pital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaon-
ing Province, China

Supported by: the Key Project of the Education Depart-
ment of Liaoning Province, No. 2004D182

Correspondence to: Ping Lu, Department of Oncology,
The First Affiliated Hospital, China Medical University, 155
Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001,
Liaoning Province, China. jyt00@163.com

Received: 2007-04-13 Revised: 2007-09-11

Abstract

AIM: To explore a potential treatment for carcinoma by observing the therapeutic effects of elemene and chemotherapy in tumor-bearing mice (LT).

METHODS: Pharmaceuticals were injected into the centers of tumors in tumor-bearing mice, and the expression of the multidrug resistance gene (mdr1) was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. The rate of inhibition of tumor growth, the pathology of the tumor and mortality were noted.

RESULTS: The expression levels of mdr1 in chemotherapy (C), elemene (E) and chemotherapy+elemene (CE) groups were 100%, 16.67% and 8.33% of the levels in the tumor-bearing (LT) group, respectively, and there was statistical significance between the E (or CE)

and LT groups ($P < 0.05$). The rates of inhibition of tumor growth in mice in groups C, E and CE were 24.3%, 29.7%, and 39.5%, respectively, and there was statistical significance when compared with LT mice, $P < 0.05$. The mortality of mice in groups C, E and CE was 20%, 10%, and 10%, respectively, and there was statistical significance when compared with LT mice (40%) ($P < 0.05$). Tumor necrosis was outstanding in CE mice, and these mice were more energetic than the mice in other groups.

CONCLUSION: Elemene can reduce the expres-
sion of the mdr1 gene and is effective in killing
tumors. Further, it is more effective when com-
bined with a chemotherapeutic agent.

Key Words: Carcinoma; Elemene; Multidrug resist-
ance gene 1; Mice; Combination therapy

Zou DW, Ba J, Ji YT, Lu P. Therapeutic effects of elemene
and chemotherapy in tumor-bearing mice. *Shijie Huaren
Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2931-2933

摘要

目的: 观察榄香烯结合化疗药对荷瘤小鼠的
治疗作用, 为临床肿瘤的治疗提供理论依据。

方法: 构建荷瘤小鼠动物模型, 肿瘤内注射给
药, 用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法
测其多药耐药基因(multidrug resistance gene,
mdr1)的表达, 同时观察抑瘤率、肿瘤坏死情
况和小鼠死亡率。

结果: 荷瘤组(LT)、化疗组(C)、榄香烯组
(E)、化疗药+榄香烯组(CE)的mdr1的表达
分别为(100%、100%、16.67%、8.33%), 其
中E、CE与LT组的mdr1比较有显著性差
异($P < 0.05$); C、E、CE组抑瘤率(24.3%、
29.7%、39.5%)和死亡率(20%、10%、10%)
分别与LT组(0、40%)比较有显著性差异
($P < 0.05$)。病理显示, CE组肿瘤坏死明显, 大体
见肿瘤腐肉状, 色晦暗, 质软, 小鼠生存活跃。

结论: 榄香烯可降低mdr1的表达并有良好的抗
肿瘤的作用, 与化疗药合用抗肿瘤作用更佳。

背景资料
从BB1生物碱中
寻找逆转耐药作
用强、特异性高
而毒副作用小的
药物很有希望, 其
中榄香烯的抗肿
瘤效果和机制是
目前研究的热点。

相关报道

目前部分报道提示: 榄香烯可防止肿瘤细胞从S期进入G₂, M期, 并诱导其凋亡, 而其逆转mdr1作用尚存在争议. 部分学者认为榄香烯与肿瘤细胞mdr1表达关系不大, 而有些学者证实榄香烯在阿霉素较高浓度情况下有逆转mdr1作用.

关键词: 肝癌; 榄香烯; 多药耐药基因; 小鼠; 联合治疗

邹大伟, 巴静, 吉阳涛, 路平. 榄香烯联合化疗治疗荷瘤小鼠. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2931-2933
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2931.asp>

0 引言

癌细胞的多药耐药(multidrug resistance, MDR)影响了肿瘤化疗的进行, 研究证实中药可以应用于逆转多药耐药^[1-3]. 目前部分研究报道榄香烯可能具有抗肿瘤作用^[4-6], 为进一步证实这一论点, 本研究采用肿瘤内注射给药, 观察4组荷瘤小鼠的多药耐药基因(mdr1)的表达率、抑瘤率、肿瘤的病理及死亡率, 探讨榄香烯的抗肿瘤效果.

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c纯系小鼠, 鼠龄6-8 wk, 体重18-20 g, 雌雄各半; 小鼠腹水型肝癌低转移株Hca-A2/p由大连医科大学病理教研室提供. mdr1引物、内参引物、mRNA提取及反转录试剂, 均由宝生物公司合成; 榄香烯由大连金港制药有限公司生产, 阿霉素、丝裂霉素由浙江海正制药公司生产.

1.2 方法 取传代7 d Hca-A₂/p的Balb/c小鼠腹水, 分离肿瘤细胞, 加入Hank's液稀释成 5×10^{10} 个细胞/L, 取100只纯系Balb/c小鼠于右前肢皮下每只接种0.2 mL, 合 1×10^6 个细胞/只, 第6天肉眼可见肿瘤生长良好, 随机取肿瘤组织镜下观察, 证实为原肝癌细胞株细胞, 荷瘤小鼠80只随机均分为4组, 当日开始用1 mL注射器予肿瘤中心注射药物, 药液均为0.5 mL. 荷瘤组(LT)用生理盐水0.5 mL; 化疗组(C)用Mitomycinum C 0.025 mg, Adriamycin 0.125 mg; 榄香烯组(E)Elemene 0.5 mL; 化疗药+榄香烯组(CE)Mitomycinum C 0.025 mg, Adriamycin 0.125 mg+Elemene 0.5 mL. 分别在第6、10、13、18、23天给药, 第28天制取标本. 按用药后24 h为第7天, 以次类推, 记录各组小鼠死亡的日期及数量. 脱颈处死后, 每只小鼠称质量及切取全瘤称质量, 取0.5 cm³肿块备测mdr1, 其余部分浸泡于140 g/L甲醛液中, 抑瘤率按下列公式计算: 抑瘤率(%) = (对照组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/(对照组平均瘤质量)×100%. 放大镜下摄片, 分析病理变化. 随机取各组存活小鼠12只测mdr1 mRNA的表达情况; RNA的提取、cDNA的合成、PCR扩增及电泳PCR产物均按试剂说明书进行. 通过扫描计算机

表 1 各组mdr1表达情况(n)

分组	-	+	++	阳性率(%)
LT	0	4	8	100 ^{ac}
C	0	2	10	100 ^{ac}
E	11	1	1	16.67
CE	11	1	0	8.33

^aP<0.05 vs E组; ^cP<0.05 vs CE组.

处理得出各标本mdr1/control cDNA比值, 结合电泳中荧光条带强弱, 将mdr1/control cDNA比值分为: (1)mdr1/control cDNA<0.1以(-)表示; (2)比值在0.1-1之间可见mdr1阳性带但较弱用(+)表示; (3)比值在1.0以上用(++)表示.

统计学处理 计量资料采用 t 检验和计数资料采用 χ^2 检验, 在软件SPSS12.0上进行.

2 结果

2.1 各组mdr1表达情况 瘤株Hca-A₂/p的mdr1的自然表达率占100%. 榄香烯单独或其和化疗药同时应用, 瘤株的mdr1表达率均有明显的降低(表1).

2.2 各方案用药后肿瘤组织病理学改变 荷瘤组(LT)肿瘤细胞密集成团, 间质甚少, 癌细胞异形性明显, 核大, 核胞比例失调, 深染, 染色质不均, 核分裂多见, 可见病理性核分裂像, 未见明显肿瘤细胞坏死. E组、C组镜下可癌细胞不同程度的变性、坏死. CE组: 大体见肿瘤色晦暗, 呈腐肉状, 镜下见癌细胞数量明显减少、变性、坏死, 胞质肿胀红染、疏松, 出现大小不等的空泡, 胞核肿胀、溶解、裂解、碎裂、固缩, 大量细胞核消失, 少量中性粒细胞坏死.

2.3 各方案的抑瘤率及死亡率 E组、C组、CE组的抑瘤率分别为24.3%, 29.7%, 39.5%. 用药后LT组、C组、E组、CE组死亡率分别为40%, 20%, 10%, 10%.

3 讨论

多药耐药的形是肿瘤细胞免受药物攻击的最有效防御机制, 其形成机制很复杂, 其中以mdr1及其编码蛋白pgp高表达的研究最为重要^[7]. pgp为单向药物能量依赖外排泵, 他可将肿瘤细胞内的化疗药物排出细胞外, 致细胞内药物浓度下降, 因而肿瘤细胞耐药, 也就影响了临床肿瘤化疗的进行. 近几年, 中药应用于逆转多药耐药, 因为他的药理作用广泛, 副作用小, 从中药中筛选MDR逆转剂有广阔前景.

潘启超 *et al*^[8]研究了11种具有钙阻滞作用的中药单体,发现对长春新碱天然耐药的BCL-7402细胞株,大多数中药单体都有类似钙通道阻滞剂维拉帕米的体外细胞毒增效作用;还研究了属双苄基异喹啉(BBI)生物碱的中药单体,例如粉防己碱、蝙蝠葛碱等具有较好的耐药逆转作用.结果提示从BBI生物碱中寻找逆转耐药作用强、特异性高而毒副作用小的药物是很有希望的,其中榄香烯的作用尤其得到了肯定.榄香烯是从中药莪术中提取的抗癌药,临床观察其对恶性肿瘤有较好的疗效和较小的副作用,对肿瘤细胞的DNA, RNA和蛋白的合成均有明显的抑制作用,防止肿瘤细胞从S期进入G2, M期,降低肿瘤的分裂增值,并诱导其凋亡,而其逆转mdr1作用尚存在争议^[9-11].

王宝成 *et al*^[12]采用肝癌细胞株BEL-7402对榄香烯能否促进mdr1的产生以及对产生MDR肿瘤细胞的生长抑制作用进行了研究,发现榄香烯与肿瘤细胞mdr1表达关系不大,对已产生MDR肿瘤细胞仍有抑制作用,未能使敏感株诱发mdr1的高表达.而有些学者用化疗药与榄香烯合用作用于K562及K562/DoM证实榄香烯在阿霉素较高浓度情况下有逆转mdr1作用,且有浓度和时间依赖性.对此矛盾的结论,本实验LT组的mdr1 mRNA表达率为100%.榄香烯单独在体内应用测其mdr1 mRNA表达率为16.67%与LT组100%有显著差异,提示榄香烯单独应用即可诱使mdr1逆转,而CE组的mdr1与C组比较有显著的差异,进一步证实榄香烯有逆转mdr1的作用.另外观察E组的抑瘤率24.3%、死亡率10%这两个指标与LT组比较都有明显差异,与离体细胞培养结论相一致,证明榄香烯单独应用就有良好的抗肿瘤作用.从病理上看,C组、E组、CE组肿瘤都有坏死情况,但CE组肿瘤坏死的严重和CE组的抑瘤率较C组、E组有差别,提示榄香烯和化疗药联合应用抗肿瘤的效果好.部分文章报道低浓度榄香烯促进肝癌细胞凋亡,高浓度加速肝癌细胞坏死.总之,榄香烯和化疗药联合应用可能有良好的抗肿瘤作用,其具体机制尚需进一步的临床研究证实^[13-15].

4 参考文献

- 1 Zubor P, Lasabova Z, Hatok J, Stanclova A, Danko J. A polymorphism C3435T of the MDR-1 gene

- associated with smoking or high body mass index increases the risk of sporadic breast cancer in women. *Oncol Rep* 2007; 18: 211-217
- 2 Trnkova Z, Bedrlíkova R, Markova J, Michalova K, Stockbauer P, Schwarz J. Semiquantitative RT-PCR evaluation of the MDR1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia. *Neoplasma* 2007; 54: 383-390
- 3 Vache C, Camares O, Cardoso-Ferreira MC, Dastugue B, Creveaux I, Vauray C, Bamdad M. A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Chem* 2007; 26: 1418-1424
- 4 Xu L, Tao S, Wang X, Yu Z, Wang M, Chen D, Jing Y, Dong J. The synthesis and anti-proliferative effects of beta-elemene derivatives with mTOR inhibition activity. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 5351-5356
- 5 Tao L, Zhou L, Zheng L, Yao M. Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 24-34
- 6 Peng X, Zhao Y, Liang X, Wu L, Cui S, Guo A, Wang W. Assessing the quality of RCTs on the effect of beta-elemene, one ingredient of a Chinese herb, against malignant tumors. *Contemp Clin Trials* 2006; 27: 70-82
- 7 Manov I, Bashenko Y, Hirsh M, Iancu TC. Involvement of the multidrug resistance P-glycoprotein in acetaminophen-induced toxicity in hepatoma-derived HepG2 and Hep3B cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 99: 213-224
- 8 潘启超, 田晖. 多种中药单体逆转肿瘤多药耐药性. 科学通报 1995; 40: 1901-1904
- 9 Foote CJ, Greer W, Kiberd B, Fraser A, Lawen J, Nashan B, Belitsky P. Polymorphisms of multidrug resistance gene (MDR1) and cyclosporine absorption in de novo renal transplant patients. *Transplantation* 2007; 83: 1380-1384
- 10 Buda G, Maggini V, Galimberti S, Martino A, Giuliani N, Morabito F, Genestreti G, Iacopino P, Rizzoli V, Barale R, Rossi AM, Petrini M. MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2007; 137: 454-456
- 11 Wu L, Xu X, Shen J, Xie H, Yu S, Liang T, Wang W, Shen Y, Zhang M, Zheng S. MDR1 gene polymorphisms and risk of recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Surg Oncol* 2007; 96: 62-68
- 12 王宝成, 郭军, 狄剑时, 师秋丽. 榄香烯乳剂与肿瘤多药耐药的基础研究. 中国肿瘤临床 1996; 23: 143-146
- 13 Zhang WX, Chen B, Zhang W, Chen N, Yu ZC, Cai WM. Effect of MDR1 gene polymorphism on progression of end-stage renal disease. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 579-583
- 14 Nakaichi M, Takeshita Y, Okuda M, Nakamoto Y, Itamoto K, Une S, Sasaki N, Kadosawa T, Takahashi T, Taura Y. Expression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in canine mast cell tumor cell lines. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 111-115
- 15 Wang XS, Yang W, Tao SJ, Li K, Li M, Dong JH, Wang MW. Effect of delta-elemene on HeLa cell lines by apoptosis induction. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 979-990

应用要点
榄香烯和化疗药联合应用可能在临床上会取得良好的抗肿瘤效果.

同行评价
本文研究了榄香烯联合化疗对荷瘤小鼠抗肿瘤作用,设计简单,内容易懂,有一定的临床意义.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽