

# 洛贝林逆转肿瘤细胞多药耐药机制新进展

谷 苗 彭昌能 李国庆<sup>△</sup>

(南华大学附属第二医院消化内科 湖南 衡阳 421001)

摘要:洛贝林,是从半边莲的品种中提取的一种哌啶生物碱。近期发现洛贝林可以逆转肿瘤细胞的多药耐药,可能作为新型、低毒、有效的耐药逆转剂。研究其作用机理、体内实验等将有助于探讨其临床实用性。

关键词:洛贝林;肿瘤细胞;多药耐药

中图分类号:R730.52 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-378-03

## Reversal Effect of Lobelin on Multidrug-resistance of Cancer Cell

GU Miao, PENG Chang-neng, LI Guo-qing<sup>△</sup>

(Department of Gastroenterology, The Second Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang Hunan 421001)

**ABSTRACT:** Lobeline, species from lobelia extract a piperidine alkaloid, Recent discovery Lobeline could reverse the of multidrug resistance of tumor cells, May be as new, low toxicity, effective resistance reversal agents, Study its mechanism of action, in vivo experiments will help to explore its clinical utility.

**Key words:** Lobelin; Tumor cell; MDR

**Chinese Library Classification(CLC):** R730.52 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)02-378-03

化疗是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一,能明显降低术后复发率,但治疗效果仍欠理想。其中一个重要原因就是肿瘤细胞多药耐药(multidrug resistance, MDR)的形成。目前有很多研究方向主要达到使部分或全部恢复耐药肿瘤细胞对所用化疗药敏感性的目的,可毒副作用大。现阶段国外有报道发现洛贝林能逆转肿瘤细胞的多药耐药,且达到一定有效效果的剂量比经典耐药逆转剂维拉帕米的剂量低得多,可以避免维拉帕米严重的副反应发生率,由此猜想洛贝林可能作为新型、低毒、有效的耐药逆转剂。本文就产生 MDR 最主要的机制、洛贝林对肿瘤细胞的耐药逆转、可能发生的机理及研究展望进行综述。

### 1 肿瘤细胞 MDR 的作用机制及经典的耐药逆转剂

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是肿瘤细胞免受化疗药物攻击的最重要的细胞防御机制,原因和机制非常复杂,其中 Loo 等报导多药耐药基因 1(MDR1)编码的 P-gp 高表达被认为是耐药形成的最主要的原因之一<sup>[1]</sup>。

#### 1.1 P-gp 蛋白的生物化学性质

P-糖蛋白是一种分子量为 170Dk 的跨膜糖蛋白,又称为 P170,完整的 P-gp 分子共有 12 个跨膜疏水区 and 2 个 ATP 结合位点,在膜内以二聚体或四聚体方式存在。

#### 1.2 肿瘤细胞中 P-gp 的作用、作用机制及经典的耐药逆转剂

可以在起源于表达 MDR1 基因的组织的肿瘤中观察 P-gp 的表达,如肝脏,肾脏,胰脏,肾上腺。使用 MDR 药物治疗白血病,

淋巴瘤,卵巢癌等的过程中也能观察到 P-gp 的表达。化疗最初对这些癌症有效。但当癌症复发时,它们通常表达更多的 P-gp。Chan 等<sup>[2]</sup>的研究表明,肉瘤和神经母细胞瘤中任何检测水平的 P-gp 表达都是一个非常消极的预后指征。这说明 P-gp 不仅是肿瘤细胞产生耐药性的标志,还是肿瘤恶化的标志。Ruiz、Johnstone<sup>[3-4]</sup>等研究报导 P-gp 还有抗凋亡的作用,机制可能是 P-gp 诱导一种新的跨膜 H<sup>+</sup> 转运,使细胞内碱化,半胱胺酶失活,从而对半胱胺酶(Caspase)依赖的凋亡途径有保护作用。

化疗不敏感或疗效差的肿瘤往往有较高的 P-gp 表达水平<sup>[5]</sup>。P-gp 能导致多种化疗药物的外排。研究证明 P-gp 是能量依赖性"药物泵",通过水解 ATP 酶获得能量,跨膜主动转运多种小分子物质(如化疗药物)以及离子如 Ca<sup>2+</sup>,能将抗癌药物主动转运出细胞,使细胞内药物浓度下降,药物对细胞的作用减弱而产生耐药<sup>[6]</sup>。较易被 P-gp 泵出细胞外的有某些天然性疏水性抗肿瘤药物,包括临床上抗肿瘤药的葱环类、天然植物碱类和表鬼臼毒类。

维拉帕米是目前已明确的具有逆转多药耐药性的钙通道阻滞剂,钙通道阻滞剂可以竞争结合 P-gp 的结合位点,影响其转运功能,增加细胞内抗肿瘤药物的浓度,逆转 MDR 细胞的耐药性,其中维拉帕米在胃癌、胰腺癌、脑膜癌、卵巢癌、肺癌等中报道有抗肿瘤生长、转移等作用<sup>[7-10]</sup>,可大剂量维拉帕米会产生严重的心脏毒性及其他不良反应。因此,仍然需要寻找新的逆转剂。而洛贝林对肿瘤细胞多药耐药的逆转,可能为我们寻求更好、安全、有效、低毒的逆转剂指明方向。

### 2 洛贝林对肿瘤细胞多药耐药的逆转及可能机制

#### 2.1 洛贝林的生物性质及现阶段主要的临床用途

洛贝林,别名祛痰碱、山梗菜碱、祛痰菜碱、北美山梗菜碱,是从山梗菜(北美半边莲)和其他半边莲(Lobelia chinensis

作者简介:谷苗,女,硕士研究生,Email:shareour@hotmail.com,研究方向:消化道肿瘤;

△通讯作者:李国庆,男,博士,主任医师,消化内科主任,硕士生导师

(收稿日期:2010-09-06 接受日期:2010-09-30)

Lour)的品种中提取的一种哌啶生物碱。能选择性地兴奋颈动脉体化学感受器,反射地兴奋呼吸中枢,大剂量也能直接兴奋呼吸中枢。临床主要用于新生儿窒息、一氧化碳中毒引起的窒息、吸入麻醉药及其他中枢抑制剂(如阿片、巴比妥类)的中毒,以及肺炎、白喉等传染病引起的呼吸衰竭。

## 2.2 洛贝林对肿瘤细胞的多药耐药的逆转

目前相关的研究已经证明中国传统中药中生物碱类的天然有效成分具有逆转肿瘤多药耐药的作用。如汉防己甲素,小檗碱,老刺木碱,苦参碱<sup>[11-13]</sup>等。

### 2.2.1 洛贝林对结肠癌、白血病多药耐药细胞株耐药的逆转

洛贝林是植物半边莲的主要组成部分,栗君等<sup>[14]</sup>报道半边莲对胃癌细胞 BG-38 的生长具有一定的抑制作用,并且这种抑制作用的程度与药物的浓度呈正相关。高永琳等<sup>[15]</sup>报道,半边莲对 Hela 细胞增殖的直接抑制作用不明显,但可通过促进细胞内储藏钙的释放和细胞外钙离子的内流,显著提高细胞内游离钙的浓度。

以上报道说明植物半边莲生物碱对肿瘤细胞有一定的抑制作用,具体的机制可能是其作用于钙离子的浓度有关。而洛贝林属于半边莲系列,且近期 Ma Y 等报导<sup>[16]</sup>用无细胞毒作用的洛贝林(10 $\mu$  mol/L)作用于多药耐药结肠癌 Caco-2 及白血病 CEM/ADR5000 细胞,发现洛贝林能抑制 P-gp 的活性,对 MDR 的逆转可能性在阿霉素化疗的细胞中得到证实,其可以提高肿瘤耐药细胞株中对耐药药物的敏感性。且通过 P-gp 的特异性荧光底物罗丹明 123,表明能明显增加耐药株 Caco-2、CEM/ADR5000 细胞内罗丹明 123 的荧光浓度,细胞内的荧光强度与洛贝林的浓度呈正相关,通过罗丹明 123 及流式细胞学得到的结果一致。实验还证明洛贝林(20 $\mu$  M)的多药耐药逆转有效率为经典耐药逆转剂维拉帕米(20 $\mu$  M)的 70%,虽洛贝林尚低于相同浓度的经典的 MDR 逆转剂维拉帕米作用下的效果,而维拉帕米只有在它的血清浓度达到很高时才能使细胞毒药物达到治疗所需的胞内水平,而此时,所用的剂量已经大大超出了其对人体产生毒性的最小剂量,其相同浓度下的毒副作用远远大于洛贝林,可以表明洛贝林是一个在无毒浓度下即可达到较高化疗耐药逆转效果的 P-gp 抑制剂。吴敏等<sup>[17]</sup>报道用无细胞毒作用的洛贝林(10 $\mu$  mol/L)作用于人结肠癌多药耐药细胞株 HCT-8/VCR,结果证实与未加逆转剂相比,洛贝林可以显著地将 VCR 和 Fu 的半数抑制浓度分别降低 3.65 和 1.35 倍,得到的结果与 Ma Y 报道的类似。

### 2.2.2 洛贝林对 BCRP(乳腺癌耐药蛋白)逆转的讨论

由于单一机制的 MDR 调节剂缺乏连续的治疗优势,关注药物耐药的多机制逆转成为必然趋势。例如,肿瘤细胞同时表达 P-gp 和 CYP、同时表达 MRP 和 GST,都比过度表达某一种蛋白的细胞耐药程度更深,表型也更为广泛。因此,开发针对各种机制的联合用药逆转耐药性有效的逆转剂更具有现实意义。

Ma Y 实验证实对多药耐药的结肠癌及白血病细胞,洛贝林可以抑制 P-gp 的活性,逆转肿瘤细胞的 MDR,但对多药耐药的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,通过外排米托蒽醌法对比,对实验组和对照组发现耐药的逆转作用不是很明显,表明洛贝林可能不是 BCRP 的抑制剂。而陈嘉等<sup>[18]</sup>报道用无细胞毒作用的

洛贝林(10 $\mu$  M/L)作用于人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADM,结果证实与未加逆转剂相比,洛贝林可以将 ADM 和 Fu 的半数抑制浓度分别降低 2.68 和 1.37 倍。洛贝林(20 $\mu$  M)的有效率是一个已知的 P-gp 竞争性抑制剂维拉帕米(20 $\mu$  M)有效率 71.6%。两者的实验结论提示我们洛贝林是否是 BCRP 和 P-gp 全部或者部分底物的思考,Litman 等<sup>[19]</sup>发现 BCRP 可使细胞内米托蒽醌、柔红霉素 (daunorubicin)、比生群 (bisantrene)、拓扑替康 (topotecan,TPT)、罗丹明 123 (rhodamine 123) 和哌唑嗪 (prazosin)浓度下降,而对 P-gp 的底物长春花(vinblastine,VLB)、紫杉醇(paclitaxel/taxol)、维拉帕米和 calcein-AM 以及 MRP 的底物 calcein 无此外排作用,Alqawi<sup>[20]</sup>等报道野生型 BCRP 与光学标记物罗丹明结合,野生型的结合虽然更为显著,但并不转运。顺铂、紫杉醇多柔比星、鬼臼乙叉甙 VP-16 对野生型和突变型 BCRP 与罗丹明 123 结合的抑制作用较一致,且顺铂和紫杉醇并非 BCRP 的转运底物,推测上述药物与罗丹明 123 结合 BCRP 位点有一定重叠。根据 BCRP 和 P-gp 的底物的相关联系,我们可以猜想在逆转 BCRP 和 MDR1 中洛贝林是其共同还是部分的转运底物,有无一定重叠程度关系,或者抑制作用的产生可能是由于洛贝林逆转 BCRP、MDR1,或者只是转运的一个步骤,转运作用的实现还依赖于结合后的一系列未知反应,两者的关系,主次如何,是否可以达到最理想的平衡状态,这些都值得我们进一步研究探讨。

总之,无毒剂量的洛贝林可以抑制 P-gp 的活性,增加抗肿瘤药物在耐药肿瘤细胞中的蓄积,增强耐药细胞对抗肿瘤药物的敏感性,从而部分逆转 MDR。洛贝林的逆转能力虽小于维拉帕米,且其副作用较小,安全、实用性较大,但目前对其洛贝林其作用通路,具体的体内试验结果等各方面研究的还不够,如果体内试验也能够达到如此高的逆转率,则可以认为在无毒剂量条件下,洛贝林是一种较好的可用于临床的 MDR 逆转剂,值得我们进一步探讨它的临床可能及实用性。

## 参考文献(References)

- [1] Loo TW, Clarke DM. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug Resistance P-glycoProtein [J]. J Biol Chem, 2002, 277(46):44332-44338
- [2] Chan H S L, Haddad G, Thorner P S, et al. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma[J]. N Engl J Med, 1991, 325:1608
- [3] Ruiz Gomez MJ, Souviron Rodriguez A, Martinez Morillo M. P-glycoprotein, a membrane Pump that represents a barrier to chemotherapy in cancer patients [J]. An MedIntema, 2002, 19(9):477-485
- [4] Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death[J]. Blood, 1999, 93(3):1075-1085
- [5] Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I, et al. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines [J]. Br Cancer, 2003, 88(12):1963
- [6] Daschner PJ, Ciolino HP, Plouzek CA, et al. Increased AP-1 activity in drug Resistant human breast cancer MCF-7 cells [J]. Breast Cancer Restreat, 1999, 53(3):229-240
- [7] 张立阳, 赵玉沛, 廖泉, 等. 维拉帕米逆转胰腺癌化疗耐药的研究[J].

- 中华肝胆外科杂志, 2004;10(04):263- 266
- Liyang zhang, Yupei zhao, Quan liao, et al. reversal of chemotherapy resistance in pancreatic cancer [J]. Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery, 2004;10(04):263- 266
- [8] 杨琳, 朱兆华. 维拉帕米对多药耐药胃癌细胞耐药逆转作用的研究 [J]. 中华消化杂志, 2002;22(2):112- 113
- Lin yang, Zhaohua zhu. Reversing of Multidrug resistance in Gastric cancer cells by Verapamil [J]. Chinese Journal of Digestion, 2002;22(2):112-113
- [9] 张洪涛, 王和平, 陈坚, 等. 维拉帕米对脑膜瘤生长影响的实验研究 (英文) [J]. 中国现代医学杂志, 2005;15(06):811- 814
- Hongtao zhang, Heping wang, Jian chen, et al. Effect of verapamil on Meningioma growth [J]. China Journal of Modern Medicine, 2005;15(06):811-814
- [10] 廖美森, 陈惠祯, 水华, 等. 顺铂、维拉帕米和环保菌素诱导卵巢癌细胞凋亡的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2000;35(2):101- 104
- Miaomei liao, Huizhen chen, Hua shui, et al. Cisplatin, verapamil and environmental streptozotocin induced apoptosis of ovarian cancer [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2000;35(2): 101-104
- [11] Liu ZL, Hirano T, Tanaka S, et al. Persistent reversal of Pglycoprotein-mediated daunorubicin resistance by tetrandrine in multidrug-resistant human T lymphoblastoid leukemia MOLT-4 cells [J]. Journal of Pharmacy And Pharmacology, 2003, 55(11):1531-1537
- [12] Min YD, Kwon HC, Yang Mc, et al. Isolation of limonoids and alkaloids from Phellodendron amurense and their multi-drug resistance (MDR) reversal activity [J]. Archives of Pharmacal Reserch, 2007, 30(1):58-63
- [13] Meschini S, Condello M, Marra M, et al. Autophagy-mediated chemo sensitizing effect of the plant alkaloid voacamine on multidrug resistant cells [J]. Toxicology in Vitro, 2007, 27(2):197-203
- [14] 粟君, 谭兴, 李劲涛, 等. 半边莲生物碱的提取及其对胃癌细胞的抑制作用 [J]. 西华师范大学学报: 自然科学版, 2007;28(4):12
- Li Jun, Tan Xing, Li Jin-tao, et al. Lobelia alkaloid extraction and inhibition in gastric cancer cells [J]. China West Normal University: Natural Science, 2007;28(4):12
- [15] 高永琳, 高冬, 林德馨, 等. 半边莲对 HeLa 细胞钙信号系统的影响 [J]. 福建中医学院学报, 2002, 12(3): 23 - 26
- Gao Yong-lin, Gao Dong, Lin De-xin, et al. Lobelia HeLa cells on the impact of calcium signaling system [J]. Journal of Fujian College of Traditional Chinese Medicine, 2002, 12(3):23-26
- [16] Ma Y, Wink M. Lobeline, a piperidine alkaloid from Lobelia can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells [J]. Phytomedicine, 2008, 15(9): 754-758
- [17] 吴敏. 洛贝林逆转结肠癌细胞株 HCT-8/VCR 多药耐药的实验研究 [D]. 中南大学, 2009
- Min wu. Study of the Reversal Effect of Lobelin on Multidrug-resistance of Colon Cancer cell lines HCT-8/VCR [D]. Central-South University (Medical Sciences), 2009
- [18] 陈嘉, 申良方, 周蓉蓉, 姚蔚, 等. 洛贝林逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 耐药作用及其机制 [D]. 中南大学学报 (医学版): 2009
- Jia chen, Liangfang shen, Rongrong zhou, Wei yao, et al. Lobeline reversal of drug resistance and mechanism in human breast cancer cells MCF-7/ADM [D]. Central-South University (Medical Sciences), 2009
- [19] Litman T, Brangi M, Hudson E, et al. The multidrug - resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half -transporter, MXR (ABCG2) [J]. J Cell Sci, 2000, 113(11):2011~2021
- [20] Alqawi O, Bates S, Georges E. Arginine482 to threonine mutation in the breast cancer resistance protein ABCG2 inhibits rhodamine 123 transport while increasing binding [J]. Biochem J, 2004, 382(2):711~716