

- Tissue Res, 1999, 297(1): 91.
- [4] Loral M, Theodor's son E, Ahlstrom PM. Tachykinins influence inters- digestive rhythm and contractivet strength of human small intestine [J]. Diodes Sic, 1997, 42(9): 1940.
- [5] 杜静, 张连峰, 秦川. 胆囊收缩素作用的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(4): 233- 235.
- [6] Wang Yu, Prpic Vera, Green Gary M, et al. Liddle Rodger A. Luminal CCK- releasing factor stimulates CCK release from human intestinal endocrine and STC- 1 cells [J]. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology (Print), 2001, 282 (1): G16- 22.
- [7] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth- hor- mone- releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402(6762): 656- 660.
- [8] 张曼, 金鑫, 范燕茹, 等. 生产素(Ghrelin)对胃肠道的保护和治疗作用[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(9): 73- 75.
- [9] Yang ZB, Yan J. Effects of the serum derived from rats treated withelectroacupuncture at different meridian acupoints on EGFR signal transduction pathway in gastric mucosal cells [J]. World journal of Acupuncture and moxibustion, 2009, 19(1): 41- 48.
- [10] 杨宗保, 严洁, 易受乡, 等. 电针大鼠胃经穴的血清对胃黏膜细胞 ERK 磷酸化水平的影响[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(2): 135- 138.
- [11] 郭晖. 针刺足阳明胃经穴对胃粘膜损伤大鼠胃运动、P 物质、胃动素和生长抑素的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2005.
- [12] 贺凤娥. 电针足三里等穴对 DGP 模型大鼠胃肠激素及超微结构的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [13] 常小荣, 严洁, 刘玉群, 等. 电针足三里和阳陵泉穴对家兔胃胆运动及脑肠肽的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(17): 1662- 1668.
- [14] 谢宇锋, 冯军, 杨宗保, 等. 御寒暖胃膏穴位贴敷对胃癌前病变大鼠胃黏膜的影响[J]. 江西中医药, 2015, 46 (5): 22- 25.

(责任编辑: 刘淑婷)

## 榄香烯逆转肺癌化疗药物耐药的实验研究

曾晖, 张永军, 张爱琴, 包文龙, 史华, 姜志明, 顾丹琳

浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022

**[摘要]** 目的: 观察与探讨榄香烯逆转肺癌化疗耐药的作用。方法: 采用细胞培养及动物实验分别从体外、体内研究榄香烯逆转化疗耐药的作用; 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测由含药血清培养的 A549 肺腺癌细胞的增殖率; 通过复制 Lewis 肺癌小鼠模型, 并予榄香烯及多柔比星进行处理, 最终测量各组小鼠肿瘤的体积, 计算抑瘤率。结果: 细胞研究结果显示, 榄香烯、多柔比星及榄香烯+多柔比星组的 Optical Density 光密度值 (OD 值) 均小于模型组 ( $P < 0.01$ ), 而榄香烯组 OD 值高于多柔比星组及榄香烯+多柔比星组 ( $P < 0.01$ ), 多柔比星组 OD 值高于榄香烯+多柔比星组 ( $P < 0.01$ )。动物研究结果显示: 与模型组比较, 榄香烯组、多柔比星组及榄香烯+多柔比星组肿瘤体积均明显缩小 ( $P < 0.01$ ), 而多柔比星组的抑瘤率高于榄香烯组 ( $P < 0.01$ ), 低于榄香烯+多柔比星组 ( $P < 0.01$ )。结论: 榄香烯具有一定的抑瘤作用, 且具有逆转化疗药物耐药的作用。

**[关键词]** 肺癌; 榄香烯; 多柔比星; 化疗耐药

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256- 7415 (2016) 06- 0271- 03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.06.119

## Experimental Study of Elemene on Reversing Chemotherapy Drug Resistance of Lung Cancer

ZENG Hui, ZHANG Yongjun, ZHANG Aiqin, BAO Wenlong, SHI Hua, JIANG Zhiming, GU Danlin

Abstract: Objective: To observe and discuss the effect of elemene on reversing chemotherapy drug resistance of lung

**[收稿日期]** 2016-02-13

**[基金项目]** 浙江省自然科学基金项目 (LY13H290006)

**[作者简介]** 曾晖 (1983-), 男, 主治医师, 主要从事肿瘤综合治疗的临床工作。

**[通讯作者]** 张永军, E-mail: zhangyj@zjcc.org.cn。

cancer. Methods : With the application of cell culture and animal experiment , the effect of elemene on reversing the chemotherapy drug resistance of lung cancer was study in vitro and in vivo. Detect the proliferation rate of A549 lung adenocarcinoma cell cultured in the drug serum in the way of MTT. Duplicate mice model with Lewis lung cancer , deal with the elemene and doxorubicin and finally measure the tumor volume of the mice in each group to calculate the anti- tumor rate. Results : The cell research result showed that the optical density of elemene group or doxorubicin group or elemene combined with doxorubicin group were all less than that in model group( $P<0.01$ ). The optical density in elemene group was more than that in doxorubicin group and the elemene combined with doxorubicin group( $P<0.01$ ). The optical density in doxorubicin group was more than that in the elemene combined with doxorubicin group( $P<0.01$ ). The animal research showed that , comparing with the model group , the tumor volume in elemene group , doxorubicin group and elemene combined with doxorubicin group was dropped obviously( $P<0.01$ ). While the anti- tumor rate of doxorubicin group was higher than that in elemene group( $P<0.01$ ) , and was lower than that in the elemene combined with doxorubicin group( $P<0.01$ ). Conclusion : Elemene has certain antitumor effect and effect of reversing the chemotherapy drug resistance.

Keywords : Lung cancer ; Elemene ; Doxorubicin ; Chemotherapy resistance

近年来,原发性肺癌的发病率和死亡率均居我国恶性肿瘤首位。虽然目前的诊断、药物及手术方式较前有较大进展,但患者5年生存率仍徘徊于15%左右<sup>[1]</sup>,造成这一现象的根本原因是治疗失败,而患者对化疗药物耐药是导致治疗失败的首要原因。因此,如何预防肺癌化疗药物耐药发生已成为现今研究的重点。

$\beta$ -榄香烯(分子式  $C_{15}H_{24}$ ,分子量 204.35)是从姜科植物温郁金中提取的有效成分。多柔比星为抗肿瘤药中细胞毒类药物(分子式  $C_{27}H_{29}NO_{11}$ ,分子量 543.52),已在基础和临床研究中证实有广谱抗肿瘤作用,现广泛应用于肺癌、胃癌、大肠癌等恶性肿瘤<sup>[2]</sup>。近年来,笔者在临床运用中发现 $\beta$ -榄香烯有一定逆肺癌化疗耐药的作用,故进行了细胞与动物实验,拟进一步验证。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞株 C57BL/6 小鼠 50 只,雌雄各半,4~6 周龄,体重 18~22 g,与 A549 肺腺癌细胞同购于浙江中医药大学实验动物中心。

1.2 实验药物  $\beta$ -榄香烯混合液(大连华立金港药业有限公司,规格:每瓶 20 mL/100 mg),等量换算小鼠的用量,1 kg 体重使用 100 mg。多柔比星(浙江海正药业股份有限公司,规格:每瓶 10 mg),等量换算小鼠的用量,1 kg 体重使用 4 mg。

1.3 实验试剂 二甲亚砜(分析纯)(江苏鸿声化工厂);新生牛血清(美国 GIBCO 公司);胰酶(吉诺生物医药技术有限公司);RPMI1640 培养液(美国 GIBCO 公司);噻唑蓝(MTT)(美国 Amresco 公司)。

1.4 实验仪器 SW-CJ-IF 层流超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Heraeus 公司);离心机(德国 Heraeus 公司);UR-4100 酶标仪(美国 Dynatech 公司);细胞培养板与培养瓶(丹麦 NUNCLON 公司)。

## 2 实验方法

2.1 体外实验 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为模型组、榄香烯组、多柔比星组及榄香烯+多柔比星组(以下简称榄+多组)4 组,每组 10 只。分别予以腹腔注射生理盐水、榄香烯(100 mg/kg)、多柔比星(4 mg/kg)及榄香烯加多柔比星(榄香烯:100 mg/kg、多柔比星:4 mg/kg),连续注射 5 天。第 6 天,所有大鼠尾静脉取血,分离血清用于培养 A549 肺腺癌细胞,细胞培养 48 h 后采用 MTT 法检测各组 A549 肺腺癌细胞的增殖情况。

2.2 动物实验 40 只 C57BL/6 小鼠分为 4 组复制 Lewis 肺癌模型:生理盐水调整 Lewis 肺癌细胞浓度至  $1 \times 10^7$  个/mL,0.2 mL 接种于小鼠右腋皮下。造模结束后,第 2 天,开始药物治疗。用药情况:4 组均腹腔注射,模型组注射生理盐水;榄香烯组注射榄香烯;多柔比星组注射多柔比星;榄+多组注射榄香烯加多柔比星。从注射当天开始,每组隔天给药 1 次,共给 5 次,第 11 天尾静脉取血后处死小鼠,完整剥离肿瘤组织,计算肿瘤体积与抑瘤率。

2.3 检测指标 ①细胞增殖情况:采用 MTT 法检测细胞增殖情况,利用酶标仪测定 570 nm 处的光密度 OD 值,以反映出活细胞数目。②瘤体积计算:游标卡尺测小鼠肿瘤最长径 a、最短径 b,体积  $V=2a^2b/5$ 。③抑瘤率:抑瘤率=(对照组瘤体积-用药组瘤体积)/对照组瘤体积 $\times 100\%$ 。

## 3 统计学方法

采用统计软件 SPSS11.0 进行数据分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用单因素方差分析。

## 4 研究结果

4.1 4 组药物对 A549 肺腺癌细胞增殖的影响 见表 1。榄香烯组、多柔比星组及榄+多组的 OD 值均较模型组小( $P<0.01$ ),而榄香烯组 OD 值高于多柔比星组和榄+多组( $P<0.01$ ),多柔比星组 OD 值高于榄+多组( $P<0.01$ )。

表1 4组药物对A549肺癌细胞增殖的影响

组别	n	OD值
模型组	10	1.31± 0.02
榄香烯组	10	1.24± 0.01 <sup>①</sup>
多柔比星组	10	1.20± 0.02 <sup>①②</sup>
榄+多组	10	1.15± 0.01 <sup>①②③</sup>

与模型组比较, ① $P < 0.01$ ; 与榄香烯组比较, ② $P < 0.01$ ; 与多柔比星组比较, ③ $P < 0.01$

4.2 4组药物对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响 见表2。与模型组比较, 榄香烯组、多柔比星组及榄+多组的肿瘤体积均明显缩小( $P < 0.01$ ), 而多柔比星组的抑瘤率高于榄香烯组( $P < 0.01$ ), 低于榄+多组( $P < 0.01$ )。

表2 4组药物对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响

组别	n	瘤体积(mm <sup>3</sup> )	抑瘤率(%)
模型组	10	116.89± 22.08	-
榄香烯组	10	73.90± 8.95 <sup>①</sup>	36.78 <sup>②</sup>
多柔比星组	10	48.86± 6.83 <sup>①②</sup>	58.20 <sup>①</sup>
榄+多组	10	30.32± 8.79 <sup>①②③</sup>	74.06 <sup>③</sup>

与模型组比较, ① $P < 0.01$ ; 与榄香烯组比较, ② $P < 0.01$ ; 与多柔比星组比较, ③ $P < 0.01$

## 5 讨论

肿瘤细胞耐药根据耐药谱可分为原药耐药(PDR)和多药耐药(MDR)两大类。PDR指仅对诱导药物产生耐药性而对其他药物不产生交叉耐药性, 而MDR则指肿瘤细胞在对一种化疗药物产生耐药的同时, 对其他结构不同、作用机制不同的药物也产生耐药现象。MDR的发生, 使大约90%肿瘤患者治疗失败。因此, 研究MDR的发生机制、寻找有效低毒的逆转剂及逆转方法, 对于临床抗肿瘤治疗有着重要而深远的意义, 故长期以来, 一直是国内外学者研究的重点。

目前西医逆转化疗耐药的药物主要有化疗逆转剂和生物逆转剂。前者主要有两类: 钙离子通道阻滞剂和钙调素抑制剂。后者主要为多种细胞因子<sup>[9]</sup>。其中, 多数逆转剂因其毒副作用, 尚不能满足临床应用的需要。

中医药具有疗效高、靶点多、不良反应少等特点, 在逆转耐药的同时有杀伤肿瘤细胞、调节和提高机体免疫功能的多重功效, 故从中药中寻找肿瘤多药耐药的抑制剂越来越受到科研及临床工作者的关注。温莪术为姜科植物蓬莪术或温郁金、广西莪术的根茎,  $\beta$ -榄香烯是从温郁金(温莪术)中提取的有效成分, 具有活血化瘀之功。已有学者研究证实活血化瘀中药具有防止化疗毒副反应、延长患者生存期的作用<sup>[4]</sup>, 而 $\beta$ -榄香烯是活血化瘀药物主要成分的浓缩, 必将进一步加强抗肿瘤的作用。国内已有学者从分子、细胞水平对 $\beta$ -榄香烯抗肿瘤作用进行了多途径、多层次、大量的基础研究, 证实该药物能较好地抑制肝癌细胞的生长、增殖, 能诱导肝癌细胞

凋亡<sup>[5-6]</sup>。

本研究在借鉴前人研究的基础上, 进一步探究 $\beta$ -榄香烯对肺癌细胞的抑制作用。结果显示, 榄香烯组的肿瘤体积明显小于模型组, 但大于多柔比星组。说明榄香烯具有一定的抑瘤作用, 但不及化疗药物, 这可能与 $\beta$ -榄香烯的注射时间较短相关。 $\beta$ -榄香烯为中药提取物, 中药一般起效较慢, 但维持时间较长, 因此, 在临床上应足量、足疗程使用。结果还显示, 当多柔比星组加用榄香烯后, 抑瘤率进一步提高, 由58.20%提升至74.06%, 出现这一结果可能有两方面的原因: ① $\beta$ -榄香烯的抗肿瘤作用与化疗药物多柔比星联合使用时有协同作用; ② $\beta$ -榄香烯具有逆转多柔比星耐药的作用, 通过逆转耐药, 使多柔比星的细胞毒性增强, 抑瘤作用进一步提高。对于后一种机理, 有待进一步研究。而关于榄香烯逆转化疗耐药的研究机理, 姜志明等<sup>[7]</sup>研究认为是通过抑制Bcl-2基因的生物活性; 姚成才等<sup>[8]</sup>认为是抑制P-gp的功能和表达。但中医药抗肿瘤是多靶点、多途径的, 是否存在其他靶点, 笔者将继续追踪。

## [参考文献]

- [1] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship [J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83 (5): 584-594.
- [2] 吴稚冰, 马胜林.  $\beta$ -榄香烯抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(10): 2255-2257.
- [3] 肖海娟, 范忠泽, 许建华, 等. 中医药逆肿瘤多药耐药的机制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(6): 108-110.
- [4] 苑艳娟, 王智森, 刘亚娴. 活血化瘀药物在治疗恶性肿瘤过程中的作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(6): 26-27.
- [5] 郭霞, 秦岩, 谭婧. 榄香烯对肝癌H22细胞荷瘤小鼠的抑瘤作用及其可能机制[J]. 中国临床药学杂志, 2013, 22(3): 155-159.
- [6] 欧阳俊, 沈洪, 刘军楼, 等.  $\beta$ -榄香烯抗肝癌的促凋亡机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(4): 738-742.
- [7] 姜志明, 吴稚冰, 凌志强, 等.  $\beta$ -榄香烯联合热疗和顺铂对人非小细胞肺癌A549细胞HSP70及耐药基因的影响[J]. 全科医学临床与教育, 2011, 9(1): 38-41.
- [8] 姚成才, 涂远荣, 杜好信, 等. 榄香烯乳剂对肺癌A549/DDP细胞株耐药逆转作用及其机制[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(12): 2670-2673.

(责任编辑: 吴凌, 刘迪成)