

## HPLC-FLD 法测定欧前胡素对肿瘤耐药细胞悬液中罗丹明 123 含量的影响<sup>\*</sup>

李志勇<sup>1</sup>, 汪春燕<sup>2</sup>, 汤涛<sup>2</sup>, 梁新丽<sup>2</sup>, 祝婧云<sup>1\*\*</sup>

(1. 南昌大学 第四附属医院药学部, 南昌 330003; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

**摘要 目的:** 建立高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)测定肿瘤耐药细胞中罗丹明 123(Rho 123)的浓度, 并采用建立的检测方法考察欧前胡素对 Rho 123 含量的影响。**方法:** 用乙腈沉淀法进行蛋白沉淀。色谱柱为 Phenomenex-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为 40 ℃, 流动相为乙腈-1% 三乙胺(磷酸调至 pH 为 3.0)(28:72), 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 激发波长 485 nm, 发射波长 546 nm, 进样量为 20 μL。**结果:** Rho 123 标准曲线为  $Y=1.1993X-4.0036$  ( $R^2=0.9997$ ), 其质量浓度在 9.375~600 ng·mL<sup>-1</sup> 范围内线性良好, 定量下限为 1.172 ng·mL<sup>-1</sup>, 日内与日间精密度均小于 10%, 绝对回收率为 70.6%~80.6%, 相对回收率为 91.0%~106.7%, 长期、短期以及反复冻融稳定性良好。2、5、10 μg·mL<sup>-1</sup> 欧前胡素组的 A2780/Taxol 与 K562/ADR 细胞内的蓄积倍数分别为 2.79、3.53、4.18 与 2.18、2.36、2.39。**结论:** 本方法专属性强, 灵敏度高, 简单可靠, 适用于检测肿瘤耐药细胞悬液中 Rho 123 的浓度, 可用于细胞中 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的活性和功能评价。欧前胡素对肿瘤耐药细胞中 P-gp 介导的 Rho 123 外排具有抑制作用。

**关键词:** 罗丹明 123(Rho123); 高效液相色谱-荧光检测法; 欧前胡素; P-糖蛋白; 肿瘤

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)09-1567-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.09.04

## Effect of imperatorin on the content of Rho 123 in the drug-resistant cell suspension of tumor by HPLC-FLD<sup>\*</sup>

LI Zhi-yong<sup>1</sup>, WANG Chun-yan<sup>2</sup>, TANG Tao<sup>2</sup>, LIANG Xin-li<sup>2</sup>, ZHU Jing-yun<sup>1\*\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, the Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract Objective:** To establish a high performance liquid chromatography-fluorescence method for determining the concentration of Rho 123 in tumor multidrug resistance cell lines, and investigating the effect of imperatorin on Rho 123 content in cell. **Method:** The Rho 123 were extracted from cell lysis with protein precipitation by acetonitrile solution and supernatant separation was performed on Phenomenex-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with temperature at 40 ℃. The elution with the mobile phase consisting of aqueous solution (1% triethylamine,

\* 江西省自然科学基金项目(20161ACB21020)

\*\* 通信作者 Tel: 13576922043; E-mail: 271174521@qq.com

第一作者 Tel: 13677085959; E-mail: 11058579@qq.com

adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid ) and acetonitrile at a flow rate of  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  were applied for the chromatographic separation and the injection volume was  $20 \mu\text{L}$ . The excitation wavelength was 485 nm, and the emission wavelength was 546 nm. **Results:** Methodological experiment results showed that the standard curve was  $Y=1.199 3X-4.003 69 (R^2=0.999 7)$ , and the linear relationship was good in the range of  $9.375-600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The lowest limit of quantification (LLOQ) of Rho 123 was  $1.172 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The intra-day and inter-day RSDs were both less than 10%. The absolute recovery rate was between 70.6% and 80.6%, the extraction recovery was between 91.0% and 106.7%. Rho 123 was stable in long-term, short-term and repeated freeze-thaw conditions. The accumulation ratios of A2780/Taxol and K562/ADR cells in the 2, 5, and  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  imperatorin groups were 2.79, 3.53, 4.18, and 2.18, 2.36, and 2.39, respectively. **Conclusion:** The method has strong specificity, high sensitive, simple and reliable, and is suitable for detecting the concentration of Rho 123 in cell suspension. It can provide a rapid and convenient method for evaluating the activity and function of P-glycoprotein (P-gp) in cells. Imperatorin can inhibit the excretion of Rho 123 which mediated by P-gp.

**Keywords:** Rhodamine 123 (Rho 123); HPLC-FLD; imperatorin; P-glycoprotein; tumor

罗丹明 123 (Rho 123) 是罗丹明系列染料中的 1 种, 因其分子结构呈刚性平面状且具有较高的荧光量子产率, 故荧光较强, 是一种常见的荧光探针物质<sup>[1-2]</sup>。Rho 123 是 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的经典底物, 能够透过细胞膜, 选择性地染色活细胞线粒体, 因此 Rho 123 可广泛作用于 P-gp 功能及活性评价<sup>[3]</sup>、线粒体膜电位<sup>[4]</sup>、细胞凋亡<sup>[5]</sup> 以及口服药物的吸收和分泌影响<sup>[6-7]</sup>。目前, 国内外检测 Rho 123 主要采用流式细胞仪检测法<sup>[8]</sup>、荧光分光光度检测法<sup>[9]</sup>、HPLC 法<sup>[10]</sup>、LC-MS 法<sup>[11]</sup>、LC-MS/MS 法<sup>[12]</sup>、微板读数器法<sup>[13]</sup> 等, 费用较高且均存在灵敏度低、操作烦琐费时等缺点。本研究旨在建立一种灵敏度高特异性强, 样品处理简便的 HPLC-荧光检测法, 测定细胞悬液中 Rho 123 的蓄积, 从而满足迅速测定对 P-gp 功能及活性评价、线粒体膜电位、细胞凋亡以及口服药物的吸收和分泌影响等研究的需要, 为药代动力学、药物相互作用、肿瘤的发生以及多药耐药等的研究提供理论依据<sup>[12]</sup>。

欧前胡素是来源于白芷、独活、当归等中药种的 1 种呋喃型香豆素成分, 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等生物活性<sup>[13-14]</sup>, 课题组研究发现, 欧前胡素可抑制 P-gp 介导如紫杉醇、硫酸长春新碱肿瘤药物外排, 增加紫杉醇等药物的肠道转运及生物利用度<sup>[15-16]</sup>。Rho 123 是 P-gp 底物, 细胞悬液中 Rho 123 含量可反映 P-gp 的外排及筛选抑制 P-gp 功能的成分。因此, 本文拟通过对 P-gp 底物 Rho 123 含量的

测定, 探讨欧前胡素增加紫杉醇等药物的肠道转运是否抑制 P-gp 外排功能有关。

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 细胞

人卵巢癌细胞株 (A2780)、人卵巢癌耐紫杉醇细胞株 (A2780/Taxol) 及人白血病细胞株 K562、人白血病耐阿霉素细胞株 K562/ADR 均购于上海歌凡生物科技有限公司。

### 1.2 试剂

Rho 123 对照品 (Sigma 公司, 批号 1012320000); 对照品欧前胡素 (批号 110826-200712)、盐酸维拉帕米 (批号 100223-200102), 中国食品药品检定研究院; 考马斯亮蓝 G-250 (碧云天生物科技研究所); 细胞裂解液 (Solarbio, 北京索莱宝科技有限公司); 牛血清白蛋白 (Solarbio, 北京索莱宝科技有限公司); RPMI1640 培养基 (Hyclone, 赛默飞世尔生物化学制品); 胎牛血清 (Gibco, 赛默飞世尔生物化学制品); 青霉素-链霉素 (Solarbio, 北京索莱宝科技有限公司); 0.25% EDTA-胰蛋白酶 (Gibco, 赛默飞世尔生物化学制品); Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (without Magnesium with Calcium, Solarbio, 北京索莱宝科技有限公司); 乙腈 (色谱纯, TEDIA 公司); 三乙胺 (分析纯, 南京化学试剂有限公司); 磷酸 (分析纯, 上海化学试剂有限公司)。

### 1.3 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪与 Agilent 1200 荧光检测器, 安捷伦科技有限公司; PHS-3C 型 pH

计,上海精密科学仪器有限公司;多功能酶标仪(Tecan, Spark 10M);高速冷冻离心机(Sigma公司);BS124S型电子分析天平(Sartorius公司)。

## 2 实验方法与结果

### 2.1 HPLC-FLD 测定肿瘤细胞中 Rho 123 含量方法的建立

#### 2.1.1 检测条件

色谱柱:Phenomenex-C<sub>18</sub>柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm);流动相:乙腈-1%三乙胺(磷酸调pH=3.0)(28:72),流速:1 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:40 °C;进样量:20 μL;FLD条件:激发波长485 nm,发射波长546 nm。

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取 Rho 123 对照品 6.0 mg 至 25 mL 棕色量瓶中,用乙腈定容,摇匀后即得质量浓度为 240 μg·mL<sup>-1</sup>的 Rho 123 对照品储备液。采用逐级稀释法分别加入乙腈稀释 Rho 123 储备液,配制成质量浓度分别为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.937 5、0.468 8 μg·mL<sup>-1</sup>的一系列对照品溶液,置 4 °C 保存。

#### 2.1.3 样品处理

**2.1.3.1 A2780 与 A2780/Taxol 细胞培养** A2780 与 A2780/Taxol 细胞培养在含 10% 的胎牛血清和 100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养基中,1 × 10<sup>6</sup>个·mL<sup>-1</sup>接种于 6 孔板中,待细胞在板中生长融合至 70%~80%,弃去完全培养基,用冰冷的 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)清洗 2 次,加入 HBSS 500 μL,用细胞刮轻轻将细胞刮下,置于 1.5 mL 的 EP 管中,冻存于 -80 °C 冰箱中以破碎细胞。反复冻融 3 次后,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液。

A2780/Taxol 细胞株用含终质量浓度为 100 0 ng·mL<sup>-1</sup> Taxol 的完全培养基维持其耐药性,实验前无药培养 2 周。

**2.1.3.2 K562 与 K562/ADR 细胞培养** K562 与 K562/ADR 细胞培养在含 10% 的胎牛血清和 100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养基中,余下操作同“2.1.3.1”项下。

K562/ADR 细胞株用含终质量浓度为 1 000 ng·mL<sup>-1</sup> ADR 的完全培养基维持其耐药性,实验前无药培养 2 周。

**2.1.3.3 标准曲线及质控细胞悬液样品的处理** 取空白的细胞裂解液 180 μL,置于 1.5 mL 的 EP 管中,加入相应质量浓度的 Rho 123 对照品溶液 20 μL,再

与 300 μL 的乙腈混匀,涡旋 3 min,14 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min 后取上清液,将 250 μL 上清液与 500 μL 的流动相混匀,涡旋 3 min,以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,用于 HPLC 分析。

**2.1.3.4 待测细胞悬液样品的处理** 取待测的肿瘤细胞的裂解液 200 μL 与 300 μL 的乙腈混匀,涡旋 3 min,14 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min 后取上清液,将 250 μL 上清液与 500 μL 流动相混匀,涡旋 3 min,以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,用于 HPLC 分析。

#### 2.1.4 方法学考察

本文考察了 4 种细胞的方法学,分别为 K562、K562/ADR、A2780、A2780/Taxol,结果表明各细胞间无显著差异,因此,本文仅附 K562/ADR 细胞的方法学研究结果。

**2.1.4.1 专属性** 分别将 3 份不同来源的空白细胞裂解液、Rho 123 细胞对照品标准液、给予 Rho 123 细胞裂解液样品,按“2.1.3”项下方法处理并进行 HPLC 分析。在上述色谱条件下,测得空白细胞组溶液、对照品溶液、细胞样品溶液的色谱图,如图 1 所示:分析物 Rho 123 有较大的色谱峰,不受杂峰的干扰,基线噪音小,方法专属性良好,保留时间约为 9.92 min,具有良好的特异性和分离度。

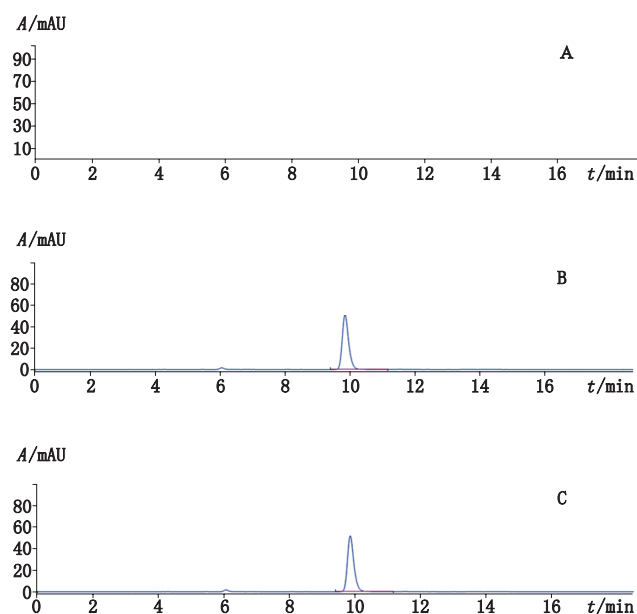


图 1 Rho 123 空白细胞组溶液(A)、Rho 123 对照品溶液组(B)、给予 Rho 123 的细胞样品溶液组(C)专属性 HPLC 色谱图

Fig. 1 Specificity HPLC of solution of blank cell (A), Rho 123 reference substances (B), and solution of cell sample with Rho 123 (C)

**2.1.4.2 标准曲线与定量下限** 细胞悬液中 Rho123 在质量浓度为 3.516 ~600 ng·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好,得到的标准曲线:

$$Y=1.1993X-4.0036 \quad R^2=0.9997$$

采用逐级稀释法,检测到 Rho 123 的定量下限为 1.172 ng·mL<sup>-1</sup> (S/N=10.1), 检测下限 0.367 ng·mL<sup>-1</sup> (S/N=3.1)。

**2.1.4.3 精密度试验** 连续 3 d 用空白细胞液配制低、中、高质控样品即含 Rho123 质量浓度为 3.516、75、600 ng·mL<sup>-1</sup> 系列浓度标准样品各 6 份,进行处理并分析,计算其浓度,考察日间和日内精密度。质控样品与标准曲线同批测定,通过随行标准曲线来计算质控样品的浓度。日内平行测定 6 次,计算日内精密度;每日测定 1 次,连续 3 d,计算日间精密度。结果 Rho 123 的日内精密密度为 1.4%~4.9%,日间精密密度为 2.8%~7.4%,小于 10%,重复性好,符合要求。

**2.1.4.4 回收率试验** 用空白细胞液配制含 Rho 123

低、中、高的质控样品各 6 份,然后用乙腈配制与 Rho 123 低、中、高质控相等浓度的对照质控样品各 6 份,进行处理,各取 20 μL 进行 HPLC 检测,记录色谱图。结果见表 1。

表 1 回收率结果 ( $\bar{x} \pm SD, n=3$ )

浓度 (concentration) / (ng·mL <sup>-1</sup> )	绝对回收率 (absolute recovery) /%		相对回收率 (relative recovery) /%	
	$\bar{x} \pm SD$	RSD/%	$\bar{x} \pm SD$	RSD/%
3.516	71.7 ± 9.16	12.8	97.5 ± 9.54	9.8
75	70.6 ± 4.71	6.7	91.0 ± 6.83	7.5
600	80.6 ± 2.92	3.6	106.7 ± 5.19	4.9

**2.1.4.5 稳定性考察** 用空白细胞液配制含 Rho123 低、中、高的质控样品各 3 份,分别测定样品在室温条件下放置 24 h、-80 °C 储存 15 d 以及 3 次冷冻-解冻循环后的稳定性(每次在 -80 °C 冰箱中放置 12 h)。结果见表 2。表明样品稳定性均良好。

表 2 稳定性结果 ( $n=3$ )

Tab. 2 Results of stability tests

浓度 (concentration) / (ng·mL <sup>-1</sup> )	制备前对照 (pre-preparation control)		冻融 (freeze-thaw)		室温 24 h (room temperature for 24 h)		长期冷冻 (15 d, -80 °C) [long-term freezing (15 d, -80 °C)]	
	$\bar{x} \pm SD$	RSD/%	$\bar{x} \pm SD$	RSD/%	$\bar{x} \pm SD$	RSD/%	$\bar{x} \pm SD$	RSD/%
3.516	3.37 ± 0.31	9.2	3.29 ± 0.31	9.4	3.41 ± 0.33	9.7	3.18 ± 0.27	8.5
75	76.63 ± 0.44	0.57	77.34 ± 0.6	0.78	76.31 ± 0.72	0.94	72.46 ± 0.47	0.65
600	601.73 ± 1.17	0.19	595.81 ± 2.74	0.46	600.30 ± 0.58	0.96	583.89 ± 0.98	0.17

## 2.2 欧前胡素对肿瘤细胞内 Rho123 含量的影响

按“2.1.3”项下方法培养各细胞,并接种于 6 孔细胞培养板中,过夜后,分别给予不同浓度的药物溶液或 HBSS,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育, 60 min 后置于冰上终止反应(约 10 min), 1 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 条件下离心 5 min, 弃去上清液, 加入冰冷的 HBSS 清洗 2 次。每孔加入含 5 μg·mL<sup>-1</sup> Rho 123 的 HBSS 液 1 mL, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 60 min, 结束后, 置于冰上终止反应(约 10 min), 弃去上清液, 加入冰冷的 HBSS 清洗 2 次。加

入 HBSS 500 μL 并用细胞刮轻轻地将细胞刮下来, 置于 1.5 mL EP 管中, 冻存于 -80 °C 冰箱中以破碎细胞。反复冻融 3 次, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后取上清液。按照“2.1.3”项下的处理方法处理样品, 同时取适量的细胞悬液按照 Bradford 蛋白浓度测定方法进行蛋白定量。将每管细胞内的 Rho 123 浓度与相应每管的总蛋白含量相除, 用以消除每管细胞数量所带来的误差。实验分组及加样顺序见表 3。欧前胡素对不同肿瘤细胞中 Rho 123 含量的影响结果见表 4、5。

表 3 不同浓度的欧前胡素对肿瘤细胞内 Rho 123 的蓄积实验分组

**Tab. 3 Groups for concentration-dependency of the effects of imperatorin on storage experiment of Rho 123 on cancer cells**

组别 (group)	加样顺序 (sample addition order)
阴性对照组 (negative control group)	① 1.0 mL 细胞悬液 (cell suspension) → ② 1.0 mL HBSS → ③ 10 μL Rho 123 (500 μg · mL <sup>-1</sup> )
阳性对照组 (positive control group)	① 1.0 mL 细胞悬液 (cell suspension) → ② 1.0 mL 不同浓度的维拉帕米 (verapamil of different concentrations) → ③ 10 μL Rho123 (500 μg · mL <sup>-1</sup> )
实验组 (experience group)	① 1.0 mL 细胞悬液 (cell suspension) → ② 1.0 mL 不同浓度的药液 (medicine of different concentrations) → ③ 10 μL Rho 123 (500 μg · mL <sup>-1</sup> )

 表 4 欧前胡素对 A2780/Taxol 细胞内 Rho123 的蓄积影响 ( $\bar{x} \pm SD, n=6$ )

**Tab. 4 Effect of imperatorin on Rhodamne 123 accumulation in A2780/Taxol cells**

分组 (group)	Rho123	蓄积倍数 (accumulation multiplier)
A2780	0.2434 ± 0.012	4.75
A2780/Taxol	0.0512 ± 0.004 <sup>▽</sup>	1.00
A2780/Taxol+100 μg · mL <sup>-1</sup> 维拉帕米 (verapamil)	0.2498 ± 0.028 <sup>*</sup>	4.88
A2780/Taxol+50 μg · mL <sup>-1</sup> 维拉帕米 (verapamil)	0.2191 ± 0.021 <sup>*</sup>	4.28
A2780/Taxol+10 μg · mL <sup>-1</sup> 欧前胡素 (imperatorin)	0.2139 ± 0.013 <sup>*</sup>	4.18
A2780/Taxol+5 μg · mL <sup>-1</sup> 欧前胡素 (imperatorin)	0.1808 ± 0.009 <sup>*</sup>	3.53
A2780/Taxol+2 μg · mL <sup>-1</sup> 欧前胡素 (imperatorin)	0.1426 ± 0.002 <sup>*</sup>	2.79

注 (note): 与 A2780 细胞株对照组相比较, <sup>▽</sup>  $P < 0.05$ ; 与 A2780/Taxol 细胞株对照组相比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  (compared with the control group of A2780 cell line, <sup>▽</sup>  $P < 0.05$ , compared with the control group of A2780/Taxol cell line, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ )

 表 5 欧前胡素对 K562/ADR 细胞内 Rho123 的蓄积影响 ( $\bar{x} \pm SD, n=6$ )

**Tab. 5 Effect of imperatorin on Rhodamne 123 accumulation in K562/ADR cells**

分组 (group)	Rho123	蓄积倍数 (accumulation multiplier)
K562	0.8854 ± 0.022	3.47
K562/ADR	0.2549 ± 0.025 <sup>▽</sup>	1.00
K562/ADR+100 μg · mL <sup>-1</sup> 维拉帕米 (verapamil)	0.6174 ± 0.017 <sup>*</sup>	2.42
K562/ADR+50 μg · mL <sup>-1</sup> 维拉帕米 (verapamil)	0.5661 ± 0.026 <sup>*</sup>	2.22
K562/ADR+10 μg · mL <sup>-1</sup> 欧前胡素 (imperatorin)	0.6105 ± 0.042 <sup>*</sup>	2.39
K562/ADR+5 μg · mL <sup>-1</sup> 欧前胡素 (imperatorin)	0.6032 ± 0.054 <sup>*</sup>	2.36
K562/ADR+2 μg · mL <sup>-1</sup> 欧前胡素 (imperatorin)	0.5545 ± 0.038 <sup>*</sup>	2.18

注 (note): 与 K562 细胞株对照组相比较, <sup>▽</sup>  $P < 0.05$ ; 与 K562/ADR 细胞株对照组相比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  (compared with the control group of K562 cell line, <sup>▽</sup>  $P < 0.05$ , compared with the control group of K562/ADR cell line, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ )

A2780/Taxol 与 A2780 相比, 细胞内 Rho123 含量明显降低, 表明 A2780/Taxol 耐药性形成, A2780/Taxol 细胞株的 P-gp 的高表达将进入细胞内的 Rho123 更多地排出细胞外。在欧前胡素的作用下,

Rho123 在 A2780/Taxol 细胞内的蓄积情况出现改变, 表现为随着欧前胡素浓度的增加, Rho 123 的蓄积逐渐增加, 外排逐渐减少。2、5、10 μg · mL<sup>-1</sup> 欧前胡素组的 A2780/Taxol 细胞内的蓄积倍数分别为 2.79、3.53、

4.18, 且各组与 A2780/Taxol 阴性对照组相比具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示欧前胡素具有增加 A2780/Taxol 细胞内 Rho 123 蓄积的作用, 且与欧前胡素的浓度相关, 但作用能力稍低于维拉帕米。

K562/ADR 与 K562 相比, 细胞内 Rho 123 含量明显降低, 表明 K562/ADR 耐药性形成, K562/ADR 细胞株的 P-gp 的高表达将进入细胞内的 Rho 123 更多地排出细胞外。在欧前胡素的作用下, Rho 123 在 K562/ADR 细胞内的蓄积情况出现明显变化, 随着欧前胡素浓度的增加, Rho 123 的蓄积逐渐增加, 外排逐渐减少。2、5、10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  欧前胡素组的 K562/ADR 细胞内的蓄积倍数分别为 2.18、2.36、2.39, 且各组与 K562/ADR 阴性对照组相比具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示欧前胡素具有增加 K562/ADR 细胞内 Rho 123 蓄积的作用和抑制 P-gp 外排的作用, 且与欧前胡素的浓度相关。

### 3 讨论

本研究采用 HPLC-荧光检测法测定细胞悬液中 Rho 123 的蓄积, 解决了流式细胞仪检测法费用昂贵, 荧光分光光度法灵敏度低、数据偏差较大、重现性差, LC-MS 与 LC-MS/MS 法操作烦琐的问题, 可在大多数实验室普及。

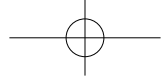
根据 Rho 123 分子结构呈刚性平面状且具有较高的荧光量子产率, 可使其荧光较强<sup>[1-2]</sup>, 采用 HPLC-荧光检测器测定 Rho 123 在细胞内的蓄积影响, 能够消除 HPLC 灵敏度有限的劣势, 且该检测器较为普及, 具有较高的实用价值。目前, 常用的蛋白沉淀剂有甲醇、乙腈、乙酸乙酯以及三氯甲烷。本实验通过考察甲醇、乙腈对细胞裂解液混合条件下 Rho 123 提取回收率的影响, 结果表明使用乙腈沉淀蛋白的能力较甲醇更高, 回收率在 96.4% 以上, 符合样本的测定要求。本方法成功用于研究细胞内 Rho 123 的蓄积影响, 表现为随着欧前胡素浓度的增加, Rho 123 的蓄积逐渐增加, 外排逐渐减少, 故本方法能够满足对 P-gp 功能及活性评价、线粒体膜电位、细胞凋亡以及口服药物的吸收和分泌影响等研究的需要, 为药代动力学、药物相互作用、肿瘤的发生以及多药耐药等的研究提供理论依据。

化学治疗在恶性肿瘤的综合治疗中占有非常重要的地位, 与手术治疗、放射治疗一起, 成为恶性肿瘤治疗的 3 把利剑, 但临床上肿瘤的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 对疗效的影响十分严重,

通过跨膜转运蛋白的外排泵作用, 可以降低多药耐药。P-gp 是重要的外排转运蛋白, 许多一线临床广泛使用的药物均受其影响, 导致肿瘤的多药耐药的发生, 如多柔比星、紫杉烷类、长春花生物碱类等。近年来研究发现, 中药活性成分在逆转多药耐药方面具有很好的疗效, 以中药为研究对象, 筛选 P-gp 逆转剂引起了研究者的广泛重视。结合前期研究结果及本次实验发现, 欧前胡素具有抑制 P-gp 外排药物的功能, 其作用机理尚需进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] ANNAERT P, BROUWER KLR. Assessment of drug interactions in hepatobiliary transport using rhodamine 123 in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(3): 388
- [2] TANG FX, HUI OY. Bidirectional transport of rhodamine 123 and Hoechst 333342 fluorescence probes of the binding sites on P-glycoprotein across MDCK-MDR1 cell monolayers [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(5): 1185
- [3] 张圣村, 马敏, 徐丽丽. 阿帕替尼逆转 P-gp 转运体介导的乳腺癌化疗多药耐药性的作用及其机制 [J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(4): 210  
ZHANG SC, MA M, XU LL. Reversal effect of apatinib on P-gp-mediated multidrug resistance of human breast cancer and its mechanisms [J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2018, 45(4): 210
- [4] 毕星宇, 张栋栋, 朱鹏飞, 等. 体外操作对人卵母细胞线粒体膜电位影响的研究 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 37(5): 389  
BI XY, ZHANG DD, ZHU PF, et al. Effect of *in vitro* manipulation on mitochondrial membrane potential of human oocytes [J]. *Chin J Reprod Contracep*, 2017, 37(5): 389
- [5] 任改艳, 孙阿宁, 张晶晶, 等. NF- $\kappa$ B 在细胞凋亡中调节作用的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(2): 323  
REN GY, SUN AN, ZHANG JJ, et al. Advances in roles of NF- $\kappa$ B in regulating pathways of apoptosis [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2015, 29(2): 323
- [6] LIN Y, KATSUMI H. Effects of labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine 123 a P-glycoprotein substrate in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(7): 1301
- [7] SHEN Q, LIN YL, HANDA T, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by *in vitro* transport and *in situ* absorption studies [J]. *Int J Pharm*, 2006, 313(1-2): 49
- [8] 周勇, 钟文彬, 陈凯, 等. Disulfiram 联合 Cu 通过上调 TNF- $\alpha$  表达及蓄积 ROS 诱导白血病干细胞凋亡 [J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(10): 984  
ZHOU Y, ZHONG WB, CHEN K, et al. Disulfiram combined with copper induces leukemia stem cell apoptosis through TNF- $\alpha$ /ROS



- pathway [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 2015, 37(10): 984
- [9] FONTAINE M, ELMQUST WF, MILLER DW. Use of rhodamine 123 to examine the functional activity of P-glycoprotein in primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers [J]. *Life Sci*, 1996, 59(18): 1521
- [10] 唐霞, 辛华雯, 欧阳萌, 等. 高效液相色谱法测定大鼠血浆罗丹明 123 的浓度 [J]. *医药导报*, 2017, 36(9): 971  
TANG X, XIN HW, OUYANG M, *et al.* Determination of Rhodamine 123 in rat plasma by high performance liquid chromatography [J]. *Her Med*, 2017, 36(9): 971
- [11] SMALLEY J, KADIYALA P, XIN B, *et al.* Development of an on-line extraction turbulent flow chromatography tandem mass spectrometry method for cassette analysis of Caco 2 cell based bi-directional assay samples [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 830(2): 270
- [12] 常媛媛, 魏静瑶, 魏涵, 等. LC-MS/MS 法测定细胞悬液中罗丹明 123 的浓度 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(8): 979  
CHANG YY, WEI JY, WEI H, *et al.* Determination of rhodamine 123 in cell culture system by LC-MS/MS [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2018, 34(8): 979
- [13] CHOOCHUAY K, CHUNHACHA P, PONGRAKHANANON V, *et al.* Imperatorin sensitizes anoikis and inhibits anchorage-independent growth of lung cancer cells [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(3): 599
- [14] 黄志平, 邵立龙, 阮阳平. 欧前胡素对顺铂的骨肉瘤细胞抗肿瘤作用的增效作用 [J]. *中国现代应用药理学*, 2015, 32(10): 1193  
HUANG ZP, SHAO LL, RUAN YP. Anti-tumor effect and mechanism of imperatorin enhances the cytotoxicity of cisplatin osteosarcoma cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2015, 32(10): 1193
- [15] 管雪静, 余世平, 梁新丽, 等. 白芷中 10 种呋喃型香豆素对长春新碱肠道转运的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2117  
GUAN XJ, YU SP, LIANG XL, *et al.* Effect of 10 furanocoumarins in *Angelica dahurica* on intestinal transport of vincristine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(14): 2117
- [16] 管咏梅, 朱卫丰, 梁新丽, 等. LC-MS 研究白芷中香豆素成分对多烯紫杉醇药代动力学的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(24): 4870  
GUAN YM, ZHU WF, LIANG XL, *et al.* Effect investigation of coumarin constituents in *Angelica dahurica* on pharmacokinetics of docetaxel by LC-MS [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(24): 4870
- [17] DORABABU M, NISHIMURA A, PRABHA T, *et al.* Effect of cyclosporine on drug transport and pharmacokinetics of nifedipine [J]. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63(9): 697

(本文于 2018 年 9 月 6 日收到)

### 《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统, 作者稿件一经本刊审核通过, 确定录用, 可优先数字出版, 同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录, 进入因特网提供信息服务, 并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件, 所有稿件须登录本刊网站 (<http://www.ywfxzz.cn>) 在线投稿, 并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用, 所有收费按本刊缴费通知办理。