

向文碧,李志操,周栋珍,等. 汉防己甲素联合化疗药物在斑马鱼体内逆转多药耐药的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 1-6.

Xiang WB, Li ZC, Zhou DZ, et al. Tetrandrine combined with chemotherapeutic drugs induces reversal of multidrug resistance in zebrafish [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 1-6.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.05.001

汉防己甲素联合化疗药物在斑马鱼体内逆转多药耐药的研究

向文碧^{1,2}, 李志操^{1,4}, 周栋珍^{1,5}, 周艳华^{1,2}, 吴西军^{1,2}, 何志旭^{2,3*}, 舒莉萍^{1,2*}

(1. 贵州医科大学 细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室, 贵州省再生医学重点实验室, 儿科学教研室, 贵阳 550004; 2. 中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室, 贵阳 550004; 3. 遵义医科大学附属医院 儿科学教研室, 贵州 遵义 563000; 4. 贵州省贵阳市妇幼保健院/贵阳市儿童医院, 贵阳 550003; 5. 贵州大学, 贵阳 550025)

【摘要】 目的 探讨汉防己甲素对斑马鱼胚胎早期发育及多药耐药基因 *abc4* 表达的影响及其机制。方法 通过药物毒性实验分析汉防己甲素药液处理后斑马鱼胚胎的死亡率、孵化率、心率和畸形率情况。取斑马鱼胚胎设置分组: 空白对照组、阿霉素药液处理组、长春碱药液处理组、汉防己甲素药液处理组、汉防己甲素和阿霉素混合药液处理组及汉防己甲素和长春碱混合药液处理组, 每组胚胎用药液处理至第 5 天后取 50 尾用于实验。通过实时荧光定量 PCR 检测 *abc4* 基因的表达情况, 罗丹明 123 实验检测胚胎的外排功能, 分析耐药程度。结果 低剂量汉防己甲素对斑马鱼胚胎毒性较低, 高剂量汉防己甲素对胚胎孵化有抑制作用, 并有致畸致死作用; 实时荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组相比 *abc4* 基因的 mRNA 在阿霉素和长春碱药液单独使用时表达增高, 而在汉防己甲素联合阿霉素、长春碱使用时表达降低; 罗丹明 123 实验结果显示, 阿霉素和长春碱单独使用时斑马鱼体内产生耐药, 而汉防己甲素联合阿霉素、长春碱使用时耐药程度降低。结论 汉防己甲素对斑马鱼胚胎毒性较低, 且汉防己甲素能逆转阿霉素和长春碱的耐药作用, 对提高治疗效果有重要意义。

【关键词】 汉防己甲素; 多药耐药; *abc4*; 斑马鱼

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 05-0001-06

Tetrandrine combined with chemotherapeutic drugs induces reversal of multidrug resistance in zebrafish

XIANG Wenbi^{1,2}, LI Zhicao^{1,4}, ZHOU Dongzhen^{1,5}, ZHOU Yanhua^{1,2}, WU Xijun^{1,2}, HE Zhixu^{2,3*}, SHU Liping^{1,2*}

(1. National & Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Guizhou Key Laboratory of Regenerative Medicine, Department of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China.

2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Guiyang 550004.

3. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000.

4. Guiyang City Maternal and Child Health Center of Guizhou, Guiyang City Children's Hospital, Guiyang 550003.

5. Guizhou University School, Guiyang 550025)

【基金项目】 国家自然科学基金(31860325); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2018PT31048); 贵州省科技厅科技平台及人才团队计划([2017]5611)。

【作者简介】 向文碧(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 儿童血液系统疾病。E-mail: 1654477193@qq.com

【通信作者】 舒莉萍(1974—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病。E-mail: gyslp-456@163.com

何志旭(1967—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病。E-mail: hzx@gmc.edu.cn * 共同通信作者

【Abstract】 Objective To investigate the effects of tetrandrine on early development in zebrafish embryos and the expression of multidrug resistance gene *abcb4* and its mechanisms. **Methods** We used a drug toxicity test to analyze the mortality, hatching rate, heart rate, and deformity rate of zebrafish embryos treated with tetrandrine. Wild-type zebrafish embryos were divided into a blank control group, doxorubicin treatment group, vinblastine treatment group, tetrandrine treatment group, tetrandrine combined with doxorubicin treatment group, and tetrandrine combined with vinblastine treatment group. Drugs were administered to each group of embryos until the fifth day, and the embryos were then used for the experiment. Expression of the *abcb4* gene was detected using real-time fluorescent quantitative PCR, and drug resistance was detected using the Rhodamine 123 test. **Results** Compared with the control group, low-dose tetrandrine had no teratogenic lethal effects on zebrafish embryos. High-dose tetrandrine significantly inhibited embryonic hatching rate and had clear lethal and teratogenic effects. Compared with the control group, the mRNA of the *abcb4* gene increased when treated with doxorubicin and vinblastine alone, but decreased when exposed to tetrandrine combined with doxorubicin and vinblastine. The Rhodamine 123 experimental result showed evidence of drug resistance in zebrafish treated with doxorubicin and vinblastine alone, and indicated that tetrandrine combined with doxorubicin and vinblastine could reverse drug resistance. **Conclusions** Tetrandrine has low toxicity for zebrafish embryos early in development, and can reverse drug resistance to doxorubicin and vinblastine. These data suggest that tetrandrine may improve sensitivity to chemotherapy drugs and thus may enhance the therapeutic effect.

【Keywords】 tetrandrine; multidrug resistance; *abcb4*; zebrafish

目前,恶性肿瘤发病率和死亡率仍逐年上升,是威胁人类生命安全的主要疾病之一。恶性肿瘤主要的治疗措施包括化疗、放疗及手术切除等,但是多数肿瘤的治疗效果仍不令人满意,其主要原因是化疗过程中肿瘤细胞产生了多药耐药导致化疗效果不佳。多药耐药是指最初对单一抗癌药物产生耐药的癌细胞后来对结构或功能不同的多种化疗药物产生交叉、广谱耐药性的现象^[1]。多药耐药的主要机制是 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白通过利用 ATP 水解释放能量将抗肿瘤药物在细胞内泵出细胞外^[2]。ABCB1(即 MDR1)编码的 P 糖蛋白(p-glycoprotein, P-gp)是 ABC 家族的主要成员之一,是引起肿瘤多药耐药的重要转运蛋白也是研究热点之一^[3]。

近年来,斑马鱼作为一个新型的模式生物在高通量药物筛选研究方面拥有其它实验动物所不具备的天然优势^[4]。斑马鱼 *abcb4* 基因与人类 ABCB1 基因的氨基酸序列相似度高达 64%^[5],且斑马鱼 *abcb4* 基因与药物在体内的吸收与积累量有关^[6]。汉防己甲素(Tetrandrine, TET)是中国传统的硅肺、自身免疫性疾病、炎症性肺病、心血管疾病和高血压的临床药物。大量研究证明,TET 抑瘤作用不明显,但是与化疗药物组合能通过抑制 P-gp 转运体逆转化疗药物产生的耐药性,从而增强化疗药物的肿瘤抑制作用^[7-9]。但是汉防己甲素在斑马鱼体内的毒性研究及其对斑马鱼耐药基因 *abcb4* 表达的影响,未见相关报道。因此,本研究通过研究 TET 对

Tubingen 野生型斑马鱼胚胎早期发育的毒性作用及 TET 与化疗药物长春碱(vinblastine, VLB)和阿霉素(doxorubicin, DOX)联合对多药耐药基因 *abcb4* 表达及功能的影响,以期探讨汉防己甲素在斑马鱼体内逆转多药耐药的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Tubingen 野生型斑马鱼为本实验中心自行传代培育[SYXK(黔)2018-0001],采用 0~5 d 的斑马鱼胚胎及幼鱼,按照 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂

TET 和 VLB 购自美国 Sigma 公司;DOX 购自大连美轮;TRIzol 试剂、逆转录试剂 First Strand cDNA Synthesis Kit 购自芬兰 Thermo 公司;IQ™ SYBR Green Supermix 试剂购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 斑马鱼养殖方法

Tubingen 野生型斑马鱼养殖于(28±5)℃的循环水系统中,光照/黑暗时间比为 12/12 h^[10]。3 个月左右斑马鱼发育成熟后进行交配,交配时将雄鱼和雌鱼按比例为 1:1 或 2:1 放入缸中,用隔板分隔开,次日光照 10 min 后拔板,半小时后收集胚胎并清洗杂质,加入胚胎培养液 eggwater(0.06 mg/mL 海盐、亚甲基蓝)放置于 28℃生化培养箱中培养,每 8 h 更换一次新的 eggwater,吸出死胚。幼鱼 5~7 d 左右以草履虫喂养,12~15 d 以后以丰年虫喂养。

1.3.2 毒性实验

将 TET 用 eggwater 配制成浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的药液,挑选受精后 12 h (12 hours post-fertilization, 12 hpf) 且发育时相一致的斑马鱼胚胎,每组 100 枚 5 mL 药液于 6 孔板内进行药物暴露,将 6 孔板放入铝盒中置于生化培养箱中 28 $^{\circ}\text{C}$ 避光培育。每天更换药液 3 次并定时去除死亡的胚胎及幼鱼,观察并统计胚胎或幼鱼在不同时相的死亡、孵化、心率和畸形情况。通过 Excel 软件采用概率单位法计算 TET 在斑马鱼上的 LC_{50} 。

1.3.3 实验处理分组

本实验共设置 6 个处理组,每组选取 100 枚发育正常并且时相一致的 Tubingen 野生型斑马鱼胚胎。对照 (control, CT) 组:不加药液用等体积 eggwater 处理;DOX 组:以终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DOX 药液进行处理^[5];VLB 组:以终浓度为 3.08 $\mu\text{mol/L}$ 的 VLB 药液进行处理^[11];TET 组:用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 TET 药液处理;TET 联合 DOX 组:以含有 20 $\mu\text{mol/L}$ TET 和 10 $\mu\text{mol/L}$ DOX 的混合药液进行处理。TET 联合 VLB 组:以含有 20 $\mu\text{mol/L}$ TET 和 3.08 $\mu\text{mol/L}$ VLB 的混合药液进行处理。每个组挑选 12 hpf 的胚胎开始药物处理。每 8 h 更换 1 次药液,直至 120 hpf。

1.3.4 实时荧光定量 PCR

收集各组 120 hpf 药物处理后的野生型斑马鱼幼鱼于 1.5 mL Ep 管中(50 尾/管),每管均加入 0.2 mL TRIzol 液后用黄枪头充分吹打制成匀浆。按 TRIzol 法提取总 RNA,最后用 DEPC 水溶解 RNA 并逆转录成 cDNA。根据斑马鱼 *abcb4* 基因的 mRNA 序列 (JQ014001, NCBI),设计 *abcb4* 基因引物, F: 5'-GTTGCTGTATTCTCCTATCG-3', 5'-R: ATCTCCAGTCTCG TTCCA-3', 送上海捷瑞公司合成。根据 IQTM SYBR Green Supermix 试剂的反应体系按扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s;55 $^{\circ}\text{C}$, 20 s;72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s;40 个循环进行扩增,并采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值分析基因相对表达量。

1.3.5 罗丹明 123 染色

用 eggwater 将罗丹明 123 配制成 5 mol/L 的染液。收集各组 120 hpf 药物处理后的野生型斑马鱼幼鱼于 6 孔板中,每孔 50 尾,用 eggwater 将幼鱼清洗 3 次吸干水分后,每组加入 5 mL 罗丹明药液,28.5 $^{\circ}\text{C}$ 下避光培养 2 h。通过检测罗丹明 123 染料在斑马鱼体力的累积量变化情况检测斑马鱼的药

物外排功能,从而检测斑马鱼的耐药程度变化^[12]。

1.3.6 酶标仪检测幼鱼荧光强度

收集各组经药物处理和罗丹明 123 染色后的野生型斑马鱼幼鱼,50 尾/组,用 1 \times PBS 洗涤 3 次后再加入 350 μL 的 1 \times PBS,用研磨棒研磨胚胎直至显微镜下看不到明显组织块后,2643 r/min 离心 5 min,吸取上清液用多功能酶标仪测定罗丹明 123 荧光强度值:激发和发射波长分别为 488 nm 和 528 nm,每组均设置 3 个平行样。

1.3.7 斑马鱼荧光强度观察

收集各组经药物处理和罗丹明 123 染色后的野生型斑马鱼幼鱼。用 eggwater 反复洗涤幼鱼 3 次后,将其置于共聚焦皿中,加入适量 30 g/L 甲基纤维素进行固定,用活细胞工作站进行观察并拍照。

1.4 统计学方法

所有实验均重复 3 次或 3 次以上,采用 GraphPadPrism 5 软件的单因素方差进行统计学分析。

2 实验结果

2.1 TET 暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应

当药物浓度低于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,胚胎死亡率较低(图 1),对照组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组在各个时间点的死亡率相差不大。5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 组和 40 $\mu\text{mol/L}$ 组在各个时间点的死亡率缓慢上升,40 $\mu\text{mol/L}$ 组胚胎死亡率从 48 hpf 开始迅速升高,至 120 hpf,40 $\mu\text{mol/L}$ 组死亡率达到 90%。说明 TET 对于胚胎的发育毒性较低,但高剂量的 TET 对胚胎仍有致死性。根据胚胎各时间点的死亡率进行统计分析,得到 TET 的半数致死浓度 $\text{LC}_{50} = 22.12 \mu\text{mol/L}$ 。

2.2 TET 暴露对斑马鱼胚胎孵化率的影响

48 hpf 时,与对照组相比,2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 5 $\mu\text{mol/L}$ 组孵化率无明显变化,当药物浓度大于

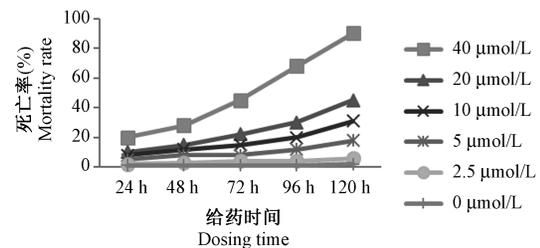


图 1 暴露于不同浓度 TET 的斑马鱼胚胎及幼鱼死亡率
Figure 1 Mortality rate in zebrafish embryos and larvae exposed to different concentrations of Tetracycline

10 $\mu\text{mol/L}$ 时随着药物暴露浓度的增加孵化率逐渐下降($P<0.01$);72 hpf 时,2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比孵化率无明显变化,当药物浓度大于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时孵化率逐渐下降($P<0.001$),当药物浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时孵化率仅为 33.7%(图 2)。

2.3 TET 对斑马鱼胚胎心率的影响

药物对斑马鱼心脏功能的影响也是评价药物毒性的一个重要指标,斑马鱼心跳在 20 hpf 左右开始出现,心脏大约在 48 hpf 左右即可发育完全。但药物对斑马鱼发育可能存在抑制作用,故选择 72 hpf 观察斑马鱼幼鱼的心脏跳动,统计在不同浓度下斑马鱼的心率。结果显示 72 hpf 时斑马鱼的心率在 130~140 次/分,2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比心率变化不明显,当药物浓度增加到 5 $\mu\text{mol/L}$ 以上时,随着药物浓度的增加,斑马鱼的心率呈下降趋

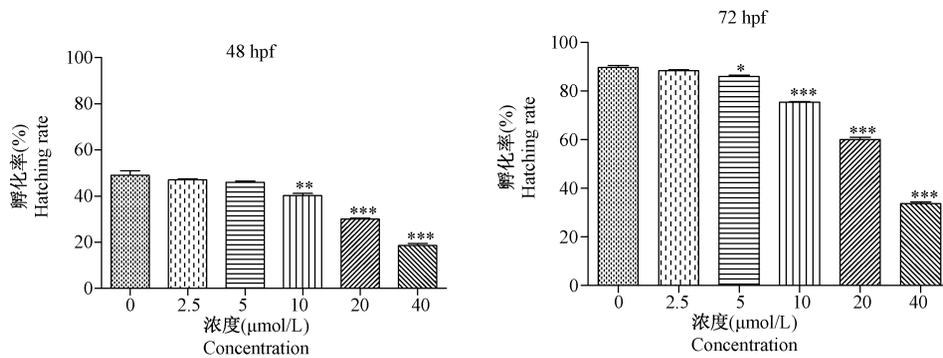
势(如图 3 所示, $P<0.001$),说明高药物浓度会降低斑马鱼的心率,影响斑马鱼的心脏功能。

2.4 TET 对斑马鱼胚胎畸形率的影响

与对照组相比,斑马鱼幼鱼的畸形率随着药物浓度的增加呈明显的上升趋势($P<0.001$),表明 TET 暴露对斑马鱼有发育毒性作用,当药物浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,幼鱼的畸形率高达 82.7%,见图 4。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测结果

不同药物处理组的斑马鱼经实时荧光定量 PCR 检测结果(图 5)显示,与对照组相比,DOX 和 VLB 单独处理组 *abcb4* 基因的 mRNA 表达增加($P<0.05$)。TET 和 DOX 共同处理组及 TET 和 VLB 共同处理组相比于 DOX 和 VLB 单独处理组 *abcb4* 基因的 mRNA 表达降低($P<0.01$)。

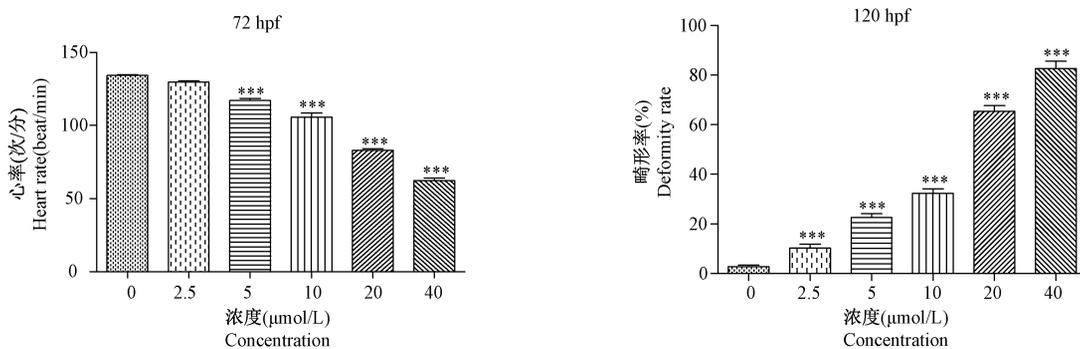


注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

图 2 暴露于不同浓度 TET 的斑马鱼胚胎孵化率

Note. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 Embryo hatching rate of zebrafish exposed to different concentrations of Tetradrine



注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, *** $P<0.001$ 。

图 3 暴露于不同浓度 TET 的斑马鱼胚胎心率

Note. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group, *** $P<0.001$.

Figure 3 Heart rate of zebrafish embryos exposed to different concentrations of Tetradrine

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, *** $P<0.001$ 。

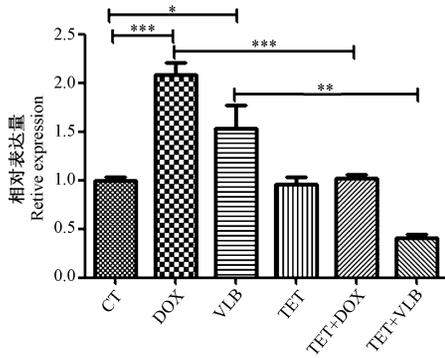
图 4 暴露于不同浓度 TET 的斑马鱼幼鱼畸形率

Note. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group, *** $P<0.001$.

Figure 4 Malformation rate of zebrafish larva exposed to different concentrations of Tetradrine

2.6 野生型斑马鱼的耐药程度检测结果

不同药物处理组的野生型斑马鱼罗丹明 123 染色后经活细胞工作站拍摄(图 6A)和酶标仪检测(图 6B)结果显示,与对照组相比,DOX 和 VLB 单独处理组荧光强度减弱,耐药程度增加 ($P < 0.001$)。TET 和 DOX 共同处理组及 TET 和 VLB 共同处理组相比于 DOX 和 VLB 单独处理组荧光强度增强,耐药程度显著下降 ($P < 0.001$)。

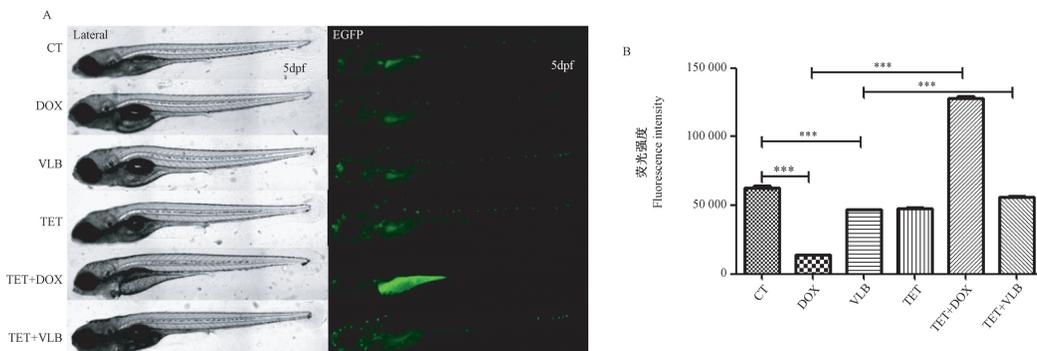


注:DOX 和 VLB 组与 CT 组相比, * $P < 0.05$; TET+DOX 组与 DOX 组相比, ** $P < 0.01$; TET+VLB 组与 VLB 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 5 不同药物处理后斑马鱼胚胎 *abcb4* 基因的 mRNA 表达变化

Note. The DOX and VLB groups compared with the CT group, * $P < 0.05$. The TET+DOX group compared with the DOX group, ** $P < 0.01$. The TET+VLB group compared with the VLB group, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Relative *abcb4* mRNA expression of drug-treated wild type zebrafish



注: A:活细胞工作站拍照结果;B:EGFP 荧光定量分析。DOX 和 VLB 与 CT 组相比,TET+DOX 组与 DOX 组相比,TET+VLB 与 VLB 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 6 不同药物处理后经罗丹明 123 染色后的野生型斑马鱼耐药程度

Note. A, Photograph of live cell imaging system. B, Detection of fluorescent expression of EGFP. The DOX and VLB groups compared with the CT group, the TET+DOX group compared with the DOX group, the TET+VLB group compared with the VLB group, *** $P < 0.001$.

Figure 6 Drug resistance in drug-treated wild type zebrafish stained with Rhodamine 123

3 讨论

目前化疗仍是肿瘤治疗的重要措施之一,化疗过程中 ABC 转运体过度表达使药物外排增加引起的多药耐药是导致肿瘤治疗失败的主要原因,而在 ABC 转运体中导致多药耐药的首要因素是 ABCB1 转运体的过度表达^[1,13]。近年来,斑马鱼作为一个新型的模式生物在高通量药物筛选研究方面拥有其它实验动物所不具备的天然优势,且斑马鱼体内的 *abcb4* 基因与人类 *ABCB1* 基因的氨基酸序列高度相似。因此,本课题基于斑马鱼的优势选择斑马鱼作为实验动物进行研究。

TET 是一种于植物粉防己的块根中提取的双苄基异喹啉类生物碱^[14]。早期因其具有消炎、镇痛、降压、抗纤维化等功效而被广泛应用于临床治疗高血压、矽肺、肝纤维化等疾病,取得非常好的疗效^[15]。近年来研究发现,TET 是一种有效的抑制剂,可逆转由 P-gp 转运体介导的多药耐药,在抗肿瘤治疗及逆转肿瘤多药耐药方面有良好的应用前景^[16]。

本研究利用斑马鱼胚胎进行 TET 浓度梯度暴露后,毒性实验结果表明只有高浓度的 TET 有明显致畸致死效应,而用中低浓度的 TET 药液处理胚胎致畸致死效应不明显。通过对死亡率的统计分析得出 TET 在斑马鱼胚胎发育早期的 $LC_{50} = 22.12 \mu\text{mol/L}$ 。根据该药物浓度选用 $20 \mu\text{mol/L}$ 对野生型斑马鱼胚胎进行药物暴露,并收集胚胎进行后续实验。

通过实时荧光定量 PCR 检测 *abcb4* 耐药基因的 mRNA 表达变化,从而判断所用药物是否产生针对 *abcb4* 的耐药。结果显示,通过用 DOX 和 VLB 药液单独处理后,斑马鱼 *abcb4* 耐药基因的 mRNA 表

达增高,说明斑马鱼体内的耐药基因 *abcb4* 被激活使斑马鱼产生了耐药,这与之前报道的 DOX 和 VLB 药物能产生针对于 ABCB1 耐药的的结果一致^[17-19]。此外,还发现 TET 联合 DOX 及 TET 联合 VLB 共同处理时比 DOX 和 VLB 单独处理时斑马鱼 *abcb4* 耐药基因的 mRNA 表达降低,提示 TET 能逆转 DOX 和 VLB 引起的耐药,这与之前报道的体外试验中 TET 可逆转 P-gp 介导的多药耐药性结果一致^[8,16,20]。为进一步验证 TET 在斑马鱼体内能逆转化疗药物 DOX 和 VLB 引起的耐药,本研究采用罗丹明 123 实验检测不同药物处理后斑马鱼的药物外排功能变化,进一步检测不同药物处理组的野生型斑马鱼的耐药程度变化情况。

罗丹明实验结果显示,经 DOX 和 VLB 处理后斑马鱼体内罗丹明染液累积量降低,说明斑马鱼体内产生了针对 *abcb4* 的耐药,DOX 和 VLB 药物暴露后,*abcb4* 编码的 P-gp 转运体激活将罗丹明染液排出体外从而导致斑马鱼体内罗丹明染液累积量降低,与实时荧光定量 PCR 检测到的结果一致。此外,TET 联合 DOX 及 TET 联合 VLB 共同处理时比 DOX 和 VLB 单独处理时斑马鱼体内罗丹明 123 染液累积量增加,提示 TET 能逆转 DOX 和 VLB 引起的耐药,这与实时荧光定量 PCR 检测结果一致。此外,TET 联合 DOX 共同处理比 TET 单独处理时斑马鱼体内罗丹明 123 染液累积量增加,而 *abcb4* 耐药基因的 mRNA 表达量无明显差异,提示 TET 联合 DOX 时 TET 可能通过下调 *abcb4* 的表达量和降低 *abcb4* 转运体的活性两种方式逆转 DOX 引起的耐药。

综上所述,本研究首先证实了 TET 对斑马鱼具有较低的发育毒性;其次,证实斑马鱼体内的 *abcb4* 基因相关耐药机制与人体内 ABCB1 基因相关耐药机制高度保守。最后确定 TET 对易引起肿瘤耐药的 DOX 和 VLB 有逆转耐药的作用,为 TET 的临床应用提供有力的实验依据,同时也证实了斑马鱼在药物筛选方面的可行性。

参考文献:

- [1] Amawi H, Sim HM, Tiwari AK, et al. ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 549-580.
- [2] Lu JF, Pokharel D, Bebawy M. A novel mechanism governing the transcriptional regulation of ABC transporters in MDR cancer cells [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2017, 7(2): 276-285.
- [3] De Vera AA, Gupta P, Lei Z, et al. Immuno-oncology agent IPI-549 is a modulator of P-glycoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)-mediated multidrug resistance (MDR) in cancer: In vitro and in vivo [J]. *Cancer Lett*, 2019, 442: 91-103.
- [4] Mann A, Bhatia S. Zebrafish: A powerful model for understanding the functional relevance of noncoding region mutations in human genetic diseases [J]. *Biomedicines*, 2019, 7(3).
- [5] 孙琮杰,何志旭,舒莉萍,等.阿霉素对模式生物斑马鱼中 *abcb4* 基因表达的影响 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(1): 7-13.
- [6] Lu X, Long Y, Sun R, et al. Zebrafish *abcb4* is a potential efflux transporter of microcystin-LR [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2015, 167: 35-42.
- [7] Joshi P, Vishwakarma RA, Bharate SB. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 273-292.
- [8] Que X, Su J, Guo P, et al. Study on preparation, characterization and multidrug resistance reversal of red blood cell membrane-camouflaged tetrandrine-loaded PLGA nanoparticles [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 199-207.
- [9] Sun H, Liu XD, Liu Q, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the novel tetrandrine derivative W6 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(6): 638-648.
- [10] 李志操,黄波,向文碧,等.红系祖细胞在造血缺陷斑马鱼体内的移植 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 84-89.
- [11] 胡荣英,孙琮杰,金璐,等.长春碱增加斑马鱼肿瘤耐药基因 *abcb4* 的表达 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(6): 758-762.
- [12] 陈露,向文碧,莫晶,等. Wnt/ β -catenin 信号通路参与化疗药物诱导的转基因斑马鱼 *abcb4* 基因的表达和耐药 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(2): 134-139.
- [13] Pasello M, Giudice AM, Scotlandi K. The ABC subfamily A transporters: multifaceted players with incipient potentialities in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 57-71.
- [14] Jang BC. Tetrandrine has anti-adipogenic effect on 3T3-L1 preadipocytes through the reduced expression and/or phosphorylation levels of C/EBP-alpha, PPAR-gamma, FAS, perilipin A, and STAT-3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476(4): 481-486.
- [15] Liu T, Liu X, Li W. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40800-40815.
- [16] Cao Z, Li D, Liu L, et al. Effect of five novel 5-substituted tetrandrine derivatives on P-glycoprotein-mediated inhibition and transport in *Caco-2* cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6808-6814.
- [17] Liu Z, Duan ZJ, Chang JY, et al. Retraction: Sinomenine sensitizes multidrug-resistant colon cancer cells (*Caco-2*) to doxorubicin by downregulation of MDR-1 expression [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215388.
- [18] Li S, Yang J, Wang J, et al. Down-regulation of miR-210-3p encourages chemotherapy resistance of renal cell carcinoma via modulating *ABCC1* [J]. *Cell Biosci*, 2018, 8: 9.
- [19] Jaferian S, Soleymaninejad M, Daraee H. Verapamil (VER) enhances the cytotoxic effects of docetaxel and vinblastine combined therapy against non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2018, 68(3): 146-152.
- [20] Lu Y, Li F, Xu T, et al. Tetrandrine prevents multidrug resistance in the osteosarcoma cell line, U-2OS, by preventing Pgp overexpression through the inhibition of NF-kappaB signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(4): 993-1000.

[收稿日期] 2019-11-07