

竹节参皂苷对顺铂耐药肺癌细胞敏感性的影响及机制研究

高贵洲, 张宏瑞, 张涛, 崔凯, 梁晓华* (空军军医大学第二附属医院胸外科, 西安 710038)

摘要: 目的 研究竹节参皂苷对顺铂耐药肺癌细胞敏感性的影响及其潜在作用机制。方法 通过递增顺铂浓度诱导肺癌 A549 细胞耐药, 测定细胞存活率, SRB 显色法测定药物敏感性, Annexin V-FITC/PI 双染测定细胞凋亡, ELISA 测定 Caspase 3 和 Caspase 8 水平, Western blotting 测定细胞中相关蛋白表达情况。结果 经长期诱导后, A549 细胞对顺铂的耐受性增加 14.79 倍, 且较稳定。与顺铂组比较, 联合应用竹节参皂苷和顺铂可显著增加 A549 细胞对顺铂的敏感性, 增加细胞内 Caspase 3 和 Caspase 8 水平, 促进细胞凋亡, 同时抑制 MDR1、P-gp、Bcl-2 和 p-Akt 等蛋白表达, 促进 Bax 蛋白表达。结论 竹节参皂苷可增加顺铂耐药细胞株对顺铂的敏感性, 增强顺铂的作用效果, 其作用机制可能与抑制耐药相关蛋白 MDR1、P-gp 和 Akt 活性相关。

关键词: 竹节参皂苷; 顺铂; 耐药

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)22-2715-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.22.005

引用本文: 高贵洲, 张宏瑞, 张涛, 等. 竹节参皂苷对顺铂耐药肺癌细胞敏感性的影响及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(22): 2715-2719.

Study on the Effect and Mechanism of Saponins from *Panax Japonicus* in Inhibiting Cisplatin Resistant Lung Cancer Cells

GAO Guizhou, ZHANG Hongrui, ZHANG Tao, CUI Kai, LIANG Xiaohua* (Department of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of saponins from *Panax japonicus* on the sensitivity of cisplatin resistant lung cancer cell and further discuss its potential mechanism. **METHODS** Drug resistance of lung cancer A549 cells was induced by increasing concentration of cisplatin, and then cell viability was determined, the drug sensitivity was determined by SRB colorimetry, apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining assay, Caspase 3 and Caspase 8 levels was measured by ELISA and the expression of related proteins was determined by Western blotting. **RESULTS** After long-term induction, the tolerance of A549 cells to cisplatin was increased by 14.79 times and was relatively stable. Compared with cisplatin treatment group, the combination of saponins from *Panax japonicus* and cisplatin significantly increased the sensitivity of A549 cells to cisplatin, increased the intracellular Caspase 3 and Caspase 8 levels and promoted apoptosis. At the same time, the expression of MDR1, P-gp, Bcl-2 and p-Akt was inhibited, and the expression of Bax protein was promoted. **CONCLUSION** Saponins from *Panax japonicus* can increase the sensitivity of cisplatin-resistant cell lines to cisplatin and enhance the effect of cisplatin, and the possible mechanism may be through inhibiting the activity of drug-resistant related proteins MDR1, P-gp and Akt.

KEYWORDS: saponins from *Panax japonicus*; cisplatin; drug resistant

肺癌是近年高发的恶性肿瘤之一, 发病隐秘, 发现时多已处于中晚期, 手术很难达到治疗效果^[1]。化疗是肺癌治疗的重要手段之一, 主要有烷化剂类、抗肿瘤抗生素类、铂剂、单抗类等。在临床使用过程中发现, 很多药物治疗效果逐渐减弱, 产生耐药反应, 导致治疗方案失败^[2]。顺铂(cisplatin, DDP)是目前肺癌治疗方案中常用的一线药物, 可与 DNA 结合形成加合物抑制基因的转录和翻译, 促进肺癌细胞凋亡。但 DDP 在使用过程中, 极易出现耐药, 包括先天性耐药和获得性耐药等, 影响临床治疗效果, 同时极大地限制其应

用^[3]。寻找合适治疗方案解决 DDP 耐药是临床亟待解决的科学问题, 也是目前肺癌治疗研究热点。

随着中药现代化的发展, 中药在肺癌治疗方面应用逐渐增加。中医认为肺癌病机属本虚标实, 脾虚痰湿, 病位在肺, 和脾肾密切相关^[4]。从传统中草药和天然植物中寻找有效的抗肿瘤药物和解决肺癌细胞耐药成为目前医药学家关注的热点。竹节参是我国西南苗家和土家民间常用草药, 属五加科人参属植物, 与同属植物人参、西洋参、三七等化学成分相似, 具有相似的药理活性, 同时具有人参和三七的部分功效^[5]。上世纪中期, 日

基金项目: 国家自然科学基金项目(81672269)

作者简介: 高贵洲, 男, 博士, 主治医师 Tel: 15229881176
主治医师 Tel: 13991112140 E-mail: 5591373@qq.com

E-mail: 15229881176@163.com *通信作者: 梁晓华, 男, 博士, 主

本曾以竹节参代替人参使用,可见其药效物质成分和药效与人参高度相似^[6]。竹节参主要成分为竹节参皂苷(saponins from *Panax japonicus*, SPJ),现代药理学研究表明,SPJ能够改善环磷酰胺引起的小鼠免疫功能下降,改善小鼠肿瘤恶病质等抗肿瘤活性^[7]。在体外研究中还发现其可诱导肺癌A549细胞凋亡,抑制肿瘤组织生长等^[8]。但其是否具有改善DDP类药物耐药作用,还未见报道。本实验拟研究SPJ对DDP耐药肺癌细胞的影响,并阐明其诱导DDP耐药肺癌细胞凋亡的分子机制,以期将其推广应用于临床。

1 材料

1.1 细胞系

肺腺癌人类肺泡基底上皮细胞A549细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 药物和试剂

竹节参药材购自西安藻露堂大药房(批号:20170917);DDP[冻干型,齐鲁制药(海南)有限公司,规格:每支10 mg,用生理盐水将DDP浓度调整为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$];胎牛血清(批号:16000-044)、RPMI 1640培养基(批号:11875093)、胰蛋白酶(批号:12605-010)购自美国Gibico公司;CCK8试剂盒(Yeasen公司,批号:40203ES60);凝胶配胶试剂盒(鼎国生物技术有限公司);ECL发光液(博士德生物技术有限公司);MDR1(批号:13342)、P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)(批号:12683)、Bcl-2(批号:4223)、Bax(批号:5023)、cleaved-Caspase 3兔抗人一抗(批号:9579)和cleaved-Caspase 8兔抗人一抗(批号:9496)均购自美国Cell Signaling Technology公司;羊抗兔二抗(博士德生物技术有限公司);磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB)(Sigma,批号:230162);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

Multiskan Go全波段酶标仪(TECAN);SDSPAGE微型凝胶电泳仪、Quantity One software图像分析系统均购自Bio-Rad;371型二氧化碳培养箱(Thermo);C6流式细胞仪(BD)。

2 方法

2.1 SPJ的提取

药材经粉碎成粗粉后,加10倍量60%乙醇溶液,浸泡2.5 h,加热回流3次,每次3 h,减压浓缩至无醇味,加水稀释后放置,离心,取上清液,用同体积的正丁醇萃取,减压浓缩得总皂苷粗品;

粗品用85%乙醇溶解后,加5倍量丙酮,静置5 h,离心,收集沉淀物并用适量丙酮洗涤,热风干燥,即得竹节参总皂苷精制品,总皂苷含量为83.1%。

2.2 细胞培养

A549细胞采用含10%FBS的1640培养基(含 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和链霉素),放置在 37°C ,5% CO_2 培养箱中培养,每48 h换液1次,细胞融合至90%时进行传代培养,取对数生长期且状态良好的细胞进行后续试验。

2.3 建立DDP耐药细胞

处于对数期生长的A549细胞,胰酶消化后传代。在培养基中递加入DDP,起始浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,4周内递增至 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,连续传代培养至100代,每隔1周测定1次耐药性,第32周建成DDP耐药的细胞系,命名为A549DDPR细胞。经检测,细胞培养基换回正常培养基培养20周内均保持耐药性。

2.4 细胞存活率测定

A549细胞或A549DDPR细胞以每毫升 1×10^4 个的细胞密度接种于96孔板中, 37°C ,5% CO_2 培养箱中培养24 h,加入含不同浓度DDP(0, 10, 100, $1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或SPJ(0, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64和 $1.28 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理24 h。吸弃含药上清,加入含CCK8培养基,继续培养4 h,450 nm测定吸光度值。已未加药处理组存活率为100%,计算各组的细胞存活率。

2.5 SRB显色法测定药物敏感性

细胞以合适浓度接种于96孔板,培养24 h后,加药物处理,细胞分为对照组、DDP组、SPJ组、DDP+SPJ组,药物处理48 h后进行下一步检测。每孔加入50%三氯乙酸预冷溶液50 μL , 4°C ,1 h固定细胞;细胞洗涤后,加入SRB液,避光孵育10 min,1%醋酸溶液洗涤5遍,干燥后,加入 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非缓冲Tris溶液(pH 10.5)溶解,545 nm处测定吸光度,记录OD值。抑制率(inhibition rate, IR) = $(1 - OD_{\text{给药}} / OD_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

2.6 Annexin V-FITC/PI双染测定细胞凋亡

细胞以每毫升 1×10^5 个密度接种于6孔板,每孔1.5 mL,培养24 h,经不同药物处理后,消化、收集细胞。采用Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡测定试剂盒检测细胞凋亡情况。细胞加入500 μL Binding buffer吹匀后,分别加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI溶液,混匀,避光孵育15 min后,用流式细胞仪检测,记录早期凋亡和晚期凋

亡的细胞比例。

2.7 ELISA 测定 Caspase 3 和 Caspase 8

细胞接种和药物按“2.4”项下方法处理,收集每孔中的细胞,加入细胞裂解液裂解后,收集上清液用于 Caspase 3 和 Caspase 8 测定。按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤进行测定,波长为 405 nm,记录 OD 值,计算 Caspase 3 和 Caspase 8 的相对表达量 $= (OD_{\text{药物}} - OD_{\text{对照}}) / (OD_{\text{空白}} - OD_{\text{对照}})$ 。

2.8 Western blotting 测定 A549 细胞中蛋白表达情况

细胞经不同处理后,收集细胞,经裂解后,收集上清液即为总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品中蛋白的含量。蛋白样品经变性后,按每孔 40 μg 蛋白量上样,经 10%SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜至聚偏氟乙烯膜上。用 5%脱脂奶粉在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭 1 h,洗膜后,加入一抗(1:1 000 稀释),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜后,1:5 000 羊抗兔二抗孵育 1 h,ECL 发光液显色。采用 Image J 软件分析蛋白表达灰度。 β -actin 为内参蛋白。

2.9 统计结果

数据采用 Graph Pad 6.0 处理分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 T 检验, $P < 0.05$ 为

差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 DDP 和 SPJ 对 A549 和 A549DDPR 细胞存活率的影响

DDP 对 A549 和 A549DDPR 的 IC_{50} 值分别为 53.42, 790.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,与 A549 相比,A549DDPR 对 DDP 的耐受性增加 14.79 倍。SPJ 对 A549 和 A549DDPR 的 IC_{50} 值分别为 0.64, 0.89 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。为研究 SPJ 是否可增加耐药细胞对 DDP 的敏感性,选择 0.16 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (细胞抑制率为 22.1%)的 SPJ 进行下一步实验。结果见图 1。

3.2 SPJ 联合 DDP 对 A549DDPR 细胞的体外抑制作用

与对照组比较,DDP 对 A549DDPR 细胞抑制作用较小,A549DDPR 细胞对 DDP 还存在一定的敏感性。与对照组比较,SPJ 组可显著增加 A549DDPR 抑制率,DDP+SPJ 组可进一步增加对 A549DDPR 的抑制率($P < 0.01$)。同时,细胞凋亡试验结果显示,与 DDP 组比较,DDP+SPJ 组可显著增加 A549DDPR 细胞凋亡($P < 0.01$),表明 SPJ 可增加 A549DDPR 对 DDP 的敏感性。结果见图 2。

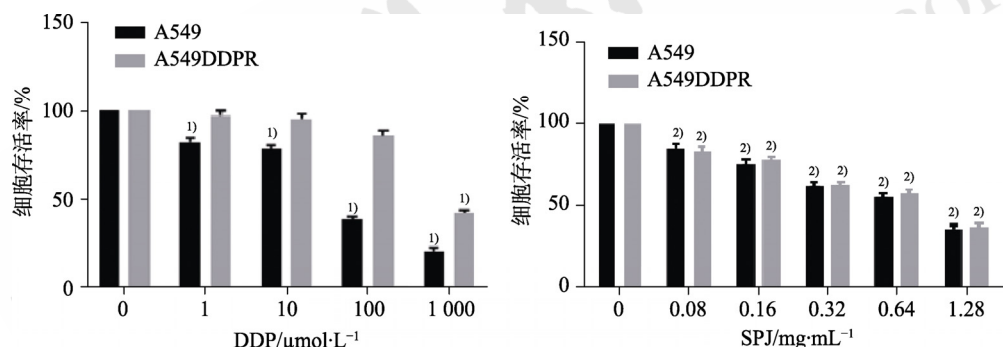


图 1 SPJ 和 DDP 对 A549 和 A549DDPR 细胞存活率的影响
与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effects of SPJ and DDP on the A549 and A549DDPR cell viability
Compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ¹⁾ $P < 0.01$.

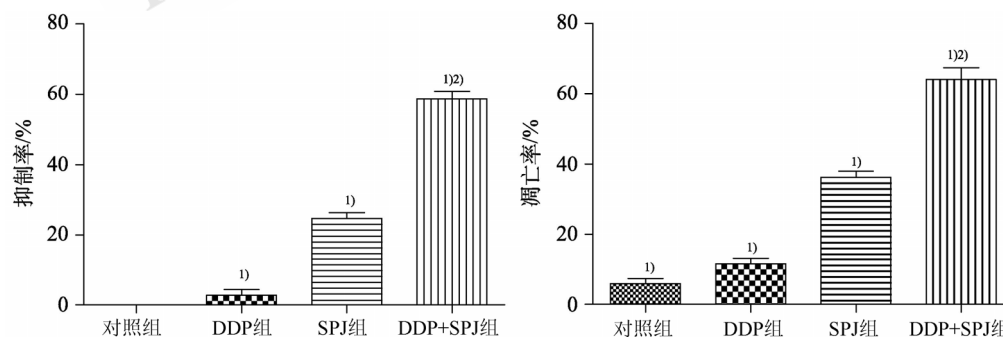


图 2 SPJ 联合 DDP 对细胞敏感性的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 DDP 组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effect of SPJ and DDP combination on the drug sensitivity
Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with DDP group, ²⁾ $P < 0.01$.

3.3 SPJ 对 DDP 耐药细胞中 Caspase 3 和 Caspase 8 水平的影响

以对照组激酶活性设置为 1, DDP 使 Caspase 3 激酶活性均值升高 6.9 倍, SPJ 使 Caspase 3 激酶活性均值升高 13.8 倍, 而 DDP+SPJ 升高 23.2 倍。同时, DDP 使 Caspase 8 激酶活性均值升高 6.8 倍, SPJ 使 Caspase 8 激酶活性均值升高 15.1 倍, 而 DDP+SPJ 升高 27.9 倍, 同时, Western blotting 结果显示, 与 DDP 组比较, DDP+SPJ 组细胞 cleaved-Caspase 3 和 cleaved-Caspase 8 蛋白表达显著增加($P<0.01$), 表明 SPJ 可增加耐药细胞系对 DDP 的促凋亡的反应活性。结果见图 3。

3.4 SPJ 对耐药相关蛋白的影响

与对照组比较, DDP 对 MDR1、Bax、Bcl-2 和 p-Akt 蛋白表达的影响均较小, 而 SPJ 组显著降低 MDR1、Bcl-2、P-gp 和 p-Akt 的蛋白表达, 升高 Bax 蛋白表达($P<0.01$)。与 DDP 组和 SPJ 组比较, DDP+SPJ 组促进 Bax 蛋白表达, 同时抑制 MDR1、Bcl-2 和 p-Akt 蛋白表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。DDP 和 SPJ 同时作用可进一步抑制 P-gp 蛋白表达, 与 DDP 组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见图 4。

4 讨论

肺癌是威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 居所有肿瘤引起死亡的首位, 中国是肺癌患者最多的国家, 给家庭和社会带来了沉重的经济和医疗负担。由于缺乏早期诊断技术和早期特异性临床特征, 大部分患者确诊时已是癌症晚期, 错过手术

时机, 化疗为主的综合治疗尤为重要^[9-10]。在化疗方案中, 以铂类药物和第 3 代化疗药联合应用的治疗方案为晚期肺癌治疗的标准一线方案。DDP 虽然治疗效果显著, 能够明显提高晚期肺癌治疗的有效率, 但其毒性较大, 不良反应严重, 严重影响患者生存质量^[11]。同时, DDP 使用过程中极易产生耐药性, 导致治疗方案失败。因此, 结合中药治疗减轻不良反应, 同时增加机体对药物的敏感性已是当前临床研究的热点。

本实验通过逐渐递增 DDP 浓度, 体外培养 A549 细胞建立耐 DDP 细胞系 A549DDPR, 结果显示 A549DDPR 对 DDP 的耐受力是正常 A549 细胞的 14.79 倍, 而且经传一定代数后, 耐药性依然存在。在此基础上, 笔者考察了 SPJ 和 DDP 联合应用对 A549DDPR 细胞系的影响。结果显示, SPJ 可显著增加 DDP 对 A549DDPR 抑制细胞活性, 促进细胞凋亡以及细胞凋亡蛋白表达, 表明 SPJ 可显著增加 A549DDPR 对 DDP 的敏感性。

肿瘤细胞产生耐药性主要通过表达多药耐药基因 MDR1 和 P-gp, 其中 MDR1 表达与多种肿瘤耐药性高度相关, 而 P-gp 可使抗肿瘤药物从肿瘤细胞中泵出, 降低化疗药物浓度^[12-13]。本研究结果显示, SPJ 可显著下调 MDR1、P-gp 和凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达, 促进促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase 3 蛋白表达, 表明 SPJ 可通过上述细胞因子逆转 A549 细胞耐药性, 达到抑制肿瘤作用。最新研究发现, 肿瘤细胞可通过调控与细胞增殖和凋亡相关的关键信号通路(如 PI3K/Akt 通路)获得

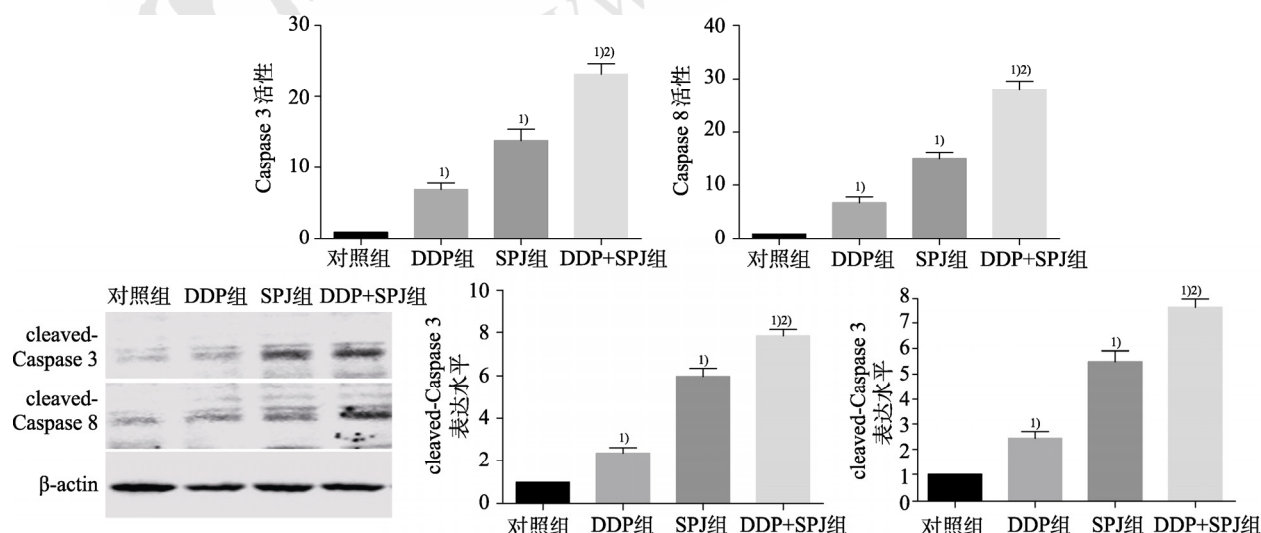


图 3 SPJ 和 DDP 联合应用对 A549DDPR 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 DDP 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of SPJ and DDP combination on the apoptosis related proteins expression in A549DDPR cell

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with DDP group, ²⁾ $P<0.01$.

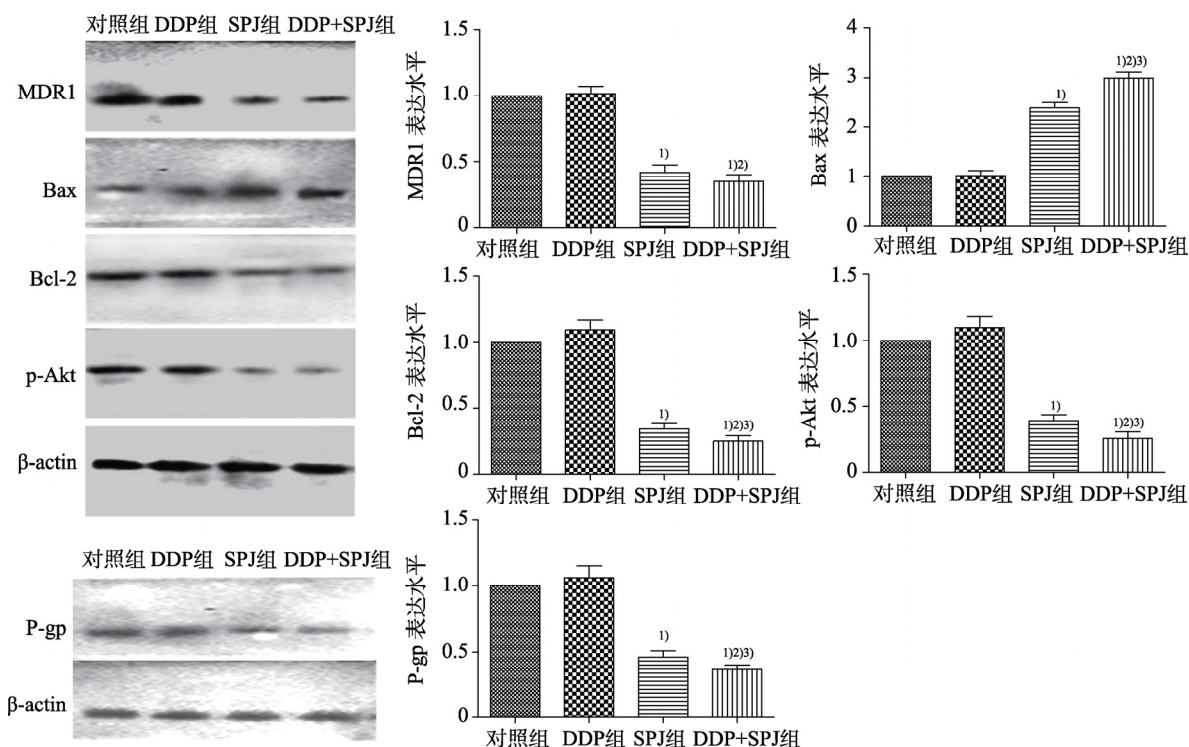


图4 SPJ对耐药相关蛋白表达的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与DDP组比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与SPJ组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Effect of SPJ on the expression of drug-resistant related proteins

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with DDP group, ²⁾ $P < 0.01$; compared with SPJ group, ³⁾ $P < 0.05$ 。

对抗肿瘤药物的抵抗能力^[14-15]。很多化疗药物会诱导PI3K/Akt通路异常激活影响化疗效果,导致多药耐药。因此,抑制PI3K/Akt通路活性则有可能改善细胞耐药性,增加对化疗药物的敏感性。Western blotting试验结果表明,SPJ可显著抑制Akt磷酸化水平,表明可抑制其活性。

综上所述,SPJ可增加DDP耐药肺癌细胞系对DDP的敏感性,诱导细胞凋亡,其作用机制可能与抑制耐药相关蛋白MDR1、P-gp和Akt活性相关。

REFERENCES

- [1] LIU X Y, WANG Y, ZHANG W. Analysis of treatment of lung cancer based on Yang Transform Qi, Yin Forming [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2017(2): 92-94.
- [2] SHI L J, LI M D, LI L, et al. Dynamics of DNA-dependent protein kinase expression in the development of platinum resistance and correlation with clinical factors [J]. Chin J Oncol Prev Treat(中国癌症防治杂志), 2014, 6(2): 114-120.
- [3] 唐梦琳, 邓万明. 肺癌顺铂耐药的分子机制研究新进展[J]. 华西医学, 2009, 24(1): 238-240.
- [4] ZHOU D H, LIN L Z, ZHOU Y Q, et al. The role of TCM method for invigorating Qi and removing the phlegm in prolonging median survival time in the patient with non-small cell lung cancer [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志) 2005, 46(8): 600-602.
- [5] 张晓霞. 两种人参属药用植物的化学成分及生物活性研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2013.

- [6] 袁丁. 竹节参药效物质及药材质量分析研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009.
- [7] ZHANG C C, JIANG M J, ZHAO H X, et al. Effects of total saponins of *Panax japonicus* Rhizoma on cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33(7): 1134-1138.
- [8] JIANG H Y, DENG Q H, ZHENG X H, et al. Effects of total saponins of *Panax japonicus* on apoptosis and activity of caspase-3 on A549 lung cancer cell [J]. Sci Technol Eng(科学技术与工程), 2015, 15(25): 100-103.
- [9] 罗卫华, 姚文秀, 王更利, 等. 吉西他滨联合顺铂治疗42例晚期非小细胞肺癌的临床疗效观察[J]. 中国肺癌杂志, 2002, 5(5): 374-375.
- [10] 李佳林, 谭小武. 晚期非小细胞肺癌的药物治疗方法研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(5): 177-178.
- [11] 崔润华. 伊立替康联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的近期疗效及毒性反应观察[J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(6): 119-120.
- [12] SUN N, SUN X C, CHEN B A, et al. MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2010, 65(3): 437-446.
- [13] LI X Q, LI J, SHI S B, et al. Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy [J]. Int J Biol Markers, 2009, 24(4): 230-237.
- [14] VIVANCO I, SAWYERS C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7): 489-501.
- [15] MARTINI M, DE SANTIS M C, BRACCINI L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review [J]. Ann Med, 2014, 46(6): 372-383.

收稿日期: 2020-01-07

(本文责编: 蔡珊珊)