

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.001>

· 论著 ·

苦参碱抑制 Nrf2 诱导的 Annexin A4 表达改善 非小细胞肺癌对顺铂耐药

刘冬¹, 周伟², 高晓博³, 王小霞⁴, 郭舜⁵, 石磊⁵, 张松⁵

- (1. 空军军医大学唐都医院肿瘤科, 西安 710038; 2. 中国人民解放军第四五一医院医学工程科, 西安 710054;
3. 中国人民解放军第三医院药剂科, 陕西 宝鸡 721004; 4. 空军军医大学唐都医院皮肤科, 西安 710038;
5. 空军军医大学唐都医院药剂科, 西安 710038)

[摘要] **目的:** 探讨苦参碱对非小细胞肺癌(non-small lung cancer cell, NSCLC)顺铂耐药性的逆转作用及其机制。**方法:** MTT法检测细胞存活率; 采用试剂盒检测细胞乳酸脱氢酶及caspase-3活性, 考察核因子E-2-相关因子2(nuclear factor-E2-related factor, Nrf2)激动剂对NSCLC细胞凋亡及膜连蛋白A4(Annexin A4)表达的影响, 同时考察苦参碱对NSCLC顺铂耐药的改善作用及对Nrf2/Annexin A4的调控作用。**结果:** 使用Nrf2激动剂后, NSCLC细胞顺铂耐药显著, 顺铂耐药细胞存活率较普通肺癌细胞显著升高, 凋亡率显著降低, Annexin A4表达明显升高, 而苦参碱可以显著抑制Nrf2诱导的Annexin A4表达, 提高细胞对顺铂的敏感性, 促进细胞凋亡发生。**结论:** 苦参碱对人NSCLC顺铂耐药细胞株顺铂耐药性有改善作用, 其机制可能与调节Nrf2/Annexin A4有关。

[关键词] 非小细胞肺癌; 顺铂; 核因子E-2-相关因子2; 膜连蛋白A4; 苦参碱

Matrine inhibits Nrf2 induced Annexin A4 expression and improves cisplatin resistance in non-small cell lung cancer

LIU Dong¹, ZHOU Wei², GAO Xiaobo³, WANG Xiaoxia⁴, GUO Shun⁵, SHI Lei⁵, ZHANG Song⁵

- (1. Department of Oncology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038; 2. Department of Medical Engineering, 451 Hospital of PLA, Xi'an 710054; 3. Department of Pharmacy, Third Hospital of the People's Liberation Army, Baoji Shaanxi 721004;
4. Department of Dermatology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038; 5. Department of Pharmacy, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract **Objective:** To investigate the reversal effect of Matrine on cisplatin-resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and its mechanism. **Methods:** MTT assay was used to detect cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) and caspase-3 (caspase-3) activity, and Nrf2 agonists were given to investigate the effects of Nrf2 on apoptosis and Annexin A4 expression in NSCLC cells. Matrine was also given to investigate its effect on cisplatin resistance and

收稿日期 (Date of reception): 2018-10-27

通信作者 (Corresponding author): 张松, Email: zhangsong801101@163.com

基金项目 (Foundation item): 陕西省重点研发计划 (2017SF-136); 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2017JM8136)。This work was supported by Shaanxi Key Research and Development Program (2017SF-136) and Basic Research Program of Natural Science in Shaanxi Province (2017JM8136), China.

regulation of Nrf2/Annexin A4 in NSCLC. **Results:** MTT assay showed that Nrf2 agonist significantly inhibited the cisplatin resistance of NSCLC cells, the survival rate of cisplatin-resistant NSCLC cells was significantly higher than that of normal lung cancer cells, the apoptosis rate was significantly decreased, the expression of Annexin A4 was significantly increased, while matrine significantly inhibited Nrf2-induced Annexin A4 expression, and significantly increased the cisplatin resistance of NSCLC cells. The sensitivity of platinum promotes cell apoptosis.

Conclusion: Matrine can improve the cisplatin resistance of human NSCLC cisplatin-resistant cell line, and the mechanism may be related to the regulation of Nrf2/Annexin A4.

Keywords non-small cell lung cancer; cisplatin; nuclear factor-E2-related factor; Annexin A4; matrine

肺癌是发病率和病死率增长最快, 对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一, 近50年来许多国家都报道肺癌的发病率和病死率均明显增高, 男性肺癌发病率和病死率均占有恶性肿瘤的第一位, 女性发病率占第二位, 病死率占第二位^[1]。我国过去30年肺癌的发病率上升了4倍, 其中非小细胞肺癌(non-small lung cancer cell, NSCLC)占有肺癌的75%~80%。约75%初诊肺癌发现时大多属于该类疾病中晚期^[1]。化学药物治疗(以下简称化疗)是肺癌的主要治疗方法, 90%以上的肺癌需要接受化疗治疗。化疗治疗NSCLC的肿瘤缓解率为40%~50%^[2]。顺铂临床常见NSCLC化疗常用药物, 但是顺铂耐药是临床目前的常见问题, 严重影响治疗效果^[3]。近年靶向药物发展迅速, 但由于价格昂贵等问题, 临床使用普及率相对较低。因此有效改善顺铂耐药是临床亟待解决的问题, 特别是对低收入家庭患者的临床治疗具有显著意义。Annexin A4属于膜联蛋白家族, 与细胞分化、肿瘤增殖及侵袭密切相关^[4], 膜联蛋白A4的高表达率是三阴性乳腺癌患者预后的独立预测因子^[5]; Annexin A4可以通过调控NF- κ B反馈回路调节胆囊癌细胞恶性行为和肿瘤生长^[6]; 抑制Annexin A4可以增加紫杉醇对肺癌细胞的敏感性^[7]。

苦参碱属于生物碱, 广泛存在于豆科植物苦参的干燥根、植株、果实中。胸膜腔内灌注苦参碱-顺铂可显著提高顺铂对NSCLC亚临床胸膜转移患者基质细胞衍生因子-1的影响^[8]; 苦参碱可以诱导NSCLC细胞活性氧激活p38, 导致caspase依赖的细胞凋亡^[9]。而苦参碱在顺铂耐药及其对Annexin A4的调控机制鲜见报道。本研究将通过建立NSCLC耐药细胞株, 考察苦参碱对NSCLC顺铂耐药及其对Annexin A4的调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

NSCLC细胞株A549, A549/DDP细胞由空军军医大学生物技术中心馈赠, DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国GIBCO公司; 青霉素链霉素溶液-双抗、胰蛋白酶购自美国HyClone公司; 苦参碱、顺铂、Nrf2激动剂(TBHQ)、Diethylmaleate、DMSO及3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐购自美国Sigma公司; LDH检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; caspase-3活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。二氧化碳培养箱(HF-90型)购自力康生物医疗科技控股有限公司; 多功能酶标仪(Tecan Mpro200)购自瑞士Tecan公司; 甲醇、乙腈分析纯购自美国Fisher公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 MTT 试验

对数生长期的A549细胞及顺铂耐药A549/DDP细胞接种于96孔培养板, 接种密度为 1×10^4 /mL, 在37℃, 5%CO₂孵箱中孵育24 h后加入2.5, 5, 10, 20, 40, 120 μ mol/L顺铂; 设置空白, 每孔总体积为200 μ L, 再孵育24 h后吸出培养基, 每孔加入MTT溶液100 μ L, 继续孵育4 h后吸去MTT液, 每孔加入200 μ L DMSO, 振荡15 min, 溶解蓝色结晶后, 490 nm波长酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值。苦参碱给药剂量通过前期预实验选取无细胞毒浓度剂量(0.5 μ mol/L), Nrf2激动剂剂量为(5, 10 μ mol/L), 苦参碱, Nrf2激动剂实验中与顺铂共同孵育24 h。

1.3 乳酸脱氢酶检测

将对数生长期A549细胞, A549/DDP细胞以

5×10^4 /mL浓度接种于96孔板中, 每孔100 μ L, 每组6复孔, 采用LDH检测试剂盒, 取100 μ L加入上述标本中, 混合孵育1 h, ELISA检测仪检测波长405 nm处的A值, 未加任何试剂的空白孔作参照, 计算不同浓度苦参素组与对照组A值的比值, 确定活化程度。

1.4 各组 caspase-3 活性的检测

将对数生长期A549细胞, A549/DDP细胞以 5×10^4 /mL浓度接种于96孔板中, 每孔100 μ L, 每组6复孔, 将Caspase-Glo 3底物和PBS混合, 取100 μ L加入上述标本中, 混合孵育1 h, ELISA检测仪检测波长405 nm处的吸光度值($A_{405 \text{ nm}}$), 未加任何试剂的空白孔作参照, 计算不同浓度苦参碱组与对照组 $A_{405 \text{ nm}}$ 的比值, 确定活化程度。

1.5 Western 印迹法检测细胞内 Annexin A4 蛋白表达

Western印迹法检测细胞中Annexin A4蛋白的表达。收集、提取蛋白质, SDS-PAGE分离蛋白。电泳条件为90 V 30 min, 120 V 1.5 h。电泳结束后以电转移法将蛋白从凝胶转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 用5%脱脂奶粉封闭过夜, 分别加入一抗兔抗人Nrf2及Annexin A4单克隆抗体各10 mL(工作液稀释比例为1:1 000)并室温孵育2 h, 然后再加入二抗鼠抗兔多克隆抗体10 mL(工作液稀释比例为1:5 000)并室温孵育2 h, 最后将PVDF膜用ECL化学发光试剂盒(美国Viagene公司)处理并显影, 检测阳性蛋白的表达水平。

1.6 统计学处理

采用SPSS 15.0统计软件进行数据分析, 数值用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 结果比较采用单因素方差分析和Student's *t*检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂耐药细胞对顺铂的敏感度明显降低

MTT试验结果表明: 在同等顺铂给药剂量下, A549/DDP耐药细胞的细胞存活率显著高于普通A549细胞株, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

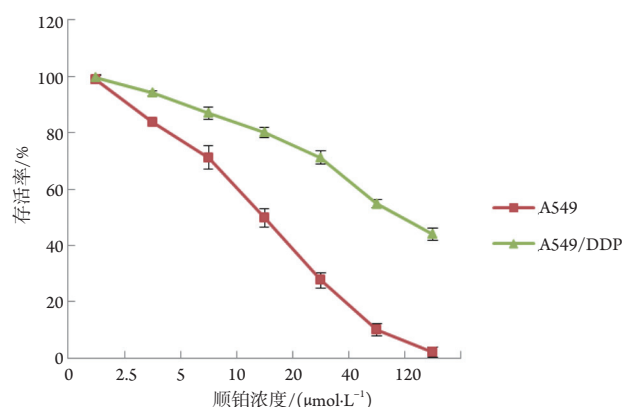


图1 不同剂量顺铂对A549和A549/DDP细胞存活率的影响
Figure 1 Effects of different doses of cisplatin on cell viability in A549 and A549/DDP cell

2.2 Nrf2 激动剂显著降低 A549 及 A549/DDP 顺铂耐药细胞对顺铂的敏感度

给予Nrf2激动剂后细胞对顺铂的敏感度均显著降低。给予不同浓度的Nrf2激动剂后, A549细胞中细胞存活率分别上升1.37及1.88倍($P < 0.05$), 而A549/DDP细胞中细胞存活率分别升高1.8及2.15倍($P < 0.05$, 图2)。此外LDH检测结果表明: 给予Nrf2激动剂显著降低顺铂引起的肿瘤细胞LDH活性($P < 0.05$)。Caspase-3活性检测结果表明: 给予Nrf2激动剂显著降低顺铂引起的肿瘤细胞caspase-3活性($P < 0.05$, 图3)。

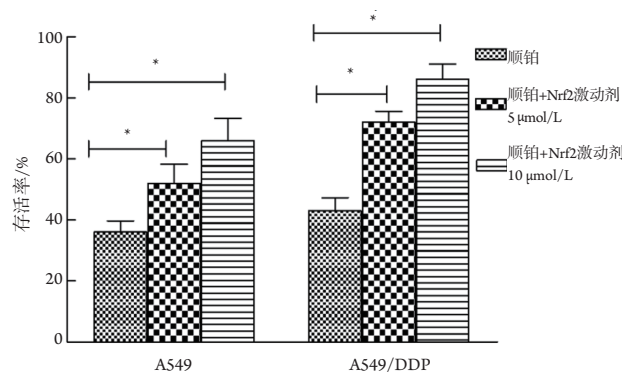


图2 Nrf2激动剂对A549和A549/DDP细胞顺铂给药后的存活率的影响

Figure 2 Effect of Nrf2 agonists on the cell viability of A549, A549/DDP cells after cisplatin administration

* $P < 0.05$.

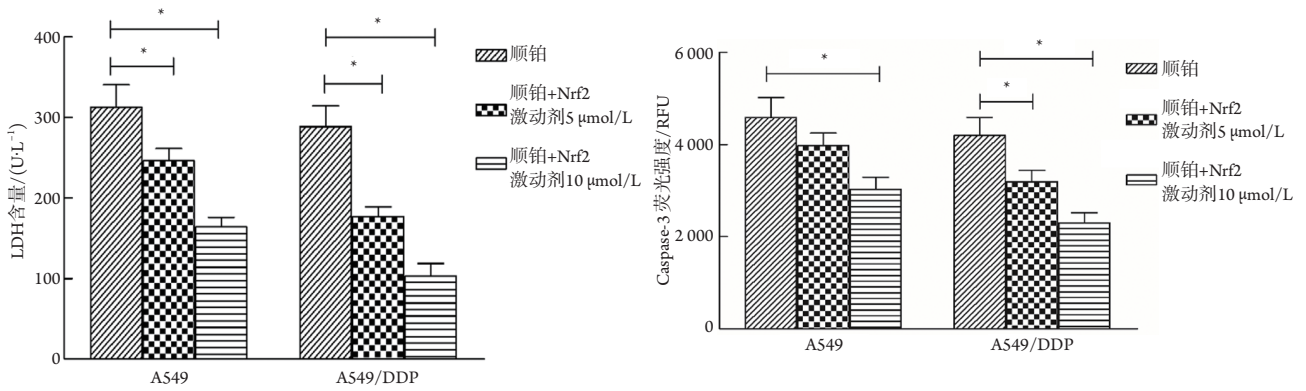


图3 Nrf2激动剂对A549和A549/DDP细胞顺铂给药后LDH及caspase-3活性的影响

Figure 3 Effects of Nrf2 agonists on LDH and caspase-3 activity in A549, A549/DDP cells after cisplatin administration

*P<0.05.

2.3 苦参碱显著提高 A549/DDP 顺铂耐药细胞对顺铂的敏感度

在A549及A549/DDP细胞中, 苦参碱均可显著逆转Nrf2激动剂诱导的顺铂敏感度降低 ($P<0.05$, 图4); LDH检测结果表明: 在A549/DDP细胞中给予苦参碱可显著促进顺铂诱导的肿瘤细胞LDH活性升高 ($P<0.05$), 亦可显著抑制Nrf2激动剂诱导的肿瘤细胞LDH活性降低作用。Caspase-3活性检测结果表明: 将苦参碱与Nrf2激动剂联合作用于A549, A549/DDP细胞, 可以明显逆转Nrf2激动剂引起的细胞耐药性升高 ($P<0.05$, 图5)。

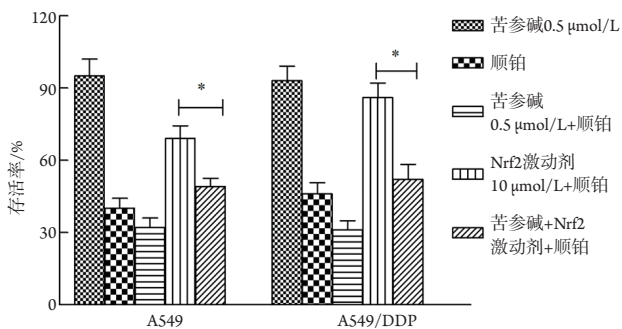


图4 苦参碱对A549, A549/DDP细胞顺铂给药后的存活率的影响

Figure 4 Effects of matrine on cell viability of A549, A549/DDP cells after cisplatin administration

*P<0.05.

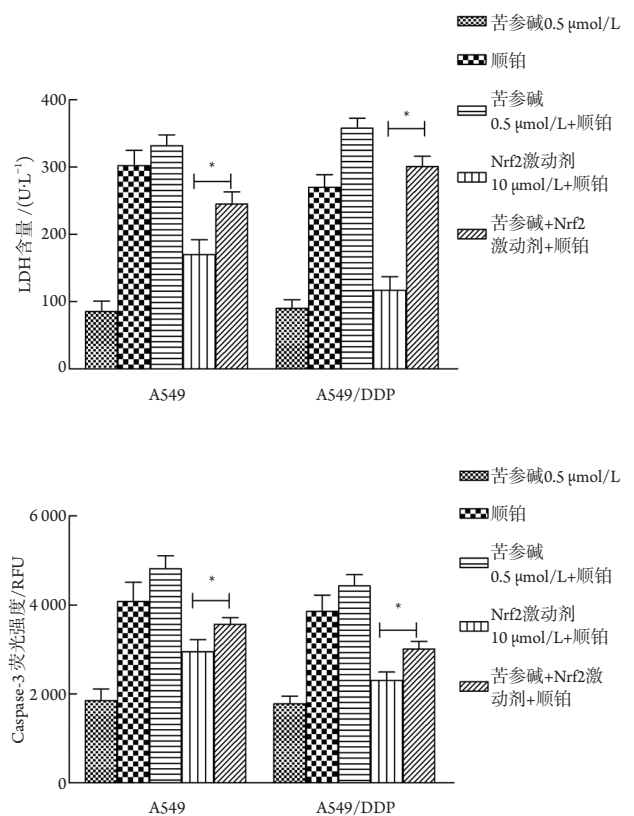


图5 苦参碱对A549, A549/DDP细胞顺铂给药后LDH及caspase-3活性的影响

Figure 5 Effects of matrine on LDH and caspase-3 activity in A549, A549/DDP cells after cisplatin administration

*P<0.05.

2.4 Nrf2 激动剂及苦参碱对 A549 及 A549/DDP 顺铂耐药细胞 Annexin A4 的表达的影响

免疫印迹实验结果表明: Nrf2 激动剂可显著升高 A549 及 A549/DDP 顺铂耐药细胞中 Annexin A4 的表达, 在 A549/DDP 顺铂耐药细胞中作用更

显著($P < 0.05$)。而联合使用时, 苦参碱显著抑制 A549/DDP 顺铂耐药细胞 Annexin A4 的表达。免疫印迹实验结果表明: 苦参碱可以显著抑制 Nrf2 诱导的 A549 及 A549/DDP 顺铂耐药细胞中 Annexin A4 的表达($P < 0.05$, 图6)。

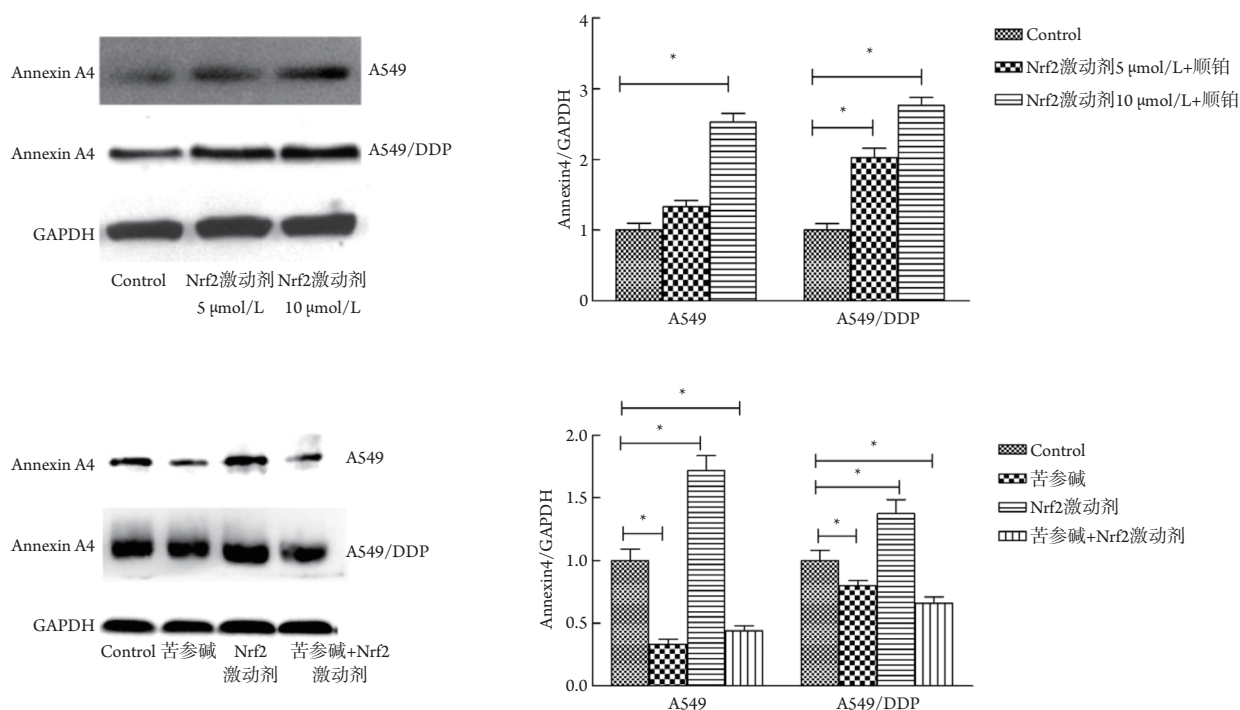


图6 Nrf2激动剂及苦参碱对A549及A549/DDP顺铂耐药细胞Annexin A4表达的影响

Figure 6 Effects of Nrf2 agonists and matrine on the expression of Annexin A4 in A549 and A549/DDP cisplatin-resistant cells

* $P < 0.05$.

3 讨论

顺铂化疗仍是临床NSCLC不良反应的主要治疗方案。但肿瘤对顺铂耐药率的不断提高, 导致其对NSCLC的疗效明显下降, 而提高顺铂给药剂量, 又会造成严重的不良反应。膜联蛋白是一类磷脂结合蛋白家族, 具有参与生物膜形成、离子通道建立和信号转导等生物学功能。膜联蛋白A4(Annexin A4)是膜联蛋白家族的重要成员, 是继酪氨酸激酶抑制剂后, 近年来新发现的治疗NSCLC的又一关键靶点, 研究表明其在胃癌中显著高表达^[10-11]。导致包括NSCLC在内的众多肿瘤对顺铂耐药的关键之一, 在于Annexin A4在耐药肿瘤组织中的高表达^[12]。此外有研究^[13-14]表明Annexin A4高表达能激活下游ATP7A和Akt信号通路。

Nrf2/ARE是近年新发现的机体抵抗内外界

氧化和化学等刺激的防御性转导通路。活化的Nrf2进入细胞核, 与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合, 启动ARE下游的II相解毒酶、抗氧化蛋白、蛋白酶体/分子伴侣等基因转录和表达以抵抗内外界有害刺激^[15]。近年研究^[16]发现Nrf2在肿瘤细胞增殖、耐药中同样具有重要作用。

本研究发现Nrf2激动剂可以明显降低NSCLC细胞对顺铂的敏感性, 抑制LDH及caspase-3活性, 降低顺铂导致的肿瘤细胞凋亡的发生, 同时上调Annexin A4蛋白表达, 促进NSCLC顺铂耐药的发生, 说明Nrf2可能通过调控Annexin A4参与介导顺铂耐药的发生。

复方苦参注射液具有明显减低患者癌性疼痛作用, 是临床化疗辅助用药, 临床治疗NSCLC及乳腺癌等腺癌多用作联合用药。近年研究^[17-20]表

明: 苦参碱与顺铂联用增效明显, 而苦参碱对肿瘤的抑制作用也多有报道。本实验结果发现: 给予低剂量的苦参碱可以明显逆转NSCLC细胞顺铂耐药, 苦参碱可以抑制Nrf2诱导的Annexin A4蛋白表达, 其改善NSCLC顺铂耐药作用与调节Nrf2诱导的Annexin A4表达有关。本研究表明Nrf2在机体中可通过调控Annexin A4继而影响NSCLC对顺铂耐药, 苦参碱可影响该途径继而发挥逆转耐药的作用; 但其具体调控机制还有待于进一步研究。苦参碱显著抑制炎症发生, 而炎症途径在肿瘤对顺铂耐药的机制研究还有待深入。有研究^[21-22]表明炎症激活的MAPK, JNK途径在顺铂耐药中发挥重要作用, 同时炎症因子TNF- α , IL-6等在卵巢癌的顺铂耐药中同样具有一定的作用。而苦参碱是否通过调控炎症反应发挥改善肿瘤对顺铂耐药的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- Langer CJ, Besse B, Gualberto A, et al. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(36): 5311-5320.
- Dhillon S. Gefitinib: a review of its use in adults with advanced non-small cell lung cancer[J]. *Target Oncol*, 2015, 10(1): 153-170.
- Yin JY, Huang Q, Zhao YC, et al. Meta-analysis on pharmacogenetics of Platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38150.
- 黄逸群, 左开井. 膜联蛋白的功能与调控研究进展[J]. *生物技术进展*, 2012, 2(3): 157-164.
HUANG Yiqun, ZUO Kaijing. Advances in function and regulation of annexin[J]. *Current Biotechnology*, 2012, 2(3): 157-164.
- Zhang ZG, Chen JN, Wang YD, et al. The role of Annexin A4 in triple-negative breast cancer progression and its clinical application[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2016, 46(5): 515-521.
- Yao HS, Sun C, Li XX, et al. Annexin A4-nuclear factor- κ B feedback circuit regulates cell malignant behavior and tumor growth in gallbladder cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 2016: 31056.
- Gaudio E, Paduano F, Nanganke A, et al. A Fhit-mimetic peptide suppresses annexin A4-mediated chemoresistance to paclitaxel in lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 29927-29936.
- Yang CL, Liu SS, Ma YG, et al. The influence of intraoperative pleural perfusion with matrine-cisplatin or cisplatin on stromal cell-derived factor-1 in non-small cell lung cancer patients with subclinical pleural metastasis[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 574-581.
- Tan C, Qian X, Jia R, et al. Matrine induction of reactive oxygen species activates p38 leading to caspase-dependent cell apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(5): 2529-2535.
- Matsuzaki S, Serada S, Morimoto A, et al. Annexin A4 is a promising therapeutic target for the treatment of platinum-resistant cancers[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(4): 403-414.
- Lin LL, Huang HC, Juan HF. Revealing the molecular mechanism of gastric cancer marker annexin A4 in cancer cell proliferation using exon arrays[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44615.
- Wang H, Deng L, Cai M, et al. Annexin A4 fucosylation enhances its interaction with the NF- κ B p50 and promotes tumor progression of ovarian clear cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 8(64): 108093-108107.
- Li ZH, Qiu MZ, Zeng ZL, et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7A) is associated with Platinum-resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 21.
- Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, et al. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(8): 1796-1809.
- 郭浩琰, 蔡蓉, 邢嵘. 核转录因子相关因子2的活化在肿瘤代谢中的作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(6): 581-587.
GUO Haoyan, CAI Rong, XING Rong. The role of Nrf2 activation in tumor metabolism[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(6): 581-587.
- 杨梦迪, 胡容. 核因子E2相关因子2在肺癌中的双向调节作用[J]. *药物生物技术*, 2018, 25(3): 258-262.
YANG Mengdi, HU Rong. Bidirectional regulation of nuclear factor E2 related factor 2 in lung cancer[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2018, 25(3): 258-262.
- 代国华, 陈明媚. 复方苦参注射液对中晚期肺癌化疗增效减毒作用的临床研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2010, 10(12): 1109-1111.
DAI Guohua, CHEN Mingmei. Synergy and attenuation of compound Matrine injection on chemotherapy in patients with advanced lung cancer: A clinic study[J]. *Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China*, 2010, 10(12): 1109-1111.
- 庞东生, 许扬, 汪雪原, 等. 复方苦参注射液联合TP方案治疗晚期NSCLC临床观察[J]. *中华全科医学*, 2011, 9(1): 50.
PANG Dongsheng, XU Yang, WANG Xueyuan, et al. Clinical effects of TP project combined with compound Matrine injections on advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2011, 9(1): 50.
- 张敬伟, 段冬梅, 任中海. 苦参注射液联合GP方案对非小细胞肺癌的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(23): 184-187.
ZHANG Jingwei, DUAN Dongmei, REN Zhonghai. Effect of Kushen injection combined with GP regimen in patients with non-small cell lung cancer[J]. *China Journal of Experimental Traditional Medical*

- Formulae, 2015, 21(23): 184-187.
20. Rong B, Zhao C, Gao W, et al. Matrine promotes the efficacy and safety of platinum-based doublet chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 14701-14717.
21. Brozovic A, Osmak M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance[J]. *Cancer Lett*, 2007, 251(1): 1-16.
22. Matassa DS, Amoroso MR, Lu H, et al. Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(9): 1542-1554.

本文引用: 刘冬, 周伟, 高晓博, 王小霞, 郭舜, 石磊, 张松. 苦参碱改善非小细胞肺癌对顺铂耐药[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(3): 457-463. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.001

Cite this article as: LIU Dong, ZHOU Wei, GAO Xiaobo, WANG Xiaoxia, GUO Shun, SHI Lei, ZHANG Song. Effect and mechanism of Matrine on cisplatin resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(3): 457-463. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.001