



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.08

文章编号: 2095-1264(2022)01-0053-07

基于 Notch 信号通路探讨 β -榄香烯逆转肺腺癌 耐药机制的研究[★]

濮忠建¹, 顾小侠², 张静知³, 韦琪³, 孙元鹏¹, 朱时林¹, 王亚军^{1*}

(¹海安市中医院 肿瘤科, 江苏 南通, 226600; ²南通市中医医院, 江苏 南通, 226001; ³南京中医药大学, 江苏 南京, 210023)

摘要: **目的** 基于 Notch 信号通路,探讨 β -榄香烯逆转肺腺癌耐药的机制。**方法** 选择对 A549/DDP 细胞无细胞毒性的 β -榄香烯浓度处理 A549/DDP 细胞,设 β -榄香烯组与对照组,两组细胞均给予不同浓度的 DDP(0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理 24 h,MTT 法检测细胞活力并计算 IC_{50} ,流式细胞仪检测细胞凋亡,Western blotting 检测凋亡相关蛋白(cleaved-caspase 3、cleaved-caspase 9)、耐药相关蛋白(P-gp、survivin、p21)及 Notch 信号通路蛋白(Notch1、Hes1、Hey2)的表达。A549/DDP 细胞在 β -榄香烯处理的基础上,联合 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Notch 信号通路激活剂 rhNF- κB 处理,比较两组的 IC_{50} ,Western blotting 检测 P-gp 以及 Notch1、Hes1、Hey2 的表达。**结果** 当 β -榄香烯浓度低于 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其对 A549/DDP 细胞的抑制率小于 10%,无细胞毒性。 β -榄香烯组 DDP 的 IC_{50} 显著低于对照组($t=14.712$, $P<0.05$),逆转倍数为 4.452 倍。 β -榄香烯组细胞凋亡率以及凋亡相关蛋白 cleaved-caspase 3 和 cleaved-caspase 9 的表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。 β -榄香烯组 P-gp、survivin 蛋白相对表达量低于对照组,而 p21 蛋白相对表达量高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。 β -榄香烯组 Notch1、Hes1、Hey2 蛋白相对表达量均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。 β -榄香烯+ rhNF- κB 组 DDP 的 IC_{50} 以及 P-gp、Notch1、Hes1、Hey2 蛋白表达水平均高于 β -榄香烯组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** β -榄香烯可通过抑制 Notch 信号通路促进 A549/DDP 细胞凋亡,并逆转肺腺癌耐药。

关键词: Notch 信号通路; β -榄香烯; 肺腺癌; 耐药

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

Study on the mechanism of β -elemene reversing drug resistance of lung adenocarcinoma based on Notch signaling pathway[★]

PU Zhongjian¹, GU Xiaoxia², ZHANG Jingzhi³, WEI Qi³, SUN Yuanpeng¹, ZHU Shilin¹, WANG Yajun^{1*}

(¹ Department of Oncology, Hai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong, Jiangsu, 226600, China; ² Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong, Jiangsu, 226001, China; ³ Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210023, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of β -elemene reversing drug resistance of lung adenocarcinoma based on Notch signaling pathway. **Methods** A549/DDP cells were treated with β -elemene in a concentration that was not cytotoxic to A549/DDP cells. Designed β -elemene group and control group. Cells in the two groups were given different concentrations (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of DDP for 24 h. Cell viability and the IC_{50} were measured by MTT, and cell apoptosis were detected by flow cytometry. The apoptosis-related proteins (cleaved-caspase 3, cleaved-caspase 9), drug resistance-associated proteins (P-gp, survivin, p21) and Notch signaling pathway proteins (Notch1, Hes1, Hey2) were detected.

[★]基金项目:南通市中医医疗联盟课题(TZYK201825)。

作者简介:濮忠建,男,硕士,主治医师,研究方向:肿瘤的中西医结合治疗。

*通信作者:王亚军,男,主任医师,研究方向:肿瘤的中西医结合治疗。

ed by Western blotting. After A549/DDP cells were treated with β -elemene + $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Notch signaling pathway activator rhNF- κ B, compare the IC_{50} between the β -elemene group and β -elemene + rhNF- κ B group, and detect the proteins P-gp, Notch1, Hes1 and Hey2 with Western blotting. **Results** When the concentration of β -elemene was lower than $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the inhibition rate of A549/DDP cells was lower than 10%, showing no cytotoxicity. The IC_{50} of DDP in A549/DDP cells in β -elemene group was lower than that in control group ($t=14.712$, $P<0.05$), and the reversal fold was 4.452 times. The apoptosis rate in the β -elemene group was higher than in the control group, and the expression levels of apoptosis-related proteins (cleaved-caspase 3 and cleaved-caspase 9) were higher than those of the control group ($P<0.05$). The relative expression levels of P-gp and survivin proteins in β -elemene group were lower than in control group, and the relative expression level of p21 protein was higher in β -elemene group than in control group ($P<0.05$). The relative expression levels of Notch1, Hes1 and Hey2 proteins in β -elemene group was lower than that in control group ($P<0.05$). The A549/DDP cells in β -elemene + rhNF- κ B group had a higher DDP IC_{50} than that in the β -elemene group, and the expression levels of P-gp, Notch1, Hes1, Hey2 proteins were higher than those of the β -elemene group ($P<0.05$). **Conclusion** β -elemene can promote apoptosis of A549/DDP cells by inhibiting Notch signaling pathway, so that can reverse the drug resistance of lung adenocarcinoma.

Keywords: Notch signaling pathway; β -elemene; Lung adenocarcinoma; Drug resistance

前言

肺癌在癌症中的发病率和死亡率均位居第一, 分别占我国癌症总发病人数的 20% 和 27.3%^[1-2], 且 50%~70% 的肺腺癌患者早期无明显症状^[3-4]。目前, 肺癌的治疗仍以手术治疗、放射治疗和药物治疗为主^[5]。顺铂(DDP)是非小细胞肺癌的常规化疗药物, 疗效显著且价格便宜, 但后期易产生细胞耐药^[6-7]。因此, 寻找克服肺腺癌耐药性的潜在药物具有十分重要的意义。近年来有学者发现, β -榄香烯除了直接发挥抗肿瘤作用外, 还可逆转肿瘤细胞耐药^[8]。已有文献报道, β -榄香烯体外可逆转人肺腺癌 A549/DDP 细胞株耐药性^[9], 但其作用机制尚未明确。Notch 信号通路参与了细胞的增殖、分化、凋亡、黏附及上皮-间质转化等过程, 其异常可能导致肿瘤的发生。异常活化的 Notch 通路可能通过其下游蛋白调控肿瘤细胞的增殖和侵袭。有研究表明, Notch 通路活化的乳腺癌细胞可对 DDP 依赖的化疗药物产生耐药性^[10]。然而, Notch 信号通路与肺腺癌的相关性研究目前未见报道。因此, 本研究旨在基于 Notch 信号通路探讨 β -榄香烯逆转肺腺癌耐药的作用机制。

1 试剂与方法

1.1 试剂 人肺腺癌 DDP 耐药细胞株 A549/DDP 及 DDP 敏感细胞株 A549 购自中国军事医学科学院肿瘤细胞库。DDP(云南个旧生物药业有限公司); β -榄香烯注射液(大连金港制药有限公司); 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、四甲基偶氮唑蓝

(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Solarbio 公司); 基础培养基和胎牛血清(Biological Industries 公司); 青霉素、链霉素(伊力特公司); 鼠抗人 P-gp 单抗、cleaved-caspase 3、cleaved-caspase 9、survivin、p21、Notch1、Hes1、Hey2 单克隆抗体及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗及鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2 细胞培养 将 A549 和 A549/DDP 细胞分别用添加了 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的含 15% 胎牛血清的 1640 培养液培养, 置于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中孵育。待细胞生长覆盖瓶底, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 平均 1~2 天传代一次, 以保证细胞活力。

分别取对数生长期 A549 和 A549/DDP 细胞, 胰酶消化后, 加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养基, 调整待测细胞密度为 5×10^3 个/孔, 接种至 96 孔板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 每组 3 孔。于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育至细胞单层铺满孔底后, 分别加入 0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DDP, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h, 倒置显微镜下观察, 并检测相关指标。

1.3 MTT 法检测 A549/DDP 细胞耐药性 取上述 96 孔板, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ MTT 溶液 ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即 0.5% MTT), 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养 4 h。终止培养后, 吸去培养孔内细胞培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使 MTT 结晶物充分溶解。使用酶联免疫检测仪测量 490 nm 处各孔的吸光度(OD 值)。以上实验重复 3 次, 取平均值, 绘制细胞生长曲线。耐药倍数=耐药细胞

IC₅₀/敏感细胞 IC₅₀。

1.4 MTT 法检测 β -榄香烯对 A549/DDP 细胞毒

性 取对数生长期 A549/DDP 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板。待细胞贴壁后,实验组分别加入 5、10、20、40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -榄香烯,对照组分别加入等量药物溶解介质,即含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,每个浓度设置 3 个平行孔。分别孵育 12、24、48、72 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),继续培养 4 h,500 $\times$ g 离心 3 min,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。全自动酶标仪测定 570 nm 处各孔 OD 值,参比波长为 630 nm。实验重复 3 次,取平均值计算细胞生长率。生长率 = $\text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。规定生长率 > 90% 的药物浓度为该药的非细胞毒性剂量,并作为最佳逆转耐药浓度。

1.5 MTT 法检测 β -榄香烯对 A549/DDP 细胞的逆

转耐药作用 取对数生长期 A549/DDP 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板。对照组分别加入终浓度分别为 0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DDP, β -榄香烯组在对照组的基础上加入 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -榄香烯,MTT 法检测每孔 OD 值(具体步骤如 1.4)。增殖率 = $\text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$ 。采用直线回归方程计算细胞生长抑制率为 50% 时的 DDP 浓度,即半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀),并计算耐药细胞的逆转耐药倍数。逆转倍数 = 逆转前 IC₅₀/逆转后 IC₅₀。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期 A549/DDP 细胞,以 5×10^3 个/L 的密度接种至细胞培养板, β -榄香烯组加入 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -榄香烯,作用 24 h,并设置对照组,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂、饱和湿度培养箱培养 48 h。收集各组细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,吸去 PBS,按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,加入 Annexin V 结合液重悬细胞,吹打均匀,使细胞浓度约为 1×10^8 个/L,将细胞移至流式管中,加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min,加入 10 μL PI 染色液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min,立即用流式细胞仪检测,保存散点图,记录数据。实验重复 3 次。

1.7 Western blotting 法检测 cleaved-caspase 3、

cleaved-caspase 9、P-gp、survivin、P21、Notch1、Hes1、Hey2 蛋白表达 取对数生长期 A549/DDP 细胞,以 5×10^3 个/L 的密度进行接种, β -榄香烯组加入 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -榄香烯,作用 24 h,并设置对照组。

培养 24 h 后,弃去培养液,胰酶消化,离心收集细胞, RIPA Lysis Buffer 裂解细胞, PBS 稀释总蛋白 (40 μg), 加热 5 min 变性后上样。120 V 下 Mini-PROTEAN TGX 凝胶电泳 (25%, 美国 CST 公司) 30 min, 在含 15% 甲醇的 Tris-甘氨酸缓冲液中平衡 10 min 后, 35 V 下转移至 PVDF 膜, 在含 5% 脱脂牛奶的 TBS 中室温封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次, 加入相应稀释度的一抗 (1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日用 PBST 洗 3 次, 加入相应稀释度的 HRP 标记的二抗 (1:2000), 室温摇床孵育 1.5 h, PBST 洗涤 5 次, ECL 显色, 扫描并记录。实验重复 3 次, 取平均值, 以 β -actin 作为内参, 采用 Quantity One 软件进行分析。蛋白相对表达量 = 目标蛋白灰度值/内参灰度值。

1.8 MTT 和 Western blotting 法检测 β -榄香烯逆

转 A549/DDP 细胞耐药 取对数生长期 A549/DDP 细胞,以 5×10^3 个/L 的密度进行接种, β -榄香烯组采用 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -榄香烯处理 24 h, β -榄香烯 + rhNF- κ B 组采用 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -榄香烯和 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Notch 信号通路激活剂 rhNF- κ B 处理 24 h。两组细胞均给予不同浓度 (0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 DDP 处理 24 h。MTT 法检测细胞活力并计算 IC₅₀ (具体步骤如 1.5), Western blotting 检测 P-gp、Notch1、Hes1、Hey2 蛋白表达 (具体步骤如 1.7)。实验重复 3 次。

1.9 统计学分析 实验数据采用 SPSS 19.0 统计学软件进行处理, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用 ANOVA 方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测 A549/DDP 细胞耐药性 A549 细胞 DDP 的 IC₅₀ 为 (7.721 ± 0.873) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, A549/DDP 细胞 DDP 的 IC₅₀ 为 (18.270 ± 1.261) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 差异有统计学意义 ($t = 14.038$, $P < 0.05$)。A549/DDP 细胞的耐药倍数为 2.366, 对 DDP 具有耐药性 (图 1)。

2.2 低浓度榄香烯对 A549/DDP 细胞无细胞毒性 不同浓度 β -榄香烯对 A549/DDP 细胞均有一定的抑制作用, 当 β -榄香烯浓度低于 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 对 A549/DDP 细胞的抑制率小于 10% (图 2)。因此, 后续实验选择 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -榄香烯处理细胞。

2.3 β -榄香烯可逆转 A549/DDP 细胞耐药 对照组 DDP 的 IC₅₀ 为 (14.550 ± 1.351) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, β -榄香烯组 DDP 的 IC₅₀ 为 (3.268 ± 0.579) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 差异有统

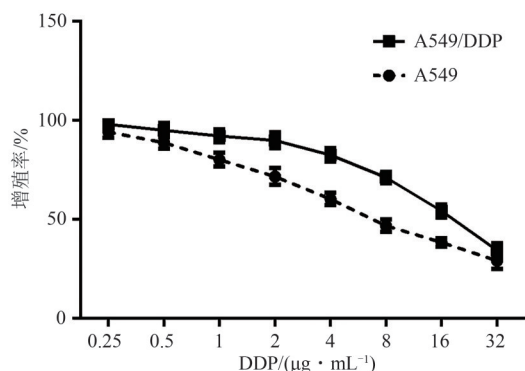


图 1 不同浓度 DDP 处理后 A549 和 A549/DDP 细胞的增殖率

Fig. 1 Proliferation rates of A549 and A549/DDP cells after treated with different concentrations of DDP

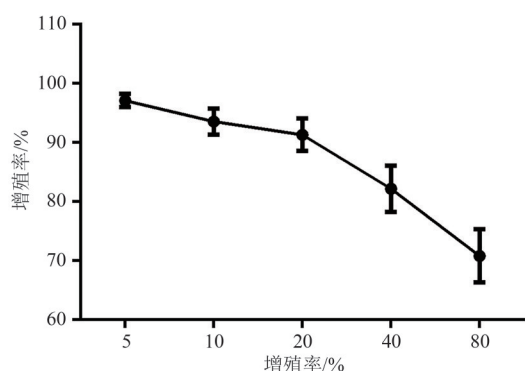


图 2 不同浓度 β-榄香烯处理后 A549/DDP 细胞的增殖率

Fig. 2 Proliferation rate of A549/DDP cells after treated with different concentrations of β-elemene

计学意义 ($t=14.712$, $P<0.05$), 表明 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β-榄香烯可逆转 A549/DDP 细胞对 DDP 耐药, 逆转倍数为 4.452 (图 3)。

2.4 β-榄香烯促进 A549/DDP 细胞凋亡 β-榄香烯组细胞凋亡率高于对照组, 差异有统计学意义 ($t=6.184$, $P<0.05$) (图 4A)。β-榄香烯组 cleaved-cas-

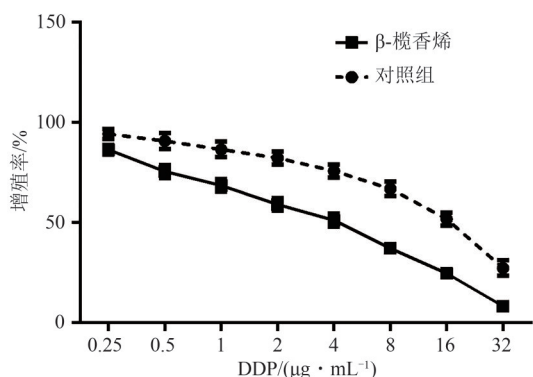


图 3 不同浓度 DDP 处理后对照组和 β-榄香烯组 A549/DDP 细胞的增殖率

Fig. 3 Proliferation rates of A549/DDP cells in the control group and β-elemene group after treated with different concentrations of DDP

pase 3 和 cleaved-caspase 9 蛋白相对表达量均高于对照组, 差异有统计学意义 ($t=5.182$, 4.993 ; $P<0.05$) (图 4B)。

2.5 β-榄香烯调节 A549/DDP 细胞耐药相关蛋白表达 β-榄香烯组 P-gp、survivin 蛋白相对表达量低于对照组, p21 蛋白相对表达量高于对照组, 差异均有统计学意义 ($t=5.612$, 4.003 , 3.412 ; $P<0.05$) (图 5)。

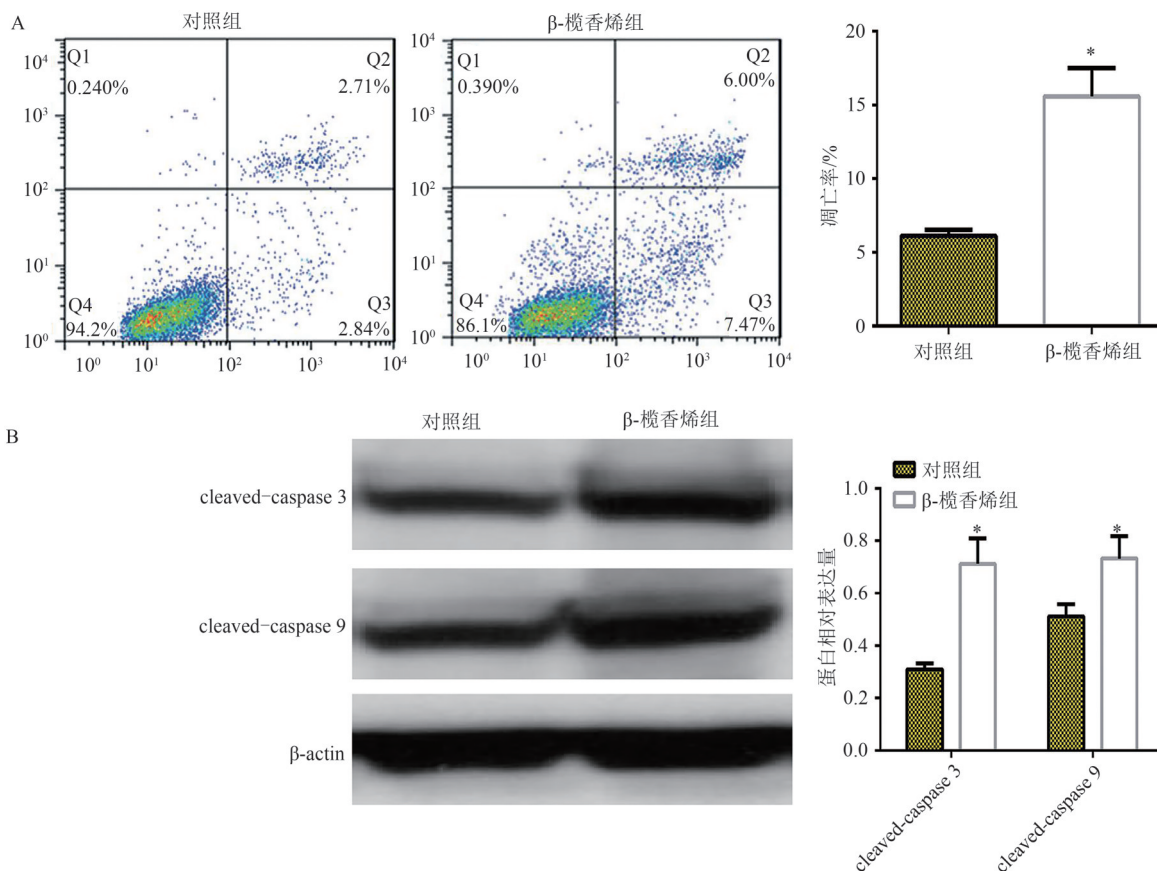
2.6 β-榄香烯抑制 A549/DDP 细胞 Notch 信号通路 β-榄香烯组 Notch1、Hes1、Hey2 蛋白相对表达量均低于对照组, 差异有统计学意义 ($t=12.059$, 9.109 , 2.212 ; $P<0.05$) (图 6)。

2.7 β-榄香烯通过抑制 Notch 信号通路逆转 A549/DDP 细胞耐药 β-榄香烯组 A549/DDP 细胞 DDP 的 IC_{50} 为 $(3.397 \pm 0.477) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, β-榄香烯 + rhNF-κB 组 A549/DDP 细胞 DDP 的 IC_{50} 为 $(11.320 \pm 1.505) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 差异有统计学意义 ($t=10.142$, $P=0.000$) (表 1); 与 β-榄香烯组比较, β-榄香烯 + rhNF-κB 组 P-gp、Notch1、Hes1、Hey2 蛋白相对表达量显著提高 ($P<0.05$) (图 7), 表明 β-榄香烯可通过抑制 Notch 信号通路逆转 A549/DDP 细胞对 DDP 耐药。

3 讨论

肺癌是临床最为常见的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率在所有恶性肿瘤中均位居第一, 每年可导致 100 000 人死亡^[4]。早期肺癌患者往往无明显症状, 首次确诊时多已发展为晚期, 失去手术切除机会, 通常需要接受化疗或放疗^[11]。DDP 是肺癌一线化疗药物, 可通过阻止 DNA 复制促进肿瘤细胞凋亡^[12]。然而, 接受 DDP 治疗的患者常发生耐药, 因此, 寻找可提高化疗敏感性或逆转耐药的药物对于改善患者预后意义重大。β-榄香烯是一种广谱抗肿瘤药物, 多项研究表明, 其可通过促进 DNA 损伤和抑制 DNA 修复来提高肺癌 A549 细胞的辐射敏感性, 进而在体内外增强化疗药物的细胞毒性^[13-14]。近年来也有学者报道, β-榄香烯可在体外逆转人肺癌 A549/DDP 细胞株的耐药性^[15], 但其潜在分子机制仍未明确。

Notch 信号通路可调控大多数细胞的分化, 在多种肿瘤的发生、发展过程中起重要作用, 而 Notch 是一种细胞膜糖蛋白受体。相关研究表明, Notch 信号通路过表达可诱导生成肿瘤干细胞 (cancer

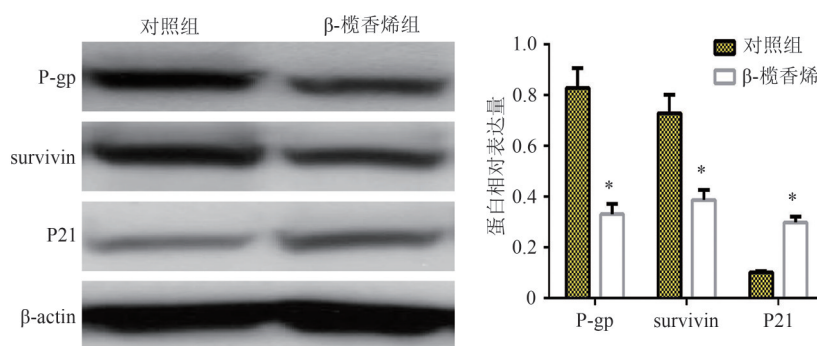


注:(A)流式细胞术检测细胞凋亡;(B)Western blotting检测凋亡相关蛋白 cleaved-caspase 3 和 cleaved-caspase 9 的表达。与对照组比较, * $P<0.05$ 。

Note: (A) Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of cells; (B) Western blotting was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins cleaved-caspase 3 and cleaved-caspase 9. Compared with the control group, * $P<0.05$.

图4 β-榄香烯促进 A549/DDP 细胞凋亡

Fig. 4 β-elemene promoted apoptosis of A549/DDP cells



注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

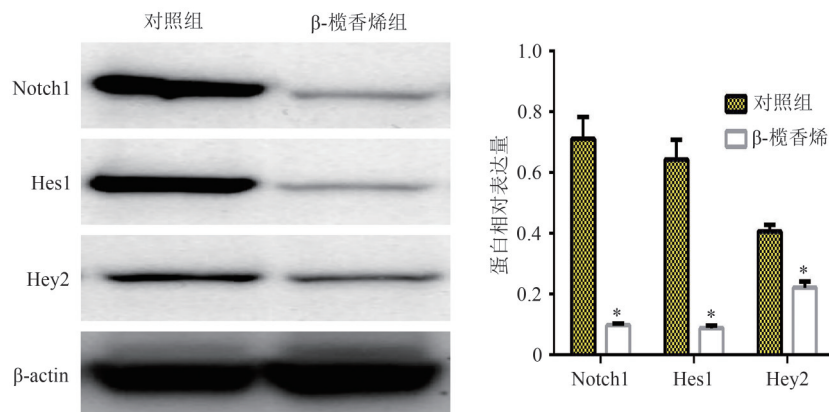
Note: compared with the control group, * $P<0.05$

图5 β-榄香烯调节 A549/DDP 细胞耐药相关蛋白表达

Fig. 5 β-elemene regulated the expressions of drug resistance-related proteins in A549/DDP cells

stem cells, CSCs), 促进细胞发生上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT), CSCs 或发生 EMT 的细胞通常具有耐药性^[16]。但 Notch 信号通路与肺腺癌的相关性目前未见报道。P-gp 是

一种位于细胞膜、依赖 ATP 的药物外排泵, 主要作用是将细胞内的药物泵出细胞外, 降低细胞内药物浓度, 导致细胞产生耐药性^[17]。survivin 是一种凋亡抑制因子, 其高表达可促进肿瘤细胞耐药。p21 在

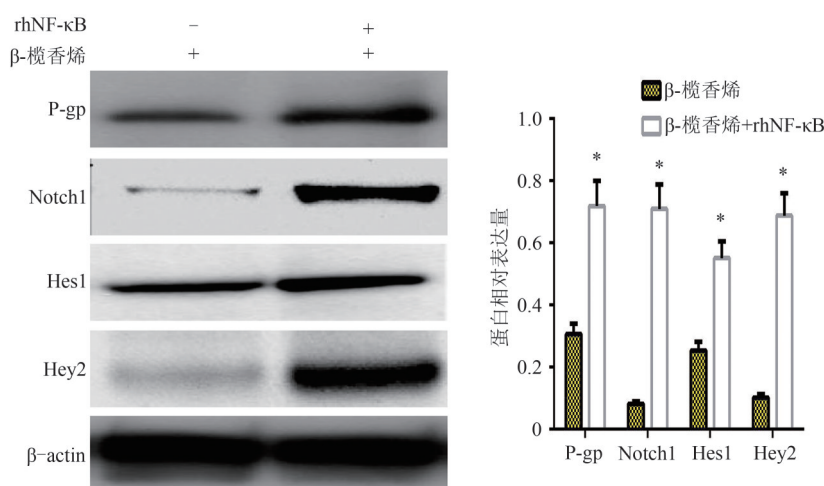


注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: compared with the control group, * $P < 0.05$

图 6 β-榄香烯抑制 A549/DDP 细胞 Notch 信号通路激活

Fig. 6 β-elemene inhibited the activation of Notch signaling pathway in A549/DDP cells



注:与 β-榄香烯组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: compared with β-elemene group, * $P < 0.05$.

图 7 β-榄香烯+Notch 信号通路激活剂对耐药蛋白表达和 Notch 信号通路蛋白的影响

Fig. 7 Effects of β-elemene + rhNF-κB on the expression of resistant protein and Notch signal pathway protein

表 1 不同浓度 DDP 处理后 β-榄香烯组和 β-榄香烯+rhNF-κB 组 A549/DDP 细胞的增殖率比较

Tab. 1 Proliferation rates of A549/DDP cells in β-elemene group and β-elemene + rhNF-κB group after treated with different concentrations of DDP

DDP / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	β-榄香烯组	β-榄香烯+ rhNF-κB 组
0.25	87.73±2.09	92.24±4.03
0.5	76.61±2.45	86.87±3.32
1	66.21±2.28	82.45±3.54
2	60.17±2.54	74.76±3.63
4	50.45±2.08	68.35±2.12
8	38.82±1.78	61.56±3.08
16	26.63±1.56	50.02±3.13
32	10.06±0.76	23.13±1.22

细胞周期 G_1/S 限定点发挥重要调控作用,化疗药物可通过激活 p21 使细胞停滞于 G_1/S 期,下调 p21 表达可增强肿瘤细胞的化疗耐药性。

本研究发现, A549/DDP 细胞对 DDP 具有耐药性,不同浓度 β-榄香烯对 A549/DDP 细胞均有一定的抑制作用,但浓度低于 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时无细胞毒性。 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β-榄香烯处理 24 h 可逆转 A549/DDP 细胞的 DDP 耐药并促进其凋亡,影响耐药基因的表达,抑制 Notch 信号通路。目前普遍认为,化疗耐药的产生与细胞膜上 P-gp 的高表达密切相关,因此,下调 P-gp 表达可显著逆转细胞耐药。为了进一步探索 β-榄香烯逆转肺腺癌耐药的机制,对经 β-榄香烯处理的 A549/DDP 细胞应用 Notch 信号通路激

活剂,重新上调耐药蛋白的表达和激活 Notch 信号通路,结果显示, β -榄香烯+ rhNF- κ B 组 A549/DDP 细胞 DDP 的 IC₅₀ 显著高于 β -榄香烯组, P-gp、Notch1、Hes1、Hey2 蛋白表达水平较 β -榄香烯组显著升高,证实 β -榄香烯可通过 Notch 信号通路逆转肺腺癌耐药。线粒体是细胞凋亡控制中心,而线粒体损伤导致的膜电位下降是细胞启动凋亡的特征性标志之一。 β -榄香烯可通过损伤线粒体膜使其膜电位下降,从而促进细胞凋亡^[17-18]。研究表明, β -榄香烯也可通过增加化疗药物在细胞内的浓度、下调肿瘤细胞膜上 P-gp 的表达而逆转化疗耐药^[15]。Notch 信号通路参与了多种恶性肿瘤的耐药,如通过调控人肝癌细胞系中 p53 的表达和 DNA 损伤上调 Notch-3 表达可导致阿霉素耐药,通过调节 Notch-1 信号通路可显著改善阿霉素和马法兰对骨髓瘤的细胞毒性^[19-20]。

综上所述, β -榄香烯可抑制 A549/DDP 细胞的 Notch 信号通路,逆转细胞耐药并促进细胞凋亡。但本研究仍然存在一定的局限性, β -榄香烯通过 Notch 信号通路逆转肺腺癌耐药的具体作用机制以及其他可能参与的信号通路仍需进一步探索。

参考文献

- [1] 高冬青,王家林. 肺癌危险因素研究现状[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(21): 1657-1662. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2019.21.15.
- [2] 中华医学会,中华医学学会肿瘤学分会,中华医学学会杂志社. 中华医学会肺癌临床诊疗指南(2018 版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(12): 935-964. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.12.012.
- [3] 曾庆鹏,赵峻. 基于国际新分类肺腺癌亚型的临床研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(5): 387-393. DOI: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.05.B001.
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21387.
- [5] 张珊珊,苏飞,但慧敏,等. 小细胞肺癌综合治疗的研究进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(23): 2744-2748. DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2019.17.23.03.
- [6] DASARI S, TCHOUNWOU P B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 364-378. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [7] ZHANG K, WANG X, WANG H Y. Effect and mechanism of Src tyrosine kinase inhibitor sunitinib on the drug-resistance reversal of human A549/DDP cisplatin-resistant lung cancer cell line [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(10): 2065-2072. DOI: 10.3892/mmr.2014.2440. Epub 2014 Aug 4.
- [8] MAO Y, ZHANG J, HOU L, et al. The effect of beta-elemene on alpha-tubulin polymerization in human hepatoma HepG2 cells [J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(6): 770-776. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2013.12.12.
- [9] POLITI K, FEIRT N, KITAJEWSKI J. Notch in mammary gland development and breast cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(5): 341-347. DOI: 10.1016/j.semcancer.2004.04.013.
- [10] RANGARAJAN A, SYAL S, SELVARAJAH O, et al. Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt [J]. Virology, 2001, 286(1): 23-30. DOI: 10.1006/viro.2001.0867.
- [11] GIRARD L, RODRIGUEZ-CANALES J, BEHRENS C, et al. An expression signature as an aid to the histologic classification of non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(19): 4880-4889.
- [12] MASTERS G A, TEMIN S, AZZOLI C G, et al. Systemic therapy for stage IV non-small-cell lung cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline update [J]. J Clin Oncol, 2017, 33(1): 3488-3515.
- [13] 梁雨辰. β -榄香烯对放疗肺癌细胞培养基诱导的 HUVEC 细胞作用研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2019.
- [14] 晋亚楠,杜喜维,杨瑞霞. β -榄香烯注射液联合甲磺酸阿帕替尼对乳腺癌细胞生长抑制作用的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 11(20): 2146-2150.
- [15] 姚成才. β -榄香烯逆转人肺腺癌 A549/DDP 细胞株的耐药性及可能机制的初步探讨[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
- [16] JANGHORBAN M, XIN L, ROSEN J M, et al. Notch signaling as a regulator of the tumor immune response: to target or not to target? [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1649. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01649.
- [17] ALLER S G, YU J, WARD A, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding [J]. Science, 2009, 323(5922): 1718-1722. DOI: 10.1126/science.1168750.
- [18] TAN G, WANG Z, CHE L, et al. Immunotherapeutic effects on murine pancreatic carcinoma by β -elemene combined with dendritic cells modified with genes encoding interleukin-23 [J]. Front Med China, 2007, 1(1): 41-45. DOI: 10.1007/s11684-007-0008-4.
- [19] BAO H Y, WANG Y, WANG J N, et al. Clinical significance of S100A6 and Notch1 in multiple myeloma patients [J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2017, 38(4): 285-289. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.04.005.
- [20] HE S, WANG G, NI J, et al. MicroRNA-511 inhibits cellular proliferation and invasion in colorectal cancer by directly targeting hepatoma-derived growth factor [J]. Oncol Res, 2018, 26(9): 1355-1363. DOI: 10.3727/096504018x15154094331876.

收稿日期: 2020-04-10 校稿: 王娟 李征

本文引用格式: 濮忠建,顾小侠,张静知,等. 基于 Notch 信号通路探讨 β -榄香烯逆转肺腺癌耐药机制的研究[J]. 肿瘤药学, 2022, 12(1): 53-59. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.08.

Cite this article as: PU Zhongjian, GU Xiaoxia, ZHANG Jingzhi, et al. Study on the mechanism of β -elemene reversing drug resistance of lung adenocarcinoma based on Notch signaling pathway[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2022, 12(1): 53-59. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.08.