

Amorphigenin联合顺铂对人肺腺癌A549/DDP细胞的协同抗肿瘤作用

钟红珍 左瑜芳 巫鑫 彭艳 何会萍 杨俊 官成浓 徐祖敏

【摘要】背景与目的 Amorphigenin是从紫穗槐属植物的种子中分离提取的鱼藤酮类化合物,研究发现amorphigenin对多种肿瘤细胞具有增殖抑制作用。本研究拟探讨amorphigenin对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的抗肿瘤作用及其可能的分子机制。方法 采用CCK-8法测定A549/DDP细胞的增殖;克隆形成实验测定A549/DDP细胞的克隆形成;流式细胞术检测细胞的凋亡率;Western blot技术检测caspase-3、PARP和LRP蛋白的表达。结果 Amorphigenin可抑制A549/DDP细胞的增殖48 h [半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)]为(2.19±0.92) μmol/L、抑制克隆形成及诱导细胞凋亡。此外,Amorphigenin与顺铂联合可协同地抑制A549/DDP细胞生长和促进凋亡;降低耐药蛋白LRP蛋白的表达。结论 Amorphigenin可抑制A549/DDP细胞增殖和促进细胞凋亡;amorphigenin可能是通过抑制耐药蛋白LRP蛋白表达,进而与顺铂对A549/DDP细胞产生协同抑制作用。

【关键词】 Amorphigenin; 顺铂; 肺腺癌; 凋亡; 抗肿瘤作用

Synergistic Antitumor Effect of Amorphigenin Combined with Cisplatin in Human Lung Adenocarcinoma A549/DDP Cells

Hongzhen ZHONG¹, Yufang ZUO¹, Xin WU², Yan PENG¹, Huiping HE¹, Jun YANG¹, Chengnong GUAN¹, Zumin XU¹

¹Cancer Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China; ²Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China

Corresponding author: Zumin XU, E-mail: zuminxu@163.com

【Abstract】 Background and objective Amorphigenin, a rotenoid compounds, from seeds of *Amorpha fruticosa*, has been shown to possess anti-proliferation activities in several cancer cells. To explore the antitumor effects of amorphigenin on cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cells and explore the underlying mechanisms. **Methods** CCK-8 assay was used to measure the proliferation of A549/DDP cells; Colony formation assay was used to measure the colony formation of A549/DDP cells; Flow cytometry assay was used to detect the apoptosis rates; Western blot analysis was used to explore the expression of apoptosis-related proteins (caspase-3 protein, PARP protein) and lung resistance protein (LRP). **Results** Our results demonstrated that amorphigenin could inhibit the proliferation of A549/DDP cells with a inhibition concentration of 50% cell growth (IC₅₀) at 48 h of (2.19±0.92) μmol/L. Amorphigenin could inhibit the colony formation ability and induce apoptosis of A549/DDP cells; Furthermore, amorphigenin combined with cisplatin showed synergistic proliferation-inhibitory effect and apoptosis-promoting effect in A549/DDP cells; reduced the expression of LRP of A549/DDP cells. **Conclusion** Amorphigenin remarkably inhibits the proliferation and induces apoptosis in A549/DDP cells. Combination of amorphigenin with cisplatin had the synergistic inhibitory effect on A549/DDP cells by downregulating the expression of LRP.

【Key words】 Amorphigenin; Cisplatin; Lung adenocarcinoma; Apoptosis; Antitumor effect

This study was supported by the grants from the National Nature Science Foundation of China (to Zumin XU)(No.81201736) and the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (to Chengnong GUAN)(No.2010B031600289).

本研究受国家自然科学基金(No.81201736)和广东省科技计划项目(No.2010B031600289)资助

作者单位: 524000 湛江, 广东医科大学附属肿瘤医院肿瘤中心(钟红珍, 左瑜芳, 彭艳, 何会萍, 杨俊, 官成浓); 524000 湛江, 广东医科大学天然药物研究与开发重点实验室(巫鑫)(通讯作者: 徐祖敏, E-mail: zuminxu@163.com)

目前肺癌发病率、死亡率居首位^[1]。临床上通常将肺癌分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌, 非小细胞肺癌占85%^[2]。而肺癌的化学治疗主要采用顺铂联合吉西他滨、紫杉醇等当中的一种^[3]。虽然化疗在肺癌的治疗中取得了一定的进展, 但5年总生存率仍较差, 低于16%^[4]。顺

铂耐药是影响肺癌化疗疗效的重要因素之一。因此,克服肺癌对顺铂的耐药具有重要的意义。Amorphigenin是从紫穗槐的种子中提取得到的一种鱼藤酮类化合物^[5]。研究^[6-8]发现amorphigenin有多种生物活性,如抗增殖作用、护肝作用、抑制神经氨酸酶的作用及抑制肺癌、结肠癌、黑色素瘤、口腔癌,白血病、前列腺癌、乳腺癌等细胞的生长。虽然amorphigenin可抑制人肺腺癌细胞A549^[7]和人肺癌细胞Lu-1^[8]的生长,但amorphigenin对耐顺铂肺腺癌A549/DDP细胞的作用及抗肿瘤作用的机制目前在国内外尚未见报道。本研究的目的是研究amorphigenin对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的抗肿瘤作用并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Amorphigenin由广东医科大学天然药物研究与开发重点实验室提供,纯度>95%^[5]。顺铂购于江苏豪森药业股份有限公司,二甲亚砜(DMSO)从美国MP Biomedicals LLC公司购买,RPMI-1640培养基、胎牛血清(FBS)购买于美国Gibco公司,胰酶购于吉诺生物医药技术有限公司,碘化丙锭(PI)和FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒购于美国BD公司,兔抗人PARP、caspase-3、LRP抗体购买于Sigma公司。辣根酶标记的山羊抗兔IgG、鼠抗人GAPDH多克隆抗体均购买于碧云天公司。Amorphigenin用DMSO溶解,配制成50 μmol/L的储存液,-20℃冰箱贮存。实验前用RPMI-1640培养基稀释,将DMSO的终浓度控制在<0.1%。

1.2 细胞培养 人肺腺癌顺铂耐药细胞株A549/DDP和A549细胞由本实验室保存并常规传代培养,培养于含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)的RPMI-1640培养基中,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。细胞每2天-3天常规传代一次,所有实验的细胞均使用对数生长期的细胞。

1.3 CCK-8法测定细胞活力 取对数生长期的细胞,常规胰酶消化成单个细胞悬液,按5.0×10³个细胞/孔的密度接种于96孔板中,置于培养箱中孵育过夜后,分别加入终浓度为0.5 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L的amorphigenin或终浓度为2.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL的顺铂。于培养箱培养24 h、48 h后,弃去原来的培养液,然后每孔加入按说明书新配制的100 μL CCK-8试剂,再于培养箱孵育2 h后,用酶标仪于450 nm波长处测吸光值。按照下列公式

计算药物对细胞的存活率:存活率%=实验组吸光值/对照组吸光值×100,并计算48 h的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.4 克隆形成实验 取对数生长期的细胞,消化成单个细胞悬浮液,500个细胞/孔接种于6 cm培养皿中,待细胞生长稳定时,加入终浓度为0.062,5 μmol/L、0.125 μmol/L、0.25 μmol/L的amorphigenin,空白对照组加入等量的培养基。放置培养箱培养15 d,当形成肉眼可见的细胞克隆后终止培养,用PBS洗2次,再用甲醇固定,然后用结晶紫染色,洗净晾干,在显微镜下拍照计数。克隆形成率%=(实验组克隆数/对照组克隆数)×100%。

1.5 联合指数计算 我们使用Chou-Talalay方法研究药物组合的协同的可能性^[9]。取对数生长期的细胞,常规胰酶消化成单个细胞悬液,按5.0×10³个细胞/孔的密度接种于96孔板中,置于培养箱中孵育过夜后,除去原来的培养基;先用浓度为0.5 μmol/L、1 μmol/L的amorphigenin处理人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP 24 h后;再用浓度为2.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL的顺铂处理24 h;弃去原来的培养液,然后每孔加入按说明书新配制的100 μL CCK8试剂,再于培养箱孵育2 h后,用酶标仪于450 nm波长处测吸光值。按照下列公式计算细胞的存活率:存活率%=实验组吸光值/对照组吸光值×100。使用CompuSyn软件自动计算出两药的联合指数及描绘出两药等效图,在等效图中(D₁/Dx₁)为横坐标,(D₂/Dx₂)为纵坐标,D₁、D₂为两药合用产生x效应时两药各种所需的浓度,而Dx₁、Dx₂则为两药单独使用时产生x效应时两药各自的浓度;根据Chou-Talalay定理规定CI<1则两药联合为协同作用,CI=1则为相加作用,CI>1,则为拮抗^[10]。

1.6 细胞凋亡测定 取对数生长期的细胞,消化成单个细胞悬液,8×10³个细胞/孔,接种于6孔板,置于培养箱孵育过夜,加入终浓度为0.5 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L的amorphigenin,联合组amorphigenin浓度为0.5 μmol/L和顺铂浓度为10 μg/mL,处理48 h后,消化收集细胞,用PI和FITC Annexin V染色,以流式细胞术检测细胞凋亡率,未处理组细胞为对照组。

1.7 免疫印迹实验 取对数生长期的细胞,以2×10⁵个/孔的密度接种于6 cm培养皿中,孵育过夜后按以下方法加入药物:amorphigenin组(0.5 μmol/L)、顺铂组(10 μg/mL)、amorphigenin联合顺铂组,处理48 h后,提取细胞总蛋白,经BCA法测定蛋白浓度,取12 μg总蛋白上样,

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 再转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 加入一抗于4 °C冰箱孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1h, 洗膜后辣根过氧化物酶HRP-ECL发光显色法对膜进行显色曝光。

1.8 统计学方法 数据采用GraphPad Prism 5软件进行单因素方差分析或t检验, 所有数据均为3次独立实验结果, 以Mean±SD表示。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Amorphigenin对人肺腺癌细胞株A549及耐顺铂株A549/DDP的生长抑制作用 CCK-8结果显示顺铂能抑制

A549/DDP和A549细胞的生长, A549/DDP的48 h的IC₅₀为(16.91±1.60) μmol/L, 而A549的48 h的IC₅₀为(2.84±0.18) μmol/L, A549/DDP的耐药倍数约为9.7倍(图1A), 表明A549/DDP对顺铂具有明显的耐药性。此外, amorphigenin呈浓度依赖性地抑制耐顺铂株A549/DDP的生长(图1B), 其48 h的IC₅₀为(2.19±0.92) μmol/L。这些结果表明amorphigenin对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP有明显的增殖抑制作用。

2.2 Amorphigenin抑制人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的克隆形成 分别用0.062,5 μmol/L、0.125 μmol/L、0.25 μmol/L的amorphigenin处理人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP 15 d, 形成的克隆数目随浓度增加而逐渐减少(图2A)。统计学分析发现0.062,5 μmol/L、0.125 μmol/L、

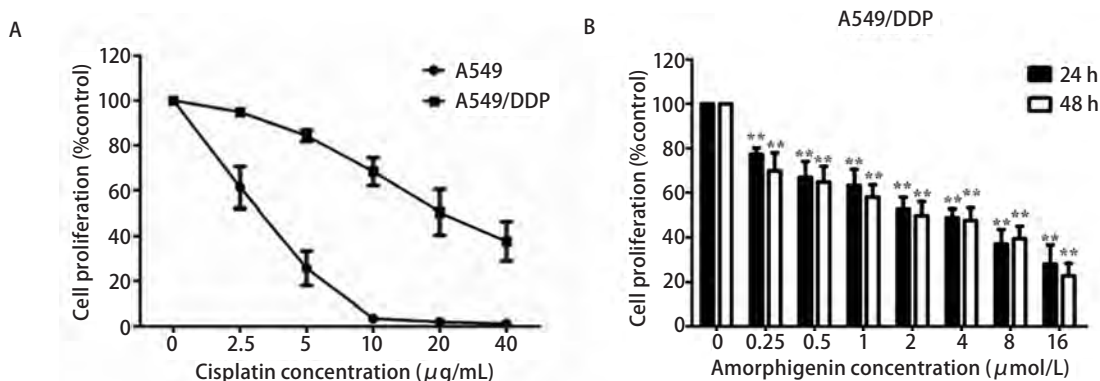


图1 Amorphigenin对肺腺癌耐顺铂细胞A549/DDP的增殖抑制作用。A: 不同浓度的顺铂作用于A549细胞和A549/DDP细胞48 h; B: Amorphigenin作用于A549/DDP细胞24 h或者48 h。**: P<0.01, 与对照组比较。

Fig 1 Amorphigenin could significantly inhibit the proliferation in cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cells. A: A549 and A549/DDP cells were treated with increasing concentrations of cisplatin for 48 h; B: A549/DDP was treated with increasing concentrations of amorphigenin for 24 h or 48 h. **: P<0.01, compared with the control group.

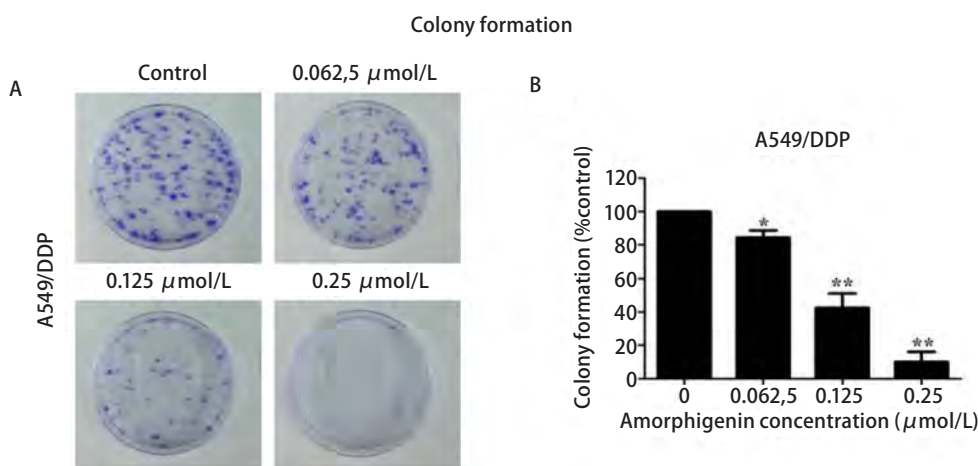


图2 Amorphigenin抑制肺腺癌耐顺铂细胞A549/DDP的克隆形成。A: 细胞培养15天后, 用结晶紫染色。B: 在显微镜下统计细胞克隆数目。*: P<0.05, **: P<0.01, 与对照组比较。

Fig 2 Amorphigenin inhibits the colony formation of cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cells. A: Colonies were stained with crystal violet at 15 days after culture; B: The number of colonies was counted under microscope. *: P<0.05, **: P<0.01, compared with the control group.

0.25 μmol/L的amorphigenin作用于A549/DDP细胞时, 克隆形成率分别为 (84.31±4.46) %、(42.49±8.65) %和 (9.94±5.89) % (图2B)。这提示amorphigenin能以浓度依赖方式抑制人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的克隆形成。

2.3 Amorphigenin诱导人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP凋亡 我们采用了流式细胞术检测了amorphigenin处理后A549/DDP细胞的凋亡率。用0.5 μmol/L-16 μmol/L浓度的amorphigenin处理人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP 48 h, 采用PI和FITC Annexin V双染法及流式细胞术检测了细胞的凋亡率, 结果显示amorphigenin呈浓度依赖性地诱导A549/DDP细胞的凋亡, 当amorphigenin浓度为0.5 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L时, 凋亡率分别为 (7.50±1.70) %、(9.20±0.56) %、(13.13±2.24) %、(13.7±4.62) %、(28.93±8.17) %和 (69.53±10.52) % (图3A, 图3B)。为了更进一步说明凋亡途径的激活可能与amorphigenin诱导的细胞凋亡有

关, 我们采用免疫印迹技术检测了凋亡相关蛋白PARP的表达。结果发现, 随着amorphigenin浓度的升高, PARP的蛋白表达水平逐渐减少, 而cleaved PARP的蛋白表达水平逐渐增加, 提示amorphigenin可能是通过激活PARP通路从而诱导人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP细胞凋亡 (图3C, 图3D)。这些结果证明了amorphigenin能诱导人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP凋亡。

2.4 Amorphigenin联合顺铂对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP具有协同的抗肿瘤作用 我们先用浓度为0.5 μmol/L、1 μmol/L的amorphigenin处理人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP 24 h后, 再用浓度为2.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL的顺铂处理24 h, 然后采用CCK-8法检测细胞的增殖变化。结果发现顺铂与0.5 μmol/L、1 μmol/L的amorphigenin联合处理后, 顺铂的24 h的IC₅₀分别为 (15.86±2.91) μg/mL、(5.18±1.94) μg/mL, 较单独应用顺铂时 (37.99±10.63) μg/mL明显降低 (图4)。这表明amorphigenin能增强顺铂对人肺腺癌

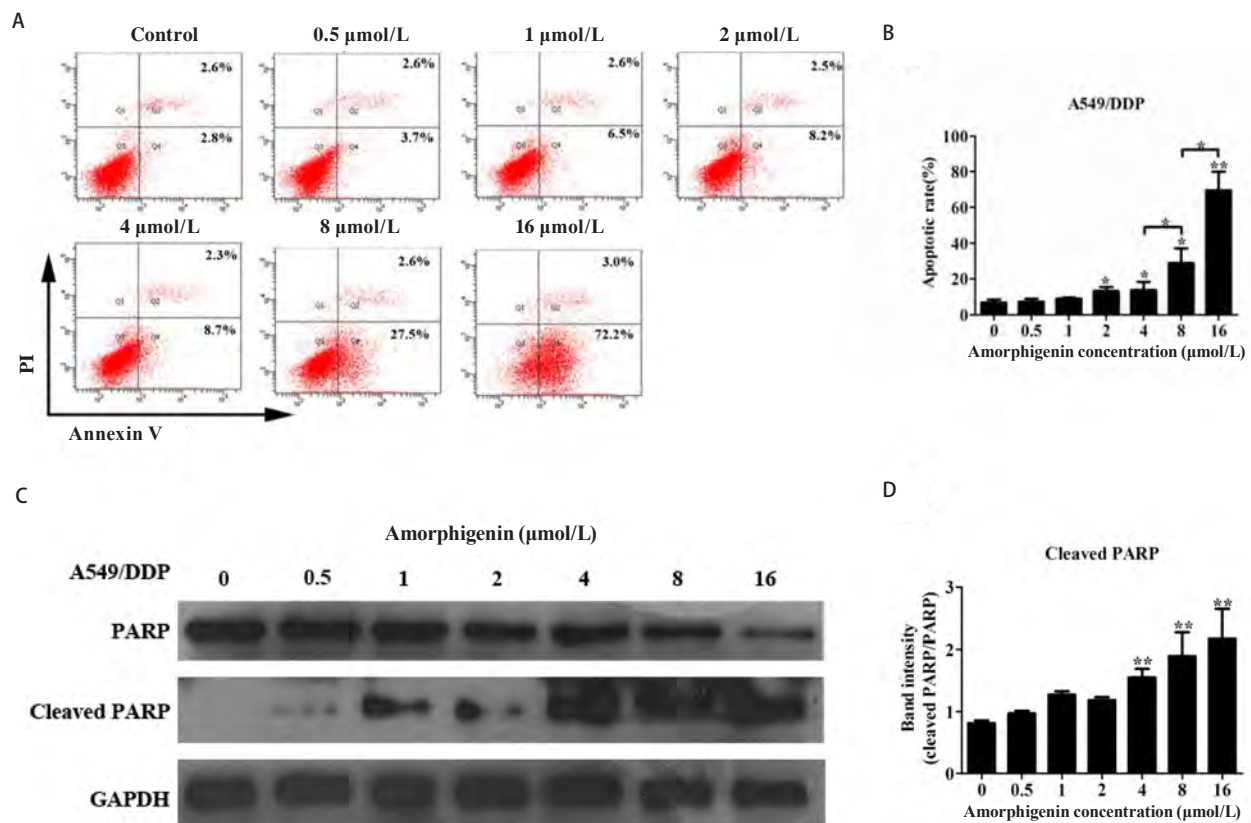


图3 Amorphigenin诱导肺腺癌细胞株A549/DDP凋亡。A、B: Amorphigenin处理A549/DDP细胞48 h; C、D: Amorphigenin对PARP和cleaved PARP蛋白的影响。*: P<0.05, **: P<0.01, 与对照组比较。

Fig 3 Amorphigenin could induce apoptosis in A549/DDP cells. A and B: A549/DDP cells were treated with increasing concentrations of amorphigenin for 48 h; C and D: The levels of PARP and cleaved PARP. *: P<0.05, **: P<0.01, compared with the control group.

耐顺铂细胞株A549/DDP的生长抑制作用。且根据等效线图分析示: Amorphigenin和顺铂10个组合浓度中, 9个组合的浓度的CI<1, 1个组合浓度CI>1; 具体CI值: 当浓度为0.50 μmol/L的amorphigenin联合2.5 μg/mL的顺铂时CI为1.31, 提示拮抗作用; 0.50 μmol/L的amorphigenin联合5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL的顺铂时CI分别为0.97、0.77、0.75、0.82, 提示是协同作用; 同样浓度为1.00 μmol/L的amorphigenin联合5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL的顺铂时CI分别为0.60、0.52、0.58、0.60、0.66, 提示是协同作用(图5A, 图5B)。这提示两药联合呈协同作用。

2.5 Amorphigenin增强顺铂对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的凋亡作用 我们采用流式细胞术测定了两药

联合时对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP凋亡的作用, 单用amorphigenin时凋亡率为(10.40±1.77)%, 单用顺铂时凋亡率为(43.90±6.22)%, 两药联合时凋亡率则达到(75.27±8.29)%(图6A, 图6B)。此外我们还采用了免疫印迹技术检测caspase-3、PARP蛋白表达。结果发现, amorphigenin联合顺铂与单用amorphigenin或顺铂相比, pro-caspase-3、PARP的蛋白表达明显减少, cleaved PARP和cleaved caspase-3的蛋白表达明显增加(图6C-图6F)。总之, amorphigenin增强顺铂对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的凋亡作用。

2.6 Amorphigenin降低LRP蛋白的表达 分别用amorphigenin, 顺铂或amorphigenin联合顺铂处理A549/DDP细胞48 h, 采用免疫印迹技术检测LRP蛋白的表

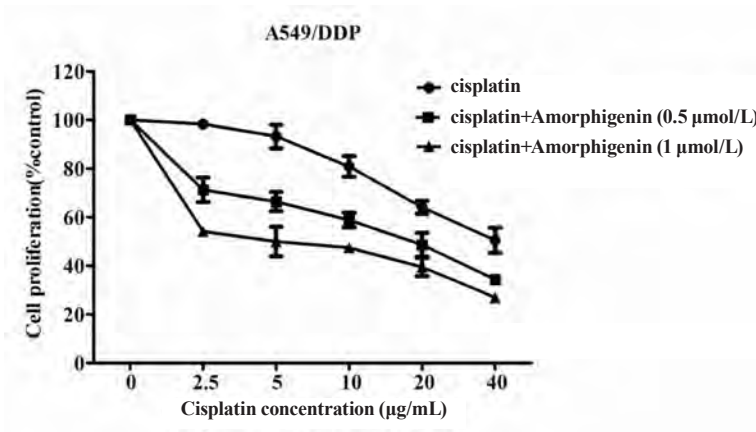


图4 Amorphigenin联合顺铂增强对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的增殖抑制作用
Fig 4 Combination of amorphigenin with cisplatin enhances the inhibition effects on cisplatin-resistant lung cancer cells

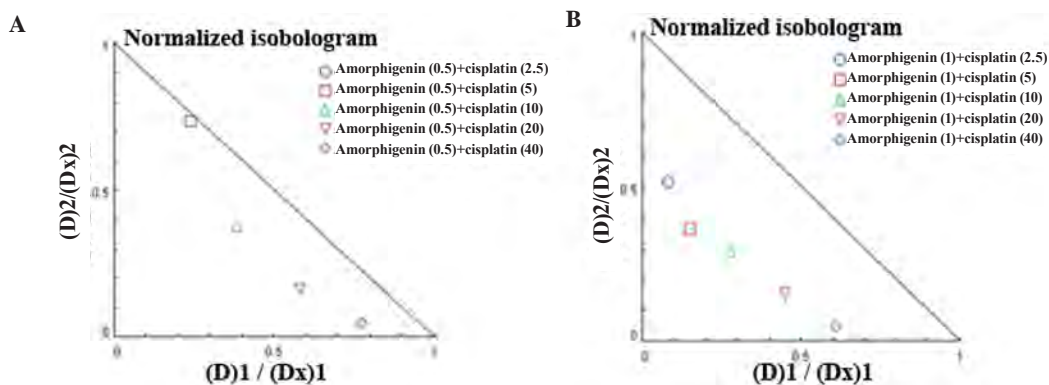


图5 Amorphigenin联合顺铂对人肺腺癌A549/DDP细胞的协同抗肿瘤作用。浓度为0.5 μmol/L (A) 和1 μmol/L (B) 的amorphigenin联合浓度为2.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL的顺铂的CI值。根据Chou-Talalay定理规定CI<1则两药联合为协同作用, CI=1则为相加作用, CI>1, 则为拮抗。
Fig 5 Synergistic antitumor effect of amorphigenin combined with cisplatin in human lung adenocarcinoma cell A549/DDP. CI values for amorphigenin at 0.5 μmol/L (A) and 1 μmol/L (B) in combination with 2.5 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20 μg/mL, 40 μg/mL cisplatin against A549/DDP cells. CI is a quantitative definition for synergism where CI<1, additive effect where CI=1 and antagonism where CI>1.

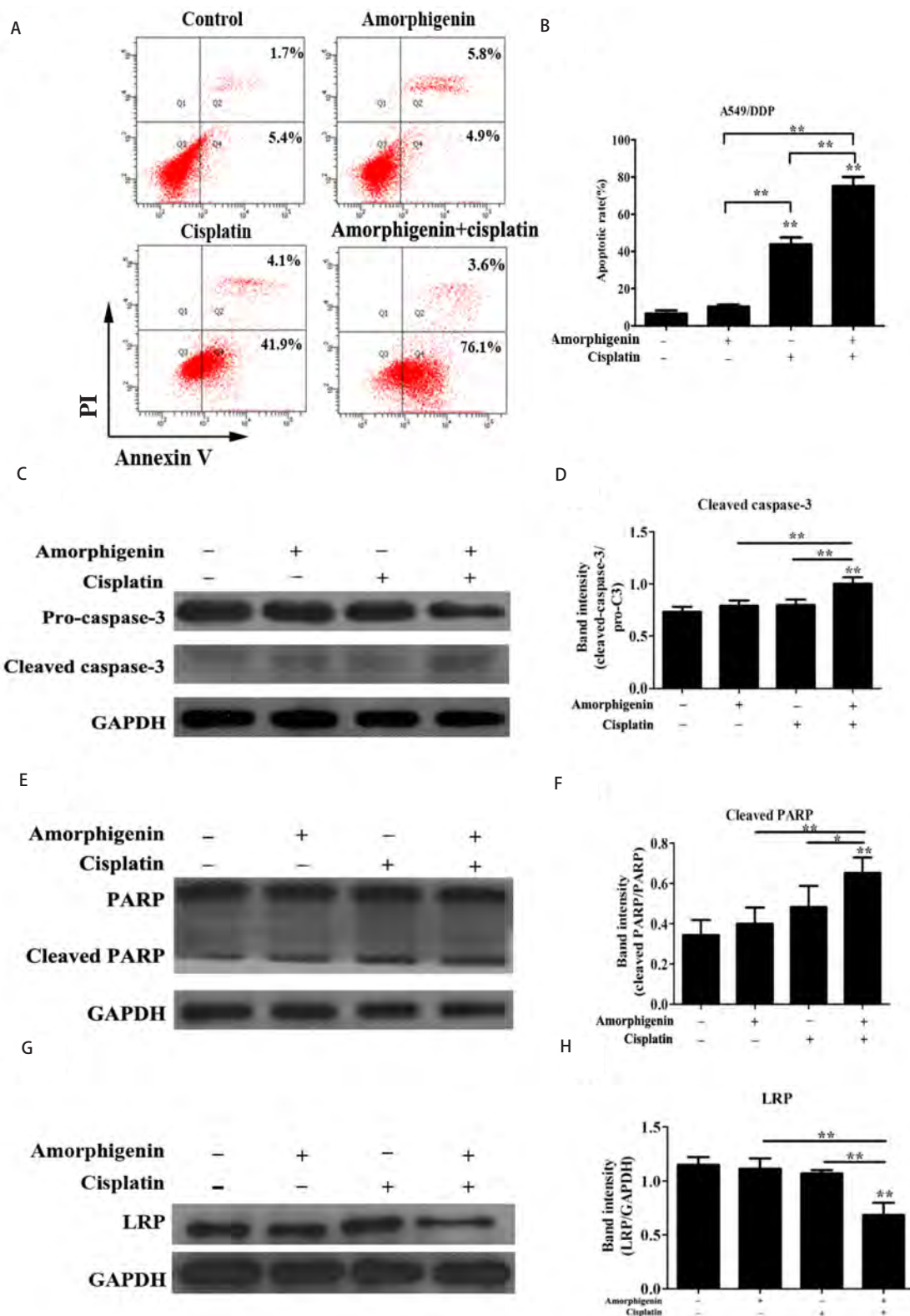


图6 Amorphigenin增强顺铂对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的凋亡作用。A、B：分别用amorphigenin或/和顺铂处理A549/DDP细胞48 h；C、E和G：Caspase-3、PARP和LRP的Western blot检测结果；D、F和H：Caspase-3、PARP和LRP含量变化的柱状分析图。*：P<0.05，**：P<0.01，与对照组比较。

Fig 6 Combination of amorphigenin with cisplatin enhances the antitumor effects on A549/DDP cells. A and B: A549/DDP cells were treated with amorphigenin or cisplatin alone or combined with amorphigenin (0.5 μmol/L) and cisplatin (10 μg/mL) for 48 h; C, E and G: The expression of caspase-3, PARP and LRP detected by Western blot; D, F and H: The densitometric analysis of caspase-3, PARP and LRP. **: P<0.01, compared with the control group.

达。我们的结果发现, amorphigenin联合顺铂与单用amorphigenin或顺铂相比, LRP蛋白的表达明显减少, 而单用顺铂组或amorphigenin组与对照组比较相差不大(图6G和图6H)。这提示了amorphigenin通过下调LRP蛋白的表达联合顺铂对肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的协同抗肿瘤作用。

3 讨论

Amorphigenin是一种鱼藤酮类化合物糖苷类紫穗槐苷的糖基苷元, 早期的研究^[11-13]发现其具有抑制破骨细胞的分化和溶解、保护肝脏、抑制细菌神经氨酸苷酶的作用。进一步的研究发现, amorphigenin可抑制多种肿瘤细胞的增殖作用, 如肺腺癌细胞A549、人结肠癌细胞HCT-8、黑色素瘤细胞RPMI-7951、人乙酰胆碱受体细胞TE671、人口腔表皮样癌细胞KB、鼠白血病细胞P388, 它们的半数有效量(50% effective dose, ED₅₀)分别为0.05 μg/mL、0.03 μg/mL、0.05 μg/mL、<0.01 μg/mL、0.04 μg/mL、0.04 μg/mL^[7]。人肺癌细胞Lu-1、人激素依赖型前列腺癌细胞LNCaP、人乳腺癌细胞MCF-7, 其ED₅₀分别为4.8 μg/mL、7.9 μg/mL和>20 μg/mL^[8]。而我们的研究首次发现amorphigenin以浓度依赖性方式抑制人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP细胞的生长, 其48 h的IC₅₀为(2.19±0.92) μmol/L, 并且诱导A549/DDP细胞凋亡。进一步研究的发现amorphigenin诱导人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP细胞凋亡的机制可能是通过激活PARP途径。

为了明确amorphigenin能否联合顺铂对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP有协同的抗肿瘤作用。结果发现顺铂与amorphigenin联合处理后, amorphigenin能显著增强顺铂对A549/DDP的生长抑制作用, 且amorphigenin能增加顺铂对人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的凋亡率。进一步的研究发现, 与amorphigenin或顺铂处理组相比, amorphigenin联合顺铂组pro-caspase-3、PARP蛋白的表达明显降低, 而cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达明显增加, 提示amorphigenin可能通过激活caspase-3、PARP蛋白从而诱导细胞凋亡。

目前的研究认为肺癌顺铂耐药机制主要是以下几个方面: ①细胞内药物浓度下降; ②细胞解毒功能增强; ③DNA损伤修复功能异常; ④逃避细胞凋亡^[14]。细胞内药物浓度下降主要与药物耐药蛋白相关; 一些报道的耐药蛋白有肺耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)、

多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP); 此外, 切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-completion 1, ERCC1)与顺铂的耐药也密切相关。MRP, 是一个ATP依赖的膜运输蛋白, 当抗肿瘤药物进入肿瘤细胞时, MRP使用ATP水解的能量把药物泵出细胞, 从而减少细胞内的药物浓度增加药物的耐药性。LRP又叫主穹窿蛋白, 主要参与细胞内毒性药物的分布而增加耐药, 多项研究^[15,16]表明肺LRP的高表达会导致对顺铂的耐药。ERCC1、DNA修复核酸内切酶, 具有5' DNA核酸内切酶活性, 在DNA切除修复过程中能够识别和清除铂类药物诱导的DNA络合物, 从而导致对顺铂的耐药。BCRP, 属于ABC膜转运蛋白超家族成员, 也是依赖ATP将化疗药物泵出细胞, 降低细胞内药物浓度, 从而增加药物的耐药性^[17]。Gyemant等^[18]研究发现amorphigenin通过降低MDR的表达水平来抑制多药耐药的人乳腺癌细胞HTB-26和多药耐药的小鼠淋巴瘤细胞L5178Y的细胞增殖, 并且amorphigenin联合表柔比星对多药耐药的小鼠淋巴瘤细胞L5178Y有协同的抗肿瘤作用。而amorphigenin对其他肿瘤的作用机制目前国内外均未见报道。但我们的研究首次发现amorphigenin通过降低LRP蛋白表达的水平来抑制人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的生长, 并且amorphigenin联合顺铂对A549/DDP细胞有协同的抗肿瘤作用。本研究我们发现amorphigenin可通过诱导凋亡抑制A549/DDP细胞增殖及增强顺铂对A549/DDP细胞的生长抑制作用。且amorphigenin可通过下调LRP蛋白表达的水平来抑制人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的生长。然而, amorphigenin能否通过影响其他耐药蛋白和/或DNA损伤修复等信号通路, 仍需进一步的探索。

总之, 本研究发现amorphigenin可通过诱导细胞凋亡抑制人肺腺癌耐顺铂细胞株A549/DDP的生长。Amorphigenin可能是通过抑制耐药蛋白LRP蛋白表达, 进而与顺铂对A549/DDP细胞产生协同抗肿瘤作用, 这为amorphigenin用于顺铂耐药肺癌的治疗提供了科学依据及理论基础。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- 2 Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. Mayo Clin Proc, 2008, 83(5): 584-594.

- 3 Wang Y, Chen L, Huang G, *et al.* Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57391.
 - 4 Jia Y, Zang A, Jiao S, *et al.* The interleukin-18 gene promoter-607 A/C polymorphism contributes to non-small-cell lung cancer risk in a Chinese population. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 1715-1719.
 - 5 Wu X, Liao H, Wu K, *et al.* Chemical constituents from the seeds of *Amorpha fruticosa* and their chemotaxonomic significance. *OALib*, 2016, 3(7): 1-7.
 - 6 Ji M, Liang Y, Gu Z, *et al.* Inhibitory effects of amorphenin on the mitochondrial complex I of *Culex pipiens pallens* coquillett (Diptera: Culicidae). *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 19713-19727.
 - 7 Li L, Wang HK, Chang JJ, *et al.* Antitumor agents, 138. Rotenoids and isoflavones as cytotoxic constituents from *Amorpha fruticosa*. *J Nat Prod*, 1993, 56(5): 690-698.
 - 8 Chin YW, Mdee LK, Mbwanbo ZH, *et al.* Prenylated flavonoids from the root bark of *Berchemia discolor*, a Tanzanian medicinal plant. *J Nat Prod*, 2006, 69(11): 1649-1652.
 - 9 Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
 - 10 Zhang N, Fu JN, Chou TC. Synergistic combination of microtubule targeting anticancer fludellone with cytoprotective panaxytriol derived from *Panax ginseng* against MX-1 cells *in vitro*: experimental design and data analysis using the combination index method. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(1): 97-104.
 - 11 Kim BG, Kwak HB, Choi E, *et al.* Amorphigenin inhibits Osteoclast differentiation by suppressing c-Fos and nuclear factor of activated T cells. *Anatomy Cell Biol*, 2010, 43(4): 310.
 - 12 Kloutek E, Popov A, Drenska D, *et al.* Experimental research on the hepatoprotective activity of flavonoids isolated from *Amorpha fruticosa*. *Eksp Med Morfol*, 1985, 24(2): 50-54.
 - 13 Kim YS, Ryu YB, Curtis-Long MJ, *et al.* Flavanones and rotenoids from the roots of *Amorpha fruticosa* L. that inhibit bacterial neuraminidase. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(8): 1849-1856.
 - 14 Florea AM, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*, 2011, 3(1): 1351-1371.
 - 15 Zhang W, Zhou H, Yu Y, *et al.* Combination of gambogic acid with cisplatin enhances the antitumor effects on cisplatin-resistant lung cancer cells by downregulating MRP2 and LRP expression. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 3359-3368.
 - 16 Li K, Chen B, Xu L, *et al.* Reversal of multidrug resistance by cisplatin-loaded magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in A549/DDP lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Nanomed*, 2013, 8: 1867-1877.
 - 17 Bharthuar A, Saif UR, Black JD, *et al.* Breast cancer resistance protein (BCRP) and excision repair cross complement-1 (ERCC1) expression in esophageal cancers and response to cisplatin and irinotecan based chemotherapy. *J Gastrointest Oncol*, 2014, 5(4): 253-258.
 - 18 Gyemant N, Tanaka M, Antus S, *et al.* *In vitro* search for synergy between flavonoids and epirubicin on multidrug-resistant cancer cells. *In Vivo*, 2005, 19(2): 367-374.
- (收稿: 2016-07-02 修回: 2016-07-23 接受: 2016-07-25)
(本文编辑 南娟)



Cite this article as: Zhong HZ, Zuo YF, Wu X, *et al.* Synergistic Antitumor Effect of Amorphigenin Combined with Cisplatin in Human Lung Adenocarcinoma A549/DDP Cells. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2016, 19(12): 805-812. [钟红珍, 左瑜芳, 巫鑫, 等. Amorphigenin联合顺铂对人肺腺癌A549/DDP细胞的协同抗肿瘤作用. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(12): 805-812.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2016.12.02