

基于 p53 介导自噬通路探讨臭椿酮对顺铂耐药胃癌细胞株耐药性的影响

皇甫娟¹, 张强¹, 魏祯瑶¹, 马亭²

1. 焦作市人民医院 肿瘤科, 河南 焦作 454000

2. 郑州大学 生物实验室, 河南 郑州 450052

摘要:目的 探讨臭椿酮对顺铂(DDP)耐药胃癌细胞株 SGC-7901/DDP 耐药性的影响及其机制。方法 采用噻唑蓝(MTT)法检测不同质量浓度臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞活力的影响以筛选无毒作用浓度。将体外培养的 SGC-7901/DDP 细胞分为臭椿酮低浓度(0.2 mg/mL)+DDP(2 μg/mL)组、臭椿酮中浓度(0.4 mg/mL)+DDP(2 μg/mL)组、臭椿酮高浓度(0.8 mg/mL)+DDP(2 μg/mL)组考察臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞 DDP 敏感性的影响;将体外培养的 SGC-7901/DDP 细胞分为对照组、DDP(2 μg/mL)组、DDP(2 μg/mL)+Pifithrin-α(20 μmol/L)组、臭椿酮(0.8 mg/mL)+DDP 组、臭椿酮+DDP(2 μg/mL)+Pifithrin-α(20 μmol/L)组考察 p53 信号通路与药物作用的关系;采用 MTT 法检测 SGC-7901/DDP 细胞活力,流式细胞仪检测 SGC-7901/DDP 细胞凋亡率,免疫印迹法检测 SGC-7901/DDP 细胞中 LC3 II、LC3 I、Beclin1 和 p53 蛋白表达水平。**结果** 0.2、0.4、0.8 mg/mL 臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞未产生明显细胞毒性。与 DDP 组相比,臭椿酮低浓度+DDP 组、臭椿酮中浓度+DDP 组、臭椿酮高浓度+DDP 组细胞活力明显降低,凋亡率、LC3 II/LC3 I 值和 Beclin1、p53 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖性;而 DDP 组和对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);给予 Pifithrin-α 作用后的 DDP+Pifithrin-α 组和臭椿酮+DDP+Pifithrin-α 组细胞活力较相应对照 DDP 组、臭椿酮+DDP 组明显升高,而细胞凋亡率、LC3 II/LC3 I 值和 Beclin1、p53 蛋白表达水平较 DDP 组、臭椿酮+DDP 组明显降低($P < 0.05$)。**结论** 臭椿酮可通过 p53 通路诱导自噬逆转 SGC-7901/DDP 细胞对 DDP 的耐药性。

关键词: 胃癌; 顺铂; 臭椿酮; 耐药; 自噬; p53 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2021)06-1112-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.06.003

Effect of ailanthone on cisplatin-resistant gastric cancer cell line based on p53-mediated autophagy pathway

HUANG Fu-juan¹, ZHANG Qiang¹, WEI Zhen-yao¹, MA Ting²

1. Department of Oncology, Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo 454000, China

2. Biology Laboratory of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ailanthone (ATE) on the drug resistance of gastric cancer cell line SGC-7901/DDP to cisplatin and its mechanism. **Methods** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the effects of different concentrations of ATE on SGC-7901/DDP cell viability to screen the non-toxic concentration. SGC-7901/DDP cells cultured *in vitro* were divided into low concentration ATE (0.2 mg/mL ATE) + DDP (2 μg/mL cisplatin), medium concentration ATE (0.4 mg/mL ATE) + DDP group, high concentration ATE (0.8 mg/mL ATE) + DDP group to investigate the effect of ailanthone on DDP sensitivity of SGC-7901/DDP cells. SGC-7901/DDP cells cultured *in vitro* were divided into control group, DDP group, DDP+ Pifithrin-α (20 μmol/L Pifithrin-α), ATE (0.8 mg/mL ATE)+DDP group, ATE+DDP+ Pifithrin-α group to investigate the relationship between p53 signaling pathway and drug action. MTT assay was used to detect the viability of SGC-7901/DDP cells, flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of SGC-7901/DDP cells, Western blotting was used to detect the protein expression levels of LC3 II, LC3 I, Beclin1, and p53 in SGC-7901/DDP cells. **Results** 0.2, 0.4, and 0.8 mg/mL ATE had no cytotoxicity on SGC-7901/DDP cells. Compared with those in DDP group, the cell viability of low concentration ATE+DDP group, medium concentration ATE+DDP group and high concentration ATE+DDP group were significantly lower, the apoptosis rate, LC3 II/LC3 I value and Beclin1, p53 protein expression levels were

收稿日期: 2020-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81903770)

作者简介: 皇甫娟(1976—),女,副主任医师,本科,研究方向为肿瘤内科。E-mail: yww217218219@163.com

significantly higher ($P < 0.05$), and it was concentration dependent. There was no significant difference between DDP group and control group ($P > 0.05$), after treatment with Pifithrin- α , the cell viability of DDP+ Pifithrin- α group and ATE+DDP+Pifithrin- α group was significantly higher than that of DDP group and ATE+DDP group, the apoptosis rate, LC3 II/LC3 I value and Beclin1, p53 protein expression levels were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** ATE can induce autophagy and reverse cisplatin resistance of SGC-7901/DDP cells by p53 pathway.

Key words: gastric cancer; cisplatin; ailanthone; drug resistance; autophagy; p53 pathway

胃癌是全球致死的重要肿瘤之一,其发病率和死亡率在我国均位居第 2 位^[1];目前,以铂类为主的化学治疗(简称化疗)是胃癌中晚期患者治疗的重要手段,但耐药性的产生使化疗面临着严峻挑战^[2]。臭椿酮又名臭椿苦酮(ailanthone),是从苦木科臭椿属植物臭椿 *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle 根茎皮中提取的天然化合物,具有抗病毒、抗结核和抗肿瘤等药理活性^[3]。近年来,有研究发现,臭椿酮不仅具有抑制膀胱癌、白血病和前列腺癌细胞生长的作用,还可逆转肿瘤细胞对顺铂(DDP)、阿霉素和抗雄激素药物 MDV3100 等的耐药抵抗^[4-6];然而,臭椿酮在胃癌顺铂耐药方面的研究未见报道。自噬是细胞的自我防御机制,可通过正反双向调节作用参与肿瘤耐药^[7];p53 是一种抑癌基因,不仅可通过调控细胞增殖、凋亡等参与肿瘤发生发展,还可通过调控自噬参与肿瘤耐药^[8];而臭椿酮被证实具有调控 p53 表达的作用^[9]。故本研究观察臭椿酮对人胃癌细胞顺铂耐药株 SGC-7901/DDP 耐药性的影响,并从 p53 介导的自噬角度探讨其可能的作用机制,旨在为改善胃癌顺铂耐药抵抗提供新线索。

1 材料与方法

1.1 仪器、药品与试剂

FP-UVDI-CB-365 凝胶成像分析系统(上海辅光精密仪器有限公司),DNM-9602A 酶联免疫检测仪(上海圣科仪器设备有限公司),FACSCalibur 流式细胞仪(北京科誉兴业科技发展有限公司)。臭椿酮(质量分数 $\geq 98\%$,货号:PCS0233)购于成都植标化纯生物技术有限公司,p53 抑制剂 Pifithrin- α (货号:A12451)购于南京百鑫德诺生物科技有限公司,顺铂、噻唑蓝(MTT)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒、总蛋白提取试剂盒、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(货号:D8810、M8180、P1200、BC3790、CA1020)购于北京索莱宝科技有限公司,Beclin1、LC3、p53 抗体(货

号:3738、4108、9282)购于美国 Cell Signaling Technology。

1.2 细胞及其培养

人胃癌细胞顺铂耐药株 SGC-7901/DDP(货号:KG309)购于南京凯基生物科技发展有限公司;使用添加有 1%青链霉素双抗和 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在条件为 37 °C、5%二氧化碳细胞培养箱内常规培养,并在培养基内加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂维持耐药。每 48 小时更换新鲜培养基,待细胞铺满瓶底 85%左右时,以 0.25%胰蛋白酶消化,并按照 1:3 比例传代。实验所用 SGC-7901/DDP 细胞为生长良好的第 3~5 代对数生长期细胞。

1.3 MTT 实验

将对数生长期的 SGC-7901/DDP 细胞种植到 96 孔板上,调整细胞数为 2×10^4 个/mL,每孔总容积 200 μL ,常规培养贴壁后,根据实验进行不同分组处理,另外设不含细胞的培养基作为空白组,每个实验处理均设 3 个复孔,待处理 48 h 后,弃培养液并向每孔中加入 20 μL 工作质量浓度为 5 g/L MTT 试剂;孵育 4 h 后,弃上清液并加入 200 μL 二甲苯亚砷;震荡反应 10~15 min 后,采用酶联免疫检测仪在 570 nm 处检测 SGC-7901/DDP 细胞吸光度(A)值,计算细胞活力。实验重复 3 次。

细胞活力=(实验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)

1.3.1 臭椿酮无毒性浓度筛选实验 细胞按上述方法培养,加入终质量浓度分别为 0(对照)、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mg/mL 臭椿酮,处理 48 h,其他处理同上。

1.3.2 顺铂敏感性实验 细胞按上述方法培养,分为①对照组:加入等量培养基;②DDP 组:加入 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂^[10];③臭椿酮低质量浓度+DDP 组:加入 0.2 mg/mL 臭椿酮和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂;④臭椿酮中质量浓度+DDP 组:加入 0.4 mg/mL 臭椿酮和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂;⑤臭椿酮高质量浓度+DDP 组:加入 0.8 mg/mL 臭椿酮和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂。处理 48 h,其

他处理同上。

1.3.3 p53 通路作用实验 细胞按上述方法培养，分为①DDP 组：给予 2 μg/mL 顺铂；②DDP+Pifithrin-α 组：给予 2 μg/mL 顺铂和 20 μmol/L Pifithrin-α；③臭椿酮+DDP 组：给予 0.8 mg/mL 臭椿酮和 2 μg/mL 顺铂；④臭椿酮+DDP+Pifithrin-α 组：给予 0.8 mg/mL 臭椿酮、2 μg/mL 顺铂和 20 μmol/L Pifithrin-α。处理 48 h，其他处理同上。

1.4 流式细胞仪检测实验

将对数生长期 SGC-7901/DDP 细胞接种至 24 孔板上，调整细胞数为 5×10⁵/mL，常规培养贴壁后，根据实验要求进行相应处理 48 h；胰蛋白酶消化收集待检测 SGC-7901/DDP 细胞后，加入结合缓冲液 100 μL 重悬细胞；参照试剂盒说明书先后加入体积均为 5 μL 染色液 Annexin V-FITC 以及 PI，充分混匀后于避光条件下孵育 15 min；补加结合缓冲液 200 μL 后，1 h 内上机检测 SGC-7901/DDP 细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.5 免疫印迹法

收集待检测的 SGC-7901/DDP 细胞，参照总蛋白提取试剂盒说明抽提总蛋白后，考马斯亮蓝法检测蛋白质质量浓度；将变性后的蛋白样品上样至 SDS-PAGE 行电泳分离后，将蛋白样品采用半干法转至聚偏氟乙烯膜上；脱脂奶粉封闭 1 h 后，经 Beclin1 (1 : 2 000)、LC3 (1 : 1 000)、p53 (1 : 2 000)、β-actin (1 : 2 000) 特异性抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后，加入发光剂显影；β-actin 作为内参，凝胶成像分析系统扫描分析 SGC-7901/DDP 细胞中 Beclin1、LC3 和 p53 蛋白表达水平。实验重复 3 次。

1.6 数据分析方法

SGC-7901/DDP 细胞增殖率、凋亡率和 Beclin1、p53 蛋白表达水平以及 LC3 II/I 值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析，以单因素方差分析进行多组间比较，SNK-*q* 检验进行组内两两比较；当 *P* < 0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞的毒性作用

当 1.6 mg/mL 及其以上质量浓度臭椿酮作用 48 h 后 SGC-7901/DDP 细胞活力较 0 mg/mL (对照) 明显降低 (*P* < 0.001)，而 0.2、0.4、0.8 mg/mL 臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞活力无明显影响，未产生明显细胞毒性。故后期以 0.2、0.4、0.8 mg/mL

作为臭椿酮低、中、高质量浓度进行实验。见表 1。

2.2 臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞顺铂敏感性的影响

与对照组相比，DDP 组细胞活力差异无统计学意义 (*P* > 0.05)，但臭椿酮低质量浓度+DDP 组、臭椿酮中质量浓度+DDP 组和臭椿酮高质量浓度+DDP 组细胞活力较 DDP 组明显降低 (*P* < 0.001)，且随臭椿酮质量浓度的升高而降低；其中，臭椿酮低质量浓度+DDP 组、臭椿酮中质量浓度+DDP 组和臭椿酮高质量浓度+DDP 组细胞活力抑制率分别为 (16.25±1.17)%、(25.16±2.25)%、(34.72±2.64)%，相对于 DDP 组 (1.44±1.52)% 的逆转倍数分别为 11.28、17.47、24.11。见表 2。

表 1 臭椿酮作用 48 h 后 SGC-7901/DDP 细胞活力变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Changes of SGC-7901/DDP cell viability after treated with ailanthone for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ /(mg·mL ⁻¹)	细胞活力/%
对照	—	100.00±0.00
臭椿酮	0.2	99.86±6.15
	0.4	97.55±5.28
	0.8	95.36±5.32
	1.6	91.57±4.50***
	3.2	82.36±3.65***
	6.4	60.25±4.02***

与对照组比较：****P* < 0.001

****P* < 0.001 vs control group

表 2 各组 SGC-7901/DDP 细胞活力的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Changes of SGC-7901/DDP cell viability in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	细胞活力/%
对照	—	100.00±0.00
DDP	2 μg·mL ⁻¹	98.56±5.03
臭椿酮+DDP	0.2 mg·mL ⁻¹ +2 μg·mL ⁻¹	83.75±3.28***
	0.4 mg·mL ⁻¹ +2 μg·mL ⁻¹	74.84±3.15***
	0.8 mg·mL ⁻¹ +2 μg·mL ⁻¹	65.28±2.36***

与 DDP 组比较：****P* < 0.001

****P* < 0.001 vs DDP group

2.3 臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞凋亡的影响

DDP 组和对照组之间细胞凋亡率差异无统计学意义 (*P* > 0.05)，而臭椿酮各质量浓度+DDP 组细胞凋亡率较 DDP 组明显升高 (*P* < 0.001)，且臭椿酮质量浓度越高，SGC-7901/DDP 细胞凋亡率越高。见图 1 和表 3。

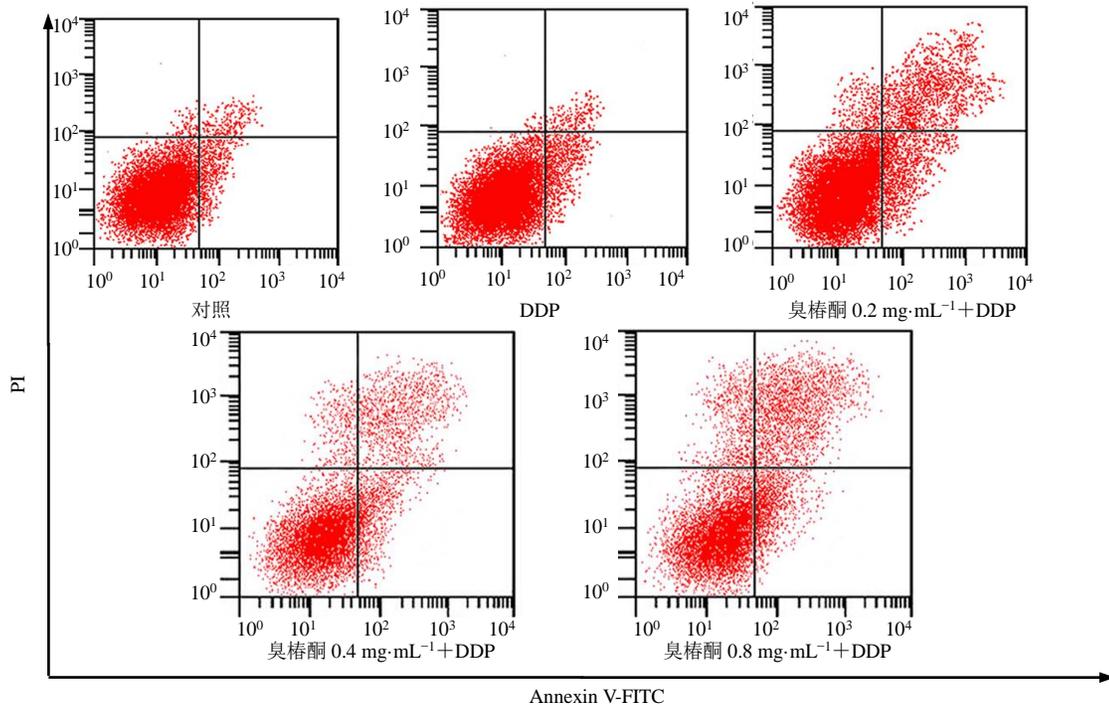


图 1 流式细胞仪检测各组 SGC-7901/DDP 细胞凋亡结果

Fig. 1 Flow cytometry analysis of SGC-7901/DDP cell apoptosis

表 3 各组 SGC-7901/DDP 细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Comparison of apoptosis rate of SGC-7901/DDP cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	凋亡率/%
对照	—	9.35 ± 1.17
DDP	2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10.18 ± 1.05
臭椿酮+DDP	0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	16.86 ± 2.43***
	0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	20.29 ± 3.18***
	0.8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	28.13 ± 2.95***

与 DDP 组比较: *** $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs DDP group

2.4 臭椿酮对 SGC-7901/DDP 细胞自噬和 p53 通路的影响

与对照组相比, DDP 组细胞自噬相关因子 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3 II/I 值以及 p53 通路

关键蛋白 p53 表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 臭椿酮各质量浓度 + DDP 组细胞中 LC3 II/I 值和 Beclin1、p53 蛋白表达水平逐渐升高, 且与 DDP 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 4。

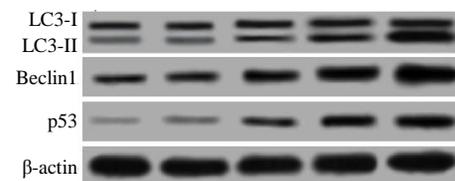
对照 DDP 0.2 0.4 0.8
臭椿酮($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + DDP

图 2 免疫印迹法检测 LC3 I、LC3 II、Beclin1 和 p53 蛋白表达

Fig. 2 Western blotting analysis of LC3 I, LC3 II, Beclin1 and p53 protein expression

表 4 各组 SGC-7901/DDP 细胞中 LC3 II/I 值和 Beclin1、p53 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Comparison of LC3 II/I value and expression levels of Beclin1 and p53 protein in SGC-7901/DDP cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	LC3 II/I	Beclin1	p53
对照	—	0.22 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.13 ± 0.02
DDP	2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.15 ± 0.03
臭椿酮+DDP	0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.40 ± 0.03***	0.38 ± 0.03***	0.24 ± 0.03***
	0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.89 ± 0.07***	0.67 ± 0.05***	0.43 ± 0.03***

与 DDP 组比较: *** $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs DDP group

2.5 p53 抑制剂对 SGC-7901/DDP 细胞的影响

与 DDP 组比较, DDP+Pifithrin- α 组细胞中 p53、Beclin1 蛋白表达水平和细胞凋亡率、LC3 II / I 值明显降低, 而细胞活力明显升高 ($P < 0.05$); 与臭椿酮+DDP 组比较, 臭椿酮+DDP+Pifithrin- α 组细胞活力明显升高, 而细胞中 p53、Beclin1 蛋白表达水平和细胞凋亡率、LC3 II / I 值明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3 和表 5。

3 讨论

我国每年胃癌新增人数达 41 万, 占全球胃癌新增人数 103 万的 39.81%^[11]; 多数胃癌患者处于进展期, 而化疗是治疗这部分人群的重要手段, 但化疗耐药性的产生严重限制了其治疗效果^[12-13]。顺铂是胃癌化疗的一线药物, 因此, 寻找低毒、有效的顺铂耐药逆转剂对胃癌治疗具有重要意义。

臭椿酮是一种天然的苦木素类化合物, 具有抗肿瘤作用^[14]。Gao 等^[15]研究表明, 臭椿酮可通过上调乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 miR-148a 表达, 抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭, 发挥抗癌作用。Ni 等^[16]研究发现, 臭椿酮可通过下调 RPA1 抑制 DNA 复制抑制非小细胞肺癌细胞生长。此外, 臭椿酮还可提高药物敏感性逆转肿瘤细胞耐药。Han 等^[5]研究指出, 臭椿酮可通过抑制 P-糖蛋白和 MDR1 表达增加细胞内阿霉素的积累, 恢复 K562/A02 细胞对阿霉素的敏感性, 被认为可能是逆转 P-糖蛋白介导的耐药肿瘤的一种潜在的治疗药物。尽管, Chen 等^[17]

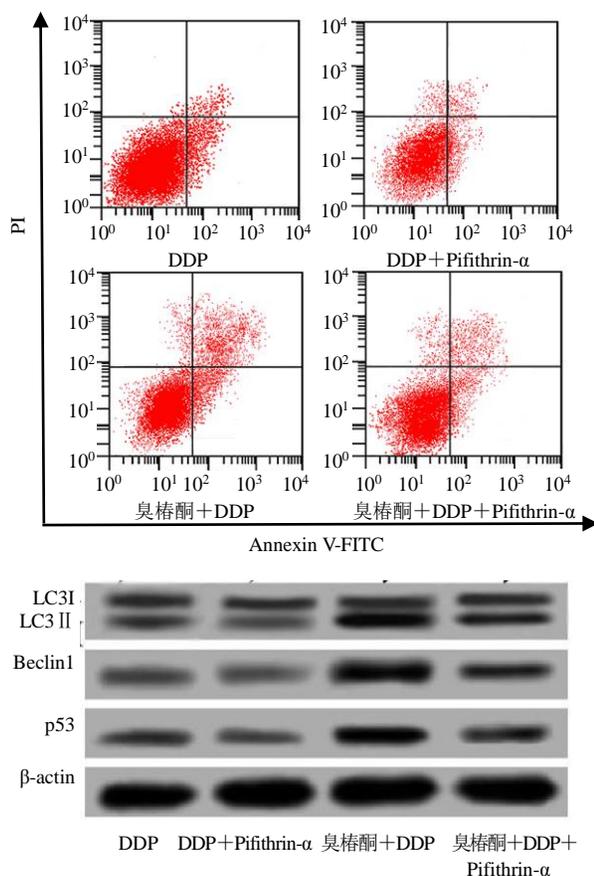


图 3 p53 抑制剂对 SGC-7901/DDP 细胞凋亡和相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of p53 inhibitor on apoptosis and related protein expression of SGC-7901/DDP cells

表 5 p53 抑制剂对 SGC-7901/DDP 细胞活力、凋亡率及 p53、Beclin1、LC3 II / I 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 5 Effect of p53 inhibitor on SGC-7901/DDP cell viability, apoptosis rate and protein expression of p53, Beclin1 and LC3 II / I ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	细胞活力/%	凋亡率/%	p53	LC3 II / I	Beclin1
DDP	2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	100.00 \pm 0.00	10.38 \pm 1.16	0.16 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03	0.23 \pm 0.03
DDP+Pifithrin- α	2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	121.35 \pm 9.76***	3.27 \pm 0.54***	0.10 \pm 0.02***	0.16 \pm 0.02***	0.15 \pm 0.03***
臭椿酮+DDP	0.8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	62.48 \pm 4.16	25.86 \pm 3.25	0.56 \pm 0.04	1.45 \pm 0.13	0.78 \pm 0.06
臭椿酮+DDP+Pifithrin- α	0.8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	87.96 \pm 5.22###	16.75 \pm 1.62###	0.38 \pm 0.03###	0.97 \pm 0.08###	0.36 \pm 0.03###

与 DDP 组比较: *** $P < 0.001$; 与臭椿酮+DDP 组比较: ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs DDP group; ### $P < 0.001$ vs ailanthone + DDP group

已报道指出, 臭椿酮可通过诱导细胞周期阻滞与凋亡发挥抗胃癌作用, 但臭椿酮在逆转胃癌顺铂耐药中的作用并不清楚。本研究以无细胞毒性作用的 0.2、0.4、0.8 mg/mL 臭椿酮联合 2 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂作用后发现, SGC-7901/DDP 细胞活力明显降低, 逆转倍

数分别为 11.28、17.47、24.11; 此外, SGC-7901/DDP 细胞凋亡率从 2 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂单独处理 (10.18 \pm 1.05) % 上升至 (16.86 \pm 2.43) %、(20.29 \pm 3.18) %、(28.13 \pm 2.95) %。结果表明, 臭椿酮可逆转 SGC-7901/DDP 细胞顺铂耐药。提示, 臭椿酮可能

是一种改善胃癌顺铂耐药的潜在药物。

自噬是一种广泛存在于生物体内的蛋白质降解过程,可通过“促进耐药细胞死亡”和“保护耐药细胞存活”两种方式参与肿瘤耐药^[7]。Wei等^[18]研究指出,LC3-II/LC3-I值和Beclin1表达升高引起的自噬是甘草苷增强SGC7901/DDP细胞顺铂敏感性改善耐药抵抗的重要机制。Wei等^[19]在人早幼粒细胞白血病的中指出,臭椿酮具有诱导细胞自噬的作用。本研究中0.2、0.4、0.8 mg/mL臭椿酮作用后发现,SGC-7901/DDP细胞中LC3-II/LC3-I值和Beclin-1蛋白表达水平明显升高。这表明臭椿酮可诱导SGC-7901/DDP细胞自噬。提示臭椿酮可能通过诱导自噬促进SGC-7901/DDP细胞死亡进而发挥逆转SGC-7901/DDP细胞顺铂耐药性的作用。p53是一种细胞自噬调节因子,在受到刺激后p53可通过激活AMPK通路或调节DRAM诱导细胞自噬^[20]。崔荣花等^[21]研究指出,重组人p53可通过抑制癌细胞增殖和诱导细胞凋亡增强胃癌细胞对顺铂的敏感性;Fu等^[22]研究指出,激活p53通路可诱导胃癌细胞自噬的发生。田艳等^[9]在非小细胞肺癌研究中发现,臭椿酮可上调p53表达。本研究发现,臭椿酮作用后SGC-7901/DDP细胞中p53蛋白表达水平明显升高。结果表明,臭椿酮可上调SGC-7901/DDP细胞中p53表达。提示,臭椿酮可能通过调控p53介导的自噬发挥改善胃癌细胞顺铂耐药的作用。本研究进一步以p53抑制剂作用后发现,臭椿酮对SGC-7901/DDP细胞活力和LC3-II/LC3-I值、Beclin-1蛋白表达的抑制作用及促凋亡作用明显逆转。这提示,臭椿酮改善胃癌细胞顺铂耐药的作用机制可能是通过调控p53通路介导自噬来实现的。

本研究结果表明,臭椿酮可逆转SGC-7901/DDP细胞的顺铂耐药性,其作用机制可能与上调p53表达诱导SGC-7901/DDP细胞自噬有关。然而,胃癌细胞顺铂耐药机制十分复杂,可能还与其他基因或通路的调控有关,还有待后续进一步深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐惠绵,王鑫.我国胃癌诊治临床研究现状与展望[J].中华胃肠外科杂志,2020,23(2):109-114.
- [2] 姜志超,依荷巴丽·迟.22例妊娠期胃癌的临床特点及预后分析[J].中华肿瘤杂志,2018,40(8):631-635.
- [3] 赵松峰,张晓坚.基于反向分子对接和网络药理学的

臭椿酮抗肿瘤作用机制研究[J].中草药,2018,49(17):114-121.

- [4] Daga M, Pizzimenti S, Dianzani C, et al. Ailanthone inhibits cell growth and migration of cisplatin resistant bladder cancer cells through down-regulation of Nrf2, YAP, and c-Myc expression [J]. *Phytomedicine*, 2019, 56(1): 156-164.
- [5] Han F, Liu G Q, Sun C F, et al. Ailanthone reverses multidrug resistance by inhibiting the P-glycoprotein-mediated efflux in resistant K562/A02 cells [J]. *Cell Mol Biol*, 2018, 64(15): 55-61.
- [6] He Y D, Peng S H, Wang J H, et al. Ailanthone targets p23 to overcome MDV3100 resistance in castration-resistant prostate cancer [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 13122-13122.
- [7] 李 旸,刘卓刚.细胞自噬在肿瘤化疗耐药中的作用[J].现代肿瘤医学,2016,24(20):3307-3312.
- [8] 杨逸铭,谢琦.p53与肿瘤耐药的研究进展[J].医学综述,2016,22(19):3805-3808.
- [9] 田 艳,洗乐武.臭椿酮对非小细胞肺癌细胞生物学特性的影响及机制研究[J].河北中医,2019,41(2):268-274.
- [10] Wei F, Jiang X, Gao H Y, et al. Liquiritin induces apoptosis and autophagy in cisplatin (DDP)-resistant gastric cancer cells in vitro and xenograft nude mice in vivo [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(5): 1383-1394.
- [11] 李子禹,闫超,李沈.胃癌围手术期营养治疗中国专家共识(2019版)[J].中国实用外科杂志,2020,40(2):145-151.
- [12] Xiao F, Ouyang B, Zou J, et al. Trim14 promotes autophagy and chemotherapy resistance of gastric cancer cells by regulating AMPK/mTOR pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2020, 81(5): 544-550.
- [13] 华国安,王蓉,黄笑欢,等.微RNA-524-5p通过靶向抑制SOX9基因表达增加胃癌细胞的顺铂敏感性[J].肿瘤,2019,39(8):606-615.
- [14] Ding H, Yu X, Hang C, et al. Ailanthone: A novel potential drug for treating human cancer (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(2): 1489-1503.
- [15] Gao W, Ge S K, Sun J Y. Ailanthone exerts anticancer effect by up-regulating miR-148a expression in MDA-MB-231 breast cancer cells and inhibiting proliferation, migration and invasion [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109(1): 1062-1069.
- [16] Ni Z, Yao C, Zhu X, et al. Ailanthone inhibits non-small cell lung cancer cell growth through repressing DNA replication via downregulating RPA1 [J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(11): 1621-1630.

- [17] Chen Y, Zhu L, Yang X, *et al.* Ailanthone induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of SGC-7901 human gastric cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6821-6827.
- [18] Wei F, Jiang X, Gao H Y, *et al.* Liquiritin induces apoptosis and autophagy in cisplatin (DDP)-resistant gastric cancer cells in vitro and xenograft nude mice *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(5): 1383-1394.
- [19] Wei C, Chen C R, Cheng Y X, *et al.* Ailanthone induces autophagic and apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia HL60 cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3569-3576.
- [20] White E. Autophagy and p53 [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(4): a026120-a026120.
- [21] 崔荣花, 王美清, 彭大为, 等. rAd-p53 联合顺铂对胃癌细胞生长及 KAI1/CD82 蛋白表达的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 2016, 31(1): 10-13.
- [22] Fu H, Wang C, Yang D, *et al.* Curcumin regulates proliferation, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cells by affecting PI3K and P53 signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4634-4642.

[责任编辑 刘东博]