

基于 Keap1/Nrf2 通路介导的自噬探讨紫草素对膀胱上皮癌 BUC 细胞化疗敏感性的影响

张 辉^{1*}, 张 爽¹, 刘扬帆¹, 宋 菲¹, 金成允²

1. 南阳市中心医院 肿瘤内科, 河南 南阳 473000

2. 郑州大学药学院 研究室, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 基于 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1/核因子 E2 相关因子 2 (Kelch-like ECH-associated protein-1/nuclear factor E2-related factor 2, Keap1/Nrf2) 通路介导的自噬探讨紫草素对膀胱上皮癌 BUC 细胞化疗敏感性的影响。方法 体外培养人 BUC 细胞 BIU-87, CCK-8 法检测不同质量浓度 (10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$) 顺铂和不同浓度 (2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 紫草素+顺铂 (40 $\mu\text{g/mL}$) 对 BIU-87 细胞增殖的影响。细胞转染实验, 设置对照组、顺铂组 (40 $\mu\text{g/mL}$)、紫草素组 (40 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂+8 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素) 和 NC 组 (转染 negative control-Nrf2+40 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂+8 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素) 和 Nrf2 组 (转染 hsa-Nrf2 mimic+40 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂+8 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素), 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测转染后 BIU-87 细胞中 Nrf2 mRNA 表达情况; CCK-8 法检测各组 BIU-87 细胞增殖情况; 流式细胞仪检测各组 BIU-87 细胞凋亡情况; 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测 BIU-87 细胞中 Keap1、Nrf2、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) I、LC3II 蛋白表达情况。**结果** 与对照组相比, 10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂可显著抑制 BIU-87 细胞增殖 ($P<0.05$); 2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素联合顺铂可显著抑制 BIU-87 细胞增殖 ($P<0.05$)。细胞转染实验中, 与对照组相比, 顺铂组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率、细胞中 Nrf2 和 LC3II 蛋白表达水平显著升高, 细胞中 Keap1、LC3I 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与顺铂组相比, 紫草素组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率、细胞中 Keap1 和 LC3I 蛋白表达水平显著升高, Nrf2 和 LC3II 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 紫草素组、NC 组以上指标差异不具有统计学意义 ($P>0.05$); 与 NC 组相比, Nrf2 组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率、细胞中 Keap1、LC3I 蛋白表达水平显著降低, Nrf2 蛋白和 mRNA 及 LC3II 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。**结论** 紫草素可能通过抑制 Keap1/Nrf2 通路介导的自噬反应, 增强 BUC 细胞 BIU-87 对顺铂的敏感性。

关键词: Keap1/Nrf2 通路; 自噬; 紫草素; 膀胱上皮癌细胞; 化疗敏感性

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3642-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.021

Effect of shikonin on chemosensitivity of bladder urothelial carcinoma cells based on Keap1/Nrf2 pathway-mediated autophagy

ZHANG Hui¹, ZHANG Shuang¹, LIU Yang-fan¹, SONG Fei¹, JIN Cheng-yun²

1. Department of Oncology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

2. Research Office of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the effect of shikonin on chemosensitivity of bladder urothelial carcinoma (BUC) cells based on autophagy mediated by Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Keap1/Nrf2) pathway. **Methods** Human BUC cells BIU-87 were cultured *in vitro*, and the effects of cisplatin (10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$) and shikonin (2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$) on the proliferation of BIU-87 cells were detected by CCK-8 method. Control group, cisplatin group (40 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin), shikonin group (40 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin + 8 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group), NC group (transfected with negative control-Nrf2 + 40 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin + 8 $\mu\text{mol/L}$ shikonin) and Nrf2 group (transfected with hsa-Nrf2 mimic + 40 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin + 8 $\mu\text{mol/L}$ shikonin). The expression of Nrf2 mRNA in BIU-87 cells was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), the proliferation of BIU-87 cells was detected by CCK-8 method, the apoptosis of BIU-87 cells was detected by flow cytometry, and Western blot was

收稿日期: 2020-11-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973529)

*通信作者: 张 辉 (1979—), 女, 本科, 主治医师, 研究方向为肿瘤内科中医用药。Tel: 15670669680 E-mail: zh8208fate@163.com

used to detect the expression of Keap1, Nrf2, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and LC3 II in BIU-87 cells.

Results Compared with control group, the proliferation inhibition rate of BIU-87 cells treated with 10, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin was significantly higher ($P < 0.05$); The proliferation inhibition rate of BIU-87 cells treated with 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$ shikonin and cisplatin was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with those in the control group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of BIU-87 cells, the protein expression levels of Nrf2 and LC3 II in cisplatin group were significantly higher, While the protein expression levels of Keap1 and LC3 I were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with those in cisplatin group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of BIU-87 cells, the protein expression levels of Keap1 and LC3 I in BIU-87 cells in shikonin group were significantly higher, while the protein expression levels of Nrf2 and LC3 II were significantly lower ($P < 0.05$); There was no significant difference in the above indexes between shikonin group and NC group ($P > 0.05$). Compared with those in NC group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of BIU-87 cells, the protein expression levels of Keap1 and LC3I in BIU-87 cells in Nrf2 group were significantly lower, while the protein expression levels of Nrf2 and LC3II were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Shikonin may enhance the cisplatin sensitivity of BUC cells BIU-87 by inhibiting the autophagy mediated by Keap1/Nrf2 pathway.

Key words: Keap1/Nrf2 pathway; autophagy; shikonin; bladder urothelial carcinoma cells; chemosensitivity

膀胱上皮癌 (bladder urothelial carcinoma, BUC) 是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一, 发病率居泌尿系统恶性肿瘤第 2 位, 是膀胱癌常见类型, 占膀胱癌患者总数的 90% 以上^[1]。目前 BUC 治疗主要采用以顺铂为基础的化疗方案, 但顺铂耐药性导致 BUC 化疗敏感性低, 治疗效果不佳, 患者 2 年生存率低^[2-3]。因此, 如何提高化疗敏感性是目前 BUC 治疗中亟需解决的问题。紫草素是从天然紫草根部分提取出的一种活性萘醌衍生物, 具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗肿瘤等作用^[4-5]。近年来研究发现, 紫草素对卵巢癌等多种癌细胞均具有抗增殖、提高顺铂敏感性的作用^[6-7]。自噬是通过降解受损的细胞器、变性的蛋白质等将能量再利用的过程, 是细胞对抗不良生长环境的一种保护机制, 其发生可降低肿瘤细胞的化疗敏感性^[8]。Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) /核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 通路是机体消除有害物质损伤作用、维持氧化还原平衡的重要通路, 可介导自噬反应^[9-10]。本研究基于 Keap1/Nrf2 通路介导的自噬探讨紫草素对 BUC 细胞化疗敏感性的影响, 以期临床提高 BUC 化疗敏感性提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人膀胱乳头状移行上皮癌细胞 BIU-87 (货号 HZ-Y1072) 购自美国 ATCC 细胞库; 顺铂 (批号 T1564, 质量分数 95%) 购自南京赛泓瑞生物科技有限公司; 紫草素 (批号 QY-0022, 质量分数 $\geq 98\%$)

购自上海乔羽生物科技有限公司; 胎牛血清 (货号 FBS500-S) 购自澳大利亚 AusGeneX 公司; DMEM 培养基 (货号 KL-P0032) 购自德国 Merck/Sigma 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂 (货号 11668019) 购自美国 Invitrogen 公司; 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 试剂盒 (货号 K1002S) 购自美国 Promega 公司; negative control (NC)-Nrf2、hsa-Nrf2 mimic 及 Nrf2、 β -actin 引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; CCK-8 试剂 (货号 CK-04) 购自日本同仁化学研究所; AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (货号 S0185) 购自哈尔滨新海基因检测有限公司; Keap1 抗体、Nrf2 抗体、GAPDH 抗体 (货号 ab139729、ab89443、ab63817) 购自 Abcam 公司; 微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体 (货号 FNab04716) 购自武汉菲恩生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (货号 0295G-HRP) 购自美国 Santa 公司; TY10GI2-2 培养箱购自美国 Shellab 公司; MODEL550 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司; BD FACSCanto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BIU-87 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温饱和湿度培养箱内培养, 传代 3 次, 取生长状态良好的对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 顺铂对 BIU-87 细胞增殖的影响 调整

BIU-87 细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 给予不同质量浓度的顺铂(10、20、40、80、160 μ g/mL) 处理, 培养 48 h, 加入 CCK-8 试剂, 避光培养 2 h, 用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度 (A)。以未给予顺铂处理细胞为对照, 计算细胞增殖抑制率。实验重复 6 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

1.2.3 紫草素对顺铂处理的 BIU-87 细胞增殖的影响 调整 BIU-87 细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 在给予 40 μ g/mL 顺铂的基础上给予不同浓度的紫草素 (2、4、8、16、32 μ mol/L) 处理, 培养 48 h, 加入 CCK-8 试剂, 避光培养 2 h, 用酶标仪测定波长 450 nm 处的 A 值。以未给予紫草素处理细胞为对照, 计算细胞增殖抑制率, 实验重复 6 次。

1.2.4 qRT-PCR 法检测转染后 BIU-87 细胞中 Nrf2 mRNA 表达情况 调整 BIU-87 细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 设置对照组、顺铂组 (40 μ g/mL)、紫草素组 (40 μ g/mL 顺铂+8 μ mol/L 紫草素) 和 NC 组 (转染 NC-Nrf2+40 μ g/mL 顺铂+8 μ mol/L 紫草素)、Nrf2 组 (转染 hsa-Nrf2 mimic+40 μ g/mL 顺铂+8 μ mol/L 紫草素)。细胞培养 48 h, 收集细胞, 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, qRT-PCR 法检测 Nrf2 mRNA 表达水平, 内参基因为 β -actin。反应程序: 95 $^{\circ}$ C、2 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、32 s, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 共循环 35 次。Nrf2 上游引物: 5'-ACGGGGCAGTCATGTACCA-3', 下游引物: 5'-GTTGAAGAACTCCTCCTGCTTG-3'; 内参 β -actin 上游引物: 5'-CTGTGGCATCCACGAAACT-3', 下游引物: 5'-GGACTCGTCATACTCCTGCTT-3'。C_t 值为扩增产物的荧光信号达到临界阈值时对应的循环数, 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示, 实验重复 6 次。

1.2.5 CCK-8 法检测各组 BIU-87 细胞增殖情况 调整 BIU-87 细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 分组及给药同“1.2.4”项。细胞培养 48 h, 加入 CCK-8 试剂, 避光培养 2 h, 用酶标仪测定波长 450 nm 处的 A 值, 计算细胞增殖抑制率, 实验重复 6 次。

1.2.6 流式细胞仪检测各组 BIU-87 细胞凋亡情况 调整 BIU-87 细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 分组及给药同“1.2.4”项。细胞培养 48 h, 收集细胞, 胰酶消化, PBS 洗涤,

用结合缓冲液将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明书操作, 加入 5 μ L Annexin V-FITC、5 μ L PI, 避光孵育 1 h, 用流式细胞仪测定细胞凋亡率, 实验重复 6 次。

1.2.7 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测各组 BIU-87 细胞中 Keap1/Nrf2 通路及自噬相关蛋白表达情况 调整 BIU-87 细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 以每孔 2 mL 接种于 6 孔培养板, 分组及给药同“1.2.4”项。细胞培养 48 h, 收集细胞, 加蛋白裂解液, 离心收集蛋白并定量, 取 50 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、转膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 Keap1 抗体 (1:300)、Nrf2 抗体 (1:300)、LC3 抗体 (1:300)、GAPDH 抗体 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入羊抗兔二抗 (辣根过氧化物酶标记, 1:2000), 室温孵育 1 h, ECL 化学发光法显色, 曝光, Image J 软件分析条带灰度, 实验重复 6 次。

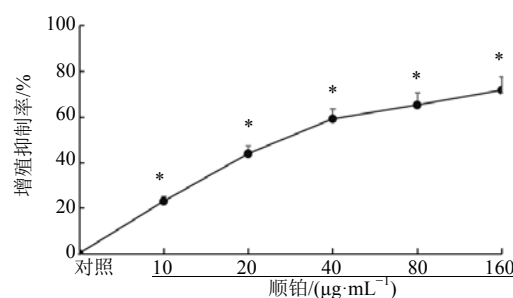
1.3 统计学分析

应用 SPSS 24.0 统计学软件进行数据分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较进行单因素方差分析, 两两比较行 SNK- q 检验。当 $P < 0.05$ 时, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对 BIU-87 细胞增殖的影响

与对照组相比, 10、20、40、80、160 μ g/mL 顺铂处理下 BIU-87 细胞增殖抑制率均显著升高 ($P < 0.05$), 半数抑制浓度 (IC_{50}) 在 20~40 μ g/mL 内, 故后续实验中顺铂处理质量浓度均采用 40 μ g/mL。见图 1。



与对照组比较: * $P < 0.05$, 图 2 同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below fig. 2

图 1 不同质量浓度顺铂处理下 BIU-87 细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Proliferation inhibition rate of BIU-87 cells treated with different concentrations of cisplatin ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.2 不同浓度紫草素对顺铂处理下 BIU-87 细胞增殖的影响

与对照组相比, 2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素联合顺铂处理下 BIU-87 细胞增殖抑制率均显著升高 ($P < 0.05$), IC_{50} 在 4~8 $\mu\text{mol/L}$ 内, 故后续实验紫草素处理浓度均采用 8 $\mu\text{mol/L}$ 。见图 2。

2.3 转染后 BIU-87 细胞 Nrf2 mRNA 表达情况

紫草素组、NC 组 BIU-87 细胞中 Nrf2 mRNA 表达水平差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$); 与 NC 组相比, Nrf2 组 BIU-87 细胞中 Nrf2 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

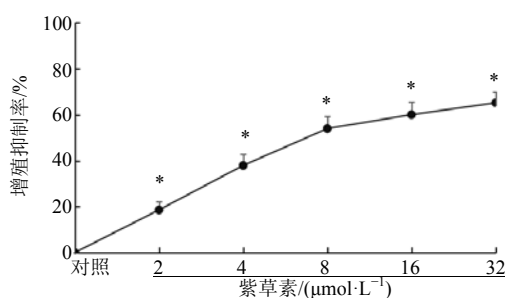


图 2 不同浓度紫草素联合顺铂处理下 BIU-87 细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Proliferation inhibition rate of BIU-87 cells treated with cisplatin and shikonin at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

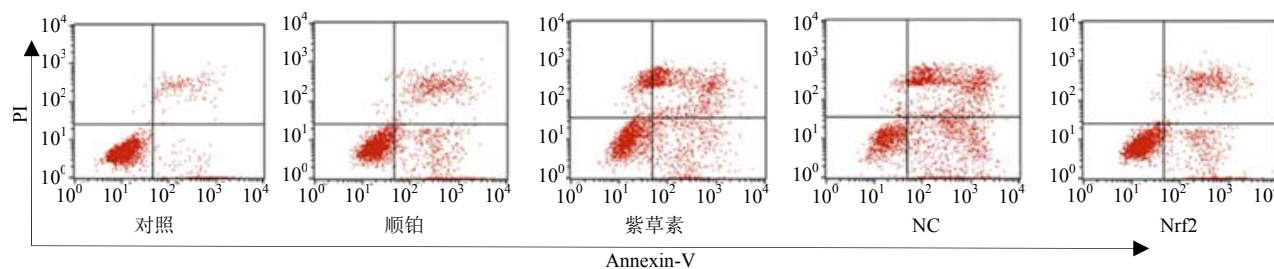
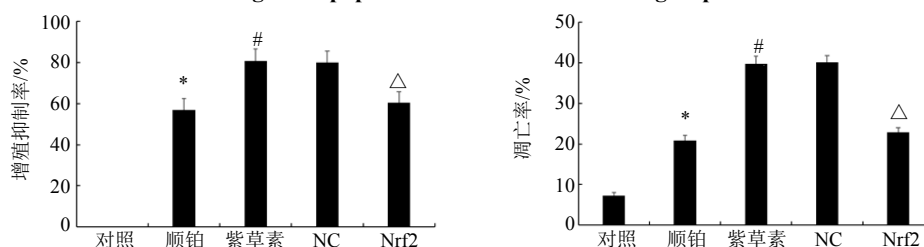


图 4 各组 BIU-87 细胞凋亡情况

Fig. 4 Apoptosis of BIU-87 cells in each group

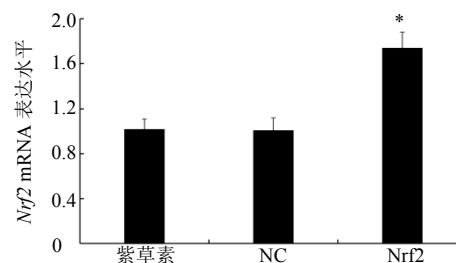


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$; 与 NC 组比较: Δ $P < 0.05$, 图 6、7 同

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs cisplatin group; Δ $P < 0.05$ vs NC group, same as below fig. 6 and 7

图 5 各组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率

Fig. 5 Proliferation inhibition rate and apoptosis rate of BIU-87 cells in each group



与 NC 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NC group

图 3 转染后 BIU-87 细胞 Nrf2 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Nrf2 mRNA expression level in BIU-87 cells after transfection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.4 转染后 BIU-87 细胞增殖、凋亡情况

与对照组相比, 顺铂组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 紫草素组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 紫草素组、NC 组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$); 与 NC 组相比, Nrf2 组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。见图 4、5。

2.5 转染后 BIU-87 细胞中 Keap1/Nrf2 通路相关蛋白表达情况

与对照组相比, 顺铂组 BIU-87 细胞中 Keap1 蛋白表达水平显著降低, Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 紫草素组 BIU-87

细胞中 Keap1 蛋白表达水平显著升高, Nrf2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 紫草素组、NC 组 BIU-87 细胞中 Keap1、Nrf2 蛋白表达水平差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$); 与 NC 组相比, Nrf2 组 BIU-87 细胞中 Keap1 蛋白表达水平显著降低, Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 6。

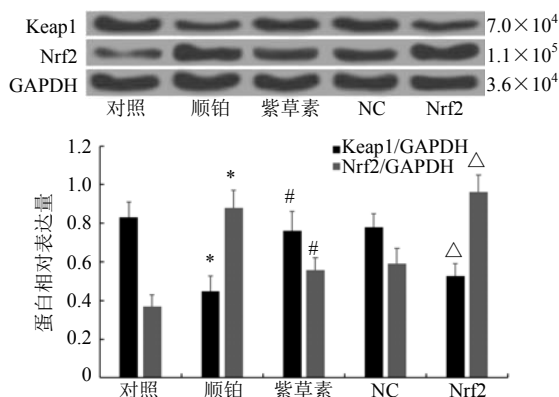


图 6 各组 BIU-87 细胞中 Keap1、Nrf2 蛋白表达情况

Fig. 6 Expression of KEAP1 and Nrf2 protein in BIU-87 cells in each group

2.6 各组 BIU-87 细胞中自噬相关蛋白表达情况

与对照组相比, 顺铂组 BIU-87 细胞中 LC3I 蛋白表达水平显著降低, LC3II 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 紫草素组 BIU-87 细胞中 LC3I 蛋白表达水平显著升高, LC3II 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 紫草素组、NC 组 BIU-87 细胞中 LC3I、LC3II 蛋白表达水平差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$); 与 NC 组相比, Nrf2 组 BIU-87 细胞中 LC3I 蛋白表达水平显著降低, LC3II 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 7。

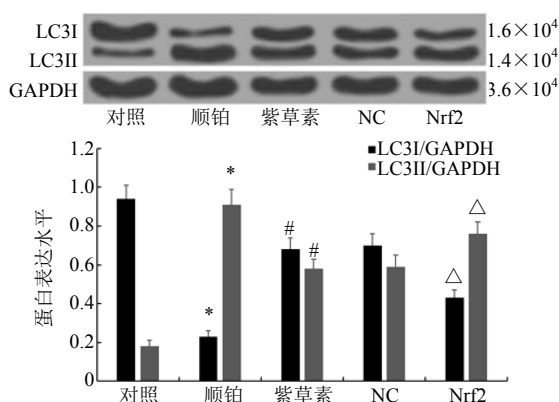


图 7 各组 BIU-87 细胞中 LC3I、LC3II 蛋白表达情况

Fig. 7 Expression of LC3I and LC3II protein in BIU-87 cells in each group

3 讨论

化疗是治疗各种癌症的重要手段之一, 其疗效经过长期广泛地研究验证, 而肿瘤化疗的敏感性与患者的预后及生存质量息息相关^[11]。顺铂是 BUC 化疗的一线基础治疗药物, 在使用过程中, BUC 易对顺铂产生耐药性, 导致化疗敏感性不高, 影响治疗效果^[12]。此外, BUC 作为一种具有复发倾向的恶性肿瘤, 在接受多次、长期化疗后, 对化疗药物的敏感性也会逐渐降低, 最终影响治疗效果^[13]。因此, 寻找合适的治疗药物提高 BUC 化疗敏感性具有重要意义。本研究通过设置顺铂质量浓度梯度, 发现 BIU-87 细胞的顺铂 IC₅₀ 在 20~40 μg/mL, 故最终选定 40 μg/mL 作为后续实验中顺铂的处理浓度。

近年来, 中药在肿瘤治疗中的作用越来越受到重视, 许多抗肿瘤药物均来自中药提取物。紫草素是中药紫草的主要活性成分, 具有抗氧化、抗菌、抗病毒、促进伤口愈合等一系列生物学特性^[14-15]。目前, 紫草素的抗肿瘤作用已在许多肿瘤中得到证实, 其在肿瘤治疗中的作用日益受到重视。Huang 等^[16]研究发现, 紫草素能通过调节微小 RNA-106b (miR-106b)/第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源蛋白 (phosphatase and tensin homolog gene deleted on chromosome 10, PTEN)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路抑制子宫内膜样子宫癌细胞的增殖并诱导其凋亡。Zhang 等^[17]研究表明, 紫草素类衍生物脱氧紫草素通过抑制 Akt 信号介导的 ATP 结合盒亚家族 B 成员 1 (ATP-binding cassette subfamily B member 1 transporter gene, ABCB1) 表达来抑制 NSCLC 细胞对顺铂的耐药。Shilnikova 等^[7]发现紫草素能诱导顺铂耐药卵巢癌细胞凋亡。许静等^[18]研究表明, 紫草素可以逆转卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞的顺铂耐药效应。本研究结果显示, 与单独顺铂处理相比, 使用 2、4、8、16、32 μmol/L 紫草素均可进一步提高 BIU-87 细胞的增殖抑制率, 紫草素组 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率较顺铂组均显著升高, 提示紫草素可以提高 BIU-87 细胞的顺铂敏感性, 但其作用机制还需进一步探究。

细胞自噬是维持细胞内环境稳态、生存的重要过程, 利用溶酶体清除损伤、多余的蛋白质及细胞器并将能量供给自身再利用, 在应激状态时起重要的防御作用^[19]。然而, 肿瘤细胞也能利用该过程在

化疗中保护自身,影响化疗敏感性。石瑛等^[20]研究发现抑制自噬可增强乳腺癌 MCF-7 细胞对紫杉醇的敏感性。张建育等^[21]研究表明,二十碳五烯酸可能通过抑制自噬反应提高膀胱癌细胞的顺铂化疗敏感性。殷雷等^[22]研究发现,肿瘤抑制因子圆柱瘤基因 *CYLD* 能通过抑制自噬提高膀胱癌细胞对吉西他滨的化疗敏感性。LC3 是自噬体膜上的标志性蛋白,在细胞质中以 LC3I、LC3II 2 种形式存在,在自噬过程中由 LC3I 转变为 LC3II,进而与自噬体特异性结合^[23]。本研究结果显示,与对照组相比,顺铂组 BIU-87 细胞中 LC3II 蛋白表达水平显著升高,LC3I 蛋白表达水平显著降低,提示 BIU-87 细胞在抵御顺铂作用时发生了自噬反应;与顺铂组相比,紫草素组 BIU-87 细胞中 LC3II 蛋白表达水平显著降低,LC3I 蛋白表达水平显著升高,提示紫草素可以通过抑制 BIU-87 细胞的自噬反应,进而加强顺铂对细胞增殖的抑制作用及对细胞凋亡的促进作用。

Keap1/Nrf2 通路是调控机体氧化应激的重要途径。在正常生理状态下,Keap1 和 Nrf2 在细胞质内形成复合体,并介导泛素化持续降解 Nrf2,以维持转录形成的 Nrf2 之间的平衡。在应激条件下,Keap1 中的半胱氨酸残基发生修饰,导致 Keap1 构象发生改变,Nrf2 从 Keap1/Nrf2 复合物中分离且不会被泛素化和降解,通过影响多种自噬凋亡基因的转录参与自噬调节^[24-25]。本研究结果显示,与对照组相比,顺铂组 BIU-87 细胞中 Keap1 蛋白表达水平显著降低,Nrf2 蛋白表达水平显著升高,提示顺铂可激活 Keap1/Nrf2 通路;与顺铂组相比,紫草素组 BIU-87 细胞中 Keap1 蛋白表达水平显著升高,Nrf2 蛋白表达水平显著降低,提示紫草素可抑制 Keap1/Nrf2 通路激活,推测紫草素可能通过影响 Keap1/Nrf2 通路影响细胞自噬反应,进而影响 BIU-87 细胞的顺铂敏感性。本研究在顺铂联合紫草素处理基础上,进一步通过转染处理细胞上调 Nrf2 表达,发现 BIU-87 细胞增殖抑制率、凋亡率显著降低,细胞中 Keap1、LC3I 蛋白表达水平显著降低,Nrf2、LC3II 蛋白表达水平显著升高,提示激活 Keap1/Nrf2 通路后,BIU-87 细胞对顺铂的敏感性降低,细胞自噬反应增强,推测紫草素增强 BIU-87 细胞的顺铂敏感性可能是通过抑制 Keap1/Nrf2 通路激活,进而抑制自噬反应发挥作用的。

综上所述,紫草素可以增强 BUC 细胞 BIU-87

对顺铂的敏感性,可能是通过抑制 Keap1/Nrf2 通路介导的自噬反应发挥作用的。但本研究仅针对 BIU-87 细胞,在其他 BUC 细胞系中的作用还需在后续实验中加以验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ku J H, Yuk H D, Godoy G, *et al.* Prognostication in patients treated with radical cystectomy for urothelial bladder carcinoma: A new simplified model incorporating histological variants [J]. *Bladder Cancer*, 2018, 4(2): 195-203.
- [2] Tyagi A, Chandrasekaran B, Kolluru V, *et al.* Combination of androgen receptor inhibitor and cisplatin, an effective treatment strategy for urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Urol Oncol*, 2019, 37(7): 492-502.
- [3] 吴建强, 黄成, 赵浩, 等. 培美曲塞钠和吉西他滨分别联合顺铂治疗晚期膀胱尿路上皮癌的安全性和有效性的临床对比研究 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019, 39(5): 811-815.
- [4] Zheng H, Huang Q, Huang S, *et al.* Senescence inducer shikonin ROS-dependently suppressed lung cancer progression [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 519.
- [5] Wang F F, Yao X S, Zhang Y W, *et al.* Synthesis, biological function and evaluation of Shikonin in cancer therapy [J]. *Fitoterapia*, 2019, 134: 329-339.
- [6] Tang Q, Liu L H, Zhang H Y, *et al.* Regulations of miR-183-5p and snail-mediated shikonin-reduced epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 577-589.
- [7] Shilnikova K, Piao M J, Kang K A, *et al.* Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and attenuates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5417-5424.
- [8] Lu X, Zhou D, Hou B, *et al.* Dichloroacetate enhances the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents via inhibiting autophagy in non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 1231-1241.
- [9] Tang Z H, Hu B, Zang F Z, *et al.* Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 510.
- [10] Fan M L, Li Y N, Yao C H, *et al.* DC32, a dihydroartemisinin derivative, ameliorates collagen-induced arthritis through an Nrf2-p62-Keap1 feedback loop [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2762.

- [11] Yu W, Ye Z X, Fang X, *et al.* Preoperative albumin-to-fibrinogen ratio predicts chemotherapy resistance and prognosis in patients with advanced epithelial ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 88.
- [12] Li B, Xie D L, Zhang H. MicroRNA-101-3p advances cisplatin sensitivity in bladder urothelial carcinoma through targeted silencing EZH2 [J]. *J Cancer*, 2019, 10(12): 2628-2634.
- [13] 卢童, 徐康. 靶向抑制 c-Myc 表达与吉西他滨联合应用增强膀胱肿瘤细胞的化疗敏感性 [J]. 遵义医科大学学报, 2020, 43(2): 160-164.
- [14] 王喜欢, 张金华, 胡亚南, 等. 紫草素对高糖诱导的血管内皮细胞凋亡和氧化应激的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(7): 1222-1227.
- [15] 李蒙娜, 闫言, 王宝玺. 紫草素促进皮肤伤口愈合机制研究进展 [J]. 中医药学报, 2018, 46(2): 124-128.
- [16] Huang C M, Hu G H. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via modulating *miR-106b*/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(2): 1-13.
- [17] Zhang S H, Wang Y. Deoxyshikonin inhibits cisplatin resistance of non-small-cell lung cancer cells by repressing Akt-mediated ABCB₁ expression and function [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(10): e22560.
- [18] 许静, 郭哲, 王秋宇, 等. 紫草素对卵巢癌细胞 SKOV3/DDP 顺铂耐药的逆转作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(9): 1616-1621.
- [19] Hou X, Xiao H T, Zhang Y H, *et al.* Transient receptor potential channel 6 knockdown prevents apoptosis of renal tubular epithelial cells upon oxidative stress via autophagy activation [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1015.
- [20] 石瑛, 路璐, 王云凤, 等. 自噬对 MCF-7 细胞紫杉醇化疗敏感性的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2018, 53(3): 320-323.
- [21] 张建业, 高瑞林, 李毅宁, 等. 二十碳五烯酸抑制自噬反应提高膀胱癌细胞化疗敏感性 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(12): 2202-2204.
- [22] 殷雷, 殷睿, 李文佳, 等. CYLD 抑制自噬提高膀胱癌细胞吉西他滨化疗敏感性 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2017, 55(8): 1-6.
- [23] 韩杨杨, 郑君刚, 杨秋红, 等. 右美托咪定对肺癌根治术侧肺组织自噬相关蛋白 LC3 的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 411-414.
- [24] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103-107.
- [25] 顾喜燕, 王志宏, 于泳浩. Nrf2-自噬通路在大鼠切口痛-瑞芬太尼诱导痛觉过敏中的作用 [J]. 天津医药, 2018, 46(2): 135-138.

[责任编辑 潘明佳]