

# 脂质体莪术醇逆转卵巢癌顺铂耐药作用的机制

杨洁真<sup>1</sup>, 王晶<sup>2</sup>, 宋永红<sup>4</sup>, 唐勤<sup>1</sup>, 吴强<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 研究脂质体莪术醇(LC)对人卵巢癌细胞顺铂耐药的逆转作用及其机制。方法 采用卵巢癌耐顺铂细胞株 SKOV3/DDP 细胞分为 5 组: 空白对照组、阴性对照组(含 12.5  $\mu\text{g/ml}$  脂质体)、顺铂组(4  $\mu\text{g/ml}$ )、LC 组(20  $\mu\text{g/ml}$ )、联合组[顺铂(4  $\mu\text{g/ml}$ ) + LC(20  $\mu\text{g/ml}$ )], CCK-8 检测各组细胞增殖能力, 高效液相色谱-串联质谱法检测细胞内顺铂平均含量, 流式细胞术检测细胞凋亡, qRT-PCR 检测 P 糖蛋白(P-gp)的 mRNA 相对表达量, 免疫细胞化学和 Western blot 检测各组细胞 P-gp 蛋白的表达情况。结果 联合组细胞增殖能力最低, 凋亡率最高( $P < 0.05$ ); 联合组细胞内顺铂平均含量大于顺铂组( $P < 0.05$ ); 联合组细胞的 P-gp mRNA 和蛋白相对表达量低于单用顺铂组( $P < 0.05$ )。结论 LC 可通过抑制 P-gp 的表达, 降低人卵巢癌耐顺铂细胞株 SKOV3/DDP 对顺铂的耐药性。

**关键词** 卵巢癌; 顺铂耐药; 脂质体莪术醇; P 糖蛋白

**中图分类号** R 737.31

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2022)07-1106-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.017

卵巢癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 其病死率位居女性恶性肿瘤第五位<sup>[1]</sup>。导致卵巢癌病死率较高的主要原因之一是肿瘤复发后对化疗药物的耐药, 耐药不仅限制了卵巢癌复发患者的二次手术机会, 对晚期卵巢癌的初次减瘤手术也有较大的影响, 因此寻找降低卵巢癌化疗耐药性的治疗方案是目前研究热点之一<sup>[2-3]</sup>。中药有效成分联合传统化疗药物, 能增强肿瘤细胞对药物的敏感性, 降低肿瘤细胞对一线化疗药物的耐药程度<sup>[4]</sup>。莪术醇是衡量中药莪术油药效的重要指标之一, 课题组前期利用脂质体运载莪术醇, 发现脂质体莪术醇(liposome cur-

cumol, LC)能有效发挥抗卵巢癌作用<sup>[5]</sup>, 并且与顺铂联合使用后能提高卵巢癌细胞对顺铂的敏感性, 促进其凋亡<sup>[6]</sup>。但是 LC 是否能够降低卵巢癌细胞对顺铂的耐药程度, 目前未见报道。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人卵巢癌细胞株 SKOV3(上海赛百慷生物技术股份有限公司); 卵巢癌顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 由安徽医科大学基础医学院实验室提供; 脂质体莪术醇(由合肥工业大学合成); 顺铂(D109812)、氯化钼(II96212)、二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDTC, S302932)(上海阿拉丁试剂有限公司); 乙腈(A955-4, 美国 ThermoFisher 公司); 凋亡试剂盒(上海贝博生物科技有限公司); 利福平(沈阳红旗制药有限公司); CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);  $\beta$ -actin(66009-1g)、Anti-P Glycoprotein(P-gp 22336-1-AP)(美国 proteintech 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠、抗兔(北京中杉金桥生物技术有限公司); 逆转录和 qPCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); qRT-PCR 引物(安徽通用生物股份有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人卵巢癌细胞株 SKOV3 用含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养, SKOV3/DDP 在常规培养基中加入 200 ng/ml 顺铂 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养, 使用前在无顺铂常规培养基中培养一周。

**1.2.1.1 细胞分组** SKOV3/DDP 细胞分成: ① 空白对照组: 常规培养基; ② 阴性对照组: 含 12.5  $\mu\text{g/ml}$  脂质体培养基; ③ 顺铂组: 含 4  $\mu\text{g/ml}$  顺铂的培养基培养 24 h; ④ LC 组: 含 20  $\mu\text{g/ml}$  的 LC 培养基培养 48 h; ⑤ 联合组: 含顺铂(4  $\mu\text{g/ml}$ ) + LC(20  $\mu\text{g/ml}$ ) 的培养基, 细胞先用含 20  $\mu\text{g/ml}$  的 LC 培养基培养 24 h, 再与含顺铂(4  $\mu\text{g/ml}$ ) + LC(20  $\mu\text{g/ml}$ ) 的培养基培养 24 h。

**1.2.1.2 激动剂分组** ① 利福平组: 用培养基稀释利福平粉末, 配成 10  $\mu\text{mol/L}$  的溶液, 培养细胞 24 h; ② 利福平 + 顺铂组: 用含利福平(10  $\mu\text{mol/L}$ )

2022-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82104633); 安徽省重点研究与开发计划(编号: 202004j07020033)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032  
<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院<sup>2</sup> 妇产科、<sup>3</sup> 病理科, 合肥 230022

<sup>4</sup> 合肥工业大学化学与材料科学学院, 合肥 230009

作者简介: 杨洁真, 女, 硕士研究生;

吴强, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aydjohn@yahoo.com

+ 顺铂(4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的培养基培养 24 h; ③ 利福平 + LC 组: 细胞先与含利福平(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) + LC(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的培养基培养 24 h, 再与 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 LC 培养基培养 24 h; ④ 利福平 + LC + 顺铂组: 细胞先与含 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 LC + 利福平(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 培养基培养 24 h, 再与含 LC(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + 顺铂(4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的培养基培养 24 h。

**1.2.2 CCK-8 法测细胞活力** 在各组细胞中, 加入 CCK-8 溶液 10  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 波长吸光度, 实验重复三次。细胞活力 = (实验组 - 无细胞培养基组) / (对照组 - 无细胞培养基组)  $\times 100\%$ 。使用 Graphpad 回归模型计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration  $IC_{50}$ )。

**1.2.3 液相色谱 - 串联质谱(HPLC-MS)测定细胞内顺铂含量** 各组取细胞沉淀, 用超声裂解后制备顺铂衍生物, 细胞悬液加内标氯化铟, 加 5% DDTC 溶液, 45  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min, 加 300  $\mu\text{l}$  乙腈混匀, 离心取上层溶液过滤, 用 HPLC-MS 测定细胞内顺铂平均含量(顺铂平均含量用顺铂衍生物与内标铟峰面积的比值/细胞数表示)。色谱柱: Thermo Synchronis  $C_{18}$  柱(1  $\mu\text{m} \times 2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ); 流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.1% 甲酸水。质谱条件: 离子源: HESI 源; 喷雾电压: 4 000 V(+); 离子化模式: ESI+; 毛细管温度: 320  $^{\circ}\text{C}$ ; 扫描模式: 选择离子监测 SIM 模式, 铂的衍生物:  $C_{15}H_{29}N_3S_6Pt$  ( $[M+H]^+ = 639.04062$ ), 内标铟的衍生物:  $C_{10}H_{19}N_2S_4In$  ( $[M+H]^+ = 410.95426$ )。

**1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡** 不含 EDTA 的胰酶消化、收集各组细胞后, 加入 400  $\mu\text{l}$  的 AnnexinV 结合液重悬细胞, 再加入 5  $\mu\text{l}$  AnnexinV 染色液, 室温避光孵育 15 min, 然后加入 5  $\mu\text{l}$  的碘化丙啶, 孵育 5 min, 最后使用流式细胞分析仪检测样本, 用 CytExpert 软件进行分析。

**1.2.5 qRT-PCR 检测 P-gp mRNA 相对表达量** 收集各组细胞, 利用 Trizol 提 RNA, 使用诺唯赞逆转录试剂将总 RNA 逆转录成 cDNA, 按照 qPCR 试剂盒说明进行引物扩增, 最终数据以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值进行计算。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT R: GAAGGCTGGGGCTCATTT
MDR-1	F: GGGATGGTCAGTGTGATGGA R: GCTATCGTGTGGCAAACAATA

**1.2.6 Western blot 检测 P-gp 蛋白表达情况** 提取各组细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 10% SDS-PAGE 凝胶, 200 mA、140 min 转移到 PVDF 膜, 封闭, 加一抗 P-gp(1:1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜, 加入二抗室温孵育 1.5 h, ECL 进行发光反应,  $\beta$ -actin 作为内参, 使用 ImageJ 软件进行灰度分析。

**1.2.7 免疫细胞化学检测 P-gp 蛋白表达情况** 常规准备细胞爬片, 甲醛固定, 用 0.2% TritonX-100 处理 5 min, 3%  $H_2O_2$  处理 5 min, 加入一抗 P-gp(1:400) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 二抗室温孵育 30 min, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水透明后加封片剂封片。

**1.3 统计学处理** 使用 Prism 8.0 进行统计分析, 数据以表示。通过未配对的  $t$  检验分析两组之间的差异, 多组均数间的比较采用单因素方差分析及其两两比较方法 LSD 法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 顺铂联合 LC 对 SKOV3/DDP 细胞增殖的影响** 如图 1A 所示, 与不同浓度顺铂培养后, SK-OV3/DDP 的细胞活力 ( $F_{SKOV3/DDP} = 220.6$ ,  $IC_{50} = 28.36 \pm 2.71 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $P < 0.05$ ) 高于 SKOV3 细胞 ( $F_{SKOV3} = 573.0$ ,  $IC_{50} = 7.64 \pm 0.58 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $P < 0.05$ )。图 1B 所示, 与不同浓度 LC 培养后, SK-OV3/DDP 细胞活力呈浓度梯度依赖性降低 ( $F = 989.1$ ,  $P < 0.05$ ),  $IC_{50}$  为 ( $126.8 \pm 5.07$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 当 LC 药物浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 细胞活力值为 90% 以上, 因此在后续研究中以 LC 药物浓度 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  为标准。图 1C 所示, 与顺铂组相比, 联合组细胞活力呈顺铂浓度梯度依赖性降低 ( $F_{顺铂组} = 340.8$  vs  $F_{联合组} = 363.7$ ,  $P < 0.05$ ), 当顺铂浓度为 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 联合用药能抑制 SKOV3/DDP 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ )。图 1D 提示, 不同浓度的裸脂质体对 SK-OV3/DDP 细胞活力无明显的抑制作用。

**2.2 LC 对 SKOV3/DDP 细胞内顺铂平均含量的影响** 如表 2 所示, 顺铂组和联合组细胞内顺铂平均含量呈时间梯度依赖性增高, 联合组细胞内顺铂平均含量高于单用顺铂组, 差异有统计学意义。

**2.3 顺铂与 LC 联合用药对细胞凋亡的影响** 与对照组 (4.62%  $\pm$  1.32%) 相比, 顺铂组 (23.11%  $\pm$  2.96%) 和联合组 (54.34%  $\pm$  3.37%) 凋亡率均增加, 联合组细胞凋亡率在四组中最高 ( $F = 242.0$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 2。

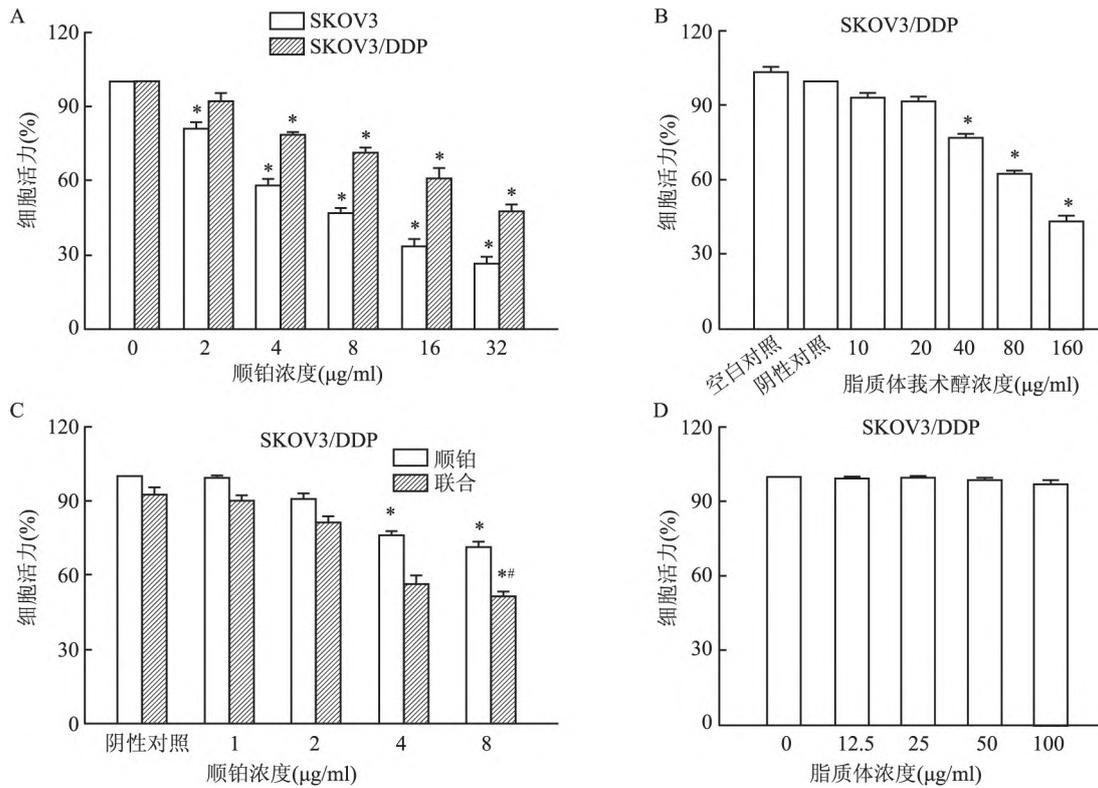


图1 顺铂与 LC 联合用药对 SKOV3/DDP 细胞活力的影响

A: 不同浓度的顺铂对 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞活力的影响; B: 不同浓度的 LC 对 SKOV3/DDP 细胞活力的影响; C: LC (20 μg/ml) 联合不同浓度顺铂 (0、1、2、4、8 μg/ml) 对 SKOV3/DDP 细胞活力的影响; D: 不同浓度脂质体 (0、12.5、25、50、100 μg/ml) 对 SKOV3/DDP 活力的影响; 阴性对照组为含有 12.5 μg/ml 脂质体培养基; 与阴性对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与顺铂组比较: #  $P < 0.05$

表2 顺铂组与联合组在不同时间点 SKOV3/DDP 细胞内的顺铂含量 (ng/ml  $\bar{x} \pm s$   $n = 3$ )

时间 (h)	顺铂组	联合组	t 值	P 值
0	1.02 ± 0.40	1.55 ± 0.01	1.91	0.197
12	7.78 ± 0.86	11.34 ± 0.73	5.47	0.006*
24	9.54 ± 0.21	12.14 ± 1.07	4.13	0.015*
48	15.46 ± 0.89	19.09 ± 1.62	3.40	0.027*

与顺铂组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 LC 通过抑制 P-gp 蛋白表达逆转 SKOV3/DDP 细胞对顺铂的耐药性** 如图 3A 所示,与 SKOV3 相比,SKOV3/DDP 细胞中 P-gp 蛋白表达水平上升 ( $t = 14.08$ ,  $P < 0.05$ )。如图 3B 所示,LC 作用 48 h 能抑制 SKOV3/DDP 细胞中 P-gp 蛋白的表达量 ( $F = 80.46$ ,  $P < 0.05$ )。如图 3C 和 D 所示,与顺铂组相比,联合用药组 P-gp mRNA 和蛋白的相对表达水平下降 ( $F_{mRNA} = 115.5$ ,  $F_{蛋白} = 258.4$ ,  $P < 0.05$ )。免疫细胞化学结果显示,联合用药能抑制 P-gp 蛋白在 SKOV3/DDP 细胞的胞质和胞膜中的表达 (图 3E)。

**2.5 P-gp 活性激动剂可逆转 LC 介导的 P-gp 蛋白表达** Western blot 结果提示,P-gp 活性激动剂利

福平能促进 SKOV3/DDP 细胞中 P-gp 蛋白的表达,并部分恢复联合用药后 SKOV3/DDP 细胞 P-gp 蛋白的表达 ( $F = 41.43$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

卵巢癌的发病率大约在 5%,但其病死率位居女性生殖系统恶性肿瘤首位<sup>[1]</sup>。在卵巢癌临床治疗中,化疗药物的使用显著延长了肿瘤患者的生存年限<sup>[7]</sup>。然而,化疗耐药的出现严重制约了化疗的效果,甚至导致治疗的失败。因此,如何逆转卵巢癌细胞顺铂耐药成为改善卵巢癌患者预后的关键环节。在本研究中,以前期研究为基础,发现脂质体莪术醇联合顺铂可明显降低卵巢癌耐药细胞株 SKOV3/DDP 细胞活力,促进凋亡,降低细胞中 P-gp 蛋白的表达,增强 SKOV3/DDP 细胞对顺铂的敏感性。

多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 作为耐药机制中最常见的原因之一,主要涉及腺苷三磷酸 (ATP) 结合盒转运体 (ATP-binding cassette, ABC) 超家族,其能将多种物质跨膜转运,保护机体免受有毒代谢物和化合物的伤害。ABC 外排转运体在肿

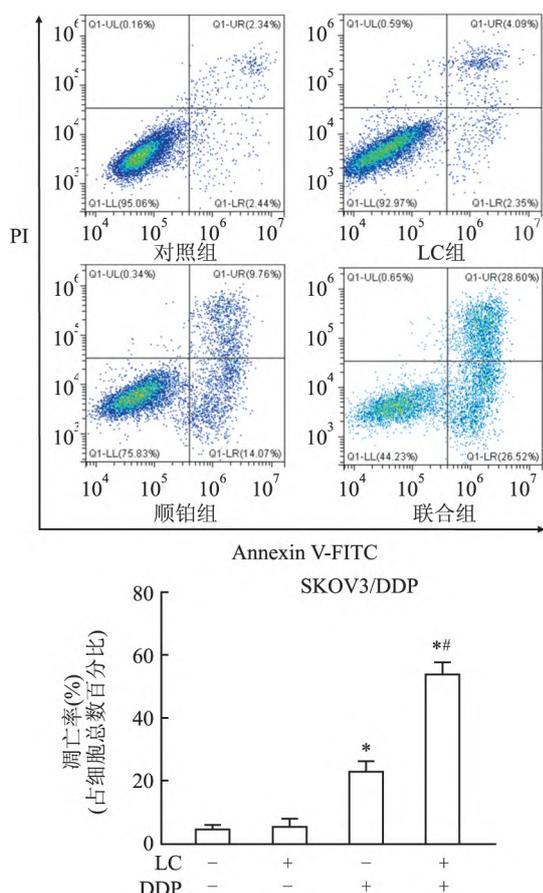


图2 顺铂与 LC 联合用药对细胞凋亡的影响

A: 不同分组处理对 SKOV3/DDP 细胞凋亡的影响; B: SKOV3/DDP 细胞凋亡统计图; 各组与阴性对照组相比: \*  $P < 0.05$ ; 与顺铂组相比: #  $P < 0.05$

瘤细胞中过表达能够限制化疗药物的长期有效使用,形成 MDR<sup>[8]</sup>。P-gp 是 ABC 转运蛋白 B 亚族,为 MDR1 的表达产物。化疗后,肿瘤细胞内 P-gp 表达升高,其通过与化疗药物结合,由 ATP 供能将细胞内药物泵出细胞外,促使细胞内药物浓度降低,从而产生耐药<sup>[8]</sup>。本研究发现,卵巢癌细胞中,相比于 SKOV3, SKOV3/DDP 中的 P-gp 蛋白表达水平明显上调。联合用药组 P-gp 的 mRNA 和蛋白表达水平下调。这与 Gao et al<sup>[9]</sup> 研究一致, P-gp 在卵巢癌细胞中的表达水平与肿瘤的多药耐药呈正相关, P-gp 促进细胞将各种化疗药物外排导致卵巢癌患者的多药耐药。

大量研究发现,莪术醇作为中药莪术挥发油中提取的有效单体成分,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>,当与化疗药物联用时,可增强化疗疗效并对肿瘤细胞有杀伤作用<sup>[11]</sup>。Huang et al<sup>[12]</sup> 研究表明,莪术醇可通过抑制 PI3K/AKT 通路激活,提高人胃癌细胞对顺铂的敏感性。莪术醇通过靶向 miR-181b-2-3p-ABCC3 轴抑制三阴性乳腺癌增长,增强其对阿霉素的敏感性<sup>[13]</sup>。课题组前期研究<sup>[6]</sup> 发现, LC 可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路激活,进一步增强顺铂抗卵巢癌作用,并降低顺铂的  $IC_{50}$ 。在本研究中,通过 HPLC-MS 检测细胞内顺铂平均含量<sup>[14]</sup>,发现顺铂联合 LC 用药促进细胞内顺铂平均含量的增高。实验发现, LC 作用 48 h 对 SKOV3/DDP 细胞

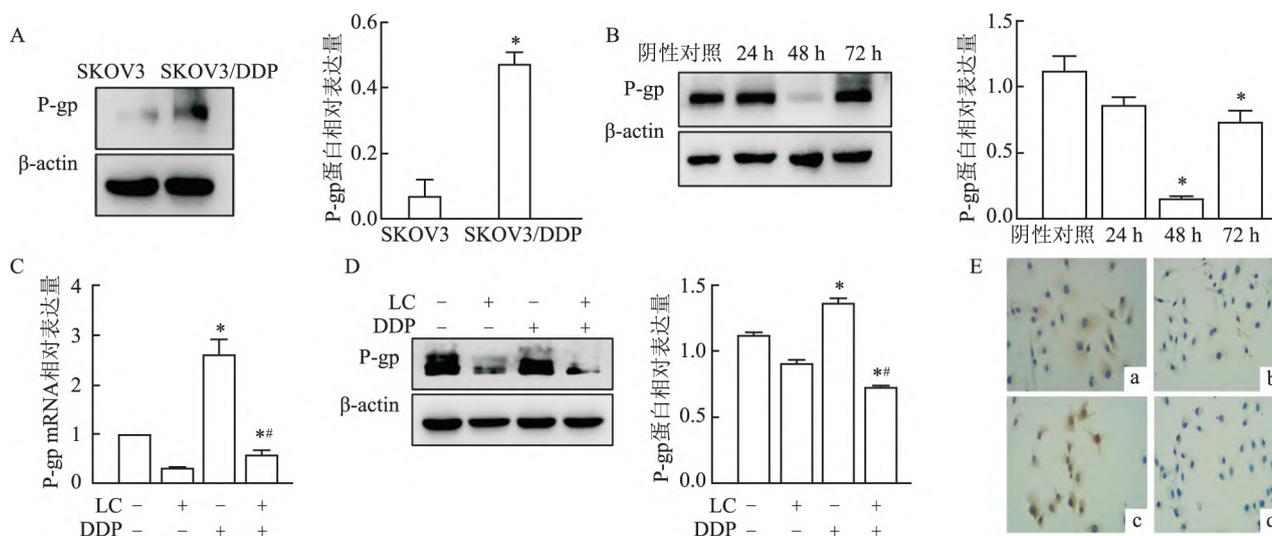


图3 LC 通过抑制 P-gp 蛋白表达逆转 SKOV3/DDP 细胞的顺铂耐药

A: P-gp 蛋白在 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞中的表达水平; B: LC 作用于 SKOV3/DDP 细胞培养不同时间(0、24、48、72 h) 后对 P-gp 蛋白表达的影响; C: LC 对各组细胞中 P-gp mRNA 表达水平的影响; D: LC 对各组细胞中 P-gp 蛋白水平的影响; E: LC 对各组细胞中 P-gp 蛋白的定位及表达的影响, HE  $\times 100$ ; a: 对照组; b: LC 组; c: 顺铂组; d: 联合组; 与阴性对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与顺铂组比较: #  $P < 0.05$

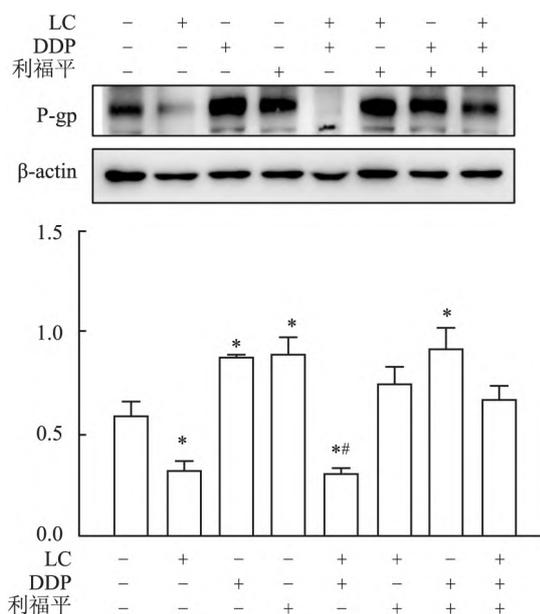


图4 P-gp 活性激动剂(利福平)影响 LC 抑制 SKOV3/DDP 细胞 P-gp 蛋白的表达量

A: 不同分组处理 SKOV3/DDP 后 P-gp 蛋白表达情况; B: A 图灰度值统计; 与阴性对照组比较, \* P < 0.05; 联合组与利福平 + LC + 顺铂组比较: #P < 0.05

的 P-gp 表达抑制效果最佳,但是临床顺铂常用一日方案,因此我们在设计联合用药方案时,将 LC 与细胞先培养 24 h 后,再与顺铂联合作用 24 h,这为药物将来的临床转化提供理论依据。

综上所述,本研究发现顺铂与 LC 联合用药能增强 SKOV3/DDP 细胞对顺铂敏感性,该作用可能与抑制 P-gp 蛋白表达、增加细胞内顺铂的药物平均含量有关。该研究为耐药卵巢癌的治疗提供新的思路,但是联合用药降低卵巢癌对顺铂耐药的机制需要进一步深入研究。

参考文献

[1] Siegel R L , Miller K D , Fuchs H E , et al. Cancer statistics , 2021 [J]. CA Cancer J Clin , 2021 , 71( 1 ) : 7 - 33.

[2] Kuroki L , Guntupalli S R. Treatment of epithelial ovarian cancer [J]. BMJ , 2020: m3773.

[3] 卢淮武,许妙纯,张钰豪,等.《2021 NCCN 卵巢癌包括输卵管癌及原发性腹膜癌临床实践指南(第 1 版)》解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021 , 37( 4 ) : 457 - 66.

[4] 周咪雯,张乐吟,孙磊涛,等. 中医药逆转化疗耐药的新兴策略和有效途径[J]. 时珍国医国药, 2021 , 32( 4 ) : 927 - 30.

[5] Wang J , Song Y , Zhang M , et al. A liposomal curcumol nano-composite for magnetic resonance imaging and endoplasmic reticulum stress-mediated chemotherapy of human primary ovarian cancer[J]. J Mater Chem B , 2019 , 7( 18 ) : 2938 - 47.

[6] 张铭勋,张晨晨,蔡泽宇,等. 脂质体载术醇联合顺铂抗人卵巢癌细胞作用和机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021 , 56( 9 ) : 1430 - 35.

[7] Tendulkar S , Dodamani S. Chemoresistance in ovarian cancer: prospects for new drugs [J]. Anticancer Agents Med Chem , 2021 , 21( 6 ) : 668 - 78.

[8] Robey R W , Pluchino K M , Hall Matthew D , et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer [J]. Nat Rev Cancer , 2018 , 18( 7 ) : 452 - 64.

[9] Gao B , Yang F , Chen W , et al. Multidrug resistance affects the prognosis of primary epithelial ovarian cancer [J]. Oncol Lett , 2019 , 18( 4 ) : 4262 - 9.

[10] Wei W , Rasul A , Sadiqa A , et al. Curcumol: from plant roots to cancer roots [J]. Int J Biol Sci , 2019 , 15( 8 ) : 1600 - 9.

[11] Keyvani G S , Khorsandi K , Gul Asma. Curcumin effect on cancer cells' multidrug resistance: An update [J]. Phytother Res , 2020 , 34( 10 ) : 2534 - 56.

[12] Huang X , Qian J , Li L , et al. Curcumol improves cisplatin sensitivity of human gastric cancer cells through inhibiting PI3K/AKT pathway [J]. Drug Dev Res , 2020 , 81( 8 ) : 1019 - 25.

[13] Zeng C , Fan D , Xu Y , et al. Curcumol enhances the sensitivity of doxorubicin in triple-negative breast cancer via regulating the miR-181b-2-3p-ABCC3 axis [J]. Biochem Pharmacol , 2020 , 174: 113795.

[14] Gerina-Berzina A , Hasnere S , Kolesovs A , et al. Determination of cisplatin in human blood plasma and urine using liquid chromatography-mass spectrometry for oncological patients with a variety of fatty tissue mass for prediction of toxicity [J]. Exp Oncol , 2017 , 39( 2 ) : 124 - 30.

## Mechanism of liposome curcumol reversing cisplatin resistance in ovarian cancer

Yang Jiezheng<sup>1</sup> , Wang Jing<sup>2</sup> , Song Yonghong<sup>4</sup> , Tang Qin<sup>1</sup> , Wu Qiang<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Pathology , Anhui Medical University , Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology , <sup>3</sup>Dept of Pathology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022; <sup>4</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering , Hefei University of Technology , Hefei 230009)

**Abstract Objective** To investigate the effect and mechanism of liposome curcumol ( LC ) on cisplatin resistance

# 白藜芦醇改善野百合碱所致大鼠肝损伤机制的初步研究

卫霞<sup>1,2</sup>, 宋育林<sup>1,2</sup>, 涂倩倩<sup>1,2</sup>, 徐魁<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨沉默信息调节因子1(SIRT1)激动剂白藜芦醇对野百合碱所致肝窦阻塞综合征的保护作用及其可能机制。方法 32只雄性SD大鼠随机分为对照组(8只)、野百合碱组(12只)和白藜芦醇组(12只)。野百合碱组和白藜芦醇组给予野百合碱(160 mg/kg)单次灌胃;白藜芦醇组于野百合碱灌胃前1 d开始每天给予白藜芦醇溶液(30 mg/kg)腹腔注射。在给予野百合碱2 d后结束实验。检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)和肝组织内谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平,观察肝脏病理变化,应用Western blot检测肝脏SIRT1、HIF-1 $\alpha$ 和VEGF蛋白的表达水平。结果 与对照组相比,野百合碱组大鼠单次灌胃后血清ALT、AST及TBil有所升高(均 $P < 0.01$ ),肝脏GSH水平降低( $P < 0.01$ )、MDA升高( $P < 0.01$ );肝脏组织病理学可见肝细胞排列紊乱,并出现变性、坏死,肝窦淤血扩张,中央静脉内皮损伤,SIRT1蛋白的表达水平降低( $P < 0.01$ ),HIF-1 $\alpha$ 和VEGF蛋

白的表达水平有所增加( $P < 0.01$ )。使用白藜芦醇干预后,血清ALT、AST、TBil指标下降( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),肝脏GSH水平升高( $P < 0.01$ ),MDA降低( $P < 0.01$ ),并可以抑制野百合碱引起的肝脏病理损伤,SIRT1蛋白的表达水平升高( $P < 0.01$ ),HIF-1 $\alpha$ 和VEGF蛋白表达下调( $P < 0.01$ )。结论 白藜芦醇可以改善野百合碱引起的大鼠肝窦阻塞综合征,其机制与激活SIRT1、抑制HIF-1 $\alpha$ /VEGF信号通路及抗氧化应激相关。

**关键词** 野百合碱;肝损伤;白藜芦醇;SIRT1;HIF-1 $\alpha$ ;氧化应激;大鼠

中图分类号 R 575; R 99

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1111-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.018

在中国,土三七等中草药是肝窦阻塞综合征(hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS)的主要致病因素<sup>[1]</sup>。HSOS确切的发病机制不明,目前认为谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭<sup>[2]</sup>、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)<sup>[3]</sup>等均与其相关。白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种多酚类物质,多种植物中存在,被认为是沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)的一种有效的激活剂<sup>[4]</sup>,具有激活SIRT1、抗氧化、抗炎等多个方面的作用<sup>[4-5]</sup>,并在多种肝脏疾病中具有保护肝脏作用<sup>[5]</sup>。白藜芦醇被证实能够通过抑制HIF-1 $\alpha$ /VEGF信号通路来减轻肝脏缺

2022-05-18 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2016A337);2016-2018年安徽高校科研平台创新团队建设项目(编号:皖教秘科[2015]49号)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽省消化系统疾病重点实验室,合肥 230022

<sup>3</sup>安徽医科大学附属六安医院消化内科,六安 237016

作者简介:卫霞,女,硕士研究生;

宋育林,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: ylsongcn@163.com

of human ovarian cancer cells. **Methods** Ovarian cancer cisplatin resistant cell line SKOV3/DDP was used. Cells were divided into five groups: blank control group, negative control group (containing 12.5  $\mu\text{g/ml}$  liposome), cisplatin group (4  $\mu\text{g/ml}$ ), LC group (20  $\mu\text{g/ml}$ ), and combined group (cisplatin (4  $\mu\text{g/ml}$ ) + LC (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Cell proliferation was detected by CCK8 assay, the content of cisplatin in cells was detected by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS), and apoptosis was detected by flow cytometry. The level of P-glycoprotein (P-gp) mRNA was detected by qRT-PCR and the expression of P-gp protein was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The cell proliferation ability of the combination group was the lowest while the apoptosis rate was the highest ( $P < 0.05$ ) among the groups. HPLC-MS showed that the content of cisplatin in combined group was higher than that in cisplatin group ( $P < 0.05$ ). P-gp mRNA and protein in the combined group were down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** LC can reduce cisplatin resistance of human ovarian cancer cell line SKOV3/DDP by inhibiting the expression of P-gp.

**Key words** ovarian cancer; cisplatin resistance; liposome curcumol; P-gp