

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.34.002

紫草素逆转人肺腺癌顺铂耐药的实验研究*

周娟¹, 钟询龙¹, 黄素超², 郑宏明², 卢琳琳²(1. 广州医科大学附属第二医院药学部, 广州 510260; 2. 广州中医药大学
国际中医药转化医学研究所, 广州 510006)

[摘要] **目的** 探讨紫草素对人肺腺癌 A549 细胞顺铂耐药的逆转作用。**方法** 用 MTT 法分别检测紫草素对 A549 细胞及 A549/DDP 顺铂耐药细胞的细胞毒性, 建立 A549/DDP 顺铂耐药移植瘤裸鼠模型, 考察紫草素对耐顺铂 A549 细胞的体内生长抑制率, 采用逐代耐药筛选实验, 考察紫草素抗肿瘤过程中是否会产生类顺铂样耐药反应。**结果** 较 A549 细胞($IC_{50}=2.27 \mu\text{mol/L}$), 紫草素对 A549/DDP 顺铂耐药细胞具有更高的杀伤效力($IC_{50}=0.95 \mu\text{mol/L}$)。同时, 紫草素与顺铂组相比, 可有效阻滞 A549/DDP 耐药细胞的体内生长(抑瘤率 35.91%, $P<0.05$), 且与顺铂联合给药时, 更能显著增加 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性(抑瘤率: 联合组 46.19% vs. 顺铂组 13.98%, $P<0.01$)。而相比于顺铂易产生耐药性, 紫草素长时间干预并没有显著增加 A549 细胞耐紫草素的细胞毒性。**结论** 体内、外实验均表明紫草素可有效逆转人肺腺癌顺铂耐药性且无继发耐药。

[关键词] 紫草素; 肺肿瘤; 药物耐受**[中图法分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)34-4327-04**Experimental study of shikonin reversing cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma***ZHOU Juan¹, ZHONG Xunlong¹, HUANG Suchao², ZHONG Hongming², LU Linlin²

(1. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China; 2. International Institute for Translational Medicine of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

[Abstract] **Objective** To study the reverse effect of shikonin (SHK) for the cisplatin (DDP) resistance of human lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods** The cytotoxicity of SHK to A549 cells and A549/DDP resistance cells was detected by MTT assay respectively. The xenograft nude mouse model of A549/DDP DDP-resistance was established. The in vivo growth inhibition rate of SHK on DDP resistant A549 cells was investigated. The successive generation drug resistance screening test was adopted to investigate whether SHK producing the cisplatin-like resistance reaction. **Results** Compared with A549 cells ($IC_{50}, 2.28 \mu\text{mol/L}$), SHK had higher killing effectiveness on A549/DDP DDP resistance cells ($IC_{50}=0.95 \mu\text{mol/L}$). Meanwhile, compared with the DDP group, SHK could effectively block the in vivo growth of A549/DDP resistance cells (tumor inhibition rate 35.91%, $P<0.05$). Moreover, the combined medication with DDP could more significantly increase the sensitivity of A549/DDP cells on DDP (tumor inhibition rate: combined group 46.19% vs. DDP group 13.98%, $P<0.01$). Compared with DDP, SHK was easy to generate the drug resistance, and the long time intervention of SHK did not significantly increase the cytotoxicity of A549 cells resistant to SHK. **Conclusion** The in vivo and in vitro experiments show that SHK can effectively reverse the DDP-resistance of lung adenocarcinoma, moreover has no secondary drug resistance.

[Key words] shikonin; lung neoplasms; drug resistance

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 以顺铂(DDP)为代表的铂类联合其他化疗药是临床治疗肺癌的一线方案^[1], 多数患者在化疗初期对药物敏感, 表现为肿瘤体积缩小, 临床症状明显减轻, 但后期效果不佳, 肿

瘤细胞的多药耐药性是导致肺癌化疗失败的主要原因之一^[2]。因此, 临床迫切需要能逆转肿瘤细胞耐药的药物。

紫草为紫草科植物新疆紫草或内蒙紫草的干燥

根,是我国常用中药材,味甘、咸,性寒,归心、肝经,具有清热凉血,活血解毒,透疹消斑等功效^[3]。紫草素(Shikonin,SHK)是一种萘醌类化合物,为紫草的主要有效成分之一,紫草素具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、加速伤口愈合和增强免疫等功效^[4]。目前,紫草素的抗肿瘤作用是研究的热点,紫草素可以通过抑制肿瘤细胞增殖,改变细胞周期,并诱导细胞凋亡等途径对多种肿瘤细胞产生作用^[5]。研究表明紫草素可以显著抑制肺腺癌 A549 细胞增殖,诱导细胞凋亡^[6-7],但紫草素对肺癌顺铂耐药的影响报道相对较少,本研究通过体内体外两方面考察紫草素对人肺癌顺铂耐药的作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株与实验动物 A549 细胞、A549/DDP 来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。SPF 级 BALB/c-nude 雌性小鼠(46 周,16~20 g),购买于中山大学动物实验中心[许可证号:SCXK(粤)2016-0029],饲养于广州中医药大学国际中医药转化医学院研究所 SPF 级实验动物中心[许可证号:SYXK(GZ)2014-0144]。

1.2 仪器与试剂 紫草素购自成都曼思特生物科技有限公司,纯度大于或等于 98%;顺铂购自山东齐鲁制药;环磷酰胺、MTT、玉米油购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 A549、A549/DDP 细胞用含 10% FBS 和 1% 双抗的 RPMI-1640 完全培养基培养,置于 5%CO₂、37℃ 饱和湿度恒温培养箱中常规培养,隔天更换培养基。

1.3.2 MTT 法检测紫草素对 A549、A549/DDP 细胞毒性影响

1.3.2.1 细胞准备 取生长状态良好的细胞胰酶消化、离心、加培养基混匀,按每孔 2 000 个细胞,把细胞接种到 96 孔板中,置培养箱中培养过夜,待细胞生长状态恢复后,再进行实验。

1.3.2.2 设计药物浓度 紫草素按 0、1、2、4、6 μmol/L 设定给药浓度。

1.3.2.3 给药处理 移除原有培养基,按实验设定药物浓度,每孔加入 200 μL 含药完全培养基,置培养箱中继续培养 72 h。

1.3.2.4 细胞毒性检测 给药结束后弃除培养基,加入用 PBS 配制的 MTT 溶液(0.5 mg/mL),每孔 100 μL,37℃ 恒温避光孵育 4 h;接着弃去 MTT 溶液,加入 DMSO(每孔 150 μL),置微孔板振荡器上快速振荡 10 min、混匀,随后把 96 孔板置于多功能酶标仪中检测其吸光度 OD 值(测定波长为 490 nm)。

1.3.2.5 检测得到的 OD 值,使用软件 GraphPad

Prism5 制作生长抑制曲线,并计算药物半数抑制浓度 IC₅₀ 值。

1.3.3 裸鼠异种移植瘤模型的建立

1.3.3.1 动物处理及饲养 BALB/c-nude 小鼠购回后,先在饲养的 SPF 级动物实验中心适应环境 1 周后,开始移植瘤模型的构建。

1.3.3.2 肿瘤细胞的移植 将处于对数生长期,且生长状态良好的 A549/DDP 细胞消化后,用无血清的 1640 培养基混悬,并用台盼蓝染色后计算活细胞数,混悬细胞,按 3.0×10⁶/只将混悬好的细胞注射到裸鼠的右前肢腋下。

1.3.3.3 接瘤后观察指标 肿瘤细胞移植后,每天观察肿瘤细胞在体内的生长的情况,并用游标卡尺测量肿瘤大小[肿瘤体积的计算公式:TV(mm³)=(L×W²)/2],同时记录下裸鼠的体质量,并观察其精神状态、活动、饮食和大小便情况等。

1.3.4 紫草素对 A549/DDP 裸鼠异种移植瘤的影响

1.3.4.1 实验分组与给药 待肿瘤体积均达到 50~100 mm³ 时,将裸鼠按照肿瘤体积和体质量分为 5 组:玉米油空白对照组(control)、环磷酰胺 25 mg/kg 阳性对照组(CTX)、顺铂 2 mg/kg 组(DDP)、紫草素 2 mg/kg 组(SHK)、顺铂 2 mg/kg+紫草素 2 mg/kg 混合组(DDP+SHK),每组 8 只。根据前期紫草素在体内抗肺腺癌药效实验结果^[8],给药方案予每天 1 次,按上述剂量连续 23 d 腹腔注射相应药物。

1.3.4.2 给药期间检测指标 观察肿瘤细胞在体内的生长情况,并同时使用游标卡尺测量肿瘤大小,记录下裸鼠的体质量和肿瘤体积大小(3 天/次),并观察其精神状态、活动、饮食和大小便的情况。

1.3.4.3 评价指标 结束 23 d 的给药后,解剖小鼠,分离取出肿瘤组织及心、肝、脾、肺、肾等主要器官,并分别进行称重、样品保存。

1.3.5 A549 对顺铂及紫草素的耐药指数评价

1.3.5.1 细胞准备 A549 细胞接种于 75 flask,培养过夜,待细胞生长状态恢复,再进行后续实验。

1.3.5.2 药物处理 移除原有培养基,分别加入含顺铂(5 μmol/L)或紫草素(2 μmol/L)完整培养基各 10 mL,置培养箱中继续培养。

1.3.5.3 耐药培养 待细胞长至 75 flask 约 80% 时,胰酶消化,使用正常完全培养基按 1:3 传代。重复上述步骤,使 A549 分别反复长期暴露于含顺铂(5 μmol/L)或紫草素(2 μmol/L)的完全培养基,以获得 A549 顺铂耐药株或 A549 紫草素耐药株。

1.3.5.4 耐药性评价 分别于长期药物暴露的第 0、5、16、20 代,使用 MTT 法,检测顺铂(0、2、4、6、8、10、20 μmol/L)和紫草素(0、1、2、4、6、8 μmol/L)对细胞

株活力影响。使用软件 Graph Pad Prism5 计算药物半数抑制浓度 IC_{50} 值。利用耐药指数评价细胞耐药性: 耐药指数(RI) = IC_{50} (第 X 代)/ IC_{50} (第 0 代)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫草素对人肺腺癌 A549/DDP 耐药性的逆转作用 紫草素分别干预 A549 细胞、A549/DDP 耐药细胞, MTT 法检测 A549 细胞 IC_{50} 值为 $2.27 \mu\text{mol/L}$, A549/DDP 耐药细胞株的 IC_{50} 为 $0.95 \mu\text{mol/L}$, 实验结果表明, A549 顺铂耐药株对紫草素不具有耐受性, 相反, 紫草素对 A549 顺铂耐药细胞具有更高的杀伤效力, 见图 1。

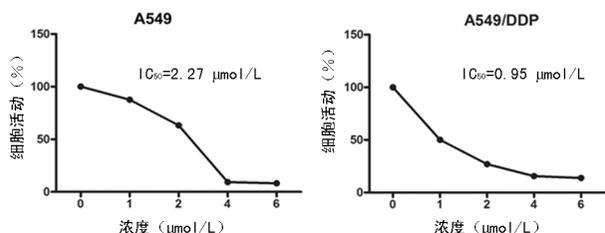
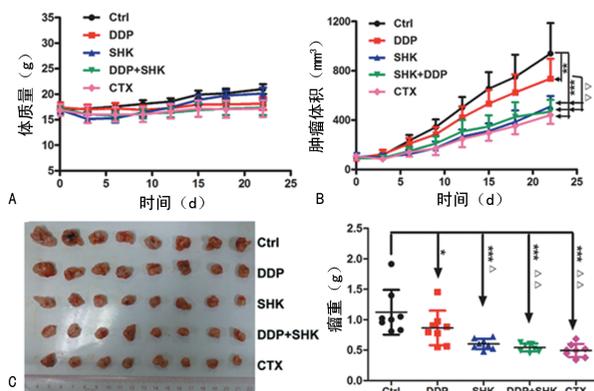


图 1 MTT 法检测紫草素对 A549 细胞、A549/DDP 耐药细胞的细胞活力

2.2 紫草素对 A549/DDP 裸鼠异种移植瘤的抑制作用 建立 A549/DDP 顺铂耐药移植瘤裸鼠模型, 按“1.3.4”项下方法分 5 组考察紫草素 (SHK, 2 mg/kg) 对耐顺铂 A549 细胞的体内生长抑制率。与对照组相比, 给药期间小鼠的体质量无明显变化, 且各组差异不大 (图 2A)。与对照组相比, DDP、SHK、DDP + SHK 以及 25 mg/kg CTX 组均可以抑制肿瘤的生长, 肿瘤体积及重量如图 2B、图 2C), 其中, 紫草素可有效阻滞 A549/DDP 耐药细胞的体内生长 (抑瘤率 35.91%, $P < 0.05$), 且与顺铂联合给药时, 更能显著增加 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性 (联合组抑瘤率 46.19% vs. 顺铂给药组抑瘤率 13.98%, $P < 0.01$)。解剖各组小鼠取常规脏器心、肝、脾、肺、肾, 检测脏器指数, 结果显示各组脏器指数无明显差异 (图 3)。

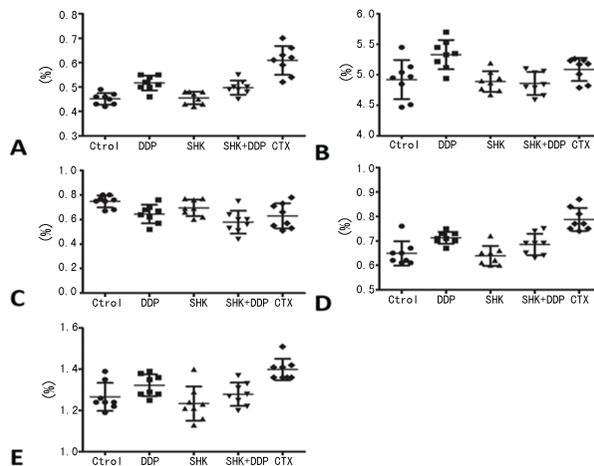
2.3 紫草素耐药指数评价 在上述试验中, 笔者发现紫草素对于 A549/DDP 的敏感性较单纯的 A549 更高, 在体内可抑制耐药细胞生长, 且在体内与顺铂联合给药时, 更能显著增加 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性。但长期使用紫草素是否会产生类顺铂样耐药性尚未清楚, 本研究以顺铂为阳性对照, 采用逐代耐药筛选实验, MTT 法检测, 结果显示经顺铂 ($5 \mu\text{mol/L}$) 处理的 A549 敏感期 IC_{50} 值为 $9.08 \mu\text{mol/L}$, 培养至第 20 代, IC_{50} 值为 $30.38 \mu\text{mol/L}$, 计算耐药指数 RI 为 3.35 (表 1), 且细胞存活率呈逐代上升趋势

(图 4A), 说明 A549 细胞对顺铂逐渐产生耐药性。相反, 经紫草素 ($2 \mu\text{mol/L}$) 干预的 A549 细胞耐药指数呈现下降的趋势 (表 1), 细胞存活率呈逐代下降趋势 (图 4B) 表明紫草素无类顺铂样耐药反应。



A: A549/DDP 耐药移植瘤裸鼠在给药期间体质量 ($n=8$); B: 药物干预后各组肿瘤组织体积比较; C: 肿瘤组织照片及其重量; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, 与对照组比较, Δ : $P < 0.05$, $\Delta\Delta$: $P < 0.01$, 与顺铂组比较

图 2 紫草素对 A549/DDP 裸鼠异种移植瘤的抑制作用



A: 心; B: 肝; C: 脾; D: 肺; E: 肾

图 3 药物干预后各组移植瘤裸鼠脏器指数评估

表 1 顺铂及紫草素对 A549 肺腺癌细胞耐药指数评价

药物	细胞株	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	耐药指数
DDP	A549	9.08	1.00
	A549-clone 5	13.50	1.49
	A549-clone 10	14.14	1.56
	A549-clone 16	23.31	2.57
	A549-clone 20	30.38	3.35
SHK	A549	2.28	1.00
	A549-clone 5	1.17	0.75
	A549-clone 10	2.06	0.91
	A549-clone 16	1.61	0.71
	A549-clone 22	2.19	0.96

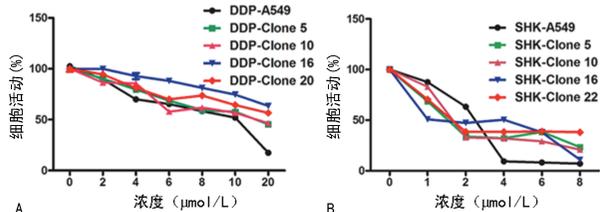


图 4 MTT 法检测长期顺铂和紫草素
A: 顺铂 5 $\mu\text{mol/L}$; B: 紫草素 2 $\mu\text{mol/L}$ 干预下 A549 细胞的存活率

图 4 MTT 法检测长期顺铂和紫草素

3 讨 论

在威胁人类生命健康的各种恶性肿瘤中,肺癌的发病率和死亡率一直居高不下,其主要的的原因在于其易发性、耐药性和高转移性^[8]。肺癌细胞对化疗药物产生耐药是影响疗效和预后的重要因素^[2],因此,铂类耐药是临床治疗肺癌的难题,期望能找到有效的抑制剂,与铂类药物联合使用提高疗效。紫草素对多种肿瘤细胞具有杀伤作用且可增加抗肿瘤治疗敏感性^[9]。关于紫草素对肺腺癌化疗逆转耐药性的研究鲜有报道,本文通过体内、体外相结合实验证实,紫草素在不产生细胞毒性条件下能够逆转人肺腺癌耐药细胞 A549/DPP 对顺铂的耐药性,紫草素与顺铂联合用药后,增强顺铂对肺腺癌耐药细胞株的杀伤作用,提高耐药细胞株对顺铂的敏感性。

综上所述,紫草素具有逆转肺腺癌顺铂耐药作用,而且具有目前临床药物所缺乏的高效、安全性较

好的优势,有很大的研究价值。

参考文献

- [1] 支修益,石远凯,于金明,等. 中国原发性肺癌诊疗规范(2015 年版)[J]. 中华肿瘤杂志,2015,37(1):67-78.
- [2] 张亚娟,常德,张健鹏,等. 肺癌化疗中铂类耐药的研究进展[J]. 中国医学科学院学报,2017,39(1):150-155.
- [3] 黄泰康. 现代本草纲目(下册)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000:2805.
- [4] 夏玲红,崔岚,王可耀,等. 紫草素及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 医药导报,2011,30(3):339-341.
- [5] 黄河,刘宗潮. 紫草素及其衍生物的抗肿瘤作用[J]. 肿瘤防治杂志,2005,12(1):75-78.
- [6] 孟燕,梁永杰. 紫草素诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡及其机制的研究[J]. 同济大学学报(医学版),2015,36(6):40-45.
- [7] 郑宏明. 紫草素诱导非小细胞肺癌衰老及分子机制[D]. 广州:广州中医药大学,2017.
- [8] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer,2015,136:359.
- [9] 唐旭霞,叶再元. 紫草素诱导肿瘤细胞死亡的研究进展[J]. 浙江医学,2015(3):265-268.

(收稿日期:2018-04-22 修回日期:2018-08-26)

(上接第 4326 页)

参考文献

- [1] FUNDER J W, CAREY R M, MANTERO F, et al. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an endocrine society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab,2016,101(5):1889-1916.
- [2] SANG X J, JIANG Y, WANG W Q, et al. Prevalence of and risk factors for primary aldosteronism among patients with resistant hypertension in China[J]. J Hypertens,2013,31(7):1465-1471.
- [3] 中华医学会内分泌学会肾上腺学组. 原发性醛固酮增多症诊断治疗的专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志,2016,32(3):188-195.
- [4] 宋颖,何文雯,杨淑敏,等. 化学发光法测定血浆醛固酮浓度/肾素浓度比值筛查原发性醛固酮增多症的价值[J]. 中华内科杂志,2016,55(1):6-10.
- [5] GIACCHETTI G, MULATERO P, MANTERO F, et al. Primary aldosteronism, a major form of low renin hypertension: from screening to diagnosis[J]. Trend Endocrinol

Metab,2008,19(3):104-108.

- [6] SONG Y, YANG S M, HE W W, et al. Confirmatory tests for the diagnosis of primary aldosteronism: a prospective diagnostic accuracy study[J]. Hypertension,2018,71(1):118-124.
- [7] WILLIAMS T A, BURRELLO J, SECHI L A, et al. Computed tomography and adrenal venous sampling in the diagnosis of unilateral primary aldosteronism[J]. Hypertension,2018,72(3):641-649.
- [8] YOUNG W F, STANSON A W, THOMPSON G B, et al. Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism[J]. Surgery,2004,136(6):1227-1235.
- [9] ROSSI G P, AUCHUS R J, BROWN M, et al. An expert consensus statement on use of adrenal vein sampling for the subtyping of primary aldosteronism[J]. Hypertension,2014,63(1):151-160.
- [10] 郭旭东,王翰博,蒋绍博,等. 腹腔镜肾上腺全切除术与部分切除术治疗肾上腺醛固酮腺瘤的对比研究[J]. 山东大学学报(医学版),2011,49(11):146-150.

(收稿日期:2018-11-13 修回日期:2018-11-22)