

Cajanol 通过抑制 P-gp 的表达来逆转卵巢癌细胞的紫杉醇耐药性

张 鑫¹ 杨海嵘¹ 梁 健² 郭鸣齐¹ 刘美微¹ 郭力锐¹

1. 齐齐哈尔市第一医院妇一科 (南院), 黑龙江 齐齐哈尔 161000

2. 齐齐哈尔市第一医院乳腺科, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

【摘要】 目的 观察 Cajanol 对紫杉醇耐药的卵巢癌细胞株活性的影响, 探讨 Cajanol 抑制卵巢癌耐药细胞株细胞增殖的可能机制。方法 研究采用人卵巢癌细胞系 A2780 及紫杉醇耐药的人卵巢癌细胞系 A2780/Taxol; 采用荧光定量 PCR、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、蛋白免疫印迹等方法研究了 Cajanol 逆转紫杉醇耐药的作用及机制。结果 MTT 法显示 Cajanol 抑制 A2780/Taxol 卵巢癌耐药株的细胞增殖, 且呈浓度依赖性; ELISA 法结果提示 Cajanol 可抑制 ABCB1 及通透性糖蛋白 (P-gp) 的转录与翻译; 蛋白免疫印迹法提示 Cajanol 可抑制 PI3K/AKT/NF- κ B/P-gp 信号通路。结论 Cajanol 可有效抑制卵巢癌耐药细胞株的增殖, 其作用机制可能与通过 PI3K/Akt/NF- κ B 通路来下调 P-gp 的表达有关。

【关键词】 Cajanol; 卵巢癌; 化疗耐药; 紫杉醇; P-gp

Cajanol reverses paclitaxel resistance in ovarian cancer cells by inhibiting the expression of P-gp

ZHANG Xin¹ YANG Hairong¹ LIANG Jian² GUO Mingqi¹ LIU Meiwei¹ GUO Lirui¹

1. the First Department of Women of the First Hospital of Qiqihar City (South Hospital), 161000 Qiqihar, Heilongjiang Province, China

2. Breast Department of the First Hospital of Qiqihar, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China

Abstract: Objective: To observe the effect of Cajanol on the activity of paclitaxel resistant ovarian cancer cell lines and explore the possible mechanism of Cajanol inhibiting the proliferation of ovarian cancer resistant cell lines. **Method:** The study used human ovarian cancer cell line A2780 and paclitaxel resistant human ovarian cancer cell line A2780/Taxol; The effect and mechanism of Cajanol on reversing paclitaxel resistance were studied using methods such as fluorescence quantitative PCR, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Western blotting. **Result:** MTT assay showed that Cajanol inhibited cell proliferation of A2780/Taxol resistant ovarian cancer cells in a concentration dependent manner; The ELISA results suggest that Cajanol can inhibit the transcription and translation of ABCB1 and permeability glycoprotein (P-gp); Protein immunoblotting suggests that Cajanol can inhibit PI3K/AKT/NF- κ B/P-gp signaling pathway. **Conclusion:** Cajanol can effectively inhibit the proliferation of ovarian cancer drug-resistant cell lines, and its mechanism of action may be related to PI3K/Akt/NF- κ B pathway is involved in downregulating the expression of P-gp.

Key Words: Cajanol; Ovarian cancer; Chemotherapy resistance; Paclitaxel; P-gp

卵巢癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 其相关死亡率在全球妇科恶性肿瘤中排名第五^[1]。化疗是卵巢癌治疗的首选, 但肿瘤细胞容易产生耐药性^[2]。研究表明, 紫杉醇耐药涉及多种机制, 其中包括多重耐药 (MDR) 蛋白的增加^[3]。ABC 转运蛋白如 MDR1/P-gp 的过度表达被认为是耐药性的经典机制。P-gp 由 ABCB1 基因编码, P-gp 启动子序列含有一个 κ B 位点, 可被核因子 κ B (NF- κ B) 识别和激活^[4]。有报道称 PI3K/Akt 信号转导通路参与了 NF- κ B 介导的 MDR^[5]。也有报道称抑制 EGFR/ERK/Akt/NF- κ B 通路可通过下调 P-gp 逆转耐药性^[6]。这表明使用合适的抑制剂来抑制 NF- κ B 介导的 P-gp 过表达是逆转

MDR 的可行方法。

植物的天然产物是抗肿瘤药物的有效来源, 其中一些已被证明可以调节 MDR^[7]。许多类型的天然产物, 如类黄酮、生物碱和萜烯, 已被证明可抑制 P-gp^[8]。Cajanol 是一种异黄酮酮化合物, 具有多种药理作用, 包括抗菌、抗真菌、抗疟疾和抗肿瘤活性^[9]。在这项研究中, 我们使用细胞增殖、荧光定量 PCR、酶联免疫吸附试验等首次证明了 Cajanol 对 P-gp 的抑制作用。我们研究了 Cajanol 对 P-gp 表达和功能的影响, 我们还研究了 Cajanol 通过 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路介导 P-gp 蛋白的调节作用。目的是进一步开发用于逆转卵巢癌耐药

性的Cajanol, 并为Cajanol的潜在临床应用提供证据。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养 人卵巢癌细胞株A2780和紫杉醇耐药卵巢癌细胞株A2780/Taxol购自上海中乔新舟生物科技有限公司。细胞培养在RPMI-1640培养基中, 培养基中添加10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素。培养条件为温度37℃, 5%CO₂。A2780/Taxol细胞在含800 ng/mL紫杉醇的培养基中培养, 实验前2周切换至非药物培养基。

1.2 MMT法检测细胞活力 消化细胞后以每孔5000个细胞接种到96孔板, 每孔200 μL。细胞贴壁后填加不同处理条件, 每孔加MTT配置溶液20 μL。继续孵育4h, 终止培养, 弃上清液。每孔加150 μL DMSO, 振荡10min。选择570nm波长, 在酶标仪上测定各孔吸光度, 以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.3 ELISA法检测蛋白含量 空白孔加标准品和标本稀释液, 其余相应孔中加标本或不同浓度标准品(100 μL/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37℃孵育90min。洗板后空白孔加生物素化抗体稀释液, 其余孔加入生物素化抗体工作液(100 μL/孔)。封板胶纸封闭反应孔, 37℃下孵育60min。再次洗板后空白孔加酶结合物稀释液, 其余孔加入工作液(100 μL/孔)。37℃避光孵育30min。充分洗板后加入显色底物(TMB)100 μL/孔, 避光37℃孵育15min。加入终止液100 μL/孔, 混匀后即刻测量OD450值。

1.4 蛋白免疫印迹 15 μg蛋白样品加入SDS-PAGE胶孔中, 80V下电泳至蛋白样品跑出浓缩胶后, 调整为120V, 直至样品跑到终点。使用95%的酒精激活PVDF膜, 以300mA转膜90min。转膜后置于5%脱脂奶粉封闭液中, 封闭2h。根据说明书要求稀释一抗, 一抗4℃孵育过夜。充分洗涤条带, 室温孵育二抗2h。将ECL发光液均匀的涂在条带上显色, 曝光机曝光。

1.5 实时荧光定量 PCR 用RNA提取试剂盒(Takara)提取总RNA, 用逆转录试剂盒(Takara)进行逆转录。采用Primer Premier 5.0设计实时定量PCR引物。SYBR®Premix Ex Taq™II试剂盒(Takara)用于实时定量检测。

1.6 乳鼠成瘤实验 A2780/Taxol细胞在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养。取对数生长期细胞制备 1×10^5 /mL的悬液。将细胞悬液接种在裸鼠右侧腋下靠近背部的皮下, 药物于肿瘤植入成功后第1、8和15天通过尾静脉注射, 每3d观察小鼠体重、身体状况及移植瘤生长情况, 连续24d。

1.7 统计分析 本研究实验数据采用软件SPSS 22.0以及GraphPad Prism5.0进行统计分析, 采用均值±标准误(Mean±SEM)来描述连续性变量。当连续性变量为正态分布时, 使用t检验评价两组间的差异。正态分布的3组及3组以上的变量之间的比较采用单因素方差分析(ANOVA), 并使用Bonferroni法进行组间比较。P<0.05(双侧)存在统计学意义。

2 结 果

2.1 Cajanol对A2780/Taxol紫杉醇耐药株细胞增殖的影响 用不同浓度的紫杉醇分别处理A2780及A2780/Taxol细胞72h, 采用MTT法计算两组的IC50值, 结果提示低浓度的紫杉醇可明显抑制A2780细胞的增殖, 其对应的IC50值相对较低, 为(1.42±0.14) μM, 而A2780/Taxol紫杉醇耐药株的IC50值为(43.72±0.94) μM, 显示了明显的耐药性。将Cajanol与紫杉醇及2、4、8或16 μM Cajanol联合处理, 其对应的IC50值为(1.30±0.10) μM、(1.27±0.11) μM、(1.28±0.09) μM、(1.24±0.11) μM, 各组之间无明显差异。而将A2780/Taxol细胞与紫杉醇及2、4、8或16 μM Cajanol联合处理, 得到的IC50值分别为(30.53±0.87) μM、(19.67±1.08) μM、(8.54±0.72) μM和(8.21±0.84) μM, 提示Cajanol可有效改善A2780/Taxol细胞对紫杉醇的耐药性, 且在浓度达到8 μM前呈浓度依赖性(见表1及图1)。

表1 MTT法检测Cajanol对A2780/Taxol紫杉醇耐药株细胞增殖的影响

药物及浓度	IC50 (μm)	
	A2780	A2780/Taxol
Paclitaxel	1.42 ± 0.14	43.72 ± 0.94
Paclitaxel+2 μM Cajanol	1.30 ± 0.10	30.53 ± 0.87
Paclitaxel+4 μM Cajanol	1.27 ± 0.11	19.67 ± 1.08
Paclitaxel+8 μM Cajanol	1.28 ± 0.09	8.54 ± 0.72
Paclitaxel+16 μM Cajanol	1.24 ± 0.11	8.21 ± 0.84
Cajanol	30.95 ± 1.02	31.42 ± 0.93

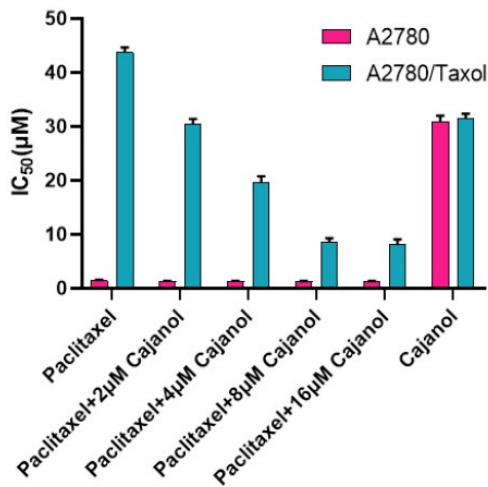


图1 MTT法检测Cajanol对A2780/Taxol紫杉醇耐药株细胞增殖的影响

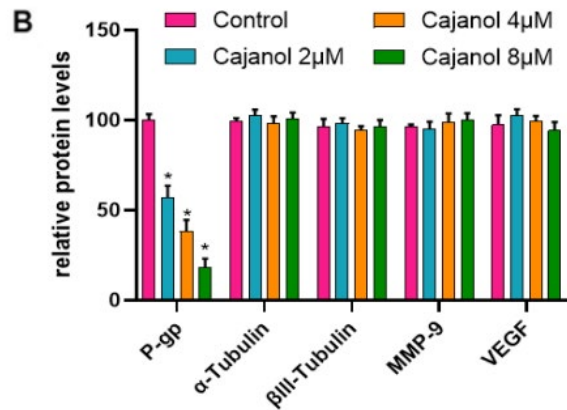
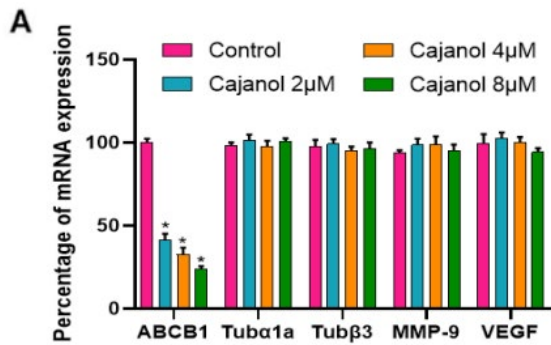


图2 Cajanol可抑制ABCB1 及P-gp的表达

2.3 Cajanol通过调节PI3K/AKT/NF-κB/P-gp信号通路逆转A2780/Taxol紫杉醇耐药株对紫杉醇的敏感性 上述结果表明Cajanol可以抑制A2780/Taxol细胞中ABCB1和P-gp的表达。由于 Akt 和 NF-κB 信号转导与 P-gp 的表达高度相关，因此推测Cajanol可能通过PI3K/AKT/NF-κB信号通路调节 P-gp。通过蛋白免疫印迹检测A2780/Taxol细胞中PI3K、Akt、p-Akt、NF-κB/p65及p-NF-κB/p65各自的表达。

结果显示Cajanol 显著降低了 PI3K、p-Akt、p-NF-κB/p65的表达。进一步使用PI3K抑制剂 LY294002处理 A2780/Taxol细胞并检测PI3K/AKT/NF-κB信号通路，结果提示LY294002处理对 PI3K/AKT/NF-κB信号通路的影响与8 µM Cajanol的结果类似。这些结果表明，Cajanol可以抑制A2780/Taxol细胞中的PI3K/AKT/NF-κB信号通路最终抑制P-gp的转录和翻译（见图3）。

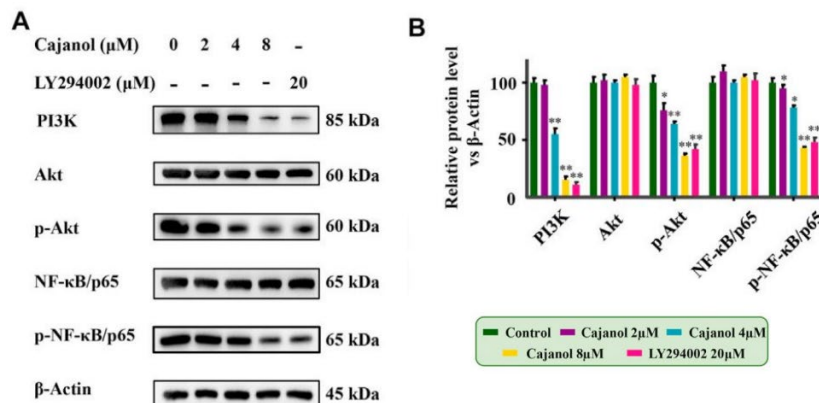


图3 Cajanol可抑制PI3K/AKT/NF-κB/P-gp信号通路

2.4 Cajanol联合紫杉醇在体内实验中抑制紫杉醇耐药肿瘤的增殖 使用A2780/Taxol细胞建立了BABL/c裸鼠肿瘤模型,并根据不同处理方式分为以下四组:对照、Cajanol、紫杉醇和Cajanol+紫杉醇,每组由4只裸鼠组成。治疗24d后,Cajanol+紫杉醇联合组小鼠的肿瘤体积明显小于其他三组;Cajanol+紫杉醇组的最终肿瘤体

积为 $(136.4 \pm 25.4) \text{ mm}^3$,而紫杉醇、Cajanol和对照组的肿瘤体积分别为 $(618 \pm 144) \text{ mm}^3$ 、 $(760 \pm 116) \text{ mm}^3$ 和 $(836 \pm 128) \text{ mm}^3$ (图4A)。并且治疗后,只有Cajanol+紫杉醇组的小鼠体重可以维持在25 g左右,而其他三组小鼠体重不足20 g(图4B)。这些结果表明Cajanol联合紫杉醇可明显抑制紫杉醇耐药肿瘤的增殖。

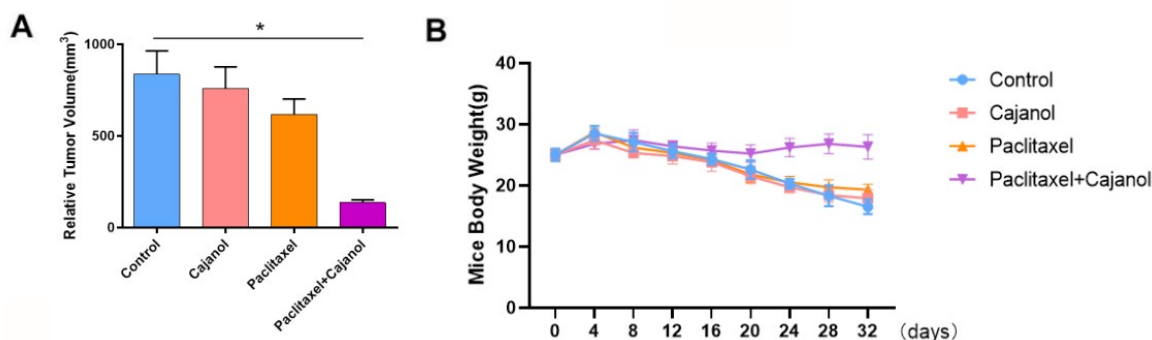


图4 Cajanol联合紫杉醇在体内实验中抑制肿瘤细胞生长及维持小鼠体重

3 讨 论

卵巢癌是病死率高的妇科恶性肿瘤,对于晚期卵巢癌患者,以紫杉醇为基础的化疗是目前的主要治疗方法^[10]。然而,临床治疗过程中往往会出现紫杉醇耐药现象,从而导致治疗失败和肿瘤复发。因此,目前寻找和开发能够逆转这种耐药性的新治疗药物迫在眉睫。

研究发现90%以上的癌症相关死亡是由于MDR,而MDR的主要原因是肿瘤中ABC转运蛋白的过度表达^[11]。其中,多药耐药基因ABCB1被认为是导致紫杉醇耐药的最重要机制之一。ABCB1过表达导致膜P-gp过表达,从而导致胞内紫杉醇浓度降低,从而降低紫杉醇对肿瘤细胞的抑制作用^[12]。微管结构的变化是紫杉醇耐药的另一个原因。 α -微管蛋白(α -tubulin)和 β III-微管蛋白(β III-tubulin)的表达增加会破坏微管的内部稳定性并降低紫杉醇的功效^[13]。此外,基质金属蛋白酶(MMP-9)通过增加血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR)的表达来促进肿瘤血管生成。VEGF的异常表达可能与紫杉醇耐药有关。肿瘤组织通过上调P-gp释放VEGF^[14]。在这项工作中,我们发现,Cajanol可以抑制ABCB1基因和P-gp蛋白的表达,但对VEGF、MMP-9、 α -tubulin或 β III-tubulin的表达没有影响。

研究表明,PI3K/Akt信号通路与MDR密切相关,PI3K/Akt通路激活NF- κ B通路,可能导致MDR1转录增加。当PI3K/Akt通路被激活时,Akt蛋白被磷酸化,导致下游I κ B- α 的磷酸化及其与NF- κ B的解离。NF- κ B核转位并与其识别位点结合后,激活MDR1基因的启动子,诱导其基因表达。阻断PI3K/Akt通路可导致MDR1/P-gp蛋白表达下调,从而逆转MDR^[15]。本研究结果表明,Cajanol可以抑制PI3K的表达和Akt的磷酸化,从而抑制I κ B的磷酸化。因此,Cajanol可以通过PI3K/Akt/NF- κ B通路抑制P-gp的表达。

迄今为止,开发可应用于临床的P-gp抑制剂一直是研究的热点和难点。维拉帕米、硝苯地平、奎尼丁和环孢素A是已开发为第一代抑制剂的P-gp底物,但具有不可接受的副作用。第二代抑制剂,包括右旋帕米和PSC833,在第一代药物的基础上进行了改良,以降低毒性。这些抑制剂是细胞色素P450的底物,它们会干扰化疗药物的药代动力学^[16]。目前还没有合成抑制剂被批准用于临床,这促使研究人员从天然产物中探索新的抑制剂。已有报道阿魏酸可通过NF- κ B下调P-gp的表达^[17]。在本研究中,8 μ M的Cajanol显著恢复了A2780/Taxol细胞对紫杉醇的敏感性,而2mM/kg的Cajanol和0.5mM/kg的紫杉醇显著抑制了小鼠转移瘤的生长。本研究结果将为开发有效的卵巢癌MDR抑制剂提供新思路。

综上,本研究提示 Cajanol 通过抑制 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路,从而减少 P-gp 蛋白的转录和翻译,最终降低紫杉醇外排诱导的 MDR。本报告可能有助于进一步探索 Cajanol 在卵巢癌治疗中的临床应用。

参考文献

- [1] HUANG ML, REN J, Jin ZY, et al. A systematic review and meta-analysis of CT and MRI radiomics in ovarian cancer: methodological issues and clinical utility [J]. *Insights Imaging*, 2023, 14 (3):117.
- [2] WU Y, LI P, ZHU YD, et al. Effectiveness and safety of mono-anlotinib mono therapy or in combination with chemotherapy in platinum-resistant recurrent ovarian cancer: a single-center retrospective study. [J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15 (3):1973-1981.
- [3] LIU Y, WANG YR, GUAN X, et al. Reversal of Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer by the Multitargeted Nanodrug Delivery System Tf-Mn-MOF@Nira@CDDP [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15 (7):26484-26495.
- [4] KODAN A, FUTAMATA R, KIMURA Y, et al. ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs [J]. *FEBS Letters*, 2021, 595 (6):707-716.
- [5] KABOLI PJ, IMANI S, JOMHORI M, et al. Chemoresistance in breast cancer: PI3K/Akt pathway inhibitors vs the current chemotherapy [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2021, 11 (7):5155-5183.
- [6] IYER, AK, SINGH A, GANTA S, et al. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013.65 (13-14):1784-802.
- [7] ENGLE K, KUMAR G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: A recent update. [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 239 (5):114542.
- [8] CHATTERJEE S, DESHPANDE AA, SHEN H. Recent advances in the in vitro and in vivo methods to assess impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein transporters in central nervous system drug disposition [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2023, 44 (1):7-25.
- [9] LUO M, LIU X, ZU Y, et al. Cajanol, a novel anticancer agent from Pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp.] roots, induces apoptosis in human breast cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2010.188 (1):151-60.
- [10] WANG W, LIU M, DING B. Comparison of the short-term efficacy and serum markers between lobaplatin/paclitaxel- And carboplatin/paclitaxel-based adjuvant chemotherapy in patient with ovarian cancer [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, 46 (1):166-172.
- [11] CHOI YH, YU AM. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development [J]. *Curr Pharm Des*.2014, 20 (5):793-807.
- [12] SUN N K, KOHLI A, HUANG S L, et al. Androgen receptor transcriptional activity and chromatin modifications on the ABCB1/MDR gene are critical for taxol resistance in ovarian cancer cells: SUN et al [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 234 (6):8760-8775.
- [13] YU H, WANG HD, QIE A, et al. FGF13 enhances resistance to platinum drugs by regulating hCTR1 and ATP7A via a microtubule-stabilizing effect [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112 (11):4655-4668.
- [14] LI L, BA A C J, DONG P, et al. MDR1/P-gp and VEGF Synergistically Enhance the Invasion of Hep-2 Cells with Multidrug Resistance Induced by Taxol [J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2009, 16 (5):1421-1428.
- [15] CHEN HR, JIA XH, WANG H, et al. Timosaponin A-III reverses multi-drug resistance in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells via downregulation of MDR1 and MRP1 expression by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016.48 (5):2063-2070.
- [16] BHARDWAJ R, COLLINS JL, Stringfellow J, et al. P-Glycoprotein and breast cancer resistance protein transporter Inhibition by cyclosporine and quinidine on the pharmacokinetics of oral rimegepant in healthy subjects [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*.2022, 11 (7):889-897.
- [17] KELLY RJ, DRAPER D, CHEN CC, et al. A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer [J]. *Clin Cancer Res*. 2011, 17 (3):569-580.