

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.006

穿心莲内酯通过抑制 Fas/FasL 信号轴降低子宫内膜癌 Ishikawa/DPP 细胞对顺铂的耐药性

姚素环¹, 史利锋¹, 李淑芳², 董素霞², 陈萍³ (1. 河南护理职业学院 妇产科, 河南 安阳 455000; 2. 河南护理职业学院附属医院·安阳地区医院, 妇产科, 河南 安阳 455000; 3. 安阳市人民医院 妇产科, 河南 安阳 455000)

[摘要] **目的:** 探讨穿心莲内酯(Andro)调节脂肪酸合成酶(Fas)/脂肪酸合成酶配体(FasL)信号轴对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞顺铂(DDP)耐药性的影响。**方法:** 采用 0、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 分别处理 Ishikawa 细胞和顺铂耐药的 Ishikawa/DPP 细胞, 0、5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Andro 处理 Ishikawa/DDP 细胞, MTT 法检测细胞增殖情况并为后续实验选择合适的给药剂量。将 Ishikawa/DDP 细胞随机分为对照组、DDP 组(DDP 干预)、Andro 组(DDP、Andro 干预)、pcDNA3.1-NC 组(转染 pcDNA3.1+DDP、Andro 干预)、pcDNA3.1-Fas/FasL 组(转染 pcDNA3.1-Fas/FasL+DDP、Andro 干预), 24 h 后, 采用 qPCR 法检测 Fas、FasL mRNA 的表达, 平板克隆形成实验、Transwell 实验和流式细胞术分别检测细胞克隆能力、细胞迁移与侵袭和细胞凋亡, WB 法检测增殖细胞核抗原(PCNA)、BAX、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、多药耐药蛋白-1(MDR-1)及 Fas、FasL 蛋白表达。**结果:** DDP 以剂量依赖的方式抑制 Ishikawa 和 Ishikawa/DPP 细胞增殖, 并且与 Ishikawa 细胞比较, Ishikawa/DPP 细胞对 DDP 的敏感性更低(均 $P<0.05$); Andro 以剂量依赖性的方式抑制 Ishikawa/DPP 细胞的增殖(均 $P<0.05$)。Ishikawa/DPP 细胞中 Fas、FasL 的表达水平均高于 Ishikawa 细胞(均 $P<0.05$)。选取 20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 和 25 $\mu\text{mol/L}$ Andro 为干预剂量, 干预时间 24 h。与对照组比较, DDP 组 Ishikawa/DPP 细胞中 PD-L1、MDR-1、Fas、FasL mRNA 及蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), 而克隆形成率、迁移与侵袭细胞数、凋亡率差异均无统计学意义(均 $P>0.05$); 与 DDP 组比较, Andro 组 Ishikawa/DPP 细胞中 Fas、FasL mRNA 表达水平、细胞克隆形成率、迁移与侵袭细胞数、PCNA、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL 蛋白表达水平显著降低, BAX 蛋白表达水平及凋亡率显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), pcDNA3.1-NC 组与 Andro 组类似; 与 pcDNA3.1-NC 组比较, pcDNA3.1-Fas/FasL 组 Ishikawa/DPP 细胞上述指标变化均被逆转($P<0.05$)。**结论:** Andro 可能通过抑制 Fas/FasL 信号轴来抑制 Ishikawa/DPP 细胞增殖、迁移与侵袭, 促进凋亡, 从而降低细胞对 DDP 的耐药性。

[关键词] 穿心莲内酯; Fas/FasL 信号轴; 子宫内膜癌; Ishikawa 细胞; Ishikawa/DPP 细胞; 化疗; 顺铂; 耐药

[中图分类号] R737.33; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)02-0154-07

Andrographolide reduces cisplatin resistance of endometrial cancer Ishikawa/DPP cells by inhibiting the Fas/FasL signaling axis

YAO Suhuan¹, SHI Lifeng¹, LI Shufang², DONG Suxia², CHEN Ping³ (1. Department of Gynaecology and Obstetrics, Henan Nursing Vocational College, Anyang 455000, Henan, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Anyang District Hospital, Affiliated Hospital of Henan Nursing Vocational College, Anyang 455000, Henan, China; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, People's Hospital of Anyang City, Anyang 455000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of andrographolide (Andro) regulation of fatty acid synthase (Fas)/fatty acid synthase ligand (FasL) signaling axis on drug resistance of endometrial cancer Ishikawa cells. **Methods:** Ishikawa cells and cisplatin-resistant Ishikawa/DPP cells were treated respectively with 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ DDP, and Ishikawa/DDP cells were treated with 0, 5, 10, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$ Andro. Cell proliferation was detected by MTT and the appropriate dose of administration was selected for subsequent experiments. Ishikawa/DDP cells were randomly divided into the control group, the DDP group (intervention with DDP), the Andro group (intervention with DDP and Andro), the pcDNA3.1-NC group (transfection with pcDNA3.1 and intervention with DDP and Andro), and the pcDNA3.1-Fas/FasL group (transfection with pcDNA3.1-Fas/FasL and intervention with DDP and Andro). After 24 h of treatment, qPCR was used to detect the mRNA expression of Fas and FasL. Plate cloning assay; Transwell assay and flow cytometry

[作者简介] 姚素环(1980—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事妇产科疾病相关研究。E-mail: YaoSuHuan135@163.com

[通信作者] 姚素环, E-mail: YaoSuHuan135@163.com

were used to detect cell cloning ability, cell migration, invasion and apoptosis, respectively. The expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), BAX, Bcl-2, MMP-2, PD-L1, multidrug resistance protein-1 (MDR-1) and Fas and FasL proteins were detected by WB method. **Results:** DDP inhibited the proliferation of Ishikawa and Ishikawa/DPP cells in a dose-dependent manner. In addition, the sensitivity of Ishikawa/DPP cells to DDP was lower than that of Ishikawa cells (all $P<0.05$). Andro inhibited the proliferation of Ishikawa/DPP cells in a dose-dependent manner (all $P<0.05$). The expression levels of Fas and FasL in Ishikawa/DPP cells were higher than those in Ishikawa cells (all $P<0.05$). 20 $\mu\text{g/mL}$ DDP and 25 $\mu\text{mol/L}$ Andro were selected as the intervention doses, and the intervention time was 24 h. Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of PD-L1, MDR-1, Fas, FasL in Ishikawa/DPP cells in the DDP group increased significantly ($P<0.05$), but there were no significant differences in clone formation rate, number of migrating and invading cells and apoptosis rate (all $P>0.05$). Compared with the DDP group, the mRNA expression levels of Fas and FasL, the cell clone formation rate, the number of migrating and invading cells, the expression level of PCNA, Bcl-2, MMP-2, PD-L1, MDR-1, Fas and FasL protein decreased significantly, while the expression level of BAX protein and the apoptosis rate increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The pcDNA3.1-NC group was similar to the Andro group. Compared with the pcDNA3.1-NC group, the changes of Ishikawa/DPP cells in the pcDNA3.1-Fas/FasL group were reversed ($P<0.05$). **Conclusion:** Andro may inhibit the proliferation, migration and invasion of Ishikawa/DPP cells by inhibiting the Fas/FasL signaling axis, promote the apoptosis, and thereby reduce the resistance of cells to DDP.

[Key words] andrographolide; Fas/FasL signaling axis; endometrial cancer (EC); Ishikawa cell; Ishikawa/DPP cell; chemotherapy; cisplatin; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(2): 154-160. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.006]

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖系统常见三大恶性肿瘤之一, 尽管许多 EC 患者通过手术即可治愈, 但仍有部分患者出现复发转移, 导致预后较差^[1-2]。化疗辅助手术治疗 EC, 可提高治疗效果, 改善患者预后^[3]。顺铂(cisplatin, DDP)是最常用的化疗药物之一, 但患者会因内在和获得性的耐药影响化疗效果^[4]。因此, 探究 EC 细胞顺铂耐药的机制, 对开发有效的预防或降低 EC 细胞耐药性药物, 进而提高患者的生存质量具有重要意义。穿心莲内酯(andrographolide, Andro)具有抗炎、抗氧化、免疫调节和抗肿瘤等多种药理作用, 能够通过调节 PKA/PP2A/IKK 信号通路逆转顺铂耐药肝细胞癌 HepG2 细胞的耐药性^[5], 可增强拓扑替康、紫杉醇、吉西他滨对急性髓系白血病^[6]、非小细胞肺癌^[7]、胰腺癌^[8]的抗肿瘤作用。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, Fas)/脂肪酸合成酶配体(fatty acid synthase ligand, FasL)介导的免疫逃逸与舌鳞状细胞癌(舌鳞癌)对 DDP 的耐药性密切相关, 特异性阻断 FasL 的表达, 可降低舌鳞癌细胞对 DDP 的耐药性, 抑制肿瘤细胞的免疫逃逸^[9]。LIN 等^[10]研究表明, Andro 可通过调控 Fas/FasL 信号通路增强结直肠癌细胞对 DDP 的敏感性。但 Andro 调节 Fas/FasL 信号轴对 EC 细胞化疗耐药性的影响尚不清楚, 因此, 本研究旨在探讨 Andro 对 EC 细胞化疗耐药性的影响及其作用机制, 以期 EC 的治疗提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

EC 细胞 Ishikawa(XY-XB-2285)和顺铂耐药的 Ishikawa/DPP 细胞均购自美国 ATCC 细胞库, 均用 DMEM 的培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素)于恒温培养箱中常规培养, 定期观察, 及时更换新的培养基。用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 主要试剂与仪器

Andro(B20207, 分析标准品, 纯度 $\geq 98\%$, 溶解于 DMSO)购自上海源叶生物科技有限公司, DDP(C2210000, 冻干粉, 纯度 $\geq 98\%$, 溶解于 PBS)购自深圳振强生物技术有限公司, DMEM 培养基(M0108B)购自上海盈湾生物科技有限公司, 细胞蛋白提取试剂盒(SH-2473)购自北京凯诗源生物科技有限公司, MTT 试剂盒(MH1001)购自江苏麦格生物科技有限公司, 细胞转染试剂盒(SY0944)购自北京伊塔生物科技有限公司, RNA 提取试剂盒(R1200-100)、反转录试剂盒(RP1105)购自北京 Solarbio 公司, Fas/FasL 过表达质粒(pcDNA3.1-Fas/FasL)及对照质粒(pcDNA3.1)、Fas、FasL 引物购自广州 RiboBio 公司, 兔源一抗: 增殖细胞核抗原[proliferating cell nuclear antigen. (PCNA), ab15498-PCNA], Bcl-2(ab203516)、BAX(ab182733)、MMP-2(ab37150)、PD-L1(ab239749)、MDR-1(ab170904)、Fas(ab133619)、FasL(ab302905)、GAPDH(ab9485)单抗以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(ab6721)均购自美国 Abcam 公司, 多功能酶标仪(LD-96A)购自山东莱恩德智能科技有限公司; qPCR 仪(CFX96 Touch)购自美国 Bio-Rad, 光学显微镜(CX31)购自日本奥林巴斯

公司,流式细胞仪(NOVOCYTE3130)购自美国艾森公司。

1.3 MTT实验检测 Andro 对 Ishikawa 细胞增殖的影响

将对数生长期 Ishikawa 细胞以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔板中,每组设 6 个复孔,培养 24 h 后吸去原培养液,加入含 0、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ DDP^[11]的培养液(0 $\mu\text{mol/L}$ Andro 组培养液含 0.1%的 DMSO)或含 5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Andro^[12]的培养液,48 h 后加入 MTT 溶液 20 μL /孔,再培养 4 h 后,加入 DMSO 150 μL /孔,充分震荡后,在酶标仪上于 490 nm 波长处检测各孔的光密度(D)值,计算细胞增殖抑制率 $=[(D_{\text{对照组}} - D_{\text{实验组}})/(D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.4 细胞分组及处理

将对数期 Ishikawa/DDP 细胞按照 1.2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,随机分成对照组、DDP 组(20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 干预)、Andro 组(DDP、Andro 干预)、pcDNA3.1-NC 组(转染 pcDNA3.1+DDP、Andro 干预)、pcDNA3.1-Fas/FasL 组(转染 pcDNA3.1-Fas/FasL+DDP、Andro 干预)。使用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒进行转染,选取 20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 和 25 $\mu\text{mol/L}$ Andro 为干预剂量。24 h 后进行后续实验。

1.5 qPCR 法检测 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL mRNA 表达水平

TRIzol 试剂提取上述各组细胞中的总 RNA,使用 Nanodrop 2000 仪器测量 RNA 浓度。使用 TaqMan microRNA cDNA 合成试剂盒进行 cDNA 合成。采用 qPCR 法检测 Fas、FasL mRNA 表达水平,根据试剂盒说明书进行 PCR 扩增,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 Fas、FasL 相对表达量。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。Fas 上游引物为 5'-CCCGGAATACCA AGTGCAGA-3',下游引物为 5'-GCTGCAGAGACG CAATTACC-3'; FasL 上游引物为 5'-GTCCACCAG CCAGAAGCATA-3',下游引物为 5'-CCCAGAGAC CAGGGCAATTC-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GGA GCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游引物为 5'-GGC TGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.6 平板克隆形成实验检测 Andro 处理与过表达 Fas/FasL 对 Ishikawa/DDP 细胞克隆形成能力的影响

收集对数期的各组细胞,接种在 6 孔板(1×10^3 个/孔)中,培养 10 d,期间及时更换培养基,用 4% 多聚甲醛固定细胞,并用结晶紫染色,水洗、干燥后计数细胞数 >50 个的克隆数,计算细胞克隆形成率。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell 实验检测 Andro 处理与过表达 Fas/FasL 对 Ishikawa/DDP 细胞迁移与侵袭能力的影响

转染后的细胞生长至对数期时,使用涂有 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室进行侵袭实验,迁移实验不涂 Matrigel 基质胶,各组均取 200 μL 细胞悬液(含 2×10^5 个细胞)加入上室,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基,培养 24 h,洗去未穿膜细胞,固定、染色后于显微镜下随机选取 5 个视野计数穿膜细胞数。

1.8 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 Andro 处理与过表达 Fas/FasL 对 Ishikawa/DDP 细胞凋亡的影响

收集对数期的各组细胞,以预冷的 PBS 洗涤 2 次,添加 100 μL 结合缓冲液悬浮各组细胞,再分别添加 Annexin V-FITC 和 PI 染液 5 μL ,混匀后避光染色 15 min,离心弃上清,加入 0.5 mL PBS 重悬细胞,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.9 WB 法检测检测 Andro 处理与过表达 Fas/FasL 对 Ishikawa/DDP 细胞中相关蛋白质表达的影响

收集对数期的各组细胞,采用 WB 法检测 PCNA、BAX、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL 蛋白表达,RIPA 裂解缓冲液提取各组细胞总蛋白。BCA 测定试剂盒用于测定蛋白质浓度。将 20 μg 蛋白加载到泳道中通过 10%SDS-PAGE 分离,将蛋白质电转移到 PVDF 膜上。用 5% 牛奶封闭后,膜与 PCNA、BAX、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL 及 GAPDH 一抗稀释液(按照 1:1 500 稀释)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下处理过夜,洗膜后在室温下与 HRP 标记的二抗(按照 1:1 000 稀释)处理 1 h,ECL 显影。以 GAPDH 为内参,Imagepro Plus 6.0 软件对蛋白质进行定量分析。

1.10 统计学处理

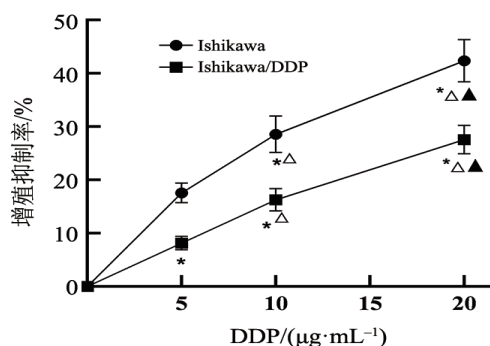
所有实验独立重复 3 次。实验数据用 Graphpad Prism 9.0 软件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间的比较用单因素方差分析,SNK- q 检验用于进一步两组间的比较。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DDP 和 Andro 均呈剂量依赖性地抑制 Ishikawa 和 Ishikawa/DPP 细胞的增殖能力

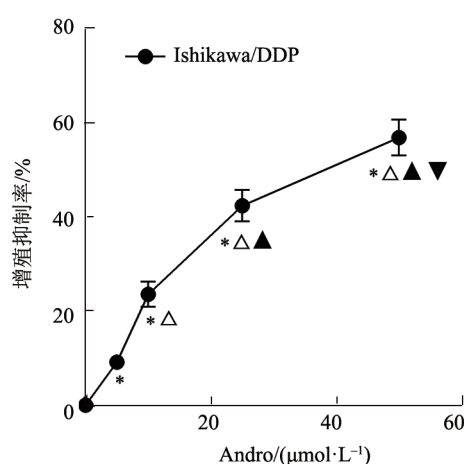
MTT 法检测结果(图 1)显示,与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,在 5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 处理下,Ishikawa 和 Ishikawa/DPP 细胞的增殖抑制率均显著升高(均 $P < 0.05$),且呈剂量依赖性;在 5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 处理下,Ishikawa 细胞的增殖抑制率均高于 Ishikawa/DPP 细胞,其中 20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 处理组的增殖抑制率最高,故本研究选取 20 $\mu\text{g/mL}$ DDP 进行后续实验。

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组比较, Ishikawa/DDP 细胞增殖抑制率在 5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Andro 干预下以剂量依赖性的方式显著增加 ($P < 0.05$, 图 2), Andro 杀伤 Ishikawa/DDP 细胞的 IC_{50} 为 35.98 $\mu\text{mol/L}$, 本研究选取 25 $\mu\text{mol/L}$ Andro 进行后续实验。



与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, $*P < 0.05$; 与 5 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ 。

图1 不同浓度 DDP 对 Ishikawa 和 Ishikawa/DDP 细胞增殖抑制率的影响



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $*P < 0.05$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$; 与 25 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.05$ 。

图2 不同浓度 Andro 对 Ishikawa/DDP 细胞增殖抑制率的影响

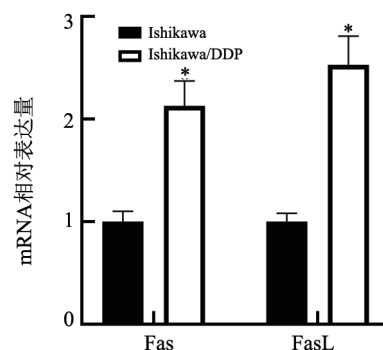
2.2 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL 呈高表达

qPCR 检测结果 (图 3) 显示, 与 Ishikawa 细胞比较, Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 Andro 抑制 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL 的表达

qPCR 检测结果 (图 4) 显示, 与对照组比较, DDP 组 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 DDP 组比较, Andro 组 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组比较, pcDNA3.1-Fas/

FasL 组 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。实验结果说明, Andro 能显著抑制 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL mRNA 的表达。

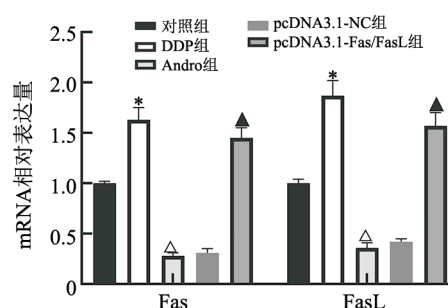


与 Ishikawa 细胞相比, $*P < 0.05$ 。

图3 Ishikawa 和 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL 的表达

2.4 Andro 抑制 Ishikawa/DDP 细胞的克隆形成能力

克隆形成实验结果 (图 5) 显示, 与对照组比较, DDP 组 Ishikawa/DDP 细胞克隆形成率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 DDP 组比较, Andro 组 Ishikawa/DDP 细胞克隆形成率显著降低 ($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组比较, pcDNA3.1-Fas/FasL 组 Ishikawa/DDP 细胞克隆形成率显著升高 ($P < 0.05$)。实验结果说明, Andro 能显著抑制 Ishikawa/DDP 细胞的克隆形成能力。



与对照组相比, $*P < 0.05$; 与 DDP 组相比, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与 pcDNA3.1-NC 组相比, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

图4 Andro 处理抑制 Ishikawa/DDP 细胞中 Fas、FasL 的表达

2.5 Andro 抑制 Ishikawa/DDP 细胞的迁移与侵袭

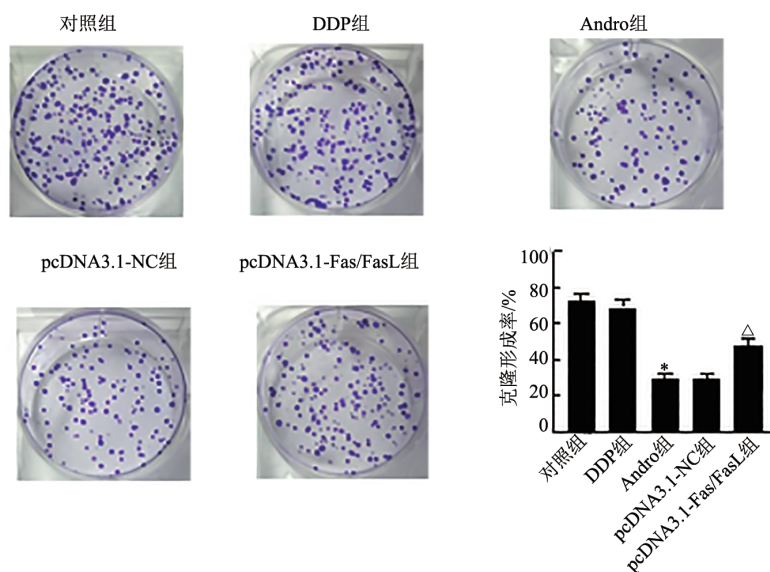
Transwell 实验结果 (图 6) 显示, 与对照组比较, DDP 组 Ishikawa/DDP 细胞迁移与侵袭细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 DDP 组比较, Andro 组 Ishikawa/DDP 细胞迁移与侵袭细胞数显著降低 ($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组比较, pcDNA3.1-Fas/FasL 组 Ishikawa/DDP 细胞迁移与侵袭细胞数显著升高 ($P < 0.05$)。实验结果说明, Andro 能显著抑制

Ishikawa/DPP细胞的迁移、侵袭能力。

2.6 Andro能诱导Ishikawa/DPP细胞凋亡

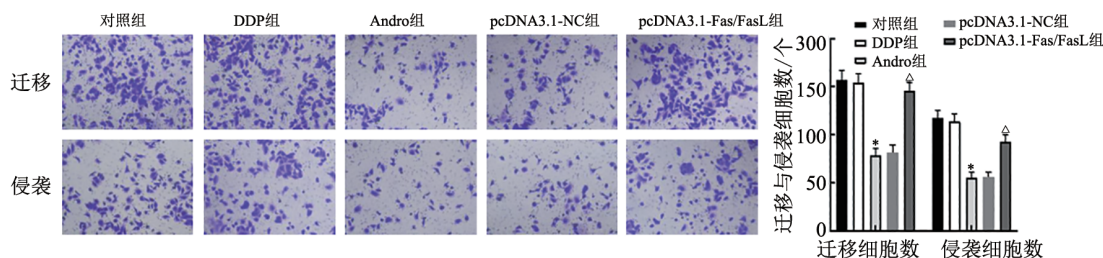
流式细胞术检测结果(图7)显示,与对照组比较,DDP组Ishikawa/DPP细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$);与DDP组比较,Andro组Ishikawa/

DPP细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与pcDNA3.1-NC组比较,pcDNA3.1-Fas/FasL组Ishikawa/DPP细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)。实验结果说明,Andro能显著促进Ishikawa/DPP细胞的凋亡。



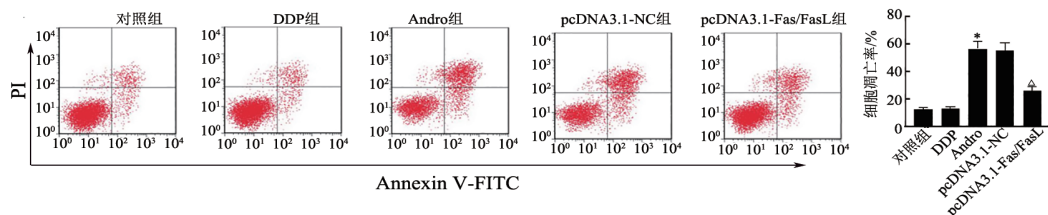
与DDP组相比,* $P<0.05$;与pcDNA3.1-NC组相比,[△] $P<0.05$ 。

图5 各组Ishikawa/DPP细胞克隆形成率($\times 50$)



与DDP组相比,* $P<0.05$;与pcDNA3.1-NC组相比,[△] $P<0.05$ 。

图6 各组Ishikawa/DPP细胞迁移与侵袭情况(结晶紫染色, $\times 200$)



与DDP组相比,* $P<0.05$;与pcDNA3.1-NC组相比,[△] $P<0.05$ 。

图7 各组Ishikawa/DPP细胞凋亡情况

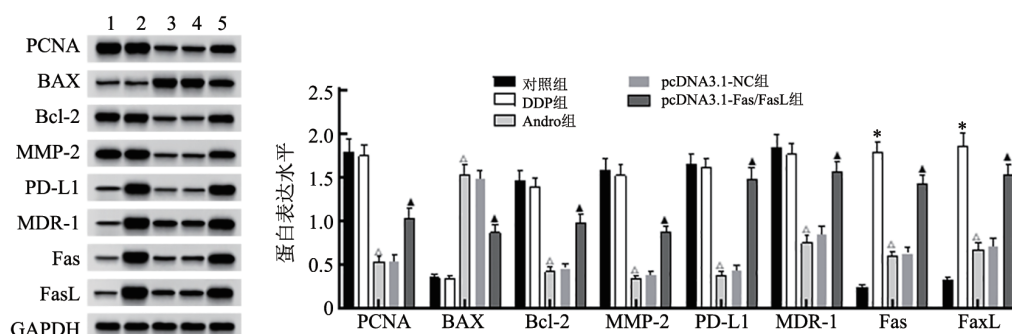
2.7 Andro对Ishikawa/DPP细胞中PCNA、BAX、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL表达的影响

WB检测结果(图8)显示,与对照组比较,DDP组Ishikawa/DPP细胞PCNA、BAX、Bcl-2、MMP-2表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),PD-L1、MDR-1、

Fas、FasL蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与DDP组比较,Andro组Ishikawa/DPP细胞PCNA、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL蛋白表达水平显著降低,BAX蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与pcDNA3.1-NC组比较,pcDNA3.1-Fas/FasL组

Ishikawa/DPP 细胞 PCNA、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL 蛋白表达水平显著升高, BAX 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。实验结果说明, Andro

能显著促进 Ishikawa/DPP 细胞中 PCNA、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL 蛋白的表达, 同时抑制 BAX 蛋白的表达。



1: 对照组; 2: DDP 组; 3: Andro 组; 4: pcDNA3.1-NC 组; 5: pcDNA3.1-Fas/FasL 组。与对照组相比, $*P<0.05$; 与 DDP 组相比, $^{\Delta}P<0.05$; 与 pcDNA3.1-NC 组相比, $^{\Delta}P<0.05$ 。

图8 各组 Ishikawa/DPP 细胞 PCNA、BAX、Bcl-2、MMP-2、PD-L1、MDR-1、Fas、FasL 蛋白表达比较

3 讨论

近年来,随着经济状况的改善和平均预期寿命的增加,EC的发病率逐渐增加,对女性的健康造成了极大威胁^[13]。化疗是治疗晚期EC的有效手段之一,DDP是辅助化疗及体外药敏实验最常用的经典药物之一,但是EC细胞对DDP耐药性的产生降低了化疗的实际疗效,导致DDP在临床应用过程中具有较大的局限性^[14]。因此,临床迫切需要探索EC耐药机制,为开展耐药EC的临床治疗提供可能。

Andro是从草本植物穿心莲中分离出来的一种二萜化合物,对各种肿瘤具有显著的抗癌作用。Andro通过抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭,调节肿瘤相关巨噬细胞极化及促进细胞凋亡,可以抑制乳腺癌、膀胱癌的发生发展^[15-16]。研究^[17]发现,Andro通过调节ROS-FOXO1轴抑制雌激素受体1转录,同时增强癌细胞对氟维司群的敏感性,从而抑制雌激素受体阳性乳腺癌生长的作用。Andro通过调节PKA/PP2A/IKK信号通路、内在凋亡途径、STAT3和Akt通路,降低顺铂耐药肝细胞癌HepG2细胞对DDP的耐药性、增强急性髓系白血病细胞对拓扑替康的敏感性及胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性^[5-6,8]。本研究发现,Andro可降低Ishikawa/DPP的细胞克隆形成率、迁移与侵袭细胞数及增殖、迁移相关蛋白表达(PCNA、MMP-2)、升高凋亡蛋白(BAX)表达及细胞凋亡率,降低抗凋亡蛋白(Bcl-2)表达。提示,Andro可显著抑制Ishikawa/DPP细胞增殖、迁移与侵袭,促进凋亡。肿瘤产生化疗药物耐药性与耐药基因活化或过表达密切相关,MDR-1是研究较多的耐药蛋白,研究发现,抑制MDR-1表达,可抑制肝癌细胞对阿霉

素的耐药性^[18]。本研究显示,Andro可降低Ishikawa/DPP中MDR-1的表达,逆转Ishikawa/DPP细胞耐药性。

Fas是一种穿膜蛋白,具有细胞质死亡结构域(death domain, DD),当被其天然配体(FasL)激活时,可激活易感细胞中的半胱天冬酶依赖性细胞凋亡。肿瘤细胞对FasL介导的细胞凋亡产生抵抗,而表达Fas的淋巴细胞对FasL介导的凋亡很敏感,这有利于肿瘤的发生、发展。许多癌细胞通过降低其对Fas诱导的细胞凋亡的敏感性,在肿瘤进展期间获得生存优势。Fas/FasL信号通路介导的免疫逃逸与舌鳞癌对DDP的耐药性密切相关,抑制FasL的表达,可降低舌鳞癌细胞对DDP的耐药性,抑制了肿瘤细胞的免疫逃逸^[9]。PD-L1信号通路是肿瘤免疫抑制的重要组成部分,可抑制T淋巴细胞活化,增强肿瘤细胞免疫耐受性,从而实现肿瘤免疫逃逸^[19]。Andro可通过调控Fas/FasL信号通路,增强结直肠癌细胞对DDP的敏感性^[10]。Andro通过抑制PD-L1信号通路,抑制免疫逃逸,抑制非小细胞肺癌进展^[20]。本研究发现,Andro可抑制Fas、FasL、PD-L1的表达,过表达Fas/FasL后,可减弱Andro对Ishikawa/DPP细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用及细胞凋亡的促进作用,降低Ishikawa/DPP细胞对DDP的敏感性。Andro可作为治疗EC的潜在治疗药物。

综上所述,Andro可能通过抑制Fas/FasL信号通路,抑制Ishikawa/DPP细胞增殖、迁移与侵袭,促进凋亡,从而降低EC细胞对DDP的耐药性。为治疗EC提供新的参考,但本研究尚有不足之处,Andro对EC细胞对DDP的耐药性的作用在动物体内仍需要进一步的研究,本实验仅验证Andro对Fas/FasL信号通路

的影响,未对其他靶点、通路进行研究,后续研究将会进行进一步明确 Andro 逆转 EC 细胞对 DDP 耐药性的作用机理。

[参 考 文 献]

- [1] CHOW R D, MICHAELS T, BELLONE S, *et al.* Distinct mechanisms of mismatch-repair deficiency delineate two modes of response to anti-PD-1 immunotherapy in endometrial carcinoma[J/OL]. *Cancer Discov*, 2023, 13(2): 312-331[2023-09-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9905265/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0686.
- [2] HUVILA J, PORS J, THOMPSON E F, *et al.* Endometrial carcinoma: molecular subtypes, precursors and the role of pathology in early diagnosis[J]. *J Pathol*, 2021, 253(4): 355-365. DOI: 10.1002/path.5608.
- [3] ABDELMAKSOU D N M, EL-MAHDY H A, ISMAIL A, *et al.* The role of miRNAs in the pathogenesis and therapeutic resistance of endometrial cancer: a spotlight on the convergence of signaling pathways[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2023, 244: 154411[2023-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36921547/>. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154411.
- [4] 邱善婷, 李晓燕, 陈哲聪, 等. miR-216b-5p 靶向 ATG5 介导自噬逆转食管癌 Eca109 细胞的顺铂耐药性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(7): 552-559. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2023.07.002.
- [5] CHOWDHURY K D, SARKAR A, CHATTERJEE S, *et al.* Cathepsin B mediated scramblase activation triggers cytotoxicity and cell cycle arrest by andrographolide to overcome cellular resistance in cisplatin resistant human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 68: 120-132. DOI: 10.1016/j.etap.2019.03.003.
- [6] HODROJ M H, JARDALY A, ABI RAAD S, *et al.* Andrographolide potentiates the antitumor effect of topotecan in acute myeloid leukemia cells through an intrinsic apoptotic pathway[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 1079-1088[2023-09-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955015/>. DOI: 10.2147/CMAR.S160924.
- [7] YUAN H H, SUN B, GAO F, *et al.* Synergistic anticancer effects of andrographolide and paclitaxel against A549 NSCLC cells[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(11): 2629-2635. DOI: 10.1080/13880209.2016.1176056.
- [8] BAO G Q, SHEN B Y, PAN C P, *et al.* Andrographolide causes apoptosis via inactivation of STAT3 and Akt and potentiates antitumor activity of gemcitabine in pancreatic cancer[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 222(1): 23-35. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.06.241.
- [9] 吴桃, 徐艳雪, 韩瞳瞳, 等. FasL 的特异性 miRNA 阻断舌鳞癌细胞免疫逃逸的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(8): 1115-1119. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.004.
- [10] LIN H H, SHI M D, TSENG H C, *et al.* Andrographolide sensitizes the cytotoxicity of human colorectal carcinoma cells toward cisplatin via enhancing apoptosis pathways *in vitro* and *in vivo*[J]. *Toxicol Sci*, 2014, 139(1): 108-120. DOI: 10.1093/toxsci/kfu032.
- [11] 汪晶, 李新, 周筠, 等. 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞顺铂耐药株增殖和凋亡及侵袭与迁移的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2023, 30(9): 513-519. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2023.09.02.
- [12] PENG Y L, WANG Y, TANG N, *et al.* Andrographolide inhibits breast cancer through suppressing COX-2 expression and angiogenesis via inactivation of p300 signaling and VEGF pathway[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 248[2023-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30314513/>. DOI: 10.1186/s13046-018-0926-9.
- [13] ZHANG Q Z, XIA T X, QI C X, *et al.* High expression of S100A2 predicts poor prognosis in patients with endometrial carcinoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 77[2023-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35042454/>. DOI: 10.1186/s12885-022-09180-5.
- [14] MATULONIS U A, HUANG H Q, FILIACI V L, *et al.* Patient reported outcomes for cisplatin and radiation followed by carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel for locally advanced endometrial carcinoma: an NRG oncology study[J]. *Gynecol Oncol*, 2022, 164(2): 428-436. DOI: 10.1016/j.ygyno.2021.11.021.
- [15] LI L, YANG L L, YANG S L, *et al.* Andrographolide suppresses breast cancer progression by modulating tumor-associated macrophage polarization through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Phytother Res*, 2022, 36(12): 4587-4603. DOI: 10.1002/ptr.7578.
- [16] XUAN L, HU J H, BI R, *et al.* Andrographolide inhibits proliferation and promotes apoptosis in bladder cancer cells by interfering with NF- κ B and PI3K/AKT signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(4): 349-356. DOI: 10.1007/s11655-022-3464-4.
- [17] XU T, JIANG Y Y, YUAN S Y, *et al.* Andrographolide inhibits ER-positive breast cancer growth and enhances fulvestrant efficacy via ROS-FOXM1-ER- α axis[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 899402 [2023-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35615146/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.899402.
- [18] LI M, LI Z, SONG J R, *et al.* miR-205 reverses MDR-1 mediated doxorubicin resistance via PTEN in human liver cancer HepG2 cells [J]. *Cell J*, 2022, 24(3): 112-119. DOI: 10.22074/cellj.2022.7231.
- [19] PEI L P, LIU Y, LIU L, *et al.* Roles of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for solid cancers[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 29[2023-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36759842/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01731-z.
- [20] WANG X R, JIANG Z B, XU C, *et al.* Andrographolide suppresses non-small-cell lung cancer progression through induction of autophagy and antitumor immune response[J/OL]. *Pharmacol Res*, 2022, 179: 106198[2023-09-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35367343/>. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106198.

[收稿日期] 2023-09-04

[修回日期] 2024-01-25

[本文编辑] 黄静怡