

丹皮酚逆转卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞多药耐药性的机制

韩立^{1,2*}, 郭晓娟^{1,2}, 陈重³, 卞华^{1,2*}, 张超云^{1,2}, 臧文华^{1,2},
王倩^{1,2}, 胡久略^{1,2}

(南阳理工学院 1. 张仲景国医国药学院, 2. 河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室, 河南 南阳 473004;
3. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 本文在卵巢癌耐药性 SKOV3/DDP 细胞中, 检测丹皮酚 (paeonol, PL) 逆转卵巢癌耐药的作用, 探讨其逆转耐药的机制。结果显示, PL 对 SKOV3/DDP 细胞具有耐药逆转作用。流式细胞术检测发现, PL 可浓度依赖性地抑制 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 功能; 采用荧光定量 PCR 和细胞免疫荧光技术, 检测发现 15、30 和 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL 对 MDR1/P-gp 和异黏蛋白 (metadherin, MTDH) 的抑制作用, 及对磷酸酶和张力蛋白类似物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 的诱导作用均逐渐增强 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。PI3K 抑制剂 LY294002 对 PTEN mRNA 的诱导和 MTDH mRNA 的抑制作用均强于或相当于 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL 组, 但其诱导 PTEN 蛋白和抑制 MTDH 蛋白的作用仅与 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL 组相当。本研究表明, PL 对 SKOV3/DDP 细胞的逆转耐药作用可能与抑制 P-gp 功能和 MDR1/P-gp、MTDH 表达, 诱导 PTEN 表达有关, 为 PL 作为耐药逆转剂应用于卵巢癌耐药治疗提供了理论依据。

关键词: 丹皮酚; 卵巢癌; 多药耐药; 异黏蛋白; 磷酸酶和张力蛋白类似物

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1511-07

The mechanisms of paeonol reversing multidrug resistance in ovarian cancer SKOV3/DDP cells

HAN Li^{1,2*}, GUO Xiao-juan^{1,2}, CHEN Zhong³, BIAN Hua^{1,2*}, ZHANG Chao-yun^{1,2},
ZANG Wen-hua^{1,2}, WANG Qian^{1,2}, HU Jiu-lue^{1,2}

(1. Zhang Zhongjing College of Chinese Medicine, 2. Henan Key Laboratory of Zhang Zhongjing Formulae and Herbs for Immunoregulation, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China;
3. College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: The purpose of this research is to investigate the effects and mechanisms of paeonol (PL), a phenolic compound found in many traditional Chinese formulations, on reversing drug resistance in the ovarian cancer resistant SKOV3/DDP cells. The results showed that PL had significant drug-resistant reversal effect on SKOV3/DDP cells. Flow cytometry showed that PL could inhibit P-glycoprotein (P-gp) function in a concentration-dependent manner. Fluorescent quantitative PCR and cell immunofluorescence techniques were used to detect mechanisms of action. Results revealed that both the inhibitory effect on MDR1/P-gp and metadherin (MTDH) expression and the induction effect on phosphatase and tensin homolog (PTEN), by 15, 30, and 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL, were increased with increased concentrations of PL ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The inhibitory

收稿日期: 2018-05-02; 修回日期: 2018-06-06.

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (162300410204).

*通讯作者 Tel: 86-377-62071309, E-mail: hanlee@live.cn;

Tel: 86-377-62071311, E-mail: biancrown@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0407

effect on MTDH mRNA and the induction effect on PTEN mRNA, by PI3K inhibitor LY294002, were stronger or equivalent to that of the 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL treated group; however, the inhibition or induction effect on MTDH or PTEN protein were only comparable to the 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL treated group. The present study shows that the effect of PL on SKOV3/DDP cells may be related to the inhibition of P-gp function and expression, the inhibition of MDR1, MTDH expression, and the induction of PTEN expression, all which can provide a theoretical foundation for PL as a drug resistance reversal agent on the treatment of ovarian cancer chemotherapy resistance.

Key words: paeonol; ovarian cancer; multidrug resistance; metadherin; phosphatase and tensin homolog

卵巢癌是妇科肿瘤中死亡率最高的恶性肿瘤,其中 90% 为上皮性卵巢癌。全球癌症生存分析工作组 (CONCORD) 的《2000 年~2014 年全球癌症生存趋势监测报告》显示,包括中国在内的绝大多数国家的卵巢癌 5 年生存率在 30%~50%^[1]。由于卵巢癌发病隐匿,约 70% 患者确诊时已为中晚期 (FIGO 分期: III 期和 IV 期)。美国国家综合癌症网络推荐的晚期卵巢癌的标准治疗方案为: 外科手术之后进行铂类为基础的化疗或者手术风险高的患者直接进行铂类基础化疗^[2]。然而,化疗导致的肿瘤多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 始终是临床肿瘤治疗难以逾越的障碍,目前也无可用于临床的 MDR 逆转剂。因此,探究 MDR 产生机制并找到应对措施是当前极其迫切而重要的研究课题。

异黏蛋白 (metadherin, MTDH) 基因 [又名星形胶质细胞升高基因-1 (astrocyte elevated gene 1, AEG-1) 或 LYRIC (lysine-rich CEACAM1 coisolated)] 在包括卵巢癌和子宫内膜等众多肿瘤中均有表达,并且能够激活 NF- κ B、MAPK、PI3K/AKT、Wnt/ β -catenin 等信号通路,参与肿瘤的发生发展、侵袭、转移和耐药,是一个潜在的多通路调控靶点^[3, 4]。MTDH 可通过激活 PI3K/AKT 通路而增加编码 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的 MDR1 基因表达,引起肿瘤 MDR^[5]。磷酸酶和张力蛋白类似物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 是参与 MTDH 调控 PI3K/AKT 通路的一个重要蛋白。MTDH 高表达可以抑制 PTEN 的表达,进而促进恶性肿瘤的生长^[6]。在卵巢癌中,PTEN 的表达与患者的无进展生存期也具有相关性^[7],且其低表达与卵巢癌的化疗耐药密切相关^[8]。因此,以 MTDH 和 PTEN 为靶点,研究开发逆转卵巢癌化疗耐药的药物是值得尝试的新研究思路。

丹皮酚 (paeonol, PL) 是牡丹皮和芍药等中药的主要活性成分。近年研究发现,PL 具有抑制肿瘤增殖、迁移和侵袭等作用,其机制与抑制核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3,

STAT3) 和 Wnt/ β -catenin 信号通路有关^[9, 10],而 Wnt/ β -catenin 信号通路激活与 MDR1/P-gp 异常表达直接相关^[11]。在乳腺癌耐药细胞中,PL 可通过抑制 P-gp 等转运蛋白表达逆转 MDR^[12]。因此,本研究旨在检测 PL 对卵巢癌耐药性肿瘤细胞的耐药逆转作用,探讨其对 PTEN 和 MTDH 的影响,为进一步研究 PL 逆转 MDR 提供实验依据。

材料与方法

仪器与试剂 LSM800 激光共聚焦显微镜,蔡司公司。ABI ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪,赛默飞世尔公司。BD FACSCelesta 流式细胞仪, BD 公司。xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析系统,艾森生物有限公司。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒、Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 赛默飞世尔公司; PCR 引物、UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,由上海生工生物公司提供; 优级胎牛血清, Biological Industries 公司; Hyclone RPMI-1640 培养基和胰酶, GE Healthcare Life Sciences 公司; PL (纯度 99.98%)、LY294002 (纯度 99.95%), MedChemExpress 公司; 罗丹明 123, Sigma 公司; 人 PTEN、MTDH、P-gp 一抗及 Alexa Fluor[®] 488 标记羊抗鼠二抗、Alexa Fluor[®] 647 标记羊抗兔二抗, PROTEINTECH 公司。顺铂 (cisplatin, DDP, 批号 307024CF), 齐鲁制药有限公司。

细胞培养 人卵巢癌耐顺铂 SKOV3/DDP 细胞 (上海信裕生物科技有限公司) 和人卵巢癌顺铂敏感 SKOV3 细胞 (南京恩晶生物有限公司) 培养在含链霉素和青霉素各 100 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 每 3~4 天胰蛋白酶消化传代 1 次。

丹皮酚对 SKOV3/DDP 细胞的耐药逆转作用 取对数生长期的 SKOV3/DDP 和 SKOV3 细胞, 分别接种于 xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析系统专用 E-Plate16 板, 每孔 200 μL , 含 7 000 个细胞。加入不同浓度顺铂, 或丹皮酚联用不同浓度顺

铂, 并设空白对照。加药后, RTCA S16 分析系统置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 通过 iPad 上的 RTCA S16 客户端实时监测细胞存活情况, 以细胞指数 (cell index) 表示, 计算半数抑制浓度 (median inhibitory concentration, IC₅₀), SKOV3/DDP 对顺铂的 IC₅₀ 除以 SKOV3 对顺铂的 IC₅₀ 得到耐药倍数 (resistance fold)。

P-gp 功能检测 取对数生长期的 SKOV3/DDP 细胞, 分为 15、30、60 μmol·L⁻¹ 丹皮酚组, 并设空白对照和阳性对照 LY294002 组。48 h 后, 弃去培养基, PBS 冲洗 3 遍, 胰酶消化制备细胞悬液 0.5 mL, 加入终质量浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 罗丹明 123。继续在 37 °C 孵育 60 min, 离心弃上清, 冰 PBS 洗涤 3 次后, 重悬于 0.5 mL 冰 PBS 中, 立即采用流式细胞仪检测, BD FACS Diva 软件分析罗丹明 123 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

荧光定量 PCR 检测 MDR1、PTEN、MTDH mRNA 表达 取对数生长期的 SKOV3/DDP 细胞, 接种于 12 孔板, 药物分组同上。37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h 后, 采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 采用 cDNA 合成试剂盒逆转录合成 cDNA, 采用荧光定量 PCR 扩增各目的基因。扩增引物序列如表 1 所示。逆转录条件为: 42 °C 逆转录 60 min, 70 °C 灭活 10 min。扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环。以 GAPDH 为内参基因, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各药物处理组 PTEN、MTDH 和 MDR1 mRNA 相对于对照组表达量的变化, 其中 ΔΔCt = (Ct_{目标基因} - Ct_{内参基因})_{处理组} - (Ct_{目标基因} - Ct_{内参基因})_{对照组}。

细胞免疫荧光检测 P-gp、MTDH 和 PTEN 蛋白表达 取对数生长期的 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞, 接种于激光共聚焦专用 20 mm 培养皿, 每皿含 1×10⁵ 个细胞, 药物分组同上。37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h 后, 弃去培养基。PBS 冲洗后, 4% 多聚甲醛固定 5 min, PBS 洗 3 次。0.5% Triton X-100/PBS 通透 10 min, PBS 洗 3 次。5% 羊血清/PBS 室温封闭 1 h。按照说明书推荐比例加入 P-gp、MTDH、PTEN 蛋白一抗, 室温孵育 1 h, 0.01% Triton X 100/PBS 洗 3 次。

加入与一抗对应的 AF488 或 AF647 荧光标记二抗, 室温孵育 1 h, 0.01% Triton X 100/PBS 洗 3 次。DAPI 染核 5 min, PBS 洗涤后滴加适量抗荧光淬灭封片剂。在激光共聚焦显微镜下观察拍照, 并用蔡司 Zen 软件分析各组蛋白表达的 MFI。

统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 GraphPad Prism 7 软件对数据进行分析并作图, 两样本均数比较采用 *t* 检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为具有统计学显著性差异。

结果

1 丹皮酚逆转 SKOV3/DDP 细胞耐药的作用

RTCA S16 系统监测细胞存活情况显示, 丹皮酚作用于 SKOV3/DDP 和 SKOV3 细胞 24 h, 未见明显细胞毒性; 作用 48 h, 对 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞的抑制率均小于 10% (图 1A、B)。LY294002 作用第 48 h, 对 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞的 IC₅₀ 分别为 (13.50 ± 0.45) 和 (19.50 ± 0.31) μmol·L⁻¹, LY294002 对两种细胞的杀伤作用均强于丹皮酚。15 μmol·L⁻¹ 丹皮酚和 10 μmol·L⁻¹ LY294002 联合顺铂后, SKOV3/DDP 细胞对顺铂的耐药倍数分别下降至 1.15 和 1.22 倍, 如表 2 和图 1C、D 所示。

Table 2 Cytotoxicity of cisplatin (DDP) alone and in combination with paeonol (PL) or LY294002 in SKOV3 and SKOV3/DDP cells. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05 vs the indicated group in SKOV3 cells; ^Δ*P* < 0.05 vs SKOV3/DDP treated with DDP

Drugs and concentration	IC ₅₀ of DDP/μg·mL ⁻¹		Resistance fold
	SKOV3	SKOV3/DDP	
DDP	3.40 ± 0.14	15.53 ± 0.11*	4.57
DDP+15 μmol·L ⁻¹ PL	2.90 ± 0.23	3.90 ± 0.11* ^Δ	1.15
DDP+10 μmol·L ⁻¹ LY294002	2.54 ± 0.31	4.17 ± 0.34* ^Δ	1.22

2 丹皮酚对 P-gp 功能的影响

流式细胞术检测发现, 丹皮酚作用 SKOV3/DDP 细胞 48 h 后, 细胞内罗丹明 123 的荧光强度随着丹皮酚的浓度增高而增强, 表明 P-gp 功能受到抑制。PI3K 通路抑制剂 LY294002 抑制 P-gp 功能作用强于 15 μmol·L⁻¹ 丹皮酚组, 弱于 30 和 60 μmol·L⁻¹ 丹皮酚组。

Table 1 Primers for MDR1, PTEN, MTDH and GAPDH

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Predicted size/bp
MDR1	AAGCCACGTCAGCTCTGGAT	CTGCATTCTGGATGGTGGAC	120
MTDH	CCTGGCCTTGCTGAAGAATC	GGCTGCTTTGCTGTTACTACT	150
PTEN	ATGTTCACTGGCGGAACCTG	CACACAGGTAACGGCTGAGG	137
GAPDH	GAGTCAACGGATTGTGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	196

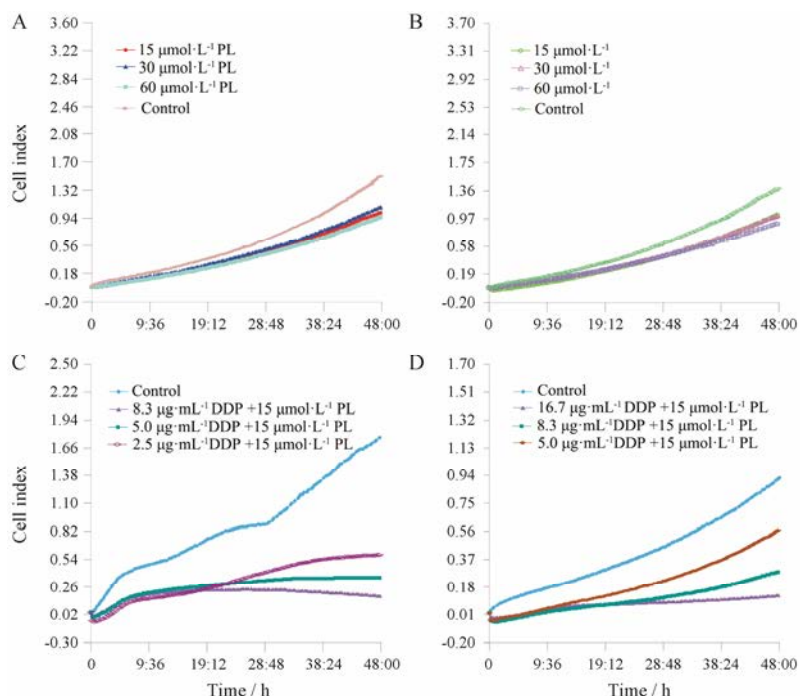


Figure 1 Cell viabilities were measured and monitored by xCELLigence RTCA SF16 after treatment with different concentrations of PL alone or combined with different concentrations of DDP. A: SKOV3 cells treated with different concentrations of PL; B: SKOV3/DDP cells treated with different concentrations of PL; C: SKOV3 cells treated with 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL plus different concentrations of DDP; D: SKOV3/DDP cells treated with 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL plus different concentrations of DDP

经统计学分析, 各组之间差异具有显著性 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$) (图 2)。

3 丹皮酚对 MDR1、PTEN、MTDH mRNA 表达的影响

丹皮酚作用细胞 48 h 后, 细胞内 PTEN mRNA 表达随着丹皮酚浓度增高而增高, LY294002 诱导 PTEN mRNA 表达的作用强于丹皮酚, 各组之间差异具有显著性 ($P < 0.01$)。细胞内 MTDH 和 MDR1 mRNA 表达随着丹皮酚浓度增高而明显受到抑制, 其他各组与 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL 相比均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。LY294002 和 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚均几乎完全抑制了 MTDH mRNA 表达, 但两组之间无显著性

差异 ($P > 0.05$), 表明二者对 MTDH mRNA 的抑制作用相当 (图 3)。

4 丹皮酚对 P-gp、MTDH、PTEN 蛋白表达的影响

激光共聚焦显微镜检测发现, 随着丹皮酚浓度增加, P-gp 和 MTDH 蛋白 MFI 值逐渐下降, PTEN 蛋白 MFI 值逐渐增加。表明丹皮酚可抑制 P-gp 和 MTDH 蛋白表达, 诱导 PTEN 蛋白表达, 与对照组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。LY294002 对 MTDH 的抑制作用和对 PTEN 的诱导作用与 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚组相当, LY294002 对 P-gp 的抑制作用与 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚组相当, 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。如图 4 所示。

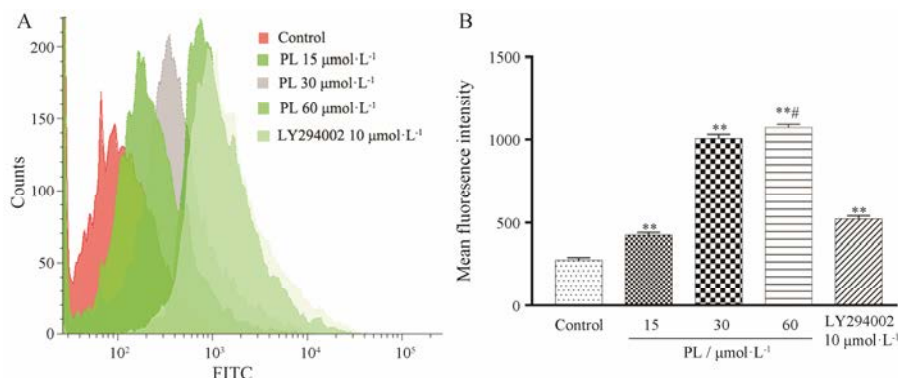


Figure 2 P-gp function changes after SKOV3/DDP cells-treated with different concentrations of PL. A: Flow cytometry analysis results; B: Statistical analysis results for the changes of MFI. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL group

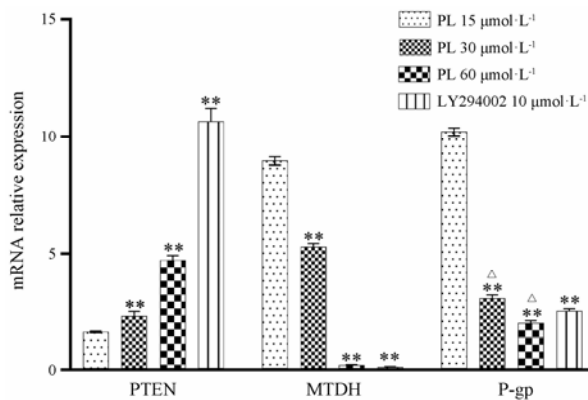


Figure 3 The relative expression changes of PTEN, MTDH and MDR1 mRNA in SKOV3/DDP cells after treatment with different concentrations of PL. ** $P < 0.01$ vs $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PL group; $\Delta P < 0.05$ vs $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002 group

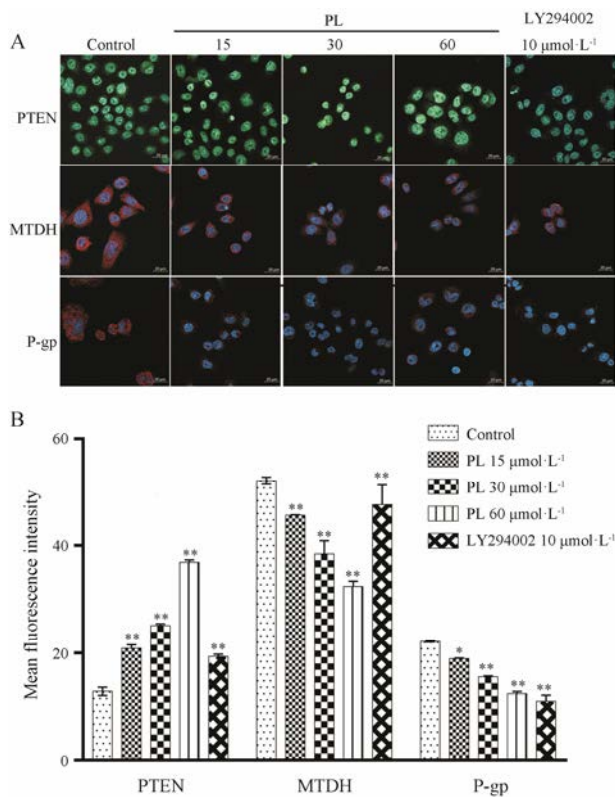


Figure 4 The protein expression changes of PTEN, MTDH and P-gp in SKOV3/DDP cells after treatment with different concentrations of PL (400 \times magnification). A: Confocal laser scanning microscopy analysis results; B: Statistical analysis results for the changes of MFI. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

讨论

MDR 的分子机制十分复杂, 包括靶基因突变与扩增、DNA 损伤修复能力改变、抗凋亡因子 (如 NF- κ B 等) 表达增强、外排转运蛋白 (如 P-gp) 过度表达等。Xu 等^[13]通过检索已发表的有关卵巢癌耐药的文献并进行 meta 分析后发现, P-gp 高表达是卵巢

癌对铂类为基础的化疗方案耐药的重要原因。研究表明, MTDH 在卵巢癌铂类化疗耐药患者肿瘤组织中的表达往往高于卵巢癌化疗敏感患者, 是一个预测化疗耐药的生物标志物^[14], 而抑制 MTDH 可以增加肿瘤细胞对顺铂的敏感性^[15]。另外, MTDH 可通过激活 PI3K/AKT 通路而增加 MDR1 的表达, 引起肿瘤 MDR^[5]。PTEN 表达下调同样可激活 PI3K/AKT, 进而诱导其下游基因 MDR1 等的表达, 引起化疗耐药^[16]。因此, MTDH 和 PTEN 的异常表达可能是卵巢癌化疗过程中 P-gp 高表达, 进而导致 MDR 的重要原因。

自从 MDR 现象发现以来, 开发逆转 MDR 的药物一直是研究人员的目标。早期的化学合成 MDR 逆转剂多因其潜在的毒性或在临床试验中并不具有明显 MDR 逆转作用而终止了研究, 而作用靶点单一可能是其疗效不明显的原因之一。因此, 研究人员开始从包括中药在内的天然产物中寻找 MDR 逆转剂, 天然来源的 MDR 逆转剂通常具有毒性较低、多靶点、人体耐受性良好等特点^[17]。丹皮酚作为牡丹皮和芍药等中药的主要活性成分, 具有抗肿瘤、保护血管和保护神经元等多种药理活性^[18,19], 对 NF- κ B、STAT3 和 Wnt/ β -catenin 等信号通路均有抑制作用^[9,10], 是一种潜在的具有多靶点作用的天然成分。本课题组前期研究发现, 以牡丹皮和芍药组方的桂枝茯苓丸可通过抑制 PI3K/AKT 通路逆转卵巢癌 MDR^[20], 本课题对丹皮酚逆转卵巢癌 MDR 的作用和机制进行研究, 可在一定程度上为桂枝茯苓丸逆转 MDR 进一步提供实验基础。

本研究采用 RTCA S16 实时无标记细胞分析系统检测细胞毒性, 除了研究药物, 无需加入其他试剂, 避免了其他试剂对细胞的影响。因此, 与 CCK-8 等细胞毒性分析方法相比具有一定优势^[21]。RTCA S16 实时无标记细胞分析系统的检测原理是利用贴壁细胞贴壁后, 专用培养板上的电阻会发生改变, 从而可以灵敏地实时监测细胞生长情况。因此, 该方法并不适用于悬浮细胞。另外, 该方法需专用仪器和培养板, 前期投入高, 导致检测成本增加。通过 RTCA S16 系统分析发现, 丹皮酚在极低细胞毒性剂量下联用顺铂, SKOV3/DDP 对顺铂的耐药倍数从 4.57 倍, 降为 1.34 倍, 表明丹皮酚具有逆转卵巢癌化疗耐药的作用。LY294002 是 PI3K 通路抑制剂, 已知具有抑制 MTDH 和 P-gp 表达及 P-gp 功能的作用^[22,23], 并可诱导 PTEN 表达^[24], 在本研究中作为阳性对照。RTCA S16 系统检测显示, LY294002 逆转耐药作用稍强于 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚。LY294002 对多种肿瘤均有较强

的杀伤作用,但因可引起毒性和成药性差,导致其未能进入临床试验阶段^[25]。

罗丹明 123 具有细胞毒性低、可特异性结合 P-gp 的特点,广泛用于对 P-gp 功能进行检测^[20,23,26]。P-gp 功能检测发现,丹皮酚可浓度依赖性地抑制 P-gp 功能。荧光定量 PCR 和细胞免疫荧光检测证实,随着丹皮酚浓度增加,其在基因和蛋白水平,对 MDR1/P-gp 和 MTDH 的抑制作用以及对 PTEN 的诱导作用均逐渐增强。LY294002 对 PTEN mRNA 的诱导作用强于 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚组,而其对 PTEN 蛋白的诱导作用仅与 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚组相当。与此相似,LY294002 与 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚均几乎完全抑制了 MTDH mRNA 的表达,但 LY294002 对 MTDH 蛋白的抑制作用仅与 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹皮酚相当,说明可能还有其他机制参与丹皮酚对 MTDH 和 PTEN 蛋白的调控。有研究表明,microRNA 214 表达增高可抑制 PTEN 表达,进而活化磷酸化蛋白激酶 B^[27],导致卵巢癌转移和耐药。

综上,丹皮酚对 SKOV3/DDP 细胞具有逆转耐药作用,其机制可能与抑制 P-gp 蛋白功能及 MDR1/P-gp 和 MTDH 表达,诱导 PTEN 表达有关。本研究为丹皮酚作为 MDR 逆转剂应用于卵巢癌 MDR 治疗提供了理论基础。然而,丹皮酚逆转 MDR 的其他潜在调控机制仍有待深入研究。

References

- [1] Allemani C, Matsuda T, di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391: 1023–1075.
- [2] NCCN Guidelines Version 5. 2017: Epithelial ovarian cancer/fallopian tube cancer/primary peritoneal cancer & less common histopathologies [EB/OL]. Washington: National Comprehensive Cancer Network, 2018 [2018-02-02]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian.pdf.
- [3] Sarkar D, Fisher PB. AEG-1/MTDH/LYRIC: Clinical Significance [M]. Oxford: Academic Press, 2013: 39–74.
- [4] Zhu GC, Yu CY, She L, et al. Metadherin regulation of vascular endothelial growth factor expression is dependent upon the PI3K/AKT pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94: e502.
- [5] Burris HA. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71: 829–842.
- [6] Du C, Yi X, Liu W, et al. MTDH mediates trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer by decreasing PTEN expression through an NF κ B-dependent pathway [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 869.
- [7] Weberpals JI, Amin MS, Chen BE, et al. First application of the automated quantitative analysis (AQUA) technique to quantify PTEN protein expression in ovarian cancer: a correlative study of NCIC CTG OV.16 [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 140: 486–493.
- [8] Wang L, Wang C, Jin S, et al. Expression of NF- κ B and PTEN in primary epithelial ovarian carcinoma and the correlation with chemoresistance [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 10953–10963.
- [9] Zhang L, Tao L, Shi T, et al. Paeonol inhibits B16F10 melanoma metastasis *in vitro* and *in vivo* via disrupting proinflammatory cytokines-mediated NF- κ B and STAT3 pathways [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67: 778–788.
- [10] Li QN, Wang LL, Tang JM, et al. Anticancer activity of paeonol on human ovarian cancer A2780 cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signal pathway [J]. *J Chin Pract Diagn Ther*, 2017, 31: 1062–1066.
- [11] Wang YH, Imai Y, Shiseki M, et al. Knockdown of the Wnt receptor Frizzled-1 (FZD1) reduces MDR1/P-glycoprotein expression in multidrug resistant leukemic cells and inhibits leukemic cell proliferation [J]. *Leuk Res*, 2018, 67: 99–108.
- [12] Cai J, Chen S, Zhang W, et al. Paeonol reverses paclitaxel resistance in human breast cancer cells by regulating the expression of transgelin 2 [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 984–991.
- [13] Xu L, Cai J, Yang Q, et al. Prognostic significance of several biomarkers in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of published studies [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139: 1257–1277.
- [14] Li C, Li Y, Wang X, et al. Elevated expression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is correlated with cisplatin-based chemoresistance and shortened outcome in patients with stages III-IV serous ovarian carcinoma [J]. *Histopathology*, 2012, 60: 953–963.
- [15] Wei YB, Guo Q, Gao YL, et al. Repression of metadherin inhibits biological behavior of prostate cancer cells and enhances their sensitivity to cisplatin [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12: 226–232.
- [16] Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16: 121–130.
- [17] Karthikeyan S, Hoti SL. Development of fourth generation

- ABC inhibitors from natural products: a novel approach to overcome cancer multidrug resistance [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 15: 605–615.
- [18] Liu YR, Chen JJ, Dai M. Paeonol protects rat vascular endothelial cells from ox-LDL-induced injury *in vitro* via downregulating microRNA-21 expression and TNF- α release [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35: 483–488.
- [19] Chen YH, Lin PL, Hsu HY, et al. Action potential bursts in central snail neurons elicited by paeonol: roles of ionic currents [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 1553–1563.
- [20] Han L, Guo X, Bian H, et al. Guizhi Fuling Wan, a traditional Chinese herbal formula, sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells through inactivation of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 4651949.
- [21] Nemade H, Chaudhari U, Acharya A, et al. Cell death mechanisms of the anti-cancer drug etoposide on human cardiomyocytes isolated from pluripotent stem cells [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92: 1507–1524.
- [22] Ma J, Xie SL, Geng YJ, et al. *In vitro* regulation of hepatocellular carcinoma cell viability, apoptosis, invasion, and AEG-1 expression by LY294002 [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38: 73–80.
- [23] Satonaka H, Ishida K, Takai M, et al. (–)-Epigallocatechin-3-gallate down-regulates doxorubicin-induced overexpression of P-glycoprotein through the coordinate inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37: 6071–6077.
- [24] Dinesh P, Rasool M. Berberine inhibits IL-21/IL-21R mediated inflammatory proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the attenuation of PI3K/AKT signaling pathway and ameliorates IL-21 mediated osteoclastogenesis [J]. *Cytokine*, 2018, 106: 54–66.
- [25] Zhao W, Qiu Y, Kong D. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7: 27–37.
- [26] Dei S, Coronello M, Bartolucci G, et al. Design and synthesis of new potent *N,N*-bis(arylalkyl)piperazine derivatives as multidrug resistance (MDR) reversing agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 147: 7–20.
- [27] Yin G, Chen R, Alvero AB, et al. TWISTing stemness, inflammation and proliferation of epithelial ovarian cancer cells through MIR199A2/214 [J]. *Oncogene*, 2010, 29: 3545–3553.