

基于巨噬细胞迁移抑制因子-NLRP3 通路探究参一胶囊增强顺铂抗肿瘤作用机制

翟婧卉¹, 魏兰懿², 宋燕青^{1*} (1. 吉林大学第一医院药学部, 吉林 长春, 130021; 2. 吉林药学院, 吉林 长春, 130021)

[摘要] 目的: 参一胶囊的主要成分为人参皂苷 Rg3, 临床上主要作为化疗药的辅助用药, 本研究主要探究参一胶囊联合顺铂对人肺腺癌细胞 (A549) 细胞抗肿瘤作用的影响及机制。方法: 将人肺腺癌细胞 (A549) 分组为空白对照组, 顺铂组 (10 μM) 和顺铂+参一胶囊组 (20, 40 和 80 $\mu\text{g/mL}$), 通过 MTT 法和划痕实验分别检测细胞存活率和迁移能力, 然后利用 Western Blot 法检测 A549 细胞内巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 和 Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 及相关蛋白的变化。结果: 与顺铂单药组相比, 联合用药组 A549 细胞存活率和迁移能力均明显降低, 并且发现参一胶囊 (80 $\mu\text{g/mL}$) 联合顺铂组的 A549 细胞内的 MIF、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 P-p65 蛋白较顺铂单药组比, 均显著性升高。结论: 参一胶囊可增强顺铂对 A549 细胞的损伤作用, 且其增强作用可能与增强 MIF-NLRP3 信号通路有关。

[关键词]: 参一胶囊; 顺铂; 巨噬细胞迁移抑制因子; Nod 样受体蛋白 3

The anti-tumor effect of Shenyi capsule enhancing cisplatin via macrophage migration inhibitory factor-NLRP3 pathway

ZHAI Jing-hui¹, WEI Lan-yi², SONG Yan-qing^{1*} (1. Department of Pharmacy, the First Hospital of Jilin University, Jilin Changchun 130021, China; 2. Pharmacy, Jilin University, Jilin Changchun 130021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The main ingredient of Shenyi Capsules is ginsenoside Rg3, which is mainly used as an adjuvant of chemotherapeutic drugs in clinic. The research explored the effect of shenyi capsule combined with cisplatin on the anti-tumor effect of human lung adenocarcinoma cells (A549). **METHODS** The cells were divided into a blank control group, the cisplatin group and the cisplatin + shen1 capsule group. The activity and migration of A549 cells were detected by MTT assay and wound healing, and the changes of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) in A549 cells were detected by Western Blot assay. **RESULTS** Compared with the cisplatin group, the cell viability and migration capacity of the shenyi capsule combined with cisplatin group were significantly reduced, and MIF, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β and P-p65 proteins were significantly increased. **CONCLUSION** Shenyi capsule can enhance the damage effect of cisplatin on A549 cells, and weaken the migration ability. Shenyi capsule may enhance the anti-tumor effect of cisplatin by activating the MIF-NLRP3 signal pathway.

KEY WORDS: Shenyi capsule; Cisplatin; Macrophage migration inhibitory factor; Nod-like receptor protein 3

1、目的

顺铂是治疗不同类型实体肿瘤的一线药物, 主要归因于其能够导致不可修复的 DNA 损伤, 使得细胞增殖停滞及线粒体凋亡。然而多数情况下接触顺铂的恶性肿瘤细胞会激活适应性反应, 使其不易收到药物的抗增殖和细胞毒性作用, 因此多数接受顺铂治疗的患者注定会经历治疗失败和肿瘤复发^[1]。逆转肿瘤细胞耐药的关键是找到可用于克服耐药的特异性靶点^[2]。已提出的顺铂耐药机制包括改变细胞对顺铂的摄取和外排, 增加肝脏的生物

转化和解毒，以及增加 DNA 修复和抗凋亡机制，从而干扰癌细胞凋亡。现有研究表明，顺铂与其他化疗药物联用可克服耐药性并减少不良反应^[3]。

据报道，慢性炎症在癌症的发生发展中起着关键作用，炎性小体介导的肿瘤炎症引起了极大关注。Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体主要通过半胱氨酸天冬氨酸酶-1 (caspase-1) 处理和白介素 1 β (IL-1 β) 分泌介导自身炎症，促进肿瘤生长^[4]。NLRP3 家族含炎症体结构域，包括 NLRP3 寡聚体和凋亡相关斑点样适配子蛋白，是天然的免疫通路，已被证实参与了多种炎症性疾病发生和发展。NLRP3 基因敲除可抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[5]。NLRP3 在不同肿瘤的发生和发展中的临床功能也突出了炎性小体的作用潜力，并作为预后标记物^[6]。巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 直接参与 NLRP3 炎症体的组装和激活，现有研究表明，MIF 可介导 NLRP3 与波形蛋白的相互作用，阻断 MIF 可特异性抑制 NLRP3 炎症体的表达^[7]。因此，激活 MIF-NLRP3 通路可为调节肿瘤微环境提供新的抗癌策略。

参一胶囊，其主要成分为人参皂苷 Rg3 (结构式如图 1 所示)，临床上主要作为化疗药的辅助用药，临床实验已证明与化疗药联合应用，肺癌的治疗效率提高了 20.4%，并且应用参一胶囊后，能明显改善化疗气虚证的症候，有增效解毒的作用，提高肿瘤患者的免疫功能^[8-9]。但目前参一胶囊与顺铂联用后增强顺铂抗肿瘤作用机制尚不明确。本文将通过对 MIF-NLRP3 通路探究参一胶囊增强顺铂抗肿瘤活性的作用机制。

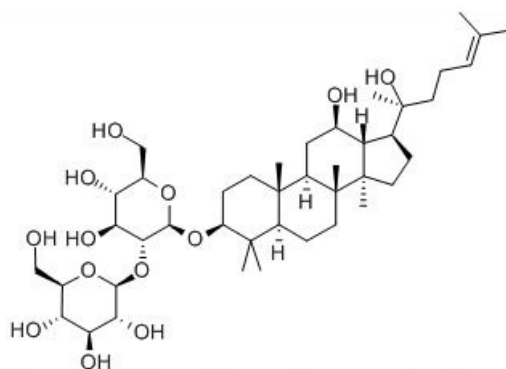


图 1 参一胶囊 (SY) 主要成分人参皂苷 Rg3 的结构式

2、材料与方法

2.1 药品与试剂

顺铂注射液 (江苏豪森药业集团有限公司)、人参皂苷 Rg3 (纯度=90.0%，大连富生天然药物开发有限公司)、胎牛血清 (Gibco)、PBS 缓冲液 (Gibco)、1640 培养基、胰酶 (Gibco)、MTT、蛋白裂解液、医用 X 射线胶片。NLRP3 抗体购于 Abcam，兔二抗购于碧云天生物技术有限公司。

2.2 细胞培养

将人肺腺癌细胞 (A549) 接种于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中，当细胞密度达到 90% 时，将原来的培养基弃掉，用 PBS 清洗 2 次后加入 1 mL 胰酶消化，等细胞变圆后再将胰酶弃掉，最后加入 4 mL 培养基小心吹打散，分瓶。

2.3 MTT 法细胞活力检测

取处于对数生长期的 A549 细胞按 5×10^4 个/mL 浓度接种到 96 孔板中，设置 6 个复孔，每孔 100 μ L，然后放入培养箱中培养。待细胞贴壁后，加药，培养 24 h 后，避光每孔加入 10 μ L 5 mg/L 的噻唑蓝 (MTT)。继续培养 4 h 后，吸出上清，再每孔加入 150 μ L DMSO，阵摇 15 min 后，用酶标仪在 490 nm 处测吸光度。

2.4 划痕实验

取处于对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中，使用无菌的 200 μL 枪头在 6 孔板中心划一个“十”字形的划痕，然后用 PBS 清洗，加药，培养 24 h 后，观察划痕宽度的变化，并用光学显微镜拍照，实验重复 3 次。

2.5 Western blot 检测

取处于对数生长期的 A549 细胞按 5×10^4 个/mL 浓度接种到中皿中，加药 24 h 后，倒掉培养液，用预冷的 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液洗 2 遍，加入适量的含有 1% 蛋白酶抑制剂（以免细胞受到蛋白酶污染）的蛋白裂解液，置于冰盒上裂解 15 分钟，用提前已经拿酒精棉擦干净的细胞刮刀刮下细胞，用微量进样器移至 1.5 mL 离心管内，13,500 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。小心吸取上层蛋白放于离心管内，加入上样缓冲液。置于水中煮沸 5 min，将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。以 Quantity One 软件计算条带面积灰度值。

2.6 统计学方法

将实验数据进行统计学处理，应用 GraphPad Prism 5 软件进行计算，数据表示为平均值 \pm 三次或更多次独立实验的平均值的标准误差 (SEM)，用 One-way ANOVA 进行 Tukey 检验，当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

3、结果

3.1 参一胶囊与顺铂对 A549 细胞活力的影响

如图 2 所示，与空白对照组相比，顺铂单药组 (CP) 和参一胶囊单药组 (SY) 单药组 A549 细胞活力随药物浓度的增加和时间的延长而呈梯度降低。SY 与 CP 联合作用后，与 CP (100 nM) 单用组比较，A549 细胞存活率进一步降低且呈一定浓度梯度和时间梯度。结果表明，SY 具有增强 CP 对 A549 细胞的损伤作用。

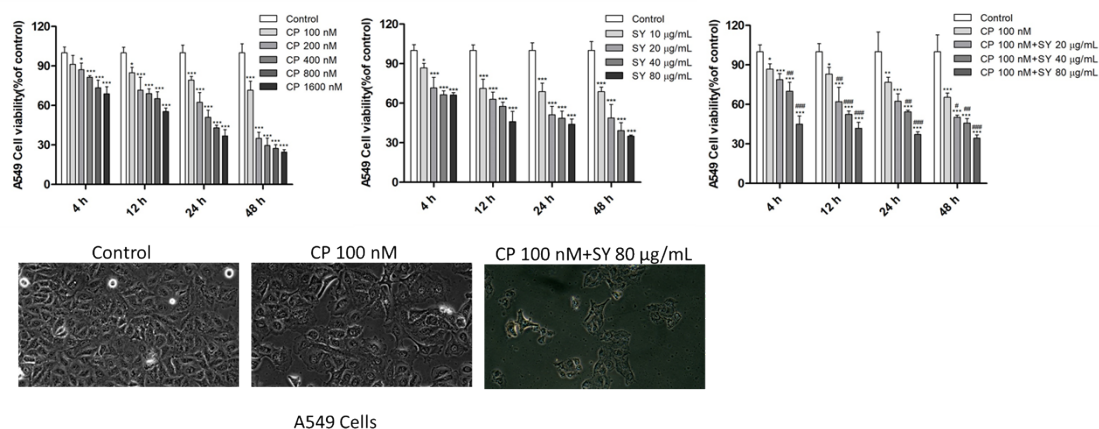


图 2 参一胶囊 (SY) 和顺铂 (CP) 对 A549 细胞活力的影响。 (* $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group, *** $P < 0.001$ vs. control group, # $P < 0.05$ vs. CP group, ## $P < 0.01$ vs. CP group, ### $P < 0.001$ vs. CP group)

3.2 参一胶囊(SY)与顺铂(CP)联用对 A549 细胞迁移能力比较

如图 3 所示，与空白组相比，CP 组划痕宽度增大，说明 CP 降低了 A549 细胞的迁移能力。与 CP 组相比，SY 与 CP 联合给药组的划痕宽度明显增大，说明 SY 与 CP 联用后，三种肿瘤细胞的迁移能力进一步降低。

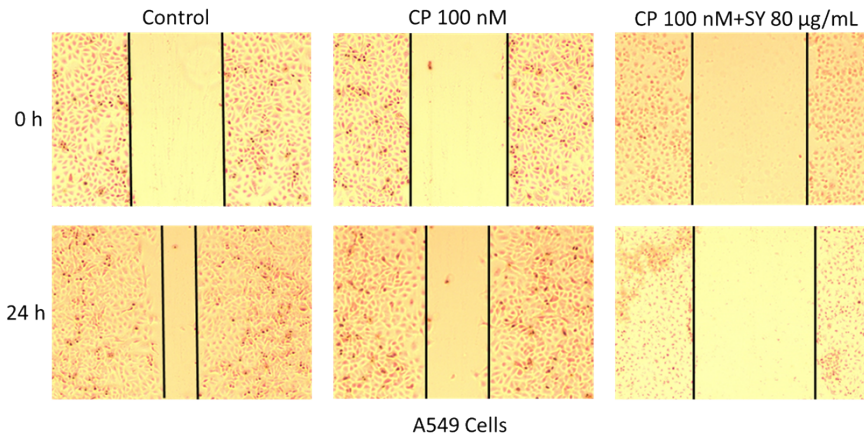


图3 参一胶囊 (SY) 与顺铂 (CP) 对 A549 细胞迁移能力的影响。

3.3 参一胶囊(SY)与顺铂(CP)联用对 A549 细胞蛋白表达的影响

如图4所示,与空白对照组比较,CP单药组的NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、p-p65和Mif蛋白表达明显升高;与CP单药组相比,SY(80 $\mu\text{g/mL}$)与CP联用后,以上蛋白表达明显升高。结果表明,SY与CP联用后,MIF和NLRP3相关蛋白表达进一步升高,说明SY增强CP抗肿瘤作用可能与增强Mif-NLRP3通路信号有关。

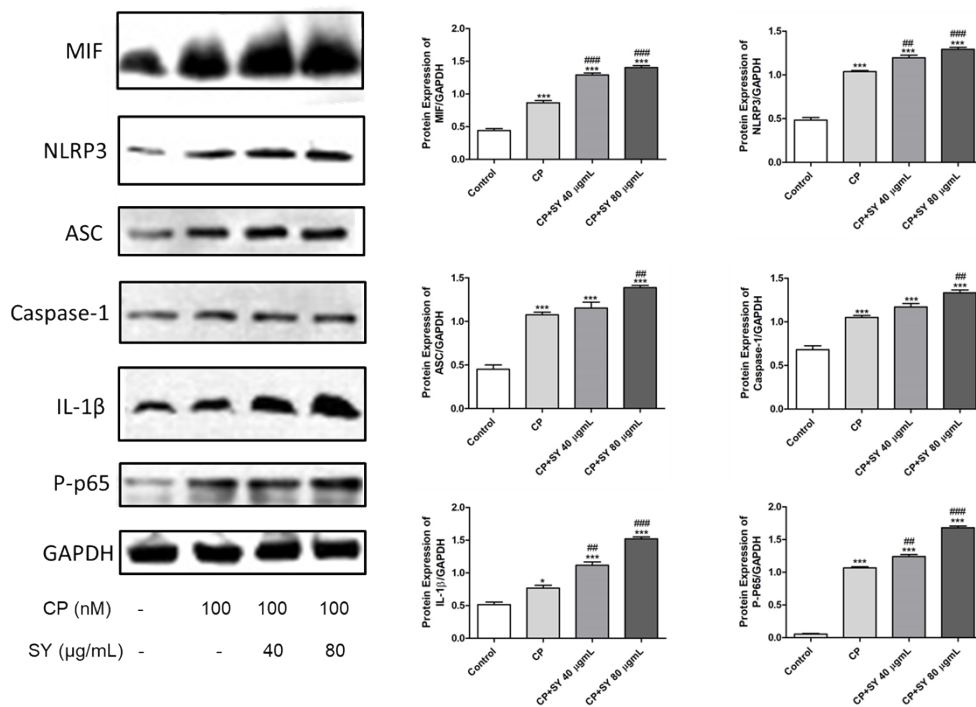


图4 参一胶囊和顺铂对 A549 细胞内相关蛋白表达的影响。(* $P < 0.05$ vs. control group, *** $P < 0.001$ vs. control group, ## $P < 0.01$ vs. CP group, ### $P < 0.001$ vs. CP group)

4、讨论

目前癌症采用标准的放化疗治疗并不理想,肿瘤细胞对临床常用的一线化疗药物也易出现耐药性,因此预后效果差。癌症的发病具有多途径、多靶点、多机制的特点,单独的化疗药物往往只作用于癌症某一机制,因此疗效不佳。而中医药讲究辨证论治,以整体的

角度来考虑某一疾病的治疗,因此适合作为西药治疗的辅助药,能够降低药物不良反应,减轻药物的副作用,同时增强药效。

参一胶囊主要成分为人参皂苷 Rg3,是从人参中提取的有效活性成分,具有抗疲劳、抗肿瘤、降血糖等作用^[10]。有大量研究表明,人参皂苷 Rg3 与化疗药联用,可显著增强化疗药的抗肿瘤作用,提高肿瘤细胞对化疗药的敏感性,减轻化疗药的耐药性^[11-13]。本文以人肺腺癌 A549 细胞为研究对象,采用 MTT 法检测参一胶囊与顺铂联用后对 A549 细胞生长抑制的影响,结果表明参一胶囊与顺铂联用后能够加强单一应用顺铂时的抗肿瘤活性,且呈剂量依赖性和时间依赖性。采用划痕实验检测联合用药对细胞迁移能力的影响,结果表明参一胶囊能够加强顺铂抑制肿瘤细胞的迁移能力。故单独应用顺铂可抑制肿瘤细胞生长及迁移,而参一胶囊与顺铂联用后可增强顺铂对肿瘤的抑制作用。

大量的研究表明,癌症的发生与 TNF- α 、IL-18 和 IL-1 β 等多种炎症因子密切相关,而以上炎症因子与 NLRP3 密切相关^[14]。NLRP3 炎症小体活化后促使 caspase-1 活化,随后切割 IL-1 β 及 IL-18 前体,产生具有生物活性的 IL-1 β 及 IL-18 并释放到细胞外^[15]。最近的研究显示,血清中 IL-1 β 和 IL-18 的高表达和癌症患者的不良预后密切相关^[16]。Shin 等^[17]研究首次发现,MIF 是促进 NLRP3 表达的上游分子,NLRP3 是 NLRP3 炎症体形成的限速步骤。且 MIF 拮抗剂可使 IL-1 β 表达减少。因此本研究采用 Western Blot 法检测单独应用顺铂及顺铂与参一胶囊联用时 A549 细胞内蛋白变化的分析,结果表明联合用药可以显著增强 MIF 与 NLRP3 及其相关蛋白的表达,从而增强顺铂的抗肿瘤活性。

综上所述,参一胶囊与顺铂联用后能够增强对肿瘤细胞的损伤作用,抑制肿瘤细胞迁移,其机制可能与增强 MIF-NLRP3 通路信号有关,为临床上癌症治疗提供新思路及抗癌新靶点。

参考文献

1. Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., Kroemer, G., 2014. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death & Disease* 5, e1257–e1257..
2. Giacomini, I., Ragazzi, E., Pasut, G., Montopoli, M., 2020. The Pentose Phosphate Pathway and Its Involvement in Cisplatin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 937..
3. Dasari, S., Bernard Tchounwou, P., 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740, 364–378..
4. Wang, H., Luo, Q., Feng, X., Zhang, R., Li, J., Chen, F., 2018. NLRP3 promotes tumor growth and metastasis in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 18..
5. Yao, M., Fan, X., Yuan, B., Takagi, N., Liu, S., Han, X., Ren, J., Liu, J., 2019. Berberine inhibits NLRP3 Inflammasome pathway in human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19..
6. Lee, H.E., Lee, J.Y., Yang, G., Kang, H.C., Cho, Y.-Y., Lee, H.S., Lee, J.Y., 2019. Inhibition of NLRP3 inflammasome in tumor microenvironment leads to suppression of metastatic potential of cancer cells. *Scientific Reports* 9..
7. Lang, T., Lee, J.P.W., Elgass, K., Pinar, A.A., Tate, M.D., Aitken, E.H., Fan, H., Creed, S.J., Deen, N.S., Traore, D.A.K., Mueller, I., Stanicic, D., Baiwog, F.S., Skene, C., Wilce, M.C.J., Mansell, A., Morand, E.F., Harris, J., 2018. Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation. *Nature Communications* 9..
8. 林洪生, 朴炳奎, 李树奇. 参一胶囊治疗肺癌 II 期临床试验总结[J]. *中国肿瘤临床*, 2002, (4): 52-55.
9. 赵增虎, 丁瑞亮, 宁宇, et al. 参一胶囊对小细胞肺癌患者化疗后免疫功能的影响[J]. *中国中医急症*, 2010, 019(004): 598-599.
10. Sun M, Ye Y., Xiao L., et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg3 (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 2017, 39, 507-518.
11. 刘浩, 侯炜, 王辉, et al. 参一胶囊联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌 50 例临床研究[J]. *中医杂志*, 2012(11):38-40+71.
12. 陶群, 任微微, 陆志灵. 参一胶囊联合洛铂和吉西他滨治疗复发性卵巢癌的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2018, v.33(06):180-183.

13. 马少军, 张洁, 单丽珠, et al. 参一胶囊联合化疗对胰腺癌患者外周血细胞水平及免疫细胞活性的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2012, 18(2).
14. 唐阳芳,王稳莹,陈蕊,杨洋.NLRP3 炎症小体在槲皮素诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡中的作用[J].现代肿瘤医学,2021,29(01):5-9.
15. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2014; 1319:82-95.
16. Terlizzi M , Casolaro V , Pinto A , Sorrentino R . Inflammasome : cancer’s friend or foe ? *Pharmacology & therapeutics* 2014 ; 143 : 24-33.
17. Shin, M.S., Kang, Y., Wahl, E.R., Park, H., Lazova, R., Leng, L., Mamula, M., Krishnaswamy, S., Bucala, R., Kang, I., 2019. Macrophage Migration Inhibitory Factor Regulates U1 Small Nuclear RNP Immune Complex–Mediated Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Arthritis & Rheumatology* 71, 109–120..