

·基础研究·

·论著·

牛蒡子苷元调节Hippo信号通路对黑素瘤细胞化疗耐药性的影响

高阳¹, 杜紫薇¹, 王海飞²

(1.河北省中医药科学院皮肤科 河北 石家庄 050000; 2.滦平县中医院皮肤科 河北 承德 068250)

[摘要]目的: 探究牛蒡子苷元 (Arctigenin, ARG) 对黑素瘤细胞化疗耐药性的影响以及该过程中对Hippo信号通路的调节机制。方法: 利用不同浓度的维莫非尼 (Vemurafenib, VEM) 持续培养A375细胞以获得耐药性黑素瘤细胞株A375/VEM; CCK-8检测不同浓度VEM对A375和A375/VEM细胞的增殖活性以及不同浓度ARG对A375/VEM细胞的毒性; 将A375/VEM细胞分为对照组、VEM组、ARG组、ARG+VEM组、ARG+VEM+Hippo抑制剂组, CCK-8法检测各组A375/VEM细胞的存活率; 克隆形成实验检测各组A375/VEM细胞的增殖情况; 流式细胞术检测各组A375/VEM细胞的凋亡情况; Western blot检测各组细胞中Cyclin D1、ERK1/2、p-ERK1/2、AKT、p-AKT及Hippo途径相关蛋白的表达; 建立耐药性黑素瘤小鼠移植模型并观察肿瘤生长情况。结果: 与对照组相比, VEM组、ARG组及ARG+VEM组A375/VEM细胞的存活率、克隆形成数量、Cyclin D1、p-ERK1/2、p-AKT、Yes相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 表达均降低 ($P < 0.05$), 且ARG+VEM组低于VEM组和ARG组 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、LATS1、p-YAP水平升高 ($P < 0.05$), 且ARG+VEM组高于VEM组和ARG组 ($P < 0.05$); 与ARG+VEM组相比, ARG+VEM+Hippo抑制剂组A375/VEM细胞的存活率、克隆形成数量、Cyclin D1、p-ERK1/2、p-AKT、YAP表达均升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、LATS1、p-YAP水平降低 ($P < 0.05$); 裸鼠移植瘤体内实验发现, ARG+VEM组小鼠肿瘤重量和体积均明显低于VEM组和ARG组 ($P < 0.05$); 进一步加入Hippo途径的抑制剂, 发现ARG对A375/VEM细胞耐药性的抑制作用被逆转 ($P < 0.05$)。结论: ARG可能是通过激活Hippo途径来抑制黑素瘤细胞的化疗耐药性。

[关键词]牛蒡子苷元 (ARG); 黑素瘤细胞; 化疗; 耐药性; Hippo信号通路

[中图分类号]R285 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455 (2025) 07-0001-06

Impact of Arctigenin on Chemoresistance of Melanoma Cells by Regulating Hippo Signal Pathway

GAO Yang¹, DU Ziwei¹, WANG Haifei²

(1. Department of Dermatology, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, Hebei, China;

2. Department of Dermatology, Luanping County Traditional Chinese Medicine Hospital, Chengde 068250, Hebei, China)

Abstract: **Objective** To explore the impact of arctigenin (ARG) on chemoresistance of melanoma cells and its regulation mechanism on Hippo signaling pathway in this process. **Methods** The drug resistant melanoma cell line A375/VEM was obtained by continuously culturing A375 cells with different concentrations of vemurafenib (VEM). CCK-8 was applied to detect the proliferative activity of VEM at different concentrations on A375 and A375/VEM cells, and the toxicity of ARG at different concentrations on A375/VEM cells. A375/VEM cells were grouped into control group, VEM group, ARG group, ARG+VEM group, and ARG+VEM+Hippo inhibitor group, CCK-8 method was applied to detect the survival rate of A375/VEM cells in each group, clone formation experiment was applied to detect the proliferation of A375/VEM cells in each group, flow cytometry was applied to detect the apoptosis of A375/VEM cells in each group. Western blot was applied to detect the expression of Cyclin D1, ERK1/2, p-ERK1/2, AKT, p-AKT, and Hippo pathway related proteins of cells in each group, the transplantation model of drug-resistant melanoma in mice was established, and the tumor growth was observed. **Results** Compared with the control group, the survival rate of A375/VEM cells, clone formation quantity, the expression of Cyclin D1, p-ERK1/2, p-AKT, and Yes-associated protein in the VEM group, ARG group, and ARG+VEM group reduced ($P < 0.05$), and the ARG+VEM group were lower than the VEM group and ARG group ($P < 0.05$), the apoptosis rate, and the levels of LATS1 and p-YAP increased ($P < 0.05$), and the ARG+VEM group were higher than the VEM group and ARG group ($P < 0.05$). Compared with the ARG+VEM group, the survival rate of A375/VEM cells, clone formation quantity, the expression of Cyclin

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (编号: 2021115)

第一作者: 高阳, 研究生、主治医师; 研究方向为皮肤外科。E-mail: hongm410@163.com

D1, p-ERK1/2, p-AKT, and YAP in the ARG+VEM+Hippo inhibitor group increased ($P<0.05$), the apoptosis rate, and the levels of LATS1 and p-YAP decreased ($P<0.05$). In vivo experiments on nude mice transplanted with tumor cells showed that the tumor weight and volume in the ARG+VEM group were obviously lower than those in the VEM and ARG groups ($P<0.05$). Further addition of Hippo pathway inhibitors revealed that the inhibitory effect of ARG on drug resistance in A375/VEM cells was reversed ($P<0.05$). **Conclusion** ARG may inhibit the chemoresistance of melanoma cells by activating Hippo pathway.

Key words: arctigenin(ARG); melanoma cells; chemotherapy; resistance; hippo signaling pathway

黑色素瘤主要是黑色素细胞发展而来, 紫外线辐射通过其对皮肤的有害影响和直接的DNA损伤而成为皮肤黑色素瘤形成的主要因素, 加速肿瘤发生^[1-2]。据了解, BRAF基因突变是黑色素瘤最常见的突变, BRAF抑制剂维莫非尼(Vemurafenib, VEM)已被用于黑色素瘤的治疗, 但化疗后会产生耐药性^[3]。Hippo途径是一种肿瘤抑制途径, 其失调会导致下游效应子转录辅调节蛋白Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)和具有PDZ结合基序的转录辅激活因子(Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)过度激活并促进癌症的发展和进展, 包括皮肤癌^[4]。有研究已经证明, Hippo肿瘤抑制通路的激活促进了黑色素细胞生长停滞^[5]。牛蒡子苷元(ARG)是从牛蒡子的种子中分离的活性成分, 具有抗氧化、抗炎、免疫调节以及对乳腺癌、卵巢癌等多种癌症的抗肿瘤作用^[6-7], 同时另一项研究发现ARG可在微环境应激条件下抑制结肠癌细胞对依托泊苷的耐药性^[8]。但其对黑色素瘤细胞以及耐药性的作用尚未明确。因此, 本研究旨在探讨ARG对黑色素瘤细胞耐药性的影响以及该过程中的具体作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物和细胞: SPF级BALB/c Nude裸鼠, 雌性, 6周龄, (18±2)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2021-0011, 将裸鼠在温度24℃~26℃, 湿度60%的环境中适用性饲养1周。人恶性黑色素瘤细胞A375购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 牛蒡子苷元(纯度: HPLC≥98%)购自四川省维克奇生物科技有限公司; 维莫非尼片(规格: 240毫克/片), 国药准字HJ20170124; CCK-8细胞增殖/毒性检测试剂盒购自艾美捷科技有限公司, 货号KTC011001; Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海弗元生物科技有限公司, 货号FY600003; Cyclin D1、ERK1/2、p-ERK1/2、LATS1、YAP、p-YAP兔单抗及AKT、p-AKT兔多抗购自英国abcam公司, 货号ab134175、ab184699、ab278538、ab243656、ab52771、ab76252、ab8805、ab38449; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)购自上海和元李记生物技术有限公司, 货号AP31L014。SpectraMax Gemini EM荧光酶标仪购自上海美谷分子仪器有限公司; 奥林巴斯CKX53倒置显微镜购自上海仪景通光学科技有限公司; BD FACS Canto II流式细胞仪购自上海远耀生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将A375细胞接种至含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素混合液的DEME培养基中, 并放置在37℃, 5%CO₂的培养箱中培养, 每3d换一次液并传代。随后为了获得VEM耐药性细胞株A375/VEM, 将A375细胞系以1×10⁴个细胞/毫升的密度接种在60mm的培养皿中, 用1μM浓度的VEM处理细胞6周, 每3d处理一次, 然后将VEM的浓度增加至2μM, 同样每3d处理细胞一次, 持续6周以获得耐药性细胞株A375/VEM。接着将VEM的浓度增加至5μM, 每周处理细胞两次以保持耐药性。A375/VEM细胞的培养方式与A375细胞相同, 使用第3代细胞进行后续实验。

1.2.2 CCK-8检测VEM对A375和A375/VEM细胞的增殖活性: 将A375和A375/VEM细胞分别接种至96孔板中(1×10⁴个细胞/孔), 然后用浓度为0.1、0.5、1、5、10、20μM的VEM处理A375细胞和A375/VEM细胞, 每孔100μl。同时设立未用VEM处理的对照组, 24h后, 每孔加入10μl的CCK-8溶液在37℃下继续孵育4h, 使用酶标仪检测490nm处的吸光度(OD值), 并计算细胞存活率及半数抑制浓度IC₅₀。细胞存活率(%)=(ODVEM处理组-OD空白组)/(OD对照组-OD空白组)×100%。

1.2.3 CCK-8检测ARG对A375/VEM细胞的毒性: 将A375/VEM细胞接种至96孔板中(1×10⁴个细胞/孔), 随后用不同浓度(1、2.5、5、10、20、40mg/L)的ARG^[7]处理细胞, 同样设置未做任何处理的对照组, 24h后按照1.2.2的实验方法计算细胞存活率及半数抑制浓度IC₅₀。

1.2.4 A375/VEM细胞分组及处理: 将A375/VEM细胞分为对照组、VEM组、ARG组、ARG+VEM组、ARG+VEM+Hippo抑制剂组。VEM组细胞用1μM的VEM培养, ARG组细胞用20mg/L的ARG培养, ARG+VEM组细胞先后依次加入20mg/L的ARG和1μM的VEM进行共培养, ARG+VEM+Hippo抑制剂组细胞先用Hippo抑制剂XMU-MP-1处理30min^[9], 然后再加入20mg/L ARG和1μM VEM进行培养。48h后按照1.2.2的方法检测各组A375/VEM细胞的存活率。

1.2.5 克隆形成实验检测各组A375/VEM细胞的增殖情况: 将A375/VEM细胞接种在6孔板中(1×10³个细胞/孔), 以1.2.4的分组培养细胞, 14d后, 弃去培养液, 用4%多聚甲醛固定细胞, 并用0.1%结晶紫染色。1h后, PBS洗涤细胞, 在显微镜下观察各组细胞的克隆形成情况, 并对克隆细胞进行计数。

1.2.6 流式细胞术检测各组A375/VEM细胞的凋亡情况: 将A375/VEM细胞接种至6孔板中(1×10⁵个细胞/孔), 以

1.2.4的分组培养48 h后,收集细胞用预冷的PBS冲洗并用 $1\times$ 结合缓冲液重悬,然后依次加入 $5\mu\text{l}$ Annexin V-FITC和 $5\mu\text{l}$ PI在室温下避光孵育15 min,使用流式细胞仪分析细胞凋亡情况,并计算细胞凋亡率。

1.2.7 Western blot检测各组细胞中Cyclin D1、ERK1/2、p-ERK1/2、AKT、p-AKT及Hippo途经相关蛋白的表达:收集按1.2.4分组培养48 h后的A375/VEM细胞,PBS洗涤后加入蛋白裂解液提取蛋白,并用BCA检测蛋白浓度。将变性后的蛋白在10% SDS-PAGE中电泳分离,并转移到PVDF膜上。将膜在5%脱脂牛奶中封闭1 h, TBST清洗后与一抗(Cyclin D1、ERK1/2、p-ERK1/2、YAP、p-YAP比例1:10 000, AKT、p-AKT比例1:500, LATS1比例1:1 000)在4℃冰箱中孵育过夜再与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二级抗体(1:3 000)在室温下孵育1 h, TBST洗涤后用ECL试剂避光孵育10 min,最后蛋白质凝胶成像系统中检测蛋白表达并拍照,使用Image J软件对蛋白灰度值进行分析。

1.2.8 移植瘤小鼠模型的建立:将按1.2.4分组培养48 h后A375/VEM细胞重悬并调整至密度为 2×10^6 个细胞/毫升,将小鼠随机分为对照组、VEM组、ARG组、ARG+VEM组、ARG+VEM+Hippo抑制剂组,每组6只。然后按分组皮下注射1 ml细胞悬液至无胸腺裸鼠的右前肢下以形成异种移植肿瘤,每天观察肿瘤生长情况,并利用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)和短径(b),每周测量3次,并计算肿瘤体积(V), $V(\text{mm}^3) = (ab^2)/2$ 。3周后,将所有小鼠用1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后断颈处死,取出肿瘤组织并称重。

1.3 统计学分析:Graphpad prism 8.0软件对数据统计分析,计量资料以表示,两组比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两多重比较采用Tukey's检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度VEM对A375和A375/VEM细胞增殖的影响:0.1、0.5、1、5、10、20 μM VEM处理后的A375细胞存活率低于未处理组($P<0.05$),1、5、10、20 μM VEM处理后A375/VEM细胞存活率低于未处理组($P<0.05$),且同一浓度下的A375细胞的存活率明显低于A375/VEM细胞($P<0.05$);A375/VEM细胞的IC50(56.76 μM)明显高于A375细胞的IC50(1.40 μM)。其中VEM浓度为1 μM 时对A375/VEM细胞有较小

的抑制作用,因此后续实验选择1 μM 的VEM,见表1。

表1 不同浓度VEM对A375和A375/VEM细胞存活率的影响($n=3, \bar{x}\pm s$)

浓度/ μM	细胞存活率/%	
	A375	A375/VEM
未处理组	100.00 \pm 1.42	100.00 \pm 1.56
0.1	83.63 \pm 3.57*	97.54 \pm 2.68
0.5	67.64 \pm 3.71*	92.69 \pm 3.64
1	52.87 \pm 3.21*	85.32 \pm 3.52*
5	36.63 \pm 2.54*	78.94 \pm 3.84*
10	21.91 \pm 2.24*	70.91 \pm 3.17*
20	8.16 \pm 1.25*	62.37 \pm 2.68*
IC50/ μM	1.40	56.76

注:*表示与A375未处理组比较, $P<0.05$;#表示与A375/VEM未处理组比较, $P<0.05$ 。

2.2 不同浓度ARG对A375/VEM细胞增殖的影响:与未处理组相比,2.5、5、10、20、40 mg/L ARG处理后的A375/VEM细胞存活率降低($P<0.05$);且ARG处理A375/VEM细胞48 h后的IC50为20.05 mg/L。因此,本实验选择浓度为20 mg/L作为后续实验ARG处理细胞的最佳浓度,见表2。

表2 不同浓度ARG对A375/VEM细胞存活率的比较($n=3, \bar{x}\pm s$)

浓度/(mg/L)	细胞存活率/%
未处理组	100.00 \pm 1.39
1	96.65 \pm 3.68
2.5	85.42 \pm 3.71*
5	74.57 \pm 3.24*
10	67.63 \pm 2.96*
20	53.91 \pm 2.73*
40	31.16 \pm 2.28*
IC50/(mg/L)	20.05

注:*表示与未处理组比较, $P<0.05$ 。

2.3 ARG对A375/VEM细胞存活率及克隆形成能力的影响:与对照组相比,VEM组、ARG组和ARG+VEM组细胞的存活率和克隆形成数量均降低($P<0.05$),且ARG+VEM组细胞存活率和克隆形成数量低于VEM组和ARG组($P<0.05$);与ARG+VEM组相比,ARG+VEM+Hippo抑制剂组细胞的存活率和克隆形成数量升高($P<0.05$),见图1、表3。

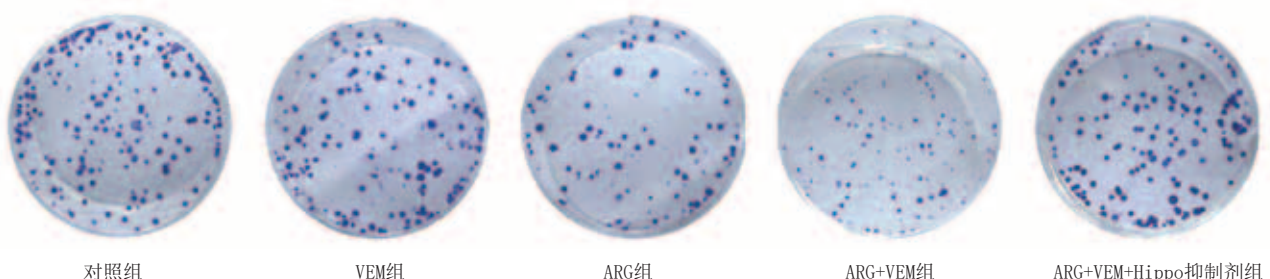


图1 各组A375/VEM细胞克隆形成情况

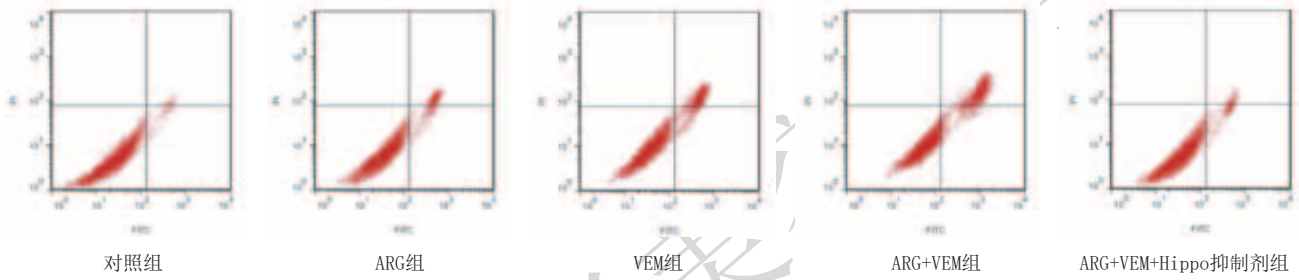


图2 流式细胞术检测各组A375/VEM细胞的凋亡情况

表3 各组A375/VEM细胞存活率和克隆数量比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率/%	克隆数量/个
对照组	100.00 ± 1.65	93.54 ± 4.47
VEM组	84.29 ± 4.15*	75.84 ± 3.61*
ARG组	52.98 ± 3.21**	57.63 ± 2.71**
ARG+VEM组	38.67 ± 1.54** ^Δ	42.25 ± 2.38** ^Δ
ARG+VEM+Hippo抑制剂组	92.53 ± 4.28 [▲]	84.39 ± 4.26 [▲]

注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$; **表示与VEM组比较, $P < 0.05$; ^Δ表示与ARG组比较, $P < 0.05$; [▲]表示与ARG+VEM组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 ARG对各组A375/VEM细胞凋亡的影响: 与对照组相比, VEM组、ARG组和ARG+VEM组细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 且ARG+VEM组细胞凋亡率高于VEM组和ARG组 ($P < 0.05$); 与ARG+VEM组相比, ARG+VEM+Hippo抑制剂组细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), 见图2、表4。

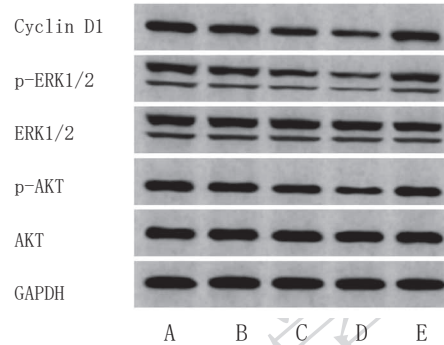
表4 各组A375/VEM细胞凋亡率的比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率/%
对照组	2.74 ± 0.63
VEM组	8.15 ± 0.84*
ARG组	19.68 ± 1.23**
ARG+VEM组	32.53 ± 1.79** ^Δ
ARG+VEM+Hippo抑制剂组	5.26 ± 0.68 [▲]

注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$; **表示与VEM组比较, $P < 0.05$; ^Δ表示与ARG组比较, $P < 0.05$; [▲]表示与ARG+VEM组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 ARG对各组A375/VEM细胞中Cyclin D1和ERK1/2、AKT及其磷酸化蛋白表达的影响: 与对照组相比, VEM组、ARG组和ARG+VEM组细胞中Cyclin D1、p-ERK1/2、p-AKT表达均降低 ($P < 0.05$), 且ARG+VEM组Cyclin D1、p-ERK1/2、p-AKT表达低于VEM组和ARG组 ($P < 0.05$); 与ARG+VEM组相比, ARG+VEM+Hippo抑制剂组细胞中Cyclin D1、p-ERK1/2、p-AKT表达均升高 ($P < 0.05$), 见图3、表5。

2.6 ARG对各组A375/VEM细胞中Hippo途径相关蛋白表达的影响: 与对照组相比, VEM组、ARG组和ARG+VEM组细胞中LATS1、p-YAP表达升高, YAP表达降低 ($P < 0.05$), 且ARG+VEM组LATS1、p-YAP表达高于VEM组和ARG组, YAP表达低于VEM组和ARG组 ($P < 0.05$); 与ARG+VEM组相比, ARG+VEM+Hippo抑制剂组细胞中LATS1、p-YAP表达降低,



注: A. 对照组; B. VEM组; C. ARG组; D. ARG+VEM组; E. ARG+VEM+Hippo抑制剂组

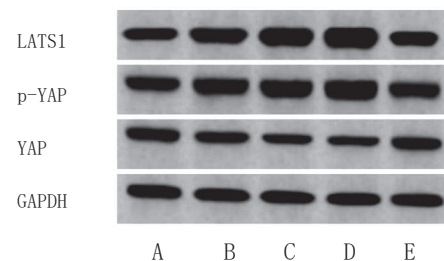
图3 各组A375/VEM细胞中Cyclin D1和ERK1/2、AKT及其磷酸化蛋白表达

表5 各组A375/VEM细胞中Cyclin D1和ERK1/2、AKT及其磷酸化蛋白相对表达量的比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	Cyclin D1	p-ERK1/2/ERK1/2	p-AKT/AKT
对照组	0.98 ± 0.07	0.85 ± 0.06	0.92 ± 0.07
VEM组	0.75 ± 0.05*	0.68 ± 0.04*	0.78 ± 0.05*
ARG组	0.53 ± 0.04**	0.45 ± 0.03**	0.59 ± 0.03**
ARG+VEM组	0.38 ± 0.02** ^Δ	0.32 ± 0.02** ^Δ	0.43 ± 0.02** ^Δ
ARG+VEM+Hippo抑制剂组	0.86 ± 0.06 [▲]	0.78 ± 0.06 [▲]	0.87 ± 0.06 [▲]

注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$; **表示与VEM组比较, $P < 0.05$; ^Δ表示与ARG组比较, $P < 0.05$; [▲]表示与ARG+VEM组比较, $P < 0.05$ 。

YAP表达升高 ($P < 0.05$), 见图4、表6。



注: A. 对照组; B. VEM组; C. ARG组; D. ARG+VEM组; E. ARG+VEM+Hippo抑制剂组

图4 各组A375/VEM细胞中Hippo途径相关蛋白表达

2.7 ARG对移植瘤小鼠的肿瘤生长情况的影响: 与对照组相比, VEM组、ARG组和ARG+VEM组小鼠的肿瘤组织重量、体积均

表6 各组A375/VEM细胞中Hippo途经相关蛋白相对表达量的比较

组别	(n=3, $\bar{x} \pm s$)		
	LATS1	p-YAP	YAP
对照组	0.91 ± 0.06	0.95 ± 0.07	0.99 ± 0.07
VEM组	1.20 ± 0.08*	1.25 ± 0.09*	0.75 ± 0.06*
ARG组	1.49 ± 0.10**	1.57 ± 0.12**	0.58 ± 0.04**
ARG+VEM组	1.78 ± 0.14** ^Δ	1.88 ± 0.14** ^Δ	0.42 ± 0.02** ^Δ
ARG+VEM+Hippo抑制剂组	1.09 ± 0.07 [▲]	1.12 ± 0.09 [▲]	0.93 ± 0.08 [▲]

注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$; **表示与VEM组比较, $P < 0.05$; ^Δ表示与ARG组比较, $P < 0.05$; [▲]表示与ARG+VEM组比较, $P < 0.05$ 。

减小 ($P < 0.05$), 且ARG+VEM组肿瘤重量和体积均小于VEM组和ARG组 ($P < 0.05$); 与ARG+VEM组相比, ARG+VEM+Hippo抑制剂组肿瘤组织重量、体积均升高 ($P < 0.05$), 见表7。

表7 各组移植瘤小鼠肿瘤组织的重量和体积 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	重量/g	体积/mm ³
对照组	0.85 ± 0.06	676.45 ± 28.96
VEM组	0.71 ± 0.05*	593.67 ± 26.38*
ARG组	0.54 ± 0.04**	415.18 ± 22.41**
ARG+VEM组	0.31 ± 0.02** ^Δ	261.82 ± 15.97** ^Δ
ARG+VEM+Hippo抑制剂组	0.80 ± 0.06 [▲]	635.15 ± 25.72 [▲]

注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$; **表示与VEM组比较, $P < 0.05$; ^Δ表示与ARG组比较, $P < 0.05$; [▲]表示与ARG+VEM组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

黑色素瘤仍然是皮肤癌导致死亡的主要原因, 易发生转移和侵袭, 且发病率和死亡率逐年升高。BRAF突变黑色素瘤占黑色素瘤患者的50%以上, 其中V600E突变占70%~90%^[10]。目前, BRAF抑制剂VEM被批准用于黑色素瘤治疗, 主要通过特异性靶向V600E突变的BRAF, 显示出明显的抗肿瘤活性, 并提高了BRAF V600E突变黑色素瘤患者的存活率^[11]。尽管VEM具有快速的疗效和良好的反应率, 但大多数黑色素瘤患者在治疗8~9个月后出现肿瘤耐药性, 严重影响了患者的生存和预后^[12]。因此, 克服BRAF抑制剂耐药性对提高患者存活率具有重要意义。本研究利用VEM持续诱导获得人黑色素瘤耐药细胞株A375/VEM, 并通过不同浓度的VEM分别处理A375和A375/VEM细胞, 结果发现VEM处理后A375细胞的IC50明显低于A375/VEM细胞, 提示A375/VEM细胞对VEM的敏感性降低, VEM耐药性黑色素瘤细胞株A375/VEM诱导成功。

ATG是牛蒡的主要活性成分, 已被证明具有较强的抗癌活性, 该活性主要归因于在乳腺癌、肺癌和结肠癌等癌细胞中诱导由线粒体破坏和细胞周期停滞介导的凋亡^[13]。研究显示ATG可通过激活自噬来增强结肠癌顺铂耐药细胞的敏感性^[14]。但对黑色素瘤细胞耐药性的作用还未了解。本研究结果显示, 与对照组和VEM组相比, ARG处理A375/VEM细胞后存活率、克隆形成数量降低, 细

胞凋亡率升高, 而ARG和VEM共同处理细胞后存活率、克隆形成数量明显低于ARG组, 凋亡率高于ARG组, 提示ARG能够提高A375/VEM耐药细胞对VEM的敏感性, 即抑制其耐药性。

据报道, BRAF是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径中的关键蛋白, 主要调节细胞增殖、分化、迁移和凋亡等功能^[11]。已知MAPK/细胞外信号调节激酶(ERK)途径和磷酸肌醇3-激酶(PI3K)-AKT途径的再激活是BRAF抑制剂耐药的分子机制^[15]。细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)是由CCND1基因编码的一种重要的细胞周期调节因子, 研究显示Cyclin D1的过度表达可能使BRAF突变的黑色素瘤细胞对VEM产生耐药性^[16]。本研究结果显示, ARG组A375/VEM细胞中Cyclin D1、p-ERK1/2、p-AKT表达低于VEM组, 而ARG+VEM组细胞中Cyclin D1、p-ERK1/2、p-AKT表达低于ARG组, 揭示了ARG可以抑制Cyclin D1蛋白的表达, 同时可以抑制MAPK/ERK和PI3K/AKT通路激活, 进而抑制细胞的增殖及对VEM的耐药性。

Hippo途径是一个进化上保守的级联, 该途径核心成分包括丝氨酸/苏氨酸激酶(Mammalian sterile 20 like kinase, MST1/2)、大肿瘤激活因子1/2(Large tumor suppressor kinase, LATS1/2)和主要下游介体YAP/TAZ。MST和LATS两种激酶的激活导致YAP/TAZ磷酸化, 限制了它们的稳定性、核定位和转录活性^[17]。在BRAFV600E突变的黑色素瘤细胞系中延长VEM治疗可诱导肌动蛋白细胞骨架重塑, 增加YAP核定位并促进耐药性和癌细胞活力^[18]。因此, YAP的核定位被认为是癌症患者的不良预后。为了防止YAP的增殖活性, 通过激活Hippo途径中LATS1, 随后磷酸化途径效应子YAP, 并驱动YAP从细胞核转移到细胞质中滞留和降解^[19]。研究显示, 泛素特异性肽酶22的过表达导致黑色素瘤中YAP蛋白水平升高, 促进黑色素瘤细胞对VEM的耐药性^[20]。本研究结果显示, ARG组A375/VEM细胞中LATS1和p-YAP水平高于VEM组, YAP表达低于VEM组, 而ARG+VEM组细胞中LATS1和p-YAP水平高于ARG组, YAP表达低于ARG组, 揭示了ARG可以通过激活耐药细胞A375/VEM中的Hippo途径中LATS1的表达, 促进YAP的磷酸化, 进而使YAP降解并失活。为了明确Hippo途径在ARG抑制A375/VEM细胞耐药性过程中的作用, 进一步加入Hippo途径的抑制剂, 结果显示ARG对A375/VEM细胞耐药性的抑制作用被逆转, 提示了ARG抑制黑色素瘤细胞耐药性的作用机制可能与Hippo信号通路被激活有关。最后本研究通过裸鼠移植瘤实验, 进一步验证了ARG可以抑制体内黑色素瘤细胞对VEM的耐药性。

综上所述, ARG可能是通过激活Hippo途径来抑制黑色素瘤细胞的耐药性。本研究为黑色素瘤细胞对BRAF抑制剂的耐药性提供了新的治疗药物和抗耐药机制。但黑色素瘤细胞的耐药机制比较复杂, 本研究仅选择一种BRAF抑制剂进行实验, 关于黑色素瘤细胞对其他化疗药物的耐药性还需更多的研究进行探索。

[参考文献]

- [1]Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, et al. Molecular markers and targets in melanoma[J]. Cells, 2021,10(9):2320.
- [2]Barreno A, Orgaz J L. Cytoskeletal remodelling as an Achilles' Heel for therapy resistance in melanoma[J]. Cells, 2022,11(3):518.
- [3]Dratkiewicz E, Simiczjew A, Pietraszek-Gremplewicz K, et al. Characterization of melanoma cell lines resistant to vemurafenib and evaluation of their responsiveness to EGFR- and MET-inhibitor treatment[J]. Int J Mol Sci, 2019,21(1):113.
- [4]Howard A, Bojko J, Flynn B, et al. Targeting the Hippo/YAP/TAZ signalling pathway: Novel opportunities for therapeutic interventions into skin cancers[J]. Exp Dermatol, 2022,31(10):1477-1499.
- [5]Vittoria M A, Kingston N, Kotynkova K, et al. Inactivation of the Hippo tumor suppressor pathway promotes melanoma[J]. Nat Commun, 2022,13(1):3732.
- [6]Shi H, Zhao L, Guo X, et al. Arctigenin attenuates breast cancer progression through decreasing GM-CSF/TSLP/STAT3/ β -Catenin signaling[J]. Int J Mol Sci, 2020,21(17):6357.
- [7]赵佼, 王丹波. 牛蒡子苷元通过调控miR-1靶向干预磷酸戊糖途径对人卵巢癌SKOV3细胞的影响[J].中国病理生理杂志,2023,39(3):487-495.
- [8]Yoon S B, Park H R. Arctigenin inhibits etoposide resistance in HT-29 colon cancer cells during microenvironmental stress[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019,29(4):571-576.
- [9]王自闯, 张娟, 陈小永. 白花蛇舌草提取物通过Hippo-YAP信号通路抑制胰腺癌SW1990细胞上皮细胞间质转化[J].中国免疫学杂志, 2020,36(16):1957-1961.
- [10]Radi R, Huang C, Elsej J, et al. Indolium 1 exerts activity against vemurafenib-resistant melanoma in vivo[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(5):798.
- [11]Wang L, Otkur W, Wang A, et al. Norcantharidin overcomes vemurafenib resistance in melanoma by inhibiting pentose phosphate pathway and lipogenesis via downregulating the mTOR pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:906043.
- [12]Tang F, Li S, Liu D, et al. Sorafenib sensitizes melanoma cells to vemurafenib through ferroptosis[J]. Transl Cancer Res, 2020, 9(3):1584-1593.
- [13]Lee K S, Lee M G, Kwon Y S, et al. Arctigenin enhances the cytotoxic effect of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8):2997.
- [14]Wang Y, Lina L, Xu L, et al. Arctigenin enhances the sensitivity of cisplatin resistant colorectal cancer cell by activating autophagy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019,520(1):20-26.
- [15]Tangella L P, Clark M E, Gray E S. Resistance mechanisms to targeted therapy in BRAF-mutant melanoma - A mini review[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2021, 1865(1):129736.
- [16]Wu H Z, Li L Y, Jiang S L, et al. RSK2 promotes melanoma cell proliferation and vemurafenib resistance via upregulating cyclin D1[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:950571.
- [17]Kang J, Wang J, Yao Z, et al. Fascin induces melanoma tumorigenesis and stemness through regulating the Hippo pathway[J]. Cell Commun Signal, 2018,16(1):37.
- [18]Garcia-Rendueles M E R, Krishnamoorthy G, Saqcena M, et al. Yap governs a lineage-specific neuregulin1 pathway-driven adaptive resistance to RAF kinase inhibitors[J]. Mol Cancer, 2022,21(1):213.
- [19]Ikonomopoulou M P, Fernandez-Rojo M A, Pineda S S, et al. Gomesin inhibits melanoma growth by manipulating key signaling cascades that control cell death and proliferation[J]. Sci Rep, 2018,8(1):11519.
- [20]Wei Y, Jiang Z, Lu J. USP22 promotes melanoma and BRAF inhibitor resistance via YAP stabilization[J]. Oncol Lett, 2021,21(5):394.

[收稿日期]2023-08-10

本文引用格式: 高阳, 杜紫微, 王海飞. 牛蒡子苷元调节Hippo信号通路对黑色素瘤细胞化疗耐药性的影响[J].中国美容医学, 2025,34(7):1-6.

· 告作者和读者 ·

关于中英文摘要书写格式的要求

本刊中的论著文稿正文前应附 300 字以内的中英文摘要, 包括目的、方法、结果、结论四要素, 并采用第三人称撰写, 不得使用“作者”、“我们”等主语。关键词 5 ~ 8 个, 撰写应正确选用中国医科院情报所出版《医学主题词注释字顺表》(MeSHAAL) 内所列的词语, 必要时可采用自由词语, 每个词组(汇)间用分号(;) 隔开。英文摘要要与中文摘要基本对应, 略有扩展以便对外交流。英文摘要格式要求: 文题中实词首字母为大写, 作者需要全部列出, 姓名及省、市名用汉语拼音, 姓氏每个字母均大写, 名字首字母大写。文题及单位用英文书写, 英文关键词均小写, 不能使用缩写词, 应与中文关键词序一致。

希望作者读者在投稿或(和)修改稿件时, 按上述要求认真补充完整, 并注意规范使用医学专业词汇。