

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.18.012

文章编号: 1006-4931(2025)18-0053-06



姜黄素通过 Wnt 抑制因子 - 1 启动子去甲基化逆转 非小细胞肺癌顺铂耐药机制研究

任振军, 李 玮, 王启哲

(上海德济医院, 上海 200331)

摘要:目的 探讨姜黄素逆转非小细胞肺癌细胞 A549、NCI-H358 顺铂(DDP)耐药的机制。方法 以姜黄素(10 $\mu\text{mol/L}$)处理 A549/DDP 细胞和 NCI-H358/DDP 细胞 48 h;采用四氮唑比色(MTT)法检测半数抑制浓度(IC_{50}),采用实时逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)法和 Western blot 法检测 Wnt 抑制因子-1(WIF-1)mRNA 和蛋白表达水平及细胞核内 β -连环蛋白(β -catenin)表达水平。以 siRNA-WIF-1 转染耐药细胞,经姜黄素(10 $\mu\text{mol/L}$)处理 2 h 后加入 DDP(10 $\mu\text{mol/L}$)继续处理细胞 48 h;采用 CCK-8 法检测 A549/DDP 细胞的增殖情况,划线法检测 NCI-H358/DDP 细胞的迁移情况,实验均设相应对照。以 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 A549/DDP 细胞 48 h,并设空白对照;采用甲基化特异性 PCR(MSP)法检测 WIF-1 启动子甲基化。以 pGL3-pro-WIF-1 转染 A549/DDP 细胞,姜黄素(10 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h,并设空白启动子 pGL3-pro-WIF-1 对照、阳性对照(1 ng/mL 地西他滨);采用荧光素酶活性检测法分析 WIF-1 启动子活性。结果 与空白对照比较,姜黄素处理 24 h、48 h 时,A549/DDP 和 NCI-H358/DDP 细胞 IC_{50} 及 β -catenin 蛋白表达水平均显著降低,WIF-1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$)。与联合用药对照(10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂)比较,siRNA-WIF-1 转染后联合用药后 A549/DDP 细胞增殖率和迁移率显著升高($P < 0.01$)。与空白对照比较,姜黄素处理 48 h 时,A549/DDP 细胞甲基化水平显著降低($P < 0.01$)。与空白启动子对照比较,pGL3-pro-WIF-1 转染后用姜黄素处理 A549/DDP 细胞 48 h 时,WIF-1 基因启动子荧光素酶水平显著升高($P < 0.01$)。结论 姜黄素逆转非小细胞肺癌细胞 DDP 耐药的机制可能与 WIF-1 基因启动子去甲基化有关。

关键词:姜黄素;非小细胞肺癌;顺铂;Wnt 抑制因子-1;耐药;Wnt/ β -catenin 通路

Mechanism of Curcumin Reversing Cisplatin Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Through WIF-1 Promoter Demethylation

REN Zhenjun, LI Wei, WANG Qizhe

(Shanghai Neuromedical Center, Shanghai, China 200331)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of curcumin reversing cisplatin (DDP) resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 and NCI-H358 cells. **Methods** A549/DDP and NCI-H358/DDP cells were treated with curcumin (10 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h. MTT assay was used to detect the half inhibitory concentration (IC_{50}). RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of Wnt inhibitory factor 1 (WIF-1) and β -catenin in the nucleus. Cells were transfected with siRNA-WIF-1, and treated with curcumin (10 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h and treated with DDP (10 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h. CCK-8 method was used to detect the proliferation of A549/DDP cells, and scribe method was used to detect the migration of NCI-H358/DDP cells, the corresponding control group was set in the experiment. A549/DDP cells were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ curcumin for 48 h, and blank control group was set; Methylation specific PCR (MSP) was used to detect WIF-1 promoter methylation. A549/DDP cells were transfected with pGL3-pro-WIF-1 and treated with curcumin (10 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h. The blank promoter pGL3-pro-WIF-1 control and positive control (1 ng/mL decitabine) were set; luciferase activity assay was used to detect the activity of WIF-1 promoter. **Results** Compared with the blank control group, the IC_{50} values and protein expression of β -catenin of A549/DDP and NCI-H358/DDP cells treated with curcumin for 24 h and 48 h were significantly decreased ($P < 0.01$); The levels of mRNA and protein expression of WIF-1 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with those in the control group of drug combination (10 $\mu\text{mol/L}$ curcumin + 10 $\mu\text{mol/L}$ DDP), the proliferation rate and migration rate of A549/DDP cells after siRNA-WIF-1 transfection in drug combination group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with those in the blank control group, the methylation level of A549/DDP cells was significantly decreased after curcumin treated for 48 h ($P < 0.01$). Compared with the blank promoter control, the luciferase level of WIF-1 gene promoter in A549/DDP cells transfected with curcumin was significantly increased ($P < 0.01$) after transfection with pGL3-pro-WIF-1. **Conclusion** Curcumin reverses DDP resistance in NSCLC cells may be related to WIF-1 gene promoter demethylation.

Key words: curcumin; non-small cell lung cancer; cisplatin; Wnt inhibitory factor 1; resistance; Wnt/ β -catenin pathway

第一作者:任振军,男,大学本科,主治医师,研究方向为急诊医学和肿瘤的治疗,(电子信箱)13564133712@163.com。

国际癌症研究机构(IARC)统计数据表明,中国癌症发病及死亡人数均居全球首位,其中肺癌最常见。我国每年新增肺癌患者约70万,其中90%为非小细胞肺癌,患者5年生存率仅16%^[1]。目前,化学治疗(简称化疗)是中晚期非小细胞肺癌标准治疗方案,顺铂(DDP)为常用化疗药物,但耐药性导致疗效欠佳。姜黄素为天然酚类抗氧化剂,能改善肿瘤化疗效果^[2-4]。有研究表明,Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)通路的异常活化与非小细胞肺癌化疗耐药机制的形成密切相关,抑制Wnt通路能有效增强非小细胞肺癌的化疗敏感性^[5-7]。然而,姜黄素是否能通过Wnt/ β -catenin通路影响非小细胞肺癌DDP耐药机制,至今尚不明晰。本研究中拟探讨姜黄素对非小细胞肺癌DDP耐药的影响及其作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:HED-SY96S型酶标仪(山东霍尔德电子科技有限公司);CB220型细胞培养箱(德国Binder公司);Glomax型化学发光检测仪(美国Promega公司);5810R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司);TP650型荧光定量PCR仪(日本Takara公司)。

试剂:二甲基亚砜(DMSO,美国Invitrogen公司,批号为D12345);姜黄素(美国MCE公司,批号为263979);DDP(北京索莱宝科技有限公司,批号为2230324001);RPMI-1640细胞培养基、胎牛血清(FBS)、无菌磷酸盐缓冲液(dPBS)、0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为2645340,2500251,3023187、3066349);NE-PER细胞核分离试剂盒、M-PER蛋白提取定量试剂盒、ECL化学底物发光试剂盒、Lipofectamine2000转染试剂、RNA提取及反转录试剂盒、荧光定量检测试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为ZJ397718, ZJ303478, AA405660A, 3045173, 2477601, 2475867);CCK-8细胞活性检测试剂盒(日本同仁化学公司,批号为JE603);兔抗人WIF、 β -catenin、 β -actin一抗(英国Abcam公司,批号分别为ab155101, ab68183, ab179467);羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号为BC10268988)。

细胞:耐药细胞株A549/DDP和NCI-H358/DDP由本实验室诱导建立,其亲本细胞购于中国科学院细胞库。

1.2 观察指标与检测方法

半数抑菌浓度(IC_{50}):采用四氮唑比色(MTT)法。实验设空白对照组(含10% FBS的RPMI 1640培养基,下同)和姜黄素组(10 $\mu\text{mol/L}$)。取2组A549/DDP和NCI-H358/DDP细胞各适量,用0.25%胰蛋白酶消化后

重新接种于96孔培养板中,过夜培养待其完全贴壁,调整密度为 1×10^4 个/孔。细胞上清中添加终浓度为0, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$ 的DDP,分别于培养后24 h和48 h时,每孔加入10 μL MTT溶液,置细胞培养箱中继续孵育4 h。去掉培养基,每孔加入100 μL DMSO,检测450 nm波长处吸光度(OD)值,计算细胞存活率及 IC_{50} 。

WIF-1 mRNA水平:采用实时逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)法。实验设空白对照组、溶剂对照组(等体积无水乙醇,下同)、姜黄素组(10.0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素,下同),细胞接种于6孔板中(孵育48 h,下同),调整密度为 5×10^4 个/孔。取3组A549/DDP和NCI-H358/DDP细胞各适量,用Trizol提取总RNA,反转录为cDNA。PCR反应体系10 μL ,其中包含SYBR荧光染料预混液5 μL ,上下游PCR引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.2 μL , cDNA 1 μL 和无菌水3.6 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 持续10 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 持续20 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 持续20 min, 40个循环。以 β -actin为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算WIF-1相对表达水平。PCR扩增用引物序列:WIF-1,上游5'-CCAG-GACTAGAGGGAGAGCA-3'和WIF-1下游5'-CCCTGGTAACCTTTGGAACACT-3'; β -actin上游5'-CCTGTAGCCAAACAGTGC-3'和 β -actin下游5'-ATACTCTGCTGATCC-3'。

蛋白表达:采用Western blot法。1)WIF-1蛋白。实验设空白对照组、溶剂对照组、姜黄素组,细胞接种于6孔板中,调整密度为 5×10^4 个/孔。取3组A549/DDP和NCI-H358/DDP细胞各适量,M-PER裂解并提取总蛋白,采用BCA法定量;各样本取12 μg ,经11% SDS-PAGE电泳后转膜,用5% BSA封闭,加兔抗人WIF-1一抗(1:400, V/V)和兔抗人 β -actin一抗(1:3 000, V/V),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,清洗3遍;加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(1:3 000, V/V),室温下孵育2 h,清洗3遍;ECL显影,压片,显影、定影、清洗,将条带灰度值数字化。以 β -actin作为内参,分析目的条带蛋白相对表达水平。2)核内 β -catenin蛋白。分离细胞核,用M-PER分别裂解并提取细胞核蛋白及总蛋白,同上电泳、转膜,孵育抗体及显影,其中兔抗人 β -catenin一抗(1:500, V/V)。以细胞内总 β -catenin蛋白为内参。

细胞增殖:采用CCK-8法。实验设空白对照组、顺铂组(10 $\mu\text{mol/L}$)、联合作用1组[2.5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂(2 h后添加,下同)]、联合作用2组(10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂)、siRNA阴性对照组(转染siRNA-NC、10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素和10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂)、siRNA组(转染siRNA-WIF-1、10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素和10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂),细胞接种于96孔培养板中,调整密度为 1×10^4 个/孔。取6组A549/DDP细胞各适

量,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,置培养箱继续孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值(OD_{450}),并计算细胞增殖率。

细胞迁移:取“细胞增殖”项下 6 组 NCI-H358/DDP 细胞各适量,用 200 μL 枪头在孔底细胞表面划线,从孔的一端划至另一端,弃去培养基,每孔加入 2 mL dPBS 清洗细胞表面,清洗 3 次;重新加入完全培养基继续培养。分别在第 1 天和第 3 天观察细胞划痕区域的变化,评估细胞迁移能力,并计算细胞迁移率。

WIF-1 基因启动子 DNA 甲基化:采用甲基化特异性 PCR(MSP)法。实验分为空白对照组和姜黄素组,细胞接种于 6 孔板中,调整密度为 5×10^4 个/孔。用生物信息学软件 MethPrimer 11.0 预测人 WIF-1 基因启动子区的 CpG 岛序列,并设计用于 MSP 检测的 PCR 引物(见表 1)。参考文献[8],取 2 组 A549/DDP 细胞各适量,提取 DNA,使用亚硫酸氢钠处理 DNA,将未甲基化的胞嘧啶(C)转化为尿嘧啶(U),而甲基化的胞嘧啶则保持不变。针对目标基因的甲基化和未甲基化位点分别设计 2 对特异性引物,分别用于扩增甲基化和未甲基化的 DNA 序列。通过 PCR 分别扩增处理后的甲基化和未甲基化序列,引物仅在对应的甲基化或未甲基化模板上起作用。通过 PCR 产物凝胶电泳,判断样本中目标位点的甲基化状态。

表 1 MSP 检测用引物信息及使用条件

Tab. 1 Primer information and application conditions for MSP detection					
引物名称	起始位	长度	$T_m(^{\circ}\text{C})$	GC(%)	序列(5'-3')
Left M1	135	24	59.54	80	GGTTTATACGCGTTTAACTGGC
Right M1	241	25	59.45	52	AATAAACGAAACAAAAACAGA
Left U1	135	25	55.54	80	GGTTTATATGTGTTTAACTGGTG
Right U1	241	25	55.74	52	AATAAACAAAAACAAAAACAA
Left M2	135	24	59.54	80	GGTTTATACGCGTTTAACTGGC
Right M2	242	25	59.45	48	AATAAACGAAAAACAAAAACGA
Left U2	135	25	55.54	80	GGTTTATATGTGTTTAACTGGTG
Right U2	242	25	56.91	50	AATAAACAAAAACAAAAACAA
Left M3	135	24	59.54	80	GGTTTATACGCGTTTAACTGGC
Right M3	241	25	59.45	52	AATAAACGAAACAAAAACAGA
Left U3	135	25	55.54	80	GGTTTATATGTGTTTAACTGGTG
Right U3	241	25	55.74	52	AATAAACAAAAACAAAAACAA

WIF-1 基因启动子活性:采用荧光素酶法。实验分为空白对照组(A组)、pGL3-pro-WIF-1 对照组(转染 pGL3-pro-WIF-1, I 组)、pGL3-pro-WIF-1 + 姜黄素组(在药物添加前 24 h 转染 pGL3-pro-WIF-1、10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素, J 组)、pGL3-pro-WIF-1 + 地西他滨组(在药物添加前 24 h 转染 pGL3-pro-WIF-1、

1 ng/mL 地西他滨, K 组),细胞接种于 6 孔板中,调整密度为 5×10^4 个/孔。取 3 组 A549/DDP 细胞各适量,每孔用 2 mL dPBS 清洗 2 次,加入 250 μL 的 1 $\times$ PLB 裂解液,室温下充分裂解。取 20 μL 裂解液加入 96 孔黑色板中,迅速加入 100 μL LAR II 试剂,10 s 内再加入 100 μL 终止底物,检测荧光素酶活性。

1.3 统计学处理

成像信号采用 Image lab 3.0 软件获取和分析,数据采用 SPSS 24.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IC_{50}

与空白对照组比较,姜黄素组 A549/DDP 和 NCI-H358/DDP 细胞的 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 均显著降低($P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 两组细胞 IC_{50} 比较($\bar{X} \pm s, \mu\text{mol/L}, n = 3$)

组别	24 h		48 h	
	A549/DDP	NCI-H358/DDP	A549/DDP	NCI-H358/DDP
空白对照组	107.79 $\pm$ 20.13	77.85 $\pm$ 8.27	68.89 $\pm$ 11.73	47.63 $\pm$ 5.92
姜黄素组	36.38 $\pm$ 7.32*	32.59 $\pm$ 7.38*	21.29 $\pm$ 3.78*	18.78 $\pm$ 4.26*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$ 。表 3 同。

Note: Compared with those in the blank control group, * $P < 0.01$ (for Tab. 2 - 3).

2.2 WIF-1 mRNA 和蛋白以及细胞核内 β -catenin 蛋白表达水平

与空白对照组比较,溶剂对照组 A549/DDP 和 NCI-H358/DDP 细胞中 WIF-1 mRNA 和蛋白,以及细胞核内 β -catenin 蛋白表达水平均无显著变化($P > 0.05$),而姜黄素组细胞中 WIF-1 mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.01$),细胞核内 β -catenin 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。详见图 1、表 3。

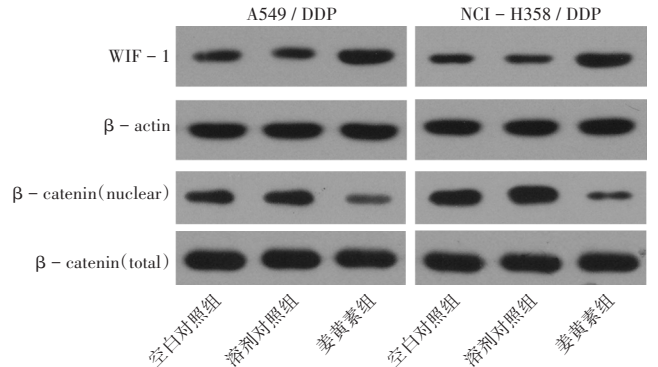


图 1 蛋白电泳图

Fig. 1 Protein electropherograms

表 3 各组细胞 WIF - 1 mRNA、蛋白及核内 β - catenin 蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 3 Comparison of the mRNA and protein expression of WIF - 1 and the protein expression of β - catenin in nuclear among different groups ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	A549 / DDP			NCI - H358 / DDP		
	WIF - 1 mRNA	WIF - 1 蛋白	核内 β - catenin	WIF - 1 mRNA	WIF - 1 蛋白	核内 β - catenin
空白对照组	0.28 ± 0.04	0.35 ± 0.08	3.97 ± 0.67	0.32 ± 0.12	0.32 ± 0.08	4.87 ± 0.87
溶剂对照组	0.31 ± 0.07	0.33 ± 0.06	3.83 ± 0.73	0.43 ± 0.09	0.29 ± 0.08	4.86 ± 0.78
姜黄素组	0.75 ± 0.15*	0.89 ± 0.09*	0.89 ± 0.24*	0.98 ± 0.22*	0.88 ± 0.18*	1.58 ± 0.36*

2.3 细胞增殖及迁移

与空白对照组比较,顺铂组 A549 / DDP 细胞增殖率和 NCI - H358 / DDP 细胞迁移率均无显著变化($P > 0.05$);与顺铂组比较,联合作用 1 组和 2 组细胞的增殖率和迁移率均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与联合作用 2 组比较,siRNA 阴性对照组细胞的增殖率和迁移率无显著变化($P > 0.05$),siRNA 组细胞的增殖率和迁移率均显著升高($P < 0.01$)。详见表 4。

表 4 各组细胞增殖率与迁移率比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 4 Comparison of proliferation rate and mobility rate among different groups ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	A549 / DDP 增殖(OD ₄₅₀)	NCI - H358 / DDP 迁移率(%)
空白对照组	1.963 ± 0.24	61.72 ± 7.93
顺铂组	1.264 ± 0.17	72.30 ± 9.81
联合作用 1 组	0.664 ± 0.10 [#]	43.20 ± 5.32 [#]
联合作用 2 组	0.609 ± 0.10 [#]	11.89 ± 1.79 [#]
siRNA 阴性对照组	0.643 ± 0.09	10.28 ± 2.12
siRNA 组	2.143 ± 0.39 ^Δ	89.72 ± 11.21 ^Δ

注:与顺铂组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与联合作用 2 组比较,^Δ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those in the DDP group, * $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; Compared with those in the drug combination group 2, ^Δ $P < 0.01$.

2.4 WIF - 1 启动子甲基化分析

生物信息学分析显示,人 WIF - 1 基因启动子上 3 个关键位点的 MSP 检测结果表明,与空白对照组比较,姜黄素组 A549 / CDDP 细胞中 WIF - 1 基因启动子甲基水平明显降低。详见图 2。与 A 组[(11.00 ± 2.13) RLU]比较,I 组 A549 / DDP 细胞中荧光素酶活性[(29.02 ± 4.36) RLU]显著升高($P < 0.01$);与 I 组比

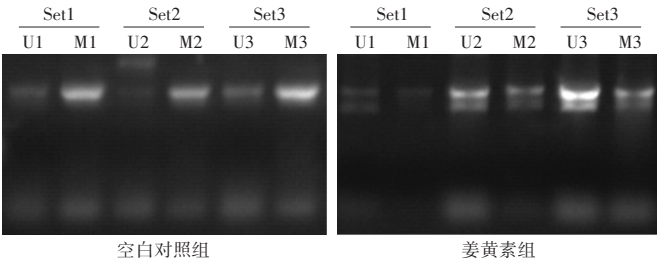


图 2 WIF - 1 启动子甲基化检测

Fig. 2 Detection of WIF - 1 promoter methylation

较,J 组[(117.34 ± 20.08) RLU]及 K 组[(123.68 ± 21.97) RLU]A549 / DDP 细胞内荧光素酶活性显著升高($P < 0.01$)。

2.5 WIF - 1 基因启动子活性分析

与 A 组比较,I 组 A549 / DDP 细胞中 WIF - 1 基因启动子荧光素酶活性显著升高($P < 0.01$);与 I 组比较,J 组和 K 组细胞内 WIF - 1 基因启动子荧光素酶活性均进一步升高($P < 0.01$)。详见表 5。

表 5 各组 A549 / DDP 细胞内 WIF - 1 基因启动子活性比较($\bar{X} \pm s, \text{RLU}, n = 3$)

Tab. 5 Comparison of fluorescein activity of WIF - 1 gene promoter in A549 / DDP cells among different groups ($\bar{X} \pm s, \text{RLU}, n = 3$)

组别	荧光素酶活性
A 组	11.00 ± 2.13
I 组	29.02 ± 4.36 ^{**}
J 组	117.34 ± 20.08 ^{##}
K 组	123.68 ± 21.97 ^{##}

注:与 A 组比较,** $P < 0.01$;与 I 组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those in the group A, ** $P < 0.01$; Compared with those in the group I, ^{##} $P < 0.01$.

3 讨论

随着工业化进程加快,肺癌在我国的发生率持续上升,已成为死亡率最高的恶性肿瘤类型之一。NSCLC 占有肺癌新发病例数的 85%。据统计,约有 75% 的 NSCLC 患者在确诊时已处于病程中晚期,患者 5 年生存率仍不足 20%^[9]。对于无特定治疗指征的患者,铂类化疗仍是 NSCLC 的标准治疗方案。其中,DDP 作为 NSCLC 化疗主要用药,其单药治疗有效率约为 20%,与第 3 代化疗药物联用时可达 40%^[10-11]。然而,耐药性的出现严重制约了顺铂治疗的长期效果,因此,DDP 耐药辅助用药研发迫在眉睫^[12]。有研究表明,姜黄素为从姜黄根茎中提取的天然活性成分,已被世界卫生组织(WHO)和美国食品和药物管理局(FDA)批准可作为天然食品添加剂使用,可降低卵巢癌、白血病和结肠癌等多种癌症的化疗耐药性,并提高低剂量紫杉醇等药物的抗肿瘤效果^[13-15]。但其作用机制尚未完全明晰。表观遗传学修饰通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 等

影响肿瘤耐药相关基因表达。目前,针对表观遗传学修饰的干预策略,如去甲基化剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂等,已被用于改善肿瘤化疗耐药的相关研究,为肿瘤患者个体化治疗方案的制订提供了新方向。

人类 WIF - 1 基因位于第 12 号染色体的 12q14.3 位置,包含 10 个外显子,编码一段 245 个氨基酸组成的蛋白质。WIF - 1 蛋白包含 N 端的信号肽、WIF 结构域、5 个表皮生长因子重复序列以及 C 端的亲水序列,属高度保守的分泌型蛋白。作为 Wnt 信号通路的天然拮抗因子,WIF - 1 的表达减少或缺失会导致 Wnt / β - catenin 信号通路的激活。有研究表明,WIF - 1 基因表达变化受其启动子区域的甲基化调控^[16-18]。Wnt / β - catenin 信号通路与肿瘤细胞的化疗耐药密切相关,当 Wnt 信号激活时,Wnt 蛋白与 Lrp5 / 6 和 Frizzled 受体结合,激活 Dsh 蛋白,阻断 GSK - 3 β 导致的 β - catenin 磷酸化和降解,从而激活 TCF / LEF 复合体,通过上调 C - myc、MDR1、Bel - 2 等基因的表达促进肿瘤细胞增殖并降低细胞对化疗药物的敏感性^[17,19]。本研究结果显示,CUR 通过上调 WIF - 1 表达抑制 β - catenin 在 DDP 耐药 NSCLC 细胞的核内聚集并显著增强了 NSCLC DDP 耐药细胞对低剂量顺铂的敏感性。

近年来,天然药物在 DNA 甲基化调节方面的研究取得了重要进展。研究证实,绿茶中的多酚类物质表没食子酸儿茶素没食子酸酯具有显著的 DNA 甲基转移酶抑制作用^[20]。大蒜中的硫化物可逆转肿瘤相关基因的甲基化,而叶酸因其有助于维持正常的 DNA 甲基化而降低癌症风险^[21-22]。提示天然药物活性成分具有作为化疗药物辅助用药的潜力^[23-24]。本研究结果显示,姜黄素能通过 WIF - 1 启动子去甲基化抑制 Wnt / β - catenin 通路活性而改善非小细胞肺癌细胞的 DDP 耐药。

综上所述,姜黄素能改善非小细胞肺癌细胞 DDP 耐药,其作用机制可能与诱导 WIF - 1 基因启动子去甲基化,抑制 Wnt / β - catenin 通路有关。

参考文献

- [1] QI JL, LI MG, WANG LJ, et al. National and subnational trends in cancer burden in China, 2005 - 20: an analysis of national mortality surveillance data [J]. *Lancet Public Health*, 2023, 8(12): e943 - e955.
- [2] 王雪婷, 李 宁, 刘 婷, 等. 姜黄素脂质体载药量与体外抗癌效果的关系[J]. *中国药业*, 2018, 27(8): 1 - 5.
- [3] 陈永宏, 高 月. 姜黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖凋亡和侵袭能力的影响[J]. *中国药业*, 2018, 27(23): 9 - 12.
- [4] TANG CY, LIU JT, YANG CS, et al. Curcumin and Its Analogs in Non - Small Cell Lung Cancer Treatment: Challenges and Expectations[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1636.
- [5] ENTEZARI M, DELDAR ABAD PASKEH M, OROUEI S, et al. Wnt/beta-catenin Signaling in Lung Cancer: Association with Proliferation, Metastasis, and Therapy Resistance [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2023, doi: 10. 2174/1568009623666230413094317. Online ahead of print.
- [6] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt / β - Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985 - 999.
- [7] ZHANG K, LI MH, HUANG HY, et al. Dishevelled1 - 3 contribute to multidrug resistance in colorectal cancer via activating Wnt / β - catenin signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115803 - 115816.
- [8] LIU M, DU LY, CHENG X, et al. CpG Island Methylation of Suppressor of Cytokine Signaling - 1 Gene Induced by HCV Is Associated With HCV - Related Hepatocellular Carcinoma [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 679593.
- [9] RELI V, TREROTOLA M, GUERRA E, et al. Abandoning the Notion of Non - Small Cell Lung Cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(7): 585 - 594.
- [10] 苗军程. 吉西他滨联合顺铂辅助化学药物治疗非小细胞肺癌临床研究[J]. *中国药业*, 2024, 33(Z1): 33 - 35.
- [11] 王永春, 赵 辉. 培美曲塞联合顺铂治疗非小细胞肺癌 29 例临床评价[J]. *中国药业*, 2018, 27(10): 45 - 47.
- [12] KRYCZKA J, KRYCZKA J, CZARNECKA - CHREBELSKA KH, et al. Molecular Mechanisms of Chemoresistance Induced by Cisplatin in NSCLC Cancer Therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8885.
- [13] ZHANG J, LIU JY, XU XY, et al. Curcumin suppresses cisplatin resistance development partly via modulating extracellular vesicle - mediated transfer of MEG3 and miR - 214 in ovarian cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(3): 479 - 487.
- [14] LIU JM, LI M, LUO W, et al. Curcumin attenuates Adriamycin - resistance of acute myeloid leukemia by inhibiting the lncRNA HOTAIR / miR - 20a - 5p / WT1 axis [J]. *Lab Invest*, 2021, 101(10): 1308 - 1317.
- [15] HUANG SL, CHANG TC, SUN NK. Curcumin reduces paclitaxel resistance in ovarian carcinoma cells by upregulating SNIP1 and inhibiting NF κ B activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 212: 115581.
- [16] ESTELLER M. Epigenetics in cancer [J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358(11): 1148 - 1159.
- [17] ZENG L, YUAN S, ZHOU P, et al. Circular RNA Pvt1 oncogene (CircPVT1) promotes the progression of papillary thyroid carcinoma by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway and modulating the ratio of microRNA-195 (miR-195) to vascular endothelial growth factor A (VEGFA) expression [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 11795-11810.
- [18] WANG RN, GENG N, ZHOU YQ, et al. Aberrant Wnt - 1 / beta - catenin signaling and WIF - 1 deficiency are important