

钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 在维拉帕米 逆转肺腺癌顺铂化疗耐药中的作用

刘 森, 范平生, 张腾跃, 黄 金, 樊高飞, 刘亚贝

(安徽省肿瘤医院, 中国科学技术大学附属第一医院,
中国科学技术大学 生命科学与医学部, 安徽 合肥, 230000)

摘 要: 目的 探讨钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 在维拉帕米逆转肺腺癌顺铂化疗耐药中的作用。方法 在肺腺癌细胞系 (A549) 中, 采用 CCK-8 法检测维拉帕米逆转顺铂耐药的能力, 采用流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 法检测维拉帕米逆转顺铂耐药中凋亡水平的效果, 采用 Western blotting 检测逆转耐药过程中 P-CaMK II/CaMK II 蛋白表达水平的变化。结果 在肺腺癌细胞系 (A549) 中, 单药顺铂组、顺铂联合维拉帕米组的细胞增长抑制率分别为 $(55.00 \pm 2.60) \%$ 、 $(32.30 \pm 1.80) \%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。凋亡实验表明, 单药顺铂组细胞凋亡率为 10.30%, 顺铂联合维拉帕米组为 21.60%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 在 A549 细胞中, 顺铂联合维拉帕米组 P-CaMK II/CaMK II 的表达明显低于单药顺铂组。结论 在肺腺癌细胞中, CaMK II 参与维拉帕米逆转化疗耐药的过程。

关键词: 肺腺癌; 维拉帕米; 顺铂; 耐药性; 钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II

中图分类号: R 734.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2019)10-005-04 DOI: 10.7619/jcmp.201910002

Role of calmodulin-dependent protein kinase II in reversing drug resistance to cisplatin chemotherapy by verapamil in patients with lung adenocarcinoma cells

LIU Miao, FAN Pingsheng, ZHANG Tengyue, HUANG Jin, FAN Gaofei, LIU Yabei

(Anhui Provincial Cancer Hospital, The First Hospital Affiliated to University of Science
and Technology of China, Division of Life Sciences and Medicine in University
of Science and Technology of China, Hefei, Anhui, 230000)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the role of calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) in reversing drug resistance to cisplatin chemotherapy by verapamil in patients with lung adenocarcinoma cells. **Methods** In lung adenocarcinoma cell lines (A549), the CCK-8 method was used to detect the ability of verapamil in reversing the drug resistance to cisplatin chemotherapy, the Annexin V-FITC/PI method was used to detect the effect of verapamil on reversing the apoptosis of drug resistance to cisplatin chemotherapy, and the Western blotting was used to detect the expression levels of P-CaMK II/CaMK II protein in reversal process. **Results** In the A549 cell line, the inhibition rates of DDP group and DDP-VER combination group were $(55.00 \pm 2.60) \%$ and $(32.30 \pm 1.80) \%$ respectively, and there was significant difference between the two groups ($P < 0.05$). The apoptosis rates of DDP group and DDP-VRP combination group were 10.30% and 21.60% respectively, and there was significant difference between the two groups ($P < 0.05$). Western blotting results showed that the expression level of P-CaMK II/CaMK II protein in A549 cell line in DDP-VRP combination group was obviously lower than that in DDP group. **Conclusion** In lung adenocarcinoma cells, CaMK II participates in the reversal process of drug resistance to cisplatin chemotherapy by verapamil.

KEY WORDS: lung adenocarcinoma; verapamil; cisplatin; drug resistance; calmodulin-dependent protein kinase II

目前, 早期肺癌仍缺乏有效的诊断手段, 大多数肺癌患者初诊时已为中、晚期, 错过了根治性治

疗的机会^[1]。采用靶向治疗、化学治疗、放射治疗、免疫治疗等手段能使肺癌患者获益,但仍有许多无靶向治疗指征的肺癌患者因肿瘤耐药性的产生而对化疗不敏感,最终导致肺癌治疗失败。多年来,本课题组通过改善维拉帕米给药途径而显著提高了晚期肺癌在内的多种实体肿瘤的治疗疗效,但具体机制尚不完全明确^[2-4]。本课题组发现在肺腺癌细胞中,维拉帕米可以有效逆转顺铂耐药,并发现钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(CaMKⅡ)参与维拉帕米逆转肺腺癌细胞耐药的过程,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料

肺腺癌细胞株 A549 购自中国科学院细胞库;胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自碧云天生物技术公司, CaMKⅡ及 P-CaMKⅡ抗体购自 Abcam 公司;HRP 二抗和 β -actin 抗体购自 Sigma 公司,顺铂(DDP, 江苏豪森, 30 mg/支)及维拉帕米(verapamil, 上海禾丰制药, 5 mg, 2 mL)购自安徽省肿瘤医院。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:肺腺癌细胞 A549 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基(含青霉素 G 钠和链霉素各 100 U/mL), 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,进行传代或接种于孔板培养。

1.2.2 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法检测细胞增殖:取对数生长的 A549 接种到 96 孔板,约 1×10^4 细胞/孔,细胞贴壁后进行药物处理。实验分为正常组、维拉帕米组、顺铂单药组(DDP)、顺铂联合维拉帕米组(DDP + VER)。维拉帕米药物浓度 4.91 μ g/mL, 顺铂浓度 1.00 μ g/mL。每组设置 3 个复孔,并设阴性对照,药物作用 48 h 后加入 CCK-8 试剂(10.00 μ L/孔),作用 1 h 后用酶标仪进行检测(Bio-Rad680)。药物对细胞的抑制率(IR) = (OD 空白 - OD 实验)/OD 空白 $\times 100\%$, OD 为吸光度值。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡:取对数生长的 A549 细胞接种于 6 孔板,药物分组及浓度同 1.2.2 内容。药物作用 48 h 后收集各组细胞重悬于 500.00 μ L 的 Binding Buffer 中,依次加入 Annexin V-FITC 5.00 μ L 和 PI 5.00 μ L, 室温

避光孵育,流式细胞仪上机检测(参照碧云天生物公司 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒说明书)。

1.2.4 Western blotting 检测蛋白表达水平:药物分组及浓度同 1.2.2 内容。将培养板内培养基弃去,冰 PBS 清洗后再次弃去,加入细胞裂解液于冰上裂解,充分刮离细胞并移入 EP 管内,置于 100 ℃金属浴锅内 10 min,以标准血清蛋白为标准品测定蛋白浓度。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,半干转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(稀释比例: β -actin 为 1:4 000; CaMKⅡ及 P-CaMKⅡ为 1:1 000),4 ℃孵育过夜, PBST 洗涤后加二抗(1:1 000)温育 2 h,加 ECL 于化学发光成像系统(ChemiScope 3600 Mini)进行成像。

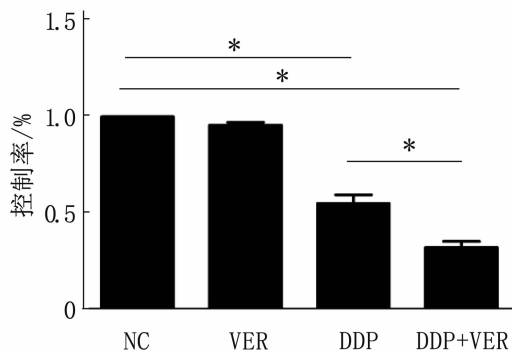
1.3 统计学处理

应用 SPSS 19.0 进行数据的统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,比较采用独立样本 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维拉帕米逆转肺腺癌细胞顺铂化疗耐药的效果

A549 细胞系在单药阿霉素组、阿霉素联合维拉帕米组中的抑制率分别为(55.00 $\pm$ 2.60)% 和 (32.30 $\pm$ 1.80)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。2 组与对照组相比均有显著差异($P < 0.05$)。见图 1。



NC 为正常组, VER 为维拉帕米组, DDP 为顺铂单药组, DDP + VER 为顺铂联合维拉帕米组。

与 DDP + VER 比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 维拉帕米逆转肺腺癌细胞顺铂化疗耐药的效果

2.2 维拉帕米促进肺腺癌细胞顺铂化疗凋亡

在 A549 细胞中,单药顺铂的凋亡率为 10.30%,顺铂联合维拉帕米为 21.60%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

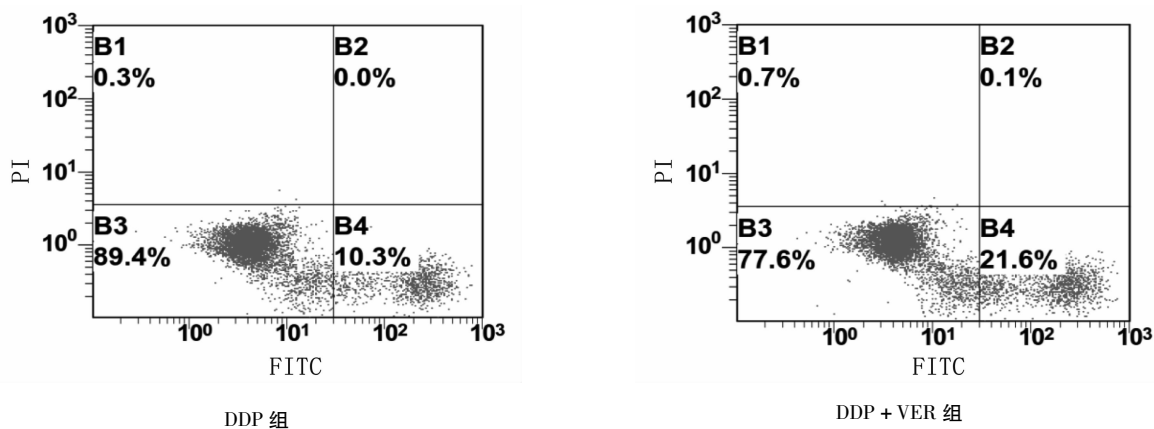
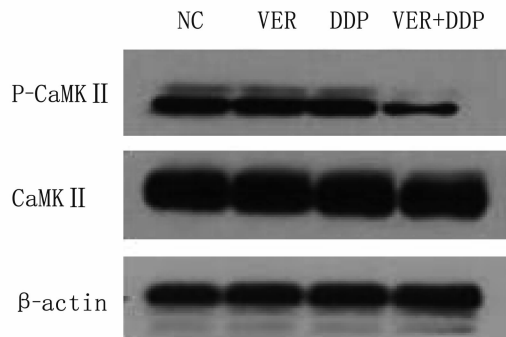


图 2 维拉帕米促进肺腺癌细胞顺铂化疗凋亡

2.3 Western blotting 检测蛋白表达水平

在 A549 细胞中，顺铂联合维拉帕米组中 P-CaMK II /CaMK II 的表达明显低于单药顺铂组。鉴于 CaMK II 已被证实参与众多肿瘤相关的信号传导通路，作者测定了单药化疗组及联合组中 P-CaMK II /CaMK II 蛋白活性水平，结果证实联合药物组中 P-CaMK II /CaMK II 蛋白表达低于化疗单药组。见图 3。



NC 为正常组，VER 为维拉帕米组，DDP 为顺铂单药组，DDP + VER 为顺铂联合维拉帕米组。

图 3 各组 P-CaMK II、CaMK II、β-actin 的表达

3 讨 论

姑息化疗是治疗晚期非小细胞肺癌患者的有效方法。与单纯支持治疗相比，使用含铂类的联合化疗可有效提高生存率，改善生活质量。由于肺癌细胞对化疗药物的天然或继发的耐受性，使得相当部分患者发生严重的不良反应，且未取得实质的治疗效果。目前认为与肿瘤耐药相关的机制主要包括 ABC 转运蛋白的跨膜转运、细胞解毒能力的增强、DNA 损伤修复系统失调及凋亡相关通路受阻等^[5]。

维拉帕米可以逆转多种肿瘤细胞对化学药物

的耐药性。体外研究^[6]发现，维拉帕米有效逆转肿瘤耐药的浓度是 6.00 ~ 10.00 μmol/L，但维拉帕米的静脉安全浓度是 1.00 ~ 2.00 μmol/L，超过安全浓度会导致窦性心动过缓、房室传导阻滞等严重的毒副作用。维拉帕米作为钙离子阻滞剂，其静脉应用时有诱发新的心脏疾病的风险。本课题组通过改变维拉帕米的给药途径（动脉介入化疗、腹腔化疗）并与化疗药物联合应用，大大提高临床疗效，且未出现明显的心脏恶性事件，但仍有部分患者疗效欠佳^[7-8]，这更加需要了解其逆转耐药的机制，寻找有效的预测分子。

CaMK II 是钙信号下游的一种多功能丝/苏氨酸蛋白激酶，存在 4 种不同基因亚型。Ca²⁺ 能与钙调蛋白（CaM）结合，形成的钙调蛋白复合物能够促进钙调蛋白与 CaMK II 结合，从而使 CaMK II 构象发生改变，引起酶的活化，调节不同细胞的生长。相关研究^[9]表明 α 和 β 亚型在神经细胞的发育及功能活性中发挥重要作用，γ 亚型在免疫系统尤其是 T 细胞记忆、CD8⁺ 细胞活化中发挥重要的作用^[10]，而 δ 亚型的研究主要集中在调节心肌细胞的稳态和功能^[11]。最近研究^[12-13]表明，CaMK II 活化包括离子通道、激酶、转录因子在内的约 40 种蛋白质，从而在多种肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、转移中发挥重要的作用。CaMK II 各种亚型在非小细胞肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、骨肉瘤等恶性肿瘤中过表达，且与其临床病理参数密切相关^[14-17]。研究^[18-19]表明 CaMK II 能够通过调控肿瘤干细胞的生长及分化，进而在肿瘤复发、治疗抵抗等方面发挥重要的作用。

本研究发现，在 A549 细胞中，维拉帕米能提高肺癌细胞中顺铂的抗癌能力，其抑制率及促进凋亡能力均显著高于顺铂单药组（P < 0.05）。同

时,维拉帕米联合顺铂组中 P-CaMK II/CaMK II 低于顺铂单药组,推测 CaMK II 参与了维拉帕米逆转化疗耐药的过程,但具体机制仍需进一步的探讨。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] 刘其秀,樊高飞,吴旻,等. 靶动脉灌注维拉帕米和化疗药物治疗非小细胞肺癌的临床研究[J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(11): 957-961.
- [3] 滕小路,刘森,张腾跃,等. 维拉帕米通过调节 Bcl-2 表达对胃癌细胞株耐阿霉素的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(4): 328-335.
- [4] Zhang T Y, Ma K L, Huang J, et al. CDKN2B is critical for verapamil-mediated reversal of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(66): 110052-110063.
- [5] Zhang D X, Fan D M. New insights into the mechanisms of gastric cancer multidrug resistance and future perspectives [J]. Future Oncol, 2010, 6(4): 527-537.
- [6] Fan P S, Zhang T Y, Huang Q, et al. Basic and clinical research on the therapeutic effect of intervention in primary liver cancer by targeted intra-arterial verapamil infusion[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(1): 59-67.
- [7] Huang J, Duan Q H, Fan P S, et al. Clinical evaluation of targeted arterial infusion of verapamil in the interventional chemotherapy of primary hepatocellular carcinoma[J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 59(2): 127-132.
- [8] Liu Y, Lu Z, Fan P, et al. Clinical efficacy of chemotherapy combined with verapamil in metastatic colorectal patients[J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 61(2): 393-398.
- [9] Ly P T, Song W H. Loss of activated CaMK II at the synapse underlies Alzheimer's disease memory loss [J]. J Neurochem, 2011, 119(4): 673-675.
- [10] McGargill M A, Sharp L L, Bui J D, et al. Active Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II gamma B impairs positive selection of T cells by modulating TCR signaling[J]. J Immunol, 2005, 175(2): 656-664.
- [11] Bers D M. CaMK II inhibition in heart failure makes jump to human[J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1044-1046.
- [12] Britschgi A, Bill A, Brinkhaus H, et al. Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(11): E1026-E1034.
- [13] Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMK II action in long-term potentiation[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(3): 169-182.
- [14] Chai S J, Qian Y Y, Tang J F, et al. RETRACTED: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II γ , a critical mediator of the NF- κ B network, is a novel therapeutic target in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Letters, 2014, 344(1): 119-128.
- [15] Liu Z L, Han G, Cao Y, et al. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II enhances metastasis of human gastric cancer by upregulating nuclear factor- κ B and Akt-mediated matrix metalloproteinase-9 production [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2459-2464.
- [16] Meng Z P, Li T, Ma X X, et al. Berbamine inhibits the growth of liver cancer cells and cancer-initiating cells by targeting Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(10): 2067-2077.
- [17] Chi M N, Evans H, Gilchrist J, et al. Phosphorylation of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II at T286 enhances invasion and migration of human breast cancer cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 33132-33139.
- [18] Chai S J, Xu X, Wang Y F, et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II γ enhances stem-like traits and tumorigenicity of lung cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(18): 16069-16083.
- [19] Gu Y, Chen T, Meng Z, et al. CaMK II, a critical regulator of CML stem/progenitor cells, is a target of the natural product berbamine[J]. Blood, 2012, 120(24): 4829-4839.

《实用临床医药杂志》“医工结合与临床研究” 2019 年专题征稿启事

自 2019 年起本刊开辟“医工结合与临床研究”专栏,欢迎相关领域研究专家向本刊赐稿,稿件将优先录用,同时给予优厚的稿酬。

具体要求:

- (1) “医工结合与临床研究”相关原创性论文,偏重临床应用研究。
- (2) 省级以上基金资助课题,提供准确的基金项目名称及编号。
- (3) 论著字数 4 000 ~ 5 000 字,需完整的中英文摘要,参考文献 15 篇以上。
- (4) 详细作者简历(姓名,职称,手机,邮箱,社会兼职,研究方向,等等)。
- (5) 请您将论文发到 1036217200@qq.com, 文件名备注“医工结合与临床研究专题征稿论文”。
- (6) 联系人: 钱锋, 13852700236, 0514-87978807
- (7) 通讯地址: 江苏省扬州市扬州大学江阳路北校区 14 栋 2 楼,《实用临床医药杂志》编辑部, 邮政编码: 225009

《实用临床医药杂志》编辑部