

吐根碱结合 PARP-1 逆转肝癌细胞 HepG2/DDP 耐药的作用研究

任鹏飞^{1,2}, 刘晨³, 冉翔³, 王恒毅¹

摘要 目的 探讨吐根碱逆转耐药肝癌耐药细胞 HepG2/DDP 的耐药性及机制。方法 采用顺铂 (DDP) 大剂量冲击结合低剂量持续诱导方法构建肝癌耐药细胞株 HepG2/DDP; 采用反向虚拟筛选、分子对接、表面离子体共振实验和免疫印迹实验寻找吐根碱逆转耐药的靶标; 转染实验验证吐根碱作用靶标; 细胞毒实验检测吐根碱联合 DDP 对 HepG2/DDP 细胞增殖的抑制作用; 流式细胞实验验证吐根碱的增敏作用; 免疫印迹实验分析凋亡相关蛋白 Bcl2、BAX 及 Cleaved-caspase-3 的表达。结果 吐根碱能够增强 DDP 对 HepG2/DDP 细胞的敏感性, 使 HepG2/DDP 对 DDP 的耐药指数 (RI) 由 3.69 降低到 0.93; 反向虚拟筛选、分子对接、表面离子体共振实验揭示吐根碱和 PARP-1 有良好的结合作用; 免疫印迹实验显示吐根碱在细胞内显著抑制 PARP-1 活性; siRNA 干扰实验显示 HepG2/DDP 细胞中 PARP-1 表达抑制后吐根碱增敏 DDP 细胞毒性的作用基本消失; 流式细胞实验显示吐根碱能够增强 DDP 对 HepG2/DDP 细胞的促凋亡作用。结论 吐根碱能够增强 HepG2/DDP 细胞对 DDP 的敏感性, 其作用机制可能与其抑制 PARP-1 的活性有关。

关键词 吐根碱; 增敏; DDP; HepG2/DDP; PARP-1

中图分类号 R 966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1182-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.002

肝癌是恶性程度最大的肿瘤之一。化疗耐药是肝癌患者预后差的重要原因^[1]。铂类药物是肝癌治疗的一线药物, 但长期使用往往会出现耐药性^[2]。DNA 损伤修复是导致肝癌耐药最主要的机制^[3-4]。研究^[5-6]表明, DNA 修复酶多聚 (ADP-核糖) 聚合酶-1 [poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1] 在耐药肝癌细胞中高度表达, 在临床上显著降低铂类药物对肝癌的治疗作用。吐根碱是一种

异喹啉生物碱, 近年来研究^[7-8]发现吐根碱联合化疗药物能够增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 但是机制尚不明确。因此, 该研究构建了顺铂 (cisplatin, DDP) 耐药肝癌细胞株 HepG2/DDP, 评价吐根碱是否通过结合 PARP-1 而发挥增敏顺铂的抗肿瘤作用, 希望为临床逆转肝癌耐药的研究提供一定的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 吐根碱 (货号: E275439)、瑞卡帕布 (货号: R288628)、DDP (货号: C295225)、3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑鎓溴化物 (MTT, 货号: T100896) 购自上海阿拉丁试剂有限公司; PARP-1 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。抗 PAR 抗体、抗 γ H2AX 抗体、抗 PARP-1 抗体、抗 β -actin 抗体、抗 BAX 抗体、抗 Bcl2 抗体、抗 Caspase-3 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; PARP-1 siRNA、NC siRNA 购自广州市锐博生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; HepG2 细胞来源于安徽医科大学药学院细胞存储中心。

1.2 反向虚拟筛选与分子对接 采用 Discovery studio 2017 软件进行反向筛选和分子对接。用 Chemdraw 2010 绘制吐根碱结构, Discovery studio 2017 优化加氢, Libdock 程序与 Discovery studio 2017 软件蛋白数据库组件对接, 选取排名前十的蛋白进行分析, 选择目标蛋白, 再次利用 Libdock 程序与目标蛋白进行对接, 获得三维 (合) 二维结合模式图, 分析小分子与配体间的键合作用。蛋白质晶体结构来源于 Protein Data Bank 数据库。

1.3 表面等离子体共振实验 将 PARP-1 蛋白标记在芯片上, 6 种浓度的吐根碱 (500、250、125、62.5、31.25、15.625 nmol/L) 通过 6 个通道以 20 μ L/min 的速度流过芯片, 持续 5 min, 再用磷酸盐缓冲液冲洗 10 min, Biacore T200 2.1 软件分析结果, 实验采用 GE Biacore T200 生物大分子相互作用分析仪 (Cytiva, 美国) 进行操作。

2022-05-10 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1908085QB76)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属阜阳医院急诊科, 阜阳 236000

³ 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 任鹏飞, 男, 硕士研究生;

王恒毅, 男, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanghyahmu@aliyun.com

1.4 DDP 耐药细胞 HepG2/DDP 的构建 采用药物大剂量冲击和低剂量持续诱导相结合的方法诱导细胞产生耐药性。将 HepG2 细胞置于含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青-链双抗的 DMEM 培养基中培养,待 HepG2 细胞细胞融合度超过 60% 以后加入 5 g/ml 的 DDP 培养,24 h 后洗去死细胞,继续培养,待再次融合度超过 60% 后加入 5 g/ml 的 DDP 培养,24 h 后洗去死细胞,依次反复传代 10 次。随后将得到的细胞加入 0.5 g/ml 的 DDP 适应性培养,培养 10 代之后检测 DDP 的 IC_{50} ,检测细胞的耐药性,备用,并将细胞命名为 HepG2/DDP。

1.5 细胞毒实验 将处于对数生长期的 HepG2 或 HepG2/DDP 接种到 96 孔板中(密度为 5 000 个细胞/孔)。培养 24 h 后加入 DDP(0、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32、64 μ g/ml)或吐根碱(1、2、4、8、16、32、64 μ mol/L)或吐根碱(16 μ mol/L) + DDP(0、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32、64 μ g/ml)后继续培养 24 h,吸去培养基后每孔加入 20 μ l 浓度为 5 mg/ml 的 MTT,在 37℃ 继续孵育 4 h,每孔再加入 100 μ l DM-SO,混匀,在 490 nm 波长处检测吸光度,所有实验重复 3 次,计算细胞生存率、 IC_{50} 值及 HepG2/DDP 细胞的耐药指数(RI)。RI = 耐药株 IC_{50} /非耐药株 IC_{50} 。

1.6 转染实验 siRNA 由广州市锐博生物科技有限公司合成。PARP-1 siRNA 序列为 5'-GGAUGAUCUUCGACGUGGA-3';阴性对照 NC siRNA 序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'。根据 LipofectamineTM 2000 说明书进行转染。转染后进行免疫荧光实验、蛋白印迹实验及细胞毒实验(设为空白组、4 μ g/ml DDP 组、16 μ mol/L 吐根碱 + 4 μ g/ml DDP 组)。

1.7 免疫荧光实验 取转染后的细胞,加入到 24 孔板中预包被多聚赖氨酸的玻片上,37℃ 孵育 5 h,待贴壁后吸干液体,多聚甲醛固定,30 min 后加入羊血清封闭,孵育 40 min,吸弃液体加入一抗后 4℃ 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,加入二抗进行荧光染色,作用 1 h 后用荧光显微镜下观察结果。

1.8 蛋白印迹实验 将浓度分别为 0、4、8、16 μ mol/L 的吐根碱与 HepG2/DDP 细胞孵育 24 h 或单独培养 HepG2、HepG2/DDP 和 HepG2/DDP (PARP-1 siRNA) 细胞 24 h 后收集细胞,蛋白定量后 SDS-PAGE 电泳分离蛋白转膜,用 TBS-T 配制的含 5% 脱脂牛奶的缓冲液封闭,1 h 后用 TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,加入 1:1 000 稀释比例的一抗(抗 PAR 抗体、抗

γ H2AX 抗体、抗 PARP-1 抗体、抗 BAX 抗体、抗 Bcl2 抗体、抗 Cleaved-caspase-3 抗体、抗 β -actin 抗体),4℃ 孵育过夜。过夜后待膜恢复至室温,TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,加入 1:3 000 稀释的对应二抗,孵育 1 h,取出膜后 TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,吸干,加入化学发光剂进行凝胶成像检测,计算吸光度,分析结果。

1.9 流式细胞检测 将对数生长期的 HepG2/DDP 细胞调整浓度为 1×10^5 个/ml,接种到 6 孔板中。分别设空白组、DDP 组(4 g/ml)和吐根碱(16 μ mol/L) + DDP(4 g/ml)组,培养 24 h 后收集细胞,1 000 r/min,4℃ 下离心 5 min,并用预冷 PBS 冲洗两次。随后将细胞重新悬浮在 100 μ l PBS 缓冲液中,加入 5 μ l Annexin V-FITC 混合。冰上避光 15 min,然后添加 400 μ l PBS。流式细胞仪检测前加入 5 μ l 碘化丙啶溶液,混匀后快速检测细胞凋亡率。

1.10 统计学处理 使用软件 SPSS 19.0 进行统计学分析,数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吐根碱体外与 PARP-1 的相互作用 反向虚拟筛选结果显示吐根碱对多个药物靶点有良好的结合作用。取契合值打分排名前十的靶点分析显示,吐根碱与降低化疗药物敏感性相关的 DNA 修复酶 PARP-1 (PDB ID: 4und) 有较高的契合值打分,提示吐根碱可能通过结合 PARP-1 增强化疗药物的敏感性。见表 1。

表 1 Discovery Studio 2017 预测的排名前十位的蛋白质晶体靶标

序号	PDB 号	靶标	契合值
1	2o8h	磷酸二酯酶 10A	0.985 7
2	3ete	谷氨酸脱氢酶	0.985 4
3	4und	多聚(ADP-核糖)聚合酶-1	0.944 7
4	1wrk	人心肌钙蛋白 C	0.915 2
5	2xdu	热休克蛋白 HSP90	0.910 2
6	3ovy	二聚血凝素	0.892 8
7	3nal	人 CYP11A1	0.869 4
8	1xom	人磷酸二酯酶 4D	0.862 4
9	4f9u	糖基化谷氨酰胺环化酶	0.858 7
10	3cy2	人原癌基因丝氨酸-苏氨酸激酶	0.849 1

对已报道的 PARP-1 的活性位点进行对接,结果显示吐根碱能够通过多种模式结合到 PARP-1 活性位点中,包括:一个形成于氨基酸 GLY863 和异喹啉环上的羟基的氢键;一个形成于氨基酸 GLU988

和异喹啉环上质子化 N 的离子键;芳香族氨基酸 TYR806、TYR889、TYR907 分别与吐根碱结构中的苯环产生的 π - π 堆积作用;多个疏水氨基酸与吐根碱通过范德华力和和多个弱的碳氢键相互作用。见图 1。

SPR 实验在分子水平观察吐根碱与 PARP-1 的相互作用,采用瑞卡帕布作为阳性对照。结果如图 2 所示,各种浓度(化合物浓度依次为 500、250、125、62.5、31.25、15.625 nmol/L)的吐根碱和瑞卡帕布通过标记 PARP-1 蛋白的芯片后,芯片表面偏振光折射率发生不同程度的变化,表明小分子与 PARP-1 蛋白发生结合作用。对结合曲线进行拟合的到解离动力学常数 KD 值,两者分别为 5.73×10^{-6} mol/L (吐根碱)和 4.26×10^{-6} mol/L (瑞卡帕布),说明吐根碱与 PARP-1 有良好的结合作用。

2.2 HepG2/DDP 细胞耐药性鉴定及 PARP-1 的表达分析 MTT 法检测了 DDP 对 HepG2 和 HepG2/DDP 耐药株的 IC_{50} 值。结果如图 3A 所示,DDP 对 HepG2 细胞增殖有显著的抑制作用,各组间

差异有统计学意义 ($F = 61.14$, $P < 0.01$), IC_{50} 值为 $(4.27 \pm 0.34) \mu\text{g/ml}$;HepG2/DDP 细胞株对各个浓度的 DDP 均显示出一定的耐药性 ($F = 73.96$, $P < 0.01$), IC_{50} 值增至 $(15.76 \pm 0.84) \mu\text{g/ml}$, RI 值为 3.69。这一结果说明 HepG2/DDP 细胞对 DDP 产生了显著的耐药性。蛋白印迹实验显示(图 3B、C), PARP-1 在 HepG2/DDP 细胞中的表达量较 HepG2 显著提高,差异有统计学意义 ($t = 13.68$, $P < 0.01$)。

2.3 吐根碱对 HepG2/DDP 细胞耐药性的逆转分析 如图 4A 所示,吐根碱在 $1 \sim 16 \mu\text{mol/L}$ 浓度区间内对 HepG2/DDP 细胞的增殖无明显抑制作用,当浓度达到 $32 \mu\text{mol/L}$ 时, HepG2/DDP 细胞的增殖显著受到抑制,抑制率达到 $(21.86 \pm 1.78) \%$, 故选择 $16 \mu\text{mol/L}$ 作为吐根碱的无毒阈值研究其对 HepG2/DDP 细胞的增敏作用。进一步研究显示吐根碱 ($16 \mu\text{mol/L}$) 联合不同浓度 DDP 与 HepG2/DDP 细胞共培养后,细胞生存率较 DDP 单用组下降,差异有统计学意义 ($F = 98.49$, $P < 0.01$)。计

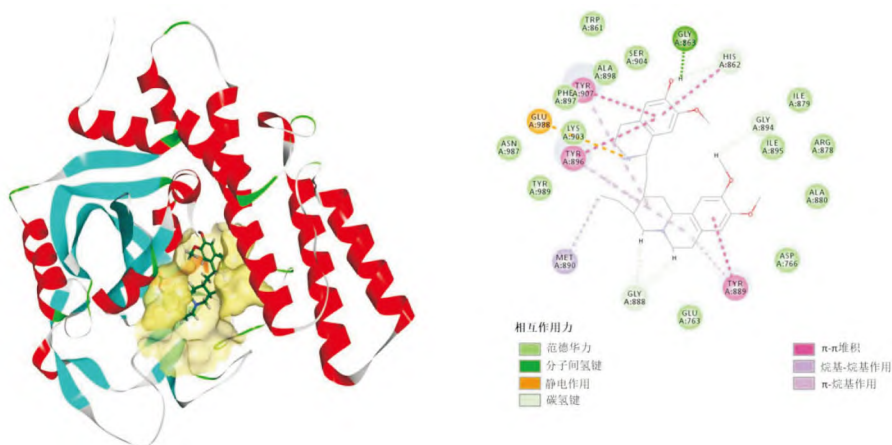


图 1 吐根碱与 PARP-1 (PDB 号:4und) 的结合模式图

A:吐根碱结合到 PARP-1 活性位点的三维模式图;B:PARP-1 活性位点的氨基酸残基与吐根碱键合作用的二维模式图

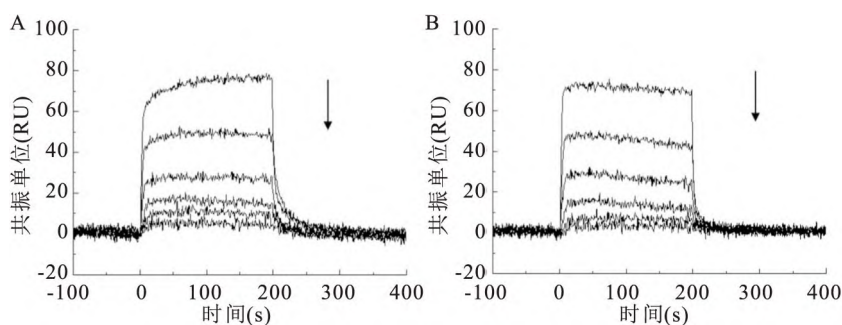


图 2 SPR 检测吐根碱与 PARP-1 结合作用

A:吐根碱与 PARP-1 的结合曲线;B:瑞卡帕布与 PARP-1 的结合曲线

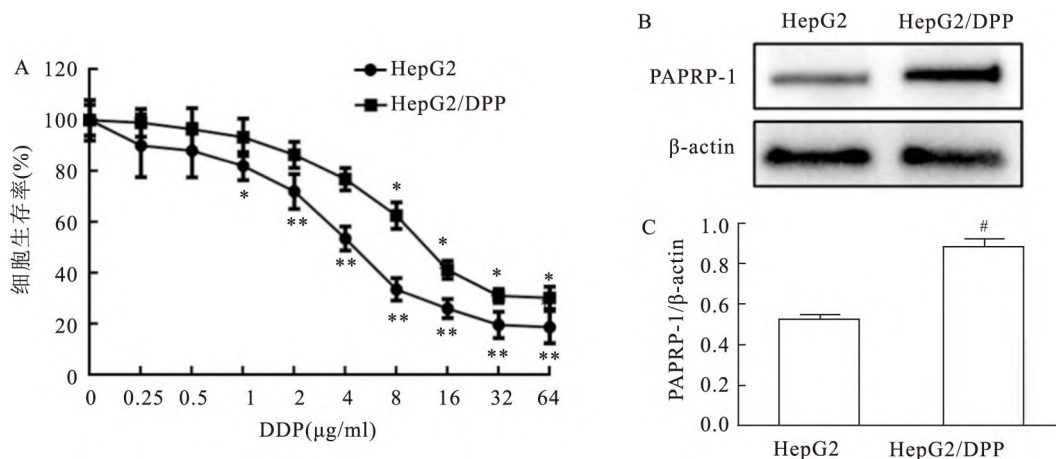


图3 HepG2/DDP 细胞耐药性鉴定及细胞株中 PARP-1 的表达

A: DDP 对 HepG2 和 HepG2/DDP 细胞增殖的影响; B: HepG2 和 HepG2/DDP 细胞 PARP-1 的表达; C: 蛋白相对表达量柱状图; 与 0 μg/ml DDP 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HepG2 组比较: # $P < 0.05$

算吐根碱和 DDP 联合用药的 IC_{50} 值, 结果显示较 DDP 单独使用组, IC_{50} 值显著下降 [IC_{50} 值为 (3.95 ± 0.43) g/ml], RI 值为 0.93。这一结果提示吐根碱对 HepG2/DDP 细胞 DDP 的耐药性有显著的逆转作用。见图 4B。

2.4 吐根碱在细胞内对 PARP-1 酶活性的影响

为进一步评价吐根碱对 PARP-1 的抑制作用, 采用免疫印迹法检测了细胞内反映 PARP-1 酶活性 PAR 表达水平及反映 DNA 损伤的 γ H2AX 表达水平。结果显示, 吐根碱处理 HepG2/DDP 细胞 24 h 后, 细胞内 PAR 的表达量明显降低, γ H2AX 的表达量增加 ($F_{PAR} = 519.0$, $P < 0.01$; $F_{H2AX} = 794.3$, $P < 0.01$), 提示吐根碱可抑制 HepG2/DDP 细胞中的 PARP-1 活性, 进而阻断细胞内 DNA 损伤修复, 增强化疗药物对肿瘤细胞的敏感性。见图 5。

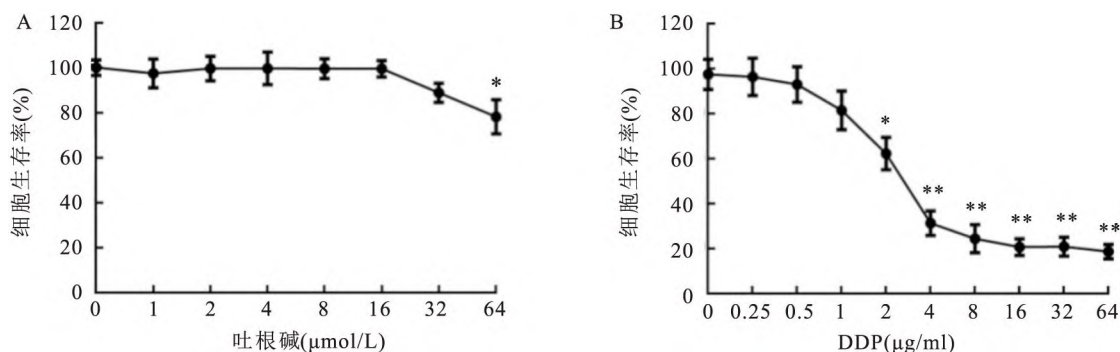


图4 吐根碱对 HepG2/DDP 细胞耐药性的逆转作用

A: 吐根碱对 HepG2/DDP 细胞增殖的影响; B: 吐根碱 (16 μmol/L) 联合 DDP 对 HepG2/DDP 细胞增殖活性的影响; 与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 吐根碱联合 DDP 对沉默 PARP-1 的 HEPG2/DDP 细胞增殖的影响 如图 6 所示, 免疫荧光和蛋白印迹实验显示 PARP-1 siRNA 转染后 HEPG2/DDP 细胞中的 PARP-1 生成量显著降低; 在吐根碱存在的条件下, 与阴性对照组相比, DDP 对 PARP-1 siRNA 转染的 HEPG2/DDP 细胞的增殖没有明显的影响。这一结果进一步证实了吐根碱通过抑制肿瘤细胞中的 PARP1 活性, 增强化疗药物的敏感性。

2.6 吐根碱联合 DDP 对 HepG2/DDP 细胞凋亡的影响 结果如图 7 所示, 空白组、DDP 组和吐根碱 + DDP 组细胞凋亡率分别为 $(2.84 \pm 1.02)\%$ 、 $(11.87 \pm 2.41)\%$ 和 $(39.77 \pm 4.66)\%$ 。与 DDP 组比较, 吐根碱 + DDP 组 HepG2/DDP 细胞凋亡率显著升高, 差异有统计学差异 ($t = 11.22$, $P < 0.01$)。蛋白印迹实验显示 (图 7B、C), DDP 降低 Bcl2 表

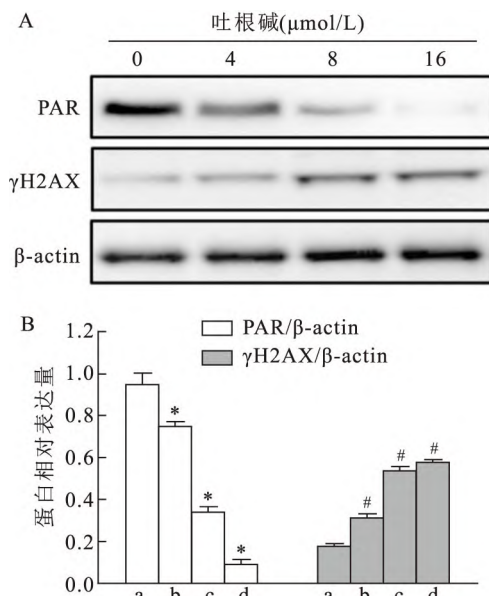


图5 吐根碱在细胞内对 PARP-1 酶活性的影响

A: PARP-1 siRNA 转染 HEPG2/DDP 细胞后免疫荧光和蛋白印迹实验结果; B: 吐根碱联合 DDP 对 PARP-1 siRNA 转染前后 HEPG2/DDP 细胞增殖的影响; a: 吐根碱 0 μmol/L 组; b: 吐根碱 4 μmol/L 组; c: 吐根碱 8 μmol/L 组; d: 吐根碱 16 μmol/L 组; 与 PAR 吐根碱 0 μmol/L 组比较: * $P < 0.05$; 与 γH2AX 吐根碱 0 μmol/L 组比较: # $P < 0.05$

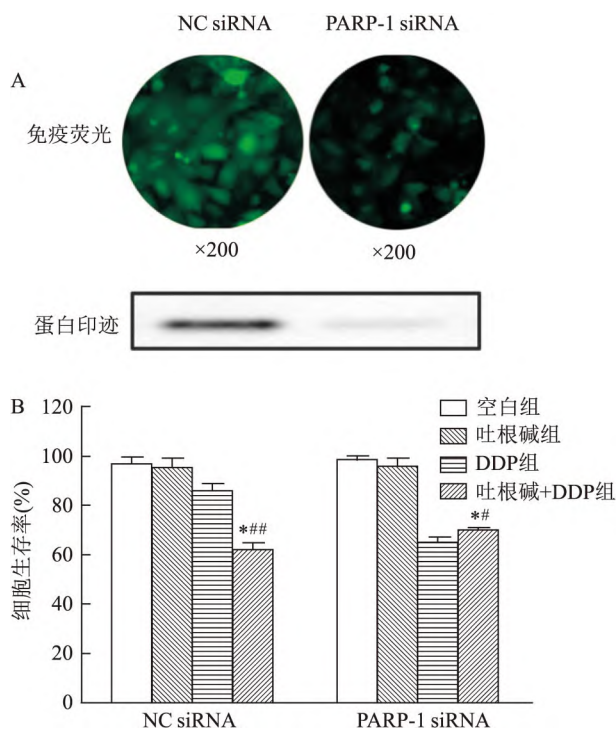


图6 吐根碱联合 DDP 对沉默 PARP-1 的 HEPG2/DDP 细胞增殖的影响

A: PARP-1 siRNA 转染 HEPG2/DDP 细胞后免疫荧光和蛋白印迹实验结果; B: 吐根碱联合 DDP 对 PARP-1 siRNA 转染前后 HEPG2/DDP 细胞增殖的影响; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 DDP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

达,同时增加 BAX 和切割的 Caspase-3 的表达水平,吐根碱则显著增强了 DDP 调控这些凋亡相关蛋白的作用,差异有统计学差异 ($F = 84.27$, $P < 0.01$)。

3 讨论

化疗耐药是导致肝癌综合治疗失败、病死率居高不下的一个主要因素。因此,研究肝癌的化疗耐药机制,寻找逆转化疗耐药的方法显得尤为重要。肿瘤细胞中 PARP1 蛋白响应于 DNA 损伤反应,在被 DNA 链断裂激活后,PARP1 以 NAD⁺ 依赖性方式催化 PAR 的合成,进行 DNA 损伤修复,这一过程在几秒钟内即可发生,是最快的 DNA 损伤反应之一^[3-4]。近年来,多种结构的 PARP-1 抑制剂陆续被开发出来,其中一些抑制剂目前作为单一药物或与 DNA 损伤药物联合已进入临床试验的不同阶段^[9-10]。目前已有 2 个 PARP-1 抑制剂获批上市,包括奥拉帕瑞布和拉卡帕瑞^[11]。多项研究^[12]表明,这些 PARP-1 抑制剂能提高肝癌细胞对 DNA 损伤药物敏感性,但是部分药物仍然存在如药代动力学差、潜在毒性的缺陷。因此,仍然需要努力寻找具高效低毒的新型骨架的 PARP-1 抑制剂。

天然产物是新药发现的巨大宝库,本研究显示来源于天然产物茜草科植物吐根单体成分吐根碱具有潜在的增敏 DDP 对肝癌细胞 HEPG2/DDP 的毒性作用,这一结果提示在临床治疗中吐根碱具有成为化疗药物增敏剂的潜力。计算机反向虚拟筛选的过程表明吐根碱与 PARP-1 有良好的结合作用,提示吐根碱可能是通过结合 PARP-1、抑制 PARP-1 活性而发挥增敏化疗药物的作用。分子对接实验分析了吐根碱与 PARP-1 的结合模式,显示吐根碱能通过多重作用与 PARP-1 的活性位点的多个氨基酸残基键合,在这些氨基酸中,GLY 863 和 TYR 907 已被证实是 PARP-1 抑制剂键合的关键氨基酸^[13]。SPR 实验在体外分析了吐根碱与 PARP-1 的相互作用,结果显示其结合 PARP-1 的能力与阳性药物瑞卡帕布相当。在细胞水平上,免疫印迹实验显示吐根碱可显著抑制 PARP-1 的活性,表现为抑制酶活标志物 PAR 表达,增强 DNA 损伤标志物 γH2AX 的表达。此外,siRNA 转染实验评价了沉默 PARP-1 基因后吐根碱联合 DDP 对的 HEPG2/DDP 细胞增殖的影响。结果显示沉默 PARP-1 基因的 HEPG2/DDP 细胞联合使用吐根碱的 DDP 与单独使用 DDP 相比,病死率没有明显变化,进一步证实了吐根碱对 DDP 的增敏作用是通过靶向结合 PARP-1。

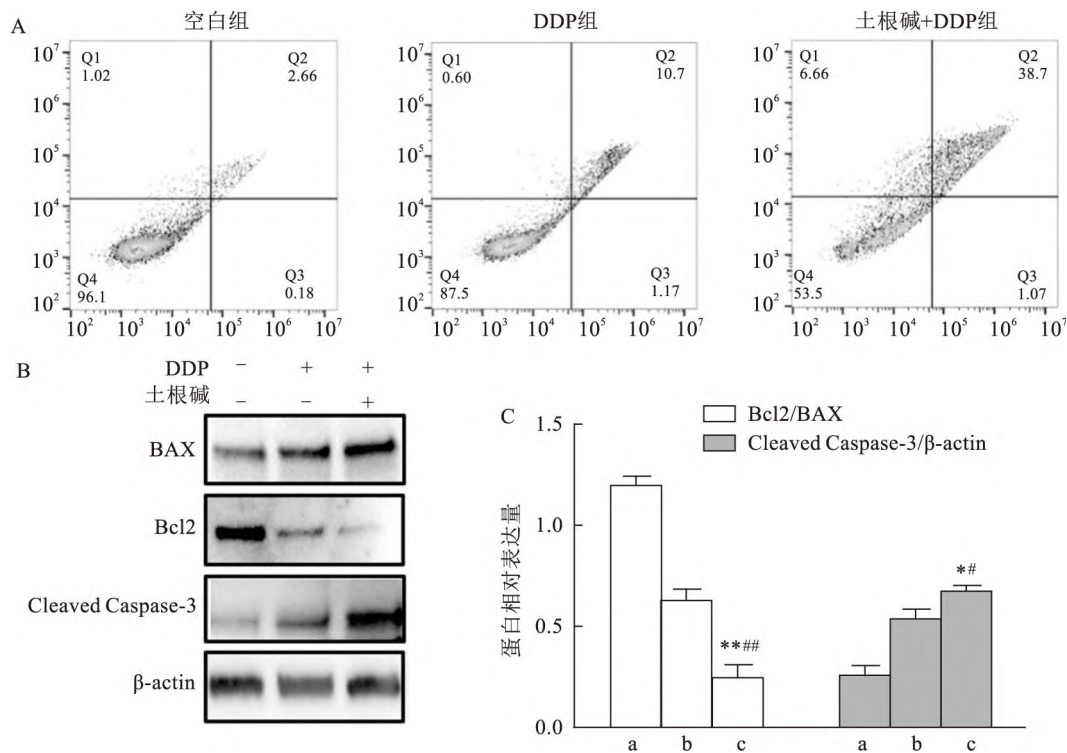


图7 吐根碱(16 $\mu\text{mol/L}$)联合DDP(4 $\mu\text{g/ml}$)对HepG2/DDP细胞凋亡的影响

A:膜联蛋白V-PI双重染色;B:各实验组给药48 h后BAX、Bcl2和Caspase-3蛋白的表达情况;C:蛋白相对表达量柱状图;a:空白组;b:DDP组;c:吐根碱+DDP组;与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与DDP组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

与DNA发生烷基化反应,损伤肿瘤细胞DNA是铂类药物诱导肿瘤细胞凋亡的主要机制^[14]。PARP-1与凋亡蛋白P53关系密切,其不仅参与P53蛋白活化途径,而且能够促进P53与细胞内损伤DNA缺口相结合,进而修复铂类药物导致的DNA损伤^[15]。因此,PARP-1作为DNA修复酶,阻碍其激活对铂类药物诱导肿瘤细胞凋亡非常重要。在本研究中,Annexin-V-PI双染实验结果显示,与DDP单独使用组相比,吐根碱可显著增加DDP诱导的HepG2/DDP细胞后期凋亡,凋亡相关蛋白Bcl2表达显著降低,Bax、Caspase-3的表达明显增加。结合先前实验结果,进一步表明吐根碱可以通过抑制PARP-1活性,增强HepG2/DDP细胞对DDP敏感性,促进DDP诱导肿瘤细胞的凋亡。

综上所述,本研究表明吐根碱对DNA修复酶PARP-1具有较强的抑制作用,能够增强铂类化疗药物对耐药肝癌细胞株的敏感性,为进一步开发治疗肿瘤的新型PARP-1抑制剂提供了基础。本研究尚存在着一些不足,如选取的肿瘤细胞种类单一、未开展动物体内实验、化合物药代动力学信息不足等,后续的研究将针对这些缺陷开展工作以提供更多吐根

碱作为肿瘤治疗药物先导化合物的数据。

参考文献

- [1] 徐磊, 张万广. 肝癌系统治疗中肿瘤超进展研究现状[J]. 中国实用外科杂志, 2021, 41(3): 284-8.
- [2] Rottenberg S, Disler C, Perego P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(1): 37-50.
- [3] Marin J J G, Cives-Losada C, Asensio M, et al. Mechanisms of anticancer drug resistance in hepatoblastoma[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(3): 407.
- [4] Zhou J, Kang Y, Chen L, et al. The drug-resistance mechanisms of five platinum-based antitumor agents[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 343.
- [5] Mateo J, Lord C J, Serra V, et al. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective[J]. Ann Oncol, 2019, 30(9): 1437-47.
- [6] 杨欣. 肝细胞肝癌组织中PARP-1、PD-1和PD-L1的表达水平及其临床意义[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [7] 高海凤. 吐根化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [8] Akinboye E S, Rosen M D, Bakare O, et al. Anticancer activities of emetine prodrugs that are proteolytically activated by the prostate specific antigen (PSA) and evaluation of *in vivo* toxicity of emetine derivatives[J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25(24): 6707-17.
- [9] Schreiber V, Illuzzi G, Héberlé E, et al. From poly(ADP-ribose)

- discovery to PARP inhibitors in cancer therapy[J]. *Bull Cancer*, 2015, 102(10): 863–73.
- [10] Vyas S, Chang P. New PARP targets for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(7): 502–9.
- [11] Rouleau M, Patel A, Hendzel M J, et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(4): 293–301.
- [12] Mateo J, Moreno V, Gupta A, et al. An adaptive study to determine the optimal dose of the tablet formulation of the PARP inhibitor olaparib[J]. *Target Oncol*, 2016, 11(3): 401–15.
- [13] LaFargue C J, Dal Molin G Z, Sood A K, et al. Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(1): e15–e28.
- [14] 徐淑萍, 孙国平, 王 华, 等. 丹皮酚增强顺铂对人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2006(1): 63–5.
- [15] Romeo M A, Gilardini Montani M S, Benedetti R, et al. Anticancer effect of AZD2461 PARP inhibitor against colon cancer cells carrying wt or dysfunctional p53[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 408(2): 112879.

Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells HepG2/DDP by emetine combined with PARP-1

Ren Pengfei^{1,2}, Liu Chen³, Ran Xiang³, Wang Hengyi¹

(¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Emergency, Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000;

³School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the reversal of drug resistance of drug-resistant hepatoma cell line HepG2/DDP by emetine and its mechanism. **Methods** The drug-resistant hepatoma cell line HepG2/DDP was established by high-dose cisplatin (DDP) shock combined with low-dose continuous induction. Reverse virtual screening, molecular docking, surface plasmon resonance (SPR) and Western blot assays were employed to explore the target of emetine. The target was validated by transfection assay *in vivo*. The inhibitory effect of emetine combined with DDP on the proliferation of HepG2/DDP cells was detected by cytotoxicity assay. The sensitization effect of emetine was verified by flow cytometry, and the expression of the apoptosis related proteins BCL2, Bax and Cleaved-caspase-3 were analyzed by Western blot. **Results** Emetine enhanced the sensitivity of HepG2/DDP cells to DDP and reduced the resistance index (RI) from 3.69 to 0.93. Reverse virtual screening, molecule docking and SPR results showed that emetine can stably bind to PARP-1. Western blot assays showed that emetine had a potent enzymatic inhibitory activity against PARP-1 *in vivo*. Furthermore, emetine's potentiation of DDP in HEPG2/DDP cells nearly disappeared when the cells were transfected with siRNAs against PARP-1. Flow cytometry showed that emetine could enhance the proapoptotic effect of DDP on HepG2/DDP cells. **Conclusion** Emetine can enhance the sensitivity of HepG2/DDP cells to DDP, and its mechanism may be related to its inhibition of PARP-1.

Key words emetine; reversal; DDP; HepG2/DDP; PARP-1