

Tomentin-A Induces Oxidative Stress-mediated Antiproliferative Effects in Cisplatin-resistant Lung Cancer Cells and Induces Apoptosis, Inhibits Migration and Invasion, Loss in MMP and Targets Ras/Raf/MEK/ERK Pathway

Bin YANG, Fengchang ZHENG, Weilin YANG, Peng SUN, Hailong ZHAO & Xiaokang ZHU *

*Department of Thoracic Surgery, Gansu Provincial Cancer Hospital, No. 2,
Xiaoxihu East Street, Qilihe District, Lanzhou, Gansu, 730050, China*

SUMMARY. Tomentin-A (Tomentin), an alkaloid found in certain plant species, has potential for antimicrobial drugs, antioxidants, and therapeutic applications in oxidative stress-related diseases like cardiovascular conditions and cancers. It also shows anti-inflammatory effects, suggests potential for cancer treatment, and has been explored for its cytotoxic effects on cancer cell lines. Keeping in consideration the pharmacological outcome of the molecule, the present research was initiated to explore its potential effects on lung cancer cells. We explored the antiproliferative effects of Tomentin on A549 cisplatin resistant NSCLC line via MTT assay. Cell colonies were detected by phase contrast microscopy. Apoptosis inducing ability of Tomentin was analysed by DAPI staining and western blotting assay. DCFH-DA assay and Rh-123 assay were utilized to ascertain the repercussions on intracellular ROS production and MMP, respectively. Migration and invasion was detected by transwell assay. Western blotting was used to check the regulatory actions of Tomentin-A on Ras/Raf/MEK/ERK pathway. Results indicated that the Tomentin proved to be a significant ($p < 0.05$) antiproliferative agent against A549 drug resistant NSCLC cells. Clonogenic assay detected dose-dependent targeting of the cell colonies by Tomentin. Tomentin administration elicited marked alterations in nuclear morphology, demonstrating a discernible effect on DNA condensation and fragmentation, as elucidated by the DAPI staining assay. Further, ROS and MMP detected studies revealed that the cell death in A549 cells is caused by abrupt increase in ROS and loss in the MMP thus indicating oxidative stress. Cell migration and invasion studies pointed out at high inhibition of target cells migration and invasion by Tomentin. The expression of Ras/Raf/MEK/ERK pathway were significantly targeted by Tomentin in Cisplatin resistant A549 cells as was indicated by downregulation of expressions of phosphorylated Ras, Raf, MEK, and ERK. In conclusion, these comprehensive results underscore the potential of Tomentin as a multifaceted therapeutic agent against drug-resistant NSCLC, warranting further exploration of its clinical applications.

RESUMEN. Tomentin-A (Tomentin), un alcaloide que se encuentra en ciertas especies de plantas, tiene potencial para medicamentos antimicrobianos, antioxidantes y aplicaciones terapéuticas en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como enfermedades cardiovasculares y cánceres. También muestra efectos antiinflamatorios, sugiere potencial para el tratamiento del cáncer y ha sido explorado por sus efectos citotóxicos en líneas celulares cancerosas. Teniendo en cuenta el resultado farmacológico de la molécula, la presente investigación se inició para explorar sus efectos potenciales sobre las células de cáncer de pulmón. Exploramos los efectos antiproliferativos de Tomentin en la línea de NSCLC resistente al cisplatino A549 mediante el ensayo MTT. Las colonias celulares se detectaron mediante microscopía de contraste de fases. La capacidad de inducción de apoptosis de Tomentin se analizó mediante tinción DAPI y ensayo de transferencia Western. Se utilizaron el ensayo DCFH-DA y el ensayo Rh-123 para determinar las repercusiones en la producción intracelular de ROS y MMP, respectivamente. La migración y la invasión se detectaron mediante ensayo Transwell. Se utilizó transferencia Western para comprobar las acciones reguladoras de Tomentin-A en la vía Ras/Raf/MEK/ERK. Los resultados indicaron que Tomentin demostró ser un agente antiproliferativo significativo ($p < 0.05$) contra las células de NSCLC resistentes a los medicamentos A549. El ensayo clonógeno detectó que Tomentin se dirigía a las colonias celulares de forma dependiente de la dosis. La

KEY WORDS: antiproliferative, apoptosis, invasion, lung cancer, migration, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, tomentin-A.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: zhuxiaokang_2006@hotmail.com

administración de tomentina provocó marcadas alteraciones en la morfología nuclear, lo que demuestra un efecto discernible sobre la condensación y fragmentación del ADN, como lo aclara el ensayo de tinción DAPI. Además, los estudios detectados con ROS y MMP revelaron que la muerte celular en las células A549 es causada por un aumento abrupto de ROS y una pérdida de MMP, lo que indica estrés oxidativo. Los estudios de migración e invasión celular señalaron una alta inhibición de la migración e invasión de las células diana por parte de Tomentin. Tomentin apuntó significativamente a la expresión de la vía Ras/Raf/MEK/ERK en células A549 resistentes al cisplatino, como lo indica la regulación negativa de las expresiones de Ras, Raf, MEK y ERK fosforilados. En conclusión, estos resultados integrales subrayan el potencial de Tomentin como agente terapéutico multifacético contra el NSCLC resistente a los medicamentos, lo que justifica una mayor exploración de sus aplicaciones clínicas.
