

## 丹参酮 II<sub>A</sub> 通过抑制 PI3K/Akt 通路逆转人喉癌细胞顺铂耐药的机制研究

吴庭艳<sup>1</sup>, 戴景芳<sup>1</sup>, 张强<sup>1</sup>, 胡芳欣<sup>1</sup>, 孔凡英<sup>1</sup>, 孔德胜<sup>1</sup>, 王海叶<sup>2</sup>

1. 邯郸邯钢医院有限责任公司, 河北 邯郸 056000

2. 邯郸市中心医院, 河北 邯郸 056000

**摘要:** **目的** 研究丹参酮 II<sub>A</sub> 对人喉癌细胞顺铂耐药的影响作用及机制。**方法** 以不同质量浓度 (0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L) 顺铂干预对数生长期人喉癌 Hep-2 细胞和人喉癌顺铂耐药细胞 (Hep-2/DDP) 48 h, CCK-8 法检测细胞增殖抑制率, 计算半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 和耐药指数 (RI)。以不同质量浓度 (0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mg/L) 丹参酮 II<sub>A</sub> 干预对数生长期 Hep-2 细胞 48 h, CCK-8 法检测细胞增殖抑制率, 计算 IC<sub>50</sub>; 采用丹参酮 II<sub>A</sub> (IC<sub>50</sub> 5.32 mg/L) + 不同质量浓度 (0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L) 顺铂干预对数生长期 Hep-2/DDP 细胞 48 h, CCK-8 法检测细胞增殖抑制率, 计算 2 种药物联用的 IC<sub>50</sub> 和逆转倍数 (RF)。取对数生长期 Hep-2/DDP 细胞, 设置对照组、顺铂组、丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组、丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂 + 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 组。各组分别给药干预 48 h 后, 采用 CCK-8 法、Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞增殖抑制率和凋亡率, Western blotting 法检测 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、激活型半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3)、cleaved Caspase-9、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B (Akt) 蛋白表达情况。**结果** 顺铂对 Hep-2 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 4.58 mg/L, 对 Hep-2/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 14.09 mg/L, RI 为 3.08; 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 Hep-2 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 5.32 mg/L; 丹参酮 II<sub>A</sub> 联合顺铂对 Hep-2/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 3.34 mg/L, RF 为 4.22。与对照组比较, 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂 + IGF-1 组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2 表达量显著降低, Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量和 Bax/Bcl-2 值显著升高 ( $P < 0.05$ )。与顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2 表达量显著降低, Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量和 Bax/Bcl-2 值显著升高 ( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂 + IGF-1 组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2 表达量显著升高, Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量和 Bax/Bcl-2 值显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 p-PI3K、p-Akt 表达量及 PI3K、Akt 磷酸化 (p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt) 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 p-PI3K、p-Akt 表达量及 PI3K、Akt 磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂 + IGF-1 组 Hep-2/DDP 细胞 p-PI3K、p-Akt 表达量及 PI3K、Akt 磷酸化水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 丹参酮 II<sub>A</sub> 可逆转人喉癌细胞顺铂耐药, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 通路活化而促进喉癌细胞凋亡有关。

**关键词:** 丹参酮 II<sub>A</sub>; 喉癌; 顺铂; 耐药; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)09-1938-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.007

## Mechanism of tanshinone II<sub>A</sub> reversing cisplatin resistance in human laryngeal cancer cells by inhibiting PI3K/Akt pathway

WU Ting-yan<sup>1</sup>, DAI Jing-fang<sup>1</sup>, ZHANG Qiang<sup>1</sup>, HU Fang-xin<sup>1</sup>, KONG Fan-ying<sup>1</sup>, KONG De-sheng<sup>1</sup>, WANG Hai-ye<sup>2</sup>

1. Handan Iron and Steel Hospital Co., Ltd., Handan 056000, China

2. Handan Central Hospital, Handan 056000, China

**Abstract: Objective** To study the effect and mechanism of tanshinone II<sub>A</sub> on cisplatin resistance in human laryngeal carcinoma cells. **Methods** Human laryngeal carcinoma Hep-2 cells and human laryngeal carcinoma cisplatin-resistant cells (Hep-2/DDP) were treated with different concentrations of cisplatin (0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 mg/L) for 48 h. The inhibition rate of cell proliferation

收稿日期: 2022-04-22

基金项目: 邯郸市科学技术研究与发展计划项目 (21422083142)

作者简介: 吴庭艳, 女, 主治医师, 主要从事老年肿瘤疾病治疗研究。E-mail: gwjjwg86@163.com

was detected by CCK-8 method, and the semi-inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) and drug resistance index (RI) were calculated. Hep-2 cells were treated with different concentrations of tanshinone  $II_A$  (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 mg/L) in logarithmic growth phase for 48 h. The cell proliferation inhibition rate was detected by CCK-8 method, and the  $IC_{50}$  was calculated. Hep-2/DDP cells were treated with tanshinone  $II_A$  ( $IC_{50}$  5.32 mg/L) + cisplatin at different concentrations (0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 mg/L) for 48 h, and the cell proliferation inhibition rate was detected by CCK-8 method. The  $IC_{50}$  and reversion fold (RF) of two drug combinations were calculated. Hep-2/DDP cells in logarithmic growth phase were divided into control group, cisplatin group, tanshinone  $II_A$  + cisplatin group, and tanshinone  $II_A$  + cisplatin + IGF-1 group. The cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate were detected by CCK-8 method and Annexin V-FITC/PI double staining method, and the expression of Bcl-2, Bax, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt was detected by Western blotting. **Results** The  $IC_{50}$  of cisplatin on Hep-2 cells was 4.58 mg/L, the  $IC_{50}$  of cisplatin on Hep-2/DDP cells was 14.09 mg/L, and the RI was 3.08. The  $IC_{50}$  of tanshinone  $II_A$  on Hep-2 cells was 5.32 mg/L. The  $IC_{50}$  and RF of tanshinone  $II_A$  combined with cisplatin were 3.34 mg/L and 4.22, respectively. Compared with the control group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of Hep-2/DDP cells in cisplatin group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with cisplatin group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of Hep-2/DDP cells in tanshinone  $II_A$  + cisplatin group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with tanshinone  $II_A$  + cisplatin group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of Hep-2/DDP cells in tanshinone  $II_A$  + cisplatin + IGF-1 group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the expression level of Bcl-2 in Hep-2/DDP cells in cisplatin group was significantly decreased, while the expression levels of Bax, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, and Bax/Bcl-2 ratio were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with cisplatin group, the expression level of Bcl-2 in Hep-2/DDP cells in tanshinone  $II_A$  + cisplatin group was significantly decreased, and the expression levels of Bax, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, and Bax/Bcl-2 ratio were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with tanshinone  $II_A$  + cisplatin group, the expression level of Bcl-2 in Hep-2/DDP cells in tanshinone  $II_A$  + cisplatin + IGF-1 group was significantly increased, and the expression levels of Bax, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, and Bax/Bcl-2 ratio were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the expressions of p-PI3K and p-Akt and the phosphorylation of PI3K and Akt (p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt) in Hep-2/DDP cells in cisplatin group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with cisplatin group, the expressions of p-PI3K and p-Akt and the phosphorylation levels of PI3K and Akt in Hep-2/DDP cells in tanshinone  $II_A$  + cisplatin group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with tanshinone  $II_A$  + cisplatin group, the expressions of p-PI3K and p-Akt and the phosphorylation levels of PI3K and Akt in Hep-2/DDP cells in tanshinone  $II_A$  + cisplatin + IGF-1 group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Tanshinone  $II_A$  can reverse the cisplatin resistance of human laryngeal cancer cells, which mechanism may be related to inhibiting the activation of PI3K/Akt pathway and promoting the apoptosis of laryngeal cancer cells.

**Key words:** tanshinone  $II_A$ ; laryngeal cancer; cisplatin; PI3K/Akt pathway

我国喉癌发病率 0.58/万, 约占头颈部恶性肿瘤的 20%, 主要表现为咽喉异物感、声音嘶哑、吞咽困难、咳血、耳痛等症状<sup>[1]</sup>。大部分患者确诊时已处于中晚期, 只能采取以化疗为主的治疗方案。顺铂是喉癌化疗常用药物, 但喉癌细胞获得性耐药严重影响着其临床疗效, 是导致喉癌晚期患者预后差的重要因素。因此, 寻找低毒高效的顺铂耐药逆转剂以提高喉癌疗效至关重要。

丹参酮  $II_A$  是从唇形科植物丹参的根茎中提取的一种活性化合物, 目前临床上主要用于缺血性心脑血管疾病的治疗, 随着药理学研究的深入, 发现丹参酮  $II_A$  具有广泛的抗肿瘤活性<sup>[2]</sup>。磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 是调控细胞增殖与凋亡的关键信号通路<sup>[3]</sup>, 丹参酮  $II_A$  通过抑制 PI3K/Akt 通路能够抑制胆管癌细胞增殖<sup>[4]</sup>、诱导卵巢癌细胞

凋亡<sup>[5]</sup>、逆转非小细胞肺癌细胞顺铂耐药<sup>[6]</sup>。本研究旨在探讨丹参酮  $II_A$  对人喉癌细胞顺铂耐药的影响及相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

人喉癌 Hep-2 细胞由河北医科大学细胞生物学研究室惠赠。

### 1.2 药物与试剂

丹参酮  $II_A$  (质量分数  $\geq 95\%$ ) 购自中国食品药品鉴定研究院 (批号 110766-210429); 顺铂购自美国 Sigma 公司 (批号 MKBZ0848V); PI3K/Akt 信号通路激活剂胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 购自美国 Cell Signaling 公司 (批号 9208SC); DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素-链霉素购自美国 Gibco 公司 (批号 8130936、R001100、

10100152、15070-054); CCK-8 试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司 (批号 210413); Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自美国 BD 公司 (批号 556317); RIPA 裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒、IgG 二抗购自上海碧云天生物技术有限公司 (批号 P0013C、P0012、A0208); 蛋白提取试剂盒、超敏 ECL 发光试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司 (批号 WLA022、WLA015);  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Proteintech 公司 (批号 60008-1-Ig); B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司 (批号 sc-6905、sc-7480); 激活型半胱氨酸蛋白酶-3 (Cleaved Caspase-3)、Cleaved Caspase-9 抗体购自武汉三鹰生物有限公司 (批号 66470-2-Ig、66483-1-Ig); PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 抗体购自英国 Abcam 公司 (批号 ab32089、ab21304、ab38451、ab87902)。

### 1.3 主要仪器

Model371 型细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); Ts2 型显微镜 (日本 Nikon 公司); MB-530 型能酶标仪 (中国深圳市汇松科技发展有限公司); FACSCalibur 型流式细胞仪、Trans-Biot Turbo 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); DYCP-31DN 型电泳仪 (北京六一公司); Tanon5200 型化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 人喉癌顺铂耐药细胞(Hep-2/DDP)的构建** 参照赵运华等<sup>[7]</sup>报道的高浓度冲击联合浓度递增法诱导建立 Hep-2/DDP 细胞: Hep-2 细胞株经解冻复苏后, 接种于含 10% 胎牛血清、1% 双抗 (青霉素 - 链霉素) 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养, 取对数生长期 Hep-2 细胞, 经 0.5 mg/L 顺铂作用 24 h 后更换为不含顺铂的 DMEM 培养基, 培养至 Hep-2 细胞恢复正常生长后再加药, 反复诱导, 直至细胞可在 0.5 mg/L 顺铂中正常生长。依次用 1、2、4 mg/L 顺铂加压筛选, 重复上述操作步骤, 最终得到可在 4 mg/L 顺铂中正常生长的喉癌 Hep-2 细胞, 即 Hep-2/DDP 细胞。

**1.4.2 CCK-8 法检测不同浓度顺铂对 Hep-2 细胞和 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)、耐药指数 (RI)** 取对数生长期 Hep-2 细胞和 Hep-2/DDP 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后分别制备浓度 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液, 100 μL/孔加入 96 孔板, 设置 0 (对照)、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0

mg/L 顺铂组, 每组设置 12 个复孔。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养 24 h 后, 各组分别更换含有相应浓度药物的培养基继续培养 48 h, 20 μL/孔加入 CCK-8 试剂, 置于细胞培养箱中避光培养 4 h, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值, 分别计算顺铂 Hep-2 IC<sub>50</sub> 和顺铂 Hep-2/DDP IC<sub>50</sub>、RI。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}}$$

$$\text{RI} = \text{顺铂 Hep-2/DDP IC}_{50} / \text{顺铂 Hep-2 IC}_{50}$$

**1.4.3 CCK-8 法检测不同浓度丹参酮 II<sub>A</sub> 对 Hep-2 细胞增殖抑制率、IC<sub>50</sub>** 取对数生长期 Hep-2 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后分别制备浓度 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液, 100 μL/孔加入 96 孔板, 设置 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mg/L 丹参酮 II<sub>A</sub> 组, 每组设置 12 个复孔。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养 24 h 后, 各组分别更换含有相应浓度药物的培养基继续培养 48 h, 加入 CCK-8 试剂 20 μL/孔, 置于细胞培养箱中避光培养 4 h, 通过酶标仪检测 450 nm 处 A 值, 计算丹参酮 II<sub>A</sub> 对 Hep-2 细胞的 IC<sub>50</sub>, 以丹参酮 II<sub>A</sub> 对 Hep-2 细胞的 IC<sub>50</sub> 作为后续实验丹参酮 II<sub>A</sub> 的浓度。

**1.4.4 CCK-8 法检测丹参酮 II<sub>A</sub> + 不同浓度顺铂对 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、IC<sub>50</sub>、逆转倍数 (RF)** 取对数生长期 Hep-2/DDP 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后分别制备浓度 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液, 100 μL/孔加入 96 孔板, 设丹参酮 II<sub>A</sub> 5.32 mg/L + 不同浓度顺铂 (0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L) 组, 每组设置 12 个复孔。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养 24 h 后, 各组分别更换含有相应浓度药物的培养基继续培养 48 h, 加入 CCK-8 试剂 20 μL/孔, 置于细胞培养箱中避光培养 4 h, 通过酶标仪检测 450 nm 处 A 值, 计算增殖抑制率、联合 IC<sub>50</sub> 和 RF。

$$\text{RF} = \text{顺铂 Hep-2/DDP IC}_{50} / \text{联合 IC}_{50}$$

**1.4.5 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率** 取对数生长期 Hep-2/DDP 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后制备浓度 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液, 100 μL/孔加入 96 孔板, 同时设置对照组、顺铂 (顺铂 Hep-2 IC<sub>50</sub>) 组、丹参酮 II<sub>A</sub> (丹参酮 II<sub>A</sub> Hep-2 IC<sub>50</sub>) + 顺铂 (顺铂 Hep-2 IC<sub>50</sub>) 组、丹参酮 II<sub>A</sub> (丹参酮 II<sub>A</sub> Hep-2 IC<sub>50</sub>) + 顺铂 (顺铂 Hep-2 IC<sub>50</sub>) + IGF-1 (0.1 mg/L) 组<sup>[8]</sup>, 每组设 12 个复孔。置于细胞培养箱培养 24 h 后, 各组分别更换含有相应终浓度药物的培养基继续培养 48 h, 加入 CCK-8 试剂 20 μL/孔, 继续避光

培养 4 h 后, 通过酶标仪检测 450 nm 处 A 值, 计算增殖抑制率。

**1.4.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率** 取对数生长期 Hep-2/DDP 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后制备浓度  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液, 500  $\mu$ L/孔加入 6 孔板, 按照 1.4.5 项下分组和给药干预 48 h 后, 经 0.25% 不含 EDTA 胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液, 按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒操作说明, 5  $\mu$ L/孔加入 Annexin V-FITC 染液避光孵育 15 min, 5  $\mu$ L/孔加入 PI 染液避光孵育 10 min, 然后通过流式细胞仪观察细胞凋亡状况并计算凋亡率。

**1.4.7 Western blotting 法检测 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达** 取对数生长期 Hep-2/DDP 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后制备浓度  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液, 500  $\mu$ L/孔加入 6 孔板, 按照 1.4.5 项下分组和给药干预 48 h 后, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后收集细胞, 加入适量 RIPA 裂解液后冰上静置 30 min, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 (离心半径 8 cm) 10 min 提取总蛋白, BCA 法定量总蛋白浓度、沸水浴 10 min 使蛋白变性后, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白、转 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h 后, 滴加稀释后的目标蛋白抗体和  $\beta$ -actin (内参) 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育 12 h, 洗膜后滴加稀释后的二抗室温避光孵育 1.5 h, 洗膜后滴加超敏 ECL 化学发光试剂显影, 以目标蛋白条带与  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度比值作为目标蛋白相对表达量。

## 1.5 统计学方法

运用软件 SPSS 20.0 进行数据分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度顺铂对 Hep-2 细胞和 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、IC<sub>50</sub>、RI 的影响

由表 1 可知, 随着质量浓度的增加, 顺铂对 Hep-2 细胞和 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率显著升高, 且呈现一定的剂量相关性 ( $P < 0.05$ ), 顺铂 Hep-2 的 IC<sub>50</sub> 为 4.58 mg/L, 顺铂 Hep-2/DDP 的 IC<sub>50</sub> 为 14.09 mg/L, RI 为 3.08。

### 2.2 不同浓度丹参酮 II<sub>A</sub> 对 Hep-2 细胞增殖抑制率、IC<sub>50</sub> 的影响

由表 2 可知, 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 Hep-2 细胞增殖抑

表 1 不同浓度顺铂对 Hep-2 细胞和 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effects of different concentrations of cisplatin on proliferation inhibition rate of Hep-2 cells and HEP-2/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

顺铂质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	细胞增殖抑制率/%	
	Hep-2	Hep-2/DDP 细胞
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	9.41 ± 1.56*	7.92 ± 0.96*
2	30.83 ± 4.27*	25.84 ± 4.09*
4	48.15 ± 6.42*	36.18 ± 5.24*
8	61.40 ± 8.29*	44.26 ± 7.03*
16	71.18 ± 9.82*	53.49 ± 8.16*
32	77.62 ± 11.09*	60.82 ± 9.41*

与 0 mg·L<sup>-1</sup> 顺铂比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs 0 mg·L<sup>-1</sup> cisplatin

表 2 不同浓度丹参酮 II<sub>A</sub> 对 Hep-2 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effects of different concentrations of tanshinone II<sub>A</sub> on proliferation inhibition rate of HEP-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

丹参酮 II <sub>A</sub> 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	Hep-2 细胞增殖抑制率/%
0.0	0.00 ± 0.00
0.5	9.64 ± 1.22*
1.0	24.35 ± 4.17*
2.0	38.51 ± 5.24*
4.0	48.23 ± 6.09*
8.0	56.18 ± 7.64*
16.0	61.48 ± 9.07*

与 0.0 mg·L<sup>-1</sup> 丹参酮 II<sub>A</sub> 比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs 0.0 mg·L<sup>-1</sup> tanshinone II<sub>A</sub> group

率显著升高, 且呈现一定的剂量相关性 ( $P < 0.05$ ), 丹参酮 II<sub>A</sub> Hep-2 的 IC<sub>50</sub> 为 5.32 mg/L (作为后续实验丹参酮 II<sub>A</sub> 浓度)。

### 2.3 丹参酮 II<sub>A</sub> 联合不同浓度顺铂对 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、IC<sub>50</sub>、RF 的影响

由表 3 可知, 丹参酮 II<sub>A</sub> (5.32 mg/L) + 顺铂 (0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L) 组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性, 联合 IC<sub>50</sub> 为 3.34 mg/L, RF 为 4.22。

### 2.4 丹参酮 II<sub>A</sub> 联合顺铂及 IGF-1 对 Hep-2/DDP 细胞增殖和凋亡的影响

顺铂组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。与顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂 + IGF-1 组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 1、表 4。

表 3 丹参酮 II<sub>A</sub> (5.32 mg·L<sup>-1</sup>) + 不同浓度顺铂对 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effects of tanshinone II<sub>A</sub> (5.32 mg·L<sup>-1</sup>) + cisplatin at different concentrations on proliferation inhibition rate of Hep-2/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

丹参酮 II <sub>A</sub> 5.32 mg·L <sup>-1</sup> + 顺铂质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	细胞增殖抑制率/%
0	23.14 ± 3.86
1	34.98 ± 4.17*
2	44.02 ± 5.83*
4	52.57 ± 7.82*
8	60.85 ± 9.04*
16	66.13 ± 11.29*
32	72.08 ± 11.65*

与丹参酮 II<sub>A</sub> 5.32 mg·L<sup>-1</sup> + 0 mg·L<sup>-1</sup> 顺铂比较: \*P < 0.05  
\*P < 0.05 vs tanshinone II<sub>A</sub> 5.32 mg·L<sup>-1</sup> + 0 mg·L<sup>-1</sup> cisplatin

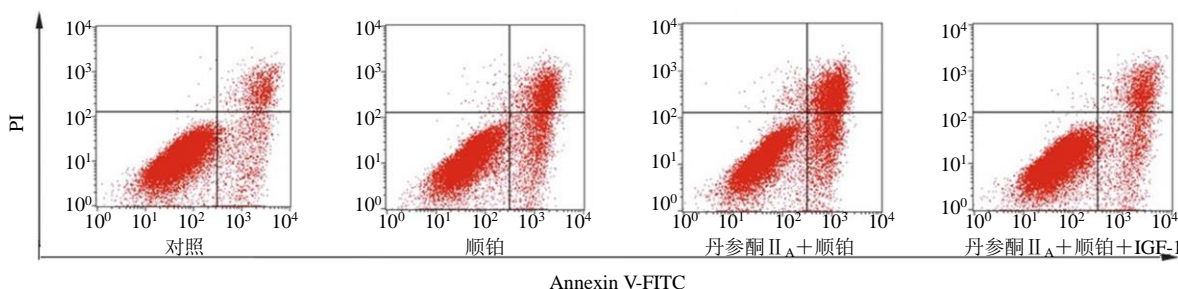


图 1 各组 Hep-2/DDP 细胞凋亡状况  
Fig. 1 Apoptosis of Hep-2/DDP cells in each group

表 4 各组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率、凋亡率的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 Comparison of proliferation inhibition rate and apoptosis rate of Hep-2/DDP cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(mg·L <sup>-1</sup> )	增殖抑制率/%	凋亡率/%
对照	—	0.00 ± 0.00	7.96 ± 1.10
顺铂	4.58	23.35 ± 3.92**	31.82 ± 4.51**
丹参酮 II <sub>A</sub> + 顺铂	5.32 + 4.58	50.18 ± 7.54#	54.37 ± 7.83#
丹参酮 II <sub>A</sub> + 顺铂 + IGF-1	5.32 + 4.58 + 0.1	29.06 ± 4.81@	13.94 ± 1.76@

与对照组比较: \*\*P < 0.01; 与顺铂组比较: #P < 0.05; 与丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组比较: @P < 0.05  
\*\*P < 0.01 vs control group; #P < 0.05 vs cisplatin group; @P < 0.05 vs tanshinone II<sub>A</sub> + cisplatin group

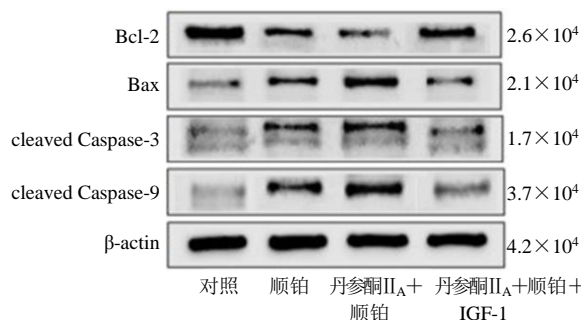


图 2 各组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达  
Fig. 2 Expression of Bcl-2, Bax, Cleaved Caspase-3, and Cleaved Caspase-9 of Hep-2/DDP cells in each group

### 2.5 丹参酮 II<sub>A</sub> 联合顺铂及 IGF-1 对 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达的影响

顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2 表达量显著低于对照组, Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量和 Bax/Bcl-2 值显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。与顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2 表达量显著降低, Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量和 Bax/Bcl-2 值显著升高 ( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂 + IGF-1 组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2 表达量显著升高, Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量和 Bax/Bcl-2 值显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 5。

### 2.6 各组 Hep-2/DDP 细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响

顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 p-PI3K、p-Akt 表达及 PI3K、Akt 磷酸化 (p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt) 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组 Hep-2/DDP 细胞 p-PI3K、p-Akt 表达量及 PI3K、Akt 磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> + 顺铂 + IGF-1 组 Hep-2/DDP 细胞 p-PI3K、p-Akt 表达及 PI3K、Akt 磷酸化水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3、表 6。

### 3 讨论

喉癌是临床上较常见的头颈部恶性肿瘤之一,

表 5 各组 Hep-2/DDP 细胞 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 值的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  
Table 5 Comparison of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 protein expression and Bax/Bcl-2 ratio of Hep-2/DDP cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(mg·L <sup>-1</sup> )	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bax/Bcl-2	cleaved Caspase-3/ β-actin	cleaved Caspase-9/ β-actin
对照	—	1.06±0.19	0.07±0.02	0.07±0.02	0.09±0.03	0.04±0.01
顺铂	4.58	0.15±0.03**	0.17±0.03**	1.13±0.21**	0.23±0.05**	0.42±0.08**
丹参酮 II <sub>A</sub> +顺铂	5.32+4.58	0.09±0.02#	0.45±0.08#	5.02±0.86#	0.68±0.13#	0.95±0.17#
丹参酮 II <sub>A</sub> +顺铂+IGF-1	5.32+4.58+0.1	0.78±0.14 <sup>ⓐ</sup>	0.10±0.02 <sup>ⓐ</sup>	0.13±0.03 <sup>ⓐ</sup>	0.12±0.03 <sup>ⓐ</sup>	0.11±0.03 <sup>ⓐ</sup>

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$ ; 与丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂组比较: <sup>ⓐ</sup> $P < 0.05$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs cisplatin group; <sup>ⓐ</sup> $P < 0.05$  vs tanshinone II<sub>A</sub> + cisplatin group

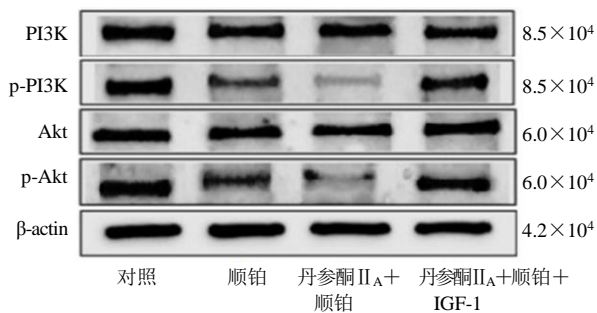


图 3 各组 Hep-2/DDP 细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达

Fig. 3 Expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt proteins of Hep-2/DDP cells in each group

表 6 各组 Hep-2/DDP 细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 6 Comparison of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt protein expression and PI3K, Akt phosphorylation levels of Hep-2/DDP cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(mg·L <sup>-1</sup> )	PI3K/β-actin	p-PI3K/β-actin	p-PI3K/PI3K	Akt/β-actin	p-Akt/β-actin	p-Akt/Akt
对照	—	1.26±0.24	1.07±0.20	0.85±0.16	1.31±0.25	1.20±0.23	0.92±0.18
顺铂	4.58	1.20±0.22	0.24±0.05**	0.21±0.04**	1.18±0.21	0.34±0.08**	0.29±0.06**
丹参酮 II <sub>A</sub> +顺铂	5.32+4.58	1.19±0.25	0.05±0.01#	0.04±0.01#	1.22±0.23	0.09±0.02#	0.08±0.02#
丹参酮 II <sub>A</sub> +顺铂+IGF-1	5.32+4.58+0.1	1.21±0.23	0.96±0.17 <sup>ⓐ</sup>	0.79±0.13 <sup>ⓐ</sup>	1.34±0.27	0.83±0.15 <sup>ⓐ</sup>	0.62±0.11 <sup>ⓐ</sup>

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$ ; 与丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂组比较: <sup>ⓐ</sup> $P < 0.05$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs cisplatin group; <sup>ⓐ</sup> $P < 0.05$  vs tanshinone II<sub>A</sub> + cisplatin group

散结等疗法<sup>[12]</sup>。中药丹参首载于《神农本草经》，为我国药典收录品种，具有活血化瘀、凉血消痈、通经止痛等功效<sup>[13]</sup>。

丹参酮 II<sub>A</sub> 是其有效成分之一，其化学结构属于脂溶性二萜醌类化合物，具有较为广泛的抗肿瘤活性，已证实丹参酮 II<sub>A</sub> 能够逆转人非小细胞肺癌细胞顺铂耐药<sup>[6]</sup>、逆转人乳腺癌细胞和人胃癌细胞阿霉素耐药<sup>[14-15]</sup>等。本研究结果显示，丹参酮 II<sub>A</sub> 能够明显逆转人喉癌细胞顺铂耐药 (RF 为 4.22)；与顺铂组比较，丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂能够明显提高 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率，而丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂+IGF-1 组 Hep-2/DDP 细胞增殖抑制率明显

约占全身恶性肿瘤的 2.1%，其中鳞状细胞癌占比超过 95%<sup>[9]</sup>。喉癌早期治疗主要采取外科手术或联合放化疗的综合方案，能够有效改善患者生活质量并延长生存期。但晚期患者预后较差，整体 5 年生存率不足 50%，其中合并咽瘘、肺部感染、呼吸困难等并发症晚期患者 5 年生存率不足 20%<sup>[10-11]</sup>。喉癌细胞获得性耐药所致化疗敏感性降低是其术后复发和疾病进展的重要原因，所以探索喉癌化疗耐药逆转剂具有重要意义。

喉癌可归属中医“喉疔”“喉瘤”“喉百叶”等范畴，气阴两虚、气滞血瘀、痰浊凝聚、痰瘀互结是其主要病机，宜采用养阴益气、活血化瘀、化痰

低于丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂组。说明丹参酮 II<sub>A</sub> 对人喉癌细胞顺铂耐药的逆转作用可能与抑制 PI3K/Akt 通路有关。

顺铂为喉癌化疗一线用药，诱导细胞凋亡是其抗肿瘤作用的主要机制之一。Bcl-2 家族蛋白对细胞凋亡过程具有重要调控作用，其中 Bax 能够破坏线粒体膜通透性使细胞色素 C (Cyt C) 释放进入胞浆，Cyt C 能够剪切活化 Caspase-9，cleaved Caspase-9 则能够诱导 Caspase-3 活化，cleaved Caspase-3 切割破坏细胞膜结构蛋白、核蛋白、DNA、核酸等生物大分子结构，诱发细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。表达于线粒体膜的 Bcl-2 能够与 Bax 形成二聚体拮抗 Bax 促凋亡作



用, 所以 Bax/Bcl-2 值能够反映二者对细胞凋亡的调控作用<sup>[18]</sup>。PI3K/Akt 信号通路参与调控细胞增殖、凋亡等过程, 与肿瘤进展密切相关, Akt 为 PI3K 的下游效应分子, 被 p-PI3K 诱导磷酸化活化, p-Akt 能够下调具有促凋亡作用的 GSK-3 $\beta$  表达, 诱导 cleaved Caspase-3 磷酸化失活<sup>[19-20]</sup>。本研究结果显示, 与顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂组能够明显升高 Hep-2/DDP 细胞凋亡率, 下调 Bcl-2 表达并上调 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达, 提高 Bax/Bcl-2 比值, 并降低 PI3K、Akt 磷酸化水平; 与丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub>+顺铂+IGF-1 组对 Hep-2/DDP 细胞凋亡和相关蛋白表达的调控作用明显减弱。提示丹参酮 II<sub>A</sub> 对人喉癌细胞顺铂耐药的逆转作用可能与抑制 PI3K/Akt 通路而促进细胞凋亡有关。

综上所述, 丹参酮 II<sub>A</sub> 可逆转人喉癌细胞顺铂耐药, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 通路活化而促进喉癌细胞凋亡有关。本研究结果提示了丹参酮 II<sub>A</sub> 联合顺铂可提高喉癌顺铂化疗效果, 为临床治疗喉癌提供了新的思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] 金辉, 杨丽萍, 刘莉, 等. 老年喉癌组织 miR-362-3p、miR-217 表达变化及其与肿瘤恶性程度相关因子的关联性 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(6): 1355-1358.

[2] 乔利, 韩茂森, 高世杰, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 的抗肿瘤药理作用及其纳米给药系统研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(11): 3919-3927.

[3] Jiang N, Dai Q, Su X, *et al.* Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(6): 4587-4629.

[4] Liu H, Liu C, Wang M, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> affects the malignant growth of cholangiocarcinoma cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 19268.

[5] Zhang X, Zhou Y, Gu Y E. Tanshinone II<sub>A</sub> induces apoptosis of ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo* through attenuation of PI3K/AKT/JNK signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 1896-1902.

[6] Liao X Z, Gao Y, Huang S, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> combined with cisplatin synergistically inhibits non-small-

cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* via down-regulating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling pathway [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(9): 2298-2309.

[7] 赵运华, 陆海涛, 陈宝刚, 等. 热疗对人喉癌 Hep-2 顺铂耐药细胞株生物学行为的影响 [J]. 肿瘤研究与临床, 2022, 34(1): 26-32.

[8] 刘炜, 于锋, 周毅波, 等. 原花青素介导的自噬流对喉癌细胞增殖影响及其机制探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(20): 1413-1421.

[9] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[10] 邹庆云, 刘映岐, 查旭东, 等. 174 例喉癌患者手术预后及影响因素分析 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2020, 26(4): 421-425.

[11] 童巧玲, 沈志森, 应焱燕, 等. 喉癌患者手术治疗的远期疗效及影响因素分析 [J]. 浙江医学, 2018, 40(23): 2521-2524.

[12] 伍映芳, 陈彩凤, 李云英. 151 例喉癌患者的中医证型聚类分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(4): 684-687.

[13] 夏静, 梁惠瑜, 黄勇, 等. 不同种源丹参质量比较研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(4): 5-7.

[14] 宁玉明, 潘一帆, 李范珠. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对阿霉素耐药人乳腺癌细胞的多药耐药逆转作用及机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6890-6896.

[15] 刘源, 倪渐凤芳, 刘丽娜, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 抑制胃癌细胞的阿霉素耐药 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(12): 2208-2214.

[16] 张静玲, 王克利, 闫双宝. 槲皮素对骨肉瘤细胞 MG-63 细胞色素 C、Bcl-2 及 bax 表达影响 [J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(9): 1629-1631.

[17] Wang H, Zhu J, Jiang L, *et al.* Mechanism of heshouwuyin inhibiting the Cyt c/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 pathway in spermatogenic cell apoptosis [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 180.

[18] 张学亚, 郭熙哲, 吴诗馨. 2-甲氧基雌二醇上调 Bax/BCL-2 比例诱导淋巴瘤 Raji 细胞凋亡的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(2): 489-493.

[19] 李红, 董玮, 侯杰, 等. 黄芩苷调控 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  途径对人结肠癌细胞生物学行为的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(3): 241-245.

[20] 刘兰, 张东雪, 朱荣芳, 等. 高磷通过 SET8-shRNA 调控 AKT/Caspase-3 通路促进血管平滑肌细胞凋亡 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(10): 1312-1318.

[责任编辑 高源]