·实验研究·

丹参酮 II_A 通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对食管癌细胞放疗敏感性的影响

张倩，刘艳娇，贾晓龙，何龙英，史志杰，马丽，张楠楠，李晓鹏*
邯郸市第一医院，河北 邯郸　056002

摘　要：目的　研究丹参酮 II_A 对人食管癌细胞放疗敏感性的影响，并基于磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（PI3K/Akt/mTOR）信号通路探讨其潜在机制。**方法**　以人食管癌 Eca-109 细胞为受试细胞，分别采用不同浓度丹参酮 II_A 和不同放射剂量处理 Eca-109 细胞，48 h 后 MTT 法检测细胞增殖活力，计算丹参酮 II_A 半数抑制浓度（IC_{50}）和放射的 IC_{50}，分别作为后续实验丹参酮 II_A 浓度和放射剂量。取对数生长期 Eca-109 细胞，设对照组、丹参酮 II_A 组、放射组、丹参酮 II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋PI3K 抑制剂（LY294002）组。通过平板克隆实验、MTT 法、流式细胞术、荧光质粒转染法检测细胞克隆形成能力、增殖活力、凋亡率和自噬状况，RT-PCR、Western blotting 法检测细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达。**结果**　丹参酮ⅡA 和放射对人食管癌 Eca-109 细胞增殖活力的抑制作用均呈现剂量相关性，丹参酮 II_A IC_{50} 为 8.75 mmol/L，放射量 IC_{50} 为 4.63 Gy。与对照组相比，丹参酮 II_A 组、放射组、丹参酮 II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组细胞克隆形成能力和增殖活力明显降低，凋亡率和自噬体数量明显升高（P＜0.05）；*PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 和蛋白表达量明显降低（P＜0.05）；Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、LC3-I、LC3-II 蛋白表达量及 Bax/Bcl-2、Cleaved Caspase-3/Caspase-3、LC3-II/LC3-I 明显升高（P＜0.05）。与丹参酮 II_A 组或放射组相比，丹参酮 II_A＋放射组和丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组对各检测指标的调控作用明显增强（P＜0.05）。与丹参酮 II_A＋放射组相比，丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组对各指标的调控作用明显增强（P＜0.05）。**结论**　丹参酮 II_A 可能通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，抑制细胞增殖并促进其凋亡与自噬，进而增强人食管癌细胞放疗敏感性。

关键词：丹参酮 II_A；食管癌；放疗；磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路；凋亡；自噬
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2023)11 - 2645 - 10
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.001

Effect of tanshinone II_A on radiotherapy sensitivity of esophageal cancer cells by regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

ZHANG Qian, LIU Yan-jiao, JIA Xiao-long, HE Long-ying, SHI Zhi-jie, MA Li, ZHANG Nan-nan, LI Xiao-peng
Handan First Hospital, Handan 056002, China

Abstract: Objective To investigate the effect of tanshinone II_A on radiotherapy sensitivity of human esophageal carcinoma cells, and explore its potential mechanism based on the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Methods**　The human esophageal cancer Eca-109 cells was used as test cells, which were treated with different concentrations of tanshinone II_A and different radiation doses respectively. 48 h later, the cell proliferation activity was detected by MTT method, the half-inhibitory concentration of IC_{50} tanshinone II_A (as the concentration of tanshinone II_A for follow-up experiments) and IC_{50} radiation (as the radiation dose for follow-up experiments) were calculated respectively. Take the Eca-109 cells in logarithmic growth period and set blank group, tanshinone II_A group, radiation group, tanshinone II_A + radiation group, tanshinone II_A + radiation + PI3K inhibitor (LY294002) group. The cloning ability, proliferation activity, apoptosis rate, and autophagy were detected by plate cloning assay, MTT assay, flow cytometry or fluorescent plasmid transfection. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related mRNA and protein expression were detected by RT-PCR or Western blotting method. **Results**　Both tanshinone II_A and radiation showed dose-dependent inhibitory effects on the proliferation of human

收稿日期：2023-09-16
基金项目：邯郸市科学技术研究与发展计划项目（22422083056ZC）
作者简介：张倩，女，硕士，主治医师，主要从事肿瘤学诊治及科研工作。E-mail: 692126537@qq.com
***通信作者：**李晓鹏　E-mail: fl08858@163.com

esophageal cancer Eca-109 cells. The IC_{50} tanshinone II_A was 8.75 mmol/L, and the IC_{50} radiation was 4.63 Gy. Compared with the control group, the clonogenesis ability and proliferation activity of tanshinone II_A group, radiation group, tanshinone II_A + radiation group and Tanshinone II_A + radiation + LY294002 group were significantly decreased, the apoptosis rate and autophagosome number were significantly increased ($P < 0.05$). The mRNA expressions of *PI3K, Akt, mTOR* were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein expression of PI3K, Akt, mTOR were significantly decreased. The protein expression of Bcl-2, Bax, Cleaved Caspase-3, LC3-I, LC3-II, and the expression ratios of Bax/Bcl-2, Cleaved Caspase-3/Caspase-3, LC3-II/LC3-I were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with tanshinone II_A group or radiation group, the regulation effect of tanshinone II_A + radiation group and tanshinone II_A + radiation + LY294002 group on the detection indexes was significantly enhanced ($P < 0.05$). Compared with tanshinone II_A + radiation group, the regulation effect of tanshinone II_A + radiation + LY294002 group was significantly enhanced ($P < 0.05$). **Conclusions** Tanshinone II_A may inhibit cell proliferation, promote apoptosis and autophagy by down-regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, thus enhancing the radiotherapy sensitivity of human esophageal cancer cells.

Key words: tanshinone II_A; esophageal cancer; radiotherapy; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; apoptosis; autophagy

食管癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一，全球每年新发病例超过 60 万例，其中约 53%的患者出现在我国，食管癌病理分型主要有鳞状细胞癌和腺癌两种，我国以鳞状细胞癌为主[1]。虽然近年来手术、放化疗技术以及生物免疫疗法等新兴手段不断发展，但食管癌患者 5 年生存率仍不足 30%[2-3]。放疗是临床治疗中晚期食管癌及术后辅助治疗的重要手段，主要作用机制为抑制肿瘤细胞增殖和促进其凋亡与自噬，放疗敏感性降低是影响食管癌放疗效果、导致复发转移的关键因素[4-6]。因此，寻找能够增强食管癌细胞放疗敏感性的新型药物，对改善食管癌患者预后具有重要意义。

丹参酮 II_A 是由唇形科植物丹参的根皮部提取的一种共轭醌、酮类化合物，具有较好的抗炎抑菌、抗氧化等药理作用，目前主要用于缺血性心血管疾病的治疗。随着药理学研究的不断深入，丹参酮 II_A 抗肿瘤活性逐渐得到关注[7]。磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（PI3K/Akt/mTOR）通路在细胞增殖、凋亡与自噬的调控机制中发挥着重要的信号传导作用[8]。研究证实，丹参酮 II_A 通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可抑制胆管癌细胞、胶质瘤细胞、喉癌细胞增殖并促进其凋亡与自噬[9-11]，可明显改善喉癌细胞顺铂化疗敏感性[12]。丹参酮 II_A 能够通过促进口腔鳞状细胞癌自噬而增强其放疗敏感性[13]。本实验以人食管癌 Eca-109 细胞作为受试细胞，研究丹参酮 II_A 对人食管癌细胞放疗敏感性的影响，并基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人食管鳞状细胞癌 Eca-109 细胞系购自青旗（上海）生物技术发展有限公司（货号 BFN60808845）。

1.2 主要试剂与仪器

丹参酮 II_A（质量分数≥98%，上海源叶生物科技有限公司，货号 B20257）；PI3K 抑制剂 2-吗啉代-8-苯基色酮（LY294002）、RPMI-1640 培养基、RIPA 裂解液、通用 RT-PCR 反转录试剂盒（北京索莱宝生物技术公司，货号 IL0270、90023、R0010、RP1100）；胎牛血清、GFP-LC3 荧光质粒、细胞转染试剂盒、Trizol 总 RNA 抽提试剂（上海碧云天生物科技公司，货号 C0236、C3006、C0511、R0016）；胰蛋白酶、MTT 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、BCA 法蛋白定量试剂盒、结晶紫（大连美仑生物技术有限公司，货号分别为 MB2925-1、MA0198、MA0220、MA0082、MB4788）；PI3K、Akt、mTOR、半胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）、激活型 Caspase-3（cleaved Caspase-3）、自噬微管相关蛋白 1 轻链 3（LC3）抗体（英国 Abcam 公司，货号 ab18097、ab38451、ab32028、ab50119、ab50132、ab47286）；B 细胞淋巴瘤-2（Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体和 IgG 二抗、ECL 显色液（北京博奥森生物技术公司，货号 bs-33411R、bs-0127R、bs-41373R、bs-40295G、C05-07004）。

2100EX 型直线加速器（美国 Varian 公司）；3111 型 CO2 细胞培养箱（美国热电公司）；HT 型酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；CytoFLEX 型流式细胞仪（美国 Beckman 公司）；DM1000 型荧光显微镜（德国 Leica 公司）；Quant Studio 5 型 RT-PCR 仪（美国 ABI 公司）；24KS 型电泳仪（北京六一公司）；TE22 型转膜仪（美国 Hoefer 公司）。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人食管鳞状细胞癌 Eca-109 细胞接种于含 10%胎牛血清、双抗（100 U/mL 青霉素

和 100 μg/mL 链霉素）的 RPMI-1640 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中进行培养。隔天更换 1 次培养基，待细胞融合至约 90%时按 1∶3 传代培养。

1.3.2　MTT 法测定不同浓度丹参酮 II_A 对 Eca-109 细胞增殖活力的影响　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化处理后离心收集细胞，5×10^3 个/孔接种至 96 孔板，分别加入含有终浓度 0、2、4、8、16、32 μmol/L 丹参酮 II_A 的培养基，继续培养 48 h 后，20 μL/孔加入质量浓度 5 mg/mL 的 MTT 溶液，继续培养 4 h，弃上清液，200 μL/孔加入 DMSO 混匀后，通过酶标仪检测 490 nm 处吸光度（*A*）值，计算丹参酮 II_A 半数抑制浓度（IC_{50}）并作为后续实验丹参酮 II_A 浓度，独立重复 3 次实验。

细胞增值率＝$A_{\text{丹参酮 IIA}}/A_{\text{丹参酮 IIA 0 μmol/L}}$

1.3.3　MTT 法测定不同放射剂量对 Eca-109 细胞增殖活力的影响　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化处理后离心收集细胞，5×10^3 个/孔接种至 96 孔板，培养 48 h 后，通过直线加速器分别给予不同放射剂量（0、1、2、4、6、8 Gy，剂量率均为 1 Gy/min，即放射时间分别为 0、1、2、4、6、8 min）进行处理，20 μL/孔加入质量浓度 5 mg/mL 的 MTT 溶液，继续培养 4 h，弃上清液，200 μL/孔加入 DMSO 混匀后，通过酶标仪检测 490 nm 处 *A* 值，计算放射 IC_{50} 并作为后续实验放射剂量，独立重复 3 次实验。

细胞增殖率＝$A_{\text{放射}}/A_{\text{放射剂量 0 Gy}}$

1.3.4　平板克隆实验检测细胞克隆形成能力　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化处理后离心收集细胞，200 个/孔接种至 6 孔板，设对照组、丹参酮 II_A 组、放射组、丹参酮 II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组。对照组加常规培养基培养 48 h；丹参酮 II_A 组加入含丹参酮 II_A（终浓度为丹参酮 II_A 的 IC_{50}，经前期实验计算 IC_{50} 为 8.75 μmol/L）的培养基培养 48 h；放射组加常规培养基培养 48 h 后放射处理（放射剂量 IC_{50} 进行放射，经前期实验计算为 4.63 Gy，剂量率为 1 Gy/min，即放射时间为 4.63 min）；丹参酮 II_A＋放射组加入含丹参酮 II_A（终浓度 8.75 μmol/L）的培养基培养 48 h 后放射处理（放射剂量 4.63 Gy）；丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组加入含丹参酮 II_A（终浓度 8.75 μmol/L）和 LY294002（终浓度 25 nmol/L）[14]的培养基培养 48 h 后放射处理（放射剂量 4.63 Gy）。继续培养至肉眼可见克隆集落时终止培养，甲醛固定 15 min、结晶紫染色 30 min，PBS 溶液清洗后，显微镜下观察并计数＞50 个细胞的克隆形成数目。独立重复 3 次实验。

1.3.5　MTT 法检测细胞增殖活力　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化后离心收集细胞，5×10^3 个/孔接种至 96 孔板，依照 1.3.4 项下分组及各组分别进行干预后，20 μL/孔加入质量浓度 5 mg/mL 的 MTT 溶液，继续培养 4 h，弃上清液，200 μL/孔加入 DMSO 混匀后，通过酶标仪检测 490 nm 处吸光度（*A*）值，独立重复 3 次实验。

细胞增殖活力＝$A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$

1.3.6　流式细胞术检测细胞凋亡率　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化后离心收集细胞，1×10^5 个/孔接种至 6 孔板，依照 1.3.4 项下分组及各组分别进行干预后，应用不含 EDTA 胰蛋白酶消化并离心收集细胞、加入结合液重悬细胞，依次加入 Annexin V-FITC 染液（5 μL/孔）和 PI 染液（5 μL/孔）、混匀后室温避光孵育 15 min，通过流式细胞仪分析细胞凋亡率。独立重复 3 次实验。

1.3.7　荧光质粒转染法检测细胞自噬状况　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化后离心收集细胞，1×10^5 个/孔接种至 6 孔板，依照 1.3.4 项下分组及各组分别进行干预后，更换常规培养基，每孔逐滴缓慢加入“4 μg GFP-LC3＋10 μL 转染试剂＋500 μL RPMI-1640 培养基”混合液，置于细胞培养箱避光培养 5 h 后更换常规培养基继续培养 48 h，荧光显微镜下观察自噬体并计数自噬体数目，独立重复 3 次实验。

1.3.8　RT-PCR 法检测细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关 mRNA 表达　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化后离心收集细胞，1×10^5 个/孔接种至 6 孔板，依照 1.3.4 项下分组及各组分别进行干预后，胰蛋白酶消化后收集细胞，Trizol 法提取总 RNA，按照试剂盒操作说明，将 RNA 反转录为 cDNA 后行 RT-PCR 扩增反应，扩增条件：95 ℃预变性 10 min，1 个循环；95 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s，40 个循环。以 GAPDH 作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目标基因相对表达量。引物序列由上海擎科生物科技公司设计与合成，见表 1。独立重复 3 次实验。

1.3.9　Western blotting 法检测细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达　取对数生长期 Eca-109 细胞，胰蛋白酶消化后离心收集细胞，1×10^5

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列		扩增长度/bp
	上游（5'-3'）	下游（5'-3'）	
PI3K	AAGCCACGGAACAGCACTCAG	GGAACGAGAGCGAAGTCTTGGA	109
Akt	AGCGACGTGGCTATTGTGAAG	GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT	215
mTOR	CATCGTGCTGTTGGGTGA	GTCCATCTTCTTGTCGAGGC	273
GAPDH	ATGGGTGTGAACCACGAGA	CAGGGATGATGTTCTGGGCA	229

个/孔接种至 6 孔板，依照 1.3.4 项下分组及各组分别进行干预后，胰蛋白酶消化后收集细胞，RIPA 法提取总蛋白，BCA 法检测蛋白含量，95 ℃水浴 10 min 使蛋白变性，取每组 30 μg 总蛋白等量上样，10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白（80 V、30 min，120 V、60 min）、转 PVDF 膜（300 mA、120 min）、5%蛋白封闭液室温封闭 1.5 h，加一抗稀释液 PI3K（1∶1 000）、Akt（1∶1 000）、mTOR（1∶1 000）、Bcl-2（1∶800）、Bax（1∶800）、Caspase-3（1∶1 000）、cleaved Caspase-3（1∶1 000）、LC3（1∶800）、GAPDH（1∶2 000）4 ℃孵育过夜，PBS 洗膜后加二抗稀释液 IgG（1∶2 000）室温孵育 1.5 h，PBS 洗膜后加 ECL 显色，通过 Image J 软件分析蛋白条带灰度值，以 GAPDH 为内参计算目标蛋白相对表达量。独立重复 3 次实验。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 不同浓度丹参酮 II_A 和不同放射剂量对 Eca-109 细胞增殖活力的影响

与丹参酮 II_A 0 μmol/L 组相比，丹参酮 II_A 2、4、8、16、32 μmol/L 组 Eca-109 细胞增殖活力呈剂量相关性降低；经计算，丹参酮 II_A 对 Eca-109 细胞 IC_{50} 为 8.75 μmol/L（作为后续实验丹参酮 II_A 浓度）。与放射剂量 0 Gy 组相比，放射剂量 1、2、4、6、8 Gy 组 Eca-109 细胞增殖活力呈剂量相关性降低；经计算，放射对 Eca-109 细胞 IC_{50} 为 4.63 Gy（作为后续实验放射剂量），见图 1。

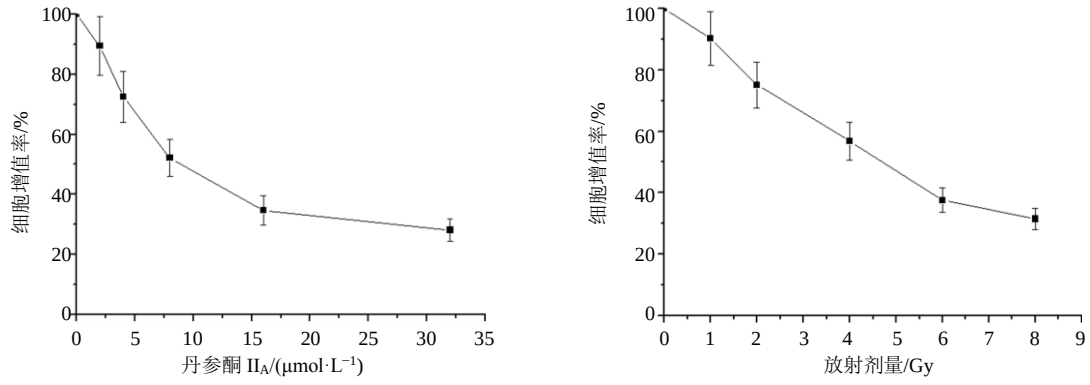


图 1 不同浓度丹参酮 II_A 和不同放射剂量对 Eca-109 细胞增殖活力的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 1 Effect of different concentrations of tanshinone II_A and different radiation doses on the proliferative activity of Eca-109 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.2 丹参酮 II_A 对 Eca-109 细胞克隆形成能力、增殖活力的影响

与对照组相比，丹参酮 II_A 组、放射组、丹参酮 II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 Eca-109 细胞克隆形成数目、增殖活力均明显降低（P＜0.05）。与丹参酮 II_A 组或放射组相比，丹参酮 II_A＋放射组和丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组细胞克隆形成数目、增殖活力均明显降低（P＜0.05）。与丹参酮 II_A＋放射组相比，丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组细胞克隆形成数目、增殖活力均明显降低（P＜0.05），见图 2、3。

2.3 丹参酮 II_A 对 Eca-109 细胞凋亡率的影响

与对照组相比，丹参酮 II_A 组、放射组、丹参酮 II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 Eca-

109 的细胞凋亡率明显升高（$P<0.05$）。与丹参酮 IIA 组或放射组相比，丹参酮 IIA＋放射组和丹参酮 IIA＋放射＋LY294002 组凋亡率明显升高（$P<0.05$）。与丹参酮 IIA＋放射组相比，丹参酮 IIA＋放射＋LY294002 组凋亡率明显升高（$P<0.05$），见图 4、5。

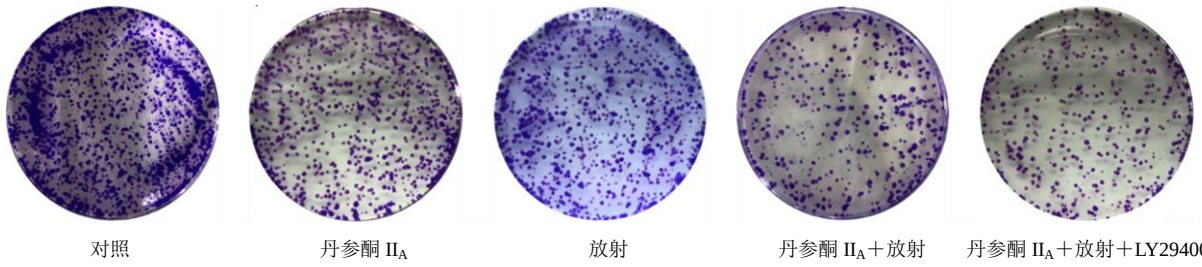
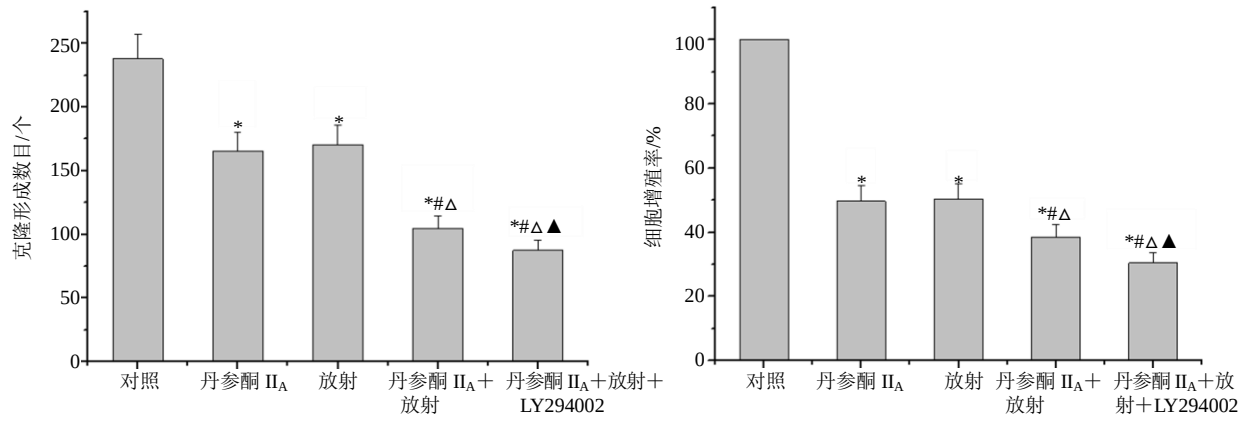


图 2　各组 Eca-109 细胞克隆形成能力（平板克隆实验，×40）

Fig. 2　Clonal formation ability of Eca-109 cells in each group (plate cloning experiment, ×40)



与对照组比较：$^{*}P<0.05$；与丹参酮 IIA 组比较：$^{\#}P<0.05$；与放射组比较：$^{\triangle}P<0.05$；与丹参酮 IIA＋放射组比较：$^{\blacktriangle}P<0.05$

$^{*}P<0.05$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$ *vs* tanshinone IIA group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* radiation group; $^{\blacktriangle}P<0.05$ *vs* tanshinone IIA + radiation group

图 3　各组 Eca-109 细胞克隆形成数目、增殖活力的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 3　Comparison of clonal formation number and proliferation activity of Eca-109 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

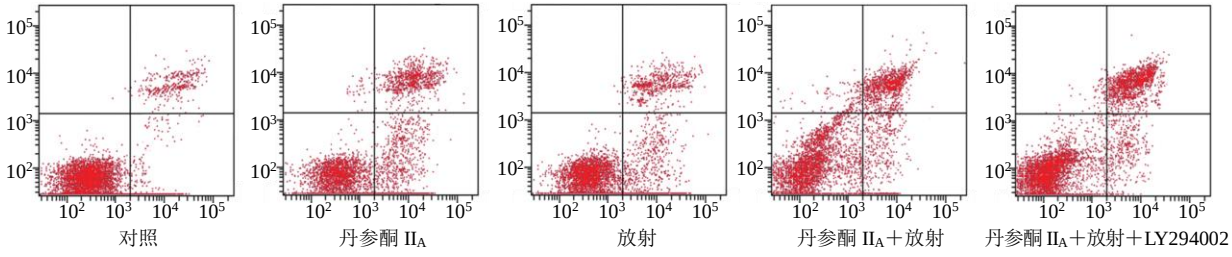


图 4　各组 Eca-109 细胞凋亡状况（流式细胞术）

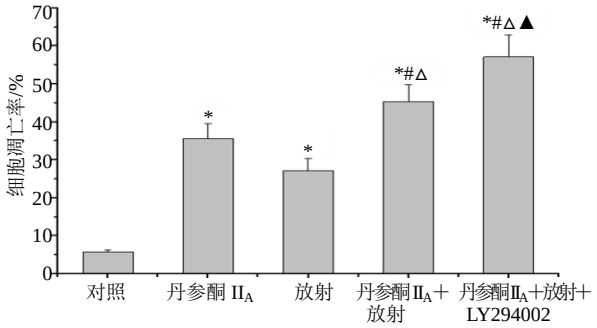
Fig. 4　Apoptosis of Eca-109 cells in each group (flow cytometry)

2.4　丹参酮 IIA 对 Eca-109 细胞自噬状况的影响

与对照组相比，丹参酮 IIA 组、放射组、丹参酮 IIA＋放射组、丹参酮 IIA＋放射＋LY294002 组细胞中自噬体数目明显升高（$P<0.05$）。与丹参酮 IIA 组或放射组相比，丹参酮 IIA＋放射组和丹参酮 IIA＋放射＋LY294002 组自噬体数目明显升高（$P<0.05$）。与丹参酮 IIA＋放射组相比，丹参酮 IIA＋放射＋LY294002 组自噬体数目明显升高（$P<0.05$）。见图 6、7。

2.5　丹参酮 IIA 对 Eca-109 细胞 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 表达量的影响

与对照组相比，丹参酮 IIA 组、放射组、丹参酮



与对照组比较：*P<0.05；与丹参酮 II_A 组比较：#P<0.05；与放射组比较：△P<0.05；与丹参酮 II_A＋放射组比较：▲P<0.05

*P < 0.05 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* tanshinone II_A group; △P < 0.05 *vs* radiation group; ▲P < 0.05 *vs* tanshinone II_A + radiation group

图 5 各组 Eca-109 细胞凋亡率的比较（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 5 Comparison of apoptosis rate of Eca-109 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 Eca-109 细胞 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 表达量明显降低（P<0.05）。与丹参酮 II_A 组或放射组相比，丹参酮 II_A＋放射组和丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 表达量明显降低（P<0.05）。与丹参酮 II_A＋放射组相比，丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 表达量明显降低（P<0.05），见图 8。

2.6 丹参酮 II_A 对 Eca-109 细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达量的影响

与对照组相比，丹参酮 II_A 组、放射组、丹参酮 II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 Eca-109 细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达量明显降低（P<0.05）。与丹参酮 II_A 组或放射组相比，丹参酮 II_A＋放射组和丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达量明显降低（P<0.05）。

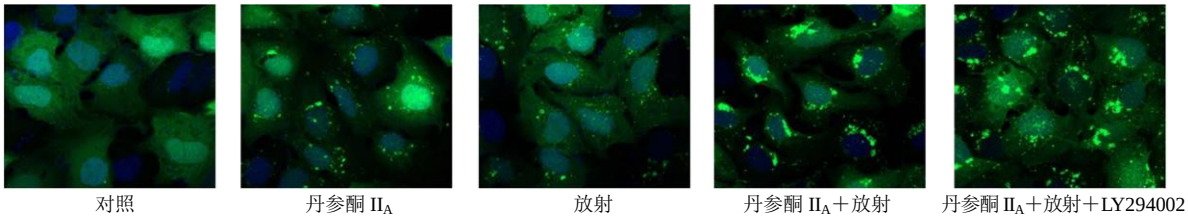


图 6 各组 Eca-109 细胞自噬状况（×400）

Fig. 6 Autophagy status of Eca-109 cells in each group (× 400)

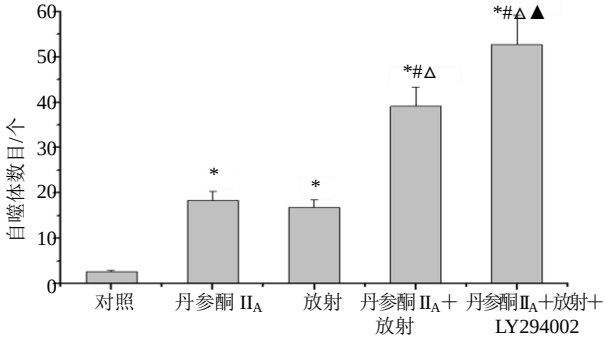


图 7 各组 Eca-109 细胞自噬体数目的比较（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 7 Comparison of number of autophagosomes of Eca-109 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

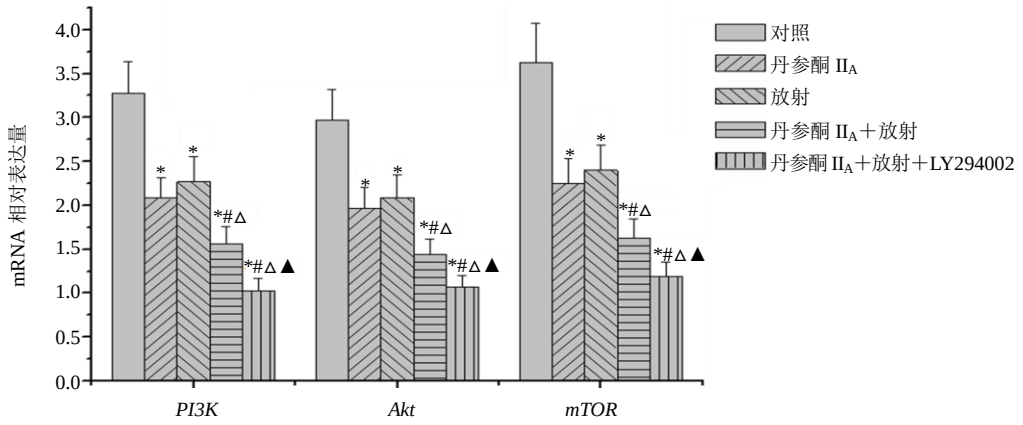
与丹参酮 II_A＋放射组相比，丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达量明显降低（P<0.05），见图 9。

2.7 丹参酮 II_A 对 Eca-109 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3、LC3-I、LC3-II 蛋白表达量的影响

与对照组相比，丹参酮 II_A 组、放射组、丹参酮 II_A＋放射组、丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 Eca-109 细胞 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、LC3-I、LC3-II 蛋白表达量及 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3、LC3-II/LC3-I 明显升高（P<0.05）。与丹参酮 II_A 组或放射组相比，丹参酮 II_A＋放射组和丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3、LC3-I、LC3-II 蛋白表达量及 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3、LC3-II/LC3-I 明显升高（P<0.05）。与丹参酮 II_A＋放射组相比，丹参酮 II_A＋放射＋LY294002 组 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、LC3-I、LC3-II 蛋白表达量及 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3、LC3-II/LC3-I 明显升高（P<0.05），见图 10～12。

3 讨论

我国为食管癌高发地区之一，2020 年数据显示我国食管癌新确诊病例和死亡病例均超过 30 万例，是严重威胁我国居民生命健康的主要恶性肿瘤之一[3]。目前，手术切除仍是临床治疗食管癌的首选方案，但由于食管癌发病隐匿、缺乏典型的临床症状和体征，超过 70%的患者确诊时已错过手术根治

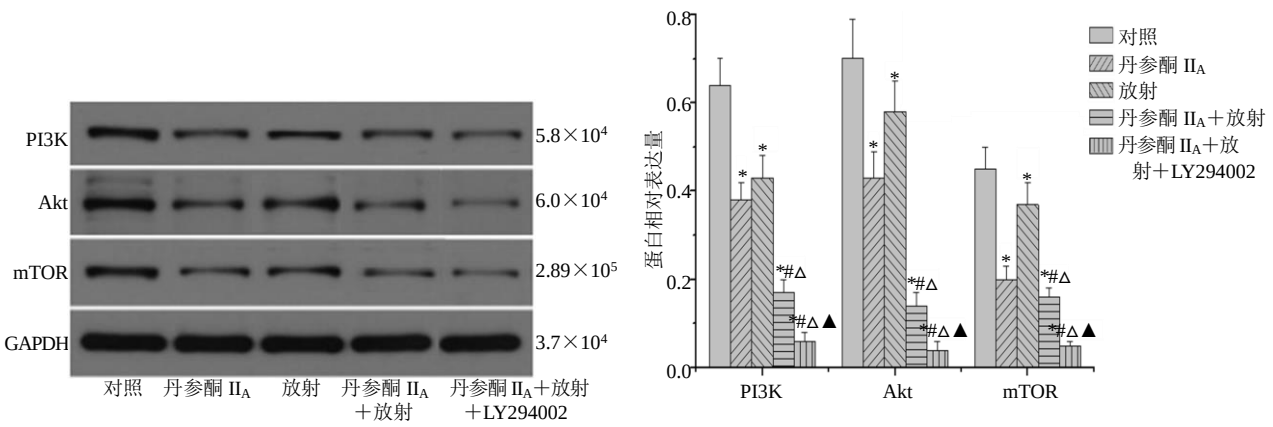


与对照组比较：*P<0.05；与丹参酮 II_A 组比较：#P<0.05；与放射组比较：△P<0.05；与丹参酮 II_A＋放射组比较：▲P<0.05

*P < 0.05 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* tanshinone II_A group; △P < 0.05 *vs* radiation group; ▲P < 0.05 *vs* tanshinone II_A + radiation group

图 8　各组 Eca-109 细胞 *PI3K*、*Akt*、*mTOR* mRNA 表达量的比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 8　Comparison of mRNA expression of *PI3K, Akt, mTOR* of Eca-109 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较：*P<0.05；与丹参酮 II_A 组比较：#P<0.05；与放射组比较：△P<0.05；与丹参酮 II_A＋放射组比较：▲P<0.05

*P < 0.05 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* tanshinone II_A group; △P < 0.05 *vs* radiation group; ▲P < 0.05 *vs* tanshinone II_A + radiation group

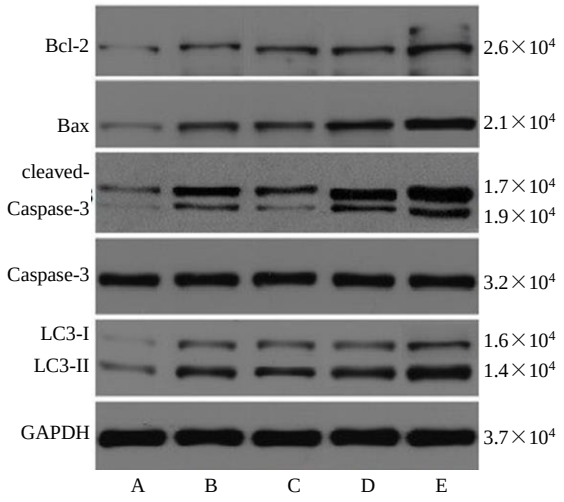
图 9　各组 Eca-109 细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达量的比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 9　Comparison of the protein expression of PI3K, Akt, mTOR of Eca-109 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

的机会，放射治疗为该部分患者的主要治疗方式，也是食管癌术后辅助治疗的重要手段，然而肿瘤细胞放疗敏感性降低限制了食管癌放疗效果。因此，寻找高效、低毒的放疗增敏剂对提高食管癌疗效具有重要意义。

丹参酮 II_A 是从中药丹参中提取的一种脂溶性共轭醌、酮类化合物[15]，研究证实，丹参酮 II_A 可通过促进肿瘤细胞凋亡与自噬对胆管癌、胶质瘤等起到抑制作用，并可提高喉癌细胞化疗敏感性，作用机制与调控 PI3K/Akt/mTOR 通路有关[9-10, 12]。本研究结果显示，丹参酮 II_A＋放射组对人食管鳞状细胞癌 Eca-109 细胞克隆形成能力、增殖活力的抑制作用及细胞凋亡、自噬的促进作用明显优于丹参酮 II_A 和放射组，并且 PI3K 抑制剂 LY294002 可明显增强丹参酮 II_A＋放射组对 Eca-109 细胞克隆形成能力、增殖活力、凋亡、自噬的调控作用。提示丹参酮 II_A 可提高人食管癌细胞放疗敏感性，作用机制可能与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

细胞凋亡和自噬受阻是恶性肿瘤发生发展的关键因素，也是肿瘤治疗的重要靶点[16]。Bcl-2 家族蛋白参与调控细胞线粒体凋亡途径，其中 Bcl-2 和 Bax 定位于线粒体膜，Bax 可正向调控线粒体膜通透性转变孔（mPTP）开放度，使大量细胞色素 C 通过 mPTP 由线粒体移入细胞质，细胞色素 C 诱导活化 Caspase-3，Cleaved Caspase-3 可促进 DNA 裂解并抑制 DNA 修复，从而促进细胞凋亡[17]。bcl-2 负



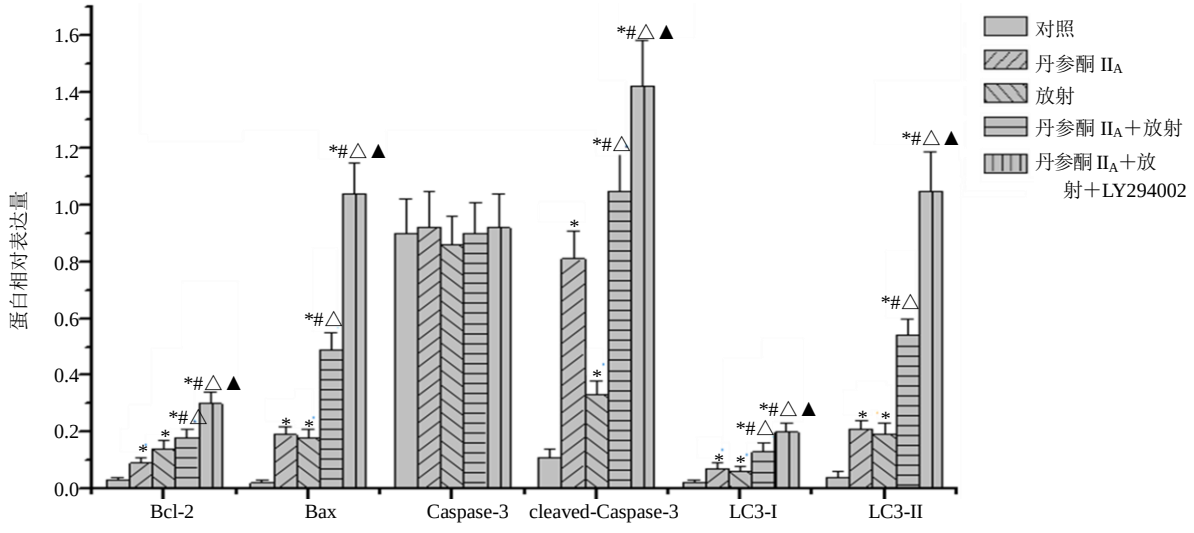
A-对照 B-丹参酮 II_A C-放射 D-丹参酮 II_A＋放射 E-丹参酮 II_A＋放射＋LY294002

A-control B-tanshinone II_A C-radiation D-tanshinone II_A + radiation E-tanshinone II_A + radiation + LY294002

图 10 各组 Eca-109 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、LC3-I、LC3-II 蛋白表达电泳图

Fig. 10 Electrophoretic images of the protein expression bcl-2, Bax, Caspase-3, Cleaved Caspase-3, LC3-I, LC3-II of Eca-109 cells in each group

向调控 mPTP 开放度而抑制细胞凋亡，并可与 Bax 结合成无生物活性的异源二聚体化合物，因此 Bax/bcl-2 表达比值也能体现 Bcl-2 家族蛋白对细胞凋亡的调节作用[18]。定位于自噬小体膜的 LC3 为细胞自噬活性的标志蛋白，自噬发生后，无活性的 LC3-I 亚型将转化为具备促自噬活性的 LC3-II 亚型，因此 LC3-II/LC3-I 表达比值能够体现细胞自噬水平[19]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与调控增殖、分化、凋亡、自噬等细胞生物学过程。刘兰等[20]报道 Akt 可抑制 Caspase-3 活化，进而阻滞细胞凋亡。mTOR 为 Akt 下游靶蛋白，Akt 可诱导 mTOR 表达与活化，活化 mTOR 可抑制 LC3-I 亚型向 LC3-II 亚型转化，从而阻滞细胞自噬[21]。Deng 等[22]报道通过药物抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可有效促进食管癌细胞凋亡与自噬。本研究结果显示，丹参酮 II_A+放射组对 Eca-109 细胞 PI3K、Akt、mTOR mRNA 和蛋白表达的抑制作用，以及对 Bax/bcl-2、Cleaved Caspase-3/Caspase-3、LC3-II/LC3-I 表达比值的降低作用明显优于丹参酮 II_A 和放射组，并且 LY294002 可明显增强丹参酮 II_A＋放射组对 Eca-109 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达



与对照组比较：*P＜0.05；与丹参酮 II_A 组比较：#P＜0.05；与放射组比较：△P＜0.05；与丹参酮 II_A＋放射组比较：▲P＜0.05

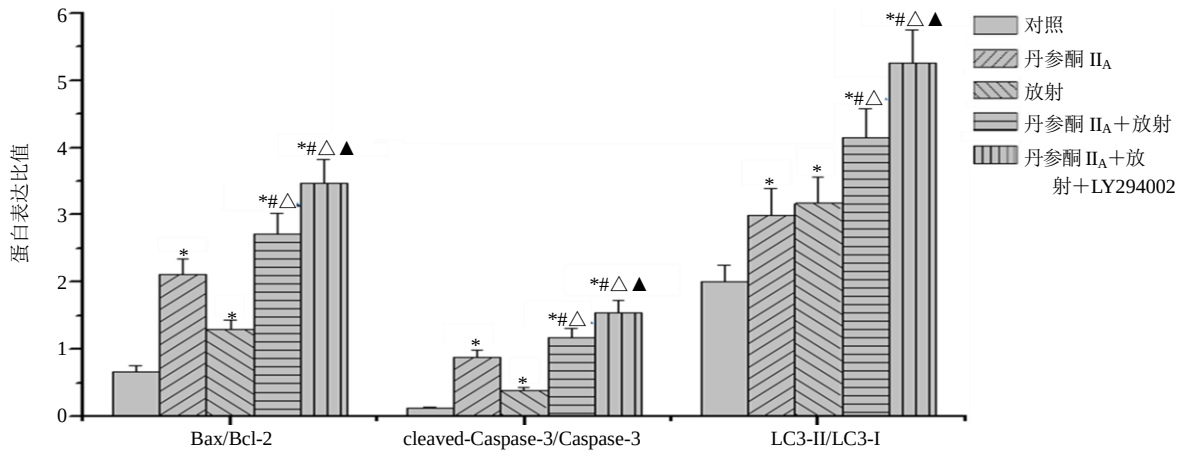
*P < 0.05 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* tanshinone II_A group; △P < 0.05 *vs* radiation group; ▲P < 0.05 *vs* tanshinone II_A + radiation group

图 11 各组 Eca-109 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3、LC3-I、LC3-II 蛋白表达量（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 11 Comparison of the protein expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, cleaved Caspase-3, LC3-I, LC3-II of Eca-109 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

的调控作用。提示丹参酮 II_A 可能通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，进而增强人食管癌细胞放疗敏感性。

综上所述，丹参酮 II_A 可能通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，抑制细胞增殖并促进其凋亡与自噬，进而增强人食管癌细胞放疗敏感性。本研究结



与对照组比较：*P＜0.05；与丹参酮 II_A 组比较：#P＜0.05；与放射组比较：△P＜0.05；与丹参酮 II_A＋放射组比较：▲P＜0.05

*P < 0.05 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* tanshinone II_A group; △P < 0.05 *vs* radiation group; ▲P < 0.05 *vs* tanshinone II_A + radiation group

图 12　各组 Bax/Bcl-2、cleaved-Caspase-3/Caspase-3、LC3-II/LC3-I 的比较（ $\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 12　Comparison of ratio of Bax/Bcl-2, cleaved-Caspase-3/Caspase-3, LC3-II/LC3-I of Eca-109 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

果为丹参酮 II_A 用作食管癌放疗辅助药物提供了理论依据，但其作用机制尚需进一步研究。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国食管癌筛查与早诊早治指南（2022，北京） [J]. 中国肿瘤, 2022, 31(6): 401-436.

[2] 路大鹏, 赵卫林, 王玉强, 等. 食管癌生存随访调查及列线图预后预测模型的建立 [J].癌变·畸变·突变, 2023, 35(1): 37-42.

[3] 宋颂, 雷林, 刘涵, 等. 中国人群食管癌疾病负担：多数据源证据汇总及分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(15): 887-896.

[4] 龚盈盈, 谢玲, 朱圣明, 等. 丁香提取物对放射抗拒食管癌细胞的体外抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 华西医学, 2021, 36(1): 66-75.

[5] 刘洋, 熊伟, 米蕊. 中晚期食管癌 AKR1C3、LEF1 表达与放疗敏感性及预后的关系分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(4): 368-371.

[6] 赵小涵, 王鹤松, 宋春洋, 等. ARL5B 对食管癌细胞放疗敏感性的影响及机制研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(15): 912-920.

[7] Zhang W, Liu C, Li J, *et al*. Tanshinone II_A: New perspective on the anti-tumor mechanism of a traditional natural medicine [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(1): 209-239.

[8] Sun R, Zhai R, Ma C, *et al*. Combination of aloin and metformin enhances the antitumor effect by inhibiting the growth and invasion and inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(3): 1141-1151.

[9] Liu H, Liu C, Wang M, *et al*. Tanshinone II_A affects the malignant growth of Cholangiocarcinoma cells by inhibiting the PI3K-Akt-mTOR pathway [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 19268.

[10] Ding L, Ding L, Wang S, *et al*. Tanshinone II_A affects autophagy and apoptosis of glioma cells by inhibiting phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian target of rapamycin signaling pathway [J]. *Pharmacology*, 2017, 99(3-4): 188-195.

[11] 王海叶, 邢瑞敏, 马欣, 等. 丹参酮 II_A 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进人喉癌 Hep-2 细胞凋亡和自噬的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(3): 308-314.

[12] 吴庭艳, 戴景芳, 张强, 等. 丹参酮 II_A 通过抑制 PI3K/Akt 通路逆转人喉癌细胞顺铂耐药的机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(9): 1938-1944.

[13] Ding L, Wang S, Qu X, *et al*. Tanshinone II_A sensitizes oral squamous cell carcinoma to radiation due to an enhanced autophagy [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 46: 264-269.

[14] 宋岩, 刘秀萍, 白伟良, 等. LY294002 联合顺铂阻断 PI3K-Akt 通路诱导喉癌 Hep-2 细胞凋亡研究 [J]. 实用肿瘤杂志, 2013, 28(2): 132-134.

[15] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.

[16] El Mashed S, O'Donovan T R, Kay E, *et al*. Apoptosis and autophagy markers predict survival in neoadjuvant treated oesophageal adenocarcinoma patients [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 908.

[17] Hu Z, Lai Y, Ma C, *et al*. *Cordyceps militaris* extract induces apoptosis and pyroptosis via caspase-3/PARP/GSDME pathways in A549 cell line [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 10(1): 21-38.

[18] Cahyadi A, Ugrasena I D G, Andarsini M R, *et al*. Relationship between Bax and Bcl-2 protein expression and outcome of induction phase chemotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23(5): 1679-1685.

[19] Li X, Dai Z, Wu X, *et al*. The comprehensive analysis identified an autophagy signature for the prognosis and the immunotherapy efficiency prediction in lung adenocarcinoma [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 749241.

[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.

[21] Kuşçu G C, Gürel Ç, Buhur A, *et al*. The regulatory effects of clomiphene and tamoxifen on mTOR and LC3-II expressions in relation to autophagy in experimental polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(3): 1721-1729.

[22] Deng L, Wu X, Zhu X, *et al*. Combination effect of curcumin with docetaxel on the PI3K/AKT/mTOR pathway to induce autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(1): 57-72.

[责任编辑 高源]