

基于转录组测序技术探讨隐丹参酮对 A2780/DDP 顺铂耐药细胞的影响及潜在机制

陈家鑫^{1,2}, 蒋诗情^{1,2}, 陈芯媛^{1,2}, 詹子欣^{1,2}, 江明华^{1,2}, 游翠芳^{1,2*}

1. 宁德师范学院附属宁德市医院, 福建 宁德 352100

2. 上海市第一人民医院宁德医院, 福建 宁德 352100

摘要: **目的** 基于转录组测序技术探讨隐丹参酮 (cryptotanshinone, CPT) 联合顺铂 (cisplatin, DDP) 干预对 A2780/DDP 细胞的影响及其潜在作用机制。**方法** 体外培养人卵巢癌 A2780 和 A2780/DDP 细胞, 将细胞分为对照组、DDP 组、DDP + CPT 给药组, 采用 MTS 细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒检测细胞存活率、划痕实验检测迁移能力、Transwell 实验检测迁移和侵袭能力, 探究 DDP + CPT 干预下对 A2780/DDP 细胞的影响。获取各组的细胞 mRNA 进行转录组测序, 筛选差异表达基因, 拓扑分析得到 CPT 改善 A2780/DDP 对 DDP 耐药的核心靶点, 对差异表达基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 采用分子对接技术研究 CPT 与核心靶点的结合能力, 实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法检测核心靶点的 mRNA 表达情况。**结果** A2780/DDP 细胞的耐药指数为 4; DDP + CPT 干预可显著抑制 A2780/DDP 耐药株的细胞存活率、细胞迁移和细胞侵袭能力 ($P < 0.001$)。差异表达基因筛选结果表明, 给药组与模型组相比共有 253 个差异表达基因, 其中 JUN 原癌基因 (JUN proto-oncogene gene, JUN)、Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)、醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2) 显著上调 ($P < 0.05$), 而趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 显著下降 ($P < 0.05$)。GO 和 KEGG 结果表明, CPT 可能影响 TLR 信号通路、B 细胞受体信号通路、白细胞介素-17 等信号通路, 从而改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 的耐药性; RT-qPCR 结果表明, CPT 可上调 JUN、TLR2、NOS2、NQO1 的 mRNA 表达 ($P < 0.001$), 抑制 CXCR4 的 mRNA 表达 ($P < 0.001$), 改善 A2780/DDP 对 DDP 的耐药性。**结论** CPT 可改善 A2780/DDP 耐药细胞对 DDP 的耐药性, 其机制可能与 CPT 上调 JUN、TLR2、NOS2、NQO1 的 mRNA 表达, 下调 CXCR4 的 mRNA 表达有关。

关键词: 隐丹参酮; 顺铂; A2780/DDP 细胞; 转录组测序; 分子对接

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)02-0546-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.018

Exploring effects and potential mechanisms of cryptotanshinone on A2780/DDP cisplatin-resistant cells based on transcriptome sequencing technology

CHEN Jiabin^{1,2}, JIANG Shiqing^{1,2}, CHEN Xinyuan^{1,2}, ZHAN Zixin^{1,2}, JIANG Minghua^{1,2}, YOU Cuifang^{1,2}

1. Affiliated Ningde Municipal Hospital of Ningde Normal University, Ningde 352100, China

2. Shanghai First People's Hospital Ningde Hospital, Ningde 352100, China

Abstract: Objective To investigate the effects of cryptotanshinone (CPT) combined with cisplatin (DDP) on A2780/DDP cells and its potential mechanism of action based on transcriptome sequencing technology. **Methods** The A2780 and A2780/DDP cells were cultured *in vitro*, and the cells were divided into control group, DDP group, and DDP + CPT experimental group. MTS cell proliferation and cytotoxicity detection Kit were used to detect the cell survival rate, scratch assay was used to detect the migratory ability, and Transwell assay was used to detect the migratory and invasive ability, to investigate the effect of DDP + CPT intervention on A2780/DDP cells. The mRNA of the above grouped cells was obtained for transcriptome sequencing, screening for differentially expressed genes, topology analysis was used to obtain the core target of CPT to improve the resistance of A2780/DDP to DDP, the

收稿日期: 2024-09-04

基金项目: 宁德市自然科学基金联合项目 (2022J02)

作者简介: 陈家鑫, 主管药师, 研究方向为中药药理学。E-mail: chenjx986@163.com

*通信作者: 游翠芳, 主任药师, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: 1532131598@qq.com

gene ontology (GO) function and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were conducted for differentially expressed genes, molecular docking technology was used to study the binding ability of CPT to the core target and real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression of the core target. **Results** The resistance index of A2780/DDP cells was four, DDP + CPT intervention significantly inhibited the cell viability, cell migration and cell invasion ability of A2780/DDP-resistant strains ($P < 0.001$). The results of differentially expressed genes screening showed that there were 253 differentially expressed genes in the drug group as compared with the model group, among which JUN proto-oncogene gene (*JUN*), Toll-like receptor 2 (*TLR2*), quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*), and nitric oxide synthase 2 (*NOS2*) were significantly up-regulated ($P < 0.05$), while chemokine receptor 4 (*CXCR4*) was significantly decreased ($P < 0.05$). The results of GO and KEGG suggested that CPT might affect the TLR signaling pathway, B-cell receptor signaling pathway, and interleukin-17 signaling pathway and other mechanisms, thereby improving the drug resistance of A2780/DDP cells to DDP. RT-qPCR results showed that CPT up-regulated the mRNA expression of *JUN*, *TLR2*, *NOS2*, *NQO1* ($P < 0.001$), inhibited *CXCR4* mRNA expression ($P < 0.001$) to improve the drug resistance of A2780/DDP to DDP. **Conclusion** CPT could improve the resistance of A2780/DDP-resistant cells to DDP, and the mechanism may be related to the up-regulation of the mRNA expression of *JUN*, *TLR2*, *NOS2*, *NQO1* and the down-regulation of *CXCR4* mRNA expression by CPT.

Key words: cryptotanshinone; cisplatin; A2780/DDP cells; transcriptome sequencing; molecular docking

卵巢癌是全球最常见和最致命的妇科恶性肿瘤之一^[1], 根据国家癌症中心与国际肿瘤研究机构联合测算的最新数据显示, 2022年中国卵巢癌卵巢癌的年龄标准化发病率为56.8%, 年龄标准化死亡率为26.4%, 年龄标准化死亡率的年度平均百分比变化呈上升趋势^[2]。隐匿性强以及多数患者复发是导致其不良预后的主要原因。随着化疗周期的增加, 在复发性卵巢癌中不可避免的出现铂类药物耐药, 但对于铂类耐药的患者的治疗仍存在治疗效果不理想、药物不良反应大等问题, 对临床治疗过程产生一定的阻碍^[3]。研究表明, 传统中药及天然化合物可在癌症治疗中作为化疗增敏剂^[4], 对降低药物的不良反应并克服其耐药性具有一定的作用。因此, 从天然药物资源中寻找高效低毒化疗增敏剂, 提高化疗疗效, 对改善卵巢癌患者预后、提高卵巢癌生存率具有重要的临床价值。

隐丹参酮 (cryptotanshinone, CPT) 是从丹参中分离的脂溶性二萜醌类化合物, 近年来因其表现出良好的抗肿瘤作用逐渐受到关注, 对肺癌、肝癌、胃癌、结直肠癌等多种癌症^[5], 均具有一定的作用, 其潜在的分子机制可能通过诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖、迁移、侵袭、靶向雌激素受体和雄激素受体以及逆转肿瘤的多重耐药等发挥作用^[6]。课题组前期通过网络药理学的方法发现隐丹参酮具有增敏或逆转卵巢癌铂耐药的潜力^[7], 但具体机制仍不明。本研究探讨隐丹参酮增强人卵巢癌 A2780/DDP 细胞对化疗药物的敏感性的可能机制及关键靶点, 为隐丹参酮

用于卵巢癌治疗提供理论依据和实验支持。

1 材料

1.1 细胞株

人卵巢癌 A2780 细胞由福建省妇幼保健院赠送, 经鉴定无支原体污染; A2780/DDP 细胞 (批号 FS-A2780-DDP) 由上海通派生物科技有限公司提供。

1.2 药品与试剂

CPT (批号 C5624, 质量分数 $\geq 98\%$)、DMEM 基础培养基 (批号 D6419) 购自美国 Sigma 公司; 顺铂 (cisplatin, DDP, 批号 H20073653) 购自山东齐鲁制药公司; 青霉素-链霉素 (批号 C0222)、改良吉萨姆染色液 (批号 C0131) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清 (批号 PS-FB5-SA) 购自美国 Hyclone 公司; 0.25% 胰蛋白酶 (批号 25200-056)、RPMI 1640 培养基 (批号 ZQ-213) 购自美国 Gibco 公司; MTS 细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒 (批号 G3581)、逆转录试剂盒 (批号 A2719)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (批号 LS2062) 购自美国 Promega 公司; Matrigel Matrix 基质胶 (批号 356234) 购自美国康宁公司; TRIZOL 总 RNA 抽提试剂 (批号 15596026) 购自美国 Ambion 公司。

1.3 仪器

BB15 型细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HF safe 1200 LC 型超净工作台 (上海 Heal Force 公司); 1X71 型荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); YL00485 型全自动细胞技术仪 (上海博大博聚科技公司); 272006878 型荧光定量

PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); ND-100C 型超微量紫外分光光度计(中国米欧仪器公司); DK-80 型电热恒温水槽(上海一恒科技公司); MAX 190 型全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 5804R 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司); 5810 II 267247 型普通高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养和 A2780/DDP 细胞对 DDP 的耐药性检测

A2780 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养; A2780/DDP 细胞用含 15% FBS、1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 贴壁后以 1 μg/mL DDP 维持耐药性^[8], 培养至 3~5 代开始构建模型。将细胞随机分为空白(不含细胞)组、对照组及 DDP (2、4、6、8、10 μg/mL) 组, 给药干预 24 h。收集各组细胞, 弃旧培养液, 每孔加入 100 μL 培养液与 20 μL MTS, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中避光孵育 2~3 h。采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞存活率及细胞耐药指数。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$$\text{细胞耐药指数} = \text{耐药细胞 IC}_{50} / \text{非耐药细胞 IC}_{50}$$

2.2 A2780/DDP 细胞增殖检测

将 A2780/DDP 细胞随机将细胞分为对照组、DDP 组、DDP+CPT 给药组, 对照组于 DMEM 培养液中常规培养; DDP 组于含 1 μg/mL DDP 培养液中培养 24 h; DDP+CPT 给药组于含 1 μg/mL DDP 培养液中加入 5、6、7、8、9、10 μmol/L CPT 干预 24 h, 后续同“2.1”项下方法。

2.3 A2780/DDP 细胞迁移检测

2.3.1 细胞划痕实验 6 孔板底部用马克笔画上等间隙的 5 条横线, 备用。将 A2780/DDP 细胞以 5 × 10⁵ 个/孔接种于提前画线的 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 弃去旧培养基, 以 2 mL PBS 洗涤细胞 2~3 次, 用移液枪头垂直于马克笔横线进行细胞划痕, 设对照组、DDP (1 μg/mL) 组及 DDP (1 μg/mL) +CPT 低、中、高剂量 (6、7、8 μmol/L) 组, 于 0 h 在镜下拍照, 于培养箱培养 24 h 后, 于倒置显微镜下拍照, 对比观察细胞迁移率。

细胞迁移率 = (初始划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 初始划痕面积

2.3.2 Transwell 实验 将 A2780/DDP 细胞分为对

照组、DDP (1 μg/mL) 组及 DDP (1 μg/mL) +CPT 低、中、高剂量 (6、7、8 μmol/L) 组, 以 2 × 10⁴ 个/孔接种于 Transwell 上室中, 每室 200 μL, 下室加入 600 μL 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 弃去旧培养基, 以无核酶水洗涤小室内细胞 2~3 次, 弃去; 加入 75% 甲醛固定细胞 15 min, 弃去; 加入结晶紫细胞染色 40 min, 弃去, 最后以无核酶水洗去残余液体, 置于倒置显微镜下观察细胞迁移情况。

2.4 A2780/DDP 细胞侵袭检测

在冰上将 Matrigel 基质胶用无血清培养基进行稀释, 混匀后加到 Transwell 上室中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育, 2 h 后吸掉上室多余液体, 每孔中加入 100 μL 无血清培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 30 min, 后续同“2.3.2”项下方法。

2.5 总 RNA 提取、cDNA 文库构建和高通量测序

利用 TRIZO 抽提总 RNA 并采用超微量紫外可见分光光度计进行 RNA 定量及纯度评估, 总 RNA 作为 mRNA 测序的建库起始样品, mRNA 通过 RNA 提取、质量检测、文库构建、文库质控、上机测序步骤, 进行构建和测序, 构建与测序委托中科新生命信云平台公司完成。

2.6 差异表达基因的筛选

采用 SOAPnuke 软件对测序数据进行滤过, 去除接头序列, 滤过掉碱基平均质量值小于 20、无法确定的碱基数量大于 5 的数据, 获得用于后续分析的数据。采用 DESeq2 进行基因的差异表达分析, 以 $|\log_2 FC| > 1$ 、 $P < 0.05$ 为条件筛选差异表达基因, 并绘制火山图。

2.7 蛋白质互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI) 的构建

所得差异表达基因上传至 STRING 数据库, 构建 PPI, 导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑参数分析, 按 Degree 参数大小对核心基因靶点进行排序。

2.8 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析和分子对接

采用微生信在线平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn>) 对交集基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。将筛选出的 5 个核心靶点与 CPT 进行分子对接验证, 并利用 PLIP^[9] 在线网站 (<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de>) 预测 CPT 与核心靶点的相互作用。

2.9 A2780/DDP 细胞的核心靶点 mRNA 水平检测

提取各组细胞中的总 RNA，紫外可见分光光度法测定 RNA 浓度后，使用逆转录试剂盒依照试剂盒说明反转录为 cDNA，再进行实时荧光定量 PCR 扩增，反应体系为 95 ℃、2 min 预变性，热循环 95 ℃、15 s，退火温度 50~60 ℃（根据引物情况设置）、40 s，40 个循环。以 β -actin 为参照基因， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	序列 (5'-3')
<i>CXCR4</i>	F: CCACGCCACCAACAGTCAGAG R: GAAGTCGGGAATAGTCAGCAGGAG
<i>JUN</i>	F: TCTACGACGATGCCCTCAACG R: GGTTC AAGGTCATGCTCTGCTTC
<i>TLR2</i>	F: GCCTCTCGGTGTCGGAATGTC R: ATGGAAACGGTGGCACAGGAC
<i>NOS2</i>	F: GACTTCCAAGACACACTTCAC R: TTCGATAGCTTGAGGTAGAAGC
<i>NQO1</i>	F: AGCCGCAGACCTTGTGATATTCC R: ATGGCAGCGTAAGTGAAGCAAAC

2.10 统计学分析

采用 SPSS21.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Shapiro-Wilk 方法正态分布检验，符合正态分布，组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。方差齐性检验采用 F 检验评估。当方差齐时，LSD 检验比较组间差异；方差不齐时，Games-Howell 检验比较组间差异。

3 结果

3.1 对 A2780/DDP 细胞耐药性的影响

如图 1-A 所示，DDP 对 A2780 细胞有显著的细胞增殖抑制作用 ($P < 0.001$)，呈剂量相关性。如

图 1-B 所示，与对照组比较，低质量浓度 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DDP 促进 A2780/DDP 细胞生长 ($P < 0.01$)，高质量浓度 (6~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) DDP 显著抑制细胞增殖 ($P < 0.01$ 、0.001)。DDP 对 A2780 及 A2780/DDP 细胞的 IC_{50} 分别为 4、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，A2780/DDP 的耐药指数为 4，表明 A2780/DDP 细胞具有一定耐药性，可以作为有效卵巢癌铂耐药细胞模型用作后续实验。

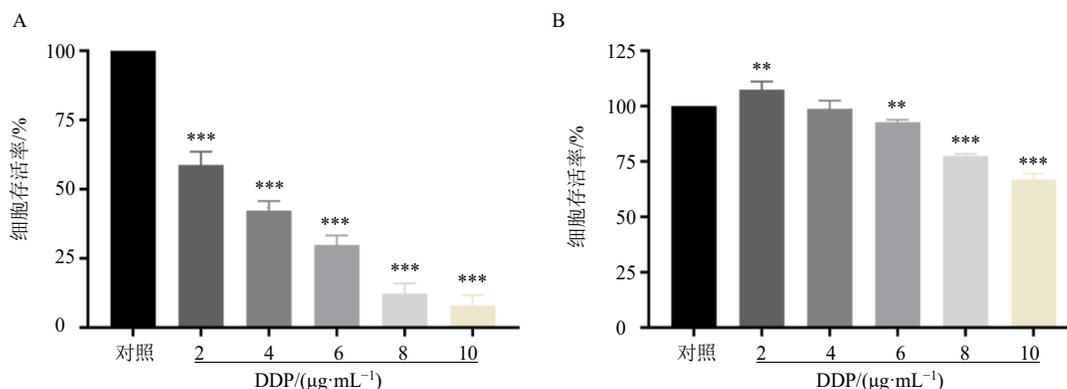
3.2 对 A2780/DDP 细胞增殖的影响

如图 2 所示，与对照组比较，DPP 组细胞存活率上升 ($P < 0.05$)，表明 DDP 促进 A2780/DDP 细胞的生长；与 DDP 组比较，DDP+CPT 各剂量组对 A2780/DDP 细胞具有显著增殖抑制作用 ($P < 0.001$)，呈剂量相关性，其中，6~8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 CPT 干预下，细胞存活率明显下降，而 9~10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CPT 可达半数细胞死亡，故以 6~8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 CPT 进行后续实验。

3.3 对 A2780/DDP 细胞迁移的影响

3.3.1 Transwell 检测 CPT 对 A2780/DDP 细胞迁移的影响 如图 3 所示，与对照组比较，DDP 组迁移至小室下的细胞数无显著性差异，而与 DDP 组比较，CPT 组细胞的迁移数量显著下降 ($P < 0.001$)，表明 CPT 可显著抑制 A2780/DDP 细胞的迁移能力。

3.3.2 细胞划痕实验检测 CPT 对 A2780/DDP 细胞迁移的影响 如图 4 所示，与对照组比较，DDP 组迁移细胞数量显著下降 ($P < 0.001$)；与 DDP 组比较，CPT 各剂量组中 A2780/DDP 迁移细胞数量显著下降 ($P < 0.001$)，表明细胞的迁移能力被显著抑制。且随着 CPT 剂量的增加，细胞迁移的抑制作用



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 DDP 对 A2780 (A) 及 A2780/DDP (B) 细胞的细胞存活率影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of DDP on cell viability of A2780 (A) and A2780/DDP (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

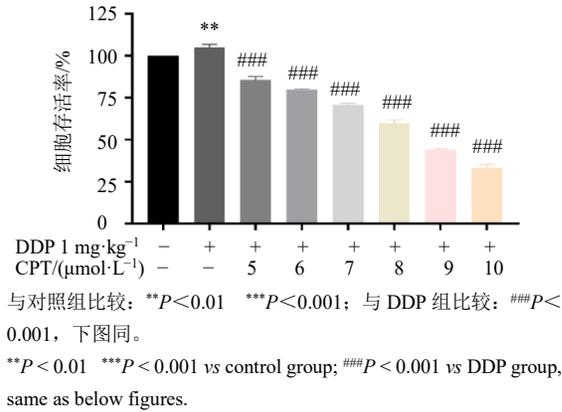


图 2 CPT 对 A2780/DDP 细胞的细胞存活率影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of CPT on cell viability of A2780/DDP cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

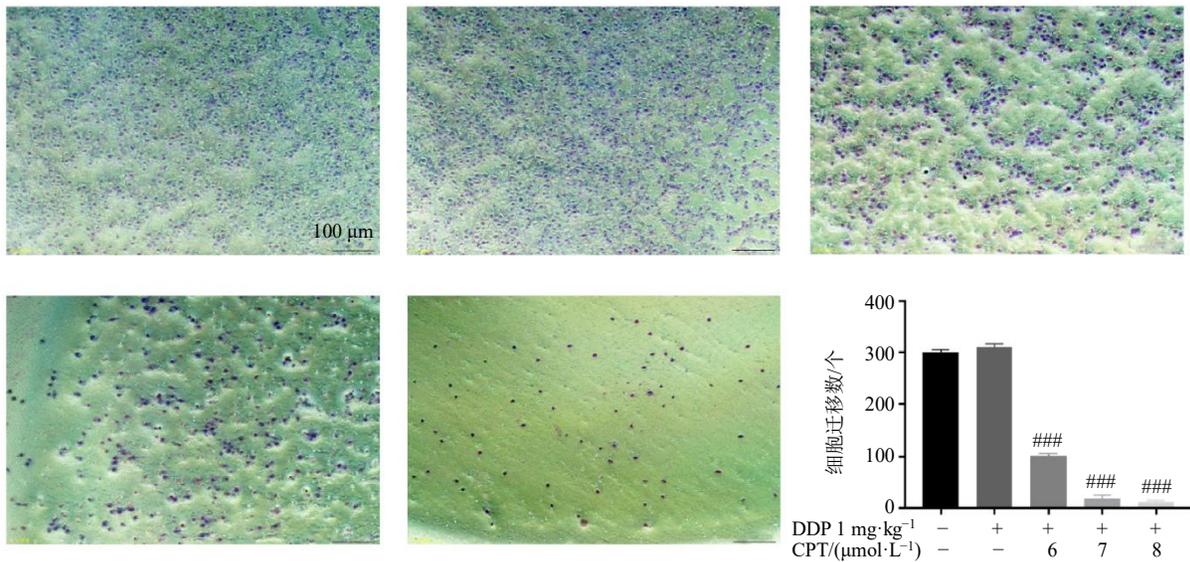


图 3 Transwell 法检测 CPT 对 A2780/DDP 细胞的细胞迁移能力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of CPT on cell migration ability of A2780/DDP cells as detected by Transwell assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

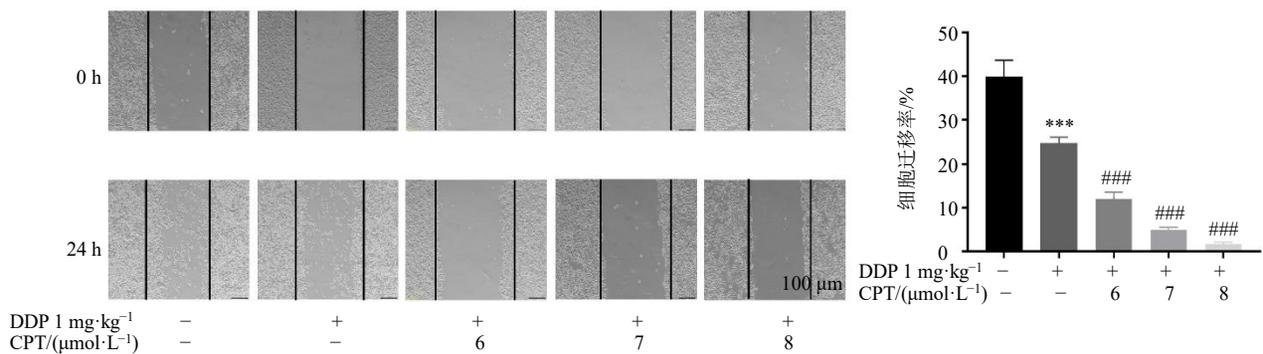


图 4 划痕实验检测 CPT 对 A2780/DDP 细胞的细胞迁移影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of CPT on cell migration of A2780/DDP cells as detected by scratch assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

逐渐增强, 导致划痕愈合面积逐渐减小, 呈现出明显的剂量相关性。

3.4 Transwell 检测 CPT 对 A2780/DDP 细胞侵袭的影响

如图 5 所示, 与对照组、DDP 组比较, DDP+CPT 给药组 A2780/DDP 细胞侵袭过基质胶至 Transwell 小室下室面的细胞数量显著下降 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性, 表明 CPT 可显著抑制 A2780/DDP 细胞的侵袭能力。

3.5 转录组测序数据质量控制

测序文库中共有 6 个检测样品原始数据, 原始序列条数为 $5.9 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$, 滤过后, $5.8 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$ 高质量读段保留。测序序列中碱基质量值 > 20 为 97%, 30% 碱基所占百分比为 94%, 碱基 G 和

C 的数量总和占总的碱基数量的百分比为 48%，表明测序数据质量良好，测序序列准确度较高。

3.6 差异表达基因、核心靶点的筛选及蛋白质互作网络构建

如图 6-A 所示，与 DDP 组比较，DDP+CPT 给

药组筛选出 253 个差异表达基因，其中 82 个下调基因，171 个上调基因。如图 6-B 所示，将 253 个差异表达基因输入 STRING 在线工具，限定物种 Homo sapiens，度值为 0.04，可得到 CPT 改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 耐药的 PPI 图，蛋白质用

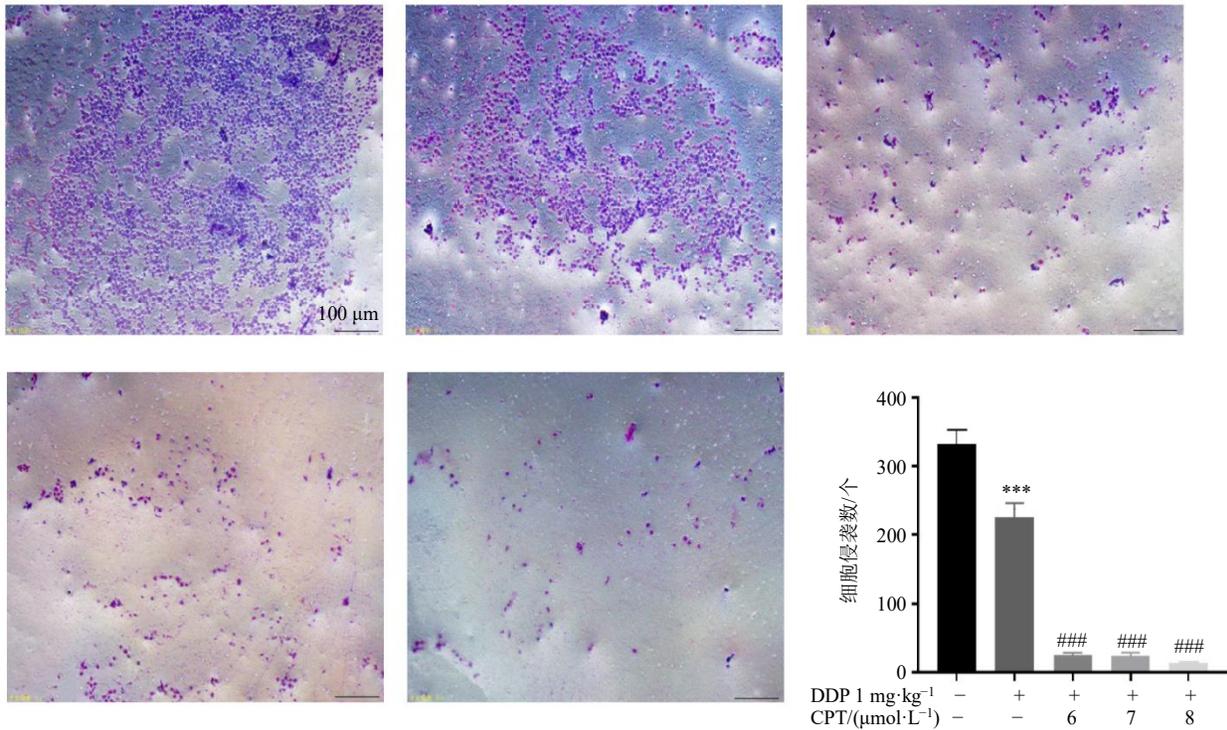


图 5 Transwell 法检测 CPT 对 A2780/DDP 细胞的细胞侵袭影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of CPT on cell invasion of A2780/DDP cells as detected by Transwell assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

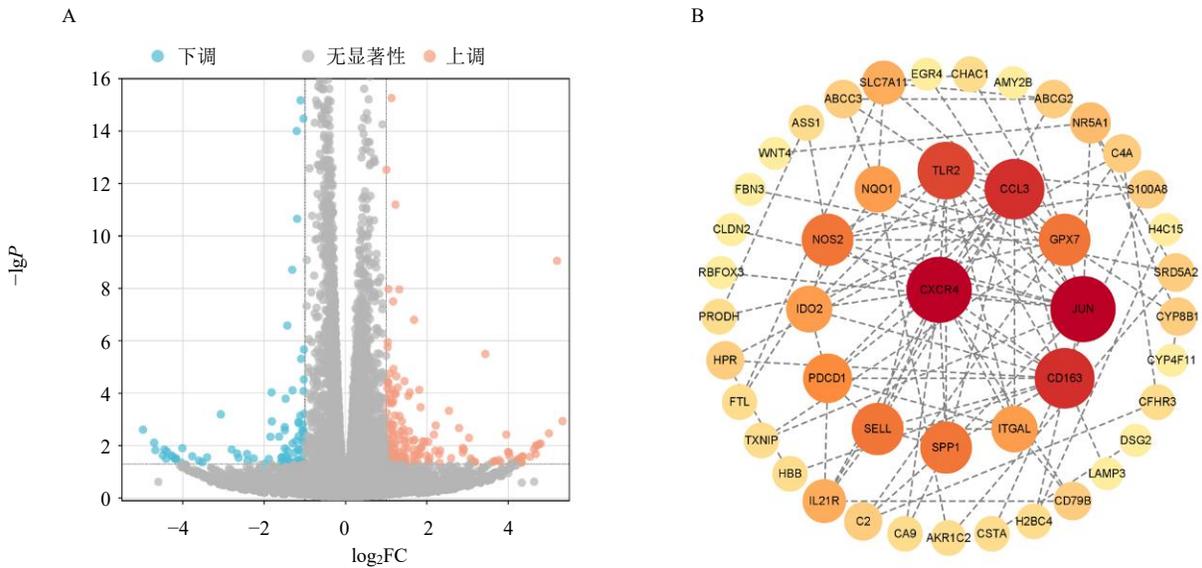


图 6 CPT 改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 耐药的差异表达基因火山图 (A) 及核心靶点图 (B)

Fig. 6 Differential gene volcano map (A) and core target map (B) for CPT to improve resistance of A2780/DDP cells to DDP

节点表示,蛋白质之间的关联用边表示。由图可知,CPT 可能主要作用于趋化因子受体 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)、JUN 重组蛋白 (JUN recombinant protein, JUN)、Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)、醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2)、CD163 分子重组蛋白 (recombinant cluster of differentiation 163, CD163)、趋化因子 (chemokine C-C motif ligand 3, CCL3)、谷胱甘肽过氧化物酶 7 (glutathione peroxidase 7, GPX7)、选择素 L (selectin L, SELL)、分泌型磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1) 等核心靶点发挥改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 耐药的能力。

3.7 功能富集分析

3.7.1 GO 功能富集 将 253 个差异表达基因进行 GO 功能富集,共得到 1387 个生物过程条目,100 个细胞组分条目,190 个分子功能条目,分别取生物过程、细胞组分、分子功能 3 个方面各前 10 位结果做聚类分析 (图 7)。CPT 可影响 A2780/DDP 细胞的细胞酮代谢过程、对氧化应激的反应、类固醇代谢过程、氨基酸代谢过程等生物过程。所在的细胞组分可能包括质膜外侧、血液微粒、分泌颗粒

膜、内质网内腔、内吞囊泡及其膜等。涉及的分子功能可能有有机酸结合、血红素结合、羧酸结合、单加氧酶活性、抗氧化活性等。

3.7.2 KEGG 富集 将 253 个差异表达基因进行 KEGG 通路富集,共涉及 135 条通路,CPT 可能通过 Toll 样受体信号通路、PD-L1 的表达和 PD-1 检查点通路、铁死亡、B 细胞受体信号通路、IL-17 信号通路、T 细胞受体信号通路等影响 A2780/DDP 细胞对 DDP 的耐受性,其中排名前 15 的通路富集结果见图 8。

3.8 分子对接

如图 9 所示,选择 CXCR4、JUN、TLR2、NQO1、NOS2 为分子对接的蛋白受体,以 CPT 为分子对接的小分子配体,结果表明,CPT 与 CXCR4、JUN、NOS2、NQO1、TLR2 的结合能分别为-7.6、-7.4、-10.5、-8.2、-8.6 kcal/mol,其结合能均小于-5 kcal/mol,表明所有的蛋白受体与 CPT 均具有良好的结合活性。分子对接结果和相互作用。

3.9 对 A2780/DDP 细胞核心靶点 mRNA 表达的影响

如图 10 所示,与对照组比较,DDP 组中 NOS2、JUN、NQO1、TLR2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$),而 CXCR4 mRNA 表达水平上升 ($P < 0.001$);而与 DDP 组比较,DDP+CPT 组结果

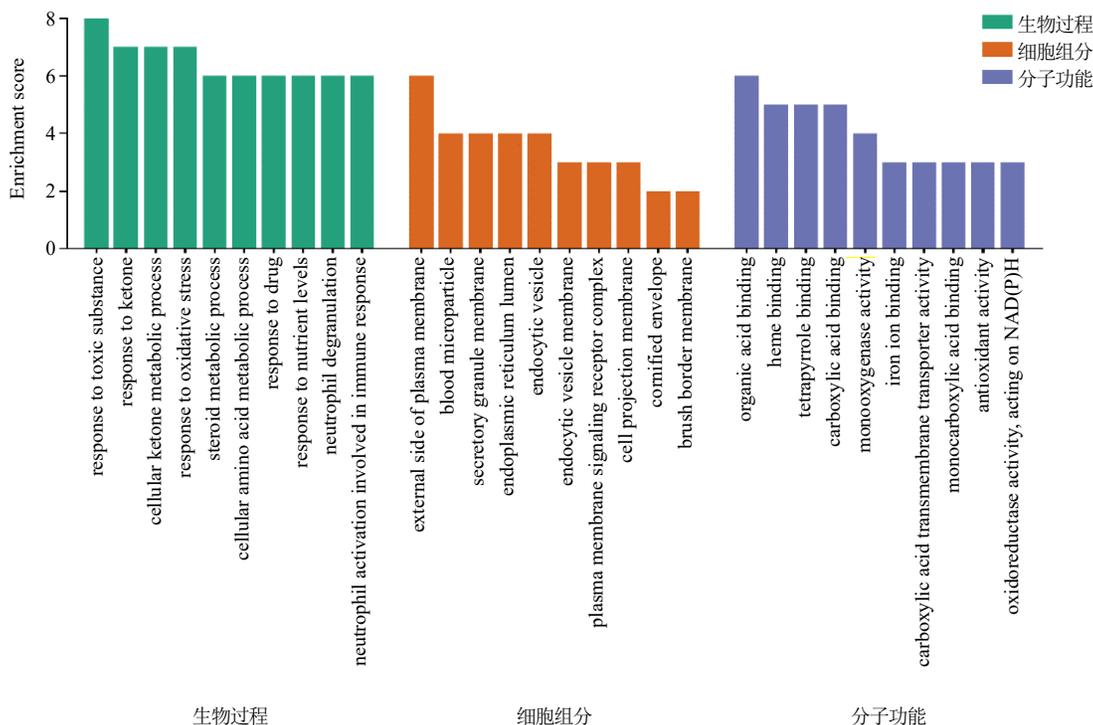


图 7 CPT 改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 耐药的 GO 富集柱状图

Fig. 7 GO-enriched histogram for CPT to improve resistance of A2780/DDP cells to DDP

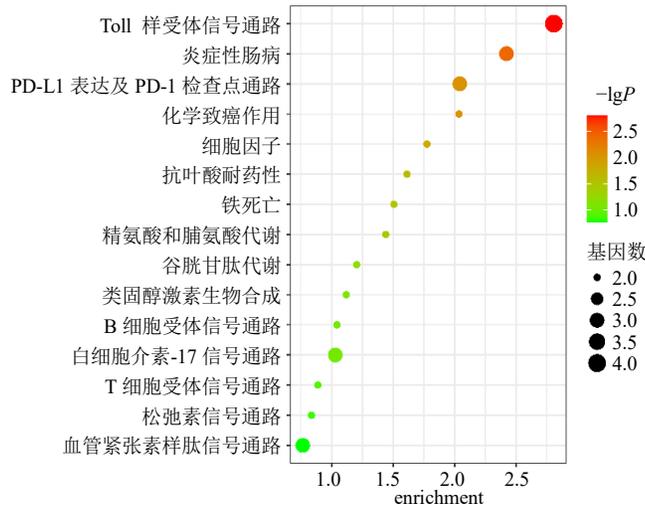


图 8 CPT 改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 耐药的 KEGG 富集气泡图

Fig. 8 KEGG-enriched bubble plot for CPT to improve resistance of A2780/DDP cells to DDP

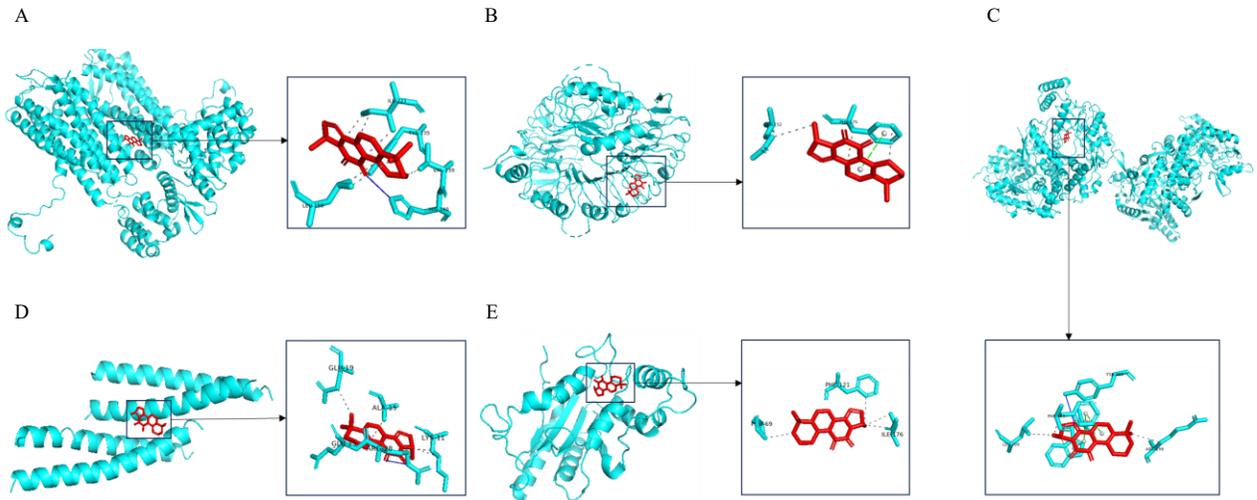


图 9 CPT 与 CXCR4 (A)、TLR2 (B)、NOS2 (C)、JUN (D)、NQO1 (E) 的分子对接和相互作用结果图

Fig. 9 Plots of molecular docking and interaction between CPT and CXCR4 (A), TLR2 (B), NOS2 (C), JUN (D), NQO1 (E)

显示 CPT 干预后可显著逆转 DDP 对上述核心基因的作用 ($P < 0.001$)。

4 讨论

卵巢癌是严重危害女性健康疾病之一，目前一线治疗以手术联合化疗为主，常规采用肿瘤细胞减灭术最大程度地切除病灶联合术后使用顺铂为基础的化疗方案，提示顺铂在卵巢癌治疗中扮演着重要角色。但伴随化疗周期的延长，许多患者会出现耐药现象，导致肿瘤在短期内增殖、迁移和复发，最终影响患者的生存质量。为寻求有效逆转和防治顺铂耐药卵巢癌的方法，本研究优选了 CPT 这一中药成分，结合转录组测序和细胞

学研究，探究其对卵巢癌铂耐药细胞的影响和潜在作用机制。

丹参是我国传统常用的活血祛瘀药，具有活血祛瘀、通经止痛、凉血消痈之功效，主治胸痹心痛、脘腹胁痛、热痹疼痛等证，根据传统中医理论，活血化瘀药可用于恶性肿瘤的治疗^[10]。CPT 是从唇形科植物丹参根茎中提取的脂溶性化合物之一，具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用。多项研究表明 CPT 对肺癌^[11-13]、胃癌^[14-15]、结直肠癌^[16-18]、肝癌^[19-22]、骨肉瘤^[23-24]、乳腺癌^[25-26]等多种癌症均具有一定的细胞杀害和抑制作用。在卵巢癌中，研究表明 CPT 可同时抑制癌细胞的

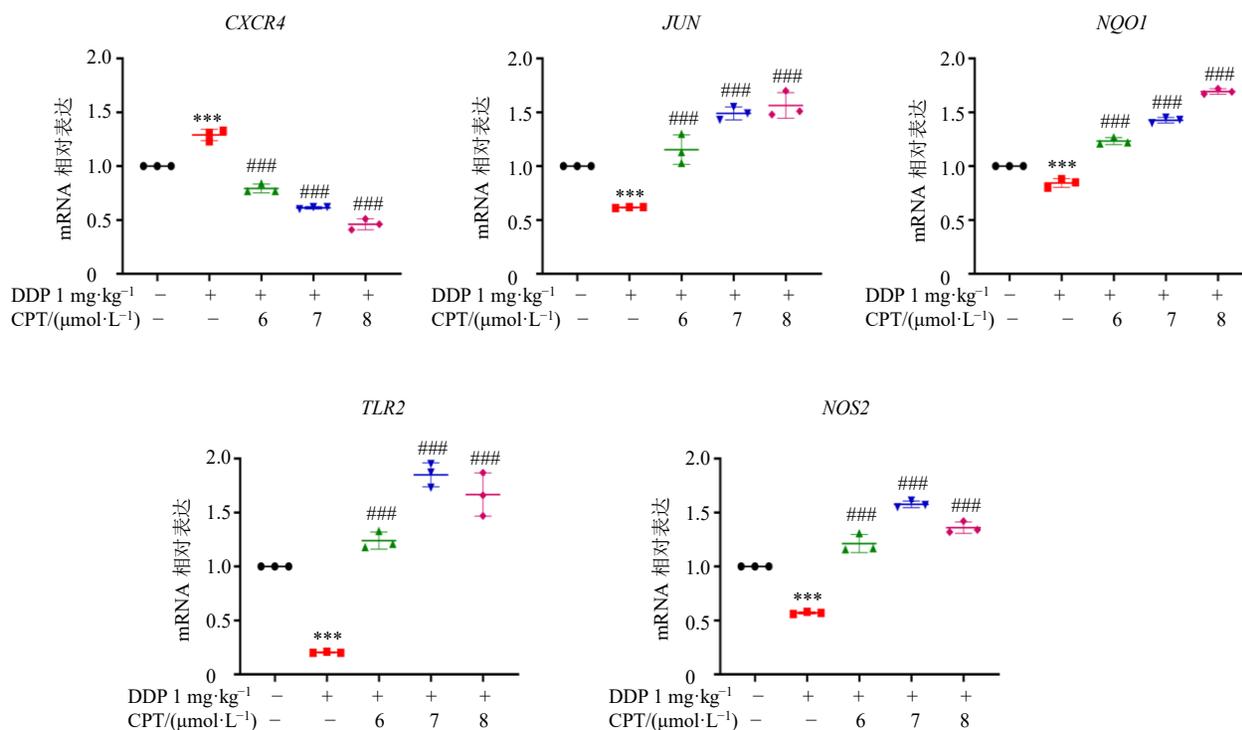


图 10 CPT 对 A2780/DDP 细胞的 *CXCR4*、*JUN*、*NQO1*、*TLR2*、*NOS2* 的基因表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of CPT on gene expression of *CXCR4*, *JUN*, *NQO1*, *TLR2*, *NOS2* in A2780/DDP cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

糖酵解和氧化磷酸化过程，有效地靶向癌细胞的能量代谢进而抑制其生长和存活^[27]；CPT 亦可同时降解原癌基因 *c-Myc* 和减弱黏着斑激酶（focal adhesion kinase, FAK）信号通路，协同抑制卵巢肿瘤的生长和转移^[28]。现有不少研究证实 CPT 具有改善肿瘤耐药的研究，李光慧等^[29]发现 CPT 可增强癌细胞对依托泊苷和氟尿嘧啶等多种抗肿瘤药物的敏感性，下调信号转导及转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, *STAT3*）靶基因从而增强阿霉素的化疗敏感性；Huang 等^[30]表明 CPT 可通过抑制癌症干细胞调节因子有效抑制癌症干燥性、化疗耐药性和致瘤性，同时可增加三阴乳腺癌对卡马替尼的敏感性。上述研究表明 CPT 在增强肿瘤细胞对化疗的敏感性方面具有巨大潜力，但具体机制存在争议。

本研究建立体外卵巢癌铂耐药模型，与 A2780 敏感株比较，DDP 对 A2780/DDP 细胞的增殖抑制能力明显弱于 A2780 细胞，其耐药指数为 4，与文献报道的耐药指数相近^[8]，表明 A2780/DDP 耐药细胞模型稳定。加入 5~10 μmol/L 的 CPT 干预后，细胞存活率结果表明 CPT 显著抑制 A2780/DDP 细

胞的增殖，提示 CPT 可以增加 DDP 对 A2780/DDP 细胞的增殖抑制能力。划痕实验和 Transwell 实验表明 CPT 联合 DDP 干预显著抑制 A2780/DDP 耐药株的迁移和侵袭。

转录组学结果表明，CPT 改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 的耐药性可能与 *NOS2*、*JUN*、*NQO1*、*TLR2*、*CXCR4* 等核心靶点相关。*NOS2* 是一氧化氮（nitric oxide, NO）亚型之一，在有活性的巨噬细胞中首次被发现^[31]，正常生理条件下，各组织的 *NOS2* 活性基本不表达，但可在干扰素、肿瘤坏死因子-α、脂多糖、白细胞介素-1 及炎症因子等细胞因子诱导下表达。孙永亮^[32]通过研究表明卵巢癌细胞表达 *NOS2*，*NOS2* 高表达的卵巢癌生存时间短，提示 *NOS2* 在卵巢癌的发生发展及患者生存预后发挥重要作用。李肖旋^[33]的研究表明 *NOS2* 在铂类耐药卵巢癌组织的表达量低于铂类敏感组。本研究结果与其类似，A2780/DDP 细胞在仅 DDP 干预下，其表达下调，而 CPT 联合干预下，*NOS2* 的表达上调，提示 CPT 可以通过上调 A2780/DDP 的 *NOS2* 表达改善对 DDP 的耐药性。*TLR2* 是 *TLR* 家族成员之一，该家族是最早被发现的天然免疫模式识别受

体,可识别微生物衍生的分子模式结构,引起受体的结构性变化,后通过髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 的募集反应,促进激酶类有丝分裂原激活蛋白的磷酸化,激活相应信号通路,调控相应基因的表达^[34]。徐娟等^[35]通过对卵巢癌患者和健康女性的血液进行分析,发现卵巢癌组 TLR2 的表达显著高于健康对照组,李玲等^[36]的研究发现 TLR9 可导致 SKOV3 对 DDP 耐药,提示 TLR 家族对卵巢癌及其耐药的发生发展有重要的意义。本研究 KEGG 富集结果同样证实 Toll 信号通路可能会是 CPT 逆转卵巢癌铂耐药细胞对 DDP 的耐药性的潜在机制之一,而 RT-qPCR 结果证明,TLR2 在 A2780/DDP 细胞中表达降低,而 CPT 可通过上调 TLR2 的表达,改善 A2780/DDP 细胞对 DDP 的耐药性。

NQO1 是一种黄素蛋白酶^[37],是人体重要的 II 相反应酶。其通过催化真核细胞内双电子还原反应,保护人体细胞对抗活性氧及其他氧化应激的损伤作用、稳定野生型肿瘤蛋白 (tumor protein 53, p53)、转换雌激素代谢产物。作为核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 重要的下游响应靶点之一, Nrf2/NQO1 信号通路已被证明在卵巢癌 DDP 耐药中发挥重要功效^[38]。张泽等^[39]研究发现丹参水提物可诱导 Nrf2 核转录,促进 NQO1 等下游基因的表达。本研究结果与之类似,在 CPT 干预下, NQO1 的表达显著升高,提示 CPT 可能通过影响 Nrf2/NQO1 信号通路,改善卵巢癌铂耐药细胞对 DDP 的耐药性。JUN 是 AP-1 的构成成分之一, AP-1 已被证实在妇科恶性肿瘤中发挥重要作用。Zhang 等^[40]研究表明 AP-1 转录因子信号通路的错误调节参与了卵巢癌的形成过程,其中 c-JUN 参与正向激活过程。大量研究表明 AP-1 表达失调是肿瘤治疗产生耐药现象的关键因素之一,在乳腺癌阿霉素耐药^[41]、吉非替尼非小细胞肺癌耐药^[42]、瑞戈非尼肝癌耐药^[43]等过程中均见到 c-JUN 异常表达。本研究通过 RT-qPCR 实验表明仅 DDP 干预下, A2780/DDP 细胞中 JUN 表达下调,而 CPT 联合干预下, JUN 表达显著上升,呈浓度依赖性。与沈霞等^[44]的研究发现丹参上调 AP-1 的表达结果一致。CXCR4 是趋化因子家族成员之一,其编码基因位于人类 2q21 染色体上,在膀胱尿路上皮癌、乳腺癌、胆管癌、胶质母细胞瘤等肿瘤中异常表达^[45]。Zhang 等^[46]比较卵巢癌组织和正常

组织以及不同病理类型卵巢癌组织中 CXCR 家族 mRNA 的表达,发现 CXCR4 mRNA 在卵巢癌组织中的表达高于正常卵巢组织,提示 CXCR4 是卵巢癌潜在的治疗靶点。陈昌贤等^[47]基于一系列卵巢癌化疗耐药与敏感基因芯片表达谱数据集进行生物信息学分析,结果发现 CXCR4 表达上调。本研究结果与之类似,在 DDP 单药干预下, CXCR4 表达上调,而加入 CPT 后, CXCR4 的 mRNA 表达水平显著下降,提示 CPT 可能通过抑制 CXCR4 的表达改善卵巢癌铂耐药细胞对 DDP 的耐药性。

综上, CPT 通过上调 JUN、TLR2、NOS2、NQO1 的表达,并抑制 CXCR4 的表达,影响 TLR 信号通路、AP-1 相关信号通路、Nrf2/NQO1 信号通路,促进 DDP 对 A2780/DDP 耐药细胞的增殖抑制作用、迁移和侵袭等肿瘤转移方面的抑制作用,起到使 A2780/DDP 细胞对 DDP 敏感而导致细胞活力、细胞迁移和侵袭能力下降之功效。本研究的创新点在于结合转录组测序和体外细胞模型,证明 CPT 可提高 A2780/DDP 细胞对顺铂的敏感性,并挖掘其潜在的作用机制。本研究可为 CPT 改善卵巢癌铂耐药提供新的靶点和通路,为深入研究丹参类中药成分在疾病动物及人体水平上的作用提供依据,有望提高治疗效果,延长患者的生存期,为临床治疗提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Richardson D L, Eskander R N, O'Malley D M. Advances in ovarian cancer care and unmet treatment needs for patients with platinum resistance: A narrative review [J]. *JAMA Oncol*, 2023, 9(6): 851-859.
- [2] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] Buechel M, Herzog T J, Westin S N, et al. Treatment of patients with recurrent epithelial ovarian cancer for whom platinum is still an option [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(5): 721-732.
- [4] Gökçe Kütük S, Gökçe G, Kütük M, et al. Curcumin enhances cisplatin-induced human laryngeal squamous cancer cell death through activation of TRPM2 channel and mitochondrial oxidative stress [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17784.
- [5] Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Orouei S, et al. Recent advances and future directions in anti-tumor activity of cryptotanshinone: A mechanistic review [J]. *Phytother*

- Res, 2021, 35(1): 155-179.
- [6] Wu Y H, Wu Y R, Li B, *et al.* Cryptotanshinone: A review of its pharmacology activities and molecular mechanisms [J]. *Fitoterapia*, 2020, 145: 104633.
- [7] 陈芯媛, 林小惠, 陈呐敏, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨中药调节卵巢癌铂耐药用药规律研究 [J]. *临床合理用药*, 2024, 17(7): 20-25.
- [8] 舒美玲, 吴悦, 叶映泉, 等. 华蟾素调控 PI3K/AKT 通路逆转卵巢癌 A2780/DDP 细胞顺铂耐药的作用机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(4): 671-677.
- [9] Adasme M F, Linnemann K L, Bolz S N, *et al.* PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W530-W534.
- [10] 孙承韬. 二氢丹参酮 I 调控 p62-Keap1-Nrf2 信号通路抑制卵巢癌生长的作用及机制研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2022.
- [11] An Q W, Wu M T, Yang C Q, *et al.* *Salviaemiltiorrhiza* against human lung cancer: A review of its mechanism (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(3): 139.
- [12] Wang H J, Zhang Y S, Zhang Y G, *et al.* Cryptotanshinone inhibits lung cancer invasion via microRNA-133a/matrix metalloproteinase 14 regulation [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 2554-2559.
- [13] 谭国耀, 蔡珮衡, 曹霖, 等. 隐丹参酮对肺癌细胞铁死亡相关基因表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(12): 1654-1659.
- [14] Chen Z M, Hu J, Xu Y M, *et al.* Cryptotanshinone inhibits cytotoxin-associated gene A-associated development of gastric cancer and mucosal erosions [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2021, 13(7): 693-705.
- [15] 马丽娟, 王锡恩, 张武广, 等. 隐丹参酮通过 miR-124 靶向调控 PKM2 基因表达抑制胃癌细胞的增殖和转移 [J]. *中草药*, 2020, 43(8): 1976-1979.
- [16] Fu X J, Zhao W W, Li K K, *et al.* Cryptotanshinone inhibits the growth of HCT116 colorectal cancer cells through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 653232.
- [17] Hashiguchi Y, Muro K, Saito Y, *et al.* Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2020, 25(1): 1-42.
- [18] 付晓菁. 隐丹参酮通过内质网应激-自噬途径诱导结肠癌细胞凋亡的机制研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- [19] 王贞丽, 王晓雯, 付晓菁, 等. 隐丹参酮对肝癌细胞凋亡和内质网应激的影响 [J]. *青岛大学学报: 医学版*, 2022, 58(4): 602-606.
- [20] 刘金丽, 佟雷, 罗焯, 等. 隐丹参酮可能具有诱导人肝癌 HepG2 细胞铁死亡的作用 [J]. *中国医学科学院学报*, 2021, 43(3): 366-370.
- [21] Luo Y, Song L, Wang X Y, *et al.* Uncovering the mechanisms of cryptotanshinone as a therapeutic agent against hepatocellular carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1264.
- [22] 赵珍. 隐丹参酮对 Hepal-6 细胞及其小鼠皮下移植瘤的抑制作用与机制的研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
- [23] Vundavilli H, Datta A, Chao S M, *et al.* Anti-tumor effects of cryptotanshinone (C₁₉H₂₀O₃) in human osteosarcoma cell lines [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 112993.
- [24] 徐亚梦, 冀全博, 张强, 等. 隐丹参酮下调 U2OS 骨肉瘤细胞血管内皮生长因子表达并抑制血管生成 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(1): 29-33.
- [25] Li H Y, Gao C D, Liang Q, *et al.* Cryptotanshinone is a intervention for ER-positive breast cancer: An integrated approach to the study of natural product intervention mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 592109.
- [26] 闫莉. 隐丹参酮通过铁死亡抑制三阴性乳腺癌的机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
- [27] Wang T, Zhang M M, Khan M, *et al.* Cryptotanshinone suppresses ovarian cancer via simultaneous inhibition of glycolysis and oxidative phosphorylation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 115956.
- [28] Guo H J, Zhang W J, Wang J X, *et al.* Cryptotanshinone inhibits ovarian tumor growth and metastasis by degrading c-Myc and attenuating the FAK signaling pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 959518.
- [29] 李光慧, 王利苹, 赵贝, 等. 隐丹参酮抗肿瘤活性与逆转化疗耐药作用的研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 29(2): 152-156.
- [30] Huang W C, Yen J H, Sung Y W, *et al.* Novel function of THEMIS2 in the enhancement of cancer stemness and chemoresistance by releasing PTP1B from MET [J]. *Oncogene*, 2022, 41(7): 997-1010.
- [31] 金春花, 刘文博, 关宏铜. 一氧化氮合酶各种亚型的信号通路对心力衰竭的作用机制与治疗的研究进展 [J]. *中国循环杂志*, 2017, 32(8): 830-832.
- [32] 孙永亮. NOS 调控 EMT 促卵巢癌细胞转移的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [33] 李肖璇. NOS1 调控 ABCG2 的表达促进卵巢癌细胞顺铂耐药的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [34] 柯嘉华, 陈丹蕾, 程魁. 靶向 Toll 样受体 2 的小分子调节剂研究进展 [J]. *药学学报*, 2023, 58(8): 2239-2249.
- [35] 徐娟, 王芳, 娄鉴芳, 等. TLR1、TLR2 和 TLR6 在卵巢癌患者 PBMC 细胞亚群中的表达和功能初探 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2014, 34(12): 1638-

- 1643.
- [36] 李玲, 李斌, 幸海燕, 等. 缺氧条件下人卵巢癌细胞对顺铂耐药与 TLR9 的关系研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(13): 1744-1747.
- [37] Siegel D, Ross D. Immunodetection of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(3/4): 246-253.
- [38] Xia C, Bai X P, Hou X Y, *et al.* Cryptotanshinone reverses cisplatin resistance of human lung carcinoma A549 cells through down-regulating Nrf2 pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(2): 816-824.
- [39] 张泽, 孟宇, 董世缘, 等. 丹参水提取物对野百合碱诱导大鼠肝窦阻塞综合征的抑制作用 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1567-1577.
- [40] Zhang Y P, Ali A, Xie J. Detection of clinically important *BRCA* gene mutations in ovarian cancer patients using next generation sequencing analysis [J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(10): 5005-5020.
- [41] Wang Y, Wan G H, Wu Y M, *et al.* AP-1 confers resistance to anti-cancer therapy by activating XIAP [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(18): 14124-14137.
- [42] Meng S Y, Wang G R, Lu Y, *et al.* Functional cooperation between HIF-1 α and c-Jun in mediating primary and acquired resistance to gefitinib in NSCLC cells with activating mutation of EGFR [J]. *Lung Cancer*, 2018, 121: 82-90.
- [43] Sasaki R, Kanda T, Fujisawa M, *et al.* Different mechanisms of action of regorafenib and lenvatinib on toll-like receptor-signaling pathways in human hepatoma cell lines [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3349.
- [44] 沈霞, 崔桂云, 张璐, 等. 丹参对大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区 AP-1 DNA 结合活性的影响 [J]. 江苏医药, 2004, 30(6): 422-424.
- [45] 王婧, 张兆君, 孙杰克, 等. 肿瘤微环境中的 CXCL12/CXCR4: 肿瘤治疗的靶点 [J]. 牡丹江医学院学报, 2023, 44(4): 122-125.
- [46] Zhang J, Huang S G, Quan L N, *et al.* Determination of potential therapeutic targets and prognostic markers of ovarian cancer by bioinformatics analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8883800.
- [47] 陈昌贤, 胡艳玲, 李力. 卵巢癌多药耐药相关基因的生物信息学分析 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(6): 492-496.

[责任编辑 罗曦]