

# 左旋紫草素对顺铂耐药人宫颈癌HeLa细胞的逆转作用研究<sup>Δ</sup>

杜春双<sup>1\*</sup>, 马亚妮<sup>2</sup>, 王 帅<sup>2</sup>, 张 飞<sup>1</sup>, 张 洁<sup>1</sup>, 桑广健<sup>1</sup>(1.天津医科大学肿瘤医院药学部/国家肿瘤临床医学研究中心/天津市肿瘤防治重点实验室/天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060; 2.天津医科大学药学院, 天津 300041)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)15-1867-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.15.13

**摘要** 目的:探讨左旋紫草素(L-SHK)对顺铂(DDP)耐药人宫颈癌HeLa细胞(HeLa/DDP)的逆转作用及其可能机制。方法:以人宫颈癌HeLa细胞株为研究对象,以DDP诱导获得HeLa/DDP耐药细胞;采用CCK-8法测定HeLa/DDP细胞的耐药指数以及不同剂量L-SHK(0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μmol/L)对该细胞的抑制率、半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)和逆转倍数;采用流式细胞术检测低、中、高剂量L-SHK(0.3、0.6、1.2 μmol/L)联合DDP对HeLa/DDP细胞周期及凋亡率的影响,采用Western blotting法检测低、中、高剂量L-SHK(0.3、0.6、1.2 μmol/L)联合DDP对HeLa/DDP细胞凋亡相关蛋白[剪切型胱天蛋白酶3(Cleaved caspase-3)、Bcl-2、Bax]表达的影响。结果:所得HeLa/DDP细胞的耐药指数为11.8。L-SHK对HeLa/DDP细胞的抑制率有随剂量增加而逐渐升高的趋势。与单用DDP比较,DDP+低、中、高剂量L-SHK组细胞的IC<sub>50</sub>值均显著降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );DDP+低、中、高剂量L-SHK组的逆转倍数分别为1.38、2.80、6.71。与空白对照组比较,各药物组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S期细胞比例,各剂量L-SHK联用组细胞的早期、晚期凋亡率及总凋亡率以及Bax、Cleaved caspase-3蛋白的表达量均显著升高;各药物组G<sub>2</sub>/M期细胞比例以及各剂量L-SHK联用组Bcl-2蛋白的表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。与DDP组比较,各剂量L-SHK联用组S期、G<sub>2</sub>/M期细胞比例和Bcl-2蛋白的表达量均显著降低;G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例,早期、晚期凋亡率及总凋亡率和Bax、Cleaved caspase-3蛋白的表达量均显著升高( $P < 0.05$ )。结论:HeLa/DDP细胞对DDP具有一定的耐药性,L-SHK可逆转这种耐药性。L-SHK和DDP联用可促进HeLa/DDP细胞凋亡,且作用强于DDP单用;这种作用可能与影响细胞周期、调控凋亡相关蛋白的表达有关。

**关键词** 人宫颈癌HeLa细胞;左旋紫草素;顺铂;耐药;凋亡;细胞周期;凋亡蛋白;逆转作用;机制

## Study on Reversal Effects of Levoshikonin on Cisplatin Resistance of Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

DU Chunshuang<sup>1</sup>, MA Yani<sup>2</sup>, WANG Shuai<sup>2</sup>, ZHANG Fei<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, SANG Guangjian<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital/National Clinical Research Center for Cancer/Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy/Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China; 2. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300041, China)

- [5] 邹清,谈唯,宁青,等.厚朴酚纳米晶体混悬剂的制备及质量评价[J].中国药房,2019,30(15):2037-2041.
- [6] 余佐彦,柯学,平其能,等.灯盏花素纳米混悬剂的制备及其大鼠体内药动学研究[J].中国天然药物,2007,5(1):50-55.
- [7] YANG X, MIAO X, CAO F, et al. Nanosuspension development of scutellarein as an active and rapid orally absorbed precursor of its BCS class IV glycoside scutellarin [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(11):3576-3584.
- [8] 田晓娜.一种新型三联苯衍生物的纳米混悬液的制备及体内外评价[D].济南:山东大学,2014.
- [9] 王丽丽,祝美华,刘正平,等.纳米混悬剂给药系统的研究进展[J].中国药房,2017,28(10):1415-1418.
- [10] 戎欣玉,宋红岩,王慧春,等.伊曲康唑纳米晶体的制备与表征[J].中国医院药学杂志,2017,37(10):916-921.
- [11] 付强,孙进,何仲贵.纳米结晶的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2010,27(12):952-960.
- [12] 常金花,薛禾菲,刘沛,等.薯蓣皂苷元纳米混悬液的制备[J].中成药,2017,39(9):1819-1824.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:121.
- [14] 贺凌云.吴茱萸次碱纳米混悬剂的构建、表征及体内评价[D].长沙:中南大学,2010.
- [15] 李炜.难溶性药物理化性质对其纳米混悬剂生物利用度的影响[D].沈阳:沈阳药科大学,2013.
- [16] ZHANG Y, ZHANG JH. Preparation of budesonide nanosuspensions for pulmonary delivery: characterization, in vitro release and in vivo lung distribution studies[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44(1):285-289.

Δ 基金项目:天津市卫生局科技基金资助项目(No.2015KZ087)

\* 副主任药师,硕士。研究方向:肿瘤药理学、临床药学。电话:022-23340123。E-mail:9150143@qq.com

(收稿日期:2020-03-19 修回日期:2020-05-22)

(编辑:唐晓莲)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the reversal effects and potential mechanism of levoshikonin (L-SHK) on cisplatin (DDP) resistance of human cervical carcinoma HeLa cells. METHODS: Human cervical carcinoma HeLa cells were used as research objects, and drug-resistant HeLa/DDP cells were induced by DDP. CCK-8 assay was used to determine drug resistance index of HeLa/DDP cells, the inhibition rate of different doses of L-SHK (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{mol/L}$ ) on cell proliferation,  $\text{IC}_{50}$  and the reversion index of L-SHK on HeLa/DDP cells. Effects of low, medium and high doses of L-SHK (0.3, 0.6, 1.2  $\mu\text{mol/L}$ ) combined with DDP on cell cycle and apoptosis rate were determined by flow cytometry. Western blotting assay was used to detect the effects of low, medium and high doses of L-SHK (0.3, 0.6, 1.2  $\mu\text{mol/L}$ ) combined with DDP on the expression of apoptosis-related protein (Cleaved caspase-3, Bcl-2 and Bax). RESULTS: The drug resistance index of HeLa/DDP cells was 11.8. The inhibition rate of L-SHK on HeLa/DDP cells increased with the increase of dose. Compared with DDP alone,  $\text{IC}_{50}$  of DDP+low-dose, medium-dose and high-dose L-SHK groups were decreased significantly, with a dose-dependent manner ( $P<0.05$ ). The reversion indexes were 1.38, 2.80, 6.71 in DDP+low-dose, medium-dose and high-dose L-SHK groups. Compared with blank control group, the proportion of cells at phase  $\text{G}_0/\text{G}_1$  and phase S in administration groups, as well as early and late apoptosis rate and total apoptosis rate of cells, the protein expression of Bax and Cleaved caspase-3 in L-SHK combination groups were increased significantly; the proportion of cells at phase  $\text{G}_2/\text{M}$  in administration group as well as the protein expression of Bcl-2 in L-SHK combination groups were decreased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with DDP group, the proportion of cells at phase S and  $\text{G}_2/\text{M}$  and the protein expression of Bcl-2 in L-SHK combination groups were significantly decreased; the proportion of cells at phase  $\text{G}_0/\text{G}_1$ , early and late apoptosis rate and total apoptosis rate, the protein expression of Bax and Cleaved caspase-3 in L-SHK combination groups were significantly increased ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: HeLa/DDP cells are resistant to DDP, and L-SHK can reverse the drug resistance. L-SHK combined with DDP can promote the apoptosis of HeLa/DDP cells, which is better than DDP alone. Its mechanism may be related to the influence of cell cycle and the regulation of apoptosis-related protein expression.

**KEYWORDS** Human cervical carcinoma HeLa cells; Levoshikonin; Cisplatin; Resistance; Apoptosis; Cell cycle; Apoptosis-related protein; Reversal effect; Mechanism

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤,发病率在全球女性常见恶性肿瘤中位居第3位,最新的统计显示,全球每年新发宫颈癌56.9万例,死亡约31.1万例<sup>[1-2]</sup>。化疗是当前治疗宫颈癌的主要手段,顺铂(Cisplatin,以下简称“DDP”)为宫颈癌化疗的一线用药。然而,由于DDP长期应用易导致耐药的发生,严重影响了宫颈癌的治疗效果<sup>[3]</sup>。由此可见,DDP耐药性问题是宫颈癌临床治疗中亟待解决的难题之一。紫草(*Arnebiae Radix*)为紫草科多年生草本植物新疆紫草[*Arnebia ecuchroma* (Royle) Johnst.]或内蒙紫草(*Arnebia guttata* Bunge)的干燥根,具有凉血、活血、解毒、透疹的功效,常用于治疗血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤等症<sup>[4]</sup>。紫草素(Shikonin,以下简称“SHK”)是从紫草中分离得到的一种天然萘醌类化合物。有研究证明,该化合物可抑制多种肿瘤细胞的增殖,并可通过促进肿瘤细胞凋亡和坏死等途径来发挥对肿瘤的治疗作用<sup>[5-6]</sup>。目前有新的研究表明,SHK对部分耐药肿瘤细胞具有一定的逆转作用,在耐药性卵巢癌、胶质母细胞瘤、肺癌等的治疗方面表现突出<sup>[7-11]</sup>。天然提取的SHK包含左旋体和右旋体两种旋光异构体,由于其右旋体不溶于水,故多以左旋紫草素(L-SHK)进行实验研究。本课题组前期研究显示,L-SHK联合DDP能够增强DDP对宫颈癌HeLa细胞的抑制作用<sup>[15]</sup>。基于此,本研究拟进一步研究L-SHK对DDP耐药宫颈癌细胞(HeLa/DDP)耐药性的影响及其可

能的分子机制,以期为耐药逆转剂的筛选以及SHK类化合物新药的开发奠定理论基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

31型 $\text{CO}_2$ 培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Eclipse TS100型显微镜/GPJ9-TS100-F型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);Epoch 2型微孔板分光光度计(美国BioTek公司);FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司);PowerPac型细胞电泳仪(美国Bio-Rad公司);C-DIGIT凝胶成像仪(美国LI-COR公司);MH1型微量振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);DK-8D型水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);PMC-060型迷你掌上离心机(日本Tomy公司);AC2-6S1Airstream II级A2型生物安全柜(美国SCCO公司);AB 135-S型十万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

### 1.2 药品与试剂

L-SHK对照品(天津一方科技有限公司,批号:AB072S,纯度: $>99\%$ );DDP注射液(江苏豪森药业集团有限公司,批号:601191902,规格:6 mL:30 mg);RP-MI 1640培养液、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为1181753、C2027005);含乙二胺四乙酸(EDTA)的0.25%胰酶(天津百诺克医药生物技术科技有限公司,批号:280514);不含ETDA的胰酶(美国Hyclone公司,批号:1715826);膜联蛋白V-硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annex-

in V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒、RNA 酶 A(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 C0080、R10030);CCK-8 检测试剂(日本 Dojindo 公司,批号:KN709);RIPA 细胞裂解液(美国 Sigma 公司,批号:C0157);兔抗人 Bax、Bcl-2、剪切型胱天蛋白酶 3(Cleaved caspase-3)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 ImmunoWay Biotechnology 公司,批号分别为 YM2631、YT0278、YC0002、YM2018);蛋白上样缓冲液、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 抗体(碧云天生物技术研究,批号:P0013、A0217);DC 蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司,批号 1702409);Western blotting 试验显影液、定影液(天津开发区宏丰科工贸有限公司);EC1 发光液由本实验室自制;二甲基亚砜(DMSO)等试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 细胞

人宫颈癌 HeLa 细胞系由天津市肿瘤医院公共实验室提供。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

称取 L-SHK 对照品 10 mg,溶于 DMSO 1 mL 中,制成浓度为 34.7  $\mu\text{mol/L}$  的 L-SHK 贮备液,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存;以 DDP 注射液作为 DDP 贮备液(5 g/L),于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷藏保存。

### 2.2 HeLa 细胞及 HeLa/DDP 细胞的培养

2.2.1 HeLa 细胞 取出冻存的 HeLa 细胞,在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中迅速融化,以 1 000 r/min 离心 5 min,沉淀加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(以下简称“完全培养基”)1 mL,吹打均匀后接种至培养皿中,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度条件下培养(培养条件下同)。观察细胞形态及数量,待细胞长满培养皿的 80% 时传代 1 次,具体操作如下:吸弃培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.5)清洗 1~2 次,加入含 EDTA 的 0.25% 胰酶、PBS 各 1 mL,消化 2~3 min,加入不含血清的 RPMI 1640 培养液终止消化,吹打制成细胞悬液,再按细胞悬液与培养液体积比 1:3 进行传代,培养,即得 HeLa 细胞。

2.2.2 HeLa/DDP 细胞 取出冻存的 HeLa 细胞按照“2.2.1”项下方法复苏后,加入完全培养基 1 mL,培养,待细胞长满培养皿的 80% 后按“2.2.1”项下方法传代,待传代细胞长至对数生长期时,将培养基更换为含 DDP 100  $\mu\text{g/L}$  的 RPMI 1640 培养液,继续培养 48 h 后,弃去原培养液,更换为完全培养基继续培养。待细胞长满培养皿的 80% 后同法传代,待传代细胞长至对数生长期时加入 DDP(质量浓度为前次培养的 2 倍),反复换药培养,直至 DDP 质量浓度达 100 mg/L(根据前期预试验结果确定),即得 HeLa/DDP 细胞。

### 2.3 HeLa/DDP 细胞耐药指数的检测

采用 CCK-8 法检测。取“2.2”项下对数生长期的

HeLa 和 HeLa/DDP 细胞适量,以 5 000 个/孔接种至 96 孔培养板中,培养 24 h 后,将细胞随机分为对照组(即 DDP 组)和不同剂量药物组。对照组加入完全培养基 100  $\mu\text{L}$ ,各药物组加入含 DDP 的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ (DDP 的最终质量浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 mg/L,剂量设置参考前期预试验所得 DDP 对非耐药细胞的作用浓度<sup>[9]</sup>),每组设 3 个复孔。培养 48 h 后,弃去培养基,每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ;培养 2.5 h 后,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的光密度(OD)值,在计算抑制率、半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )的基础上,计算 HeLa/DDP 细胞的耐药指数。抑制率=(1-试验组细胞 OD 值/对照组细胞 OD 值) $\times$ 100%;耐药指数=药物对耐药细胞的  $\text{IC}_{50}$ /药物对敏感细胞的  $\text{IC}_{50}$ (当耐药指数 $<$ 5 时,为低度耐药;当耐药指数为 5~15 时,为中度耐药;当耐药指数 $>$ 15 时,为高度耐药<sup>[16]</sup>)。上述试验重复 3 次(下同)。

### 2.4 L-SHK 对 HeLa/DDP 的增殖抑制作用及耐药逆转作用考察

2.4.1 L-SHK 对 HeLa/DDP 的增殖抑制作用 采用 CCK-8 法检测。取“2.2”项下对数生长期的 HeLa/DDP 细胞适量,以 5 000 个/孔接种至 96 孔培养板中,培养 24 h 后,将细胞随机分为对照组(即 DDP 组)和不同剂量药物组。对照组加入含 DDP 的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ (DDP 的最终质量浓度为 2 mg/L,剂量设置参考该药表观分布容积及“2.3”项下试验结果,下同),各药物组加入同时含 L-SHK 和 DDP 的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ (DDP 最终质量浓度均为 2 mg/L, L-SHK 的最终浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16  $\mu\text{mol/L}$ ;剂量设置参考前期预试验所得 L-SHK 对非耐药细胞的作用浓度<sup>[9]</sup>),每组设 3 个复孔。培养 48 h 后,弃去培养基,每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ;培养 2.5 h 后,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值,按“2.3”项下方法计算抑制率。

2.4.2 L-SHK 对 HeLa/DDP 的耐药逆转作用 采用 CCK-8 法测定。取“2.2”项下对数生长期的 HeLa/DDP 细胞适量,以 5 000 个/孔接种至 96 孔培养板中,培养 24 h 后,将细胞随机分为对照组(即 DDP 组)和不同剂量药物组。对照组加入含 DDP 的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ (DDP 的最终质量浓度为 2 mg/L),各药物组分别加入同时含 DDP 和 L-SHK 的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ (DDP 的最终质量浓度均为 2 mg/L,低、中、高剂量 L-SHK 的最终浓度分别为 0.3、0.6、1.2  $\mu\text{mol/L}$ ;剂量设置参考“2.4.1”项下结果及前期试验结果<sup>[15]</sup>,下同),每组设 3 个复孔。培养 48 h 后,弃去培养基,每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ;培养 2.5 h 后,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值,按“2.3”项下方法计算抑制率和  $\text{IC}_{50}$ ,并计算逆转倍数。逆转倍数=使用逆转剂前药物对细胞的  $\text{IC}_{50}$ /使用逆转剂后药物对细胞的  $\text{IC}_{50}$ 。

## 2.5 L-SHK联合DDP对HeLa/DDP细胞周期分布的影响考察

采用流式细胞术检测。取“2.2”项下对数生长期的HeLa/DDP细胞适量,以5 000个/孔接种于24孔培养板中,培养24 h后,将细胞分为空白对照组、DDP组以及DDP+低、中、高剂量L-SHK组。空白对照组加入完全培养基1 mL,各给药组加入含相应药物的完全培养基1 mL(DDP最终质量浓度均为2 mg/L,低、中、高剂量L-SHK的最终浓度分别为0.3、0.6、1.2  $\mu\text{mol/L}$ ),每组设3个复孔。培养48 h后,收集细胞,用4  $^{\circ}\text{C}$ 的PBS清洗2次后,置于4  $^{\circ}\text{C}$ 的70%乙醇中固定过夜;以1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,用预冷的PBS清洗2次,弃去上清液;每管加入PI试剂500  $\mu\text{L}$ ,同时加入RNA酶A使其最终质量浓度达100  $\mu\text{g/mL}$ ,于4  $^{\circ}\text{C}$ 染色15 min后,使用流式细胞仪测定各细胞周期的分布比例。

## 2.6 L-SHK联合DDP对HeLa/DDP细胞凋亡的影响考察

采用流式细胞术检测。取“2.2”项下对数生长期的HeLa/DDP细胞适量,以5 000个/孔接种于12孔培养板中,培养24 h后,按“2.5”项下方法分组、给药,每组设3个复孔。培养48 h后,用不含EDTA的胰酶消化,以1 000 r/min离心5 min后,弃去上清液,以PBS洗涤2次,收集细胞。每组细胞分别加入Annexin V-FITC结合液195  $\mu\text{L}$ ,轻轻重悬;再于暗室内加入Annexin V-FITC染色液5  $\mu\text{L}$ ,轻轻混匀;最后加入PI试剂5  $\mu\text{L}$ ,混匀,于室温避光孵育10 min后,使用流式细胞仪检测其早期、晚期凋亡率及总凋亡率。

## 2.7 L-SHK联合DDP对HeLa/DDP细胞凋亡相关蛋白表达的影响考察

采用Western blotting法检测。取“2.2”项下对数生长期的HeLa/DDP细胞适量,以5 000个/孔接种于12孔培养板中,培养24 h后,按“2.5”项下方法分组、给药,每组设3个复孔。培养48 h后,加入RIPA细胞裂解液100  $\mu\text{L}$ ,充分混匀,冰浴30 min,于4  $^{\circ}\text{C}$ 下以12 000 r/min离心20 min,收集上清液,以DC法测定蛋白含量。蛋白经上样缓冲液稀释后,于100  $^{\circ}\text{C}$ 下变性5 min。取变性后的蛋白样品适量,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压:80~180 V);电泳后,于80 V下转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上;以5%脱脂奶粉封闭1 h后,分别加入相应一抗(稀释度均为1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;用三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液清洗5 min $\times$ 3次,加入相应二抗(稀释度为1:5 000),室温孵育1 h;用TBST溶液清洗5 min $\times$ 3次,以ECL发光液显色处理后,置于凝胶成像仪上成像并采用Image J v1.7.0软件分析,以相应蛋白与内参 $\beta$ -actin的灰度值比值表示该蛋白的表达量。

## 2.8 统计学方法

采用SPSS 15.0软件对数据进行统计分析。数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 HeLa/DDP耐药细胞的耐药指数

DDP对HeLa/DDP细胞的 $\text{IC}_{50}$ 值为(35.82  $\pm$  0.34) mg/L,显著高于其对HeLa细胞的(3.04  $\pm$  0.43) mg/L( $P < 0.05$ );HeLa/DDP细胞的耐药指数为11.8,为中度耐药。

### 3.2 L-SHK对HeLa/DDP细胞的抑制及耐药逆转作用

3.2.1 L-SHK对HeLa/DDP细胞的抑制作用 L-SHK作用后HeLa/DDP细胞的抑制率见图1。由图1可见,L-SHK对HeLa/DDP细胞的抑制率有随剂量增加而逐渐升高的趋势,其 $\text{IC}_{50}$ 为3.92  $\mu\text{mol/L}$ 。结合上述结果并参考本课题组前期试验结果<sup>[15]</sup>,发现当L-SHK为0.3、0.6、1.2  $\mu\text{mol/L}$ 时,其对HeLa/DDP细胞的抑制作用较小,故以这3个浓度分别作为后续试验的低、中、高剂量。

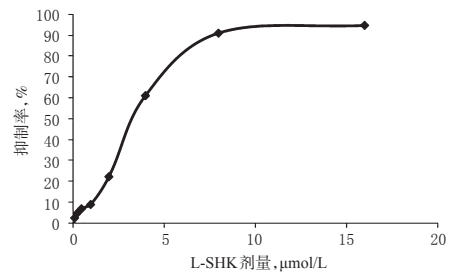


图1 L-SHK作用后HeLa/DDP细胞的抑制率

Fig 1 Inhibitory rate of L-SHK to HeLa/DDP cells

3.2.2 L-SHK对HeLa/DDP细胞的耐药逆转作用 L-SHK作用后HeLa/DDP细胞的 $\text{IC}_{50}$ 和逆转指数见表1。由表1可见,与DDP组比较,DDP+低、中、高剂量L-SHK组的 $\text{IC}_{50}$ 值均显著降低,且DDP+中、高剂量L-SHK组显著低于DDP+低剂量L-SHK组,DDP+高剂量L-SHK组显著低于DDP+中剂量L-SHK组( $P < 0.05$ ),呈剂量依赖性;DDP+低、中、高剂量L-SHK组的逆转倍数分别为1.38、2.80、6.71。

表1 L-SHK作用后HeLa/DDP细胞的 $\text{IC}_{50}$ 和逆转指数( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1  $\text{IC}_{50}$  and reversal index of L-SHK to HeLa/DDP cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$\text{IC}_{50}$ , mg/L	逆转倍数
DDP组	35.82 $\pm$ 0.84	
DDP+低剂量L-SHK组	25.88 $\pm$ 0.51 <sup>*</sup>	1.38
DDP+中剂量L-SHK组	12.79 $\pm$ 0.48 <sup>**</sup>	2.80
DDP+高剂量L-SHK组	5.34 $\pm$ 0.26 <sup>**†</sup>	6.71

注:与DDP组,\* $P < 0.05$ ;与DDP+低剂量L-SHK组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与DDP+中剂量L-SHK组比较,<sup>†</sup> $P < 0.05$

Note: vs. DDP group, \* $P < 0.05$ ; vs. DDP+low-dose L-SHK group, \* $P < 0.05$ ; vs. DDP+medium-dose L-SHK group, <sup>†</sup> $P < 0.05$

### 3.3 L-SHK 联合 DDP 对 HeLa/DDP 细胞周期的影响

与空白对照组比较,各药物组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S期细胞比例均显著升高,G<sub>2</sub>/M期细胞比例均显著降低( $P<0.05$ );与 DDP 组比较,DDP+低、中、高剂量 L-SHK 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例均显著升高,S期、G<sub>2</sub>/M期细胞比例均显著降低( $P<0.05$ ),详见图2、表2。

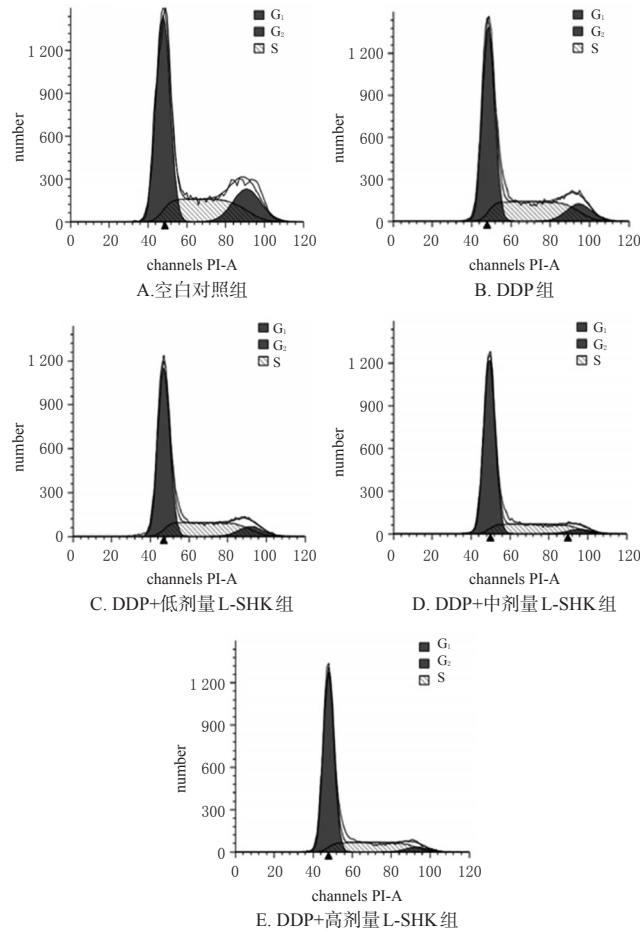


图2 L-SHK 联合 DDP 对 HeLa/DDP 细胞周期影响的流式细胞图

Fig 2 Flow cytometries of L-SHK combined with DDP on cell cycle of HeLa/DDP cells

表2 L-SHK 联合 DDP 对 HeLa/DDP 细胞周期分布比例的影响( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Tab 2 Effects of L-SHK combined with DDP on the cell cycle distribution ratio of HeLa/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> /M期
空白对照组	54.62 ± 1.38	28.15 ± 0.78	17.23 ± 0.53
DDP组	57.11 ± 1.84*	32.90 ± 1.47*	10.00 ± 0.43*
DDP+低剂量L-SHK组	63.65 ± 2.01**	29.38 ± 1.58**	6.96 ± 0.62**
DDP+中剂量L-SHK组	71.46 ± 1.97**	25.25 ± 0.86**	3.29 ± 0.41**
DDP+高剂量L-SHK组	74.19 ± 1.60**	23.29 ± 1.23**	2.52 ± 0.27**

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ;与 DDP 组比较,\*\* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$ ; vs. DDP group, \*\* $P<0.05$

### 3.4 L-SHK 联合 DDP 对 HeLa/DDP 细胞凋亡的影响

与空白对照组和 DDP 组比较,DDP+低、中、高剂量 L-SHK 组细胞的早期、晚期凋亡率及总凋亡率均显著升高( $P<0.05$ );而 DDP 组上述指标与空白对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),详见图3、表3。

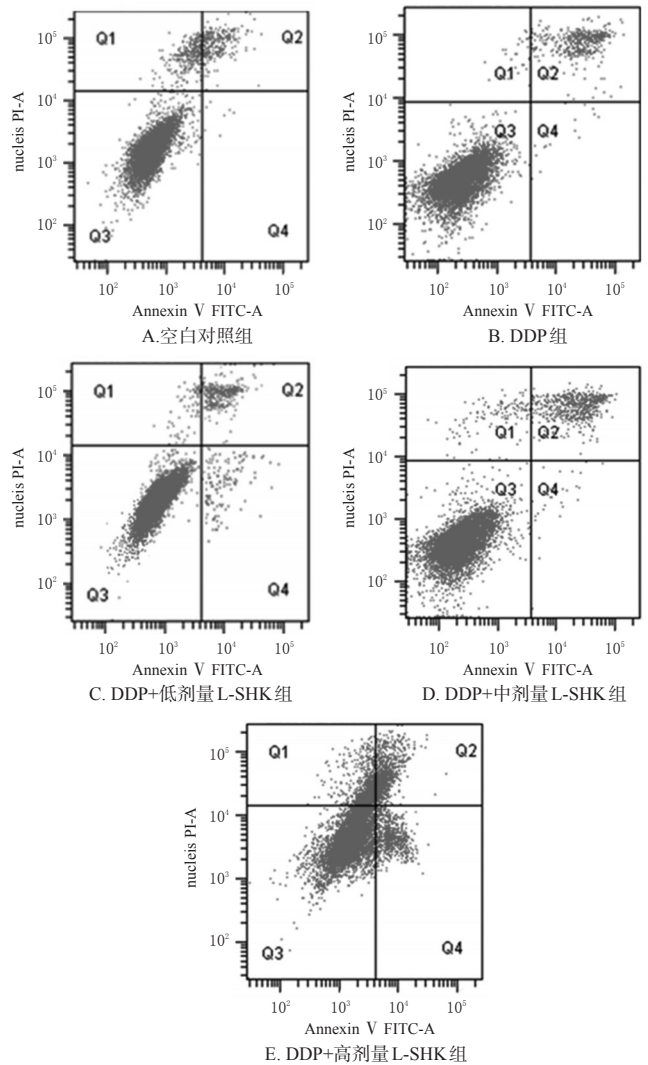


图3 L-SHK 联合 DDP 对 HeLa/DDP 细胞凋亡影响的流式细胞图

Fig 3 Flow cytometries of L-SHK combined with DDP on the apoptosis of HeLa/DDP cells

### 3.5 L-SHK 联合 DDP 对 HeLa/DDP 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与空白对照组和 DDP 组比较,DDP+L-SHK 联用组细胞中 Bcl-2 蛋白的表达量均显著降低,Bax、Cleaved caspase-3 蛋白的表达量均显著升高( $P<0.05$ );而 DDP 上述指标与空白对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),详见图4、表4。

## 4 讨论

近年来,有关 SHK 类化合物的研究报道日益增多,其作为肿瘤耐药治疗的增敏剂,可一定程度上逆转肿瘤

表3 L-SHK联合DDP对HeLa/DDP细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Tab 3 Effects of L-SHK combined with DDP on the apoptosis rate of HeLa/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
空白对照组	2.87±0.68	0.10±0.01	2.97±0.58
DDP组	3.08±0.46	0.11±0.01	3.20±0.43
DDP+低剂量L-SHK组	5.57±0.52**	0.53±0.33**	6.10±0.65**
DDP+中剂量L-SHK组	8.50±0.63**	1.23±0.47**	9.73±0.69**
DDP+高剂量L-SHK组	19.90±1.26**	3.93±0.72**	23.83±1.03**

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ;与DDP组比较,\*\* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$ ; vs. DDP group, \*\* $P<0.05$

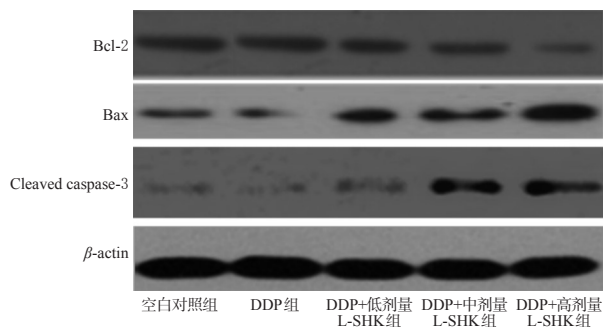


图4 L-SHK联合DDP对HeLa/DDP细胞凋亡相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 4 Electrophoretograms of the effects of L-SHK combined with DDP on expression of apoptosis-related proteins in HeLa/DDP cells

表4 L-SHK联合DDP对HeLa/DDP细胞凋亡相关蛋白表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 4 Effects of L-SHK combined with DDP on expression amount of apoptosis-related proteins in HeLa/DDP cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bcl-2	Bax	Cleaved caspase-3
空白对照组	0.82±0.06	0.45±0.02	0.12±0.00
DDP组	0.79±0.03	0.44±0.03	0.14±0.00
DDP+低剂量L-SHK组	0.70±0.04**	0.58±0.02**	0.23±0.01**
DDP+中剂量L-SHK组	0.69±0.04**	0.78±0.03**	0.75±0.03**
DDP+高剂量L-SHK组	0.38±0.02**	0.93±0.05**	0.78±0.02**

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ;与DDP组比较,\*\* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$ ; vs. DDP group, \*\* $P<0.05$

细胞的耐药性<sup>[9-12]</sup>,这一发现使得肿瘤治疗领域的研究有了新的突破。Shilnikova K等<sup>[7]</sup>研究了L-SHK对DDP耐药的人卵巢癌A2780细胞(A2780-CR)的毒性和迁移抑制作用,发现该化合物可增加耐药细胞线粒体膜去极化、上调上皮细胞钙黏蛋白表达、下调神经元钙黏蛋白表达,从而降低A2780-CR细胞的迁移能力,抑制该细胞的上皮间质转化。替莫唑胺(TMZ)是胶质母细胞瘤(GBM)常用的化疗药物,但其严重的耐药性影响了GBM的治疗效果;将SHK、TMZ联合处理GBM细胞后,

发现GBM细胞的增殖和迁移能力均有所减弱,基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9的表达均明显下调,并可通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路来减少GBM的复发<sup>[8]</sup>。Wang Y等<sup>[11]</sup>在研究SHK抗膀胱癌的作用机制时发现,与DDP单用相比,SHK与DDP联用对肿瘤细胞的杀伤效果更显著,作用机制可能与SHK可逆转膀胱癌细胞的DDP耐药有关。有研究显示,L-SHK可提高EGFR基因野生型非小细胞肺癌(NSCLC)患者应用厄洛替尼/吉非替尼的抗癌效果,且联用效果优于任一药物单用,其机制可能为通过激活活性氧(ROS)介导的内质网应激而诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[17]</sup>。

基于上述文献和本课题前期工作,本研究首先建立了DDP耐药HeLa细胞模型,发现DDP对HeLa/DDP细胞的IC<sub>50</sub>值为(35.82±0.34) mg/L,显著高于其对HeLa细胞的(3.04±0.43) mg/L;其耐药指数为11.8,提示该细胞耐药性为中等。本研究进一步探讨了不同剂量L-SHK对HeLa/DDP细胞增殖的抑制和耐药逆转作用。结果显示,不同剂量L-SHK对HeLa/DDP细胞的抑制作用有随剂量增加而逐渐增强的趋势;与DDP单用相比,联用低、中、高剂量L-SHK后,其对HeLa/DDP细胞的IC<sub>50</sub>值均显著降低,且具有剂量依赖性;其逆转倍数分别为1.38、2.80、6.71,提示L-SHK具有一定的耐药逆转活性。

前期研究结果显示,L-SHK与DDP联用可明显抑制HeLa细胞增殖、促进细胞凋亡<sup>[15]</sup>。在此基础上,本研究进一步探讨了L-SHK与DDP联用对HeLa/DDP细胞周期及凋亡情况的影响。结果显示,与空白对照组比较,各药物组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S期细胞比例以及各剂量L-SHK联用组细胞早期、晚期凋亡率及总凋亡率均显著升高,各药物组G<sub>2</sub>/M期细胞比例均显著降低;且各剂量L-SHK联用组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例以及早期、晚期凋亡率及总凋亡率均显著高于DDP组,S期、G<sub>2</sub>/M期细胞比例均显著低于DDP组。这提示与单用DDP比较,联用L-SHK可抑制细胞周期由G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期向S期、G<sub>2</sub>/M期的转换,从而促进细胞凋亡。

为进一步研究L-SHK促进HeLa/DDP细胞凋亡的可能机制,本研究采用Western blotting法检测了凋亡相关蛋白的表达情况。促进细胞凋亡是抗肿瘤药物发挥治疗效果的重要途径之一,且在凋亡过程中均伴有Caspase-3家族的激活;该家族激活后,Caspase-3转变为Cleaved caspase-3,后者表达越多,则表明细胞凋亡比例越高<sup>[18]</sup>。Bcl-2和Bax是细胞凋亡的重要调节因子,其中Bcl-2发挥抗凋亡作用,而Bax发挥促凋亡作用<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,与空白对照组和DDP组比较,各剂量L-SHK联用组细胞中Bcl-2蛋白的表达量均显著降低,

Bax、Cleaved caspase-3 蛋白的表达量均显著升高。这提示 L-SHK 可通过上调 Bax、Cleaved caspase-3 蛋白和下调 Bcl-2 蛋白的表达来促进耐药细胞 HeLa/DDP 的凋亡,且这种作用强于 DDP 单用,与许静等<sup>[20]</sup>的研究结果基本一致。

综上所述,L-SHK 联合 DDP 可逆转卵巢癌细胞 HeLa/DDP 的耐药性,其作用可能是通过影响细胞周期、调控凋亡相关蛋白的表达来实现的。但本研究并未对具体的作用机制以及其他相关因子(如 P-糖蛋白、信号转导及转录激活蛋白 1、M2 型丙酮酸激酶等)进行探讨,故有待后续研究进一步完善。

## 参考文献

[1] 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.

[2] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7-30.

[3] 刘红,张国楠.宫颈癌化疗耐药相关问题[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2015, 31(3):198-201.

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版:北京:中国医药科技出版社, 2015:340.

[5] 杨武斌,罗晓玲,胡娟,等.紫草抗肿瘤活性成分及作用机制研究现状[J]. *解放军药学学报*, 2017, 33(4):359-362.

[6] LUO H, VONG CT, CHEN H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine[J]. *Chin Med*, 2019. DOI: 10.1186/s13020-019-0270-9.

[7] SHILNIKOVA K, PIAO MJ, KANG KA, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and attenuates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4):5417-5424.

[8] MATIAS D, BALÇA-SILVA J, DUBOIS L G, et al. Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition[J]. *Cell Oncol: Dordr*, 2017, 40(3):247-261.

[9] TANG JC, REN YG, ZHAO J, et al. Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/STAT3/cyclinD1 signal pathway[J]. *Life Sci*, 2018. DOI: 10.1016/j.

lfs.2018.05.012.

[10] LI B, YUAN Z, JIANG J, et al. Anti-tumor activity of Shikonin against afatinib resistant non-small cell lung cancer via negative regulation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Biosci Rep*, 2018. DOI: 10.1042/BSR20181693.

[11] WANG Y, HAO F, NAN Y, et al. PKM2 inhibitor shikonin overcomes the cisplatin resistance in bladder cancer by inducing necroptosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(13):1883-1891.

[12] MIRZAEI SA, REIISI S, TABARI PG, et al. Broad blocking of MDR efflux pumps by acetylshikonin and acetoxyisovalerylshikonin to generate hypersensitive phenotype of malignant carcinoma cells[J]. *Sci Rep*, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-21710-5.

[13] HSIEH Y, LIAO C, CHEN W, et al. Shikonin inhibited migration and invasion of human lung cancer cells via suppression of c-Met mediated epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12):4639-4651.

[14] LIU X, SUN G. Shikonin enhances adriamycin antitumor effects by inhibiting efflux pumps in A549 cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4):4270-4276.

[15] 杜春双,王帅,张飞,等.左旋紫草素联合顺铂对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用及其作用机制[J]. *沈阳药科大学学报*, 2018, 35(3):232-237.

[16] 沙慧芳,孙强玲,杨晓华.耐紫杉醇肺癌细胞 BNX 动物模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(12):1296-1299.

[17] LI Y, HU X, LI Q, et al. Shikonin sensitizes wild-type EGFR NSCLC cells to erlotinib and gefitinib therapy[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4):3882-3890.

[18] ZHANG R, SHI H, REN F, et al. The aberrant upstream pathway regulations of CDK1 protein were implicated in the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells[J]. *J Ovarian Res*, 2017. DOI:10.1186/s13048-017-0356-x.

[19] OU L, LIN S, SONG B, et al. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis[J]. *Int J Nanomed*, 2017. DOI:10.2147/IJN.S140526.

[20] 许静,郭哲,王秋宇,等.紫草素对卵巢癌细胞 SKOV3/DDP 顺铂耐药的逆转作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(9):1616-1621.

(收稿日期:2020-01-07 修回日期:2020-05-11)

(编辑:张元媛)