

丹参酮 II_A 对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响及相关机制研究

吴春霞, 樊晨星, 王秀艳, 袁松, 李昆*

锦州医科大学附属第一医院 检验科, 辽宁 锦州 121001

摘要: 目的 探讨丹参酮 II_A 对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响及相关机制。方法 分别用丹参酮 II_A、阿霉素、阿霉素+丹参酮 II_A 干预人乳腺癌 MCF-7 和阿霉素耐药的 MCF-7 (MCF-7/dox) 细胞, 采用 MTS 法检测细胞增殖率, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 划痕实验观察细胞迁移能力, Western blotting 法检测腺瘤样结肠息肉易感蛋白 (APC)、 β -catenin、钙黏附蛋白 E (E-cadherin)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、MMP-9 蛋白的表达。结果 丹参酮 II_A 能明显增强阿霉素对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞的增殖抑制、迁移抑制和诱导凋亡作用; 与阿霉素敏感的 MCF-7 细胞比较, MCF-7/dox 细胞中 APC 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), β -catenin 蛋白表达水平显著提高 ($P < 0.05$); 与单用阿霉素比较, 阿霉素与丹参酮 II_A 联合使用能明显上调 MCF-7 及 MCF-7/dox 细胞内 APC 及 E-cadherin 表达水平 ($P < 0.05$), 下调 β -catenin、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。结论 APC/ β -catenin 信号通路参与了乳腺癌细胞阿霉素耐药的发生; 丹参酮 II_A 能够通过调控 APC/ β -catenin 信号通路增强乳腺癌细胞对阿霉素化疗的敏感性。

关键词: 丹参酮 II_A; 阿霉素; 乳腺癌; 腺瘤样结肠息肉易感蛋白; β -catenin; 耐药

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)07-1657-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.024

Effect of tanshinone II_A on chemosensitivity of doxorubicin in breast cancer cells and its related mechanisms

WU Chun-xia, FAN Chen-xing, WANG Xiu-yan, YUAN Song, LI Kun

Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China

Abstract: Objective To assess the effect of tanshinone II_A on the chemosensitivity of doxorubicin in breast cancer cells and investigate its related mechanisms. **Methods** MCF-7 and MCF-7/dox cells were respectively treated with tanshinone II_A, doxorubicin, and doxorubicin combined with tanshinone II_A. MTS assay was used to detect cell proliferation; Flow cytometry was used to analyze cell apoptosis; Scratch assay was used to evaluate cell migration; Western blotting was used to detect the expressions of APC, β -catenin, E-cadherin, MMP-2, and MMP-9. **Results** Tanshinone II_A could significantly enhance the inhibitory effects of doxorubicin on cell proliferation and migration of MCF-7 and MCF-7/dox cells and the effect of doxorubicin on inducing cell apoptosis. Compared to MCF-7 cells, the protein expression of APC in MCF-7/dox cells was significantly decreased ($P < 0.05$) while the expression of β -catenin in MCF-7/dox cells was significantly increased ($P < 0.05$). Compared to treatment with doxorubicin alone, combined treatment of doxorubicin and tanshinone II_A could significantly up-regulate the protein expression of APC and E-cadherin ($P < 0.05$) and down-regulate the protein expression of β -catenin, MMP-2, and MMP-9 ($P < 0.05$). **Conclusion** The APC/ β -catenin pathway was involved in the development of doxorubicin resistance in breast cancer cells. Tanshinone II_A enhanced the chemosensitivity of doxorubicin in breast cancer cells through regulating APC/ β -catenin pathway.

Key words: tanshinone II_A; doxorubicin; breast cancer; APC; β -catenin; drug resistant

乳腺癌已经成为严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一。目前乳腺癌的治疗仍然以手术为主, 化疗、放疗和内分泌疗法为辅。随着抗癌药物的不断问世,

使化疗在乳腺癌的综合治疗中占有重要的地位。阿霉素作为乳腺癌常用一线化疗药物, 在具有良好抗肿瘤效果的同时也产生很多的毒副作用, 如造血抑

收稿日期: 2019-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303255)

作者简介: 吴春霞 (1995—), 女, 在读研究生, 研究方向为中药抗肿瘤药理。Tel: 18341654156 E-mail: 2642324585@qq.com

*通信作者 李昆, 女。Tel: 13841621869 E-mail: lklszlym@163.com

制、免疫力降低、心脏毒性等,其中以心脏毒性最为明显。不仅如此,随着用药时间的延长,患者也容易对阿霉素甚至与其结构无关、作用机制不同的其他化疗药物产生耐药性^[1]。因此,如何在增加阿霉素化疗敏感性的同时降低其毒副作用成为研究热点。丹参酮 II_A 为我国传统中药丹参的主要有效成分,研究显示丹参酮 II_A 不仅具有良好的心血管保护作用^[2-3],同时还能通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、干扰肿瘤细胞周期及相关信号转导通路等起到抗肿瘤作用^[4-8]。由于阿霉素对心肌的毒副作用正是丹参酮 II_A 参与治疗的重点之处,因此,很多学者评估了丹参酮 II_A 对阿霉素引起的心脏毒性的影响。研究结果显示,丹参酮 II_A 可以降低阿霉素引起的毒副作用,但关于阿霉素联合丹参酮 II_A 抗肿瘤效果的研究少有报道^[9-11]。因此,本研究选用丹参酮 II_A 为研究对象,探讨其对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响及相关机制。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌 MCF-7 和阿霉素耐药的 MCF-7(MCF-7/dox) 细胞均购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 药材与试剂

DMEM 高糖培养基、青链霉素均购于美国 Hyclone 公司;胎牛血清购于德国 Serana 公司;丹参酮 II_A 粉末(批号 JL1806010006,质量分数≥98%)购于上海江莱生物科技公司,DMSO 溶解分装后,于-20℃贮存;阿霉素粉末(批号 02130102,质量分数≥98%)购于山西普德药业股份有限公司,无菌水溶解分装后,放-20℃保存;磷酸盐缓冲液(PBS)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司;MTS 细胞增殖试剂盒购于美国 Bio Vision 公司;细胞凋亡检测试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司;二甲基亚砷(DMSO)购于美国 Sigma 公司;小牛血清白蛋白购于北京 Solarbo 科技有限公司;GAPDH、腺瘤样结肠息肉易感蛋白(APC)、β-catenin、钙黏附蛋白 E(E-cadherin)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 抗体均购于沈阳万类生物科技有限公司。

1.3 仪器

CO₂ 孵育箱购于 Thermo 科技有限公司;酶标仪购于 BioTek 公司;流式细胞仪购于美国 BD 公司;数显恒温水浴箱购于江苏金坛医疗厂;倒置显微镜购于徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;立式压

力蒸汽灭菌器购于上海实业博迅有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞培养于含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 DMEM 高糖培养液中,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,根据细胞生长情况,每隔 1~2 天换 1 次液体,待细胞长满时进行传代或冻存。MCF-7/dox 细胞在培养过程中需用 3.68 μmol/L 的阿霉素培养来维持耐药性,于实验前 1 周对其进行脱药培养。

2.2 MTS 法检测丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖的影响

取 2~3 次传代后对数生长期细胞,用 0.25%胰蛋白酶进行消化制成细胞密度为 1×10⁵ 个/mL 的悬液,以每孔 100 μL 铺于 96 孔板中,设空白组、对照组和丹参酮 II_A 各浓度组,于 37℃、5% CO₂ 的环境中培养 24 h,吸去板中旧液,加入事先用无血清 DMEM 高糖培养基稀释的丹参酮 II_A 溶液,使其终浓度为 0.035、0.070、0.140、0.210、0.280、0.350、1.700、3.500、17.000 μmol/L,继续培养 24 h 后,采用 MTS 法检测细胞增殖率。于 490 nm 检测吸光度(A)值。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

因丹参酮 II_A 本身具有抗肿瘤作用,为了更好地评估其对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响,选用对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞生长没有影响的无毒剂量(临界浓度)的丹参酮 II_A 用于后续实验。

2.3 MTS 法检测丹参酮 II_A 对阿霉素抑制乳腺癌 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖的影响

取 2~3 次传代后对数生长期细胞,用 0.25%胰蛋白酶进行消化制成细胞密度为 1×10⁵ 个/mL 的悬液,以每孔 100 μL 铺于 96 孔板中,于 37℃、5% CO₂ 的环境中培养 24 h,分别以阿霉素 0.46、0.92、1.84、2.76、3.68、4.60 μmol/L 和阿霉素各浓度联合丹参酮 II_A 0.07 μmol/L 处理 MCF-7 细胞;分别以阿霉素 3.68、7.36、14.72、22.08、29.44、44.16 μmol/L 和阿霉素各浓度联合丹参酮 II_A 0.07 μmol/L 处理 MCF-7/dox 细胞,作用 24 h 后,采用 MTS 法检测细胞增殖率并计算增敏倍数。

$$\text{增敏倍数} = \text{IC}_{50} \text{阿霉素-联合用药前} / \text{IC}_{50} \text{阿霉素-联合用药后}$$

2.4 流式细胞术检测丹参酮 II_A 对阿霉素抑制乳腺癌细胞凋亡的影响

取 2~3 次传代后对数生长期 MCF-7 和 MCF-7/

dox 细胞, 用 0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 以每孔 3×10^5 个细胞铺于 6 孔板中, 于 37°C 、5% CO_2 的环境中培养 24 h, 分别以阿霉素 $3.68 \mu\text{mol/L}$ 、阿霉素 $3.68 \mu\text{mol/L}$ 联合丹参酮 II_A $0.07 \mu\text{mol/L}$ 处理 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞, 另设不加药物的对照组, 作用 24 h 后用 0.25%胰酶消化, PBS 洗 2 遍, $1\ 200 \text{ r/min}$ 离心 8 min, 以 Binding buffer $500 \mu\text{L}$ 重悬细胞, 加入 $5 \mu\text{L}$ AnnexinV-FITC 和 $10 \mu\text{L}$ Propidium Iodide 混匀, 室温避光 15 min, 于 1 h 内采用流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化。

2.5 划痕实验检测丹参酮 II_A 对阿霉素抑制乳腺癌细胞迁移的影响

取 2~3 次传代后对数生长期 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞, 用 0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 以相同细胞数铺于 6 孔板中, 于 37°C 、5% CO_2 环境中培养, 以第 2 天长成单层为宜。待细胞长成单层, 用 $100 \mu\text{L}$ 枪头在每个孔中划“+”字, 弃去旧液, 划落细胞用 PBS 洗净, 每孔中加入 2 mL 不含血清的 DMEM 高糖培养基, 用封口膜封好, 在普光显微镜下进行加药前的拍照, 拍照时让划痕统一呈垂直方向。拍照后分别以阿霉素、阿霉素联合无毒剂量丹参酮 II_A 处理 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞, 且 2 种细胞各留 1 组不加药作对照组。因为划痕实验要保持一定的细胞密度, 所以选择阿霉素浓度为 IC_{10} 浓度, MCF-7、MCF-7/dox 细胞选用的阿霉素浓度分别为 0.18 、 $9.0 \mu\text{mol/L}$, 于加药后 24、48 h 后重新进行拍照。

2.6 Western blotting 检测 APC、 β -catenin、E-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平

取培养于 10 cm 培养皿内对数生长期的 MCF-7

和 MCF-7/dox 细胞, 用 0.25%胰酶消化后按 1:2 传代, 于第 2 天进行加药处理。设对照组、阿霉素 ($3.68 \mu\text{mol/L}$) 组、阿霉素 ($3.68 \mu\text{mol/L}$) 联合丹参酮 II_A ($0.07 \mu\text{mol/L}$) 组, 药物作用 24 h 后, 收样于 EP 管中, $5\ 500 \text{ r/min}$ 离心 4 min, 加入裂解液涡旋混匀后于冰上静置 30 min 裂解, 置于 4°C 、 $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 25 min, 吸取上清即为总蛋白, 对收集的各组蛋白进行定量, 使其终质量浓度相同。取等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜上, BSA 封闭 1 h, 加入一抗 APC、 β -catenin、E-cadherin、MMP-9 (1:500) 和 MMP-2 (1:1 500) 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜, 加相应二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 使用超敏化学发光检测试剂盒对其进行显色, 利用自动电泳凝胶成像仪采集图像, 待显出条带后, 进行分析。

2.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行处理分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立样本进行比较时采用 t 检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖的影响

如图 1 所示, 浓度不高于 $0.07 \mu\text{mol/L}$ 的丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖无影响。当丹参酮 II_A 浓度高于 $0.07 \mu\text{mol/L}$ 时, 随着丹参酮 II_A 浓度的增加, 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用越明显。因丹参酮 II_A 本身具有抗肿瘤作用, 为了更好地评估其对阿霉素抗乳腺癌细胞活性的影响, 应排除丹参酮 II_A 本身的抗肿瘤作用, 因此后续选用丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖没有影响的无毒剂量 (临界浓度) $0.07 \mu\text{mol/L}$ 进行实验。

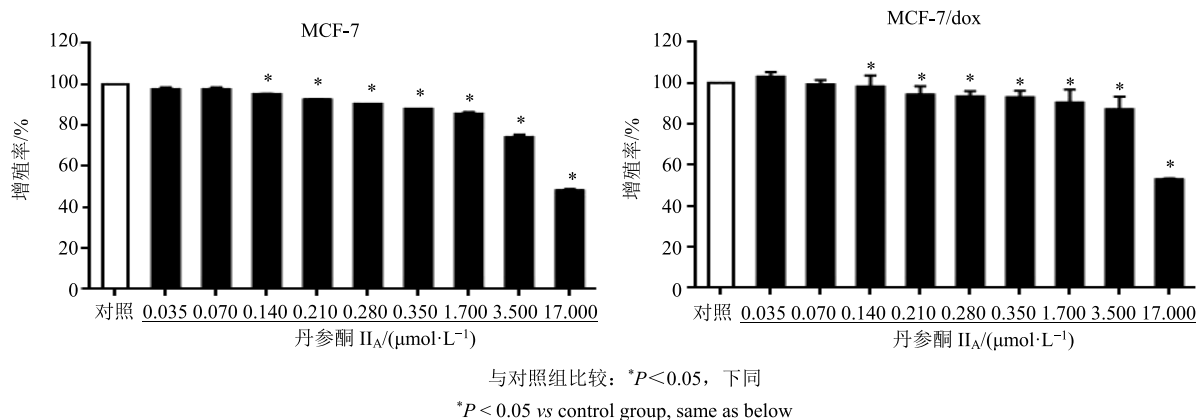


图 1 丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of tanshinone II_A on proliferation of MCF-7 and MCF-7/dox cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 丹参酮 II_A 对阿霉素抑制 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖的影响

如图 2 所示, 与单用阿霉素相比, 阿霉素与丹参酮 II_A 联合会更明显地抑制 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖。在 MCF-7 细胞中, 丹参酮 II_A 将阿霉素的化疗敏感性提高到 1.40 ± 0.16 倍, 在 MCF-7/dox 细胞中, 丹参酮 II_A 将阿霉素的化疗敏感性提高到 1.78 ± 0.09 倍。与阿霉素敏感的 MCF-7 细胞比较, 丹参酮 II_A 提高 MCF-7/dox 细胞化疗敏感性的作用更明显 ($P < 0.05$)。

根据阿霉素对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 选取阿霉素

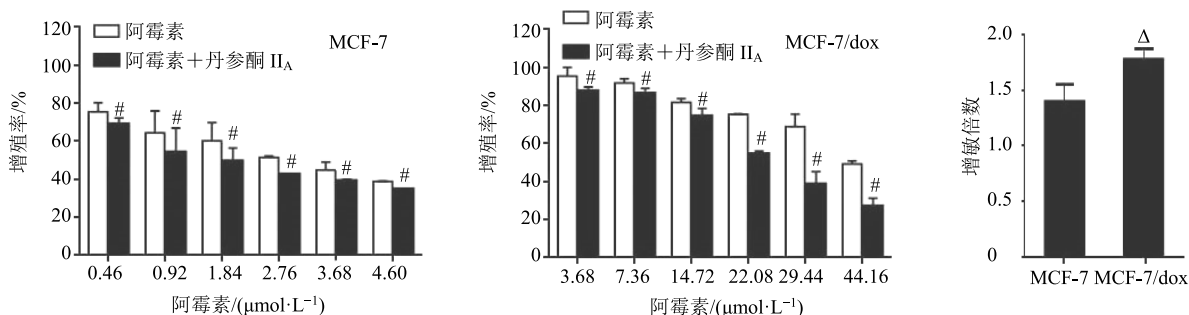
浓度 $3.68 \mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。

3.3 丹参酮 II_A 对阿霉素诱导 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞凋亡的影响

如图 3 所示, 与单用阿霉素相比, 阿霉素与丹参酮 II_A 联合使用会更明显诱导 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞凋亡, 其中以诱导早期凋亡作用最为明显 ($P < 0.05$)。

3.4 丹参酮 II_A 对阿霉素抑制 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞迁移的影响

如图 4 所示, 与单用阿霉素比较, 阿霉素与丹参酮 II_A 联合使用明显抑制 MCF-7 和 MCF-7/dox 细



与阿霉素组比较: # $P < 0.05$; 与 MCF-7 细胞比较: $\Delta P < 0.05$, 下同
$P < 0.05$ vs doxorubicin group; $\Delta P < 0.05$ vs MCF-7 cells, same as below

图 2 丹参酮 II_A 对阿霉素抑制乳腺癌 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of tanshinone II_A on proliferation of MCF-7 and MCF-7/dox cells inhibited by doxorubicin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

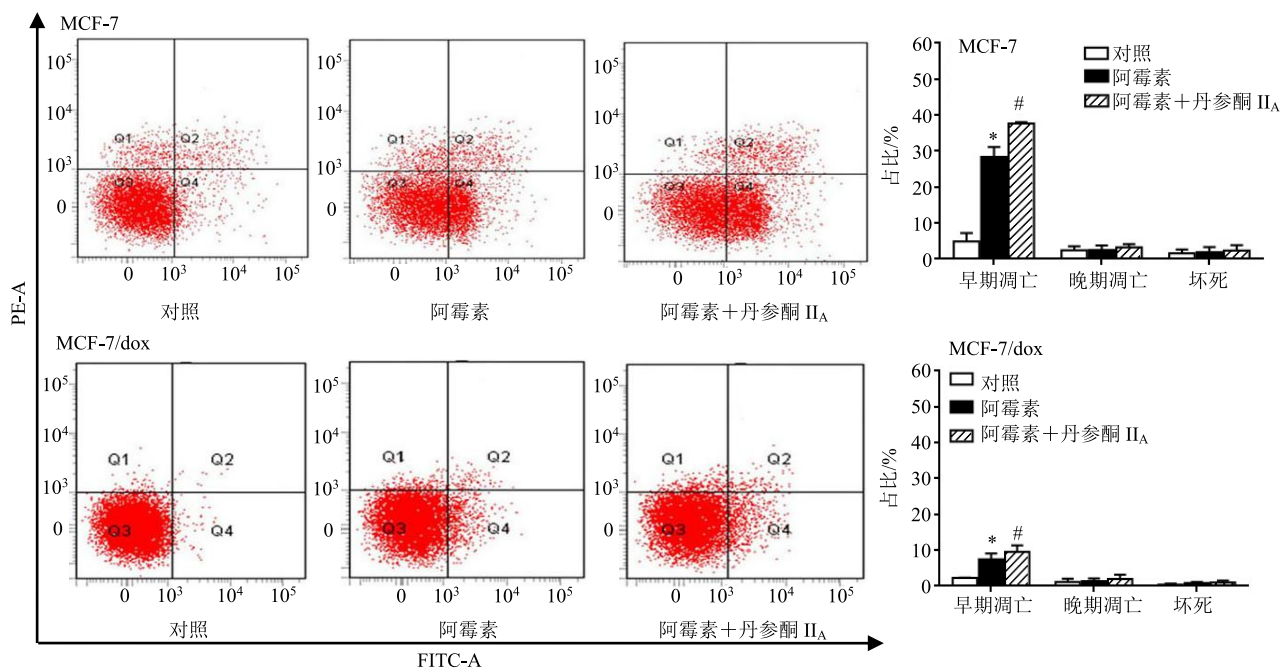


图 3 丹参酮 II_A 对阿霉素诱导 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of tanshinone II_A on apoptosis of MCF-7 and MCF-7/dox cells induced by doxorubicin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

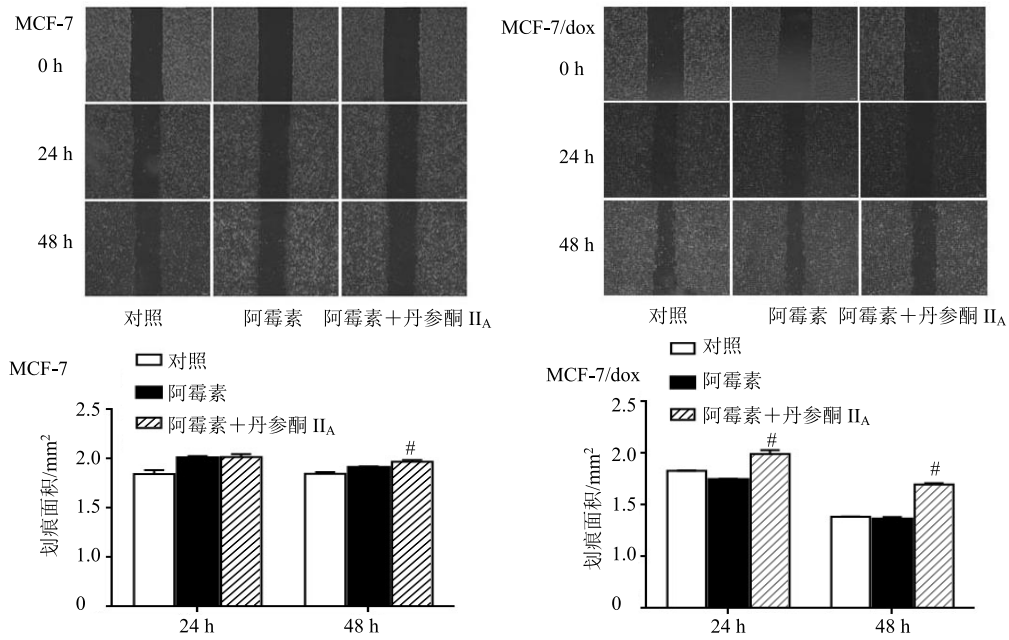


图 4 丹参酮 II_A 对阿霉素抑制 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of tanshinone II_A on migration of MCF-7 and MCF-7/dox cells inhibited by doxorubicin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞的迁移。在阿霉素敏感的 MCF-7 细胞中，药物作用 24 h 后对细胞迁移抑制作用不明显，48 h 后才会明显抑制细胞迁移 ($P < 0.05$)；而在 MCF-7/dox 细胞中，药物作用 24 h 后就能明显抑制细胞迁移，随着用药时间延长，抑制作用越明显 ($P < 0.05$)。

3.5 丹参酮 II_A 对 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞中 APC、 β -catenin、E-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

如图 5 所示，与阿霉素敏感的 MCF-7 细胞比较，APC 蛋白在 MCF-7/dox 细胞中表达水平显著降低

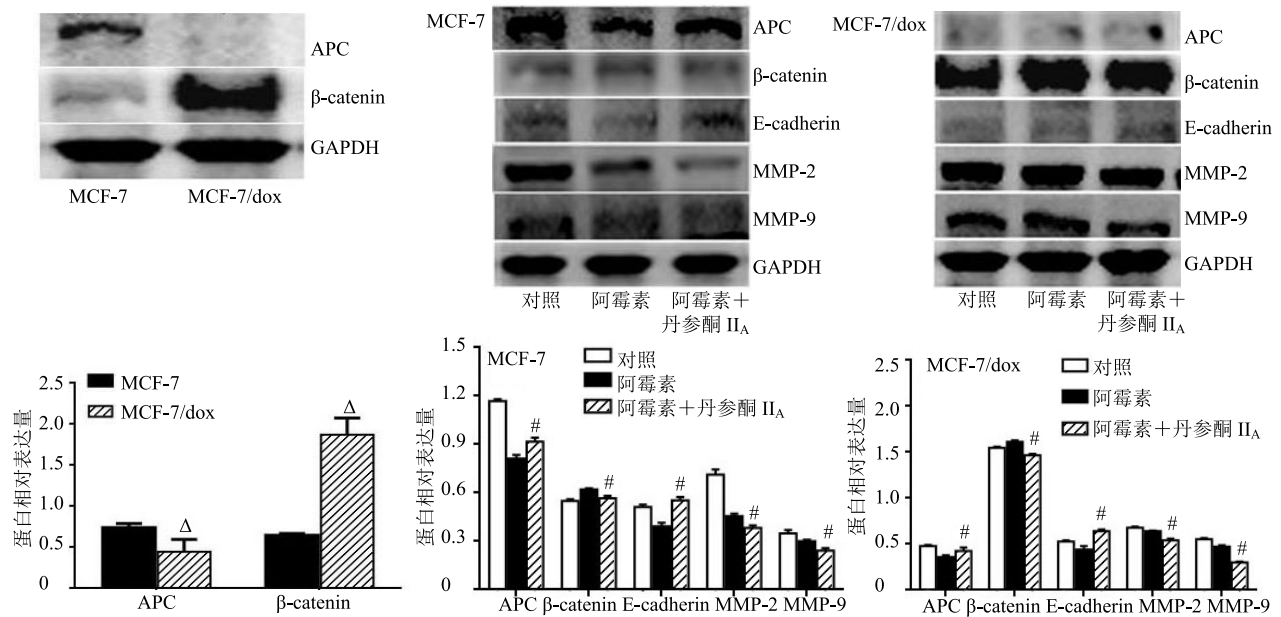


图 5 丹参酮 II_A 对乳腺癌 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞 APC、 β -catenin、E-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of tanshinone II_A on expressions of APC, β -catenin, E-cadherin, MMP-9, and MMP-2 in MCF-7 and MCF-7/dox cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.05$), β -catenin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 说明 APC/ β -catenin 信号通路参与了 MCF-7/dox 细胞对阿霉素耐药的发生。为进一步探讨丹参酮 II_A 增强乳腺癌细胞对阿霉素化疗敏感性是否与 APC/ β -catenin 信号通路有关, 检测了 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞中 APC、 β -catenin、E-cadherin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平。结果表明, 与单用阿霉素比较, 阿霉素与丹参酮 II_A 联合使用会明显下调 MCF-7 及 MCF-7/dox 细胞中 β -catenin、MMP-9、MMP-2 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$), 上调 MCF-7 及 MCF-7/dox 细胞中 APC、E-cadherin 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$)。

4 讨论

虽然乳腺癌的治疗已取得了很大进展, 但是乳腺癌患者的死亡率仍在逐年增加, 这与乳腺癌细胞的多药耐药性密切相关。阿霉素作为蒽环类药物的代表, 已成为乳腺癌化疗的一线用药, 然而, 随着化疗周期延长, 一方面乳腺癌细胞容易对阿霉素甚至对其他结构不同、作用机制不同的化疗药物产生耐药性, 导致乳腺癌化疗失败、复发转移; 另一方面, 阿霉素也会对机体产生许多毒副作用, 其中以心脏毒性最为严重, 从而限制了其临床应用。针对乳腺癌细胞对阿霉素的耐药性, 目前临床上多采用 2 种或 3 种化疗药物联合的模式治疗乳腺癌^[12-13], 这虽然降低了阿霉素的用药剂量、减轻其毒副作用和弥补了其耐药问题, 但也因此增强了其他化疗药物的毒副作用, 因此, 寻找一种既能增强乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性又能减轻其所带来的毒副作用的化疗增敏剂亟待解决。理想的化疗增敏剂应具有安全、毒副作用小或对机体有保护作用、具有一定的抗肿瘤作用等优势。丹参酮 II_A 是丹参的主要有效成分, 因其具有较好的心血管保护作用, 已被制备成滴丸、胶囊、注射液等, 用于缺血性心脏病的治疗^[14-15]。现代药理学研究显示, 丹参酮 II_A 不仅具有心血管保护作用, 还具有调节免疫力、抗感染、抗肿瘤等作用。鉴于丹参酮 II_A 所具有的这些药理作用, 认为其符合作为化疗增敏剂的条件, 因此本实验选用丹参酮 II_A 与阿霉素联合使用, 检测其对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响。实验结果显示, 丹参酮 II_A 能明显增强阿霉素对人乳腺癌细胞的增殖抑制、迁移抑制和诱导其凋亡作用, 说明丹参酮 II_A 能增强乳腺癌细胞对阿霉素化疗的敏感性。

APC 是 β -catenin 的负向调控因子, 其可作为载

体将糖原合成酶激酶-3 (GSK-3 β) 和 β -catenin 联系起来, 促进 GSK-3 β 磷酸化 β -catenin, 导致 β -catenin 降解。而高水平的 β -catenin 可通过 GSK-3 β 使 APC 蛋白磷酸化, 从而促进其对 β -catenin 的降解效率, 使胞质内 β -catenin 蛋白水平保持在一种平衡状态。研究发现, 当 APC 发生突变或者缺失时, APC 虽能与 β -catenin 结合, 但却不能降解 β -catenin, 使得 β -catenin 在细胞核内过度聚集, 导致细胞发生异常增殖, 从而引起肿瘤的发生^[16-19]。还有研究发现, APC 发生突变或者缺失时所引起的 APC/ β -catenin 信号通路的异常活化能够介导肿瘤细胞耐药性的发生^[20]。此外, APC/ β -catenin 通路通过对其下游靶基因如 E-cadherin、MMP-2、MMP-9 等的调控, 调控细胞与细胞、细胞与基质之间的黏附作用^[21-25]。为探讨 APC/ β -catenin 信号途径是否参与乳腺癌细胞阿霉素耐药发生, 首先检测了 MCF-7 和 MCF-7/dox 细胞中 APC、 β -catenin 的表达情况, 结果显示, 与阿霉素敏感的 MCF-7 细胞相比, MCF-7/dox 细胞中 APC 的表达明显减少, β -catenin 表达明显增多, 说明 APC/ β -catenin 信号途径参与了乳腺癌细胞阿霉素耐药的发生。为进一步探讨丹参酮 II_A 增强乳腺癌细胞对阿霉素化疗敏感性是否与 APC/ β -catenin 信号通路有关, 用阿霉素、阿霉素联合丹参酮 II_A 分别干预乳腺癌 MCF-7 及 MCF-7/dox 细胞, 并检测 APC、 β -catenin、E-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 蛋白的表达情况。结果显示, 与单用阿霉素相比较, 阿霉素与丹参酮 II_A 联合使用时, 能明显上调 MCF-7 及 MCF-7/dox 细胞内 APC 及 E-cadherin 的表达水平, 下调 β -catenin、MMP-2 及 MMP-9 的表达水平。

综上所述, 推测丹参酮 II_A 能够通过调控 APC/ β -catenin 信号通路增强乳腺癌细胞对阿霉素的化疗敏感性。因此, 丹参酮 II_A 可以作为一种潜在化疗增敏剂与阿霉素联合应用治疗乳腺癌。

参考文献

- [1] Sommer A K, Hermawan A, Ljepoja B, *et al.* A proteomic analysis of chemoresistance development via sequential treatment with doxorubicin reveals novel players in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 1987-1997.
- [2] Maione F, Vincenza V, Cantone M G, *et al.* Molecular mechanism of tanshinone II_A and cryptotanshinone in platelet anti-aggregating effects: An integrated study of pharmacology and computational analysis [J]. *Fitoterapia*, 2015, doi: 10.1016/j.fitote.2014.11.024.

- [3] Pang H, Han B, Yu T, *et al.* The complex regulation of tanshinone II_A in rats with hypertension-induced left ventricular hypertrophy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92216.
- [4] Chiu T L, Su C C. Tanshinone II_A increases protein expression levels of PERK, ATF6, IRE1 α , CHOP, caspase-3 and caspase-12 in pancreatic cancer BxPC-3 cell-derived xenograft tumors [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 3259-3263.
- [5] Li G, Shan C, Liu L, *et al.* Tanshinone II_A inhibits HIF-1 α and VEGFA expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117440.
- [6] Lee W D, Liang Y J, Chen B H. Effects of tanshinone nanoemulsion and extract on inhibition of lung cancer cells A549 [J]. *Nanotechnology*, 2016, doi: 10.1088/0957-4484/27/49/495101.
- [7] Lu M, Wang J. Tanshinone II_A induces huamn colorectal cancer cell apoptosis: The potential roles of Aurora A-p53 and survivin-mediated signaling pathways [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(2): 603-610.
- [8] Huang S Y, Chang S F, Liao K F, *et al.* Tanshinone II_A inhibits epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer cells via modulation of STAT3-CCL2 signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, doi: 10.3390/ijms18081616.
- [9] Jiang B, Zhang L, Wang Y, *et al.* Tanshinone II_A sodium sulfonate protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(7): 1538-1544.
- [10] Hong H J, Liu J C, Chen P Y, *et al.* Tanshinone II_A prevents doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through Akt-dependent pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 157(2): 174-179.
- [11] 高洁, 白茹, 李长志, 等. 丹参酮 II_A 对阿霉素抑制肿瘤细胞生长作用的影响 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(2): 91-94.
- [12] Chalakur-Ramireddy N K R, Pakala S B. Combined drug therapeutic strategies for the effective treatment of triple negative breast cancer [J]. *Biosci Rep*, 2018, doi: 10.1042/BSR20171357.
- [13] Hasan M, Leak R K, Stratford R E, *et al.* Drug conjugates— an emerging approach to treat breast cancer [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2018, 6(4): e00417.
- [14] Zhang X D, He C X, Cheng J, *et al.* Sodium tanshinone II_A sulfonate (DS-201) induces vasorelaxation of rat mesenteric arteries via inhibition of L-type Ca²⁺ channel [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00062.
- [15] 冯帅, 沙爽, 常庆, 等. 丹参酮 II_A 对缺血性心脏病中细胞凋亡与自噬的调控机制研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4670-4677.
- [16] Kanwar S S, Yu Y, Nautiyal J, *et al.* The Wnt/beta-catenin path-way regulates growth and maintenance of colonospheres [J]. *Mol Cancer*, 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-212.
- [17] Cho S G. APC downregulated 1 inhibits breast cancer cell invasion by inhibiting the canonical WNT signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4845-4852.
- [18] Tian J, He H, Lei G. Wnt/beta-catenin pathway in bone cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 9439-9445.
- [19] 赵轶峰, 魏玉磊, 王萍, 等. 姜黄素抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导乳腺癌细胞凋亡的机制研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(29): 3202-3204.
- [20] Zhan X, Li M, Zuo K, *et al.* upregulated miR-155 in papillary thyroid carcinoma promotes tumor growth by targeting APC and activating Wnt/beta-catenin signaling [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(8): 1305-1313.
- [21] Wang C, Jin H, Wang N, *et al.* Gas6/Axl Axis contributes to chemoresistance and metastasis in breast Cancer through Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling [J]. *Theranostics*, 2016, 6(8): 1205-1219.
- [22] Ma J, Guo X, Zhang J, *et al.* PTEN gene induces cell invasion and migration via regulating AKT/GSK-3 beta/beta-catenin signaling pathway in human gastric cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 60(12): 3415-3425.
- [23] Zhang F, Wang Z, Fan Y, *et al.* Elevated STAT3 signaling-mediated upregulation of MMP-2/9 confers enhanced invasion ability in multidrug-resistant breast cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 24772-24790.
- [24] 李幼梅, 张思仪, 赵连梅, 等. LIN28A、E-cadherin 和 vimentin 在浸润性乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2017, 29(4): 304-308.
- [25] Webb A H, Gao B T, Goldsmith Z K, *et al.* Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in *in vitro* models of retinoblastoma [J]. *BMC Cancer*, 2017, doi: 10.1186/s12885-017-3418-y.