

# 顺铂联合衣霉素对神经母细胞瘤的抑制作用及其机制

张腾龙 孙文静 宋军莹 侯琳

(青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 青岛 266071)

**[摘要]** **目的** 探究顺铂(DDP)联合衣霉素(TM)对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞的抑制作用及其机制。**方法** 将人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞分为对照组、TM 组(0.4 mg/L TM 处理 24 h)、DDP 组(4 mg/L DDP 处理 24 h)和 DDP+TM 组(0.4 mg/L TM+4 mg/L DDP 共处理 24 h)。采用 CCK-8 实验、平板克隆实验、划痕实验、Transwell 实验分别检测各组细胞的细胞活力、增殖能力、迁移能力和侵袭能力,采用免疫印迹法检测各组细胞中 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路相关蛋白 JAK-2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 和 HIF1 $\alpha$  的表达水平。**结果** 实验结果显示,DDP+TM 组两种细胞的细胞活力、增殖能力、侵袭能力、第 12 及 24 小时时的迁移能力及 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路各蛋白表达水平均显著低于其他三组( $t_{LSD}=2.14\sim 78.95, P<0.05$ )。**结论** DDP 联合 TM 可通过 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路抑制神经母细胞瘤的增殖和迁移,该结果为神经母细胞瘤的治疗提供了新思路。

**[关键词]** 神经母细胞瘤;顺铂;衣霉素;Janus 激酶 2;STAT3 转录因子;缺氧诱导因子 1,  $\alpha$  亚基;细胞运动;细胞增殖

**[中图分类号]** R730.264**[文献标志码]** A

**The inhibitory effect of cisplatin combined with tunicamycin on neuroblastoma and related mechanism** ZHANG Tenglong, SUN Wenjing, SONG Junying, HOU Lin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the inhibitory effect of cisplatin (DDP) combined with tunicamycin (TM) on human neuroblastoma SH-SY5Y and SK-N-SH cells and related mechanism. **Methods** Human neuroblastoma SH-SY5Y and SK-N-SH cells were divided into control group, TM group (treated with 0.4 mg/L TM for 24 h), DDP group (treated with 4 mg/L DDP for 24 h), and DDP+TM group (treated with 0.4 mg/L TM and 4 mg/L DDP for 24 h). CCK-8 assay, plate colony formation assay, scratch assay, and Transwell assay were used to measure the viability and proliferation, migration, and invasion abilities of cells in each group, and Western blotting was used to measure the expression levels of the JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  pathway-related proteins such as JAK-2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, and HIF1 $\alpha$  in each group of cells. **Results** Experimental results showed that compared with the other three groups, the DDP+TM group had significantly lower viability, proliferation and invasion abilities, migration ability at 12 and 24 h, and expression levels of the JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  pathway-related proteins ( $t_{LSD}=2.14-78.95, P<0.05$ ). **Conclusion** DDP combined with TM can inhibit the proliferation and migration of neuroblastoma via the JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  pathway, which provides new ideas for the treatment of neuroblastoma.

**[KEY WORDS]** Neuroblastoma; Cisplatin; Tunicamycin; Janus kinase 2; STAT3 transcription factor; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; Cell movement; Cell proliferation

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童最为常见的外周神经系统实体肿瘤,该病发病率占儿童恶性肿瘤的 8%~10%,严重危害儿童健康<sup>[1-2]</sup>。顺铂(DDP)目前被普遍用于 NB 患者的治疗,但其过多使用也会造成肿瘤细胞耐药及胃、肝、肾、耳等器官损伤<sup>[3-6]</sup>。寻找新型药物与 DDP 联合使用以减少 DDP 毒副作用,并克服肿瘤细胞的耐药性,对于提高 NB 的治疗效果尤为重要<sup>[7]</sup>。衣霉素(TM)对 NB 有抗癌活性<sup>[8-12]</sup>。已有研究表明在肝癌、肺癌及

头颈癌中, TM 可提高肿瘤细胞对 DDP 的敏感性,但其是否对 NB 有相同作用目前尚不清楚<sup>[13-15]</sup>。酪氨酸激酶 2 (JAK2)-信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)-缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )通路作为肿瘤细胞中的关键信号通路促进肿瘤的增殖和侵袭迁移<sup>[16-18]</sup>。本研究探究 DDP 联合 TM 对人 NB 细胞的抑制作用及其机制,旨在为 NB 患者的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人 NB 细胞系 SH-SY5Y、SK-N-SH 细胞(贴壁

**[收稿日期]** 2024-03-27; **[修订日期]** 2024-05-30**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81472542);山东省自然科学基金资助项目(ZR2023MH122)**[通讯作者]** 侯琳, Email: qingyi001@126.com

细胞)购自中国科学院上海细胞库,DDP、TM 购自上海生工生物工程股份有限公司,DMEM 高糖培养基、胎牛血清购买于上海雅酶生物科技有限公司, $\beta$ -actin、JAK-2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 和 HIF1 $\alpha$  抗体购自英国 Abcam 公司,CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司,胰酶及 0.1% 的结晶紫溶液购自武汉塞维尔生物科技有限公司,Matrigel 基质胶购自上海翌圣生物科技有限公司。

## 1.2 细胞的培养及分组

将 SH-SY5Y、SK-N-SH 细胞置于含体积分数 0.1 的胎牛血清以及 1% 青霉素/1% 链霉素溶液的 DMEM 高糖培养基中,于 37 °C、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养至对数生长期备用。分别将 1 mg DDP 粉末及 1 mg TM 粉末用 200  $\mu$ L DMSO 充分溶解,再用 DMEM 高糖培养基稀释到 4 mg/L,以备后续分组使用。将 SH-SY5Y、SK-N-SH 细胞分别分为对照组(DMEM 高糖培养基处理 24 h)、DDP 组(4 mg/L DDP 处理 24 h)、TM 组(0.4 mg/L TM 处理 24 h)、DDP+TM 组(0.4 mg/L TM 和 4 mg/L DDP 共处理 24 h)。

## 1.3 CCK-8 实验检测各组细胞的细胞活力

取处于对数生长期的细胞,铺于 96 孔板中过夜培养,去除培养基后按 1.2 中分组方法处理细胞。处理结束以后,在 96 孔板每孔中直接加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,室温孵育 3 h,使用酶标仪在 450 nm 波长处检测各组溶液的吸光度(A)值,并且据此计算各组细胞的细胞活力。细胞活力 =  $1 - (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}}) \times 100\%$

## 1.4 平板克隆实验检测各组细胞增殖能力

使用胰酶消化处于对数生长期的细胞,并以 1 000 r/min 离心,用 DMEM 培养基重悬细胞,以获得单细胞悬液。取 20  $\mu$ L 单细胞悬液用 DMEM 培养基稀释为  $1 \times 10^6$  个/L,每孔 200  $\mu$ L 接种于 6 孔板中,置于 37 °C、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。待细胞贴壁后,按 1.2 中分组方法处理细胞,处理结束以后将各组培养基更换为不含药的 DMEM 培养基,随后放入 37 °C、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的培养箱继续培养 2 周。弃掉培养基,用 PBS 洗 2 次,随后 4% 多聚甲醛固定细胞并使用 0.1% 结晶紫溶液染色后,用自来水将结晶紫溶液冲洗干净,室温放置干燥。对各组细胞拍照并用 Image J 软件分析图片,得到各组克隆细胞数,以克隆形成率代表细胞增殖能力。克隆形成率 =  $(\text{克隆细胞数} \div \text{接种细胞数}) \times 100\%$ 。

## 1.5 划痕实验检测各组细胞迁移能力

将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,待细胞密度 > 95% 时,用 200  $\mu$ L 移液枪枪头垂直于 6 孔板划痕,用 PBS 洗 2 次后,随后按 1.2 各组步骤处理细胞。后在 37 °C、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养各组细胞,分别在培养第 0、12、24 小时于同一视野拍照并测量划痕面积。细胞迁移率 =  $(\text{划痕面积}_{0\text{h}} - \text{划痕面积}_{12\text{h}/24\text{h}}) / \text{划痕面积}_{0\text{h}} \times 100\%$ 。

## 1.6 Transwell 实验检测各组细胞侵袭力

将 Matrigel 基质胶提前放入 4 °C 冰箱过夜,稀释后包被 Transwell 小室底部膜的上室面,室温风干。使用胰酶消化处于对数生长期的细胞,再以 1 000 r/min 离心后,按 1.2 中分组方法处理细胞,用无血清 DMEM 培养基重悬细胞后得到细胞悬液。在小室中加入细胞悬液,并将小室放置于 24 孔板中。在 24 孔板下室加入 500  $\mu$ L 含体积分数 0.1 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 24 h 后,以 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min;弃掉多聚甲醛后加入 2 mL 0.1% 结晶紫溶液染色 10 min,将结晶紫溶液冲洗干净,室温下放置至干燥以后,显微镜拍照并计数侵袭至小室下层的细胞。细胞侵袭率 =  $(\text{侵袭细胞数} \div \text{接种细胞数}) \times 100\%$ 。

## 1.7 免疫印迹法检测各组细胞中 JAK-2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 和 HIF1 $\alpha$ 蛋白表达水平

取处于对数生长期的细胞,按 1.2 中分组方法处理细胞,用 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白。接着加入电泳缓冲液,然后于 100 °C 水中煮沸变性 15 min。配制 SDS-PAGE 电泳所需的分离胶和浓缩胶,在浓缩胶加样孔中各加入相应组别的蛋白进行电泳。电泳结束后将蛋白电转至 PVDF 膜上。将电转后的膜用 50 g/L 的脱脂奶粉浸泡封闭 2 h。将膜放在一抗稀释液(1 : 1 000)中室温孵育 3 h, TBST 洗膜;将膜放在二抗稀释液中室温孵育 1 h, TBST 洗膜。最后加入 ECL 发光液显影以后,拍照保存图像。使用 Image J 软件分析各组蛋白条带的灰度值,以  $\beta$ -actin 蛋白作为内部参照,计算各组目的蛋白的相对表达量。各组目的蛋白的相对表达量以目的蛋白的条带灰度值/ $\beta$ -actin 蛋白的条带灰度值表示。

## 1.8 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学分析。每组细胞设置 3 个复孔,所有实验均重复 3 次,结果取均值。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析或重复测量设计的

方差分析,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 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞的细胞活力比较

CCK-8 实验结果显示,对照组、DDP 组、TM 组以及 DDP+TM 组 SH-SY5Y 细胞的细胞活力分别为  $(100.00 \pm 0.67)\%$ 、 $(86.43 \pm 0.45)\%$ 、 $(90.21 \pm 0.82)\%$ 、 $(75.34 \pm 0.53)\%$ ,DDP+TM 组细胞的细胞活力均显著性低于其他三组 ( $F = 35.31, t_{LSD} = 13.25 \sim 45.89, P < 0.05$ );对照组、DDP 组、TM 组以及 DDP+TM 组 SK-N-SH 细胞的细胞活力分别为  $(100.00 \pm 0.45)\%$ 、 $(82.85 \pm 0.52)\%$ 、 $(89.56 \pm 0.67)\%$ 、 $(66.23 \pm 0.41)\%$ ,DDP+TM 组细胞的细胞活力显著性低于其他三组细胞 ( $F = 63.25, t_{LSD} = 11.67 \sim 31.33, P < 0.05$ )。

### 2.2 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞克隆形成率比较

平板克隆实验结果显示,对照组、DDP 组、TM 组、DDP+TM 组 SH-SY5Y 细胞克隆形成率分别为  $(73.68 \pm 2.12)\%$ 、 $(67.25 \pm 3.21)\%$ 、 $(60.43 \pm 1.78)\%$ 、 $(43.67 \pm 2.53)\%$ ,DDP+TM 组的细胞克隆形成率显著低于其他三组 ( $F = 63.84, t_{LSD} = 12.21 \sim 24.23, P < 0.05$ );对照组、DDP 组、TM 组及 DDP+TM 组 SK-N-SH 细胞克隆形成率分别为  $(78.98 \pm 3.12)\%$ 、 $(63.47 \pm 1.83)\%$ 、 $(71.23 \pm 2.44)\%$ 、

$(50.43 \pm 1.34)\%$ ,DDP+TM 组的细胞克隆形成率显著性低于其他三组 ( $F = 42.23, t_{LSD} = 21.34 \sim 35.21, P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.3 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞的细胞迁移率比较

重复测量设计的方差分析结果显示,时间、组别及其交互作用对 SH-SY5Y 细胞的迁移率均有显著影响 ( $F_{时间} = 352.68, F_{组别} = 234.57, F_{交互} = 148.12, P < 0.05$ );单独效应结果显示,第 12、24 小时 DDP+TM 组细胞迁移率均显著性低于其他三组 ( $F_{组间} = 121.23, 134.85, t_{LSD} = 2.14 \sim 55.23, P < 0.05$ )。时间、组别及其交互作用对 SK-N-SH 细胞的迁移率均有显著影响 ( $F_{时间} = 456.65, F_{组别} = 176.45, F_{交互} = 53.52, P < 0.05$ );单独效应结果显示,第 12、24 小时 DDP+TM 组细胞迁移率均显著低于其他三组 ( $F_{组间} = 236.38, 634.23, t_{LSD} = 13.75 \sim 76.32, P < 0.05$ )。见表 1、图 2。

表 1 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞迁移率比较 ( $\bar{x}/\%, n=9, \bar{x} \pm s$ )

组别	SH-SY5Y 细胞		SK-N-SH 细胞	
	第 12 小时	第 24 小时	第 12 小时	第 24 小时
对照组	$73.68 \pm 2.12$	$86.32 \pm 3.21$	$67.89 \pm 1.87$	$90.83 \pm 2.81$
DDP 组	$67.25 \pm 3.21$	$75.45 \pm 2.34$	$54.27 \pm 2.34$	$74.78 \pm 3.45$
TM 组	$60.43 \pm 4.78$	$68.32 \pm 1.98$	$59.23 \pm 3.24$	$71.23 \pm 4.12$
DDP+TM 组	$43.67 \pm 3.53$	$52.34 \pm 3.76$	$39.34 \pm 2.64$	$58.62 \pm 3.53$

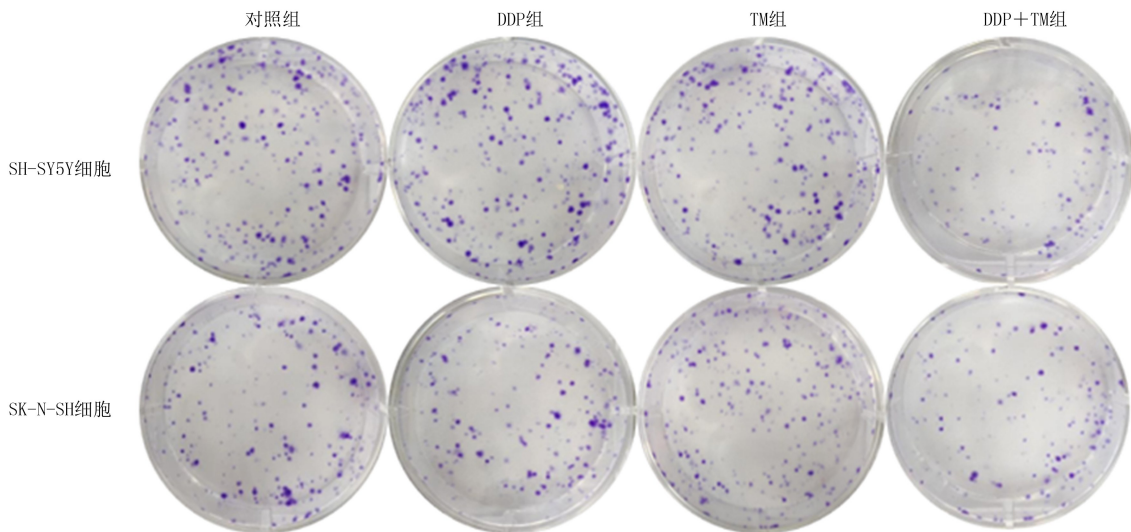


图 1 各组 SH-SY5Y 和 SK-N-SH 细胞平板克隆实验结果

### 2.4 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞的细胞侵袭率比较

Transwell 实验结果显示,对照组、DDP 组、TM 组以及 DDP+TM 组 SH-SY5Y 细胞侵袭率分别为  $(78.23 \pm 1.12)\%$ 、 $(65.45 \pm 1.03)\%$ 、 $(70.54 \pm$

$1.35)\%$ 、 $(55.67 \pm 1.21)\%$ ,DDP+TM 组细胞侵袭率显著低于其他三组 ( $F = 723.41, t_{LSD} = 11.09 \sim 33.23, P < 0.05$ );对照组、DDP 组、TM 组、DDP+TM 组 SK-N-SH 细胞的侵袭率分别为  $(81.23 \pm 1.08)\%$ 、 $(73.17 \pm 1.23)\%$ 、 $(78.78 \pm 1.12)\%$  以及

(52.43±1.08)%, DDP+TM 组细胞侵袭率显著低于其他三组 ( $F = 625.46, t_{LSD} = 13.23 \sim 32.12, P < 0.05$ )。见图 3。

### 2.5 各组 SH-SY5Y 以及 SK-N-SH 细胞中 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$ 通路相关蛋白表达水平比较

DDP+TM 组 SH-SY5Y 细胞 JAK-2、p-JAK2、

STAT3、p-STAT3、HIF1 $\alpha$  蛋白水平均显著低于其他三组 ( $F = 523.40 \sim 657.80, t_{LSD} = 14.25 \sim 78.95, P < 0.05$ ); DDP+TM 组 SK-N-SH 细胞 JAK-2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、HIF1 $\alpha$  蛋白水平均显著低于其他三组 ( $F = 356.78 \sim 523.81, t_{LSD} = 18.09 \sim 56.43, P < 0.05$ )。见图 4、表 2。

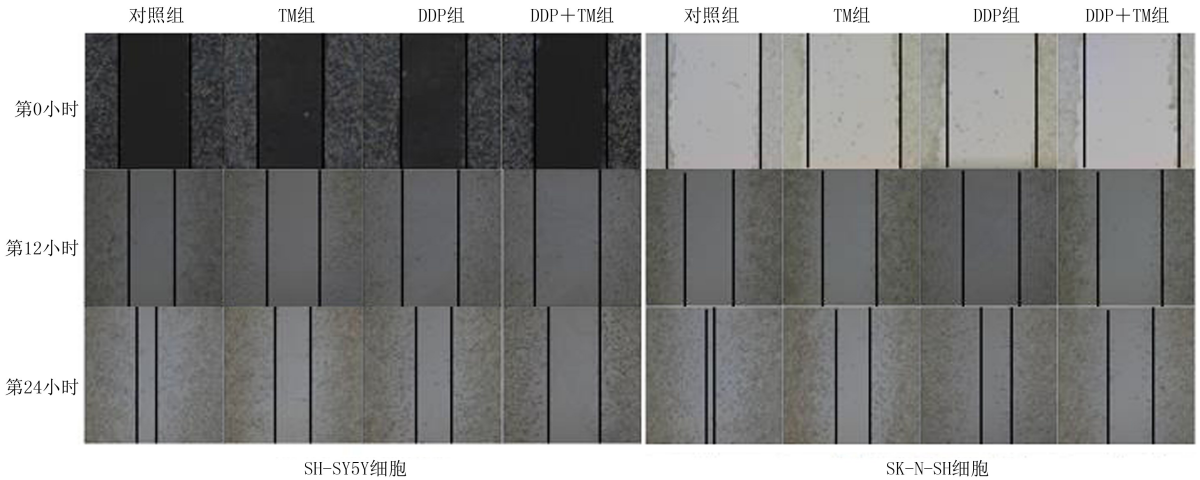


图 2 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞划痕实验结果 (40 倍)

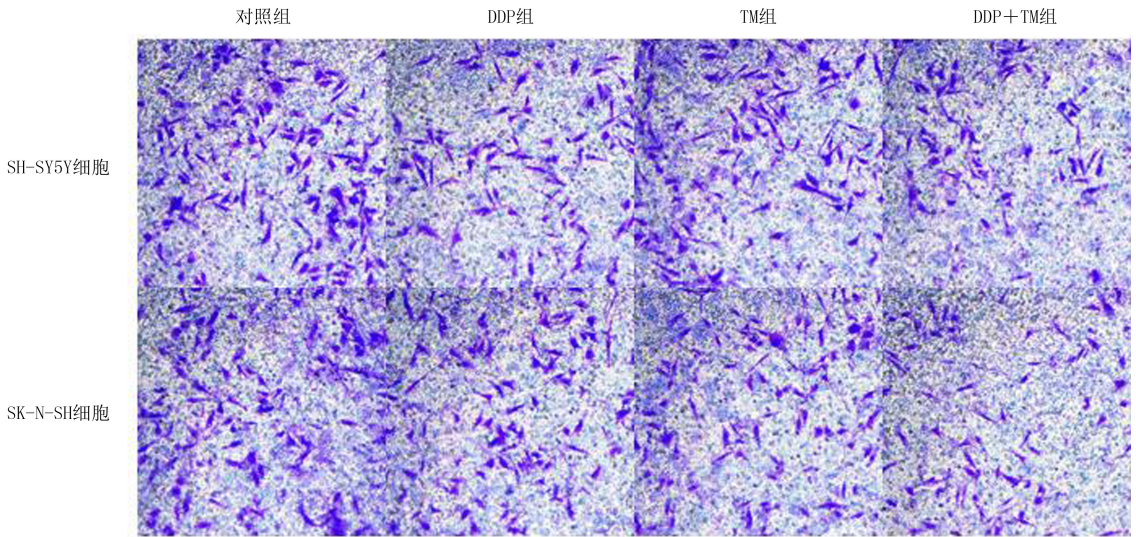


图 3 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞结晶紫染色结果 (200 倍)

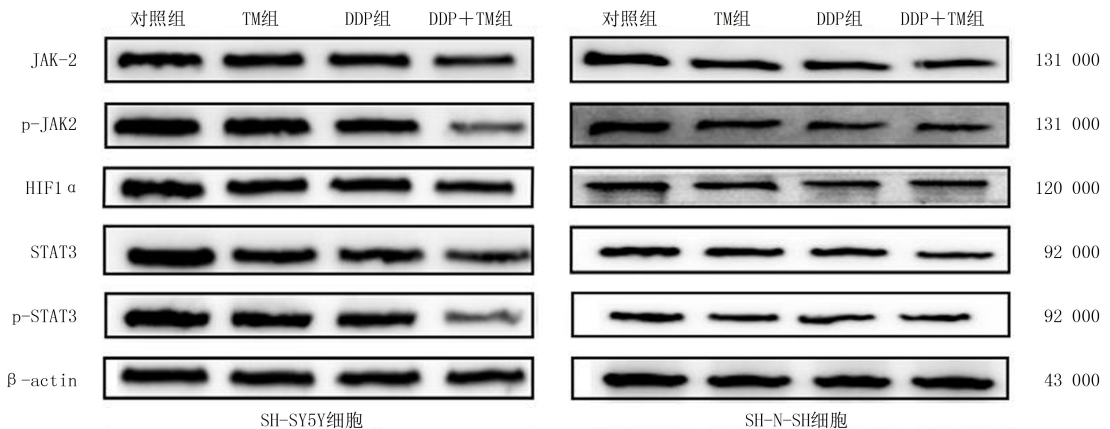


图 4 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞免疫印迹结果

表 2 各组 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞中 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路相关蛋白表达水平比较 ( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

组别	JAK-2	p-JAK2	STAT3	p-STAT3	HIF1 $\alpha$
SH-SY5Y 细胞					
对照组	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.02
DDP 组	0.83 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.02	0.86 $\pm$ 0.03	0.94 $\pm$ 0.02	0.86 $\pm$ 0.02
TM 组	0.89 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.03
DDP+TM 组	0.62 $\pm$ 0.02	0.58 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.02
SK-N-SH 细胞					
对照组	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02
DDP 组	0.93 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.02
TM 组	0.87 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.03
DDP+TM 组	0.56 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.02

### 3 讨 论

NB 是一种由未成熟神经细胞形成的肿瘤, 最常见于幼儿。通常起始于肾上腺, 但也可形成于颈部、胸部、腹部和脊柱。NB 的临床特征主要是其异质性, 根据诊断年龄、肿瘤组织学类型、MYCN 基因等指标的情况, NB 可以分为低危组、中危组和高危组<sup>[19]</sup>。目前对于高危组 NB 的治疗有多种方式, 如手术治疗、化疗、放疗、干细胞移植、靶向治疗、免疫治疗等, 但是鉴于高危组 NB 本身的复杂性, 及其在治疗过程中产生的耐药性和化疗抵抗性, 即便综合各种强化治疗方案, 高危组 NB 患者的预后仍不理想, 治愈率仅为 30% 左右<sup>[20]</sup>。因此, 其治疗选择是临床医生面临的一个相当棘手的问题。

DDP 是含有氯基和氨基的第一代铂类化疗药物, 普遍用于 NB 患者的治疗, 但 DDP 的过度使用会造成肿瘤细胞对其耐药, 同时高剂量 DDP 的使用也会损伤患者的胃、肝、肾、耳等器官, 因此 DDP 的临床应用被极大地限制, 如何减少 DDP 的临床用量以减轻其毒副作用和提高肿瘤细胞对 DDP 的敏感性成为目前临床研究重点<sup>[21-22]</sup>。TM 是一种通过抑制 N-连接的糖基化从而诱导内质网应激的天然抗生素, 能够逆转肿瘤细胞对紫杉醇、多柔比星、曲妥珠单抗等多种药物的耐药性<sup>[23]</sup>。DDP 和 TM 在肝癌、肺癌、鼻咽癌等多种肿瘤的联合治疗中的作用已有报道, 但在 NB 治疗中的作用还未见研究报道。本研究利用人 NB 细胞系 SH-SY5Y 和 SK-N-SH 细胞探究 DDP 联合 TM 对 NB 的治疗效果及其作用机制。

本项研究中, CCK-8 实验检测 DDP 联合 TM 对于人 SH-SY5Y 以及 SK-N-SH 细胞活性的影响, 结果表明 DDP 联合 TM 显著抑制了 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞活力; 平板克隆实验结果表明, DDP、

TM 两药联合处理可使 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞增殖能力受到明显抑制; 划痕实验结果表明, 两药联合处理使 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞迁移能力受到抑制; Transwell 实验结果则表明, DDP 联合 TM 可使 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞侵袭能力受到抑制。

JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路与多种肿瘤的发生发展密切相关<sup>[24]</sup>。有研究表明, 在肿瘤细胞中, JAK2 磷酸化激活 STAT3, 而 STAT3 则能够与 HIF1 $\alpha$  相互作用, 抑制 HIF1 $\alpha$  蛋白的泛素化降解, 最终促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路已经成为抑制多种肿瘤生长和迁移侵袭的重要靶点<sup>[25]</sup>。为了进一步探究 DDP 联合 TM 抑制 NB 进展的具体机制, 本研究通过使用免疫印迹法检测 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞中 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路相关蛋白的表达, 实验结果显示 DDP 联合 TM 处理可使 SH-SY5Y 及 SK-N-SH 细胞中 JAK-2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 和 HIF1 $\alpha$  的蛋白表达水平显著下降, 表明细胞中 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路被抑制。以往研究仅发现 DDP 联合 TM 能够通过增强内质网应激诱导多种肿瘤细胞凋亡, 而本研究首次发现 DDP 联合 TM 能够通过抑制 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路减缓 NB 进展, 这也表明两药联合可多靶点作用于 NB 细胞, 从而协同抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。但是 DDP 联合 TM 抑制 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路的具体调控机制, 以及该机制是否与 TM 诱导的内质网应激有关, 这些问题仍有待今后更加深入的研究。

综上所述, 本研究证明 DDP 联合 TM 可以通过 JAK2-STAT3-HIF1 $\alpha$  通路抑制人 NB 细胞系的 SH-SY5Y 和 SK-N-SH 细胞增殖、迁移和侵袭。两药联用有望提高 NB 治疗有效率, 降低 DDP 对于

NB 患者的毒副作用,从而为 NB 的临床治疗提供新策略。

**作者声明:**张腾龙、孙文静、宋军莹参与了研究设计;张腾龙、侯琳参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

- [1] QIU B, MATTHAY K K. Advancing therapy for neuroblastoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022,19(8):515-533.
- [2] MARIS J M, HOGARTY M D, BAGATELL R, et al. Neuroblastoma[J]. *Lancet*, 2007,369(9579):2106-2120.
- [3] DASARI S, TCHOUNWOU P B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740:364-378.
- [4] GHOSH S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug [J]. *Bioorg Chem*, 2019,88:102925.
- [5] BAYRAM P, AKSAK KARAMESE S, ÖZDEMİR B, et al. The effects of cisplatin and jaceosidin on SH-SY5Y neuroblastoma cells: An electron microscopic, molecular and biochemical study[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2023,47(5):388-397.
- [6] KAYA-SEZGINER E, KİRLANGİÇ Ö F, KARAKAYA C, et al. Apoptosis inducing effect of sodium butyrate and cisplatin alone or in combination on SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. *J Res Pharm* 2023,27(1):329-338.
- [7] LEE S I, JEONG Y J, YU A R, et al. Carfilzomib enhances cisplatin-induced apoptosis in SK-N-BE(2)-M17 human neuroblastoma cells[J]. *Sci Rep*, 2019,9(1):5039.
- [8] BRODNANOVA M, HATOKOVA Z, EVINOVA A, et al. Differential impact of imipramine on thapsigargin- and tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021,902:174073.
- [9] IKEDA A, NEMOTO K, YOSHIDA C, et al. Suppressive effect of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid that down-regulates thioredoxin-interacting protein expression, on tunicamycin-induced apoptosis in SK-N-SH human neuroblastoma cells[J]. *Neurosci Lett*, 2013,549:135-139.
- [10] RAPINO C, CASTELLUCCI A, LIZZI A R, et al. Modulation of endocannabinoid-binding receptors in human neuroblastoma cells by tunicamycin[J]. *Molecules*, 2019,24(7):1432.
- [11] WU D, WANG P R, WANG S Y. Low levels of Bax inhibitor-1 gene expression increase tunicamycin-induced apoptosis in human neuroblastoma SY5Y cells [J]. *Neural Regen Res*, 2012,7(17):1331-1337.
- [12] WU J, CHEN S, LIU H, et al. Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multi-drug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018,37(1):272.
- [13] AHMED B, KHAN M N, NISAR M A, et al. Tunicamycin enhances the suppressive effects of cisplatin on lung cancer growth through PTX3 glycosylation via AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2019,54(2):431-442.
- [14] HOU H L, SUN H F, LU P, et al. Tunicamycin potentiates cisplatin anticancer efficacy through the DPAGT1/Akt/ABCG2 pathway in mouse Xenograft models of human hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013,12(12):2874-2884.
- [15] NODA I, FUJIEDA S, SEKI M, et al. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin enhances sensitivity to cisplatin in human head-and-neck carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(2):279-284.
- [16] KE Q D, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)[J]. *Mol Pharmacol*, 2006,70(5):1469-1480.
- [17] LI J J, SHEN J Y, WANG Z, et al. ELTD1 facilitates glioma proliferation, migration and invasion by activating JAK/STAT3/HIF-1 $\alpha$  signaling axis[J]. *Sci Rep*, 2019,9(1):13904.
- [18] JUNG J E, KIM H S, LEE C S, et al. STAT3 inhibits the degradation of HIF-1 $\alpha$  by pVHL-mediated ubiquitination [J]. *Exp Mol Med*, 2008,40(5):479-485.
- [19] WANG H R, CHEN X, HE L. A narrative review of radiomics and deep learning advances in neuroblastoma: Updates and challenges[J]. *Pediatr Radiol*, 2023,53(13):2742-2755.
- [20] CARLSTROM L P, VAN GOMPEL J J, CHOBY G. Olfactory neuroblastoma: Treatment strategies for advanced disease [J]. *Curr Otorhinolaryngol Rep*, 2023,11(2):117-127.
- [21] GAO X X, ZHANG C, WANG Y J, et al. Berberine and cisplatin exhibit synergistic anticancer effects on osteosarcoma MG-63 cells by inhibiting the MAPK pathway[J]. *Molecules*, 2021,26(6):1666.
- [22] BRIZZOLARA A, GARBATI P, VELLA S, et al. Co-administration of fendiline hydrochloride enhances chemotherapeutic efficacy of cisplatin in neuroblastoma treatment[J]. *Molecules*, 2020,25(22):5234.
- [23] ZAFAR A, WANG W, LIU G, et al. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges[J]. *Med Res Rev*, 2021,41(2):961-1021.
- [24] YANG F, JOVE V, BUETTNER R, et al. Sorafenib inhibits endogenous and IL-6/S1P induced JAK2-STAT3 signaling in human neuroblastoma, associated with growth suppression and apoptosis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012,13(7):534-541.
- [25] ZHENG Q, LIU Y Y, LIU W W, et al. Cucurbitacin B inhibits growth and induces apoptosis through the JAK2/STAT3 and MAPK pathways in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014,10(1):89-94.

(本文编辑 范睿心 厉建强)