

丹参酮ⅡA诱导人小细胞肺癌细胞凋亡及其分子机制

王江峰 陈 晟

摘要 目的 了解丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌细胞(H446细胞)的凋亡诱导作用,并探讨其可能的分子机制。**方法** 采用MTT法检测不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌H446细胞增殖的影响结果;Hoechst 33258法检测不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌H446细胞凋亡的影响;qPCR法检测不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌H446细胞凋亡基因的影响;Western blot法检测不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌H446细胞凋亡的影响。**结果** 不同药物浓度的丹参酮ⅡA(0.3、0.6、1.25、2.5、5和10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)抑制人小细胞肺癌H446细胞增殖且呈浓度和时间依赖性;随着药物浓度的提高,人小细胞肺癌H446细胞凋亡小体的形成数量增加,高浓度组差异有统计学意义($P < 0.05$);高浓度组丹参酮ⅡA促进凋亡基因(Bax, caspase-9, caspase-3)的表达,抑制凋亡抑制基因(Akt, Bcl-2)的表达且差异有统计学意义($P < 0.05$);高浓度组丹参酮ⅡA促进凋亡蛋白(Bax, caspase-9, caspase-3)的表达,抑制凋亡抑制蛋白(Akt, Bcl-2)的表达且差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 丹参酮ⅡA可能是通过Akt-Bax/Bcl-2-caspase9-caspase3信号通路诱导人小细胞肺癌H446细胞的凋亡。

关键词 丹参酮ⅡA 人小细胞肺癌 细胞增殖 凋亡基因

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.022

Tanshinone II A Induce Human Small Cell Lung Cancer Cells Apoptosis and Molecular Mechanism. Wang Jiangfeng, Chen Sheng. Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang 310022, China

Abstract Objective To know the Tanshinone II A induce human small cell lung cancer cells (H446 cells) apoptosis, and discuss the possible molecular mechanism. **Methods** Determined by MTT method of different concentrations of Tanshinone II A impact on human small cell lung cancer H446 cells proliferation; Determined by Hoechst 33258 method of different concentrations Tanshinone II A influence on human small cell lung cancer H446 cells apoptosis; Determined by qPCR method of different concentrations of Tanshinone II A impact on human small cell lung cancer H446 cells apoptosis gene; Determined by Western blot method of different concentrations of Tanshinone II A effect on lung cancer H446 cells apoptosis. **Results** Different drug concentrations of Tanshinone II A (0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inhibit human small cell lung cancer H446 cells proliferation and depend by the concentration and time; With the increase of the concentration of the drug in the formation of human small cell lung cancer H446 cells apoptosis corpuscle number increase, significant difference was found in high concentration group ($P < 0.05$); High concentration group of Tanshinone II A promote apoptosis gene (Bax, caspase-9, caspase-3) expression, and inhibit apoptosis inhibiting genes (Akt, the Bcl-2) expression and there were significant differences ($P < 0.05$); High concentration group of Tanshinone II A promoting apoptosis protein (Bax, caspase-9, caspase-3) expression, and inhibit apoptosis inhibiting protein (Akt, the Bcl-2) expression and there were significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone II A may be through Akt - Bax/Bcl-2-caspase-9-caspase-3 signaling pathways induced human small cell lung cancer H446 cells apoptosis.

Key words Tanshinone II A; Human small cell lung cancer; Cell proliferation; Apoptosis gene

肺癌是临幊上常见的恶性肿瘤之一,其病死率无论在男性还是女性都位居第一^[1]。目前肺癌经过手术和常规治疗仍难以控制,5年内的病死率约为80%~85%^[2]。尽管对肺癌的分子机制有了一定的了解,同时研究发现部分有意义的信号通路,但肺癌

的治疗干预措施却未见明显效果^[3]。肺癌的病理学类型一般为小细胞肺癌和非小细胞肺癌:小细胞肺癌属于分化差的神经内分泌癌;非小细胞癌约占肺癌总数的85%,常见的类型有腺癌,鳞癌和大细胞癌等。肺癌的病理类型多样,因此需要研究作用更加广泛的药物。传统的化疗药物在对癌细胞杀伤的同时,对正常组织也有细胞毒性。目前靶向药物口服治疗的不良反应相对小,疗效尚可,但其高耐药性却限制了其发展。本研究通过不同浓度丹参酮ⅡA诱导人小细胞肺癌H446细胞凋亡,探讨其可能的分子机制。

基金项目:浙江省中药管理局基金资助项目(2015ZA039)

作者单位:310022 杭州,浙江省肿瘤医院胸外科

通讯作者:陈晟,副主任医师,电子信箱:chensheng111@163.com

胞肺癌 H446 细胞凋亡,并探索其可能的作用机制。寻找一个有效和安全的治疗策略去阻止,抑制或逆转小细胞肺癌的进展。

材料与方法

1. 细胞株:人小细胞肺癌 H446 细胞株受赠于浙江省肿瘤研究所。

2. 试剂:RNA 提取试剂盒 MirNeasy Mini Kit(美国 Qiagen 公司),反转录试剂盒 PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis Kit(D350A)和 real - time PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (DRR081A)购于日本 TaKaRa 公司。引物由上海捷瑞公司合成。

3. MTT 法检测不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞增殖的影响:将 H446 细胞用含 10% 胎牛血清的对应细胞的培养液置于 25cm^2 培养瓶中,放置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,待细胞对数期增殖后用于实验。将人小细胞肺癌 H446 细胞按 5000 个/孔接种于 96 孔板,细胞贴壁后分别加入不同药物浓度的丹参酮 II A(0.3、0.6、1.25、2.5、5 和 10 μg/ml),每组细胞设 6 个复孔。分别培养 24、48 和 72h 后,每孔加入 5.0g/L MTT 溶液 20 μl,37℃ 孵育 4h,弃孔内上清液后加入 DMSO 150 μl,振荡 10min,570nm 波长下用酶标仪测定吸光(A)值。根据 A 值计算存活率(vital rate, VR):VR(%) = 药物组 A 值/空白对照组 A 值) × 100%。上述实验重复 3 次取平均值,评估不同药物浓度的丹参酮 II A 的人小细胞肺癌 H446 细胞的增殖情况。

4. Hoechst 33258 法检测不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞凋亡的影响:按 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,根据 MTT 结果选取 2 个药物浓度组:分别为对照组,低浓度组和高浓度组,细胞贴壁后分别加入不同药物浓度的丹参酮 II A,每组细胞设 3 个复孔。培养 48h 后,每孔加入 1g/ml Hoechst 33258 溶液 2 μl,37℃ 孵育 4h,用荧光显微镜进行观察,从细胞核的形态改变来评估各组细胞凋亡的情况。

5. qPCR 法检测不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞凋亡基因的影响:按 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,根据 MTT 结果选取 2 个药物浓度组:分别为对照组,低浓度组和高浓度组,细胞贴壁后分别加入不同药物浓度的丹参酮 II A,每组细胞设 3 个复孔。培养 48h 后,用 TRIzol 提取 Total RNA。采用反转录试剂盒(NucleoSpin® miRNA cDNA Synthesis Kit,日本 TaKaRa 公司)将提取的 Total RNA 反转录成 cD-

NA,采用 qPCR 法检测各组样本中 AKT、Bax、Bcl - 2、caspase - 9、caspase - 3 等凋亡基因和凋亡抑制基因的表达差异。

6. Western blot 法检测不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞凋亡蛋白的影响:按 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,根据 MTT 结果选取两个药物浓度组:分别为对照组,低浓度组和高浓度组,细胞贴壁后分别加入不同药物浓度的丹参酮 II A 每组细胞设 3 个复孔。培养 48h 后,用 RIPA 裂解液提取总蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度,变性处理,采用 Western blot 法检测各组样本中 AKT、Bax、Bcl - 2、caspase - 9、caspase - 3 等凋亡蛋白和凋亡抑制蛋白的表达差异。

7. 统计学方法:应用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞增殖的影响:不同药物浓度的丹参酮 II A(0.3、0.6、1.25、2.5、5 和 10 μg/ml)抑制 H446 细胞的增殖呈浓度和时间依赖性($P < 0.05$,图 1)。

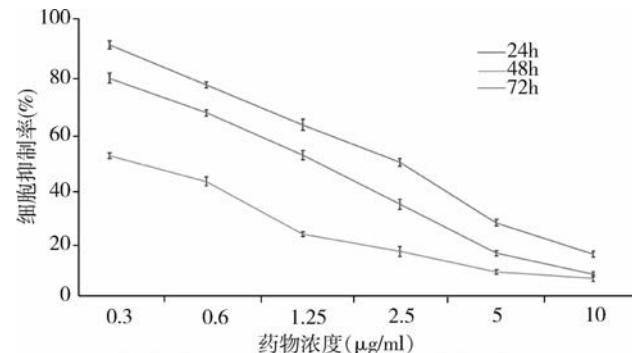


图 1 不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞增殖的影响

2. 不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞凋亡的影响:不同药物浓度的丹参酮 II A(1.25 和 2.5 μg/ml)作用人小细胞肺癌 H446 细胞 48h 后:低浓度组和高浓度组均出现凋亡小体,高浓度组凋亡小体数与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

3. 不同浓度丹参酮 II A 对人小细胞肺癌 H446 细胞凋亡基因的影响:不同药物浓度的丹参酮 II A(1.25 μg/ml 和 2.5 μg/ml)作用人小细胞肺癌 H446 细胞 48h 后:高浓度组丹参酮 II A 促进凋亡基因(Bax、caspase - 9、caspase - 3)的表达,抑制凋亡抑制基因(Akt、Bcl - 2)的表达且比较差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。



图2 不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌细胞凋亡的影响

A. 对照组; B. 丹参酮 1.25 μg/ml; C. 丹参酮 2.5 μg/ml

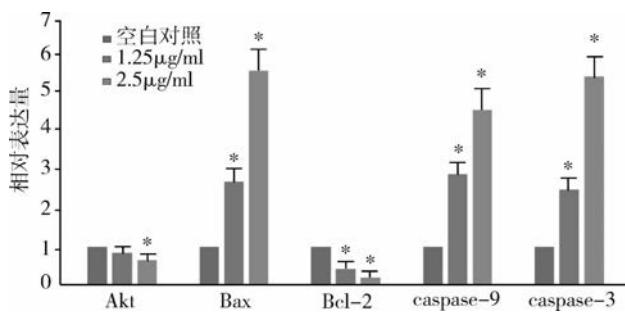


图3 不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌H446细胞凋亡基因的影响

4. 不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌H446细胞凋亡蛋白的影响:不同药物浓度的丹参酮ⅡA(1.25 μg/ml 和 2.5 μg/ml)作用人小细胞肺癌H446细胞48h后:低浓度组较正常对照组差异有统计学意义,高浓度组丹参酮ⅡA较正常对照组具有显著促进凋亡蛋白(Bax、caspase-9、caspase-3)的表达,抑制凋亡抑制蛋白(Akt、Bcl-2)的表达且差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

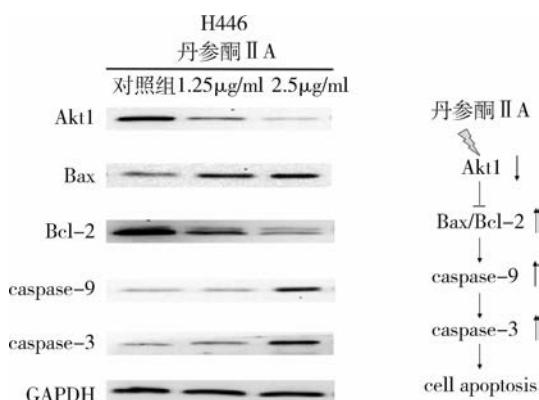


图4 不同浓度丹参酮ⅡA对人小细胞肺癌H446细胞凋亡蛋白的影响

具有活血散淤、消肿止血、消炎止痛、调经止痛、扩张冠状动脉、改善心肌缺血状况、降低血压、安神静心、降血糖和抗菌等功效等作用。《滇南本草》载其“补心定志,安神宁。治健忘怔忡,惊悸不寐”。《本经》谓其“主心腹邪气,肠鸣幽幽如走水,寒热积聚;破症除瘕,止烦满,益气”。《纲目》言“活血,通心包络。治痈痛”。丹参酮ⅡA是丹参根部提取的单体,是主要药用成分之一。

目前研究发现丹参酮ⅡA主要具有保护心血管系统和抗肿瘤的作用。丹参酮ⅡA最先研究用于心脏保护作用,临幊上也有一些丹参制剂用于保护心血管系统。Sun等^[4]研究发现,在体外小鼠糖尿病性心肌病模型中,丹参酮ⅡA通过β₂受体-Akt-GSK-3β信号通路抑制心肌细胞凋亡,改变炎性基因的表达从而起到保护心脏的作用。有研究表明,丹参酮ⅡA在心血管系统疾病中具有抗氧化作用,其调控GPx基因的表达和活性,改变特定的抗氧化酶的表达和活化,从而防止心肌细胞的氧化损伤^[5-8]。

近几年来丹参酮ⅡA研究的热点主要是抗肿瘤作用。Wang等^[9]研究发现丹参酮ⅡA在体外促进人食管鳞癌细胞凋亡并阻滞其细胞周期于G₂/M期,发现可能是通过Akt-Bax/bcl-2-caspase-9-caspase-3信号通路促进细胞凋亡。Hou等^[10]研究发现胃癌细胞株SGC-7901细胞在丹参酮ⅡA作用下发生细胞凋亡,且效果和5-FU化疗药物作用相当。一些研究同样发现丹参酮ⅡA能促进肿瘤细胞凋亡(包括口腔癌细胞、乳腺癌细胞、膀胱癌细胞和结直肠癌细胞等)^[11-14]。除了上述几种恶性肿瘤细胞,丹参酮ⅡA对肺癌的细胞作用也是相当显著。Chen等^[15]的Meta分析显示,丹参酮ⅡA对肺腺癌细胞株A549细胞和小鼠肺癌模型均有抗肿瘤作用。Zhang等^[16-18]同样研究发现丹参酮ⅡA抑制肺腺癌细胞株A549细胞增殖并促进凋亡,CCK-8方法检

讨 论

丹参是唇形科鼠尾草属植物,味苦、微寒、无毒,

测丹参酮ⅡA 的 IC₅₀(48) 是 $14.5 \pm 3.3 \mu\text{mol/L}$, 同时丹参酮ⅡA 抑制 A549 细胞的侵袭和转移。Chen 等^[19]研究丹参酮ⅡA 对小细胞肺癌细胞株 H146 细胞发现, 丹参酮ⅡA 抑制 H146 细胞增殖, 通过提高氧自由基和 Ca²⁺ 促进肺癌细胞的凋亡, 并预测丹参酮ⅡA 可能是治疗小细胞肺癌的新方法。

肺癌的病死率在常见的恶性肿瘤中居首位, 流行病学调查显示, 全球大约每年有 130 万人死于肺癌, 其中以中老年人为主^[20]。手术的创伤和化疗药物的毒性不良反应一直是肺癌治疗中的绊脚石。同时肺癌的发病率也正在逐年上升, 其主要原因是长期吸烟和大气环境的变化。丹参酮ⅡA 具有显著抑制肿瘤细胞作用的同时, 还能减少机体正常细胞毒性不良反应, 保护心血管系统。中药单体的开发可以明确我国传统方剂的药理作用, 是实现中药与国际接轨的必经道路, 通过本研究表明丹参酮ⅡA 可能是通过 Akt - Bax/bcl - 2 - caspase - 9 - caspase - 3 信号通路诱导小细胞肺癌(H446 细胞)凋亡, 故丹参酮ⅡA 对小细胞肺癌细胞的作用无论对个人、家庭和社会都有重要的意义。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2007 [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1):43 - 66
- Li YL, Gong Y, Li LL, et al. Bioactive tanshinone I inhibit the growth of lung cancer in part via downregulation of Aurora A function [J]. Mol Carcinog, 2013, 52(7):535 - 543
- Spiro SG, Silvestri GA. One hundred years of lung cancer [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(5):523 - 529
- Sun D, Shen M, Li J, et al. Cardioprotective effects of tanshinone IIA pretreatment via kinin B2 receptor - AKT - GSK - 3β dependent pathway in experimental diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Diabetol, 2011, 10(10):4
- Li YS, Yan L, Yong YQ. Effect of Tanshinone II A on the transforming growth factor beta1/Smads signal pathway in rats with hypertensive myocardial hypertrophy [J]. Chinese J Integrated Traditional West Med, 2010, 30(5):499
- Yang L, Zou XJ, Gao X, et al. Sodium tanshinone II A sulfonate attenuates angiotensin II - induced collagen type I expression in cardiac fibroblasts in vitro [J]. Exp Mol Med, 2009, 41(7):508 - 516
- Tang FT, Cao Y, Wang TQ, et al. Tanshinone II A attenuates atherosclerosis in ApoE - / - mice through down - regulation of scavenger receptor expression [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 650(1):275 - 284
- Fang ZY, Lin R, Yuan BX, et al. Tanshinone II A downregulates the CD40 expression and decreases MMP - 2 activity on atherosclerosis induced by high fatty diet in rabbit [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(2):217 - 222
- Wang JF, Feng JG, Han J, et al. The molecular mechanisms of tanshinoneA on the apoptosis and arrest of human esophageal carcinoma cells [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:582730
- Hou JH, He JT, Jin X, et al. Study on optimisation of extraction process of tanshinone II A and its mechanism of induction of gastric cancer SGC7901 cell apoptosis [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(6):456 - 458
- Tseng PY, Lu WC, Hsieh MJ, et al. Tanshinone IIA induces apoptosis in human oral cancer KB cells through a mitochondria - dependent pathway [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(2):540 - 546
- Chan SE, Lai HW, Su CC, et al. Effect of supplementation of tanshinone II A and sodium tanshinone II A sulfonate on the anticancer effect of epirubicin: an in vitro study [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, 2011:841564
- Chiu SC, Huang SY, Chang SF, et al. Potential therapeutic roles of tanshinone IIA in human bladder cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(1):15622 - 15637
- Miao Liu, Qiong Wang, Fang Liu, et al. UDP - glucuronosyltransferase 1A compromises intracellular accumulation and anti - cancer effect of tanshinone II A in human colon cancer cells [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e79172
- Chen Y, Zhu J, Zhang W. Antitumor effect of traditional Chinese herbal medicines against lung cancer [J]. Anticancer Drugs, 2014, 25(9):983 - 991
- Zhang J, Wang J, Jiang JY, et al. Tanshinone II A induces cytochrome c - mediated caspase cascade apoptosis in A549 human lung cancer cells via the JNK pathway [J]. Int J Oncol, 2014, 45(2):683 - 690
- Chiu TL, Su CC. Tanshinone II A induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through the induction of reactive oxygen species and decreasing the mitochondrial membrane potential [J]. Int J Mol Med, 2010, 25(2):231 - 236
- Fang Liu, Guo Yu, Guangji Wang, et al. An NQO1 - initiated and p53 - independent apoptotic pathway determines the anti - tumor effect of tanshinone IIA against non - small cell lung cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(7):e42138
- Cheng CY, Su CC. Tanshinone II A may inhibit the growth of small cell lung cancer H146 cells by up - regulating the Bax/Bcl - 2 ratio and decreasing mitochondrial membrane potential [J]. Mol Med Rep, 2010, 3(4):645 - 650
- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225 - 249

(收稿日期:2017-01-22)

(修回日期:2017-02-18)