

二氢丹参酮对人肺癌 GLC-82 细胞的抑制作用及其机制研究[△]

孙蓓^{1,2*}, 叶因涛¹, 王冬¹, 钱钧强¹, 娄建石^{2#} (1.天津医科大学肿瘤医院/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 300060; 2.天津医科大学基础医学院, 天津 300070)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4775-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.08

摘要 目的:研究二氢丹参酮(DTS)对人肺癌GLC-82细胞的抑制作用及其作用机制。方法:以质量浓度为0(空白对照)、5、10、20、40、80、100 μg/ml的DTS作用细胞24、48 h后,采用MTT法测定细胞的增殖抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀);流式细胞术检测17.85 μg/ml DTS作用12、24、48 h后细胞的凋亡情况,计算凋亡率;Western blot法检测Bcl-2、Bax和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)蛋白的表达。结果:与空白对照组比较,DTS组细胞的增殖受到抑制,作用24、48 h后最大细胞抑制率分别为54.48%、64.95%,IC₅₀分别为62.36、33.94 μg/ml;DTS可诱导细胞的凋亡且与作用时间呈正相关,凋亡率为5.6%~29.6%;Western blot检测结果表明,DTS能下调细胞中Bcl-2蛋白的表达、上调Caspase-3蛋白的表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:DTS对人肺癌GLC-82细胞有较强的抑制作用,并诱导其凋亡,其机制可能与下调Bcl-2蛋白的表达、上调Caspase-3蛋白的表达有关。

关键词 人肺癌GLC-82细胞;二氢丹参酮;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3蛋白

Inhibitory Effect and Its Mechanism of Dihydrotanshinone on Human Lung Cancer GLC-82 Cell

SUN Bei^{1,2*}, YE Yin-tao¹, WANG Dong¹, QIAN Jun-qiang¹, LOU Jian-shi² (1.Cancer Hospital of Tianjin Medical University/National Clinical Research Center for Cancer/Tianjin Key Lab of “Cancer Prevention and Therapy”, Tianjin 300060, China; 2.College of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of dihydrotanshinone (DTS) on human lung cancer GLC-82 cell and its mechanism. METHODS: After treated with 0 (blank control), 5, 10, 20, 40, 80 and 100 μg/ml DTS for 24 and 48 h, MTT assay was used to measure the inhibition rates and IC₅₀ of cells; cell apoptosis was detected by flow cytometry after treated with 17.85 μg/ml DTS for 12, 24 and 48 h to calculate apoptotic rate; Western blot was used to detect the protein expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3. RESULTS: Compared with blank control group, different concentrations of DTS inhibited the proliferation of cells; 24 and 48 h maximal inhibition rate were 54.48% and 64.95%, respectively; IC₅₀ were 62.36 and 33.94 μg/ml. DTS could induce cell apoptosis in positive time dependent manner, and the range of inhibition rate was 5.6%-29.6%; Western blot showed DTS could down-regulate the expression of Bcl-2 protein and up-regulate the expression of Caspase-3 protein ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: DTS have significant inhibitory effect on GLC-82 cells and also induce cell apoptosis, by a possible mechanism of down-regulating the expression of Bcl-2 protein and up-regulating the expression of Caspase-3 protein.

KEYWORDS Human lung cancer GLC-82 cell; Dihydrotanshinone; Cell apoptosis; Caspase-3 protein

后血清药物浓度最高,在肝、肾、脾、肺、心、脑等组织的分布无显著性差异,且葛根黄酮自微乳制剂的组织药物浓度显著高于同组织的愈风宁心片,其相对生物利用度分别为(182 ± 40)%、(227 ± 34)%和(249 ± 43)%。

本课题在前人研究的基础上,运用中医药理论,对葛根素固体自微乳的制备进行了优化^①。本文通过对自制葛根素固体自微乳胶囊进行药动学研究,建立了大鼠体内分析方法,并通过测定ig葛根素固体自微乳胶囊和市售愈风宁心片后大鼠体内的血药浓度,得出前者相对生物利用度为238.77%,证明了相对于市售愈风宁心片,自微乳化给药系统可提高葛根素的生物利用度。

参考文献

△基金项目:天津医科大学科学基金青年项目(No.2014KYQ06)

*副主任药师,硕士。电话:022-23340123。研究方向:临床药理学。E-mail:sunpei003@sina.com

#通信作者:教授,博士生导师。电话:022-83336888。研究方向:心血管药理学、临床药理学。E-mail:jianshilou@163.com

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:925.
- [2] 马佳佳,李红梅,董治宇,等.葛根素的药理作用及其临床应用[J].第四军医大学学报,2002,23(Suppl):64.
- [3] 洪赟飞.葛根素口服自微乳化给药系统的研究[D].上海:上海医药工业研究院,2005:1-54.
- [4] 孙洪胜,傅春升,张红艳.葛根素固体自微乳制剂的制备及其质量评价[J].中国药房,2011,22(39):3 677.
- [5] 殷静.尼莫地平自微乳化胶囊的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004:1-83.
- [6] 崔晶.姜黄素固体自微乳化制剂的研究[D].济南:山东大学,2006:1-87.
- [7] 史朝晖.α-细辛脑自微乳化胶囊的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004:1-66.
- [8] 崔升森.葛根素体内药动学及葛根黄酮自微乳化软胶囊的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004:1-136.

(收稿日期:2015-01-12 修回日期:2015-06-10)

(编辑:邹丽娟)

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其病死率居各种肿瘤的首位,对人类健康和生命构成了极大的威胁。丹参是临床最常用的活血化瘀中药,二氢丹参酮(DTS)是丹参的脂溶性活性成分之一,具有菲醌结构,通过引起DNA损伤从而抑制肿瘤细胞的DNA合成^[1-2]。近年来的研究证实,DTS不仅具有天然抗氧化、抗心血管及抗菌消炎的药理作用,而且还具有明显的抗肿瘤活性,尤其是体外抗肿瘤活性,而对正常组织细胞的毒性却很小^[3-5]。目前对于DTS诱导人肺癌GLC-82细胞凋亡及机制的研究鲜有报道。故笔者拟通过研究DTS对人肺腺癌GLC-82细胞的抑制作用,并探讨其可能的作用机制,为研发新型防治肺癌的药物制剂提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Thermo 371 CO₂培养箱(美国 Thermo Electron 公司);Cyto FLEX 流式细胞仪(美国 Beckman 公司);MODEL 680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);CP225D 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

DTS 粉末(上海源叶生物公司,批号:YY90060,纯度:>98%);青霉素-链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1400,规格:青霉素 10 ku/ml、链霉素 10 mg/ml);RPMI1640 培养液(北京百诺克医药生物技术有限责任公司);MTT(上海生物工程有限公司);二甲基亚砜(DMSO,中国医药集团);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);磷酸盐缓冲液(PBS,北京百诺克医药生物技术有限责任公司);Annexin V-FITC/溴化丙啶(PI)双染凋亡试剂盒,Bcl-2、Bax、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)和 β -actin 抗体(美国 BD 公司)。

1.3 细胞

人肺腺癌 GLC-82 细胞由天津医科大学肿瘤研究所免疫室提供。

2 方法

2.1 细胞培养

从液氮罐中取出冻存的肺癌 GLC-82 细胞液,立即投入 37 °C 温水中复苏,使细胞冻存液在 1~2 min 内融化。细胞冻存液清洗后,用 RPMI1640 培养液(含 10% 新生牛血清及青霉素-链霉素混合液)培养细胞,将细胞置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,选对数生长期的细胞进行试验。

2.2 药物处理

用 DMSO 溶解 DTS,制备成 DTS 质量浓度为 1 mg/ml 的母液,超声 10 min 助溶,用培养液稀释至 DMSO 终浓度 < 0.1% ($V_{\text{DMSO}}/V_{\text{DTS}} < 0.1 \mu\text{l/ml}$),过滤除菌,4 °C 避光保存,备用。

2.3 MTT 法检测细胞抑制率

取对数生长期细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,接种于 96 孔板中,每孔 200 μl 。分别设立空白对照组和给药组,空白对照组给予等体积的培养液,给药组分别加入不同质量浓度(5、10、20、40、80、100 $\mu\text{g/ml}$)的 DTS。分别培养 12、24、48 h 后,电镜($\times 200$ 倍)下观察细胞的形态变化。加入 5 mg/ml 的 MTT 液继续培养,4 h 后吸弃上清,加入 DMSO(150 $\mu\text{l/孔}$),振荡 5 min,于酶标仪 570 nm 波长处测定光密度(OD_{570})。计算细

胞存活率和抑制率:细胞存活率(%)=(给药组 OD_{570} /空白对照组 OD_{570}) $\times 100\%$,细胞抑制率(%)=1-细胞存活率(%);并拟合求得半数抑制浓度(IC_{50})。试验重复 3 次。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

取对数生长期细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于 6 孔板中,每孔 2 ml。分别设空白对照组、给药组,空白对照组给予等体积的 PBS,给药组使 DTS 质量浓度为 17.85 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50} 值)。培养 12、24、48 h 后以离心半径为 5 cm、1 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀,PBS 洗 2 次;加入 5 μl Annexin V-FITC,4 °C 避光染色 5 min,再加入 PI 避光染色 15 min,然后补足缓冲液至 500 μl ;用 300 目的细胞筛过滤,取滤液上流式细胞仪检测,分析细胞凋亡情况,计算凋亡率。光源采用 488 nm 波长的氩离子激光器,发射波长大于 630 nm,每份标本收集 10 000 个细胞以上,死细胞着染产生红色荧光。

2.5 Western blot 法检测蛋白表达

细胞分组及给药情况同“2.4”项下。DTS(17.85 $\mu\text{g/ml}$)分别作用于细胞 12、24、48 h 后,收集细胞,加细胞裂解液提取细胞总蛋白,定量后取等量样本行 SDS-PAGE 电泳分离,然后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。将膜在封闭液中封闭 2 h,分别与 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3(稀释比例为 1:300)的一抗在 4 °C 孵育过夜,PBS 分别洗膜,加入二抗(稀释比例为 1:3 000),室温孵育 2 h,加入化学发光染色液,转入 X 光暗盒中曝光 3 min,显影。 β -actin 为内参对照,以目的蛋白条带与 β -actin 蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达值。

2.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 检验,两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DTS 对细胞活性的影响

MTT 法检测结果显示,给予不同质量浓度的 DTS 对细胞的生长有明显抑制作用。DTS 作用 24、48 h 后最大细胞抑制率分别为 54.48%、64.21%, IC_{50} 值分别为 62.36、33.94 $\mu\text{g/ml}$,且 DTS 对细胞的抑制作用具有浓度-时间依赖性。与空白对照组比较,各给药组细胞抑制率均升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),DTS 对细胞的抑制结果详见表 1。随着 DTS(17.85 $\mu\text{g/ml}$)作用时间的延长,细胞形态逐渐皱缩、脱落死亡,见图 1。

表 1 DTS 作用不同时间对细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of DTS on the activity of cell after different duration($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	OD_{570}		抑制率, %	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0(空白对照组)	0.476 \pm 0.012	0.668 \pm 0.011	0	0
5	0.435 \pm 0.015	0.579 \pm 0.013*	8.45	13.29
10	0.395 \pm 0.011*	0.492 \pm 0.011**	16.92	26.42
20	0.314 \pm 0.010**	0.349 \pm 0.011**	33.94	47.63
40	0.245 \pm 0.010**	0.291 \pm 0.012**	48.41	56.44
80	0.226 \pm 0.006**	0.239 \pm 0.013**	52.47	64.21
100	0.217 \pm 0.007**	0.234 \pm 0.010**	54.48	64.95

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

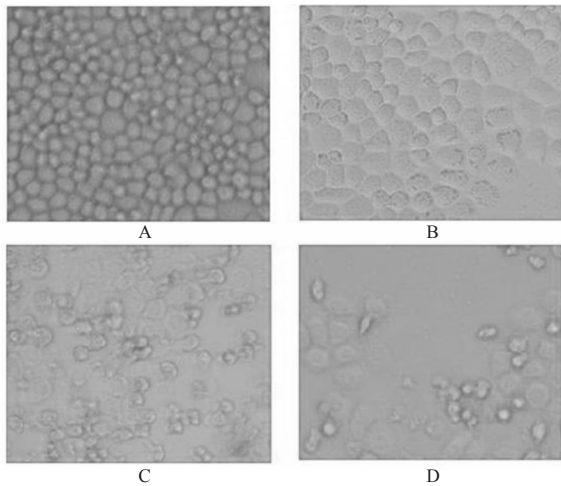


图1 DTS作用不同时间对细胞形态的影响($\times 200$)
A.空白对照组;B.12 h;C.24 h;D.48 h

Fig 1 Effects of DTS on the morphology of cell after different duration ($\times 200$)

A. blank control group; B. 12 h; C. 24 h; D. 48 h

3.2 DTS对细胞凋亡的影响

DTS可诱导细胞凋亡,并随给药时间的增加,诱导凋亡的作用增强。与空白对照组比较,DTS作用12、24、48 h后细胞的凋亡率升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。在流式细胞仪的散点图上,左下象限A3显示活细胞,右下象限A4显示早期凋亡细胞,右上象限A2显示晚期凋亡细胞。散点图显示,随着给药时间的增加,左下象限A3活细胞逐步减少,而右下象限早期凋亡以及右上象限晚期凋亡细胞逐步增加。DTS作用不同时间对细胞凋亡的影响见表2,流式散点图见图2。

表2 DTS作用不同时间对细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of DTS on the apoptosis of cell after different duration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率, %
空白对照组	0.2 \pm 0.01
DTS(12 h)组	5.6 \pm 0.14*
DTS(24 h)组	16.9 \pm 0.32**
DTS(48 h)组	29.6 \pm 0.45**

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 DTS对相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,DTS作用后Bcl-2蛋白表达减弱、Caspase-3蛋白表达增强($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);Bax蛋白表达无明显变化。DTS作用不同时间对相关凋亡蛋白表达结果的影响见图3、表3。

4 讨论

丹参中的水溶性和脂溶性成分均具有广泛且复杂的药理作用。在丹参的脂溶性萜醌类成分中,DTS是主要的抗肿瘤活性成分之一。笔者前期试验研究表明,丹参酮化合物可抑制乳腺癌、宫颈癌、肝癌等肿瘤细胞的增殖,并诱导多种肿瘤细胞凋亡、影响细胞周期分布^[6]。

细胞凋亡又称程序性死亡(PCD),是在内、外因素诱导下,由多基因参与调控的主动的细胞死亡^[7-8]。Bcl-2家族主要包

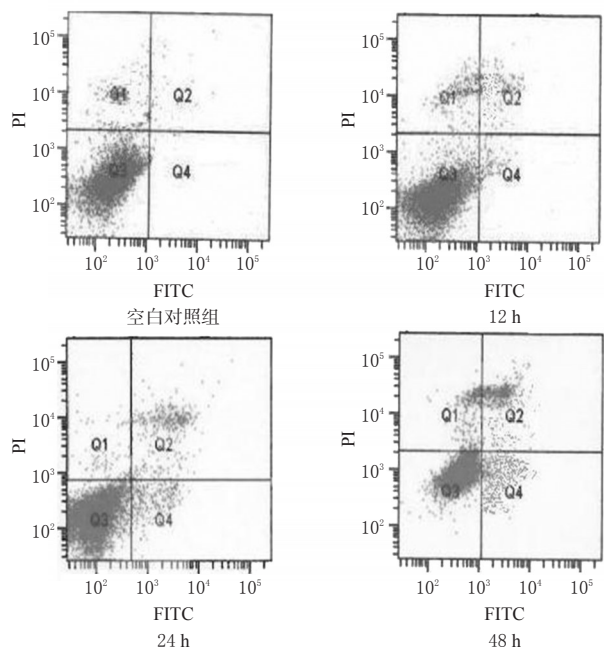


图2 DTS作用不同时间后的流式散点图

Fig 2 The flow scatter diagram of DTS effect after different duration

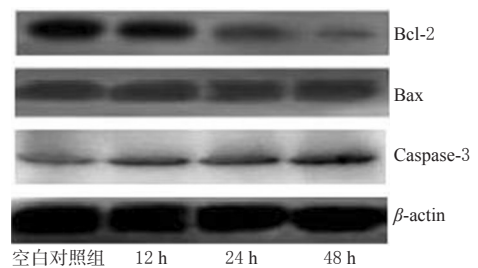


图3 DTS作用不同时间后相关凋亡蛋白的表达图谱

Fig 3 The expression patterns of Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein by DTS after different duration

表3 DTS作用不同时间对Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of DTS on the expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein after different duration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bcl-2	Bax	Caspase-3
空白对照组	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.03
DTS(12 h)组	0.61 \pm 0.03*	1.04 \pm 0.02	1.64 \pm 0.05*
DTS(24 h)组	0.34 \pm 0.02*	0.98 \pm 0.03	2.31 \pm 0.06**
DTS(48 h)组	0.22 \pm 0.01**	1.05 \pm 0.01	3.76 \pm 0.09**

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

括抑制凋亡的成员如Bcl-2、Bcl-xL、Bax等。有研究表明,P53、Bcl-2、c-myc、fas等基因是细胞凋亡分子机制的调控位点^[9-11]。其中,Bcl-2基因是Bcl-2家族中最重要的基因,可抑制细胞凋亡,同时一个启动型Caspase-2也控制着线粒体通透性的增加和促凋亡因子的释放^[12-13]。本实验结果表明,DTS能明显抑制人肺腺癌GLC-82细胞的增殖,且具有时间-浓度依赖性。DTS(17.85 $\mu\text{g/ml}$)随给药时间的增加诱导细胞凋亡的作用逐渐增强。随给药时间的变化,DTS能显著下调Bcl-2蛋白

表达、上调 Caspase-3 蛋白表达,而 Bax 蛋白表达无明显变化。

综上所述,DTS 能抑制人肺腺癌 GLC-82 细胞的增殖,并诱导细胞凋亡,其作用机制可能是通过下调 Bcl-2 蛋白的表达、上调 Caspase-3 蛋白表达,激活 Caspase 家族蛋白发挥诱导凋亡的作用,但其确切的作用机制还需进一步研究证实。

参考文献

[1] 甄霞,李运曼,方伟蓉,等.丹参酮化合物对 K562 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用研究[J].中国药理学通报,2008,24(7):964.

[2] Shin DS, Kim HN, Shin KD, et al. Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription-3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 193.

[3] Stumpf C, Fan Q, Hintermann C, et al. Anti-inflammatory effects of danshen on human vascular endothelial cells in culture[J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(5): 1 065.

[4] Park JH, Park OK, Cho JH, et al. Anti-inflammatory effect of tanshinone I in neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury in the gerbil hippocampus[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(7): 1 300.

[5] Jie L, Du H, Huang Q, et al. Tanshinone II_A induces apoptosis in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via blockade of the cell cycle in the G₂/M phase and a mitochondrial pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(8): 1 366.

[6] 叶因涛,徐文清,杨福军,等.隐丹参酮对宫颈癌 Hela 细胞增殖及细胞凋亡的影响[J].中国中药杂志,2010,35(1):118.

[7] Xu L, Feng JM, Li JX, et al. Tanshinone-1 induces tumor cell killing, enhanced by inhibition of secondary activation of signaling networks[J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(11):905.

[8] Zhang X, Lu H, Wang Y, et al. Taurine induces the apoptosis of breast cancer cells by regulating apoptosis-related proteins of mitochondria[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1): 218.

[9] Wei G, Margolin AA, Haery L, et al. Chemical genomics identifies small-molecule mcl1 repressors and Bcl-xL as a predictor of mcl1 dependency[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4):547.

[10] Michael J, Albert S, Alexandra K, et al. Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks[J]. *Cell*, 2012, 149(4): 780.

[11] Yuen HF, Chan KK, Grills C, et al. Ran is a potential therapeutic target for cancer cells with molecular changes associated with activation of the PI3K/Akt/mTORC1 and Ras/MEK/ERK pathways[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(2):380.

[12] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2):41.

[13] Zhang K, Wang J, Jiang H, et al. Tanshinone II_A inhibits lipopolysaccharide-induced muc1 over expression in alveolar epithelial cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 306(1):59.

(收稿日期:2015-05-18 修回日期:2015-07-30)
(编辑:林 静)

为期3年的药品上市许可持有人制度试点将在十省市开展

本刊讯 2015年11月4日闭幕的十二届全国人大常委会第十七次会议授权国务院在北京、天津、河北、上海、江苏、浙江、福建、山东、广东、四川等十省市,开展为期3年的药品上市许可持有人制度试点。

“药品上市许可持有人制度是当今国际社会普遍实行的药品管理制度。”国家食品药品监督管理总局法制司司长徐景和介绍,目前我国药品管理法规定,只有药品生产企业才可以申请药品注册,取得药品批准文号。随着我国药品产业的快速发展以及药品监管理念制度的不断进步,这一产品注册与生产许可相捆绑的管理制度的弊端逐渐出现,不利于鼓励药物创新和资源配置。

2015年11月4日表决通过的《关于授权国务院在部分地方开展药品上市许可持有人制度试点和有关问题的决定》明确,允许试点省市药品研发机构和科研人员取得药品批准文号,对药品质量承担相应责任。

徐景和说,实行药品上市许可持有人制度,允许药品上市许可持有人与生产企业相分离,有利于充分调动研发者的积极性,促进药品创新;优化资源配置,抑制低水平重复建设;落

实企业主体责任,加强药品质量管理,提高药品质量;创新药品治理机制,充分发挥政府、企业和市场三者为加强药品管理中的作用。

为提升药品质量,推进我国药品产业转型升级,该决定还同意国务院组织开展药品注册分类改革。依照药品管理法相关规定,批准生产已有国家药品标准的药品,应当符合国家药品标准,并达到原研药品的质量和疗效;批准生产在境外已经上市在境内尚未上市的药品,尚无国家药品标准的,应当达到原研药品的质量和疗效。

“药品直接关系到广大人民群众的身体健康和生命安全,实行药品上市许可持有人制度是药品监管制度的重要创新,涉及到药品管理法中有关制度的完善。”徐景和说,为积极稳妥推进,宜先行试点,实践证明可行后,再全面推开。通过这些试点来积累经验,为下一步药品管理法进一步完善提供经验。

据悉,该决定自2015年11月5日起施行。试点期间取得的药品批准文号,在试点期满后继续有效。国务院在试点期间将加强对试点工作的组织指导和监督检查,保证药品质量和安全。