

丹参酮 II_A 逆转多药耐药的体外效应研究^Δ

潘 登*, 陈可和(广西壮族自治区人民医院临床肿瘤中心, 南宁 530021)

中图分类号 R915;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3488-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.11

摘要 目的:研究丹参酮 II_A 逆转多药耐药的体外效应。方法:以 0 [仅 20 mg/L 多柔比星(ADM)或顺铂(DDP), 阴性对照], 5 mg/ml 丹参酮 II_A (联合 20 mg/L ADM 或 DDP) 培养人乳腺癌耐 ADM(MCF-7/ADM) 细胞、人肺癌耐 DDP(A549/DDP) 细胞 24、48 h 后, 采用 MTT 法测定细胞活力; 聚合酶链反应(PCR) 法测定细胞中细胞周期控制蛋白 CDC25A、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CKD2) mRNA 表达。结果:与阴性对照比较, 丹参酮 II_A 作用于 MCF-7/ADM、A549/DDP 细胞 24、48 h 后细胞活力减弱, 细胞中 CDC25A、CKD2 mRNA 表达减弱, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:丹参酮 II_A 联合 ADM 或 DDP 能够抑制 MCF-7/ADM 和 A549/DDP 的细胞活力, 减弱细胞中 CDC25A、CKD2 mRNA 表达, 具有一定的逆转恶性肿瘤多药耐药的作用。

关键词 丹参酮 II_A; 多药耐药; 肺癌; 乳腺癌; 细胞活力

Study on *in vitro* Effects of Tanshinone II_A to Reverse Multiple Drug Resistance

PAN Deng, CHEN Ke-he (Clinical Oncology Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study *in vitro* effects of tanshinone II_A to reverse multiple drug resistance. METHODS: MCF-7/ADM cells and A549/DDP cells were cultured with 0 [20 mg/L doxorubicin (ADM) or cisplatin (DDP), negative control], 5 mg/ml tanshinone II_A (combined with 20 mg/L ADM or DDP) for 24 and 48 h. Then MTT method was used to determine cell viability, and polymerase chain reaction (PCR) was adopted to detect mRNA expressions of cell cycle control protein CDC25A and cell cyclin dependent kinase (CKD2). RESULTS: Compared to the negative control, after MCF-7/ADM cells and A549/DDP cells were cultured with tanshinone II_A for 24 and 48 h, cell viability was weaker, also were mRNA expressions of CDC25A and CKD2. There were statistical differences ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Tanshinone II_A combined with ADM or DDP can inhibit the viability of cell line MCF-7/ADM and cell line A549/DDP, decrease expression of CDC25A, CKD2 mRNA in cells and reverse multiple drug resistance in malignant tumors.

KEYWORDS Tanshinone II_A; Multiple drug resistance; Lung cancer; Breast cancer; Cell viability

乳腺癌和肺癌是我国较为常见的两类恶性肿瘤, 尽管手术切除是目前治疗乳腺癌和肺癌的主要方式, 但仍需在手术切除后继续给予化疗药物以杀灭残留的肿瘤细胞, 进而预防肿瘤复发。在乳腺癌和肺癌患者的化疗过程中, 会出现化疗药物耐药现象。在癌症晚期, 肿瘤细胞原发耐药和继发耐药(获得性耐药) 达 90% 以上^[1], 这也是导致化疗不敏感的主要原因, 其中肿瘤细胞发生获得性多药耐药 (Multiple drug resistance) 是研究热点^[2]。丹参酮 II_A (Tanshinone II_A) 是中药唇形科植物丹参根须的提取物丹参酮单体之一, 已被成功分离提纯, 并被应用于心血管疾病和肿瘤的试验研究^[3]。丹参酮 II_A 已被发现具有诱导肿瘤细胞分化、促进凋亡以及抑制增殖的作用, 但具体机制尚不明确^[4]。探究能够逆转获得性多药耐药的化疗方式有助于改善恶性肿瘤患者的化疗效果, 延长生存时间。笔者拟研究丹参酮 II_A 逆转多药耐药的体外效应, 以其临床应用提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

CO₂ 培养箱 (上海百典仪器有限公司); I9700 型聚合酶链反应 (PCR) 仪 (美国 AB 公司)。

^Δ 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题 (No. Z2012288)

* 主治医师, 硕士。研究方向: 肿瘤化疗、靶向治疗、生物治疗、姑息与康复。E-mail: pandeng0630@163.com

1.2 药品与试剂

盐酸多柔比星 (ADM) 注射液 (深圳万乐药业有限公司, 批号: 20140509, 规格: 10 mg/支); 盐酸顺铂 (DDP) 注射液 (江苏豪森药业股份有限公司, 批号: 20140924, 规格: 30 mg/支); 丹参酮 II_A (西安天丰生物科技有限公司, 批号: 20131109, 纯度: >98%); RPMI 1640 培养液、MTT、PCR 试剂盒 (美国 Promega 公司)。

1.3 细胞

人乳腺癌耐 ADM 细胞 MCF-7/ADM 株、人肺癌耐 DDP 细胞 A549/DDP 株均购于中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

从液氮罐中取出 MCF-7/ADM、A549/DDP 细胞, 加入 RPMI 1640 完全培养液重悬细胞沉淀至细胞培养瓶中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 细胞活力测定

用 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, 接种于 96 孔培养板中培养 24 h, 使细胞贴壁。以 0 (仅 20 mg/L ADM 或 DDP, 阴性对照)、5 mg/ml 丹参酮 II_A (联合 20 mg/L ADM 或 DDP) 分别作用于 MCF-7/ADM、A549/DDP 细胞 24、48 h, 弃尽细胞培养基, 加入预先配制好的 MTT 溶液, 孵育 4 h 后吸除 MTT 溶液, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 摇床上低速振荡 10 min。在酶标仪 490 nm 波长处测定光密度以代表细胞

活力。试验均重复检测6次,取平均值。

2.3 细胞中CDC25A、CKD2 mRNA表达测定

用RPMI 1640培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔培养板中培养24 h,使细胞贴壁。以“2.2”项下0(阴性对照)、5 mg/ml丹参酮II_A分别作用MCF-7/ADM、A549/DDP细胞48 h。收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗2次(每次2 min),加入1 ml Trizol裂解液后室温放置5 min,转入离心管中,以离心半径为13.5 cm、3 000 r/min离心10 min。取上清液移入新离心管,加200 μl 氯仿,静置3 min,以离心半径为13.5 cm、3 000 r/min离心10 min。取含总RNA上层清液于新离心管,加0.5 ml异丙醇,室温沉淀10 min后,以离心半径为13.5 cm、3 000 r/min离心10 min,弃上清液,加75%乙醇1 ml,洗涤RNA,以离心半径为13.5 cm、3 000 r/min离心10 min,去掉乙醇留沉淀,空气干燥5 min,加入100 μl 经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的灭菌双蒸水。提取RNA后反转录为cDNA,采用两步法PCR扩增目的基因,分别扩增细胞周期控制蛋白CDC25A、细胞周期蛋白依赖性激酶2(CKD2)及 β -actin,扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏。扩增产物于2%琼脂糖凝胶分离恒压下电泳30 min,凝胶成像。试验均重复检测3次,取平均值。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因	序列
CDC25A	上游:5'-CTGGAGGTGAAGAAACAAC-3' 下游:5'-CTCATCAGACAAAGTGGC-3'
CKD2	上游:5'-CAGGCGTAGCAGAGTGGTGC-3' 下游:5'-TACAGGCAGGCGGAAGGAG-3'
β -actin	上游:5'-ATCTGACACCACCTTCTACAATGAGCTGCG3-3' 下游:5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG 3-3'

2.4 统计学方法

采用SPSS 18.0软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞活力测定结果

与阴性对照比较,5 mg/ml丹参酮II_A分别作用于MCF-7/ADM、A549/DDP细胞24、48 h,细胞活力减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。细胞活力测定结果见表2。

表2 细胞活力测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of cell viability($\bar{x} \pm s, n=6$)

丹参酮II _A 质量浓度,mg/ml	MCF-7/ADM细胞		A549/DDP细胞	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0(阴性对照)	100 \pm 15.62	100 \pm 17.53	100 \pm 17.79	100 \pm 18.03
5	34.52 \pm 4.62*	18.94 \pm 2.45*	38.14 \pm 5.53*	21.42 \pm 3.45*

注:与阴性对照比较,* $P < 0.01$

Note: vs. negative control, * $P < 0.01$

3.2 细胞中CDC25A、CKD2 mRNA表达测定结果

与阴性对照比较,5 mg/ml丹参酮II_A分别作用于MCF-7/ADM、A549/DDP细胞48 h,细胞中CDC25A、CKD2 mRNA表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。细胞中CDC25A、CKD2 mRNA表达测定结果见表3。

4 讨论

表3 细胞中CDC25A、CKD2 mRNA表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Results of mRNA expressions of CDC25A and CKD2 in cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

丹参酮II _A 质量浓度,mg/ml	MCF-7/ADM细胞		A549/DDP细胞	
	CDC25A	CKD2	CDC25A	CKD2
0(阴性对照)	100 \pm 17.19	100 \pm 18.59	100 \pm 16.04	100 \pm 18.56
5	25.52 \pm 3.62*	36.61 \pm 5.31*	19.98 \pm 2.76*	26.84 \pm 3.91*

注:与阴性对照比较,* $P < 0.01$

Note: vs. negative control, * $P < 0.01$

在心血管疾病的研究中,发现丹参酮II_A具有类似维拉帕米(VRP)的细胞膜钙通道阻滞作用和电生理活性,其结构亦符合多药耐药逆转剂共同的结构特征^[5]。MCF-7/ADM是耐受化疗药物ADM的乳腺癌细胞株,A549/DDP是耐受化疗药物DDP的肺癌细胞株,两者分别是研究乳腺癌、肺癌化疗耐药的理想工具^[6-7]。本研究用MTT法检测了两种细胞株的细胞活力,结果显示,5 mg/ml丹参酮II_A培养MCF-7/ADM、A549/DDP细胞后,细胞活力减弱。这提示丹参酮II_A处理能够逆转肿瘤细胞株的多药耐药情况。

肺癌细胞和乳腺癌细胞具有极强的增殖能力,这同时也是癌症发生局部复发、远处转移以及化疗药物耐药的病理生理基础^[8]。肿瘤细胞的增殖能力受到多种基因的调控,细胞周期蛋白是增殖过程重要的调节分子。CDC25A是一类双重特异性磷酸酶,能够与CDK相互作用并使其发生去磷酸化;Cyclin E是一类在细胞增殖的G₁~S期特异性表达的细胞周期蛋白,能够与激活的CKD2结合。两者共同发挥作用并促进细胞周期由G₁期过渡到S期^[9]。已有研究表明,CDC25A和CKD2高表达与结肠癌、乳腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤的发生密切相关^[10];当以上两种分子过度表达时,会造成肿瘤细胞过度增殖以及对化疗药物的敏感性降低^[11]。本研究对细胞中上述因子mRNA表达进行检测,结果显示,丹参酮II_A可减弱MCF-7/ADM细胞和A549/DDP细胞中CDC25A、CKD2 mRNA的表达。

综上,丹参酮II_A联合ADM或DDP能够抑制MCF-7/ADM细胞和A549/DDP细胞的活力,抑制细胞中CDC25A、CKD2 mRNA表达,具有一定的逆转恶性肿瘤多药耐药的作用。

参考文献

- [1] Merk J, Rolff J, Dorn C, et al. Chemoresistance in non-small-cell lung cancer: can multidrug resistance markers predict the response of xenograft lung cancer models to chemotherapy?[J]. *Eur J Cardiothorax Surg*, 2011, 40(1): 29.
- [2] 王江峰,周御来,袁红.丹参酮II_A对人A549/CDDP细胞凋亡和耐药蛋白表达的作用[J]. *中国药理通讯*, 2010, 27(3): 26.
- [3] 张欣,张蒲容,陈洁.丹参酮II_A对乳腺癌抑制作用的体内实验研究[J]. *四川大学学报:医学版*, 2010, 41(1): 62.
- [4] Xu L, Feng L, Zhu JM, et al. Tanshinone-1 induces tumor cell killing, enhanced by inhibition of secondary activation of signaling networks[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 31(4): 905.
- [5] 何欣,曾柏荣,刘华.丹参酮II_A对小鼠Lewis肺癌获得性多药耐药及相关酶系影响的实验研究[J]. *中医药导报*,

不同分子质量段全蝎蛋白对转基因斑马鱼血管生成的影响

侯林^{1*}, 周芹芹², 崔清华¹, 田景振^{1#} (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省医学科学院药物研究所/济南大学医学与生命科学学院, 济南 250000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3490-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.12

摘要 目的: 研究不同分子质量段全蝎蛋白对转基因斑马鱼血管生成的影响。方法: 建立转基因斑马鱼模型。先后以超滤法、离子交换层析法对全蝎蛋白进行分离, 获得不同分子质量段的全蝎蛋白(3~10 ku、>10~50 ku、>50 ku)。以10、100、500 μg/ml的上述全蝎蛋白培养转基因斑马鱼胚胎, 荧光显微镜下对转基因斑马鱼节间血管进行计数, 优选全蝎蛋白最适分子质量段; 以>50 ku全蝎蛋白1、2成分再次进行上述培养与血管计数, 优选最适成分。结果: 质量浓度为500 μg/ml的>50 ku全蝎蛋白1成分抑制斑马鱼血管生成活性最强, 抑制率为92.59%。结论: 全蝎蛋白及其相关成分具有抑制血管生成的活性, 可能为全蝎抗肿瘤机制之一。

关键词 全蝎; 超滤; 离子交换层析; 斑马鱼; 血管生成;

The Effects of Scorpion's Proteins with Different Molecular Weights on Angiogenesis of the Transgenic Zebrafish

HOU Lin¹, ZHOU Qin-qin², CUI Qing-hua¹, TIAN Jing-zhen¹ (1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences/School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan, Jinan 250000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of scorpion's proteins with different molecular weights on angiogenesis of the transgenic zebrafish. METHODS: The vascular fluorescence transgenic zebrafish models were established. Scorpion's proteins were separated by ultrafiltration and ion exchange chromatography to obtain the scorpion protein fractions with different molecular weights (3-10 ku, >10-50 ku and >50 ku). The embryos of transgenic zebrafishes were cultured in the above 10, 100 and 500 μg/ml scorpion's proteins. Intersegmental vessels of the transgenic zebrafishes were counted under the fluorescence microscope to optimize the most suitable scorpion's protein molecular weight. The vessels were counted again with >50 ku scorpion protein component 1 and 2, so as to select suitable component. RESULTS: The >50 ku scorpion's protein fraction component 1 with the mass concentration of 500 μg/ml had the highest inhibitory activity for the angiogenesis of the transgenic zebrafish, with inhibitory rate of 92.59%. CONCLUSIONS: Scorpion's protein and its fractions have the activity of angiogenesis inhibition, which may be one of anti-cancer mechanisms of scorpion.

KEYWORDS Scorpion; Ultrafiltration; Chromatography; Zebrafish; Angiogenesis

肿瘤的发生、生长和转移与肿瘤新生血管的形成密切相关。早在1971年 Folkman J^[1]就提出肿瘤的生长和转移具有血

管依赖性的观点, 认为肿瘤的生长分为无血管期和血管期, 在无血管期, 肿瘤细胞主要依靠周围组织的弥散来获取氧和营

2010, 16(9): 89.

- [6] 刘瑞娟, 孙长岗, 唐世锋, 等. 逆转胶囊含药血清对人乳腺癌耐药药株 MCF-7/ADR 细胞 P-gp 蛋白表达的影响[J]. 实用癌症杂志, 2010, 25(10): 20.
- [7] 张兆颖, 储婷, 马伟从, 等. 丹参酮 II_A 脂质体的制备及对 HepG2/ADR 细胞增殖的抑制作用[J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(1): 33.
- [8] 官玲花. HPLC 法同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(32): 3 056.
- [9] Rocha G, Oliveira RR, Kaplan MA, *et al.* 3β-acetyl tormentic acid reverts MRP1/ABCC1 mediated cancer resistance through modulation of intracellular levels of GSH and inhibition of GST activity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 741(9): 140.
- [10] 李春娣, 张薇, 徐亚东. 丹参酮 II_A 磺酸钠注射液对小鼠 Lewis 肺癌生长及 PCNA 表达的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2010, 31(3): 24.
- [11] Jiao JW, Wen F. Tanshinone II_A acts via p38 MAPK to induce apoptosis and the down-regulation of ERCC1 and lung-resistance protein in cisplatin-resistant ovarian cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 781.

(收稿日期: 2015-05-12 修回日期: 2015-06-15)

(编辑: 张静)

* 讲师。研究方向: 中药新药与新技术研究方向。电话: 0531-89628597。E-mail: houlin5027@163.com

通信作者: 教授。研究方向: 中药新药与新技术。电话: 0531-89628080。E-mail: tianjingzhen@163.com