

丹参酮 II_A 诱导人鼻咽癌 CNE 细胞凋亡

戴支凯^{1,2*}, 黄大林³, 石京山², 余丽梅⁴, 吴芹², 徐庆¹

(1. 桂林医学院药理学教研室, 广西桂林 541004; 2. 贵州省基础药理重点实验室, 贵州遵义 563003; 3. 桂林医学院微生物学教研室, 广西桂林 541001; 4. 贵州省细胞工程重点实验室, 贵州遵义 563003)

[摘要] 目的:探讨丹参酮 II_A (tanshinone II_A, Tan II_A) 抗人鼻咽癌 CNE 作用及其可能作用机制。方法:通过细胞形态学观察、生长曲线绘制、MTT 检测以及克隆实验观察 Tan II_A 对 CNE 细胞增殖的影响;应用 Hoechst33258 和 PI 双染法观察 Tan II_A 对 CNE 细胞凋亡的影响;采用荧光分光光度计检测 Tan II_A 对 CNE 细胞细胞内钙及线粒体膜电位的影响;RT-PCR 检测 Tan II_A 对 CNE 细胞 Bad, MT-1A mRNA 表达的影响。结果: Tan II_A 能抑制 CNE 细胞增殖,且随 Tan II_A 剂量的增加和作用时间的延长而增强, Tan II_A 作用 CNE 细胞 24, 48, 72 h 的 IC₅₀ 分别为 45.7, 24.8, 3.3 mg · L⁻¹。Tan II_A 作用 CNE 细胞 24 h 后, CNE 细胞出现染色质聚集等典型的凋亡形态学改变,且随 Tan II_A 剂量的增加, CNE 细胞凋亡百分率逐渐增大。Tan II_A 作用后, CNE 细胞的细胞内钙升高、线粒体膜电位降低、Bad mRNA 表达增加、MT-1A mRNA 表达上调。结论: Tan II_A 具有抗 CNE 作用,其诱导细胞凋亡可能与钙依赖性通路和 MT-1A 表达上调有关。

[关键词] 丹参酮 II_A; 肿瘤; 人鼻咽癌 CNE 细胞; 凋亡; 钙依赖性通路; MT-1A

唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦和滋补之功效。丹参酮 II_A (tanshinone II_A, Tan II_A) 为丹参的主要组成成分之一,具有抑制心肌肥大、抗炎、抗氧化、增强机体免疫功能、抗衰老等作用。近来的研究显示, Tan II_A 对乳腺癌、肺癌、骨肉瘤、肝癌、白血病、卵巢癌等多种肿瘤细胞的增殖具有抑制作用,具有良好的抗肿瘤前景^[1]。然而, Tan II_A 的抗肿瘤作用的机制、抗肿瘤谱及其应用价值尚未完全明了,继续研究其作用机制、对其他肿瘤作用的有效性及其在抗肿瘤的应用价值成为当前紧迫的研究任务^[1]。本研究以人鼻咽癌细胞株 CNE 为研究对象,初步探索了 Tan II_A 抗肿瘤的可能机制。

1 材料

1.1 药物、试剂及细胞 人鼻咽癌细胞株 CNE 由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。RPMI-1640 培养基干粉为 Gibco 产品;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。丹参酮 II_A 对照品由中国药品生物制品检定所提供。5 氟尿嘧啶 (5-FU) 购自上海旭东海普药业有限责任公司。胰蛋白酶, 噻唑蓝 (MTT), 二甲基亚砜 (DM-

SO), Fura-2/AM, Hoechst33258, 罗丹明 123 (R123) 和碘化丙啶 (PI) 均为 Sigma 公司产品; Trizol Regent 和 Prime ScriptTM RT reagent kit: 宝生物工程 (大连) 有限公司; POWER SYBR[®] GREEN PCR Master Mix: Applied Biosystems, Foster City, CA。引物 18S (NR_003286, F: 5'-GAACGAGACTCTGGCATGCTAA-3', R: 5'-ACGCCACTTGTCCCTCTAAGAA-3') 和 MT-1A (NM_005946, F: 5'-CTCGAAATGGACCCCAACTG-3', R: 5'-CAGCCCTGGGCACACTTG-3') 由 Sigma 公司合成, 引物 Bad (NM_004322.3, F: 5'-AGTGACCTTCGCTCCACATC-3', R: 5'-CACGGATCCTCTTTTTG-CAT-3'), 由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 仪器 550 型酶标仪 (BioTek Instruments, 美国); DM4000b 型荧光显微镜 (Leica Microsystems Ltd., 德国); EL05113056 荧光分光光度计 (Cary Eclipse, 澳大利亚); TU1810 型紫外-可见分光光度计 (北京普析仪器有限责任公司); Mastercycler Gradient Cycler (Eppendorf AG, 德国); iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, Inc., 美国)。

2 方法

2.1 细胞培养 CNE 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞于指数生长期时, 胰蛋白酶消化, 进行传代培养。

[稿件编号] 20100717004

[通信作者] *戴支凯, 副教授, 硕士生导师, 主要从事抗肿瘤药理研究, Tel: (0773) 589801, E-mail: dzhk110@126.com



2.2 MTT 检测 将 5×10^4 个/mL 的对数生长期 CNE 细胞接种于 96 孔板, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 。次日分为阴性对照组 (RPMI 1640)、阳性对照组 (5-FU, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, RPMI 1640 配制) 和 5 个 10 倍梯度的试药组 ($0.01 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, RPMI 1640 配制), 每组设 4 个平行孔。于结束培养 (24, 48, 72 h) 前 4 h, 加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT。结束培养后, 小心吸弃上清, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min, 于酶标仪 490 nm 检测各孔的吸光度 A 。计算生长抑制百分率和 IC_{50} 。实验重复 3 次。

2.3 培养细胞的观察 采 5×10^4 个/mL 的对数生长期 CNE 细胞接种于 24 孔板, $1 \text{ mL}/\text{孔}$, 次日分组加药。药物作用 24 h 后, 倒置显微镜下观察药物作用后的细胞形态。

2.4 细胞克隆试验 应用细胞克隆实验检测 Tan II_A 对 CNE 细胞的长期毒性作用。取指数生长期细胞, 接种于 6 孔板, 每孔 250 个细胞。次日分组加药, 药物作用 24 h 后, 去上清, PBS 洗 2 遍, 换成无药物的完全培养基, 于 $5\% \text{ CO}_2$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中继续培养 10 d。培养结束后, 弃上清, 用锥虫蓝溶液 (0.5 g 锥虫蓝溶于 100 mL 95% 乙醇) 染色, 倒置显微镜下计数细胞集落数 (每个集落的细胞数大于 50 个细胞)。计算其他各给药组的克隆百分率, 克隆百分率 = 给药组的克隆数/阴性对照组的克隆数 $\times 100\%$ 。

2.5 PI 和 Hoechst33258 双荧光染色/荧光显微镜观察 将细胞接种于 24 孔板, 次日分组加药。药物作用 24 h 后, 去上清, 加入 PBS 配制的荧光染液 (终浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PI 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst33258), 荧光倒置显微镜下观察并计数 5 个不同区域共 15 个视野的凋亡细胞。

2.6 细胞内钙 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 检测 Fura-2/AM 是一种钙离子敏感的荧光染料。Fura-2/AM 负载细胞后, 用荧光分光光度计以激发波长分别为 340 nm 和 380 nm、发射波长为 510 nm 测定其荧光强度比率 (F_{340}/F_{380}), 该荧光强度比率能反映 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化, 已成为判断 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的指标^[2]。取对数生长期细胞, 用缓冲液 (含 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.4) 洗 2 遍, 用含 0.2% 牛血清白蛋白的上述缓冲液重悬细胞, 加入终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fura-2/AM, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min。用上述缓冲液洗 3

遍, 以去除细胞外残留的 Fura 2/AM。用含 0.2% 牛血清白蛋白的上述缓冲液重悬细胞, 调整为 5×10^5 个/mL, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 20 min。荧光分光光度计测定 F_{340}/F_{380} 。实验结果以给药前的平均比率进行标准化。

2.7 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi_m$) 测定 R123 是一种具有膜通透性的阳离子荧光染料, 可扩散进入细胞质, 聚集于带负电位的线粒体, 结合基质蛋白后其荧光即淬灭。线粒体膜去极化时, R123 释放进入细胞浆, R123 荧光恢复。因此, R123 荧光强度能反映线粒体膜去极化程度^[3]。取对数生长期细胞, D-Hanks 液洗 2 遍, 用 D-Hanks 液重悬细胞, 加入终浓度为 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 R123, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光负载 30 min。R123 负载的细胞用 D-Hanks 洗 3 遍, 再用 D-Hanks 液重悬细胞, 调整为 4×10^5 个/mL。荧光分光光度计测定荧光强度, 设定激发波长 488 nm, 发射波长 535 nm。荧光强度稳定后, 加入 Tan II_A 。实验结果以给药前的平均荧光强度进行标准化。

2.8 Real-time RT-PCR 将细胞接种于 6 孔板, 次日分组加药。药物作用 24 h 后, 去上清, PBS 洗 3 遍。加入 0.5 mL Trizol Regent 收集总 RNA, 采用氯仿萃取、异丙醇沉淀和 75% 乙醇洗涤后, 加入 $50 \mu\text{L}$ DEPC 水溶解。紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} , 计算 RNA 的含量, 配置 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RNA 样品。按试剂盒说明进行 RT ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min; $85 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 s) 和 PCR ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环)。以 18S 为内参基因, 根据测得的 CT 值计算目的基因的相对表达量 = 目的基因的表达量/内参基因的表量。

2.9 统计学分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 Tan II_A 对 CNE 细胞体外增殖的影响 Tan II_A 对 CNE 细胞体外增殖随给药剂量的增加和作用时间的延长而逐渐增强。其中, 作用 CNE 细胞 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 分别为 45.7, 24.8, 3.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1)。 Tan II_A 作用 CNE 细胞 24 h 后 (图 2), 阴性对照组细胞达到融合, 细胞呈圆形, 形态清晰。与阴性对照组比, Tan II_A 处理后的贴壁细胞密度下降, 悬浮细胞和细胞碎片增多。

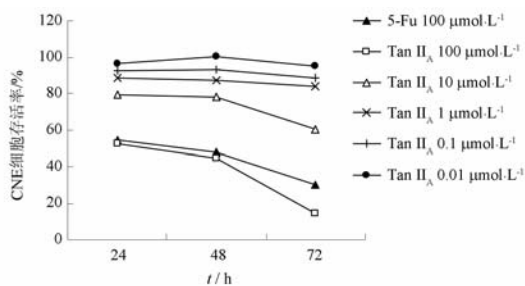
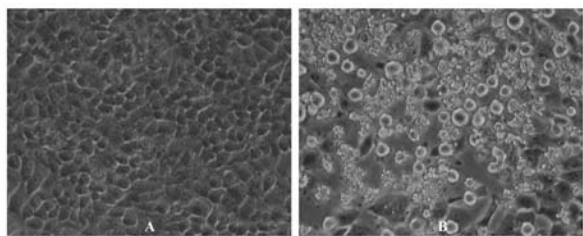


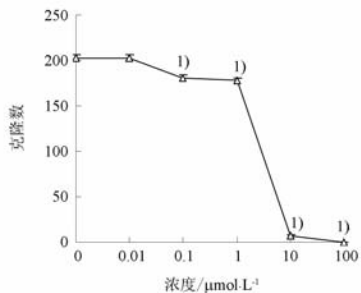
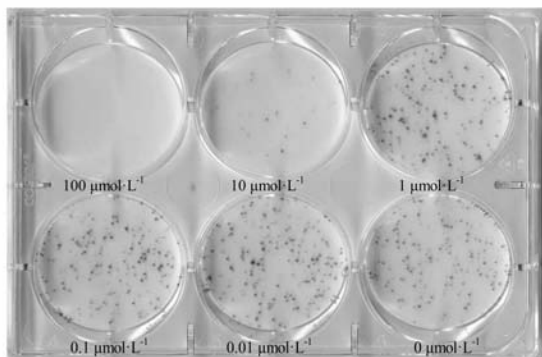
图1 Tan II_A对CNE细胞增殖的抑制作用



A. 阴性对照组; B. Tan II_A 100 μmol·L⁻¹ (图4同)。

图2 Tan II_A作用24 h对CNE细胞生长的影响(×200)

3.2 细胞克隆试验 随 Tan II_A剂量的增加,CNE细胞克隆数逐渐减少,其中,Tan II_A的 10 μmol·L⁻¹和 100 μmol·L⁻¹组的克隆数下降显著(图3)。



与对照组相比¹⁾*P* < 0.01 (图6同)。

图3 Tan II_A对CNE细胞克隆的影响

3.3 Hoechst33258和PI染色 双荧光染色显示,正常细胞染色质呈均一的蓝染;早期凋亡细胞核染色质聚集,呈亮蓝色;晚期凋亡细胞核碎裂,蓝染,或核裂解后呈红染。阴性对照组凋亡细胞极少,与阴性对照组比,Tan II_A作用后的凋亡细胞和死亡细胞明显增多。细胞计数显示,阴性对照组的凋亡细胞百分率为(2.6 ± 1.2)%,10,50,100 μmol·L⁻¹的Tan II_A作用后的凋亡细胞百分率分别为(15.25 ± 2.4)%,(32.4 ± 4.4)%,(43.4 ± 4.6)%,均高于阴性对照组(*P* < 0.01,图4)。

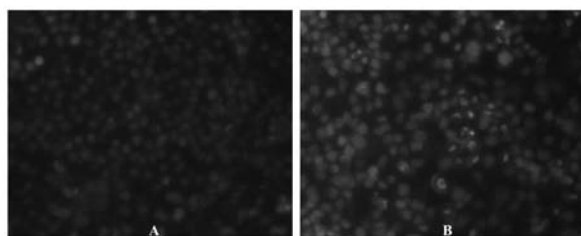


图4 Tan II_A处理CNE细胞后的Hoechst33258和PI染色(×200)

3.4 [Ca²⁺]_i测定 荧光分光光度计检测结果显示,CNE细胞 Fura-2/AM 负载后的 *F*₃₄₀/*F*₃₈₀ 比率为(2.18 ± 0.55),10,50,100 μmol·L⁻¹的Tan II_A作用后的 *F*₃₄₀/*F*₃₈₀ 比率分别为(3.76 ± 0.50),(4.79 ± 0.40)和(5.41 ± 0.21),均高于阴性对照组(*P* < 0.01)。提示,Tan II_A具有升高CNE细胞[Ca²⁺]_i的作用。

3.5 Δψ_m的测定 R123 荧光强度检测显示,随 Tan II_A剂量的增加,R123 荧光强度逐渐减弱。呈剂量依赖性。提示,Tan II_A可使CNE细胞的Δψ_m下降(图5)。

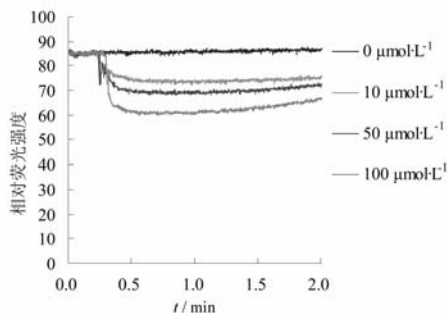


图5 Tan II_A对CNE细胞线粒体膜电位的影响

3.6 Tan II_A对CNE细胞Bad,MT-1A mRNA表达的影响 荧光定量PCR检测显示,CNE细胞Bad mRNA的表达随Tan II_A剂量的增加而逐渐增加;100 μmol·L⁻¹Tan II_A作用后CNE细胞MT-1A mRNA的表达增加($P < 0.01$,图6)。

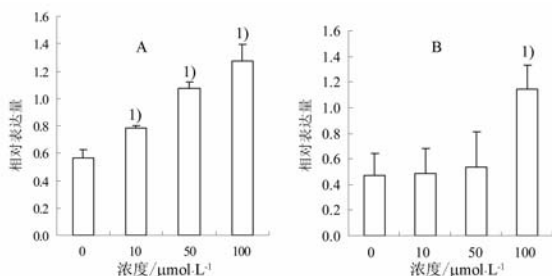


图6 Tan II_A对CNE细胞Bad(A)和MT-1A(B) mRNA表达的影响

4 讨论

Tan II_A是中药丹参中提取的一种脂溶性成分。以往研究显示,Tan II_A具有良好的抗肿瘤前景^[1]。本研究显示,Tan II_A作用CNE细胞后,贴壁细胞减少,悬浮细胞和细胞碎片增多;随Tan II_A剂量的增加和作用时间的延长,Tan II_A对CNE细胞增殖的抑制作用逐渐增强,其中,Tan II_A作用CNE细胞24,48,72 h的IC₅₀分别为45.7,24.8,3.3 mg·L⁻¹;此外,10,100 μmol·L⁻¹的Tan II_A对CNE细胞克隆的抑制作用明显。这些结果提示,Tan II_A具有抑制CNE细胞体外增殖的作用。

许多药物通过不同的生物学机制引起肿瘤细胞增殖抑制^[5]。本研究显示,Tan II_A处理后,CNE细胞出现了核染色质聚集等凋亡形态学改变。随Tan II_A的增加,凋亡CNE细胞的比率逐渐增大。其中,100 μmol·L⁻¹的Tan II_A作用后的凋亡细胞百分率达(43.4 ± 4.6),明显高于阴性对照组的(2.6 ± 1.2)($P < 0.01$)。表明诱导肿瘤细胞凋亡是Tan II_A抗肿瘤作用的机制之一,与相关报道^[6]一致。

[Ca²⁺]_i的升高是细胞凋亡的关键信号之一,[Ca²⁺]_i升高,可激活Calmodulin(CaM),通过Calcineurin,DAPK(death-associated protein kinase)和CaMK(calmodulin-dependent kinase)通路诱导细胞凋亡^[7]。Calcineurin能引起Bad去磷酸化,Bad易位进入线粒体,并能引起活性氧的产生,通过p53介

导的细胞凋亡通路引起细胞凋亡。[Ca²⁺]_i升高,CaMK II通过自磷酸化或活性氧化而激活,至少可通过3种通路诱导细胞凋亡^[8]:①激活JNK,诱导Fas;②线粒体摄取Ca²⁺,线粒体外膜通透性增加,Δψ_m下降,凋亡基因的释放;③激活STAT1,通过转录或非转录机制促进凋亡。另有报道^[9],应激刺激能引起的内质网释放Ca²⁺,线粒体摄取Ca²⁺,触发线粒体功能障碍,并激活CaMK II,从而诱导凋亡。本研究结果显示,Tan II_A作用后,CNE细胞[Ca²⁺]_i升高,线粒体膜电位下降,Bad mRNA的表达增加。提示,Ca²⁺依赖的凋亡通路可能是Tan II_A抗肿瘤作用的机制之一。

金属硫蛋白(metallothionein,MT)是一种富含半胱氨酸的小分子蛋白,其进化过程与其他癌胚基因产物相似,在许多正常细胞包括肝细胞(尤其是胚胎期和出生后的早期)呈阳性表达。在绝大多数肿瘤中,MT的表达与肿瘤分化程度呈负相关,MT可作为肿瘤侵袭程度及其预后的指标。但在人喉癌中MT高表达与高分化有关^[10],MT的相对表达可能与肿瘤或组织的类型、疾病的不同阶段等有关^[11-12]。本研究结果显示,Tan II_A作用后,CNE细胞内MT-1A mRNA的表达增多。提示,Tan II_A可能通过上调MT-1A的表达,促进了肿瘤细胞分化。

综上所述,Tan II_A具有抗CNE作用,并能诱导CNE细胞凋亡,其诱导细胞凋亡可能与钙依赖性通路和上调MT-1A表达有关。然而,MT-1A的表达与钙依赖性通路的关系尚不清楚,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Shailendra Kapoor. Tanshinone II_A: a potent, natural anti-carcinogenic agent for the management of systemic malignancies[J]. Chin J Integr Med,2009,15(2):153.
- [2] Xianglian Ni, Grace J Sullivan, Miguel Martin-Caraballo. Developmental characteristics of AMPA receptors in chick lumbar motoneurons[J]. Dev Neurobiol,2007,67(11):1419.
- [3] Ward M W, Rego A C, Frenguelli B G, et al. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells[J]. J Neurosci,2000,20(19):7208.
- [4] Hakan Savli, Sema Sirma, Balint Nagy, et al. Real-time PCR analysis of the apoptosis related genes in ATRA treated APL t(15;17) patients[J]. Exp Mol Med,2003,35(5):454.
- [5] Root D E, Flaherty S P, Kelley B P, et al. Biological mechanism profiling using an annotated compound library[J]. Chem Biol,2003,10(9):881.
- [6] 姬郁林,何金涛,周清华,等.丹参酮对人肺癌细胞株的抑制作用及其分子机理[J].中国肺癌杂志,2008,11(2):202.

- [7] Maria Hägg Olofsson, Aleksandra Mandic Havelka, Slavica Brnjic, et al. Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology: role of calmodulin kinase II[J]. BMC Chem Biol, 2008, 8: 2.
- [8] Jenelle M Timmins, Lale Ozcan, Tracie A Seimon, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways [J]. J Clin Invest, 2009, 119(10): 2925.
- [9] Lim W S, Timmins J M, Seimon T A, et al. STAT1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress *in vitro* and in advanced atherosclerotic lesions *in vivo*[J]. Circulation, 2008, 117(7): 940.
- [10] Pastuszewski W, Dziegiel P, Krecicki T, et al. Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer [J]. Anticancer Res, 2007, 27 (1): 335.
- [11] Cherian M G, Jayasurya A, Bay B H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis [J]. Mutat Res, 2003, 533(12): 201.
- [12] Jin R, Huang J, Tan P H, et al. Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2004, 10 (2): 74.

Apoptosis inducing effect of tanshinone II_A on human nasopharyngeal carcinoma CNE cells

DAI Zhikai^{1,2*}, HUANG Dalin³, SHI Jingshan², YU Limei⁴, WU Qin², XU Qing¹

(1. Pharmacology Department of Guilin Medical College, Guilin 541004, China;

2. The Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province, Zunyi 563003, China;

3. Microbiology Department of Guilin Medical College, Guilin 541004, China;

4. Key laboratory of Cell Engineering in Guizhou Province, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate anticancer effect and potential mechanism of tanshinone II_A (Tan II_A) on human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE cells. **Method:** Antiproliferative effect of Tan II_A on CNE cells was evaluated by morphological examination, cell growth curves, colonial assay and MTT assay. Apoptosis detection was carried out using Hoechst33258 and PI double-dyeing method. Intracellular Ca²⁺ concentration and mitochondria membrane potential were detected by fluorospectrophotometer. Bad and MT-1A transcript analysis in CNE cells was analyzed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Tan II_A could inhibit CNE cells proliferation in dose- and time-dependent manner. 50% inhibiting concentration of Tan II_A on CNE cells in 24, 48, 72 h was 45.7, 24.8, 3.3 mg · L⁻¹, respectively. Typical apoptotic morphology such as chromatin aggregation was observed in CNE cells with Tan II_A treated for 24 h, and the apoptotic inducing effect was in a dose-dependent manner. After treated with Tan II_A, intracellular Ca²⁺ concentration of CNE cells was increased, mitochondria membrane potential of the cells was decreased, relative mRNA level of Bad and MT-1A was up-regulated. **Conclusion:** Tan II_A had anticancer effect on CNE cells through apoptosis via calcineurin-dependent pathway and MT-1A downregulation.

[**Key words**] Tanshinone II_A; carcinoma; human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE; apoptosis; calcineurin-dependent pathway; MT-1A

doi:10.4268/cjcm20111526

[责任编辑 张宁宁]