

· 论 著 ·

丹酚酸 B 对肝癌细胞的体外抑制作用及基本机制

何金洋^{1*}, 刘亚敏², 葛文华², 江远³, 郭兴伯¹

摘要:目的 观察丹酚酸 B 对小鼠肝癌细胞 hepa1-6 的抑制作用及其基本机制。方法 以 hepa1-6 细胞培养为体外模型,用 MTT 法检测丹酚酸 B 对 hepa1-6 细胞的细胞毒作用,然后以 Annexin V 法用流式细胞仪检测丹酚酸 B 诱导 hepa1-6 细胞死亡的机制,以荧光定量 PCR 法检测丹酚酸 B 对 hepa1-6 细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 BaxmRNA 水平的影响。结果 丹酚酸 B 在 12.5ug/ml 以上对 hepa1-6 细胞有明显的细胞毒作用,其 TC50 为 31.9ug/ml。在 25-50ug/ml 之间,诱导 hepa1-6 细胞凋亡率为 27.58%~74.26%,在 37.5ug/ml 浓度时可以使抑制凋亡基因 Bcl-2 mRNA 显著降低,使促进凋亡基因 BaxmRNA 显著升高。结论 丹酚酸 B 对小鼠肝癌细胞 hepa1-6 具有显著体外抑制作用,其机制主要是诱导细胞凋亡。

关键词:丹酚酸 B;肝癌;hepa1-6 细胞;体外

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)6-660-04

Inhibiting effect and basic mechanism of salvianolic acid B on mouse hepatoma hepa1-6 cell line. HE Jin-yang^{1*}, LIU Ya-min², GE Wen-hua², et al. (Tropical Medicine Institute, Guangzhou Traditional Chinese Medicine University, Guangzhou 510405, Guangdong P. R. China)

Abstract: Objectives To observe the inhibiting effect and basic mechanism of Salvianolic acid B on mouse hepatoma hepa1-6 cell line. Methods Hepa1-6 cell culture was taken as in vitro model. MTT method was used for testing the cytotoxicity effect of Salvianolic acid B on the hepatoma cell line. Hepatoma cell death style was tested with Annexin V method in flow cytometry. Apoptosis related genes were tested with realtime quantitative PCR assay. Results Salvianolic acid B have marked cytotoxic effect on the hepa1-6 cell line in certain range of concentration. Its TC50 is 31.9ug/ml. The proportion of hepa1-6 cell apoptosis were between 27.58 and 74.26% when Salvianolic acid B was administrated in the concentration of 25-50ug/ml. The anti-apoptosis factor BCL-2 mRNA level was significantly decreased and pro-apoptosis factor Bax mRNA level was significantly elevated. Conclusion Salvianolic acid B can significantly inhibit the propagation of hepa1-6 cell line in vitro. The related mechanism is induction of cell apoptosis.

Key words: Salvianolic acid B;Hepatoma;Hepa1-6 cell line;In vitro.

丹酚酸 B 是丹参水溶性部位中的一种重要单体成分,一直被认为具有心血管系统活性,可以保护心肌缺血再灌注损伤、保护微血管细胞、预防动脉粥样硬化及血栓形成等^[1]。近年来也有报道丹酚酸 B 有抗乳腺肿瘤作用^[2],但未见有丹酚酸 B 对肝癌作用的报道。而丹参及丹参的脂溶性成分及丹参注射液都有对肝癌有效的研究报道^[3,4]。为此,本试验探讨以丹酚酸 B 对小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 抑制作用情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及培养基 小鼠肝癌细胞 hepa1-6, ATCC 编号为 CRL-1830,购买于中科院上海细胞库,培养基为高糖 DMEM,添加双抗(100u/L 青霉素、100mg/L 链霉素)、0.3g/L 谷氨酰胺、10%胎牛血清。

1.1.2 实验用药 丹酚酸 B(购买于南京 TCM 中药研究所,批号为 TCM056-080405,含量为 98.5%),阿霉素(购买于 Sigma 公司,货号 D1515)。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞分组 将 Hepa1-6 细胞复苏后在细胞瓶中培养至长满瓶底,然后以 1×10^5 /ml 浓度接种于 96 孔板中继续培养。待长满后开始上药。将丹酚酸 B 用培养基倍比稀释为 6 个浓度,分别为 100.0、50.0、25.0、12.5、6.25 和 3.125ug/ml。阿霉素用 10uM 浓度。丹酚酸 B 和阿霉素的每个浓度都设 3 孔,另设正常细胞对照孔 3 个和空白对照孔 3 个。药物作用 48h 后进行 MTT 检测。

1.2.2 MTT 检测 向吸去上清的细胞孔中加入含 0.4g/L MTT 的无血清培养液 0.1ml/孔,37℃ 孵育 4

作者单位:1.广州中医药大学热带医学研究所,广东 广州 510405; 2.广州中医药大学温病学教研室,广东 广州 510405; 3.广州医学院附属深圳沙井医院肝病科,广东 深圳 518104

作者简介:何金洋(1975~),男,博士,副研究员,主要从事肝病和艾滋病的实验和临床研究。

* 通讯作者 E-mail: sunny12345678_89@yahoo.com.cn

h, 去上清, 用二甲基亚砷溶解, 测 490nm 波长下的光密度 D 值。

1.2.3 半数毒性浓度(TC50)的计算

$$TC_{50} = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - <50\% \text{破坏百分率}}{>50\% \text{破坏百分率} - <50\% \text{破坏百分率}} \times C \right)$$

A = log >50% 破坏率药物浓度, B = log <50% 破坏率药物浓度 C = A - B

$$\text{破坏百分率}(\%) = \frac{\text{细胞对照 OD 值} - \text{给药实验组 OD 值}}{\text{细胞对照 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}} \times 100$$

1.2.4 细胞死亡机制流式细胞仪检测 将细胞先在培养瓶中培养至铺满后, 用 0.25% 的胰酶消化, 用培养基调细胞浓度至 1×10^5 细胞/ml, 然后接种于 24 孔板, 每孔 1ml。待细胞贴壁长满后开始分组上药。细胞分为 4 组, 分别为: 丹酚酸 B 高剂量组 (50 μ g/ml)、丹酚酸 B 中剂量组 (37.5 μ g/ml)、丹酚酸 B 低剂量组 (25 μ g/ml)、正常细胞组。正常细胞对照组不上药。药物作用 48h 后开始收集细胞标本, 用 0.25% 胰酶消化后, 加入 PBS, 800rpm 离心 4min, 洗 2 次, 然后进行流式细胞仪检测。采用南京凯基公司的 Annexin V 试剂盒进行检测。试剂盒货号为 KGA106; 批号为: 080905。将用 PBS 洗过的细胞进行计数, 然后稀释为约 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 细胞/ml, 取 0.5ml 转入流式细胞管, 加入试剂盒中的 Annexin V-FITC 5 μ l 混匀后, 加入 5 μ l Propidium Iodide 混匀, 然后上流式细胞仪 (BD 公司, FACS Caliber 型) 进行检测。采用荧光 1 和荧光 3 进行检测。凋亡细胞判定根据试剂盒说明书进行, 右下象限为凋亡细胞。

1.2.5 细胞凋亡相关基因 mRNA 检测分组 细胞在培养瓶中培养至铺满后, 用 0.25% 的胰酶消化, 用培养基调细胞浓度至 1×10^5 细胞/ml, 然后接种于 24 孔板, 每孔 1ml。待细胞贴壁长满后开始上药。细胞分为丹酚酸 B 组和正常细胞组。每组 3 孔。丹酚酸 B 组为 37.5 μ g/ml; 正常细胞对照组不上药。

1.2.6 细胞 RNA 提取 丹酚酸 B 作用 48h 后, 弃去上清液, 每孔加入 Trizol 试剂 0.5ml, 吹打混匀后每孔吸入无 RNA 酶的 1.5ml 离心管中冻存待检。RNA 提取方法为: 将冻存于 1.5ml 离心管中的细胞于室温下充分融化, 加入氯仿 0.1ml, 混匀后静置 10min, 然后于 4℃ 下 12 000rpm 离心 15min; 将上层水相移入另一个新的无 RNA 酶的 1.5ml 离心管中, 加入异丙醇 0.5ml, 混匀后静置 10min, 然后 12 000rpm 离心 10min, 弃去上清, 再加入 75% 乙醇 1ml, 8 500rpm 离心 5min, 弃去上清并用滤纸吸干管底液体, 用无 RNA 酶的水 30 μ l 溶解沉淀, 然后立刻进入逆转录。

1.2.7 RNA 逆转录和定量 PCR 逆转录体系采用 10 μ l, 组分为: 10 \times buffer 1 μ l, 10mM dNTP 0.5 μ l, RNase inhibitor 20u, oligo dT 引物 0.5 μ l, M-MLV 逆转录酶 0.5 μ l, 模板 RNA 5.5 μ l。反应条件为: 42℃、1h; 70℃、10min。然后冻存于 -20℃ 冰箱待测。后续定量 PCR 采用染料法, 以 25 μ l 体系, 引物浓度为 250nM, 每个基因均用模型组的 A 孔的 cDNA 为标准品做标准曲线。将 cDNA 10 倍梯度稀释为 4 个浓度, 分别赋值为 1e7、1e6、1e5、1e4 copies/ml。扩增条件为: 95℃ 变性 1min; 然后 95℃, 15sec; 60℃, 1min, 40 个循环。然后进行定量分析。定量 PCR 引物见表 1。

表 1 定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences for Quantitative PCR assay

1.2.8 定量 PCR 结果分析计算 用软件计算得到每

引物名称 (Name of primer)	正向引物 (Sense primer)	反向引物 (Antisense primer)	产物大小 (Product size)
Bax	tctaggaagctccagttcgatg	aaccttcattgcacccattc	102bp
Bcl-2	cagaaacctcctgccacct	ctcatccacgggtccacacag	109bp
GAPDH	cccactcctccacctttgac	atgaggtccaccacctgt	115bp

个基因的相对拷贝数, 然后将 Bax 或 Bcl-2 的拷贝数分别与 GAPDH 比较, 得出比值即为 Bax 或 Bcl-2 的相对量。然后将相对量用进行统计分析。

1.3 统计学分析 采用 *t* 检验和方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 hepa1-6 肝癌细胞的抑制作用 50 μ g/ml 丹酚酸 B 的破坏率为 81.87%, 而 25 μ g/ml 的丹酚酸 B 的破坏率则急剧下降为 32.69%。至 6.25 μ g/ml 以下时已经没有明显的细胞破坏, 计算得其 TC50 为 31.9 μ g/ml, 见表 2。

2.2 对细胞死亡方式检测 丹酚酸 B 50 μ g/ml 组、37.5 μ g/ml、25 μ g/ml 剂量组的凋亡百分率分别为 73.2 ± 1.53 、 46.55 ± 5.08 、 24.18 ± 5.39 , 与正常对照组的 10.69 ± 2.42 比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。说明这三个剂量组的丹酚酸 B 均可显著诱导 hepa1-6 细胞凋亡, 且在 25~50 μ g/ml 之间呈现一定的量效关系 ($r = 0.9998$, $P < 0.01$)。见图 1。

2.3 对凋亡相关细胞因子 mRNA 表达的影响 丹酚酸 B 作用于 hepa1-6 细胞后, Bax mRNA 表达水平与细胞对照组比较显著上升 ($t = 6.9223$, $P < 0.01$); 而 Bcl-2 mRNA 表达水平与细胞对照组比较明显下降 ($t = 3.5299$, $P < 0.05$), 见表 3。

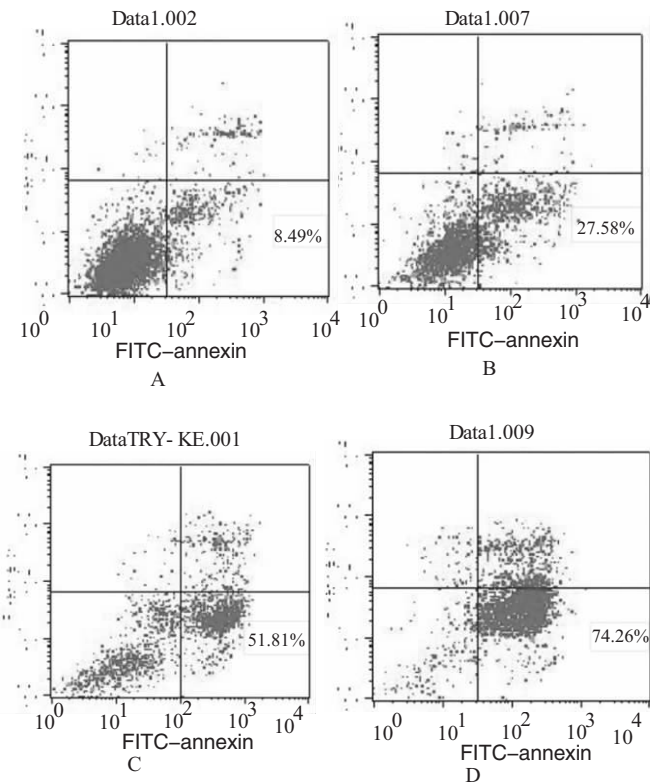
3 讨论

Hepa1-6 细胞是由 C57BL/6j 小鼠正常上皮细胞

表 2 丹酚酸 B 对 hepa1-6 细胞的抑制作用

Table 2 The inhibition effect of Salvianolic acid B to Hepa1-6 cell line

组别 Groups	浓度 (concentration) μ g/ml	各孔 OD 值(490nm) (OD value of tested wells)				平均 OD 值 (Average OD value) (M± SD)	破坏率% (Destruction ratio)	TC50 μ g/ml
		A	B	C	D			
丹酚酸 B Salvianolic acid B	50	0.404	0.449	0.448	0.470	0.443± 0.028	81.87	toxic concentration
	25	1.453	1.453	1.521	1.546	1.493± 0.048	32.69	
	12.5	1.970	1.968	1.935	2.152	2.006± 0.098	8.67	31.9
	6.25	2.121	2.182	2.222	2.257	2.196± 0.058	-0.2	
	3.125	2.124	2.120	2.093	2.056	2.098± 0.031	4.3	
	1.5625	2.149	2.161	2.290	2.250	2.213± 0.069	-1.03	
	0.78125	2.214	2.266	2.263	2.352	2.274± 0.057	-0.04	
	0.390125	2.205	2.261	2.158	2.158	2.196± 0.049	-0.2	
阿霉素 doxorubicin	10μ M	1.162	1.015	1.037	-	1.071± 0.079	52.46	
细胞对照 cell control	0	2.187	2.128	2.265	2.182	2.191± 0.056		
空白对照 blank control	0	0.058	0.056	0.055	0.056	0.056± 0.001		



A: 正常对照组流式细胞图;B:丹酚酸 B25μ g/ml 组与正常对照组比较, 凋亡细胞显著增加。C:37.5μ g/ml 组则凋亡细胞更多; D :50μ g/ml 组则大部分细胞已经凋亡

A: Flow Cytometry figure of blank control group;B: Flow Cytometry figure of 25μ g/ml group;C Flow Cytometry figure of 37.5μ g/ml group; D: Flow Cytometry figure of 50μ g/ml group

图 1 丹酚酸 B 对 hepa1-6 肝癌细胞凋亡的流式细胞图
Fig 1 Flow Cytometry figure of showed that the cell apoptosis induced by Salvianolic acid B

诱导纯化而成,恶性程度高而免疫原性弱^[5],因此可以被用来注射入 C57BL/6j 小鼠体内而造成小鼠 HCC 移植瘤^[6]。这种模型的优点就在于与裸鼠 HCC 移植瘤免疫缺陷相比,这种 HCC 移植瘤可以更好的模拟自

表 3 丹酚酸 B 作用 hepa1-6 细胞后细胞表达 Bax、Bcl-2 mRNA 量的变化

Table 3 The expression levels of mRNA of Bax and Bcl-2 in hepa1-6 after Salvianolic acid B administration.

基因 Gene	组别 Groups	mRNA 相对量 Relative amount			M± SD
		A	B	C	
Bax	丹酚酸 B 组 (Salvianolic acid B group)	12.34	14.53	15.37	14.08± 1.56***
	细胞对照组 (Blank control group)	5.33	6.66	3.49	5.16± 1.59
Bcl-2	丹酚酸 B 组 (Salvianolic acid B group)	1.52	3.27	3.45	2.75± 1.07**
	细胞对照组 (Blank control group)	5.76	4.98	7.35	6.03± 1.21

注 丹酚酸 B 组与细胞对照组比较,***P<0.01,**P<0.05。
Note : Salvianolic acid B compared with blank control,***P<0.01,**P<0.05。
然界体内的 HCC 环境,可以进行 HCC 免疫学研究。因此本课题选择 hepa1-6 细胞作为体外模型来检测丹酚酸 B 的抗 HCC 效果,以便于后续进行体内实验工作。

本实验显示,丹酚酸 B 在 12.5~50ug/ml 之间对 hepa1-6 细胞有明显的细胞毒作用,其 TC50 为 31.9ug/ml,显示出较好的细胞毒作用。

细胞凋亡的早期主要发生在细胞膜上,是磷脂不对称性改变引起的磷脂酰丝氨酸(PS)暴露于细胞膜外所致。Annexin V 是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白,对 PS 具有较高亲和性^[7],它可以作为敏感探针检测细胞膜表面的 PS 位置,特异结合标记的异硫氰酸荧光素(FITC)而保持细胞膜的完整性。因此可使变性染色质着色的荧光染料碘化丙啶(PI)不进入细胞质。然而,坏死细胞的细胞膜和细胞质可同时分别受 Annexin V 和 PI 的标记,在流式细胞仪得到的双变量散点图上,正常活细胞为 Annexin V⁻/PI⁻,凋亡细胞 Annexin V⁺

/PI⁻ 坏死细胞 Annexin V⁺/PI⁺[8]。该方法省时、可靠,可定量,且能区别凋亡与坏死,因此是目前较为理想的方法。结果显示,丹酚酸 B 能够使 hepa1-6 细胞凋亡,并呈现量效关系。这从形态上表明了丹酚酸 B 主要是通过诱导 hepa1-6 细胞凋亡而起到抑制 hepa1-6 细胞作用的。在前面用流式细胞术证实丹酚酸 B 主要是以诱导 hepa1-6 细胞凋亡的方式来抑制 Hepa1-6 细胞生长的基础上,本实验运用定量 PCR 技术来观察细胞凋亡相关基因 mRNA 表达情况,以进一步阐明丹酚酸 B 诱导 hepa1-6 细胞凋亡的基本机制。

细胞凋亡是有一系列的酶参与的,由基因控制的一个主动的、高度有序的细胞死亡过程。线粒体在细胞凋亡的过程中起着关键作用。线粒体的促凋亡作用受 Bcl-2 和 caspases 的调节。Bcl-2 家族蛋白包括两类功能相反的蛋白质,一类是抑制细胞凋亡的蛋白,如 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w 等;另一类是促进细胞凋亡的蛋白 Bax、Bak、Bok 等。Bcl-2 对凋亡细胞的线粒体调控是多方面的,在线粒体外膜的过量表达抑制了叔丁基氢过氧化物(1-butylhy droperoxide, tBOOH)、prororphore 和 attractyloside 诱导的 MPT,却不能抑制其他因素,如 500μ mol/L Ca²⁺ 或胍(diamide)诱导 MPT。因此, Bcl-2 只能在较窄的范围内抑制 MPT 的发生[9]。另外, Bcl-2 还可以通过抑制 cytC 的释放而阻止凋亡的发生。bax 的促凋亡功能与其结构有关。Willis 等[10]认为只具有 BH3 结构域的蛋白是促凋亡的,在凋亡信号的传导中,与线粒体膜有关的调节是重要阶段[11]。Pan 等[12]的研究认为当胞质内的 bax 接到死亡信息后,由胞浆移位并插入到线粒体膜中,形成 bax 通道,促进的细胞色素 C 释放并进入胞质,使 bcl-2 与 Apaf-1 分离,后者可激活 caspase,从而诱导细胞凋亡。

本实验发现,以 37.5μ g/ml 的丹酚酸 B 作用于 hepa1-6 细胞 48h 后, BaxmRNA 表达显著上调,而 Bcl-2 mRNA 显著下调,这说明在丹酚酸 B 作用后,促进凋亡的 Bax 表达明显上升,而抑制凋亡的 Bcl-2 表达明显下调,表明丹酚酸 B 可能通过使 hepa1-6 细胞表达促进凋亡的基因升高和抑制凋亡的基因表达降低这二方面来诱导 hepa1-6 细胞凋亡。

参考文献:

[1] Yin Y, Wang F. Advances in Salvianolic acid B research [J]. China

Pharmacist, 2007, 10(10):1034-1036. (In Chinese)

(尹音,王峰.丹酚酸 B 研究进展[J].中国药师,2007,10(10):1034-1036.)

[2] Song XD, Yang Y, Yang JH, et al. The effect of salvianolic acid B on a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line[J]. Journal of Binzhou Medical University, 2007, 30(1):11-12. (In Chinese)

(宋晓冬,杨玥,杨军厚,等.丹酚酸 B 抗前列腺肿瘤的作用[J].滨州医学院学报,2007,30(1):11-12.)

[3] Chen J, Ling CQ. Salvia miltiorrhiza and prevention of hepatoma[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1999, 30(3):226-228. (In Chinese)

(陈坚,凌昌全.丹参与肝癌防治[J].中草药,1999,30(3):226-228.)

[4] Tang ZZ, Fu LB, Tang Y. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human hepatoma cell line by tanshinone A [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2003, 25(9):774-777. (In Chinese)

(唐忠志,付立波,唐瑛.丹参酮 A 抑制人肝癌细胞的生长及诱导其凋亡的实验研究[J].第三军医大学学报,2003,25(9):774-777.)

[5] Kroger A, Ortmann D, Krohne T U, et al. Growth suppression of the hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6 by an activatable interferon regulatory factor-1 in mice. Cancer res.2001, 61(6):2609-2671.

[6] Zhou ZX, Lv MD, Yin XY, et al. Establishment of Subcutaneous Hepatoma in C57BL/6j Mice with Hepa1-6 Cells [J]. Guangdong Medical Journal, 2007, 28(2):178-180. (In Chinese)

(周忠信,吕明德,殷晓煜,等.C57BL/6j 小鼠接种 Hepa1-6 细胞诱导皮下肝癌模型的建立[J].广东医学,2007,28(2):178-180.)

[7] Walsh GM, Dewson G, Wardlaw AJ, et al. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils [J]. J Immunol Methods, 1998 Aug 1, 217(1-2):153-163.

[8] Wang F, He XW, Yan HL, et al. Non-fusion expression in Escherichia coli Single-step purification of recombinant human annexin A5 for detection of apoptosis[J]. Protein Expr Purif, 2006, 45(1):80-7.

[9] Vander Heiden M G, Chandel N S, Li X X, et al. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(9):4666-4671.

[10] Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak[J]. Science, 2007, 315(5813):856-859.

[11] Capano M, Crompton M. Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases [J]. Biochem J, 2006, 395(1):57-64.

[12] Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, bcl-x and apaf-1 form a ternary complex[J]. J Biol Chem, 1998, 273(10):5841-5845.

收稿日期:2012-01-21 编辑:符式刚