



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.016
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3852.shtml

· 基础研究 ·

丹参酮 IIA 对胃癌细胞的抑制作用及其与 NF- κ B 信号通路的关系

赵雪峰¹, 魏敬妙², 李勇¹, 焦志凯¹, 刘羽¹

(河北医科大学第四医院 1. 普通外科 2. 肝胆外科, 河北 石家庄 050011)

摘要

目的: 探讨丹参酮 IIA (tanshinone IIA) 体外对人胃癌 SGC7901 细胞的作用及其对 NF- κ B 信号通路的影响。

方法: 不同浓度丹参酮 IIA (0.5、1、2、4 μ g/mL) 作用 SGC7901 细胞不同时间 (24、48、72 h) 后, 用 MTT 法检测细胞增殖情况。丹参酮 IIA (2 μ g/mL) 作用 SGC7901 细胞 48 h 后, 用流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blot 法检测 NF- κ B p65 亚单位、I κ B- α 、磷酸化 I κ B- α 、IKK- α / β 、磷酸化 IKK- α / β 的水平; ELISA 法检测 p65 亚单位的 DNA 结合活性。

结果: MTT 结果显示, 丹参酮 IIA (1、2、4 μ g/mL) 明显抑制 SGC7901 细胞的增殖, 并呈明显的时间与浓度依赖性(均 $P < 0.05$); 凋亡分析显示, 丹参酮 IIA 处理组细胞凋亡率明显高于对照组 ($P < 0.05$); NF- κ B 信号通路相关分子检测显示, 与对照组比较, 丹参酮 IIA 处理组细胞 p65、IKK- β 及其磷酸化蛋白水平明显下降 (均 $P < 0.05$), I κ B- α 水平无明显改变 ($P > 0.05$), 但其磷酸化蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 IKK- α 及其磷酸化蛋白表达水平表达变化均不明显 (均 $P > 0.05$); NF- κ B 亚单位 p65 的 DNA 结合活性明显下降。

结论: 丹参酮 IIA 可抑制人胃癌 SGC7901 细胞增殖并促进其凋亡, 其机制可能是降低 NF- κ B 信号通路的活性有关。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(4):483-487]

关键词

胃肿瘤; 丹参酮; NF- κ B
中图分类号: R735.2

Inhibitory effect of tanshinone IIA on gastric cancer cells and involvement of NF- κ B signaling pathway

ZHAO Xuefeng¹, WEI Jingmiao², LI Yong¹, JIAO Zhikai¹, LIU Yu¹

(1. Department of General Surgery 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Corresponding author: LI Yong, Email: li_yong_hbth@126.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of tanshinone IIA on gastric cancer SGC7901 cells in vitro and its influence on the NF- κ B signaling pathway.

Methods: SGC7901 cells were exposed to different concentrations (0.5, 1, 2 and 4 μ g/mL) of tanshinone IIA for different lengths of time (24, 48 and 72 h), and then the cell proliferation was determined by MTT assay. In SGC7901 cells after exposure to tanshinone IIA (2 μ g/mL) for 48 h, the apoptosis rate was measured by flow cytometry; the protein expressions of p65 subunit, I κ B- α , phosphorylated I κ B- α , IKK- α / β , and phosphorylated IKK- α / β

收稿日期: 2013-05-26; 修订日期: 2014-02-11。

作者简介: 赵雪峰, 河北医科大学第四医院副主任医师, 主要从事消化道肿瘤临床与基础方面的研究。

通信作者: 李勇, Email: li_yong_hbth@126.com

β were detected by Western blot; the DNA binding activity of NF- κ B p65 subunit was detected by ELISA assay.

Results: Results of MTT assay showed that tanshinone IIA (1, 2, and 4 μ g/mL) significantly inhibited the proliferation of SGC7901 cells in a time- and concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). Apoptosis analysis showed that the apoptosis rate in tanshinone IIA treated cells was significantly higher than that in the control cells ($P < 0.05$); measurement of the NF- κ B signaling pathway showed that in tanshinone IIA treated cells compared with the control cells, the expression levels of p65 subunit, and IKK- β along with its phosphorylated form were significantly decreased (all $P < 0.05$), and I κ B- α expression level had no significant change ($P > 0.05$) but its phosphorylated form was significantly reduced ($P < 0.05$), while the levels of IKK- α and its phosphorylated form had no significant change (both $P > 0.05$); the DNA binding activity of p65 subunit was significantly decreased ($P < 0.05$).

Conclusion: Tanshinone IIA can inhibit proliferation and induce apoptosis in gastric cancer SGC7901 cells, and the mechanism may probably be related with its suppression of the activity of NF- κ B signaling pathway.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(4):483-487]

KEYWORDS Stomach Neoplasms; TANSHINONE; NF- κ B

CLC number: R735.2

胃癌病死率为世界第二，虽然其发病率在世界范围内呈现不断下降的趋势，但在亚洲仍发病率较高^[1-3]。在我国病死率居恶性肿瘤之首。目前，胃癌治疗仍以手术和化疗为主^[4]，但5年生存率仍不足30%^[5]。核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种重要的转录因子，许多致癌因素可激活NF- κ B途径，促进细胞生长、恶性转化及侵袭转移等。某些药物可通过抑制NF- κ B活性从而抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、减少肿瘤血管生成等^[6]。丹参酮IIA (tanshinone IIA)是从传统中草药丹参根部提取的脂溶性化合物，近年来其抗肿瘤活性受到高度重视。研究^[7-8]发现丹参酮IIA可抑制乳腺癌和结肠癌NF- κ B信号通路。本研究主要观察丹参酮IIA对胃癌细胞生长的影响以及与NF- κ B信号转导通路的关系，为丹参酮IIA临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

SGC7901细胞为人胃癌细胞株，购自中国科学院上海细胞研究所。胎牛血清、RPMI1640细胞培养基、胰蛋白酶，购自美国GIBCO公司；MTT和丹参酮IIA (纯度>99%)购自美国Sigma公司；非放射性NF- κ B p65检测试剂盒、核蛋白抽提定量试剂盒为美国Chemicon公司产品；p65、I κ B- α 和GAPDH抗体购自Santa Cruz公司；IKK- α/β 、磷酸化-I κ B- α (p-I κ B- α)和磷酸化-IKK- α/β (p-IKK- α/β)抗体购自Cell Signaling公司；电泳和转膜系统为Bio-Rad公司

产品；PVDF膜为Millipore公司产品。

1.2 细胞培养

SGC7901细胞在含有10%胎牛血清、100 IU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基中培养，在含5% CO₂、37 °C条件下恒温孵育。每3天用含0.02% EDTA的0.25%胰蛋白酶溶液消化以1:3的比例传代。

1.3 MTT法检测细胞增殖

SGC7901细胞以 5×10^3 个/mL密度接种于96孔板，于37 °C和5%的CO₂条件下培养24 h后，用含有不同浓度的丹参酮IIA (0.5、1、2、4 μ g/mL)分别处理细胞24、48、72 h，对照组加入0.1% DMSO。每组设置6个复孔。各实验组于实验结束前4 h加入20 μ L的MTT (浓度为5 mg/mL)，培养4 h后，弃去培养液，加入150 μ L DMSO室温振荡15 min溶解结晶，用酶标仪于波长490 nm测吸光度值 (OD值)，以OD值表示SGC7901细胞增殖能力。以上实验重复3次。

1.4 AnnexinV/PI流式细胞分析法检测细胞凋亡

5×10^3 个/mL密度接种于12孔板中，于37 °C和5%的CO₂条件下培养24 h后，实验组加入2 μ g/mL丹参酮IIA，对照组加入0.1% DMSO，处理细胞48 h。收集各组细胞 (包括培养基中的和贴壁的)，用冷的PBS清洗1遍，每管加入500 μ L结合缓冲液和5 μ L的AnnexinV和PI，室温避光染色5 min，用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5 Western blot各蛋白的表达

SGC7901细胞以 5×10^3 个/mL的密度接种于6孔板，于37 °C和5%的CO₂条件下培养24 h，实验组加入2 μ g/mL丹参酮IIA，对照组加入0.1%

DMSO, 处理细胞 48 h, 收集细胞, 用裂解缓冲液裂解整个细胞或者核蛋白抽提试剂盒提取核蛋白, 各组取等量蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后转到 PVDF 膜上。PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, p65、I κ B- α 、IKK- α 、IKK- β 、p-I κ B- α 和 p-IKK- α / β 各目标分子特异性一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 接着, 用辣根过氧化物酶标记的相应的二抗室温孵育 2 h。ECL 法检测结合的目的条带。以 GAPDH 作为内参照, 用目的蛋白吸光度值/内参照吸光度值的比值进行统计比较。

1.6 ELISA 法检测 NF- κ B 亚单位 p65 的 DNA 结合活性

SGC-7901 细胞以 5×10^3 个/mL 密度接种于 6 孔板, 于 37 $^{\circ}$ C 和 5% 的 CO₂ 条件下培养 24 h, 实验组加入 2 μ g/mL 丹参酮 IIA, 对照组加入 0.1% DMSO, 处理细胞 48 h, 收集各组细胞, 提取细胞核蛋白, 蛋白定量后调整各组蛋白样品浓度为 5 mg/mL, 各步骤严格按非放射性 NF- κ B p65 检测试剂盒说明进行操作, 最后, 用酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值, 以 (A) 值反映 NF- κ B 亚单位 p65 的 DNA 结合活性。

1.7 统计学处理

计数数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行 ANOVA 分析处理和 Dunnett 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹参酮 IIA 对 SGC7901 细胞增殖的影响

丹参酮 IIA (0.5、1、2、4 μ g/mL) 作用 SGC7901 细胞 24、48、72 h 后, MTT 结果显示, 与对照组比较, 1、2、4 μ g/mL 丹参酮 IIA 对胃癌细胞以浓度和时间依赖的方式抑制 SGC7901 细胞生长 (均 P<0.05) (表 1)。

2.2 丹参酮 IIA 对 SGC7901 细胞凋亡的影响

流式细胞分析结果显示, 与对照组细胞比较, 实验组细胞凋亡率明显升高 [(12.24 \pm 2.27) % vs. (2.92 \pm 0.35) %] (P<0.05)。

2.3 丹参酮 IIA 对 SGC7901 细胞 NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响

与对照组比较, 实验组 NF- κ B 亚单位 p65 的表达显著下降 (P<0.05)。I κ B- α 表达水平无变化, p-I κ B- α 水平则明显下降 (P<0.05)。进一步检测上游 IKK- α / β 、及其 p-IKK- α / β 的水平, 结果发现, 丹参酮 IIA 作用 SGC7901 细胞

后, IKK- β 及其磷酸化蛋白表达水平明显下降 (P<0.05), 而 IKK- α 及其磷酸化蛋白表达水平表达变化不明显 (P>0.05) (图 1) (表 2)。

表 1 丹参酮 IIA 对 SGC7901 细胞增殖的影响 (OD 值)
Table 1 Effect of tanshinone IIA on proliferation of SGC7901 cells (OD value)

丹参酮 IIA 浓度 (μ g/mL)	24 h	48 h	72 h
0(对照组)	1.02 \pm 0.18	1.04 \pm 0.16	1.01 \pm 0.15
0.5	0.94 \pm 0.16	0.87 \pm 0.14	0.85 \pm 0.13
1	0.77 \pm 0.13 ¹⁾	0.63 \pm 0.11 ¹⁾	0.56 \pm 0.07 ^{1), 2)}
2	0.62 \pm 0.08 ¹⁾	0.52 \pm 0.06 ^{1), 2)}	0.44 \pm 0.06 ^{1), 2), 3)}
4	0.53 \pm 0.07 ¹⁾	0.42 \pm 0.06 ^{1), 2)}	0.32 \pm 0.05 ^{1), 2), 3)}

注: 1) 与对照组比较, P<0.05; 2) 与同浓度组 24 h 比较, P<0.05; 3) 与同浓度组 48 h 比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. control group; 2) P<0.05 vs. the same concentration group in 24 h; 3) P<0.05 vs. the same concentration group in 48 h

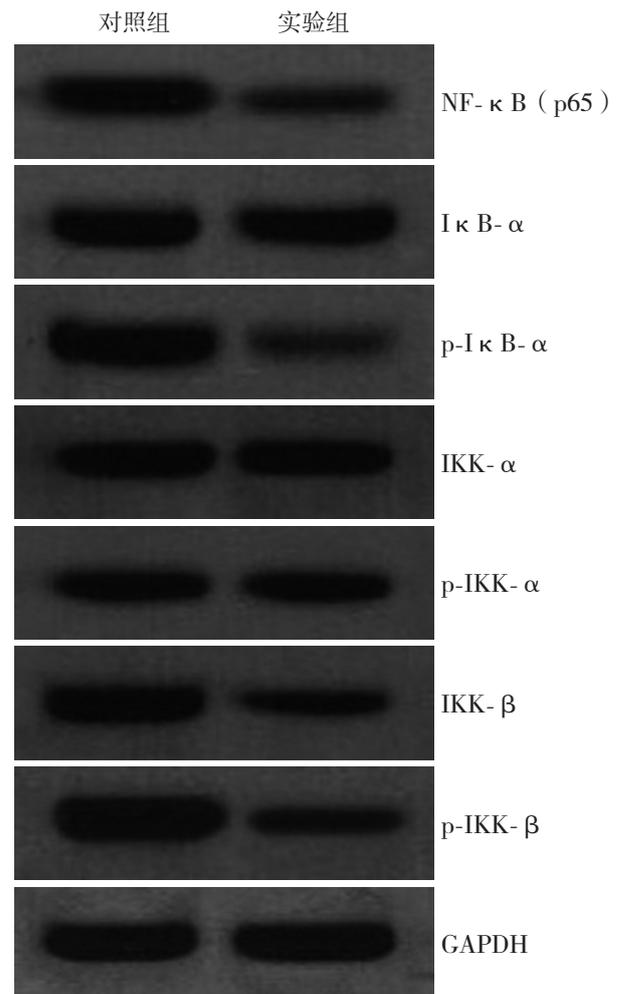


图 1 NF- κ B 信号通路蛋白表达情况
Figure 1 Expressions of the proteins associated with NF- κ B signaling pathway

表 2 丹参酮 IIA 对 NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响 (相对表达量)

组别	p65	I κ B- α	p-I κ B- α	IKK- α	p-IKK- α	IKK- β	p-IKK- β
对照组	0.96 \pm 0.13	0.87 \pm 0.11	0.93 \pm 0.15	0.88 \pm 0.14	0.75 \pm 0.11	0.85 \pm 0.12	0.91 \pm 0.15
实验组	0.47 \pm 0.07 ¹⁾	0.82 \pm 0.09	0.39 \pm 0.05 ¹⁾	0.83 \pm 0.12	0.73 \pm 0.09	0.44 \pm 0.07 ¹⁾	0.42 \pm 0.06 ¹⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. control group

2.4 丹参酮 IIA 对 SGC7901 细胞 NF- κ B 亚单位 p65 的 DNA 结合活性的影响

与对照组比较, 实验组 IIA 组 NF- κ B 亚单位 p65 的 DNA 结合活性明显下降 [(0.35 \pm 0.06) vs. (0.86 \pm 0.13)] ($P < 0.05$)。

3 讨论

丹参酮 IIA 具有广泛的生理作用, 如抗炎和抗氧化作用等^[9]。目前, 有研究^[10-11]发现丹参酮 IIA 可抑制胃癌细胞增殖促进细胞凋亡, 其具体机制仍不十分清楚。本研究以 SGC7901 细胞为研究对象, 观察丹参酮 IIA 对胃癌 NF- κ B 信号通路的影响, 以探讨丹参酮 IIA 抗肿瘤的机制。

本研究首先观察了丹参酮 IIA 对 SGC7901 细胞增殖和凋亡的影响, 结果显示丹参酮 IIA 可抑制细胞生长促进其凋亡。NF- κ B 可通过调控多种基因的表达, 调节癌细胞生物学行为^[12]。因此抑制 NF- κ B 通路的活性可抑制肿瘤的发生发展^[13]。

NF- κ B 发挥作用需要转位入核, 调控下游基因转录^[14], 在此过程中, I κ B 磷酸化对 NF- κ B 信号通路的活化起关键作用^[15-16]。而 I κ B 的磷酸化主要受其上游分子 I κ B 激酶 (IKK) 的调节。目前, 许多研究以 NF- κ B 为靶点, 从不同角度阐释了 NF- κ B 在肿瘤发病、预防及治疗中的作用机制^[17-20]。本研究发现, 丹参酮 IIA 可以抑制 NF- κ B 亚单位 p65 的表达, 其抑制因子 I κ B 的磷酸化也受到抑制, 进一步对上游信号分子 IKK 的磷酸化水平检测表明, 丹参酮 IIA 可以抑制 IKK- β 磷酸化而不影响 IKK- α 及其磷酸化, 此结果提示, 丹参酮 IIA 可能通过抑制 IKK- β 及其磷酸化, 抑制 NF- κ B 信号通路, 从而抑制胃癌的增殖和凋亡。当然, 更深入的机制尚需大量实验进一步证实。p65 是 NF- κ B 的功能亚单位, 具有调控下游基因的转录, 并能够激活细胞因子的级联放大。因此, p65 活化水平可代表 NF- κ B 的激活程度。本研究进一步对 p65 的 DNA 结合活性进行检

测, 证明了丹参酮 IIA 不仅能抑制 SGC7901 细胞 NF- κ B 亚单位 p65 的蛋白表达, 而且抑制了 p65 的功能。

综上, 丹参酮 IIA 能够抑制 SGC7901 细胞生长促进其凋亡, 其机制之一可能是抑制 NF- κ B 信号通路。尽管丹参酮 IIA 对胃癌的作用及机制仍需要更深入的研究, 研究表明, 丹参酮 IIA 可能是一个用于胃癌治疗有效的候选药物。

参考文献

- [1] Giuseppe V, Alberto DL, Gian MR, et al. Epidemiology of Gastric Cancer and Screening Programs[J]. Surg Mult Man Gastric Cancer, 2012, doi:10.1007/978-88-470-2318-5_1.
- [2] Fock KM, Ang TL. Epidemiology of helicobacter pylori infection and gastric cancer in Asia[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010,25(3):479-486.
- [3] de Martel C, Forman D, Plummer M, et al. Gastric cancer: epidemiology and risk factors[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2013, 42(2):219-240.
- [4] Wagner AD, Grothe W, Haerting J, et al. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data[J]. J Clin Oncol, 2006, 24 (18):2903-2909.
- [5] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [6] Qin Y, Li L, Chen J, et al. Fentanyl inhibits progression of human gastric cancer MGC-803 cells by NF-kappaB downregulation and PTEN upregulation in vitro[J]. Oncol Res, 2012, 20(2/3):61-69.
- [7] Su CC, Chien SY, Kuo SJ, et al. Tanshinone IIA inhibits human breast cancer MDA-MB-231 cells by decreasing LC3-II, Erb-B2 and NF- κ Bp65[J]. Mol Med Report, 2012, 5(4):1019-1022.
- [8] Shan YF, Shen X, Xie YK, et al. Inhibitory effects of tanshinone II-A on invasion and metastasis of human colon carcinoma cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(11):1537-1542.
- [9] Yin X, Yin Y, Cao FL, et al. Tanshinone IIA attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats[J]. PLoS One, 2012, 7(6):e38381.
- [10] Chen J, Shi DY, Liu SL, et al. Tanshinone IIA induces growth inhibition and apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo[J]. Oncol Rep, 2012, 27(2):523-528.

- [11] Dong X, Dong J, Peng G. Growth-inhibiting and apoptosis-inducing effects of Tanshinone II A on human gastric carcinoma cells[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2007, 27(6):706-709.
- [12] 傅庭焕, 李基业, 王世斌. 抑制核转录因子活化逆转胃癌细胞株耐药性研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(5):402-406.
- [13] Ahmed KM, Cao N, Li JJ. HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer[J]. Anticancer Res, 2006, 26(6B):4235-4243.
- [14] Park KA, Byun HS, Won M, et al. Sustained activation of protein kinase C downregulates nuclear factor-kappaB signaling by dissociation of IKK-gamma and Hsp90 complex in human colonic epithelial cells[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(1):71-80.
- [15] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1):1-12.
- [16] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, et al. NF-kB in development and progression of human cancer[J]. Virchows Arch, 2005, 446(5):475-482.
- [17] 廖新华, 仇广林, 陈锐, 等. 胃癌细胞中 β 肾上腺能受体与 NF- κ B 通路及其下游侵袭相关因子的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(10):1285-1290.
- [18] 邓征浩, 周建华, 肖德胜, 等. RASSF1A 基因对胃癌 SGC7901 细胞 NF- κ B 活性的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(5):494-498.
- [19] 秦龙, 张才全. 渥曼青霉素对人胃癌细胞的作用及机制[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(10):1035-1038.
- [20] 曾繁余, 刘菁, 袁桂峰, 等. 姜黄素对 HepG-2 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(4):474-478.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 赵雪峰, 魏敬妙, 李勇, 等. 丹参酮 IIA 对胃癌细胞的抑制作用及其与 NF- κ B 信号通路的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(4):483-487. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.016
 Cite this article as: ZHAO XF, WEI JM, LI Y, et al. Inhibitory effect of tanshinone IIA on gastric cancer cells and involvement of NF- κ B signaling pathway[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(4):483-487. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.016

2014 中国临床普外科前沿与争论高峰论坛

我国现代外科学奠基人, 现代外科一代宗师, 著名外科学家, 中国科学院资深院士裘法祖教授亲笔题名的“中国临床普外科前沿与争论高峰论坛”, 遵循“学术交流促发展, 探索前沿勇创新, 精英荟萃增友谊, 弘扬医学为民众”的宗旨, 由“华中科技大学同济医学院附属同济医院”“海峡两岸外科医学会”“中国临床普外科前沿与争论高峰论坛”组委会共同主办, “大连医科大学附属第二医院”承办的“2014 中国临床普外科前沿与争论高峰论坛”定于 2014 年 10 月 17 日至 19 日在大连市隆重召开。本次盛会时逢裘法祖教授诞辰 100 周年, 将举行隆重的纪念活动。

我们非常真诚地邀请全国普外科广大同仁踊跃投稿, 积极参会。本次大会邀请中华外科杂志、中华普通外科杂志、中华肝胆外科杂志、中华实用外科杂志、中华消化外科杂志、中华实验外科杂志、中华胃肠外科杂志等作为本次“学术支持单位”。本次论坛将授予国家级继续教育学分。

1. 征文内容: (1) 外科基础研究、肝胆胰脾外科、胃肠外科、甲状腺乳腺外科、血管外科的临床研究与实践; (2) 普外科各亚专科微创外科手术的规范和创新等。

2. 征文要求: 国内外未公开发表的论文(论著、病例报告、综述、述评)600 字以内的中文摘要(按“目的、方法、结果、结论”四项撰写, 并列 3 个关键词)一份, 需注明作者单位、姓名、职务或职称、通信地址、邮政编码、联系电话和 Email, 以便联系。

3. 投稿方式: 请将您的电子版稿件发到以下 Email 地址: gaofengltdl2014@163.com, 邮件主题请写明“2014 高峰论坛征稿”。投稿截止日期: 2014 年 8 月 30 日。

如希望了解更多征文或会务信息, 请联系:

1. 辽宁省大连市沙河口区中山路 467 号 邮编: 116027 电话: 0411-84671619

大连医科大学附属第二医院

刘彩刚: 15566892506 高振明: 15541178317 Email: gaofengltdl2014@163.com.

2. 湖北省武汉市硚口区解放大道 1095 号 邮编: 430030 电话: 027-83665315 (留言)

华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科 传真: 027-83665375

王兵: 13307171656 李红波: 18071457497 Email: gaofengltdl2014@163.com