

丹参酮 II_A 对阿霉素抑制肿瘤细胞生长作用的影响

高洁^{1,2}, 白茹¹, 李长志¹, 刘培庆^{2*}

1 南开大学药学院, 天津 300071;

2 中山大学药学院, 广东 广州 510080

摘要 目的: 观察丹参酮 II_A 对阿霉素诱导 2 种肿瘤细胞 (K562 和 Bel-7402 细胞) 死亡作用的影响。方法: MTT 法检测细胞存活率, Hoechst 33342 染色从形态学上反映肿瘤细胞凋亡情况。结果: 丹参酮 II_A 本身对 2 种肿瘤细胞均有抑制增殖、促凋亡的作用, 不会干扰阿霉素诱导肿瘤细胞死亡的作用, 甚至对其对 K562 细胞的促凋亡作用有协同效果。结论: 丹参酮 II_A 对阿霉素抑制肿瘤细胞生长有协同作用, 但对肿瘤细胞有一定的选择性。

关键词 丹参酮 II_A; 阿霉素; 肿瘤细胞

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0091-04

Effects of Tanshinone II_A on Adriamycin-induced suppression of tumor cells growth

GAO Jie^{1,2}, BAI Ru¹, LI Chang-zhi¹, LIU Pei-qing^{2*}

1 College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2 School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract Objective: To investigate the effects of Tanshinone II_A on Adriamycin-induced suppression of growth in two kinds of tumor cell (K562 and Bel-7402). **Methods:** MTT colorimetric assay was used to detect the survival rate of tumor cells. Hoechst 33342 staining was used to reflect tumor cells apoptosis morphologically after different treatments. **Results:** Tanshinone II_A alone induced cell death in K562 cells and human hepatocarcinoma Bel-7402 cells. It did not interfere with the antiproliferative effects of Adriamycin in these two cells. When used with Adriamycin, Tanshinone II_A even enhanced cell death induced by Adriamycin in K562 cells. **Conclusion:** Tanshinone II_A shows synergistic effect with Adriamycin in suppression of tumor cells growth, however, with cell type specificity.

Key words Tanshinone II_A; Adriamycin; tumor cells

丹参酮 II_A (Tanshinone II_A, TSN) 是丹参酮中含量最高、结构最具有代表性的活性成分, 是非醌类的衍生物, 丹参酮 II_A 药理作用广泛^[1,2], 如促肿瘤细胞凋亡^[3]、保护肝细胞^[4]、神经细胞^[5]以及抗 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡^[6]等。前期的研究结果证实, 丹参酮 II_A 有保护阿霉素诱导的心肌细胞凋亡的作用^[7]。但是, 丹参酮 II_A 与阿霉素同时应用时是否会干扰其促肿瘤细胞凋亡的作用还未见报道。因此, 本研究选用人白血病细胞 K562 和人肝癌细胞 Bel-7402 肿瘤细胞对这个问题进行验证。

1 材料和仪器

1.1 药品和试剂

阿霉素购于广州市药品检验所; 丹参酮 II_A (Tanshinone II_A, TSN), 由中山大学药学院提纯所得。噻唑蓝 (MTT)、Hoechst 33342 染料、胰蛋白酶 (Sigma 公司分装); RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季清公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞株

人白血病细胞株 K562 和人肝癌细胞株 Bel-7402 由中山大学实验动物中心细胞库提供。

1.3 实验仪器

双人单面超净工作台 (苏州净化设备有限公司); CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 荧光

收稿日期: 2010-02-25

* 通讯作者 刘培庆, E-mail: liupq@mail.sysu.edu.cn

倒置显微镜(德国 Leica 公司); Elx-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.4 细胞培养

K562 和 Bel-7402 细胞常规复苏后, 培养于含有 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液中, 置于 CO₂ 培养箱(37℃, 5% CO₂, 饱和湿度)培养, 1~2 d 换液一次, 0.25% 胰酶常规消化传代, 取对数生长期细胞进行实验。

1.5 实验分组

对照组、阿霉素组(ADR 1.0 μmol/L)、阿霉素加 TSN 高剂量组(ADR 1.0 μmol/L+TSN 2.0 μmol/L)、阿霉素加 TSN 低剂量组(ADR 1.0 μmol/L+TSN 0.5 μmol/L)、单用 TSN 高剂量组(TSN 2.0 μmol/L)、单用 TSN 低剂量组(TSN 0.5 μmol/L)。

2 实验方法

2.1 MTT 法测定肿瘤细胞活力

细胞用含血清培养基稀释成 1×10^4 /mL, 接种于 96 孔板中, 每组平行 10 孔, 每孔 200 μL, 细胞培养过夜后, 按照分组先向各孔加不同浓度的 TSN, 使其终浓度分别为 2.0 μmol/L 和 0.5 μmol/L, 预孵育 2 h 后加阿霉素(终浓度为 1.0 μmol/L)继续培养 48 h。各组细胞于药物刺激结束前 4 h, 每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 继续培养 4 h 后, 终止细胞培养, 弃上清, 加入 DMSO, 振荡 10 min 使结晶充分溶解后, 使用酶标仪测定各组细胞 570 nm 处吸光度。以各组细胞相对对照组吸光度值的比例代表细胞存活率的百分比。

2.2 Hoechst 33342 染色观察细胞核形态变化

细胞用含血清培养基调整浓度为 1×10^5 /mL, 接种于 6 孔板, 每孔 2 mL。按照分组如上加药处理。培养 48 h 后, 小心吸走上清液, 立即用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 蒸馏水洗 2 次, 每孔加入 5 μg/mL Hoechst 33342, 室温孵育 15 min, 蒸馏水洗 3 次, 荧光倒置显微镜下观察细胞核形态学的变化。

2.3 统计学处理

实验均重复 3 次, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 SPSS 统计软件分析, 组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 MTT 法检测药物对肿瘤细胞存活率的影响

细胞处理后采用 MTT 法检测细胞存活率。根

据 MTT 法检测原理, 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶并沉积在细胞中, 而死细胞则无此种功能, DMSO 能够溶解细胞中的紫色结晶, 用酶标仪在 570 nm 波长处检测其吸光度值, 可间接反映活细胞数量和细胞存活率。在一定细胞数范围内, MTT 结晶物的形成量与活细胞数成正比。

3.1.1 阿霉素对肿瘤细胞存活率的影响

以对照组 K562 细胞存活率为 100%, 1.0 μmol/L 阿霉素作用 48 h 后 K562 细胞的存活率下降至 (69.9±4.5)% (图 1A), 以对照组 Bel-7402 细胞存活率为 100%, 1.0 μmol/L 阿霉素作用 48 h 后 Bel-7402 细胞的存活率下降至 (87.6±2.2)% (图 1B), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.1.2 丹参酮 II_A 对肿瘤细胞存活率的影响

图 1A 显示, 单用高剂量 TSN 时, 与对照组相比, K562 细胞存活率下降至 (84.3±4.7)%, 单用低剂量 TSN 时, 存活率下降至 (88.8±8.2)%, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 图 1B 显示, 对 Bel-7402 细胞, 高剂量 TSN 组细胞活力下降至对照组的 (94.0±4.9)% ($P < 0.05$), 而低剂量 TSN 组细胞活力为 (99.7±2.9)%, 与对照组相比没有统计学差异。

3.1.3 丹参酮 II_A 对阿霉素诱导的肿瘤细胞死亡的影响

MTT 结果显示, 与对照组相比, 高剂量和低剂量 TSN 预孵育 2 h 后阿霉素继续孵育 48 h 可使 K562 细胞存活率分别下降至 (59.0±2.7)% 和 (60.0 ± 3.6)% ($P < 0.05$), 与单用阿霉素组相比, 也均具有显著性差异(图 1A)。图 1B 显示, 与对照组相比, 高剂量和低剂量 TSN 预孵育 2 h 后阿霉素继续孵育 48 h 可使 Bel-7402 细胞存活率分别下降至 (84.9±4.5)% 和 (92.6±1.4)% ($P < 0.05$), 但与单用阿霉素组相比无显著性差异。

3.2 细胞调亡的形态学变化

采用 Hoechst 33342 染色的方法在荧光显微镜下观察各组细胞核形态的变化。结果显示, 正常细胞核体积较大, 较圆, 表面光滑, 细胞核发出弥散均匀与蓝色荧光(图 2 A-a、2B-a)。经阿霉素处理 48 h 后, 可见到散在分布的调亡细胞核(图 2 A-b、2B-b): 胞核体积明显缩小、皱缩, 呈浓染致密的颗粒块状, 碎裂成大小不等, 呈多边形、圆形或花瓣

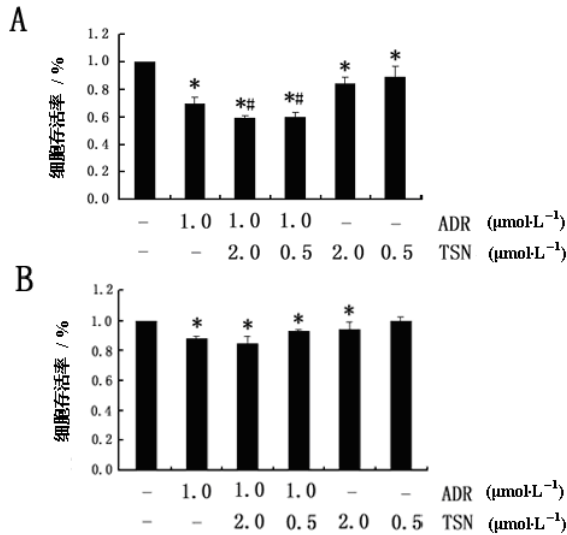


图1 丹参酮II_A对肿瘤细胞存活率的影响
Fig.1 Effect of Tanshinone II_A on cell viabilities of K562 cells (A) and Bel-7402 cells

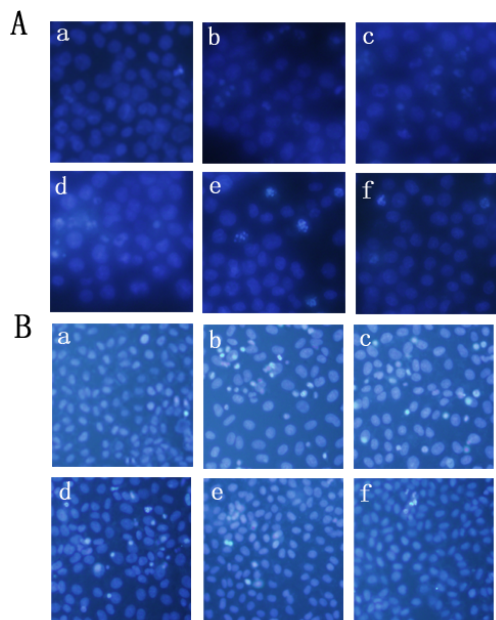


图2 丹参酮II_A对K562细胞(A)和Bel-7402细胞(B)细胞凋亡的形态学变化的影响
Fig.2 Effect of Tanshinone II_A on Nuclei of apoptotic cells of K562 cells (A) and Bel-7402 cells (B)

状。每孔随机选取5个视野，分别计数凋亡细胞核个数和全体细胞核数，计算凋亡发生率，可知阿霉素引起的K562细胞凋亡的数量在TSN预孵育后显著升高，而TSN对阿霉素诱导的Bel-7402细胞凋亡则无明显影响，与MTT结果一致。

4 讨论

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 为唇形科鼠尾草属

植物，以根入药，具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效，已广泛用于临床治疗冠心病等心脑血管疾病^[8]。丹参的化学成分有脂溶性的二萜醌和水溶性的酚酸2大类，前者包括丹参酮、隐丹参酮，后者如丹酚酸、原儿茶醛、紫草酸等。丹参酮(Tanshinone)是丹参的有效活性组分，包括丹参酮I、丹参酮II_A、丹参酮II_B等10多个单体，均具有邻醌或对醌结构，易被还原为二酚类衍生物，后者又易被氧化为醌，在转变过程中起电子传递作用，在生物体内的代谢产物参与了机体的多种生物化学反应。本研究中的丹参酮II_A是丹参酮中含量最高、结构最具有代表性的活性成分。

阿霉素(又名多柔比星)是一种蒽环类抗生素衍生物，它是目前最常用的治疗血液系统恶性肿瘤及实体瘤的抗肿瘤药^[9,10]。然而，阿霉素的临床应用却因为其剂量依赖性的心脏毒性而受到限制，这种心脏毒性可能发展为一种严重而不可逆的心肌病——阿霉素性心肌病。

本课题组之前的研究结果已经证实，丹参酮II_A有保护阿霉素诱导的心肌细胞凋亡的作用，本研究在K562和Bel-7402肿瘤细胞中，采用MTT法检测细胞存活率，Hoechst 33342染色从形态学上反映肿瘤细胞凋亡情况。结果显示，丹参酮II_A对2种肿瘤细胞均有抑制增殖、促凋亡的作用，并且不会干扰阿霉素诱导肿瘤细胞死亡的作用，甚至对其对K562细胞的促凋亡作用有协同效果。上述结果提示，丹参酮II_A可作为治疗某些肿瘤时阿霉素化疗的辅助用药，具有增效减毒的作用，但还有待进一步的体内实验及临床验证。实验结果同时表明，丹参酮II_A对阿霉素诱导K562和Bel-7402肿瘤细胞死亡作用的影响是不同的。这就提示，丹参酮II_A对阿霉素诱导的肿瘤细胞死亡作用的协同效果可能具有较高的细胞选择性。阐明这种选择性的发生机制将为指导临床治疗提供必要的理论依据，这也有待于我们今后继续研究。

参考文献:

- [1] 和凡, 钟国平, 赵立子, 等. 丹参酮II_A对大鼠细胞色素P450酶的诱导作用[J]. 中草药, 2009, 40(6):938-942.
- [2] 张茵, 张伯礼, 高秀梅, 等. 丹酚酸B和丹参酮II_A不同配比对肿瘤坏死因子α损伤大鼠心脏微血管内皮细胞的影响[J]. 中草药, 2004, 35(1):63-65.

- [3] 邓 惠, 罗焕敏, 黄 丰, 等. 丹参酮II A对C6胶质瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(9):1791-1794.
- [4] 刘永忠, 王晓东, 刘永刚. 丹参酮II A对四氯化碳损伤原代培养大鼠肝细胞的影响[J]. 中药材, 2003, 26(6): 415-417.
- [5] Xia W J, Yang M, Fok T F, *et al.* Partial neuroprotective effect of pretreatment with tanshinone IIA on neonatal hypoxia-ischemia brain damage[J]. *Pediatr Res*, 2005, 58 (4): 784-790.
- [6] 谢 辉, 郑 智. 丹参酮II A对血管紧张素II诱导的心肌细胞肥大、凋亡的影响[J]. 高血压杂志, 2004,12(4): 359-361.
- [7] Gao J, Yang G Q, Pi R B, *et al.* Tanshinone II A protects neonatal rat cardiomyocyte from adriamycin-induced apoptosis[J]. *Transl Res*, 2008, 151(2):79-87
- [8] 徐任生. 丹参一生物学及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [9] Ettinghausen S E, Bonow R O, Palmeri S T, *et al.* Prospective study of cardiomyopathy induced by adjuvant doxorubicin therapy in patients with soft-tissue sarcomas [J]. *Arch Surg*, 1986, 121(12): 1445-1451.
- [10] Schlumberger M, Parmentier C, Delisle MJ, *et al.* Combination therapy for anaplastic giant cell thyroid carcinoma[J]. *Cancer*, 1991, 67(3): 564-566.