

丹参素的抗癌活性研究

赵广荣*, 田莉莉, 王长松

系统生物工程教育部重点实验室, 天津市生物与制药工程重点实验室, 天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072

摘要 目的: 建立体外抗癌天然药物筛选模型, 评价丹参素的抗癌活性。方法: 以遗传物质 DNA 为靶标, 溴化乙锭 (EB) 为致癌物质, 丹参素为试药, 利用荧光光谱检测丹参素对 EB-DNA 体系的荧光猝灭效应; 利用圆二色谱技术检测丹参素对 EB-DNA 体系的干扰作用。结果: 丹参素能明显抑制 EB-DNA 体系的荧光强度, 且具有浓度依赖性; 丹参素能够有效阻断 EB 嵌入 DNA 的碱基对中, 维持 DNA 分子的正常构象。结论: 丹参素抑制致癌剂对 DNA 链的嵌入, 从而起抗癌活性。该模型可应用于抗癌功效的天然药物的筛选中。

关键词 筛选模型; 抗癌天然药物; 丹参素; 荧光光谱; 圆二色谱; DNA 构象

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 03-0180-03

Anticancer activity of denshensu

ZHAO Guang-rong*, TIAN Li-li, WANG Chang-song

Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Biological and Pharmaceutical Engineering; Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, P. R. China

Abstract Objective: To establish *in vitro* screening model for natural anticancer drugs and evaluate the anticancer activity of denshensu on carcinogenic damaged DNA. **Methods:** Genetic material DNA was used as target, ethidium bromide (EB) as carcinogen, quenching effect of denshensu on fluorescence spectrum of EB-DNA was detected. Interfering effect of denshensu on circular dichroism spectra of EB-DNA was measured. **Results:** Denshensu strongly quenched the fluorescent intensity at a dose-dependent manner. The circular dichroism spectra showed that denshensu could inhibit the insertion of EB to base pairs of DNA, and maintain the normal conformation of DNA. **Conclusion:** Denshensu possesses strong anticancer activity by inhibiting insertion of carcinogens into genetic DNA. This model would be applicable for screening natural anticancer drugs

Key words screening model; anticancer natural drug; denshensu; fluorescence spectrum; circular dichroism spectrum; DNA conformation

遗传物质 DNA 的突变与损伤是发生细胞癌变过程的第一步^[1]。溴化乙锭是染料类化学致癌剂, 它具有刚性芳环结构, 可以平行嵌入 DNA 的碱基对之中, 使 DNA 复制时碱基错配, 从而导致基因突变, 细胞发生癌变。由于溴化乙锭与核酸的结合没有碱基序列特异性, 因此可造成大范围的突变。丹参素为传统中药丹参中的主要水溶性组分, 具有多种药理作用, 如抑制血小板聚集、抗凝血、扩张冠状动脉、抗氧化损伤^[2]、抗肿瘤^[3]等。有实验表明丹参素在无血清培养液中有明显的抑癌作用, 当丹

参素浓度达到 80 mg/mL 时, 抑癌效应与阿克拉霉素 A 相同^[4]。本文在体外分子水平建立化学致癌剂溴化乙锭与 DNA 的相互作用模型, 检测丹参素在分子水平的抗癌作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

丹参素购于陕西森弗生物技术有限公司; 质粒小提中量试剂盒购于北京天根生物技术有限公司; 质粒 DNA 用碱性裂解法从大肠杆菌中提取, 再用试剂盒纯化, 纯化后的质粒吸光度为: $1.75 \leq A_{230}/A_{260} \leq$

收稿日期: 2010-02-19

基金项目: 国家自然科学基金 (30873400); 国家重大新药创制专项资助 (2009ZX09301)。

* 通讯作者 赵广荣, Tel: (022) 87401546; E-mail: grzhao@tju.edu.cn

1.95, $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$, 用微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度并稀释至所需浓度。

1.2 仪器

DYY-6C 型电泳仪: 北京六一仪器厂; 紫外凝胶成像系统: 美国 UVP 公司; ND-1000 微量紫外分光光度计: 德国 Thermo Scientific; 双光束紫外可见分光光度计: TU-1900, 北京; 圆二色谱仪 JASCO: J-715 日本; Varian 荧光光度计: 美国。

1.3 溴化乙锭-DNA 的荧光猝灭反应

在 1 cm^2 石英比色皿中加入终质量浓度为 $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质粒 DNA 与 $10 \mu\text{mol/L}$ 溴化乙锭, 然后加入终浓度分别为 100 、 300 、 600 、 $900 \mu\text{mol/L}$ 的丹参素, 室温下孵育 15 min 。荧光检测条件: $\text{Ex}=5 \text{ nm}$, $\text{Em}=5 \text{ nm}$, 激发波长 350 nm , 发射波长 597.5 nm , 全波长扫描范围: $550 \sim 700 \text{ nm}$, 扫描速度为中等。用 PBS ($\text{pH}=7.5$) 缓冲溶液调零。

丹参素抑制溴化乙锭-DNA 荧光强度的抑制率计算公式为

$$[1 - (I_c - I_a) / (I_b - I_a)] \times 100\%$$

I_a 为溴化乙锭在最大发射波长 597.5 nm 处的发光强度; I_b 为溴化乙锭-DNA 在最大发射波长 597.5 nm 处的发光强度; I_c 为加入丹参素之后溴化乙锭-DNA 体系在最大发射波长 597.5 nm 处的发光强度。

根据经典猝灭理论方程 Stern-Volmer: $F_0/F=1+K\tau[Q]$, F_0/F 对猝灭剂浓度 Q 作图。 F_0 为溴化乙锭-DNA 体系的荧光强度, F 为加入猝灭剂时 EB-DNA 体系的荧光强度, K 为双分子猝灭过程速率常数, τ 为没有猝灭剂存在下荧光分子平均寿命, 生物大分子荧光寿命约为 10^{-8}s ^[5], Q 为猝灭剂的浓度。

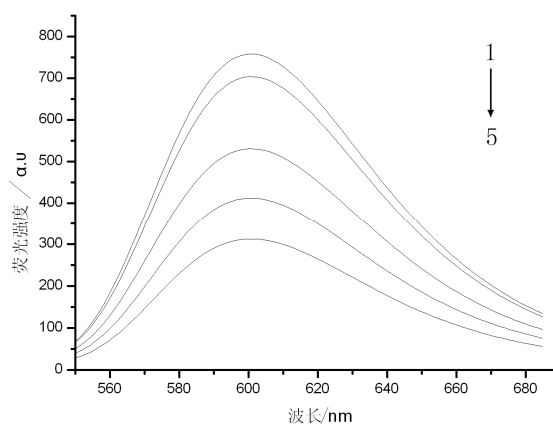
1.4 圆二色谱分析

圆二色谱在 20°C 下测定, 样品池厚度为 0.2 cm , 氮气流速恒定, 扫描范围为 $220 \sim 300 \text{ nm}$, DNA 浓度为 $0.113 \mu\text{mol/L}$, 测定 DNA 圆二色谱图, 然后向 DNA 溶液中分别加入溴化乙锭终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$, 丹参素终浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$, 对比溴化乙锭与丹参素对 DNA 微观结构的影响。然后在溴化乙锭-DNA 中加入丹参素终浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$, 检测丹参素对溴化乙锭-DNA 圆二色谱的影响。相同浓度的丹参素、溴化乙锭作为参比液, 消除两者在 $220 \sim 300 \text{ nm}$ 处的 CD 值。每个样品测量 3 次, 取平均值。

2 结果与讨论

2.1 丹参素对 EB-DNA 的荧光抑制效应

图 1 显示丹参素对 EB-DNA 体系具有荧光猝灭效应, 并且具有浓度依赖性。溴化乙锭与 DNA 本身的荧光很弱, 但是当 EB 嵌入 DNA 结构中时, 荧光强度增强。当 DNA、溴化乙锭与丹参素同时存在时, 溴化乙锭-DNA 体系的荧光强度随丹参素的浓度增加依次降低。当丹参素浓度为 $900 \mu\text{mol/L}$ 时, 丹参素对溴化乙锭-DNA 体系的荧光抑制率为 63.5% 。



$C_{(\text{EB})}$: $10 \mu\text{mol/L}$, $C_{(\text{DNA})}$: $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Curve 1-5: denshensu with doses of 0, 100, 300, 600, and $900 \mu\text{mol/L}$

图 1 丹参素对 EB-DNA 体系的荧光猝灭效应

Fig.1 Fluorescence quenching effect of denshensu on EB-DNA

根据经典方程 Stern-Volmer: $F_0/F=1+K\tau[Q]$, F_0/F 对猝灭剂丹参素浓度 Q 作图, 如图 2 所示。 F_0/F 与 Q 呈良好的线性相关性 ($R^2 > 0.99$), 并求得丹参素对溴化乙锭-DNA 体系的猝灭常数为 $1.5 \times 10^{11} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。根据经典的荧光猝灭理论, 由于丹参素对溴化乙锭-DNA 体系的荧光猝灭常数大于猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ^[5], 因此, 丹参素与 DNA 之间可能通过弱作用力形成复合物, 阻断了溴化乙锭嵌入 DNA 碱基。

2.2 丹参素、溴化乙锭与 DNA 相互作用的圆二色谱

圆二色谱是研究小分子化合物与 DNA 相互作用对 DNA 构象影响的重要手段^[8]。溴化乙锭、丹参素对 DNA 微观构象影响的圆二色谱图如图 3 所示。DNA 的圆二色谱中, 处于 274 nm 处的正峰是由碱基堆积产生的, 240 nm 处的负峰是由 DNA 双螺旋

结构的 B 型构象产生的。当溴化乙锭加入 DNA 溶液中时, 明显引起 DNA 圆二色谱的改变, 正峰明显降低, 负峰明显增强。原因是溴化乙锭平行嵌入 DNA 的碱基对中, 减弱碱基的堆积程度, 增强 DNA 的双螺旋构象。当丹参素加入 DNA 溶液时, 丹参素对 DNA 圆二色谱的影响明显低于溴化乙锭, 说明丹参素与 DNA 的相互作用不同于溴化乙锭, 证明丹参素通过氢键等弱作用力与 DNA 形成复合物。当向溴化乙锭-DNA 体系中加入丹参素时, 正峰强度增加, 负峰强度降低。说明丹参素有效阻止溴化

乙锭与 DNA 的嵌合作用, 降低了 DNA 的碱基堆积与双螺旋构象的变化。

3 结论

癌症成为目前严重影响人类健康的首要疾病, 化学因素导致遗传物质 DNA 的突变是主要致癌原因之一。从中药中筛选具有抑制化学致癌剂作用的天然药物显得十分重要和尤为迫切。本文利用溴化乙锭与 DNA 结合后产生强烈荧光现象, 设计了体外抗癌药物筛选模型。荧光光谱与圆二色谱结果显示, 丹参素能够有效的抑制强致癌剂溴化乙锭嵌入 DNA 的碱基对中, 阻止了致癌剂与 DNA 结合。从微观结构分析可知, 丹参素可能通过氢键等弱作用力与 DNA 形成复合物, 在 DNA 的周围形成保护层。本文筛选模型原理明确, 操作简单, 方案易行, 可大规模筛选, 可望应用于中药现代化和二次开发的研究中。

参考文献:

- [1] Miriam P. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk [J]. *Cancer*, 2004, 4: 630-636.
- [2] Zhao G R, Zhang H M, Ye T X, *et al.* Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46:73-81.
- [3] 方 杰. 丹参素对乳腺癌 MCF 细胞株的作用[J]. 中国老年学杂志, 2003, 3(23):168
- [4] 哇 建, 林 枫. 丹参素对胃腺癌 NGCC 细胞株的作用[J]. 镇江医学院学报, 1997, 7(4):384-385.
- [5] 张海容, 郭祀远, 李 琳. 光谱法研究硫酸酯化壳聚糖与 DNA 的作用机理[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(6):829.
- [6] Zhang H Y, Cheng D Z. Theoretical characterization and its application of free radical scavenging activity for phenolic antioxidants[J]. *Acta Biophysinica Sinica*, 2000, 6(1):1-9.
- [7] Anderson F, Fisher J, Hara Y, *et al.* Green tea catechins partially protect DNA from $\cdot\text{OH}$ radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22:1189-1193.
- [8] Song Y M, Yang P J, Wang L F, *et al.* Study on the interactions between $\text{Sm}(\text{RA})_2\cdot\text{Ac}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and DNA[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 61(8):1266-1270.

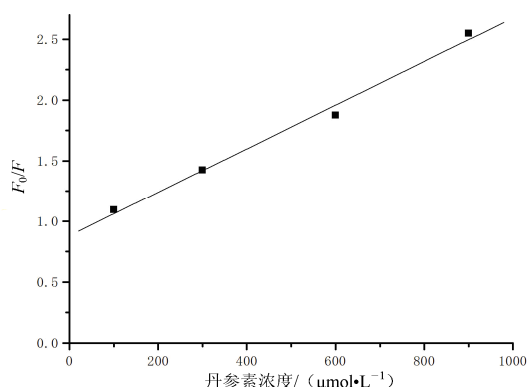
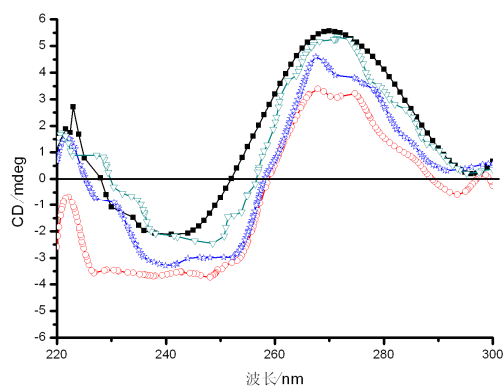


图 2 丹参素与溴化乙锭-DNA 体系作用的 Stern-Volmer 曲线

Figure 2 Stern-Volmer plot of the interaction between Danshensu and EB-DNA



(—■—), in the presence of 5 $\mu\text{mol/L}$ EB(—○—), 300 $\mu\text{mol/L}$ propanoid acid (—▽—), 5 $\mu\text{mol/L}$ EB, and 300 $\mu\text{mol/L}$ propanoid acid (—☆—)

图 3 丹参素对 EB-DNA 构象影响的圆二色谱

Fig. 3 Circular dichroism spectra of 0.113 $\mu\text{mol/L}$ DNA