

丹皮酚抗肿瘤作用及作用机制研究进展

高立民, 满其倩

德州市第二人民医院, 山东 德州 251500

摘要: 丹皮酚是牡丹皮和徐长卿的主要药效成分。近年来, 丹皮酚由于具有多种药理活性越来越受到关注, 如抑菌抗炎、解热镇痛、增强免疫力等。同时, 丹皮酚抗肿瘤作用也成为近期的研究热点, 包括对肝癌、结肠癌、胃癌等多种肿瘤细胞具有抑制作用, 其抗肿瘤机制主要有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、改善机体免疫力等。对丹皮酚抗肿瘤作用相关的研究结果进行了综述, 探讨了其抗肿瘤的机制, 为深入研究丹皮酚的药理作用提供依据。

关键词: 丹皮酚; 药理活性; 抗肿瘤作用; 作用机制; 诱导凋亡

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2016) 02-0300-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.031

Research progress on antitumor effect and mechanism of paeonol

GAO Li-min, MAN Qi-qian

The Second People Hospital of Dezhou, Dezhou 251500, China

Abstract: Paeonol is the main active component of *Moutan Cortex* and *Cynanchum paniculatum*. In recent years, paeonol has been paid more attention to because of varieties of pharmacological activities, antibacterial and anti-inflammatory activities, improving the immune system, etc. Meanwhile, the antitumor effect of paeonol has become a research focus recently. For instance, paeonol can inhibit the development of liver cancer, colon cancer, and stomach cancer by inhibiting the proliferation of cancer cells, inducing apoptosis and improving immunity. In this paper, experimental studies related to the antitumor effect of paeonol were reviewed. Antitumor mechanisms of paeonol were discussed to provide references for further study of the pharmacological effects of paeonol.

Key words: paeonol; pharmacological activities; antitumor; mechanism; apoptosis induction

丹皮酚又名牡丹酚, 是毛茛科植物牡丹的干燥根皮(牡丹皮)和萝藦科植物徐长卿的干燥根或全草的主要有效成分。丹皮酚的化学结构为 2-羟基-4-甲氧基苯乙酮, 分子式为 $C_9H_{10}O_3$, 属于小分子苯酚类物质, 结构简单, 易挥发、水溶性差。近年来的药理研究显示丹皮酚具有多种生物活性, 包括抑菌抗炎^[1]、解热镇痛、抗肝细胞损伤^[2]、抗心律失常^[3]等。近年来, 由于肿瘤发病率的提高, 丹皮酚的抗肿瘤作用受到重视, 已经有研究显示丹皮酚对肝癌、胃癌等多种肿瘤细胞均有抑制作用, 其抗肿瘤机制主要有诱导细胞凋亡^[4]、抑制细胞增殖^[5]。查询国内外近期发表的相关文献, 对丹皮酚抗肝癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、食管癌等多种肿瘤作用的试验结果进行了梳理及综述, 并探讨了其抗肿瘤的作用机制, 为深入研究丹皮酚的抗肿瘤药理

活性及进一步开发抗肿瘤新药提供依据。

1 抗肝癌

张春虎等^[6]采用 MTT 法检测了丹皮酚体外对肝癌细胞 MHCC97-H 增殖的抑制作用, 并采用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)及蛋白质印迹法(Western Blot)等实验检测了丹皮酚对肝癌细胞抑癌基因 PTEN 及致癌基因 AKT 相关 mRNA 及蛋白的表达。结果显示, 在质量浓度为 2.60~166.18 mg/L, 作用时间分别为 24、48、72、96 h 时, 丹皮酚对 MHCC97-H 细胞增殖均具有较强的抑制作用, 且呈时间、浓度相关。同时, 与空白对照组相比, 经 72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀) 19.48 mg/L 丹皮酚处理 12、24、36 h 的细胞 PTEN mRNA 表达逐渐增强, 而 Akt1 及 Akt2 mRNA 表达逐渐减弱, 相关蛋白表达规律相同, 推测丹皮酚可能是通过此途径达

收稿日期: 2015-12-24

作者简介: 高立民, 副主任医师, 研究方向为中药化学成分及抗肿瘤作用。Tel: 18905431919 E-mail: dzws2020@163.com

到抑制肝癌细胞 MHCC97-H 增殖的作用。Xu 等^[7]采用 MTT 法检测了丹皮酚对肝癌细胞 HepG₂ 体外增殖的抑制作用, 并采用流式细胞术 (FCM) 检测其对肝癌细胞 HepG₂ 细胞周期及凋亡的影响。MTT 结果显示, 丹皮酚浓度为 7.81~250 mg/L 作用 48 h, 对 HepG₂ 细胞增殖具有抑制作用, 且呈浓度相关, IC₅₀ 为 (104.77±7.28) mg/L。FCM 实验结果表明丹皮酚可以将细胞周期阻滞于 S 期, 且凋亡峰 sub-G₁ 的比例随药物浓度升高 (31.25、62.5、125 mg/L, 24 h) 而增大, 表明丹皮酚可以通过阻滞细胞周期进程及诱导细胞凋亡来达到抗肝癌的作用。

孙国平等^[8]建立了小鼠移植性肝癌 HepA 肿瘤细胞模型, 采用称质量法检测了丹皮酚在小鼠体内的抑瘤作用, 并采用放免法检测了丹皮酚对于荷瘤小鼠体内免疫调节因子白细胞介素 (IL) -2 及凋亡诱导因子肿瘤坏死因子 (TNF) - α 含量的变化。结果显示丹皮酚在浓度 50 mg/(kg·d), 作用 14 d, 对荷瘤小鼠的抑瘤率可达到 42.55%, 并且抑瘤率随药物的浓度升高而上升。同时, 与空白对照组相比, 丹皮酚可以明显提高小鼠血清中 IL-2 及 TNF- α 的水平, 并能增强脾细胞诱生 IL-2 及腹腔巨噬细胞诱生 TNF- α 的能力, 提示丹皮酚可能是通过改善小鼠免疫力及诱导肝癌细胞凋亡来达到抑制小鼠体内肿瘤发展作用的。

由以上研究结果可以看出, 丹皮酚在体内外均可抑制肝癌细胞的发展, 其作用机制包括体外抑制细胞增殖、促进抑癌基因的表达、诱导细胞凋亡 (如阻滞周期进程)、增强机体免疫力等。

2 抗结肠癌

计春燕等^[9]将不同浓度的丹皮酚作用于人结肠癌 HT-29 细胞, 然后采用 HE 染色后观察及透射电镜观察细胞形态变化; 采用末端标记法 (TUNEL) 检测丹皮酚对 HT-29 细胞凋亡的诱导作用, 并用免疫细胞化学技术检测了丹皮酚作用前后 HT-29 细胞内凋亡相关基因 bcl-2 及 p53 表达的变化。结果表明, 随药物浓度的升高 (3.91~250 mg/L), 肿瘤细胞的形态发生较大变化, 胞质浓缩、体积变小、出现凋亡小体, 甚至出现细胞坏死、肿胀破裂。作用 48 h, 随药物浓度的升高 (15.63、62.5、250 mg/L), 凋亡指数 (AI) 逐渐增大, 凋亡相关蛋白 bcl-2 及 p53 的表达量降低。表明丹皮酚可以诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡, 可能是通过影响凋亡相关蛋白的表达所致。

李正荣等^[10]采用 MTT 法检测了丹皮酚体外对结直肠癌细胞 LoVo 增殖的抑制作用, 并采用 FCM 检测丹皮酚对细胞凋亡率及细胞中凋亡抑制蛋白 bcl-2 表达的影响。结果显示, 丹皮酚浓度在 0.047~1.504 μ mol/L 内, 作用时间分别为 24、48、72、96 h 可以明显地抑制结直肠癌细胞的增殖, 并具有浓度及时间相关关系; 随着药物浓度的升高 (0.094、0.376、1.504 μ mol/L), 凋亡峰 sub-G₁ 峰的比例逐渐增大, 当丹皮酚的浓度为 1.504 μ mol/L 时作用 48 h, 凋亡峰比例高达 (36.93±1.53) %。而且细胞中凋亡抑制蛋白 bcl-2 的含量随药物浓度的升高而降低。

Ye 等^[11]采用了 MTT 法检测丹皮酚对 HT-29 细胞增殖的抑制作用, 采用 FCM 检测丹皮酚对细胞凋亡及周期进程的影响, 应用 RT-PCR 及免疫细胞化学染色法检测丹皮酚作用前后细胞中环氧化酶-2 (COX-2) 及周期相关因子 p27 表达的变化。结果表明, 浓度在 0.024~1.504 mmol/L 内, 作用时间分别为 24、48、72、96 h, 丹皮酚可以抑制 HT-29 细胞的增殖, 且具有浓度、时间相关性。随着药物浓度 (0.094、0.376、1.504 mmol/L) 升高, HT-29 细胞的凋亡率升高; 当丹皮酚浓度为 1.504 mmol/L 时, 凋亡峰比例达到 34.5%, 同时丹皮酚可将细胞周期阻滞在 S 期。而且丹皮酚可以降低 COX-2 的表达, 升高 p-27 的表达, 均具有浓度相关关系。

以上研究结果表明丹皮酚可以诱导结直肠癌细胞的凋亡, 主要通过促进凋亡相关蛋白 (如 bcl-2 蛋白) 的表达、阻滞细胞周期进程发展、改变细胞形态等作用诱导细胞的凋亡, 达到抑制结直肠癌发展的目的。

3 抗乳腺癌

汤海标等^[12]采用了 MTT 法检测丹皮酚对两种乳腺癌细胞株 Bcap-37 及 MDA-MB-453 增殖的抑制作用, 采用 FCM 检测药物对细胞周期进程及凋亡的影响, 应用 Western Blot 检测药物作用前后凋亡相关蛋白表达水平的变化。结果表明, 丹皮酚浓度为 100~800 μ g/mL, 作用时间为 24、48、72 h 可以明显抑制乳腺癌细胞的增殖, 且随药物浓度的升高、时间的延长, 两种细胞的活性降低。同时, 与空白对照相比, 400 μ g/mL 丹皮酚作用 48 h 可以将两种细胞的周期阻滞于 G₁ 期, 降低胱天蛋白酶 (caspase) -3、caspase-7 的表达而升高 PTEN 的表达, 这就从分子水平解释了丹皮酚对两种乳腺癌细胞株的凋亡诱导作用。

Cai 等^[13]首先建立了对于抗肿瘤药物紫杉醇具有耐药性的乳腺癌细胞模型 MCF-7/PTX, 然后采用 MTT 法、FCM、Western Blot、RT-PCR 等方法检测丹皮酚对 MCF-7/PTX 耐药性的逆转作用。结果表明, 在丹皮酚浓度为 15、30、60 $\mu\text{mol/L}$ 时, MCF-7/PTX 对于紫杉醇的敏感性增强, 且随丹皮酚浓度的升高, 乳腺癌细胞对紫杉醇的 IC_{50} 值分别为 688.9、389.2、280.1 nmol/L 。与只加入紫杉醇药物组比较, 丹皮酚+紫杉醇协同组中, MCF-7/PTX 早期及晚期凋亡细胞比例升高, 转胶蛋白 (transgelin) 2 及抗性蛋白 P-gp、MRP1、BCRP 的表达均降低。

王建杰等^[14]建立荷瘤小鼠 (EMT6 乳腺癌) 模型, 并分别 ip 给予生理盐水、环磷酰胺 (25 mg/kg) 及丹皮酚 (150、300 mg/kg), 1 次/d, 共 14 d, 采用 FCM、酶联免疫吸附 (ELISA) 法、RT-PCR 等实验检测了药物作用前后小鼠外周血中 T 淋巴细胞亚群比例、血清中 IL-2 与 TNF- α 水平、外周血单个核细胞 (PBMC) IL-2 与 TNF- α mRNA 表达水平。结果显示, 与生理盐水组相比, 丹皮酚可以提高小鼠 CD4^+ T 细胞百分数与 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值及血清中 IL-2、TNF- α 水平, 并且可以促进 PBMC 中 IL-2 及 TNF- α mRNA 的表达。提示丹皮酚可能是通过改善小鼠的免疫功能、升高 IL-2 及 TNF- α 的水平而达到抗肿瘤作用的。

总体来说, 丹皮酚可以通过促进某些凋亡蛋白的表达、阻滞细胞周期进程的发展等诱导乳腺癌细胞的凋亡; 同时, 丹皮酚可以逆转某些耐药细胞株对抗肿瘤药物的耐药性、增强其敏感性及增强机体免疫力等达到治疗乳腺癌的作用。

4 抗胃癌

李娜^[15]采用 MTT 法检测了丹皮酚对两种胃癌细胞株 (人胃癌细胞株 SGC-7901 和小鼠前胃癌细胞 MFC) 增殖的抑制作用, 通过取瘤称质量法评估丹皮酚对荷瘤小鼠 MFC 肿瘤生长的抑制作用, 采用流式细胞术检测丹皮酚对两种细胞周期进程及凋亡的影响, 采用免疫组化 S-P 法检测丹皮酚对细胞及实体瘤中凋亡相关蛋白 bcl-2 及 bax 表达水平的影响。结果显示, 丹皮酚可以抑制两种细胞的增殖, 呈现明显的量效关系, 对人胃癌细胞株 SGC-7901 和小鼠前胃癌细胞 MFC 的 IC_{50} 值分别为 82.60、60.10 mg/L ; 浓度为 200 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 作用 11 d, 丹皮酚对 MFC 荷瘤小鼠的抑瘤率达 51.62%。同时, 与生理盐水组比较, 丹皮酚可以升高 sub-G₁ 凋亡峰

的比例, 将细胞周期阻滞于 S 期, 并且促进 bax 的表达、抑制 bcl-2 的表达, 以诱导胃癌细胞凋亡, 从分子水平探讨了丹皮酚诱导胃癌细胞凋亡的可能机制。

5 抗食管癌

Sun 等^[16]采用 MTT 法、流式细胞术等检测了丹皮酚对两种食管癌细胞 SEG-1 及 Eca-109 的增殖、周期分布的影响。结果显示, 丹皮酚浓度在 7.8~250 mg/L 作用 48 h, 两种细胞活性随药物浓度升高而降低, IC_{50} 值分别为 57.73、124.77 mg/L 。与空白组相比, 丹皮酚浓度在 15.63~125 mg/L , 作用 24 h, SEG-1 及 Eca-109 两种细胞中凋亡细胞比例逐渐上升, 且细胞周期阻滞于 S 期, 并呈浓度相关。

杨震等^[17]采用 MTT 法以及取瘤称质量法检测了丹皮酚在体内外对食管癌细胞 Eca-109 增殖的抑制作用, 并通过 TUNEL 法测定 AI 值来评估其对 Eca-109 细胞的凋亡诱导作用。结果显示, 丹皮酚对 Eca-109 细胞增殖具有较强的抑制作用, 作用 48 h 测得的 IC_{50} 值为 0.342 mmol/L ; 体内 ig 给予丹皮酚 200 mg/kg , 1 次/d, 连用 14 d, 对裸鼠移植 Eca-109 的抑瘤率可达 34.46%。TUNEL 实验结果表明, 随着药物浓度 (25、50、100、200 mg/kg) 的升高, AI 值增大, 与空白对照组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。

动物实验结果显示, 丹皮酚主要通过抑制细胞增殖、阻滞细胞周期进程及诱导细胞凋亡等方式达到治疗食管癌的效果。

6 抗其他肿瘤

张旃等^[18]采用 MTT 法得出丹皮酚可以抑制人肺癌细胞株 GLC-82 的增殖, 并采用 FCM 测得出丹皮酚可将 GLC-82 细胞周期阻滞在 S 期, 促进细胞的凋亡。董会月^[19]以白血病细胞株 K562 及耐药细胞株 K562/ADM 为研究对象, 通过 RT-PCR 法检测丹皮酚作用后 K562 及 K562/ADM 细胞中耐药相关基因 *mdr-1*、MRP、LRP 表达的变化, 结果表明丹皮酚可以降低 3 种耐药相关基因的表达, 揭示了丹皮酚逆转耐药细胞系 K562/ADM 的耐药性的可能机制。Yin 等^[20]采用 MTT 法得出丹皮酚可以抑制卵巢癌细胞株 SKOV3 的增殖, 采用 Western Blot 实验得出丹皮酚 100、200 $\mu\text{g/mL}$, 作用 24 h 可以升高被分解的 caspase-3 的水平, 而降低生存素 (survivin) 蛋白的表达的结论。

7 结语

从目前的研究报道可以看出,丹皮酚对多种肿瘤细胞的发展均具有较好的抑制作用,如肝癌、胃癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌等,其作用机制主要有降低细胞活性、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、逆转癌细胞对化疗药物(如紫杉醇)的耐药性、调节凋亡相关蛋白(bcl-2、bax、caspase 3等)的表达、增强机体免疫力等。今后的研究应继续加强对丹皮酚抗肿瘤作用分子机制的实验分析,以探索可能的信号转导通路以及作用靶点;同时,由于对丹皮酚药理作用的相关研究多围绕体外细胞实验进行的,而对于动物的在体实验研究较少,为此应加强体内实验的研究。在作用机制与毒理比较明确的时候可以深入到临床研究,为进一步开发含有丹皮酚的抗肿瘤新药及临床应用提供理论支持,同时为提高肿瘤的诊治水平提供新思路。

参考文献

- [1] 高玉云. 丹皮酚/厚朴酚抑菌效果研究及其在牙膏中的应用 [D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 14-47.
- [2] 颜贵明, 戴敏, 宣自华, 等. 丹皮酚对急性肝细胞损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 854-858.
- [3] 张金花, 熊永爱. 丹皮酚对大鼠缺血性心律失常及其心肌细胞 miRNA-1 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 129-132.
- [4] 钱翠娟, 姚军, 王建文, 等. 丹皮酚对肝癌细胞 HepG2 凋亡及 NF- κ B 通路的影响 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(1): 48-49.
- [5] Li N, Fan L L, Sun G P, *et al.* Paeonol inhibits tumor growth in gastric cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(35): 4483-4490.
- [6] 张春虎, 胡随瑜, 曹美群, 等. 丹皮酚对肝癌 MHCC97-H 细胞 PTEN、AKT 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(8): 1134-1137.
- [7] Xu S P, Sun G P, Shen Y X, *et al.* Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in HepG₂ cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(2): 250-256.
- [8] 孙国平, 沈玉先, 张玲玲, 等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 160-162.
- [9] 计春燕, 谭诗云, 汪毅, 等. bcl-2 和 p53 在丹皮酚诱导人结直肠癌 HT-29 细胞凋亡中的作用及其机制 [J]. 中国全科医学, 2007, 10(5): 364-366.
- [10] 李正荣, 史浩, 揭志刚. 丹皮酚对人结肠癌 LoVo 细胞增殖抑制机制的研究 [J]. 消化肿瘤杂志, 2010, 2(4): 230-233.
- [11] Ye J M, Deng T, Zhang J B. Influence of paeonol on expression of COX-2 and p27 in HT-29 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(35): 4410-4414.
- [12] 汤海标, 蔡锦威, 刘卫国, 等. 丹皮酚对乳腺癌细胞的生长抑制作用 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(4): 276-281.
- [13] Cai J X, Chen S Y, Zhang W P, *et al.* Paeonol reverses paclitaxel resistance in human breast cancer cells by regulating the expression of transgelin 2 [J]. *Phytomedicine*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.02.012>.
- [14] 王建杰, 董航, 罗文哲, 等. 丹皮酚对 EMT6 乳腺癌小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(27): 17-19.
- [15] 李娜. 丹皮酚对胃癌细胞作用的体内外实验及其机制研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007: 14-33.
- [16] Sun G P, Wan X N, Xu S P, *et al.* Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines [J]. *Dis Esophagus*, 2008, 21: 723-729.
- [17] 杨震, 孙国平, 徐淑萍, 等. 丹皮酚体内外抗人食管癌 Eca-109 细胞增殖及诱导凋亡的作用 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(5): 654-658.
- [18] 张旗, 李明昌, 谭炳炎, 等. 丹皮酚抑制 GLC-82 细胞增殖的体外实验研究 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6(6): 637-640.
- [19] 董会月. 丹皮酚逆转人白血病耐药细胞系 K562/ADM 细胞多药耐药的作用研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2010: 8-14.
- [20] Yin J, Wu N Sh, Zeng F Q, *et al.* Paeonol induces apoptosis in human ovarian cancer cells [J]. *Acta Histochemica*, 2013, 115: 835-839.