

芹菜素与丹参酮II_A的协同抗肿瘤作用及机制

李莹雪^{1,2}, 王锐银², 包永明^{1*}

1. 大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116024

2. 广州神农生物技术有限公司 神农中药研究所, 广东 广州 510663

摘要: **目的** 研究芹菜素 (Api) 和丹参酮II_A (Tan II_A) 联用对多种肿瘤细胞的协同抗肿瘤作用, 并揭示其发生协同作用的机制。**方法** 以人胃癌 BGC823 细胞、人乳腺癌 MCF7 细胞、人肝癌 SMMC7721 细胞为研究对象, 采用 MTT 法检测 Api 和 Tan II_A 联用对细胞的增殖抑制作用; 采用 AV-PI 双染法、PI 染色法检测药物对 BGC823 细胞凋亡、细胞周期的影响; 免疫印迹法检测 BGC823 细胞凋亡相关蛋白 p53、BAX/BCL-2 和周期蛋白 B1、D1 的表达; 圆二色和 DNA 熔点法检测药物与 DNA 结合情况; S180 荷瘤鼠模型检测药物的抑瘤效果。**结果** Api 与 Tan II_A 联用对 BGC823 等肿瘤细胞的增殖有协同抑制作用, 联用指数 CI 在 0.28 左右。两药联用显著增加了细胞凋亡 ($P < 0.01$), 上调了胞内 BAX/BCL-2 比值 ($P < 0.01$); 周期蛋白水平发生变化, 细胞周期阻滞在 S 期得到强化。两药与 DNA 以两种不同方式结合, DNA 热变性曲线显著改变。体内抑瘤实验证明与单药相比, 两药联用荷瘤鼠肿瘤体积和肿瘤质量均显著降低 ($P < 0.01$), 抑瘤效果与环磷酰胺相当, 但不良反应较小。**结论** Api 与 Tan II_A 联用具有协同抗肿瘤作用; 药物与 DNA 以不同的方式结合, 加剧了细胞周期的阻滞, 是二者产生协同作用的核心机制。

关键词: 丹参酮II_A; 芹菜素; 协同作用; 抗肿瘤; 细胞凋亡; 细胞周期阻滞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)22-5788-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.017

Synergistic antitumor effects and mechanism of apigenin and tanshinone II_A

LI Ying-xue^{1,2}, WANG Rui-yin², BAO Yong-ming¹

1. School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

2. Shennong Institute of Chinese Medicine, Guangzhou Union Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510663, China

Abstract: Objective To evaluate the synergistic anticancer effects of the combination of apigenin (Api) and tanshinone II A (Tan II_A), and investigate the mechanisms of pharmacological effects and their potential applications as an anticancer therapy in clinics. **Methods** MTT assay were used to determine anticancer effects of the combination of Api and Tan II_A on BGC823, MCF7, and SMMC7721 cells. AV-PI dual stain and PI staining method were used for detecting the effect of the two drugs combination on BGC823 cell apoptosis and cell cycle. Expression of p53, BAX/BCL-2, cyclin B1 and D1 proteins were determined by Western blotting. Circular dichroism method and DNA melting point method were explored to detect interaction among the two drugs and DNA. S180 tumor xenograft mice model was used to evaluate the antitumor effects of the two drugs combination. **Results** Tan II_A combined with Api exerted synergistic inhibitory effects on the proliferation of BGC823 and other tumor cells with the CI of 0.28. After tumor cell treated by combination of Tan II_A and Api, the tumor cell apoptosis was significantly enhanced and the value of BAX/BCL-2 in cells was up-regulated ($P < 0.01$); The levels of cyclin B1, D1 protein were changed and cell cycle arrest was increased which mainly blocked in S phase. The interaction among the two drugs and DNA was in two different ways, leading to the curves of thermal denaturation of DNA changed significantly. Furthermore, the combination of Tan II_A and Api showed a stronger inhibitory effect on tumor volume and weight in S180 mice model than monotherapy, which was similar to cyclophosphamide therapy but less side effects. **Conclusion** Tan II_A combined with Api exerted synergistic antitumor effects. The two drugs interacted with DNA in different ways and aggravated the cell cycle arrest, which were the key mechanisms of their synergistic antitumor effects.

Key words: tanshinone II_A; apigenin; synergistic effects; anticancer; apoptosis; cell cycle arrest

收稿日期: 2020-03-29

作者简介: 李莹雪 (1975—), 博士研究生, 从事中药新剂型、新技术、新工艺研究。Tel: 13928943502 E-mail: liyingxue0533@163.com

*通信作者 包永明 (1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为蛋白质及酶工程、生物催化与转化、药物化学及药理。

Tel: (0411)84706365 E-mail: biosci@dlut.edu.cn

近年来,肿瘤已经成为威胁人类生存健康的重大疾病。目前主要的治疗手段由于靶点单一、耐药性、不良反应大等原因无法根治肿瘤,手术、放疗、化疗后肿瘤易二次复发并扩散,临床上需要一种低毒、多靶点的长期辅助药物,用于手术、放化疗后预防肿瘤的二次复发^[1]。随着植物化学研究的发展,人们发现了大量具有抗肿瘤活性的天然化合物,这些化合物毒性较低,不易产生耐药性,但由于抗肿瘤效果和成药性等问题,其临床开发受到限制。具有抗肿瘤活性的天然化合物联用,可同时作用于肿瘤细胞的多个靶点,并且具有协同抗肿瘤作用,是一种较好的给药策略^[2]。近年来,多药联合应用及其协同作用的研究越来越受到人们的重视^[3]。

芹菜素(Api,图1-A)是广泛存在于蔬菜和水果中的一种黄酮类化合物,具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗菌等多种生理功能^[4]。Api对多种肿瘤细胞如抗胶质瘤^[5]、前列腺癌^[6]、胰腺癌细胞^[7]、结肠癌^[8]、乳腺癌^[9]、卵巢癌^[10]、宫颈癌^[11]、肝癌^[12]、肺癌细胞^[13]具有抑制或促凋亡作用,其抗肿瘤的机制研究主要涉及的靶点有ROS^[6,14-15]、p53^[6,16-17]、AKT^[18-19]、微管蛋白^[5]、DNA^[20]、Hsp90/Cdc37^[4]等。

丹参酮II_A(Tan II_A,图1-B)是一种在临床上用来治疗心血管疾病的天然化合物^[21-22],对多种癌细胞如乳腺癌细胞^[23-24]、前列腺癌细胞^[25]、结肠癌细胞^[26]、肝癌细胞^[27-28]、肺癌细胞^[29]等具有抑制作用。Tan II_A是一种多靶点的单体化合物,其主要靶点包括VEGF/VEGFR2^[29]、Bax/Bcl-2^[30]、NF-κB^[31]和p53^[32]等。研究表明,Tan II_A为DNA的小沟结合剂,通过与DNA的小沟结合,可有效激活p53,进而诱发细胞凋亡^[32]。与化疗药物相比,Tan II_A不良反应小、安全性高^[31],但其溶解性不佳、抗肿瘤作用不强,无法在临床上用于抗肿瘤的治疗^[28]。

课题组前期研究发现,Api与Tan II_A联用对肿瘤细胞具有协同抑制作用。本研究揭示了Tan II_A和Api在分子、细胞和动物水平上的协同抗肿瘤作用及作用机制。

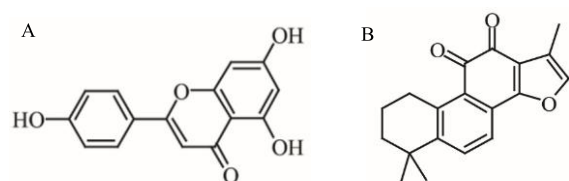


图1 Api (A) 和 Tan II_A (B) 的结构式

Fig. 1 Structures of Api (A) and Tan II_A (B)

1 仪器与材料

1.1 细胞株

人胃癌 BGC823 细胞、人乳腺癌 MCF7 细胞和人肝癌 SMMC7721 细胞由本课题组保存。

1.2 实验动物

CL 级 BALB/c 小鼠 30 只,雌雄各半,6 周龄,18~22 g,购自广州中山大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(粤)2016-0029。

1.3 仪器

细胞培养箱、多功能酶标仪(Thermo 公司);倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);圆二色谱分析仪(日本 Jasco 公司);垂直层流洁净工作台(西班牙 Telstar 公司)。

1.4 药物与试剂

Tan II_A(批号 150814)、Api(批号 151205),质量分数均≥98%,购自四川维克奇生物技术有限公司;紫杉醇(批号 NF-20160525,质量分数≥99%),购自西安天丰生物科技有限公司;环磷酰胺(CTX,批号 SJ0121RA14,质量分数≥97%),购自上海源叶生物科技有限公司。

DMEM 高糖培养基、胎牛血清,购自美国 Hyclone 公司;MTT、细胞凋亡检测试剂盒,购自南京凯基生物科技公司;BAX、BCL2、p53、周期蛋白 B1、周期蛋白 D1、GAPDH 抗体,购自武汉三鹰生物技术有限公司;小牛胸腺 DNA(CT-DNA)购自北京索莱宝有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

BGC823、MCF7、SMMC7721 细胞分别用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。以 1:3 传代比,3~4 d 传代 1 次,传代 1~2 次后即可用于后续实验。

2.2 MTT 法测定细胞增殖

以 1×10⁴/孔的密度分别将 BGC823、MCF7、SMMC7721 细胞接种于 96 孔板中,孵育 24 h 后分别加入 Tan II_A(12.5、25、50、100、200 μmol/L)、Api(6.25、12.5、25、50、100 μmol/L)、紫杉醇(30 nmol/L),孵育 48 h 后弃去培养基,PBS 洗涤 1 次,再加入 100 μL 含 0.5 mg/mL MTT 的无血清培养基孵育 4 h,弃上清,加入 100 μL DMSO,充分溶解后用酶标仪进行检测,检测波长 570 nm,参考波长 630 nm。

2.3 药物协同指数确定

利用 Chou-Talalay 模型, 可以计算出 2 种药物共同作用的联用指数 $CI^{[33]}$ 。当 CI 值 >1 时, 2 种化合物具有拮抗作用; 当 CI 值 $=1$ 时, 2 种化合物具有相加作用; 当 CI 值 <1 时, 2 种化合物具有协同作用, 当 CI 值 <0.7 时, 2 种化合物具有较强的协同效应。

$$CI = D_1 / (D_x)_1 + D_2 / (D_x)_2$$

其中 D_1 和 D_2 分别代表联合给药时 Tan II_A 和 Api 的给药浓度; $(D_x)_1$ 和 $(D_x)_2$ 代表 Tan II_A 和 Api 达到联合用药抑制率时单独给药的浓度。

$$D_x = D_m (f_a / f_u)^{1/m}$$

其中 f_a 和 f_u 为两药联用时的抑制率和存活率。 $f_a = 1 - f_u$; D_m 是中位剂量 (根据 IC_{50} 理论计算)。对中效方程式两边取对数得到。

$$\lg(f_a / f_u) = m \lg D - m \lg D_m$$

2.4 细胞凋亡检测

采用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒测定 Tan II_A 和 Api 对 BGC823 细胞的促凋亡作用。BGC823 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 cm 培养皿中, 孵育 24 h。分别加入 Tan II_A (50 μ mol/L)、Api (100 μ mol/L), 孵育 48 h 后收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μ L 含 2 μ L Annexin V-FITC 的结合液, 于冰上避光孵育 10 min, 流式细胞仪进样检测。

2.5 细胞周期检测

用无血清的 DMEM 高糖培养基将 BGC823 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 cm 的平皿中, 孵育 18~24 h 后, 弃去培养基, 分别加入用 10% FBS 培养基配制的 Tan II_A (50 μ mol/L)、Api (100 μ mol/L), 孵育 24、48、72 h 后, 1 200 r/min 离心 5 min, 收集细胞。用 PBS 洗涤 2 次, 加入 200 μ L 预冷的 PBS 重悬, 逐滴加入 2 mL 预冷的 75%乙醇中, 于 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h; 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, PBS 洗涤 1 次, 加入 200 μ L PI 染色液 (50 μ g/mL PI、200 μ g/mL RNase A、0.1% TritonX-100), 室温避光染色 30 min, 经 300 目尼龙网滤过, 流式细胞仪进样检测。

2.6 DNA 结合分析

采用圆二色 (CD) 法测定药物与 DNA 的结合情况。分别在 CT-DNA 中加入 Tan II_A (25、50、100 μ mol/L)、Api (50、100、200 μ mol/L), 以 CT-DNA (100 μ mol/L) 溶液作为对照, 比较药物引起的 DNA 特征 CD 谱图的变化。采用 J-810 圆二色谱仪扫描

得到 CD 图谱, 使用前用干燥的 N_2 将光谱仪光学室的 O_2 排净, 使用光程为 1 cm 的石英皿以 500 nm/min 扫描 235~400 nm 的 CD 光谱, 响应时间为 0.5 s, 狭缝宽度为 2 nm, 扫描累计 2 次后自动计算平均值。

2.7 DNA 熔点分析

分别在 CT-DNA 中分别加入 Tan II_A (25、50、100 μ mol/L)、Api (50、100、200 μ mol/L), 以 CT-DNA (100 μ mol/L) 溶液作为对照, 比较药物引起的 DNA 熔点变化。样品从 25 $^{\circ}$ C 升温至 95 $^{\circ}$ C, 采用紫外分光光度仪检测样品在 260 nm 的紫外吸收值。紫外吸收值对温度作图得到 DNA 热变性曲线。实验重复 3 次, 结果取 3 次实验的平均值。

2.8 免疫印迹法检测 BCL2、BAX、p53、周期蛋白 B1、周期蛋白 D1 的表达

BGC823 细胞, 分别加入 Tan II_A (25、50 μ mol/L)、Api (50、100 μ mol/L), 孵育 48 h, 收集细胞。用细胞裂解蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品 (100~120 μ g) 经 12% SDS-PAGE 电泳后, 电转至 PVDF 膜, 用含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、120 mmol/L NaCl、0.1%聚山梨酯 20) 37 $^{\circ}$ C, 封闭 1~2 h。加入一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 再加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 4 次。加入 ECL 发光液显影, 用 Gel-Pro 分析软件分析目标蛋白的灰度值。

2.9 S180 肿瘤模型抑瘤分析

小鼠 ip 0.2 mL S180 细胞, 5~9 d 后, 在超净工作台内抽出肿瘤细胞, 加入适量 PBS, 离心弃上清液, 加入 3 倍体积的 PBS 重悬。将 0.2 mL 细胞液注射到小鼠右腋下。继续饲养小鼠 3~4 d, 小鼠右腋有明显硬块则表明肿瘤细胞已在小鼠右腋下生长, 筛选出右腋有明显硬块的小鼠用于实验。

根据前期实验探索, 造模成功的小鼠分为对照组、Tan II_A (30 mg/kg) 组、Api (60 mg/kg) 组、Tan II_A 与 Api 联用组、CTX (20 mg/kg) 组, 每组 6 只。Tan II_A、Api 分别以 25%大豆油水混合物超声溶解, CTX 以超纯水溶解。各给药组小鼠 ig 0.5 mL 相应药物, 1 次/d, 连续 10 d。每天记录各组小鼠体质量。10 d 后, 称定小鼠体质量后处死, 取出肿瘤称定质量并用游标卡尺测量肿瘤大小。测量肿瘤的长和宽, 取平均值作为肿瘤的直径。

$$\text{肿瘤体积} = (\text{瘤长} \times \text{瘤宽}^2) / 2$$

$$\text{肿瘤抑制率} = 1 - \text{药物组肿瘤质量} / \text{对照组肿瘤质量}$$

2.10 统计学分析

各实验组均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性分析用 SPSS 16.0 软件中的 ANOVA 的单因素方差分析。

3 结果

3.1 Tan II_A 与 Api 对细胞增殖的影响

如图 2-A 所示, Tan II_A 和 Api 对 BGC823 细胞的毒性呈剂量相关性增加。给予 Api (200 $\mu\text{mol/L}$), 细胞存活率为 $(45.0 \pm 8.9)\%$; 给予 Tan II_A (100 $\mu\text{mol/L}$), 细胞存活率为 $(46.5 \pm 8.7)\%$; Tan II_A (100 $\mu\text{mol/L}$) 和 Api (200 $\mu\text{mol/L}$) 联用, 细胞存活率为 $(10.6 \pm 1.6)\%$ 。Api (25 $\mu\text{mol/L}$) 与 Tan II_A (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 联用对细胞的毒性与紫杉醇相当。Api、Tan II_A 的 IC₅₀ 分别为 190、102 $\mu\text{mol/L}$; 联用时, Api、Tan II_A 的 IC₅₀ 分别为 25、12.5 $\mu\text{mol/L}$; 联用

后, Api、Tan II_A 的抗肿瘤活性均提高了 8 倍。如图 2-B 所示, Api (25 $\mu\text{mol/L}$) 与 Tan II_A (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 的 CI 值为 0.28。

如图 3 所示, Tan II_A、Api 对 MCF7 细胞的毒性呈剂量相关性增加。给予 Api (50 $\mu\text{mol/L}$), 细胞存活率为 $(72.0 \pm 5.1)\%$; 给予 Tan II_A (25 $\mu\text{mol/L}$), 细胞存活率为 $(39.8 \pm 8.4)\%$; Tan II_A (50 $\mu\text{mol/L}$) 和 Api (25 $\mu\text{mol/L}$) 联用, 细胞存活率下降到 $(14.1 \pm 3.2)\%$ 。Tan II_A (50 $\mu\text{mol/L}$) 和 Api (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 对细胞的毒性与紫杉醇相当。Tan II_A (50 $\mu\text{mol/L}$) 和 Api (25 $\mu\text{mol/L}$) 联用的 CI 值为 0.31。

如图 4 所示, Tan II_A、Api 对 SMMC7721 细胞的毒性呈剂量相关性增加。给予 Api (50 $\mu\text{mol/L}$), 细胞存活率为 $(86.2 \pm 2.3)\%$; 给予 Tan II_A (25

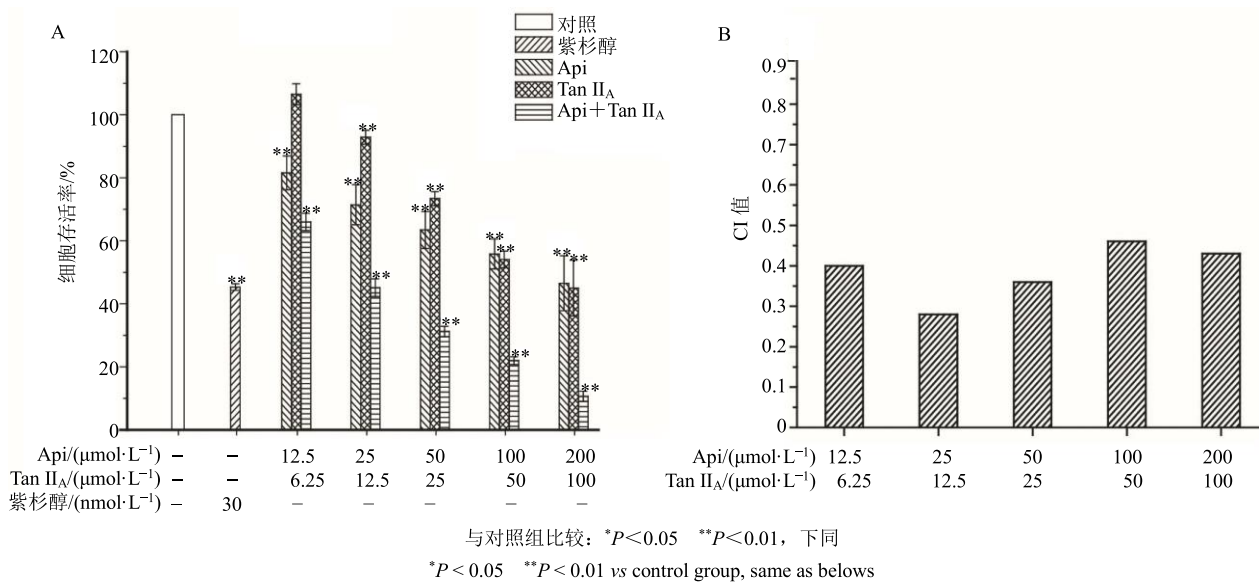


图 2 Api 与 Tan II_A 对 BGC823 细胞增殖的影响 (A) 和 CI 值 (B)

Fig. 2 Effect of Api and Tan II_A on proliferation of BGC823 cells (A) and CI value (B)

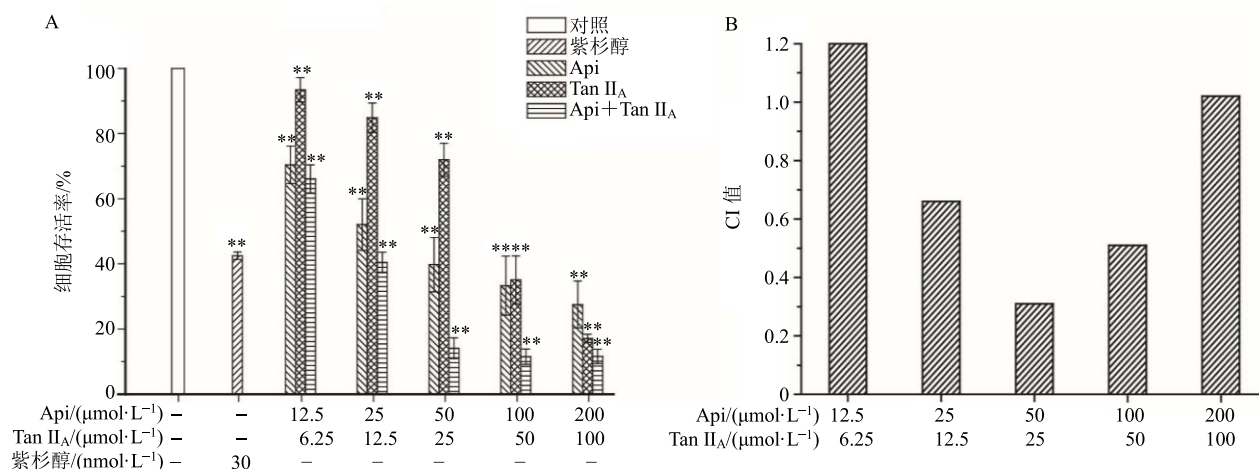
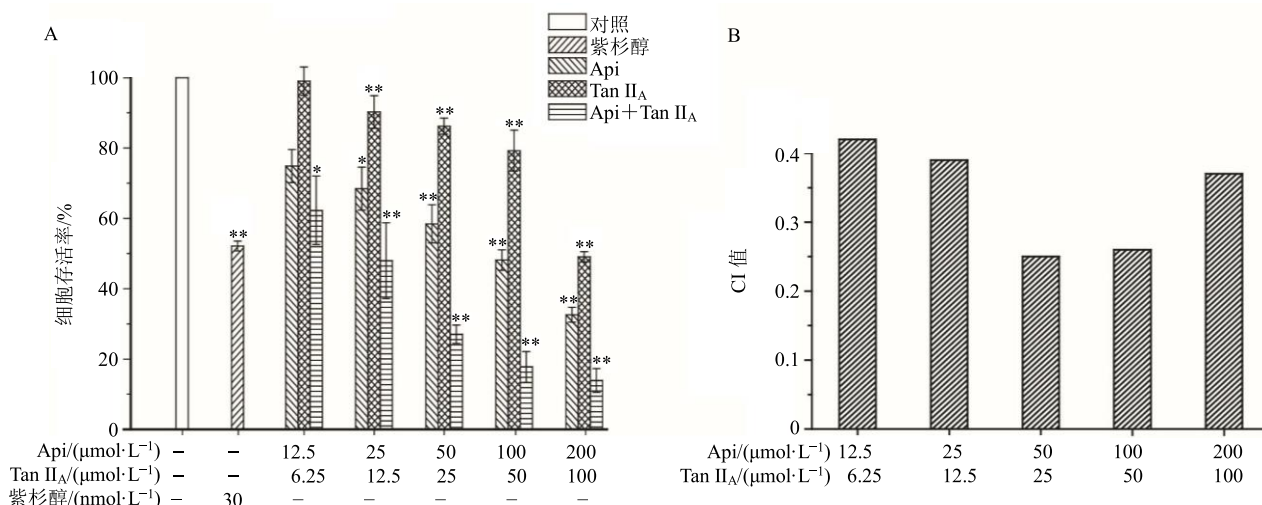


图 3 Api 与 Tan II_A 对 MCF7 细胞增殖的影响 (A) 和 CI 值 (B)

Fig. 3 Effect of Api and Tan II_A on proliferation of MCF7 cells (A) and CI value (B)

图 4 Api 与 Tan II_A 对 SMMC7721 细胞增殖的影响(A) 和 CI 值 (B)Fig. 4 Effect of Api and Tan II_A on proliferation of SMMC7721 cells (A) and CI value (B)

$\mu\text{mol/L}$), 细胞存活率为 $(68.5 \pm 6.1)\%$; Tan II_A ($50 \mu\text{mol/L}$) 和 Api ($25 \mu\text{mol/L}$) 联用, 细胞存活率下降到 $(27.0 \pm 2.6)\%$ 。Tan II_A ($12.5 \mu\text{mol/L}$) 和 Api ($25 \mu\text{mol/L}$) 联用对细胞的毒性与紫杉醇相当。Tan II_A ($25 \mu\text{mol/L}$) 和 Api ($50 \mu\text{mol/L}$) 的 CI 值为 0.25。

上述结果表明, Tan II_A 和 Api 联用对多种肿瘤细胞具有协同抗肿瘤作用。由于 Tan II_A 和 Api 对 3 种细胞协同抗肿瘤的效果差异不大, 后续研究采用 BG823 细胞株为对象。

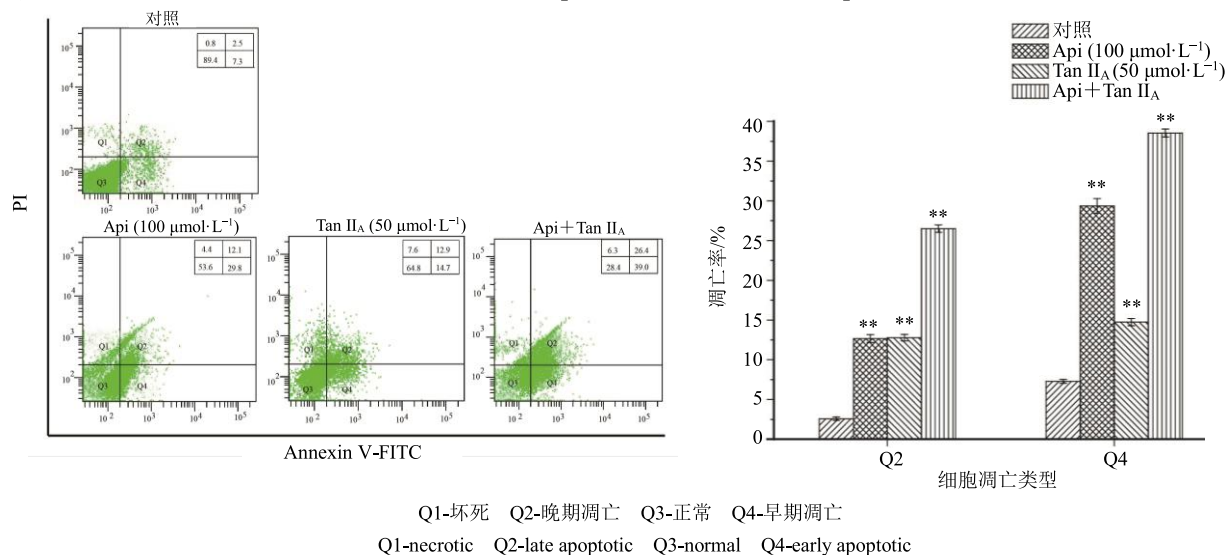
3.2 Tan II_A 与 Api 对 BGC823 细胞凋亡的影响

如图 5 所示, Tan II_A 和 Api 联用时, 细胞早期凋亡率 (Q4) 为 39.0% , 高于 Tan II_A 组 (14.7%) 和 Api 组 (29.8%); 晚期凋亡与早期凋亡率之和 (Q2+Q4) 为 65.4% , 高于 Tan II_A 组 (27.6%) 和 Api 组

(41.9%)。表明与单独给药相比, Tan II_A 和 Api 联用更能促进 BGC823 细胞凋亡。

如图 6-A、B 所示, 与对照组比较, Tan II_A、Api 均显著下调细胞中抗凋亡蛋白 BCL2 表达, 上调促凋亡蛋白 BAX 的表达 ($P < 0.01$); 与单独给药组比较, 联用组 BCL2 蛋白表达显著降低, BAX 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。BCL2/BAX 是启动细胞凋亡的“分子开关”, BCL2/BAX 降低促进细胞凋亡, 升高则细胞凋亡耐受。Tan II_A 和 Api 联用时, BCL2 表达降低, BAX 表达升高, 促进细胞凋亡。

促凋亡蛋白 p53 是 BAX 和 BCL2 的上游调控蛋白, 如图 6-C 所示, 与对照组比较, Tan II_A、Api 均显著升高细胞中 p53 表达 ($P < 0.01$); 与单独给药组比较, 联用组 p53 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。



Q1-坏死 Q2-晚期凋亡 Q3-正常 Q4-早期凋亡
Q1-necrotic Q2-late apoptotic Q3-normal Q4-early apoptotic

图 5 Api 与 Tan II_A 对 BGC823 细胞凋亡的影响Fig. 5 Effect of Api and Tan II_A on apoptosis of BGC823 cells

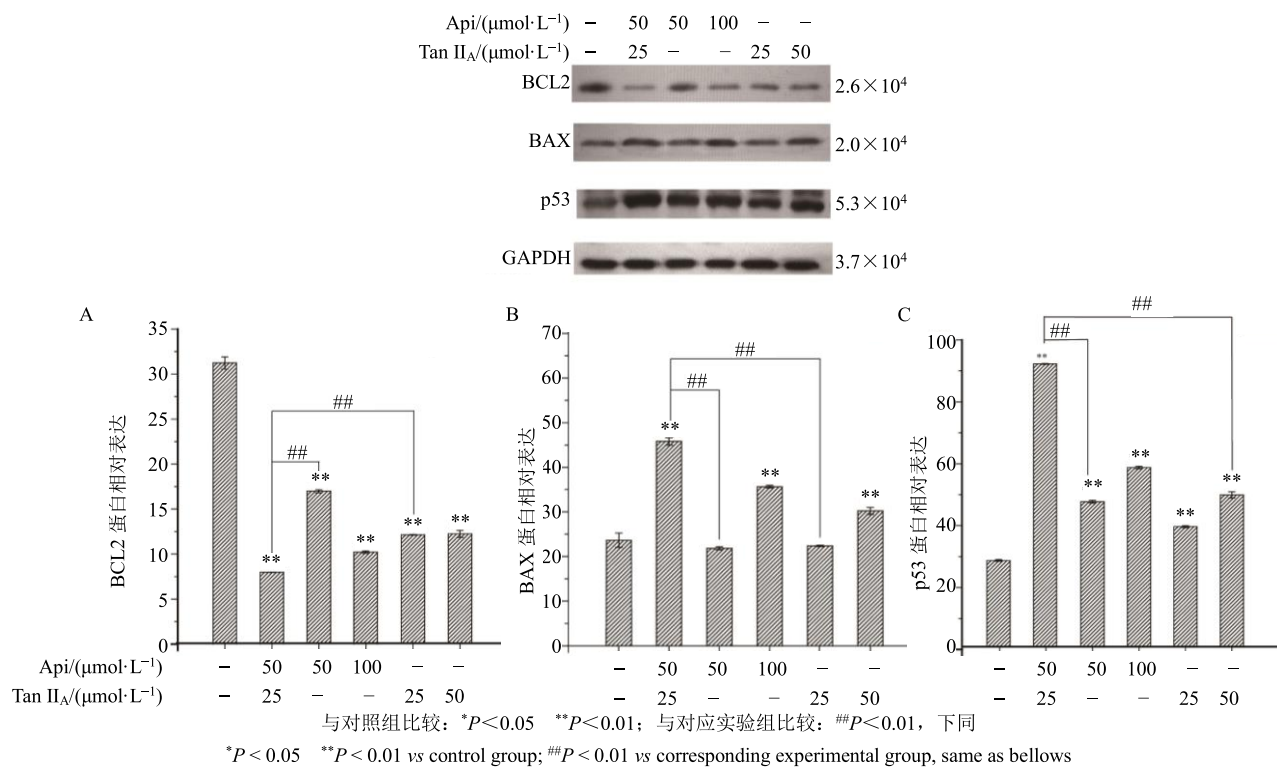


图 6 Api 与 Tan II_A 对 BGC823 细胞 BCL2 (A)、BAX (B) 和 p53 (C) 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of Api and Tan II_A on expressions of BCL2 (A), BAX(B) and p53 (C) protein in BGC823 cells

以上结果表明, Tan II_A 和 Api 存在协同抗肿瘤的作用, 且与 p53 信号通路相关。

3.3 Tan II_A 与 Api 对 BGC823 细胞周期的影响

如图 7 所示, 给予 Tan II_A 24 h 时, 与对照组 (54.17%) 相比, G₁ 期细胞占比为 52.77%, 48 h 时增加至 57.14%, 72 h 时增加至 60.72%; 24 h 时, 与对照组 (9.15%) 相比, G₂/M 期细胞占比为 8.40%, 48 h 时明显下降至 2.90%, 72 h 时未检测到 G₂/M 期细胞; 24、48、72 h 时, S 期细胞占比为 38.83%~39.95%, 与对照组 (36.67%) 相比没有显著变化。上述结果说明 Tan II_A 将细胞周期阻滞在 G₁ 期。

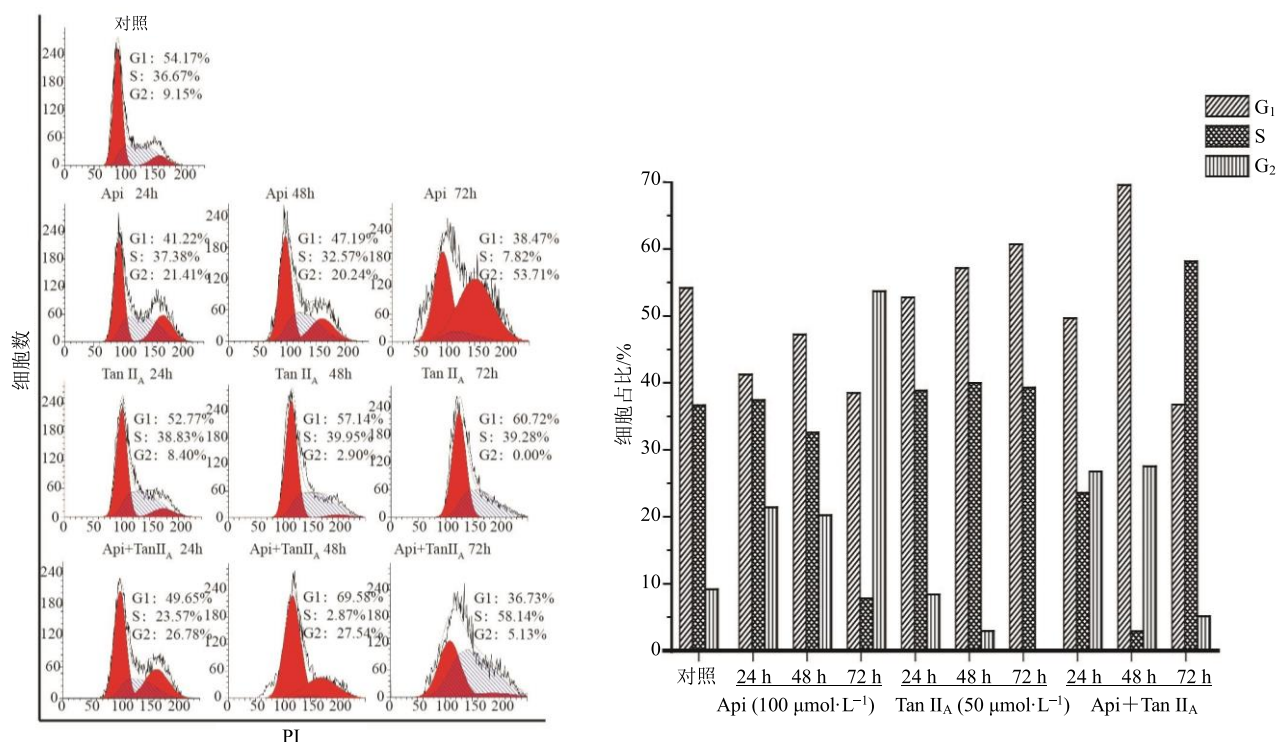
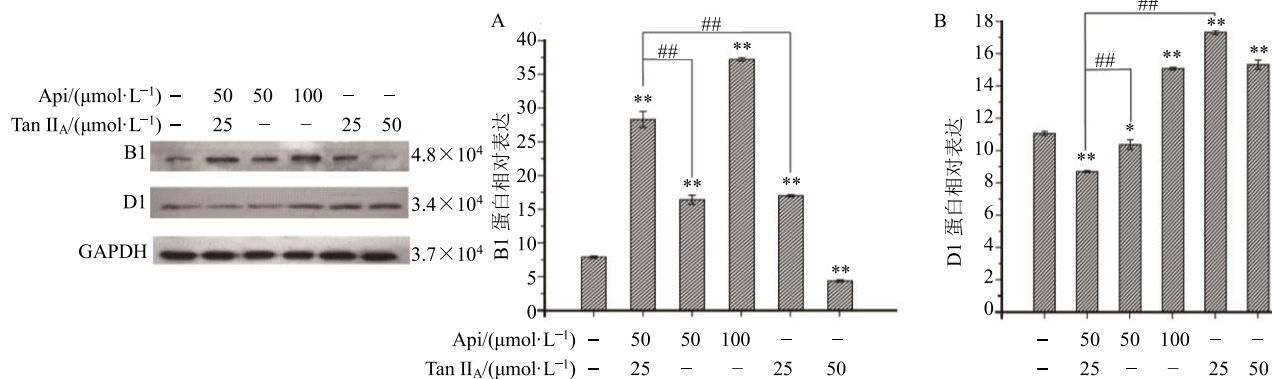
与 Tan II_A 不同, 给予 Api 24 h 时, 与对照组 (54.17%) 比较, G₁ 期细胞占比降至 41.22%, 48 h 上升至 47.19%, 72 h 时降至 38.47%; 24 h 时, 与对照组 (9.15%) 比较, G₂/M 期细胞占比上升至 21.41%, 48 h 时为 20.24%, 72 h 时上升至 53.71%; 24 h 时, S 期细胞占比为 37.38%, 48 h 时降至 32.57%, 72 h 时降至 7.82%。上述结果表明 Api 将细胞周期阻滞在 G₂/M 期。

Tan II_A 与 Api 联用时, 周期阻滞更加复杂。24 h 时, G₁ 期细胞占比从 54.17% 降至 49.56%, S 期细胞占比从 36.67% 降至 23.57%, G₂/M 期细胞从 9.15% 增加至 26.78%, 说明细胞发生了 G₂/M 期阻滞。48 h

时, G₁ 期细胞占比从 49.56% 增加至 69.58%, S 期细胞占比从 23.57% 降低至 2.87%, G₂/M 期细胞 26.78% 上升至 27.54%, 说明细胞在 G₂/M 期的基础上还发生了 G₁ 期阻滞。72 h 时, G₁ 期细胞占比从 69.58% 降低至 36.73%, S 期细胞占比从 2.87% 增加至 58.14%, G₂/M 期细胞从 27.54% 降低至 5.13%, 说明细胞发生了 S 期阻滞。

综上, Tan II_A 将细胞周期阻滞在 G₁ 期; Api 将细胞周期阻滞在 G₂/M 期; Tan II_A 与 Api 联用时, 细胞发生多个检查点的周期阻滞, 24 h 先阻滞于 G₂/M 期, 48 h 阻滞于 G₁ 期和 G₂/M 期, 72 h 阻滞于 S 期。

细胞的细胞周期受到严格的调控, 当细胞周期阻滞时, 周期蛋白水平发生改变。Cyclin B1 参与调控细胞周期从 G₂ 期向 M 期过渡, 细胞进入 M 期后, Cyclin B1 水平减少, 因此当周期阻滞于 G₂/M 期, Cyclin B1 水平增加。Cyclin D1 参与调控细胞周期从 G₁ 期向 S 期过渡, 细胞进入 S 期后, Cyclin D1 水平减少, 因此当周期阻滞在 G₁ 期, Cyclin D1 水平增加。如图 8 所示, Api 单独给药后, 细胞内 Cyclin B1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), 提示细胞发生 G₂/M 期阻滞。Tan II_A 单独给药后, 细胞内 Cyclin D1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), 提示细胞阻滞在 G₁

图 7 Api 与 Tan II_A 给药 24、48、72 h 对 BGC823 细胞周期的影响Fig. 7 Effect of Api and Tan II_A on cell cycle of BGC823 cells at 24, 48, 72 h图 8 Api 和 Tan II_A 对 BGC823 细胞周期蛋白 B1 (A) 和 D1 (B) 表达的影响Fig. 8 Effect of Tan II_A and Api on expressions of cyclin B1 (A) and D1 (B) in BGC823 cells

期。Tan II_A 与 Api 联用 48 h 后,与单独给药组相比,细胞内 Cyclin B1 蛋白表达显著增加, Cyclin D1 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$),提示此时发生了多个检查点的周期阻滞,细胞处于 G₂ 期和 S 期阻滞。

3.4 Tan II_A、Api 与 DNA 的相互作用

p53 是 DNA 损伤的响应元件,为了进一步探讨 Tan II_A 与 Api 的协同机制,采用 CD 光谱法和 DNA 熔点检测来考察 Tan II_A、Api 与 DNA 的相互作用。

如图 9-A 所示,无药物处理时,CT-DNA 呈现典型的 B 型 DNA 图谱;Api 与 DNA 孵育后,在 300~400 nm 产生了诱导圆二色 (ICD) 信号,且信号随 Api 剂量增加而增强,说明 Api 与 CT-DNA 之间产

生了相互作用。通常较强的 ICD 信号表示产生了外部的结合模式 (沟槽结合或外部堆积),较弱的 ICD 信号表示对应嵌入结合模式,嵌插剂的发色团分子长轴与 DNA 碱基对长轴垂直时产生正的 ICD 信号,而嵌插剂发色团分子长轴与 DNA 碱基对长轴平行时产生负的 ICD 信号。

因此,结果表明,随 Api 剂量增加,Api 与 DNA 产生了沟槽结合和外部堆积。如图 9-B 所示, Tan II_A 与 CT-DNA 孵育后,在 276 nm 处信号增强。说明 Tan II_A 与 DNA 结合,改变了 DNA 骨架的碱基堆积结构。如图 9-C 所示,当 Tan II_A、Api 与 DNA 同时孵育时,两种 CD 信号同时显现,说明同时发生

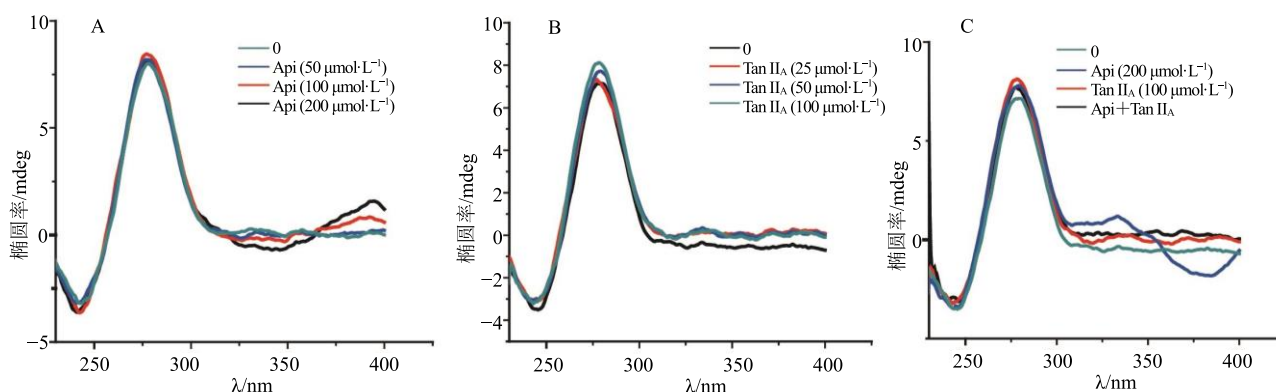


图 9 Api (A)、Tan II_A (B) 及混合物 (C) 对 CT-DNA 结构的影响

Fig. 9 Effects of Api (A), Tan II_A (B) and mixture (C) on structure of CT-DNA

了两种不同方式的结合。两种药物联用时,在 300~400 nm ICD 信号由正转负,提示可能产生了 DNA 嵌入。

如图 10 所示, Tan II_A、Api 与 DNA 结合后热变性曲线发生了明显的变化。Api 与 CT-DNA 结合后热变性曲线上移, Tan II_A 与 CT-DNA 结合后,热变性曲线下移, Tan II_A、Api 混合物与 CT-DNA 结合后,热变性曲线显著下移,说明 Tan II_A、Api 同时与 DNA 结合后,对 DNA 的稳定性产生了更大的改变。

3.5 Tan II_A 与 Api 对荷瘤鼠的作用

如图 11-A 所示,与对照组比较,CTX 组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$), Tan II_A、Api 单独给药和联合给药组小鼠体质量均无显著变化,表明 Tan II_A 与 Api 对小鼠的毒性较低。

如图 11-B~D、表 1 所示, Tan II_A、Api 组肿瘤质量为 (1.93 ± 0.35) 、 (2.22 ± 0.47) g,与对照组 (2.17 ± 0.24) g 相比无显著变化; Tan II_A 与 Api 联

用组肿瘤质量为 (1.35 ± 0.12) g,与对照组相比显著降低 ($P < 0.01$),抑瘤效果优于 CTX 组 (1.79 ± 0.28) g。说明 Tan II_A 与 Api 在小鼠体内可以发挥协同抗肿瘤作用。

4 讨论

遗传物质 DNA 是抗肿瘤药物作用的重要靶点。DNA 结合剂可以干扰 DNA 与蛋白之间的相互作用,并影响 DNA 复制、转录、翻译、修复等一系列生物过程。DNA 结合剂主要包括小沟结合剂、大沟结合剂和 DNA 嵌入剂^[34]。

本研究发现 Tan II_A 与 Api 都能够与 CT-DNA 发生相互作用,但作用的方式不同, Tan II_A 改变了 CT-DNA 的碱基堆积,但没有改变螺旋的结构; Api 以外部结合的方式与 CT-DNA 结合。 Tan II_A 与 Api 联用,改变 CT-DNA 的碱基堆积及外部沟槽结合堆积两种结合同时发生。 Tan II_A 和 Api 都能够影响 CT-DNA 的热变性曲线,两者联合使 CT-DNA 的热变性曲线显著下移。表明 Tan II_A 嵌入 DNA 双螺旋的结构中,改变了双螺旋的碱基堆积; Api 以相对较弱的作用力在外部与 DNA 双螺旋结合;这两种作用力同时出现,改变了 DNA 的稳定性,影响 DNA 复制、转录、翻译、修复等。

细胞周期结果显示, Tan II_A 将细胞阻滞在 G₁、S 期, Api 将细胞阻滞在 G₂/M 期;两种药物联用使细胞周期的阻滞增强,多个细胞检查点上发生周期阻滞。24~72 h,细胞先后发生 G₂/M 期阻滞、G₁ 期和 G₂/M 期阻滞、S 期阻滞。因此,由于 Tan II_A、Api 与 DNA 结合,干扰 DNA 的转录、复制等,使细胞无法增殖,从而诱导肿瘤细胞凋亡。

本研究发现 Tan II_A 和 Api 联用对 BGC823、MCF7、SMMC7721 细胞都具有显著的协同抗肿瘤作

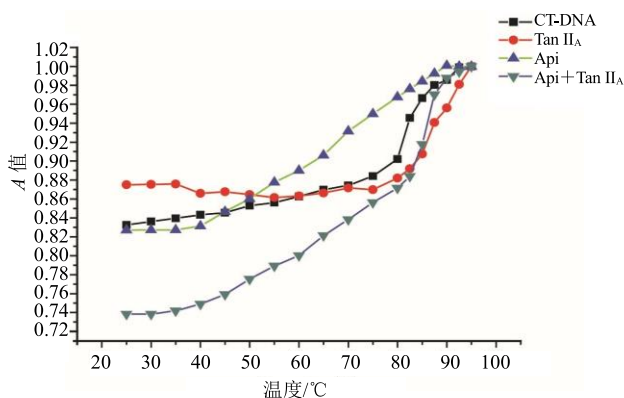


图 10 Api 与 Tan II_A 对 CT-DNA 热变性曲线的影响

Fig. 10 Effect of Api and Tan II_A on curves of thermal denaturation of CT-DNA

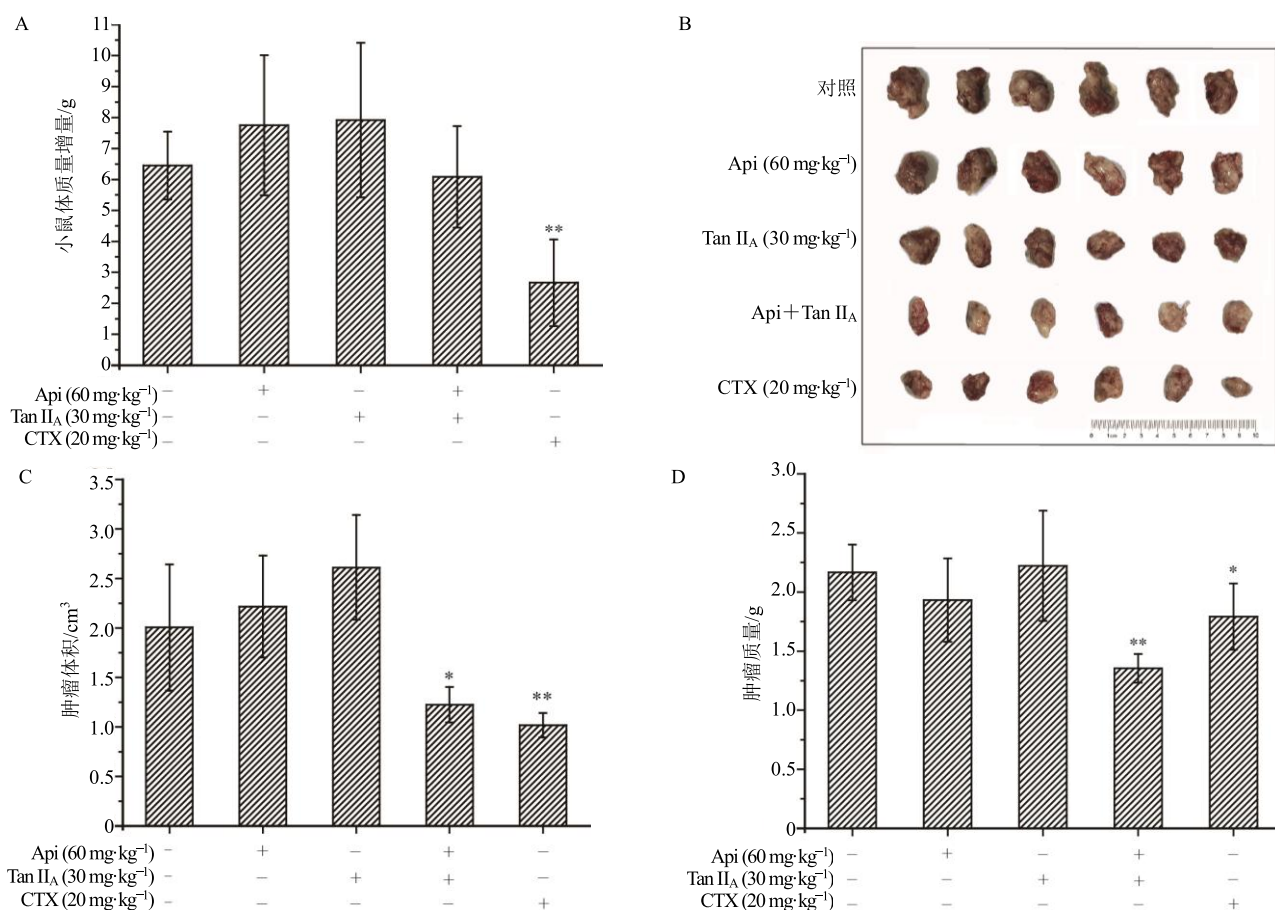


图 11 Api 与 Tan II_A 对荷瘤鼠体重 (A)、肿瘤外观 (B)、肿瘤体积 (C)、肿瘤质量 (D) 的影响

Fig. 11 Effect of Api and Tan II_A on body weight (A), tumor appearance (B), tumor volume (C), and tumor weight (D) in mice

表 1 Api 与 Tan II_A 对荷瘤鼠肿瘤的抑制率

Table 1 Inhibition rates of mice tumor after treated with Tan II_A and Api

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤质量/g	抑制率/%
对照	—	2.17 ± 0.24	—
Api	60	2.22 ± 0.47	-2.4
Tan II _A	30	1.93 ± 0.35	11.0
Api + Tan II _A	60+30	1.35 ± 0.12	37.6
CTX	20	1.79 ± 0.28	17.4

用, 并且 Api (25 μmol/L) 与 Tan II_A (12.5 μmol/L) 联用的细胞毒性与紫杉醇 (30 nmol/L) 相当。S180 荷瘤鼠的抑瘤实验证实了 Tan II_A 与 Api 的协同抗肿瘤作用, 与 CTX 相比, 抑瘤效果更优、不良反应更小。

肿瘤是典型的内生性疾病, 致病基因和靶点复杂。单一靶点的化学药物, 很难解决问题, 并且肿瘤细胞的变异也会造成耐药性问题。因此, 抗肿瘤药物设计、筛选时, 多靶点协同作用可解决药物有效性、耐药性、不良反应的问题。

Tan II_A 与 Api 作为中草药的有效活性成分, 均具有一定的抗肿瘤作用, 但因为抗肿瘤效果不强和成药性等问题无法应用于临床。本研究利用 Tan II_A

与 Api 的协同作用机制, 通过联合给药增强了抗肿瘤的功效, 降低了不良反应, 为开发低毒、高效的抗肿瘤辅助用药提供理论支持, 也为中药现代化提供了方向。

参考文献

- [1] Xu Y M, Xin Y Q, Diao Y, *et al.* Synergistic effects of apigenin and paclitaxel on apoptosis of cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29169.
- [2] Tian X Y, Liu L. Drug discovery enters a new era with multi-target intervention strategy [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(7): 539-542.
- [3] Merzenich U, Sigrid G. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products: Potential and challenges for drug development [J]. *Synergy*, 2014, 1(1): 59-69.
- [4] He J, Ning C W, Wang Y, *et al.* Natural plant flavonoid apigenin directly disrupts Hsp90/Cdc37 complex and inhibits pancreatic cancer cell growth and migration [J]. *J Funct Foods*, 2015, 18: 10-21.
- [5] Wang Y, Xu Y S, Yin L H, *et al.* Synergistic anti-glioma effect of hydroxygenkwanin and apigenin *in vitro* [J]. *Chem-Biol Interact*, 2013, 206(2): 346-355.
- [6] Shukla S., Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53

- activation [J]. *Free Radical Bio Med*, 2008, 44(10): 1833-1845.
- [7] Wu D G, Yu P, Li J W, *et al.* Apigenin potentiates the growth inhibitory effects by IKK- β -mediated NF- κ B activation in pancreatic cancer cells [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(1): 157-164.
- [8] Li C H, Lin D L, Fu X Q, *et al.* Apigenin up-regulates transgelin and inhibits invasion and migration of colorectal cancer through decreased phosphorylation of AKT [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(10): 1766-1775.
- [9] Choi E J, Kim G H. Apigenin causes G₂/M arrest associated with the modulation of p21Cip1 and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(4): 285-290.
- [10] Li Z D, Hu X W, Wang Y T, *et al.* Apigenin inhibits proliferation of ovarian cancer A2780 cells through Id1 [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(12): 1999-2003.
- [11] Zheng P W, Chiang L C, Lin C C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells [J]. *Life Sci*, 2005, 76(12): 1367-1379.
- [12] Valdameri G, Trombetta-Lima M, Worfel P R, *et al.* Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 193(2): 180-189.
- [13] Bruno A, Siena L, Gerbino S, *et al.* Apigenin affects leptin/leptin receptor pathway and induces cell apoptosis in lung adenocarcinoma cell line [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(13): 2042-2051.
- [14] Banerjee K, Mandal M. Oxidative stress triggered by naturally occurring flavone apigenin results in senescence and chemotherapeutic effect in human colorectal cancer cells [J]. *Redox Biol*, 2015, 5: 153-162.
- [15] Harrison M E, Power Coombs M R, Delaney L M, *et al.* Exposure of breast cancer cells to a subcytotoxic dose of apigenin causes growth inhibition, oxidative stress, and hypophosphorylation of Akt [J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(2): 211-217.
- [16] King J C, Lu Q Y, Li G, *et al.* Evidence for activation of mutated p53 by apigenin in human pancreatic cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2): 593-604.
- [17] King J C, Li A, Reber H A, *et al.* Apigenin induces pancreatic cancer cell apoptosis by a P53-mediated mechanism [J]. *J Surg Res*, 2010, 158(2):393.
- [18] Li C H, Lin D L, Fu X Q, *et al.* Apigenin up-regulates transgelin and inhibits invasion and migration of colorectal cancer through decreased phosphorylation of AKT [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(10): 1766-1775.
- [19] Lee W J, Chen W K, Wang C J, *et al.* Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 226(2): 178-191.
- [20] Zhang S, Sun X, Kong R, *et al.* Studies on the interaction of apigenin with calf thymus DNA by spectroscopic methods [J]. *Spectrochim Acta A*, 2015, 136(136PC): 1666-1670.
- [21] Gao S, Liu Z P, Li H, *et al.* Corrigendum to: Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone II_A [Atherosclerosis 220 (2012) 3-10] [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 604.
- [22] Xu S W, Liu P Q. Tanshinone II-A: New perspectives for old remedies [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23(2): 149-153.
- [23] Lin C Y, Wang L, Wang H, *et al.* Tanshinone II_A inhibits breast cancer stem cells growth *in vitro* and *in vivo* through attenuation of IL-6/STAT3/NF- κ B signaling pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(9): 2061-2070.
- [24] Yu T, Zhou Z C, Mu Y G, *et al.* A novel anti-cancer agent, acetyltanshinone II_A, inhibits oestrogen receptor positive breast cancer cell growth by down-regulating the oestrogen receptor [J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(1): 94-103.
- [25] Chiu S C, Huang S Y, Chen S P, *et al.* Tanshinone II_A inhibits human prostate cancer cells growth by induction of endoplasmic reticulum stress *in vitro* and *in vivo* [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013, 16(4): 315-322.
- [26] Su C C, Chen G W, Kang J C, *et al.* Growth inhibition and apoptosis induction by tanshinone II_A in human colon adenocarcinoma cells [J]. *Planta Med*, 2008, 74(11): 1357-1362.
- [27] Yuan S L, Wei Y Q, Wang X J, *et al.* Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(14): 2024-2028.
- [28] Li Q, Wang Y, Feng N P, *et al.* Novel polymeric nanoparticles containing tanshinone II_A for the treatment of hepatoma [J]. *J Drug Target*, 2008, 16(10): 725-732.
- [29] Xie J, Liu J H, Liu H, *et al.* The antitumor effect of tanshinone II_A on anti-proliferation and decreasing VEGF/VEGFR2 expression on the human non-small cell lung cancer A549 cell line [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(6): 554-563.
- [30] Su. Tanshinone II_A may inhibit the growth of small cell lung cancer H146 cells by up-regulating the Bax/Bcl-2 ratio and decreasing mitochondrial membrane potential [J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(4): 645-650.
- [31] Jang S I, Kim H J, Kim Y J, *et al.* Tanshinone II_A inhibits LPS-induced NF- κ B activation in RAW 264.7 cells: Possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 542(1/2/3): 1-7.
- [32] Zhang Z C, Gao J, Wang Y Y, *et al.* Tanshinone II_A triggers p53 responses and apoptosis by RNA polymerase II upon DNA minor groove binding [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(10): 1316-1322.
- [33] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 621-681.
- [34] Sheng J, Gan J H, Huang Z. Structure-based DNA-targeting strategies with small molecule ligands for drug discovery [J]. *Med Res Rev*, 2013, 33(5): 1119-1173.