

丹酚酸 A 诱导 HepG2 细胞凋亡及抑制 c-Met 表达

唐志华, 丁洁卫, 肖幸丰(绍兴市人民医院·浙江大学绍兴医院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 目的 通过研究丹酚酸 A(salvianol acid A, SalA)对肝癌 HepG2 细胞株 c-Met 蛋白表达的影响, 探讨 SalA 抑制肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡的可能作用机制。方法 以肝癌 HepG2 细胞株为研究对象, 采用 MTT 法及流式细胞术检测 SalA 作用后细胞存活、增殖及凋亡情况; 同时运用 Western blot 法及 PCR 法检测 HepG2 细胞 c-Met 及其下游信号通路中关键蛋白和基因表达的改变。结果 肝癌 HepG2 细胞经 SalA 处理后, 其细胞增殖显著抑制, 细胞凋亡比例亦升高, 且呈浓度依赖性; 同时 HepG2 细胞中 c-Met 及其下游信号分子 AKT 的磷酸化水平显著下调, 凋亡相关蛋白 Bax、caspase-3 和 caspase-9 的表达亦明显上调。结论 SalA 能有效抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖并诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与其抑制 HepG2 细胞中 c-Met 蛋白及其下游信号通路中 AKT 蛋白的磷酸化水平有关。

关键词: 丹酚酸 A; 肝癌 HepG2 细胞; c-Met; 细胞凋亡

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)05-0537-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.005

Salvianolic Acid A Induces Apoptosis and Inhibits the C-Met Expression in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Line

TANG Zhihua, DING Jiewei, XIAO Xingfeng(Shaoxing People's Hospital, Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Shaoxing 312000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of salvianol acid A (SalA) on the protein expression of proto-oncogene c-Met in human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line, and explore the potential mechanism of the anti-proliferation and induce-apoptosis effects of SalA on HepG2 cells. **METHODS** MTT and Flow cytometry methods were used to analyze the anti-proliferation and induce-apoptosis effects of SalA on HepG2 cells. Western blotting and PCR methods were used to analyze the mRNA and protein expression of c-Met and the downstream proteins. **RESULTS** SalA could effectively inhibit the proliferation of HepG2 cells *in vitro*, and induce the cell apoptosis. The inhibitory effect was in a dose and incubation time dependent manner. The protein expression and the tyrosine kinase activity of proto-oncogene c-Met and the downstream signal protein AKT were decreased significantly in HepG2 cells after treatment with SalA. The expression of apoptosis-related proteins (Bax, caspase-3 and caspase-9) could also be inhibited significantly. **CONCLUSION** SalA can inhibit the proliferation of HepG2 cells and the mechanism may be related with inhibiting the activation of proto-oncogene c-Met and the downstream protein AKT, which triggering the cells apoptosis.

KEY WORDS: salvianol acid A; HepG2 cells; c-Met; cell apoptosis

丹参(*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*)为唇型科植物丹参(*Salviae miltiorrhiza* Bge.)的干燥根及根茎^[1], 目前临床上广泛用于冠心病的治疗。丹酚酸 A(salvianol acid A, SalA)属酚酸类化合物, 是从丹参中提取的一种水溶性成分^[2]。前期研究表明, SalA 能有效抑制部分肿瘤细胞的增殖, 但其机制尚未完全明确^[3-5]。原癌基因 c-Met 在肝癌等多种肿瘤组织中表达存在异常, 且 c-Met 作为肿瘤信号网络中的节点蛋白, 能通过多条信号通路广泛参与肿瘤细胞生物学功能调控^[6]。本课题组前期研究中检测和筛选了多个原癌基因发现,

SalA 能有效抑制 HepG2 细胞中 c-Met 蛋白的表达。因此本实验通过研究 SalA 对肝癌 HepG2 细胞 c-Met 基因表达的影响, 进一步分析其对 c-Met 下游信号通路的作用, 明确 SalA 抑制 HepG2 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡的机制, 为促进 SalA 的临床应用提供实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞株(中科院上海细胞所); SalA (上海友思生物技术有限公司, 批号: 100118, 含量: 98.5%)用 DMEM 培养基稀释成所需浓度的

无菌工作液。DMEM 培养基(Gibco);小牛血清(杭州四季青生物技术研究所);所需抗体(Santa Cruz);AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Biovision 公司,批号:MS160108);PI 试剂盒(Sigma 公司,批号:P4170);硝酸纤维膜(Millipore);M-MLV 和 Taq 酶(MBI);Trizol(上海生工)。

1.2 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞培养于含 10%小牛血清的 DMEM 培养基中,青霉素($100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$),链霉素($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT 法检测细胞增殖情况

取对数生长期的 HepG2 细胞,调整细胞浓度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔板,用不同浓度的 SalA 分别作用 12, 24, 48 h,采用 MTT 法,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值。细胞增殖率=(实验组 A570 nm/对照组 A570 nm) $\times 100\%$ 。根据正规机率单位法,利用 SPSS 统计软件分析计算 SalA 对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。收集对数生长期细胞,以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中,分别给予不同浓度的 SalA 作用 24 h 后,弃培养基, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 洗涤 2 次, $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心,以 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度重悬细胞于 100 μL 的 $1\times$ 结合缓冲液中,加入 5 μL Annexin V 和 10 μL PI 染液,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,再加入 300 μL 上述缓冲液,于 1 h 内置 FACS Vantage 型流式细胞仪检测。Annexin V(+)/PI(-)为凋亡细胞,双染色阳性为坏死细胞或凋亡晚期细胞。

1.5 Western-blot 蛋白质印迹法

用 RIPA 缓冲液[50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH8.0), 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, 0.1% SDS, 1%脱氧胆酸钠, 1% Triton-X100, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF 和 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Leupeptin]裂解细胞,离心提取总蛋白。用 Bradford 法测定各组蛋白浓度。经 12% SDS-PAGE 电泳后,蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上。膜分别用含 5%脱脂奶粉的 TTBS [10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris(pH 7.5), 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, 0.1%吐温 20]室温封闭 1 h;目标蛋白和 β -Actin 的

一抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 1 h。经 TTBS 洗膜后采用 ECL 法检测目标蛋白和 β -Actin 的蛋白条带。 β -Actin 的表达量作为内参。

1.6 RT-PCR 分析

按 Trizol RNA 提取试剂盒的说明,提取总 RNA。用 DNA/RNA 紫外检测仪测定其含量和纯度。按实验室常规操作,在 MMLV 逆转录酶作用下,制备 cDNA。在 Taq 酶作用下,进行扩增。扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 70 s, 30 个循环。所得的扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 100 V 25 min。凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)成像,用 Quantity One 软件定量分析产物条带的光密度,以 GAPDH 条带的光密度作为内参。实验所用 c-Met 的引物序列为: 5'-TCTTGGGACATCAGAGGGTC-3'(正向引物)和 5'-TGACTGCAGGACTGGAAATG-3'(反向引物)^[7];内参 GAPDH 的引物序列为 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'(正向引物)和 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT-3'(反向引物)。引物均委托上海生工公司合成。

1.7 数据统计分析

所有实验都重复 3 次,实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 15.0 统计程序,以 Dunnett's *t* 检验分析样本均数间显著性差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SalA 抑制 HepG2 细胞增殖并诱导细胞凋亡

MTT 实验分析表明,SalA 作用 12, 24, 48 h 后,其对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值分别为 72.5, 63.2, 31.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时,采用 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪定量检测凋亡结果显示,经 SalA 作用 24 h 后, HepG2 细胞的凋亡率亦随着药物浓度的增加而升高。结果见图 1。

2.2 SalA 抑制 c-Met mRNA 的转录

采用 RT-PCR 法结合 Quantity One 分析软件对 SalA 处理后各组 HepG2 细胞 c-Met mRNA 转录水平进行比较发现: 40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SalA 作用 24 h 后均能显著抑制 c-Met mRNA 的表达,与对照组比较, c-Met mRNA 表达量分别下降了 35.7%和 48.4%($P<0.05$),结果见图 2。

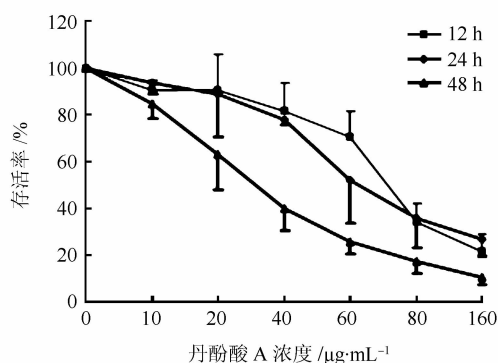


图1 SalA 抑制 HepG2 细胞的增殖并诱导细胞凋亡效果

Fig 1 The anti-proliferation and induce-apoptosis effects of SalA on HepG2 cell lines

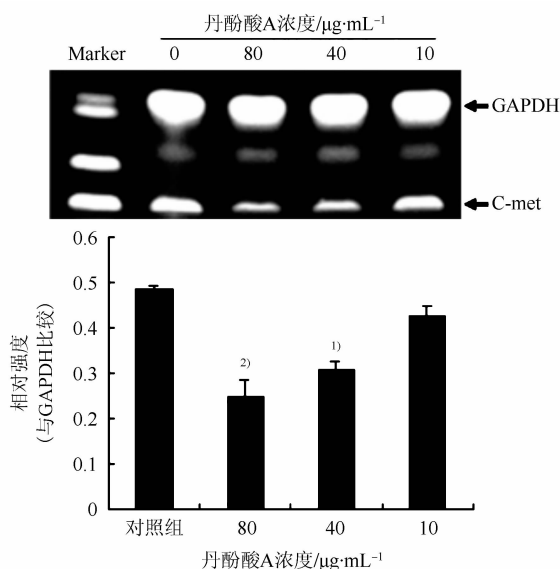
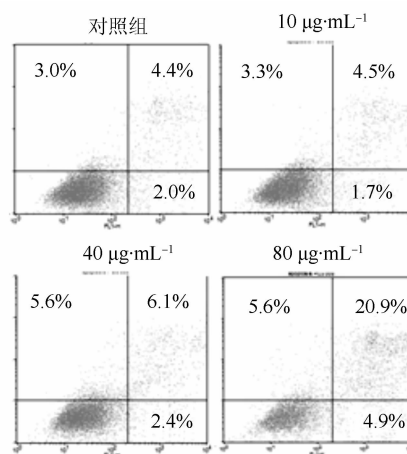


图2 SalA 抑制 HepG2 细胞 c-Met mRNA 转录效果与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Fig 2 Inhibitory effect of SalA on c-Met mRNA expression in HepG2 cells

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

2.3 SalA 抑制 c-Met 蛋白表达和磷酸化水平

不同浓度 SalA 处理 HepG2 细胞后,用 Western blot 法结合 Quantity One 光密度分析软件定量分析细胞内原癌基因 c-Met 蛋白的表达量及磷酸化水平改变,结果发现 10, 20, 40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SalA 作用 HepG2 细胞 24 h 后,细胞原癌基因 c-Met 蛋白的表达量分别下降 3.6%, 27.1%, 37.6% 和 49.5%; c-Met 磷酸化水平亦分别降低 7.2%, 17.3%, 28.6% 和 68.5%。40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SalA 能显著抑制 HepG2 细胞 c-Met 蛋白的表达量及磷酸化水平

($P<0.05$), 结果见图 3。

2.4 SalA 抑制下游信号蛋白 AKT 的磷酸化水平

SalA 处理 HepG2 细胞 24 h 后,对 c-Met 调控的下游信号通路中关键蛋白的研究发现,40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SalA 作用后,PI3K/AKT 通路中 AKT 蛋白的磷酸化水平分别下降了 34.7% 和 58.6% ($P<0.05$), 结果见图 3。

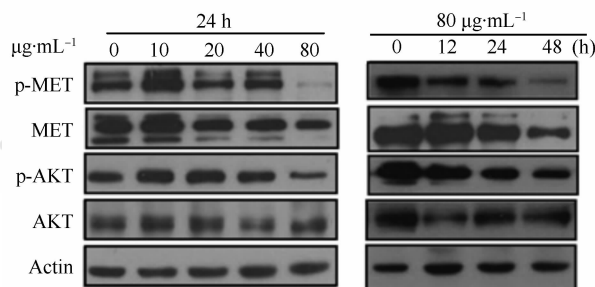


图3 SalA 抑制 HepG2 细胞 c-Met 蛋白表达和磷酸化水平以及下游信号蛋白 AKT 的磷酸化水平

Fig 3 SalA inhibits the protein expression and the tyrosine kinase activity of proto-oncogene c-Met and the tyrosine kinase activity of the downstream signal factor AKT

2.5 SalA 对凋亡相关蛋白的影响

采用 Western blot 法进一步分析 HepG2 细胞经 SalA 作用后对细胞凋亡相关蛋白表达的改变。结果显示,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SalA 作用 24 h 后, Bax、caspase-3 以及 caspase-9 蛋白的表达水平分别升高 2.81, 2.83 和 3.32 倍,而 Bcl-2 蛋白的表达则下降 41.7% ($P<0.05$)。同时,上述蛋白的表达水平均随着 SalA 浓度的增加而变化,呈现浓度依赖性,结果见图 4。

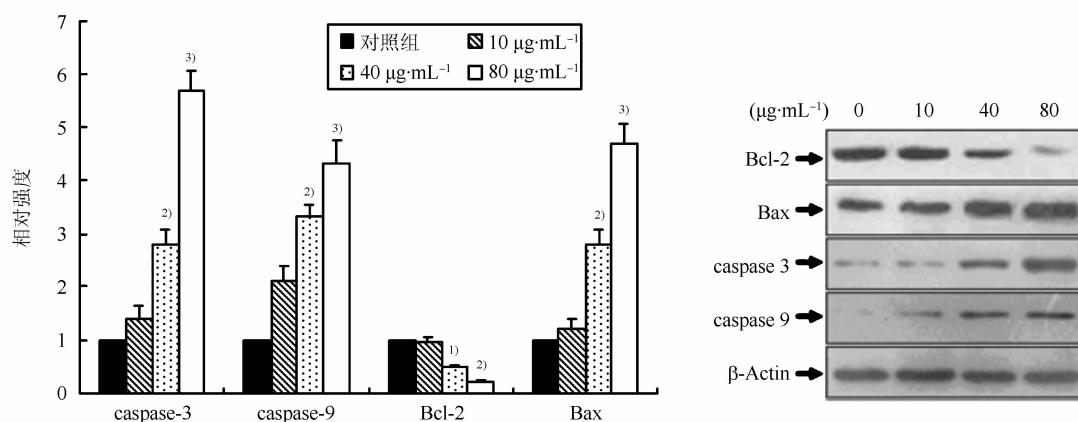


图4 SalA对HepG2细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$

Fig 4 SalA modulates the expression of apoptosis-related proteins in HepG2 cells

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$

3 讨论

原癌基因 *c-Met* 是肝细胞生长因子/离散因子 (hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF) 的受体, 具有酪氨酸激酶活性。在肺癌、结肠癌、肝癌、直肠癌、胃癌、卵巢癌、肾癌、神经胶质瘤、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌等肿瘤组织中广泛存在异常^[6], 主要表现为: ①*c-Met* 过表达导致其信号过度放大; ②*c-Met* 过表达导致自身构象改变, 在无肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 激活的情况下, *c-Met* 仍表现出自发的持续性激活; ③*c-Met* 表达正常, 但是自分泌或旁分泌的 HGF 过度激活 *c-Met*; ④*c-Met* 发生基因突变, 在无 HGF 的情况下仍表现出持续激活^[8]。作为肿瘤信号网络中的节点蛋白, *c-Met* 通过多条信号通路广泛参与肿瘤细胞生物学功能调控。*c-Met* 被激活后, 首先 *c-Met* 靠近胞内区的 4 个磷酸化位点的酪氨酸残基发生自身磷酸化, 募集下游的 Gab-1, Grb-2, Shc 和 c-Cbl 等衔接蛋白, 接着通过一系列的磷酸化反应活化 PI3K, ERK1/2, PLC- γ , STAT 和 FAK 等重要的信号分子及相应的信号通路, 从而调节肿瘤细胞的增殖、分化、形态改变和侵袭运动等。由于 *c-Met* 是导致肿瘤形成及转移的许多通路的交叉点, 因而, 以 *c-Met* 为靶标可相对较容易地实现对许多通路的同时干扰, 以实现细胞形态改变、增殖减缓、成瘤性降低、侵袭能力下降等一系列的变化。因而, *c-Met* 已成为抗肿瘤治疗的一个极有希望的新靶点^[6]。

前期研究表明 SalA 用于抗肿瘤作用, 主要是

与各种抗癌药联合使用, 起到增效减毒的作用^[9-10]。而毕蕾等研究表明 SalA 具有抑制肺癌细胞 A549 增殖的作用, 其作用机制可能与 SalA 能有效抑制 PTEN-PI3K/AKT 信号通路中 P-AKT 蛋白的表达, 促进 PTEN 蛋白及 T-AKT 蛋白的表达有关^[3]。在对肝癌 HepG2 细胞的研究中同样发现其抑制增殖诱导凋亡的效应, 并发现其作用机制可能与 SalA 降低 HepG2 细胞线粒体跨膜电位有关^[4]。而王昕等^[5]研究发现 SalA 对人肺腺癌细胞 LTP 的迁移也具有抑制作用, 可能与抑制 ERK 信号通路有关。上述研究结果提示, SalA 除了辅助化疗作用以外, 本身亦具有一定的抑制肿瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡的作用。

而本研究从 *c-Met* 这一肿瘤信号网络中的节点蛋白入手, 分析了 SalA 在调节 *c-Met* 蛋白表达和磷酸化水平中的作用, 以及对下游信号通路的影响。结果表明, Sal-A 能显著抑制 HepG-2 细胞增殖, 并诱导细胞凋亡, 呈现一定程度的剂量依赖性。其作用机制可能是通过抑制 HepG-2 细胞内 *c-Met* 基因转录和蛋白表达, 进而降低 *c-Met* 下游信号通路 PI3K/AKT 中 AKT 蛋白的磷酸化水平, 并抑制凋亡相关蛋白 Bax、caspase-3 和 caspase-9 的表达所致。当然, 关于 SalA 抑制 *c-Met* 后对细胞表面其他受体如 EGFR、Plexin B、CD44 等的影响如何, *c-Met* 抑制后是否存在多条信号通路的抑制以及 SalA 对 *c-Met* 抑制效应是否存在肝细胞生长因子的参与等问题, 都有待于进一步深入研究和探讨。

REFERENCES

- [1] LIANG X, BAI M, YAN X, et al. External curative effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* decoction on skin wounds [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(5): 486-490.
- [2] LI Z G, NI G C, SUN X W, et al. Determination of the residual organic solvents in salvianolic acid A by GC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(1): 59-61.
- [3] BI L, CHEN W P, CHEN J P, et al. Effects of salvianolic acid A on inhibition of human lung cancer cells by regulating PTEN-PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*(南京中医药大学学报), 2012, 28(6): 541-543.
- [4] BI L, CHEN W P, JIANG Z Q, et al. Effect of salvianolic acid A on mitochondrial transmembrane potential of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2012, 27(4): 1171-1173.
- [5] WANG X, TIAN Y, YAN X Y, et al. Inhibitory effect of salvianolic acid A on migration of LTPC cells via ERK signaling [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2011, 33(12): 2059-2061.
- [6] YOU H, DING W, DANG H, et al. c-Met represents a potential therapeutic target for personalized treatment in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 879-889.
- [7] ZHANG Y M, ZHANG X Y, LIU L L, et al. Detection of expressions of HGF mRNA and c-Met mRNA in cervical carcinoma with QRT-PCR method [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci*(西安交通大学学报 医学版), 2011, 32(2): 234-237.
- [8] BIRCHMEIER C, BIRCHMEIER W, GHERARDI E, et al. Met, metastasis, motility and more [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(12): 915-925.
- [9] ZHANG S H, SU J, ZHEN Y S. Salvianolic acid A inhibits nucleoside transport and potentiates the antitumor activity of chemotherapeutic drugs [J]. *Acta Pharm Sin*(药理学学报), 2004, 39(7): 496-499.
- [10] PAN Y F, ZHANG J B, DING J, et al. Pharmacological research progress of salvianolic acid A [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*(中国中医药科技), 2008, 15(4): 294-295.

收稿日期: 2013-08-28

乌灵菌粉化学成分研究

陆静娴¹, 罗镭¹, 陈勇¹, 陈建², 祝明^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004; 2.浙江佐力药业股份有限公司, 浙江湖州 313299)

摘要: 目的 对乌灵菌粉的化学成分进行研究。方法 采用硅胶柱层析、制备液相等多种分离手段, 对乌灵菌粉中石油醚、乙酸乙酯部分进行提取、分离、纯化, 通过核磁数据进行结构鉴定。结果 分离并鉴定 4 个化合物, 分别为: 5-hydroxymellein(1)、5-carboxymellein(2)、金雀异黄素(3)和 5-methylmellein(4)。结论 化合物 2, 3, 4 为首次从乌灵菌粉提取分离得到; 化合物 1, 2, 4 为乌灵菌粉的特征性成分。

关键词: 乌灵菌粉; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)05-0541-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.006

Chemical Constituents of Wuling Fermentative Powder

LU Jingxian¹, LUO Lei¹, CHEN Yong¹, CHEN Jian², ZHU Ming^{1*} (1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2. Zhejiang Jolly Pharmaceutical Co. Ltd., Huzhou 313299, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the chemical constituents of Wuling fermentative powder. **METHODS** Four components were extracted, separated and purified from the parts of petroleum and acetic ether by the means of silica gel column chromatography and preparative HPLC methods, and identified by NMR data. **RESULTS** The four compounds were elucidated as: 5-hydroxymellein(1), 5-carboxymellein(2), genistein(3) and 5-methylmellein(4). **CONCLUSION** The later three components are obtained for the first time from Wuling Fermentative powder. 1, 2 and 4 are the characteristic components in Wuling Fermentative powder.

KEY WORDS: Wuling fermentative powder; chemical constituents

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项(2012ZX09304005)

作者简介: 陆静娴, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)864594225
任中药师 Tel: (0571)86734991 E-mail: zhumingd@hotmail.com

E-mail: lujingxian1984@gmail.com

*通信作者: 祝明, 女, 主