

模型组血清中 TNF- α 较空白组显著升高,说明模型组有显著炎症症状, TNF- α 参与了溃疡的发展过程,是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎症介质,使血管内皮细胞通透性增加,调节其他组织代谢活性并促使其他细胞因子的合成和释放^[6],并且 TNF- α 升高程度与口腔溃疡的严重程度呈正相关。用药各组的 TNF- α 逐渐下降,说明用药组炎症得到不同程度控制。模型组血清中 IL-6 较空白组也显著升高,提示促炎细胞因子 IL-6 参与免疫应答,是炎症反应的促发剂,使细胞免疫功能紊乱。IL-6 可能是反映疾病活动状态或许还有预后作用的临床指标^[7]。模型组血清中 VEGF 较空白组显著升高,与溃疡局部症状呈正相关,表明炎症形成过程中分泌较多的 VEGF^[8],它可能是促进溃疡愈合的修复因子,起到关键性作用,并随着症状的减轻,其表达也随之下调,相反,其表达越高,预示着口腔溃疡创面的损伤越严重^[9]。从实验结果来看,高剂量 APE 外用组和桂林西瓜霜组的治疗效果没有差异,说明 APE 有显著抗炎,调控细胞因子作用。

口腔溃疡面积变化和溃疡黏膜局部充血水肿程度变化可直观反映溃疡病理损伤情况,血清中 TNF- α 、IL-6 可直接反映口腔溃疡炎症介质的释放情况,血清中 VEGF 水平可间接反映溃疡修复的能力,组织病理学检查可反映口腔溃疡局部炎症细胞浸润程度和口腔溃疡愈合情况。综上所述,本实验结果提示,APE 促进溃疡愈合是通过有效减轻口腔溃疡充血水肿程度、显著抑制 TNF- α 、

IL-6 的释放,显著调控 VEGF 的表达,来加强机体的防御机制,提高机体免疫力实现的。APE 疗效确切,为临床口腔溃疡提供了一种简易有效的治疗方法。

REFERENCES

- [1] 尹青,邓明明.穿心莲内酯抗炎作用研究进展[J].广东医学,2014,35(5):786-788.
- [2] TANG P P, BAI M, GUO X F, et al. External curative effect of mugwort water decoction in oral ulceration guinea pig model [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2012, 27(5): 1286-1289.
- [3] LI L J, ZHANG Y, PENG L H, et al. Research progress of chinese medicine based on topical preparations for treating skin wound [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(10): 1285-1288.
- [4] 苗明三,徐玉茵,刘会丽.口腔溃疡动物模型研究进展[J].中医药学刊,2006,24(9):1636-1637.
- [5] WANG X X, PING J Y, WANG J, et al. Effect evaluation and experience in using chemical inustion [J]. J Chin Tradit Chin Med Inform(中国中医药咨询), 2012, 4(4): 518
- [6] HU S P, WANG Y, YU P Y, et al. Study on *in vitro* anti-inflammatory mechanism of the essential component of Huanglian Jiedu decoction [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(10): 1171-1174.
- [7] 吴国庆,刘旭盛.细胞因子在急性胰腺炎发病中的作用[J].中华肝胆外科杂志,2005,11(1):49-52.
- [8] LI K, JIA L L, LI H Y, et al. Effects of Huanglian Ejiao decoction with different decoction methods on mouth ulcer rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2014, 32(1): 41-42.
- [9] ZHENG W W. Study on the relationship between splenogastric hydropyrexia syndrome of ROU and VEGF, TNF- α and influence on koukuifang [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2008.

收稿日期:2016-01-26

丹参多酚酸盐对胶质瘤 U251 细胞增殖及凋亡的影响

张文静, 张小林*, 蒋峰(温州医科大学附属舟山医院, 浙江 舟山 316021)

摘要:目的 研究丹参多酚酸盐对胶质瘤 U251 细胞增殖及凋亡的影响,并探讨其发生机制。方法 应用 CCK-8 试剂盒检测丹参多酚酸盐对 U251 细胞增殖的影响,流式细胞仪观察丹参多酚酸盐对 U251 细胞周期及细胞凋亡的影响,qRT-PCR 检测自噬基因 Beclin-1 的表达。结果 丹参多酚酸盐可明显抑制胶质瘤 U251 细胞增殖,使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,促进细胞凋亡,上调自噬基因 Beclin-1 mRNA 的表达。结论 丹参多酚酸盐可抑制胶质瘤 U251 细胞生长,诱导细胞发生凋亡,促凋亡效应可能与自噬基因 Beclin-1 mRNA 表达增多有关。

基金项目:舟山市医药卫生科技计划项目(2012B14, 2013A06)

作者简介:张文静,女,硕士,住院医师 Tel:(0580)2292858
Tel:(0580)2292755 E-mail: syzxlin@qq.com

E-mail: fizwjing@qq.com *通信作者:张小林,男,硕士,主治医师

关键词: 丹参多酚酸盐; 胶质瘤; 增殖; 凋亡; 自噬

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)09-1137-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.011

Effect of Depsides Salts from *Salvia Miltiorrhiza* on Proliferation and Apoptosis of Glioma U251 Cells

ZHANG Wenjing, ZHANG Xiaolin*, JIANG Feng(Zhoushan Hospital, Afiliated to Wenzhou Medical University Zhoushan 316021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* on proliferation and apoptosis of glioma U251 cells, and explore the possible mechanism. **METHODS** The effect of depsides salts from salvia miltiorrhiza on proliferation of U251 cells was assessed using the CCK-8 assay. Cell cycle analysis was done by flow cytometry. AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit was used to detect apoptosis of cells. Real-time PCR(qRT-PCR) was employed to analyze expression of autophagy-related gene Beclin-1. **RESULTS** The growth inhibition of U251 cells by depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* was in a dose-dependent manner. After treatment with 0.2 mg·mL⁻¹, cell cycle was arrested at G₀/G₁ phase, depsides salts from salvia miltiorrhiza also significantly enhanced apoptosis of U251 cells with up-regulated pro-autophagic gene Beclin-1. **CONCLUSION** Depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* can inhibit the growth of glioma U251 cells, induce cell apoptosis, which may be related to raise expression of Beclin-1mRNA.

KEY WORDS: depsides salts from *Salvia miltiorrhiza*; glioma; proliferation; apoptosis; autophagy

脑胶质瘤是最常见的原发中枢神经系统肿瘤, 约占原发性脑肿瘤的 45%~50%, 胶质瘤患者 5 年生存率仅为 12%~15%^[1]。对于脑胶质瘤的化疗辅助治疗的研究是近年来的 1 个热点, 具有活血化瘀功效的丹参作为抗肿瘤药物可通过对肿瘤细胞的细胞毒作用、诱导肿瘤细胞分化和凋亡、抑制肿瘤细胞侵袭和转移等途径抑制肿瘤的生长^[2]。丹参中最重要的有效活性成分是丹参多酚酸盐(丹参乙酸镁), 关于丹参多酚酸盐对胶质瘤细胞增殖及凋亡影响的文献尚无报道, 因此研究丹参多酚酸盐对胶质瘤细胞增殖及凋亡的影响, 并对其作用机制进行初步探讨。

1 仪器与试剂

3111 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Forma); BHC-1300IIB2 生物安全柜(苏州金净净化设备公司); DNM-9602 酶标仪(北京普朗新技术有限公司); Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD); 7300 型 PCR 仪(美国 ABI)。

丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司, 批号: Z20050249); DMEM(美国 Hyclone, 批号: SH30243.01); 胎牛血清(美国 Gibco, 批号: 16000-044); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD, 批号: 556547); PI(上海碧云天生物科技有限公司, 批号: ST511); CCK-8(日本同仁化学研究所, 批号: CK04-100); SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(日本 TaKaRa, 批号: DRR081A);

ReverTra Ace® qPCR RT Kit(日本 ToYoBo, 批号: F0921K); 引物(上海生工生物工程有限公司)。胶质瘤 U251 细胞购自中科院上海细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

人脑胶质瘤细胞系 U251 细胞培养于含胎牛血清 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 d 换液 1 次。实验选取对数生长期的细胞。

2.2 CCK-8 检测细胞增殖

对数生长期的 U251 细胞, 胰蛋白酶消化, 稀释细胞使其浓度为 3×10⁴·mL⁻¹, 分别取 100 μL 至 96 孔培养板, 每种细胞每块板接种 3 个同样的孔作为复孔, 37 °C 培养过夜, 然后加入含有药物的培养基, 对照组加入生理盐水, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24, 48, 72 h 后, 按 1:10 体积比混合 Cell Counting Kit-8(CCK-8)和无血清培养基 DMEM, 100 μL 加入待测孔中, 37 °C、5% CO₂ 孵育 1 h, 微板分光光度计测定 450 nm 波长吸光度。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期

将 0.2 mg·mL⁻¹ 的丹参多酚酸盐与对数生长期的 U251 细胞作用 8, 24, 48, 72 h 后, 收集处理的细胞及对照组细胞, 560 r·min⁻¹ 离心 5 min, 含有 10%胎牛血清的 PBS 悬浮, 细胞悬液用无水乙醇于 -20 °C 冰箱内固定细胞 24 h, 1 680 r·min⁻¹ 离心去除固定液, PBS 漂洗混匀细胞, 加入 1 mg·mL⁻¹

的 RNase A 溶液悬浮, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的碘化丙啶(PI) 溶液避光染核 10 min, 流式细胞仪进行细胞 DNA 含量的测定, 确定细胞在各细胞周期所占比例。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

将终浓度为 0.05, 0.1, 0.2, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丹参多酚酸盐与对数生长期的 U251 细胞作用 48 h, 对照组加入生理盐水, 收集细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 加入培养液, $560 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, 用 4°C PBS 清洗 2 次, 然后将细胞重悬于 $195 \mu\text{L}$ 结合液, 加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC, 混匀后室温下避光孵育 10 min, $560 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, 加入 $190 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 加入 $10 \mu\text{L}$ 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴, 避光放置, 随即采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测自噬相关基因 Beclin-1 表达

2.5.1 细胞 RNA 的提取

对数生长期的 U251 细胞用胰酶消化后以 $3\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔板中, 贴壁生长 24 h 后, 加入丹参多酚酸盐稀释液, 使药物分别为 0.05, 0.1, 0.2, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对照组加入等体积的生理盐水, 在 37°C 、5% CO_2 培养箱中分别培养 48 h, 收集细胞, RNA 提取按照 Trizol 试剂说明书推荐的步骤操作。

2.5.2 cDNA 的合成

使用 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit 进行逆转录反应, 所有操作均在冰上完成, 总反应体系为 $10 \mu\text{L}$ 。取总 RNA $1 \mu\text{g}$, 加 DEPC 水至 $7 \mu\text{L}$, 65°C 加热 5 min, 冰上放置 3 min, 依次加入 5x RT Buffer $2 \mu\text{L}$ 、RT Enzyme mix $0.5 \mu\text{L}$ 、Primer mix $0.5 \mu\text{L}$, 混匀后 37°C 15 min、 98°C 5 min、 4°C 10 min, 即得到逆转录产物(cDNA), 加灭菌纯水稀释至 10 倍, -20°C 保存备用。

2.5.3 Rt-PCR

以逆转录反应产物为模板进行扩增反应, Beclin-1 引物正义为 $5'\text{-ATCCTGGACCGTGTCACCATCCAGG-3'}$, 反义为 $5'\text{-GTTGAGCTGAGTGTCAGCTGG-3'}$; GAPDH 引物正义为 $5'\text{-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'}$, 反义为 $5'\text{-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'}$ 。PCR 按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒推荐步骤执行, 反应体系为 $20 \mu\text{L}$: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II $10 \mu\text{L}$ 、Forward Primer $0.8 \mu\text{L}$ 、Reverse Primer $0.8 \mu\text{L}$ 、ROX Reference Dye $0.4 \mu\text{L}$ 、cDNA $8 \mu\text{L}$ 。置于 ABI7300 荧光定量 PCR 仪上按下列条件扩增:

95°C 30 s 预变性, 95°C 5 s、 60°C 31 s, 扩增 40 个循环, 然后 95°C 15 s、 60°C 1 min、 95°C 15 s。PCR 完成后, 根据实时荧光定量扩增曲线获取目的基因和内参基因的 C_t 值, 以目的基因 Beclin-1 的相对定量值(RQ 值)进行统计学分析。

2.6 统计学方法

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 2 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丹参多酚酸盐抑制 U251 细胞的增殖

丹参多酚酸盐对 U251 细胞增殖抑制效应呈良好的剂量依赖性, 结果见图 1。在 24 h 时, 抑制效果不明显, 对照组及各浓度药物组的 OD 值相差较小。而随着时间的推移, 各浓度药物组的 OD 值明显较对照组小, 且随着药物浓度的增高, 抑制作用增强, 曲线变得低平, 甚至出现下垂现象。

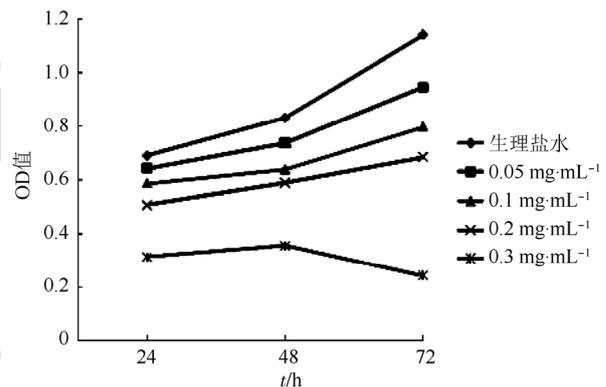


图 1 丹参多酚酸盐对 U251 细胞生长曲线的影响

Fig. 1 Effect of depsides salts from salvia miltiorrhiza on cell growth curve in U251

3.2 丹参多酚酸盐对 U251 细胞周期的影响

流式细胞仪分析结果显示, $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丹参多酚酸盐处理 U251 细胞后, 细胞周期分布发生不同程度的变化。随着作用时间的延长, G_0/G_1 期的比例逐渐增加, S 期、 G_2/M 期的比例减小。丹参多酚酸盐作用 72 h 后, G_0/G_1 期细胞比例增加, 丹参多酚酸盐使胶质瘤 U251 细胞周期停滞于 G_0/G_1 期, 与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$), 结果见表 1、图 2。

3.3 丹参多酚酸盐诱导 U251 细胞的凋亡

在双变量流式细胞仪的散点图上, 右下象限 (AnnexinV-FITC⁺/PI⁻) 表示早期凋亡细胞, 右上象

限(Annexin V-FITC⁺/PI⁺)表示晚期凋亡细胞。流式细胞仪结果表明,丹参多酚酸盐可诱导胶质瘤 U251 细胞凋亡,随着药物浓度增加,细胞凋亡率明显增加,尤其是早期凋亡率,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),结果见表 2、图 2。

表 1 不同作用时间丹参多酚酸盐对 U251 细胞周期的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* on cell cycles in U251($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期/%		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	43.58±0.03	20.97±0.13	31.02±0.31
丹参多酚酸盐(8 h)	52.24±0.37 ¹⁾	20.22±1.21	26.61±1.22
丹参多酚酸盐(24 h)	65.59±0.54 ¹⁾	3.40±0.27	31.32±0.47
丹参多酚酸盐(48 h)	70.35±0.20 ¹⁾	5.09±0.88	22.30±0.49
丹参多酚酸盐(72 h)	75.76±0.39 ¹⁾	3.45±0.89	24.37±0.23

注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

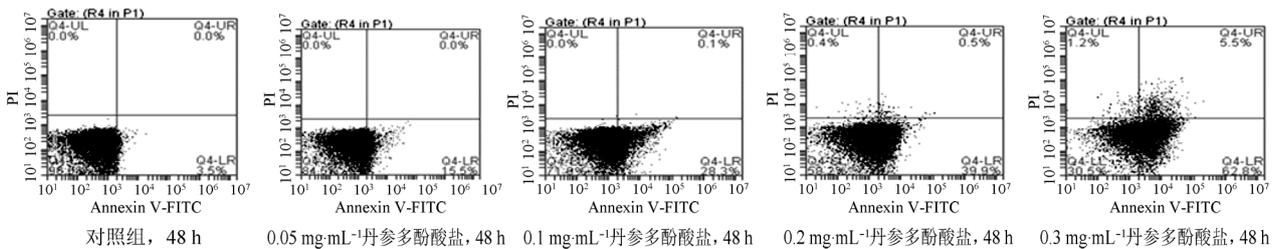


图 2 不同浓度丹参多酚酸盐对 U251 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* on U251 cell apoptosis

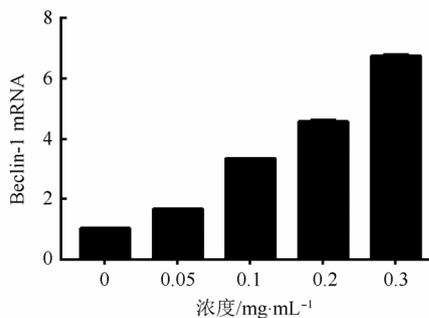


图 3 丹参多酚酸盐对 U251 细胞自噬相关基因 Beclin-1 的影响

Fig. 3 Effect of depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* on the expression of Beclin-1 mRNA

4 讨论

肿瘤化疗辅助治疗成为日前研究热点,期望通过联合用药提高化疗效能,减少化疗耐药,同时能减轻化疗不良反应,提高化疗耐受,中药的低不良反应和抗肿瘤作用越来越受到研究者的重视。

表 2 不同浓度丹参多酚酸盐对 U251 细胞凋亡的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* on cell apoptosis in U251($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡/%	晚期凋亡/%	总凋亡/%
对照组	3.27±0.06	0.00	3.27±0.06
0.05 mg·mL ⁻¹ 丹参多酚酸盐	15.47±0.11 ¹⁾	0.00	15.47±0.11 ¹⁾
0.1 mg·mL ⁻¹ 丹参多酚酸盐	29.50±0.64 ¹⁾	0.07±0.01	29.57±0.63 ¹⁾
0.2 mg·mL ⁻¹ 丹参多酚酸盐	40.33±0.16 ¹⁾	0.43±0.05 ¹⁾	40.77±0.20 ¹⁾
0.3 mg·mL ⁻¹ 丹参多酚酸盐	63.27±0.16 ¹⁾	4.53±0.68 ¹⁾	67.80±0.54 ¹⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

3.4 丹参多酚酸盐对 U251 细胞 Beclin-1 的影响

浓度梯度的丹参多酚酸盐作用于 U251 细胞 48 h 后,收集 RNA, qRT-PCR 法检测各组自噬相关基因 Beclin-1 mRNA 的表达量,结果显示,随着丹参多酚酸盐浓度的增加,Beclin-1 mRNA 的表达量增加,量-效关系明显($P<0.05$),结果见图 3。

丹参含有多种化学成分,根据性质主要分为以丹酚酸为代表的水溶性成分和以丹参酮类化合物为代表的脂溶性成分两大类。近年来,研究热点是丹参酮类化合物的抗肿瘤的的生长作用,近期许多研究发现丹参酮 II A 可通过多个环节抑制肿瘤细胞的生长,如:丹参酮 II A 通过 mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 信号传导通路抑制乳腺癌细胞 HIF-1 α 及 VEGF 的表达来抑制肿瘤新生血管的形成^[3];整合转录组学和蛋白组学研究发现丹参酮 II A 通过阻滞胃癌细胞的糖代谢来抑制肿瘤细胞的生长^[4];丹参酮 II A 通过减少病毒癌基因 E6 及 E7 的表达,从而促进宫颈癌细胞的凋亡来抑制肿瘤细胞的生长^[5]。

在胶质瘤的研究中,丹参酮 II A 也表现出多途径的抗肿瘤效应,如:丹参酮 II A 通过抑制 STAT3 的激活来促进胶质瘤 C6 细胞的凋亡及抑制其增殖^[6];丹参酮 II A 通过抑制 IL6/STAT3 信号

通路来诱导胶质瘤干细胞的凋亡、抑制胶质瘤干细胞的生长、减弱胶质瘤干细胞的多能性^[7]。

中药传统用药方法是用其水煎剂，即丹参的水溶性成分，所以研究丹参的水溶性成分抗肿瘤细胞生长的机制更有意义。本研究采用丹参中最重要水溶性活性成分丹参多酚酸盐，首次证实了丹参多酚酸盐可使胶质瘤细胞周期停滞于G₀/G₁期，促进胶质瘤细胞的凋亡，抑制胶质瘤细胞的增殖。作为自我毁灭的过程，凋亡及自噬在神经系统疾病的发生发展中扮演了重要的角色。Wirawan E 及 Luo S 等研究团队均发现 Beclin 1 基因的清除不仅能减弱其介导的促细胞自噬功能，并且 Beclin 1 基因降解产生的 C 末端片段能跨膜进入线粒体敏感型细胞使其释放促凋亡因子细胞色素而促进细胞的凋亡^[8-9]。本研究也发现，丹参多酚酸盐能上调胶质瘤 U251 细胞自噬相关基因 Beclin 1 表达，Beclin 1 基因降解产生的 C 末端片段的增多是否介导了丹参多酚酸盐促细胞凋亡的作用，有待进一步研究。

REFERENCES

[1] LU C, SHERVINGTON A. Chemoresistance in gliomas [J]. Mol Cell Biochem, 2008, 312(1/2): 71-80.
[2] YUAN S L, WANG Y J, WEI Y Q. Anticancer effect of

tanshinone and its mechanisms [J]. Chin J Cancer(癌症), 2003, 22(12): 1363-1366.
[3] LI G, SHAN C, LIU L, et al. Tanshinone II A inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117440.
[4] LIN L L, HSIA C R, HSU C L, et al. Integrating transcriptomics and proteomics to show that tanshinone II A suppresses cell growth by blocking glucose metabolism in gastric cancer cells [J]. BMC Genomics, 2015, 2(5): 16-41.
[5] MUNAGALA R, AQIL F, JEYABALAN J, et al. Tanshinone II A inhibits viral oncogene expression leading to apoptosis and inhibition of cervical cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 536-546.
[6] TANG C, XUE H L, HUANG H B, et al. Tanshinone II A inhibits constitutive STAT3 activation, suppresses proliferation, and induces apoptosis in rat C6 glioma cells [J]. Neurosci Lett, 2010, 470(2): 126-129.
[7] YANG L, GUO H, DONG L, et al. Tanshinone II A inhibits the growth, attenuates the stemness and induces the apoptosis of humangioma stem cells [J]. Oncol Rep, 2014, 32(3): 1303-1311.
[8] WIRAWAN E, VANDE WAALLE L, KERSSE K, et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhance apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria [J]. Cell Death Dis, 1(1): e18. doi: 10.1038/cddis.2009.16.
[9] LUO S, RUBINSZTEIN D C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-XL [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 268-277.

收稿日期: 2015-11-02

蛇床子素对 TRAIL 抗乳腺癌活性的影响及其作用机制

王倩, 郑海雅, 周颖, 钟益芳(丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000)

摘要:目的 探讨中药活性成分蛇床子素对抗肿瘤药物 TRAIL 抗乳腺癌活性的影响并研究其机制。方法 用蛇床子素联合 TRAIL 体外治疗乳腺癌细胞系 BT-20, MTT 法检测肿瘤细胞的细胞活力, Annexin V/PI 染色检测肿瘤细胞的凋亡, 免疫共沉淀法检测 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的形成。Western blot 法检测 BT-20 细胞 caspase-8 的活化及蛇床子素对 BT-20 细胞 cIAP2 蛋白表达的影响。结果 联用蛇床子素显著提高 TRAIL 对 BT-20 细胞活力的抑制率和凋亡诱导活性。免疫共沉淀及 Western blot 结果发现联合蛇床子素后, TRAIL 治疗的 BT-20 细胞内的 RIP1-FADD-caspase-8 复合物水平及 caspase-8 的活化程度显著提高。Western blot 结果发现蛇床子素对 BT-20 细胞内的 cIAP2 蛋白表达有抑制作用。在 BT-20 细胞中转入 cIAP2 表达质粒后, 蛇床子素对 TRAIL 抗肿瘤活性的促进作用受到抑制。结论 蛇床子素通过促进死亡受体复合物的形成增强 TRAIL 对乳腺癌细胞的凋亡诱导效应。

关键词: 蛇床子素; TRAIL; 乳腺癌; caspase-8; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)09-1141-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.012

作者简介: 王倩, 女, 硕士, 主管技师 Tel: 18957092550 E-mail: lishuiwangqian@163.com