经验交流

文章编号:1000-5404(2014)17-1862-02

丹参酮ⅡA通过抑制COX-2的转录、翻译和活性抑制胃癌细胞增殖

赵雪峰,李　勇,贾　楠,刘　羽　(050011 石家庄,河北医科大学第四医院外三科)

[关键词]　丹参酮;胃肿瘤;环氧合酶2;细胞增殖
[中图法分类号]　R735.2; R979.1　[文献标志码]　B

胃癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一。目前,胃癌的治疗仍以手术和化疗为主,但5年生存率不足30%[1]。丹参酮是从丹参中提取的化合物,其中丹参酮ⅡA(Tan ⅡA)是脂溶性成分的代表。研究发现,Tan ⅡA抑制胃癌细胞生长、促进胃癌细胞凋亡[2]。但药物作用具有多靶点多途径的特点,因此,本研究观察Tan ⅡA体外对胃癌细胞生长及环氧合酶2(cyclooxygenase 2,COX-2)表达的影响。

1　材料与方法

1.1　药物及试剂

人胃癌细胞株SGC-7901购自中科院上海细胞所,胎牛血清购自美国Gibco公司,MTT和Tan ⅡA(纯度>99 %)购自Sigma公司,塞来昔布购自美国辉瑞公司;COX-1、COX-2抗体购自Santa Cruz公司,Real-Time PCR仪为美国ABI公司产品,电泳和转膜系统为Bio-Rad公司产品。

1.2　细胞培养

SGC-7901细胞在RPMI1640培养基中常规培养,传代。实验分组:对照组加入0.1%二甲基亚砜(DMSO),丹参酮ⅡA组中加入1、2、4 mg/L Tan ⅡA,阳性对照组加入50 μmol/L塞来昔布处理细胞48 h,进行Real-Time PCR(RT-qPCR)、Western blot和ELISA实验。

1.3　MTT检测

细胞以5×10^3/孔接种于96孔板,24 h后,实验组加入Tan ⅡA(0.5、1、2、4 mg/L)作用24、48 h和72 h,阳性对照组加入50 μmol/L塞来昔布,溶剂对照加入0.1% DMSO。每组设置6个复孔。于实验结束前4 h加入20 μL的MTT(浓度为5 g/L),4 h后更换为150 μL DMSO,室温振荡15 min,用酶标仪于波长490 nm测吸光度值[D(490)]。实验重复3次。

1.4　总RNA提取及Real-Time PCR检测

提取各组细胞总RNA,逆转录为cDNA,进行qPCR反应。设计引物:COX-2上游5′-CCCTTCTGCCTGACACCTT-3′,下游5′-TCCTACCACCAGCAACCCT-3′,片段大小150 bp;COX-1上游5′-TGCTCAGGAGGAAGTTCATACC-3′,下游5′-GGACCCATCTTGCCAGAAGT-3′,片段大小119 bp;内参GAPDH上游引物5′-TGAACGGGAAGCTCACTG-3′,下游引物5′-GCTTCACCACCTTCTTGATG-3′,片段大小121 bp。根据实时荧光定量扩增曲线获取目的基因和内参基因的Ct值,以目的基因表达的相对定量值进行统计学分析。实验重复3次。

1.5　Western blot检测

冰上裂解细胞30 min,间断涡旋混匀。8 000×g、4 ℃离心取上清。上清液经BCA试剂盒定量后,每组取50 μg总蛋白经SDS-PAGE分离后转到PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,COX-2(1∶300)、COX-1(1∶400)特异性一抗4 ℃过夜,辣根过氧化酶标记的相应的二抗(1∶5 000)室温孵育2 h。ECL法检测结合的目的条带。用目标蛋白吸光度值/内参照GAPDH吸光度值进行统计比较。实验重复3次。

1.6　ELISA测定前列腺素E2的生成

24孔板每孔接种1×10^5/mL细胞,细胞贴壁后按1.2实验分组处理细胞。24 h后收集各组细胞培养基,按说明书操作测定前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)的生成。每组设置6个复孔。实验重复3次。

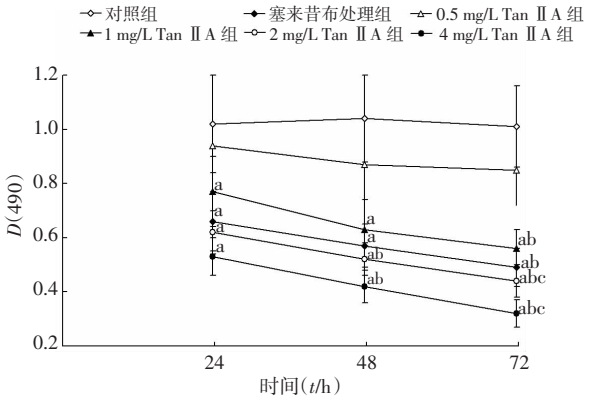
1.7　统计学分析

计数数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0软件进行单因素分析和Dunnett检验。

2　结果

2.1　Tan ⅡA抑制细胞增殖

MTT结果显示1、2、4 mg/L Tan ⅡA作用SGC-7901细胞24、48、72 h后,以浓度和时间依赖的方式抑制细胞增殖($P<0.05$,图1)。



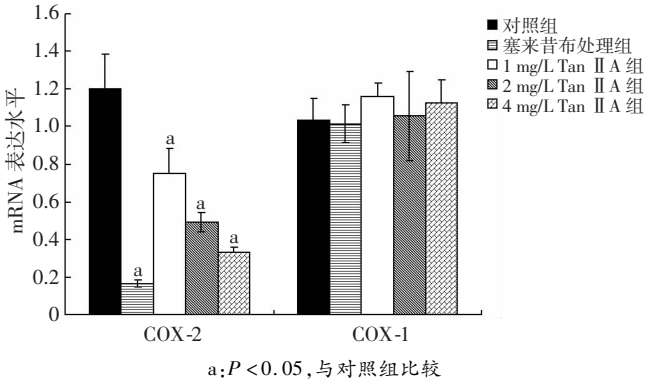
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与同组24 h比较;c:$P<0.05$,与同组48 h比较

图1　Tan ⅡA对SGC-7901细胞增殖的影响

2.2　Tan ⅡA抑制胃癌细胞COX-2转录

RT-qPCR结果显示,1、2、4 mg/L Tan ⅡA作用于SGC-7901细胞48 h,COX-2 mRNA表达明显下降($P<0.05$),COX-1的mRNA表达无变化(图2)。

[通信作者]　李　勇,E-mail: li_yong_hbth@126.com
[优先出版]　http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140516.1000.018.html(2014-05-16)

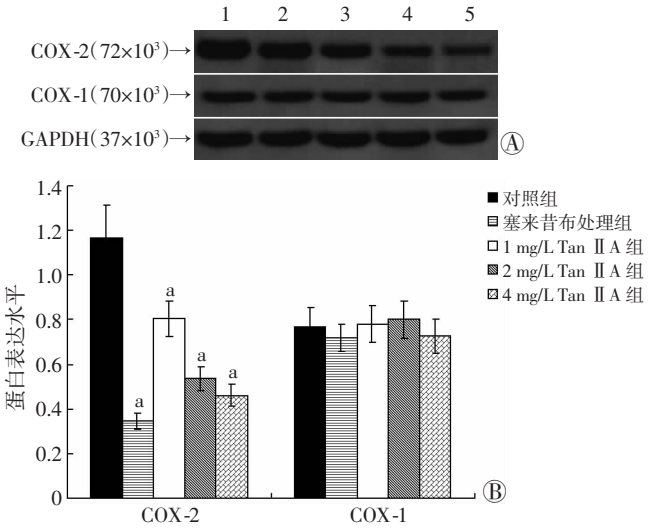


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2　Tan ⅡA 对 SGC-7901 细胞 COX-2、COX-1 mRNA 表达的影响

2.3　Tan ⅡA 抑制胃癌细胞 COX-2 翻译

Western blot 检测显示 1、2、4 mg/L Tan ⅡA 作用于 SGC-7901 细胞 48 h,COX-2 蛋白表达明显下降($P<0.05$),COX-1 的蛋白表达无变化(图 3)。

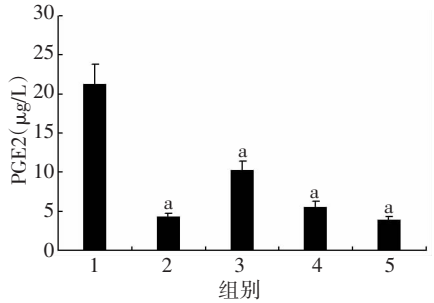


A:Western blot 检测　1:对照组;2:塞来昔布处理组;3:1 mg/L Tan ⅡA 组;4:2 mg/L Tan ⅡA 组;5:4 mg/L Tan ⅡA 组;B:半定量分析
a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3　丹参酮ⅡA 对 SGC-7901 细胞 COX-2、COX-1 蛋白表达水平的影响

2.4　Tan ⅡA 对胃癌细胞 COX-2 活性的影响

ELISA 结果显示,1、2、4 mg/L Tan ⅡA 孵育 SGC-7901 细胞 48 h 可明显抑制 PGE2 的生成($P<0.05$,图 4)。



1:对照组;2:塞来昔布处理组;3:1 mg/L Tan ⅡA 组;4:2 mg/L Tan ⅡA 组;5:4 mg/L Tan ⅡA 组;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　Tan ⅡA 对 SGC-7901 细胞 PGE2 的影响

3　讨论

COX 是前列腺素合成的一类关键酶,至少存在两个亚型:COX-1 在多种组织中均持续稳定的表达;COX-2 为诱导形式[3],在正常组织中不表达或表达量极低,在多种消化道肿瘤如胃癌中表达上调。目前认为 COX-2 可能通过多种机制参与肿瘤的形成[4]。COX-2 抑制剂塞来昔布、美洛昔康及尼美舒利等可抑制癌细胞生长,但具有明显的心血管副作用。

Tan ⅡA 具有广泛的生理作用,如抗炎和抗氧化[5]等。近来发现,Tan ⅡA 有明显的抗癌活性[6]。本研究表明 1 mg/L 及以上浓度 Tan ⅡA 可时间和剂量依赖地抑制细胞增殖。由于 PGE2 可促进胃癌细胞生长[7],因此,COX-2 常作为防治疗肿瘤的潜在靶标[8]。本研究发现,Tan ⅡA 抑制了 COX-2 的表达和活性,而对 COX-1 表达无影响。由于 COX-1 属于结构型基因,在胃、肾、血小板、内皮细胞和巨噬细胞中呈结构性表达,参与体内基础前列腺素的合成,完成正常的生理活动。该结果说明 Tan ⅡA 在抑制胃癌细胞增殖的同时还可能避免 COX-1 来源的前列腺素抑制相关的副作用的发生。以上结果表明,Tan ⅡA 对 COX-2 表达及活性的抑制,是其抑制胃癌增殖的原因之一。Tan ⅡA 可能作为候选药物用于胃癌治疗。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Chen J, Shi D Y, Liu S L, *et al*. Tanshinone ⅡA induces growth inhibition and apoptosis in gastric cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncol Rep, 2012, 27(2): 523-528.

[3] Hla T, Bishop-Bailey D, Liu C H, *et al*. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(5): 551-557.

[4] Cao Y, Prescott S M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer[J]. J Cell Physiol, 2002, 190(3): 279-286.

[5] Yin X, Yin Y, Cao F L, *et al*. Tanshinone IIA attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38381.

[6] Yan M Y, Chien S Y, Kuo S J, *et al*. Tanshinone IIA inhibits BT-20 human breast cancer cell proliferation through increasing caspase 12, GADD153 and phospho-p38 protein expression[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(5): 855-863.

[7] Yuan X L, Chen L, Li M X, *et al*. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg cells suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner[J]. Clin Immunol, 2010, 134(3): 277-288.

[8] Dannenberg A J, Subbaramaiah K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise[J]. Cancer Cell, 2003, 4(6): 431-436.

(**收稿**:2013-10-13;**修回**:2013-11-27)

(编辑　龙　亮)