论 著

隐丹参酮对人下咽鳞癌细胞FaDu增殖及迁移的影响

高 琳[1]，费 静[2]，刘 毅[1]，李晓红[1]
1.西南医科大学附属医院 健康管理中心（泸州 646000）；2.西南医科大学附属医院 耳鼻咽喉头颈外科（泸州 646000）

【摘 要】 **目的** 本研究通过体外实验探讨隐丹参酮对人下咽鳞癌细胞的增殖及迁移的影响。**方法** 用不同浓度（0 μM、2.5 μM、5 μM、10 μM）的隐丹参酮处理FaDu细胞。通过细胞克隆、细胞划痕与Transwell实验分析药物对细胞增殖、迁移能力的影响。Western blot法检测周期相关蛋白和EMT相关蛋白的表达水平。**结果** 与对照组相比，隐丹参酮能有效抑制FaDu细胞增殖及克隆形成能力（$P < 0.01$），且呈剂量依赖性。在用隐丹参酮处理24 h后，处理组细胞的划痕愈合能力及细胞迁移能力较对照组明显降低，呈剂量依赖性。药物处理后，AKT蛋白、细胞周期相关蛋白（CDK 4和Cyclin D）及EMT相关蛋白Vimentin表达明显下调。**结论** 隐丹参酮能有效抑制人咽鳞癌细胞FaDu的增殖和迁移，其作用机制可能与其下调AKT、CDK4、Cyclin D及Vimentin蛋白的表达有关，进而抑制细胞，表现出对较强的细胞毒性。

【关键词】 隐丹参酮 人下咽鳞癌 细胞增殖 细胞迁移
【中图分类号】 R453.9 **文献标志码** A **DOI**：10.3969/j.issn.2096-3351.2021.05.021

Effect of cryptotanshinone on the proliferation and migration of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma FaDu cells

GAO Lin[1], FEI Jing[2], LIU Yi[1], LI Xiao-hong[1]
1.*Department of Health Management Center, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*; 2.*Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of cryptotanshinone on the proliferation and migration of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma through *in vitro* experiments. **Methods** Different concentrations (0 μM, 2.5 μM, 5 μM, and 10 μM) of cryptotanshinone was used to treat FaDu cells. Cell cloning, wound healing assay, and Transwell assay were performed to analyze the effect of cryptotanshinone on cell proliferation and migration. Western blot was used to measure the expression levels of cyclin- and EMT-related proteins. **Results** Compared with the control group, cryptotanshinone effectively inhibited the proliferation and clone-forming abilities of FaDu cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). After treatment with cryptotanshinone for 24 h, the treatment group had significantly lower wound healing ability and cell migration ability compared with the control group in a dose-dependent manner. After cryptotanshinone treatment, the expression of Akt, CDK4, cyclin D, and vimentin was significantly down-regulated. **Conclusion** Cryptotanshinone can effectively inhibit the proliferation and migration of human pharyngeal squamous cell carcinoma FaDu cells, and the mechanism of its action may be related to its down-regulating the Akt, CDK4, cyclin D, and vimentin protein expression, thereby inhibiting cells and showing strong cytotoxicity.

【**Keywords**】 Cryptotanshinone Human hypopharyngeal squamous cell carcinoma Cell proliferation Cell migration

基金项目：四川省医学青年创新科研课题（Q19059）；西南医科大学校级项目（2019ZQN022）
第一作者简介：高 琳，主治医师。
通信作者：李晓红，教授，硕士。E-mail：1848922774@qq.com

下咽鳞癌是一种原发于下咽部且侵袭性高的头颈部恶性肿瘤,由于其发病位置隐匿且症状不典型,大部分患者就诊时已为晚期[1]。一直以来,对下咽鳞癌早期诊断及治疗缺乏有效的治疗手段,手术、放疗和化疗是其主要治疗方式[2],导致患者术后的整体生存情况并不理想,因此亟需新的理念及治疗药物来改善现状。

隐丹参酮(cryptotanshinone, CPT)是传统中药丹参中的主要脂溶性成分,具有抗炎、抗氧化等多种药理作用[3-4]。而近年来,CPT被报道可抑制肝癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞增殖,阻碍肿瘤细胞侵袭与转移,表现出较好的抗肿瘤活性[5-8]。但目前并无CPT作用于下咽鳞癌的研究报道。本研究以人下咽鳞癌细胞FaDu为研究对象,探讨CPT对FaDu细胞增殖及迁移的影响。

1 材料

1.1 细胞

人下咽鳞癌细胞FaDu,购自中国科学院细胞库。

1.2 药物及试剂

隐丹参酮,胎牛血清(Biological Industries),高糖DMEM培养基(Hyclone),0.25%胰蛋白酶(含EDTA,Thermo Fisher),RIPA强裂解液(Beyotime),Transwell小室(24孔 8.0um,Corning),CDK4、Cyclin D、GAPDH抗体(Proteintech),Vimentin抗体(Servicebio),AKT抗体(ZEN-BIO),p-AKT抗体(Beyotime)。

1.3 仪器

倒置荧光显微镜(Olymplus,日本);全光谱分光光度计(Thermo Fisher,美国);电泳仪、垂直电泳槽(Bio-Rad,美国)。

2 方法

2.1 细胞培养

人下咽鳞癌细胞FaDu常规培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中,待细胞长至90%密度左右时,用0.25%胰蛋白酶消化传代培养,并进行后续实验。

2.2 CCK-8实验

参照CCK-8试剂盒(Beyotime)操作。

2.3 克隆形成实验

在6孔培养板中每孔接种1 000个FaDu细胞,加入含CPT的新鲜高糖DMEM培养基处理24 h后,换成新鲜高糖DMEM培养基继续培养。7 d后用4%多聚甲醛固定,结晶紫染色后进行拍照。

2.4 划痕实验

在6孔培养板中每孔接种6×10^5个FaDu细胞,第2 d用黄枪头垂直于孔底进行划痕。加入含CPT的新鲜无血清高糖DMEM培养基,培养24 h后,拍照分析。

2.5 Transwell迁移实验

将Transwell小室放入24孔板中,在每个上室中加入含FaDu细胞的无血清高糖DMEM培养基,向每个下室中加入含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,培养24 h后,多聚甲醛固定,结晶紫染色,在显微镜下对小室下层的细胞进行拍照计数。

2.6 蛋白印迹(Western blot)实验

收集不同浓度CPT处理的细胞,加入RIPA强裂解液提取蛋白,再利用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜,一抗4 ℃孵育过夜,HRP标记的二抗室温孵育2 h后,通过ECL化学发光于凝胶成像系统中成像。

2.7 统计学分析

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计学分析,计量资料以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用独立样本t检验,以$P < 0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CPT抑制FaDu细胞增殖

CCK-8实验检测CPT对FaDu细胞增殖的影响,见图1。与对照组(DMSO组)相比,不同浓度的CPT(2.5 μM、5 μM、10 μM、20 μM)作用于人下咽鳞癌细胞FaDu 24 h、48 h及72 h后,表现出不同程度的抑制作用。随CPT浓度的增加,对FaDu细胞增殖的抑制作用逐渐增强,且呈现浓度和时间的依赖性关系,见表1。各加药浓度组与对照组(DMSO组)相比具有统计学意义($P < 0.01$)。同时CPT对FaDu细胞在24 h、48 h及72 h的半数致死剂量IC50分别为15.42 μM、6.49 μM、3.46 μM。

3.2 CPT抑制FaDu细胞克隆形成

细胞克隆形成实验分析CPT对FaDu细胞克隆形成的影响,见图2。与对照组(DMSO组)相比,不同浓度的CPT(2.5 μM、5 μM、10 μM)对人下咽鳞癌细胞FaDu克隆形成能力表现出不同程度的抑制作用。随CPT浓度的增加,对FaDu细胞克隆形成的抑制作用越来越强(图1)。统计各组细胞克隆形成的数量并

表1 不同浓度CPT处理后各组细胞的相对存活率

组别	相对存活率(%)			与对照组相比的t值		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0 μM CPT	100 ± 1.916	100 ± 5.169	100 ± 2.820	/	/	/
2.5 μM CPT	85.81 ± 4.110[a]	71.56 ± 1.740[b]	60.49 ± 3.305[c]	6.995	11.66	20.34
5 μM CPT	72.35 ± 4.401[a]	55.74 ± 0.897[b]	38.46 ± 3.229[c]	12.88	18.86	32.10
10 μM CPT	58.31 ± 6.127[a]	39.10 ± 0.961[b]	20.43 ± 2.086[c]	14.52	25.90	50.73
20 μM CPT	45.34 ± 3.957[a]	26.80 ± 3.128[b]	14.35 ± 0.602[c]	27.80	27.09	66.42
F	125.664	497.128	888.567			
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01			

注:a与24 h对照组比较,$P < 0.01$;b与48 h对照组比较,$P < 0.01$;c与72 h对照组比较,$P < 0.01$

计算各组的克隆形成率,各组的克隆形成率分别为DMSO组(67.0% ± 4.9%)、CPT 2.5 μM组(30.1% ± 1.8%)、CPT 5 μM组(13.2% ± 3.3%)、CPT 10 μM组(7.5% ± 2.2%),各加药浓度组与对照组相比具有统计学意义($P < 0.01$),且单因素方差分析表明F = 197.504,$P < 0.001$。

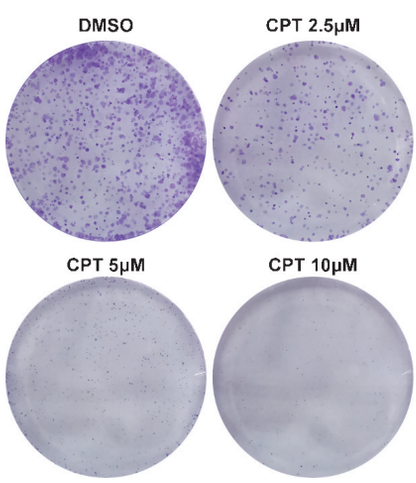


图1 CPT对FaDu细胞克隆形成能力的影响

3.3 CPT抑制FaDu细胞迁移

细胞划痕实验与Transwell迁移实验分析CPT对FaDu细胞迁移能力的影响(图3)。细胞划痕实验结果发现CPT能明显抑制人下咽鳞癌细胞FaDu划痕愈合能力,且随CPT浓度的增加,其抑制作用越来越强(图2)。统计各组24 h后的细胞愈合率,DMSO组84.5% ± 3.8%、CPT 2.5 μM组65.3% ± 1.3%、CPT 5 μM组39.5% ± 2.1%、CPT 10 μM组12.6% ± 3.2%,各加药浓度组与对照组(DMSO组)相比具有统计学意义($P < 0.01$),且单因素方差分析表明F = 388.287,$P < 0.001$。。Transwell迁移实验结果表明CPT能明显抑制人下咽鳞癌细胞FaDu迁移能力,且随CPT浓度的增加,其抑制作用越来越强(图3)。与对照组(DMSO组)相比各组的相对细胞迁移率为:DMSO组(100% ± 4.0%)、CPT 2.5 μM组(77.2% ± 3.7%)、CPT 5 μM组(44.8% ± 4.2%)、CPT 10 μM组(10.0% ± 1.4%),各加药浓度组与对照组相比具有统计学意义($P < 0.01$),且单因素方差分析表明F = 375.848,$P < 0.001$。

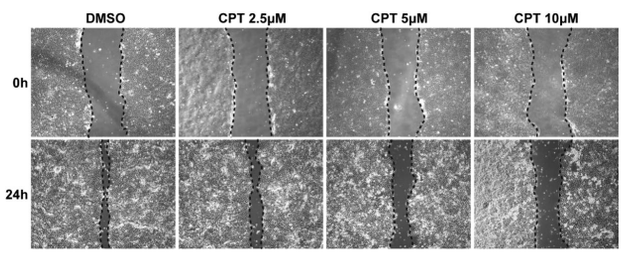


图2 细胞划痕实验检测CPT对FaDu细胞迁移能力的影响

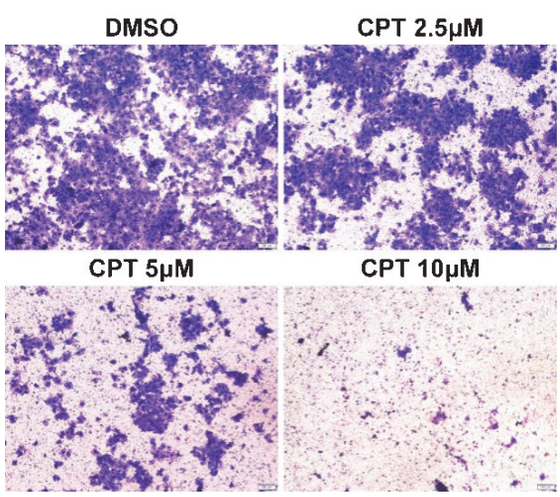


图3 Transwell迁移实验检测CPT对FaDu细胞迁移能力的影响

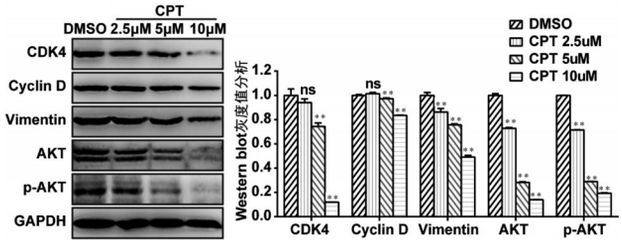
3.4 CPT抑制FaDu细胞周期及迁移相关蛋白的表达

为进一步阐明CPT调控FaDu细胞增殖和迁移的分子机制,采用Western blot检测不同浓度的CPT处理FaDu细胞后细胞周期相关蛋白CDK4、Cyclin D及EMT相关蛋白Vimentin的表达情况。Western blot结果如图5所示,与对照组(DMSO组)相比,CDK4、Cyclin D及Vimentin蛋白相对表达量随CPT浓度的增加而明显下调。进一步灰度值分析发现,加药浓度组(5 μM组与10 μM组)与对照组相比各蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.01$)(图4)。

3.5 CPT抑制AKT蛋白的表达

AKT蛋白作为PI3K / AKT信号通路核心蛋白,经磷酸化激活形成p-AKT后可进一步调控下游细

胞周期相关蛋白CDK4、Cyclin D及EMT相关蛋白Vimentin的表达,参与细胞增殖及转移的调控。通过Western blot检测不同浓度CPT处理FaDu细胞后AKT蛋白的表达,结果显示AKT及p-AKT蛋白相对表达量随CPT浓度的增加而明显下调。进一步灰度值分析发现,各加药浓度组与对照组相比各蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.01$)(图4)。



注:**与DMSO对照组比较,$P < 0.01$;ns与DMSO对照组比较,$P > 0.05$

图4　Western blot检测不同浓度CPT处理FaDu细胞后相关蛋白的表达变化

4　讨论

下咽癌是一种少见的头颈部恶性肿瘤,约占头颈部恶性肿瘤的3% ~ 5%,其病理类型以鳞状细胞癌为主[9-10]。由于早期下咽癌的症状与体征并不明显,70% ~ 85%的患者在确诊时已处于Ⅲ期或Ⅳ期,且极易发生颈部淋巴结转移,导致患者预后差、生存率低[11-12]。尽管对下咽癌的手术治疗、放疗、化疗及靶向药物治疗取得了重要进展,但下咽癌患者的预后尚无明显改善[13]。因此,有必要寻找与下咽癌治疗进展相关的新策略。

隐丹参酮(cryptotanshinone, CPT)作为一种从丹参中提取的天然化合物,目前研究表明其除在心血管疾病及神经退行性疾病中表现出良好的治疗前景[14-16],在多种肿瘤(如肝癌、胰腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌等)中也显示出较好的抗肿瘤活性[17-22]。Luo等[23]研究发现,CPT可抑制肝癌细胞异种移植瘤的生长,且其对肝癌的抗肿瘤机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路后引起的细胞凋亡和自噬有关。黄等[24]的研究发现,CPT能有效抑制胰腺癌细胞的生长和迁移,其作用机制可能与其下调AKT的表达,并进一步导致胰腺癌细胞生长周期阻滞及抑制EMT过程有关。Zhang等[25]研究发现,CPT通过调节MMP/TIMP系统、PI3K/AKT/mTOR信号和HIF-1α核易位,抑制炎症和肿瘤血管生成来抑制结肠癌的生长和侵袭。Jin L等[26]研究发现,CPT通过促进TAZ从核向细胞质的易位减弱非小细胞肺癌细胞的干性,揭示其作为非小细胞肺癌辅助治疗的可能性。

本研究发现,CPT能够抑制人下咽癌细胞FaDu的增殖及迁移能力,且抑制作用呈药物浓度依赖性增强。通过进一步检测CPT对PI3K/AKT信号通路核心蛋白AKT蛋白的影响,结果表明CPT可明显抑制总AKT及p-AKT的表达。本研究表明CPT在下咽癌中表现出较好的抗肿瘤活性,其作用机制可能与其下调AKT的表达,并进一步下调细胞周期蛋白(CDK4及Cyclin D)及上皮细胞-间充质转化蛋白(Vimentin)的表达有关。

5　结论

CPT能明显抑制人下咽癌细胞FaDu的增殖及迁移,其抑制作用可能是通过下调PI3K/AKT信号通路核心蛋白AKT蛋白的表达来实现,但其确切的调控机制还需进一步的研究。本研究为CPT用于下咽癌患者的治疗提供了依据,为其作为抗下咽癌药物的后续开发奠定基础。

参 考 文 献

[1] Garneau JC, Bakst RL, Miles BA. Hypopharyngeal cancer: a state of the art review[J]. Oral Oncol, 2018, 86: 244-250.

[2] Belcher R, Hayes K, Fedewa S, *et al*. Current treatment of head and neck squamous cell cancer[J]. J Surg Oncol, 2014, 110(5): 551-574.

[3] Li JF, Zheng MY, Wang CY, *et al*. Cryptotanshinone attenuates allergic airway inflammation through negative regulation of NF-κ B and p38 MAPK[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(2): 268-278.

[4] 曾金, 张志荣, 缪萍, 等. 隐丹参酮的药理作用研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(6): 1309-1313.

[5] Chen WX, Lu Y, Chen GY, *et al*. Molecular evidence of cryptotanshinone for treatment and prevention of human cancer[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(7): 979-987.

[6] Xiong S, Wang RH, Chen Q, *et al*. Cancer-associated fibroblasts promote stem cell-like properties of hepatocellular carcinoma cells through IL-6/STAT3/Notch signaling[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(2): 302-316.

[7] Qi PF, Li YL, Liu XM, *et al*. Cryptotanshinone suppresses non-small cell lung cancer via microRNA-146a-5p/EGFR axis[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(5): 1072-1079.

[8] Zhang WD, Yu WY, Cai GP, *et al*. A new synthetic derivative of cryptotanshinone KYZ3 as STAT3 inhibitor

for triple-negative breast cancer therapy[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11): 1098.

[9] Hall SF, Groome PA, Irish J, *et al*. The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx[J]. Laryngoscope, 2008, 118(8): 1362-1371.

[10] Cooper JS, Porter K, Mallin K, *et al*. National cancer database report on cancer of the head and neck: 10-year update[J]. Head Neck, 2009, 31(6): 748-758.

[11] 周梁. 下咽癌的治疗进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2019, 25(4): 333-338.

[12] Buckley JG, MacLennan K. Cervical node metastases in laryngeal and hypopharyngeal cancer: a prospective analysis of prevalence and distribution[J]. Head Neck, 2000, 22(4): 380-385.

[13] Vasudevan HN, Yom SS. Combining systemic therapy with radiation: head and neck cancer treatments in an era of targeted agents and immunotherapy[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2020, 18(7): 907-913.

[14] 张芳艳, 梅峥嵘, 陈少锐, 等. 隐丹参酮对谷氨酸诱导的皮层神经元凋亡的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(6): 667-669.

[15] Kwon H, Cho E, Jeon J, *et al*. Cryptotanshinone enhances neurite outgrowth and memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 136: 111011.

[16] Du Y, Du LJ, He ZX, *et al*. Cryptotanshinone ameliorates the pathogenesis of systemic lupus erythematosus by blocking T cell proliferation[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 74: 105677.

[17] Chang JHM, Lin CH, Shibu MA, *et al*. Cryptotanshinone (Dsh-003) from *Salvia miltiorrhiza Bunge* inhibits prostaglandin E2-induced survival and invasion effects in HA22T hepatocellular carcinoma cells[J]. Environ Toxicol, 2018, 33(12): 1254-1260.

[18] Ge YQ, Yang B, Chen Z, *et al*. Cryptotanshinone suppresses the proliferation and induces the apoptosis of pancreatic cancer cells via the STAT3 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 7782-7788.

[19] Wang JY, Zhang GJ, Dai CY, *et al*. Cryptotanshinone potentiates the antitumor effects of doxorubicin on gastric cancer cells via inhibition of STAT3 activity[J]. J Int Med Res, 2017, 45(1): 220-230.

[20] Li WD, Saud SM, Young MR, *et al*. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth *in vitro*[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1-2): 63-73.

[21] Zhang JT, Wen GL, Sun LH, *et al*. Cryptotanshinone inhibits cellular proliferation of human lung cancer cells through downregulation ofIGF-1R/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2018, 40(5): 2926-2934.

[22] Liu YD, Lin FL, Chen YD, *et al*. Cryptotanshinone inhibites bladder cancer cell proliferation and promotes apoptosis via the PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. J Cancer, 2020, 11(2): 488-499.

[23] Luo Y, Song L, Wang XY, *et al*. Uncovering the mechanisms of cryptotanshinone as a therapeutic agent against hepatocellular carcinoma[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1264.

[24] 黄治伟, 谭鹏, 杜毅超, 等. 隐丹参酮对胰腺癌细胞生物学行为的影响及作用机制[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(9): 1060-1068.

[25] Zhang L, Chen C, Duanmu JX, *et al*. Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1α nuclear translocation[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 429-437.

[26] Jin LL, Wu ZZ, Wang YL, *et al*. Cryptotanshinone attenuates the stemness of non-small cell lung cancer cells via promoting TAZ translocation from nuclear to cytoplasm[J]. Chin Med, 2020, 15: 66.

(2021-03-31 收稿)

专 家 简 介



李晓红，西南医科大学附属医院教授，健康管理部主任，中国康复医学会第一届健康管理专业委员会委员，四川省医师协会第二届健康管理分会副会长，四川省医学会第四届健康管理专业委员会常务委员，泸州市医学会健康管理专业委员会主任委员，泸州市健康体检医疗质量控制中心业务主任，四川省西部精神医学第二届协会营养运动与心身健康专委会委员。从事临床医疗、教学、科研工作20余年。擅长神经病学常见病多发病诊治，面瘫、脑卒中管理，正念、中医养生保健调理，慢病筛查、慢病健康管理等。主持省级及校级课题多项，发表中文外文期刊论文50余篇。科研成果曾先后获四川省人民政府科技进步三等奖，四川省科技进步二等奖，泸州市科技进步一等奖。受评为“泸州市青年岗位能手”、“泸州市杰出青年岗位能手”、西南医科大首届“金教鞭之星”、西南医科大学优秀教师等荣誉。