基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1798-03

丹参酮ⅡA对人胆管癌HCCC-9810细胞增殖及VEGF表达的影响

周 军,郑 军,肖文波,刘益军
(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察丹参酮ⅡA(Tanshinone ⅡA)对人胆管癌HCCC-9810细胞增殖和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响,探讨其可能抗肿瘤的作用机制。方法:体外培养人胆管癌HCCC-9810细胞株,采用MTT比色法观察不同浓度和作用时间下丹参酮ⅡA对HCCC-9810细胞的增殖抑制情况;RT-PCR法检测细胞中VEGF mRNA的转录情况;Western blot法检测细胞内VEGF蛋白的表达。结果:低质量浓度丹参酮ⅡA(0.1 mg/L)对HCCC-9810细胞增殖抑制作用不明显,但当质量浓度达到0.25 mg/L以上时,则能显著抑制胆管癌细胞的增殖,其抑制效应随时间和浓度的增加呈逐渐增强,同时抑制癌细胞内VEGF mRNA的转录和VEGF蛋白的表达($P<0.01$)。结论:丹参酮ⅡA在体外能显著抑制HCCC-9810细胞增殖,并能抑制VEGF基因表达,提示这可能是其抗肿瘤的作用机制之一。

【关键词】丹参酮ⅡA;胆管癌;血管内皮生长因子
【中国图书分类法分类号】R735.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-17

Influence of Tanshinone ⅡA on cell proliferation and vascular endothelial growth factor expression in human bile duct carcinoma cell line HCCC-9810

ZHOU Jun, et al
(*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the influence of Tanshinone ⅡA on cell proliferation and vascular endothelial growth factor expression in human bile duct carcinoma cell line HCCC-9810, and to explore its possible anti-tumor mechanism of action. *Methods*: Human bile duct carcinoma HCCC-9810 cells were cultured in vitro and treated with tanshinone ⅡA. The cell proliferation was examined by the method of MTT; the transcriptions of VEGF mRNA were demonstrated by RT-PCR technique; Western blot was applied to examine the protein expression of VEGF. *Results*: Low-dose (0.1 mg/L) tanshinone ⅡA has no significant inhibitory effect on cellular proliferation of HCCC-9810 cells. When the concentration exceeded 0.25 mg/L, tanshinone ⅡA significantly inhibited cellular proliferation in a time-and concentration-dependent manner, and down regulated the mRNA and protein expression of VEGF ($P<0.01$). *Conclusion*: Within a certain drug concentration, tanshinone ⅡA can inhibit the proliferation of HCCC-9810 cells and play a potential role in inhibiting angiogenesis by down-regulating the expression of VEGF.

【Key words】Tanshinone ⅡA; Bile duct carcinoma; VEGF

丹参酮ⅡA(Tanshinone ⅡA)是从中药丹参中提取的有效成分,具有天然的抗氧化作用。近年来研究表明,丹参酮ⅡA对多种肿瘤细胞具有生长抑制、诱导凋亡作用[1-3],本研究采用不同质量浓度的丹参酮ⅡA作用于人胆管癌HCCC-9810细胞株,通过MTT法观察丹参酮ⅡA对胆管癌细胞的增殖抑制作用,并检测其对肿瘤细胞血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响,以进一步探讨丹参酮ⅡA抗肿瘤的有关机制,为临床应用提供理论依据。

作者介绍:周 军(1981-),男,硕士,
研究方向:消化道肿瘤的基础与临床研究。
通讯作者:郑 军,男,副教授,E-mail:from3891@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 材料

人胆管癌HCCC-9810细胞株购自中科院上海生命科学研究院细胞库;丹参酮ⅡA系由中国药品鉴定所提供的化学

标准品,用二甲亚砜(DMSO)溶解,4℃冷藏备用;细胞培养液 RPMI1640(GIBCO 公司);小牛血清(杭州四季青公司);噻唑蓝(MTT)、DMSO(Sigma 公司);兔抗人 VEGF 单克隆抗体(碧云天公司);RNA 提取试剂 TRIZOL 及 2×Taq PCR MasterMix(北京天根生化科技公司);RT 试剂盒(TOYOBO 公司);X-光胶片(柯达公司);滤纸(Whatman 公司);PVDF 膜(Millipore 公司);显影液、定影液(上海冠龙化学发光试剂 Shine-Gene 公司);预染蛋白 marker(Fermentas);HRP 二抗、内参一抗(南京金思特公司)。人胆管癌细胞株 HCCC-9810 培养于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液,置于 37℃、CO_2 体积分数为 5%培养箱中培养。1~2 d 换液,3~4 d 传代 1 次,实验时选用对数生长期细胞。

1.2 方法

1.2.1 MTT 比色法检测 将 HCCC-9810 细胞密度调整为 1.0×10^6 个/ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,置于 37℃、CO_2 体积分数为 5%培养箱中培养。实验设空白对照组、细胞对照组(对照组)和实验组。待细胞贴壁后于实验组加入丹参酮ⅡA,使其质量浓度分别为 0.1、0.25、0.5、1.0 mg/L 4 个浓度组,空白对照组为只加培养液,不加细胞,每组 5 个复孔。分别培养 24、48 h 及 72 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/ml) 20 μl,继续培养 4 h 后,吸去培养液,每孔加入二甲基亚砜 50 μl,用酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度(A)值。每组实验重复 3 次,取均值。计算细胞抑制率,细胞抑制率 =(1-实验组 A 值/细胞对照组 A 值)×100%。

1.2.2 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 表达 丹参酮ⅡA(0.25、0.5 mg/L 和 1.0 mg/L)处理 HCCC-9810 细胞 48 h 后,用 Trizol 提取细胞总 RNA,各样本取 5 μg 总 RNA,按 RT 试剂盒说明书进行 cDNA 合成,取 2 μl RT 产物进行 PCR 反应。引物序列如下:VEGF:上游引物 5'-TTGCTGCTCTACCTCCAC-3',下游引物 5'-AATGCTTTCTCCGCTCTG-3';β-actin(内参照):上游引物 5'-CCATGTACGTTGCTATCCAGG-3',下游引物:5'-TCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'(上海生工生物工程技术服务有限公司合成),扩增产物分别为:417 bp 和 252 bp。PCR 扩增体系 25 μl,反应条件为:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 30 s,循环 35 次,终延伸 72℃ 5 min。PCR 产物经 1.2%TAE 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照。用凝胶成像分析系统分析结果,mRNA 的相对表达量 =IOD 值目的基因 VEGF/IOD 值内参照 β-actin[积分光密度(Intergrated optical density,IOD)]。

1.2.3 Western blot 法检测 VEGF 蛋白表达 丹参酮ⅡA(0、0.25、0.5、1.0 mg/L)处理 HCCC-9810 细胞,48 h 后收集细胞,加入 300 μl 蛋白裂解液,静置 5 min,4℃,12 900 g,离心 10 min,取上清液,测定总蛋白浓度。取 40 μg 蛋白行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电泳结束后冲洗凝胶,蛋白转移到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭非特异性抗原后,加入 1:500 稀释的 VEGF 单克隆抗体,1:3 000 稀释的 GAPDH 为内参标准,温育 1.5 h,用 TBST 清洗 3 次,每次 10 min。加入 1:5 000 稀释的二抗,温育 1.5 h,用 TBST 清洗 4 次,每次 10 min。化学发光,显影,定影。对胶片进行扫描,然后用 UVP 凝胶图象处理系统,Labworks4.6 软件分析目的条带的光密度值,将 VEGF 和 GAPDH 比值作为蛋白相对表达水平。

1.3 统计学处理

应用统计软件包 SPSS16.0 进行统计学分析,数据进行正态分布检验和方差齐性检验,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数间比较采用方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,以 $P<0.01$ 为有显著统计学差异。

2 结 果

2.1 丹参酮ⅡA 对胆管癌 HCCC-9810 细胞的生长抑制作用

不同质量浓度的丹参酮ⅡA(0.1、0.25、0.5 mg/L 和 1.0 mg/L)作用不同时间(24、48 h 和 72 h),对 HCCC-9810 细胞抑制效应见表 1、图 1。当药物浓度为 0.1 mg/L 时,与空白对照组比较,对细胞增殖抑制不明显,即使延长作用时间至 72 h,其抑制率仅为 13.69%,而质量浓度达 0.25 mg/L 及以上时丹参酮ⅡA 对胆管癌 HCCC-9810 细胞均呈明显的抑制作用,且呈时间和浓度依赖性,各浓度组与对照组之间的差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 不同浓度丹参酮ⅡA 对胆管癌 HCCC-9810 细胞 VEGF mRNA 表达的影响

经半定量分析后发现,随着丹参酮ⅡA 浓度的增加,VEGF mRNA 的表达呈现出相应的下降趋势(图 2,表 2)。对照组,0.25、0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 丹参酮ⅡA 处理组 VEGF/β-actin 光密度比值分别为 0.819±0.026、0.642±0.017、0.534±0.026 和 0.452±0.047。与对照组比较,丹参酮ⅡA 各质量浓度组 VEGF mRNA 的表达均显著降低,组间差异具有显著统计学意义($F=130.62$,$P<0.01$)。

表 1 不同浓度、不同时间丹参酮ⅡA 作用胆管癌 HCCC-9810 细胞后的吸光度($n=5$)

组别(mg/L)	24 h	48 h	72 h
对照组	0.462±0.017	0.736±0.027	1.241±0.404
0.1	0.426±0.001	0.653±0.018	1.071±0.017
0.25	0.354±0.009	0.426±0.031	0.688±0.017
0.5	0.284±0.013	0.264±0.009	0.412±0.030
1.0	0.195±0.006	0.197±0.017	0.153±0.013
F 值	$F=505.09$	$F=582.14$	$F=30.77$
P 值	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

2.3 Western blot 法检测胆管癌 HCCC-9810 细胞中 VEGF 蛋白表达

经测量分析后发现，丹参酮ⅡA 作用胆管癌 HCCC-9810 细胞 48 h 后，随着药物浓度的增加，VEGF 蛋白的表达逐渐下调(图 3，表 3)。对照组，0.25、0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 丹参酮ⅡA 处理组 VEGF/GAPDH 光密度比值分别为 0.637 ± 0.009、0.474 ± 0.017、0.354 ± 0.014 和 0.144 ± 0.015。与对照组比较，丹参酮ⅡA 各质量浓度组 VEGF 蛋白的表达均显著降低，组间差异具有统计学意义(F=1 548.5，P<0.01)。

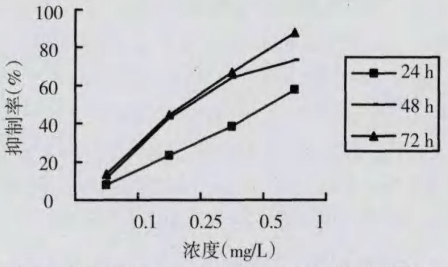
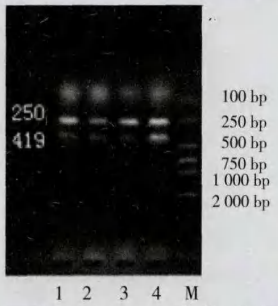
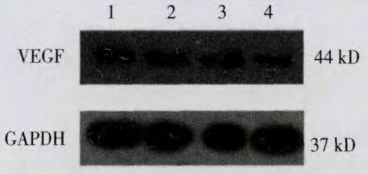


图 1 丹参酮ⅡA 对 HCCC-9810 细胞的抑制作用



1. 0.25 mg/L；2. 0.5 mg/L；3. 1.0 mg/L；4. 对照组；M. Marker PRI 2000

图 2 半定量 RT-PCR 法检测细胞内 VEGF mRNA 的表达



1. 对照组；2. 0.25 mg/L；3. 0.5 mg/L；4. 1.0 mg/L

图 3 Western blot 法检测 VEGF 蛋白的表达

表 2 丹参酮ⅡA 作用 48 h 对细胞 VEGF mRNA 转录的影响(n=5)

丹参酮ⅡA (mg/L)	VEGF mRNA
对照组	0.819 ± 0.026
0.25	0.642 ± 0.017 *
0.5	0.534 ± 0.026 *
1.0	0.452 ± 0.047 *
F 值	F=130.62
P 值	P<0.01

注 *: P<0.01，与对照组比较组间差异具有统计学意义。

表 3 Western blot 法检测 VEGF 蛋白的表达(24 h)(n=5)

丹参酮ⅡA(mg/L)	IOD (VEGF/GAPDH)
对照组	0.637 ± 0.009
0.25	0.474 ± 0.017 *
0.5	0.354 ± 0.014 *
1.0	0.144 ± 0.015 *
F 值	F=1 548.5
P 值	P<0.01

注 *: P<0.01，与对照组比较组间差异具有统计学意义。

3 讨 论

近年来中药以其天然自然、毒副作用小的优势为肿瘤的防治提供了新的方法和思路，其中丹参酮ⅡA 是从中药丹参中提取的有效成分，具有天然的抗氧化作用，对多种肿瘤细胞具有杀伤作用。齐伟等[4]研究表明丹参酮ⅡA 在体外能抑制胆管癌细胞增殖、诱导细胞凋亡同时抑制 Survivin 基因表达，本实验中，低浓度的丹参酮ⅡA(0.1 mg/L)，即使延长作用时间至 72 h，其抑制率仅为 13.69%，而当质量浓度在 0.25 mg/L 及以上时，丹参酮ⅡA 则表现出明显的时间和浓度依赖地抑制肿瘤细胞增殖的效应(P<0.01)。

现代医学研究表明，肿瘤血管的生成在肿瘤的生长和转移过程中发挥重要作用，肿瘤和血管生成之间的相互作用机制也得到明确[5,6]。肿瘤的生长和转移依赖新生血管的生成，肿瘤血管的生成时由一系列促血管生成因子引发和维持的病理血管生成过程，其中 VEGF 是重要的细胞调节因子，在肿瘤组织中有较高表达[7,8]。VEGF 不仅与肿瘤血管的生成有关，还直接参与了肿瘤的侵袭和转移等病理过程[9,10]，因此通过抑制 VEGF 等促血管生成因子的表达可抑制肿瘤的生长、侵袭和转移，可能成为治疗肿瘤新的方法[11-13]。

本研究同时发现，以不同质量浓度的丹参酮ⅡA(0.25、0.5、1.0 mg/L)作用胆管癌癌 HCCC-9810 细胞后，经 RT-PCR 法检测后表明：随着药物质量浓度的增加，细胞内 VEGF mRNA 的表达逐渐下调(P<0.01)，进一步经 Western blot 法检测，随着药物质量浓度的增加，VEGF 蛋白的表达也逐渐降低(P<0.01)。

综上推测，丹参酮ⅡA 不仅能抑制胆管癌 HCCC-9810 细胞增殖，同时能抑制肿瘤细胞内 VEGF mRNA 的转录和蛋白的表达，这提示丹参酮ⅡA 可能具有潜在的抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移的作用，但是目前对丹参酮ⅡA 抑制肿瘤生长的机制及其对 VEGF 的影响途径尚不十分清楚。可以预测，随着研究的不断深入，丹参酮ⅡA 作为临床潜在的抗肿瘤辅助药物，其抑制肿瘤细胞增殖及抗肿瘤血管生成将得到更深层次分子机制的支持。

参 考 文 献

[1] 翟学敏，禾水祥，任牡丹，等. 丹参酮ⅡA 对人肝癌 SMMC-7721 细胞 EGF 及其受体表达的影响[J].浙江大学学报(医学版)，2009，38(2)：163-169.

[2] 陈 坚，钟 良，钱利平，等. 丹参酮ⅡA 诱导 SGC 胃癌细胞凋亡及机制[J].复旦学报(医学版)，2007，34(1)：57-65.

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1801-05

辛伐他汀预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后炎症介质及NOS的影响

安 民,刘丹彦,吴会生,雷 蕾
(重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨辛伐他汀预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后肿瘤坏死因子(Tumer nectosis factor-α,TNF-α)、白介素-10(Interleukim-10,IL-10)、S-100蛋白以及一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase,NOS)亚型的影响。方法:雄性SD大鼠72只,随机分为假手术组(C组),缺血再灌注损伤组(I/R组)和辛伐他汀预处理组(Si组)(20 mg/kg灌胃,术前连续3 d),采用Zivin改进法建立模型,造模成功后,分别在再灌注6、12、24 h,取脊髓组织作HE形态学染色;ELISA法测定组织TNF-α,IL-10;应用免疫组化法检测脊髓S-100蛋白;比色法检测组织NOS各亚型以及测定24 h内神经功能评分。结果:I/R组各时间点TNF-α与S-100蛋白表达量呈显著正相关;与I/R组相比,Si组形态学的损伤改变较轻;Si组能提高再灌注后12、24 h神经功能评分,降低各时间点TNF-α含量及再灌注后12、24 h S-100蛋白的表达,提高再灌注6、12 h结构型NOS(Constitutcive NOS, cNOS)活性,降低再灌注12、24 h诱导型NOS(Inducible NOS,iNOS)活性,但IL-10含量在再灌注24 h上升不如I/R组明显。结论:脊髓缺血再灌注损伤后,组织S-100蛋白的表达与炎症反应具有一定相关性。辛伐他汀预先给药后,S-100蛋白的表达减少,脊髓缺血再灌注损伤减轻,神经功能得到改善,其机制可能与减少TNF-α的释放,上调cNOS表达,降低iNOS活性有关,但辛伐他汀不能通过增加IL-10的释放而发挥保护作用。

【关键词】辛伐他汀;脊髓缺血再灌注损伤;肿瘤坏死因子;S-100;白介素-10;一氧化氮合酶
【中国图书分类法分类号】R614.27 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-13

Effects of Simvastatin pretreatment on expression of inflammatory mediators and NOS in rats subjected to spinal cord ischemia-reperfusion injury

AN Min, et al
(*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of simvastatin pretreatment on expression of TNF-α, S-100 protein, IL-10 and the subtypes of NOS in rats subjected to spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Methods*: 72 healthy male SD rats were randomly divided into three groups: sham operation(group C), ischemia-reperfusion injury (group I/R) and simvastatin pretreatment (group Si) (20 mg/kg for 3 days via an orogastric tube before the operation).

作者介绍:安 民(1985-),女,硕士,研究方向:围术期脑保护。
通讯作者:刘丹彦,女,副教授,E-mail: liudanyan418@sina.com.cn。

[3] 张 欣,张蒲蓉,陈 洁,等.丹参酮ⅡA对乳腺癌抑制作用的体内实验研究[J].四川大学学报:医学版,2010,41(1):62-67.
[4] 齐 伟,黄 强,王 成,等.丹参酮ⅡA对人胆管癌细胞Survivin表达的影响及意义[J].肝胆外科杂志,2008,16(6):452-454.
[5] Chen L,Shibasaki F.Angiogenesis and meta stasis of carcinoma[J].Clin Calcium,2006,16(4):613-619.
[6] Moon W S,Rhyu K H,Kang M J,et al.Overexpression of VEGF and angiopoietin 2:a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma[J].Mod Pathol,2003,16(6):552-557.
[7] 钟 崇,郭荣平,石 明,等.VEGF与MMP-9在肝癌组织中的表达及其临床意义[J].癌症,2006,25(5):599-603.
[8] 雷 杰,费建东,刘振显,等.乳腺癌组织中Ang-2及VEGF的表达及意义[J].肿瘤防治研究,2008,35(4):263-265.
[9] Garzet G G,Ciavattini A,Lucarini G,et al. Expression of vascular endothelial growth factor related to 72-kilodalton metalloprotei nase immunostaining in patients with serous ovari- antumors[J].Cancer,1999,85(10):2219-2225.
[10] 高砚春,吴城义.COX-2、VEGF-C在乳腺癌中的表达及与淋巴转移的关系[J].重庆医科大学学报,2007,32(9):915-918.
[11] Wang S C,Liu H,Ren L F,et al.Inhibiting colorectal carcinoma growth and metastasis by blooking the expression of VEGF using RNA int erference[J].Neoplasia,2008,10(4):399-407.
[12] Hotz H G,Hines O J,Masood R,et al.VEGF antisanse therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer[J].Surgery,2005,137(2):192-199.
[13] Grothey A,Ellis L M.Targeting angiogene sis driven by vascular endothelial growth factors using antibody-based thera-pies[J].Cancer J,2008,14(3):170-177.

(责任编辑:关蕴良)