

丹参酮 II A对胃癌细胞迁移和侵袭能力的抑制作用及机制

赵雪峰 贾楠 李勇 范立侨 王冬

河北医科大学第四医院普外科, 河北 石家庄 050011

[摘要] **背景与目的:** 有研究证实, 丹参酮 II A (tanshinone II A) 对肿瘤细胞具有抑制增殖、诱导分化和促凋亡的作用, 并可抑制骨肉瘤细胞迁移和侵袭。但丹参酮 II A抑制胃癌侵袭和转移的机制尚不明确。本研究主要探讨丹参酮 II A对人胃癌SGC7901细胞体外迁移和侵袭的影响。**方法:** 不同浓度(0.5、1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)丹参酮 II A分别作用体外培养的胃癌SGC7901细胞24、48、72 h后, MTT比色法检测细胞增殖活力的改变; 细胞划痕实验观察细胞的迁移能力的改变; 3D侵袭实验观察细胞侵袭能力的改变; Real-time PCR和蛋白质印迹法(Western blot)分别检测细胞间黏附分子1(ICAM-1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)mRNA和蛋白的表达水平改变。**结果:** 1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丹参酮 II A对胃癌细胞株SGC7901有明显的抑制作用, 且抑制作用存在时间-剂量依赖性($P<0.05$); 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丹参酮 II A呈时间依赖性抑制SGC7901细胞迁移; 1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丹参酮 II A呈浓度依赖性抑制SGC7901细胞侵袭; 丹参酮 II A下调SGC7901细胞ICAM-1、MMP-2、MMP-9表达, 同时可上调TIMP-2表达($P<0.05$)。**结论:** 丹参酮 II A可抑制胃癌SGC7901细胞的迁移和侵袭, 上调TIMP-2的表达, 下调ICAM-1、MMP-2、MMP-9的表达, 可能是其作用机制之一。

[关键词] 丹参酮 II A; 胃癌; 迁移; 侵袭

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.10.003

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)10-0793-05

Tanshinone II A inhibits migration and invasion of human gastric cancer SGC7901 cells ZHAO Xue-feng, JIA Nan, LI Yong, FAN Li-qiao, WANG Dong (Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050051, China)

Correspondence to: LI Yong E-mail: li_yong_hbth@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Recently, it was reported that tanshinone II A (Tan II A) could inhibit proliferation, induce differentiation and apoptosis of human cancer cells. Previous studies also indicated that Tan II A could inhibit the migration and invasion of osteosarcoma. However, the effects of Tan II A on the migration and invasion of gastric cancer and the mechanism remains unclear. The aim of this study was to investigate the effect of Tan II A on gastric cancer cell SGC7901 migration and invasion of *in vitro*. **Methods:** After different concentrations (0.5, 1, 2, and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of Tan II A treatment for 24, 48, and 72 h respectively, MTT assay were developed to detect the cell proliferation of SGC7901. The wound healing assay and 3D-transwell assay were used to observe the migration and invasion of SGC7901 cells, respectively. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) mRNA and protein were measured with real-time PCR and Western blot. **Results:** 1, 2, and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tan II A showed a dose- and time- dependent growth inhibition on SGC7901 cells. 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tan II A showed a time-dependent migration inhibition of SGC7901 cells. 1, 2, and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tan II A could inhibit the invasion of SGC7901 cells. Real-time PCR and Western blot showed a reduction in expression of ICAM-1, MMP-2, and MMP-9, as well as an increase in expression of TIMP-2 ($P<0.05$). **Conclusion:** Tan II A inhibits human gastric cancer SGC7901 cell migration and invasion *in vitro*. TIMP-2 upregulation and, ICAM-1, MMP-2, MMP-9 downregulation might be one of the mechanisms of anti-tumor of Tan II A.

[Key words] Tanshinone II A; Gastric cancer; Migration; Invasion

胃癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 在中国和亚洲其他国家发病率较高^[1-2]。胃癌的治疗仍以手术和化疗为主^[3]。术后复发及远处转移是导致患者死亡的主要原因, 而复发及转移的主要原因在于胃癌细胞有很强的侵袭迁移能力。因此, 抑制胃癌侵袭转移成为胃癌治疗的重要环节。丹参酮是从丹参中提取的化合物, 其中丹参酮II A是脂溶性成分的代表。近年丹参酮II A的抗肿瘤活性受到高度重视。研究发现, 丹参酮II A抑制胃癌细胞生长, 诱导癌细胞分化^[4-5]。另有研究显示, 丹参酮II A可抑制骨肉瘤细胞迁移和侵袭^[6]。本研究旨在体外观察丹参酮II A对人胃癌SGC7901细胞侵袭转移的影响, 并对其分子机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 药物及试剂

SGC-7901细胞为人胃癌细胞株, 购自中国科学院上海细胞研究所。胎牛血清、RPMI 1640细胞培养基、胰蛋白酶, 购自美国GIBCO公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)和丹参酮II A(Tan II A)(纯度>99%)购自Sigma公司; 3D侵袭小室购自美国Costar公司; ICAM-1、MMP-2、MMP-9、TIMP-2抗体购自Santa Cruz公司; TRIzol试剂为美国Invitrogen公司产品; 逆转录试剂盒为Promega公司产品; Real-time PCR试剂盒为Fermentas公司产品; 引物由上海生工生物技术公司合成。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; PVDF膜为Millipore公司产品。

1.2 细胞培养

SGC-7901细胞在含有10%胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI-1640培养基中培养, 在37 °C、CO₂体积分数为5%的条件下恒温温育。每3天用含0.02% EDTA的0.25%胰蛋白酶溶液消化以1:3的比例传代。

1.3 MTT法检测

SGC7901细胞以 5×10^3 个/mL密度接种于96

孔板, 于37 °C、CO₂体积分数为5%的条件下培养24 h后, 用不同浓度的丹参酮II A (0.5、1、2、4 μg/mL)分别处理细胞24、48、72 h, 对照组加入0.1% DMSO。每组设置6个复孔。各实验组于实验结束前4 h加入20 μL的MTT(浓度为5 mg/mL), 培养4 h后, 弃去培养液, 加入150 μL DMSO室温振荡15 min溶解结晶, 用酶标仪于波长490 nm测吸光度值(A值), 以A值表示SGC7901细胞增殖能力。实验重复3次。

1.4 细胞划痕实验

消化后, 胃癌SGC7901细胞悬液以 4×10^5 个/mL密度接种于6孔板, 100%汇合后, 吸尽培养液, 加入PBS液洗涤1次, 沿孔板底部划一直线, 用PBS洗去刮下的SGC7901细胞, 将含2 μg/mL丹参酮II A的培养基加入6孔板, 对照组加入等量0.1% DMSO的培养基, 培养24、48、72 h后, 显微镜下任意取6个视野, 计数越过划痕的细胞数, 以细胞数代表肿瘤细胞的迁移能力。实验重复3次。

1.5 3D侵袭实验

用100 μL Matrigel胶覆盖3D侵袭小室上室, 在超净台中用紫外线照射2 h, 使Matrigel胶充分聚合。用0.25%胰蛋白酶消化, 丹参酮II A(1、2、4 μg/mL)作用16 h, 对照组加入等量0.1% DMSO的培养基, 调整浓度至 4×10^5 个/mL, 每组分别吸200 μL接种于上室, 小室置于24孔板内, 下室加含10%小牛血清的RPMI-1640培养24 h。取出小室, 棉签擦掉上室的Matrigel胶和细胞, 甲醇固定膜10 min, 结晶紫染色, 高倍镜下随机计数6个视野中的细胞数, 以细胞数代表肿瘤细胞的侵袭能力。实验重复3次。

1.6 总RNA提取及Real-time PCR

SGC7901细胞以 5×10^3 个/mL密度接种于6孔板, 于37 °C、CO₂体积分数为5%的条件下培养24 h, 用1、2、4 μg/mL丹参酮II A作用48 h, 溶剂对照加入0.1% DMSO。收集各组细胞, 用TRIzol试剂提取各组细胞总RNA, 用紫外分光光度仪测定RNA浓度及纯度, 并经电泳鉴定后进行逆转

录,以cDNA为模板进行Real-time PCR反应。以GAPDH为内参照。ICAM-1上游引物:5'-GGCTGGAGCTGTTTGAGAAC-3',下游引物:5'-ACTGTGGGTTCAACCTCTG-3';MMP-2上游引物:5'-CCGTGGTGAGATCTTCTTCT-3',下游引物:5'-CCTCGTATACCGCATCAATCT-3';MMP-9上游引物:5'-CTGGCACCACCACAACATCAC-3',下游引物:5'-TACACGCGAGTGAAGGTGAGC-3';TIMP-2上游引物:5'-TATCTACACGGCCCCCTCCT-3',下游引物:5'-CCTCGGCCTTTCCTGCAAT-3';GAPDH上游引物5'-CGGGAATCGTGCGTGAC-3',下游引物5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'。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ICAM-1、MMP-2、MMP-9、TIMP-2表达的相对定量值(RQ值)进行统计学分析。

1.7 蛋白质印迹法(Western blot)检测

SGC7901细胞以 5×10^3 个/mL密度接种于6孔板,于37℃、CO₂体积分数为5%的条件下培养24 h,1、2、4 μg/mL丹参酮II A作用48 h,溶剂对照加入0.1% DMSO。收集各组细胞,用裂解缓冲液(50 mmol/L Tris pH=7.2,1% Triton X-100,0.5%草酸钠,0.1%十二烷基硫酸钠,500 mmol/L NaCl,10 nmol/L MgCl₂,10 mg/mL亮抑肽酶,10 mg/mL抑肽酶和1 mmol/L PMSF)裂解整个细胞,细胞总蛋白经10% SDS-PAGE分离后转到PVDF膜上。PVDF膜在5%脱脂奶粉室温封闭1 h,细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9、组织金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)各目标分子特异性一抗4℃过夜,接着,用辣根过氧化物酶标记的相应的二抗室温温育2 h。ECL法检测结合的条带。以GAPDH作为内参照,用目的蛋白ICAM-1、MMP-2、MMP-9、TIMP-2的吸光度(A)值/内参照A值的比值进行统计比较。

1.8 统计学处理

计数数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0软件进行ANOVA分析处理和Dunnnett检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹参酮II A抑制SGC7901细胞增殖

MTT结果显示,与对照组相比,1、2、4 μg/mL丹参酮II A对胃癌细胞以浓度和时间依赖的方式抑制细胞生长($P < 0.05$,表1)。

表1 丹参酮II A对SGC7901细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of Tan II A on the proliferation of SGC7901 cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h
Control	1.02±0.18	1.04±0.16	1.01±0.15
0.5 μg/mL Tan II A	0.94±0.16	0.87±0.14	0.85±0.13
1 μg/mL Tan II A	0.7±0.13*	0.63±0.11*	0.56±0.07**
2 μg/mL Tan II A	0.62±0.08*	0.52±0.06**	0.44±0.06**
4 μg/mL Tan II A	0.53±0.07*	0.42±0.06**	0.32±0.05**Δ

*: $P < 0.05$ compared with control group; #: $P < 0.05$ compared with 24 h of the same group; Δ: $P < 0.05$ compared with 48 h of the same group.

2.2 丹参酮II A抑制SGC7901细胞迁移

划痕实验结果显示,与对照组相比,2 μg/mL丹参酮II A组随着作用时间的延长,细胞迁移能力逐渐下降,呈明显的效应-时间依赖关系($P < 0.05$,表2,图1)。

表2 丹参酮II A对SGC7901细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of Tan II A on the migration of 7901 cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h
Control	305.18±41.82	316.04±40.11	315.22±41.82
2 μg/mL Tan II A	187.17±20.26*	137.44±14.67**	104.43±13.27**Δ

*: $P < 0.05$ compared with control group; #: $P < 0.05$ compared with 24 h of the same group; Δ: $P < 0.05$ compared with 48 h of the same group.

2.3 丹参酮II A抑制SGC7901细胞侵袭

Transwell小室侵袭实验结果显示,与对照组相比,1、2、4 μg/mL丹参酮II A组细胞侵袭能力逐渐下降,呈明显的效应-浓度依赖关系($P < 0.05$,表3)。

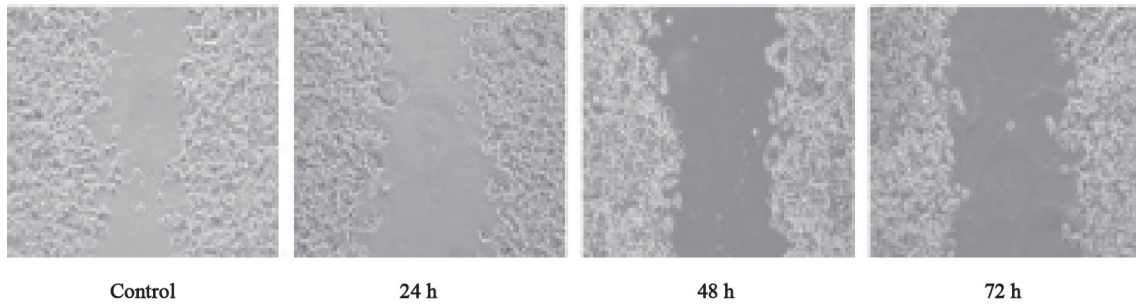


图 1 丹参酮 II A 对 SGC7901 细胞迁移的影响

Fig. 1 Effects of Tan II A on the migration of SGC7901 cell lines

表 3 丹参酮 II A 对 SGC7901 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of Tan II A on the invasion of SGC7901 cell lines

Group	n	($\bar{x} \pm s$)
Control		99.81 ± 12.89
1 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A		69.03 ± 11.97*
2 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A		50.61 ± 8.78*
4 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A		43.53 ± 7.07*

*: $P < 0.05$ compared with control group.

2.4 丹参酮 II A 对 SGC7901 细胞迁移和侵袭相关分子表达的影响

Real-time PCR 和 Western blot 分析结果显示, 与对照组相比, 2、4 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II A 组细胞内 ICAM-1、MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达下调 ($P < 0.05$), TIMP-2 mRNA 和蛋白表达上调 ($P < 0.05$); 1 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II A 组细胞内 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1、MMP-2 蛋白表达下调 ($P < 0.05$), TIMP-2 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$, 表 4、5, 图 2)。

表 4 丹参酮 II A 对 SGC7901 细胞 ICAM-1、MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of Tan II A on the ICAM-1, MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 mRNA level of SGC7901 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	ICAM-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-2
Control	1.19 ± 0.17	1.02 ± 0.30	0.98 ± 0.21	1.07 ± 0.16
1 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A	0.75 ± 0.15*	0.70 ± 0.11	0.86 ± 0.15	1.65 ± 0.17*
2 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A	0.52 ± 0.16*	0.60 ± 0.05*	0.60 ± 0.11*	3.35 ± 0.57*
4 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A	0.34 ± 0.01*	0.41 ± 0.04*	0.36 ± 0.04*	4.68 ± 0.60*

*: $P < 0.05$ compared with control group.

表 5 丹参酮 II A 对 SGC7901 细胞 ICAM-1、MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of Tan II A on the protein levels ICAM-1, MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in SGC7901 cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Group	ICAM-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-2
Control	1.09 ± 0.16	0.87 ± 0.14	1.16 ± 0.20	0.33 ± 0.06
1 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A	0.65 ± 0.11*	0.60 ± 0.09*	0.81 ± 0.17	0.42 ± 0.07
2 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A	0.47 ± 0.07*	0.41 ± 0.05*	0.62 ± 0.11*	0.75 ± 0.12*
4 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A	0.31 ± 0.04*	0.28 ± 0.04*	0.41 ± 0.06*	0.94 ± 0.16*

*: $P < 0.05$ compared with control group.

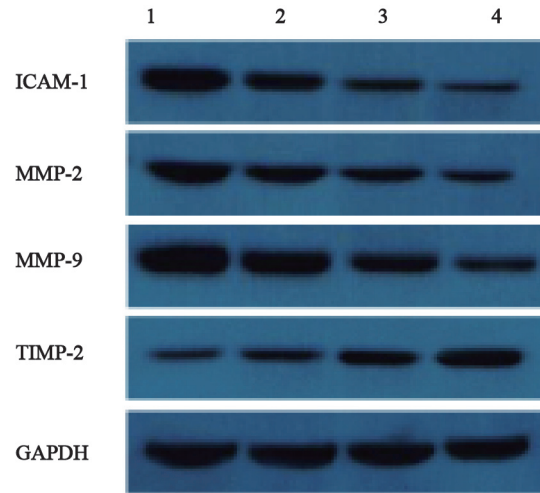


图 2 丹参酮 II A 对 SGC7901 细胞 ICAM-1、MMP-2、MMP-9、TIMP-2 蛋白的影响

Fig. 2 Effects of Tan II A on the protein level of SGC7901 cell lines

1: Control; 2: 1 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A; 3: 2 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A; 4: 4 $\mu\text{g/mL}$ Tan II A.

3 讨 论

肿瘤转移是恶性肿瘤恶化的结果,而迁移和侵袭能力的增强则是发生转移的基础。丹参酮IIA具有广泛的生理作用,如抗炎和抗氧化作用等^[7],其中对心脑血管病的研究取得了显著的成绩,受到国内外学者的高度关注。近年来有研究表明,丹参酮IIA可抑制骨肉瘤和肝癌细胞的迁移和侵袭^[6,8],而丹参和赤芍则能促进大鼠移植瘤模型肝转移的发生^[9]。由于肿瘤细胞的特点各异,药物作用的机制差别很大。因此,本研究观察了丹参酮IIA对胃癌侵袭转移的作用和可能的机制,以深化对丹参酮IIA抗肿瘤作用的认识。

肿瘤的侵袭转移是一个复杂过程,主要包括细胞黏附、蛋白降解和移动3个步骤,其中,黏附是肿瘤发生转移的始动因素,而ICAM-1具有介导细胞间、细胞与胞外基质间黏附的功能。本研究结果发现,对照组细胞ICAM-1表达水平较高;而丹参酮IIA作用后,ICAM-1表达明显下调。肿瘤转移、侵袭与多种转移相关蛋白降解和破坏细胞外基质有关,基质金属蛋白酶(MMPs)家族成员多是降解和破坏细胞外基质的主要蛋白水解酶类,其中以MMP-2和MMP-9与胃癌的生长、浸润及转移关系最密切^[10]。本研究发现,以丹参酮IIA作用胃癌SGC7901细胞后,细胞内MMP-2和MMP-9 mRNA和蛋白表达逐渐下调。金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)是MMPs的抑制剂,可通过与MMPs非共价结合抑制其对基底膜的降解。本研究显示,丹参酮IIA作用与SGC7901细胞后,可上调TIMP-2 mRNA和蛋白表达,提示丹参酮IIA可通过不同途径抑制胃癌细胞侵袭和转移。

综上所述,丹参酮IIA可上调TIMP-2的表

达、下调ICAM-1、MMP-2、MMP-9的表达,且具有抑制胃癌SGC7901细胞的侵袭和转移的作用。然而,更深层次分子机制及信号途径等尚未明确,随着研究的不断深入,丹参酮IIA作为临床潜在的抗肿瘤药物,其抗肿瘤机制会得到更多的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] LEUNG W K, WU M S, KAKUGAWA Y, et al. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice [J]. Lancet Oncol, 2008, 9 (3): 279-287.
- [3] WAGNER A D, GROTHE W, HAERTING J, et al. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(18): 2903-2909.
- [4] 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.
- [5] 郭庆寅, 伍学强, 刘玉峰. 丹参酮IIA诱导NB4细胞分化与PML-RAR α 融合蛋白的关系 [J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(1): 15-20.
- [6] ZHANG Y, WEI R X, ZHU X B, et al. Tanshinone IIA induces apoptosis and inhibits the proliferation, migration, and invasion of the osteosarcoma MG-63 cell line in vitro [J]. Anticancer Drugs, 2012, 23(2): 212-219.
- [7] 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.
- [8] YUXIAN X, FENG T, REN L, et al. Tanshinone II-A inhibits invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo [J]. Tumori, 2009, 95(6): 789-795.
- [9] 丁罡, 宋明志, 于尔辛. 丹参、赤芍对大鼠Walker 256 癌肝转移影响机制的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2001, 11(4): 364-366.
- [10] PATEL S, SUMITRA G, KONER B C, et al. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression [J]. Clin Biochem, 2011, 44 (10-11): 869-872.

(收稿日期: 2013-03-04 修回日期: 2013-09-16)