

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.008

丹酚酸 B 通过抑制线粒体功能增加胶质瘤细胞的放疗敏感性*

武子朝¹ 韩瑞阳² 朱建彪¹ 魏煜军¹ 魏龙晓^{3△}

(1 西安市安康医院 陕西 西安 710104; 2 西安市兵器工业五二一医院 陕西 西安 710065;

3 第四军医大学唐都医院 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究药用植物丹参的根茎提取成分丹酚酸 B 对人胶质瘤 U251 细胞的放疗增敏作用,并探讨其可能的分子机制。**方法:**使用 1 μM 浓度的丹酚酸 B 处理胶质瘤 U251 细胞,并用等量 PBS 建立对照组,使用射线照射建立放射治疗模型。MTT 法检测细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡;荧光染色检测活性氧 ROS 含量及线粒体肿胀程度。**结果:**丹酚酸 B 能够显著降低射线照射后 U251 细胞活力,并增加其凋亡($P<0.05$)。丹酚酸 B 能够显著增加射线照射后 U251 细胞活性氧 ROS 的产生,并增加线粒体的肿胀程度($P<0.05$)。**结论:**丹酚酸 B 能够通过诱导内源性凋亡增加胶质瘤细胞的放疗敏感性,这种作用可能是通过抑制线粒体功能而实现的。

关键词:丹酚酸 B;放疗;线粒体;胶质瘤

中图分类号:R739.4;R730.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)09-1636-04

Salvianolic Acid B Renders Glioma Cells More Sensitive to Radiation via Inhibiting Mitochondrial Function*

WU Zi-zhao¹, HAN Rui-yang², ZHU Jian-biao¹, WEI Yu-jun¹, WEI Long-xiao^{3△}

(1 Ankang Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, 710104, China; 2 The 521th Hospital of Xi'an ordnance industry, Xi'an, Shaanxi, 710065, China; 3 Tangdu hospital, The fourth military medical university, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of salvianolic acid B (SalB) on the radiosensitization of human glioma U251 cells and the possible underlying mechanisms. **Methods:** U251 cells were treated with 1 μM SalB or phosphate buffered saline (PBS), and treated with radiation to establish the in vitro model. MTT assay was used to measure the cell viability; flow cytometry was used to detect the apoptotic cell death; fluorescence staining was used to measure the generation of reactive oxygen species(ROS) and the mitochondrial swelling in U251 cells. **Results:** SalB significantly decreased cell viability and increased apoptotic cell death after radiation in U251 cells ($P<0.05$). SalB significantly increased intracellular ROS generation and mitochondrial swelling after radiation in U251 cells ($P<0.05$). **Conclusion:** Salvianolic acid B renders glioma U251 cells more sensitive to radiation through inducing intrinsic apoptotic cell death, and these effects was partly dependent on the inhibition of mitochondrial function.

Key words: SalB; Radiation; Mitochondria; Glioma

Chinese Library Classification(CLC): R739.4; R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1636-04

前言

脑胶质瘤是中枢神经系统常见肿瘤之一,也是世界范围内造成脑肿瘤相关死亡的首要原因。最为常见的恶性脑胶质瘤是胶质母细胞瘤,它具有增值和侵袭能力强的特点^[1]。尽管近年来胶质瘤的综合治疗取得许多进展,但胶质母细胞瘤病人的中位生存期仍不足 14 个月。目前,胶质瘤的治疗除手术治疗和药物化疗外,放射治疗也是重要的治疗方法之一^[2]。

丹酚酸是传统药用植物丹参根茎中提取的重要有效成分,是一类水溶性酚类,其中丹酚酸 B(salvianolic acid B, SalB)是含量最多、药用价值最高的一类^[3]。以往研究表明,SalB 具有抗

炎、抗氧化、抗凝等多种药理学活性^[4-6]。另外,SalB 对肿瘤细胞增殖的抑制作用也在多种肿瘤细胞系中得到了证实,包括前列腺癌、乳腺癌、肝癌、头颈鳞状细胞癌等^[7-9]。也有文献报道 SalB 对胶质瘤 U87 细胞具有诱导凋亡的作用^[8],但其对胶质瘤细胞放疗敏感性的作用目前尚未见报道。因此,本研究的目的是观察 SalB 对胶质瘤 U251 细胞的放疗增敏作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人胶质瘤 U251 细胞系为本实验室保有,细胞培养采用含

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81371447)

作者简介:武子朝(1976-),男,主治医师,主要研究方向:神经系统影像诊断及放射治疗机制

△通讯作者:魏龙晓,男,副主任医师,副教授,主要研究方向:分子影像诊断及放射治疗机制研究,

电话:029-85401993, E-mail: weilongxiao_fmnu@163.com

(收稿日期:2014-10-24 接受日期:2014-11-19)

有 10%胎牛血清、80 U/ml 抗生素(青霉素和链霉素)的 DMEM 培养基,置于 37℃ 含 5%CO₂ 的恒温培养箱中培养,隔日更换培养基。丹酚酸 B 购自美国 Sigma 公司,溶于磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液中备用。MTT 检测试剂盒、流式凋亡检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、线粒体分离提纯试剂盒均购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞活力检测 细胞活力检测采用 MTT 法进行。取对数生长期的 U251 细胞接种于 96 孔板内,加入 SalB 使其在培养基中的浓度为 1 μM,同时设置等量 PBS 为对照。24 h 后在室温条件下接受放射量分别为 0, 10, 20, 40, 60 Gy 的射线照射。照射结束后每孔加入 5 mg/mL 浓度的 MTT 20 μL 继续培养 4 h,然后弃去培养液,加入二甲亚砜(DMSO)终止反应。将 96 孔板置于振荡器上震荡至结晶溶解后,使用酶标仪测定各样品在 570 nm 处吸光度。细胞活力结果表示为 0 Gy 射线照射 PBS 处理组细胞吸光度的百分比。

1.2.2 细胞凋亡检测 细胞凋亡检测采用流式细胞术进行。取对数生长期的 U251 细胞接种于 60 mm 培养皿内,加入 SalB 使其在培养基中的浓度为 1 μM,同时设置等量 PBS 为对照。24 h 后在室温条件下接受放射量为 20 Gy 的射线照射。照射结束后用不含钙离子的预冷 PBS 冲洗细胞,重悬于结合缓冲液中。细胞悬液中加入含 annexin V(AV)和碘化丙啶(PI)的染色液在室温下避光孵育 15 min 后,将细胞置于流式细胞仪下计数,AV⁺/PI⁻ 和 AV⁺/PI⁺ 的细胞合计为凋亡细胞,AV⁺/PI⁺ 的细胞计为坏死细胞。

1.2.3 ROS 含量检测 ROS 含量检测采用商品化 ROS 检测试剂盒进行。取对数生长期的 U251 细胞接种于 60 mm 培养皿内,加入 SalB 使其在培养基中的浓度为 1 μM,同时设置等量 PBS 为对照。24 h 后在室温条件下接受放射量分别为 0 和 20 Gy 的射线照射。照射结束后按说明书要求加入荧光染料在 37℃ 避光条件下孵育 1 h,PBS 冲洗细胞后,在荧光显微镜下观察绿色荧光强度,ROS 含量表示为 0 Gy 射线照射 PBS 处理组细胞荧光强度的倍数。

1.2.4 线粒体肿胀检测 取对数生长期的 U251 细胞接种于 96 孔板内,加入 SalB 使其在培养基中的浓度为 1 μM,同时设置等量 PBS 为对照。24 h 后在室温条件下接受放射量分别为 0

和 20 Gy 的射线照射。照射结束后按标准方法分离并纯化线粒体,将线粒体以 0.5 mg/mL 的浓度重悬于缓冲液(含 0.2 M 蔗糖,5 mM 琥珀酸盐,1 mM 磷酸盐,2 μM 鱼藤酮,pH 7.4)中,加入 200 μM 氯化钙后在 540 nm 处测量各样品吸光度。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS16.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验,多组间均数比较用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 SalB 对放疗后细胞活力的影响

在对照组细胞,射线照射可明显降低 U251 细胞活力,且随着射线强度的增加,细胞活力下降程度逐渐增大,呈强度依赖性变化。使用 SalB 预处理细胞 24 h 后,同样强度射线照射(20, 40 和 60 Gy)U251 细胞活力下降更为明显($P<0.05$)。在 10 Gy 强度射线照射条件下,SalB 预处理组细胞活力下降较对照组无明显统计学差异($P>0.05$,见图 1)。

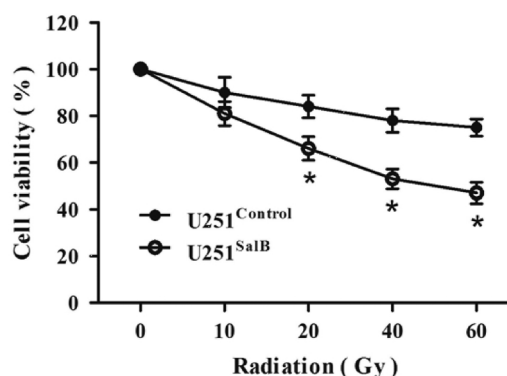


图 1 SalB 对放疗后细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of SalB on cell viability after radiation in U251 cells

* $P<0.05$ vs. U251Control group

2.2 SalB 对放疗后细胞凋亡的影响

如图 2A 所示,对照组 U251 细胞在接受 20 Gy 强度射线照射后发生明显细胞凋亡($18.3 \pm 3.4\%$),而细胞坏死并不明显($2.3 \pm 1.2\%$)。在 SalB 预处理组,射线照射后细胞凋亡较对照组明显增加($27.2 \pm 2.5\%$, $P<0.05$),而细胞坏死并未见明显变化($2.9 \pm 1.6\%$,见图 2B)。

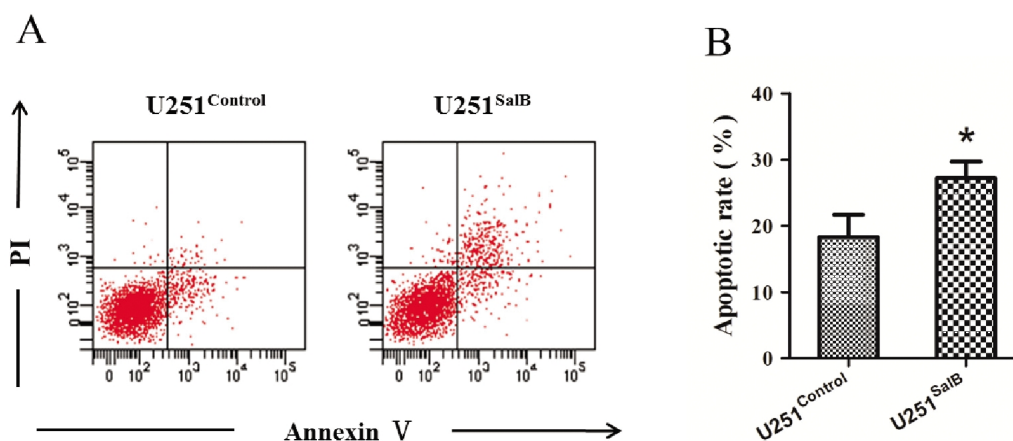


图 2 SalB 对放疗后细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of SalB on apoptotic cell death after radiation in U251 cells * $P<0.05$ vs. U251Control group

2.3 SalB 对放疗后细胞内 ROS 含量的影响

使用 SalB 处理细胞 24 h 后,在未接受射线照射的情况下,细胞内 ROS 含量较对照组未有明显增加($P>0.05$)。使用 20 Gy 强度射线照射后,在对照组细胞,ROS 含量明显增加($P<0.05$)。使用 20 Gy 强度射线照射后,SalB 预处理组细胞 ROS 含量较对照组细胞增加更为明显($P<0.05$,见图 3)。

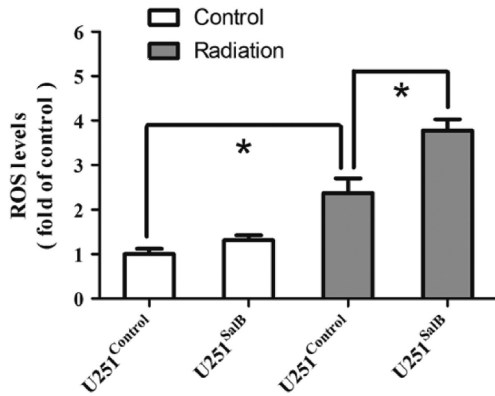


图 3 S SalB 对放疗后细胞内 ROS 含量的影响

Fig. 3 Effect of SalB on ROS generation after radiation in U251 cells * $P<0.05$

2.4 SalB 对放疗后线粒体肿胀程度的影响

使用 SalB 处理细胞 24 h 后,在未接受射线照射的情况下,细胞线粒体肿胀程度较对照组未有明显增加 ($P>0.05$)。使用 20 Gy 强度射线照射后,在对照组细胞,线粒体肿胀程度明显增加($P<0.05$)。使用 20 Gy 强度射线照射后,SalB 预处理组细胞线粒体肿胀程度较对照组细胞增加更为明显($P<0.05$,见图 4)。

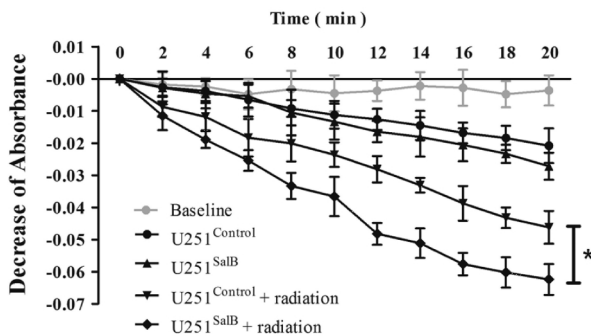


图 4 S SalB 对放疗后线粒体肿胀程度的影响

Fig. 4 Effect of SalB on mitochondrial swelling after radiation in U251 cells * $P<0.05$

3 讨论

胶质瘤是神经外科最为常见的肿瘤之一,尤其是胶质母细胞瘤增殖、侵袭能力强,占脑肿瘤致死病例数的 49%^[10]。目前,胶质瘤主要采用手术治疗、药物化疗和放射治疗联合的综合治疗,但患者死亡率仍居高不下。放射治疗是胶质瘤术后治疗的重要方法之一,可明显减少部分病人肿瘤的复发,但并不是所有患者放射治疗都有效,部分患者可出现明显的放疗耐受。近年来,放疗增敏剂的研究取得了许多进展,尤其是以中药提取物为来源的放疗增敏剂,因其来源广泛、价格低廉和低毒性的特点,受到广泛的重视^[11]。SalB 是药用植物丹参根茎中的提取

成分,多项研究表明其具有明显的抗肿瘤细胞增殖作用,使用浓度在 10 μM 至 100 μM 范围^[8]。本研究发现,SalB 在 1 μM 的低浓度下即可明显增加射线对胶质瘤 U251 细胞的增殖抑制作用,说明其在低于增殖抑制浓度的剂量具有明显的放疗增敏剂的作用。

凋亡,又称程序性死亡,是由多种分子信号通路介导的细胞主动死亡的过程,在生理和多种病理条件下对维持细胞正常功能具有重要意义。研究表明,凋亡抑制是包括胶质瘤在内的多种肿瘤发生、发展的重要机制,多种促凋亡信号通路的抑制和抗凋亡信号通路的异常激活是胶质瘤复发率高、难以治愈的主要原因^[12]。放射治疗可以通过损伤 DNA 碱基与糖链、破坏 DNA 双链结构和改变细胞周期等方式诱导细胞凋亡,从而达到控制肿瘤细胞增殖的目的^[13]。部分胶质瘤细胞缺失 G1/S 期检测点,而是依赖于 G2/M 期检测点进行 DNA 合成,对放射治疗并不敏感^[14]。因此,采用放疗增敏剂辅助放射治疗,增加胶质瘤细胞的凋亡,成为胶质瘤放射治疗研究的重要靶点。本研究发现,使用小剂量、低毒性的 SalB 处理胶质瘤 U251 细胞 24 h 后,放射治疗造成的细胞凋亡明显增加,说明 SalB 可以有效的通过诱导细胞凋亡增加胶质瘤细胞的放疗敏感性。

目前研究表明,肿瘤细胞的凋亡可以通过多种信号途径来实现,其中最为重要的两大经典信号途径是由死亡受体介导的外源性凋亡途径和由线粒体介导的内源性凋亡途径^[15]。内源性凋亡途径以线粒体通透性改变、促凋亡因子释放、活性氧自由基产生和 Caspase 家族激活为特征。活性氧 ROS 是线粒体能量代谢的产物,在低浓度时 ROS 作为细胞内信使物质并不具有细胞毒性,但浓度过高时 ROS 可通过抑制线粒体功能导致细胞凋亡^[16]。相对于正常胶质细胞,胶质瘤细胞利用酮类和脂肪酸进行能量代谢的能力较低,且细胞内抗氧化酶类还原型谷胱甘肽(reduced glutathione hormone, GSH)等含量较低^[17,18]。以往研究还发现,超过 95%的胶质母细胞瘤患者瘤细胞样本中抗凋亡分子 Bcl-2 高表达,它可通过作用于 α 晶体蛋白和 Caspase-7 直接抑制 Caspase-3 的激活,从而抵抗放疗造成的细胞凋亡^[19]。因此,以线粒体途径为靶点的促凋亡药物成为胶质瘤放疗增敏剂研发的热点^[20]。本研究发现,低剂量 SalB 处理后,U251 细胞 ROS 含量和线粒体肿胀程度未见明显变化,但放射治疗造成的 ROS 产生和线粒体肿胀明显增强。这些结果提示,SalB 在低剂量下可敏化胶质瘤细胞线粒体,使其更易受到射线照射的损伤,加重了放疗造成的细胞内源性凋亡。

总之,本研究在人胶质瘤 U251 细胞系中证明了药用植物提取成分 SalB 对胶质瘤细胞具有放疗增敏作用,并且发现这一作用可能是通过引发线粒体功能障碍从而诱导内源性细胞凋亡实现的,这为 SalB 作为放疗增敏剂应用于胶质瘤治疗打下了基础。

参考文献(References)

- [1] Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review[J]. Neuro Oncol, 2014, 16(3): 829-840
- [2] Alexiou GA, Tsiouris S, Kyritsis AP, et al. Glioma recurrence versus radiation necrosis: accuracy of current imaging modalities [J]. J Neurooncol, 2009, 95(1): 1-11

- [3] Cao W, Guo XW, Zheng HZ, et al. Current progress of research on pharmacologic actions of salvianolic acid B [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(4): 316-320
- [4] Chen T, Cao H, Zhu S, et al. Investigation of the binding of Salvianolic acid B to human serum albumin and the effect of metal ions on the binding [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2011, 81(1): 645-652
- [5] Chen T, Zhu S, Cao H, et al. Studies on the interaction of salvianolic acid B with human hemoglobin by multi-spectroscopic techniques[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2011, 78(4): 1295-1301
- [6] Chen T, Liu W, Chao X, et al. Salvianolic acid B attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in mice [J]. Brain Res Bull, 2011, 84(2): 163-168
- [7] Zhao Y, Guo Y, Gu X. Salvianolic Acid B, a potential chemopreventive agent, for head and neck squamous cell cancer [J]. J Oncol, 2011, 2011(2): 534-548
- [8] Wang ZS, Luo P, Dai SH, et al. Salvianolic acid B induces apoptosis in human glioma U87 cells through p38-mediated ROS generation [J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(7): 921-928
- [9] Yang Y, Ge PJ, Jiang L, et al. Modulation of growth and angiogenic potential of oral squamous carcinoma cells in vitro using salvianolic acid B[J]. BMC Complement Altern Med, 2011, 11(3): 54-55
- [10] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment [J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2683-2710
- [11] Hosseinimehr SJ. Beneficial effects of natural products on cells during ionizing radiation [J]. Rev Environ Health, 2014, 29 (6): 139-142
- [12] Bogler O, Mikkelsen T. Angiogenesis and apoptosis in glioma: two arenas for promising new therapies [J]. J Cell Biochem, 2005, 96(1): 16-24
- [13] Pauwels B, Wouters A, Peeters M, et al. Role of cell cycle perturbations in the combination therapy of chemotherapeutic agents and radiation[J]. Future Oncol, 2010, 6(9): 1485-1496
- [14] Fernet M, Megnin-Chanet F, Hall J, et al. Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper-radiosensitivity[J]. DNA Repair (Amst), 2010, 9(1): 48-57
- [15] Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, et al. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(8): 845-848
- [16] Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Oxidative stress and cell signaling[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(9): 1163-1182
- [17] Jelluma N, Yang X, Stokoe D, et al. Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes[J]. Mol Cancer Res, 2006, 4(5): 319-330
- [18] Santandreu FM, Brell M, Gene AH, et al. Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22(5): 757-768
- [19] Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, et al. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma [J]. Genes Dev, 2007, 21(1): 98-111
- [20] Ordys BB, Launay S, Deighton RF, et al. The role of mitochondria in glioma pathophysiology[J]. Mol Neurobiol, 2010, 42(1): 64-75

(上接第 1635 页)

- Liu Ming, Ji Lei, Wang Yan-ling. Placental Factors Related to Preeclampsia[J]. Int Reprod Health/Fam Plan, 2013, 32(6): 454-458
- [12] Li X, Li C, Dong X, et al. MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 550-554
- [13] Cobelliis L, Mastrogiacomio A, Fedefio E, et al. Distribution of Notch protein members in normal and preeclampsia complicated placentas[J]. Cell Tissue Res, 2007, 330(3): 527-534
- [14] Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidzic M, et al. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of preeclampsia [J]. Development, 2011, 138 (14): 2987-2998
- [15] Karamjit S Dolt, Manoj K Mishra, Jayashree Karar, et al. cDNA cloning, gene organization and variant specific expression of HIF-1 α in high altitude yak (*Bos grunniens*)[J]. Gene, 2007, (386): 73-80
- [16] E S Meade, Y Y Ma, S Guller. Role of Hypoxia-Inducible Transcription Factors 1a and 2a in the Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression in a Human Trophoblast Cell Line [J]. Placenta, 2007, (28): 1012-1019
- [17] Reshef Tal. The Role of Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Preeclampsia Pathogenesis [J]. Biology of Reproduction, 2012, 87(6): 1341-1348
- [18] Lala N, Girish GV, Cloutier-Bosworth A, et al. Mechanisms in decorin regulation of vascular endothelial growth factor-induced human trophoblast migration and acquisition of endothelial phenotype [J]. Biol Reprod, 2012, 87(3):59
- [19] Zou Y, Jiang Z, Yu X, et al. Upregulation of long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates proliferation, migration, apoptosis, and network formation in trophoblast cells HTR-8SV/neo [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79598
- [20] Fu G, Brki J, Hayder H, et al. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(3): 5519-5544
- [21] Alasztics B, KukorZ, Valent S, et al. The pathophysiology of preeclampsia in view of the two-stage model [J]. Orv Hetil, 2012, 153 (30): 1167-1176
- [22] Zou Y, Jiang Z, Yu X, et al. MiR-101 regulates apoptosis of trophoblast HTR-8/SVneo cells by targeting endoplasmic reticulum (ER) protein 44 during preeclampsia [J]. J Hum Hypertens, 2014, 28 (10): 610-616
- [23] Li X, Li C, Dong X, et al. MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 550-554
- [24] Li Q, Pan Z, Wang X, et al. miR-125b-1-3p inhibits trophoblast cell invasion by targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1 in preeclampsia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, S0006-291X (14)01675-1