

丹参酮 IIA 对大鼠移植性肝癌的抑制作用 *

王晓露¹ 解方为² 陈 曦² 张 霞² 欧阳学农^{2△}

(1 南京军区福州总医院肿瘤科 福建 福州 350025 2 江苏省中医院肿瘤内科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:观察丹参酮 IIA 对大鼠移植性肝癌的抑制作用。方法:将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、丹参酮 IIA 高、低剂量组。各组动物于移植术后 12d 处死。分离肿瘤测量其体积,realtime RT-PCR 法和 western blot 法检测肿瘤组织中 HMGB1、VEGF mRNA 和蛋白的表达。结果:丹参酮 IIA 能明显降低肿瘤体积,降低肿瘤组织中 HMGB1、VEGF mRNA 和蛋白的表达。结论:丹参酮 IIA 能抑制大鼠移植性肝癌的生长,其机制可能与抑制 HMGB1、VEGF 表达有关。

关键词 丹参酮 IIA HMGB1 VEGF

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)11-2062-03

The Inhibitive Effect of Tanshinone IIA on Implanted Hepatoma in Rats*

WANG Xiao-lu¹, XIE Fang-we², CHEN Xi², ZHANG Xia², OUYANG Xue-nong^{2△}

(1 Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command, Fuzhou 350025;

2 Department of Oncology, Hospitals of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu province, Nanjing 210029)

ABSTRACT Objective: To study the effect of Tanshinone IIA on implanted hepatoma in rats. **Method:** Sprague Dawley rats were divide into normal group, sham operated group and two Tanshinone IIA groups. Contents of HMGB1, VEGF protein and mRNA were detected by immunohistochemical and real-time PCR methods, respectively. **Result:** In Tanshinone IIA groups, Contents of HMGB1, VEGF protein and mRNA were decreased markedly. **Conclusion:** Tanshinone IIA could inhibit the implanted hepatoma in rats. This maybe be concerned with that it could inhibit the expression of HMGB1 and VEGF in the implanted hepatoma in rats.

Key words: Tanshinone IIA HMGB1 VEGF

Chinese Library Classification: R735.7 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)11-2062-03

丹参酮是中药丹参根的乙醚提取物中的成分,为丹参主要有效作用部位,该药对冠状动脉粥样硬化性心脏病及缺血性脑血管病有确切疗效,丹参酮 A 为丹参酮中主要有效成分之一。近年研究发现,丹参酮 A 对多种肿瘤细胞具有细胞毒作用,可以通过对肿瘤细胞的杀伤、诱导分化和凋亡、抑制侵袭和转移的机制发挥抗肿瘤作用^[1,2]。本研究拟观察丹参酮 A 对肝癌的治疗作用并对其机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试验药物

丹参酮 A(中国医药集团上海化学试剂公司)。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠 24 只,鼠龄 8 周,体质量 180~220 g,南京医科大学实验动物中心提供。皮下荷瘤 SD 大鼠(瘤株:Walker-256)购自中国科学院上海实验动物中心。

1.3 试剂

第一抗体 anti-HMGB1、VEGF、GAPDH(santa cruz),第二抗体 anti-Rabbit IgG(北京中杉公司),其它试剂为分析纯。逆转录试剂盒、荧光定量 realtime RT-PCR 试剂盒为 TakaRa 公司产品。

1.4 仪器

紫外分光光度计(上海亚研公司),LightCycler 型实时荧光定量基因扩增系统(德国 Roche 公司),垂直电泳槽(BIO-RAD 公司)。

1.5 方法

1.5.1 大鼠移植性肝癌肿瘤模型的制备 将皮下荷瘤大鼠断颈处死后,局部消毒,取出皮下瘤体,去除纤维组织,挑选肿瘤边缘鱼肉样无出血、坏死的肿瘤组织,用特制双刀片切成 1mm³ 大小的瘤块以备种植用。将 SD 大鼠用 20%乌拉坦 0.5ml/100 g 行腹腔注射麻醉。切口处去毛、消毒,在上腹约 1.5~2 cm 处作正中切口,显露肝左叶,用眼科剪刺破肝包膜,在包膜下作 0.5~1 cm 的隧道,将准备好的瘤组织块用眼科镊植入,确认瘤组织未退出、无出血,立即关腹。

1.5.2 实验分组 将 SD 大鼠随机分为两组,其中假手术组 6 只,其余大鼠做种植肝癌手术,术后将存活大鼠再随机分成 4 组:模型组 6 只,丹参酮高、低剂量组各 6 只。假手术组只手术,不移植肿瘤组织;丹参酮 A 高、低剂量组和模型组均移植肿瘤组织,其中丹参酮 A 高、低剂量组每天分别给予丹参酮 A 45、15mg/kg 灌胃。各组动物于移植术后 12d 处死,分离肿瘤组织和正常肝组织备用。

1.5.3 Western blot 蛋白抽提按试剂盒说明书进行。Western blot:蛋白上样后 80V 电泳 2h,100V 恒压湿转 1h,转膜结束后

* 基金项目:“十一五”军队中医药研发推广专项课题基金资助(2006051002)

△通讯作者 欧阳学农 主任医师 研究方向肿瘤内科治疗 E-mail: oyxn@public.fz.fj.cn, 电话: 0591-83787037

(收稿日期:2010-12-13 接受日期:2011-01-10)

脱脂奶粉封闭 60 分钟,加入一抗后 4℃冰箱过夜。TBST 洗膜 3 遍,每次 10min。然后加入二抗后室温 30~40 min。TBST 洗膜 3 遍,每次 10min。显影液显影,凝胶成像仪获取图像,图片用 Glyko BandScan version 进行灰度扫描,计算 HIF-1β 和 GAPDH 的灰度比值。

1.5.4 RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 取 50~100mg 肿瘤组织,置于研磨钵中,加入液氮研磨,匀浆转入 1.5ml EP 管中,加入 1mL Trizol,用加样枪吹打混匀,室温静置 10 min,加入 0.2 ml 氯仿,摇匀,室温下静置 15min,4℃ 12000g

离心 15 min,将上层水相转移至新的离心管中,加入等体积的异丙醇,摇匀,室温下静置 10 min 后 4℃ 10000g 离心 10min,弃上清,75%乙醇清洗 2 次,将 RNA 沉淀晾干,用 20 ul 无 RNA 酶去离子水溶解,进行逆转录,逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应:模板取 1μl cDNA,扩增条件为 95℃预变性 2min;随后 95℃ 30s,退火温度下 30s,72℃ 20s,共 40 个循环。采用 "primer premier 5.0" 软件设计引物(表 1),引物由 invitrogen 公司合成。采用双标准曲线法对待测基因丰度相对定量。

表 1 引物
Tab.1 primer

Gene	Length(bp)	Upstream	Downstream	TM (℃)
HMGB1	173	5' GTAATGCCTTTGCCCTTCTAT 3'	5' TATCCGCTTTCCTTGTATCTG 3'	58.0
VEGF	186	5' TGGACTTGAGTTGGGAGGAG 3'	5' GGATGGGTTTGTCTGTTC 3'	58.0
GAPDH	144	5' AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC 3'	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	58.0

1.5.5 各组动物间肿瘤体积的测定 分离肿瘤组织,测量肿瘤最大径和与最大径垂直的最宽径。肿瘤体积 =a× b²/2 a 为肿瘤最大径 b 为最大径垂直的最宽径。

1.5.6 统计学方法 数据以均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 12.0 统计学软件对数据进行统计学处理,统计学方法采用 χ^2 检验,当 P<0.05 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参酮 A 对荷瘤大鼠肿瘤组织 HMGB1,VEGF mRNA、蛋白表达的影响

本实验采用 realtime RT-PCR 和 western blot 法检测了假手术组正常肝组织和其余各组肿瘤组织中 HMGB1,VEGF mRNA 和蛋白的表达。结果如表 2、图 A,B 所示,肿瘤组织相对与正常肝组织中 HMGB1,VEGF mRNA 和蛋白的表达明显升高,丹参酮 A 能显著降低肿瘤组织中 HMGB1,VEGF mRNA 和蛋白的表达。

表 2 丹参酮 A 对 HMGB1,VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)
Tab 2 The effect of Tanshinone A on expression of HMGB1 and VEGF

Group	Dose (mg/kg)	mRNA		Protein	
		HMGB1/ GAPDH	VEGF/ GAPDH	HMGB1/ GAPDH	VEGF/ GAPDH
Sham	0	0.021± 0.004	0.092± 0.015	0.10± 0.015	0.23± 0.036
Model	0	0.14± 0.021 ^{##}	0.24± 0.028 ^{##}	0.81± 0.12 ^{##}	0.84± 0.028 ^{##}
Tanshinone A	15	0.11± 0.017*	0.19± 0.023*	0.61± 0.10*	0.65± 0.13*
Tanshinone A	45	0.075± 0.011**	0.11± 0.014**	0.38± 0.052**	0.39± 0.056**

P<0.01 vs sham group, *P<0.05, ** P<0.01 vs model

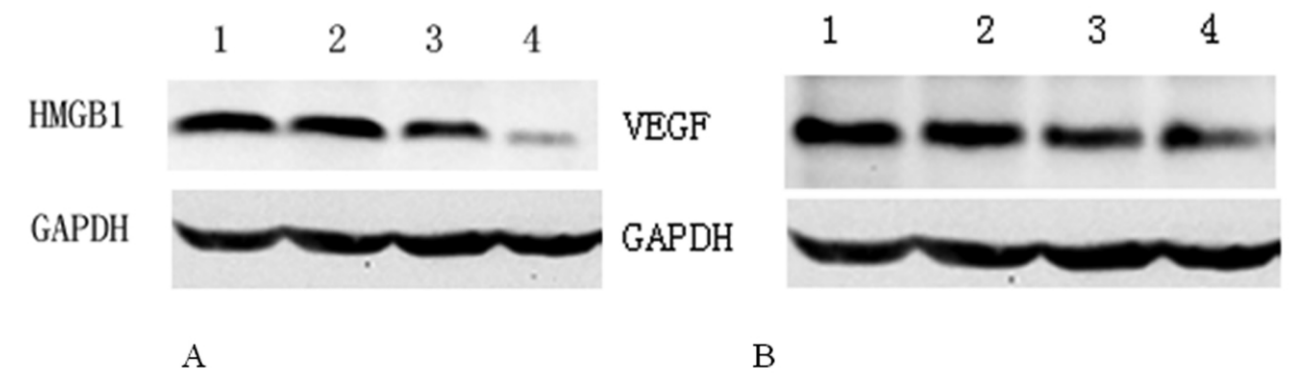


图 A HMGB1 蛋白表达
Fig A The expression of HMGB1 protein
1. 模型组 2. 丹参酮 A 低剂量组 3. 丹参酮 A 高剂量组 4. 假手术组
1. model group 2. Tanshinone A(15mg/d) 3. Tanshinone A(45mg/d) 4. sham group

图 B VEGF 蛋白表达
Fig B The expression of VEGF protein

2.3 丹参酮 A 对荷瘤裸鼠肿瘤大小的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$) 酮 A 能显著降低 SD 大鼠肝肿瘤大小 ,其中低、高剂量组分
本实验测量了荷瘤裸鼠肿瘤大小 结果如表 3 所示 :丹参 别降低了 27.94%($P<0.05$)、49.44%($P<0.01$)。结果如表 3 所示。

表 3 丹参酮 A 对肿瘤大小的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 The impact of tanshinone A on tumor size ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose (mg/kg)	肿瘤体积(cm^3)
Sham	0	0
Model	0	0.68± 0.14
Tanshinone A	15	0.49± 0.087*
Tanshinone A	45	0.35± 0.052**

$P<0.01$ vs sham group ;* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model

3 讨论

高迁移率族蛋白 1 (high mobility group protein box-1 , HMGB1) 是真核细胞核内一类含 量丰富的非组蛋白染色质蛋白。作为核 DNA 结合蛋白,在稳定核小体结构,调节基因转录 ,调节炎症、增殖、迁徙、生存等细胞生命活动中起重要作用^[3-5]。近年发现 ,HMGB1 与肿瘤细胞的生长、浸润和转移有密切关系^[6,7]。HMGB1 是一种抗凋亡结合蛋白 其过表达可抑制细胞凋亡 ,从而导致肿瘤的发生、生长^[8]。HMGB1 可促进血管内皮细胞的增加并诱导血管内皮生长因子 (VEGF) 表达 ,抑制 HMGB1 的表达可抑制新生血管形成^[9]。肿瘤的生长、侵袭、转移与肿瘤的新生血管密切相关 肿瘤组织通过分泌血管形成的细胞因子,诱导了新生血管形成 ,VEGF 是目前已知作用最强的血管生成诱导因子^[10]。VEGF 作为一种选择性促内皮细胞有丝分裂素 ,诱导血管内皮细胞增殖 ,还可促进血管构建。它还可以直接作用于血管内皮细胞增加血管通透性 ,促使血浆蛋白和纤维蛋白外渗凝结成纤维凝胶 ,为成纤维细胞、内皮细胞和其他细胞移动侵入提供了暂时的基质成分 ,并最终将它转化为血管化的连接组织^[11-13]。VEGF 过度表达诱导肿瘤组织新生血管形成增加 提高了肿瘤细胞的增殖率^[14-15]。丹参为唇形科鼠尾草属植物的根。丹参酮是中药丹参根的乙醚提取物中的成分 ,为丹参主要有效作用部位 ,该药既往主要用于心血管疾病的治疗 ,近年研究发现其具抗肿瘤作用 本研究通过动物实验证实了丹参酮 A 对肝癌的抑制作用 发现丹参酮 A 能显著抑制肝癌的生长 ,并能降低肿瘤组织中 HMGB1 ,VEGF 的表达 ,初步揭示了丹参酮 A 抑制肝癌生长的机制。

参 考 文 献(References)

[1] 余椿生,宋忠花.丹参[J]. 食品与药品,2005,7 (12): 72-74
Yu Chun-sheng, Song Zhong-hua [J]. Salvia miltiorrhiza, 2005, 7 (12): 72-74

[2] 柴瑞震. 丹参的药理研究近况 [J]. 中国中医药科技, 2003, 10(6): 390-392
Chai Rui-zhen. Recent developments of salvia miltiorrhiza's pharmacology research[J]. Chinese traditional medicine technology, 2003, 10 (6): 390-392

[3] Gauley J, Pisetsky DS. The translocation of HMGB1 during cell acti-

vation and cell death[J]. Autoimmunity, 2009, 42(4): 299-301

[4] Zhang S, Zhong J, Yang P, et al. HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2009, 3(1): 24-38

[5] Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(1-2): 101-113

[6] Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer[J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28:367-388

[7] Tang D, Kang R, Zeh HJ 3rd, et al. High-mobility group box 1 and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(1-2):131-140

[8] Rossini A, Zacheo A, Mocini D, et al. HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44 (4): 683-693

[9] Kang HJ, Lee H, Choi HJ, et al. Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers[J]. Lab Invest, 2009, 89 (8): 948-959

[10] Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, et al. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development[J]. Cell, 2010, 140(2): 268-279

[11] Benavente S, Verges R, Hermosilla E, et al. Overexpression of phosphorylated 4E-BP1 predicts for tumor recurrence and reduced survival in cervical carcinoma treated with postoperative radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009, 75(5): 1316-1322

[12] Guibal A, Taillade L, Mule S. Noninvasive contrast-enhanced US quantitative assessment of tumor microcirculation in a murine model: effect of discontinuing anti-VEGF therapy [J]. Radiology, 2010, 254 (2): 420-429

[13] Mulligan JK, Rosenzweig SA, Young MR. Tumor secretion of VEGF induces endothelial cells to suppress T cell functions through the production of PGE2[J]. J Immunother, 2010, 33(2): 126-135

[14] Ghosh S, Maity P. VEGF antibody plus cisplatin reduces angiogenesis and tumor growth in a xenograft model of ovarian cancer [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2010, 29(1): 17-30

[15] Park K, Lee MY, Kim KS, et al. Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethyleneimine-hyaluronic acid conjugate[J]. Biomaterials, 2010, 31(19): 5258-5265