

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.04.004

丹参酮ⅡA通过抑制STAT3活化调控胃癌细胞增殖和凋亡的研究^{*}

张拥军¹,彭伯坚¹,曹天生²,卢秀珊¹,郭曙光^{3△}
(1.广东省广州市花都区人民医院消化内科 510800;2.广东省广州市花都区人民医院普外科 510800;3.中山大学附属第三医院体检科,广州 510630)

[摘要] **目的** 研究丹参酮ⅡA(TanⅡA)对胃癌细胞增殖的抑制作用,并探讨其分子机制。**方法** 应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同浓度的TanⅡA(2.5、5、10 μg/mL)对3种胃癌细胞株(SNU-638、MKN1和AGS)增殖的影响;流式细胞仪检测细胞凋亡情况;Western blot检测凋亡相关蛋白(Bax,cleaved caspase-3、Bcl)以及信号转导和转录激活因子3(STAT3)、p-STAT3蛋白表达变化;荧光素酶报告基因检测STAT3转录活性变化。**结果** 与对照组比较,TanⅡA能明显抑制胃癌细胞的增殖,促进细胞凋亡,增加凋亡相关蛋白Bax和cleaved caspase-3的表达,降低Bcl的表达;TanⅡA明显抑制STAT3磷酸化,过表达STAT3可下调TanⅡA的促凋亡作用及对STAT3转录活化的抑制作用。**结论** TanⅡA可能通过抑制STAT3转录活化调控胃癌细胞的增殖和凋亡。

[关键词] 胃肿瘤;丹参酮ⅡA;信号转导和转录激活因子3;凋亡
[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)04-0559-05

Study on tanshinone Ⅱ A regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells via inhibition of STAT3 activation^{*}

ZHANG Yongjun¹, PENG Bojian¹, CAO Tiansheng², LU Xiushan¹, GUO Shuguang^{3△}
(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of General Surgery, Huadu District People's Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510800, China; 3. Physical Examination Center, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and molecular mechanism of tanshinone Ⅱ A (Tan Ⅱ A) on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. **Methods** The MTT assay was performed to determine the effect of Tan Ⅱ A (2.5, 5, 10 μg/mL) on cell proliferation in SNU-638, MKN1 and AGS gastric cancer cells. The flow cytometry was applied to detect the cellular apoptosis; the expression changes of apoptosis related proteins (Bax, cleaved caspase-3, Bcl) and STAT3, p-STAT3 protein were detected by Western blot. The luciferase reporter assay was used to determine the change of STAT3 transcriptional activity. **Results** Compared with the control group, Tan Ⅱ A could significantly inhibit the cell proliferation in gastric cancer cells, promoted the cellular apoptosis, increased apoptosis related protein Bax and cleaved caspase-3 protein expression, and reduced the Bcl expression; Tan Ⅱ A significantly inhibited STAT3 phosphorylation, over expressed STAT3 could down-regulate the Tan Ⅱ A apoptosis-promoting effect and inhibited the STAT3 transcription activation. **Conclusion** Tan Ⅱ A regulates the proliferation of gastric cancer cells through inhibiting STAT3 transcription activation.

[Key words] gastric neoplasms; tanshinone Ⅱ A; STAT3; apoptosis

胃癌是世界上发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一^[1-2]。据不完全统计,每年新发病例约有100万例^[3-4]。尽管目前胃癌治疗取得了一定的进展,但晚期胃癌患者的总体疗效不太理想,5年生存率仅为5%~20%^[5-6]。近年来,众多的研究表明传统中草药具有显著的抗肿瘤活性^[7-9]。丹参酮ⅡA(TanⅡA)是天然植物丹参的主要活性成分,前期的研究已发现它具有多种药理活性,比如缓解心绞痛,有效改善血流动力学等^[10-12]。近年来,丹参酮ⅡA在乳腺癌、膀胱癌、结直肠癌和前列腺癌中的抗肿瘤活性也广受研究者青睐^[13-14]。虽然有研究表明TanⅡA能抑制胃癌细胞生长,但其潜在的分子机制尚不清楚^[15-16]。

^{*} 基金项目:广州市花都区科技工业和信息化局——医疗卫生一般科研专项项目(17-HDWS-021)。 作者简介:张拥军(1977—),副主任医师,硕士,主要从事消化系统肿瘤的研究。 △ 通信作者,E-mail:3529982274@qq.com。

信号转导和转录激活因子 3(STAT3)是信号转导因子 STAT 家族的成员之一^[17]。它广泛参与调节了一系列生物过程,如细胞增殖、肿瘤发生、血管生成和表皮细胞向间充质细胞转化等^[18]。磷酸化 STAT3 分子上的 2 个磷酸化位点酪氨酸 705(Tyr705)和丝氨酸 727(Ser727)对于 STAT3 组成性激活以及肿瘤的发生、发展发挥着关键作用^[19-21]。有研究表明 STAT3 的构成性激活可以促进胃癌的进一步恶化和发展^[22-23]。因此,以 STAT3 为靶点,发掘新的能抑制 STAT3 组成性激活的化合物对于治疗人类胃癌具有重要的临床意义。本研究中采用人胃癌细胞株,并给予 Tan II A 处理,探讨 Tan II A 对胃癌细胞增殖的影响,并明确其作用机制是否与抑制 STAT3 活化有关。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及试剂 人胃癌细胞株(SNU-638、MKN1 和 AGS)购自国家细胞资源中心(中国科学院,上海)。SNU-638 和 MKN1 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,AGS 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,并置于含 5%CO₂ 的恒温培养箱。Tan II A 购自 Sigma-Aldrich 公司。cleaved caspase-3、Bcl 和 Bax 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,p-STAT3 和 STAT3 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。FLAG-STAT3 和 pHRL-TK 质粒购自生工公司。

1.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖 将细胞以 1×10⁴ 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中过夜。随后给予不同浓度的 Tan II A 处理不同时间后,每孔加入 20 μL MTT 染料继续孵育 2 h。小心移除培养基并加入溶解/终止溶液。使用酶标仪在 570 nm 处检测各孔吸光度并计算细胞存活率。

1.3 细胞凋亡检测 当不同浓度的 Tan II A 处理细胞后,收集细胞至离心管中,离心弃培养液,用 PBS 洗涤。随后使用 Annexin V 和 PI 双染色,应用流式细胞仪分析结果。根据比例计算不同药物浓度对细胞凋亡的影响。

1.4 Western blot 当用不同浓度的 Tan II A 处理

细胞后,加入裂解缓冲液裂解细胞并收集、提取总蛋白进行定量。随后采用 SDS-PAGE 分离,PVDF 膜电转,脱脂牛奶(5%)封闭 1 h,分别加入一抗孵育 4℃ 过夜。次日加入 TBST 缓冲液洗膜 3 次后加入辣根过氧化酶标记二抗,室温摇床孵育 1 h 后用 TBST 缓冲液洗膜 3 次。最后采用 ECL 法显影,并进行定量分析。

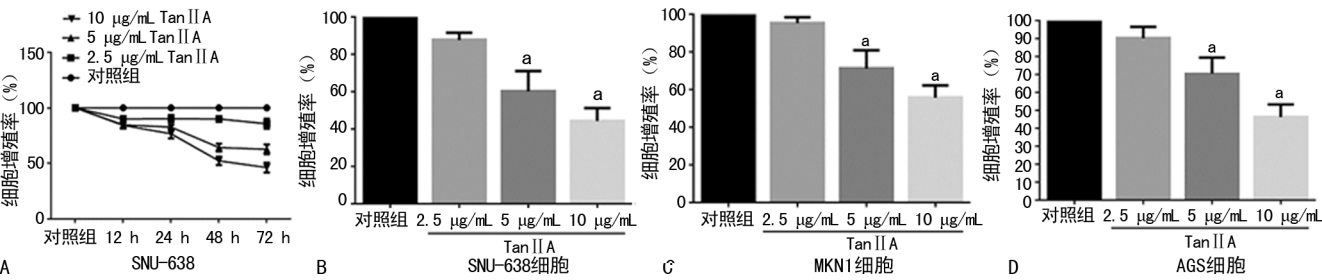
1.5 细胞转染和 STAT3 转录活性 根据 Lipofectamine 2000 使用说明书,将 FLAG-STAT3 质粒和对照质粒 pHRL-TK 分别瞬时转染细胞后,并给予指定浓度的 Tan II A 处理。随后用双荧光素酶报告基因测定系统测定 STAT3 的转录活性。

1.6 统计学处理 用 SPSS 20.0 统计分析软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,多个样本间比较采用单因素方差分析 Bonferroni post-hoc Test 进行统计学处理,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

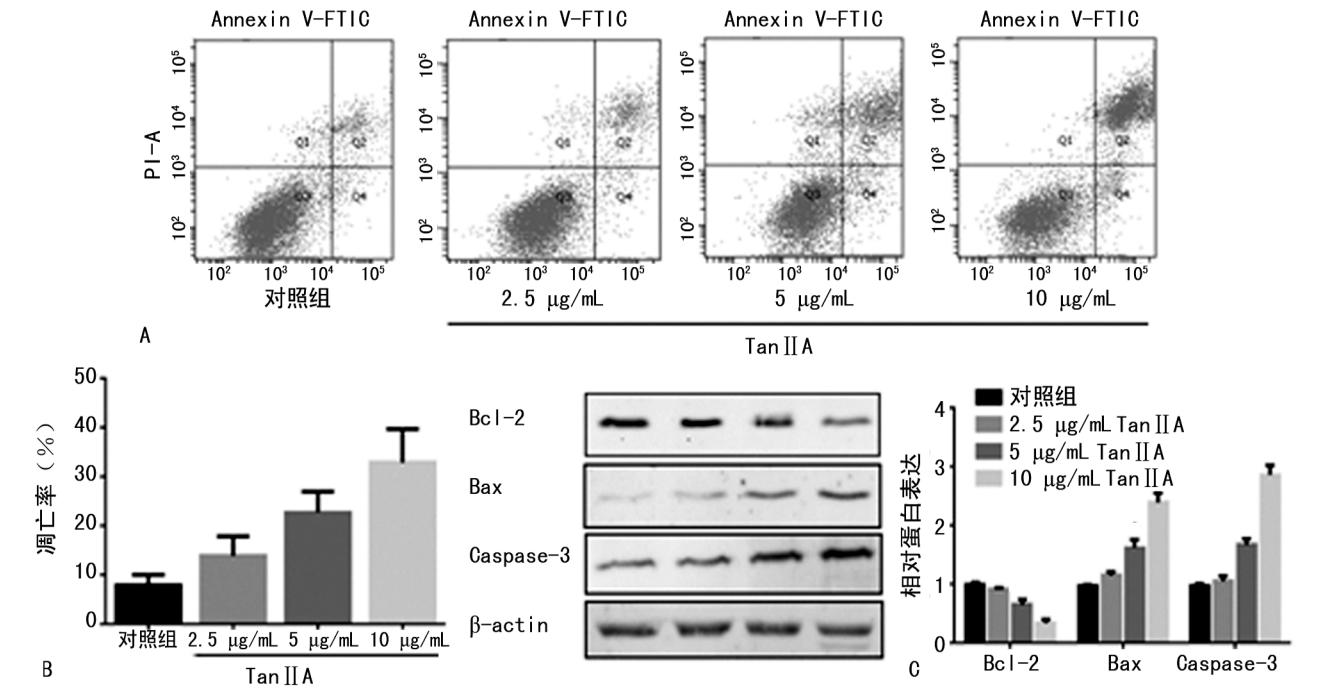
2.1 Tan II A 抑制人胃癌细胞增殖 MTT 实验结果显示 Tan II A 能以时间和剂量依赖的方式有效抑制 SNU-638 细胞增殖(图 1A 和 1B)。10 μg/mL Tan II A 表现出最强抗肿瘤活性,因此被用于后续研究。与此同时,当给予不同浓度 Tan II A 处理人胃癌 MKN1 和 AGS 细胞之后,Tan II A 也能明显抑制细胞增殖(图 1C 和 1D),但以 SNU-638 细胞活性最佳,因此 SNU-638 细胞被选择用于进一步研究。

2.2 Tan II A 诱导人胃癌细胞凋亡 当 Annexin-V/PI 双染色标记 Tan II A 处理 SNU-638 细胞后,使用流式细胞仪检测 Tan II A 对胃癌细胞凋亡的影响。图 2A、2B 显示,Tan II A 处理之后能明显增加凋亡细胞比例,百分比由 7.77%±2.24%(对照组)增加到 Tan II A 处理组 13.80%±4.06%(2.5 μg/mL),22.70%±4.25%(5 μg/mL)和 32.87%±6.80%(10 μg/mL)。图 2C 显示 Tan II A 处理之后能诱导 Bax 和 cleaved caspase-3 的蛋白表达,并抑制 Bcl 蛋白水平。



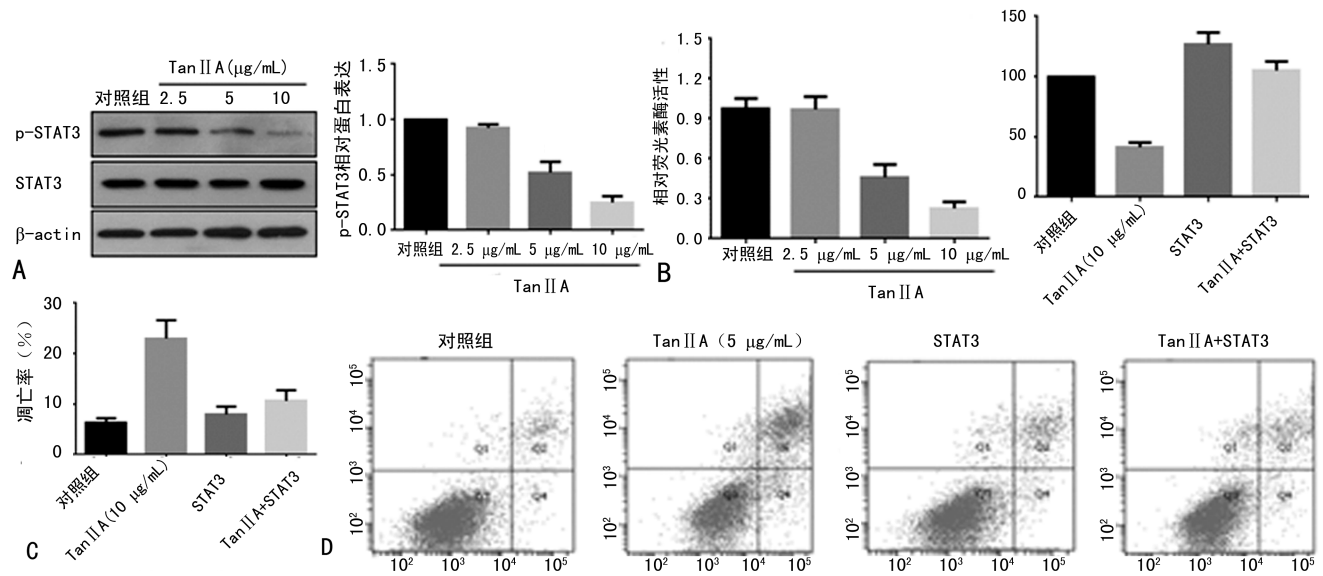
A: Tan II A 对 3 种胃癌细胞增殖的时效、量效关系;B: Tan II A 对 SUN-638 细胞增殖的影响;C: Tan II A 对 MKN1 细胞增殖的影响;D: Tan II A 对 AGS 细胞增殖的影响

图 1 Tan II A 对人胃癌细胞增殖的影响



A:Annexin V、PI 双染色细胞凋亡图;B:相对细胞凋亡率;C:Western blot 蛋白条带及相对蛋白表达

图 2 Tan II A 对胃癌细胞凋亡的影响



A: Tan II A 对 STAT3 磷酸化的影响;B: Tan II A 对 STAT3 转录活性的影响;C: 过表达 STAT3 对细胞增殖的影响;D: 过表达 STAT3 对细胞凋亡的影响

图 3 Tan II A 对 STAT3 信号通路的影响

2.3 STAT3 在 Tan II A 抑制人胃癌细胞增殖中的作用 如图 3A 所示, Tan II A(5, 10 μg/mL)处理 SNU-638 细胞能有效抑制 STAT3 中 Tyr705 位点的磷酸化水平(约 54% 和 77%)。为了进一步证实 STAT3 信号通路是否参与了 Tan II A 抗胃癌细胞增殖过程,本研究采用了 SNU-638 细胞与 p-STAT-LUC 质粒共转染。双荧光素报告实验显示 Tan II A (5, 10 μg/mL)处理后能有效降低 STAT3 的活性(图 3B)。STAT3 过表达后能显著减少 Tan II A 抑制细胞增殖和诱导凋亡的比例(图 3C 和 D)。

3 讨论

本研究发现了中药丹参分离得到的生物活性组分 Tan II A 能有效抑制人胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,具体机制是由于 Tan II A 作用于 STAT3 的磷酸化 Tyr705 位点从而抑制 STAT3 磷酸化水平, STAT3 质粒共转染实验进一步证实了推断。本研究表明 Tan II A 能有效抑制 STAT3 活化过程,从而发挥抗胃癌作用。

胃癌是常见恶性肿瘤,其病死率居全球第三^[24]。近年来尽管在胃癌的诊断和治疗方面取得了较大进

展,但胃癌患者的总体预后仍然较差^[25-26]。目前的治疗方式能够在一定程度上控制病情,延长患者生存期,但严重的毒副作用不仅会影响复发患者的生活质量,甚至还会危及患者的生命^[27]。因此,研发用于胃癌治疗的新药物具有重要的临床意义。

Tan II A 是从丹参根茎提取的活性成分,大量证据表明 Tan II A 对多种癌细胞的生长具有抑制作用^[28]。本研究发现 Tan II A 处理之后可明显诱导细胞凋亡,增加 Bax 和 cleaved caspase-3 的蛋白表达并下调 Bcl 蛋白水平。前期研究报道 STAT3 信号通路的组成性活化被认为是癌症发生、发展和进展的重要因素^[20,29]。本研究发现 Tan II A 处理后可明显抑制体内 STAT3 磷酸化过程,而且表现出剂量依赖性。当细胞中过表达 STAT3 时,Tan II A 对细胞增殖的抑制比例以及诱导 SNU-638 细胞凋亡显著减少。本研究阐明了 STAT3 在 Tan II A 调控胃癌细胞增殖和凋亡过程中的作用。但是,Tan II A 在体内是否发挥抗胃癌活性,Tan II A 如何影响体内胃癌肿瘤组织中凋亡相关蛋白表达,以及 STAT3 如何参与调控值得进一步探讨。不仅如此,Tan II A 通过其他机制起作用的可能性不能排除,值得深入研究。而本研究仍存在一些局限,比如应该同时纳入正常的胃细胞进行比较分析,从而进一步阐述 Tan II A 的作用是癌症特异性的。综上所述,本研究认为 Tan II A 可能通过下调 STAT3 活化水平从而发挥抗胃癌活性。

参考文献

- [1] LAZĂR D C, TĂBAN S, CORNIANU M, et al. New advances in targeted gastric cancer treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(30):6776-6799.
- [2] ILSO D H. Advances in the treatment of gastric cancer[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2017, 33(6):473-476.
- [3] APICELLA M C, GIORDANO S. Targeted therapies for gastric cancer: failures and hopes from clinical trials[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34):57654-57669.
- [4] MOLINA-CASTRO, S, EREIRA-MARQUES J, FIGUEIREDO C, et al. Gastric cancer: Basic aspects[J]. *Helicobacter*, 2017, 22 Suppl 1: S26-29.
- [5] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):359-386.
- [6] SIEGEL R L, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30.
- [7] WANG L I, WU J Z, LU J W, et al. Regulation of the cell cycle and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by tanshinone I in human breast cancer cell lines[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2):931-939.
- [8] GUTHEIL W G, REED G, RAY A, et al. Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(1):173-179.
- [9] GAO H, LAMUSTA J, ZHANG W F, et al. Tumor cell selective cytotoxicity and apoptosis induction by an herbal preparation from *brucea javanica*[J]. *N Am J Med Sci (Boston)*, 2011, 4(2):62-66.
- [10] WEI B, YOU M G, LING J J, et al. Regulation of antioxidant system, lipids and fatty acid β -oxidation contributes to the cardioprotective effect of Sodium tanshinone II A sulpho-nate in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 230(1):148-156.
- [11] ZHOU L Z, CHOW M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use[J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12):1345-1359.
- [12] FANG J, LITTLE P J, XU S. Atheroprotective effects and molecular targets of tanshinones derived from herbal medicine danshen[J]. *Med Res Rev*, 2017, 38(1):201-228.
- [13] LI G B, SHAN C Y, LIU L, et al. Tanshinone II A inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2):e0117440.
- [14] ZHANG Y, JIANG P X, YE M, et al. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10):13621-13666.
- [15] SU C C. Tanshinone II A inhibits human gastric carcinoma AGS cell growth by decreasing BiP, TCTP, Mcl-1 and Bcl-xL and increasing Bax and CHOP protein expression[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6):1661-1668.
- [16] YU J, WANG X X, LI Y H, et al. Tanshinone II A suppresses gastric cancer cell proliferation and migration by downregulation of FOXM1[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3):1394-1400.
- [17] YU H K, PARDOLL D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(1):41-51.
- [18] GRIVENNIKOV S I, KARIN M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(1):11-19.
- [19] PARK E, PARK J, HAN S W, et al. NVP-BKM120, a novel PI3K inhibitor, shows synergism with a STAT3 inhibitor in human gastric cancer cells harboring KRAS mutations[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4):1259-1266.
- [20] GUO C, SU J, LI Z J, et al. The G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) suppresses gastric cancer cell proliferation and migration through antagonizing STAT3 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33):

34402-34413.

[21] YANG J B,CHATTERJEE-KISHORE M,STAUGAITIS S M,et al. Novel roles of unphosphorylated STAT 3 in oncogenesis and transcriptional regulation[J]. Cancer Res,2005,65(3):939-947.

[22] CHEN J,WANG J Q,LIN L,et al. Inhibition of STAT3 signaling pathway by nitidine chloride suppressed the angiogenesis and growth of human gastric cancer[J]. Mol Cancer Ther,2012,11(2):277-287.

[23] XIONG H,DU W,WANG J L,et al. Constitutive activation of STAT3 is predictive of poor prognosis in human gastric cancer[J]. J Mol Med (Berl),2012,90(9):1037-1046.

[24] MASTORAKI A,BENETOU C,MASTORAKI S,et al. The role of surgery in the therapeutic approach of gastric cancer liver metastases[J]. Indian J Gastroenterol,2016,35(5):331-336.

[25] JIANG X M,WANG W F,YANG Y M,et al. Identification of circulating microRNA signatures as potential non-invasive biomarkers for prediction and prognosis of lymph

node metastasis in gastric cancer[J]. Oncotarget,2017,8(39):65132-65142.

[26] KAGAWA S,SHIGEYASU K,ISHIDA M,et al. Molecular diagnosis and therapy for occult peritoneal metastasis in gastric cancer patients [J]. World J Gastroenterol,2014,20(47):17796-17803.

[27] MOHELNIKOVA-DUCHONOVA B M, SOUCEK P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics;the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy[J]. World J Gastroenterol,2014,20(30):10316-10330.

[28] WANG X L,LEE K H. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen [J]. Med Res Rev,2007,27(1):133-148.

[29] MORA L B,BUETTNER R,SEIGNE J,et al. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines;direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells[J]. Cancer Res,2002,62(22):6659-6666.

(收稿日期:2018-08-22 修回日期:2018-11-01)

(上接第 558 页)
为进一步研究开发打下基础。

参考文献

[1] 张丽霞,管志斌. 西双版纳药用榕树资源[J]. 亚热带植物科学,2004,33(2):60-62.

[2] HUYAERE K,SKIBSTED L H. Flavonoids protecting food and beverages against light[J]. J Sci Food Agric,2015,95(1):20-35.

[3] 吴京平. 天然植物性抗氧化剂在食品工业中的应用[J]. 北京联合大学学报(自然科学版),2007,21(2):63-66.

[4] 王忠雷,杨丽燕,张小华,等. 中药黄酮类抗氧化活性成分研究进展[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2013,15(3):551-554.

[5] 羊波,应茵,陈冬丽,等. 黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J]. 中国药师,2016,19(7):1369-1373.

[6] 董兰岚,吕娟,何元,等. 黄桷树叶中总黄酮的乙醇超声提取工艺研究[J]. 应用化工,2017,46(11):2188-2190.

[7] 汪洋,胡魁,陈玲,等. 黄桷树叶总黄酮提取物对 A549 细胞的保护作用研究[J]. 重庆医学,2017,46(16):2178-2182.

[8] 王小红,曹阳,吴阳,等. 大叶榕须有效成分提取工艺研究[J]. 化学研究与应用,2010,22(12):1486-1491.

[9] 丁嘉信,李万忠,李慧芬,等. 银杏叶提取物总黄酮紫外分光光度法含量测定的适应性研究[J]. 食品与药品,2012,14(4):260-263.

[10] ORIHUELA R,MCPHERSON C A,HARRY G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. Br J Pharmacol,2016,173(4):649-665.

[11] 骆党委,叶静,黄雅燕,等. AB-8 大孔吸附树脂精制芦柑皮总黄酮及黄酮类化合物的分离[J]. 食品科学,2014,35(6):30-35.

[12] 陈胜发,刘彦超,龙凤来. 榕属植物化学成分研究进展[J]. 杨凌职业技术学院学报,2010,9(3):13-17.

[13] PERRY V H,HOLMES C. Microglial priming in neurodegenerative disease[J]. Nat Rev Neurol,2014,10(4):217-224.

[14] XU L,HE D,BAI Y. Microglia-mediated inflammation and neurodegenerative disease[J]. Mol Neurobiol,2016,53(10):6709-6715.

(收稿日期:2018-08-23 修回日期:2018-11-13)