

网络出版时间: 2016-5-9 15:43:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.004.html>

隐丹参酮抑制恶性神经胶质瘤细胞 C6 增殖及对 JAK2-STAT3 信号通路的影响

唐焕焕¹, 沈晓燕², 段小群¹, 徐庆¹, 苑博¹, 张嫦丽¹, 吕良¹

摘要 目的 评估隐丹参酮对恶性神经胶质瘤细胞 C6 的增殖作用及对 JAK2-STAT3 信号通路的影响。方法 使用 MTT 法评价隐丹参酮对 C6 细胞存活率的影响, 使用 hochest 染色和 BrdU 插入法检测隐丹参酮对 C6 细胞凋亡和增殖的影响, 使用 Western blot 法检测隐丹参酮对 C6 细胞 p-JAK2 和 p-STAT3 (Tyr705) 的影响。结果 隐丹参酮显著抑制 C6 的生长和增殖 ($P < 0.05$), 但不促进凋亡。隐丹参酮显著抑制 p-STAT3 (Tyr705) 蛋白表达, 但不影响 p-JAK2。结论 隐丹参酮是恶性神经胶质瘤 C6 的抗增殖剂, 其作用机制与抑制 STAT3 信号有关。

关键词 恶性神经胶质瘤; 增殖; JAK2-STAT3 信号通路

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0769-04

恶性神经胶质瘤是原发性脑肿瘤中最常见的恶性肿瘤, 并具有高死亡率^[1]。恶性神经胶质瘤的经典治疗方法包括手术切除、术后放射治疗和化疗(通常用替莫唑胺)。但是, 基于这些疗法, 患者平均存活时间仅为 14.6 个月, 并且, 在过去的二十年中, 患者的存活率并没有显著改善^[2]。因此, 为了提高神经胶质瘤的治疗的效果, 探索更有效的治疗方法很有必要。隐丹参酮 (cryptotanshinone), 从丹参中提取分离得到的主要活性成分之一, 已经报道具有广泛的药理作用。研究^[3]显示隐丹参酮可以减轻氧化低密度脂蛋白诱导的动脉粥样硬化病灶的事件, 并减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤。隐丹参酮通过抑制 RAW264.7 细胞 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传导途径抑制炎症细胞因子的分泌^[4]。同时, 隐丹参酮通过调节淀粉样前体蛋白的代谢产生神经保护和抗阿尔茨海默病的作用^[5]。

研究^[6-9]显示, 隐丹参酮具有抗肿瘤活性。该研究旨在研究隐丹参酮对恶性神经胶质瘤细胞 C6 的抗肿瘤作用, 并探索其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 荧光倒置显微镜购自日本 NIKON 公司产品; CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司产品; 酶标仪购自美国 Bio-Tech 公司; C6 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; DMEM、青霉素链霉素双抗 (PS)、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; 隐丹参酮、MTT、DMSO 购自美国 Sigma Aldrich 公司; BrdU 细胞增殖试剂盒购自美国 Exalpha Biologicals 公司; 抗 p-STAT3 (Tyr705) 和抗 p-JAK2 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 抗 GAPDH 抗体、hochest33258 购自苏州碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 C6 细胞用高葡萄糖 DMEM 培养基, 含 10% FBS、100 μ g/ml 链霉素和 100 U/ml 的青霉素, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。每周 1 次的间隔, 以 1:5 的比例进行传代培养。

1.2.2 MTT 法 为了测量细胞生长, 进行 MTT 测定法。细胞铺在 100 μ l 96 孔板的培养基中。培养过夜后, 将细胞用各种浓度的 CTS 的处理 24 ~ 48 h, 然后用 MTT (5 mg/ml) 孵育和 DMSO (100 μ l/孔) 溶解。用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度值。

1.2.3 hochest33258 法染色细胞 细胞接种于培养板, 不同浓度隐丹参酮处理 24 h 后, 弃去培养液, 用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛常温下固定 30 min, PBS 洗 3 次, 5 mg/L Hoechst 33258 常规染色 10 min, PBS 洗 3 次, 倒置荧光显微镜下观察。

1.2.4 BrdU 细胞增殖试验 参考文献^[10]报道和 BrdU 细胞增殖测定试剂盒说明, 对细胞增殖进行测定。简言之, 将细胞悬浮在生长培养基中接种在 96 孔板中, 密度为每个孔 10 000 个细胞, 并在 5% 的 CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。第 2 天加入 0 ~ 20 μ mol/L 浓度的隐丹参酮。隐丹参酮处理 48 h 后,

2016-03-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81460619); 广西自然科学基金青年项目 (编号: 2015GXNSFBA139178)

作者单位: ¹ 桂林医学院药学院药理学教研室 桂林 541001

² 复旦大学药学院药理学与生物化学教研室, 上海 200120

作者简介: 唐焕焕, 女, 硕士研究生;

吕良, 男, 讲师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: luliang998@163.com

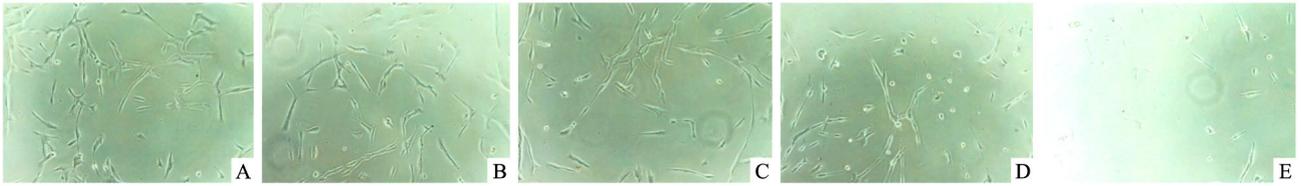


图1 不同浓度隐丹参酮对 C6 细胞形态的影响 ×100

A: 隐丹参酮(0 μmol/L) 处理组; B: 隐丹参酮(2.5 μmol/L) 处理组; C: 隐丹参酮(5 μmol/L) 处理组; D: 隐丹参酮(10 μmol/L) 处理组; E: 隐丹参酮(20 μmol/L) 处理组

20 μl 的 BrdU 加入到每个孔 , 孵育 12 h。然后加入固定液在室温中培养 30 min。洗涤后 , 细胞与一个预稀释的检测抗体在室温下孵育 1 h。加入 HRP 偶联的二抗在室温下孵育 1 h 后 , 加入终止液。然后用酶标仪在 450 nm 测定光密度值。

1.2.5 Western blot 法检测 各组细胞用预冷的 PBS 洗涤 2 次 , 用 RIPA 缓冲液 [含 50 mmol/L 的 Tris , pH 7.4 , 150 mmol/L NaCl , 1 mmol/L 的 PMSF , 1 mmol/L 的 EDTA , 1% 的 Triton X-100 , 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) , 1 mmol/L 的 Na₃VO₄ , 1 mmol/L 的 NaF 和蛋白酶抑制剂混合物 (罗氏公司)] 收集蛋白样品。含等量蛋白的样品通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离 , 并转移至硝酸纤维素膜上。膜在含 0.05% Tween-20 的 PBS 中用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h , 然后在 4 °C 中用一抗孵育过夜。然后将膜用 PBS 洗涤后 , 用辣根过氧化物酶连接的二抗在室温孵育 1 h。条带通过增强型化学发光液进行免疫发光并进行检测 , 用化学发光成像仪观察。

1.3 统计学处理 所有实验重复 3 次以上 , 并且数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异通过单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 并用 LSD 检验进一步两两比较。

2 结果

2.1 从细胞形态角度观察隐丹参酮对 C6 细胞生长的影响 加不同浓度隐丹参酮后 , 在显微镜下观察细胞的密度、形态 , 见图 1 , 随着隐丹参酮浓度的增加 , 细胞密度减少。

2.2 采用 MTT 法检测隐丹参酮对 C6 细胞生长的影响 各组间差异有统计学意义 ($F = 100.87$, $P < 0.05$) , 隐丹参酮呈浓度依赖性抑制 C6 细胞生长。见图 2。

2.3 使用 BrdU 掺入测定法确认 CTS 对细胞增殖的效果 各组间差异有统计学意义 ($F = 48.08$, $P < 0.05$) , 隐丹参酮剂量依赖性抑制 C6 细胞增殖。见

图 3。

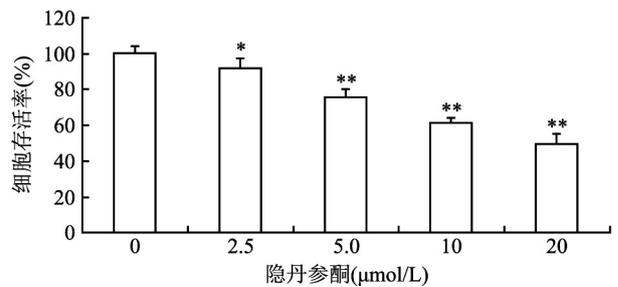


图2 隐丹参酮对 C6 细胞存活率的影响

与隐丹参酮 0 μmol/L 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

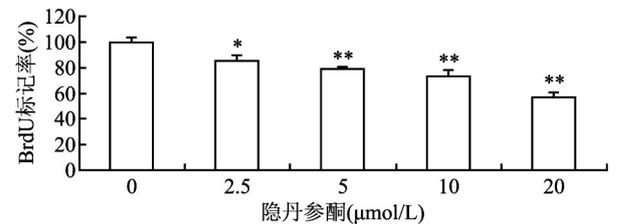


图3 隐丹参酮对 C6 细胞增殖率的影响

与隐丹参酮 0 μmol/L 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 采用 hochest33258 法检测隐丹参酮对 C6 细胞凋亡的影响 不同剂量隐丹参酮 (0 ~ 20 μmol/L) 处理 24 h 后细胞核呈现弥漫均匀的低强度荧光 , 呈浅染核大形态 , 均未出现核碎裂、核固缩等典型细胞凋亡形态。见图 4。

2.5 Western blot 法检测隐丹参酮对激活状态的 STAT3 的作用 STAT3 信号通路在肿瘤生长中有关键作用 , STAT3 信号通路在人脑胶质瘤细胞呈持续激活状态。本实验研究隐丹参酮是否对激活状态的 STAT3 具有作用。隐丹参酮 (5、10 μmol/L) 对 C6 细胞 Tyr705 位点磷酸化具有抑制作用。为了探索隐丹参酮是否通过抑制 STAT3 上游信号通路引起的其磷酸化水平的变化 , 本研究检测 STAT3 的上游激酶 JAK2 的磷酸化水平。隐丹参酮 (5、10 μmol/L) 处理 1 h 后 , 使用 Western blot 法检测

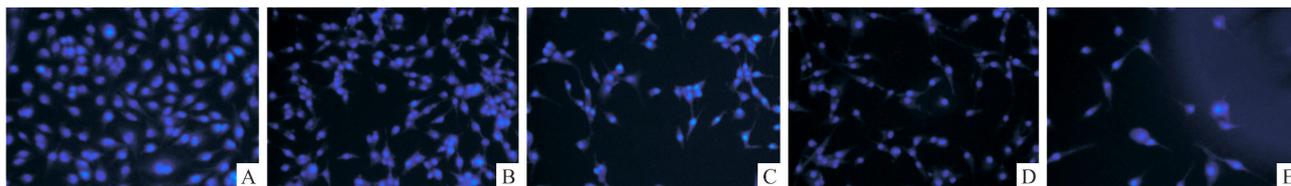


图4 不同浓度隐丹参酮对 C6 细胞核 hochechst33258 染色的影响 ×100

A: 隐丹参酮(0 $\mu\text{mol/L}$) 处理组; B: 隐丹参酮(2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组; C: 隐丹参酮(5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组; D: 隐丹参酮(10 $\mu\text{mol/L}$) 处理组; E: 隐丹参酮(20 $\mu\text{mol/L}$) 处理组

p-JAK2、p-STAT3 (Tyr705) 和 GAPDH 蛋白表达水平 结果显示隐丹参酮并不影响上游激酶 JAK2 的磷酸化水平,见图 5。

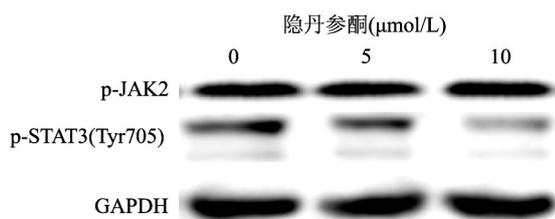


图5 不同浓度隐丹参酮对 C6 细胞 p-JAK2 和 p-STAT3(Tyr705) 的影响

3 讨论

本实验研究了隐丹参酮对神经胶质瘤细胞株 C6 的增殖作用,并探讨其可能机制。结果表明:① 隐丹参酮具有抑制神经胶质瘤细胞株 C6 生长的作用;② 隐丹参酮抑制神经胶质瘤细胞株 C6 的生长是通过抑制细胞增殖途径,而不是凋亡;③ 隐丹参酮抑制 p-STAT3 (Tyr705),但不抑制其上游激酶 JAK2。

前期研究^[11]中用隐丹参酮处理正常大鼠脑细胞(原代皮层神经元和星形胶质细胞)显示,在 2.5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内隐丹参酮对正常细胞没有毒性。因此本研究使用了上述浓度进行大鼠来源的恶性胶质瘤细胞株 C6 的抗肿瘤实验。隐丹参酮对其它类型肿瘤的作用已有部分报道^[6-9],在 HepG2 和 MCF7 肿瘤细胞,隐丹参酮通过诱导细胞凋亡抑制细胞生长。在前列腺癌、白血病和宫颈癌细胞株,隐丹参酮既诱导细胞凋亡,又抑制其增殖,从而抑制肿瘤细胞生长^[6-9]。研究显示隐丹参酮抑制神经胶质瘤细胞的生长作用是通过增殖途径,且没有证据表明隐丹参酮会诱导神经胶质瘤细胞凋亡。而在恶性神经胶质瘤细胞 STAT3 是持续性激活的,这与正常细胞不同^[12]。因此,特异性靶向 STAT3 信号的

被认为是治疗恶性神经胶质瘤的具有潜在开发价值的靶点^[13]。

已经有文献^[14]报道,隐丹参酮不会影响上游激酶的磷酸化水平,如 EGFR 和 Src。因此,本研究选择检测这些生长因子和细胞因子受体的下游激酶(JAK2),而这些激酶在胶质瘤中是异常激活的。遗憾的是,并没有显示隐丹参酮对 p-JAK2 具有改变作用。虽然最近的研究^[10]表明,CTS 通过抑制 mTOR 信号抑制 Rh30 和 DU145 细胞的增殖。并且,在 C5a 诱导的 RAW264.7 细胞的迁移实验中,隐丹参酮抑制 p-Akt^[15]。因此,在不同细胞类型中隐丹参酮可能具有不同的作用和机制。可以确认 CTS 选择性阻断 STAT3 的酪氨酸磷酸化。

综上所述,当前的研究表明,CTS 可能是一个潜在的神经胶质瘤抗增殖剂,其机制可能与 STAT3 信号有关。

参考文献

- [1] Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2005, 64(6): 479-89.
- [2] Stupp R, Mason W P, van den Bent M J, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 987-96.
- [3] Ang K P, Tan H K, Selvaraja M, et al. Cryptotanshinone attenuates *in vitro* oxLDL-induced prelesional atherosclerotic events [J]. Planta Med, 2011, 77(16): 1782-7.
- [4] Tang S, Shen X Y, Huang H Q, et al. Cryptotanshinone suppressed inflammatory cytokines secretion in RAW264.7 macrophages through inhibition of the NF-kappaB and MAPK signaling pathways [J]. Inflammation, 2011, 34(2): 111-8.
- [5] Mei Z, Zhang F, Tao L, et al. Cryptotanshinone, a compound from Salvia miltiorrhiza modulates amyloid precursor protein metabolism and attenuates beta-amyloid deposition through upregulating alpha-secretase *in vivo* and *in vitro* [J]. Neurosci Lett, 2009, 452(2): 90-5.
- [6] Park I J, Kim M J, Park O J, et al. Cryptotanshinone induces ER

- stress-mediated apoptosis in HepG2 and MCF7 cells [J]. *Apoptosis*, 2012, 17(3): 248–57.
- [7] Li H, Zhang Q, Chu T, et al. Growth-inhibitory and apoptosis-inducing effects of tanshinones on hematological malignancy cells and their structure activity relationship [J]. *Anticancer Drugs*, 2012, 23(8): 846–55.
- [8] 叶因涛, 徐文清, 仲巍. 隐丹参酮对宫颈癌 Hela 细胞增殖及细胞凋亡的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(1): 118–21.
- [9] Chen W, Luo Y, Liu L, et al. Cryptotanshinone inhibits cancer cell proliferation by suppressing Mammalian target of rapamycin-mediated cyclin D1 expression and Rb phosphorylation [J]. *Cancer Prev Res(Phila)*, 2010, 3(8): 1015–25.
- [10] Park S J, Kong H K, Kim Y S, et al. Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase decreases cell mobility and cell proliferation through cell cycle arrest [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(7): 2127–38.
- [11] Lu L, Li C, Li D, et al. Cryptotanshinone inhibits human glioma cell proliferation by suppressing STAT3 signaling [J]. *Mol Cell Biochem* 2013, 381(1–2): 273–82.
- [12] Heimberger A B, Priebe W. Small molecular inhibitors of p-STAT3: novel agents for treatment of primary and metastatic CNS cancers [J]. *Recent Patent CNS Drug Discov*, 2008, 3(3): 179–88.
- [13] Doucette T A, Kong L Y, Yang Y, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 promotes angiogenesis and drives malignant progression in glioma [J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(9): 1136–45.
- [14] Shin D S, Kim H N, Shin K D, et al. Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 193–202.
- [15] Don M J, Liao J F, Lin L Y, et al. Cryptotanshinone inhibits chemotactic migration in macrophages through negative regulation of the PI3K signaling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151(5): 638–46.

Cryptotanshinone inhibits proliferation of malignant glioma C6 cells and its influence on JAK2-STAT3 signal pathway

Tang Huanhuan¹, Shen Xiaoyan², Duan Xiaoqun¹, et al

(¹Dept of Pharmacology, Guilin Medical University of Pharmacy, Guangxi 541001;

²Dept of Pharmacology and Biochemistry, Fudan University of Pharmacy, Shanghai 200120)

Abstract Objective To evaluate the effect of cryptotanshinone(CTS) on the proliferation of malignant glioma C6 cells and its influence on JAK2-STAT3 signal pathway. **Methods** MTT was used to evaluate the survival rate of CTS on C6 cells. Hoechst staining and BrdU assay was used to detect the cell apoptosis and proliferation. Western blot was used to detect the expressions of p-JAK2 and p-STAT3(Tyr705). **Results** CTS inhibited C6 cells growth and proliferation significantly($P < 0.05$), but not induced apoptosis. CTS decreased phosphorylation of p-STAT3(Tyr705), but not p-JAK2. **Conclusion** CTS may be a potential anti-proliferation agent of malignant glioma C6 cells and that its mechanism may be related to the inhibition of STAT3 signaling.

Key words malignant glioma; proliferation; JAK2-STAT3 signaling pathway