

丹参注射液通过干扰肿瘤细胞与血小板相互作用抑制 SKOV3 细胞体外增殖

袁萍¹, 姜思琴¹, 聂亦然², 刘盛玲³, 傅蔚然⁴, 田会茹¹, 付剑江^{1*}

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004;

2. 江西中医药大学国际教育学院, 南昌 330004;

3. 江西中医药大学生命科学院, 南昌 330004; 4. 首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 观察丹参注射液对肿瘤细胞与血小板相互作用诱导的卵巢癌细胞增殖的抑制作用。方法: 采用噻唑蓝(MTT)比色法和集落形成法, 观察血小板对 SKOV3 体外生长的诱导作用及丹参注射液(12, 24, 48 g·L⁻¹)的抑制作用; 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血小板-肿瘤细胞相互作用系统及血小板上清液中转化生长因子-β₁(TGF-β₁)含量, 并观察丹参注射液对 TGF-β₁分泌的影响; 采用微量板法和 ELISA 观察肿瘤细胞培养上清液对血小板聚集和分泌的影响, 并检测丹参注射液的抑制作用; 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)观察丹参注射液对血小板核转录因子-κB(NF-κB)信号转导通路的影响及单独用丹参注射液的影响。结果: 与空白组比较, 血小板诱导组吸光度 A₅₇₀显著升高(P<0.01); 血小板+丹参注射液组 A₅₇₀则较血小板诱导组显著降低(P<0.01), 且与丹参注射液组比较, 经血小板诱导的同剂量丹参注射液组细胞增殖抑制率更显著(P<0.01)。与空白组比较, 血小板诱导组集落数明显增加(P<0.05); 血小板+丹参注射液的集落数则明显低于血小板诱导组(P<0.05, P<0.01)。与空白组比较, 血小板诱导组上清液中 TGF-β₁含量显著升高(P<0.01); 血小板+丹参注射液组 TGF-β₁含量显著降低(P<0.01); 与丹参注射液(24 g·L⁻¹)组比较, 经血小板诱导的同剂量丹参注射液组抑制率更高(P<0.01)。与空白组比较, 经丹参注射液处理的血小板上清中 TGF-β₁明显减少(P<0.05, P<0.01); 经丹参注射液处理的 SKOV3 上清中 TGF-β₁的含量差异无统计学意义。与空白组比较, SKOV3 细胞上清液诱导组的小血小板聚集、血栓素 A₂(TXB₂)和 5-羟色胺(5-HT)分泌显著升高(P<0.01), 细胞上清液诱导+丹参注射液组上述指标均显著降低(P<0.01), 且与丹参注射液(24 g·L⁻¹)组比较, 经细胞上清液诱导的同剂量丹参注射液组抑制率更高(P<0.01)。与空白组比较, 血小板诱导组的磷酸化 TGF-β 激活激酶 1(p-TAK1), p-NF-κB 表达显著升高, p-NF-κB 抑制蛋白(p-IκB)表达显著降低(P<0.01); 血小板+丹参注射液组 p-TAK1, p-NF-κB 表达均显著降低, p-IκB 表达显著升高(P<0.01)。结论: 丹参注射液可通过抑制血小板与肿瘤细胞相互作用从而对 SKOV3 细胞增殖产生的影响, 其作用机制可能与抑制血小板分泌 TGF-β₁有关。

[关键词] 丹参注射液; 血小板; 卵巢癌; 相互作用

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0059-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212324

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211015.0425.002.html>

[网络出版日期] 2021-10-15 13:43

Danshen Injection Inhibits SKOV3 Cell Proliferation *in Vitro* by Interfering with Their Interaction with Platelets

YUAN Ping¹, JIANG Si-qin¹, NIE Yi-ran², LIU Sheng-ling³, FU Wei-ran⁴, TIAN Hui-ru¹, FU Jian-jiang^{1*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. International Education College, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

3. College of Life Sciences, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

4. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[收稿日期] 20210809(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873043, 81960736)

[第一作者] 袁萍, 硕士, 从事中药抗肿瘤药理研究, E-mail: 1347015808@qq.com

[通信作者] * 付剑江, 博士, 教授, 从事中药抗肿瘤药理研究, Tel: 0791-87118919, E-mail: jianjiang_fu@yeah.net

[Abstract] Objective: To investigate the inhibitory effects of Danshen injection against ovarian cancer cell proliferation induced by the interaction between platelets and cancer cells. **Method:** The induction of platelets on SKOV3 growth *in vitro* and the inhibitory effect of Danshen injection at 12, 24, and 48 g·L⁻¹ were observed by 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and cell colony formation assays. The content of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in the platelet-tumor cell interaction system and platelet supernatant and the effect of Danshen injection on TGF- β_1 secretion were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The influences of tumor cell culture supernatant on platelet aggregation and secretion and the inhibitory effect of Danshen injection were determined by microplate assay and ELISA. The effects of Danshen injection on platelet nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway were assayed by Western Blot. **Result:** Compared with the blank group, the platelet induction group exhibited significantly elevated absorbance at A_{570} ($P < 0.01$), while the absorbance at A_{570} in the platelet + Danshen injection group was significantly lower than that in the platelet induction group ($P < 0.01$). The comparison with the Danshen injection group revealed that the cell proliferation inhibitory rate in the platelet + Danshen injection group at the same dose was more significant ($P < 0.01$). The number of colonies in the platelet induction group was obviously increased in contrast to that in the blank group ($P < 0.05$), while the number of colonies in the platelet + Danshen injection group was significantly lower than that in the platelet induction group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As demonstrated by comparison with the blank group, TGF- β_1 content in the supernatant of the platelet induction group rose remarkably ($P < 0.01$), whereas that in the platelet + Danshen injection group declined ($P < 0.01$). Compared with the Danshen injection (24 g·L⁻¹) group, the platelet + Danshen injection group displayed more obvious inhibition ($P < 0.01$). Compared with the blank group, Danshen injection significantly reduced the TGF- β_1 content in platelet supernatant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no significant change in the content of TGF- β_1 in SKOV3 supernatant treated with Danshen injection. The platelet aggregation, thromboxane A₂ (TXB₂), and serotonin (5-HT) secretion in the SKOV3 cell supernatant induction group were significantly increased as compared with those in the blank group ($P < 0.01$), while such indexes in the cell supernatant induction + Danshen injection group were obviously decreased ($P < 0.01$). Compared with the Danshen injection (24 g·L⁻¹) group, the cell supernatant induction + Danshen injection group displayed more obvious inhibition at the same dose ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the platelet induction group exhibited obviously up-regulated phosphorylated TGF- β -activated kinase-1 (TAK-1) and NF- κ B, but down-regulated phosphorylated inhibitory protein of NF- κ B (I κ B) ($P < 0.01$), which however were significantly reversed in the platelet + Danshen injection group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Danshen injection affect the proliferation of SKOV3 cells by inhibiting their interaction with platelets, which may be related to the inhibited secretion of TGF- β_1 .

[Keywords] Danshen injection; platelet; ovarian cancer; interaction

血小板是一种多功能的血细胞,在止血凝血、伤口愈合、炎症反应及血栓形成等生理和病理过程中有重要作用。大量证据表明血小板与恶性肿瘤之间具有密切的关系。恶性肿瘤的发生和发展往往伴随着血小板数量的增多和(或)活性的明显升高,30%~60%恶性肿瘤常合并血小板增多,甚至伴随血栓疾病,尤其在肿瘤晚期此现象相当普遍^[1]。血小板增多与肿瘤的类型、分期密切相关,二者呈正相关性^[2]。

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* 的干燥根及根茎,是最常用的活血化瘀中

药之一,首载于《神农本草经》,具有去瘀止痛、养血安神的功效,广泛用于心血管疾病的治疗。现代药理学研究表明,丹参可以显著抑制血小板活化、抑制血小板聚集,具有良好的抗血小板聚集作用,是临床上广泛使用的防治血栓性疾病的治疗药物。随着活血化瘀则在肿瘤临床的广泛应用,丹参用于肿瘤治疗的报道逐年增多。研究表明,丹参中含有多种抗肿瘤活性成分,这些活性成分在肿瘤发生发展及转移的不同阶段,起着重要作用^[3-4]。鉴于血小板与肿瘤细胞之间的相互作用和丹参的抗血小板及抗肿瘤活性,本研究拟从血小板与肿瘤细胞之

间的相互作用入手,探讨丹参注射液的抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 药物 丹参注射液(浙江康恩贝制药股份有限公司,国药准字Z33020529,批号181208),每支10 mL,含丹参15 g。

1.2 细胞株及细胞培养 人卵巢癌细胞株SKOV3细胞,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞库,由江西中医药大学药理学科组传代、保管,其中10~15代细胞进行实验。SKOV3细胞培养于含10%胎牛血清、青霉素和链霉素的DMEM培养基中培养,置于37℃,5%CO₂的培养箱内,3~4 d传代1次。

1.3 试剂 凝血酶,琼脂,噻唑蓝(MTT),乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA)(Sigma-Aldrich公司,批号分别为10602400001,232-658-1,M2128,ED2P-1423);人全血(江西省血液中心,批号1910312);血栓素B₂(TXB₂)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(Cloud-Clone Corp公司,批号L150504364);5-羟色胺(5-HT)ELISA试剂盒,磷酸化(p)-转化生长因子激活激酶1(TAK1),p-抑制性核转录因子κBα(p-IκBα),p-核转录因子-κB(p-NF-κB p65),β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体(Abcam公司,批号ab133053,109404,133426,76302,109404);人转化生长因子-β₁(TGF-β₁)ELISA试剂盒(R&D Systems公司,批号DY240-05);辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔免疫球蛋白(Ig)G(Cell Signaling Technology公司,批号7074s)。

1.4 仪器 EC3型凝胶成像系统(美国UVP公司);ELx800型酶标仪(美国BioTek公司);PowerPac™通用型电泳仪,Trans-blot转膜仪(美国Bio-Rad公司);DMI3000B型荧光倒置显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 含血小板血浆的制备 将EDTA抗凝的人体血液于室温下1 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径13.5 cm,下同),取上清于硅化玻璃管中得富血小板血浆(PRP),剩余血20℃,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清得贫血小板血浆(PPP),以PPP稀释PRP到适宜浓度的含血小板血浆。

2.2 MTT比色法检测细胞生长 将生长良好的SKOV3细胞用胰酶消化后配制密度1×10⁴个/mL的细胞液,按1 000个/孔接种于96孔板,每孔加100 μL。待细胞在37℃,5%CO₂条件下培养24 h贴壁后换成不同处理的培养基,分别为空白组、血

小板诱导组(血小板终密度1.5×10¹⁰个/L),丹参注射液中剂量组(终质量浓度24 g·L⁻¹),血小板诱导+丹参注射液高剂量组(血小板终密度1.5×10¹⁰个/L,终质量浓度48 g·L⁻¹),血小板诱导+丹参注射液中剂量组(血小板终密度1.5×10¹⁰个/L,终质量浓度24 g·L⁻¹),血小板诱导+丹参注射液低剂量组(血小板终密度1.5×10¹⁰个/L,终质量浓度12 g·L⁻¹),每个处理设3个复孔,继续培养72 h。检测前4 h,弃去上清,每孔加入5 g·L⁻¹ MTT 100 μL,4 h后弃上清,加二甲基亚砜(DMSO)150 μL,用全自动酶标仪于570 nm处测定吸光度A。

2.3 集落形成法检测细胞增殖 取对数生长期的SKOV3细胞,经消化后制备成密度为200个/mL的细胞悬液,接种铺板至6孔细胞培养板中,每孔细胞悬液1 mL,在5%CO₂,37℃细胞培养箱中培养。分组方法同2.2项。继续培养14 d,每天更换培养基。培养结束后,弃去培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次,晾干后每孔加入甲醇1 mL固定15 min,PBS洗涤,每孔加入0.5 g·mL⁻¹结晶紫染液1 mL,静置10 min后,蒸馏水轻轻洗涤,在显微镜下计数各组>50个细胞数的集落数。

2.4 ELISA检测培养上清中TGF-β₁含量 血小板与肿瘤细胞共培养及丹参注射液孵育方法及分组同2.2项,孵育结束后,收集上清液,采用体系上清液中TGF-β₁含量采用试剂盒测定上清液中TGF-β₁含量。

2.5 ADP诱导的血小板聚集实验 PRP 900 μL加入5 mL洁净玻璃管中,加入SKOV3细胞培养上清液100 μL,摇匀,并在37℃摇床振摇孵育2 min。取孵育液280 μL于96孔板中,随后分别加入ADP溶液(ADP溶液的终浓度为10 mmol·L⁻¹)和丹参注射液(终质量浓度分别为12,24,48 g·L⁻¹)各10 μL。细胞上清液诱导组加入ADP溶液和空白溶剂各10 μL。另取PRP 900 μL加入5 mL洁净玻璃管中,加入空白细胞培养基100 μL,摇匀,37℃摇床振摇孵育2 min,作为空白管。从上述空白管中取孵育液280 μL于96孔板中,随后分别加入ADP溶液(ADP溶液终浓度为10 mmol·L⁻¹)和空白溶剂各10 μL,作为空白组。另设丹参注射液组,以丹参注射液(终质量浓度为24 g·L⁻¹)10 μL取代空白组中的空白溶剂。上述各孔中血小板终密度为5×10⁸个/L。将96孔板放入37℃摇床振摇孵育210 s后,酶标仪上测定490 nm处A,计算各组血小板聚集率。聚集率=(A_{空白组}-A_{给药组})/A_{空白管组}×100%。

2.6 血小板TXB₂,5-HT含量测定 TXA₂性质不稳定,半衰期极端,易水解为稳定的代谢产物TXB₂,通过测定TXB₂水平反应血小板中TXA₂含量。按照2.1项方法制备PRP悬液。按照2.5项方法处理血小板。孵育结束后,4℃,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液。分别采用ELISA试剂盒测定TXB₂,5-HT含量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测SKOV3细胞相关蛋白表达 血小板与肿瘤细胞共培养及丹参注射液孵育方法及分组同2.2项,各组细胞处理结束后,收集细胞,经洗涤,裂解后,采用考马斯亮蓝法测定总蛋白质含量。取等量蛋白在10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳。转膜,封闭,加入一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,经Tris缓冲盐水(TTBS)洗膜后,加入二抗(1:1 000),室温孵育2 h。洗膜,采用二氨基联苯胺(DAB)显色剂显色,在EC3凝胶成像系统中拍照,分析。

2.8 统计学分析 应用SPSS 13.0统计软件进行分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间差异采用单因素方差分析,方差齐性采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对血小板诱导的SKOV3细胞体外增殖的影响

与空白组比较,血小板诱导组 A_{570} 显著升高($P<0.01$),表明血小板可显著刺激卵巢癌细胞SKOV3增殖。血小板诱导+丹参注射液(12,24,48 g·L⁻¹)组细胞的 A_{570} 均显著低于血小板诱导组($P<0.01$)。与丹参注射液(24 g·L⁻¹)组比较,血小板诱导+丹参注射液同剂量组细胞增殖抑制率更显著($P<0.01$)。见表1。

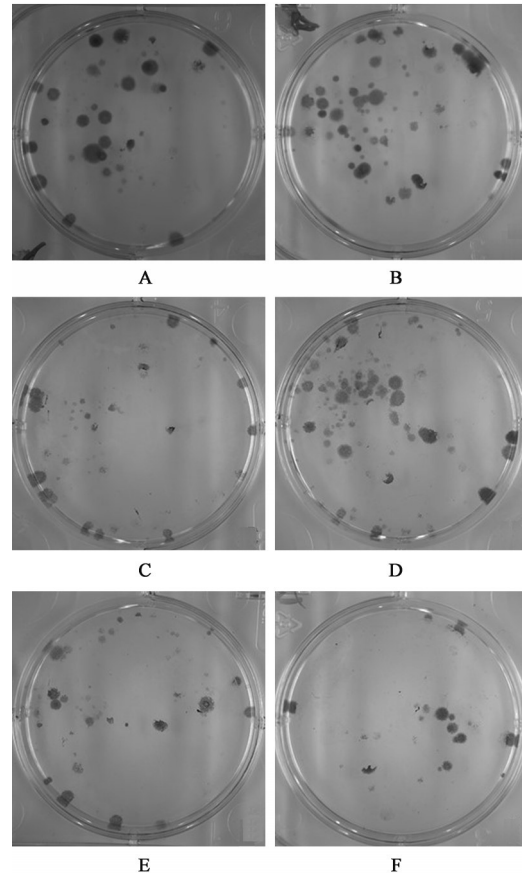
表1 血小板对肿瘤细胞SKOV3体外生长的诱导作用及丹参注射液的抑制作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of platelet (PLT) on proliferation of SKOV3 cells and inhibition of Danshen injection(DAN) ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | A_{570} | 抑制率/% |
|-------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白 | | 1.41±0.09 | - |
| 血小板诱导 | | 1.91±0.07 ²⁾ | - |
| 丹参注射液 | 24 | 1.22±0.11 ¹⁾ | 13.45±1.24 |
| 血小板诱导+丹参注射液 | 12 | 1.67±0.10 ³⁾ | 12.17±0.87 |
| | 24 | 0.94±0.12 ³⁾ | 50.53±3.14 ⁴⁾ |
| | 48 | 0.48±0.03 ³⁾ | 73.10±4.39 |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与血小板诱导组比较³⁾ $P<0.01$;与丹参注射液组比较⁴⁾ $P<0.01$ (表3,4同)。

3.2 对血小板诱导的SKOV3细胞体外集落形成的影响 与空白组比较,血小板诱导组集落数明显增加($P<0.05$)。血小板诱导+丹参注射液(12,24,48 g·L⁻¹)组细胞集落数均明显低于血小板诱导组($P<0.05, P<0.01$)。与丹参注射液(24 g·L⁻¹)组比较,血小板诱导+丹参注射液同剂量组集落形成抑制率更高($P<0.05$)。见图1,表2。



A. 空白组;B. 血小板诱导组;C. 丹参注射液组;D~F. 血小板诱导+丹参注射液(12,24,48 g·L⁻¹)组

图1 丹参注射液对血小板诱导的SKOV3细胞集落形成的影响
Fig. 1 Effect of platelet on colony-forming of SKOV3 cells and inhibition of DAN

3.3 对TGF-β₁分泌的影响

与空白组比较,血小板诱导组上清液中TGF-β₁含量显著升高($P<0.01$);与血小板诱导组比较,血小板诱导+丹参注射液(12,24,48 g·L⁻¹)组可显著降低血小板与SKOV3细胞共孵育体系中TGF-β₁含量($P<0.01$)。与丹参注射液(24 g·L⁻¹)组比较,血小板诱导+丹参注射液同剂量组抑制率更高($P<0.01$)。随后检测了经丹参注射液孵育的血小板和SKOV3细胞上清中TGF-β₁的含量,与空白组比较,经丹参注射液处理的血小板上清中TGF-β₁明显减少($P<0.05, P<0.01$),提示丹参注射液可能通过抑制血小板释放TGF-β₁,进而抑制

表2 丹参注射液对血小板诱导的SKOV3细胞集落形成的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of PLT on colong-forming of SKOV3 cells and inhibition of DAN ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | 集落数 /个 | 抑制率 /% |
|-------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白 | | 54.33±4.04 | - |
| 血小板诱导 | | 71.33±7.23 ¹⁾ | - |
| 丹参注射液 | 24 | 25.00±2.00 ²⁾ | 53.27±3.98 |
| 血小板诱导+丹参注射液 | 12 | 44.33±8.62 ³⁾ | 37.42±5.88 |
| | 24 | 28.67±5.51 ⁴⁾ | 59.62±1.83 ⁵⁾ |
| | 48 | 17.00±3.46 ⁴⁾ | 66.51±4.81 |

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与血小板诱导组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与丹参注射液组比较⁵⁾P<0.05。

SKOV3细胞的增殖。见表3,4。

表3 丹参注射液对血小板-SKOV3相互作用体系中TGF-β₁含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of DAN on TGF-β₁ content in PLT and SKOV3 cells interacting system ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | TGF-β ₁ /μg·L ⁻¹ | 抑制率 /% |
|-------------|-------------------------|--|--------------------------|
| 空白 | | 14.95±0.61 | - |
| 血小板诱导 | | 27.75±4.61 ²⁾ | - |
| 丹参注射液 | 24 | 10.02±0.48 ¹⁾ | 28.33±3.68 |
| 血小板诱导+丹参注射液 | 12 | 20.78±2.73 ³⁾ | 30.57±5.98 |
| | 24 | 15.73±2.13 ³⁾ | 45.30±3.54 ⁴⁾ |
| | 48 | 9.74±1.26 ³⁾ | 66.17±5.19 |

3.4 对SKOV3细胞诱导的血小板活化的影响 与空白组比较,SKOV3细胞上清液诱导组的血小板聚集显著升高(P<0.01)。细胞上清液诱导+丹参注射液(12,24,48 g·L⁻¹)组的血小板聚集率均显著低于细胞上清液诱导组(P<0.01)。与丹参注射液

表4 丹参注射液对血小板上清液中TGF-β₁含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of DAN on TGF-β₁ level in supernatant of PLT ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | TGF-β ₁ /μg·L ⁻¹ | 抑制率/% |
|-------|------------------------|--|------------|
| 空白 | | 13.69±0.96 | - |
| 丹参注射液 | 12 | 11.06±1.27 ¹⁾ | 18.86±1.11 |
| | 24 | 9.04±0.73 ²⁾ | 34.63±3.76 |
| | 48 | 6.17±0.64 ²⁾ | 59.30±6.37 |

(24 g·L⁻¹)组比较,细胞上清液诱导+丹参注射液同剂量组抑制率更高(P<0.01)。见表5。

表5 丹参注射液对SKOV3细胞上清液诱导的血小板聚集活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of DAN on aggregation rate of PLT induced by supernatant of SKOV3 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$) %

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | 聚集率 | 抑制率 |
|---------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 空白 | | 43.01±9.09 | - |
| 细胞上清液诱导 | | 67.38±18.23 ¹⁾ | - |
| 丹参注射液 | 24 | 31.07±8.56 ¹⁾ | 26.98±7.25 |
| | 12 | 46.12±15.18 ²⁾ | 33.49±9.16 |
| | 细胞上清液诱导+丹参注射液 | 24 | 34.60±6.12 ²⁾ |
| 48 | | 23.34±5.05 ²⁾ | 61.64±11.63 |

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与细胞上清液诱导组比较²⁾P<0.01;与丹参注射液组比较³⁾P<0.01(表6同)。

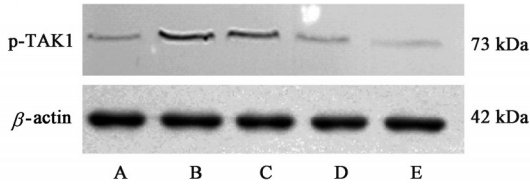
检测丹参注射液对SKOV3细胞上清液诱导的血小板分泌活性,结果与血小板聚集活性相似,细胞上清液可以增强血小板分泌TXA₂和5-HT;与细胞上清液诱导组比较,细胞上清液诱导+丹参注射液(12,24,48 g·L⁻¹)组可显著抑制血小板的分泌活性(P<0.01)。与丹参注射液组比较,等剂量丹参注射液+细胞上清液组具有更高的抑制率(P<0.01)。见表6。

表6 丹参注射液对SKOV3细胞上清液诱导的血小板分泌活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of DAN on the activities of secretion of PLT induced by supernatant of SKOV3 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | TXB ₂ /pg·(10 ⁶ 个PLT) ⁻¹ | 抑制率/% | 5-HT /pg·(10 ⁶ 个PLT) ⁻¹ | 抑制率 /% |
|---------------|-------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
| 空白 | | 16.91±2.59 | - | 159.22±16.81 | - |
| 细胞上清液诱导 | | 58.50±11.64 | - | 203.51±14.70 | - |
| 丹参注射液 | 24 | 11.09±3.80 ¹⁾ | 34.47±5.24 | 136.22±11.31 ¹⁾ | 14.36±3.39 |
| | 12 | 46.10±9.08 ²⁾ | 21.96±2.85 | 170.47±9.30 ²⁾ | 16.44±3.29 |
| 细胞上清液诱导+丹参注射液 | 24 | 32.30±7.02 ²⁾ | 44.72±3.50 ³⁾ | 131.00±14.51 ²⁾ | 35.69±8.87 ³⁾ |
| | 48 | 26.23±3.92 ²⁾ | 55.93±9.61 | 110.21±8.60 ²⁾ | 45.41±13.81 |

3.5 对血小板细胞诱导的SKOV3内p-TAK1蛋白表达的影响 与空白组比较,血小板诱导组p-TAK1蛋白表达显著升高($P<0.01$)。细胞上清液+丹参注射液($12, 24, 48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组p-TAK1蛋白表达均显著低于细胞上清液诱导组($P<0.01$)。见图2,表7。



A. 空白组; B. 血小板诱导组; C-E. 血小板+丹参注射液(12, 24, 48 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组(图3同)

图2 丹参注射液对SKOV3细胞诱导的血小板p-TAK1表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of DAN on expression of p-TAK1 in PLT induced by supernatant of SKOV3 cells

表7 丹参注射液对SKOV3细胞诱导的血小板p-TAK1蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of DAN on expression of p-TAK1 in PLT induced by supernatant of SKOV3 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | p-TAK1/ β -actin |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 空白 | | 0.31 \pm 0.09 |
| 细胞上清液诱导 | | 1.75 \pm 0.23 ¹⁾ |
| 细胞上清液+丹参注射液 | 12 | 0.93 \pm 0.23 ²⁾ |
| | 24 | 0.71 \pm 0.31 ²⁾ |
| | 48 | 0.16 \pm 0.05 ²⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与细胞上清液诱导组比较²⁾ $P<0.01$ 。

3.6 对血小板诱导的SKOV3细胞NF- κ B信号转导通路活性的影响 与空白组比较,血小板诱导组p-NF- κ B蛋白表达显著升高,p-I κ B蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与血小板诱导组比较,血小板诱导+丹参注射液($24, 48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)处理可显著升高p-I κ B蛋白表达,降低p-NF- κ B蛋白表达($P<0.01$)。见图3,表8。

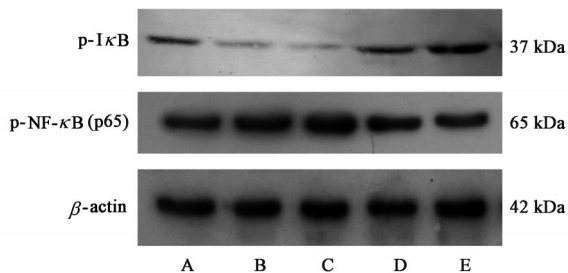


图3 丹参注射液对血小板诱导的SKOV3细胞NF- κ B信号转导通路活性的影响。

Fig. 3 Electrophoresis of DAN on activities of NF- κ B signaling transduction pathway in SKOV3 cells induced by PLT

表8 丹参注射液对血小板诱导的SKOV3细胞NF- κ B信号转导通路活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of thrombin activated platelet on expression of NF- κ B in SKOV3 cells and inhibition of DAN ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | p-I κ B | p-NF- κ B |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 空白 | | 0.077 \pm 0.006 | 2.260 \pm 0.264 |
| 血小板诱导 | | 0.034 \pm 0.002 ¹⁾ | 3.141 \pm 0.259 ¹⁾ |
| 血小板诱导+丹参注射液 | 12 | 0.023 \pm 0.002 | 4.011 \pm 0.241 |
| | 24 | 0.113 \pm 0.014 ²⁾ | 2.508 \pm 0.163 ²⁾ |
| | 48 | 0.312 \pm 0.031 ²⁾ | 1.785 \pm 0.152 ²⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与血小板诱导组比较²⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

丹参具有祛瘀、止痛、活血通经之功效,是中医治疗肿瘤的临床实践中使用频率最高的活血化瘀中药之一。在对1362个抗癌经验方中应用频率前60位的中药排序中,丹参排在第4位^[5-6],丹参具有抑制血小板聚集,改善微循环,抗血栓,抗肿瘤等作用。目前,对于丹参抗肿瘤作用的研究主要围绕其对肿瘤细胞增殖的抑制作用和抗转移开展。对丹参的抗肿瘤增殖作用研究,主要是围绕对肿瘤细胞的直接杀伤作用展开,其作用机制主要表现包括影响恶性肿瘤细胞癌基因表达;直接抑制肿瘤细胞;诱导肿瘤细胞凋亡等方面^[7-9]。这些作用机制并不能完全体现丹参通畅血脉,化散瘀滞的作用特点。鉴于血小板异常在血瘀证中的作用,为了深入揭示丹参的抗肿瘤作用与其活血化瘀功效之间的关系,该文从血小板与卵巢癌细胞相互作用入手,探讨丹参的体外抗肿瘤增殖作用及可能的机制。

本研究结果发现,血小板可以显著刺激卵巢癌细胞SKOV3的增殖,丹参注射液则可浓度依赖性的抑制这种由血小板诱导的细胞增殖作用。在对血小板与SKOV3细胞相互作用体系中TGF- β_1 含量的检测中发现,与未经丹参注射液孵育的对照组比较,丹参注射液孵育组的TGF- β_1 含量降低。进一步研究发现,丹参注射液可单独抑制血小板分泌TGF- β_1 ,提示丹参可能通过抑制血小板分泌TGF- β_1 ,进而抑制SKOV3细胞的体外增殖。进一步检测了SKOV3细胞中TAK1活性的改变。TAK1是参与细胞增殖、分化等多种病理生理过程的重要调节激酶,可由包括TGF- β_1 在内的多种细胞因子激活,并可参与c-Jun激酶(JNK),丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及NF- κ B等信号转导通路的活化^[10-11]。结果发现,经血小板孵育后,SKOV3细胞内磷酸化

的TAK1表达增加,丹参注射液抑制血小板所引起的这种TAK1的活化作用。在对NF- κ B信号转导通路活性的研究中,也证实了丹参的这一效应。上述研究表明,丹参注射液可通过抑制血小板释放TGF- β_1 ,进而抑制SKOV3细胞的增殖。

为了进一步观察丹参注射液对TGF- β_1 含量的影响是否与血小板的活性改变有关,采用微量板法和ELISA观察了SKOV3细胞上清液对血小板活性的影响。结果发现,经SKOV3上清液孵育后,血小板的聚集率及TXA2和5-HT的分泌均增加,提示肿瘤细胞可促进血小板的聚集于分泌,丹参注射液则可浓度依赖性的抑制这种由肿瘤细胞诱导的血小板活化。结果证实丹参注射液可能是通过影响肿瘤细胞诱导的血小板活化,从而降低TGF- β_1 分泌,进而抑制SKOV3细胞增殖。

由于丹参本身具有细胞毒作用,为了辨别丹参的抗肿瘤作用是通过干扰血小板-肿瘤细胞相互作用而产生的,还是因丹参本身的细胞毒作用而导致的,在药效观察是设置了单独的丹参注射液组,作为药效评判,以消除丹参注射液本身的抗肿瘤作用所带来的阳性结果。结果发现,无论是在细胞增殖还是在血小板活化和血小板TGF- β_1 分泌实验中,与单独的丹参注射液组比较,在血小板-肿瘤细胞相互作用组中,丹参注射液都具有更强的抑制率。结果提示,丹参注射液可通过干扰血小板与肿瘤细胞相互作用产生抗肿瘤活性。

综上,丹参注射液可通过抑制血小板与肿瘤细胞相互作用,从而抑制SKOV3细胞的体外增殖,发挥抗肿瘤作用,其机制可能与干扰TGF- β_1 诱导的信号转导有关。本文从血小板与肿瘤细胞的相互作用入手,探索了丹参注射液的体外抗肿瘤效应,后续研究将对丹参注射液的上述效应进行体内的验证,同时,进一步从细胞、分子水平对其作用机制进行深入探讨,为探索丹参乃至活血化瘀药的活血化瘀功效及其抗癌作用间的内在联系、阐明其作用特点提供证据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HAEMMERL M, STONE R L, MENTER D G, et al. The platelet lifeline to cancer: challenges and opportunities [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33 (6) : 965-983.
- [2] XU X R, YOUSEF G M, NI H. Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents [J]. *Blood*, 131 (16) : 1777-1789.
- [3] WANG T, FU X, WANG Z, et al. Danshen formulae for cancer: a systematic review and Meta-analysis of high-quality randomized controlled trials [J]. *Evid-based Compl Alt*, 2019, doi: 10.1155/2019/2310639.
- [4] LIN Y S, SHEN Y C, WU C Y, et al. Danshen improves survival of patients with breast cancer and dihydroisotanshinone I induces ferroptosis and apoptosis of breast cancer cells [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.01226.
- [5] 张伟伟, 陆茵. 丹参抗肿瘤活性成分研究新进展 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(3):389-392.
- [6] 王淙悦, 喻明, 王华伟, 等. 中药应用于肿瘤转移的20年用药规律探索 [J]. *环球中医药*, 2014, 7(2): 113-116.
- [7] ZHANG Y, JIANG P, YE M, et al. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10):13621-13666.
- [8] GUO R, LI L, SU J, et al. Pharmacological activity and mechanism of tanshinone iia in related diseases [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:4735-4748.
- [9] MA L, TANG L, YI Q. Salvianolic acids: potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis disease and cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00097.
- [10] MUKHOPADHYAY H, LEE N Y. Multifaceted roles of TAK1 signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39 (7):1402-1413.
- [11] D'IGNAZIO L, BATIE M, ROCHA S. Hypoxia and inflammation in cancer, focus on HIF and NF-kappaB [J]. *Biomedicines*, 2017, doi: 10.3390/biomedicines5020021.

[责任编辑 张丰丰]