

隐丹参酮对 IGF-1 促 PC12 细胞存活的作用及机制探讨

孟茜, 郑文华*

(中山大学药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 研究隐丹参酮对类胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 促进 PC12 细胞存活的影响及可能机制。**方法:** 首先采用剥夺血清造成细胞损伤模型确定 IGF-1 发挥促存活作用的剂量, 然后不同剂量的隐丹参酮预先作用 PC12 细胞, 再加入 IGF-1 处理, MTT 检测隐丹参酮对 IGF-1 促 PC12 细胞存活的影响; Western blot 检测隐丹参酮对 IGF-1 诱导其受体 (IGF-1R) 磷酸化及下游信号通路磷酸酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 及细胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2 的影响。**结果:** MTT 显示隐丹参酮能剂量依赖性地阻断 IGF-1 的促存活作用, 抑制 PC12 细胞的增殖; Western blot 结果显示 IGF-1 能明显诱导其受体 (IGF-1R) 磷酸化, 而隐丹参酮则起抑制作用, 并使下游 Akt 及 ERK1/2 的磷酸化水平下调, 呈明显的剂量依赖性。**结论:** 隐丹参酮可通过抑制 IGF-1R 及其下游信号分子 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化, 从而抑制 IGF-1 的促存活功能, 发挥其自身抑制细胞存活, 促使细胞凋亡的作用。

[关键词] 隐丹参酮; PC12 细胞; 类胰岛素样生长因子-1 受体; 蛋白激酶 B; 细胞外信号调节激酶 1/2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0195-04

[doi] 10.11653/syfy2013100195

Influence and Possible Mechanisms of Cryptotanshinone on the Survival of PC12 Cells Promoted by IGF-1

MENG Qian, ZHENG Wen-hua*

(The School of Pharmaceutical Sciences, Sun-yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** Study the effect of cryptotanshinone (CTS) on the survival of in PC12 cells promoted by insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and possible mechanisms. **Method:** The serum deprivation model was constructed to determine the dose of IGF-1 to play the survival-promoting effect, then pretreat PC12 cells with different concentrations of CTS, then treated with IGF-1 processing 24 hours, MTT assay was used to detect the effect of CTS on protective function of IGF-1. The effect of CTS and IGF-1 on the phosphorylation level of IGF-1 receptor (IGF-1R) were analyzed by Western blot and downstream targets were also detected such as protein kinase B (Akt) and extracellular signal regulated kinase (ERK). **Result:** After treatment with IGF-1, cell viability of PC12 cells was increased in a dose-dependent manner as same as the phosphorylation level of IGF-1R, whereas CTS attenuated the survival promoting effect of IGF-1 in PC12 cells and decreased the phosphorylated IGF-1R. Moreover, CTS attenuated the phosphorylation of Akt and ERK1/2 induced by IGF-1 in a dose-dependent manner. **Conclusion:** These data indicate that CTS has an inhibitory effect on PC12 cells viability via down-regulate the phosphorylation of IGF-1R and downstream Akt and ERK.

[Key words] cryptotanshinone; PC12 cells; IGF-1R; Akt; ERK1/2

隐丹参酮 (cryptotanshinone, CTS) 是活血化瘀类中药丹参的有效成分之一^[1], 具有清除氧自由

[收稿日期] 20121225(024)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30711120565)

[第一作者] 孟茜, 硕士研究生, E-mail: mengqian8719@163.com

[通讯作者] * 郑文华, 博士, 教授, E-mail: whzheng1232@163.com

基、改善微循环、抗感染等的药理作用,近年来它的抗肿瘤活性陆续被报道。研究发现隐丹参酮对神经胶质细胞瘤^[2]、淋巴瘤^[3]、胃癌等多种人类肿瘤细胞具有毒性作用,引起了广泛关注,但其抗肿瘤机制仍有待研究。已有大量研究表明类胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)及下游蛋白激酶 B(Akt),胞外信号调节激酶(ERK)1/2 的磷酸化是促进细胞存活的重要信号^[4-5],并在肿瘤发生中发挥重要作用^[6]。本文主要研究隐丹参酮对 IGF-1 的促存活功能、IGF-1R 磷酸化及下游磷酸酰肌醇-3-激酶(PI3K)/Akt, ERK1/2 信号通路的影响,探讨隐丹参酮抑制 PC12 增殖的可能机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 隐丹参酮(批号 852-9903,中国药品生物制品检定所),人源重组胰岛素样生长因子-1(IGF-1,批号 100-11,美国 Peprotech 公司),DMEM(批号 1995-065)、胎牛血清(批号 91109001-2)、马血清(批号 8143876)、抗生素(PSA,批号 15240-096,美国 Gibco 公司;胰酶(批号 C0201)、MTT(批号 1001320349)及 Western blot 相关试剂(碧云天生物技术研究);Western blot 所用抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 细胞 PC12 细胞株源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞,购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。

1.3 仪器 双人单面超净工作台(苏州净化设备有限公司),二氧化碳培养箱(Thermo Electron 公司),PL303 型电子天平(Mettler Toledo 公司),Model 680 酶标仪、垂直电泳(Bio-RAD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 PC12 细胞培养于含 5% 胎牛血清、5% 马血清、1% PSA 的 DMEM 培养基中,37℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,隔天用 0.25% 胰酶消化传代备用。

2.2 细胞处理 取对数生长期细胞,用胰酶消化并接种于含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基中计数,分别按 1×10^5 个/孔、 1×10^6 个/孔接种于 96 和 12 孔培养板中,24 h 后待细胞融合达 80% 左右可进行药物处理。

2.2.1 IGF-1 对 PC12 细胞的促存活作用 细胞接种于 96 孔板,处理前换成纯的 DMEM 培养基培养 1 h,然后进行处理,正常对照组加入含 1% 胎牛血清的培养基,模型组给予纯 DMEM,给药组分别加入不同浓度的 IGF-1。IGF-1 终质量浓度分为 2.5,5,

10,20,40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度设 5 个复孔,置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,吸去培养基进行 MTT 检测。

2.2.2 CTS 对 IGF-1 促细胞存活作用的影响 96 孔板细胞换纯 DMEM 剥夺血清 1 h,然后正常组加入含 1% 胎牛血清的培养基,模型组加入纯 DMEM,给药组分别给予 0,2.5,5,10,20,40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CTS,60 min 后给药组加入 IGF-1(剂量由 2.2.1 实验确定),每组设 5 个复孔,置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,吸去培养基进行 MTT 检测。

2.2.3 IGF-1 诱导 IGF-1R 磷酸化的剂量曲线 12 孔板细胞处理前换成纯培养基培养 1 h,分别加入终质量浓度为 0,1,3,10,30,100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IGF-1 处理 10 min,然后弃掉培养液,进行 Western blot 检测。

2.2.4 CTS 对 IGF-1R 及下游信号通路的影响 12 孔板中细胞处理前换成纯培养基,1 h 后分别加入终浓度为 0,2.5,5,10,20,40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CTS 预处理 1 h,再加入 IGF-1(剂量由 2.2.3 确定)处理 10 min,然后弃掉培养液进行 Western blot 检测。

2.2.5 细胞活力测定 依据郑文华等建立的方法进行^[7]。加入 MTT 液(临用前用 DMEM 溶解,pH 7.4,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)100 μL ,置 37℃ 培养箱培养 4 h,弃去液体每孔加入 100 μL DMSO,室温振荡 5 min,用 Model 680 酶标仪在 492 nm 处测吸光度(A),作为反应细胞存活的参数。

2.2.6 对 IGF-1R 及下游信号通路的影响 Western blot 免疫印迹分析技术:吸去培养液,用冷 PBS 轻轻冲洗,收获细胞后提细胞总蛋白,BCA 法将蛋白浓度调至相等浓度,以 30 μg 的蛋白样经 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h。加入各抗体,4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,再用辣根过氧化物酶标记相应的二抗,室温孵育 1 h。ECL 化学发光系统检测信号强度。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 IGF-1 对剥夺血清引起 PC12 细胞损伤的促存活作用 与正常组相比血清剥夺组细胞存活率明显下降($P < 0.01$),细胞损伤严重,在倒置显微镜下可见正常对照组细胞贴壁生长,形状呈梭形/三角形,边界清楚,胞浆丰富,突触相互交织成网状,折光性强;血清剥夺后,细胞突起减少,细胞肿胀变圆,折光

率减弱。而给药组随着 IGF-1 剂量的不断增加,细胞的存活率逐渐增加,当质量浓度达到 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时就已经与剥夺血清组产生明显差异 ($P < 0.01$),细胞存活率与正常对照组基本相同,通过实验证明 IGF-1 具有良好的促进 PC12 细胞存活的作用,在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时效果已经很明显。见表 1。

表 1 IGF-1 对剥夺血清引起 PC12 细胞损伤的促存活作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率 /%
正常	-	0.72 ± 0.04	100 ± 5.55
血清剥夺	-	0.44 ± 0.06	$61.11 \pm 8.33^{1)}$
IGF-1	2.5	0.50 ± 0.05	69.44 ± 6.23
	5	0.61 ± 0.05	$84.72 \pm 6.94^{2)}$
	10	0.73 ± 0.04	$101.39 \pm 5.32^{3)}$
	20	0.85 ± 0.05	$118.06 \pm 6.90^{3)}$
	40	0.92 ± 0.04	$127.78 \pm 5.31^{3)}$

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,与血清剥夺组相较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 CTS 对 IGF-1 促 PC12 细胞存活的抑制作用

采用 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 IGF-1 的保护剂量,分别加入 $2.5, 5, 10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CTS 预处理 60 min,再加入 IGF-1 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 后与只加入 IGF-1 相比细胞存活率逐渐下降,当 CTS 为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已经具有统计学差异 ($P < 0.01$),这表明 CTS 能剂量依赖性的抑制 IGF-1 的促存活作用。见表 2。

表 2 CTS 对 IGF-1 促 PC12 细胞存活作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	药物浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率 /%
正常	-	0.74 ± 0.03	100 ± 4.112
血清剥夺	-	0.48 ± 0.06	$64.86 \pm 8.23^{1)}$
IGF-1 ⁶⁾	10	0.73 ± 0.04	$98.95 \pm 6.40^{3)}$
CTS + IGF-1 ⁶⁾	2.5	0.66 ± 0.06	$89.19 \pm 8.23^{4)}$
	5	0.60 ± 0.05	$81.08 \pm 7.23^{5)}$
	10	0.43 ± 0.08	$58.11 \pm 9.32^{5)}$
	20	0.34 ± 0.05	$45.95 \pm 7.10^{5)}$
	40	0.28 ± 0.04	$37.84 \pm 6.31^{5)}$

注:与 IGF-1 组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$;⁶⁾ IGF-1 为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 IGF-1 刺激的剂量曲线 不同浓度 IGF-1 干预 PC12 细胞 10 min 后,可剂量依赖性的诱导 IGF-1R 磷酸化, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IGF-1 可明显增加 IGF-1R 磷酸化水平,下游 Akt 及 ERK1/2 的磷酸化水平也呈现相同趋势。这说明 IGF-1 通过激活 IGF-1R 进而激活下游促存活信号通路: Akt 以及 ERK1/2 来发挥其促进细胞存活的功能。见图 1。

3.4 CTS 对 IGF-1R 及下游信号通路的影响 采用 $2.5, 5, 10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CTS 预处理 60 min,再

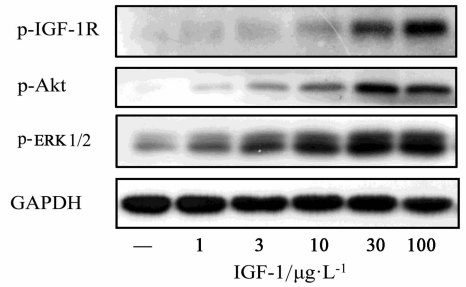


图 1 不同剂量 IGF-1 干预对 IGF-1R 磷酸化的影响

采用 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IGF-1 刺激 10 min, Western blot 结果可见, CTS 能剂量依赖性的降低 IGF-1R 磷酸化水平,其下游主要促存活通路 Akt, ERK1/2 的磷酸化水平也被抑制,而总蛋白的水平没有明显变化。见图 2。

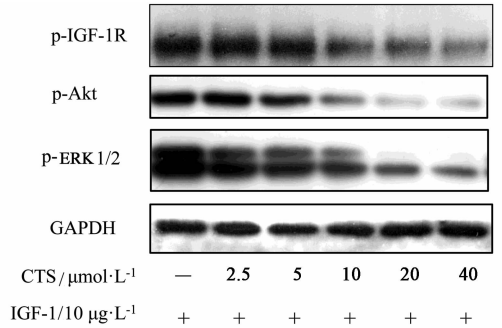


图 2 隐丹参酮对 IGF-1R 及下游信号通路的影响

4 讨论

隐丹参酮是丹参的主要抗肿瘤活性成分,可以通过对肿瘤细胞的杀伤、诱导分化及凋亡等机制来发挥其抗肿瘤作用^[8]。研究表明,隐丹参酮对体外培养的多种肿瘤细胞的生长都有较强的抑制作用,但其确切机制还不是很透彻。近些年关于胰岛素在肿瘤生长中发挥直接作用已得到证实,多种肿瘤细胞的生长需要胰岛素的维持^[9],对这些现象通常解释为高浓度胰岛素激活 IGF-1R,然后激活两条重要的促存活通路 PI3K/Akt 通路和 ERK1/2 通路^[10],维持并促进肿瘤生长。因此,如果阻断了 IGF-1R 的激活或者阻断其下游 Akt 和 ERK1/2 的激活,则可以一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖,促进其凋亡。

本研究显示,隐丹参酮能有效地抑制 IGF-1R 的磷酸化及下游主要促存活信号通路,从而阻断 IGF-1 对 PC12 细胞的促存活作用,从而抑制 PC12 细胞株的存活及增殖。因此隐丹参酮作为丹参的脂溶性有效成分,可抑制在肿瘤发生发展中起重要作用的 IGF-1R 的激活,进而阻断下游级联信号通路,作为一种植物成分的新型抗癌类药物,为临床筛选抗肿瘤药提供了一条新的可能途径。

坎离颗粒对压力负荷超载大鼠心肌能量代谢 及血流动力学的影响

阮小芬¹, 蒋梅先^{1*}, 徐裕亚², 姚成增¹, 贾美君¹, 仇富荣¹, 高成璐¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021; 2. 浙江省宁波市镇海区中医院, 浙江 宁波 315200)

[摘要] 目的:以腹主动脉缩窄造成压力负荷超载的大鼠心力衰竭模型为研究对象,观察压力负荷超载性心衰发生发展过程中心肌能量代谢及心脏功能的变化及坎离颗粒的影响。方法:采用腹主动脉缩窄法制成心脏压力负荷超载心衰模型,造模1周后灌胃给药,以培哌普利($5.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和曲美他嗪($0.36 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)作为阳性对照药,观察坎离颗粒各组($13.5, 6.75, 3.38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)给药32周后,血流动力学指标及心肌能量代谢的变化。结果:与假手术组比较,模型组大鼠左室收缩压(LVSP, $P < 0.01$)和左室舒张末期压(LVEDP, $P < 0.05$)均显著升高, $+dp/dt_{\max}$ ($P < 0.01$)和 $-dp/dt_{\max}$ ($P < 0.05$)均加大,三磷酸腺苷(ATP), ATP/二磷酸腺苷(ADP)显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,坎离颗粒3个剂量组LVEDP均显著降低($P < 0.05$),坎离颗粒中剂量组 $+dp/dt_{\max}$ 则有加大,且明显大于培哌普利组($P < 0.01$),坎离中剂量组ATP显著增高($P < 0.05$)。结论:坎离颗粒干预显著改善该心衰模型心肌能量代谢并同时改善左室舒张功能。

[关键词] 腹主动脉缩窄; 心力衰竭; 心肌能量代谢; 心脏功能; 坎离颗粒

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0198-05

[doi] 10.11653/syjf2013100198

[收稿日期] 20121023(001)

[基金项目] 上海市科委课题(08dz1972200);国家自然科学基金项目(30701135);上海市卫生系统优秀青年人才培养计划项目(XYQ2011064)

[第一作者] 阮小芬,主治医师,从事中西医结合心血管治疗研究, Tel:18018512332, E-mail: rxfzdl@163.com

[通讯作者] * 蒋梅先,主任医师,从事中西医结合心血管治疗研究, Tel:021-53827256, E-mail: jmxzgx@medmail.com.cn

[参考文献]

[1] 毛莹,袁媛,何希荣,等. 不同元素对丹参毛状根生长及丹参酮类成分积累的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 11(15):6.

[2] Wang J, Wang X. Growth inhibition and induction of apoptosis and differentiation of tanshinone IIA in human glioma cells[J]. J Neurooncol, 2007, 82(1):11.

[3] 张雷,郭芙林,魏伟. 隐丹参酮对淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1):92.

[4] Wine R N, McPherson C A, Harry G J. IGF-1 and p-AKT signaling promote hippocampal CA1 neuronal survival following injury to dentate granule cells[J]. Neurotoxicity Research, 2009, 16(3):280.

[5] Lennartsson J, Burovic F, Witek B, et al. Erk 5 is necessary for sustained PDGF-induced Akt phosphorylation and inhibition of apoptosis[J]. Cell Signal, 2010, 22(6):955.

[6] Saikali Z, Setya H, Singh G, et al. Role of IGF-1/IGF-

1R in regulation of invasion in DU145 prostate cancer cells[J]. Cancer Cell Int, 2008(8):10.

[7] Zheng W H, Kar S, Quirion R. Stimulation of protein kinase C modulates insulin-like growth factor-1-induced akt activation in PC12 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(18):13377.

[8] 赵冬耕,孙佳,王明艳,等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞SMMC-7721 PI3K/AKT信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 11(11):136.

[9] Bähr C, Groner B. The insulin like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a drug target; novel approaches to cancer therapy[J]. Growth Horm IGF Res, 2004, 14(4):287.

[10] Bertrand F E, Steelman L S, Chappell W H, et al. Synergy between an IGF-1R antibody and Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in suppressing IGF-1R-mediated growth in hematopoietic cells[J]. Leukemia, 2006, 20(7):1254.

[责任编辑 聂淑琴]