

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.011

藏红花素对 C6 胶质瘤细胞生长及 Survivin 和 Livin 表达的影响 *

董秋峰 闫志丰 杨鑫 霍军丽 陈晓燕 李娟 甄海宁[△] 费舟[△]

(第四军医大学西京医院神经外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究藏红花素对大鼠 C6 胶质瘤细胞生长及凋亡蛋白抑制因子 Survivin 和 Livin 表达的影响。**方法:**体外培养 C6 胶质瘤细胞,加入不同浓度的藏红花素培养液,并于不同时间点进行观测,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法绘制细胞生长曲线,观察 C6 细胞的生长活性;通过相差显微镜和 Hoechst 荧光染色法观察 C6 细胞的形态学变化;采用 Western blot 法检测 Survivin 和 Livin 蛋白的表达水平。**结果:**C6 胶质瘤细胞经藏红花素作用后细胞生长受到明显抑制,用含 2、4 和 8 mg/ml 藏红花素的培养液作用 48h 后各组 C6 细胞的 OD 值分别为 0.732 ± 0.013 , 0.421 ± 0.010 和 0.289 ± 0.017 , 细胞生长抑制率分别为 $26.8 \pm 0.01\%$ 、 $58.0 \pm 0.02\%$ 和 $71.1 \pm 0.02\%$, 其中 4 mg/ml 和 8 mg/ml 藏红花素实验组细胞生长抑制率与阴性对照组均有显著性差异 (P 均 < 0.05);相差显微镜和 Hoechst 荧光染色法观察显示实验组 C6 细胞出现典型的凋亡形态学改变;Western blot 检测显示实验组 C6 细胞 Survivin 和 Livin 蛋白表达明显下调。**结论:**藏红花素能明显抑制 C6 胶质瘤细胞的体外生长,其抑制作用与诱导 C6 细胞发生凋亡和下调凋亡蛋白抑制因子 Survivin 和 Livin 的表达有关。

关键词:藏红花素;胶质瘤;Survivin;Livin

中图分类号:R285;R739.41 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)16-3042-04

Influence of Crocin on Growth and Expression of Survivin and Livin in C6 Glioma Cells*

DONG Qiu-feng, YAN Zhi-feng, YANG Xin, HUO Jun-li, CHEN Xiao-yan, LI Juan, ZHEN Hai-ning[△], FEI Zhou[△]

(Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shannxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of crocin on growth and expression of inhibitors of apoptosis protein (IAPs) survivin and livin in rat C6 glioma cells. **Methods:** The C6 glioma cells were cultured in vitro, treated with different concentration of crocin, and observed on different time points. The growth activity of C6 cells was investigated using cell growth curve drawn according to methyl thiazolyl tetrazolium (MTT)-based colorimetric assay. The changes of C6 cells morphology were observed under phase contrast microscope and using Hoechst fluorescent staining. The protein expression level of survivin and livin was analyzed using Western blot. **Results:** The growth of C6 cells was significantly suppressed in vitro by crocin, at 48 hours after treatment with culture solution including 2, 4 and 8 mg/ml of crocin, the optical density (OD) values of C6 cells were 0.732 ± 0.013 , 0.421 ± 0.010 and 0.289 ± 0.017 respectively, as well as the growth inhibition rates of C6 cells were $26.8 \pm 0.01\%$, $58.0 \pm 0.02\%$ and $71.1 \pm 0.02\%$ respectively, there were significant differences comparing the cell growth inhibition rates of experimental groups with both 4 mg/ml and 8 mg/ml of crocin with that of negative control group ($P < 0.05$ for both). The changes of typical apoptotic morphology were presented in C6 cells of experimental groups. In addition, the Western blot analysis showed decreased protein expression of survivin and livin in C6 cells of experimental groups. **Conclusion:** Crocin can inhibit obviously the growth of C6 cells in vitro, and its inhibition effect is associated with inducing C6 cells apoptosis and down-regulating expression of IAPs survivin and livin in C6 cells.

Key words: Crocin; Glioma; Survivin; Livin

Chinese Library Classification(CLC): R285; R739.41 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)16-3042-04

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,其发病率约占颅内肿瘤的 45%。目前对于胶质瘤的发病机制已有了更深入的研究,其治疗方法也有了较大的发展,但胶质瘤患者的预后并未得到根本改善。尽管采取手术、放疗和化疗等综合治疗方法,

恶性胶质瘤患者的中位生存期仍徘徊在一年左右。因此,不断探索新的更为有效的胶质瘤治疗手段,多年来一直是倍受人们关注的热点课题^[1,2]。中医药是祖国医学的"瑰宝",也是肿瘤防治研究的一个重要领域。近年来研究显示中草药藏红花(Cro-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172396);第四军医大学西京医院学科助推计划创新人才基金资助项目(XJZT08R09)

作者简介:董秋峰(1985-),男,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:胶质瘤的发病机制与综合治疗,

电话:18392137868, E-mail: dxc090329@163.com

[△] 通讯作者:甄海宁,副教授,副主任医师,硕士生导师。

费舟,教授,主任医师,博士生导师

(收稿日期:2013-11-16 接受日期:2013-12-10)

cus sativus L, Saffron)的有效成分藏红花素(Crocin)对多种肿瘤细胞具有明显的抗癌活性,且对正常细胞几乎无毒副作用,有望成为一种新型的天然抗癌药物^[3,4]。目前有关藏红花素对胶质瘤的抗癌作用及机制研究,国际上尚未见相关报道,国内仅有个别报道^[5]。为此本研究探讨了藏红花素对 C6 胶质瘤细胞生长的抑制作用以及对凋亡蛋白抑制因子 Survivin 和 Livin 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

藏红花素(分子式 $C_{44}H_{64}O_{24}$, 分子量 977)购自 Sigma 公司,用二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)溶解配成 100 $\mu\text{mol/L}$ 贮存液,置 -20°C 冻存。大鼠 C6 胶质瘤细胞株由第四军医大学西京医院全军神经外科研究所保存。改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)和胰蛋白酶购自 Gibco 公司,胎牛血清由大连宝生物技术公司提供,四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、Hoechst 33258 荧光试剂盒、青霉素和链霉素均购自 Sigma 公司,Survivin 和 Livin 兔抗鼠多克隆抗体以及 β -actin 兔抗鼠单克隆抗体,均购自 Santa Cruz 公司。超净工作台为苏州净化设备厂生产,酶联仪和蛋白电泳仪均为美国伯乐公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 大鼠 C6 胶质瘤细胞用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM 培养液,置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养,用含 0.25%胰蛋白酶和 0.02%的乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)消化液传代,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法绘制细胞生长曲线 设置用含 1、2、4、8 和 16 mg/ml 藏红花素培养液处理的 5 个实验组,以及含等量 DMSO 培养液处理的阴性对照组,于处理后 24、48 和 72 h 三个时间点进行观测。于每个时间点每组细胞取三个复孔分别加入 20 μL (5 g/L) MTT,继续培养 4 h,吸弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,震荡 10 min。用酶联仪检测每孔细胞在 490 nm 波长下的光密度值(optical density, OD),并绘制细胞生长曲线。细胞生长抑制率(%)=(对照组 OD-实验组 OD)/对照组 OD $\times$ 100%。

1.2.3 相差显微镜观察 取对数生长期的 C6 细胞,用含 2、4 和 8 mg/ml 藏红花素的培养液作用 48 h,在倒置相差显微镜下观察细胞的形态学变化。

1.2.4 Hoechst 33258 荧光染色 将 C6 细胞接种于 24 孔板,培养过夜,用含 2、4 和 8 mg/ml 藏红花素的培养液作用 48 h。以下按试剂盒说明书进行操作,简言之,细胞用 4%多聚甲醛于 4°C 固定 15 min,用磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate buffered saline, PBS)漂洗,每孔加入 Hoechst 33258 荧光染色液 0.5 μL ,室温孵育 10 min,用 PBS 漂洗,风干后用抗荧光淬灭封片液封片,于倒置荧光显微镜下观察摄片。

1.2.5 Western blot 取对数生长期的 C6 细胞,用含 2、4 和 8 mg/ml 藏红花素的培养液作用 48 h,预冷的 0.01 mol/L PBS 漂洗,SDS(sodium dodecyl sulphate)裂解液裂解细胞,于冰浴超声下提取蛋白并定量。行 12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶

电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),用半干法将蛋白转移至 PVDF(polyvinylidene fluoride)膜。5%脱脂奶粉液室温下封闭 1 h,分别加入 Survivin、Livin 和 β -actin 一抗, 4°C 孵育过夜。加入山羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,暗室中化学发光法显影,图像分析仪扫描蛋白条带并分析。

1.3 统计学方法

使用 SPSS12.0 软件包进行统计学分析,计量数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析和 Dunnett-t 检验, $P<0.05$ 定为有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 藏红花素对 C6 胶质瘤细胞的生长抑制作用

如图 1 细胞生长曲线所示,藏红花素对 C6 胶质瘤细胞的生长具有明显的抑制作用,并呈现剂量和时间依赖性。用含 2、4 和 8 mg/ml 藏红花素的培养液作用 48 h 后各组 C6 细胞的 OD 值分别为 0.732 ± 0.013 、 0.421 ± 0.010 和 0.289 ± 0.017 ,细胞生长抑制率分别为 $26.8\pm 0.01\%$ 、 $58.0\pm 0.02\%$ 和 $71.1\pm 0.02\%$,其中 4 mg/ml 和 8 mg/ml 藏红花素实验组细胞生长抑制率与阴性对照组均有显著性差异(P 均 <0.05)。

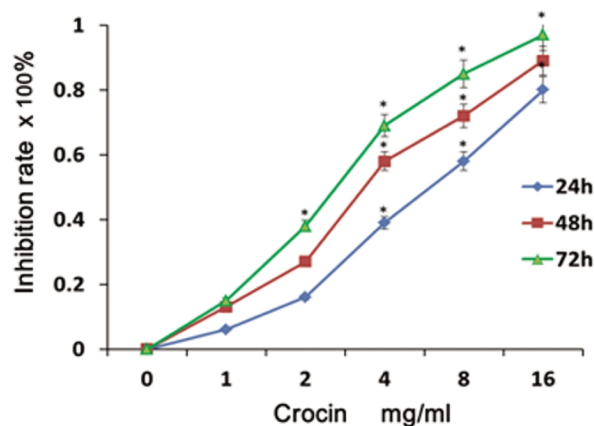


图 1 藏红花素对 C6 细胞的增殖抑制作用(* $P<0.05$ vs 阴性对照组)

Fig.1 Inhibition of proliferation of C6 by Crocin (* $P<0.05$ vs negative control group)

2.2 藏红花素作用后 C6 胶质瘤细胞的形态学改变

相差显微镜下观察可见对照组 C6 细胞贴壁状况良好,细胞多呈长梭形,折光性好。2 mg/ml 藏红花素实验组 C6 细胞多呈短梭形或多角形,生长状态不佳。4 mg/ml 和 8 mg/ml 藏红花素实验组随浓度增加逐渐出现较多凋亡样细胞,表现为细胞变圆、固缩、胞膜出泡、折光性增强,8 mg/ml 藏红花素实验组还出现较多漂浮的坏死细胞。Hoechst 33258 染色使 C6 细胞胞核呈现蓝色荧光,与相差显微镜下观察一致,实验组随藏红花素浓度增加逐渐出现较多凋亡样细胞,表现为染色质浓集、断裂成块、胞核呈现亮蓝色荧光(图 2)。

2.3 藏红花素作用后对 C6 胶质瘤细胞 Survivin 和 Livin 表达的影响

Western blot 结果显示藏红花素处理后实验组 C6 胶质瘤细胞 Survivin 和 Livin 的表达明显下调,且随藏红花素浓度的增加,对 Survivin 和 Livin 表达的抑制作用更加明显(图 3)。

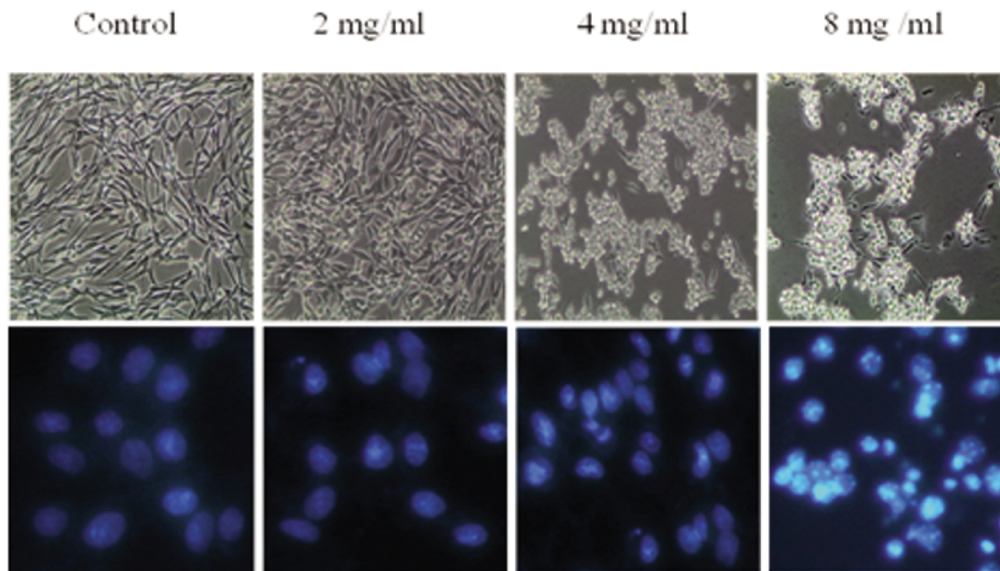


图2 藏红花素随浓度变化对 C6 细胞增殖抑制诱导凋亡的影响

Fig. 2 The results of Croci induced C6 cells apoptosis

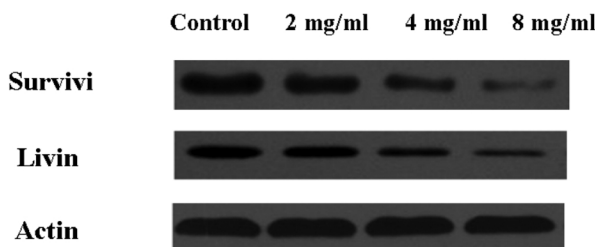


图3 Western blot 检测蛋白在各组细胞中 Livin and survivin 蛋白的表达
Fig.3 Detection of Livin and survivin protein expression in each group of cells by Western-blot

3 讨论

藏红花又名西红花、番红花,是鸢尾科番红花属球根类草本植物,自古就是活血化瘀的良药。藏红花主要分布于南欧各国及伊朗等地,我国也有少量栽培。由于藏红花产量极低,采收耗时费力,在我国被列为珍稀名贵中药材。研究表明藏红花具有很强的活血化瘀、散郁开结、降血脂、抗氧化、抗病毒、提高免疫力等药理作用,因此被誉为“植物黄金”^[6,7]。近年来的研究显示藏红花还具有明显的抗癌活性,因此其在肿瘤防治中的作用和机制研究又成为人们关注的一个新的热点课题^[6,7]。

藏红花生药中的主要成分包括藏红花素、藏红花二甲酯、藏红花苦素、挥发油(主要成分为藏红花醛,是藏红花苦素的分解产物)。藏红花素是藏红花有效成分中的一种主要色素,由藏红花酸糖基化形成,是一种极其少见的水溶性类胡萝卜素^[3,4]。已有研究发现藏红花素对结直肠癌^[8,9]、肝癌^[10]、胰腺癌^[11]、乳腺癌^[12,13]、宫颈癌^[13,14]、膀胱癌^[15]、前列腺癌^[16]、舌鳞癌^[17]、白血病^[18,19]和淋巴瘤^[20]等肿瘤细胞都具有较强的抑制作用,而对正常细胞几乎无毒副作用。藏红花素所具有的特殊的水溶性及其对癌细胞强有力的抑制作用,使其成为藏红花色素中更有望应用于癌症防治的天然药物成分^[3,4]。

目前有关藏红花素对胶质瘤的抗癌作用及机制研究,国内外仅有个别报道。霍军丽等^[9]的研究显示,用藏红花素处理

U251 胶质瘤细胞可显著抑制瘤细胞的增殖,并诱导其发生凋亡。我们的研究也证实,用藏红花素干预后可明显抑制 C6 胶质瘤细胞的生长,并随药物浓度增加和作用时间延长,藏红花素对瘤细胞的生长抑制作用逐渐增强,表现出浓度和时间依赖性。通过对 C6 胶质瘤细胞的形态学观察显示,藏红花素作用后 C6 胶质瘤细胞出现大量的凋亡样细胞和坏死细胞,提示诱导瘤细胞凋亡和出现坏死可能是藏红花素抑制 C6 胶质瘤细胞生长的重要机制。

凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP)是一类重要的抗细胞凋亡分子家族,Survivin 和 Livin 是该家族中的两个重要成员^[21]。二者均可与凋亡效应蛋白 Caspase-3、Caspase-7 和 Caspase-9 结合并抑制其活性,从而发挥强大的抗细胞凋亡作用^[22-25]。Survivin 和 Livin 在包括胶质瘤在内的多种人类肿瘤组织中存在高表达,而在正常组织和细胞中仅有微弱表达或无表达,并与某些类型肿瘤的预后密切相关,因此被认为是两个重要肿瘤相关分子^[22-25]。本研究首次证实,藏红花素作用后可明显下调 C6 胶质瘤细胞中 Survivin 和 Livin 蛋白的表达,并随药物浓度增加藏红花素抑制 Survivin 和 Livin 蛋白表达的作用逐渐增强,提示下调 Survivin 和 Livin 蛋白的表达是藏红花素诱导 C6 胶质瘤细胞发生凋亡的一个重要机制。霍军丽等^[9]的研究显示,藏红花素可增加 U251 胶质瘤细胞胞浆内钙离子的含量,上调内质网分子伴侣 GRP78 的表达,并提高内质网相关凋亡分子 CHOP、Caspase-4 和 JNK 的活性,提示藏红花素可通过诱导内质网应激性凋亡抑制 U251 胶质瘤细胞的增殖。结合本研究结果,提示藏红花素诱导胶质瘤细胞凋亡和抑制瘤细胞生长涉及多种分子机制。

综上所述,藏红花素可通过诱导瘤细胞发生凋亡和坏死而明显抑制胶质瘤细胞的生长,而其诱导胶质瘤细胞凋亡与下调凋亡蛋白抑制因子 Survivin 和 Livin 的表达有关。藏红花素抗胶质瘤的作用和机制值得进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Taylor JW, Chi AS, Cahill DP. Tailored therapy in diffuse gliomas: us-

- ing molecular classifiers to optimize clinical management[J]. *Oncology* (Williston Park), 2013, 27(6): 504-514
- [2] Wang Y, Jiang T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management[J]. *Cancer Lett*, 2013, 331(2): 139-146
- [3] 夏丹. 藏红花的抗肿瘤作用 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, 39(12): 910-912
- Xia Dan. Anticancer effect of crocin [J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 39(12): 910-912
- [4] Zhang Z, Wang CZ, Wen XD, et al. Role of saffron and its constituents on cancer chemoprevention[J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(7): 920-924
- [5] 霍军丽, 甄海宁, 刘卫平, 等. 藏红花素诱导人胶质瘤U251 细胞内质网应激性凋亡的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(22): 4212-4214
- Huo Jun-li, Zhen Hai-ning, Liu Wei-ping, et al. Crocin Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Apoptosis in Human Glioma U251 Cells [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11 (22): 4212-4214
- [6] 季文军, 代文婷. 中药藏红花的研究概况 [J]. *海峡药学*, 2011, 23 (10): 79-81
- Ji Wen-jun, Dai Wen-ting. The research situation of traditional Chinese medicine *Crocus sativus* [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2011, 23(10): 79-81
- [7] Gohari AR, Saeidnia S, Mahmoodabadi MK. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties[J]. *Pharmacogn Rev*, 2013, 7(13): 61-66
- [8] Aung HH, Wang CZ, Ni M, et al. Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells [J]. *Exp Oncol*, 2007, 29(3): 175-180
- [9] Rastgoo M, Hosseinzadeh H, Alavizadeh H, et al. Antitumor activity of PEGylated nanoliposomes containing crocin in mice bearing C26 colon carcinoma[J]. *Planta Med*, 2013, 79(6): 447-451
- [10] Nouredini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(5): 2305-2309
- [11] Bakshi H, Sam S, Rozati R, et al. DNA fragmentation and cell cycle arrest: a hallmark of apoptosis induced by crocin from kashmiri saffron in a human pancreatic cancer cell line [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(3): 675-679
- [12] Chrysanthi DG, Lamari FN, Iatrou G, et al. Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(1A): 357-362
- [13] Mousavi SH, Moallem SA, Mehri S, et al. Improvement of cytotoxic and apoptogenic properties of crocin in cancer cell lines by its nanoliposomal form[J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(10): 1039-1045
- [14] 龚青, 石丁波, 蔡卫斌, 等. 藏红花素诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及其作用机制[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(19): 1445-1477
- Gong Qing, Shi Ding-bo, Cai Wei-bin, et al. Effect and mechanism of HeLa cell apoptosis induced by crocin [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2009, 16(19): 1445-1477
- [15] Zhao P, Luo CL, Wu XH, et al. Proliferation apoptotic influence of crocin on human bladder cancer T24 cell line [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(15): 1869-1873
- [16] D'Alessandro AM, Mancini A, Lizzi AR, et al. *Crocus sativus* stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(6): 930-942
- [17] Sun J, Xu XM, Ni CZ, et al. Crocin inhibits proliferation and nucleic acid synthesis and induces apoptosis in the human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(10): 2679-2683
- [18] Xu HJ, Zhong R, Zhao YX, et al. Proliferative inhibition and apoptotic induction effects of crocin on human leukemia HL-60 cells and their mechanisms [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2010, 18 (4): 887-892
- [19] Rezaee R, Mahmoudi M, Abnous K, et al. Cytotoxic effects of crocin on MOLT-4 human leukemia cells [J]. *J Complement Integr Med*, 2013, 16: 10
- [20] Bakshi HA, Sam S, Feroz A, et al. Crocin from Kashmiri saffron (*Crocus sativus*) induces in vitro and in vivo xenograft growth inhibition of Dalton's lymphoma (DLA) in mice [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009, 10(5): 887-890
- [21] Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(2): 109-124
- [22] Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective [J]. *Drug Discov Today*, 2011, 16(11-12): 485-494
- [23] Rödel F, Sprenger T, Kaina B, et al. Survivin as a prognostic/predictive marker and molecular target in cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(22): 3679-3688
- [24] Wang L, Zhang Q, Liu B, et al. Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(12): 3661-3669
- [25] Yan B. Research progress on Livin protein: an inhibitor of apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(1-2): 39-45