

熊果酸对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和凋亡的影响研究

陈伟 刘海生 魏萌 王丽红 师艳艳

【摘要】 目的 研究熊果酸对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和凋亡的影响及其相关机制。方法 以不同浓度熊果酸(40、20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和顺铂(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)干预对数生长期人骨肉瘤 MG-63 细胞;采用噻唑蓝比色法测定细胞增殖抑制率,通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞周期和细胞凋亡状况,采用逆转录 PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测细胞中 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) mRNA、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia, bcl-2) mRNA 的表达,采用免疫印迹法(western blotting, WB)检测细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达。结果 经熊果酸干预 48 小时能够显著提高人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制率,延长细胞周期 G_0/G_1 期并缩短 G_2/M 期,提高细胞凋亡率(apoptosis index, AI),上调 Bax mRNA 表达并下调 bcl-2 mRNA 表达、提高 Bax/bcl-2 比值,上调 caspase-3 蛋白表达,熊果酸上述作用具有一定的剂量依赖性。结论 熊果酸具有抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖并促进其凋亡的作用,其机制可能与熊果酸能够阻滞细胞周期以及调节凋亡相关基因和蛋白表达有关。

【关键词】 熊果酸; 骨肉瘤; MG-63 细胞; 增殖; 凋亡

【中图分类号】 R738.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.04.013

Effects of ursolic acid on the proliferation and apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells

CHEN Wei, LIU Haisheng, WEI Meng, et al. Third Department of Orthopedics, Handan Central Hospital, Handan 056001, China

Corresponding author: CHEN Wei, E-mail: hdsyzyhrf@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Ursolic Acid(UA) on the proliferation and

作者单位: 056001 邯郸市中心医院骨三科(陈伟、魏萌、王丽红、师艳艳);邯郸市人民医院外一科(刘海生)

作者简介: 陈伟(1976-), 硕士, 副主任医师。研究方向: 骨科疾病研究。E-mail: hdsyzyhrf@163.com

apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells. **Methods** The human osteosarcoma MG-63 cells in logarithmic growth phase was treated with UA (10, 20, 40 μ g/mL) and Cisplatin (40 μ g/mL). The cellular growth inhibition rate was calculated by MTT, cell cycle and apoptosis rate were analyzed by flow cytometry, the expression of Bax mRNA and bcl-2 mRNA were detected by RT-PCR, the expression of caspase-3 protein was detected by western blotting. **Results** The cellular growth inhibition rate of human osteosarcoma MG-63 cell in UA treated groups were significantly increased; the G0/G1 phase of the cell cycle was prolonged and the G2/M phase was shortened, the apoptosis rate was significantly increased; the expression of Bax mRNA was significantly increased, while the expression of bcl-2 mRNA was significantly decreased, and the ratio of Bax/bcl-2 was significantly increased; the expression of caspase-3 protein was significantly increased; all of the effects above were dose-dependent with a certain. **Conclusions** UA can effectively inhibit human osteosarcoma MG-63 proliferation and promote it apoptosis, which perhaps related to its effects of arresting cell cycle and regulating the expression of apoptosis-related genes and proteins.

[Key words] Ursolic Acid; Osteosarcoma; MG-63 cell; Proliferation; Apoptosis

骨肉瘤发病率居原发恶性骨肿瘤之首^[1-2], 每年新发患者约 5/100 万^[3], 多发于青少年且死亡率高, 是临床上亟待解决的一个难题。目前临床上对于骨肉瘤的治疗主要采取手术辅以放疗的方案, 但 80% 的患者因确诊时体内已经出现转移病灶而致使手术治疗效果不佳^[4], 5 年生存率仅 30% 左右。因此, 以抑制骨肉瘤细胞生长为切入点研究高效、低毒的新型抗肿瘤药物以及新的治疗方案是临床上亟待解决的问题。熊果酸(ursolic acid, UA)是一种具有抗氧化、抗炎、抗纤维化等多种生物学活性的五环三萜类化合物^[5-10], 广泛存在于熊果、女贞子等植物中; 现代药理学研究发现熊果酸对肺癌、肝癌、舌癌细胞等生长均具有一定的抑制作用^[11-13], 但熊果酸是否对人骨肉瘤 MG-63 细胞生长具有抑制作用尚未见文献报道。本实验通过体外培养人骨肉瘤 MG-63 细胞并给予熊果酸进行干预治疗, 研究熊果酸对人骨肉瘤 MG-63 细胞生长的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物与试剂

人骨肉瘤 MG-63 细胞株引自河北医科大学细胞生物研究室; 熊果酸购自陕西慧科植物开发有限公司(纯度 \geq 98%, 批号: 140617); 注射用顺铂购自山东齐鲁制药有限公司(批号: 1503018); DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 HyClone 公司(批号分别为: 15010037、15040127、15050009); MTT 购自美国 Sigma 公司(批号: M2128); Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司(批号: 150419); Caspase-3 单克隆抗体购自碧云天生物

技术有限公司(20150127); bcl-2、Bax 上下游引物购自上海博亚生物公司(批号分别为: 20150216、20150120)。

1.2 主要仪器

超净工作台(购自苏州安泰空气技术有限公司); 二氧化碳细胞培养箱(购自美国 Thermo Scientific 公司); 酶标仪(购自美国 BIO-RAD 公司); DYY-11 型多用电泳仪、DYCZ-40B 转印泳槽(购自北京六一仪器厂); 流式细胞仪(购自美国 BD 公司); RT-PCR 仪(购自武汉新未来仪器技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、分组与给药 人骨肉瘤 MG-63 细胞株经复苏后植入 DMEM 高糖培养基进行培养并取对数生长期细胞进行下一步实验; 0.25% 胰酶消化、调整细胞浓度为 5×10^4 /mL 后分为空白对照组、熊果酸低、中、高剂量(10、20、40 μ g/mL) 组和顺铂(40 μ g/mL) 组, $n = 10$; 各组分别给予相应浓度药物进行干预, 48 小时后行各指标检测。

1.3.2 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞增值抑制率的测定 调整细胞浓度至 5×10^4 /mL, 接种于 96 孔板, 每孔滴加 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL), 培养 4 小时后去上清, 加入 DMSO 200 μ L, 振荡 10 分钟后通过酶标仪测定波长 570 nm 处吸光度(optical density, OD) 值, 计算各组人骨肉瘤 MG-63 细胞增值抑制率: 细胞增值抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$

1.3.3 细胞周期的检测和细胞凋亡状况的观察 各组细胞经 PBS 洗涤、加入 70% 乙醇 5 mL 混匀并置

4℃环境 48 小时后离心取细胞,经 PBS 洗涤并打散细胞团后加 5 μL 水解酶 Rnase (10 mg/mL),置 37℃环境 1 小时,加入碘化丙啶染液,避光孵育 30 分钟,然后通过流式细胞仪进行检测,采用 CELL Quest 软件分析各组细胞的细胞周期时相及凋亡状况。

1.3.4 各组 MG-63 细胞 bcl-2 mRNA、bax mRNA 表达的检测及 Bax/bcl-2 比值的计算 通过基因文库查询并设计合成 bcl-2、Bax、β-actin 基因上、下游引物; bcl-2 引物:上游 5'-GGGATGCCTTTGTGGAACA-3',下游 5'-TGATTTGACCATTTC CTGA-3'; bax 引物:上游 5'-ATCCAGGATCGAGCAGG GAGGATGG-3',下游 5'-AGATGGTCACTGTCTGCCATGTGGG-3'; β-actin 引物:上游 5'-CCTGTATGCC TCTGGTCGA-3',下游 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCT-3'。经药物干预 48 小时后,0.25%胰酶消化并收集各组细胞,加入适量 TRIzol 试剂提取总 RNA 并测定总 RNA 浓度,反转录为 cDNA 后进行 PCR 反应,扩增完毕后取 PCR 产物于琼脂糖凝胶电泳,最后通过凝胶成像仪观察并照相。以 β-actin 为内参,以灰度值进行半定量分析 bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达并计算 Bax/bcl-2 表达比值。

1.3.5 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞 Caspase-3 蛋白表达的检测 各组细胞经 PBS 溶液洗涤后行超声裂解,低温离心(4℃,12000 rpm)20 分钟取沉淀,采用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性(沸水浴加热 5 分钟)、上样(每孔上样 30 μg),经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转 PVDF 膜、室温下 5%脱脂奶粉封闭 2 小时,一抗(Caspase-3,β-actin)4℃过夜,洗膜、二抗(1:100)室温孵育 1 小时后经 ECL 系统显影;以 β-actin 为内参,以条带灰度值测定 Caspase-3 表达相对量。

1.4 统计学处理

运用软件 SPSS 15.0 进行统计分析,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制率

通过 MTT 比色法检测细胞增殖抑制率,结果如表 1 所示:熊果酸各剂量组和顺铂组人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制率显著高于空白对照组($P < 0.01$),且熊果酸对 MG-63 细胞增殖抑制作用呈现一定剂量

依赖性;熊果酸高剂量组细胞增殖抑制率显著高于顺铂组($P < 0.05$)。

表 1 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(<i>n</i>)	增殖抑制率(%)
空白对照组	10	0.0±0.0
熊果酸低剂量组	10	24.7±5.1 ^a
熊果酸中剂量组	10	41.6±7.3 ^a
熊果酸高剂量组	10	68.5±10.2 ^{ab}
顺铂组	10	42.8±7.0 ^a

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与顺铂组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞周期

通过流式细胞术检测细胞周期,结果如表 2 所示:熊果酸中、高剂量组人骨肉瘤 MG-63 细胞周期 G₀/G₁期较空白对照组显著延长,S 期和 G₂/M 期显著缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中熊果酸高剂量组较顺铂组具有统计学差异($P < 0.05$)。

表 2 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞周期比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	细胞周期		
	G ₀ /G ₁ 期(%)	S 期(%)	G ₂ /M 期(%)
空白对照组	37.5±1.3	43.9±1.7	18.6±1.2
熊果酸低剂量组	42.8±2.2	41.2±1.9	16.0±1.4
熊果酸中剂量组	53.5±2.5 ^a	36.9±1.4 ^a	9.6±0.8 ^b
熊果酸高剂量组	67.9±3.7 ^{bc}	28.2±1.5 ^{bc}	3.9±0.7 ^{bc}
顺铂组	52.3±2.8	39.5±2.4	8.2±1.1 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与顺铂组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.3 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡

采用流式细胞术检测细胞凋亡状况,结果如图 1 所示:经熊果酸各剂量组和顺铂组人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡细胞数明显增多,熊果酸诱导细胞凋亡的作用呈现一定的剂量依赖性;计算 AI 结果如表 3 所示:熊果酸各剂量组和顺铂组人骨肉瘤 MG-63 细胞 AI 显著高于空白对照组($P < 0.01$),其中熊果酸高剂量组人骨肉瘤 MG-63 细胞 AI 显著高于顺铂组($P < 0.05$)。

表 3 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(<i>n</i>)	AI (%)
空白对照组	10	3.5±1.6
熊果酸低剂量组	10	18.9±4.7 ^a
熊果酸中剂量组	10	31.4±4.8 ^a
熊果酸高剂量组	10	67.5±8.2 ^{ab}
顺铂组	10	35.9±7.3 ^a

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与顺铂组比较,^b $P < 0.01$ 。

行研究发现,熊果酸能够呈剂量依赖性地阻滞人骨肉瘤 MG-63 细胞周期、抑制增殖并提高其细胞凋亡率,且熊果酸高剂量组均优于顺铂组,提示熊果酸具有抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖并促进其凋亡的作用。

Caspase 是激活各种凋亡刺激因子(Apaf-1)的关键蛋白酶,参与细胞凋亡的启动及整个凋亡过程的调节;bcl-2 能够抑制线粒体破裂,可直接与 Apaf-1 结合而抑制 Caspase-3 激活,抑制促凋亡蛋白 Bax 细胞毒性作用,调节细胞内钙浓度,从而起到抑制细胞凋亡的作用^[16-17];Bax 属于 Bcl-2 基因家族成员,具有诱导线粒体渗透性改变而释放细胞色素 C、激活促凋亡蛋白 Caspase-9,而表现出促细胞凋亡作用^[18]。此外,Bax 能够与 bcl-2 聚合成二聚体,从而抑制 bcl-2 活性而促进细胞凋亡,所以 Bax/bcl-2 比值更加能够体现 Bcl-2 基因家族对细胞凋亡的调控作用^[19-21]。本研究发现,熊果酸能够有效上调人骨肉瘤 MG-63 细胞 Bax mRNA 表达、下调 bcl-2 mRNA 表达并提高 Bax/bcl-2 比值,上调 Caspase-3 蛋白表达,这可能是熊果酸诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的重要分子机制。

总之,熊果酸具有抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖并促进其凋亡的药理学作用,其作用机制可能与熊果酸阻滞细胞周期于 G₀/G₁期以及调节凋亡相关基因(Bax、bcl-2)和蛋白(Caspase-3)表达有关。

参 考 文 献

- [1] Van DE, Luitgaarden AC, Kapusta L, et al. High prevalence of late adverse events in malignant bone tumour survivors diagnosed at adult age[J]. *Neth J Med*, 2014, 72(10): 516-522.
- [2] Pu F, Chen F, Chen S, et al. Association between GSTP1 polymorphisms and prognosis of osteosarcoma in patients treated with chemotherapy: a meta-analysis [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 23(8): 1835-1842.
- [3] Whelan J, McTieman A, Cooper N, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(4): 508-517.
- [4] Moore DD, Luu HH. Osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2014, 162: 65-92.
- [5] 赵瑞芳. 熊果酸对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国医药导报*, 2015, 12(7): 24-28.
- [6] 郝冉冉, 王晨静, 仲伟珍, 等. 熊果酸对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(4): 29-32.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗动脉粥样硬化作用

[J]. *上海医药*, 2014, 35(23): 73-79.

- [8] 王翔, 阎昭, 王旭, 等. 熊果酸纳米脂质体的镇痛作用和抗炎活性[J]. *山东医药*, 2013, 53(29): 31-35.
- [9] 刘双, 毛汉文, 刘佩文, 等. 熊果酸对高血压大鼠心肌纤维化及 p38 活化的影响[J]. *内科急危重症杂志*, 2016, 22(1): 64-67.
- [10] 周娟娟, 朱莹. 熊果酸抗肝纤维化作用及其机制的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(21): 3390-3395.
- [11] 付伦, 朱敏, 李招云, 等. 熊果酸对肺癌细胞株 A549 及 SPCA1 细胞周期的抑制作用[J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(5): 68-73.
- [12] 崔兵兵, 程丽芳, 侯立静, 等. 熊果酸抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞生长及凋亡的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 181-184.
- [13] 李爱霞, 赵玉林, 张军辉, 等. 熊果酸诱导人舌鳞状细胞癌 Tea8113 细胞凋亡的作用[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2010, 17(9): 491-492.
- [14] 王丽琴. 熊果酸对人上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *安徽医药*, 2016, 20(4): 647-650.
- [15] 王艳杰, 王扬, 吴勃岩, 等. 熊果酸对人宫颈癌 hela 细胞体外抗肿瘤作用的形态学观察[J]. *中医药信息*, 2013, 30(6): 30-33.
- [16] Ogura T, Tanaka Y, Tamaki H, et al. Docetaxel induces Bcl-2 and pro-apoptosis caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6): 2330-2338.
- [17] Vizetto-Duarte C, Custódio L, Gangadhar KN, et al. Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(5): 550-557.
- [18] Farhadi F, Jahanpour S, Hazem K, et al. Garlic (*Allium sativum*) fresh juice induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma; the involvement of caspase-3, bax and bcl-2 [J]. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 2015, 9(4): 267-273.
- [19] Saeedi Borujeni MJ, Hami J, Haghiri H, et al. Evaluation of Bax and Bcl-2 Proteins Expression in the Rat Hippocampus due to Childhood Febrile Seizure [J]. *Iran J Child Neurol*, 2016, 10(1): 53-60.
- [20] Renault TT, Dejean LM, Manon S, et al. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2 [J]. *Mech Ageing Dev*, 2016, S0047-6374(16): 30049-30045.
- [21] Dolka I, Król M, Sapieryński R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study [J]. *Res Vet Sci*, 2016, 105: 124-133.

(收稿日期: 2016-07-03)

(本文编辑: 韩虹娟)