

番茄红素对人骨肉瘤细胞顺铂增敏作用及机制研究

柴旭泽 魏 凯 王贵方

摘 要 **目的** 研究番茄红素(lycopene, LP)对人骨肉瘤 MG-63 细胞顺铂化疗敏感度的影响并初步探讨其可能的作用机制。**方法** 体外培养并取对数生长期人骨肉瘤 MG-63 细胞,设空白对照组、LP 组(10 μ g/ml)、顺铂组(40 μ g/ml)和联合组[LP (10 μ g/ml) + 顺铂(20 μ g/ml)];药物干预 48h 后,采用噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞增殖抑制率,流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞周期和细胞凋亡状况,反转录 PCR(RT-PCR)法检测 Bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达并计算 Bax/bcl-2 比值,蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 caspase-3 蛋白表达。**结果** 联合干预组与顺铂组比较发现,联合干预组人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.05$),细胞周期 G₀/G₁ 期显著延长($P < 0.05$)、S 期和 G₂/M 期显著缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$),细胞凋亡率(apoptosis index, AI)显著升高($P < 0.01$),Bax mRNA 表达明显上调、bcl-2 mRNA 表达显著下调($P < 0.05$)且 Bax/bcl-2 比值显著升高($P < 0.01$),caspase-3 蛋白表达上调($P < 0.01$)。LP 组与空白对照组比较发现,LP 组 MG-63 细胞周期明显改变(G₀/G₁ 期延长、G₂/M 期缩短),bcl-2 mRNA 表达显著下调($P < 0.05$)、Bax/bcl-2 比值显著升高($P < 0.05$),caspase-3 蛋白表达显著上调($P < 0.01$)。**结论** LP 具有提高人骨肉瘤 MG-63 细胞顺铂敏感度的药理学作用,其机制可能与 LP 能够阻滞细胞周期以及调节凋亡相关调控基因和蛋白表达有关。

关键词 番茄红素 骨肉瘤 顺铂 增敏作用 凋亡

中图分类号 738.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.041

Efficacy Enhancing Effect of Lycopene on Human Osteosarcoma Cells Treated by Cisplatin. Chai Xuze, Wei Kai, Wang Guifang. Handan Iron and Steel Group Co. Ltd. Affiliated Worker's Hospital, Hebei 056001, China

Abstract **Objective** To investigate the efficacy enhancing effect and mechanism of lycopene (LP) on human osteosarcoma MG-63 cells treated by Cisplatin. **Methods** The human osteosarcoma MG-63 cells in logarithmic growth phase was treated with LP (10 μ g/ml), Cisplatin (40 μ g/ml) and LP (10 μ g/ml) + Cisplatin (20 μ g/ml), and blank group was set. The cellular growth inhibition rate was calculated by MTT. Cell cycle and apoptosis rate were analyzed by flow cytometry (FCM). The expression of Bax mRNA and bcl-2 mRNA were detected by RT-PCR and the ratio of Bax/bcl-2 was calculated. The expression of Caspase-3 protein was detected by western blotting. **Results** Compared with Cisplatin group, the cellular growth inhibition rate of human osteosarcoma MG-63 cell in LP + Cisplatin group was significantly increased ($P < 0.05$). The cell cycle was arrested at G₀/G₁ phase ($P < 0.05$). The apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$). The expression of Bax mRNA was increased, while the expression of bcl-2 mRNA was significantly decreased ($P < 0.05$) and the ratio of Bax/bcl-2 was significantly increased ($P < 0.01$). The expression of Caspase-3 protein was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with blank group group, the G₀/G₁ phase in cell cycle of LP group was increased and the G₂/M phase was decreased, and the expression of bcl-2 mRNA was significantly decreased ($P < 0.05$). The ratio of Bax/bcl-2 was significantly increased ($P < 0.05$). The expression of Caspase-3 protein was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** LP can effectively enhance the effect on human liver cancer MG-63 cells treated by Cisplatin, which perhaps was related to its effects of altering the cell cycle and the expression of apoptosis-related genes and proteins.

Key words Lycopene; Osteosarcoma; Cisplatin; Enhancing effect; Apoptosis

目前临床上对于骨肉瘤的治疗主要采取截肢手术结合术前术后化疗的方案,而 5 年生存率仍仅为 30% 左右。近年来研究发现化疗耐药是影响骨肉瘤疗效的主要因素之一^[1,2]。因此寻找高效、低毒的化疗增敏剂或许是提高治疗效果、延长患者生命的有效

手段之一。番茄红素(lycopene, LP)是一种具有抗氧化、增强机体免疫力等多种药理学作用的类胡萝卜素^[3,4],近年来 LP 抗肿瘤作用也逐渐得到研究人员的普遍关注,既往研究发现 LP 对肺癌、胃癌、卵巢癌等均具有一定的抑制作用^[5-7]。康红钰等^[8]和徐华等^[9]分别研究发现 LP 能够增强小鼠肉瘤 H₂ 对环磷酰胺和氟尿嘧啶的化疗敏感度。顺铂(cisplatin)为骨

肉瘤化疗基础用药,但 LP 能否增强骨肉瘤细胞对顺铂的敏感度、提高其疗效尚未见文献报道,本研究通过体外培养人骨肉瘤 MG-63 细胞并给予 LP+顺铂联合干预,并对比顺铂组疗效,研究 LP 对人骨肉瘤细胞顺铂增敏作用并初步探讨其机制。

材料与方法

1. 细胞、药物与试剂:人骨肉瘤 MG-63 细胞株由河北医科大学细胞生物研究室惠赠;番茄红素购自南京泽朗生物科技有限公司(纯度 $\geq 96\%$);注射用顺铂购自山东齐鲁制药有限公司;DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 HyClone 公司;MTT、DMSO 购自美国 Sigma 公司;Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;bcl-2、Bax 上下游引物购自上海博亚生物公司;caspase-3 单克隆抗体购自碧云天生物技术有限公司。

2. 实验仪器:超净工作台(江苏苏净集团有限公司);细胞培养箱(美国 Thermo Electron 公司);酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);RT-PCR 仪(武汉新未来仪器技术有限公司);DYY-11 型多用电泳仪、DYCZ-40B 转印泳槽(北京六一仪器厂)。

3. 实验方法:(1)细胞培养、分组与给药:人骨肉瘤 MG-63 细胞株经常规解冻复苏后植入 DMEM 高糖培养基于细胞培养箱中进行培养,取对数生长期细胞经 0.25% 胰酶消化、调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 后分为空白对照组、LP 组($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、顺铂组($40 \mu\text{g}/\text{ml}$)和联合组(LP $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ + 顺铂 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$);各组分别给予相应浓度药物进行干预,经药物干预 48h 后行各指标检测。(2)细胞增殖抑制率的测定:药物干预 48h 后调整细胞浓度至 $5 \times 10^4/\text{ml}$,转移至 96 孔板,每孔滴加 $5 \text{mg}/\text{ml}$ MTT 溶液 $20 \mu\text{l}$ 后继续培养 4h、去上清、加入 DMSO $200 \mu\text{l}$,常温下振荡 10min 后通过酶标仪测定波长 570nm 处吸光度(A)值,然后计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率($\%$) = $[1 - (\text{实验组 A 值} - \text{空白组 A 值}) / (\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值})] \times 100\%$ 。(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 5ml 混匀并置 4°C 环境 48h、离心取细胞,经 PBS 洗涤并打散细胞团后加 $5 \mu\text{l}$ 水解酶 Rnase ($10 \text{mg}/\text{ml}$),置 37°C 环境 1h,加入碘化丙啶染液,避光孵育 30min,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。(4)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。MG-63 细胞经药物干预 48h 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。(5)caspase-3 蛋白表达的检测:各组细胞行超声裂解并低温离心(4°C , $12000 \text{r}/\text{min}$, 20min)取沉淀,采用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性(沸水浴加热 5min)、上样(每孔上样 $30 \mu\text{g}$),经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转 PVDF 膜、室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2h,滴加一抗(1:500) caspase-3、 β -actin 4°C 过夜,洗膜、二抗(1:100)室温孵育 1h 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。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计数资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 LSD-t 检验, R $\times$ C 表(双向有序、属性不同)采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞增殖抑制率:如表 1 所示,较空白对照组,LP 组、顺铂组和联合组人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制率均显著升高($P < 0.01$);联合组与顺铂组比较,联合组细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.05$)。

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

组别	孔数(n)	增殖抑制率($\%$)
空白对照组	10	0.0 ± 0.0
LP 组	10	$24.8 \pm 5.1^{**}$
顺铂组	10	$37.5 \pm 6.4^{**}$
联合组	10	$52.4 \pm 7.0^{**\#}$

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与顺铂组比较, # $P < 0.05$

2. 细胞周期:如表 2 所示,较空白对照组,LP 组、顺铂组和联合组人骨肉瘤 MG-63 细胞周期 G_0/G_1 期均显著延长($P < 0.05$, $P < 0.01$),顺铂组和联合组 S 期、 G_2/M 期显著缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$);联合组与顺铂组比较,联合组细胞周期 G_0/G_1 期显著延长($P < 0.05$)且 G_2/M 期显著缩短($P < 0.01$),S 期差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞周期 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (n)	细胞周期 (%)		
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白对照组	10	37.6 ± 1.5	43.7 ± 1.9	19.6 ± 1.5
LP 组	10	46.8 ± 2.9 *	41.5 ± 2.2	11.7 ± 1.0
顺铂组	10	54.9 ± 3.2 *	36.8 ± 1.7 *	8.3 ± 0.9 **
联合组	10	60.4 ± 3.5 ***#	34.5 ± 2.0 **	5.1 ± 0.7 ***#

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

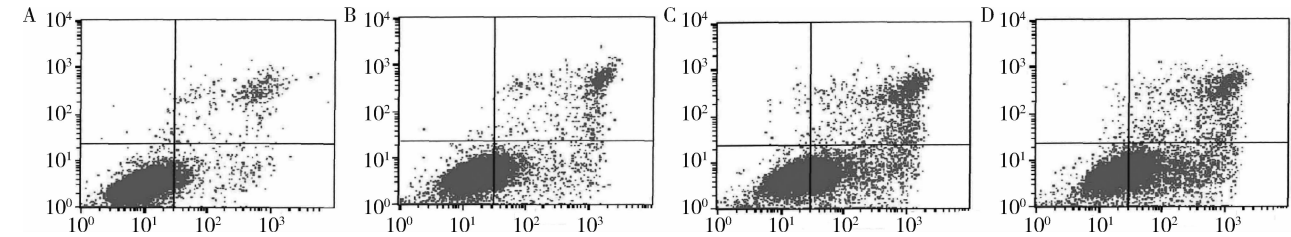


图 1 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡状况

A. 空白对照组; B. LP 组; C. 顺铂组; D. 联合组

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

组别	孔数 (n)	AI (%)
空白对照组	10	3.8 ± 1.6
LP 组	10	20.4 ± 3.5 *
顺铂组	10	42.7 ± 5.6 *
联合组	10	58.7 ± 6.9 **#

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与顺铂组比较, # $P < 0.05$

4. bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达检测和 Bax/bcl-2 比值计算结果: 如表 4 所示: LP 组、顺铂组和联合组人骨肉瘤 MG-63 细胞 bcl-2 mRNA 表达均显著下调 ($P < 0.05, P < 0.01$), 顺铂组和联合组 Bax mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)、Bax/bcl-2 比值显著提高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 联合组与顺铂组比较, 联合组 bcl-2 mRNA 表达和 Bax mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), Bax/bcl-2 值显著升高 ($P < 0.05$)。

表 4 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞 bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达和 Bax/bcl-2 比值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (n)	bcl-2 ($\times 10^{-3}$)	Bax ($\times 10^{-3}$)	Bax/bcl-2
空白对照组	10	44.6 ± 13.2	65.2 ± 17.0	1.6 ± 0.6
LP 组	10	32.5 ± 9.8 *	73.4 ± 25.9	2.3 ± 0.8 *
顺铂组	10	25.7 ± 7.3 **	88.5 ± 29.1 *	3.5 ± 1.2 **
联合组	10	22.4 ± 6.5 **	109.7 ± 30.8 **	5.1 ± 1.6 ***#

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较, # $P < 0.05$

5. caspase-3 蛋白表达: 如图 3 和表 5 所示: LP

3. 细胞凋亡状况: 如图 1 所示, 较空白对照组, LP 组、顺铂组和联合组人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡细胞数呈不同程度的增多, 其中以联合组最为显著; 计算凋亡指数 (AI) 结果如表 3 所示, 较空白对照组, LP 组、顺铂组和联合组人骨肉瘤 MG-63 细胞 AI 均显著升高 ($P < 0.01$); 联合组与顺铂组比较, 联合组细胞 AI 显著升高 ($P < 0.05$)。

组、顺铂组和联合组人骨肉瘤 MG-63 细胞 caspase-3 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$); 联合组与顺铂组比较, 联合组 caspase-3 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$)。

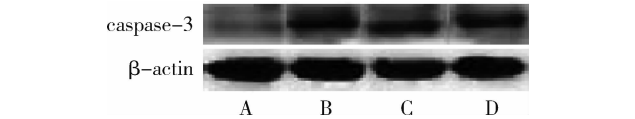


图 3 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞 caspase-3 蛋白表达

A. 空白对照组; B. LP 组; C. 顺铂组; D. 联合组

表 5 各组人骨肉瘤 MG-63 细胞 caspase-3 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (n)	caspase-3/β-actin
空白对照组	10	0.08 ± 0.03
LP 组	10	0.27 ± 0.09 *
顺铂组	10	0.33 ± 0.12 *
联合组	10	0.46 ± 0.13 **#

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与顺铂组比较, # $P < 0.05$

讨 论

每年新发骨肉瘤患者约 5/100 万, 其发生率居恶性骨科肿瘤之首, 多发于青少年且致死率高, 是临床上亟待解决的一个难题^[10,11]。临床上主要采用截肢手术辅以术前术后化疗的治疗方案, 顺铂是骨肉瘤化疗的一线用药, 诱导细胞凋亡是其最主要的作用机制^[12]。但耐药性的产生是影响骨肉瘤化疗效果的主要原因之一, 因此寻找高效、低毒的耐药逆转剂或化

疗增敏剂或许是提高其疗效的有效手段之一。

番茄红素 (lycopene, LP) 是一种具有广泛生物学活性的胡萝卜素, 张玉江等^[5] 研究发现 LP 能够抑制人肺癌 H520 细胞的侵袭和迁移而抑制肺癌细胞的扩散。范现英等^[6] 总结分析发现 LP 具有增强机体免疫力、诱导胃癌细胞凋亡的作用。于海荣等^[13] 研究发现 LP 能够通过改变膜电位以及促进内源性活性氧的生成而抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖。此外, LP 增强化疗敏感度作用逐渐得到医药科研工作者的关注, 既往研究发现 LP 能够增强小鼠肉瘤 H₂ 对环磷酰胺和氟尿嘧啶的化疗敏感度^[8,9]。本实验研究发现, 与顺铂组比较, LP + 顺铂联合给药干预能够更加显著阻滞人骨肉瘤 MG-63 细胞周期于 G₀/G₁ 期, 显著提高 MG-63 细胞增殖抑制率并显著提高 MG-63 细胞凋亡率, 提示 LP 能够增强人骨肉瘤细胞顺铂化疗敏感度。

诱导肿瘤细胞凋亡是顺铂抗肿瘤作用的主要机制, 而细胞凋亡过程有多种基因和蛋白参与调控^[12]。Caspase 是激活各种凋亡刺激因子的关键蛋白酶, 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, 可直接与多种凋亡刺激因子结合而抑制 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^[14]。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^[15]。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^[16]。本实验研究发现, 联合组与顺铂组比较, LP + 顺铂联合给药干预能够有效上调 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; LP 组与空白对照组比较发现, 经 LP 干预能够有效下调 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 LP 增强人骨肉瘤 MG-63 细胞顺铂化疗敏感度的重要分子机制。

综上所述, LP 具有增强人骨肉瘤细胞顺铂化疗敏感度的药理学作用, 其作用机制可能与 LP 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。

参考文献

- 1 张利恒, 李亮, 李晓峰, 等. 骨肉瘤化疗药物敏感性实验研究[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(1): 100-102
- 2 李梅, 杨小明, 蓝国波, 等. 骨肉瘤化疗多药耐药的分子机制及其逆转[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(2): 353-356
- 3 刘国安, 薛莹, 马伟, 等. 番茄红素的抗氧化活性研究[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2016, 52(2): 89-94
- 4 杜宏举, 郑珊, 马玲, 等. 番茄红素对小鼠免疫功能的促进作用[J]. 毒理学杂志, 2014, 28(3): 211-214
- 5 张玉江, 马李杰, 杨水清, 等. 番茄红素对人肺癌 H520 细胞侵袭和迁移能力的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(06): 885-888
- 6 范现英, 董胜利, 孟弘婧, 等. 番茄红素抗胃癌作用及机制的研究[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2016, 10(6): 858-860
- 7 李荣, 匡双玉, 肖俊辉, 等. 番茄红素异构体对人卵巢癌 HO-8910 细胞增殖和凋亡的影响效果初探[J]. 中南药学, 2013, 11(9): 654-657
- 8 康红钰, 任亮, 刘春杰, 等. 番茄红素对环磷酰胺治疗小鼠肉瘤 H₂₂ 的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(4): 751-753
- 9 徐华, 任亮, 马菲, 等. 番茄红素对氟尿嘧啶治疗小鼠荷瘤 H₂₂ 的协同作用[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(11): 884-887
- 10 Van DE, Luijtgarden 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
- 11 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
- 12 杨轩, 袁栋栋, 姜学军, 等. 顺铂通过诱导膀胱癌细胞自噬促进细胞凋亡[J]. 北京大学学报: 医学版, 2013, 45(2): 221-226
- 13 于海荣, 苗浩, 庞冲, 等. 番茄红素对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的影响及其作用机制研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(4): 16-18
- 14 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
- 15 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
- 16 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

(收稿日期: 2016-12-18)

(修回日期: 2017-02-28)