

虫草素对人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响及其机制研究

梅红军 刘 洋

摘 要 **目的** 研究虫草素对人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 采用 CCK-8 实验检测不同浓度虫草素作用于 MG-63 骨肉瘤细胞 24h 和 48h 后对癌细胞增殖的抑制作用;采用流式细胞术分析虫草素对 MG-63 细胞周期分布及凋亡的影响;采用 Western blot 法检测虫草素对 MG-63 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3 及 NICD1、Hes1 蛋白表达的影响。**结果** 虫草素对人骨肉瘤 MG-63 细胞有明显的增殖抑制作用,导致 MG-63 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期并诱导细胞凋亡;虫草素可上调 Bax、cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白的表达并下调 Bcl-2、NICD1 和 Hes1 蛋白的表达。**结论** 虫草素通过抑制骨肉瘤细胞增殖,诱导细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期并通过线粒体凋亡途径诱导 MG-63 细胞凋亡从而发挥抗骨肉瘤作用,可能骨肉瘤细胞中 Notch 信号通路活性下调有关。

关键词 虫草素 MG-63 细胞 凋亡 Notch 信号通路

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.018

Effect of Cordcepin on Apoptosis of MG-63 Osteosarcoma Cells and its Mechanism. Mei Hongjun, Liu Yang. The Fifth Hospital of Wuhan, Hubei 430030, China

Abstract Objective To study the effect of cordcepin on proliferation and apoptosis of MG-63 osteosarcoma cells and explore its mechanism. **Methods** MG-63 cells were treated with vary concentrations of cordcepin, the proliferation of MG-63 cells were detected by CCK-8 assay, the cell cycle distribution and apoptosis rate of MG-63 cells were determined by flow cytometry. The expression levels of Bax, Bcl-2, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3 NICD1 and Hes1 were detected by western blot. **Results** CCK-8 assay showed that cordcepin inhibits proliferation of MG-63 cells in a concentration- and time- dependent manner. The results of flow cytometry suggested that cordcepin treatment could arrest cell cycle at G₀/G₁ phase and induce apoptosis of MG-63 cells. The expression levels of Bax, cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 increased with the treatment of cordcepin, whereas the protein levels of Bcl-2, NICD1 and Hes1 decreased. **Conclusion** Cordcepin exerts anti-osteosarcoma effects through inhibiting the proliferation, inducing cell cycle arrest and apoptosis, which is related with the down-regulation of Notch signaling pathway.

Key words Cordcepin; MG-63 cell; Apoptosis; Notch signaling pathway

骨肉瘤是常发于青少年的恶性肿瘤,其生物学行为为高度恶性,容易转移和复发,预后差^[1,2]。随着新辅助化疗的出现,骨肉瘤患者的 5 年生存率明显提高,但仍无法令人满意,并且,由于化疗药物的毒性不良反应以及肿瘤耐药的发生,大大降低了常用化疗药物的作用效果^[3]。因此,寻找新的抗肿瘤药物显得尤为重要,而从祖国传统医学里面寻找抗肿瘤新药无疑有着巨大前景。

虫草素,又称为虫草菌素,是一种来自于冬虫夏草的天然产物,也是冬虫夏草的主要活性成分,

然而目前已有研究报道体外合成虫草素的方法^[4]。虫草素属于核苷类药物,嘌呤类生物碱,具有抗菌抗病毒、免疫调节、抗肿瘤等多种生理功能^[5]。研究表明,虫草素对多种肿瘤产生抑制作用,如乳腺癌、肝癌、胃癌、舌癌等,但虫草素在骨肉瘤中的作用,尚未探讨^[6-9]。本研究通过细胞实验,研究虫草素对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、凋亡、细胞周期分布的影响,并初步探索其抗骨肉瘤相关分子机制,以期虫草素用于临床骨肉瘤患者的治疗提供实验基础。

材料与方法

1. 材料:人骨肉瘤 MG-63 细胞购自中国科学院细胞库上海保藏中心。虫草素购自美国 Sigma 公司。新生胎牛血清购自澳大利亚 Gibco 公司, MEM Alpha

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81341078);武汉市科技计划项目(2014062801011264)

作者单位:430050 武汉市第五医院骨科

通讯作者:梅红军,副教授,电子信箱:dreamingmhj@163.com

培养基购自美国 Hyclone 公司。BCA 蛋白定量试剂盒, 0.25% 胰酶, CCK-8 试剂盒, AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自武汉谷歌生物科技有限公司。RIPA 裂解液、抗体 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、NICD1、Hes1 和 β -actin 均购自美国 CST 公司。

2. 细胞培养: MG-63 骨肉瘤细胞培养在含 10% 新生胎牛血清, 1% 双抗的 MEM Alpha 培养基中, 置于 37℃, 含 5% CO₂ 培养箱中培养。

3. CCK-8 实验: 将 MG-63 细胞以 5×10^3 个/毫升浓度接种于 96 孔板上, 每孔 100 μ l, 孵育 24h 待细胞贴壁后加入不同浓度的虫草素 (0、20、40、60、80 和 100 μ g/ml), 继续培养 24h 或 48h 后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 90 μ l 培养基, 共计 100 μ l, 37℃ 孵育 1h, 用自动酶标仪测量每孔细胞在 450nm 波长下的吸光度 (A) 值^[10]。细胞活力 (%) = 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。

4. 细胞周期检测: 不同浓度虫草素 (0、20、40 和 80 μ g/ml) 处理骨肉瘤 MG-63 细胞 24h 后, 收集细胞并用 75% 乙醇固定过夜, 再用 2ml 冷 PBS 洗涤 1 次, 然后用 400 μ l 冷 PBS 重悬细胞, 再加入 10 μ l RNase A (1mg/ml), 37℃ 水浴 20min 后, 加入 100 μ l PI (50 μ g/ml) 染料, 混匀后避光孵育 30min, 随即用流式细胞仪分析细胞周期分布。

5. 细胞凋亡分析: 不同浓度虫草素 (0、20、40 和 80 μ g/ml) 处理骨肉瘤 MG-63 细胞 24h 后, 用冷 PBS 洗涤细胞 2 次后用 500 μ l 结合缓冲液重悬细胞并转移至 5ml 流式管中, 依次加入 5 μ l Annexin V/FITC 和 5 μ l PI, 混匀, 避光孵育 15min 后用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

6. Western blot 法检测: 用虫草素 (40 μ g/ml) 处理 MG-63 细胞 48h 后, 收集细胞, 加入裂解液 RIPA 提取胞质蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 转膜后用 5% 脱脂牛奶于室温封闭 1.5h, 加入相应一抗孵育 4℃ 条件下孵育过夜。TBST 洗膜后添加二抗, 37℃ 孵育 1h。TBST 溶液振摇洗 3 次, 每次 10min, 在暗室中将 PVDF 膜用发光剂显色曝光后分析结果。以目的蛋白与 β -actin 的灰度比值表示蛋白表达水平。

7. 统计学方法: 应用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较使用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 虫草素抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖: 用浓度为 0、20、40、60、80 和 100 μ g/ml 虫草素处理 MG-63 细胞 24h 和 48h 后, 用 CCK-8 法检测虫草素对 MG-63 细胞增殖的影响。虫草素能抑制 MG-63 细胞增殖, 降低细胞活力, 并且呈现出时间和浓度依赖性, 其 24h 和 48h 的 IC₅₀ 分别为 70.30 μ g/ml 和 45.36 μ g/ml。虫草素能有效的抑制肿瘤细胞生长和存活 (图 1)。

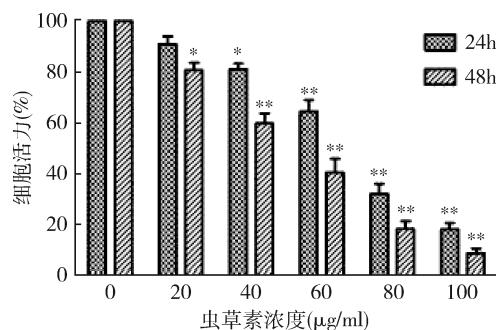


图 1 虫草素对 MG-63 细胞增殖抑制作用
与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. 虫草素导致 MG-63 细胞周期阻滞: 将 MG-63 细胞用浓度为 0、20、40 和 80 μ g/ml 的虫草素处理 24h 后, 用 PI 单染流式细胞术检测虫草素对 MG-63 细胞周期分布的影响。如图 2 所示, 在不同浓度虫草素 (0、20、40 和 80 μ g/ml) 的作用下, MG-63 细胞周期分布发生明显改变, 与对照组比较, 处于 G₀/G₁ 期的细胞所占比例明显增多, 而 S 期细胞比例则明显减少, 说明虫草素能导致 MG-63 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。

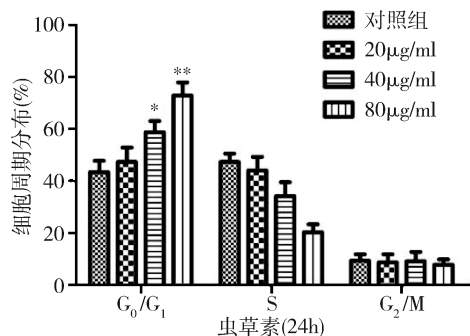


图 2 虫草素对 MG-63 细胞周期分布的影响
与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 虫草素诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡: 用 0、20、40 和 80 μ g/ml 的虫草素处理 MG-63 细胞 24h 后, 用 AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术检测虫草素对 MG-63 细胞凋亡率的影响。结果表明, 随着虫草素浓度的增加, MG-63 细胞凋亡率显著性提高,

表现出浓度依耐性,并且与对照组比较,差别具有统计学意义,说明虫草素对 MG - 63 细胞有明显诱导凋亡作用(图 3)。

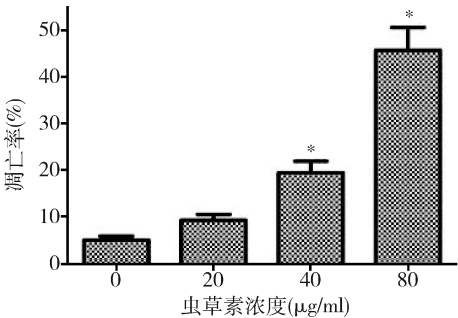


图 3 虫草素对 MG - 63 细胞凋亡率的影响
与对照组比较, * $P < 0.01$

4. 虫草素对 MG - 63 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响:为探究虫草素诱导 MG - 63 骨肉瘤细胞凋亡的分子机制,笔者采用 Western blot 法检测经不同浓度虫草素处理后 MG - 63 细胞中凋亡相关蛋白的表达情况。结果表明,经 40μg/ml 虫草素处理 MG - 63 细胞 48h 后,与空白对照组比较,细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达量明显增加,而抑凋亡蛋白 Bcl - 2 的表达量显著减少,Bax/Bcl - 2 显著增加,差异有统计学意义。并且,在虫草素的作用下,MG - 63 细胞中 cleaved caspase - 9 和 cleaved caspase - 3 的表达水平也明显上调,这一结果说明,虫草素诱导 MG - 63 细胞凋亡与线粒体通路激活有关(图 4)。

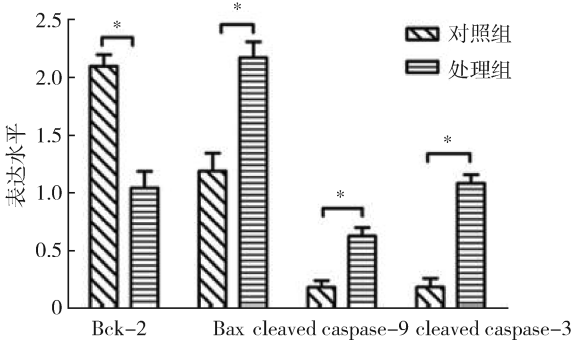
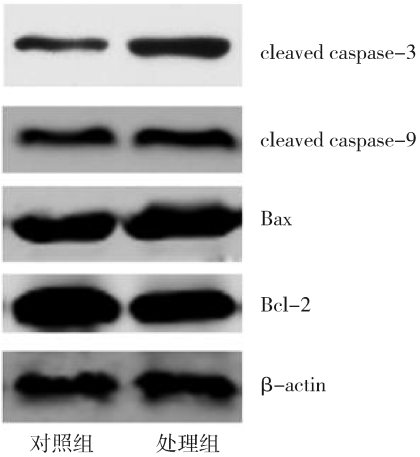


图 4 虫草素对 MG - 63 细胞凋亡相关蛋白表达的影响
* $P < 0.05$

5. 虫草素对 MG - 63 细胞中 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响:为探究虫草素抗 MG - 63 骨肉瘤细胞的分子机制,笔者检测了 MG - 63 细胞中 Notch 信号通路相关蛋白的表达水平。结果表明,虫草素处理组肿瘤细胞 NICD1 的表达水平显著减少,并且 Notch 下游靶基因 Hes1 的表达水平也明显下降(图 5)。这一结果表明,虫草素抑制 MG - 63 骨肉瘤细胞增殖和促进凋亡等抗肿瘤效应可能与下调 Notch 信号通路活性有关。

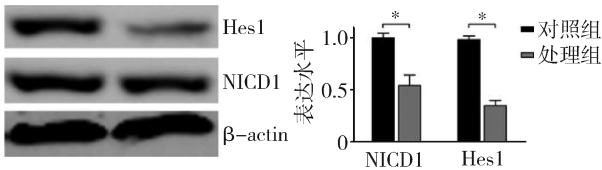


图 5 虫草素对 MG - 63 细胞 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响
* $P < 0.05$

讨 论

骨肉瘤是一种来源于间叶组织的容易转移和复发的恶性肿瘤,好发于 10 ~ 20 岁的青少年^[11]。近几十年来,随着诊疗水平的进步,骨肉瘤患者的 5 年生存率明显改善,由 20 世纪 70 年代的不足 20% 提升至 70% 左右,然而对于转移和复发的骨肉瘤患者,5 年生存率并未明显提高^[12]。手术切除加术后联合化疗是骨肉瘤患者的常见治疗手段,而常用的化疗药物如

顺铂等往往伴随着严重的不良反应并且长期使用会导致耐药的发生,因而寻找新的抗肿瘤药物当前研究的一大方向。由于三氧化二砷在血液系统肿瘤中的成功应用以及青蒿素在抗疟疾中取得的巨大成就,越来越多的研究者开始从祖国传统医学里面探寻新的有效的毒性不良反应小的抗肿瘤药物。

虫草素(3' - 脱氧腺苷)是来自冬虫夏草的天然产物,属于核苷类新药。研究表明,虫草素具有抗菌抗病毒、免疫调节和抗肿瘤等多种生理功能。谭玉林等^[13]研究发现,虫草素能剂量依耐性的抑制 MDA - MB - 231 细胞的生长并诱导其凋亡,其分子机制可能与 TMSG - 1 蛋白表达上调有关,虫草素能有效引

起舌癌 TCA-8113 细胞发生细胞周期阻滞并诱导其凋亡,其机制可能与 CyclinB1 和 Bcl-2 表达减少有关^[14]。而虫草素在骨肉瘤中的作用尚未探索,因此,本研究初步探索虫草素对 MG-63 骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响,并初步探索其相关作用机制。

本研究应用不同浓度的虫草素(0、20、40、60、80 和 100 $\mu\text{g/ml}$)处理 MG-63 骨肉瘤细胞 24h 和 48h 后,采用 CCK-8 法检测癌细胞增殖能力,结果发现,虫草素呈时间、浓度依耐性的抑制 MG-63 细胞增殖,且 24h 和 48h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 70.30 $\mu\text{g/ml}$ 和 45.36 $\mu\text{g/ml}$,表明虫草素对 MG-63 细胞有一定的细胞毒作用。PI 单染流式细胞术检测虫草素对 MG-63 细胞周期分布的影响,结果表明,随着虫草素浓度的增加,处于 G_0/G_1 期的细胞所占比例明显增多,而 S 期细胞比例则明显减少,说明虫草素能诱导 MG-63 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。诱导肿瘤细胞凋亡是抗肿瘤药物作用的一个重要机制,为探究虫草素对 MG-63 细胞凋亡的影响,笔者采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测不同浓度虫草素(0、20、40 和 80 $\mu\text{g/ml}$)作用下,癌细胞凋亡率的改变,结果表明,随着虫草素浓度的增加,MG-63 细胞凋亡率显著提高,与对照组比较差异有统计学意义。

细胞凋亡又称为细胞程序性死亡,是机体维持内环境稳定,更好适应生存环境而发生的细胞主动性死亡,经典的细胞凋亡途径包括线粒体细胞凋亡途径和死亡受体凋亡途径^[15]。在线粒体凋亡途径中,凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 等调节细胞色素 C 由线粒体释放到细胞质,释放到细胞质中的细胞色素 C 能与 Apaf-1 结合,进而系列活化 caspase-9、caspase-3,导致细胞凋亡。因此研究了虫草素对 MG-63 细胞中凋亡相关蛋白如 Bax、Bcl-2 等表达的影响。结果表明,在虫草素的作用下,MG-63 细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达量明显增加,而抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量明显减少,并且 MG-63 细胞中 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 的表达水平也显著上调,说明虫草素通过线粒体凋亡途径诱导 MG-63 细胞凋亡。为进一步探究虫草素抗骨肉瘤的分子机制,笔者检测了骨肉瘤细胞中 Notch 信号通路相关蛋白的表达水平,发现 Notch 胞内段 NICD1 及 Notch 下游靶基因的表达明显下调,说明虫草素抗骨肉瘤效应与癌细胞中 Notch 信号通路活性下调有关。不过,笔者的研究尚未比较虫草素与传统化疗药物如顺铂、甲

氨蝶呤、阿霉素等药物抗骨肉瘤的效果,也未深入探讨虫草素抗骨肉瘤效应与 Notch 信号下调的关系,这需要在今后的研究中进一步证明。

总之,笔者的研究表明,虫草素能时间、浓度依耐性抑制 MG-63 骨肉瘤细胞增殖,导致细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期并通过线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡,其抗骨肉瘤效应可能与 Notch 信号活性下调有关,为虫草素用于临床骨肉瘤患者的治疗提供参考,但虫草素抗骨肉瘤的具体机制,例如是否通过其他信号通路以及作用靶点,有待于进一步阐明。

参考文献

- 1 Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of osteosarcoma and current management[J]. *Rheumatol Ther*, 2016, 3(2):221-243
- 2 Nystrom LM, Reimer NB, Reith JD, *et al*. The treatment and outcomes of extraskelatal osteosarcoma: institutional experience and review of the literature[J]. *Iowa Orthop J*, 2016, 36:98-103
- 3 Hongtao HE, Jiangdong NI, Huang J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(5):1352
- 4 蔡友华,刘学铭. 虫草素的研究与开发进展[J]. *中草药*, 2007, 38(8):1269-1272
- 5 王征,武雪,刘建利,等. 虫草素抗肿瘤活性研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(16):1365-1368
- 6 谭玉林,谢明,方会龙,等. 虫草素对 MDA-MB-231 细胞增殖及细胞凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(8):1-5
- 7 李娜,单媛媛,武德珍,等. 虫草素抑制肝癌转移及分子机制研究[J]. *药学报*, 2017, 7:1117-1121
- 8 孙光斌,兰岚,唐红梅,等. 虫草素抑制人胃癌细胞 MKN-28 运动侵袭能力研究[J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(3):152-156
- 9 田忠林. 虫草素对舌癌 TCA-8113 细胞周期和凋亡的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 5:1322-1324
- 10 Hwang IH, Oh SY, Jang HJ, *et al*. Cordycepin promotes apoptosis in renal carcinoma cells by activating the MKK7-JNK signaling pathway through inhibition of c-FLIPL expression[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10):e0186489
- 11 Varshney J, Scott M, Largaespada D, *et al*. Understanding the osteosarcoma pathobiology: a comparative oncology approach [J]. *Veter Sci*, 2016, 3(1):3
- 12 Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, *et al*. Translational biology of osteosarcoma. [J]. *Natu Rev Cancer*, 2014, 14(11):722
- 13 谭玉林,谢明,方会龙,等. 虫草素对 MDA-MB-231 细胞增殖及细胞凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(8):1-5
- 14 田忠林. 虫草素对舌癌 TCA-8113 细胞周期和凋亡的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 5:1322-1324
- 15 Zou WW, Xiao HP, Gu MN, *et al*. Propofol induces rat embryonic neural stem cell apoptosis by activating both extrinsic and intrinsic pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4):1123-1128

(收稿日期:2017-12-28)

(修回日期:2018-03-16)