

白花丹素对骨肉瘤细胞系 U2OS 的作用及其机制

田林强, 陈安民, 尹德龙, 宫晨, 任晔, 郭风劲

Effect and Mechanism of Plumbagin in Human Osteosarcoma Cell Line U2OS

Tian Linqiang, Chen Anmin, Yin Delong, Gong Chen, Ren Ye, Guo Fengjin

Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: Guo Fengjin, E-mail: f j guo@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the effect of plumbagin on the growth of osteosarcoma cell line U2OS and its possible underlying mechanisms. **Methods** Cell apoptosis of plumbagin against osteosarcoma was studied by CCK-8 assay; morphological changes was studied by HOECHST 33342 staining; the expression of p53 and MDM2 gene was studied by Western blot assay. **Results** CCK-8 assay showed that plumbagin had an obvious inhibition on osteosarcoma cell line in a dose-dependent manner; HOECHST 33342 staining showed that plumbagin inhibited the growth of osteosarcoma cell line U2OS through the promotion of apoptosis; Western blot assay showed that plumbagin played the role by changing the expression proportion of p53 and MDM2. **Conclusion** Plumbagin inhibited osteosarcoma cell line U2OS cells growth through cell apoptotic pathways.

Key words: Plumbagin; Osteosarcoma cells; Apoptosis; p53 gene; MDM2 gene

摘要: 目的 研究白花丹素对骨肉瘤细胞系 U2OS 的作用, 并初步探讨其作用机制。**方法** 用 CCK-8 法检测白花丹素对骨肉瘤细胞的促凋亡作用; 用 HOECHST 33342 染色研究白花丹素对骨肉瘤细胞作用后的形态学变化; 用 Western blot 法检测白花丹素作用后骨肉瘤细胞 MDM2 和 p53 蛋白表达情况。**结果** CCK-8 结果显示白花丹素对骨肉瘤细胞有明显的抑制作用, 而且呈浓度依赖性; HOECHST 33342 染色结果显示白花丹素对骨肉瘤 U2OS 细胞的抑制作用主要是通过促进凋亡来实现; Western blot 结果显示白花丹素能够改变 p53/MDM2 基因表达比例。**结论** 白花丹素通过细胞凋亡途径抑制骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞的生长。

关键词: 白花丹素; 骨肉瘤细胞; 凋亡; p53 基因; MDM2 基因

中图分类号: R738.1; R730.52 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)11-1285-04

0 引言

白花丹素是从中药白花丹中提取的一种天然萘醌类化合物, 是中药白花丹的主要活性成分。白花丹在中国有很久的临床应用, 包括抗炎、杀菌、抗原虫等作用。现代的实验研究表明, 白花丹素有多种生物活性, 包括激活 Nrf2/ARE, 对脊髓的缺血性损伤起到保护作用^[1]; 在淋巴细胞中抑制 NF-κB 的激活从而起到抑制炎性反应的作用^[2]。白花丹素通过多种途径对肿瘤细胞进行抑制及杀伤作用, 包括促进胰腺癌细胞的凋亡^[3]、在肺癌细胞系 A549 中通过抑制 TPA 诱导的 MMPs 和 u-PA 的表达来降低肿瘤细胞的转移等^[4]。但是其对骨肉瘤细胞的作用及其机制尚未见报道, 本文研究了白花丹素对骨肉瘤细胞

系 U2OS 的作用, 并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

白花丹素(Plumbagin)购于美国 Sigma 公司, 将其溶解在 DMSO 溶液中, 配置成 0.1 mol/L 储存液存放于 -20℃ 冰箱保存备用; 骨肉瘤细胞系 U2OS 为本实验室保存; CCK-8 试剂盒购于碧云天生物技术研究所; HOECHST 33342 和 DMSO 购自美国 Sigma 公司; 小牛血清和高糖细胞培养液购自 Hyclone 公司; 考马斯亮蓝、凝胶试剂盒、硝酸纤维素膜、ECL 发光试剂盒、兔抗人一抗和羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 倒置相差显微镜及荧光显微镜均购自日本 Nikon 公司; 细胞培养箱(Heal Force HF240)。

1.2 方法

1.2.1 细胞凋亡的测定 取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 每孔约 5 000 个细胞。培养过夜后加入 1.5 μM、3.0 μM 和 6.0 μM 的白花丹素(所有培养液

收稿日期: 2011-12-08; 修回日期: 2012-03-13

基金项目: 973 课题资助项目(2002CB513100)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科

通信作者: 郭风劲, E-mail: f j guo@tjh.tjmu.edu.cn

作者简介: 田林强(1982-), 男, 博士在读, 主要从事骨科肿瘤及神经损伤方面的研究

中 DMSO 的终浓度不超过 0.1%), 以含 0.1% 的 DMSO 为正常对照组, 每组设 4 个复孔。白花丹素作用 24 h 后吸弃培养液, 用不含血清的高糖培养液洗两遍, 每孔加入 CCK-8 染色液 100 μ l, 37℃ 避光孵育染色 3 h, 用酶联免疫标记仪测定细胞的吸光值, 计算出细胞的生存率(以对照组为 100% 计算)。

1.2.2 细胞染色 将 HOECHST 33342 溶解在 PBS 中, 配置成 10 μ g/ml 的储存液存放在 -20℃ 冰箱中备用。使用时将其用 PBS 稀释成 1 μ g/ml 工作液。取对数生长期的细胞以每孔 5×10^4 的密度种植于 24 孔板中培养过夜。换液后用不同浓度的白花丹素(1.5 μ M、3.0 μ M 和 6.0 μ M)作用 24 h 后, 用 PBS 轻轻漂洗, 加入终浓度为 1 μ g/ml 的 HOECHST 33342 工作液, 染色 10 min 后放置于倒置荧光显微镜下观察并拍照(随机选取 20 \times 10 倍镜下 10 个视野计数凋亡细胞数和未凋亡细胞数, 凋亡细胞核明显浓缩)。

1.2.3 蛋白提取和 Western blot 检测 p53 和 MDM2 的表达 取对数生长期的细胞以 1×10^6 /ml 的密度种植于 6 孔板中培养过夜。用不同浓度的白花丹素(1.5 μ M、3.0 μ M 和 6.0 μ M)作用于细胞 24 h 后, PBS 冲洗, 0.25% 的胰酶消化, 收集细胞(冲洗液也同样离心后收集细胞), 用 200 μ l 组织裂解液(组织裂解液为 RIPA, 含体积分数为 1% 的 PMSF)置于冰上裂解 30 min, 4℃ 离心机 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液测蛋白浓度(考马斯亮蓝法测定), 置于 -20℃ 保存。调整蛋白浓度后热变性, 取相同总量的蛋白质进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳后转移蛋白至硝酸纤维素膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 加入适量稀释于 5% 脱脂奶粉的一抗, 4℃ 孵育过夜。使用 TBST 漂洗三次, 每次 15 min, 加入 1:2 000 的 HRP 标记的二抗, 室温孵育 2 h 后用 TBST 漂洗三次, 每次 15 min。在暗室内使用 ECL 发光液发光, 压片后曝光盒曝光。图片照相后用 Qantity One 分析软件进行分析测定。

1.3 统计学方法

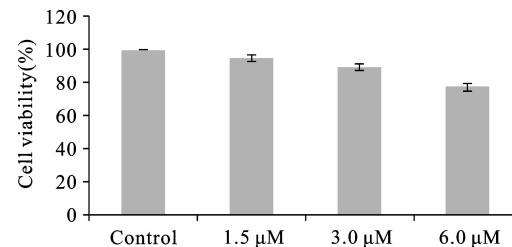
采用 SPSS 15.0 统计软件包对数据进行分析, 数

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用 ANOVA 方差分析, 计数资料比较采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白花丹素对骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞活性的影响

U2OS 细胞经不同浓度的白花丹素作用 24 h 后, 细胞活力明显降低, 各组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。细胞活力和白花丹素的浓度呈明显的反比例关系, 说明随着白花丹素浓度的增高, 细胞活力逐渐降低, 呈现出明显的浓度依赖性, 见图 1。



The viability of U2OS cells were reduced significantly after treatment by different concentration of plumbagin and in a dose-dependent manner($P < 0.05$)

图 1 不同浓度白花丹素对骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞活性的影响

Figure 1 Effect of U2OS cell viability treated by different concentration of plumbagin

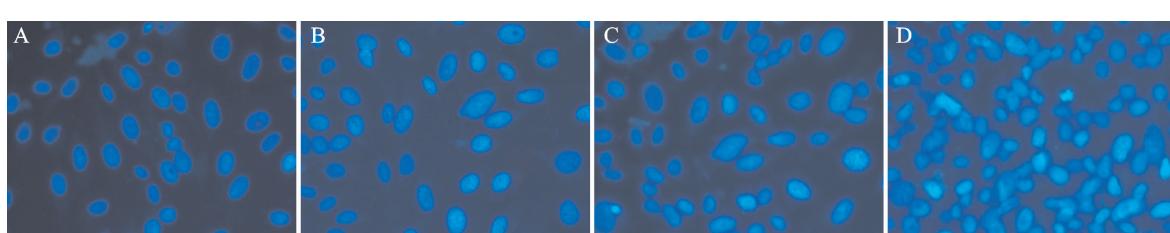
2.2 白花丹素对 U2OS 细胞生长的影响

白花丹素作用 24 h 后用 HOECHST 33342 染色, 在 10 \times 20 倍倒置相差显微镜下观察, 发现有凋亡细胞, 而且随着白花丹素浓度的增加, 细胞凋亡的数目增多, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 和细胞活力的结果是一致的, 见图 2、表 1。

表 1 白花丹素作用骨肉瘤 U2OS 细胞后细胞凋亡的检测

Table 1 The apoptotic detection of U2OS cells treated by plumbagin

	Control	1.5 μ M	3.0 μ M	6.0 μ M
Living cells	370 \pm 6.1	341 \pm 12.5	361.3 \pm 24.6	351.7 \pm 10.0
Apoptotic cells	24.7 \pm 4.2	60.3 \pm 7.0	91.3 \pm 8.3	88.7 \pm 8.4



A:Control; B:1.5 μ M; C:3.0 μ M; D:6.0 μ M

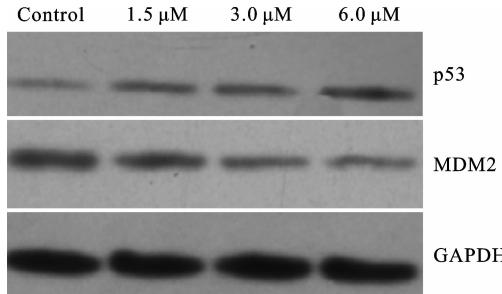
Treated by different concentration of plumbagin, the apoptotic cells were increased obviously, in the 6.0 μ M group reached the maximum. There were significant difference compared between groups ($P < 0.05$)

图 2 白花丹素作用骨肉瘤 U2OS 细胞后 HOECHST33342 染色结果(HOECHST 33342 \times 200)

Figure 2 HOECHST 33342 staining result of U2OS cells treated by plumbagin(HOECHST 33342 \times 200)

2.3 白花丹素对 p53 和 MDM2 表达比例的影响

Western blot 结果显示,白花丹素作用后能够明显增加 p53 的表达,而且显著降低 MDM2 的表达,经灰度分析后进行比较,各组间差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



The expression of p53 gene were increased gradually, on the contrary, the expression of MDM2 gene were decreased. Which confirmed that plumbagin could decrease the expression of MDM2 and increase the expression of p53 which played an important role in apoptotic pathway

图 3 白花丹素对 p53 和 MDM2 表达比例的影响

Figure 3 The effect of plumbagin on expression proportion of p53 and MDM2

3 讨论

白花丹素是一种棕黄色的结晶体,微溶于水,易溶于乙醇、氯仿等有机溶剂。白花丹在我国已经有两千多年的使用历史,目前证实具有杀菌、抗炎、抗寄生虫等多种作用^[5-6],而且对体外肝细胞的毒性作用明显小于肿瘤细胞^[7]。研究表明,20 μM 的白花丹素对前列腺上皮细胞系 RWPE-1 细胞无明显的促凋亡的作用^[8]。

骨肉瘤多发生在青少年人群,男性多见。中国骨肉瘤发病率在原发恶性肿瘤中居首位,为 1.5~2.0/10 万^[9]。骨肉瘤进展迅速,其远处转移和复发是骨肉瘤治疗失败的常见原因。骨肉瘤的发生是多种癌基因激活和(或)抑癌基因失活的累加结果。分子生物学研究表明,骨肉瘤细胞表现出明显的基因突变,包括染色体区段的丢失、增加和重排,肿瘤抑制基因的失活以及信号转导途径的改变。其中, p53 基因是研究较早和较深入的基因之一。而 U2OS 细胞系是表达野生型 p53 的骨肉瘤细胞系,因此本研究选择该细胞系进行研究^[10]。

野生型 p53 基因定位于 17P13,编码 wtp53 蛋白,为四聚体核内磷蛋白,在维护基因组的完整性方面具有重要的作用。p53 蛋白可以与 DNA 结合从而发挥作用,其激活后可以对正常细胞被破坏的 DNA 进行应答,启动细胞周期停滞或凋亡的相关程

序。其机制主要为 DNA 受到损伤后,p53 基因转录和翻译的水平增高,蛋白表达量增加,通过细胞周期蛋白激酶途径阻滞细胞生长,使 DNA 受损伤的细胞停滞于 G₀/G₁ 期,使受损伤细胞启动自身修复机制进行恢复;若修复失败,则 p53 通过抑制 bcl-2 和诱导促凋亡基因 Bax 的表达促使凋亡。当野生型 p53 基因发生丢失、突变或与病毒、癌基因产物结合而失活时,上述调控机制的效能明显降低甚至丧失,受损伤细胞进入 S 期,细胞分裂增殖,最终导致恶性转化细胞数目增多。在骨肉瘤细胞中,p53 基因的改变主要包括基因缺失、重排和点突变,从而丧失其正常的功能。本研究发现,经过白花丹素作用后,U2OS 细胞中 p53 蛋白的表达量呈现出明显的上升趋势,而且呈现出良好的浓度依赖性。这说明白花丹素可能通过诱导 p53 基因的表达,从而使 p53 蛋白发挥出促进凋亡的作用。CCK-8 的结果也表明,白花丹素可以促进骨肉瘤细胞的凋亡,这可能与促进 p53 基因的表达有关。由于本实验只使用了一个时间点,没有进行不同时间点的比较,所以最佳作用时间及剂量依赖性的程度尚需进一步的研究。

MDM2 基因最早在小鼠 BALB/c 细胞中发现。1992 年 Oliner 等^[11]利用分子技术克隆出人 MDM2 基因,其位于 12 号染色体长臂 13~14,编码一种相对分子质量 90×10^3 的核蛋白。在人类许多肿瘤中,如软组织肉瘤、骨肉瘤、恶性胶质细胞瘤及一些乳腺肿瘤等,都有 MDM2 基因扩增和蛋白产物过量表达。MDM2 基因表达产物可以与 p53 蛋白形成蛋白-蛋白复合体,对 p53 蛋白的功能起到负调节作用。MDM2 蛋白与 p53 蛋白结合,解除 p53 蛋白的 G₁ 期细胞阻滞和诱导受损伤细胞凋亡的能力^[12]。

1993 年 Ladanyi 等^[13]用 Southern blot 的方法在 28 例骨肉瘤标本中(其中 16 例为原发肿瘤,11 例为转移性肿瘤,1 例为局部复发)检测 MDM2 的表达,发现 4 例标本中表达阳性,这 4 例标本 3 例为转移性肿瘤,1 例为局部复发,说明 MDM2 和骨肉瘤的复发和转移关系密切。肖华亮等^[14]研究 MDM2 和 p53 的蛋白定位及与患者预后的关系,发现骨肉瘤组织中 MDM2 的总表达量为 50%,p53 为 40%,两者有显著的负相关,且两者和患者预后均有关联。本研究表明,MDM2 蛋白在 U2OS 细胞中表达阳性。白花丹素可以明显抑制 U2OS 细胞 MDM2 的表达,且随着白花丹素浓度的增加,MDM2 的表达呈现出明显的抑制。我们推测白花丹素可能是通过增加 p53 蛋白的表达来抑制 MDM2 的表达,从而发挥促进细胞凋亡的作用。同

时,白花丹素还可以抑制骨肉瘤细胞的转移,这和Shieh等^[4]的研究结果相似,但这是不是通过相同的分子机制尚需进一步证实。

本研究表明,白花丹素可以通过p53途径诱导细胞凋亡,而且呈现出明显的剂量-浓度效应,这可能和白花丹素降低MDM2蛋白的表达并且促进p53蛋白的表达有关,但是具体的分子机制尚需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Son TG, Camandola S, Arumugam TV, et al. Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia[J]. J Neurochem, 2010, 112(5):1316-26.
- [2] Checker R, Sharma D, Sandur SK, et al. Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition of NF- κ B activation in lymphocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(7-8): 949-58.
- [3] Chen CA, Chang HH, Kao CY, et al. Plumbagin, isolated from *Plumbago zeylanica*, induces cell death through apoptosis in human pancreatic cancer cells[J]. Pancreatology, 2009, 9(6): 797-809.
- [4] Shieh JM, Chiang TA, Chang WT, et al. Plumbagin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions by reducing binding activities of NF- κ B and AP-1 via ERK signaling pathway in A549 human lung cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 335(1-2):181-93.
- [5] Kuete V, Tangmouo JG, Meyer JJ, et al. Diospyrone, crassiflorone and plumbagin; three antimycobacterial and antiguonorrhoeal naphthoquinones from two *Diospyros* spp[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(4):322-5.
- [6] Demma J, Hallberg K, Hellman B. Genotoxicity of plumbagin and its effects on catechol and NQNO-induced DNA damage in mouse lymphoma cells[J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23(2): 266-71.
- [7] Wei M, Liu HG, Liu LM. Study on toxicity of plumbagin on human liver cell L-O2 in vitro[J]. Shizhen Guo Yi Guo Yao, 2010, 21(6):1312-4. [韦敏,刘华钢,刘丽敏.白花丹素的体外肝毒性研究[J].时珍国医国药,2010,21(6):1312-4.]
- [8] Aziz MH, Dreckenschmidt NE, Verma AK. Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(21):9024-32.
- [9] Tong X, Lin XG. p53 gene and osteosarcoma[J]. Guo Ji Gu Ke Xue Za Zhi, 2008, 29(6):390-1,394. [童翔,林向进. p53基因与骨肉瘤[J].国际骨科学杂志,2008,29(6):390-1,394.]
- [10] Hu X, Yu AX, Qi BW, et al. The expression and significance of IDH1 and p53 in osteosarcoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29:43.
- [11] Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas[J]. Nature, 1992, 358(6381):80-3.
- [12] Lopes MA, Nikitakis NG, Ord RA, et al. Amplification and protein expression of chromosome 12q13-15 genes in osteosarcomas of the jaws[J]. Oral Oncol, 2001, 37(7):566-71.
- [13] Ladanyi M, Cha C, Lewis R, et al. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma[J]. Cancer Res, 1993, 53(1):16-8.
- [14] Xiao HL, Chen L, Wang D. The expression and significance of MDM2 protein and p53 protein in osteosarcoma[J]. Di San Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2000, 22(4):357-9. [肖华亮,陈俐,王东. MDM2蛋白和P53蛋白在骨肉瘤组织中的表达及意义[J].第三军医大学学报,2000,22(4):357-9.]

〔编辑:安 凤;校对:黄园玲〕