

As₂O₃ 联合 FP99 诱导骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡的初步研究

Preliminary Study on the Apoptosis by Treating Human Osteosarcome MG-63 with As₂O₃ Combined with FP99

肖 涛/XIAO Tao^{1,2},李康华/LI Kang-hua³,方建珍/FANG Jian-zhen²,王万春/WANG Wan-chun²,李桂源/LI Gui-yuan¹

1. 中南大学湘雅医学院,长沙 410078
2. 中南大学湘雅二医院,长沙 410011
3. 中南大学湘雅医院,长沙 410078

1. Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China
2. The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China
3. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

[摘要] 采用噻唑蓝(MTT)法发现 FP99 能够协同三氧化二砷(As₂O₃) 抑制人骨肉瘤细胞 MG-63 的生长,并采用流式细胞计数进一步证实 FP99 加强 As₂O₃ 对 MG-63 细胞凋亡的诱导作用;进而检测了 Caspase-3 的活性,发现 As₂O₃ 联合 FP99 作用 MG-63 细胞后, Caspase-3 的活性显著提高,提示我们 As₂O₃ 联合 FP99 增加 MG-63 细胞的凋亡率的机制可能是通过提高 Caspase-3 激酶活性,从而促进了整个凋亡通路的激活,最终导致细胞凋亡的增加。

[关键词] FP99; As₂O₃; MG-63 细胞; 凋亡; Caspase-3

[文献标识码] A

[中图分类号] R730.54, Q255

[文章编号] 1000-7857(2006)04-0048-03

Abstract: FP99 is an active substance from nightshade. We found the proliferation of MG-63 cells was inhibited by FP99 combined with As₂O₃ through MTT assay. In addition, the results indicated that the percent of apoptosis was elevated after treated by As₂O₃ combined with FP99 in MG-63 cells. To account for the mechanism of apoptosis in MG-63 cell, the detection of Caspase-3 activity was performed. The results indicated that the activity of Caspase-3 was increased after treated with As₂O₃ combined with FP99. We conclude that As₂O₃ combined with FP99 elevated apoptosis in MG-63 cell through increasing activation of Caspase-3.

Key Words: FP99; As₂O₃; MG-63 cell; apoptosis; Caspase-3

Document Code: A

CLC Numbers: R730.54, Q255

Article ID: 1000-7857(2006)04-0048-03

1 引言

FP99 是从一种茄科植物的根和叶中提取的活性物质,具有止痛消肿、祛风解毒的作用,民间用于毒蛇咬伤、痈疮肿痛及肝癌

的治疗。我们经过一系列实验研究发现,其水溶性成分具有抑制动物肿瘤及促进荷瘤动物免疫功能和延长寿命的作用。

在之前的研究中我们发现,采用不同浓度 As₂O₃ 处理骨肉瘤

收稿日期: 2005-06-30

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(03JJY4030)

作者简介: 肖 涛,男,长沙市人民路 39 路中南大学湘雅二医院骨科研究室副主任,副教授,研究方向为骨肉瘤的基因治疗;

E-mail: xiaotaoyl@163.com

李桂源(通讯作者),男,中南大学副校长,教授,研究方向为癌变与侵袭原理、基因治疗;E-mail: Ligy@xysm.net

- 中国骨质疏松症杂志,2002,8(1):84-86.
- [6] 梁渊,梅桥生,田怀谷,等. 如何正确认识生物-心理-社会医学模式的概念及其指导作用[J]. 医学与社会,2004,17(5):1-3.
- [7] KANIS JA, MELTON LJ 3rd, CHRIS-TIANSEN C, et al. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res[J]. 1994, 9(8): 1 137-1141.

- [8] BADIA X, DIEZ -PEREZ A, ALVAREZ -SANZ C et al. Measuring quality of life in women with vertebral fractures due to osteoporosis: a comparison of the OQLQ and QUALEFFO[J]. Qual Life Res. 2001,10 (4): 307-317.
- [9] BADIA X, DIEZ -PEREZ A, ALVAREZ -SANZ C, et al. Measuring quality of life in

women with vertebral fractures due to osteoporosis: a comparison of the OQLQ and QUALEFFO[J]. Qual Life Res. 2001,10 (4):307-317.

- [10] 魏权龄. 数据包络分析 [J]. 科学通报, 2000,45(17):1 793-1 809.

(责任编辑 李慧政)



细胞系 MG-63 可诱导骨肉瘤细胞凋亡。电镜观察结果显示,细胞出现典型的凋亡特征性变化,细胞膜表面微绒毛消失,细胞内大量空泡形成,核仁消失,核染色质浓缩、碎裂,聚于核膜边缘和凋亡小体形成;DNA 琼脂糖凝胶电泳出现 DNA 断裂梯形条带,且随浓度的增加,梯形条带也越明显。研究结果表明 As₂O₃ 可诱导骨肉瘤细胞凋亡^[1]。

最近几年,对细胞凋亡发生分子机制的研究取得了很大的进展,发现很多死亡信号都能激活多种 Caspase。Caspase 属于半胱氨酸蛋白酶类,可以介导细胞的凋亡,但 Caspase 参与凋亡具有严格的细胞类型和死亡信号特异性,对于某一特定的死亡信号,特定 caspase 可能在某一细胞的凋亡中发挥作用,而在另一种细胞内则无影响。在所有的 Caspase 中,Caspase-3 在细胞凋亡中所起的作用最被关注,在凋亡过程中可被其它 Caspase 所激活,参与染色质的凝聚和核酸的激活,促使细胞发生凋亡^[2-3]。

本文运用噻唑蓝(MTT)、FCM、激酶活性检测等方法,研究 FP99 联合 As₂O₃ 对于骨肉瘤细胞 MG-63 的影响,进而探讨 FP99 联合 As₂O₃ 诱导细胞凋亡的信号传导通路,为 FP99 及其提取物的防癌抗癌功能的利用提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 细胞培养

人骨肉瘤细胞株 MG-63 细胞由中南大学湘雅二医院内分泌研究所廖二元教授惠赠,在含有 100 μ/ml 青霉素、100 μ/ml 链霉素和 10 %新生牛血清的 DMEM 培养液内,置 37℃、5%CO₂ 孵箱中传代培养。

2.2 试剂及仪器

As₂O₃(SIGMA 公司产品)以磷酸缓冲液(PBS)制成 10 mmol/L 的储存液,临用时以 MEM 培养液稀释成所需浓度;FP99 自行提取制备成 200 mg/ml 含干药溶液;MEM 培养基(SIGMA 产品);人 Annexin V-FITC 试剂盒由深圳晶美公司提供;Caspase-3 Colorimetric Assay Kits (BD 公司产品) MTT (3,4,5dimethylthiazol-2,5diphenyl tetrazolium bromide)、胰蛋白酶(1:250)购自华美公司;流式细胞仪 CALIB 型(BD 公司);蛋白/核酸分析仪 DU640 型(BECKMAN 公司)。

2.3 MTT 法检测As₂O₃和 FP99 对 MG-63 细胞增殖抑制

采用 MTT 法检测不同浓度 As₂O₃ 和 1.0%FP99 对人骨肉瘤细胞株的增殖抑制率,取对数生长期 MG-63 细胞,用 0.15%胰酶分散细胞后计数,调整细胞浓度为 5×10⁴ ml,植入 96 孔细胞培养板,200 μl/孔,待细胞贴壁,分别加入不同浓度 As₂O₃ 和 FP99,同时设一组不加药物的细胞组,作实验参照,每组均含 4 个平行孔,置 CO₂ 孵箱内分别培养 48 h,结束前 4~6 h 每孔加入 MTT(5 mg/ml) 10 μl,小心去除上清液,加入 DMSO100 μl,轻轻震荡至 MTT 沉淀完全溶解,在多孔扫描分光光度计上,测定 570 nm 波长下吸光度 A 值。取复孔 A 值平均数,按下式计算药物对细胞的抑制率。实验重复 3 次。

细胞抑制率(%)=(1-实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值)×100%。

2.4 细胞凋亡的检测

在凋亡发生的早期,当磷脂酰丝氨酸(PS)暴露于细胞质膜的 outer leaflet 上时,膜非对称性丧失。钙依赖性磷脂结合蛋白 V (Annexin V)能特异性与 PS 结合,用来检测凋亡早期细胞膜 PS 的翻转情况。通过荧光标记 Annexin V 可以对发生凋亡的细胞的数量和程度进行分析。分别用不同浓度 FP99 和 As₂O₃ 作用 MG-63 细胞 48 h,收集 5×10⁵ 个细胞,按照 Annexin V-FITC 试剂盒说明书操作。BD 公司流式细胞仪检测,FITC Ex/Em:488/518;PI Ex/Em:535/617。数据用 ModFit 分析软件处理。

2.5 Caspase-3 活力检测

分别用不同浓度 FP99 和 As₂O₃ 作用 MG-63 细胞 48 h,收集 2×10⁶ 个细胞,严格按照 Caspase-3 Colorimetric Assay Kits 操作方法,测定 Caspase-3 活性。

2.6 统计学方法

SPSS9.0 统计学软件处理数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's T 检验。

3 结果

3.1 As₂O₃ 和 FP99 对 MG-63 细胞增殖抑制

我们在以前的文章中曾报道,As₂O₃ 诱导 MG-63 细胞凋亡的最佳时间为 48 h^[1],因此本文作用时间均采用 48 h。不同浓度 As₂O₃ 和 FP99 分别作用和协同作用 MG-63 细胞 48 h,均可见细胞增殖受到不同程度的抑制,并且该抑制作用随浓度的升高而增强(p<0.01),结果见表 1。从表 1 得出,单加 As₂O₃ 0.5 μmol/L 时,细胞抑制率为 3.95±1.47%,当 0.5 μmol/L As₂O₃ 与 1%FP99 合用时,其细胞抑制率达到 50%,两组比较 P<0.001。

表 1 不同浓度As₂O₃和 FP99 对 MG-63 细胞增殖抑制的影响(%)

Tbl. 1 Effect on proliferation in MG-63 cells by treated with As₂O₃ combined with FP99

组 别	浓度(μmol/L)	细胞抑制率(%)
As ₂ O ₃ (μmol/L)	0.5	3.95±1.47
	1.0	22.40±6.40
	2.0	48.68±16.50
	4.0	67.49±21.20
As ₂ O ₃ (μmol/L)+FP99(mg/dl)	0.5+1.0	51.43±10.78*
	1.0+1.0	87.24±10.32
	2.0+1.0	98.30±0.48
	4.0+1.0	细胞全部死亡

注:* P<0.001(与As₂O₃ 0.5μmol/L 组比较)

3.2 细胞凋亡检测

图 1 为 annexinV/PI 双变量流式细胞仪散点图,在图中可见 3 群细胞,即左下象限显示活细胞群(annexinV⁻/PI⁻);右下象限显示凋亡细胞群(annexinV⁺/PI⁻);左上象限显示坏死细胞群(annexinV⁻/PI⁺)。由图 1 和表 2 可看出,As₂O₃+FP99 组与 As₂O₃ 组比较,annexinV⁺/PI⁻细胞明显增加;2 个加药组与未处理组比较,凋亡细胞与坏死细胞均显著增加。结果提示,极低浓度 As₂O₃ 与 FP99 协同能够诱导 MG-63 细胞凋亡,与未处理组比较有显著差别。

表 2 As₂O₃协同 FP99 对 MG-63 细胞 caspase-3 活力和 AnnexinV-FITC 的影响

Tbl. 2 Effect on caspase-3 and AnnexinV-FITC in MG-63 cells by treated with As₂O₃ combine with FP99

组 别	Caspase-3(活性单位 u)	AnnexinV-FITC(%)
As ₂ O ₃ 0.5 μmol/L	0.78±0.22 ^①	3.04±0.29 ^④
As ₂ O ₃ 0.5 μmol/L+FP991%	1.72±0.26 ^②	6.49±2.66 ^②
As ₂ O ₃ 0.5 μmol/L+FP992%	5.50±1.15 ^③	11.58±3.24 ^③
未处理组	0.40±0.09	0.65±0.11

注:① P>0.01(与未处理组比较);② P<0.01(与As₂O₃ 0.5 μmol/L 组比较);③ P<0.001(与As₂O₃ 0.5μmol/L 组比较);④ P<0.01(与未处理组比较)

3.3 caspase-3 活力检测

As₂O₃ 与 FP 99 协同作用 MG-63 细胞,Caspase-3 表达显著升高,且浓度越高酶活力也越强,与单加 As₂O₃ 比较差别有显著性。结果显示,FP 99 能协同 As₂O₃ 加剧细胞凋亡,从而激活半胱氨酸酶级联反应。

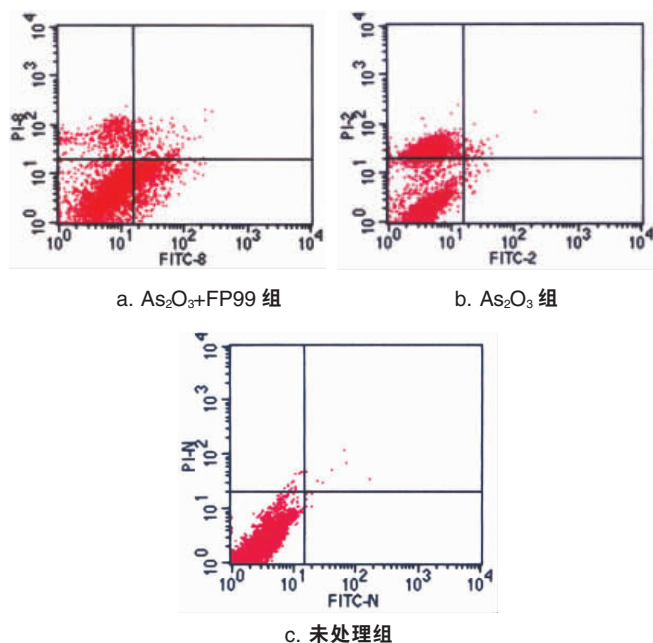


图 1 细胞凋亡散点图

Fig. 1 FCM detected apoptosis

4 讨论和初步结论

细胞凋亡是普遍存在于多细胞生物体内的一种自发、主动的细胞死亡过程,是生物体维持细胞数量相对稳定的固有机理。这一机制若有障碍或发生异常,就有可能引发肿瘤或其它病变。肿瘤是一种细胞凋亡过少而增殖过多的疾病,若能抑制肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡,肿瘤细胞就有可能停止生长。

很多植物有效提取成分都具有抗癌的作用,如从绿茶中提取的茶多酚能够诱导细胞凋亡从而抑制肿瘤的生长^[4-6]。紫杉醇是从天然植物红豆杉中提取的抗癌药,可诱导人急性早幼粒细胞白血病、人乳腺癌细胞、人食管癌细胞的凋亡。

已证实 As_2O_3 对急性早幼粒细胞白血病(APL)等具有良好的促凋亡作用,临床应用于 APL 也取得了较为满意的疗效。至于 As_2O_3 抗凋亡的机制较为复杂,其中可能的机制:①下调癌基因表达或上调抑癌基因的表达,例如:采用抑制剂诱导 B 淋巴瘤细胞株 MBC-1 凋亡时,P53 蛋白表达的阳性率由 2.3%增高到 32.9%;诱导人肺癌细胞 GLC-82 凋亡时,c-myc 基因表达下降,而 P53 表达升高^[7];②造成线粒体内膜电位差破坏,使 ATP 合成异常,不能为细胞提供充足能量而引起凋亡^[8-10]。

本实验运用噻唑蓝 (MTT) 法发现,FP99 对人骨肉瘤细胞 MG-63 的生长有抑制作用,并与 As_2O_3 有协同效应。采用流式细胞计数进一步证实 FP99 对 MG-63 细胞生长抑制是由于诱导 MG-63 细胞发生凋亡。进而,我们检测了 Caspase-3 的活性,发现 FP99 联合 As_2O_3 作用 MG-63 细胞后能够提高 Caspase-3 的活性,这提示我们 FP99 联合 As_2O_3 诱导 MG-63 细胞出现凋亡的机制可能是通过活化 Caspase-3 酶从而激活整个凋亡通路,最终导致细胞的凋亡。该研究为我们进一步寻找高效、低毒、安全的骨肉瘤治疗新药奠定了坚实的基础。

参考文献(References)

- [1] 肖涛,李康华,方建珍,等.三氧化二砷诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的实验研究[J].湖南医科大学学报,2002,27(2):111-113.
- [2] SONG Q, LEES MILLERI SP, KUMAR S, et al. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in

apoptosis[J]. EMBO, 1996,15:3238-3246.

- [3] ENARIN M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD[J]. Nature,1998,391:43-50.
- [4] ZHANG G, MATSUMOTO S, HYON SH, et al. Polyphenol, an extract of green tea, increases culture recovery rates of isolated islets from nonhuman primate pancreata and marginal grade human pancreata [J]. Cell Transplant,2004;13(2):145-152.
- [5] BAEK SJ, KIM JS, JACKSON FR, et al. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells [J]. Carcinogenesis,2004,25(12):2 425-2 432.
- [6] HOU Z, LAMBERT JD, CHIN KV, et al. Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention[J]. Mutat Res ,2004 Nov 2;555(1-2):3-19.
- [7] SHEN L, CHEN TX, WANG YP, et al. As_2O_3 induces apoptosis of the human B lymphoma cell line MBC-1 [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2000,14(2):116-119.
- [8] PERKINS C, KIM CN, FANG G, et al. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR,MRP,Bcl-2,or Bcl-x [J]. Blood, 2000;95(3):1 014-1 022.
- [9] PU Y S, HOUR T C, CHEN J, et al. Arsenic trioxide as a novel anti-cancer agent against human transitional carcinoma - characterizing its apoptotic pathway [J]. Anticancer Drugs, 2002,13(3):293-300.
- [10] NAKAGAWA Y, AKAO Y, MORIKAWA H, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell line[J]. Life Sci.,2002,70(19):2 253-2 269.

(责任编辑 王 芷)

·科技智力游戏·

轻松一刻——九宫填数

该游戏的填数规则为:①在 9×9 的大九宫格内,出题者已给出若干数字,其它宫位的数字空留,需要读者根据逻辑推理填写剩下空格里的数字;②填满数字的大九宫里,数字之间的关系必须满足:每一行与每一列都有 1 到 9 的数字,每个实线所标 3×3 的小九宫格里也有 1 到 9 的数字,且每个数字在每行、每列及每个小九宫格里只能出现 1 次,即既不能重复也不能缺少。答案请见下期。

九宫 1 难度系数◆◆◆◇◇

		3	9		6			
5	7			2	3			
		3	4		8			
6	3						7	
	9		1	3				
4						1	8	
	6	7	5					
	9	5			7	1		
5	8	1						

九宫 2 难度系数◆◆◆◆◇

	9		8				6	
	1	6		9	2			
2							9	1
9							5	4
6				8				
		6					3	
	3	4				7		
	6	1		9			4	
5		4	7	8				

九宫 1

3	8	6	9	5	2	1	4	7
2	7	4	3	1	8	5	9	6
5	1	9	4	6	7	2	3	8
9	5	3	6	2	1	7	8	4
8	4	2	5	7	9	6	1	3
7	6	1	8	3	4	9	5	2
1	3	5	7	4	6	8	2	9
6	2	8	1	9	3	4	7	5
4	9	7	2	8	5	3	6	1

九宫 2

4	2	6	5	1	8	9	7	3
3	1	9	6	7	2	4	8	5
8	7	5	4	3	9	6	1	2
2	3	7	8	9	6	5	4	1
6	4	8	1	5	7	2	3	9
5	9	1	2	4	3	7	6	8
7	5	3	9	6	1	8	2	4
1	8	4	7	2	5	3	9	6
9	6	2	3	8	4	1	5	7

上期答案

(供稿 李建才 责任编辑 李向荣)