

# 去甲二氢愈创木酸抑制骨肉瘤 Mg63 细胞生长的研究

王京亮, 王 亮, 王小开, 张忠民, 金大地\*  
(南方医科大学第三附属医院脊柱外科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨去甲二氢愈创木酸对骨肉瘤细胞 Mg63 的生长抑制作用及其机制。【方法】应用四甲基偶氮唑蓝 (MTT 法) 和克隆形成法测定去甲二氢愈创木酸对 Mg63 细胞的生长抑制作用, 检测其抑制骨肉瘤细胞生长的时间效应和剂量效应; 用流式细胞技术进行细胞周期分析; 用 Western blot 法检测药物对 Mg63 细胞 mTORC1 信号通路活性的影响。【结果】去甲二氢愈创木酸对 Mg63 细胞具有明显的生长抑制作用, 且呈时间依赖和剂量依赖关系, 72 h IC50 值为  $(48 \pm 2) \mu\text{mol/L}$ 。10、20、50  $\mu\text{mol/L}$  可显著抑制 Mg63 克隆形成数量, 且随剂量增加抑制作用明显增强。细胞周期阻滞于 G0/G1 期, mTORC1 信号通路蛋白 p-S6 和 p-4E-BP1 与对照组相比明显下调。【结论】去甲二氢愈创木酸明显抑制骨肉瘤细胞 mg63 增殖, 诱导细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 这一作用可能是通过对 mTORC1 信号通路的抑制完成。

**关键词:**骨肉瘤; 去甲二氢愈创木酸; 增殖; mTORC1

**中图分类号:** R738.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)03-0341-05

## Nordihydroguaiaretic Acid Inhibited Growth of Osteosarcoma Mg63 Cells In Vitro

WANG Jing-liang, WANG Liang, WANG Xiao-kai, ZHANG Zhong-min, JIN Da-di\*  
(Department of Orthopedic Surgery, The Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the growth inhibitory effects and its potential molecular mechanism of nordihydroguaiaretic acid on human osteosarcoma Mg63 cells. 【Methods】Effects of nordihydroguaiaretic acid on proliferation, cell cycle progression in osteosarcoma Mg63 cells, and involvement of mTORC1 signaling in this process were examined by MTT assay, colony formation assay, flow cytometry, and Western blot analysis. 【Results】Nordihydroguaiaretic acid inhibited Mg63 cell proliferation, colony formation dose and time-dependently, induced G0/G1 arrest in osteosarcoma MG63 cells. The 72 h IC50 value of nordihydroguaiaretic acid for Mg63 was  $(48 \pm 2) \mu\text{mol/L}$ . 10, 20, and 50  $\mu\text{mol/L}$  nordihydroguaiaretic acid inhibited the colony formation obviously. The protein level of downstream target of mTORC1 phosphorylation of S6 and 4E-BP1 was down-regulated. 【Conclusion】Nordihydroguaiaretic acid is a promising agent for treatment of osteosarcoma and mTORC1 signaling may contribute to its growth inhibitory effects on osteosarcoma cells.

**Key words:** osteosarcoma; nordihydroguaiaretic acid; proliferation; mTORC1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3):341-345]

去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是从常青灌木中提取的一种天然药物成分,具有抗氧化、抗菌、抗病毒等多种医学功效<sup>[1]</sup>,近来被发现它能抑制宫颈癌、直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌在内等肿瘤细胞的增殖,并诱导其凋亡<sup>[2-5]</sup>。但目前缺乏 NDGA 抗骨肉瘤作用研究资料,本实验初步观察 NDGA 对人骨肉瘤 MG63 细胞生长的抑制作用,进一步探讨其作用机制,为

NDGA 抗骨肉瘤的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

骨肉瘤细胞系 Mg63 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库, NDGA 购自美国 Sigma 公司, DMEM, 胎牛血清, 四甲基偶氮唑盐(MTT)、

收稿日期:2011-12-19

基金项目:广东省自然科学基金(8151051501000024)

作者简介:王京亮,博士研究生,研究方向:脊柱外科; \*通信作者:金大地,博士生导师,教授, E-mail:dadijin@yahoo.com

二甲亚砜(DMSO)购自 Gibco BRL 公司;细胞周期试剂盒购自 Invitrogen 公司;S6、4E-BP1、 $\beta$ -actin 抗体,辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠、山羊抗兔、兔抗山羊二抗和化学发光试剂盒均购自 Santa Cruz 公司;P-S6 (S235/236)、P-4E-BP1(T37/46) 抗体购自 Cell signal 公司;Tris 碱、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)和硝酸纤维素膜购自 BIO-RAD 公司;细胞培养板、培养皿和移液管购自 Corning 公司;其他试剂和耗材均为国产。NDGA 以 DMSO 配制成 300 mmol/L 母液,实验当日以新鲜培养基稀释成所需浓度。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 骨肉瘤细胞系 Mg63 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清 DMEM 培养液中,常规置于 37 °C、体积百分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,根据细胞生长速度适时更换培养基,用 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 mL/L EDTA 工作液消化分散细胞,进行传代或接种培养。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞增殖 采用 MTT 比色法检测 NDGA 对细胞增殖的影响。设实验组 5 组,包括对照组及不同浓度的药物组 4 组(浓度分别为 10、20、50、100  $\mu$ mol/L),每组设 4 个复孔。将 Mg63 单细胞悬液以 2 000 个/mL 接种于 3 块 96 孔培养板中,每孔 200  $\mu$ L。培养 24 h,加入不同浓度的 NDGA,分别再培养 24、48、72 h 后取出,每孔加入 20  $\mu$ L MTT(5 g/L) 溶液继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 200  $\mu$ L DMSO,振荡 5 min,以全自动酶标仪在 570 nm 波长下检测各孔吸光度值(OD),细胞存活率(%)=加药组 OD 值/对照组 OD 值 $\times$ 100%,并以存活率为纵轴,以药物浓度为横轴绘制剂量-效曲线。

1.2.3 克隆形成实验 取对数生长期细胞,2.5 g/L 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化后,加入培养液吹打混匀,以每孔 400 个细胞接种于 6 孔培养板,37 °C、体积百分数为 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养 24 h,细胞贴壁后设置对照组和药物组,药物组加入不同浓度的药物(最终浓度分别为 10、20、50  $\mu$ mol/L),每 3 d 更换一次培养液。当对照组镜下可见的细胞团达到 50 个细胞时,培养结束,PBS 清洗 3 遍,加纯甲醇固定 15 min。弃去固定液,加适量结晶紫染液染色 30 min,然后流水缓慢洗去染色染液,空气中干燥。倒置显微镜下计数克隆,含 50 个细胞以上形成的细胞集落为 1 个克隆,并

计算克隆形成率。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times$ 100%。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期分布 常规接种 Mg63 细胞,每瓶接种细胞为  $5 \times 10^5$  个,培养 24 h 后,无血清 DMEM 培养基同步化培养 24 h,设未用 NDGA 处理的对照组和加药组(浓度为 20、50 和 100  $\mu$ mol/L 的 NDGA 处理),继续培养 24 h,收集不同药物浓度作用的 Mg63 细胞,用 PBS 洗 2 次,再用 700 mL/L 的冷乙醇在-20 °C 下固定过夜。用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 RNase A (10 mg/mL) 37 °C 处理 1 h。随后加入碘化丙锭(100  $\mu$ g/mL)对细胞进行染色。室温放置 1 h 后,上流式细胞仪检测,应用 Cellquest 软件获取数据,Modfit 软件分析细胞周期。

1.2.5 用 Western blot 检测相关蛋白表达 常规接种 Mg63 细胞于 6 孔板,每孔接种细胞为  $5 \times 10^4$  个,培养 24 h 后,设未用 NDGA 处理的对照组和加药组(浓度为 10、20、50、100、150  $\mu$ mol/L),给药作用 24 h 后,提取细胞总蛋白,加热变性后,于-20 °C 保存。取蛋白 20  $\mu$ L,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将分离后的蛋白质电转移到 PVDF 膜上,用封闭液封闭滤膜 4 h,依次结合相应浓度的一抗(1:1 000),于 4 °C 孵育过夜,洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:2 000),孵育 1 h。用化学发光法曝光胶片,冲洗显色,检测相应蛋白条带。用凝胶成像分析系统扫描分析蛋白条带。

1.2.6 统计学方法 数据以均数 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS 13.0 软件,其中 MTT 结果行两因素方差分析,其余采用单因素方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NDGA 对 Mg63 细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示,10  $\mu$ mol/L NDGA 对 Mg63 的增长没有抑制作用,但从 20  $\mu$ mol/L 开始 NDGA 对 Mg63 细胞具有明显的生长抑制作用,且呈时间和剂量依赖性,不同浓度组间、不同时间组间细胞存活率差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 1),相同作用时间条件下,20、50、100  $\mu$ mol/L NDGA 作用组间的比较表明,NDGA 对 Mg63 细胞的生长抑制作用随浓度的增加而增强;相同作用浓度条件下,24、48 和 72 h 各组间比较表明,NDGA

对 Mg63 细胞的生长抑制作用随处理时间的延长而增强。72 h IC<sub>50</sub> 值为(48 ± 2) μmol/L。

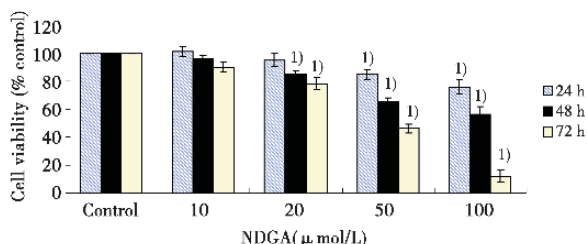


图1 去甲二氢愈创木酸对 MG63 细胞增殖的抑制作用  
Fig.1 The inhibitory effects of NDGA on the proliferation of Mg63 cells

1)  $P < 0.05$  vs control.

### 2.2 NDGA 对 Mg63 细胞克隆形成的影响

与对照组比较,不同浓度(10、20、50 μmol/L)的 NDGA 对 Mg63 细胞克隆形成均有抑制作用,细胞克隆形成率随 NDGA 浓度升高而下降,NDGA 浓度高于 20 μmol/L 时细胞生长缓慢,每个克隆包含的细胞数目少,且随生长时间增加未再出现新增殖细胞,实验结束时存活细胞数量少、活力低下,几乎处于静止期;对照组及不同浓度处理组克隆形成率分别为 (25.5 ± 3.5)%、(10.5 ± 2.1)%、(3.5 ± 1.3)%、(0.5 ± 0.4)%;各组克隆形成率均有显著性差异,  $P < 0.05$ (图 2)。

### 2.3 流式细胞仪检测 NDGA 对 Mg63 细胞周期分布的影响

不同浓度 NDGA (20、50 和 100 μmol/L)作用 Mg63 细胞 24 h 后,细胞周期发生明显改变(图 3)。流式细胞仪检测结果表明, NDGA 作用后, Mg63 细胞周期被阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,且该效应在 50 μmol/L 后趋于明显,在 100 μmol/L 浓度时效应最大,处于 S 和 G<sub>2</sub>/M 期细胞所占比例的明显下降,  $P < 0.01$ (表 1)。

### 2.4 NDGA 对 Mg63 细胞 mTORC1 信号通路蛋白的影响

NDGA 作用 Mg63 细胞 24 h 后,Western blot 检测可见,NDGA 浓度高于 50 μmol/L 时 mTORC1 信号通路下游底物磷酸化 4E-BP1 和 S6 水平与对照组相比明显下调,但在低浓度(20 μmol/L 以下)时 mTORC1 信号通路蛋白没有明显降低,甚至轻微上调(图 4)。

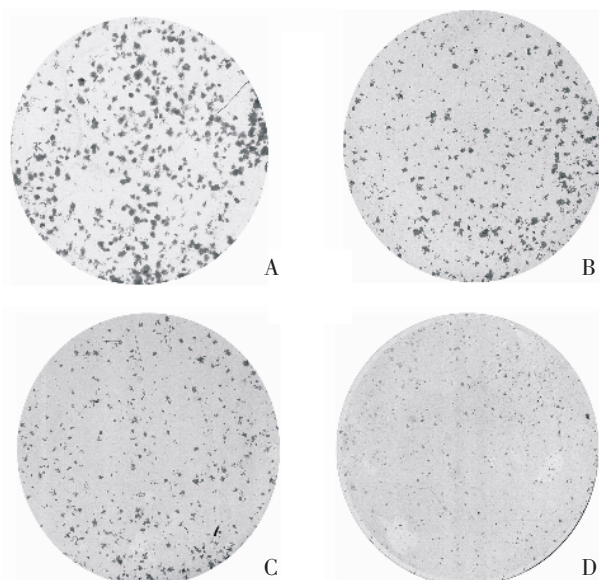


图2 去甲二氢愈创木酸抑制 MG63 细胞克隆形成  
Fig.2 NDGA inhibited MG63 cells colony formation  
A: control, B: 10 μmol/L, C: 20 μmol/L, D: 50 μmol/L

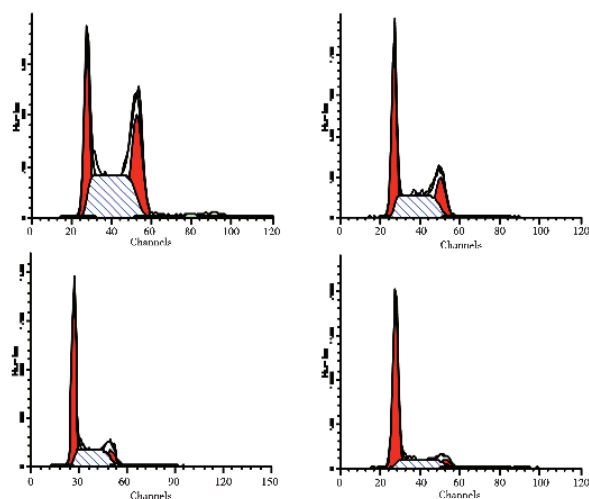


图3 去甲二氢愈创木酸对 MG63 细胞周期的影响  
Fig.3 Effects of NDGA on cell cycles of MG63 cells  
A: control, B: 20 μmol/L, C: 50 μmol/L, D: 100 μmol/L

表1 不同浓度 NDGA 对 MG63 细胞周期的影响  
Table 1 Effects of NDGA on cell cycles of MG63 cells  
(n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

Cell cycle	Control	20	50	100
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	25.22 ± 2.19	34.11 ± 9.52 <sup>1)</sup>	48.82 ± 8.91 <sup>2)</sup>	67.66 ± 7.73 <sup>2)</sup>
S	45.77 ± 3.36	40.56 ± 2.76	36.09 ± 4.85 <sup>1)</sup>	26.13 ± 2.20 <sup>2)</sup>
G <sub>2</sub> /M	29.01 ± 2.19	25.43 ± 1.37	15.09 ± 3.54 <sup>2)</sup>	6.22 ± 2.61 <sup>2)</sup>

Compared with control group, 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$

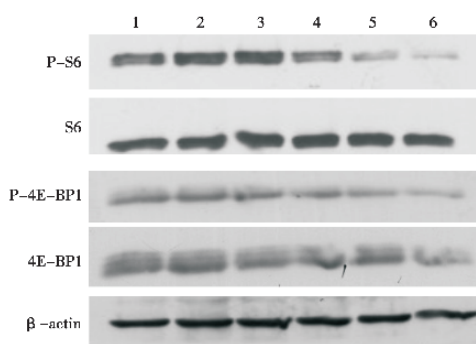


图 4 NDGA 对 Mg63 细胞 mTORC1 通路相关蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of NDGA on the expression of mTORC1 - related proteins in MG63 cells

1: control, 2: 10  $\mu\text{mol/L}$ , 3: 20  $\mu\text{mol/L}$ , 4: 50  $\mu\text{mol/L}$ , 5: 100  $\mu\text{mol/L}$ , 6: 150  $\mu\text{mol/L}$

### 3 讨论

NDGA也可人工合成,是脂氧化酶的抑制剂,具有抗氧化作用,近年来发现NDGA对多种实体瘤细胞的生长具有抑制作用,并有预防肿瘤形成,且对肿瘤转移和体内移植瘤的生长也有显著的抑制作用。由于NDGA相对无毒性,因此的抗癌前景受到越来越多的关注,但目前有关NDGA抗肿瘤作用机制尚不完全清楚。研究发现NDGA的抑制肿瘤作用可能为NDGA选择性抑制了细胞周期蛋白D1的表达,使细胞周期阻滞于G1期和引起凋亡;而诱导凋亡作用与激活细胞色素c和caspase-9途径以及改变Bcl-2家族蛋白水平等密切相关<sup>[6-8]</sup>。

本研究中,采用NDGA处理骨肉瘤Mg63细胞,细胞增殖和克隆形成能力明显减弱,细胞生长停顿于G1期。MTT结果表明10  $\mu\text{mol/L}$ 浓度时NDGA对Mg63细胞的增殖没有表现抑制作用,但随着NDGA浓度的增高,Mg63细胞的增殖受到明显的抑制,且呈显著的时间和剂量效应。表明NDGA在其生理剂量(< 10  $\mu\text{mol/L}$ )时表现其植物激素活性,对Mg63细胞的增殖并不表现抑制作用,甚至有轻微的促进作用,但随着剂量的增加,能够显著抑制其体外增殖,这一现象与文献报道符合<sup>[9]</sup>。细胞克隆形成实验是用来检测肿瘤细胞增殖能力、侵袭性、对杀伤因素敏感性等的重要技术方法,其原理是将细胞分离成单细胞悬液,在培

养基上接种培养,根据集落形成数量和大小来检测细胞增殖能力和致瘤性,该实验可用来研究肿瘤细胞对不同杀伤因素的敏感性。克隆形成率不仅与加入培养液的体积、成份等有关,尚与细胞本身增殖能力、接种细胞密度有关<sup>[10]</sup>,本研究结果显示:NDGA在小剂量(10  $\mu\text{mol/L}$ )时即可以抑制Mg63细胞克隆形成,比MTT法检测肿瘤增殖显示出了更好的敏感性,这可能与细胞接种密度小有关,NDGA为脂溶性,可以透过细胞膜在细胞内富集,就会导致单个细胞内的NDGA的量相对更高,因而也就可以在低剂量下抑制克隆形成了细胞周期进程中两个限制点,一个限制点在G1/S转变期,另一个在G2/M转变期。当细胞受到损伤时就会发生周期阻滞,这有利于细胞进行损伤修复,以维持遗传稳定性。当损伤超过细胞的修复能力时,则促使细胞凋亡<sup>[3,6]</sup>。本实验流式细胞检测结果表明,NDGA可使培养的MG63细胞G1期细胞比增高,S期细胞比下降,而细胞周期中G1期为合成蛋白质和DNA合成准备的阶段,DNA复制和组蛋白的合成在S期完成,说明NDGA对MG63细胞的细胞周期阻滞在G1/S转变期,延缓细胞进入分裂期,从而抑制细胞增殖,加速细胞凋亡。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(the mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种高度保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,mTOR信号通路整合来自细胞内外的各种信号,调节细胞的代谢、生长增殖及存活等生理活动。mTOR信号通路在肿瘤发生过程中过度活化,促进了细胞增殖、生长、分化和存活。mTOR在细胞内通过与其它分子形成复合物而保持生物学活性,目前认为主要有两种复合物:①mTORC1和②mTORC2;mTORC1能够被雷帕霉素抑制,接受生长因子、营养及能量、氧应激等刺激,通过磷酸化下游底物4E-BP1和p-S6来调节蛋白质翻译与合成<sup>[11]</sup>。本实验Western blot检测结果表明NDGA作用Mg63细胞24h后,NDGA浓度高于50  $\mu\text{mol/L}$ 时mTORC1信号通路下游底物4E-BP1和S6磷酸化水平与对照组相比明显下调,但在低浓度(20  $\mu\text{mol/L}$ 以下)时mTORC1信号通路蛋白磷酸化水平没有明显降低,甚至轻微上调,这可能是因为提取蛋白时细胞密度大,多在80%以上,影响单个细胞的NDGA浓度相对较低,这就导致了与细胞克隆实验比较,似乎NDGA

对信号通路蛋白影响的不敏感。高浓度(50  $\mu\text{mol/L}$  以上)NDGA 可以明显抑制 mTORC1 信号通路的活化,从而影响蛋白质翻译起始、核糖体生物合成、能量代谢、细胞周期和细胞凋亡等多种生物学行为,起到抗肿瘤作用。

综上所述,NDGA 抑制骨肉瘤 Mg63 细胞增殖和克隆集落形成,使细胞生长停顿于 G1 期,其分子作用机制可能与其下调 mTORC1 通路相关蛋白 P-S6、P-4E-BP1 有关,但 NDGA 作用于 mTORC1 信号通路上游靶点及其机制仍有待进一步研究确定。本研究初步提示 NDGA 在骨肉瘤治疗中具有一定研究和开发应用价值,NDGA 有望成为一种新型的抗骨肉瘤药物,为骨肉瘤的临床治疗提供一种新的治疗手段。

#### 参考文献:

- [1] Fujimoto N, Kohta R, Kitamura S, et al. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA)[J]. *Life Sci*, 2004, 74 (11): 1417-1425.
- [2] Allen KL, Tschantz DR, Awad KS, et al. A plant lignan, 3'-O-methyl-nordihydroguaiaretic acid, suppresses papillomavirus E6 protein function, stabilizes p53 protein, and induces apoptosis in cervical tumor cells[J]. *Mol Carcinog*, 2007, 46(7):564-575.
- [3] Hausott B, Greger H, Marian B, et al. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(10): 569-576.
- [4] Huang JK, Chen WC, Huang CJ, et al. Nordihydroguaiaretic acid-induced  $\text{Ca}^{2+}$  handling and cytotoxicity in human prostate cancer cells [J]. *Life Sci*, 2004, 75 (19): 2341-2351.
- [5] Meyer GE, Chesler L, Liu D, et al. Nordihydroguaiaretic acid inhibits insulin-like growth factor signaling, growth, and survival in human neuroblastoma cells[J]. *Cell Biochem*, 2007, 102(6): 1529-1541.
- [6] Ryan CJ, Zavodovskaya M, Youngren JF, et al. Inhibitory effects of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on the IGF-1 receptor and androgen dependent growth of LAPC-4 prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2008, 68 (11): 1232-1240.
- [7] Meyers RO, Lambert JD, Hajicek N, et al. Synthesis, characterization, and anti-melanoma activity of tetra-O-substituted analogs of nordihydroguaiaretic acid [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(16): 4752-4755.
- [8] Lü JM, Nurko J, Weakley SM, et al. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update [J]. *Med Sci Monit*, 2010, 16(5): RA93-100.
- [9] Limer JL, Parkes AT, Speirs V. Differential response to phytoestrogens in endocrine sensitive and resistant breast cancer cells in vitro [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119 (3): 515-521.
- [10] Zhou R, Zhang Z, Zhao L, et al. Inhibition of mTORC1 signaling by oleanolic acid contributes to its anti-tumor activity in osteosarcoma cells [J]. *Orthop Res*, 2011, 29 (6): 846-852.
- [11] Stephan WS, Robbie L, Michael NH. TOR signaling in growth and metabolism [J]. *Cell*, 2006, 124(3): 471-484.

(编辑 徐杰)

(上接第 340 页 from page 340)

- reactive CD8<sup>+</sup> T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (5): 2817-2824.
- [10] Mathew A, Rothman A. Understanding the contribution of cellular immunity to Dengue disease pathogenesis [J]. *Immunological Reviews*, 2008, 225(8): 300-313.
- [11] Lin YL, Liu CC, Chuang JI, et al. Involvement of Oxidative Stress, NF-IL-6, and RANTES Expression in dengue -2 -virus -infected human liver cells [J]. *Virology*, 2008, 276(1): 114-126.
- [12] Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection [J]. *Exp Biol Med*, 2008, 233(4): 401-408.
- [13] Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus - specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones [J]. *J Virol*, 1999, 73(5): 3623-3629.
- [14] Azeredo EL, De LM, Zagne SM, et al. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 143(2): 345-356.

(编辑 王晓鹰)