

硫化氢抑制骨肉瘤 U2OS 细胞的体外生长

郭海华¹, 李敬春², 冯鉴强³, 张泷涓⁴, 雍碧城¹, 黄纲^{1*}

(1.中山大学附属第一医院骨肿瘤科,广东,广州 510080;2.广州市妇女儿童医疗中心骨科,广东,广州 510623;
3.中山大学医学院生理教研室,广东,广州 510080;4.中山大学附属第一医院外科实验室,广东,广州 510080)

摘要:【目的】探讨硫化氢单独及与顺铂联用对骨肉瘤细胞生长的影响及其可能机制。【方法】分别用 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L NaHS(硫化氢载体)单独或与 20 mg/L 顺铂共同作用骨肉瘤 U2OS 细胞 24 h, CCK-8 比色法检测细胞存活率;分别用 0.4 及 1.0 mmol/L NaHS 作用骨肉瘤 U2OS 细胞 24 h, 1.0 mmol/L NaHS 单独或与 20 mg/L 顺铂联用作用骨肉瘤 U2OS 细胞 24 h, 细胞单克隆形成法检测各组单克隆数;1.0 mmol/L NaHS 与 20 mg/L 顺铂共同作用骨肉瘤 U2OS 细胞 24 h, Western-Blot 法检测 Bcl-2、Bax、NFκB 蛋白的表达。【结果】硫化氢对 U2OS 细胞生长的影响:0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L NaHS 作用 U2OS 细胞 24 h, 细胞存活率与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 1、2、3、4、5 mmol/L NaHS 作用 U2OS 细胞 24 h, 细胞存活率分别为 $(90.01 \pm 7.49)\%$ 、 $(88.00 \pm 4.12)\%$ 、 $(87.26 \pm 4.05)\%$ 、 $(85.40 \pm 4.39)\%$ 和 $(82.99 \pm 4.65)\%$, 与对照组比较, 能不同程度抑制 U2OS 细胞的生长($P < 0.05$)。0.4 mmol/L NaHS 组、1 mmol/L NaHS 组细胞单克隆数分别为 445.00 ± 25.00 、 306.00 ± 17.69 , 与对照组(464.33 ± 8.32)比较, 1 mmol/L NaHS 组细胞单克隆数减少($P < 0.01$); 0.4 mmol/L NaHS 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。NaHS 与顺铂联用对骨肉瘤细胞的影响:分别用 0.8、1、2、3、4、5 mmol/L NaHS 联合 20 mg/L 顺铂共同作用 U2OS 细胞 24 h, 细胞存活率分别为 $(54.13 \pm 4.03)\%$ 、 $(54.09 \pm 1.13)\%$ 、 $(50.37 \pm 4.56)\%$ 、 $(41.44 \pm 3.95)\%$ 、 $(40.00 \pm 4.34)\%$ 和 $(36.35 \pm 3.90)\%$, 与单用顺铂组($59.76 \pm 3.15\%$)比较, 存活率下降($P < 0.05$)。NaHS+顺铂组细胞单克隆数为 231.00 ± 13.52 , 与顺铂组(285.67 ± 11.59)比较, 细胞单克隆数下降($P < 0.01$); NaHS+顺铂组 NFκB 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值较顺铂组下降。【结论】1 mmol/L 浓度以上的 NaHS 能抑制骨肉瘤细胞的生长, 0.8 mol/L 浓度以上的 NaHS 通过减少 NFκB 入核, 增加细胞的凋亡, 从而增强顺铂对骨肉瘤细胞的抑制作用。

关键词:硫化氢;顺铂;骨肉瘤 U2OS 细胞;抑制;NFκB

中图分类号:R738.1 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)03-0358-06

Hydrogen Sulfide Inhibits Growth of Osteosarcoma Cells U2OS In Vitro

GUO Hai-hua¹, LI Jing-chun², FENG Jian-qiang³, ZHANG Long-juan⁴, YONG Bi-cheng¹, HUANG Gang^{1*}

(1.Department of Orthopedic-Oncology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2.Department of Orthopedic, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China;3.Department of
Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;4.Laboratory of Surgery,
The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of hydrogen sulfide (H₂S) alone or combined with cisplatin on osteosarcoma cells U2OS and the possible mechanism in vitro. 【Method】 Osteosarcoma cells U2OS were treated with NaHS (a donor of H₂S) at different concentration (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0 mmol/L) alone or combined with cisplatin at 20 mg/L concentration for 24 h respectively, then cell viability was tested by cell counter kit-8. U2OS cells were treated with NaHS at 0.4, and 1.0 mmol/L concentration for 24 h respectively, and U2OS cells were treated with NaHS at 1.0 mmol/L concentration alone or combined with cisplatin at 20 mg/L concentration for 24 h, then the number of monoclonal formation experiment. U2OS cells were treated with NaHS at 1.0 mmol/L concentration combined with cisplatin at 20 mg/L concentration for 24 h, then the

收稿日期:2012-12-25

基金项目:广东省科技计划项目(2012B031800050)

作者简介:郭海华,硕士研究生,主治医师, E-mail: haihuaguoguo@163.com * 通信作者:黄纲,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:骨与软组织肿瘤学, E-mail: ganghuang@163.net

expressions of Bcl-2, Bax, and NFκB were evaluated by Western blot assay.【Result】 The effects of hydrogen sulfide on U2OS cells: At the concentration from 1 to 5 mmol/L, NaHS dose-dependently inhibited cell viability in U2OS cells. Compared with control group, the monoclonal number of 1 mmol/L NaHS group was declined significantly ($P < 0.05$). The effect of hydrogen sulfide combined with cisplatin on U2OS cells: U2OS cell viability was dose-dependently declined by NaHS at the concentration from 0.8 to 5 mmol/L combined with cisplatin at 20 mg/L concentration for 24 h. Compared with cisplatin group, the monoclonal number of NaHS + cisplatin group was declined ($P < 0.01$). The expression of NFκB and the ratio of Bcl-2/Bax expression were declined in the NaHS + cisplatin group compared with cisplatin group.【Conclusion】 Hydrogen sulfide can inhibit the growth of U2OS cells at the concentration above 1.0 mmol/L and enhance the inhibition of cisplatin on proliferation of U2OS cells at the concentration above 0.8 mmol/L concentration by decreasing the transportation of NFκB to the nucleus and then increase the apoptosis of U2OS cells.

Key words: hydrogen sulfide; cisplatin; osteosarcoma U2OS cells; inhibit; NFκB

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3): 358-363]

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是一种能溶于水有臭鸡蛋气味的气体,作为一种细胞保护剂受到越来越广泛的研究^[1]。但硫化氢对肿瘤细胞作用的研究报道却不尽相同, Li 等^[2]报道硫化氢促进恶性胶质瘤的生长, Cao 等^[3]报道硫化氢导致胰腺腺癌细胞凋亡。顺铂是骨肉瘤化疗的常见药,能诱导骨肉瘤细胞的损伤,硫化氢亦能抑制顺铂(cisplatin)诱导的人骨髓间充质干细胞损伤而起细胞保护作用^[4]。那么硫化氢对骨肉瘤细胞的生长有何影响,硫化氢是否会降低顺铂对骨肉瘤细胞的损伤作用呢?本试验以硫化氢(sodium hydrosulfide, NaHS)作为硫化氢的供体,探讨硫化氢对骨肉瘤 U2OS 细胞生长的影响及硫化氢与顺铂共同作用对 U2OS 细胞生长的影响,并初步探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

硫化氢(NaHS)、顺铂购自 Sigma 公司; cck-8 购自同仁公司;胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司;抗 Bcl-2、抗 Bax、抗 NFκB 和 Western-Blot 检测试剂盒购自 Cell Signaling Technology Inc。细胞胞浆蛋白和核蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

骨肉瘤 U2OS 细胞购自中国科学院细胞库,细胞置于含 100 mL/L 胎牛血清 DMEM 高糖培养基中,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件培养,取对数生长期细胞进行试验。

1.3 试验分组

1.3.1 硫化氢对骨肉瘤细胞生长的影响 ①根据

NaHS 浓度将实验分为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L 10 组,每组均作用 U2OS 细胞 24 h,检测不同浓度下细胞存活率;②选取 1.0 mmol/L NaHS,根据不同作用时间分为 3、6、12、24、48 h 5 组,检测不同作用时间下细胞存活率;③根据 NaHS 浓度将实验分为 0、0.4、1.0 mmol/L 3 组 每组均作用 U2OS 细胞 24 h 后培养 7 天,计数各组细胞单克隆数。

1.3.2 硫化氢与顺铂联用对骨肉瘤细胞的影响

①分别用 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L NaHS 分别与 20 mg/L 顺铂共同作用 U2OS 细胞 24 h,检测各组细胞存活率;②20 mg/L 顺铂、1 mmol/L NaHS + 20 mg/L 顺铂分别作用 U2OS 细胞 24 h 后培养 7 d,计数各组细胞单克隆数;③20 mg/L 顺铂、1 mmol/L NaHS + 20 mg/L 顺铂分别作用 U2OS 细胞 24 h,提取各组蛋白,用 Western-Blot 法检测各组 Bcl-2、Bax、NFκB 蛋白的表达。

1.4 细胞存活率的检测

取对数生长期细胞,以 5 000 个/孔接种于 96 孔板,37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养过夜待细胞贴壁,用含有不同处理因素的培养基培养细胞,每组设 5 个复孔。处理结束后加入 CCK-8(每孔 100 μL 加 10 μL CCK-8),轻摇,37 ℃孵育 2 h,然后用酶联免疫检测仪测定每孔在 450 nm 波长处的吸光度(OD)。取 5 孔 OD 值的平均值,按公式计算各组细胞存活率,存活率(%)=(实验组 OD-空白对照组 OD)/(正常对照组 OD-空白对照组 OD) × 100%,实验重复 3 次。

1.5 细胞单克隆形成试验

取对数生长期细胞,以 500 个/孔接种于 6 孔板,37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养过夜,细

胞贴壁后用含不同处理因素的培养基培养细胞 24 h, PBS 洗 2 遍, 更换不含处理因素的培养基培养细胞 7 d, 形成细胞单克隆集落, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 用 0.05% 结晶紫染色 30 min, 风干, 计数单克隆数, 试验重复 3 次, 取 3 次单克隆数的平均值。

1.6 Western-Blot 法检测 Bcl-2、Bax、NF κ B 蛋白的表达

U2OS 细胞接种于培养皿中, 培养至 80% 满时按各试验组要求加入不同处理因素。按操作说明书提取细胞胞浆蛋白和核蛋白, BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h。随后加入抗 Bcl-2 (1:1 000) 或抗 Bax (1:1 000) 或抗 NF κ B (1:1 000) 或抗 GAPDH (1:3 000) 或抗 Histone (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 7 min \times 3 次, 加入相应的二抗 (羊抗兔 IgG 1:3 000), 常温孵育 1 h, TBST 漂洗 10 min \times 3 次。将 PVDF 膜用发光剂显色后曝光到 X 光片上, 用 Image J1.41 进行灰度分析。

1.7 统计学处理

实验数据采用均数 \pm 标准差表示, 用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理, 采用单因素方差分析或 t 检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NaHS 对骨肉瘤细胞存活率的影响

0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L NaHS 分别作用 U2OS 细胞 24 h, 各组细胞存活率分别为 (99.54 \pm 5.15)%、(97.11 \pm 7.46)%、(96.55 \pm 5.94)%、(95.23 \pm 5.30)%、(92.09 \pm 2.78)%、(88.00 \pm 4.12)%、(87.26 \pm 4.05)%、(85.40 \pm 7.39)% 和 (82.99 \pm 4.65)%。1.0 mmol/L 以上组与对照组比细胞存活率下降 (图 1, $P < 0.05$, $P < 0.01$), NaHS 在 1~5 mmol/L 的浓度范围内, 呈剂量相关性抑制 U2OS 细胞存活率 ($r = -0.987$, $P < 0.05$)。1 mmol/L NaHS 作用 U2OS 细胞 3、6、12、24、48 h, 各组细胞存活率分别为 (94.81 \pm 1.54)%、(93.36 \pm 2.30)%、(89.81 \pm 2.07)%、(87.89% \pm 2.03)% 和 (80.62% \pm 1.11)%, 与对照组比较, 各组细胞存活率均下降 (图 2, $P < 0.01$), 1 mmol/L NaHS 在 3~48 h 的时间范围内, 呈时间相关性抑制 U2OS 细胞存活率 ($r = -0.988$, $P < 0.01$)。提

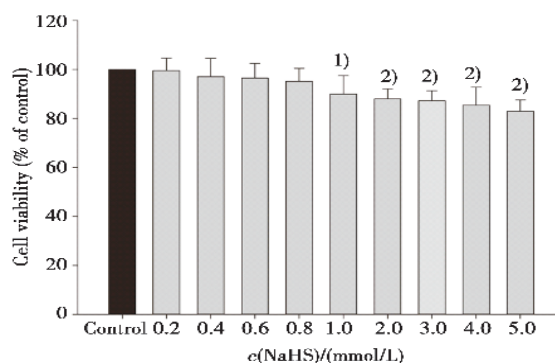


图 1 不同浓度 NaHS 作用 24 h 对骨肉瘤 U2OS 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of sodium hydrosulfide at different concentrations on viability of osteosarcoma U2OS cells when they are treated for 24 h

$\bar{x} \pm s$ $n = 5$ 1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$ compared with control group.

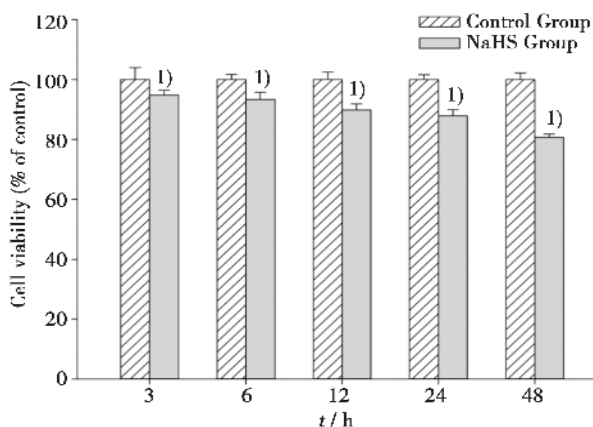


图 2 1 mmol/L NaHS 作用不同时间段对 U2OS 细胞细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of 1 mmol/L NaHS on viability of U2OS treated in different time

$\bar{x} \pm s$ $n = 5$ 1) $P < 0.01$ compared with control group.

示: 浓度在 1 mmol/L 以上的硫化氢能抑制骨肉瘤 U2OS 细胞的生长, 而浓度在 1 mmol/L 以下的硫化氢对骨肉瘤 OS 细胞的生长无影响。

2.2 NaHS 与顺铂合用对骨肉瘤细胞存活率的影响

0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L NaHS 分别与 20 mg/L 顺铂共同作用作用 U2OS 细胞 24 h, 各组细胞存活率分别为 (60.01 \pm 4.44)%、(57.59 \pm 4.99)%、(55.72 \pm 3.03)%、(54.13 \pm 7.03)%、(53.21 \pm 4.49)%、(50.37 \pm 5.56)%、(41.44 \pm 3.95)%、(40.00 \pm 4.34)% 和

(36.35 ± 3.89)% 与顺铂组 (61.22 ± 4.44)% 比较, 0.8 mmol/L 以上组存活率下降(图 3, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。NaHS 在 0.8 ~ 5.0 mmol/L 浓度范围内呈剂量相关性增强顺铂抑制 U2OS 细胞存活率 ($r = -0.979$, $P < 0.05$)。提示: 浓度在 0.8 mmol/L 以上的硫化氢能增强顺铂对骨肉瘤 U2OS 细胞的损伤。

2.3 NaHS 单用或与顺铂合用对骨肉瘤细胞单克隆形成的影响

0.4 及 1.0 mmol/L NaHS 分别作用 U2OS 细胞 24 h 后培养 7 天, 细胞单克隆数分别为 445.00 ± 25.00 及 306.00 ± 17.69, 与对照组 (464.33 ± 8.33) 比, 1.0 mmol/L 组细胞单克隆数下降 ($P < 0.01$, 图 4); 0.4 mmol/L 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4)。20 mg/L 顺铂单独或联用 1.0 mmol/L NaHS 作用 U2OS 细胞 24 h 后培养 7 d, NaHS+顺铂组细胞单克隆数为 231 ± 13.52, 与顺铂组 (285.67 ± 11.59) 比较, 细胞单克隆数下降 ($P < 0.01$, 图 5)。进一步提示: 1 mmol/L 的硫化氢能抑制骨肉瘤 U2OS 细胞的生长, 并且能增强顺铂对骨肉瘤 U2OS 细胞的损伤。

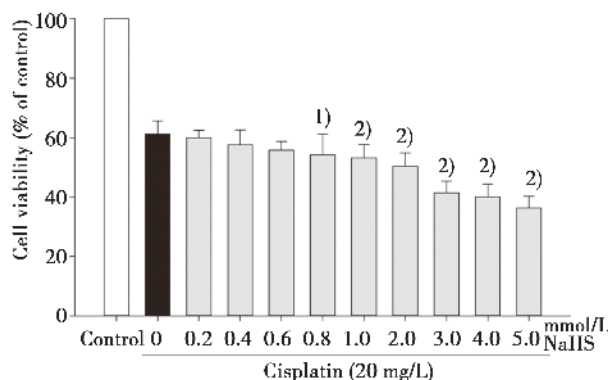


图 3 不同浓度 NaHS 联合 20 mg/L 顺铂作用 24 h 对骨肉瘤 U2OS 细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of sodium hydrosulfide at different concentration combined with cisplatin at the concentration of 20 mg/L on viability of osteosarcoma U2OS cells when they are treated for 24 h

$\bar{x} \pm s$ $n = 5$ 1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$ compared with cisplatin group
 $\bar{x} \pm s$ $n = 5$ 1) $P < 0.05$ compared with cisplatin group.

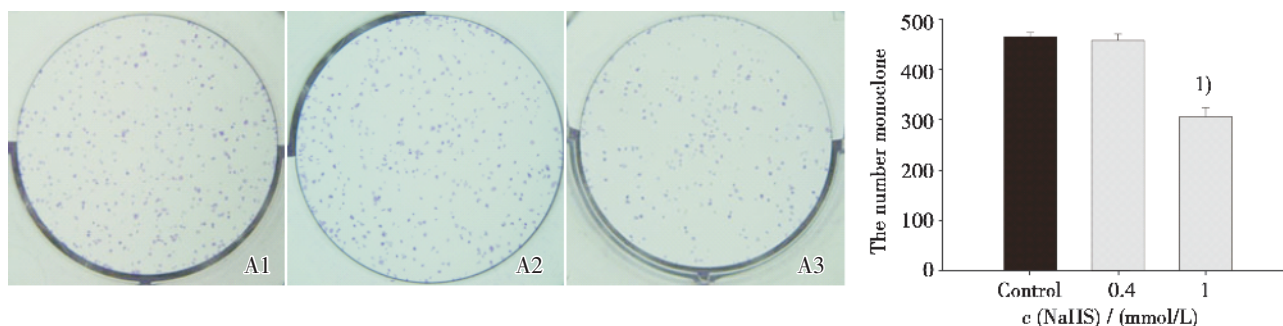


图 4 不同浓度 NaHS 对 U2OS 细胞单克隆形成的影响

Fig.4 Effect of sodium hydrosulfide at different concentration on monoclonal formation of U2OS cells

A1: control group the number of monoclonal: 467; A2: 0.4 mmol/L NaHS group the number of monoclonal: 456; A3: 1 mmol/L NaHS group the number of monoclonal: 303; $\bar{x} \pm s$ $n = 3$ 1) $P < 0.01$ compared with control group.

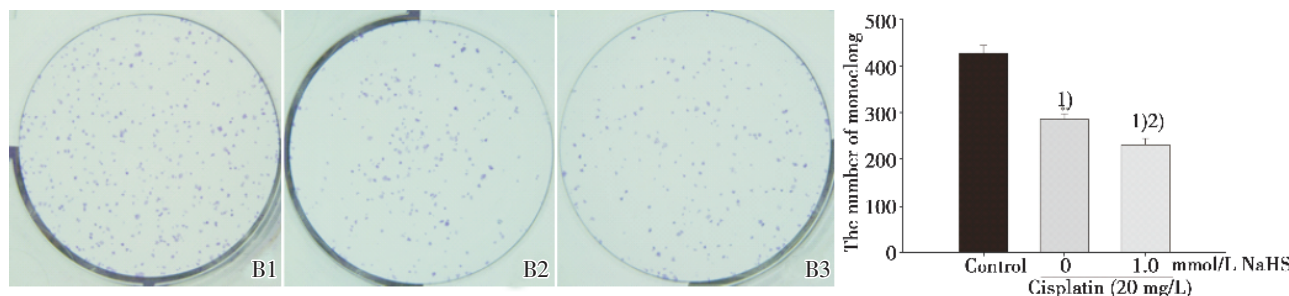


图 5 NaHS 联用顺铂对 U2OS 细胞单克隆形成的影响

Fig.5 Effect of sodium hydrosulfide combined with cisplatin on monoclonal formation of U2OS cells

B1: control group the number of monoclonal: 440; B2: cisplatin group the number of monoclonal: 299; B3: NaHS + cisplatin group the number of monoclonal: 218; $\bar{x} \pm s$ $n = 3$ 1) $P < 0.01$ compared with control group 2) $P < 0.01$ compare with cisplatin group

2.4 NaHS 与顺铂联用对 NF κ B 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值的影响

20 mg/L 顺铂单独或联用 1.0 mmol/L NaHS 作用 U2OS 细胞 24 h。NaHS+顺铂组较顺铂组 NF κ B 蛋白在细胞核内的表达明显下降($P < 0.01$, 图 6); NaHS+顺铂组较顺铂组 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值下降($P < 0.01$, 图 7)。提示:硫化氢是通过减少 NF κ B 入细胞核,进而减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 的转录,从而增强顺铂对骨肉瘤 U2OS 细胞的损伤。

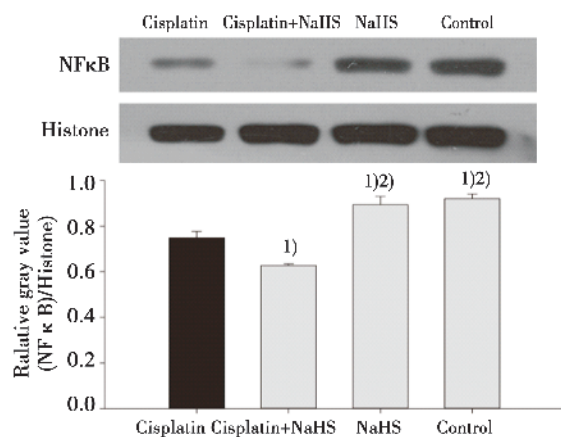


图 6 NaHS 下调 NF κ B 的表达

Fig.6 Sodium hydrosulfide downregulated the express of NF κ B

1) $P < 0.01$ compared with cisplatin group 2) $P < 0.01$ compared with NaHS+cisplatin group.

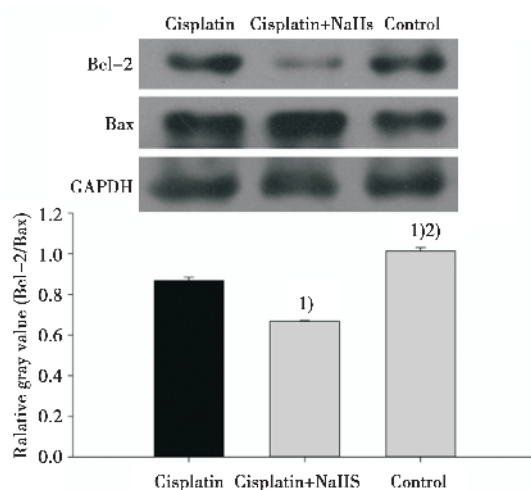


图 7 NaHS 下调 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值

Fig.7 Sodium hydrosulfide downregulated the ratio of Bcl-2/Bax expression

1) $P < 0.01$ compared with cisplatin group 2) $P < 0.01$ compared with NaHS + cisplatin group.

3 讨论

硫化氢作为继一氧化氮、一氧化碳后被发现的第 3 种气体信号分子,在不需要载体蛋白的情况下,可直接透过细胞膜,在不同的组织细胞间有不同的生理浓度,对细胞的生长和凋亡起着不同的作用^[5]。硫化氢作为一种保护剂能对抗化疗时由顺铂诱导的人骨髓间充质干细胞损伤^[4],在对正常组织起保护作用的同时,能否也对肿瘤细胞也起保护作用呢?对肿瘤细胞而言,即使是对同一种肿瘤不同细胞系,硫化氢的所起的作用亦会有所用不同:Cao 等^[6]报道内源性和外源性硫化氢均抑制 WiDR 结肠癌细胞增殖,而 Rose 等^[7]报道硫化氢抑制 HCT116 结肠癌细胞凋亡。而硫化氢对骨肉瘤细胞的生长未见明确报道。

本试验中,0.2 ~ 0.8 mmol/L NaHS 对 U2OS 细胞的存活率没有影响,而 1 ~ 5 mmol/L NaHS 能呈浓度相关性抑制 U2OS 细胞的存活率,1 mmol/L NaHS 在 3 ~ 48 h 范围内呈时间相关性抑制 U2OS 细胞的存活率。提示:较低浓度(0.2 ~ 0.8 mol/L)硫化氢对 U2OS 细胞的生长没有影响,而较高浓度(1~5 mol/L)硫化氢能抑制骨肉瘤细胞的生长。本文还观察到:1 mmol/L NaHS 作用 U2OS 细胞 24 h,能使细胞的单克隆数下降,从另一方面亦提示较高浓度硫化氢(1 mmol/L)能抑制 U2OS 细胞的生长。孙东升^[8]等报道 0.8 mmol/L 以上的外源性硫化氢促进胃癌细胞的凋亡,支持本文结果。

重要的是,本研究除了观察到 1.0 ~ 5.0 mmol/L 的 NaHS 能抑制 U2OS 细胞的存活率,且 0.8 ~ 5.0 mmol/L NaHS 能呈剂量相关性增强顺铂对 U2OS 细胞存活率的抑制。本文亦观察到,NaHS 与顺铂联用能使细胞的单克隆数较顺铂组下降,进一步提示硫化氢能增强顺铂对 U2OS 细胞的损伤作用。顺铂是骨肉瘤化疗的一线用药,但骨肉瘤对顺铂化疗敏感性下降亦不少见,硫化氢与顺铂联用能增强顺铂对骨肉瘤细胞的损伤作用,为顺铂对骨肉瘤的化疗提供新的药物靶点。

通过对胞浆 Bcl-2、Bax 蛋白、细胞核内 NF κ B 蛋白表达的检测,本研究观察到顺铂与 NaHS 联用组较顺铂组 NF κ B 蛋白表达下调,Bcl-2/Bax 蛋白表达比值下降。细胞核因子 NF κ B(nuclear factor of kappa B)是调节基因表达的重要转录因子,有

P65 及 P50 两个亚基。通常情况下, NF κ B 与抑制蛋白 I κ B 结合在胞浆。当细胞受到致癌物、白介素、细胞因子等的刺激, I κ B 磷酸化, I κ B 与 NF κ B-I κ B 复合体分离, NF κ B 进入细胞核内与相关 DNA 序列结合, 启动下游基因的转录, 主要激活一些细胞粘附分子、炎症因子和抗凋亡基因如 P53、C-mys、Bcl-2 基因的转录, 发挥抗凋亡的作用^[9]。Bcl-2、Bax 基因均属于 Bcl-2 家族, 分别是 Bcl-2 家族中最具有代表性的抗凋亡和促凋亡的基因。Bax 蛋白主要位于胞浆, 当凋亡发生时, 它从胞浆转移到线粒体外膜上, 调控凋亡诱导蛋白细胞色素 C 的释放, 导致细胞凋亡^[10]。Bcl-2 蛋白位于线粒体膜上, 能与 Bax 蛋白结合成二聚体, 阻止 Bax 蛋白的释放, 从而抑制细胞的凋亡^[11]。Campell 等^[12]发现 NF κ B 参与骨肉瘤细胞对顺铂耐药, 该机制通过增强抗凋亡基因 Bcl-2 的转录来实现。值得注意的是, 本实验观察到硫化氢与顺铂合用增强顺铂对 U2OS 细胞的损伤作用的同时, 降低核内 NF κ B 及胞浆内 Bcl-2 蛋白的表达, 而核内 NF κ B 及胞浆内 Bcl-2 蛋白表达下降均提示细胞凋亡增多, 由此, 本文推断, 硫化氢增强顺铂对骨肉瘤细胞的损伤作用的机制可能是与胞浆内的 NF κ B 蛋白结合, 减少 NF κ B 蛋白入核, 降低核内 NF κ B 蛋白的表达, 从而减少抗凋亡基因 Bcl-2 的转录, 起到促进细胞凋亡的作用。

Chattopadhyay 等^[13]报道, 释放硫化氢的非甾体抗炎药能提高其对结肠癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、白血病细胞的抗癌作用, 本实验结果提示浓度在 1mmol/L 以上的硫化氢能抑制骨肉瘤 U2OS 细胞的生长, 并且浓度在 0.8 mmol/L 以上的硫化氢的与顺铂联用可提高顺铂对骨肉瘤细胞的损伤作用, 增强骨肉瘤细胞对顺铂的敏感性, 提高化疗效果, 这在对顺铂抵抗的骨肉瘤化疗中可起到积极意义, 为硫化氢的临床应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(1): 45-57.
- [2] Li ZY, Liu SC, Xu PJ, et al. Hydrogen sulfide stimulates the development of rat glioblastoma [J]. *Zhong hua Zhong Liu Za Zhi*, 2012, 34(4): 254-258.
- [3] Cao Y, Adhikari S, Ang AD, et al. Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(3): C503-C510.
- [4] 李敬春, 黄纲, 雍碧城, 等. 硫化氢抑制顺铂致人骨髓间充质干细胞的损伤 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(10): 1736-1740.
Li JC, Huang G, Yong BC, et al. Hydrogen sulfide protects human bone marrow mesenchymal stem cells against cisplatin-induced damage [J]. *J Clin Rehab Tis Eng Res*, 2011, 15(10): 1736-1740.
- [5] Baskar R, Bian J. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 656(1-3): 5-9.
- [6] Cao Q, Zhang L, Yang G, et al. Butyrate-stimulated H₂S production in colon cancer cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(9): 1101-1109.
- [7] Rose P, Moore PK, Ming SH, et al. Hydrogen sulfide protects colon cancer cells from chemopreventative agent beta-phenylethyl isothiocyanate induced apoptosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(26): 3990-3997.
- [8] 孙东升, 张力. 外源性硫化氢对人胃癌细胞凋亡的影响 [J]. *中国医疗前沿*, 2010, 5(13): 77-78.
Sun DS, Zhang L. Effects of Exogenous Hydrogen Sulfide on Apoptosis of Human Gastric Cancer Cells [J]. *Nat Med Fron China*, 2010, 5(13): 77-78.
- [9] Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(5): 852-860.
- [10] Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2 [J]. *Science*, 1997, 277(5324): 370-372.
- [11] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9): 647-656.
- [12] Campbell KJ, Witty JM, Rocha S, et al. Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor-kappaB transactivation [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 929-935.
- [13] Chattopadhyay M, Kodela R, Nath N, et al. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs inhibit the growth of human cancer cells: a general property and evidence of a tissue type-independent effect [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(6): 715-722.

(编辑 张恩健)