

槲皮素诱导耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞系 U2-OS/MTX300 凋亡

谢显彪¹, 尹军强¹, 贾强², 王晋¹, 邹昌业¹, 王姚斐¹, 黄纲¹, 沈靖南^{1*}

(1.中山大学附属第一医院骨肿瘤科, 广东 广州 510080; 2. 贵州省生物研究所, 贵州 贵阳 550009)

摘要:【目的】研究槲皮素对耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞株 U2-OS/MTX300 的增殖抑制和诱导凋亡作用及相关机制。【方法】以不同浓度槲皮素及甲氨蝶呤处理 U2-OS 及 U2-OS/MTX300。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法及平板克隆检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞周期, Hoechst 33258 染色及流式细胞仪检测凋亡, Western blot 法检测凋亡相关蛋白 cleaved-PARP, Bax, Bak, Bcl-2 及 Bcl-XL 表达。【结果】槲皮素可明显抑制耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞 U2-OS/MTX300 的增殖, 72 h IC₅₀ 值为 (22 ± 4) μmol/L。10、25、50 μmol/L 可显著抑制 U2-OS/MTX300 克隆形成数量, 且随剂量增加抑制作用明显增强。槲皮素与甲氨蝶呤之间不存在交叉耐药性。槲皮素能诱导 U2-OS/MTX300 细胞 S 期阻滞, 并可诱导胞内产生典型凋亡小体, 流式细胞仪可检测到明显凋亡。其作用机制是通过上调 Bax, Bak 及下调 Bcl-2 表达, 促进 cytochrome C 释放及诱发 PARP 等重要胞内蛋白断裂来实现。【结论】槲皮素可显著抑制耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞系 U2-OS/MTX300 细胞增殖并诱导其凋亡, 线粒体途径可能是其诱导凋亡的重要机制。

关键词:槲皮素; 骨肉瘤; 细胞系; 细胞凋亡; 甲氨蝶呤

中图分类号: R738

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)03-0331-05

Quercetin Induces Apoptosis in Methotrexate Resistant Osteosarcoma Cell Line U2-OS/MTX300 In Vitro

XIE Xian-biao¹, YIN Jun-qiang¹, JIA Qiang², WANG Jin¹, ZOU Chang-ye¹, WANG Yao-fei¹,
HUANG Gang¹, SHEN Jing-nan^{1*}

(1. Department of Orthopaedic Oncology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Institute of Biology, Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550009, China)

Abstract: 【Objective】To study the growth inhibition, apoptosis induction effects and underlying mechanism of quercetin on methotrexate resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 in vitro. 【Methods】U2-OS and U2-OS/MTX 300 cells were treated with quercetin and methotrexate. Cell viability was evaluated by MTT and colony formation assay. Cell-cycle status, apoptosis inducing effect, and the expression of apoptosis-related proteins were evaluated by flow cytometry, fluorescent staining, DNA fragmentation assay, and Western blotting, respectively. 【Results】Quercetin inhibited cell growth in U2-OS/MTX300. The 72 h IC₅₀ value of quercetin for U2-OS/MTX300 was (22 ± 4) μmol/L. 10, 25, and 50 μmol/L quercetin inhibited the colony formation obviously. There was no cross resistance between methotrexate and quercetin. Induction of S phase arrest and apoptosis were confirmed by flow cytometry and fluorescent staining in U2-OS/MTX300. Quercetin induced Bak, Bax up-regulation, Bcl-2 down-regulation, cytosolic cytochrome C accumulation and cleavage of PARP in U2-OS/MTX300 cells. 【Conclusion】Quercetin inhibits the growth and induces apoptosis in MTX resistant human osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300. The mitochondrial apoptosis pathway probably plays an important role in this process.

Key words: quercetin; osteosarcoma; cell line; apoptosis; methotrexate

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3): 331-335]

骨肉瘤是最常见的骨骼原发恶性肿瘤, 目前随着新辅助化疗的使用, 其临床预后已大大改善^[1]。

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是最重要的骨肉瘤一线化疗药物, 但由于其耐药性产生严重影响骨

收稿日期: 2011-02-14

基金项目: 广东省自然科学基金(4009423)

作者简介: 谢显彪, 博士, 研究方向: 骨肿瘤; * 通信作者: 沈靖南, 博士, 教授, 研究方向: 骨肿瘤, E-mail: shenjn01@hotmail.com

肉瘤患者的预后。从天然药物中寻找安全有效的抗肿瘤药物可为骨肉瘤的治疗开辟一条新的途径^[2]。槲皮素(quercetin, Qu)是一种天然的黄酮类化合物,具有显著的抗氧化和自由基清除功能。目前国内外研究越来越重视槲皮素在抗肿瘤方面的作用^[3-6],然而对于其抗骨肉瘤的疗效,尤其是对耐化疗药物的骨肉瘤的疗效,实验研究资料尚少。本实验研究槲皮素对耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞株 U2-OS/MTX300 生长、增殖的影响,为槲皮素在抗骨肉瘤的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

槲皮素购于 Sigma 公司,以二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成储备原液,于-20℃保存。工作液以不含血清的培养基稀释,DMSO 终浓度控制在体积分数小于 0.5%。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hoechst 33258 及 MTX 均购于 Sigma 公司。凋亡相关抗体 Cytochrome C,cleaved-PARP,Bax,Bak,pBad,Bad,Bcl-2 和 Bcl-XL 购于 Cell Signal 公司, β -actin 购于 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞株及细胞培养

骨肉瘤细胞系 U2-OS 及 U2-OS/MTX300 (MTX 耐药细胞株)由意大利 Rizzoli 骨科研究所 Dr. M SERRA 惠赠。U2-OS 于体积分数 10%胎牛血清 DMEM 培养液中培养,U2-OS/MTX300 于含有 300 ng/mL MTX 的 10%胎牛血清 DMEM 培养液中持续培养。槲皮素处理时 U2-OS/MTX300 移至 10%的胎牛血清 DMEM 培养液中以避免 MTX 对实验结果的影响。

1.3 MTT 法检测细胞增殖抑制

取对数生长期的细胞 180 μ L(2×10^3 个)接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,加入不同浓度槲皮素或 MTX,每组设 3 个复孔。培养 44 h 后,加入 10 μ L 的 5 mg/mL MTT,培养至 48 h。弃去培养液,加入 0.1 mL DMSO,待结晶完全溶解后,在 Bio-Rad550 酶联免疫检测仪上以 570 nm 和 630 nm 双波长测定每孔的吸光度值。Bliss 法计算抑制细胞生长达 50%时的药物浓度,以 IC_{50} 值表示。

1.4 平板克隆形成

取对数生长期的细胞,计数 200 个细胞分别接种含 37℃预温培养液的六孔板中,并轻轻摇

匀。置于培养箱中,24 h 后加入不同浓度槲皮素,以后每 3 d 更换 1 次培养液,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,以 PBS 浸洗 2 次,甲醇固定 15 min。加结晶紫染液染色 10~30 min。将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,用肉眼直接计数克隆。

1.5 流式细胞仪分析细胞周期

收集 10、25、50 μ mol/L 槲皮素处理 24 h 后的细胞,PBS 洗涤 2 次,体积分数 70%乙醇固定,4℃过夜,经 10 μ mol/L 的溴化丙啶(PI)染色,4℃避光 30 min 后,置流式细胞仪,488 nm 激发光检测细胞 DNA 含量,分析不同浓度药物作用下的各期细胞比率。

1.6 Hoechst 33258 荧光染色

取对数生长期的细胞培养于带玻片的 6 孔板中, 2×10^5 个/孔,细胞贴壁后分别加入 10、25、50 μ mol/L 的槲皮素,继续培养 48 h;加入固定液 4℃固定 5 min;PBS 清洗,加入 10 mg/mL Hoechst 33258 染色液,染色 10 min;PBS 洗片,紫外光激发下,荧光显微镜进行细胞核形态学观察,并摄片。

1.7 Annexin V/PI 染色流式细胞仪测定细胞凋亡率

10、25、50 μ mol/L 的槲皮素处理细胞 72 h 后,收集各组细胞。按照细胞凋亡率测定试剂盒的方法,分别添加 Annexin V 和 PI,在流式细胞仪上测定细胞凋亡率。

1.8 Western blot 检测蛋白表达

收集 10、25、50 μ mol/L 槲皮素处理的各组细胞,PBS 洗涤 2 次,用 NP40 裂解细胞,提取细胞总蛋白。按照碧云天的试剂盒说明书抽提细胞浆蛋白。进行 SDS 电泳后电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。1:1 000 的一抗 4℃孵育过夜。二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,最后加入化学发光剂进行检测,X 线片暗室曝光,常规显影定影。

1.9 统计方法

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,实验重复 3 次。数据输入 SPSS 11.0 软件中,两样本均数采用 t 检验,多样本均数采用方差分析,其中 MTT 结果行两因素方差分析,其余行单因素方差分析(ANOVA)及 Bonferroni 法进行组间差异比较,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 代表两组差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 槲皮素对 U2-OS/MTX300 具增殖抑制显著作用

槲皮素对 U2-OS/MTX300 的生长抑制作用呈现明显时间及剂量依赖性,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)。克隆形成实验也显示 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素可显著抑制骨肉瘤细胞克隆形成数量,且随剂量增加抑制效果明显增强(图 2)。本研究测定 MTX 对 U2-OS 及 U2-OS/MTX300 72 h IC_{50} 值分别为 $(9 \pm 3)\text{nmol/L}$ 及 $(1064 \pm 4)\text{nmol/L}$,两者差异有存在显著统计学意义 ($P < 0.05$),而槲皮素对上述两种细胞 72 h IC_{50} 值分别为 $(21 \pm 5)\mu\text{mol/L}$ 及 $(22 \pm 4)\mu\text{mol/L}$,两者无统计学差异 ($P > 0.05$),由此可见槲皮素与 MTX 之间不存在交叉耐药性。

2.2 槲皮素诱导细胞周期阻滞

槲皮素处理 24 h 后,流式细胞仪检测可见,随着槲皮素浓度的增高,骨肉瘤 U2-OS/MTX300 细胞的 G0/G1 期细胞比例下降,S 期细胞比例增加,与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 3)。表明槲皮素通过将细胞阻滞在 S 期,以抑制其增殖。

2.3 槲皮素诱导 U2-OS/MTX300 细胞凋亡

10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理细胞 72 h 后,通过 Hoechst 33258 染色可见对照组细胞核形态规则,染色均匀,而处理组出现染色质凝集,可见浓染致密的团块状荧光,有典型的凋亡小体形成,随剂量的升高凋亡小体数量逐渐增多(图 4)。相同浓度槲皮素处理细胞 72 h 后流式细胞仪检测可见槲皮素组细胞凋亡率与对照组相比明显增加,且随剂量升高而增加 ($P < 0.05$)。这些结果均表明槲皮素具有诱导 U2-OS/MTX300 细胞凋亡作用。

2.4 槲皮素影响凋亡相关蛋白的表达

10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理 72 h 后,Western blot 检测可见胞浆内 cytochrome C 表达量与对照相比随剂量增加而升高,胞内 cleaved-PARP, Bax, Bak 表达量也随剂量的增加而上调, Bcl-2 则随剂量的增加而下调。Bcl-XL 表达量变化

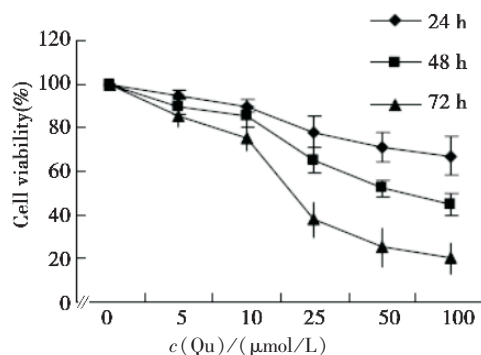


图 1 槲皮素对 U2-OS/MTX300 的增殖抑制作用

Fig.1 Quercetin inhibited the proliferation of U2-OS/MTX300 cells

不明显(图 5)。

3 讨 论

目前从天然药物中寻找低毒、高效的抗肿瘤药物是研究的热点。槲皮素作为一种天然的黄酮类化合物,广泛存在于植物及食物中。近年来已有报道其对乳腺癌、结肠癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、鼻咽癌、黑色素瘤等多种恶性肿瘤具有显著抗癌功效^[3-8]。槲皮素抗肿瘤作用具有选择性,对正常细胞的毒性微弱^[3]。因此槲皮素的抗肿瘤作用与传统化疗药物相比具有优势,是一种理想的抗肿瘤药物,其制剂已进入 I 期临床研究。目前槲皮素在抗骨肉瘤方面的报道较少,黄祚瑶等^[9]研究表明槲皮素可显著诱导骨肉瘤细胞系 MG63 凋亡,但尚未见槲皮素对耐化疗药骨肉瘤细胞的相关报道。

本研究结果表明槲皮素能够有效地抑制耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞系 U2-OS/MTX300 的增殖,其 72 h IC_{50} 值为 $(22 \pm 4)\mu\text{mol/L}$ 。槲皮素与 MTX 在骨肉瘤中不存在交叉耐药性。通过流式细胞仪检测及细胞形态学结果可以看出,槲皮素对耐甲氨蝶呤骨肉瘤的抗肿瘤作用主要是通过将肿瘤细胞阻滞在 S 期抑制细胞的增殖及诱导凋亡而实现的。既往研究中报道槲皮素抑制肿瘤细胞的 IC_{50} 值在 10 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$,对多种肿瘤细胞具有诱导细胞周期阻滞及凋亡作用,细胞周期阻滞可能发生在 G2/M, G0/G1 或 S 期^[3-8],其具体的抗肿瘤机制在不同细胞类型中存在一定差异。

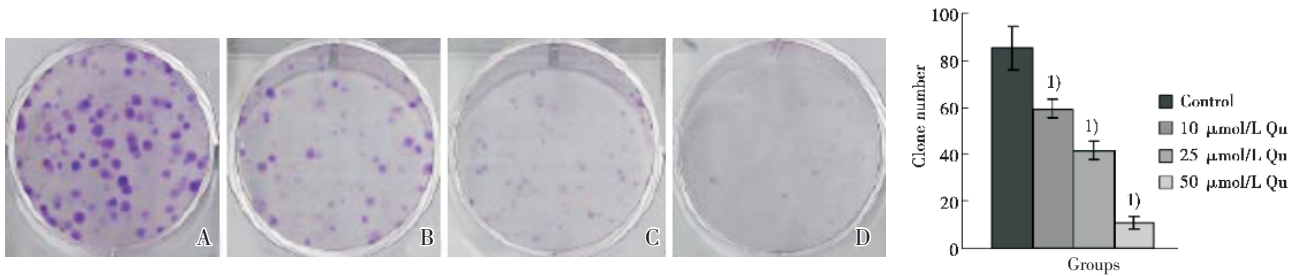


图 2 槲皮素抑制 U2-OS/MTX300 克隆形成

Fig.2 Quercetin inhibited colony formation of U2-OS/MTX300 cells

A: control; B: 10 $\mu\text{mol/L}$ Qu; C: 25 $\mu\text{mol/L}$ Qu; D: 50 $\mu\text{mol/L}$ Qu; E: Relation between clone number of U2-OS/MTX300 and concentration of Qu, 1) $P < 0.05$ vs control

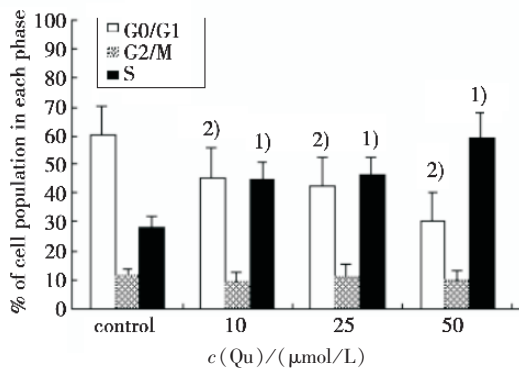


图 3 槲皮素诱导 U-2OS/MTX300 细胞周期 S 期阻滞

Fig.3 Quercetin induced S phase arrest in U-2OS/MTX300 cells

1) $P < 0.05$ vs control

目前槲皮素诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制主要认为与抑制细胞内 MCL1、Bcl-2、cyclooxigenase-2 表达,上调 Bax,激活 caspase-3 酶活性,活化细胞线粒体或死亡受体凋亡通路等有关^[3-4,7-8]。本研究对于槲皮素诱导耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞的凋亡机制进行初步探讨。Bcl-2 蛋白家族是一组与凋亡有密切关系的蛋白,其主要由促凋亡蛋白及抗凋亡蛋白组成。当上述两组蛋白之间的比例升高时,促进凋亡;反之,则凋亡程度减低^[10]。本研究中可见骨肉瘤细胞经槲皮素处理后胞内促凋亡蛋白 Bax 及 Bak 上调而抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调,胞浆内 cytochrome C 表达量随处理剂量增加而升高。同

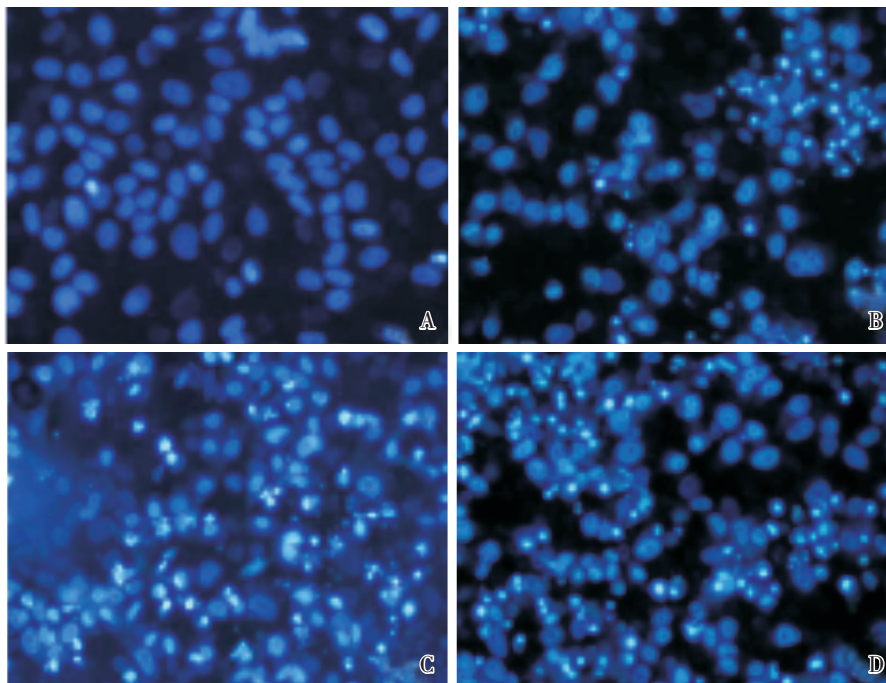


图 4 槲皮素处理后细胞形态学改变

Fig.4 Morphology changes after quercetin treatment

A: control; B: 10 $\mu\text{mol/L}$ Qu; C: 25 $\mu\text{mol/L}$ Qu; D: 50 $\mu\text{mol/L}$ Qu

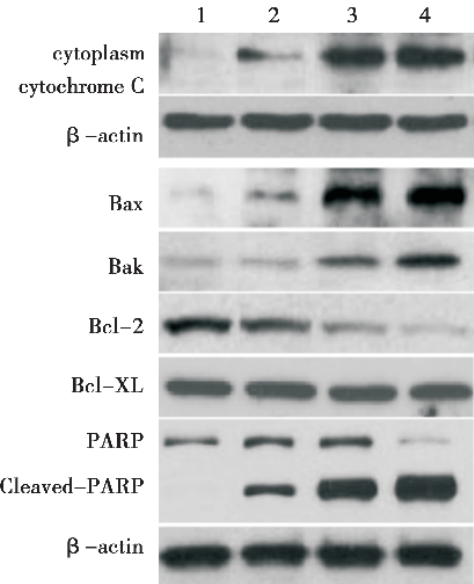


图 5 槲皮素处理后胞内凋亡相关蛋白水平变化

Fig.5 Expression level of apoptosis related protein changed after quercetin treatment

Lane 1: control; Lane 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ Qu; Lane 3: 25 $\mu\text{mol/L}$ Qu; Lane 4: 50 $\mu\text{mol/L}$ Qu

时,作为 caspase 酶底物的 PARP 随槲皮素剂量的升高其断裂片段 cleaved-PARP 明显升高,这表明在该凋亡过程中 caspase 酶活性明显升高。细胞主要凋亡的途径主要有两条,一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase,另一条则是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase,降解胞内的重要蛋白而引起细胞凋亡。本研究表明线粒体凋亡途径可能在槲皮素诱导的骨肉瘤细胞系凋亡中发挥重要的作用,其主要是通过影响 Bcl-2 家族蛋白相对水平,促进线粒体 cytochrome C 释放,进而活化 caspase 酶促进 PARP 及细胞内其他重要蛋白的断裂而实现的。

综上所述,本研究表明槲皮素对耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞 U2-OS/MTX300 显著抑制增殖和诱导凋亡作用,诱导凋亡作用不受 MTX 耐药的影响。槲皮素诱导骨肉瘤凋亡可能是通过线粒体凋亡途径实现。因此,槲皮素有可能成为对 MTX 耐药骨肉瘤患者的候选药物,为其临床应用提供了重要

的实验基础和理论依据。

参考文献:

[1] Marina N, Gebhardt M, Teot L, et al. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma [J]. Oncologist, 2004, 9(4): 422-441.

[2] Abelson PH. Medicine from plants[J]. Science, 1990, 247(4942): 513.

[3] Cheng S, Gao N, Zhang Z, et al. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through downregulation of Mcl-1 and activation of Bax[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(23): 5679- 5691.

[4] Russo M, Spagnuolo C, Volpe S, et al. Quercetin induced apoptosis in association with death receptors and fludarabine in cells isolated from chronic lymphocytic leukaemia patients[J]. Br J Cancer, 2010, 103(5): 642-648.

[5] 冯红波,张军辉.槲皮素对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖的影响及机制研究[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(20): 33-34.

[6] 顾远晖,李一平,李安强,等.槲皮素对人肝癌 SMMC-7721 细胞生长的抑制及细胞凋亡的诱导作用[J]. 兰州大学学报:医学版, 2010, 36(3): 9-12.

[7] Chou CC, Yang JS, Lu HF, et al. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(8): 1181-1191.

[8] Niu G, Yin S, Xie S, et al. Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2011, 43(1): 30-37.

[9] 黄祚瑶,刘晓宁,李建,等. 槲皮素对人骨肉瘤细胞系 MG-63 中凋亡相关因子 caspase-3 的表达影响[J]. 华西医学, 2008, 23(5): 1089-1090.

[10] Salomons GS, Brady HJ, Verwijs-Janssen M, et al. The Bax alpha:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia[J]. Int J Cancer, 1997, 71(6): 959-965.

(编辑 刘清海)