

莪术油对骨肉瘤 saos-2 细胞 IGF-1R, Akt 及 Bcl-2 表达的影响

朱福良^{1,2}, 刘金洋¹, 黄凤香^{2*}

(南宁广济高峰医院, 南宁 530000; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:初步研究莪术油对骨肉瘤 saos-2 细胞的作用,并探讨胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R),蛋白激酶 B (Akt) 及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 的表达情况。方法:以 saos-2 细胞为研究对象,采用 MTT 法观察不同质量浓度 30, 60, 120 mg·L⁻¹ 莪术油作用 saos-2 细胞 24, 48, 72 h 后的增殖影响,流式细胞术观察莪术油(30, 60, 120 mg·L⁻¹)诱导 saos-2 细胞的凋亡,RT-PCR 检测 IGF-1R mRNA 的表达,Western blot 检测 Akt 及 Bcl-2 的蛋白表达变化。结果:与空白组比较,莪术油(30, 60, 120 mg·L⁻¹)能明显抑制 saos-2 细胞的增殖,并诱导 saos-2 细胞凋亡,呈剂量依赖性,明显下调 IGF-1R mRNA 的表达,明显下调 Akt 及 Bcl-2 蛋白的表达($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:莪术油具有抑制 saos-2 细胞生长和诱导凋亡的作用,其抗肿瘤作用与抑制 IGF-1R, Akt 及 Bcl-2 的表达有相关性。

[关键词] 莪术油; 骨肉瘤; 增殖与凋亡; 胰岛素样生长因子-1 受体; 蛋白激酶 B; B 细胞淋巴瘤/白血病-2

[中图分类号] [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)17-0126-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170126

Inhibition of IGF-1R, Akt and Bcl-2 by Curcumae Rhizoma Oil on Human Osteosarcoma saos-2 Cells
ZHU Fu-liang^{1,2}, LIU Jin-yang¹, HUANG Feng-xiang^{2*} (1. Nanning GuangJi GaoFeng Hospital, Nanning 530000, China; 2. Guilin Medical Collge, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Curcumae Rhizoma oil on human osteosarcoma cell line saos-2, and discuss the change of the expression level of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), protein kinase B (Akt) and B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2). **Method:** The effects of Curcumae Rhizoma oil on the proliferation of osteosarcoma cell line saos-2 were detected by MTT assay. Cytometry was used to analyze cell apoptosis; expression of IGF-1R was detected by real-time PCR, and the expression of Akt and Bcl-2 was detected by western-blot. **Result:** Curcumae Rhizoma oil could obviously inhibit the growth of osteosarcoma cells and induce saos-2 cell apoptosis in a dose dependent manner. The expression of IGF-1R, Akt and Bcl-2 was down regulated in the curcumol-treated cells. **Conclusion:** Curcumae Rhizoma oil can inhibit proliferation and induce apoptosis of saos-2 cells, and its antitumor effect is associated with suppressing the expression of IGF-1R, Akt and Bcl-2.

[Key words] Curcumae Rhizoma oil; osteosarcoma; proliferation and apoptosis; insulin-like growth factor-1 receptor; protein kinase B; B-cell lymphoma/leukemia-2

骨肉瘤是一种常见的原发性恶性骨肿瘤^[1],骨肉瘤的治疗方法是手术治疗以外辅以化疗和放疗^[2]。莪术油为中药莪术的挥发油,具有抗血栓,抗病毒,抗感染和抗肿瘤的活性^[3]。已有文献报道莪术油能够抑制多种肿瘤细胞的生长增殖和诱导其凋亡,目前莪术油对骨肉瘤细胞的作用还未见文献报道。胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)是近 20 年来研究比较热门的细胞因子,在肿瘤的生长发展具有重要作用,有文献显示其在骨肉瘤中高度表达,降低或抑制其表达有望成为骨肉瘤药物治疗的新靶

点^[4]。本文从莪术油对骨肉瘤细胞 saos-2 的增殖抑制及诱导凋亡方面进行了研究,并对与增殖、凋亡和转移相关的 IGF-1R 信号通路进行了探讨,旨在为骨肉瘤临床药物治疗提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞株 人骨肉瘤细胞株 saos-2 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂 莪术油(中国食品药品检定研究院,批号 1544-200202), 0.25% 胰蛋白酶(吉诺生物医药

[收稿日期] 20150310(020)

[基金项目] 广西医药产业人才小高地项目(1415);桂林市科学研究与技术开发项目(20140105-8)

[第一作者] 朱福良,在读硕士,主治医师,从事骨科学工作, Tel:18076586660, E-mail:31532286@qq.com

[通讯作者] * 黄凤香,高级实验师,从事药理学工作, Tel:0773-5895146, E-mail:97443006@qq.com

技术有限公司,批号 1403040),胎牛血清(上海依科赛生物制品有限公司,批号 130915),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 8114129),噻唑蓝(美国 Amersco 公司,批号 0793),SYBR Green 荧光染料(美国 ABI 公司,批号 4367659),Annexin V-FITC / PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号 556547),Bcl-2(批号 0104a)和 Akt(批号 WL0003b)购自沈阳万类生物有限公司, β -actin 鼠单抗及山羊抗小鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 TA09,2A2305),RIPA 蛋白裂解液(上海碧云天有限公司,批号 P0013B),Trizol(天根生物有限公司,批号 DP421),逆转录试剂盒(英潍捷基生物有限公司,批号 C28025-032),ECL 发光液(美国 Bio Rad 生物公司,批号 102030354)。

1.3 仪器 iMARK 型号酶标仪(美国 Bio Rad 公司),IXTIFL 型号倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),legend RT-Plus 型号高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司),BR II 型号蛋白电泳及转膜系统(美国 Bio Rad 公司),7500 型 fsat 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),Aria III 型号流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 按常规方法培养 saos-2 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于 5% CO₂ 恒温细胞培养箱中培养中,1~2 d 传代 1 次。莪术油用 DMSO 溶解成 120 g·L⁻¹ 的母液,用时用培养基稀释成(30,60,120 mg·L⁻¹),空白组为 0.1% DMSO 完全培养基。

2.2 MTT 法观察莪术油抑制 saos-2 细胞生长的作用 取对数期生长的 saos-2 细胞,胰酶消化离心后稀释到 1 × 10⁴ 个/mL,按每孔 200 μ L 接种 96 孔板中,待细胞贴壁后,加药干预,分成莪术油组及空白组,每组设 5 个复孔,药物处理培 24,48,72 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ 的噻唑蓝(MTT)20 μ L,继续培养 4 h,小心吸去上清,每孔加入 150 μ L 的 DMSO 溶解紫色结晶,室温避光震荡 10 min,于酶标仪上检测 490

nm 的吸光度 A,并计算 saos-2 细胞的增殖抑制率,实验重复 3 次。抑制率的计算参照杨周萍等^[5]的计算方法。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数期生长的 saos-2 细胞,以 2 × 10⁴ 个每孔接种于 6 孔板内,每组设 3 个复孔,待细胞贴壁后,加药干预 48 h,收集上清,胰酶消化后收集细胞,用冷 PBS 洗 1 遍并收集 PBS,每孔用 100 μ L 的 banding buffer 重悬细胞,加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光染色 1 h,上机前再加入 100 μ L 的 Banding buffer,筛网过滤后上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.4 RT-PCR 检测 IGF-1R 的表达 将对数生长期的细胞消化后接种于直径 10 cm 的 corning 培养皿中,加药处理细胞 48 h,收集细胞及上清液中的死细胞,用 Trizol 法提取总 mRNA,按逆转录试剂盒的步骤反转录成 cDNA 后,SYBR Green 染料法分析 IGF-1R 基因的表达。IGF-1R 及内参的引物序列为参照 Giusy 的文献^[5]。

2.5 Western blot 检测 Akt 和 Bcl-2 的表达 将对数生长期的细胞消化后接种于直径 10 cm 培养皿中,加药干预细胞 48 h 后,将死细胞和活细胞全部收集,RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min,12 000 r·min⁻¹,4 $^{\circ}$ C 离心 25 min,收集上清,蛋白定量,以每孔 50 μ g 蛋白上样蛋白电泳,转膜,封闭 1 h,一抗室温孵育 3 h,PBST 洗 4 遍,二抗孵育 1 h,PBST 洗 4 遍后,ECL 显影压片。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 莪术油对 saos-2 细胞的增殖抑制的影响 不同浓度的莪术油处理细胞后,saos-2 细胞均有不同程度的抑制,随着作用浓度的增大及作用时间的延长,其增殖抑制率也增大,呈现出一定的剂量依赖性和时间依赖性,与空白组相比差异极显著性($P < 0.01$)。见表 1。

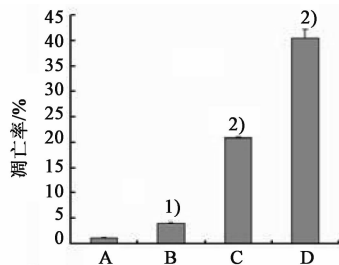
表 1 莪术油在不同时间对肺腺癌 saos-2 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of Curcumae Rhizoma oil on inhibition of lung adenocarcinoma saos-2 cells in different time ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
		A ₄₉₀	抑制率/%	A ₄₉₀	抑制率/%	A ₄₉₀	抑制率/%
空白	-	0.357 ± 0.018	-	0.598 ± 0.022	-	1.069 ± 0.090	-
	30	0.321 ± 0.012 ¹⁾	10.1	0.512 ± 0.016 ¹⁾	14.3	0.879 ± 0.052 ¹⁾	17.7
莪术油	60	0.294 ± 0.009 ¹⁾	17.8	0.362 ± 0.018 ¹⁾	39.5	0.479 ± 0.020 ¹⁾	55.2
	120	0.202 ± 0.010 ¹⁾	43.0	0.262 ± 0.010 ¹⁾	56.2	0.318 ± 0.012 ¹⁾	70.3

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 1~2 同)。

3.2 对 saos-2 细胞凋亡的影响 saos-2 细胞经莪术油处理后,流式细胞术的结果显示,莪术油处理骨肉瘤细胞 48 h 后,随着浓度的升高,凋亡率增加,4 组细胞的凋亡率分别为 1.1%, 4.1%, 24.9% 和 41.7%,尤其是早期凋亡的细胞增加明显 ($P < 0.01$)。见图 1。



A. 空白组; B. 莪术油 30 mg·L⁻¹组; C. 莪术油 60 mg·L⁻¹组; D. 莪术油 120 mg·L⁻¹组(图 2 同)

图 1 莪术油诱导骨肉瘤细胞 saos-2 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 1 Effects of Curcumaе Rhizoma oil on apoptosis of lung adenocarcinoma saos-2 cells($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.3 对 saos-2 细胞 IGF-1R, Akt 及 Bcl-2 表达的影响 莪术油处理 saos-2 细胞后,荧光定量的结果显示 IGF-1R mRNA 的表达随着莪术油浓度的升高而下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), Western blot 的结果显示 IGF-1R 的下游因子 Akt 及 Bcl-2 蛋白的表达均下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),且呈浓度依赖性。见图 2。

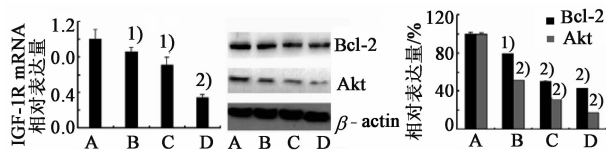


图 2 莪术油对 saos-2 细胞 IGF-1R, Akt 及 Bcl-2 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effects of Curcumaе Rhizoma oil on expressions of IGF-1R, Akt, Bcl-2 lung adenocarcinoma saos-2 cells($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

骨肉瘤的发病率,我国一直居于世界前列,好发于青少年及儿童,预后不良,目前在骨肉瘤的综合治疗中,药物治疗对于提高患者的生存率起着非常重要的作用^[6]。近年来,中药及其活性成分抗肿瘤作用研究进展迅速。莪术油是一种具有抗肿瘤活性的挥发油,通过抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤活性。有文献报道莪术油能够抑制乳腺癌和肺癌的生长增殖及诱导凋亡^[4],还可以增加鼻咽癌对化疗的敏感性^[7]。本实验结果表明,莪术油在体外能显著的抑制骨肉瘤细胞的增殖和诱导骨肉瘤细胞的凋亡,说明了莪术油具有显著的诱导骨

肉瘤细胞凋亡的作用。

大量证据表明 IGF-1R 在众多肿瘤中高表达,与恶性肿瘤的发生发展和转移浸润密切相关。实验及临床研究均证实,在一些肿瘤组织中 IGF-1R 是过表达的。有文献报道,与正常的癌旁组织相比,骨肉瘤的组织中 IGF-1R 的表达显著的增高^[2,8],因此抑制或者下调 IGF-1R 可以抑制骨肉瘤细胞的生长和增殖,促进肿瘤细胞的凋亡,针对 IGF-1R 的靶向治疗,有望成为骨肉瘤的治疗方法^[9]。IGF-1R 的活化会引起下游一系列的信号发生级联反应,其中包括了 PI3K/Akt 信号途径^[10]。本研究发现用莪术油处理骨肉瘤 saos-2 细胞后,IGF-1R 的表达显著下降,并且其下游信号通路蛋白 Akt 和 Bcl-2 的表达也显著下降,其抑制作用呈浓度依赖性。因此笔者推测莪术油的抗骨肉瘤的作用可能与其抑制了 IGF-1R 的表达,进而抑制了 Akt 和 Bcl-2 的活性有关。本研究仅在体外探讨了莪术油对 saos-2 细胞 IGF-1R, Akt 及 Bcl-2 表达水平影响,其抗骨肉瘤的作用还需进行深入研究。

[参考文献]

- [1] 牛晓辉,徐海荣.骨肉瘤的化疗[J].中国癌症杂志, 2010,20(2): 81-85.
- [2] 牛晓辉,徐海荣.骨肉瘤的化疗进展[J].中国癌症杂志, 2012, 22(9): 663-668.
- [3] 杨长福,李亚东,牛建昭.莪术油对肺腺癌 A549 细胞周期及组织蛋白酶 K 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2010,16(8): 113-115.
- [4] Giusy Di Conza, Marianna Buttarelli, Olimpia Monti, et al. IGF-1R/MDM2 relationship confers enhanced sensitivity to RITA in ewing sarcoma cells [J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(6): 1247-1256.
- [5] 杨周萍,臧林泉,黄婕,等.芹菜素抗肺癌 SPC_A1 细胞增殖和诱导凋亡作用[J].中国实验方剂学杂志, 2010, 20(1): 115-118.
- [6] 仇志强,廖琦.骨肉瘤治疗的研究进展[J].中国修复重建外科杂志, 2010, 24(12): 1469-1475.
- [7] 吴冬梅,杨荣宁.莪术油对鼻咽癌 CNE_2 细胞的凋亡及放疗增敏机制的影响[J].肿瘤防治杂志, 2008, 35(11): 778-782.
- [8] Kang H G, Jenabi J M, Liu X F, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor I receptor by epigallocatechin gallate blocks proliferation and induces the death of Ewing tumor cells [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(5): 1396-1407.
- [9] Larsson O, Girmital A, Girmita L. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer [J]. British J Cancer, 2005, 92(12): 2097-2101.
- [10] Valenciano A, Henríquez Hernández L A, Moreno M, et al. Role of IGF-1 receptor in radiation response [J]. Transl Oncol, 2012, 5(1): 1-9.

[责任编辑 周冰冰]