

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.003

蛇床子素促进人骨肉瘤细胞株 SAOS-2 凋亡 *

吕怡凝^{1,2} 刘天华¹ 彭燕丽¹ 刘真宏¹ 王璐¹ 单宏丽^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学药理教研室 黑龙江 哈尔滨 150081; 2 哈尔滨市社会保险事业管理局医院 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:观察蛇床子素(osthole)对人骨肉瘤细胞 SAOS-2 增殖和凋亡的影响及潜在的调控机制。**方法:**采用 MTT 法、TUNEL 染色技术和流式细胞术检测不同浓度蛇床子素对骨肉瘤细胞凋亡的影响;Western blot 检测蛇床子素对骨肉瘤细胞中与细胞凋亡密切相关的蛋白(Bax、Bcl-2)的变化。**结果:**蛇床子素作用于 SAOS-2 细胞后,MTT 结果显示 SAOS-2 细胞的活力受到明显抑制,且与蛇床子素浓度和时间相关;Western blot 结果显示细胞中的促凋亡蛋白 Bax 表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显减弱,且呈剂量依赖性。**结论:**蛇床子素可显著抑制人骨肉瘤细胞的增殖且促进其凋亡的作用,可能与上调凋亡蛋白 Bax 和下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关。

关键词:蛇床子素;人骨肉瘤细胞;细胞凋亡

中图分类号:R285.5;R738 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)11-2012-04

Osthole Promotes the Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line SAOS-2*

LV Yi-ning^{1,2}, LIU Tian-hua¹, PENG Yan-li¹, LIU Zhen-hong¹, WANG Lu¹, SHAN Hong-li^{1Δ}

(1 Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

2 The Hospital of Harbin Social Insurance Administration, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects induced by osthole on the proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell line SAOS-2 and the involved control mechanism. **Methods:** After SAOS-2 cells were incubated with different concentrations of osthole, apoptosis of SAOS-2 cells was detected by MTT, TUNEL and flow cytometry assays. The expression of apoptosis associated proteins (Bax and Bcl-2) was determined by Western blot. **Results:** The results of MTT showed that osthole inhibited the vitality of SAOS-2 cells in a dose-and time-dependent manner. The results of Western blot showed that osthole up-regulated the expression of apoptotic protein Bax remarkably, but decreased the level of anti-apoptotic protein Bcl-2 significantly. Moreover, the regulation on Bax and Bcl-2 protein were associated with the dose of osthole. **Conclusion:** Osthole inhibits proliferation and promotes cell apoptosis in SAOS-2 cells. The up-regulation of apoptotic protein Bax and down-regulation of anti-apoptotic protein Bcl-2 may be involved in the osthole induced apoptosis in SAOS-2 cells.

Key words: Osthole; Human Osteosarcoma Cells; Cell Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): R285.5; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2012-04

前言

骨肉瘤又称为成骨肉瘤,是一种常见于在 20 岁以下的儿童和青少年的原发性恶性肿瘤,特点是恶性程度高、转移早、预后差。尽管近年来随着新的化疗药物的发展,患者的生存率有了提高,然而现有的化疗药物不良反应明显,给患者造成疾病之外的二次伤害。因此,研究发现新的治疗效果好、毒副作用低的药物成为治疗骨肉瘤研究的热点。蛇床子素又名甲氧基欧芹酚,是伞形科一年生草本植物蛇床 *Cnidium monnieri*(L.)的果实,是一种天然香豆素类化合物衍生物。已经有研究报道蛇床子素具有抗炎^[1]、抗氧化^[2]、抗糖尿病^[3]和抗肿瘤^[4]的作用,且可以促进骨形成和骨吸收,减少骨丢失,从而抑制骨质疏松^[5,6]。既往研究显示许多香豆素类化合物在肺癌 A549、皮肤癌 A375、乳腺癌 MCF-7、肝癌 HSCs 和白血病 HL-60 具有细胞毒作用^[7-11],

而关于蛇床子素对抗骨肉瘤 SAOS-2 的作用研究较少。本研究主要探讨了蛇床子素对人骨肉瘤细胞凋亡的作用,以期蛇床子素应用于治疗人骨肉瘤提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

骨肉瘤细胞系 SAOS-2 来源于中国北京细胞资源中心,细胞培养用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 RPMI1640 培养基,培养条件为 5% CO₂ 和 37℃。

1.2 MTT 实验

取对数生长期的单层贴壁细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,制备成约 5×10⁵/L 的细胞悬液,在 96 孔板中,每孔加入 200 μL 细胞悬液,待细胞贴壁后,将其分为 6 组(以蛇床子素终浓度命名):0、25、50、100、150、200 μM,每个组

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(QC2016120)

作者简介:吕怡凝(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:心血管药理学,E-mail:lyn29899188@126.com

Δ 通讯作者:单宏丽(1972-),女,博士生导师,教授,主要研究方向:心血管药理学,E-mail:492867473@qq.com,电话:045186671354

(收稿日期:2016-06-28 接受日期:2016-07-25)

设置 16 个复孔,按照实验分组给药操作完成后,轻轻晃动 96 孔板,使药物均匀分布,之后将 96 孔板置入培养箱中,分别孵育 12、24 和 48 小时后,每孔中分别加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT,避光情况下培养箱内孵育 4 小时。然后,弃去培养液,每孔中加入 150 μL 的 DMSO,避光情况下置于室温的摇床上低速震荡 10 分钟。接下来,将其置于酶标仪 OD 值 490 nm 测量各孔的吸光值。每组实验重复 3 次。

1.3 TUNEL 检测细胞凋亡

取对数生长期的单层贴壁细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,制备成约 $5 \times 10^7/\text{L}$ 的细胞悬液,在 24 孔板中,每孔加入 500 μL 细胞悬液,待细胞贴壁后,按照之前的实验分组进行实验处理。待处理时间结束,弃培养基,用 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗清洗 3 次,每次 10 min。接着按照试剂盒说明进行 TUNEL 实验,在显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的单层贴壁细胞,用 0.25%不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,制备成浓度约为 $1 \times 10^6/\text{L}$ 细胞悬液。加入 400 μL AnnexinV 结合液悬浮细胞,并在细胞悬浮液中加入 5 μL AnnexinV-FITC 染色液,在冰上避光孵育 15 min,之后再加入 10 μL PI 染色液轻轻混匀,避光孵育 5 min,最后立即用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5 Western Blotting 检测蛋白表达

人骨肉瘤 SAOS-2 细胞在蛇床子素处理 24 h 后,实验用碧云天公司的 Western blot 细胞裂解液,按照说明书收集蛋白样品,在收集的蛋白样品中加入适量浓度的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。再在 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min,使蛋白变性后,然后进行 SDS-PAGE 电泳,此实验重复 3 次。一抗:Bax(1:1000)、Bcl-2(1:1000)和 GAPDH(1:200000)购自 proteintech 公司,二抗:兔源性多克隆(1:10000)和鼠源性多克隆(1:10000)购自 proteintech 公司。

1.6 统计学分析

利用 IBM SPSS Statistics19 软件对数据进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较采用方差分析,两组间比较采用

SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蛇床子素抑制人骨肉瘤细胞 SAOS-2 增殖

用 0、25、50、100、150、200 μM 浓度的蛇床子素作用于 SAOS-2 细胞 12、24 和 48 小时后,MTT 结果显示随剂量和时间的增加,蛇床子素对骨肉瘤细胞 SAOS-2 活力的抑制作用逐渐增强,说明蛇床子素抑制骨肉瘤的作用具有剂量、时间依赖性,24 小时 IC_{50} 为 95 μM ,见图 1。

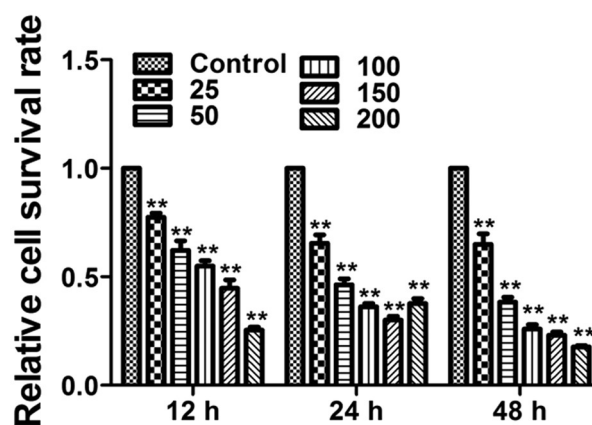


图 1 蛇床子素对骨肉瘤 SAOS-2 细胞活力的影响

以 0 μM 蛇床子素处理骨肉瘤 SAOS-2 细胞 12 小时、24 小时、48 小时的活力作为阴性对照组($n=10$, ** $P < 0.01$ vs. Control)

Fig.1 Effects of osthole on the cell viability of osteosarcoma SAOS-2 cells The groups which were treated with osthole at 0 μM for 12 h, 24 h and 48 h respectively were used as control accordingly.($n=10$, ** $P < 0.01$ vs. Control.)

2.2 蛇床子素促进人骨肉瘤细胞 SAOS-2 凋亡

荧光显微镜下,凋亡的细胞被染成绿色或黄绿色,蓝色为细胞核 (TUNEL 用来检测凋亡过程中细胞核 DNA 的断裂情况,正常细胞几乎没有 DNA 断裂)。与对照组相比,150 μM 的蛇床子素处理 SAOS-2 细胞后凋亡的细胞数量明显增加。

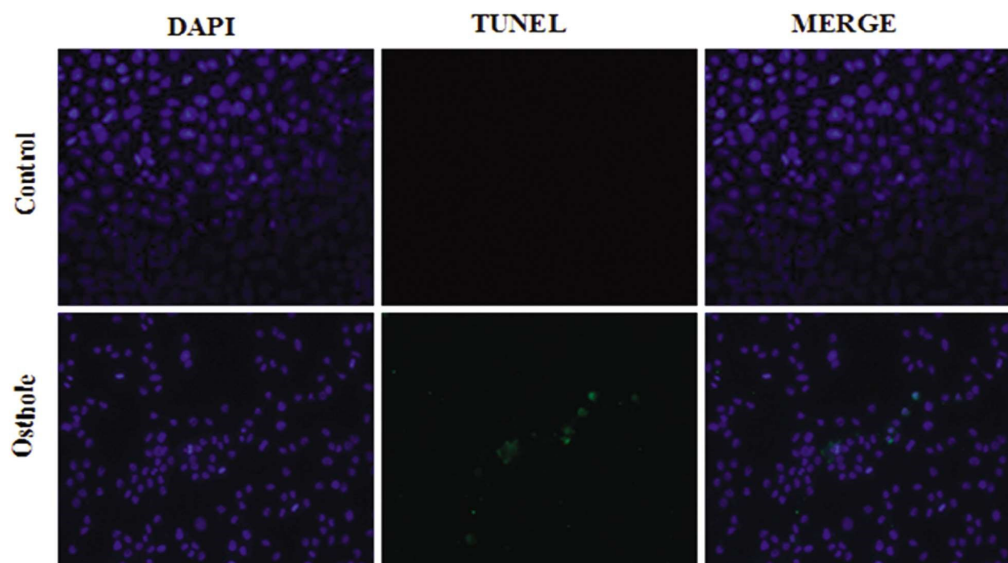


图 2 TUNEL 实验检测蛇床子素诱发骨肉瘤细胞的凋亡情况

Fig.2 Effects of osthole on the apoptosis in osteosarcoma cells detected by TUNEL assay

分别以 0、50、100、150 μM 蛇床子素作用于骨肉瘤细胞 24 小时后，流式细胞术测得骨肉瘤细胞的凋亡率分别为 $19.28 \pm 4.1\%$ 、 $35.63 \pm 3.5\%$ 、 $55.47 \pm 3.5\%$ 、 $74.93 \pm 2.5\%$ ，且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。

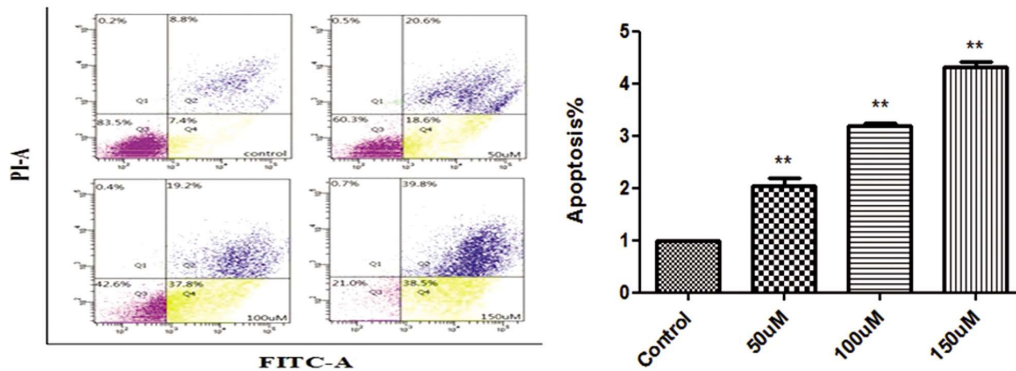


图 3 流式细胞术检测蛇床子素诱发骨肉瘤细胞凋亡

所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示。 ($n=3$, $**P < 0.01$ vs. Control.)

Fig.3 Effects of osthole on the apoptosis in osteosarcoma cells detected by flow cytometry

Data was expressed as mean $\pm$ SD. ($n=3$, $**P < 0.01$ vs. Control.)

2.3 蛇床子素对凋亡相关蛋白(Bcl-2 和 Bax)表达的影响

如图 4 所示：以 0、50、100、150 μM 的蛇床子素处理骨肉瘤 SAOS-2 细胞 24 小时后，应用蛋白印迹检测骨肉瘤细胞中

Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况。结果显示，与对照组相比，蛇床子素可以下调 Bcl-2 蛋白，上调 Bax 蛋白，且呈剂量依赖性。

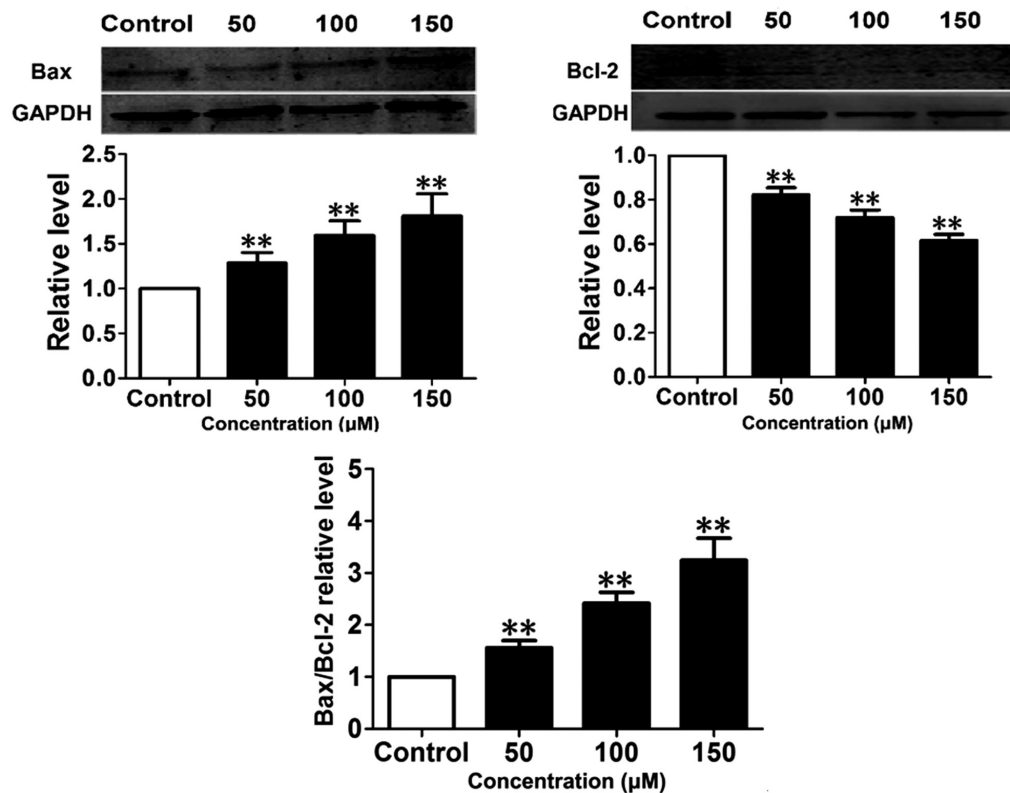


图 4 蛇床子素对骨肉瘤细胞中 Bcl-2 和 Bax 影响情况

所有数据以 GAPDH 为内参，以均数 $\pm$ 标准差表示。 ($n=7$ for Bax, $n=5$ for Bcl-2, $**P < 0.01$ vs. Control.)

Fig.4 Effect of osthole on expression of Bcl-2 and Bax in osteosarcoma cells

Quantitative assay was performed with GAPDH as an internal control. Data was expressed as mean $\pm$ SD normalized to Ctl. ($n=7$ for Bax, $n=5$ for Bcl-2, $**P < 0.01$ vs. Control.)

3 讨论

草本植物提供了具有众多生物学功能的化学物质。在这些植物化学物质中，香豆素在抗氧化、酶抑制和抗肿瘤等方面都

具有重要的生物化学作用^[12]。最近的研究表明从蛇床子果分离出来的甲氧基欧芹酚(osthole)、异欧前胡素(isoimperatorin)、氧化前胡素(oxypeucedanin)、邪蒿素(braylin)四种化合物中，甲氧基欧芹酚和异欧前胡素在抑制人上皮癌细胞增长上其抑制作

用最强,甲氧基欧芹酚对白血病细胞系有最强的细胞毒作用^[13],对 PC3 细胞的细胞毒作用反应也较明显^[14]。这些研究结果表明蛇床子素(osthole)在抗肿瘤增殖方面有重要作用。在本研究中,MTT 实验结果显示蛇床子素对骨肉瘤 SAOS-2 细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖性,提示蛇床子素可能具有抗骨肉瘤的作用。

诱导细胞凋亡而不是细胞坏死是抗肿瘤药的一个重要特征。细胞凋亡是受基因调控的程序性死亡^[15,16],而细胞坏死人们通常认为是细胞死亡的一个偶然发生事件,可以通过细胞程序性调控机制发生和调控的^[17-21],并且细胞坏死通常伴随炎症的发生,因此更多了解药物启动或抑制细胞凋亡有助于揭示许多疾病发生的机制^[7,8,12,22]。所以,在接下来的实验中,我们检测了蛇床子素(osthole)诱导细胞凋亡的能力及与凋亡相关的关键蛋白,结果显示蛇床子素促骨肉瘤细胞 SAOS-2 凋亡的作用呈剂量依赖性。

Bcl-2 家族在调控细胞凋亡上是一个重要组成部分,该家族既可抑制细胞凋亡又可促进细胞凋亡^[23]。在细胞凋亡早期中,Bax 和 Bcl-2 通过影响线粒体的通透性发挥抗凋亡或是促凋亡作用。这是由于线粒体膜的通透性可以影响线粒体膜外的可溶性物质释放进入细胞液的过程,进而影响细胞凋亡^[24]。本研究结果显示蛇床子素(osthole)在骨肉瘤 SAOS-2 细胞中可以上调 Bax 的表达,同时下调 Bcl-2 的表达,因此蛇床子素(osthole)可能通过线粒体机制诱导 SAOS-2 细胞凋亡。

综上所述,蛇床子素可显著抑制人骨肉瘤细胞的增殖且促进其凋亡的作用,可能与上调凋亡蛋白 Bax 和下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关。

参考文献(References)

- [1] Li F, Gong Q, Wang L, et al. Osthole attenuates focal inflammatory reaction following permanent middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2012, 35(10): 1686-1690
- [2] Zhang J, Xue J, Wang H, et al. Osthole improves alcohol-induced fatty liver in mice by reduction of hepatic oxidative stress[J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(5): 638-643
- [3] Liang H J, Suk F M, Wang C K, et al. Osthole, a potential antidiabetic agent, alleviates hyperglycemia in db/db mice[J]. Chemico-biological interactions, 2009, 181(3): 309-315
- [4] Ding D, Wei S, Song Y, et al. Osthole exhibits anti-cancer property in rat glioma cells through inhibiting PI3K/Akt and MAPK signaling pathways [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2013, 32 (6): 1751-1760
- [5] Li X X, Hara I, Matsumiya T. Effects of osthole on postmenopausal osteoporosis using ovariectomized rats; comparison to the effects of estradiol [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25 (6): 738-742
- [6] Ming L G, Zhou J, Cheng G Z, et al. Osthol, a coumarin isolated from common cnidium fruit, enhances the differentiation and maturation of osteoblasts in vitro[J]. Pharmacology, 2011, 88(1-2): 33-43
- [7] Yoo S W, Kim J S, Kang S S, et al. Constituents of the fruits and leaves of *Euodia daniellii*[J]. Archives of pharmacological research, 2002, 25 (6): 824-830
- [8] Bhattacharyya S S, Paul S, De A, et al. Poly (lactide-co-glycolide) acid nanoencapsulation of a synthetic coumarin: cytotoxicity and bio-distribution in mice, in cancer cell line and interaction with calf thymus DNA as target [J]. Toxicology and applied pharmacology, 2011, 253 (3): 270-281
- [9] Liao P C, Chien S C, Ho C L, et al. Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF- κ B, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2010, 58 (19): 10445-10451
- [10] Shin E, Lee C, Sung S H, et al. Antifibrotic activity of coumarins from *Cnidium monnieri* fruits in HSC-T6 hepatic stellate cells [J]. Journal of natural medicines, 2011, 65(2): 370-374
- [11] Murata T, Itoigawa M, Ito C, et al. Induction of apoptosis in human leukaemia HL-60 cells by furanone-coumarins from *Murraya siamensis*[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2008, 60(3): 385-389
- [12] Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents [J]. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents, 2005, 5(1): 29-46
- [13] Yang L L, Wang M C, Chen L G, et al. Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines [J]. Planta medica, 2003, 69(12): 1091-1095
- [14] Hu Y, Wen Q, Liang W, et al. Osthole reverses beta-amyloid peptide cytotoxicity on neural cells by enhancing cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2013, 36(12): 1950-1958
- [15] Fylaktakidou K C, Hadjipavlou-Litina D J, Litinas K E, et al. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities [J]. Current pharmaceutical design, 2004, 10 (30): 3813-3833
- [16] Coti K K, Belowich M E, Liang M, et al. Mechanised nanoparticles for drug delivery[J]. Nanoscale, 2009, 1(1): 16-39
- [17] Sadraei Y S, Sajjadi S E, M Mozafari H. Antispasmodic effects of *Prangos ferulacea* acetone extract and its main component osthole on ileum contraction [J]. Research in pharmaceutical sciences, 2012, 8 (2): 137-144
- [18] Shokoohinia Y, Sajjadi S E, Gholamzadeh S, et al. Antiviral and cytotoxic evaluation of coumarins from *Prangos ferulacea* [J]. Pharmaceutical biology, 2014, 52(12): 1543-1549
- [19] Twomey J D, Kim S R, Zhao L, et al. Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells[J]. Drug Resistance Updates, 2015, 19: 13-21
- [20] Rakotoarison O, Rabenau I, Lobstein A, et al. Vasorelaxing properties and bio-guided fractionation of *Cedrelopsis grevei* [J]. Planta medica, 2003, 69(2): 179-181
- [21] Xie L, Takeuchi Y, Cosentino L M, et al. Anti-AIDS Agents. 37. 1 Synthesis and Structure-Activity Relationships of (3'R, 4'R)-(+)-cis-Khellactone Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents [J]. Journal of medicinal chemistry, 1999, 42(14): 2662-2672
- [22] Sadraei H, Shokoohinia Y, Sajjadi S E, et al. Antispasmodic effect of osthole and *Prangos ferulacea* extract on rat uterus smooth muscle motility[J]. Research in pharmaceutical sciences, 2012, 7(3): 141-149
- [23] Porichi O, Nikolaidou M E, Apostolaki A, et al. BCL-2, BAX and P53 expression profiles in endometrial carcinoma as studied by real-time PCR and immunohistochemistry [J]. Anticancer research, 2009, 29(10): 3977-3982
- [24] Chen W, Zhao Z, Li L, et al. Hispolon induces apoptosis in human gastric cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 45(1): 60-72