

槲皮素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞体外增殖与凋亡的影响

孙南阳¹, 符芳姿², 谭江波³

- (1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙, 410005;
2. 中南大学湘雅医学院附属海口医院, 海南 海口, 570208;
3. 湖南师范大学附属湘东医院, 湖南 株洲, 412200)

[摘要] 目的: 观察槲皮素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和凋亡的影响。方法: 不同浓度的槲皮素作用于体外培养的 MG-63 细胞, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测槲皮素对 MG-63 细胞增殖的抑制能力, 流式细胞术 (FCM) 检测槲皮素对 MG-63 细胞凋亡的影响。结果: 槲皮素可显著抑制 MG-63 细胞增殖, 具有明显剂量和时间依赖性; 槲皮素可明显诱导 MG-63 细胞凋亡。结论: 槲皮素能够抑制 MG-63 细胞增殖, 诱导 MG-63 细胞凋亡。

[关键词] 槲皮素; 人成骨肉瘤 MG-63 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.09.071

Effect of quercetin on in vitro proliferation and apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells

SUN Nan-yang¹, FU Fang-zi², TAN Jiang-bo³

- (1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China;
2. Haikou Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, Hainan, China;
3. Xiangdong Hospital Affiliated to Hunan Normal University, Zhuzhou 412200, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of quercetin on in vitro proliferation and apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells. Methods: Different concentrations of quercetin were used for in vitro culture of MG-63 cells. MTT assay was used to assess the inhibitory effect of quercetin on the proliferation of MG-63 cells, and flow cytometry was used to evaluate the effect of quercetin on the apoptosis of MG-63 cells. Results: Quercetin significantly inhibited the proliferation of MG-63 cells in a dose- and time-dependent manner. It also induced the

同时本研究也为后续探讨月华丸 (胶囊) 是否通过影响巨噬细胞的自噬发挥抗结核的作用提供了一定的前期实验支撑, 其具体机制和可能途径还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吴恩强, 陈江平, 池宏亮. 我国肺结核患者治疗效果的影响因素分析[J]. 临床合理用药, 2016, 9(11A): 111-112.
- [2] 李文红, 王芳, 付莹, 等. 肺结核药物性肝损伤的相关因素分析[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(11): 2097-2100.
- [3] 苏建华, 屠德华, 刘剑君. X线片检查对考核肺病六个月短程化疗效果的评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 18(3): 173-174.
- [4] 张伯礼, 薛博瑜. 中医内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 56.
- [5] 李飞. 方剂学 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 936.
- [6] 胡东, 王婉, 赵润鹏, 等. 结核分枝杆菌分泌性酸性磷酸酶 (SapM) 抑制小鼠巨噬细胞自噬[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(6): 726-729.
- [7] 秦欢, 高绍莹, 袁建波, 等. 结核分枝杆菌小分子热休克蛋白 16.3 蛋白的原核表达及功能检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(5): 480-484.

- [8] 郑钰晖. 中医药治疗肺结核的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 29(9): 98-99.
- [9] 万轲. 左氧氟沙星和利福平治疗初治肺结核的临床疗效比较[J]. 中国医学创新, 2012, 9(23): 51-52.
- [10] 杨彩娥, 王琰, 雷红, 等. 结核分枝杆菌利福平依赖株与耐药株的耐药状况比较[J]. 中国防痨通讯, 2011, 33(3): 163-165.
- [11] 钱继伟. 肺结核中医治疗研究进展[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2011, 28(1): 71-73.
- [12] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 219.
- [13] 许济群, 王绵之. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 28.
- [14] 孟繁荣, 谢贝, 刘志辉. 巨噬细胞对结核分枝杆菌免疫反应的研究进展[J]. 现代医院, 2013, 13(12): 10-13.
- [15] Ponpuak M, Deretic V. Autophagy and p62/sequestosome 1 generate neo-antimicrobial peptides (cryptides) from cytosolic proteins[J]. Autophagy, 2011, 7(3): 336-337.
- [16] 胡少婷, 李升锦, 黄秦. 髓样分化因子 88 抑制剂 ST2825 对重组耻垢分枝杆菌感染 THP-1 细胞自噬的影响[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(6): 562-564, 572.

(收稿日期: 2018-03-26)

第一作者: 孙南阳, 男, 医学硕士, 医师, 研究方向: 骨科疾病的中医药防治

通讯作者: 谭江波, 男, 硕士研究生在读, 主治医师, 研究方向: 恶性肿瘤的中医药防治

apoptosis of MG-63 cells. Conclusion: Quercetin can inhibit the proliferation of MG-63 cells and induce the apoptosis of MG-63 cells.

Key words: quercetin; human osteosarcoma MG-63 cell; cell proliferation; cell apoptosis; experimental study

骨肉瘤是一种儿童及青少年最常见的恶性骨肿瘤,其特征是肿瘤细胞为未成熟骨或骨样组织,好发于股骨、胫骨、肱骨等四肢长骨的干骺端生长板^[1]。目前常规的化疗药物均为细胞毒性药物,毒副作用大^[2]。因此寻找低毒的抗骨肉瘤药物具有重要的临床意义。

槲皮素作为一种天然黄酮类化合物,广泛存在于多种中药中,如三七、款冬花、高良姜、桑寄生等。目前研究表明,槲皮素具有防治动脉硬化^[3]、抗抑郁^[4]、抗阿尔茨海默病^[5]、抗糖尿病^[6]和抗高血压^[7]等多种生物学功能。近年,槲皮素抗肿瘤作用倍受关注,有研究证实槲皮素能抑制多种肿瘤细胞的增殖和诱导凋亡,是目前已知的最强的中药抗癌有效成分之一。但其在人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖与凋亡方面作用的研究尚未见文献报道。

本研究以人成骨肉瘤 MG-63 细胞为研究对象,采用体外实验初步探索槲皮素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和凋亡的影响,从而为槲皮素治疗骨肉瘤的临床应用及其作用机制提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人骨肉瘤 MG-63 细胞株(美国 ATCC 细胞库)。培养基 DMEM(Gibco 公司),并加入 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)、青链霉素双抗混合液(北京中杉公司),在 5% CO₂ 孵育箱内 37℃ 恒温培养,细胞每隔 4~5d 传代 1 次。

1.2 试剂 槲皮素(纯度>98%,成都普菲德生物技术有限公司),二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),MTT 试剂盒(武汉锐博生物),细胞凋亡检测试剂盒(Sigma 公司)。

1.3 MTT 测定检测细胞活性 将细胞以 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔培养板,待细胞贴壁后 24h 弃细胞上清,每孔分别加入相当于 0、50、100、150、200 和 250 μg/mL 槲皮素,0.1% DMSO 作为对照组。在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24、48、72h 后各孔分别加入终浓度为 5mg/mL 的 MTT 10 μL,继续于培养箱中培养 4h 后弃去上清,每孔加 150 μL DMSO,震荡 10min 后,用全自动酶标仪在波长 490nm 测吸光度(A)值,计算生长抑制率。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的人骨肉瘤 MG-63 细胞以 4×10⁴/mL 的细胞密度接种于 6 孔培养板中,每孔 2mL,待细胞贴壁后弃去培养液后加入 2mL 含不同浓度槲皮素(100、150、200 μmol/L)的含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液,以 0 μmol/L 浓度组为对照组。处理细胞 72h 后,收集上清中细胞,胰酶消化贴壁的细胞,离心(1000rpm 5min)收集每组细胞,PBS 洗 1 次后用 400 μL buffer 重悬细胞,取 100 μL 细胞悬液于 1.5mL 离心管中,加入 5 μL Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)后轻轻摇匀,室温避光孵育 15min,每 5min 用移液枪轻轻吹打混匀,加入 400 μL buffer 在 1h 内上流式细胞仪检测。

1.5 统计学方法 统计分析运用 SPSS 22.0 软件或 Graph-Pad Prism 5.0 进行。所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,将需要进行分析的 2 组先进行方差齐性检验,若方差齐,按等方差双样本检验得到 T-Test 值;若方差不齐,则按异方差双样本检验得到 T-Test 值。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

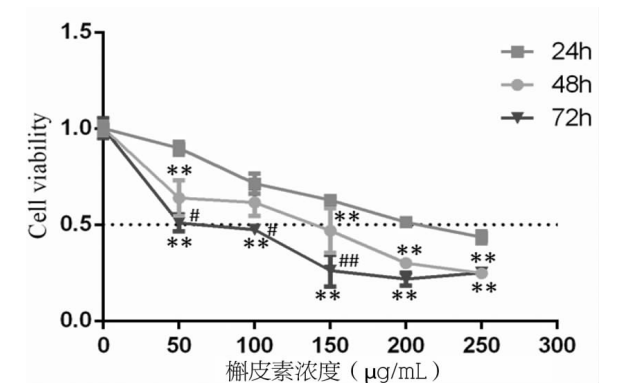
2.1 槲皮素对 MG-63 细胞增殖的影响 如表 1 所示,MTT 实验结果显示,各时间点槲皮素干预组(50、100、150、200、250 μg/mL)均显著抑制骨肉瘤 MG-63 细胞活力,且随着槲皮素浓度的增加,骨肉瘤 MG-63 细胞活力呈现出逐渐下降趋势,表明槲皮素浓度依赖性抑制骨肉瘤 MG-63 细胞活力。

如图 1 中可知,各浓度槲皮素干预组随时间抑制骨肉瘤 MG-63 细胞活力呈逐渐增强。除 100 μg/mL 槲皮素干预组在 24h 与 48h 之间、200 μg/mL 和 250 μg/mL 槲皮素干预组在 48h 与 72h 之间比较,差异无统计学意义,余各浓度槲皮素干预组间存在统计学差异。根据以上结果,选择 150、200 和 250 μg/mL 槲皮素处理 48h 进行下一步实验。

表 1 各时间点不同浓度槲皮素对 MG-63 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

槲皮素浓度 (μg/mL)	24h	48h	72h
0	1.000 ± 0.031	1.001 ± 0.023	1.001 ± 0.041
50	0.897 ± 0.027 ^a	0.638 ± 0.075 ^b	0.509 ± 0.035 ^b
100	0.714 ± 0.042 ^b	0.615 ± 0.057 ^b	0.474 ± 0.008 ^b
150	0.628 ± 0.014 ^b	0.469 ± 0.095 ^b	0.262 ± 0.067 ^b
200	0.512 ± 0.006 ^b	0.300 ± 0.006 ^b	0.218 ± 0.027 ^b
250	0.435 ± 0.026 ^b	0.248 ± 0.008 ^b	0.253 ± 0.007 ^b

注:与 0 μg/mL 槲皮素组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。



注:采用两因素方差分析进行统计学分析,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ vs. 24h;[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ vs. 48h; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 1 不同浓度槲皮素对 MG-63 细胞在 24、48 和 72h 之间活力的差异

2.2 槲皮素对骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响 与 DMSO

组比较,槲皮素各干预组可显著增加骨肉瘤 MG-63 细胞早期凋亡,且呈剂量依赖性。200 $\mu\text{g/mL}$ 和 250 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素干预组可显著减少骨肉瘤 MG-63 活细胞。值得注意的是,200 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素干预组能显著增加骨肉瘤 MG-63 细胞的晚期凋亡和坏死,而且该组的骨肉瘤 MG-63 活细胞比例较其它干预组更低。(见表 2、图 2)

表 2 细胞凋亡情况($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	活细胞	早期凋亡细胞	晚调 and 坏死细胞
DMSO 组	3	76.8 $\pm$ 2.73	5.8 $\pm$ 0.9	15.8 $\pm$ 1.8
100 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素组	3	66.3 $\pm$ 4.28	13.2 $\pm$ 1.4 ^a	18.4 $\pm$ 5.6
200 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素组	3	28.3 $\pm$ 3.45 ^b	18.2 $\pm$ 1.8 ^b	52.3 $\pm$ 5.5 ^b
250 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素组	3	30.6 $\pm$ 4.47 ^b	35.4 $\pm$ 4.3 ^b	32.9 $\pm$ 8.8

注:与 DMSO 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

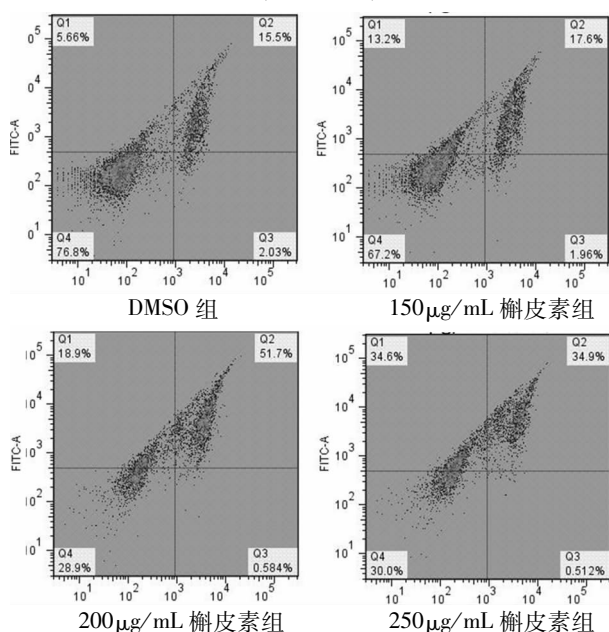


图 2 各组细胞凋亡图

3 讨 论

肿瘤的发生发展主要表现为肿瘤细胞不受控制地过度增殖和凋亡抑制^[8]。因此,抑制肿瘤细胞增殖,诱导其细胞凋亡是目前肿瘤临床治疗的主要策略之一。本研究拟通过观察槲皮素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和凋亡的影响,初步阐明槲皮素抗人成骨肉瘤的机制。

抑制肿瘤细胞的增殖对治疗癌症有至关重要的作用,近年来研究发现槲皮素能够有效抑制多种癌细胞增殖,如槲皮素对胃癌 SGC-7901 细胞^[9]、乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞^[10]、结肠癌 SW480 细胞^[11]等恶性肿瘤细胞的增殖有显著的抑制作用,并呈明显的时间和浓度依赖性。本实验结果显示,槲皮素对 MG-63 细胞也有明显的增殖抑制作用,且此作用具有浓度和时间依赖性。

凋亡是多细胞生物体发生程序性细胞死亡的过程^[12]。化疗药物主要通过诱导细胞凋亡来杀死癌细胞。本次实验过程中,我们发现槲皮素处理后的 MG-63 细胞,其流式结果显示 FITC 标记阳性、碘化丙啶染色阴性的早凋亡细胞显

著增加,这表明槲皮素诱导骨肉瘤 MG-63 细胞的早期凋亡。槲皮素在其他细胞系也同样被证实具有促凋亡生物活性,如罗进勇等^[13]研究发现槲皮素可通过上调促凋亡蛋白 p53,下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 来促使肺腺癌 A549 细胞发生细胞凋亡;刘义锋课题组证实,槲皮素能降低 STAT3 磷酸化,进而阻断 STAT 通路来促进胶质瘤干细胞发生凋亡^[14];马建勋等^[15]发现,槲皮素能降低线粒体膜电位,进而诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞发生凋亡。本实验中,槲皮素诱导的骨肉瘤 MG-63 细胞的早期凋亡,可能涉及以上机制,需下一步实验进一步完善证明。

总之,本研究发现槲皮素能够抑制 MG-63 细胞增殖,促进其凋亡从而发挥其抗肿瘤的作用,为槲皮素临床治疗骨肉瘤提供了一定的实验基础。

参考文献

- [1] Moore DD, Luu HH. Osteosarcoma [J]. Cancer Treat Res, 2014 (162): 65-92.
- [2] Zhou W, Hao M, Du X, et al. Advances in targeted therapy for osteosarcoma [J]. Discov Med, 2014, 17(96): 301-307.
- [3] 刘亮, 高超, 姚平, 等. 槲皮素对动脉粥样硬化小鼠自噬蛋白表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3): 539-542.
- [4] 刘健翔, 方吟荃, 魏峥曦, 等. 槲皮素与贯叶连翘提取物合用抗抑郁作用初步研究 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2013, 42(6): 615-619.
- [5] 李永金, 顾振纶, 陈月芳, 等. 槲皮素对阿尔茨海默病大鼠学习记忆影响及与海马细胞凋亡关系的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(7): 59-62.
- [6] 侯晓敏, 秦小江. 槲皮素通过激活 Kv1.5 保护糖尿病大鼠冠脉损伤 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(10): 1442-1445.
- [7] 侯国军, 秦小江, 侯晓敏, 等. 槲皮素对肾性高血压大鼠的降压作用及机制研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(2): 137-139.
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [9] 耿威, 仇慧颖, 李林, 等. 槲皮素对胃癌细胞增殖及侵袭的调控作用及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(1): 34-36.
- [10] 李世正, 李昆, 张俊华, 等. 槲皮素在人乳腺癌细胞中抑制增殖和诱导凋亡的作用 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2009, 16(2): 124-128.
- [11] 林增海, 马涛, 孟勇. 槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞增殖的抑制作用 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(5): 699-701.
- [12] Boehm I. Apoptosis in physiological and pathological skin: implications for therapy [J]. Curr Mol Med, 2006, 6(4): 375-394.
- [13] 罗进勇, 李林, 尹一兵. 槲皮素对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 重庆医学, 2005, 34(4): 551-552.
- [14] 刘义锋, 张保朝, 温昌明, 等. 槲皮素通过 STAT 通路抑制胶质瘤干细胞增殖促进其凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2017(5): 657-662.
- [15] 马建勋, 田宏伟, 李安强, 等. 槲皮素诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008(23): 1792-1795.

(收稿日期: 2018-05-22)