

# 雷公藤甲素抗骨肉瘤细胞的实验研究

石倩玮 李曙光 李俊 凌昌全

**摘要 目的** 观察雷公藤甲素体内、外抗骨肉瘤效应,探索相关分子机制。**方法** 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测雷公藤甲素对骨肉瘤细胞的生长抑制效应,流式细胞异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(FITC/PI)双染法检测细胞凋亡,Western blot 检测相关信号蛋白表达情况,裸鼠荷骨肉瘤模型验证雷公藤甲素抗骨肉瘤的体内效应,免疫组织化学法(IHC)检测瘤体内相关蛋白表达情况。**结果** 雷公藤甲素能够显著抑制多种骨肉瘤细胞的增殖,并且能够诱导其发生凋亡;激活线粒体相关信号通路;显著抑制骨肉瘤在裸鼠体内生长,并检测到细胞凋亡现象。**结论** 雷公藤甲素通过激活线粒体相关凋亡信号通路,诱导骨肉瘤细胞发生凋亡,并且抑制其在裸鼠体内生长。

**关键词** 雷公藤甲素;骨肉瘤;细胞凋亡

Anti-tumor Effects of Triptolide on Osteosarcoma Cells *in vitro* and *in vivo*: an Experimental Research SHI Qian-wei, LI Shu-guang, LI Jun, and LING Chang-quan Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai (200433), China

**ABSTRACT Objective** To observe *in vitro* and *in vivo* effects of triptolide on growth inhibition and apoptosis of osteosarcoma cells, and to further explore its correlated molecular mechanisms. **Methods** The growth inhibition effects of triptolide on osteosarcoma cells were detected using MTT assay. The apoptosis was detected using flow cytometry. The protein expressions of associated signals were detected using Western blot. The *in vivo* anti-osteosarcoma effects of triptolide were verified in osteosarcoma nude mice. The *in vivo* associated protein expressions were detected using immunohistochemistry (IHC). **Results** Triptolide could significantly inhibit the proliferation of various osteosarcoma cells. Besides, it could induce their apoptosis. Triptolide triggered the mitochondrial dependent apoptotic pathway, significantly inhibited the *in vivo* growth of osteosarcoma cells, and caused *in vivo* apoptosis. **Conclusions** Triptolide induced apoptosis of osteosarcoma cells partially through activating mitochondria associated apoptosis signal pathway. Triptolide also induced apoptosis of osteosarcoma cells and inhibited their *in vivo* growth in nude mice.

**KEYWORDS** triptolide; osteosarcoma; apoptosis

骨肉瘤是常见的骨源性肿瘤,好发于儿童和青少年,病死率和致残率很高<sup>[1]</sup>。虽然通过新辅助化疗结合手术治疗,使其预后有较大改善,但骨肉瘤经手术治疗 3 年后仍有 30% ~ 40% 的复发率<sup>[1]</sup>。目前临床常规使用的化疗药物,如甲氨喋呤、顺铂等易产生耐药性且毒副反应较多<sup>[2]</sup>,因此,开发新的化疗药物对骨肉瘤的治疗具有重要意义。雷公藤甲素作为传统中药雷公藤的主要活性物质,近年来受到的重视程度逐年增高,其抗肿瘤的活性已成为了研究的热点之一,但是关于雷公藤甲素抗骨肉瘤活性的作用及其具体机制目前鲜有报道。为观察雷公藤甲

素的抗骨肉瘤效应并探讨相关机制,我们进行了相关实验研究,现报告如下。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 药物 雷公藤甲素(triptolide) 分子式  $C_{20}H_{24}O_6$ , 分子量 360.39, 纯度大于 98%, 购自 Sigma 公司(批号:048k1186)。异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(FITC/PI)双标凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物。一抗抗 Bcl-2/Bax/Caspase-3 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,置 -20℃ 冰箱保存。

1.2 细胞 人骨肉瘤细胞 MG 63 和 U2OS 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;SD 大鼠骨肉瘤细胞 UMR-106 由第四军医大学附属唐都医院骨肿瘤研究所馈赠,源于美国麻省总医院。此 3 种细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81073106)

作者单位:第二军医大学长海中医医院(上海 200433)

通讯作者:凌昌全, Tel:021-81871551, E-mail:lingchangquan

@hotmail.com

胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、完全饱和湿度条件下常规培养。

1.3 动物 BALB/c 裸鼠, 4 ~ 6 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 雄性, 18 只购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物合格证号: SCHG(沪)2007-0005。在第二军医大学动物实验中心无特殊病原菌条件下分笼饲养, 自由觅食、饮水。

## 2 方法

2.1 雷公藤甲素对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法。每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板中, 每孔体积 100  $\mu$ L, 24 h 后以不同浓度雷公藤甲素刺激细胞, 在培养指定时间结束前 4 h 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)10  $\mu$ L, 继续孵育 4 h, 终止培养, 平板离心机离心后(1 000 r/min, 5 min), 小心吸弃孔内上清液, 每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜(DMSO), 放置摇床 10 min 使结晶物充分溶解, 在全自动酶标仪(EXL800) 490nm 波长测定各孔光密度(OD)值。

2.2 细胞早期凋亡检测 细胞凋亡采用 FITC/PI 双标法检测。以不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化并收集细胞于流式管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清以 1 mL 预冷的 PBS 洗涤 3 遍, 向各管细胞中加入 Binding buffer 500  $\mu$ L 和 FITC 标记的膜联蛋白(FITC-Annexin V)荧光染料 5  $\mu$ L, 振荡混匀后, 避光反应 5 min, 向各管内再加入 PI 荧光染料 5  $\mu$ L, 振荡混匀, 流式细胞仪上机检测细胞荧光信号。采用 CellQuest 软件计算 FITC 染色阳性且 PI 染色阴性细胞(即早期凋亡细胞)比例。

2.3 裸鼠骨肉瘤生长的抑制情况 参照文献[3]。选取裸鼠右侧肩胛骨外缘皮下注射约  $10^7$  个 UMR-106 细胞, 待肿瘤长至约 0.5cm  $\times$  0.5cm 时开始进行腹腔注射给药。将裸鼠分为分溶剂对照组、阴性对照组、给药组共 3 组, 每组 6 只。溶剂对照组腹腔

注射 DMSO, 阴性对照组腹腔注射灭菌磷酸盐缓冲液(PBS), 给药组每天腹腔注射雷公藤甲素 0.4  $\mu$ L/kg。每天 1 次, 5 天为 1 个疗程, 给药 2 个疗程。给药结束次日处死裸鼠, 取材。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析, 所有计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较先行方差齐性检验, 方差齐者进行单因素方差分析, 实验前后比较采用 *t* 检验; 方差不齐者进行非参数检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1 雷公藤甲素对骨肉瘤细胞增殖抑制作用(图 1) 雷公藤甲素能够显著抑制 MG63、U2OS 及 UMR-106 细胞的增殖, 并且该增殖抑制效应呈浓度依赖, IC<sub>50</sub> 值约 100nmol/L。

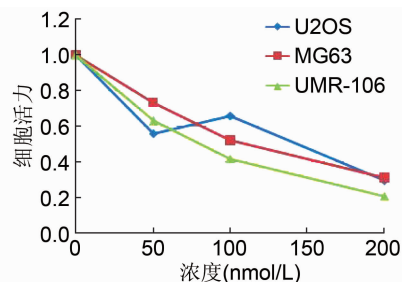


图 1 雷公藤甲素对多种骨肉瘤细胞增殖的影响

2 雷公藤甲素对骨肉瘤细胞 UMR-106 的诱导凋亡作用(图 2) 分别用 0、100、200 nmol/L 雷公藤甲素处理 UMR-106 细胞 48 h 后, 收集细胞, Annexin V-FITC/PI 双染, 上机检测细胞凋亡。流式细胞仪结果表明, 随着药物浓度的增加, 当浓度升至 200nmol/L 早期凋亡细胞(十字叉右下角细胞群)超过细胞总数的 30%, 细胞凋亡率也相应增加, 最高可达到 33.77%。高、低浓度给药组与溶剂对照组比较, 差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

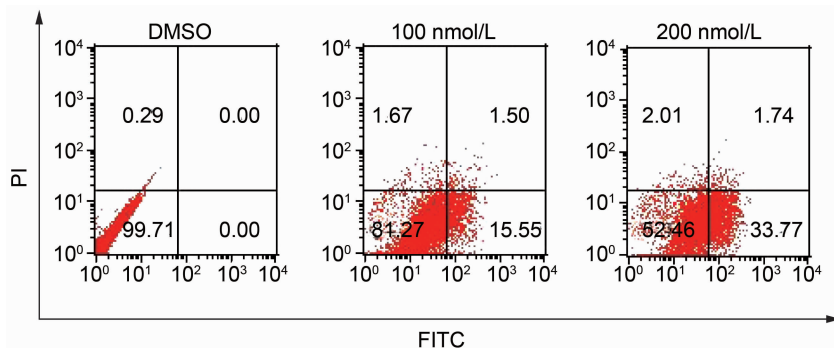


图 2 雷公藤甲素诱导 UMR-106 细胞发生凋亡

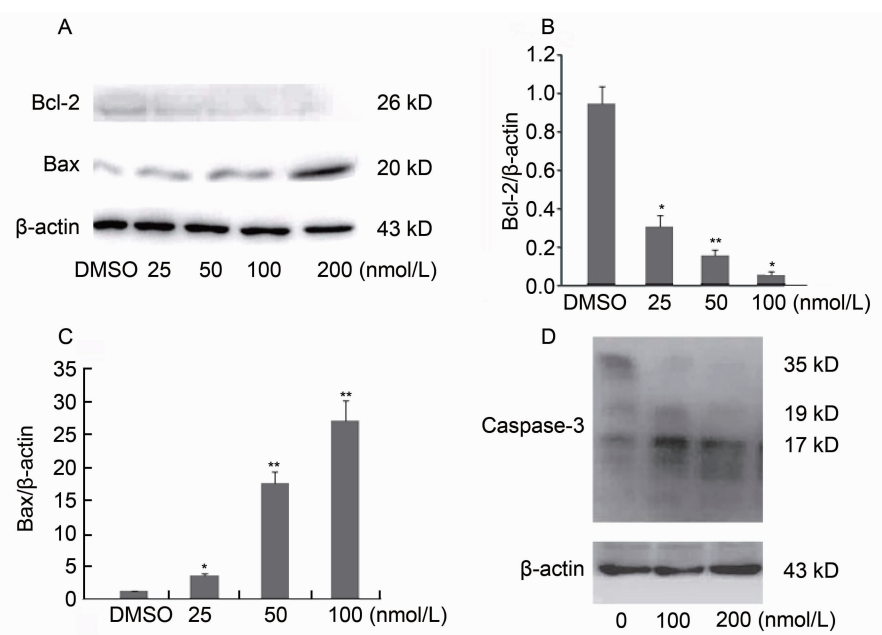
3 雷公藤甲素对凋亡相关信号通路的调节作用(图 3) Western blot 结果表明,随着雷公藤甲素浓度的增加,在 UMR-106 细胞中, **Caspase-3** 剪切体和 **Bax** 的表达水平逐渐增高, **Caspase-3** 前体和 **Bcl-2** 的表达水平逐渐降低,并呈一定的浓度依赖性。

4 雷公藤甲素对裸鼠骨肉瘤种植瘤的生长抑制作用(图 4) 与溶剂对照组比较,给药组骨肉瘤瘤体显著缩小,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

5 雷公藤甲素调节裸鼠瘤体内相关信号蛋白的表达(图 5) 免疫组织化学检测表明,雷公藤甲素能够上调 **Bax**,同时下调 **Bcl-2** 在骨肉瘤组织内的表达;原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测表明,雷公藤甲素能够诱导骨肉瘤细胞在裸鼠体内发生凋亡。

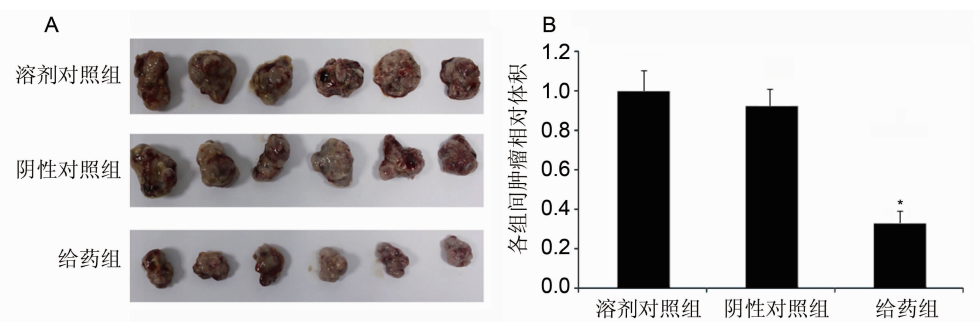
讨 论

骨肉瘤好发于青少年,为高度恶性肿瘤,易发生转移,病死率较高。虽然通过新辅助化疗结合手术治疗,使其预后有较大改善,5 年生存率由 20 世纪 70 年代末的 10% 左右上升到如今的 60% 左右,但近 30 多年间,骨肉瘤经手术治疗 3 年后有 30% ~ 40% 的复发率,尽管进行了多种努力,一直未能取得较大进展<sup>[1]</sup>。目前临床常规使用的化疗药物,如甲氨蝶呤、顺铂等易产生耐药性且毒副反应较多<sup>[2]</sup>。因此,寻找新的化疗药物对骨肉瘤的治疗将具有重要意义。雷公藤甲素作为传统中药雷公藤的主要活性物质,近年来受到的重视程度逐年增高<sup>[4]</sup>,其抗肿瘤的活性已成为了研究的热点之一。研究发现,雷公藤甲素体内体外可诱导多



注:A 为蛋白电泳结果;B 为各组间 **Bcl-2** 特异性条带平均灰度值;C 为各组间 **Bax** 特异性条带平均灰度值;与溶剂对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;D 为雷公藤甲素对 **Caspase-3** 蛋白剪切的影响

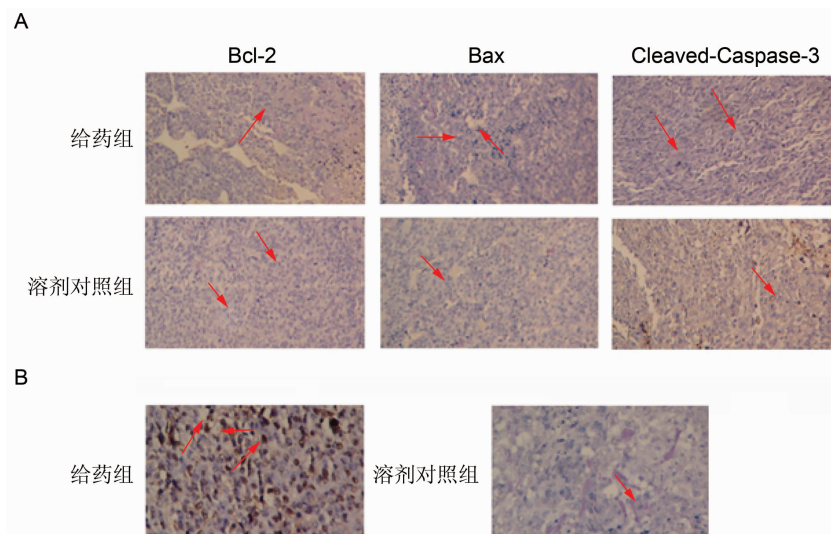
图 3 雷公藤甲素激活线粒体相关信号通路



注:A 为各组裸鼠骨肉瘤瘤体照片;B 为各组间骨肉瘤瘤体平均体积比值;与溶剂对照组比较, \* $P < 0.01$

图 4 各组裸鼠骨肉瘤瘤体抑制情况比较





注:A 为给药组和溶剂对照组裸鼠瘤体内免疫组织化学检测结果(NBT/BCIP 染色,  $\times 200$ ),检测了 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 剪切体蛋白表达情况;B 为给药组和溶剂对照组裸鼠瘤体内 TUNEL 检测结果(DAB 染色,  $\times 400$ ),显示给药组裸鼠瘤体内肿瘤细胞发生显著凋亡

图5 雷公藤甲素调节裸鼠瘤体内相关信号蛋白表达

种肿瘤细胞凋亡<sup>[5-9]</sup>,可关于雷公藤甲素抗骨肉瘤活性的作用及其具体机制,目前鲜有报道。实验采用不同浓度的雷公藤甲素作用于骨肉瘤 UMR-106 细胞,发现其能明显抑制骨肉瘤 UMR-106 细胞的体外增殖,其抑制作用呈一定的时间—剂量依赖性。同时,形态学上的观察结果和流式细胞仪分析证实了雷公藤甲素可诱导 UMR-106 细胞凋亡。为探讨雷公藤甲素诱导 UMR-106 细胞凋亡的可能机制,实验中采用 Western blot 法分析了其对 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达的影响。Caspase 家族一般以酶原的形式存在,它的激活是细胞发生凋亡途径中最关键的步骤之一<sup>[10]</sup>。Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的成员,它能够特异地裂解大量底物,使细胞发生生化及形态上的改变,并最终导致细胞凋亡<sup>[11, 12]</sup>。此外,Bcl-2 和 Bax 皆为 Bcl-2 家族成员,其中 Bcl-2 是公认最强的抗凋亡因子,而 Bax 是促凋亡因子。Bcl-2 和 Bax 互相拮抗,其 Bax/Bcl-2 比率在诱导细胞凋亡中同样起着关键的作用<sup>[13]</sup>。Bax/Bcl-2 比率的升高能激活 Caspase-3,因此和 Caspase 家族密切相连,共同促进细胞凋亡<sup>[14]</sup>。我们用不同浓度的雷公藤甲素处理 UMR-106 细胞 48 h 后,发现 UMR-106 细胞中 Caspase-3 蛋白发生了活化,而且 Bax/Bcl-2 比率也相应增高,并呈一定的浓度依赖性。由此可见,Caspase 家族介导的凋亡途径可能在雷公藤甲素诱导骨肉瘤细胞凋亡过程中发挥了重要的作用。综上所述,雷公藤甲素可诱导骨肉瘤细胞发生凋亡,其诱导凋亡作用与上调 Bax/Bcl-2 比率,

激活 Caspase 级联反应有关。因此,雷公藤甲素作为一种传统中药提取物,在骨肉瘤化疗中可能蕴含着很大潜能,值得进一步研究和开发。

## 参 考 文 献

- [1] Fagioli F, Biasin E, Mereuta OM, et al. Poor prognosis osteosarcoma: new therapeutic approach [J]. Bone Marrow Transplant, 2008, 41 (Suppl 2): S131-S134.
- [2] Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6(7): 1075-1085.
- [3] Matsui Y, Watanabe J, Ikegawa M, et al. Cancer-specific enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity with triptolide through an interaction of inactivated glycogen synthase kinase-3 $\beta$  with p53 [J]. Oncogene, 2008, 27(33): 4603-4614.
- [4] Xu LQ, Li XF, Zhang YW, et al. Effects of Chinese herbal medicine Yiqi Huayu Recipe on apoptosis of dorsal root ganglion neurons and expression of Caspase-3 in rats with lumbar nerve root compression [J]. J Chin Integr Med, 2010, 8(12): 1174-1179.
- [5] Zhu W, Ou Y, Li Y, et al. A small-molecule triptolide suppresses angiogenesis and invasion of human anaplastic thyroid carcinoma cells via down-regulation of the nuclear factor-kappa B pathway

- [J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(4): 812-819.
- [6] Chen YW, Lin GJ, Chia WT, et al. Triptolide exerts anti-tumor effect on oral cancer and KB cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Oral Oncol, 2009, 45(7): 562-568.
- [7] Mujumdar N, Mackenzie TN, Dudeja V, et al. Triptolide induces cell death in pancreatic cancer cells by apoptotic and autophagic pathways [J]. Gastroenterology, 2010, 139(2): 598-608.
- [8] Kim MJ, Lee TH, Kim SH, et al. Triptolide inactivates Akt and induces Caspase-dependent death in cervical cancer cells via the mitochondrial pathway [J]. Int J Oncol, 2010, 37(5): 1177-1185.
- [9] Liu Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(3): 377-383.
- [10] Mao WJ, Chen L, Yang CX, et al. Effects of triptolide-mediated serum on secretion function of adrenocortical cells isolated from rats [J]. J Chin Integr Med, 2010, 8(6): 562-567.
- [11] Meng XW, Fraser MJ, Feller JM, et al. Caspase-3 activates endo-/exonuclease: further evidence for a role of the nuclease in apoptosis [J]. Apoptosis, 2000, 5(3): 243-254.
- [12] Demelash A, Karlsson JO, Nilsson M, et al. Selenium has a protective role in Caspase-3-dependent apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in primary cultured pig thyrocytes [J]. Eur J Endocrinol, 2004, 150(6): 841-849.
- [13] Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death [J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 395-419.
- [14] Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8): 1339-1350.

(收稿:2012-05-30 修回:2012-12-30)

## · 征订启事 ·

### 《Chinese Journal of Integrative Medicine》

(中国结合医学杂志,英文版)

《Chinese Journal of Integrative Medicine》(中国结合医学杂志,英文版)是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊,旨在促进结合医学及替代医学的国际交流,及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、短篇交流、病例报告、综述、中西药相互作用、政策法规、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录,如:Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/MEDLINE、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Medica (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于2007年被SCI-E收录。根据2012年6月29日汤姆森公司公布的2011年期刊引证报告,本刊影响因子为0.799。2010年10月1日与汤森路透集团签约,正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

《Chinese Journal of Integrative Medicine》为大16开本,铜版纸印刷,彩色插图,2011年改为月刊,80页,国内定价为40.00元/期,全年定价:480.00元。国际标准刊号:ISSN 1672-0415,国内统一刊号:CN 11-4928/R,国内邮发代号:82-825,海外发行由Springer公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京海淀区西苑操场1号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827,62876547,62876548;传真:010-62874291;E-mail: cjim\_en@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn/english/index.asp>。