

羊齿天门冬根茎提取物对人骨肉瘤细胞增殖的抑制作用*

瞿家权¹, 石 莺¹, 贾 薇¹, 张永东², 钟 飞¹

(1. 吉首大学医学院病理学教研室, 湖南吉首 416000; 2. 吉首大学附属第一医院, 湖南吉首 416000)

摘要:目的 探讨羊齿天门冬根茎提取物对人骨肉瘤细胞增殖的影响及其分子机制。方法 MTT 法检测羊齿天门冬根茎提取物对人骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖和生长的影响; 平板集落形成法检测羊齿天门冬根茎提取物对细胞锚定依赖性生长的影响; 碘化丙啶单染流式细胞仪检测细胞周期分布改变; Western blot 检测环氧化酶 2(COX-2) 蛋白表达水平改变。结果 羊齿天门冬根茎乙酸乙酯部位(AF-A)对 Saos-2 细胞具有细胞毒作用(IC₅₀ 值为 26.7 μg/mL); AF-A 对 Saos-2 细胞锚定依赖性生长具有抑制作用, 呈剂量相关性(P<0.05); AF-A(30.0、100.0 μg/mL)处理 Saos-2 细胞 48 h 后, 细胞 S 期百分比分别为(43.7±2.5)%和(51.9±1.9)%, 与对照组(31.8±4.8)%比较差异有统计学意义(P<0.05); 不同浓度 AF-A 均能抑制 Saos-2 细胞 COX-2 蛋白水平表达。结论 AF-A 对人骨肉瘤细胞增殖和生长具有抑制作用, 其机制可能与诱导人骨肉瘤细胞 S 期阻滞和抑制 COX-2 蛋白水平表达有关。

关键词: 百合科; 乙酸乙酯部位; 骨肉瘤; 细胞增殖; 环氧化酶 2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.02.026

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)02-0203-03

Inhibitory effect of extracts from asparagus filicinus rhizome on proliferation of human osteosarcoma cells*

Qu Jiaquan¹, Shi Ying¹, Jia Wei¹, Zhang Yongdong², Zhong Fei¹

(1. Department of Pathology, Medical College of Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China;

2. First Affiliated Hospital of Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of extracts from asparagus filicinus rhizome on proliferation of human osteosarcoma Saos-2 cells and its molecular mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the cytotoxic activity and growth inhibition of three different extracts from asparagus filicinus rhizome against Saos-2 cells; plate colony formation assay was performed to detect active fraction of asparagus filicinus rhizome on the anchorage dependent growth of Saos-2 cells; the cell cycle alteration was determined by propidium iodide staining and flow cytometry analysis; the alteration of protein expression level of COX-2 was determined by using Western blotting. **Results** Ethyl acetate fraction of asparagus filicinus rhizome(AF-A) exerted the potent cytotoxicity on Saos-2 cells(IC₅₀ = 26.7 μg/mL); AF-A induced the inhibitory effect on the anchorage dependent growth of Saos-2 cells in a dose dependent manner(P<0.05); Saos-2 cells treated by AF-A at the concentration of 30.0 and 100.0 μg/mL for 48 h induced the increase of percentages of S phase from(31.8±4.8)% in the control group to(43.7±2.5)% and(51.9±1.9)%, the difference showing statistical significance(P<0.05). Western blotting showed that AF-A at different concentrations decreased COX-2 protein expression. **Conclusion** AF-A possesses the inhibitory effect on the proliferation and growth of human osteosarcoma cells in vitro, and its mechanism might be associated with the induction of S phase arrest and the inhibition of COX-2 protein expression level.

Key words: liliaceae; ethyl acetate fraction; osteosarcoma; cell proliferation; cyclooxygenase 2

百合科植物羊齿天门冬是湘西地区较常的药用植物, 通常以其块根入药, 为常见百合科植物天门冬的伪品, 故俗称大天冬或小百部^[1]。新近研究提示, 羊齿天门冬总皂苷部位对肺癌和乳腺癌细胞系均具有明显的生长抑制作用^[2], 而其甾体皂苷部位具有明显的抗炎镇痛作用^[3]。环氧化酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2) 不仅是抗炎镇痛药物的主要分子靶标, 而且与人骨肉瘤细胞的增殖、侵袭、转移能力密切相关^[4]。因此, 作者采用抗肿瘤药物体外筛选模型对羊齿天门冬抗骨肉瘤活性部位进行定向筛选, 并检测不同浓度的羊齿天门冬块根活性部位对人骨肉瘤细胞增殖和生长的影响, 初步探讨羊齿天门冬有效部位抑制人骨肉瘤细胞的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 羊齿天门冬根茎药材为购于湖南省武陵山医药公司, 经吉首大学医学院附属医院副主任中药师张永东鉴定为羊齿天门冬干燥根茎。羊齿天门冬根茎药材粉碎后, 加 10 倍量 90% 乙醇在室温下回流浸提 3 次, 每次滤过 4 h, 合并浸提液, 减压回收黄褐色乙醇初提取物(ethanol extract from asparagus filicinus, AF-E)。浓缩液分别用石油醚和乙酸乙酯萃取, 回收溶剂分别获得淡黄色结晶石油醚部位(petroleum ether fraction from asparagus filicinus, AF-P)和淡黄色结晶乙酸乙酯部位(ethyl acetate fraction from asparagus filicinus, AF-A), 含生药 2.45 g/100 g。各部位提取物用二甲基亚砜(DMSO)溶解后, 经 0.45 μm 无菌滤器过滤, 配制成母液浓度分别为 300.0 和 1 000.0 μg/mL 溶液, -20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 细胞 人骨肉瘤细胞系 Saos-2 购自中南大学湘雅实

* 基金项目: 湖南省卫生计生厅科研课题资助(B2011-070); 吉首大学校级科研课题资助(11JD047)。作者简介: 瞿家权(1982-), 讲师, 在读博士, 主要从事抗肿瘤药物筛选和机制的研究。

验中心,用含 12%胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,约 2~3 d 传代 1 次,待细胞进入对数生长期时,0.25%胰蛋白酶消化,细胞均匀悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS)中,记数并制成细胞悬液备用。

1.1.3 试剂 DMEM 培养基为 Gibco 公司产品,小牛血清为杭州四季青生物有限公司产品,胰蛋白酶和 RIPA 细胞裂解液购自碧云天生物技术研究所,流式细胞仪染色 Annexin-V-FITC 试剂盒购自美国 Beckman coulter 公司,顺氯氨铂(DDP)为齐鲁制药有限公司生产,噻唑蓝(MTT)、DMSO 均为美国 Sigma 公司产品, β -actin 和 COX-2 人单克隆抗体为上海翔升分装美国 Santa Cruz 公司产品。

1.1.4 仪器 倒置相差显微镜,日本 Olympus,CKX41 型; CO₂ 培养箱,日本三洋公司; 荧光显微镜,日本 Olympus; 酶标分析仪(EX-800 型),北京普朗新技术有限公司, DNM-9602 型。

1.2 方法

1.2.1 MTT 比色法 取对数生长期 Saos-2 细胞,以每孔 1×10^3 个细胞/180 μ L 接种于 96 孔培养板中,每孔分别加入 20 μ L 的 AF-E、AF-P 和 AF-A 工作液(浓度为 300 μ g/mL),使其终浓度分别为 1.0、3.0、10.0、30.0、100.0 μ g/mL,溶媒对照组每孔加入相同体积的终浓度为 0.02% DMSO 的完全培养基,采用顺氯氨铂(DDP)作为阳性对照组(终浓度为 3 μ g/mL); 每组设 5 个复孔,分别培养 12、24、48、72、96 h。每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 液 20 μ L,置培养箱中继续培养 4 h 后,弃上清液,每孔加入 DMSO 100 μ L,震荡 10 min,充分溶解紫蓝色沉淀物;酶标仪在 570 nm 波长测定吸光度值(A 值)。计算细胞增殖相对抑制率(IR), $IR = (1 - \text{实验组 A 均值} / \text{对照组 A 均值}) \times 100\%$,并按改良寇氏法计算出 AF-E、AF-P 和 AF-A 的 IC₅₀ 值,本实验重复 3 次。

1.2.2 平皿集落形成法 6 孔板中按 500 个/孔的细胞密度接种,培养基补齐液体为每孔 2 mL,置于细胞培养箱孵育,待接种细胞完全贴壁后,弃原有培养基。每组设 4 个复孔,每孔加入体积为 100 μ L,终浓度分别为 0.3、1.0、3.0、10.0、30.0、100.0 μ g/mL 的 AF-E、AF-P 和 AF-A 工作液(浓度为 300 μ g/mL),并以相同体积 PBS 作为对照组,DDP 作为阳性对照组(终浓度为 3 μ g/mL),最后用含 12%胎牛血清的 DMEM 培养基补足液量至 2 mL,静置培养,适时换液,2 周后终止培养。经吉姆萨(Giemsa)染色后,在倒置显微镜下($\times 40$)计数大于 50 个细胞的集落,计算平皿效率 = 每孔集落数目/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪检测 取对数生长期 Saos-2 细胞,计数 1×10^6 个细胞接种于 100 mL 培养瓶中,每组设置 3 次平行重复,待细胞完全贴壁后,换 3%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 12 h,终浓度分别为 1.0、10.0、30.0、100.0 μ g/mL 的提取物浓度分别处理细胞 6 h,常规 0.25%胰酶消化后收集各组细胞,PBS 洗涤 3 次后,以 4 ℃ 的 70%乙醇固定细胞 24 h 后,50 mg/L 的碘化丙啶染色计数后送流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 Western blot 检测 各处理组细胞,PBS 洗涤 3 次,加入 400~600 μ L RIPA 裂解缓冲液,于冰上裂解 30 min 后,4 ℃,10 000 \times g 离心 20 min,小心吸出上清液,BCA 法进行蛋白定量,常规煮沸变性 5 min,样品蛋白上样量为每泳道 20 μ g,6%和 10% SDS-PAGE 电泳(积层胶 80 V,分离胶 120 V)后,电转移(100 mA,1 h)至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭

2 h,孵一抗(1:200)4 ℃过夜,室温下孵二抗(1:3 000)1.5 h,加发光剂后,压片(5~10 min),显影定影(3~5 min),采用 alpha image 图像分析系统对胶片扫描分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据统计分析,各组实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 *t* 检验;多组均数之间比较采用单因素 ANOVA 方差分析,方差分析后采取 LSD-*q* 两两比较法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 羊齿天门冬根茎提取物对人骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖和生长的影响 MTT 比色法测定结果显示:AF-E、AF-P、AF-A 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖均具有抑制作用;3 种提取部位分别作用 Saos-2 细胞 48 h 的 IC₅₀ 值分别为 87.3、452.9、26.7 μ g/mL。AF-A 处理组(10.0、30.0、100.0 μ g/mL)对人骨肉瘤 Saos-2 细胞生长具有抑制作用,呈时间和剂量依赖性,见图 1。平皿集落形成率结果显示:AF-A 处理组(10.0、30.0、100.0 μ g/mL)对人骨肉瘤 Saos-2 细胞锚定依赖性生长具有显著的抑制作用,见图 2。

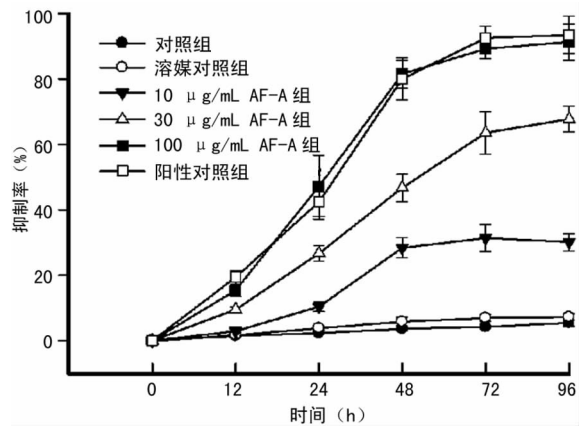


图 1 各组对人骨肉瘤 Saos-2 细胞生长曲线的影响

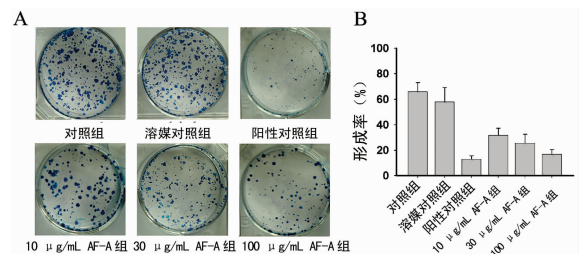


图 2 各组处理 Saos-2 细胞 48 h 后对平皿克隆效率的影响

表 1 各组处理 Saos-2 细胞 48 h 后对细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期分布(%)		
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照组	58.3 \pm 3.6	31.8 \pm 4.8	12.6 \pm 2.6
溶媒对照组	63.6 \pm 2.9	29.4 \pm 3.5	10.5 \pm 2.3
阳性对照组	43.8 \pm 6.5	47.7 \pm 4.3	8.8 \pm 3.2
10.0 μ g/mL AF-A 组	57.8 \pm 5.4	36.2 \pm 3.7	7.1 \pm 3.5
30.0 μ g/mL AF-A 组	47.9 \pm 4.7	43.7 \pm 2.5	9.7 \pm 3.2
100.0 μ g/mL AF-A 组	42.8 \pm 2.5	51.9 \pm 1.9	5.3 \pm 2.6

2.2 AF-A 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞周期的影响 采用 PI 单

染流式细胞术分析 10.0、30.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组、对照组、溶媒对照组(0.2% DMSO)、阳性对照组(DDP 浓度为 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞 48 h 后,各组 Saos-2 细胞周期分布变化情况:30.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组,阳性对照组(DDP 浓度为 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与对照组比较出现显著的 S 期阻滞,见表 1。

2.3 AF-A 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖抑制作用的分子机制

Western blot 胶片显示:10.0、30.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组与对照组比较,COX-2 的表达降低,见图 3。

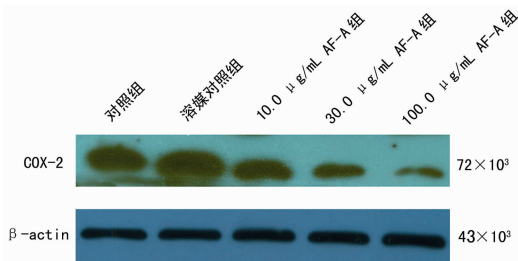


图 3 各组 COX-2 表达水平变化

3 讨论

我国具有悠久的天然植物药应用历史,天然植物的长期民间药用经验所提示的药效学作用值得借鉴,而依托我国丰富的天然药用植物资源,筛选具有开发前景的高效抗肿瘤候选药物实体或活性部位一直是我国抗肿瘤新药创制的重要前置策略^[5]。研究显示,从百合科天然植物筛选出的白藜芦醇^[6]、芦荟多糖、重楼提取物、大蒜素等单体或复合物均具有显著的抗肿瘤活性,并成为具有良好开发前景的抗肿瘤候选药。大天冬药材来源于百合科天门冬属植物羊齿天门冬的干燥块根,可能具有抗炎、镇痛、抗肿瘤的多重生物学活性^[1]。新近研究显示,COX-2 不仅与非甾体抗炎药的抗炎、镇痛作用相关,而且 COX-2 高表达与人骨肉瘤细胞增殖、侵袭、转移能力以及结肠癌 Dukes 分期、淋巴结转移的数目、患者生存期相关^[4,7]。因此,作者选择 COX-2 高表达的人骨肉瘤细胞系 Saos-2 作为受试对象,以聚酰胺柱层析法获得 AF-E、AF-P、AF-A,采用定向药效学方法筛选其抗肿瘤活性部位,并初步探讨羊齿天门冬根茎活性部位抗肿瘤的分子机制。

本研究结果显示:通过 MTT 抗肿瘤作用体外筛选发现,AF-A 具有较强抗人骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖作用,其 IC_{50} 为 26.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此研究提示,通过聚酰胺柱层析法和抗肿瘤药物体外模型筛选出的 AF-A 具有抗人骨肉瘤作用的活性部位,而 AF-E、AF-P 抗人骨肉瘤作用较弱。为了进一步证实 AF-A 的抗人骨肉瘤作用,作者采用 MTT 法检测不同浓度 AF-A 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞生长曲线的影响,结果显示,30.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组对人骨肉瘤 Saos-2 细胞生长具有显著抑制作用,100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组对人骨肉瘤 Saos-2 细胞生长曲线抑制作用与 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDP 处理组相当。此结果提示,AF-A 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞生长的抑制可能具有剂量和时间依赖性。平皿集落形成法检测结果显示,30.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组与对照组比较显著抑制人骨肉瘤 Saos-2 细胞锚定依赖性生长抑制作用($P < 0.05$)。PI 单染流式细胞术分析结果显示,30.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组主要使 Saos-2 细胞出现 S 期细胞周期阻滞。此结果提示,AF-A 可能通过影响细胞 S 期的生物

学功能而发挥抗肿瘤作用,其抗肿瘤分子机制与抑制 DNA 合成相关。细胞 S 期阻滞是抗肿瘤药物的重要细胞周期机制,周期非特异性抗肿瘤药(如烷化剂、铂剂、抗肿瘤抗菌药物)可作用于细胞 S 期,而抗代谢类药物(如嘧啶拮抗物、嘌呤拮抗物、叶酸拮抗物)主要抑制 DNA 合成作用使细胞发生 S 期阻滞。细胞 S 期阻滞可为细胞提供充足时间使受损 DNA 修复,而过度的 S 期阻滞则诱导细胞凋亡。研究报道证实,低浓度白藜芦醇诱导胃癌细胞发生 S 期阻滞,而高浓度白藜芦醇则无此效应^[8]。Western blot 检测结果显示,10.0、30.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF-A 组均显著抑制 COX-2 表达,呈浓度依赖性($P < 0.05$)。研究显示,选择性 COX-2 抑制剂(如美洛昔康、塞来昔布等)通过抑制 COX-2 而发挥骨肉瘤细胞增殖^[9-10]、侵袭和转移的抑制作用,其基本机制可能在于 COX-2 调控 p53 活性而抑制 DNA 损伤诱导的修复。结果提示,AF-A 可能通过抑制 COX-2 表达而抑制人骨肉瘤细胞,而 AF-A 抑制 COX-2 表达的活性组分和具体分子机制有待于进一步研究。

综上所述,本文通过采用体外抗肿瘤药物筛选模型对羊齿天门冬根茎提取物主要提取部位进行定向筛选,证实 AF-A 具有较强的抗人骨肉瘤细胞活性;AF-A 可能通过诱导细胞 S 期停滞,抑制 COX-2 表达而发挥抗肿瘤作用。

参考文献:

- [1] 陆连英. 天冬及其混伪品羊齿天门冬的比较鉴别[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 662.
- [2] 陶华明. 麻黄根及羊齿天门冬化学成分研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [3] 丁怡, 杨崇仁. 小百部的甾体皂甙成分[J]. 药学学报, 1990, 25(7): 509-514.
- [4] Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, et al. Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis[J]. Cancer Res, 2006, 66(13): 6657-6664.
- [5] 吴唐维, 宁勇, 陈卫群. 微 RNA 参与中药抗肿瘤作用的研究进展[J]. 重庆医学, 2013, 42(13): 1536-1538.
- [6] 唐春兰, 杨和平. 姜黄素抗肿瘤作用的分子生物学机制研究进展[J]. 重庆医学, 2006, 35(6): 555-557.
- [7] Yamac D, Celenkoclu G, Coskun U, et al. Prognostic importance of COX-2 expression in patients with colorectal Cancer[J]. Pathol Res Pract, 2005, 201(7): 497-502.
- [8] 李莹, 药立波, 王立峰, 等. 虎仗提取物白藜芦醇诱导胃癌细胞 HGC27 凋亡[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(19): 1797-1799.
- [9] 王秀清, 刘惠民, 郭梅艳, 等. 乳腺癌组织中 COX-2 与 MMP-2 的表达及其意义[J]. 重庆医学, 2011, 40(23): 2289-2290.
- [10] 廖化梅, 刘建. 环氧化酶-2 与雌、孕激素受体在子宫内膜癌中的表达及相关性研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(24): 2395-2397.