

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.35.002

白花蛇舌草对人骨肉瘤 MG-63 细胞 Bax 基因表达的影响*

黄煜朗¹, 唐毓金^{1,2Δ}, 王俊利³, 谢克恭², 黄可²(1. 广西医科大学研究生学院, 南宁 530021; 2. 右江民族医学院附属医院脊柱骨病外科, 广西百色;
3. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西百色 533000)

摘要:目的 探讨白花蛇舌草对人骨肉瘤 MG-63 细胞 Bax 基因表达的影响。方法 采用 MTT 法检测一定浓度白花蛇舌草注射液对 MG-63 细胞作用 6、12、24、48 h 后的细胞增殖抑制率, 实时荧光 PCR(RT-PCR)检测细胞内 Bax 基因的表达情况。结果 白花蛇舌草注射液能明显抑制 MG-63 细胞增殖, 浓度为 100 μL/mL 时, 随着作用时间的延长, Bax 基因表达明显升高($P < 0.05$)。结论 白花蛇舌草注射液可能通过上调 Bax 基因表达诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡。

关键词:白花蛇舌草; 骨肉瘤; Bax 基因

中图分类号: R273

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)35-4708-03

Effect of hedyotic diffusa willd injection on osteosarcoma MG-63 cells bax gene expression*

Huang Yulang¹, Tang Yujin^{1,2Δ}, Wang Junli³, Xie Kegong², Huang Ke²

(1. Graduate School, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Spinal Surgeon, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University, Baise, Guangxi 533000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hedyotic diffusa willd injection on osteosarcoma MG-63 cells Bax gene expression. **Methods** MTT was used to detect the inhibition rate of MG-63 cells by hedyotic diffusa willd injection after 6, 12, 24, 48 h certain concentration, RT-PCR was used to detect the intracellular expression of Bax gene. **Results** Hedyotic diffusa willd injection can significantly inhibit the proliferation of MG-63 cells, as the concentration was 100 μL/mL, Bax gene expression was significantly increased over time ($P < 0.05$). **Conclusion** Upregulating the expression of Bax gene by hedyotic diffusa willd injection can induced human osteosarcoma MG-63 cells apoptosis to death.

Key words: hedyotic diffusa willd; osteosarcoma; Bax gene

骨肉瘤是儿童与青少年常见的起源于间叶组织的恶性肿瘤。随着化学治疗、手术及骨重建等治疗手段的发展, 有资料显示目前 5 年总体生存率为 55%~75%^[1-2], 但仍是病死率极高的恶性肿瘤。因此, 研究新的抗肿瘤药并应用于临床是提高骨肉瘤疗效的重要途径之一。本试验通过测定白花蛇舌草注射液对骨肉瘤 MG-63 细胞 Bax 基因表达的影响, 为进一步开发白花蛇舌草抗骨肉瘤的药用价值奠定基础。

1 材料与方**1.1 材料**

1.1.1 细胞株 人骨肉瘤细胞株 MG-63 细胞为广西医科大学科学实验中心惠赠, 引自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药物与试剂 白花蛇舌草注射液购自安徽凤阳科苑药业有限公司(国药准字 Z34020595, 批号 120601); MTT、二甲亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司。胎牛血清、高糖 DMEM 培养基购自 Gibico 上海立菲生物技术有限公司; PBS(1×)、胰蛋白酶购自北京索莱宝公司; 细胞培养瓶、96 孔板、15 mL 离心管购自 Corning 公司; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; 引物合成由宝生物工程(大连)有限公司完成; 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; Marker I、2×Taq PCR MasterMix(KT201-01)、SYBR Green I 试剂盒购自 TianGen 公司; 8 联管

购自美国 Axygen 公司。

1.1.3 仪器 CO₂ 细胞培养箱 MCO-18AIC、超低温冰箱 MDF-U72V 购自日本 SANYO 公司; 生物安全柜 BHC-1300 II A/B3 购自苏净集团安泰公司; 电热恒温水槽 DK-8D 型购自上海精宏实验设备有限公司; 台式离心机购自上海安亭科学仪器厂; 酶标仪(Multiskan MK3 Thermo), PCR 仪(BIO-RAD), 倒置显微镜(Leica 型号 DMIL)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人骨肉瘤 MG-63 细胞接种于培养瓶, 加入体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(以下简称培养基)5 mL, 置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中常规培养, 每 2 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制 取对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后加培养基 5 mL 吹打成混悬液, 计数后调整细胞浓度, 取 150 μL(5×10³ 个)接种于 96 孔板。将白花蛇舌草注射液与培养基配制成 50、100、200、300、400 μL/mL 不同浓度含药液, 现配现用。待细胞贴壁后, 弃去培养基, 加入不同浓度的含药液, 并设空白对照组(只加相同量培养基), 每组 5 个复孔。培养 24 h 后, 加入 20 μL 的 5 mg/mL MTT, 继续培养 4 h 后弃去含药液, 加入 150 μL DMSO, 37 °C 恒温摇床震荡

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260315); 广西自然科学基金资助项目(2012GXNSFAA053169); 广西卫生厅医疗卫生重点科研课题(重 2010059); 广西中医药专项科技课题(GZPT1250、GZKZ1157、GZZC1177、GZZC1042)。作者简介: 黄煜朗(1986-), 硕士, 主要从事骨病临床研究。Δ 通讯作者, Tel: 15078685668; E-mail: tangyujin196709@163.com。

10 min,待结晶完全溶解后,在酶标仪上 492 nm 波长测定吸光度(A)值,取平均值,计算细胞抑制率。计算公式:细胞增殖抑制率(RI)=(对照组 A 值-药物组 A 值)/对照组 A 值×100%。

1.2.3 Bax 基因表达

1.2.3.1 总 RNA 提取 取对数生长期细胞,调整为 1×10^5 个/mL,接种于培养瓶,待细胞贴壁后加 100 μ L/mL 含药培养基 5 mL,分别培养 6、12、24、48 h,按照 Trizol 提取试剂说明书进行总 RNA 提取。紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,取 A_{260}/A_{280} 在 1.80~2.20 之间用于 RT-PCR。

1.2.3.2 cDNA 合成 参照逆转录试剂盒说明 SYBR Premix Ex Taq™ II (RR820A),将 RNA 逆转录成 cDNA。

1.2.3.3 RT-PCR 检测 参照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)(RR047A)试剂盒说明。25.0 μ L 反应体系包括 SYBR Permixon Ex Taq II 12.5 μ L,上下游目的及内参(β -actin)引物(表 1)各 0.5 μ L,cDNA 1.0 μ L,ddH₂O 10.5 μ L。将 25.0 μ L 体系设 3 个复孔,加入 8 联管中,使用 PCR 仪进行扩增,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,95 $^{\circ}$ C PCR 反应 5 s,63 $^{\circ}$ C 退火 30 s,共计 40 个循环的 PCR 反应,重复实验 3 次。反应结束后得到扩增曲线和溶解曲线,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值。

表 1 RT-PCR 引物

基因名称	引物
Bax	
上游引物	5'-GTG TGT GGA GAG CGT CAA CC-3'
下游引物	5'-AAA AGC CAC CCC ACT TCT CT-3'
β -actin	
上游引物	5'-ATC CCA GCC TCC GTT ATC CT-3'
下游引物	5'-GAC CAA AAG CCT TCA TAC ATC TCA-3'

1.3 统计学处理 使用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量

资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

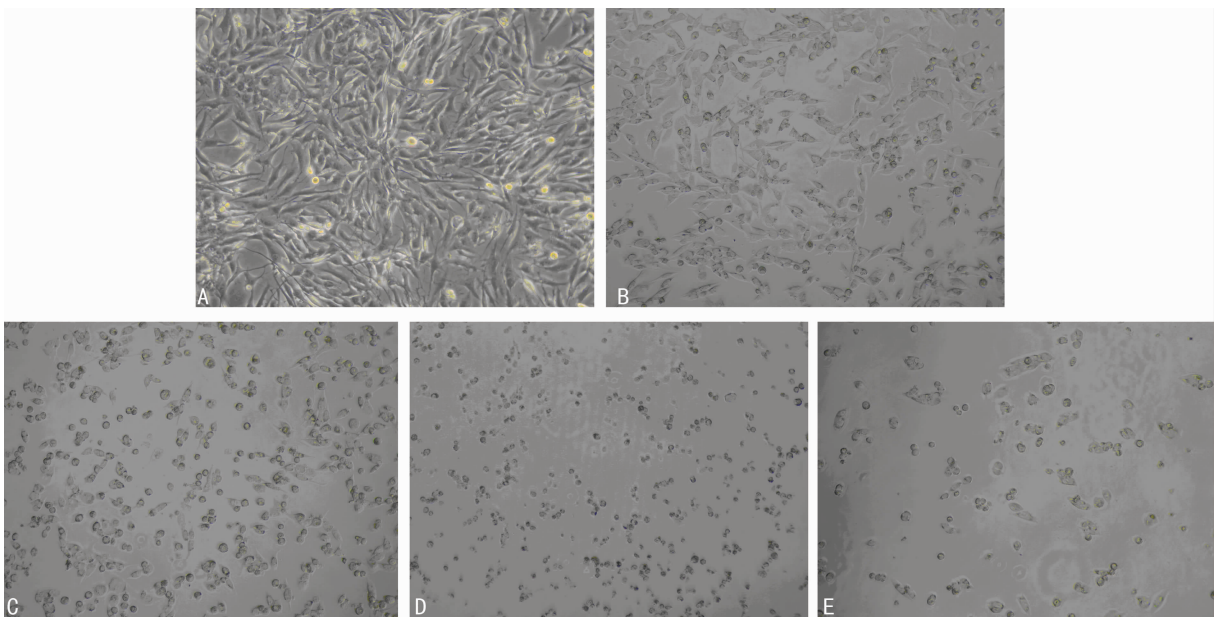
2 结 果

2.1 白花蛇舌草注射液对 MG-63 细胞增殖抑制作用 MTT 法检测结果显示:(1)白花蛇舌草注射液对 MG-63 细胞的抑制作用呈浓度依赖,当白花蛇舌草注射液浓度为 200 μ L/mL、作用 24 h 可见绝大部分细胞变圆、脱落、死亡。浓度在 50 μ L/mL 时抑制作用不明显($P > 0.05$),而浓度为 100 μ L/mL 时有明显的抑制作用($P < 0.05$)。取浓度为 100 μ L/mL 进行下一步实验,见表 2。(2)倒置显微镜下观察浓度为 100 μ L/mL 白花蛇舌草注射液对 MG-63 细胞不同作用时间的细胞形态。空白对照组细胞狭长、形态多样,较紧密地贴壁生长,加药组(加药 6 h 组、12 h 组、24 h 组及 48 h 组)细胞随着药物作用时间的延长,细胞逐渐皱缩、细胞间间隔变大,增殖被抑制,见图 1。

2.2 Bax 基因的表达水平 RT-PCR 检测结果显示,Bax 基因溶解曲线无非特异扩增和引物二聚体,见单一峰,无杂峰,结果可信,见图 2。取 100 μ L/mL 白花蛇舌草注射液分别作用于 MG-63 细胞 6、12、24、48 h 后,Bax 基因表达水平明显高于空白对照组($P < 0.05$),组间差别有统计学意义($P < 0.05$),且呈时间依赖性,提示白花蛇舌草注射液抑制细胞增殖可能是通过上调 Bax 基因表达而实现,见表 3。

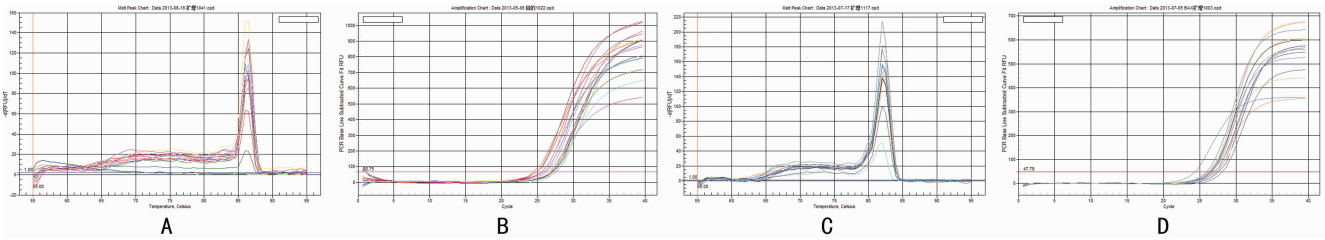
表 2 不同浓度白花蛇舌草注射液对 MG-63 细胞的增殖抑制比较($\bar{x} \pm s$)

白花蛇舌草注射液浓度(μ L/mL)	抑制率(%)
0	0
50	15.42 \pm 0.43
100	67.21 \pm 0.27
200	95.38 \pm 0.31
300	98.73 \pm 0.56
400	98.46 \pm 0.43



A:空白对照组细胞;B:加药 6 h 组;C:加药 12 h 组;D:加药 24 h 组;E:加药 48 h 组。

图 1 倒置显微镜观察的结果($\times 200$)



A: Bax 基因溶解曲线; B: Bax 基因扩增曲线; C: β -actin 基因溶解曲线; D: β -actin 基因扩增曲线。

图 2 RT-PCR 检测结果

表 3 Bax 基因的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax 基因
空白对照组	1.00 ± 0.00
加药 6 h 组	5.39 ± 0.388
加药 12 h 组	7.73 ± 0.291
加药 24 h 组	16.91 ± 0.414
加药 48 h 组	23.42 ± 0.335

3 讨 论

细胞凋亡是在凋亡信号作用下,由基因调控细胞主动死亡的过程,其形态主要表现为细胞固缩、染色质凝聚边集及形成凋亡小体^[3],现代研究认为肿瘤的药物治疗主要通过诱导细胞凋亡而达到治疗目的^[4]。Bax 基因是属于 *Bcl-2* 基因家族中调节细胞凋亡的促进基因,表达于多种肿瘤细胞中,其抗肿瘤的机制是通改变线粒体膜通透性,使细胞色素 C 及钙离子和小分子物质进入细胞质中,激活 Caspase-3,使与细胞周期及 DNA 修复等相关蛋白或激酶失活,导致细胞凋亡^[5]。当 Bax 基因过度表达则形成 Bax-Bax 二聚体,诱导细胞凋亡;而 *Bcl-2* 基因表达增高形成 Bax-Bcl-2 二聚体时细胞凋亡被抑制,因此 Bax 基因与 *Bcl-2* 基因的比例在一定程度上决定着细胞是否凋亡^[6]。中药提取物作为抗肿瘤药物是目前研究的热点, Mousavi 等^[7]研究发现乳腺癌细胞在浓度为 200~2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的红花提取物中增殖受抑制, Bax 基因表达增高。 Tsai 等^[8]研究也表明,樟芝提取物可通过提高 Bax 基因表达,降低 *Bcl-2* 基因表达而达到诱导口腔癌细胞 OCE-M1 和 OC-2 凋亡。

白花蛇舌草属于茜草科草本植物的全草,具有清热解毒、活血散结、利尿消肿的功效。近年来研究发现,白花蛇舌草的主要成分为萜醌类、熊果酸、齐墩果酸、三萜类、多糖类、香豆素类及甾醇类等,具有抗菌、抗氧化、增强免疫功能,并通过调控 Ras、C-myc、*Bcl-2* 等基因表达而具有不同的抗肿瘤作用^[9-12]。白花蛇舌草注射液为中药白花蛇舌草提取制成的单味药灭菌水溶液。本实验发现浓度为 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的白花蛇舌草注射液作用 6 h 后,倒置显微镜观察可见 MG-63 细胞逐渐皱缩变小、核深染,随着时间延长,细胞变圆、悬浮死亡,与 Wilde 等^[13]报道一致。PCR 结果显示促凋亡的 Bax 基因高表达,说明白花蛇舌草注射液对骨肉瘤 MG-63 细胞具有抑制作用的机制可能是通过上调 Bax 基因的表达来实现的。

综上所述,本实验立足于本地区丰富的中药资源,对白花蛇舌草作用于骨肉瘤细胞的机制进行部分研究,有利于白花蛇舌草的药用开发及研制抗骨肉瘤的新药提供实验依据。

参考文献:

[1] Jaffe N. Osteosarcoma: review of the past, impact on the

future. The American experience[J]. Cancer Treat Res, 2009, 152: 239-262.

- [2] 张清,徐万鹏,郭卫,等. 我国骨肉瘤治疗现状及改进建议——17 家骨肿瘤治疗中心 1998~2008 年资料分析[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2009, 8(3): 129-132.
- [3] Tamm I, Schriever F, Dcrken B. Apoptosis; implications of basic research for clinical oncology [J]. Lancet Oncol, 2001, 2(1): 33-42.
- [4] Sykietis GP, Papavassiliou AG. Apoptosis; the suicide solution in cancer treatment and chemoprevention [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2006, 15(6): 575-577.
- [5] Gottlieb RA. Mitochondria and apoptosis [J]. Biol Signals Recept, 2001, 10(3/4): 147-161.
- [6] Claassen MA, De Knecht RJ, Tilanus HW, et al. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis [J]. J Hepatol, 2010, 52(3): 315-321.
- [7] Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, et al. Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(8): 1909-1913.
- [8] Tsai WC, Rao YK, Lin SS, et al. Methylantcinic acid induces tumor specific growth inhibition in oral cancer cells via bax-mediated mitochondrial apoptotic pathway [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(20): 6145-6148.
- [9] 刘盼盼,姚晓东,李洁. 白花蛇舌草化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国药业, 2011, 20(21): 96-98.
- [10] 沈楚云,林圣云,戴铁颖,等. 白花蛇舌草诱导骨髓瘤 8226 细胞凋亡的研究 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2012, 22(1): 4-7, 65.
- [11] Wang JH, Shu LH, Yang LL, et al. 2-Hydroxy-3-methyl-anthraquinone from Hedyotis diffusa WILLD induces apoptosis via alteration of Fas/FasL and activation of caspase-8 in human leukemic THP-1 cells [J]. Arch Med Res, 2011, 42(7): 577-583.
- [12] Lin J, Wei L, Xu W, et al. Effect of hedyotis diffusa willd extract on tumor angiogenesis [J]. Mol Med Rep, 2011, 4(6): 1283-1288.
- [13] Wilde A, Zheng Y. Ran out of the nucleus for apoptosis [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(1): 11-12.

(收稿日期: 2014-07-08 修回日期: 2014-09-19)