

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.25.002

羟喜树碱联合顺铂对骨肉瘤 HOS 细胞增殖及凋亡的影响研究*

潘润桑¹,陈致瑜²,罗振华²,余福勋²,杨 斌²,聂瑛洁^{2△},田晓滨^{2▲}
(1. 贵州医科大学研究生院,贵阳 550004;2. 贵州省人民医院,贵阳 550001)

[摘要] **目的** 探讨羟喜树碱联合顺铂对骨肉瘤细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 培养骨肉瘤 HOS 细胞。羟喜树碱实验分为不同浓度组,羟喜树碱联合顺铂实验分为空白组、羟喜树碱组、顺铂组及联合用药组。CCK-8 测定各组作用于 HOS 细胞不同时间后细胞活力的变化;平板克隆检测细胞集落形成的情况;流式细胞术检测细胞凋亡情况,Western blot 检测凋亡相关蛋白表达。**结果** HOS 细胞的增殖率随着羟喜树碱剂量增加而降低($P<0.05$),细胞集落形成数量呈浓度依赖性减少($P<0.05$),细胞凋亡率明显增加($P<0.05$),Caspase3 剪切体、Bax 表达水平逐渐上升($P<0.05$)。与羟喜树碱组、顺铂组相比,联合应用组 HOS 细胞凋亡比例最高,凋亡相关蛋白 Caspase3 剪切体、Bax 表达量最高。**结论** 羟喜树碱在一定程度上能够有效地抑制骨肉瘤的增殖并诱导细胞凋亡的发生,与顺铂联合用药后效果更明显。

[关键词] 骨肉瘤;羟喜树碱;顺铂;细胞增殖;细胞凋亡
[中图分类号] R738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)25-3249-04

Effect of hydroxycamptothecin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of osteosarcoma HOS cells*

PAN Runsan¹,CHEN Zhiyu²,Luo Zhenhua²,Yu Fuxun²,Yang Bin²,Nie Yingji^{2△},Tian Xiaobin^{2▲}
(1. Graduate School, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;
2. Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of hydroxycamptothecin(HYD) combined with cisplatin on the proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells by various in vitro experiments. **Methods** Osteosarcoma HOS cells were cultured. The HYD test was divided into different concentration groups. The HYD combined with cisplatin test was divided into blank group, HYD group, cisplatin group and combination group. CCK-8 was used to determine the cell viability of HOS cells at different time points; plate cloning was used to detect the formation of cell colonies; flow cytometry was used to detect apoptosis; Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins. **Results** The proliferation rate of HOS cells decreased with the increase of HYD dose ($P<0.05$), the number of colony formation decreased in a concentration-dependent manner ($P<0.05$), the apoptosis rate increased significantly ($P<0.05$), and the expression levels of Caspase 3 shear body and Bax increased gradually ($P<0.05$). Compared with HYD group and cisplatin group, the apoptosis rate of HOS cells in combination group was the highest, and the expression of apoptosis-related protein Caspase 3 shear body and Bax was the highest. **Conclusion** HYD can effectively inhibit the proliferation of osteosarcoma and induce apoptosis to a certain extent, and the effect of combination with cisplatin is more obvious.

[Key words] osteosarcoma; hydroxycamptothecin; cisplatin; cell proliferation; apoptosis

骨肉瘤是一种常见的骨组织恶性肿瘤,具有发病率高、恶性程度高、易发生远处转移等特点,早期诊断和治疗较困难^[1]。目前虽然有多种手术及化疗治疗方式,但总体治疗效果不理想^[2]。目前顺铂仍为骨肉瘤临床治疗常用化疗药,且联合用药对骨肉瘤的治疗将会取得更好的疗效。近年来发现一些中药制剂对

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560269);贵州省重大应用基础研究[黔科合 J 重大字(2015)2003];贵州省人民医院院士工作站——个性化诊疗与转化医学分站[黔科合院士站(2015)4015];贵州省科技厅国际合作项目[黔科合外 G 字(2014)7020 号];贵州省人民医院博士基金[GZSYBS(2016)03 号]。 作者简介:潘润桑(1986—),硕士,主要从事骨肉瘤基础研究。 △ 通信作者,E-mail:nienyj@hotmail.com。 ▲ 通信作者,E-mail:txb6@vip.163.com。

骨肉瘤的治疗有一定效果,是目前较为热门的一种新辅助疗法^[3]。羟喜树碱是一种能选择性抑制 DNA TopoI 功能的天然化合物^[4],目前已广泛应用于临床并取得一定治疗效果。羟喜树碱能够抑制多种恶性肿瘤细胞,对肝癌、胃癌、白血病^[5-8]等多种肿瘤均有明显的抑制作用。而羟喜树碱在骨肉瘤的治疗作用目前仍不清楚,本实验通过一系列体外实验探讨羟喜树碱对骨肉瘤 HOS 细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 实验所用骨肉瘤细胞系 HOS 细胞购自中国典型培养物保藏中心;羟喜树碱(纯度 99.91%)购自美国 SELLECK 公司(批号:S2423);顺铂购自美国 Sigma 公司(货号:p4394);二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;CCK-8 试剂盒(300T)购自日本 Dojindo 公司;GAPDH、Cleaved-Caspase3,山羊抗鼠、山羊抗兔等抗体均购自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将骨肉瘤 HOS 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基的 25 mL 培养瓶中。置于 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱培养,使细胞均匀贴壁生长,隔天换液,换液时使用 PBS 清洗。取对数生长期的细胞进行实验。羟喜树碱单药实验分为空白组,10、20、40、80 μmol/L 等浓度组。羟喜树碱联合顺铂实验分为空白组,羟喜树碱组(40 μmol/L),顺铂组(40 μmol/L)及联合用药组(羟喜树碱 40 μmol/L+顺铂 40 μmol/L)。

1.2.2 CCK-8 检测细胞活力 胰酶消化细胞后,中和制备细胞悬液,计数。96 孔板内每孔接种 5 000 个细胞,每组 5 个复孔,按此方法种植 HOS 细胞于 96 孔板。分别于 24、48、72 h 时检测吸光度值(A 值)。每孔加入 CCK-8 工作液 100 μL,细胞培养箱中孵育 2 h,酶标仪下检测波长 450 nm 处 A 值。

1.2.3 平板克隆细胞集落形成实验 胰酶消化细胞,制备单细胞悬液,计数后稀释至 1×10³ 个/mL。在 6 cm 培养皿中加入 1 000 个细胞,待细胞贴壁后分别给药。培养 2 周后,以 4%多聚甲醛固定 30 min,2%结晶紫染色 30 min,洗净烘干后拍照。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 加药处理 24、48、72 h,收集上清液于流式管,PBS 清洗后加 1 mL 不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,中和后收集于流式管,800 r/min 离心 5 min,弃上清液。PBS 清洗干粉,800 r/min 离心 5 min,弃上清液。每组加入 200 μL 1×Binding Buffer,在 Buffer 中加入 5 μL Annexin V-

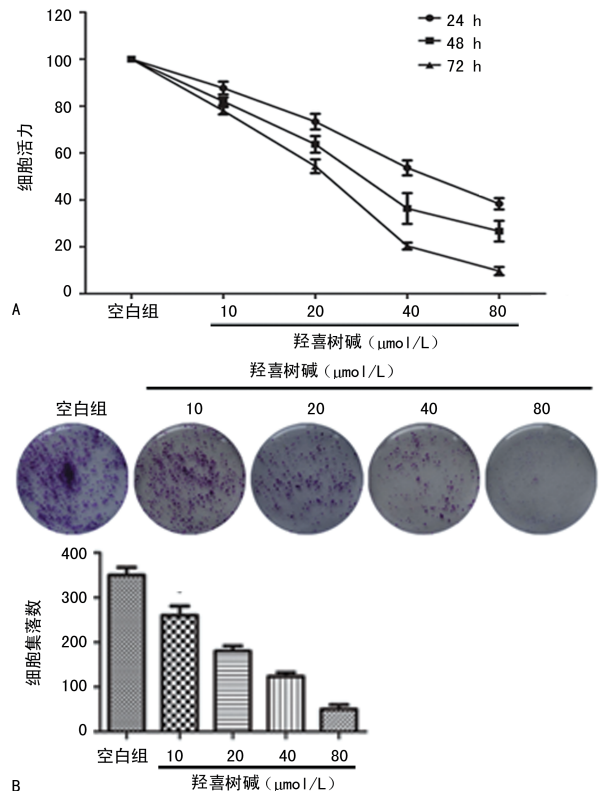
FITC、10 μL PI,混匀;4℃避光反应 15 min;流式细胞仪上机检测,记录结果。

1.2.5 Western blot 提取各实验组细胞的蛋白,通过电泳、转膜、洗膜,一抗 4℃摇床孵育 16 h,二抗室温孵育 1 h,洗膜,在化学发光试剂盒电化学发光(ECL)液中于凝胶成像系统下曝光,以 GAPDH 为内参照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 羟喜树碱对 HOS 细胞增殖的影响 与空白组比较,不同浓度羟喜树碱作用均出现明显的抑制作用(*P* < 0.05),且细胞活性随着时间及浓度的增加逐渐降低(*P* < 0.05)。随着羟喜树碱浓度的增加,HOS 细胞克隆形成的细胞团明显减小,细胞集落数量形成逐渐减少,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1。



A: CCK-8 检测细胞活力; B: 平板克隆细胞集落形成实验

图 1 羟喜树碱对 HOS 细胞增殖的影响

2.2 羟喜树碱对 HOS 细胞凋亡的影响 随着羟喜树碱浓度的增加,HOS 细胞发生凋亡的比例明显升高(*P* < 0.05),细胞凋亡率分别为 7%、17%、26%、34%、53%;凋亡相关蛋白 Caspase3 剪切体表达逐渐增加;与空白组相比,其余组 Caspase3 剪切体、Bax 表达上调(*P* < 0.05),40、80 μmol/L 组更为明显(*P* < 0.01),见图 2。

2.3 羟喜树碱联合顺铂对 HOS 细胞增殖的影响

与空白组比较,羟喜树碱组、顺铂组及联合用药组均在不同时间对 HOS 细胞出现抑制作用。羟喜树碱组及联合用药组的抑制率分别为 $(65.5 \pm 3.9)\%$ 和 $(73.0 \pm 4.6)\%$,联合用药组对细胞活力抑制作用最强,差异有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。联合用药组相比于其他组,HOS 细胞克隆形成的细胞团明显减小 $(P < 0.05)$,见图 3。

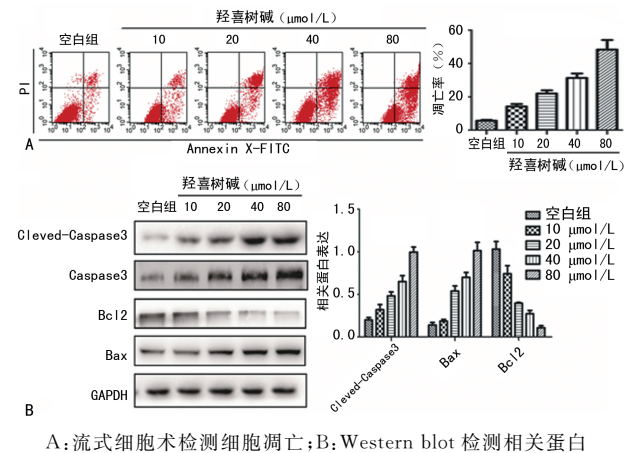


图2 羟喜树碱对 HOS 细胞凋亡的影响

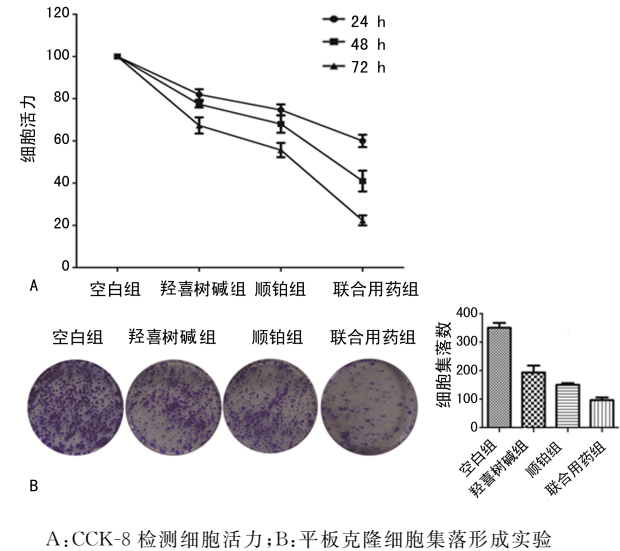


图3 羟喜树碱联合顺铂对 HOS 细胞增殖的影响

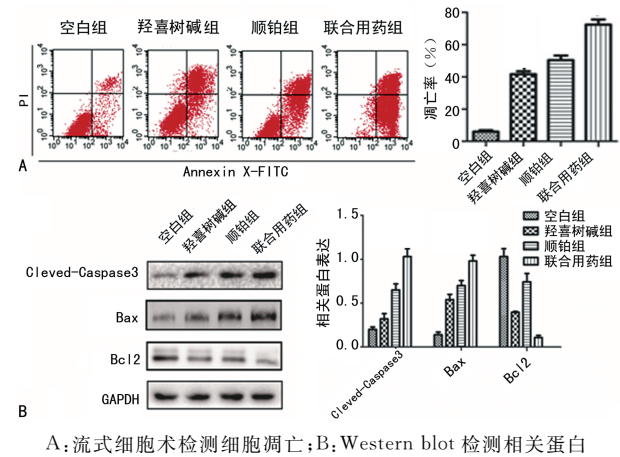


图4 羟喜树碱联合顺铂对 HOS 细胞凋亡的影响

2.4 羟喜树碱 HYD 联合顺铂对 HOS 细胞凋亡的影响 与羟喜树碱组、顺铂组相比,联合用药组 HOS 细胞发生凋亡的比例最高 $(P < 0.05)$,凋亡相关蛋白 Caspase3 剪切体、Bax 表达量最高 $(P < 0.05)$,见图 4。

3 讨论

骨肉瘤好发于青少年,是最常见的原发性恶性骨肿瘤疾病之一^[9]。目前的治疗方式主要为手术切除及放化疗^[10]。虽然化疗方式有一定效果,然而治疗效果仍较差,有效率 60% 左右^[11]。因此,寻找新的抗骨肉瘤细胞恶性生物学行为的药物显得尤为重要。

羟喜树碱是我国自主研发的新型抗肿瘤药物,其药理学功能主要是不可逆的抑制 DNA 复制^[12]。目前在临床有较为广泛的应用,尤其在肿瘤的治疗中有一定的成效。在结直肠的联合化疗中,羟喜树碱联合奥沙利铂与单用奥沙利铂组相比,其诱导的肿瘤细胞凋亡率明显增加^[13]。有文献报道羟喜树碱抑制肝癌细胞增殖具有浓度依赖性,并能引起细胞发生明显凋亡相关改变^[14]。目前,由于其在肿瘤治疗存在一定的有效性,近年研制出了片剂、滴丸、固体分散片、脂质体、纳米体等一系列新剂型^[15]。羟喜树碱对治疗多种恶性肿瘤具有明显疗效,然而其在骨肉瘤中的临床作用仍不清楚,有待进一步研究。

本研究显示,随着羟喜树碱浓度的增加和作用时间的延长,其对细胞的抑制作用逐渐增加,呈现出时间和剂量依赖性,细胞集落形成数量及大小均降低,细胞凋亡比例明显增高,凋亡相关蛋白 Caspase3、Bax 表达逐渐增加,Bcl2 表达逐渐降低,表明羟喜树碱促进 HOS 细胞的凋亡,提示羟喜树碱对骨肉瘤细胞有明显的抑制作用。羟喜树碱在联合顺铂用药后,显示出了更加明显的抑制肿瘤增殖的反应。

以上实验均表明羟喜树碱能够在体外抑制骨肉瘤 HOS 细胞的增殖,促进其凋亡,联合顺铂用药较单用顺铂化疗效果更佳,为临床治疗骨肉瘤提供新的思路和实验基础。然而具体相关机制尚不清楚,有待进一步深入研究。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
[2] LONGHI A, ERRANI C, DE PAOLIS M, et al. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art [J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32(6): 423-436.
[3] GUEMBEL D, BEKESCHUS S, GELBRICH N, et al. Cold atmospheric plasma in the treatment of osteosarcoma[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 119-125.
[4] XU W, XING F, DONG K, et al. Application of traditional

- Chinese medicine preparation in targeting drug delivery system[J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(3): 258-265.
- [5] LIU Z, LI H, FAN Y, et al. Combination treatment with *Rhizoma Paridis* and *Rhizoma Curcuma longa* extracts and 10-hydroxycamptothecin enhances the antitumor effect in H22 tumor model by increasing the plasma concentration [J]. *Biom Pharm*, 2016, 83(8): 627-634.
 - [6] ZHANG Y, SONG W, ZHANG F, et al. Differentiation-inducing activity of hydroxycamptothecin on cancer stem-like cells derived from hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(8): 2473-2481.
 - [7] WU X, SHAO X, MENG X, et al. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in hydroxycamptothecin-resistant gastric cancer cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(2): 259-269.
 - [8] WANG Y Q, LI L F, JIANG W, et al. Synthesis and evaluation of a DHA and 10-hydroxycamptothecin conjugate [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(19): 5592-5599.
 - [9] GNOLI M, PONTI F, SANGIORGI L. Tumor syndromes that include bone tumors: an update [J]. *Surg Pathol Clin*, 2017, 10(3): 749-764.
 - [10] DAVIS L E, JANEWAY K A, WEISS A R, et al. Clinical trial enrollment of adolescents and young adults with sarcoma [J]. *Cancer*, 2017, 123(18): 3434-3440.
 - [11] SHANKAR G M, CLARKE M J, AILON T, et al. The role of revision surgery and adjuvant therapy following subtotal resection of osteosarcoma of the spine: a systematic review with meta-analysis [J]. *J Neurosurg Spine*, 2017, 27(1): 97-104.
 - [12] LI X, CHEN H, SUN Y, et al. Hydroxycamptothecin prevents intraarticular scar adhesion by activating the PERK signal pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 810(1): 36-43.
 - [13] YAO Y, SUN Y, ZHAO H, et al. Oxaliplatin plus hydroxycamptothecin versus oxaliplatin plus 5-fluorouracil and leucovorin in treatment of advanced colorectal cancer [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(21): 1829-1833.
 - [14] LI P, CHEN L, ZHENG F, et al. Intraperitoneal chemotherapy with hydroxycamptothecin reduces peritoneal carcinomatosis: results of an experimental study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(1): 37-44.
 - [15] ZHU H M, GU J H, XIE Y, et al. Hydroxycamptothecin liposomes based on thermal and magnetic dual-responsive system: preparation, in vitro and in vivo antitumor activity, microdialysis-based tumor pharmacokinetics [J]. *J Drug Target*, 2017, 23(117): 1-12.
- (收稿日期: 2018-03-08 修回日期: 2018-05-12)
-
- (上接第 3248 页)
- [9] MÜLLER S, NOWAK K. Exploring the miRNA-mRNA Regulatory Network in Clear Cell Renal Cell Carcinomas by Next-Generation Sequencing Expression Profiles [J]. *Biom Res Int*, 2014, 2014: 948408.
 - [10] DENG M, TANG H, ZHOU Y, et al. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(17): 2997-3005.
 - [11] LIU F Y, ZHOU S J, DENG Y L, et al. MiR-216b is involved in pathogenesis and progression of hepatocellular carcinoma through HBx-miR-216b-IGF2BP2 signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(3): e1670.
 - [12] HE S, LIAO B, DENG Y, et al. MiR-216b inhibits cell proliferation by targeting FOXM1 in cervical cancer cells and is associated with better prognosis [J]. *Bmc Cancer*, 2017, 17(1): 673.
 - [13] CHEN X, LIU X, HE B, et al. MiR-216b functions as a tumor suppressor by targeting HMGB1-mediated JAK2/STAT3 signaling way in colorectal cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(10): 2051-2069.
 - [14] SUN M, WANG X, CHEN T, et al. microRNA-216b inhibits cell proliferation and migration in human melanoma by targeting FOXM1 in vitro and in vivo [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(12): 1272-1282.
 - [15] YOU Y, TAN J, GONG Y, et al. MicroRNA-216b-5p functions as a tumor-suppressive RNA by targeting TPT1 in pancreatic cancer cells [J]. *J Cancer*, 2017, 8(14): 2854-2865.
 - [16] DI LEVA G, GAROFALO M, CROCE C M. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9: 287-314.
 - [17] WANG Y, XU P, YAO J, et al. MicroRNA-216b is down-regulated in human gastric adenocarcinoma and Inhibits proliferation and cell cycle progression by targeting onco-gene HDAC8 [J]. *Target Oncol*, 2016, 11: 197-207.
 - [18] TSIMAFYEYU I, BRATSLAVSKY G. Fibroblast growth factor receptor 1 as a target for the therapy of renal cell carcinoma [J]. *Oncology*, 2015, 88(6): 321-331.
 - [19] TSIMAFYEYU I, ZAVELEVA E, STEPANOVA E, et al. OM-RCA-01, a novel humanized monoclonal antibody targeting fibroblast growth factor receptor 1, in renal cell carcinoma model [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(6): 1436-1443.
 - [20] EGELI U, TEZCAN G, CECENER G, et al. miR-216b targets FGFR1 and confers sensitivity to radiotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma patients without EGFR or KRAS mutation [J]. *Pancreas*, 2016, 45: 1294-1302.
- (收稿日期: 2018-03-18 修回日期: 2018-05-16)