

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.18.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220425.0903.002.html\(2022-04-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220425.0903.002.html(2022-04-25))

基于 RhoA/ROCK 信号通路番茄红素对骨肉瘤 MG63 细胞荷瘤小鼠的抑瘤作用机制研究*

王新强,吴良邦,章月红,顾增辉[△]

(中国人民解放军联勤保障部队第 903 医院骨三科,杭州 310004)

[摘要] **目的** 探讨番茄红素(LP)对人骨肉瘤 MG63 细胞增殖及荷瘤裸鼠肿瘤抑制作用和其潜在机制。**方法** 选取对数生长期的人骨肉瘤 MG63 细胞,根据实验目的分为 5 组:对照组、LP 5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和顺铂(DDP,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组;LP 或 DDP 处理细胞 48 h 后,MTT 检测细胞抑制率、流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡的改变。背部皮下注射 MG63 细胞建立荷瘤裸鼠模型,设为模型组、LP 10、20、40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组和 DDP(2 mg/kg)组,每组 10 只;接种后使用 LP 或 DDP 处理 14 d 后处死裸鼠,称量瘤体质量并计算抑瘤率,Western blot 检测肿瘤组织中小 GTPase RhoA/Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶(ROCK)信号通路相关蛋白的表达水平。**结果** 在体外试验中,与对照组比较,LP 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 DDP 组细胞增殖抑制率明显升高、细胞周期 G_0/G_1 期明显延长,细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在体内试验中,LP 20、40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组瘤质量较模型组明显减轻、抑瘤率明显升高,肿瘤组织 RhoA 和 ROCK 蛋白表达水平下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** LP 阻碍了 MG63 的生长,可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路有关。

[关键词] 番茄红素;骨肉瘤;MG63 细胞;细胞增殖;细胞周期;细胞凋亡;RhoA/ROCK 信号通路**[中图法分类号]** R966**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)18-3069-05

Lycopene act as antitumor on osteosarcoma MG63 cells xenograft mice by RhoA/ROCK signaling pathway*

WANG Xinqiang, WU Liangbang, ZHANG Yuehong, GU Zenghui[△]

(The Third Department of Orthopedics, 903 Hospital, Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Hangzhou, Zhejiang 310004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the inhibitory role of lycopene (LP) on the proliferation of human osteosarcoma cells MG63 cells of xenograft mice and its potential mechanism. **Methods** Human osteosarcoma MG63 cells at logarithmic growth phase were selected divided into five groups according to experimental purpose: control group, LP (5, 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group and cisplatin (DDP, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group. Cells were treated with LP or DDP for 48 h, MTT was used to detect the cell inhibition, and flow cytometry was used to detect the changes in cell cycle and apoptosis. MG63 cells were injected subcutaneously into the back to establish a xenograft model, and these animals were set as model group, LP group (10, 20 and 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and DDP group (2 mg/kg), with the number of 10 in each group. After inoculation, nude mice were treated with LP or DDP for 14 days and sacrificed later. The tissues were weighed and the tumor inhibition rates were calculated. The expression levels of small GTPase RhoA/Rho associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) signal pathway related proteins in tumor tissues were detected by Western blot. **Results** In vitro experiments, compared with the control group, it was clear to see that the rate of proliferation inhibition was increased significantly in LP (5, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group and DDP group, cell cycle G_0/G_1 phase was prolonged significantly and cell apoptosis rate was increased significantly. The above statistical results have statistical

* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2019329727)。 作者简介:王新强(1982—),主治医师,硕士,主要从事创伤骨科研究。

[△] 通信作者, E-mail: f123my@163.com。

difference ($P < 0.05$). In vivo experiments, the tumor mass in the LP 20 and 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ group was reduced significantly, the tumor inhibition rate was increased significantly, the proteins levels of RhoA and ROCK in tumor tissue were down-regulated, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** LP hinders the growth of MG63, which may be related to the inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway.

[Key words] lycopene; osteosarcoma; MG63 cells; cell proliferation; cell cycle; apoptosis; RhoA/ROCK signaling pathway

番茄红素(lycopene, LP)是一种属于类胡萝卜素家族的膳食抗氧化剂,可在红色和黄色水果或植物中合成^[1]。主要存在于胡萝卜、西瓜、木瓜、芦笋和欧芹中^[2]。LP(化学式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$)是一种亲油性四萜,具有共轭双键结构^[3]。LP 具有多种功能,包括抗炎、抗氧化和抗增殖,可预防或治疗心力衰竭、肿瘤。LP 可通过抑制氧化应激、神经元凋亡和炎症及恢复线粒体功能表现出治疗作用,这其中包括帕金森病、亨廷顿病、阿尔茨海默病、癫痫和抑郁症及恢复啮齿动物的记忆能力^[4]。LP 还可以有效预防和治疗心血管疾病和癌症。其中在降低肺癌和前列腺癌风险方面起到了明显的预防作用^[5]。但 LP 在骨肉瘤中的作用及其潜在机制鲜有文献报道,本研究旨在通过体外试验观察 LP 对人骨肉瘤 MG63 细胞的作用,并通过荷瘤裸鼠模型探讨其对荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响及潜在机制,为寻找骨肉瘤的治疗方法提供新思路,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

50 只雄性裸鼠,体重(23.26 ± 2.56)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SYXK(京)2017-0033。LP(纯度 $\geq 98\%$,南京泽朗生物科技有限公司);注射用顺铂(DDP,山东齐鲁制药有限公司);DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS,美国 HyClone 公司);MTT、二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司);PI-RNase A 试剂(美国 Trevigen 公司);组织蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂(美国 Roche Molecular Biochemicals 公司);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Life Technologies 公司);Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate 底物发光系统(美国 Millipore 公司);鼠抗兔小 GTPase RhoA 和 Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶(ROCK)一抗、辣根过氧化物酶耦联的兔二抗(美国 CST 公司);Luminescent 图像分析仪 LAS-4000mini 用于分析显影结果(美国 GE Healthcare 公司);酶标仪、流式细胞仪(美国 Biorad 公司);BI-2000 医学图像

分析系统(成都泰盟科技有限公司);DYY-11 型多用电泳仪、DYCZ-40B 转印泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 分组

MG63 人骨肉瘤细胞购自美国 ATCC 细胞库,在混合 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中培养,选取对数生长期细胞用 0.25% 胰酶消化,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL 后分为对照组、LP 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 DDP(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组^[6]。各组细胞分别给予 LP 或 DDP 处理 48 h 进行后续试验。

1.2.2 细胞增殖

调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL,转移至 96 孔板,每孔滴加 MTT 溶液(5 mg/mL,20 μL)后继续培养 4 h。去除细胞上清液后加入 DMSO 200 μL ,常温下振荡 10 min 后在 570 nm 处波长下用酶标仪测定吸光度(A)值。细胞增殖抑制率(%)计算公式为:抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 A 值} - \text{空白组 A 值}) / (\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值})] \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞术

收集每组处理后的细胞并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两次。对于细胞周期检测,在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下用乙醇固定细胞,再将细胞置于 PI-RNaseA 试剂中室温下孵育 25 min 后,用 PBS 洗涤染色的细胞并通过流式细胞仪分析。对于细胞凋亡测定,收集处理过的细胞后,将它们用 Annexin V-FITC/PI 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 避光条件下染色 25 min。用 PBS 洗涤 2 次后,被染色的细胞用于细胞凋亡分析。

1.2.4 移植瘤模型建立

参照之前的方法^[7]制备荷瘤鼠模型:收集对数生长期 DMEM 高糖培养的人骨肉瘤 MG63 细胞,制备浓度为 5×10^6 个/mL 的单细胞悬液,在无菌条件下于背部后部皮下接种(0.2 mL, 1×10^6 个细胞)。50 只模型裸鼠分为 5 组:模型组,LP 10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组和 DDP(2 mg/kg)组,每组 10 只。造模成功后通过 LP 或 DDP 腹腔给药,持续 14 d^[8]。抑瘤率计算方法为:抑瘤率(%) = $(\text{模型组瘤质量} - \text{实验组瘤质量}) / \text{模型组瘤质量} \times 100\%$ 。

1.2.5 蛋白免疫印迹

用冷 PBS 洗涤骨肉瘤组织,用组织蛋白裂解液混合蛋白酶抑制剂的混合物裂解。在冰上孵育 30 min 后,4 ℃下以 12 000×g 离心 15 min 后收集上清液,并使用 BCA 法测定蛋白质浓度。含有等量总蛋白的(20 μg)的样品通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯凝胶电泳(SDS-PAGE)分离并转移到 PVDF 膜上。膜在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,然后与对应一抗混合孵育 4 ℃过夜。随后,将膜与辣根过氧化物酶耦联的兔二抗一起孵育。使用高度灵敏的底物发光系统检测抗体结合蛋白条带,Luminescent 图像分析仪 LAS-4000mini 用于分析显影结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多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 LP 对 MG63 细胞增殖抑制率的影响

与对照组比较,LP 5、10、20 μg/mL 组和 DDP 组 MG-63 细胞增殖抑制率均明显升高($P < 0.05$),且 LP 20 μg/mL 组细胞增殖抑制率明显高于 DDP 组($P < 0.05$),见图 1。

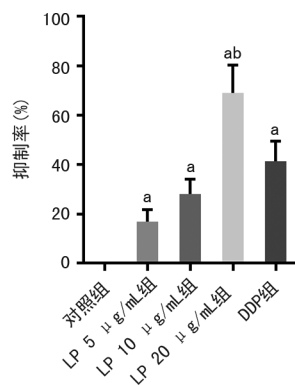
2.2 LP 对 MG63 细胞周期的影响

与对照组比较,LP 5、10、20 μg/mL 组和 DDP 组 MG-63 细胞周期 G_0/G_1 期明显延长($P < 0.05$),S 期和 G_2/M 期明显缩短($P < 0.05$)。与 DDP 组比较,LP 20 μg/mL 组细胞在上述细胞周期的改变更为明显($P < 0.05$),见图 2。

2.3 LP 对 MG63 细胞凋亡的影响

与对照组比较,LP 5、10、20 μg/mL 组和 DDP 组

MG-63 细胞凋亡率均明显升高($P < 0.05$),且 LP 20 μg/mL 组 MG-63 细胞凋亡率明显高于 DDP 组($P < 0.05$),见图 3。



^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 DDP 组比较。

图 1 LP 对 MG63 细胞增殖抑制率的影响

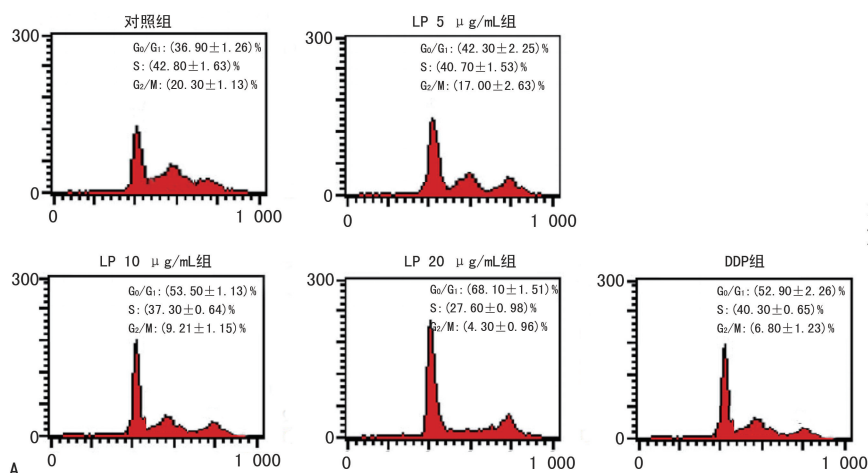
2.4 LP 对各组裸鼠荷瘤质量和抑瘤率的影响

与模型组比较,LP 20、40 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组和 DDP 组瘤质量明显降低、抑瘤率明显升高($P < 0.05$);LP 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组瘤质量和抑瘤率与 DDP 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1、图 4。

表 1 各组裸鼠瘤质量和抑瘤率比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

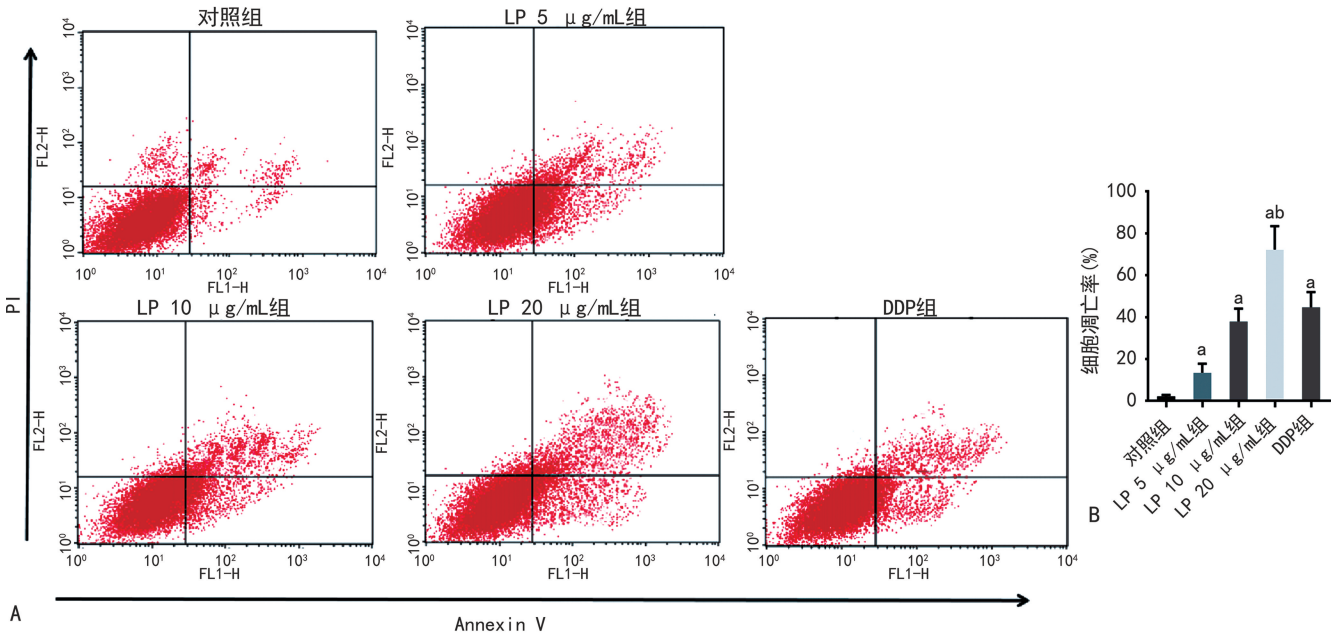
组别	瘤质量(g)	抑瘤率(%)
模型组	1.72±0.17	0.00±0.00
LP 10 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	1.59±0.34	22.66±4.88 ^a
LP 20 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	1.14±0.43 ^a	34.44±5.63 ^a
LP 40 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	0.82±0.34 ^a	52.73±6.20 ^a
DDP 组	0.76±0.17 ^a	56.71±5.60 ^a

^a: $P < 0.05$,与模型组比较。



A. 流式细胞术检测 LP 和 DDP 对 MG63 细胞周期的分布改变; B. 各组细胞周期统计分析结果;^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 DDP 组比较。

图 2 LP 对 MG63 细胞周期的影响



A. 流式细胞术检测 LP 和 DDP 对 MG63 细胞凋亡的改变; B. 各组细胞凋亡统计分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 DDP 组比较。

图 3 LP 对 MG63 细胞凋亡的影响

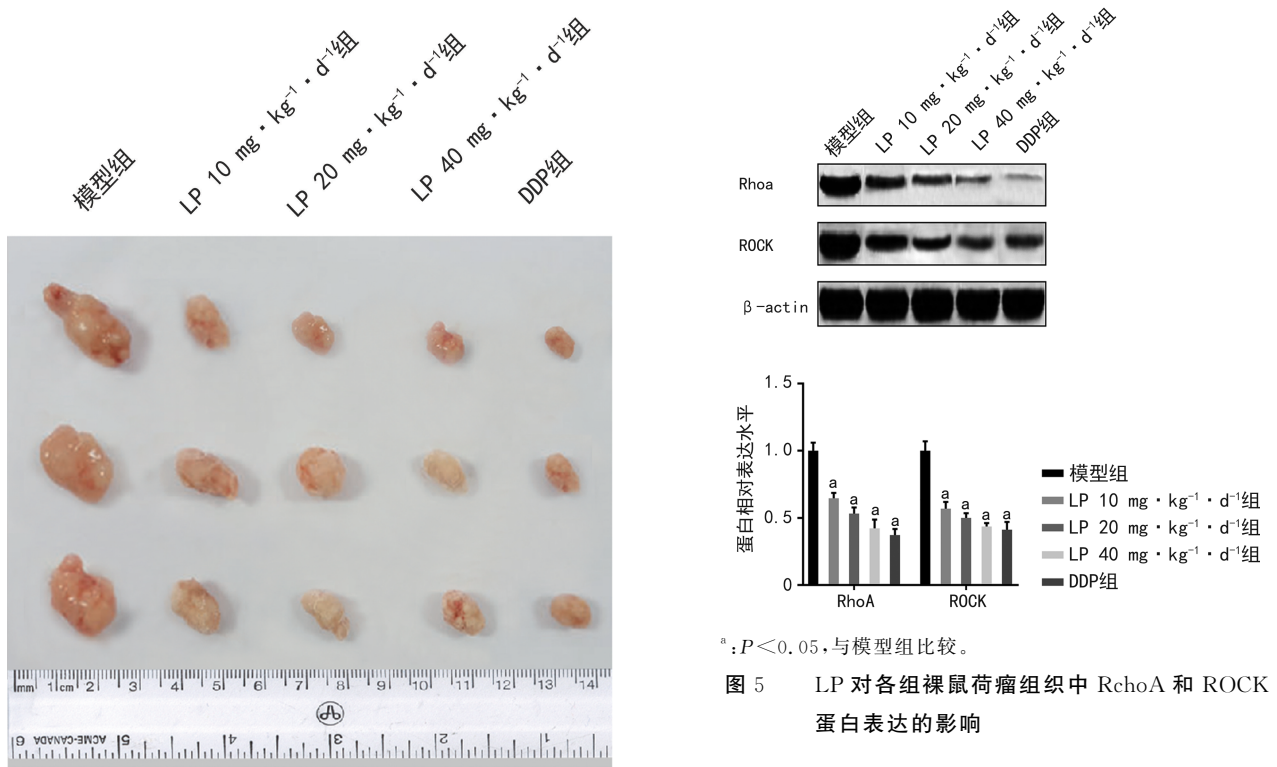


图 4 各组裸鼠瘤体比较

2.5 LP 对各组裸鼠荷瘤组织中 RchoA 和 ROCK 蛋白表达的影响

与模型组比较, LP 10、20 和 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 组和 DDP 组 RchoA 和 ROCK 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); LP 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 组与 DDP 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

^a: $P < 0.05$, 与模型组比较。

图 5 LP 对各组裸鼠荷瘤组织中 RchoA 和 ROCK 蛋白表达的影响

3 讨 论

有研究表明, 在人结肠癌细胞系 HT-29 细胞的体外研究中, LP 可以通过抑制糖原合酶激酶-3β 的磷酸化来抑制癌细胞的侵袭和基质金属蛋白酶-7、Akt 和细胞外信号调节蛋白激酶 1 和 2 的表达。在前列腺癌 PC3 细胞系中, LP 可通过降低 AKT2 的表达、增加 microRNA Lethal-7 的表达来阻止细胞增殖和诱导细胞凋亡^[9]。本研究中, LP 能够阻滞 MG-63 细

胞周期于 G_0/G_1 期,抑制细胞增殖和促进凋亡;体内研究发现,LP 能够抑制荷瘤裸鼠的肿瘤生长、提高抑瘤率。这说明 LP 对骨肉瘤细胞的细胞增殖和肿瘤生长均具有一定的抑制作用。

RhoA 是 Rho 家族的小 GTPase 蛋白成员,已被证明是癌症进展中的关键信号通路^[10]。WANG 等^[11]研究表明 RhoA/ROCK 信号通路的激活可以促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭。此外,RhoA/ROCK 信号通路可以参与血管形成并限制非小细胞肺癌的侵袭^[12-13]。LIN 等^[14]研究表明 CXCR4 可以促进 RhoA GTPase 的激活和 ROCK1 的磷酸化。本研究中,LP 剂量组 RhoA 和 ROCK 蛋白表达明显下调,其对 RhoA/ROCK 信号通路的作用与顺铂组相似,这可能是 LP 促进荷瘤组织细胞凋亡而抑制肿瘤生长的重要分子机制之一。

综上所述,LP 可抑制体外人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、细胞周期,促进细胞凋亡,还可抑制骨肉瘤裸鼠肿瘤生长,其机制可能与 LP 抑制 RhoA/ROCK 信号通路有关。

参考文献

- [1] 刘艳峰. 番茄红素对糖尿病肾病模型大鼠肾纤维化的影响[J]. 中医学报,2022,37(3):593-598.
- [2] MIRAHMADI M, AZIMI-HASHEMI S, SABURI E, et al. Potential inhibitory effect of lycopene on prostate cancer[J]. Biomed Pharmacother,2020,129:110459.
- [3] 刘宸境. 番茄红素对氧化应激下小鼠脂肪间充质干细胞成骨分化的保护作用[D]. 青岛:青岛大学,2021.
- [4] PAUL R, MAZUMDER M K, NATH J, et al. Lycopene- A pleiotropic neuroprotective nutraceutical; deciphering its therapeutic potentials in broad spectrum neurological disorders[J]. Neurochem Int,2020,140:104823.
- [5] SAINI R K, RENGASAMY K R R, MAHOMOODALLY F M, et al. Protective effects of lycopene in cancer, cardiovascular, and neurodegenerative diseases; an update on epidemiological and mechanistic perspectives[J]. Pharmacol Res,2020,155:104730.
- [6] 杨丽萍,赵孟雷,凌书建. 番茄红素对人肝癌细胞增殖和凋亡的影响及其机制[J]. 国际肿瘤学杂志,2017,44(5):327-331.
- [7] 杨志强,陈路,张雅茜,等. 紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究[J]. 中国比较医学杂志,2022,32(1):68-74+96.
- [8] 孙慧霞,郭哲,许静. 枸杞多糖对顺铂化疗诱导的大鼠卵巢早衰模型的卵巢保护作用[J]. 临床与病理杂志,2020,40(3):578-584.
- [9] LI D, CHEN L, ZHAO W, et al. microRNA-let-7f-1 is induced by lycopene and inhibits cell proliferation and triggers apoptosis in prostate cancer[J]. Mol Med Rep,2016,13(3):2708-2714.
- [10] YUAN J, CHEN L, XIAO J, et al. SHROOM2 inhibits tumor metastasis through RhoA-ROCK pathway-dependent and -independent mechanisms in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Death Dis,2019,10(2):58.
- [11] WANG W, DU H, LIU H, et al. SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 promotes ovarian cancer cell migration and invasion via the activation of the RhoA/ROCK signaling pathway[J]. Oncol Rep,2019,41(1):668-676.
- [12] XIA Y, CAI X Y, FAN J Q, et al. The role of sema4D in vasculogenic mimicry formation in non-small cell lung cancer and the underlying mechanisms[J]. Int J Cancer,2019,144(9):2227-2238.
- [13] UMELO I A, WEVER O D, KRONENBERGER P, et al. Combined inhibition of rho-associated protein kinase and EGFR suppresses the invasive phenotype in EGFR-dependent lung cancer cells[J]. Lung Cancer,2015,90(2):167-174.
- [14] LIN S C, GOU G H, HSIA C W, et al. Simulated microgravity disrupts cytoskeleton organization and increases apoptosis of rat neural crest stem cells via upregulating CXCR4 expression and RhoA-ROCK1-p38 MAPK-p53 signaling[J]. Stem Cells Dev,2016,25(15):1172-1193.