

## 盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞体外增殖和凋亡的影响

张健<sup>1)</sup>, 李斌<sup>2)</sup>, 赵养学<sup>1)</sup>, 李德成<sup>1)</sup>

(1) 西安市第九医院骨科, 陕西 西安 710054; 2) 西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061)

**[摘要]** **目的** 探讨盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖凋亡的影响及其分子机制. **方法** MTT 法检测盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的作用, 利用流式细胞仪检测盐霉素对 MG-63 细胞凋亡的作用. Western blot 法检测盐霉素对 MG-63 细胞中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白表达的影响. **结果** 盐霉素可以抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖, 并呈现出时间、剂量依赖效应; 经过盐霉素 (2  $\mu\text{M}$  和 4  $\mu\text{M}$ ) 处理的 MG-63 细胞, 与对照组 (0  $\mu\text{M}$ ) 相比, 其凋亡细胞的比率明显升高 ( $P < 0.05$ ); 盐霉素 (2  $\mu\text{M}$  和 4  $\mu\text{M}$ ) 还可明显上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 等表达水平, 并同时下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平 ( $P < 0.05$ ). **结论** 盐霉素能有效抑制人骨肉瘤细胞 MG-63 的增殖, 促进其凋亡, 其作用机制可能与调节凋亡相关蛋白的表达有关.

**[关键词]** 骨肉瘤; 盐霉素; 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]** 2095 - 610X (2014) 07 - 0059 - 04

## Effect of Salinomycin on the Proliferation and Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line MG-63

ZHANG Jian<sup>1)</sup>, LI Bin<sup>2)</sup>, ZHAO Yang-xue<sup>1)</sup>, LI De - cheng<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Orthopedics, The Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an Shanxi 710054; 2) School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shanxi 710061, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of salinomycin on the proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell line MG-63 and the underlying mechanism. **Methods** MTT assay was used to determine the effect of salinomycin on the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of MG-63 cell under salinomycin treatment. The protein expressions of apoptosis-related protein Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in MG-63 cells under salinomycin treatment were evaluated by Western blot. **Results** The results showed that the treatment with salinomycin suppressed the growth of MG-63 cells in a time and concentration dependent manner; the apoptosis rate of MG-63 cells under salinomycin (2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ ) treatment was remarkably increased as compared with that in the control group (0  $\mu\text{M}$ ). In addition, Western blot results showed that the expressions of pro-apoptosis proteins Bax and Caspase-3 were significantly up-regulated under salinomycin (2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ ) treatment ( $P < 0.05$ ); and the anti-apoptosis protein Bcl-2 was down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Salinomycin can inhibit the proliferation and induce apoptosis of human osteosarcoma cell line MG-63, which may be related to regulating the apoptosis-related protein expressions.

**[Key words]** Osteosarcoma; Salinomycin; Cell proliferation; Cell apoptosis

骨肉瘤是儿童和青少年骨骼系统最常见的原发性恶性肿瘤, 约占所有原发性骨恶性肿瘤的 35%<sup>[1]</sup>. 股骨远端、胫骨近端是骨肉瘤的好发部位, 约占所有发病部位的三分之二左右. 由于其恶性程度高、

发展迅速, 常早期出现肺、脑等远处转移, 因此患者的预后较差<sup>[2]</sup>. 早期发现并积极手术是治疗骨肉瘤的有效方法, 但由于早期缺乏肿瘤预警信号, 多数患者在诊断时已出现转移. 近年来, 随着对辅助

**[基金项目]** 陕西省卫生厅科研基金资助项目 (2012D19)

**[作者简介]** 张健 (1978~), 男, 山东聊城市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事骨科临床工作.

化疗和新辅助化疗技术的广泛开展与应用,骨肉瘤患者 5 a 生存率已提高到 70%,较之前大为改善。但是,现有化疗药物毒副反应大,长期用药导致对机体的毒副作用以及肿瘤细胞耐药成为近年来困扰临床医生的又一难题<sup>[1]</sup>。随着医学研究的深入,人们逐渐认识到骨肉瘤等肿瘤细胞具有增殖活跃和抵抗凋亡等特征,这些特性在在肿瘤快速进展及抵抗放疗过程中起着重要作用。因此如何抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡成为肿瘤治疗中的新问题,并越来越引起临床医生和肿瘤研究者的关注及重视。寻找新型的、高效低毒又经济的抗人骨肉瘤药已成为当今骨肉瘤治疗研究的热点。

近年来,盐霉素在肿瘤研究领域受到较多的关注<sup>[2]</sup>。盐霉素属于离子型载体抗生素,最初是在白色链霉菌中发现的,其发挥抗菌作用的机制是通过与细胞中的阳离子结合并起中和作用,是它能够发挥杀菌作用的前提。近年来的研究显示,盐霉素对肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌、胰腺癌等多种肿瘤具有生长抑制作用。然而,盐霉素是否可以抑制骨肉瘤的生长,目前尚未见报道。本研究就盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖、凋亡的影响及可能的作用机制进行探讨,为盐霉素应用于人骨肉瘤治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人骨肉瘤 MG-63 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。MG-63 贴壁生长于 RPMI-1640 培养液(含

10%新生牛血清、青霉素 100 μg/mL、链霉素 100 μg/mL),在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 的潮湿培养箱内培养。当生长至 80% 融合时将细胞用胰酶消化传代。本实验中所用细胞均处于对数生长期。MTT 试剂盒、盐霉素(S4526)、DMSO 等购自美国 Sigma 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司;RPMI-1640 培养液购自美国 Hyclone 公司;新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;兔抗 Bax、兔抗 Caspase-3 及兔抗 Bcl-2 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司,抗 β-actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国 Bioworld 公司,RIPA 蛋白裂解液购自南京碧云天生物科技有限公司。

### 1.2 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期的人骨肉瘤 MG-63 细胞以  $4 \times 10^4$ /mL 的细胞密度接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μL,待细胞贴壁后,加入无血清的培养基饥饿 12 h 后弃去培养液,并加入 200 μL 含不同浓度盐霉素(0 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM、4 μM、8 μM)的无血清 RPMI-1640 培养液,其中 0 μM 浓度组为对照组,每组设 5 个复孔。细胞生长 24 h 和 48 h 时,弃上清后,每孔加 200 μL 新配制的 MTT 溶液(5 mg/mL),37℃ 继续孵育 4 h,离心弃上清,每孔加入 150 μL DMSO。震荡混匀后用酶标仪于 492 nm 波长处进行吸光度(OD 值)测定,计算不同时间、不同浓度的盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖抑制率。用以下公式计算增殖抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD}_{492} - \text{实验组 OD}_{492}}{\text{对照组 OD}_{492}} \times 100\%$$

以上实验重复 3 次以上。

### 1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的人骨肉瘤 MG-63 细胞以  $5 \times 10^5$ /mL 的细胞密度接种于 6 孔培养板中,每孔 2 mL,待细胞贴壁后加入无血清的培养基饥饿 12 h,弃去培养液后加入 2 mL 含不同浓度盐霉素(0 μM、2 μM、4 μM)的无血清 RPMI-1640 培养液,以 0 μM 浓度组为对照组。处理细胞 48 h 后,胰酶消化后离心收集每组细胞,PBS 洗 2 次后用 PBS 重悬细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /mL,在细胞悬液中加入 10 μL Annexin V-FITC,轻轻摇匀后于 4℃ 避光条件下孵育 15 min,再加入 20 μL 碘化丙啶(PI)后轻轻摇匀,于上述条件下再次避光孵育 30

min,在 1 h 内上流式细胞仪检测。

### 1.4 Western Blot 检测

将人骨肉瘤 MG-63 细胞按  $1 \times 10^6$  瓶接种于培养瓶中培养过夜,待细胞贴壁后加入无血清的培养基饥饿细胞 12 h 后,弃去培养液,实验组加入含盐霉素(终浓度为 2 μM 和 4 μM)的无血清 RPMI-1640 培养液,对照组加入等体积不含盐霉素的无血清 RPMI-1640 培养液。继续培养 48 h 后,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,加热变性后将蛋白置于 -20℃ 保存。取 150 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将凝胶中蛋白以半干转膜法转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭滤膜 2 h,加一抗稀释液(1:5 000)4℃ 孵育过

夜, PBST 缓冲液洗膜后加入二抗稀释液 (1:5000), 室温孵育 2 h, PBST 缓冲液再次洗膜后, 采用化学发光法 (ECL) 曝光胶片, 冲洗显色检测相应蛋白条带.

### 1.5 统计学方法

用 SPSS 软件进行分析, 计量资料以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的影响

用不同浓度的盐霉素 (0  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、2  $\mu\text{M}$ 、4  $\mu\text{M}$ 、8  $\mu\text{M}$ ) 干预人骨肉瘤 MG-63 细胞, 分别在干预后 24 h、48 h 用 MTT 法检测细胞的增殖情况. 如图 1 所示, 经 0.5 ~ 8  $\mu\text{M}$  的盐霉素处理后, MG-63 细胞的生长出现不同程度的抑制, 并且呈现出浓度及时间依赖效应. 与对照组 (0  $\mu\text{M}$  盐霉素干预组) 相比, 结果具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 以上结果显示, 盐霉素可以有效抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖, 并呈浓度和时间依赖性.

### 2.2 盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响

人骨肉瘤经盐霉素 (0  $\mu\text{M}$ 、2  $\mu\text{M}$ 、4  $\mu\text{M}$ ) 干预 48 h 后, 运用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况 (图 2). 结果显示, 对照组 (0  $\mu\text{M}$  盐霉素处理组) 的细胞经过 48 h 后, 细胞的凋亡率为 (9.20  $\pm$  1.18) %, 而 2  $\mu\text{M}$  及 4  $\mu\text{M}$  盐霉素干预组细胞的凋亡率分别为 (29.25  $\pm$  4.25) %、(43.30  $\pm$  4.50) %, 凋亡率明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ). 以上结果显示, 盐霉素可以有效诱导人骨肉瘤细胞凋亡, 且凋亡细胞比例随着盐霉素浓度的升高而增加.

### 2.3 盐霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡相关蛋白的影响

采用不同浓度的盐霉素 (0  $\mu\text{M}$ 、2  $\mu\text{M}$ 、4  $\mu\text{M}$ ) 干预人骨肉瘤 MG-63 细胞 48 h 后, 提取细胞总蛋白进行 Western blot 检测. 结果显示, 与对照组 (0  $\mu\text{M}$  盐霉素干预组) 相比, 2  $\mu\text{M}$  及 4  $\mu\text{M}$  盐霉素干预均能明显抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 但以 4  $\mu\text{M}$  抑制作用更为明显, 与对照组相比, 结果有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 与此同时, 在 2  $\mu\text{M}$  及 4  $\mu\text{M}$  盐霉素干预下, MG-63 细胞的促凋亡蛋白 Bax 及 Caspase-3 的表达水平均显著升高, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但以 4  $\mu\text{M}$  的作用浓度更为明显 (图 3). 以上结果提示, 盐霉素诱

导人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡可能是通过抑制抗凋亡蛋白表达, 提高促凋亡相关蛋白表达而实现的.

## 3 讨论

肿瘤的发生发展是一个多步骤、多阶段、多因素共同参与的复杂过程. 正常情况下, 细胞的增殖与凋亡之间保持着一种动态平衡, 这种平衡是维系生物个体稳态的重要因素. 而肿瘤细胞的基因发生突变或表达异常, 正是这些改变赋予肿瘤细胞异质性, 表现为不受控制地过度增殖增殖和凋亡抑制<sup>[5]</sup>. 因此, 抑制肿瘤细胞增殖, 诱导其细胞凋亡是

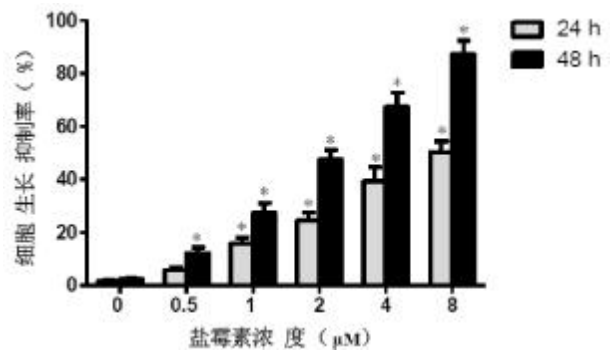


图 1 盐霉素对 MG-63 细胞增殖影响

Fig. 1 The effects of salinomycin on MG-63 cell proliferation

与未处理组 MG-63 细胞比较, \* $P < 0.05$ .

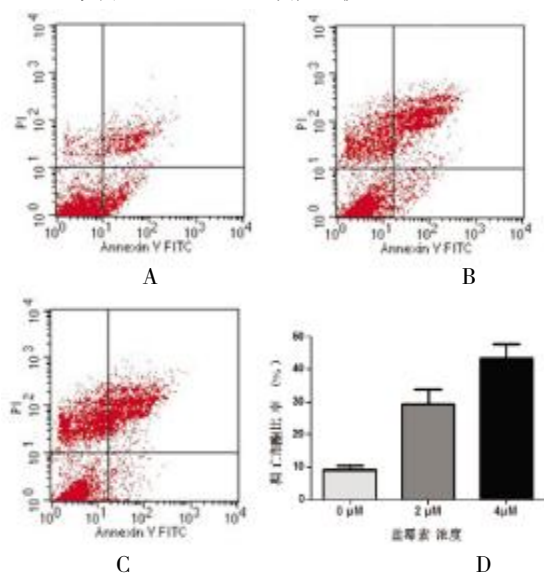


图 2 流式细胞仪分析不同浓度盐霉素对 MG-63 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Influence of different concentration of salinomycin on the apoptosis of MG-63 by flow cytometry

A: 0  $\mu\text{M}$  盐霉素组; B: 2  $\mu\text{M}$  盐霉素组; C: 4  $\mu\text{M}$  盐霉素组; D: 凋亡细胞比率统计图.

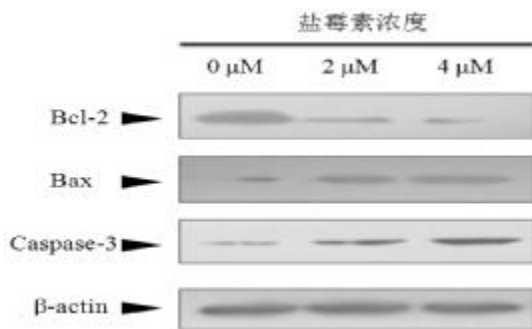


图 3 Western blot 检测盐霉素对 MG-63 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 3 The effects of salinomycin on apoptosis - related proteins expression in MG-63 cell was detected by Western blot

抑制肿瘤生长的主要策略之一。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡，是细胞在遭受过度不良刺激时，为保持自身组织稳定而主动启动的主动性死亡过程，该过程受到严格的程序性调控。多个基因参与凋亡过程的执行和调节。其中，bax 是一个极重要的诱导细胞凋亡基因，由该基因编码的蛋白 Bax 可与抗凋亡蛋白 Bcl-2 形成异二聚体，阻抑 Bcl-2 发挥作用，从而诱导细胞发生凋亡<sup>[6]</sup>。研究发现 Bax/Bcl-2 两蛋白之间的比例关系是决定细胞凋亡与否的关键因素。当各种因素或药物诱导 Bax 上调或抑制 Bcl-2 表达时，Bax/Bcl-2 比例升高，细胞倾向于发生凋亡。半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶（Caspases）是执行哺乳动物细胞凋亡的主要蛋白酶家族。其中 Caspase-3 是 Caspase 家族最重要的凋亡执行者<sup>[7]</sup>。本研究证实了盐霉素可以有效诱导 Bax 和 Caspase-3 表达，抑制 Bcl-2 蛋白表达，从而起到抑制骨肉瘤细胞增殖、促进骨肉瘤细胞凋亡的作用。

多项研究表明盐霉素具有抗肿瘤作用并有可能作为一种新型抗肿瘤制剂<sup>[8-10]</sup>。研究发现盐霉素能促进卵巢癌细胞凋亡，并呈现浓度剂量效应。此外，盐霉素可以提高了卵巢癌细胞中 p38 蛋白的磷酸化，从而抑制卵巢癌细胞的生长及异种移植<sup>[11]</sup>。在乳腺癌中，盐霉素显示出较好的抑癌作用，并且盐霉素的抗癌作用明显优于常规化疗药物紫杉醇<sup>[12]</sup>。据报道，盐霉素能对人结直肠癌细胞 HT29 和 SW480 中具有干细胞特征的 CD133 阳性的细胞亚种群起到靶向杀伤作用<sup>[13]</sup>。本研究证实盐霉素可以浓度依赖性抑制人骨肉瘤细胞增殖，并诱导其凋亡，且该作用可能是通过调节凋亡相关蛋白

的表达而实现的。总之，盐霉素在不同起源的人类癌症细胞中均能诱导巨大的细胞凋亡，调控凋亡相关蛋白的表达可能是其发挥作用的主要机制之一。因此盐霉素骨肉瘤的临床治疗中具有潜在的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] PICCI P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). Orphanet J Rare Dis, 2007;2:6.
- [2] MIRABELLO L, TROISI R J, SAVAGE S A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program [J]. Cancer, 2009, 115(7):1 531 - 1 543.
- [3] FERNANDEZ-PINEDA I, BAHRAMI A, GREEN J F, et al. Isolated subcutaneous metastasis of osteosarcoma 5 years after initial diagnosis [J]. J Pediatr Surg, 2011, 46 (10): 2 029 - 2 031.
- [4] 张鹰, 王毅. 盐霉素抗肿瘤作用研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(15):2 986 - 2 988.
- [5] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646 - 674.
- [6] 黄永红, 熊丽霞, 周晓燕, 等. 大蒜素调节 Bcl-2/Bax 促进宫颈癌 U14 细胞凋亡的研究[J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 53(6):8 - 24.
- [7] 董雅洁, 高维娟. bcl-2、bax、caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32 (21): 4 828 - 4 830.
- [8] 石俊杰, 王哲, 李阳, 等. 盐霉素对人肺腺癌 A549 细胞株生物学特性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(8):1 592 - 1 594.
- [9] 赵月, 沈娜, 任精华, 等. 盐霉素对乳腺癌转移的抑制作用[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30 (8): 1 635 - 1 637.
- [10] 孙秀梅, 高峰, 刘子凤. 盐霉素对结肠癌干细胞特性的抑制作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2013, 51(9): 40 - 44.
- [11] ZHANG B, WANG X, CAI F, et al. Effects of salinomycin on human ovarian cancer cell line OV2008 are associated with modulating p38 MAPK [J]. Tumour Biol, 2012, 33 (6):1 855 - 1 862.
- [12] GUPTA P B, ONDER T T, JIANG G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009, 138(4):645 - 659.
- [13] DONG T T, ZHOU H M, WANG L L, et al. Salinomycin selectively targets 'CD133+' cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(6): 1 797 - 1 804.

(2014-02-14 收稿)