

洛铂对骨肉瘤MG-63细胞增殖、凋亡的影响及其机制



冯和林¹, 郑丽华², 赵亚恒², 李增怀¹, 褚彦青¹, 冯建刚¹, 吴宏增¹, 单保恩³

Effects of Lobaplatin on Proliferation and Apoptosis of Osteosarcoma MG-63 Cells and Its Mechanism

FENG Helin¹, ZHENG Lihua², Zhao Yaheng², LI Zenghuai¹, CHU Yanqing¹, FENG Jian'gang¹, WU Hongzeng¹, SHAN Baoen³

1. Department of Orthopedics, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Graduate School of Hebei Medical University; 3. Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University and Hebei Cancer Institute

Corresponding Author: SHAN Baoen, E-mail: baoenshan@hotmail.com

Abstract: Objective To study the effects of lobaplatin on the proliferation and apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells and the mechanism of its function. **Methods** MG-63 cells in log phase were divided into control group and experimental groups. Experimental groups were treated with different concentrations of lobaplatin (2, 4 and 8 μg/ml). MTT colorimetry and flow cytometry were used to detect the effects of lobaplatin on cellular morphology change, cell growth, cell cycle, and the induction of apoptosis in MG-63 cells. Cell growth curves were studied at different concentrations of lobaplatin. Western blot was used to detect the effects of lobaplatin on the expression of Bcl-2 in MG-63 cells. **Results** Lobaplatin could inhibit the growth or proliferation and increase the apoptosis of osteosarcoma cell line MG-63 in a dose- and time-dependent manner. Bcl-2 protein level was decreased after lobaplatin treatment. **Conclusion** The effects of lobaplatin on the proliferation, the apoptosis and changing the cell cycle change of MG-63 cells might be related to its inhibition on Bcl-2 protein expression.

Key words: Lobaplatin; Osteosarcoma; MG-63 cells; Apoptosis; Bcl-2

摘要: 目的 探讨洛铂对骨肉瘤MG-63细胞增殖与凋亡的作用及其机制。方法 取对数生长期的MG-63细胞进行实验, 分为对照组和实验组(加入不同浓度洛铂: 2、4和8 μg/ml)。采用噻唑盐(MTT)比色法、流式细胞技术(FCM)检测洛铂对MG-63细胞的形态改变、生长及增殖抑制、细胞周期阻滞和细胞凋亡诱导等作用, 并绘制不同浓度时MG-63细胞的生长曲线, 应用Western blot的方法分析洛铂对MG-63细胞的Bcl-2蛋白表达的影响。结果 洛铂能够抑制MG-63细胞的生长、增殖并诱导其凋亡, 并呈浓度和时间依赖效应。Western blot检测结果显示洛铂可使MG-63细胞Bcl-2蛋白表达下降。结论 洛铂能显著抑制MG-63细胞增殖, 诱导细胞凋亡和细胞周期变化, 可能与调节MG-63细胞Bcl-2蛋白的表达有关。

关键词: 洛铂; 骨肉瘤; MG-63细胞; 凋亡; Bcl-2

中图分类号: R738.1 文献标识码: A

0 引言

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)来源于初始的间质细胞, 原发于骨组织, OS是骨组织最常见的原

发性恶性肿瘤, 恶性度很高并且青少年多发^[1]。在15~19岁之间的青少年人中发生率最高, 常伴有病理性骨折、顽固性骨痛、脊髓及周围神经压迫症状。目前OS的治疗主要是辅助化疗结合手术。铂类药物在其化疗中有着非常重要的作用, 第3代铂类药物洛铂(Lobaplatin, LBP)的抗肿瘤效果与顺铂(DDP)和卡铂(CAP)相当甚至更好, 不良反应更低, 且与DDP无交叉耐药, 已经用于多种恶性肿瘤的治疗。本研究选取LBP作用于MG-63细胞, 采用MTT比色法、流式细胞技术检测、Western blot等方法分析LBP对MG-63细胞的增殖抑

收稿日期: 2013-02-21; 修回日期: 2013-06-20

基金项目: 河北省科技厅支撑课题资助项目(11276156)

作者单位: 1. 050011石家庄, 河北医科大学第四医院骨科; 2. 河北医科大学研究生学院; 3. 河北医科大学第四医院科研中心 河北省肿瘤研究所

通信作者: 单保恩, E-mail: baoenshan@hotmail.com

作者简介: 冯和林(1978-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事骨肿瘤研究与诊治工作

制、细胞周期阻滞、细胞凋亡诱导等作用,在分子和细胞水平初步探讨其可能的作用机制,从而为LBP在OS化疗中的应用提供相应的理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

MG-63细胞株购自中科院上海细胞库,CO₂培养箱(EL312e)购自美国,96孔细胞培养板购自上海研拓生物科技有限公司,酶联免疫检测仪购自上海京工实业有限公司,FACS-420型流式细胞仪购自美国Becton Dickinson公司,兔抗人Bcl-2一抗购自上海亿欣生物试剂公司,羊抗兔二抗购自南京生兴生物技术有限公司,倒置相差显微镜购自日本尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MG-63细胞株在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下,用含10%灭活小牛血清的RPMI 1640全培养液培养,每2~3天传代1次。实验均取对数生长期细胞,调整细胞浓度为(0.5~1)×10⁴/ml。接种细胞24 h进入对数生长期后开始加药。

1.2.2 实验分组及用药情况

将MG-63细胞接种于25 ml细胞培养瓶中,加入RPMI 1640细胞培养液4 ml,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中培养24~48 h后倒掉培养液,加入0.25%胰蛋白酶消化液1~2 ml,消化约5~7 min,弃去消化液,并制成单细胞悬液,调整细胞密度为1×10⁴/ml,接种于96孔细胞培养板中。然后随机分为A、B两组,A组:为对照组(单细胞悬液+同等体积的0.9% NaCl);B组:洛铂处理组,设3个浓度梯度,加入药物浓度分别为2、4、8 μg/ml。以上各组分别设3个复孔。置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中培养48 h。培养期间注意观察培养液性状,如有必要则换液一次并分别加入浓度为2、4、8 μg/ml的药物,同时对对照组也换液一次并加入等体积0.9% NaCl。

1.2.3 观察细胞形态学变化

将密度为1×10⁴/ml的细胞悬液接种到无菌96孔细胞培养板上,设不同浓度的实验组和对照组,每组3个复孔,共计12孔,每孔加入100 μl细胞悬液置培养箱内培养24 h。待细胞贴壁生长后再更换培养液,并加入不同浓度的洛铂,对照组加入同等体积的0.9% NaCl,继续培养48 h后,光学显微镜下观察细胞形态学改变。

1.2.4 测定并绘制细胞生长曲线

按1×10⁴/孔的密度将MG-63细胞悬液接种到无菌96孔细胞培养板上,培养箱内培养24 h,更换培养液。按实验分组加入不同浓度的洛铂,每24 h取3孔进行细胞计数,连取7天,取其平均值绘制细胞生长曲线。

1.2.5 细胞增殖抑制实验

采用MTT比色法检测细胞增殖抑制情况。取对数生长期细胞,经消化后制备成浓度为1×10⁴/ml的细胞悬液,按实验分组情况接种到无菌96孔细胞培养板上,每孔加入细胞悬液100 μl,每组设3个复孔。于细胞培养箱内培养24 h,待细胞贴壁后更换培养液,并按照实验设计,实验组加入不同浓度的洛铂溶液,对照组加入同等体积的0.9% NaCl。继续放入培养箱内培养,并按时间梯度(24、48、72 h)依次采集细胞,每孔加入MTT溶液20 μl(5 mg/ml),继续培养4 h后吸弃培养孔内的上清液,然后每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,振荡10 min,使蓝紫色结晶物充分溶解。于酶联免疫检测仪上,选择490 nm波长,测定各孔光吸收值(A值),计算细胞生长率=(A_{实验组}-A_{对照组})/A_{对照组}×100%,对比各组的细胞生长率差异。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

采用碘化丙啶(propidium Iodide, PI)一步插入法DNA定量荧光染色法。将实验组不同药物浓度干预下的细胞制备成单细胞悬液并用70%的乙醇固定,冰浴30 min。每份待测样本中加入预先配置的DNA荧光染液1 ml,置4℃冰箱内染色30 min,调整每份样本的细胞数为1×10⁶/ml,上机检测前去除样本中70%的乙醇。应用FACS-420型流式细胞仪检测、分析样本的细胞凋亡率和细胞周期,每份样本检测1×10⁵个细胞,每组检测3个样本并重复3遍。细胞DNA周期则通过B.D公司提供的流式细胞分析软件,计算出细胞周期各时相分布的百分比,依据细胞时相分布计算出细胞增殖指数(PI),公式为:PI=[(S+G₂/M)/(G_{0/1}+S+G₂/M)]×100%。

1.2.7 Western blot检测Bcl-2蛋白表达

取处于对数生长期的MG-63细胞,0.25%胰酶消化后用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液调整细胞浓度为1×10⁴/ml,将细胞悬液加入100 ml培养瓶中培养。实验分给药组、空白对照组。培养24 h后,给药组加入浓度分别为2、4和8 μg/ml的洛铂,空白对照组加入等体积0.9% NaCl,继续培养48 h。

用Bradford法测定蛋白含量,取50 μg蛋白用12%的分离胶和5%的浓缩胶进行SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕后,用半湿转膜50 mA电转2 h将蛋白转移到NC膜上。取出膜用含3% BSA的TTBS 4℃封闭过夜。TTBS洗膜3次,每次5 min,加1:250稀释的兔抗人Bcl-2一抗,杂交3 h后TTBS洗膜3次,每次5 min,然后加碱性磷酸酶标记的1:7 500稀释的羊抗兔二抗,2 h后取出膜,TTBS洗3次,每次5 min。加入显色剂闭光显色,显色后凝胶成像系统照相并用分析软件对蛋白含量进行定量。提取6次不同的样本,重复实验6次。数据以空白对照组为100%,计算各个样品相对于空白对照组蛋白含量的百分率,进行统计和方差分析。

1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0统计学软件t检验、单因素多本比较的方差分析进行统计学处理。Levene方差齐性检验结果 $P > 0.05$ 可认为样本方差齐,检验水准 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 洛铂对MG-63细胞形态学的影响

经不同药物浓度的洛铂溶液作用细胞48 h后,于倒置相差显微镜下进行观察可见:对照组细胞生长状态良好,密度较大,细胞长势旺盛,贴壁性好。细胞透明,呈梭形或多边形,细胞内颗粒较少,细胞核可见,见图1A;实验组细胞生长状态较差,密度显著减小,贴壁性不佳,对数期细胞含量少,漂浮细胞含量明显增多。肿瘤细胞回缩呈圆形或类圆形,细胞间隙增大,细胞膜折光性增强,胞质浑浊,颗粒感增强,细胞核固缩,甚至可见部分细胞裂解,见图1B~1D。上述现象随洛铂浓度的增加更见明显。

2.2 洛铂对MG-63细胞生长的影响

不同剂量的洛铂作用于MG-63细胞后,每天取一组细胞,经倒置相差显微镜计数,连续观察7

天,并绘制细胞生长曲线。结果显示,与对照组相比较实验组细胞的增殖受到明显的抑制,并且这种抑制现象随着洛铂药物剂量的增加与作用时间的延长而显著增强,见图2。

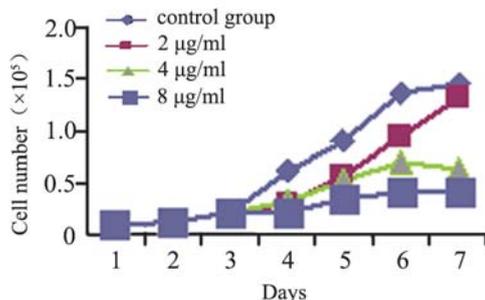


图2 不同剂量的洛铂作用MG-63细胞7天后的生长曲线 (n=84,s=0.076)

Figure2 Growth curves of MG-63 cells treated by different doses of Lobaplatin for 7 days (n=84,s=0.076)

2.3 洛铂对MG-63细胞增殖的影响

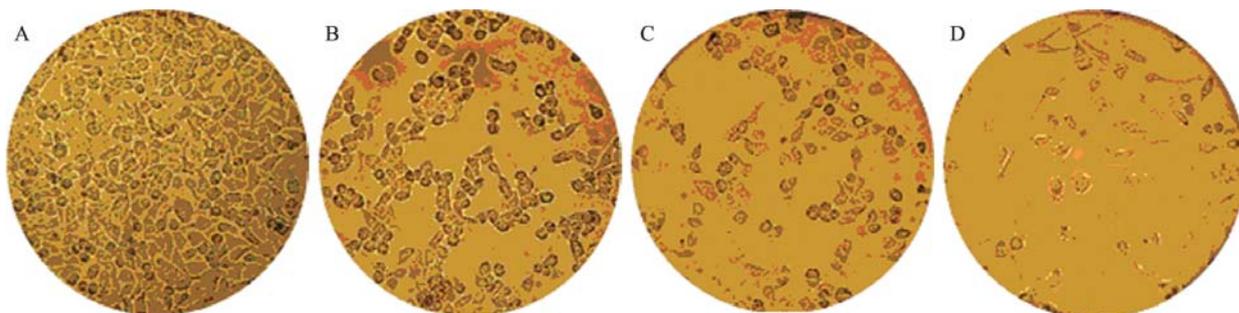
采用MTT法测定细胞增殖抑制率。对照组细胞正常生长,不同药物剂量洛铂作用相同时间以及相同药物剂量作用不同时间的实验组细胞生长均受到不同程度的抑制。不同药物剂量洛铂(2、4、8 μg/ml)作用相同时间, MG-63细胞增殖抑制率存在差异,且各组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$),随药物浓度的增加细胞增殖抑制率逐渐增大,与对照组相比较差异均有统计学意义,且实验组之间差异也有统计学意义($P < 0.05$),见表1。体现了洛铂能够抑制MG-63细胞增殖,且呈浓度和时间依赖效应。

表1 MTT比色法分析洛铂在MG-63细胞增殖中的作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table1 Effects of Lobaplatin on the proliferation of MG-63 by MTT colorimetric method (OD) ($\bar{x} \pm s$)

Lobaplatin	24 h	48 h	72 h
0 μg/ml	0.494±0.016	0.765±0.013	1.035±0.036
2 μg/ml	0.466±0.011* [△]	0.687±0.017* [△]	0.830±0.023* [△]
4 μg/ml	0.432±0.020* [△]	0.560±0.028* [△]	0.605±0.022* [△]
8 μg/ml	0.365±0.010* [△]	0.394±0.005* [△]	0.429±0.019* [△]

Notes: * $P < 0.05$; [△] $P < 0.05$



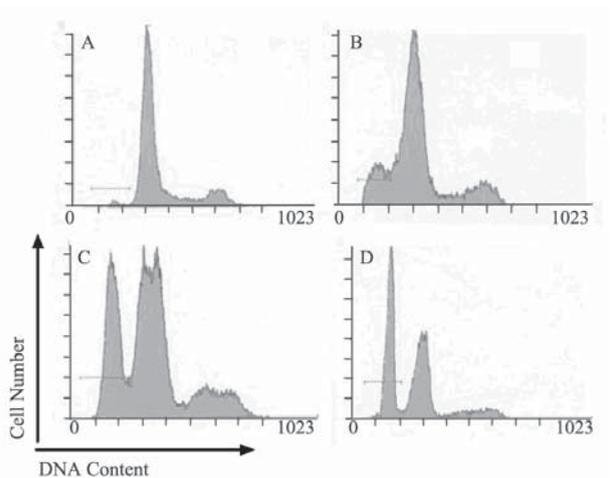
A:control group; B,C and D:treated with lobaplatin at 2,4 and 8 μg/ml,respectively

图1 洛铂作用MG-63细胞48 h后的细胞学形态改变 (10×10)

Figure1 Morphological changes of MG-63 cells treated by Lobaplatin for 48h (10×10)

2.4 洛铂对MG-63细胞周期、凋亡及凋亡相关基因表达的影响

经不同药物浓度的洛铂作用的各组细胞上机后均可检测到亚G₁期细胞（凋亡细胞），见图3B~3D，而对照组细胞则未见细胞凋亡峰，见图3A。2、4、8 μg/ml洛铂均可诱导MG-63细胞凋亡，与对照组比较差异均有统计学意义（*P* < 0.05），不同剂量的洛铂组间进行比较，差异有统计学意义（*P* < 0.05），见表2。



A:control group; B,C and D:treated with lobaplatin at 2,4 and 8μg/ml respectively

图3 流式细胞术检测MG-63细胞应用洛铂处理48 h后的细胞凋亡情况

Figure3 Effects of Lobaplatin on the apoptosis of MG-63 cells detected by FCM for 48 h

表2 流式细胞术检测洛铂处理48 h后对MG-63细胞周期的影响 (x̄±s)

Table2 Effects of Lobaplatin on cell cycle in MG-63 by FCM for 48 h (x̄±s)

Lobaplatin (μg/ml)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
0	55.60±0.82	28.80±0.75	15.90±1.01	45.37±1.12
2	57.40±0.60 [△]	27.13±0.91 [△]	15.47±0.40 ^{*△}	41.60±0.60 [△]
4	68.23±2.01 ^{*△}	7.05±1.10 ^{*△}	24.73±3.11 ^{*△}	36.53±1.11 ^{*△}
8	72.33±2.50 ^{*△}	6.68±0.50 ^{*△}	21.19±2.60 ^{*△}	27.68±2.47 ^{*△}

Notes:^{*}:*P*<0.05;[△]:*P*<0.01

检测凋亡相关基因Bcl-2的表达。经不同药物浓度的洛铂作用各组细胞48 h后，用Western blot检测结果显示：随洛铂剂量不断增加，Bcl-2蛋白表达量逐渐降低，见图4。

3 讨论

OS的发病率逐渐上升，其治疗效果欠佳。而且OS有较高的转移率，大约20%的患者在初次诊断OS时已发生了肺转移，另外40%的患者稍晚发

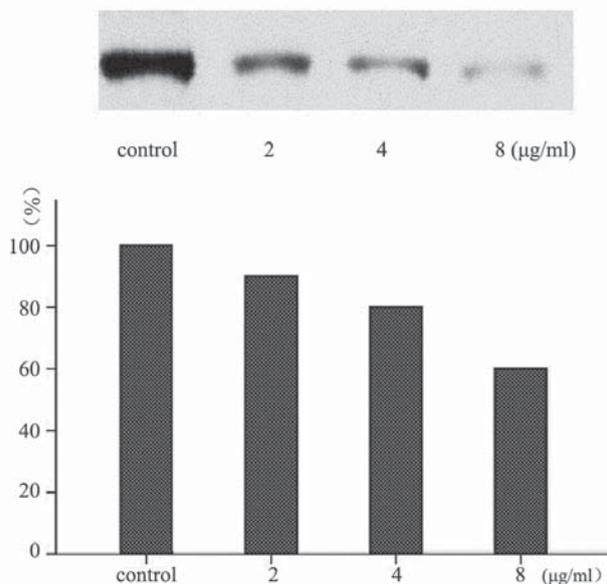


图4 蛋白印迹技术分析洛铂处理48 h后Bcl-2的表达水平(x̄±s)
Figure4 Effects of Lobaplatin on the expression of Bcl-2 in MG-63 detected by Western blot for 48h (x̄±s)

生转移。其中80%的患者发生肺转移，另外转移瘤容易对常规的化疗产生耐药性^[2]。LBP是第三代铂类抗癌新药，其抗肿瘤作用机制是通过形成Pt-GG和Pt-AG链内交叉连接，阻碍DNA的复制和转录过程，从而干扰肿瘤细胞周期的运行，还能使DNA模板失活，从而使DNA聚合酶不能发挥其催化作用，对细胞周期中各期均有不同程度的影响。

LBP是德国ASTA公司研发的第三代铂类药物，化学名为1，2-二氨甲基-环丁-乳酸合铂，其对多种动物和人的肿瘤细胞株有明确的细胞毒作用。第3代铂类药物LBP的抗肿瘤效果与顺铂（DDP）和卡铂（CAP）的作用更好，临床前研究显示，LBP的抗癌指数等于或高于顺铂或卡铂，不良反应较DDP、CAP低。LBP具有水溶性高、细胞毒性强、肾毒性低、胃肠道反应及骨髓抑制轻的特点，与DDP无交叉耐药^[3]。其在非小细胞肺癌及乳腺癌中有较高的疗效，研究证实LBP可以克服肿瘤对DDP、CAP的耐药性^[4]，因此对于耐DDP的OS可以应用LBP进行进一步治疗，而且与其他抗肿瘤药物联合应用时其不良反应可以耐受^[5]。

凋亡异常与恶性肿瘤的发生、发展和预后密切相关，通过形态学观察、流式细胞术和Western blot等检测来分析不同LBP浓度干预下MG-63细胞的凋亡、相关蛋白表达以及细胞周期的变化。本实验形态学观察显示，LBP促进MG-63细胞裂解凋亡。流式细胞仪检测显示MG-63细胞凋亡率随LBP浓度的增加而增大，MG-63细胞存活细胞数量与

LBP剂量具有明显浓度梯度依赖关系。Western blot显示:Bcl-2蛋白表达量随洛铂剂量不断增加而逐渐降低,从而促进MG-63细胞凋亡。细胞周期分析显示,不同药物浓度的LBP作用细胞48 h后,细胞G₀~G₁期与S期细胞数量明显增加,G₂~M期细胞分布百分率则表现为下降趋势。这一现象说明,LBP能够直接诱导体外培养的MG-63细胞系凋亡,而且呈现浓度依赖性。LBP作用于细胞后可以使细胞停滞在DNA合成前期,并在此期抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡。

细胞凋亡是受多种因素影响的,其中主要包括促凋亡因子(Pro-Apoptotic)和抗凋亡因子(Anti-Apoptotic)^[6]。目前已经证实的促凋亡基因有c-myc、c-myb、P53、Fas等;抗凋亡基因主要有Bcl-2、Bcl-x_L等;Takayama等^[7]报道Bcl-2是许多生理性细胞凋亡的关键性调节因子,在细胞凋亡的内源性共用通道调节上起到至关重要的作用。其过度表达可以减少细胞凋亡,使机体引发增殖性疾病或恶性肿瘤。多项研究表明,在恶性肿瘤中高表达Bcl-2与其不良预后有关,体外实验证明,肿瘤细胞高表达Bcl-2导致化疗及放疗抵抗^[8]。当进行化疗或放疗时,肿瘤细胞不是因此凋亡而是基因变得不稳定,肿瘤细胞凋亡失控缘于Bcl-2家族蛋白高表达,因此用药物干预Bcl-2途径能够获得满意临床效果^[8]。目前临床常用的化疗药物许多都是通过降低Bcl-2蛋白的表达来诱导细胞凋亡。大量研究表明化疗能通过线粒体途径对体外培养的肿瘤细胞下调Bcl-2蛋白促进肿瘤细胞凋亡^[9-11]。实验通过Western blot检测显示LBP在体外可使MG-63细胞凋亡抑制基因Bcl-2表达减弱。这一现象表明,LBP在体外促进MG-63细胞凋亡的机制之一可能是通过抑制抗凋亡基因Bcl-2的表达来实现的。

在本实验研究中,无论是形态学观察还是流式细胞术检测,结果均显示在体外LBP能够明显促进MG-63细胞凋亡、抑制MG-63细胞增殖以及改变MG-63细胞周期,且呈浓度和时间依赖性,这表明LBP可能在OS治疗方面具有一定作用。缘于实验时间及实验条件的限制,本研究未能进行动物模型实验和人体临床试验,但在MG-63细胞系中LBP已显示出了抗OS细胞增殖、促OS细胞凋亡

的独特优势,因此LBP在OS中的作用需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhao YH,Feng HL,Zheng LH,*et al.*Progress on osteosarcoma pathogenesis[J].Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2014,41(3):283-6.[赵亚恒,冯和林,郑丽华,等.骨肉瘤发病机制的研究进展[J].肿瘤防治研究,2014,41(3):283-6.]
- [2] Hughes DP. Strategies for the targeted delivery of therapeutics for osteosarcoma[J]. Expert Opin Drug Deliv,2009,6(12):1311-21.
- [3] Lai SQ, Xu M. Antineoplastic lobaplatin[J]. Shi Jie Lin Chuang Yao Wu,2005,26(5):315. [赖树清,须媚.抗肿瘤药洛铂[J].世界临床药物,2005,26(5):315.]
- [4] Zhao S, Yang GL, Lv YQ, *et al.* The initial approach to the effect of lobaplatin on lung cancer cell line A549[J]. Lin Chuang Zhong Liu Xue Za Zhi,2011,16(1):14-8. [赵珊,杨光磊,吕英谦,等.洛铂对肺癌A549细胞作用的初步探讨[J].临床肿瘤学杂志,2011,16(1):14-8.]
- [5] Yang LQ, Qin SK, Qian J, *et al.* Clinical study of lobaplatin combined with fluorouracil and leucovorin for advanced esophageal carcinoma [J]. Lin Chuang Zhong Liu Xue Za Zhi,2006,11(12):895-7,900. [杨柳青,秦叔逵,钱军,等.洛铂联合氟尿嘧啶、氟尿嘧啶治疗晚期食管癌的临床研究[J].临床肿瘤学杂志,2006,11(12):895-7,900.]
- [6] Rougraff BT,Kneisl JS,Simon MA,*et al.*Skeletal metastases of unknown origin.A prospective study of a diagnostic strategy[J].J Bone Joint Surg Am,1993,75(9):1276-81.
- [7] Takayama S,Sato T,Krajewski S,*et al.*Cloing and functional analysis of AG-1:a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity[J].Cell,1995,80(2):279-84.
- [8] Thomas S, Quinn BA, Das SK, *et al.* Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets,2013,17(1):61-75.
- [9] Yin QH, Yan FX, Zu XY, *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2[J]. Cytotechnology,2012,64(1):43-51.
- [10] Liang CZ, Zhang JK, Shi Z, *et al.* Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2[J]. Cancer chemother and pharmacol, 2012,69(2):317-31.
- [11] Chang C, Zhu Y, Tang X, *et al.* The anti-proliferative effects of norcantharidin on human HepG2 cells in cell culture[J]. Mol Biol Rep,2011,38(1):163-9.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]