

二氢青蒿素对人成骨肉瘤MG-63细胞凋亡的诱导作用

马玉樊¹ 卢婷利¹ 王韵晴¹ 赵 雯¹ 梅其炳¹ 陈 涛^{1,2,3*}

(¹空间生物实验模拟技术重点实验室, 西北工业大学生命学院, 西安 710072; ²陕西脂质体工程技术研究中心, 西安 710075; ³西安力邦制药有限公司, 西安 710077)

摘要 采用CCK-8细胞增殖检测、流式细胞仪、Hoechst 33258染色、细胞周期检测、细胞凋亡检测等研究了二氢青蒿素对人成骨肉瘤MG-63细胞凋亡的诱导作用。细胞增殖检测发现二氢青蒿素对MG-63细胞48 h及72 h时的50%抑制率分别为44.87 $\mu\text{mol/L}$ 和19.15 $\mu\text{mol/L}$; 细胞周期检测发现细胞生长被阻滞在G₀/G₁期; Hoechst33258染色凋亡检测发现细胞核出现致密的固缩形态及颗粒状荧光; Annexin V-FITC双染细胞凋亡检测发现二氢青蒿素对MG-63细胞的凋亡率为45.10%。表明: 二氢青蒿素可明显诱导MG-63细胞的凋亡, 并且MG-63细胞的凋亡与二氢青蒿素存在剂量与时间依赖关系, 二氢青蒿素对人成骨肉瘤MG-63细胞凋亡的诱导具有显著作用, 这将为进一步研究细胞凋亡机制提供基础和实验依据。

关键词 二氢青蒿素; 人成骨肉瘤细胞; 细胞凋亡; 流式细胞术

青蒿素是我国学者在20世纪70年代初从青蒿中分离提纯出的一种有效的抗疟单体, 它是含有过氧桥结构的新型倍半萜内酯化合物, 具有快速、高效、无抗药性、低毒性的特点, 被世界卫生组织称为“治疗疟疾的最大希望”。目前, 青蒿素类药物除了用于疟疾治疗外, 还有很多研究表明它具有抗肿瘤的作用。例如: 青蒿素及其衍生物对鼠艾氏腹腔积液瘤细胞和人Hela细胞有细胞毒活性。用青蒿琥酯处理的HepG细胞可见梯状DNA和凋亡小体^[1]。Beekman等^[2]对从9种不同组织中培养的60株肿瘤细胞进行检测发现, 双氢青蒿素对白血病、黑色素瘤、结肠癌、前列腺癌和乳腺癌细胞株高度敏感, 而对非小细胞肺癌、中枢神经系统肿瘤、卵巢癌和肾癌细胞株的敏感度较低。董海鹰等^[3]研究青蒿素对体外培养的K562细胞的凋亡诱导作用及机制, 结果发现青蒿素可抑制白血病K562细胞的生长, 诱导K562细胞跨膜电位下降而导致细胞凋亡。周晋等^[4]发现青蒿素可破坏白血病细胞的细胞膜, 引起胞体膨胀和钙内流, 最终导致细胞凋亡。但是, 二氢青蒿素(DHA)对骨肉瘤细胞系是否具有抑制作用, 目前报道得很少。所以, 本研究将分别应用细胞培养、细胞计数、流式细胞仪、Hoechst 33258染色、细胞周期检测、细胞凋亡检测等技术考察二氢青蒿素对人成骨肉瘤MG-63细胞的凋亡诱导作用, 以期为进一步研究二氢青蒿素诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用机制

及治疗多种骨骼疾病提供重要基础和研究依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人成骨肉瘤MG-63细胞引自西北工业大学生命学院细胞室, MEM培养基、胎牛血清购自HyClone公司, 二氢青蒿素购自Sigma公司, Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(CCK-8)购自BestBio贝博生物, Hoechst 33258检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 凋亡诱导处理 人成骨肉瘤MG-63细胞培养在含10%胎牛血清、10⁴ U/L青霉素、10⁴ U/L链霉素及2 mmol/L L-谷氨酰胺的MEM培养基中, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。细胞培养12 h后进行不同浓度的二氢青蒿素诱导处理。

1.2.2 存活率测定 将MG-63细胞以1×10⁴/mL的浓度接种于96孔板中, 置37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 待细胞贴壁后对照组换上新鲜培养液, 处理组换上含不同浓度二氢青蒿素的培养液(浓度分别

收稿日期: 2011-07-04 接受日期: 2011-09-06

陕西省科技计划(No.200801905)和陕西省自然科学基金(No.2010JM2021)

资助项目

*通讯作者。Tel: 029-88338890, E-mail: taochen@libang.com.cn

为1.0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$), 每组设8个复孔。继续分别培养24, 48, 72 h后, 每孔中加入10 μL 的CCK-8溶液, 孵育4 h后测定450 nm各孔的吸光值, 绘制细胞存活曲线。同时, 为了排除药物的毒性作用, 本实验考察了不同浓度的二氢青蒿素(浓度分别为1.0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)对正常骨细胞MC-3T3的抑制作用。实验各重复三次。

1.2.3 细胞周期测定 将MG-63细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种于6孔板中, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞贴壁后对照组换上新鲜培养液, 处理组换上含不同浓度二氢青蒿素的培养液(浓度分别为6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$)。继续培养24 h后, 收集对照组和处理组细胞, 细胞数量在 1×10^6 个以内。分别用PBS洗涤细胞两次, 再将细胞重悬于75%冰冻乙醇中-20 $^{\circ}\text{C}$ 固定1 h, 用冷PBS洗涤细胞一次, 再用200~500 μL 冷PBS重悬细胞, 加入RNase A溶液20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min, 400目筛网过滤, 加入400 μL 碘化内铈(PI)染液, 轻轻混匀后4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30~60 min。流式细胞仪分析细胞周期分布。最大激发波长为488 nm。

1.2.4 Hoechst 33258荧光染色检测 将无菌盖玻片放入6孔板中, 并将MG-63细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种于6孔板中盖玻片上, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞贴壁后对照组换上新鲜培养液, 处理组换上含不同浓度二氢青蒿素的培养液(浓度分别为6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$)。继续培养24 h后, 取出盖玻片, 用冷Buffer A洗涤细胞两次, 加入1 mL的4%甲醛溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞10 min, 去固定液, 用Buffer A洗2次, 滴加100 μL Hoechst 33258工作液, 室温染色10 min, 水冲净晾干, 以紫外光340 nm波长激发, 荧光显微镜下观察。

1.2.5 细胞凋亡检测 将MG-63细胞以 $(4 \sim 7) \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种于6孔板中, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞贴壁后对照组换上新鲜培养液, 处理组换上含二氢青蒿素的培养液(浓度分别为0, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$)。继续培养24 h后, 收集对照组和处理组细胞, 用冷PBS洗涤两次, 用400 μL 1 $\times$ binding buffer悬浮细胞, 浓度大约为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。在细胞悬浮液中加入5 μL Annexin V-FITC, 轻轻摇匀后于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育15 min。再加入10 μL PI后轻轻混匀于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育5 min。在1 h内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

1.2.6 统计学处理 本实验应用SPSS11.5统计软件包进行数据处理, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用One-Way ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二氢青蒿素对人成骨肉瘤MG-63细胞生长的影响

经过不同浓度的二氢青蒿素分别处理骨肉瘤MG-63细胞24, 48, 72 h后, 细胞的存活率出现明显的变化, 见图1。结果显示, 随着二氢青蒿素浓度的增加以及作用时间的增加, 二氢青蒿素对骨肉瘤细胞的抑制作用显著增强。由图中数据可以计算出48 h时二氢青蒿素对骨肉瘤细胞的 IC_{50} 浓度为44.87 $\mu\text{mol/L}$, 72 h时二氢青蒿素对骨肉瘤细胞的 IC_{50} 浓度为19.15 $\mu\text{mol/L}$ 。二氢青蒿素对正常骨细胞MC-3T3的抑制作用见图1, 结果表明二氢青蒿素对正常细胞基本没有抑制作用, 也证实了二氢青蒿素低毒性的特点。

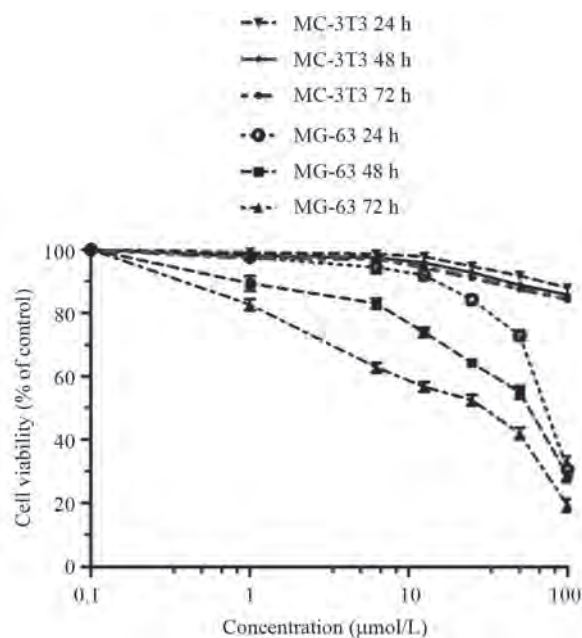


图1 二氢青蒿素分别处理MG-63、MC-3T3细胞24, 48, 72 h后的MTT检测结果

Fig.1 Effect of DHA on cell viability of MG-63 and MC-3T3 cells were treated with different concentrations of DHA for 24, 48, 72 h by MTT assay

2.2 二氢青蒿素对人成骨肉瘤MG-63细胞周期的影响

经不同浓度的二氢青蒿素诱导处理后, 人成骨

肉瘤MG-63细胞的细胞周期分布出现明显的变化, 见表1和图2。结果显示, 对照组(图2A) MG-63细胞 G_0/G_1 期细胞比例为32.49%, S期细胞占30.04%, 而 G_2/M 期细胞占37.47%; 经50 $\mu\text{mol/L}$ 二氢青蒿素诱导处理24 h之后(图2E), 细胞周期出现明显的改变: G_0/G_1 期细胞明显增加为84.12%, S期细胞明显下降仅为8.98%, G_2/M 期细胞明显下降为6.90%。并且, 随着药物浓度增大, G_0/G_1 期细胞的比例随浓度依赖性增大, 见表1。此结果显示二氢青蒿素可以将MG-63细胞阻滞在 G_0/G_1 期, 进而抑制MG-63细胞的增殖, 并

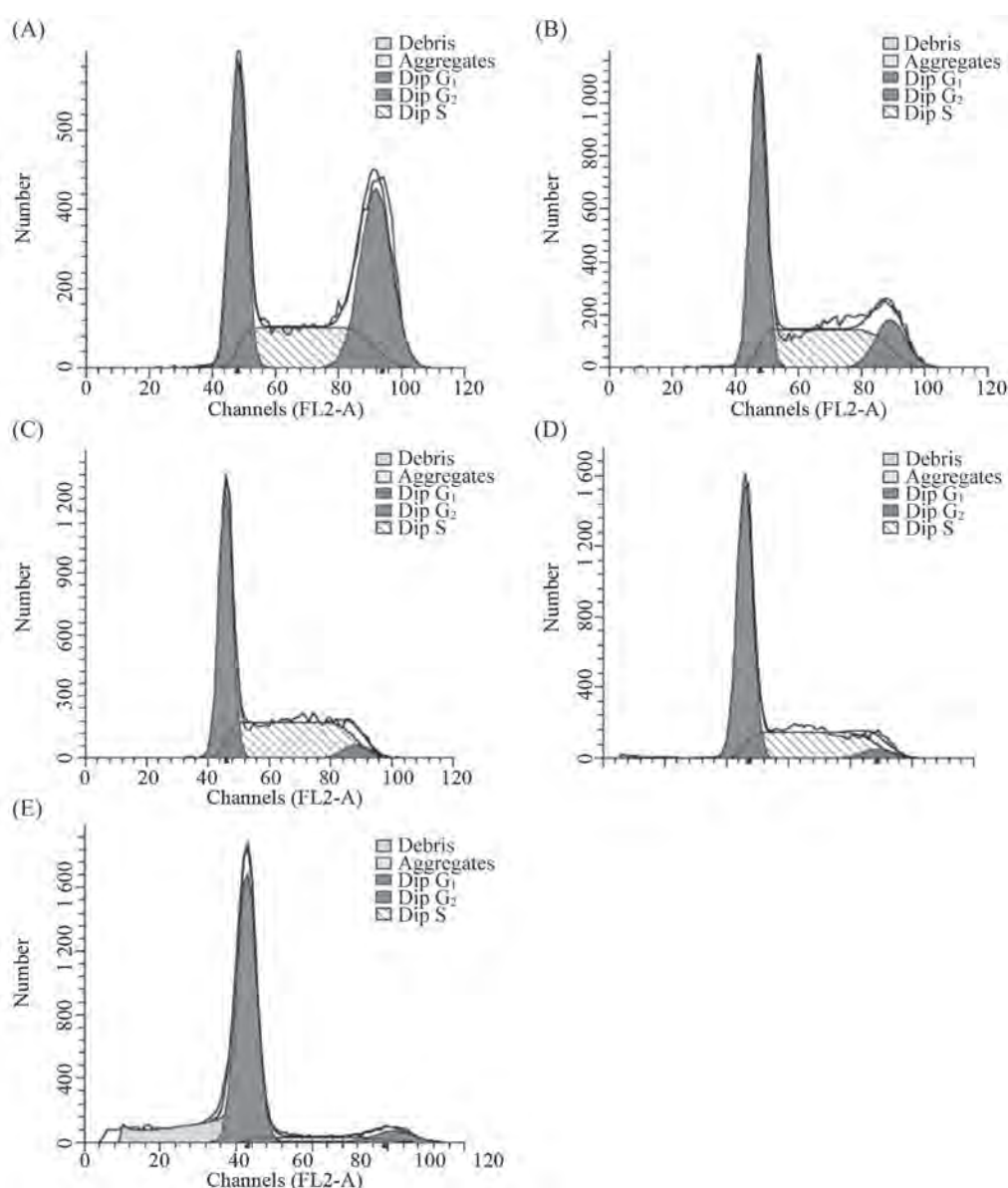
诱导其凋亡。

2.3 Hoechst 33258荧光染色结果

经Hoechst 33258荧光染色后, 荧光显微镜下对照组(DHA浓度为0)人成骨肉瘤MG-63细胞形态完整、有规则、细胞核完整、着色均匀、荧光成弥散状。二氢青蒿素处理组细胞染色质凝聚、细胞核裂解、着色不规则、呈现出细胞凋亡的典型变化即核碎裂, 见图3。

2.4 二氢青蒿素对MG-63细胞凋亡的影响

人骨肉瘤细胞MG-63分别经不同浓度二氢青蒿



A: 二氢青蒿素0 $\mu\text{mol/L}$; B: 6.25 $\mu\text{mol/L}$; C: 12.5 $\mu\text{mol/L}$; D: 25 $\mu\text{mol/L}$; E: 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

A: DHA 0 $\mu\text{mol/L}$; B: DHA 6.25 $\mu\text{mol/L}$; C: DHA 12.5 $\mu\text{mol/L}$; D: DHA 25 $\mu\text{mol/L}$; E: DHA 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

图2 不同浓度二氢青蒿素对MG-63细胞的细胞周期影响结果图

Fig.2 Inhibitory effects of various concentrations of DHA on cell cycle in MG-63 cells

素处理24 h后收集细胞, 用Annexin V-FITC双染法处理细胞, 经流式细胞仪检测细胞凋亡, 见图4和图5。由图5可见, 二氢青蒿素能明显诱导MG-63细胞的凋亡效应, 对比正常细胞, 经过50 $\mu\text{mol/L}$ 二氢青蒿素处理24 h后, 处于凋亡末期的细胞从0.07%上升到45.10%, 具有显著性差异。

表1 不同浓度二氢青蒿素对MG-63细胞的各个细胞周期的影响

二氢青蒿素浓度($\mu\text{mol/L}$)	G ₀ /G ₁ 期(%)	S期(%)	G ₂ /M期(%)
DHA concentrations	G ₀ /G ₁ phage (%)	S phage (%)	G ₂ /M phage (%)
0	32.49	30.04	37.47
6.25	45.01	40.69	14.30
12.5	46.67	48.70	4.64
25	57.95	38.24	3.81
50	84.12	8.98	6.90

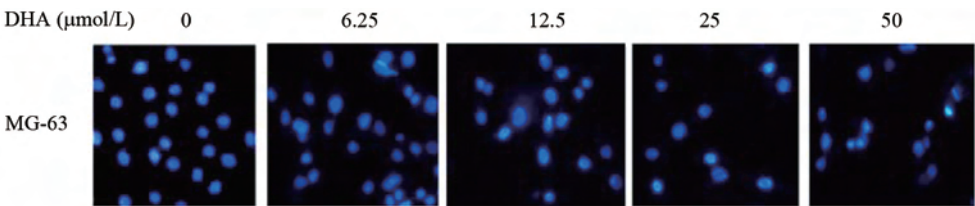


图3 荧光染色检测不同浓度二氢青蒿素(0, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$)作用MG-63细胞24 h后的结果
Fig.3 Observation of fluorescence microscope of MG-63 cells previous and after treated with different concentrations of DHA (0, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h

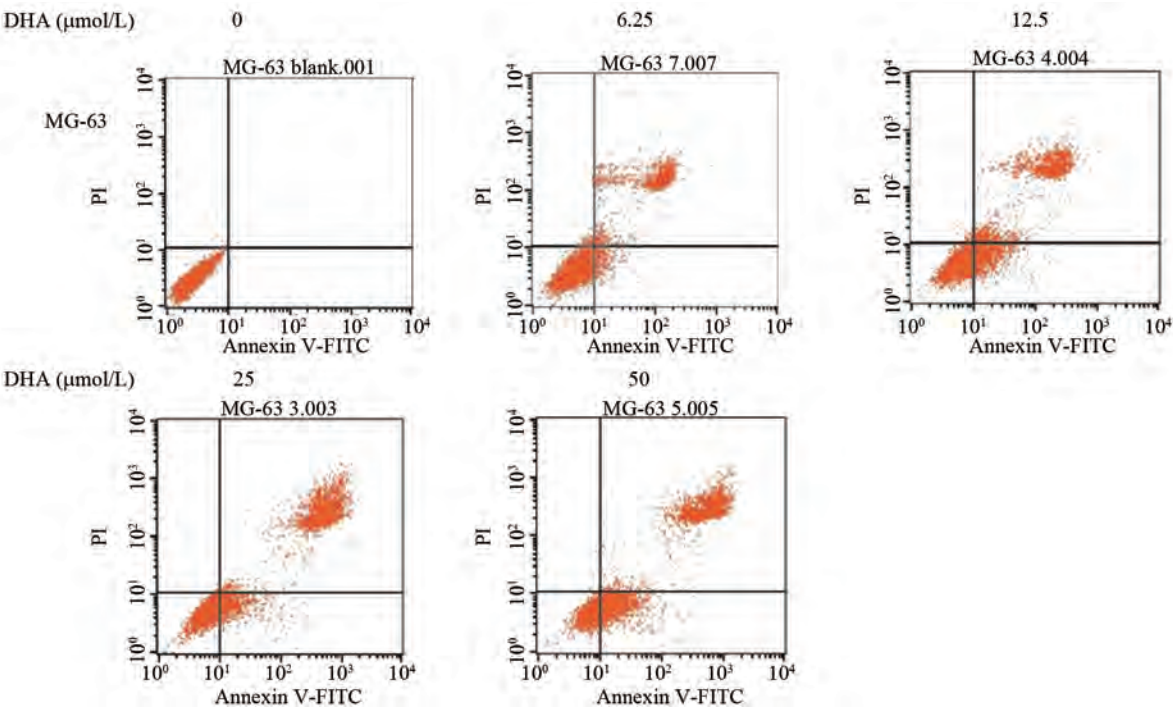


图4 Annexin V-FITC双染法检测不同浓度二氢青蒿素(0, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 24 h引起MG-63细胞凋亡的结果图
Fig.4 Assessment of apoptosis by Annexin V-FITC kit on the MG-63 cell when treated with different concentrations of DHA (0, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h

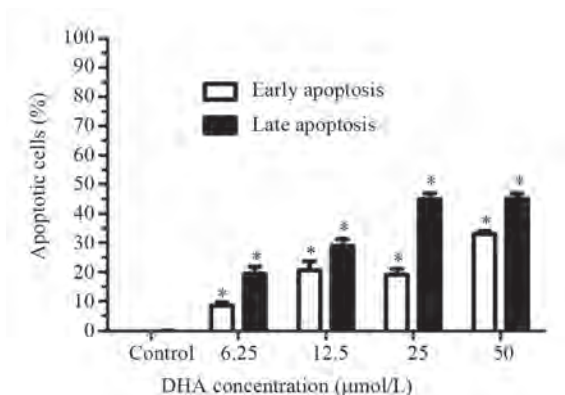


图5 Annexin V-FITC双染法检测二氢青蒿素对MG-63细胞凋亡的数据结果图(数据均取平均值, * $P<0.001$)

Fig.5 Assessment of apoptosis by Annexin V-FITC/PI on the MG-63 cell (Results are means $\pm$ SEM. * $P<0.001$ compared with the control)

3 讨论

20世纪70年代用于治疗骨肉瘤的药物有甲氨蝶呤和大剂量的亚叶酸钙。后来,阿霉素、顺铂、异环磷酰胺被用于治疗人骨肉瘤。但是,在骨肉瘤患者的后期治疗中往往需要用很大的剂量,这使得很多患者出现严重的不良反应,同时产生了耐药性。因此,目前需要寻找新的疗效高、毒性低的骨肉瘤治疗药物。青蒿素是一种治疗疟疾的高效低毒性药物,有很多研究已经通过体内体外试验证实青蒿素具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,例如:白血病细胞^[5-9]、纤维肉瘤细胞^[10-11]、卵巢癌细胞^[12-14]、乳腺癌细胞^[15]、子宫颈癌细胞^[16-18]、神经胶质瘤细胞^[19]、肺癌细胞^[20-21]、口腔癌细胞^[22]、前列腺癌细胞^[23-25]等。但是,二氢青蒿素(DHA)对骨肉瘤细胞系是否具有抑制作用,目前报道得很少。本研究分别应用细胞培养、细胞计数、流式细胞仪、Hoechst 33258染色、细胞周期检测、细胞凋亡检测等技术考察了二氢青蒿素对人成骨肉瘤MG-63细胞的凋亡诱导作用。

考察二氢青蒿素对MG-63细胞增殖、周期的影响是鉴定其对骨肉瘤作用的一个方面。本文研究结果显示, MG-63细胞是一株分裂增殖旺盛的细胞。但是,经不同浓度二氢青蒿素诱导处理后,细胞的生长受到明显的抑制,其中, 48 h以及72 h二氢青蒿素对MG-63的 IC_{50} 值分别为44.87 μ mol/L和19.15 μ mol/L。同时, 经过不同浓度二氢青蒿素处理后, MG-63细胞的周期各时相的细胞比例也发生了显著变化, 对照组MG-63细胞 G_0/G_1 期细胞比例为32.49%, S期细胞占30.04%,

G_2/M 期细胞占37.47%; 经50 μ mol/L二氢青蒿素诱导处理之后, G_0/G_1 期细胞显著增加为84.12%, S期细胞明显下降仅为8.98%, G_2/M 期细胞比例减少为6.9%。本文实验结果表明, 经二氢青蒿素诱导处理后, 人成骨肉瘤MG-63细胞的增殖受到了明显的抑制, 细胞周期在 G_0/G_1 期受到阻滞。由此表明, 二氢青蒿素能显著地抑制人成骨肉瘤MG-63细胞的增殖, 阻滞细胞周期的运转, 诱导细胞的凋亡。

考察和鉴定MG-63细胞经二氢青蒿素诱导处理前后的细胞形态变化, 是判断细胞是否凋亡的又一个重要指标。本文通过荧光显微镜观察结果显示, 经二氢青蒿素处理的MG-63细胞表面出现明显的核仁减少、染色深、形态不规则现象。同时, 有些细胞可见明显的细胞残核、细胞膜皱缩、细胞核裂解等明显的凋亡特征。此特征说明二氢青蒿素具有诱导人成骨肉瘤MG-63细胞凋亡的生物学效应。

Annexin V-FITC双染细胞凋亡检测可以直观地反映二氢青蒿素诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用。本文通过双染凋亡检测结果显示, 二氢青蒿素能明显诱导MG-63细胞的凋亡效应, 对比正常细胞, 经过50 μ mol/L二氢青蒿素处理24 h后, 处于凋亡末期的细胞比例从0.04%上升到96.61%, 具有显著性差异。

本文研究工作充分证实了二氢青蒿素具有有效诱导人成骨肉瘤MG-63细胞凋亡的作用, 从而为成骨细胞凋亡机制的进一步研究和相关骨骼疾病的防治研究工作提供了重要基础和实验研究依据。

参考文献 (References)

- 1 陈征途, 黄真炎, 吴玲霓, 曾庆平. 青蒿素介导肝瘤细胞凋亡的实验研究. 中西医结合肝病杂志 2000; 10(5): 23-5.
- 2 Beekman AC, Wierenge PK, Woerdenbag HJ, van Uden W, el-Feraly FS, Galal AM, *et al.* Artemisinin-derived sesquiterpene lactones as potential antitumour compounds: Cytotoxic action against bone marrow and tumour cell. *Planta Medica* 1998; 64(7): 615.
- 3 董海鹰, 王知非, 宋维华, 王 珍, 杨宝峰. 青蒿素诱导K562细胞凋亡研究. 中国肿瘤 2003; 12(8): 39-41.
- 4 周 晋, 孟 然, 李丽敏, 刘 影, 李宝馨, 杨宝峰. 青蒿素对白血病细胞株和原代细胞的影响. 中华内科杂志 2003; 42(10): 44-5.
- 5 Meshnick SR. Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* 2002; 32(13): 1655-60.
- 6 O'Neill PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem* 2004; 47(12): 2945-64.

- 7 Singh NP, Lai HC. Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells. *Anticancer Res* 2005; 25(6B): 4325-31.
- 8 Lee J, Zhou HJ, Wu XH. Dihydroartemisinin downregulates vascular endothelial growth factor expression and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57(2): 213-20.
- 9 Singh NP, Ferreira JF, Park JS, Lai HC. Cytotoxicity of ethanolic extracts of *Artemisia annua* to Molt-4 human leukemia cells. *Planta Med* 2011; 77(16): 1788-93.
- 10 Moore JC, Lai HC, Li JR. Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer Lett* 1995; 98(1): 83-7.
- 11 Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Res* 2004; 24(4): 2277-80.
- 12 Jiao Y, Ge CM, Meng QH. Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth. *Acta Pharmacol Sinica* 2007; 28(7): 1045-56.
- 13 Chen HH, Zhou HJ, Fang X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives *in vitro*. *Pharmacol Res* 2003; 48(3): 231-6.
- 14 Chen T, Li M, Zhang R, Wang H. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cell. *J Cell Mol Med* 2009; 13(7): 1358-70.
- 15 Singh NP, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci* 2001; 70(1): 49-56.
- 16 Disbrow GL, Baega AC, Kierpiec KA. Dihydroartemisinin is cytotoxic to papillomavirus-expressing epithelial cells *in vitro* and *in vitro*. *Cancer Res* 2005; 65(23): 10854-61.
- 17 Lai HC, Singh NP. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer Lett* 2006; 231(1): 43-8.
- 18 Singh NP, Lai HC. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci* 2004; 70(1): 49-56.
- 19 Huang XJ, Ma ZQ, Zhang WP, Lu YB, Wei EQ. Dihydroartemisinin exerts cytotoxic effects and inhibits hypoxia inducible factor-1alpha activation in C6 glioma cells. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(6): 849-56.
- 20 Mu D, Chen W, Yu B, Zhang C, Zhang Y, Qi H. Calcium and survivin are involved in the induction of apoptosis by dihydroartemisinin in human lung cancer SPC-A-1 cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007; 29(1): 33-8.
- 21 Mu D, Zhang W, Chu D, Liu T, Xie Y, Fu E, *et al*. The role of calcium, P38 MAPK in dihydroartemisinin-induced apoptosis of lung cancer PC-14 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61(4): 639-45.
- 22 Nam W, Tak J, Ryu JK, Jung M, Yook JI, Kim HJ, *et al*. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Head Neck* 2007; 29(4): 335-40.
- 23 He Q, Shi J, Shen XL, An J, Sun H, Wang L, *et al*. Dihydroartemisinin upregulates death receptor 5 expression and cooperates with TRAIL to induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2010; 9(10): 819-24.
- 24 Morrissey C, Gallis B, Solazzi JW, Kim BJ, Gulati R, Vakar-Lopez F, *et al*. Effect of artemisinin derivatives on apoptosis and cell cycle in prostate cancer cells. *Anticancer Drugs* 2010; 21(4): 423-32.
- 25 Nakase I, Gallis B, Takatani-Nakase T, Oh S, Lacoste E, Singh NP, *et al*. Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis. *Cancer Lett* 2009; 274(2): 290-8.

Apoptosis of Human Osteosarcoma MG-63 Cells Induced by Dihydroartemisinin

Ma Yufan¹, Lu Tingli¹, Wang Yunqing¹, Zhao Wen¹, Mei Qibing¹, Chen Tao^{1,2,3*}

(¹Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China; ²Shaanxi Liposome Research Center, Xi'an 710075, China; ³Xi'an Libang Pharmaceuticals Co.Ltd, Xi'an 710077, China)

Abstract The apoptosis effects of dihydroartemisinin (DHA) on human osteosarcoma MG-63 cells have been studied using the methods of CCK-8 staining, flow cytometry analysis, Hoechst33258 staining, Annexin V-FITC staining and electron microscope. The results showed that DHA decreased the cell viability in a concentration and time-dependent manner. The IC₅₀ values of DHA against the MG-63 cells were determined as 44.87 μmol/L and 19.15 μmol/L after 48 h and 72 h, respectively. The results of flow cytometry analysis showed that DHA could induce the emergence of the phase of apoptosis, the rate is 45.10% and the cell cycle is blocked in G₀/G₁ phase. Cell nucleus concentrated and appeared granular fluorescence by Hoechst33258 staining. This study suggested that DHA had induced apoptosis of the human osteosarcoma MG-63 cells effectively, and provided foundation and research proofs to study more about the apoptosis mechanisms of the osteosarcoma cells.

Key words DHA; human osteosarcoma MG-63 cells; cell apoptosis; flow cytometry

Received: July 4, 2011 Accepted: September 6, 2011

This work was supported by the Planned Science and Technology Project of Shaanxi Province (No.200801905) and Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No.2010JM2021)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88338890, E-mail: taochen@libang.com.cn