

人参皂甙 Rg1、肉桂酸和丹参酮 IIA 组合对成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖与相关基因表达的影响

石松林 王国红 李祺福* 马宗源 林昌健¹ 赵振利

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

¹ 厦门大学化学化工学院化学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要 研究中药有效成分人参皂甙 Rg1、肉桂酸和丹参酮 IIA 组合对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制和相关基因表达影响, 探索其对肿瘤细胞的生物学效应。以 33 $\mu\text{g/ml}$ 人参皂甙 Rg1、296.32 $\mu\text{g/ml}$ 肉桂酸和 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 丹参酮 IIA 的组合(简称 RCT)处理人成骨肉瘤 MG-63 细胞, 以肿瘤细胞分化诱导物 HMBA 处理 MG-63 细胞为平行对照, 用流式细胞仪、免疫细胞化学检测及光镜观察系统研究 RCT 组合对 MG-63 细胞的作用。生长曲线及细胞周期检测显示 RCT 组合可显著抑制 MG-63 细胞的增殖, 细胞生长抑制率达 72.37%, 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期; 免疫细胞化学检测显示 RCT 组合处理后 MG-63 细胞的癌基因 *c-fos*、*c-myc* 表达下调, 抑癌基因 *p27*、*Rb* 表达上调。RCT 组合对 MG-63 细胞增殖及相关基因表达的影响与分化诱导物六亚甲基双乙酰胺(HMBA)处理组相似。

关键词 人参皂甙 Rg1; 肉桂酸; 丹参酮 IIA; 人成骨肉瘤 MG-63 细胞; 癌基因与抑癌基因

肿瘤细胞诱导分化研究不仅是研究细胞癌变与逆转机制、细胞增殖分化调控等生命科学基础问题的重要领域, 同时也是肿瘤治疗研究的一条重要的新途径。肿瘤诱导分化研究的发展有赖于高效低毒的分化诱导物的不断发现。中药有效成分长久以来广泛用于抗肿瘤研究和临床肿瘤的治疗, 因其毒副作用小和临床应用前景明确的特点, 已成为今后找寻具有临床应用价值的诱导分化物的重要方向。现有报道了多种中药有效成分对肿瘤细胞诱导分化的作用, 但存在着单一中药有效成分诱导分化作用弱和机制研究不深入的问题^[1,2]。多种分化诱导物的联合诱导是诱导肿瘤细胞终末分化的重要手段。我们认为采用多种中药有效成分组合联合诱导肿瘤细胞终末分化, 可解决长久存在的诱导分化物细胞毒性大, 作用靶点单一、临床应用受限的问题, 并且对肿瘤细胞的终末分化诱导效果显著。有望成为今后中药有效成分诱导肿瘤细胞终末分化研究的主要方向。人成骨肉瘤 MG-63 细胞具有成骨细胞分化潜能和显著的终末分化指标。在先前的工作中, 本实验室以 MG-63 细胞建立了肿瘤细胞终末分化诱导研究实验模型, 并鉴定了人参皂甙 Rg1、肉桂酸和丹参酮 IIA 单体对 MG-63 细胞分化的诱导作用^[3,4]。本文在此基础上进一步以人参皂甙 Rg1、肉桂酸 CINN 和丹参酮 TanIIA 的低浓度组合(RCT)联合诱导处理 MG-63 细胞, 以化学分化诱导物六亚甲基双乙酰胺(HMBA)

为平行对照, 研究中药有效成分组合对 MG-63 细胞增殖、细胞周期和分化相关基因表达的影响, 为深入研究中药抗肿瘤作用机制索新途径。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和处理

人成骨肉瘤 MG-63 细胞(引自武汉大学动物资源保藏中心)培养于 RPMI1640 培养液中(内含 15% 热灭活小牛血清、600 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素, pH 7.2), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养备用。取对数生长期细胞进行消化传代培养 24 h 后加入含有 33 $\mu\text{g/ml}$ 人参皂甙 Rg1+296.32 $\mu\text{g/ml}$ 肉桂酸+0.3 $\mu\text{g/ml}$ 丹参酮 IIA 的培养液(以下用 RCT 表示)进行处理, 同时以未加 RCT 的培养液同步培养 MG-63 细胞作为阴性对照组, 以 50 $\mu\text{g/ml}$ 人参皂甙 Rg1、444.48 $\mu\text{g/ml}$ 肉桂酸和 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 丹参酮 IIA 分别处理 MG-63 细胞, 以 5 mmol/L HMBA 培养液培养细胞作为阳性平行对照组。

1.2 细胞生长曲线的测定

取对数生长期细胞, 以 5×10^4 个/ml 细胞浓度接种于一批 25 ml 培养瓶中, 接种 24 h 后, 对照组换上

收稿日期: 2008-05-21 接受日期: 2008-08-01

国家自然科学基金(No.30470877, No.20773100)、福建省自然科学基金(No.2008J0302)及中国博士后科学基金(No.20070420754)资助

* 通讯作者。Tel: 0592-2185363, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

新鲜培养液,各处理组分别换上内含各种中药有效成分单体、RCT组合及HMBA的培养液,逐日(1~7天)从对照组和处理组各取三瓶细胞,用苔盼蓝排除法进行活细胞计数,取平均值,绘制细胞生长曲线。

1.3 细胞周期测定

取对照组和各处理组细胞分别清洗、消化、离心洗涤,细胞沉淀重悬于0.5 ml D-Hank's液中,迅速注入冰预冷的75%乙醇固定,4℃暂存待检。检测时先离心去乙醇,0.1 mol/L PBS洗涤3次,于100 μg/ml RNase 37℃温育20 min以消化RNA,离心后加入50 μg/ml的碘化丙啶(PI)4℃染色30 min。用流式细胞仪(Becton-Dickson公司产品)分析细胞周期分布。

1.4 癌基因 *c-fos*、*c-myc* 及抑癌基因 *p27*、*Rb* 产物表达观察样品制备

取分别生长有对照组和处理组细胞的盖玻片条,预温至37℃的D-Hank's液漂洗3次,每次2~3 min,洗掉残余培养液,冷丙酮4℃固定20 min。PBS洗涤3次,每次5 min,3% H₂O₂温育10 min,蒸馏水洗3次,每次5 min,滴加适量的5%山羊血清封闭液室温温育20 min,吸去多余液体不洗,滴加一抗(*c-Myc*、*c-Fos*和*p27*抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,*Rb*抗体购自武汉博士德生物工程有限公司)37℃温育1 h或4℃过夜,PBS漂洗3次,每次5 min,滴加生物素标记的二抗(IgG/Bio)37℃温育20~30 min,PBS漂洗3次,每次5 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素SABC,37℃温育20~30 min,PBS漂洗4次,每次5 min,DAB显色剂室温显色5~20 min,自来水充分冲洗,蒸馏水洗1~2 min,乙醇系列脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,Olympus BH-2型光学显微镜下观察拍照,记录结果。

2 结果

2.1 RCT组合对人成骨肉瘤MG-63细胞生长的影响

生长曲线测定的结果显示MG-63细胞增殖较快,当接种数为 5.0×10^4 个/ml时,连续计数至第七天,细胞增殖为 8.019×10^5 个/ml,为原来16.04倍,倍增时间为47.96 h。经Rg1、CINN、TanIIA、RCT组合及HMBA分别处理后,MG-63细胞的生长速度受到不同程度地抑制。其中RCT组合处理7天后的细胞计数结果为 2.216×10^4 个/ml,仅为原来的4.43倍,倍增时间高达89.39 h,增殖抑制率达到了72.37%,而Rg1、CINN、TanIIA等有效成分单体的抑制率分别为22.06%、54.94%、52.10%,在各个中药有效成分处理组中RCT组合对MG-63细胞的生长抑制最

为显著,显示出协同加成效应(图1)。经HMBA处理后第7天细胞的计数结果为 4.15×10^5 个/ml细胞数为原来的8.3倍,抑制率为50.69%。

2.2 RCT组合对人成骨肉瘤MG-63细胞周期的影响

经Rg1、CINN、TanIIA、RCT组合及HMBA诱导处理7天之后,细胞周期均出现明显的G₀/G₁期阻滞。其中RCT组合和HMBA处理的效果最为明显,细胞比例由47.5%上升为72.5%与70.3%,分别增加了52.6%与48%,而RCT处理组S期和G₂/M期的细胞比例则分别下降了62.5%和38.5%。HMBA处理组细胞S期和G₂/M期的比例则分别下降了53.0%和37.5%(图2)。实验结果提示各处理组细胞在G₁期向S期的演变不同程度地受阻,其中RCT组合对细胞周期的阻滞最显著。

2.3 RCT组合对人成骨肉瘤MG-63细胞相关癌基因与抑癌基因表达的影响

免疫组织化学方法(strept avidin biotin complex, SABC)研究MG-63细胞在RCT组合处理前后癌基因*c-fos*、*c-myc*和抑癌基因*Rb*、*p27*表达产物变化。

2.3.1 *c-fos* 基因表达产物的变化 实验结果显示,对照组细胞*c-fos*染色呈强阳性,免疫反应的产物为深棕色的颗粒,位于细胞核内和细胞质区,细胞核及核周边的细胞质中分布较多,圆形细胞染色较深(图3A)。RCT处理组免疫显色反应呈弱阳性,反应产物为细小的浅黄色颗粒,主要分布于靠近核膜的少部分细胞质区,核内也有分布(图3B)。HMBA处理组显色反应呈弱阳性,浅棕色反应产物分布于细胞核及核周边细胞质中(图3C)。RCT处理组显色反应较HMBA处理组更弱。

2.3.2 *c-myc* 基因表达产物的变化 免疫染色实验结果显示,对照组细胞*c-myc*基因产物表达呈强阳性,反应产物为深棕色颗粒,主要分布于细胞核内核仁以及细胞核周边的细胞质区域,颗粒分布较不均一(图3D)。RCT处理组反应呈弱阳性,反应产物为浅棕色细小颗粒,靠近核膜的细胞质区分布较多,细胞核内分布较少(图3E)。HMBA处理组显色反应亦呈弱阳性,略强于RCT处理组,反应产物分布于细胞核内核仁及核周边细胞质中(图3F)。

2.3.3 *Rb* 基因表达产物的变化 *Rb*蛋白的免疫细胞化学显示其在对照组MG-63细胞中呈弱阳性表达,免疫反应的产物为浅棕色细小颗粒,分布在细胞核内和核周围的细胞质区(图3G)。RCT处理组(图3H)免疫反应结果呈强阳性,反应产物为深棕色颗粒,主要分布于细胞核内核仁和近核的细胞质区域。

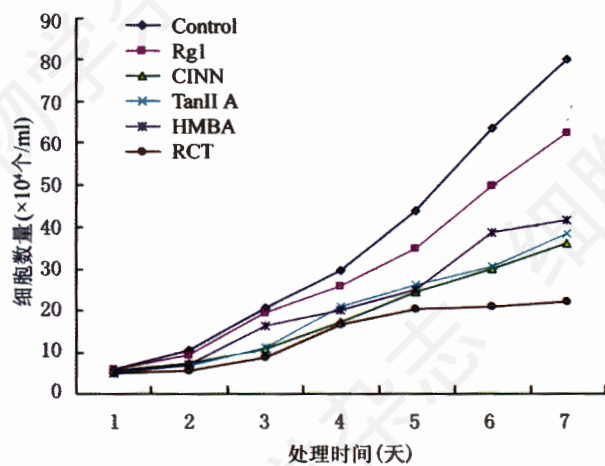


图1 RCT组合对人成骨肉瘤MG-63细胞生长的影响

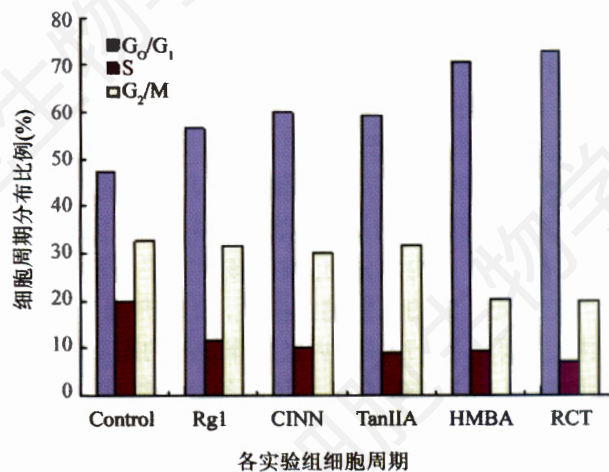


图2 RCT组合对MG-63细胞周期的影响柱形图

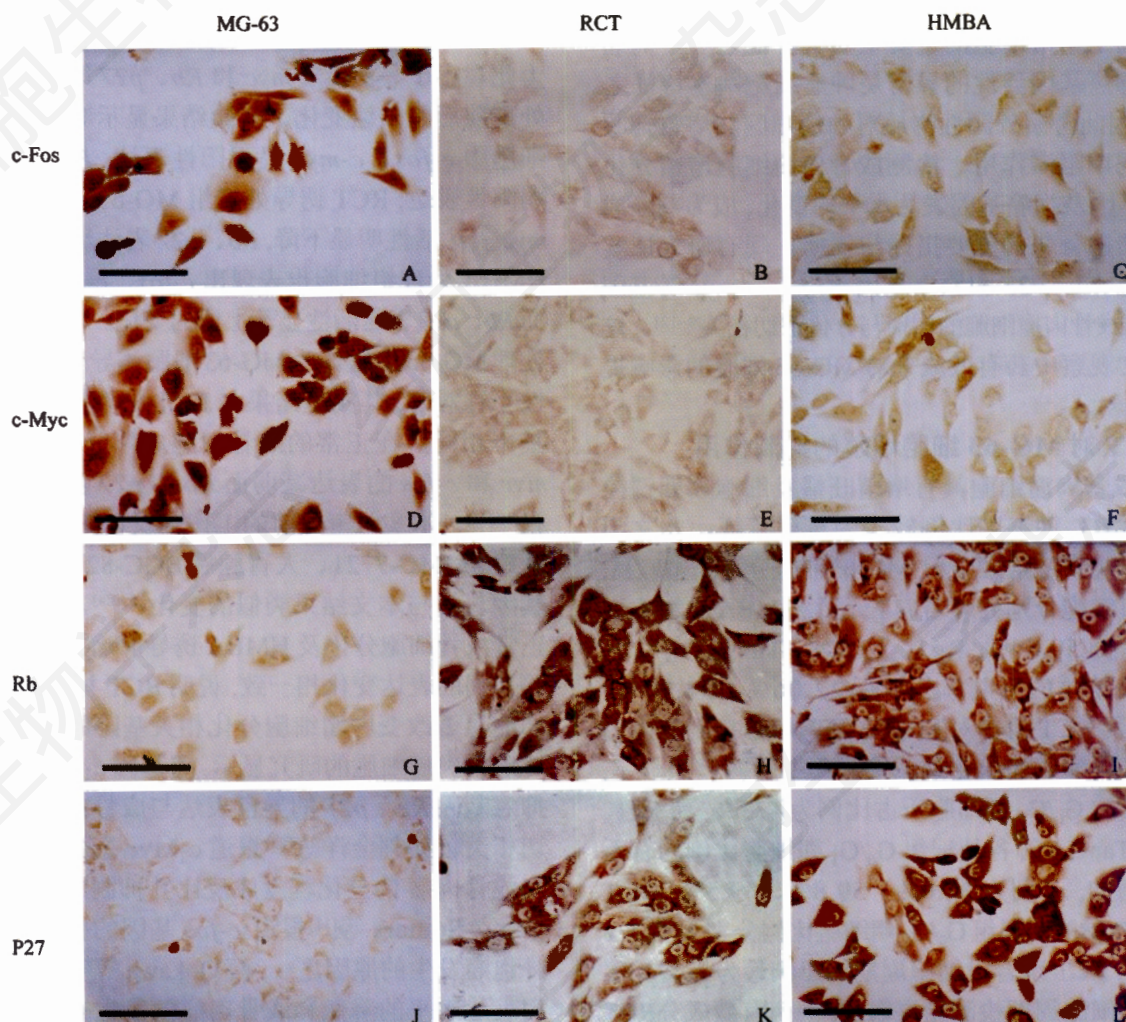


图3 增殖分化相关基因在RCT与HMBA处理前后MG-63细胞里的表达(标尺示80 μm)

A~C: c-Fos 蛋白在未处理 MG-63 细胞内(A)强阳性表达, 在 RCT 处理细胞(B)与 HMBA 处理细胞(C)中表达显著减弱。D~F: c-Myc 蛋白在未处理 MG-63 细胞内(D)强阳性表达, 在 RCT 处理细胞(E)与 HMBA 处理细胞(F)中表达显著减弱。G~I: Rb 蛋白在未处理 MG-63 细胞内(G)弱阳性表达, 在 RCT 处理细胞(H)与 HMBA 处理细胞(I)中强阳性表达。J~L: P27 蛋白在未处理 MG-63 细胞内(J)弱阳性表达, 在 RCT 处理细胞(K)与 HMBA 处理细胞(L)中强阳性表达。

HMBA 处理组(图 3I)结果亦呈阳性,深棕色颗粒分布于核内核仁和近核的细胞质位置。RCT 处理组和 HMBA 处理组结果类似。

2.3.4 p27 基因表达产物的变化 对照组免疫细胞化学染色的结果显示 P27 蛋白的表达较弱,染色呈弱阳性,反应的产物为浅棕色细小颗粒,主要分布于细胞质中,且呈均匀分布,细胞核中几乎看不到(图 3J)。RCT 处理组的细胞显色阳性,反应产物为棕黄色颗粒,主要分布于细胞核内及紧靠核膜的胞质区,其中细胞核内 P27 的表达高于其他各处理组(图 3K)。HMBA 处理组免疫反应结果强阳性,略强于 RCT 处理组(图 3L)。

3 讨论

细胞增殖失控及细胞周期调节发生紊乱是肿瘤细胞区别于正常细胞的重要生物学特征之一。而癌基因和抑癌基因活性的异常是肿瘤细胞基本特征之一^[5-8]。因此考察外源性物质对肿瘤细胞的增殖抑制及细胞周期阻滞作用、检测成骨肉瘤细胞增殖分化相关癌基因及抑癌基因表达水平的变化,成为判断成骨肉瘤细胞分化的重要指标与依据。现有研究证实抑癌基因 *Rb*、*p27* 和原癌基因 *c-fos*、*c-myc* 等基因的改变与成骨肉瘤细胞的增殖与分化密切相关^[9-12]。这些为本文观察中药有效成分对 MG-63 细胞的影响提供了依据。

3.1 RCT 对 MG-63 细胞增殖的抑制作用

人成骨肉瘤细胞具有增殖旺盛及细胞周期调控紊乱、 G_0/G_1 期细胞比例较少的重要特征。本文细胞生长曲线测定结果显示, MG-63 细胞分裂增殖旺盛,各处理组细胞分别处理培养 7 天后, HMBA 对细胞增殖抑制率为 50.69%, Rg1、CINN、TanIIA 等中药有效成分单体的抑制率分别为 22.06%、54.94%、52.10%, 而 RCT 组合对 MG-63 细胞增殖抑制率高达 72.37%, 为各处理组之最。细胞周期检测结果显示, 对照组细胞 G_0/G_1 期细胞所占比例为 47.5%, 而 Rg1、CINN、TanIIA 等各处理组 G_0/G_1 期细胞比例均有不同程度增加, 分别为 56.6%、59.8%、59.5%, RCT 组合及 HMBA 处理组 G_0/G_1 期细胞比例分别为 72.5% 和 70.3%, RCT 组合对细胞周期的影响最为显著。生长曲线和细胞周期检测结果表明, 中药有效成分 RCT 组合相比各有效成分单体对 MG-63 细胞增殖抑制与细胞周期调控效果最为显著, 具有协同加成作用。RCT 组合与 HMBA 相比对 MG-63 细胞有着类似的增殖抑制与细胞周期调控作用, RCT 组合的作用效果甚至高于 HMBA 处理组。HMBA 是一种广泛用于各类

细胞分化诱导研究的典型分化诱导物^[13], 现有的研究证实 HMBA 诱导肿瘤细胞分化过程中伴随着生长抑制与细胞周期 G_0/G_1 期的阻滞^[14,15]。前人的中药有效成分诱导肿瘤细胞分化研究也证实人参皂甙 Rg1、肉桂酸和丹参酮 IIA 等成分对正常细胞和肿瘤细胞具有诱导分化作用并滞细胞增殖^[16-18], 与之相比较, RCT 对肿瘤细胞的作用效果更为明显。本文实验结果表明 RCT 和 HMBA 相比对 MG-63 细胞具有相似甚至更强的生长抑制与细胞周期 G_0/G_1 期的阻滞作用, 这提示 RCT 和 HMBA 一样能够有效地抑制细胞增殖、阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期, 对 MG-63 细胞具有与分化诱导物 HMBA 相似的增殖抑制作用。

3.2 RCT 对 MG-63 细胞的增殖增殖相关基因表达的影响

成骨肉瘤细胞具有癌基因 *c-fos*、*c-myc* 表达上调和抑癌基因 *Rb* 和 *p27* 表达下调的重要特征。本文为此观察了 *c-fos*、*c-myc* 和 *Rb*、*p27* 等基因在 RCT 处理前后的表达变化。实验结果显示对照组 MG-63 细胞中 *c-fos*、*c-myc* 呈强阳性表达, *Rb*、*p27* 均呈弱阳性表达; RCT 诱导处理组 MG-63 细胞 *c-fos*、*c-myc* 表达活性明显下降, *Rb*、*p27* 表达活性显著上调; HMBA 处理组细胞也表现出 *c-fos*、*c-myc* 表达下调而 *Rb*、*p27* 表达活性显著上调的变化。本文以 HMBA 处理 MG-63 细胞作为 MG-63 细胞诱导分化效果的阳性平行对照, 其实验结果与 RCT 处理组的实验结果基本相同。在正常的成骨细胞成熟分化过程中, *c-myc* 和 *c-fos* 的表达减弱而 *Rb* 和 *p27* 基因的表达增强^[19-22]。本实验室先前的工作也发现 HMBA 诱导人肝癌 SMMC-7721、人胃腺癌 BGC-823 分化中相关基因表达与本文结果类似的变化^[23,24]。本文结果与正常成骨细胞分化及 HMBA 诱导肿瘤分化过程中相关基因的表达变化相一致, 说明 RCT 与 HMBA 一样均能显著改变肿瘤细胞分化相关基因的表达。前人对成骨肉瘤细胞的研究显示, 癌基因 *c-fos*、*c-myc* 和抑癌基因 *Rb*、*p27* 的异常表达与成骨肉瘤的发生密切相关。如刘金洋等^[25]报道 *c-Myc* 蛋白的表达强度与成骨肉瘤的分化程度成反比并抑制成骨肉瘤细胞分化。Sunters 等^[11]报道 *c-fos* 基因的扩增可能是成骨肉瘤发生的原因之一, 而 Ookawa 等^[26]发现 pRb 蛋白表达水平的降低和成骨肉瘤的发生有关, *Rb* 的表达可诱导成骨肉瘤细胞的分化。Thomas 等^[27]报道 *p27* 的缺失表达与人成骨肉瘤细胞的去分化密切相关, *p27* 可以引发细胞周期阻滞并调控成骨细胞终末分化, 而这些进程在人成骨肉瘤细胞中被阻断。RCT 处理 MG-63 细胞的相关基因表达变化与正常成骨细

细胞分化过程中相关基因表达变化一致, 也与本文 HMBA 阳性对照组以及前人的成骨肉瘤诱导分化研究中相关基因表达变化相吻合。这表明中药有效成分 RCT 组合处理 MG-63 细胞, 与癌细胞分化诱导物一样能够有效的下调癌基因 *c-fos*、*c-myc* 的表达水平, 抑制细胞的恶性增殖, 同时上调 *p27* 和 *Rb* 等抑癌基因的表达, 使 MG-63 细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 进而促使人成骨肉瘤细胞走向分化。

本文结果表明, 中药有效成分 RCT 组合与肿瘤细胞化学分化诱导物 HMBA 一样, 对 MG-63 细胞增殖与周期运转具有显著的抑制作用并能改变相关癌基因、抑癌基因的表达而诱导肿瘤细胞分化。本文有关 RCT 作用的研究为进一步研究 RCT 抗肿瘤作用及其机制提供了依据, 并对中药有效成分组合联合诱导肿瘤细胞分化研究提供了新的探索途径。

参考文献(References)

- [1] 李 鹏等。生物学通报, 2002, 37: 133
 [2] 王家鹏等。中医研究, 2003, 16: 114
 [3] 李祺福等。厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46: 836
 [4] 石松林等。现在生物医学进展, 2008, 8: 801
 [5] Bover L *et al.* *Cell Mol Biol*, 1998, 44: 493
 [6] Sakorafas GH *et al.* *Eur J Surg Oncol*, 1995, 21: 251
 [7] Xue Q *et al.* *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92: 285
 [8] Pompetti F *et al.* *J Cell Biochem*, 1996, 63: 37
 [9] Benassi MS *et al.* *Int J Cancer*, 1999, 84: 489
 [10] Drissi H *et al.* *Cancer Res*, 1999, 59: 3705
 [11] Sunters A *et al.* *Dev Genet*, 1998, 22: 386
 [12] Gamberi G *et al.* *Oncology*, 1998, 55: 556
 [13] Wang H *et al.* *Chin Med Sci J*, 2002, 17: 27
 [14] Shirsat NV *et al.* *Cell Biol Int*, 2001, 25: 621
 [15] Wang QH *et al.* *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117: 453
 [16] Zhang HS *et al.* *J Cell Biochem*, 2006, 98: 1471
 [17] 王 涛等。癌症, 2000, 19: 782
 [18] 袁淑兰等。华西药理学杂志, 2003, 18: 327
 [19] Smith E *et al.* *J Biol Chem*, 2002, 277: 18191
 [20] Zayzafoon M *et al.* *J Biol Chem*, 2005, 280: 7049
 [21] Smith E *et al.* *J Cell Biochem*, 1997, 66: 141
 [22] Drissi H *et al.* *Cancer Res*, 1999, 59: 3705
 [23] 黄宗平等。厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35: 606
 [24] 欧阳高亮等。实验生物学报, 2001, 34: 269
 [25] 刘金洋等。中国现代医学杂志, 2004, 14: 66
 [26] Ookawa K *et al.* *Oncogene*, 1997, 14: 1389
 [27] Thomas DM *et al.* *J Cell Biol*, 2004, 167: 925

The Effects of the Combination of Ginsenoside Rg1, Cinnamic Acid and TanshinoneII A on the Proliferation and Genes Expression of MG-63 Cell

Song-Lin Shi, Guo-Hong Wang, Qi-Fu Li*, Zong-Yuan Ma, Chang-Jian Lin¹, Zhen-Li Zhao

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology & Tumor cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ¹ State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surfaces, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract To explore the anticancer mechanisms and biological effects of the effective component of chinese herbs, the human osteosarcoma MG-63 cells were treated with the combination of 33 $\mu\text{g/ml}$ ginsenoside Rg1, 296.32 $\mu\text{g/ml}$ cinnamic acid and 0.3 $\mu\text{g/ml}$ tanshinoneIIA (RCT) and the MG-63 cells treated with hexamethylene bisacetamide (HMBA) were investigated as positive control of induced differentiation. They were subjected to flow cytometry, immunocytochemical assay and light microscopy. The analysis of cell growth curve and cell cycle revealed that RCT can markedly inhibit cell proliferation and arrest cells in G_0/G_1 phase. The inhibitory rate of cell growth was 72.37% after 7 days treatment by RCT. The results of immunocytochemical staining indicated that the expression of oncogenes including *c-fos* and *c-myc* were down-regulated, whereas the expression of antitumor genes including *p27* and *Rb* were up-regulated. Similar results were obtained from HMBA treated MG-63 cells.

Key words ginsenoside Rg1; cinnamic acid; tanshinone IIA; human osteosarcoma MG-63 cells; oncogene and tumor-suppressor gene

Received: May 21, 2008 Accepted: August 1, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470877, No.20773100), the Natural Science Foundation of Fujian Province of China (No.2008J0302) and Chinese Postdoctoral Science Foundation (No.20070420754)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2185363, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn