

姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的诱导作用

郑燕彬 杨海波 陈兰英¹ 李祺福* 赵振利 刘用金

(厦门大学生命科学学院, 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 厦门 361005;

¹平顶山工学院, 平顶山 467044)

摘要 应用细胞培养、细胞计数、流式细胞仪、琼脂糖凝胶电泳、Hoechst33258 染色、苏木精-伊红(HE)染色、透射电镜观察等技术研究姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的诱导作用。实验结果显示, 姜黄素可明显诱导 MG-63 细胞的凋亡, 经 7.5 mg/L 姜黄素诱导处理后, 人成骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖活动受到显著的抑制, 细胞生长抑制率达 63.14%; 细胞周期检测出现亚二倍体(亚 G₁ 期)细胞峰值, 细胞凋亡率达 21.8%; 琼脂糖凝胶电泳出现细胞凋亡典型的 DNA “梯状” 条带; 细胞核经 Hoechst33258 染色出现浓染致密的固缩形态和颗粒状荧光; 光镜和电镜观察结果显示, 姜黄素处理组细胞体积缩小, 细胞核固缩, 染色质凝聚、线粒体肿胀、有凋亡小体形成等显著的凋亡特征。研究结果表明, 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 凋亡的诱导具有显著作用, 从而为进一步研究细胞凋亡机制和多种骨骼疾病的研究提供重要基础和研究依据。

关键词 姜黄素; 人成骨肉瘤细胞; 细胞凋亡; 流式细胞术; 琼脂糖凝胶电泳

细胞凋亡对于多细胞生物个体发育的正常进行, 生物稳态的保持以及抵御外界各种因素的干扰具有十分关键的作用。细胞凋亡不仅在细胞生物学研究中具有十分重要的理论意义并且对于揭示生物生长发育机制方面具有重要意义。成骨细胞凋亡研究不仅对于揭示细胞凋亡机制, 阐明骨骼发育的机制具有重要意义, 同时对于探索和研究骨骼疾病也具有重要意义^[1]。成骨肉瘤细胞作为一种类成骨细胞, 不仅具有成骨细胞早期分化特征而且具有肿瘤细胞恶性增殖的生物学特征, 是成骨细胞研究的常用细胞模型^[2]。姜黄素作为一种细胞凋亡诱导物已在国内外的细胞凋亡研究中广泛应用^[3,4], 是一种理想的细胞凋亡诱导药物。本实验室此前的研究表明姜黄素能有效诱导人胃腺癌细胞、人永生上皮细胞、食管癌细胞的凋亡^[5]。为此, 本文应用姜黄素处理人成骨肉瘤 MG-63 细胞, 研究姜黄素对 MG-63 细胞凋亡的诱导作用, 以期成骨细胞凋亡引起的疾病的研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人成骨肉瘤 MG-63 细胞引自中国典型培养物保藏中心。RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品, 小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品, 姜黄素(curcumin, Cur)购自中国生物药品检定所。

1.2 细胞培养及凋亡诱导处理

人成骨肉瘤 MG-63 细胞培养在内含 15% 热灭活小牛血清、10 万 U/L 青霉素、10 万 U/L 链霉素及 50 mg/L 卡那霉素的 RPMI-1640 培养基(pH 7.2), 于 37 °C 培养。细胞培养 24 h 后进行姜黄素诱导处理。

1.3 生长曲线测定

将细胞以 1×10^5 个/ml 接种于一批 25 ml 培养瓶中, 接种 24 h 后对照组换上新鲜培养液, 处理组换上含 7.5 mg/L 姜黄素的培养液, 逐日(1~7 天)从对照组和处理组各取三瓶细胞, 用台盼蓝拒染法进行活细胞计数, 取其平均值, 绘制细胞生长曲线。实验重复三次, 结果基本一致, 以其中一次为准。

1.4 细胞周期测定

将对照组和姜黄素处理的细胞分别用 PBS 清洗, 消化收集细胞, 并用 PBS 离心洗涤, 将细胞重悬于 75% 的 4 °C 预冷乙醇中固定, 置 4 °C 保存。检测时先离心去乙醇, PBS 洗涤, 于 10 mg/ml RNase 中 37 °C 温育 20~30 min, 加入 50 mg/L 碘化丙啶(PI)染色 30 min。流式细胞仪进行细胞周期时相动力学检测, 分析细胞周期分布。

1.5 DNA 电泳分析

取对照组细胞和分别处理了 24 h、48 h 和 72

收稿日期: 2008-06-05 接受日期: 2008-09-27

国家自然科学基金项目资助(No.30470877)

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

h 的处理组细胞洗涤后离心沉淀, 加溶解缓冲液 20 μ l, 再加入 10 μ l 50 万 U/L RNaseA, 37 $^{\circ}$ C 温育 120 min, 加入 10 μ l 20 mg/ml 蛋白酶 K 55 $^{\circ}$ C 水浴 3 h, 加 4 μ l 10 \times DNA 加样缓冲液, 在含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭 TAE 的 1%~1.5% 琼脂糖凝胶干孔中加 20 μ l DNA 样品, 同时加入 marker 作对照。在 5 V/cm 电场中电泳, 待溴酚蓝迁移至胶 2/3 处后停止电泳, 置凝胶于紫外分析仪下观察照相。

1.6 Hoechst33258 荧光染色检测

取分别长有对照组细胞和处理组细胞的盖玻片条, 温 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛(pH 7.2) 4 $^{\circ}$ C 固定 10 min, PBS 漂洗, 5 g/L Hoechst33258 室温避光温育 10 min, PBS 漂洗, DDW 漂洗, 含 90% 甘油的 PBS 封片, 用荧光显微镜(Olympus BH-2)进行检测。

1.7 光学显微镜样品制备与观察

取对数生长期细胞, 接种于一批放有盖玻片条的培养瓶中, 接种 24 h 后, 对照组细胞换上新鲜培养液, 处理组换上含 7.5 mg/L 姜黄素的作用液, 培养 72 h 后取出长有细胞的盖玻片条, 温 PBS 液漂洗, Bouin-Hollande 液固定过夜, 70% 乙醇洗涤, 常规苏木精-伊红(HE)染色, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照。

1.8 透射电子显微镜观察样品制备

取对数生长期细胞接种于一批 50 ml 培养瓶中, 接种 24 h 后, 进行加药处理, 一定时间后取对照组和处理组的细胞分别经 37 $^{\circ}$ C 的 PBS 洗涤 2~3 次, 用橡皮刮刀推下细胞移入离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 细胞沉淀用 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 预固定 1 h, 然后小心切成约 1 mm³ 见方的细胞小块, 再用 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 1 h, 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 1% 四氧化锇 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 618 包埋, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 于 JEM100-CX II/S 型透射电子显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 姜黄素对人成骨肉瘤 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, 当细胞接种数为 5.5×10^4 个/ml 时, 计数至第 7 天, 细胞增殖为 8.57×10^5 个/ml, 为原来 17.13 倍, 其倍增时间为 47.96 h; 但经姜黄素处理后, MG-63 细胞的生长速度受到不同程度地抑制。7.5 mg/L 姜黄素处理 7 天后, 细胞的计数结果为 3.16×10^5 个/ml, 细胞数为原来的 6.32 倍, 倍增时间达到 67.29 h, 抑制率为 63.14% (图 1)。

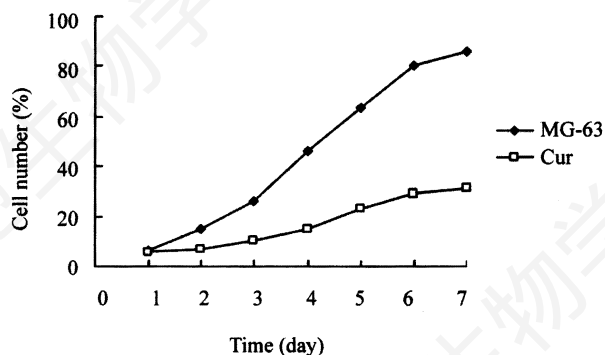


Fig.1 The effect of curcumin on the proliferation of MG-63 cells

Table 1 The effect of curcumin on the cell cycle of MG-63 cells

Group	Sub-G ₁ (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
Control	12.71	39.5	24.7	29.4
Treatment	21.8	40.6	8.78	28.8

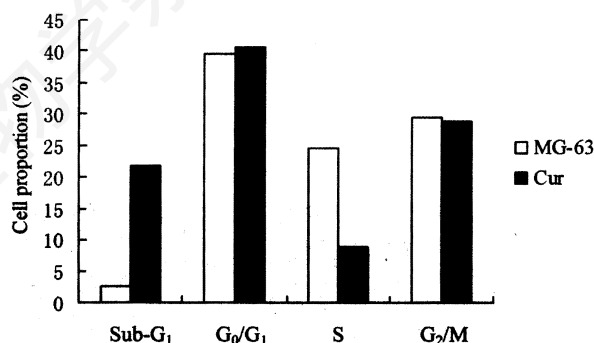


Fig.2 The effect of curcumin on the cell cycle of MG-63 cells

2.2 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞周期的影响

细胞周期测定结果(表 1, 图 2)显示, 经 7.5 mg/L 姜黄素诱导处理之后, 人成骨肉瘤 MG-63 细胞的细胞周期分布出现明显的变化。测定结果显示, 对照组 MG-63 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例为 39.5%, S 期细胞占 24.7%, 而 G₂/M 期细胞占 29.4%; 经 7.5 mg/L 姜黄素诱导处理之后, 细胞周期出现明显的凋亡峰, 亚 G₁ 期细胞比例高达 21.8%, G₀/G₁ 期细胞稍有增加为 40.6%, S 期细胞明显下降仅为 8.78%, G₂/M 期细胞比例则有所减少为 28.8%。

2.3 姜黄素对 MG-63 细胞 DNA 的降解作用

经过 7.5 mg/L 姜黄素处理的 MG-63 细胞 DNA 琼脂糖电泳(图 3)显示: 对照组细胞不出现 DNA 降解现象, 电泳时出现高分子量的亮带; 而姜黄素处理组细胞随着姜黄素的作用 DNA 发生了水解, 出现了典型

的梯度条带,并具有时间依赖性。其中 24 h 实验组的 DNA 电泳现象与对照组相比变化不明显,随着姜黄素作用时间的推移,48 h 作用组出现了 180~200 bp 或其倍数级左右的小分子 DNA,特别是 72 h 实验组, DNA 断裂片段条带非常明显。

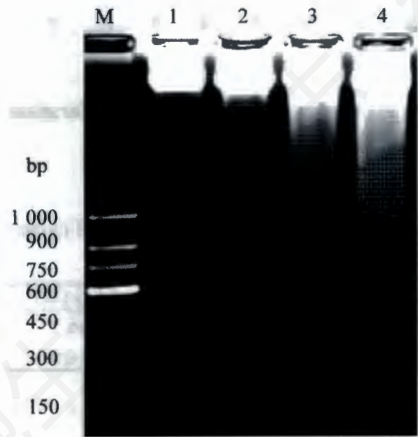


Fig.3 Electrophoresis analysis of DNA in curcumin-treated MG-63 cells

M: marker; 1: control; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h.

2.4 荧光显微镜观察

荧光显微镜下对照组人成骨肉瘤 MG-63 细胞核完整,着色均匀,荧光成弥散状,比较黯淡(图 4-1)。姜黄素处理组细胞,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(图 4-2)。

2.5 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞形态的光学显微镜观察

光镜下人成骨肉瘤 MG-63 细胞群体排列不规则,个体细胞形状不规则,具有上皮样、圆形、梭形等形态,同时较常见癌巨细胞、多核细胞以及多极分裂相细胞,细胞体积较小、细胞核大、核质比例大、细胞核形状不规则(图 4-3)。姜黄素处理的 MG-63 细胞,群体细胞排列不规则,细胞大小变化不明显,多见胞质突起和圆形的固缩细胞,核仁减少,染色很深,细胞皱缩,染色质凝聚,常见的处于分裂期的癌细胞减少,可见有成群或单独存在的凋亡细胞(图 4-4)。

2.6 透射电子显微镜观察

透射电子显微镜观察结果显示, MG-63 细胞体积

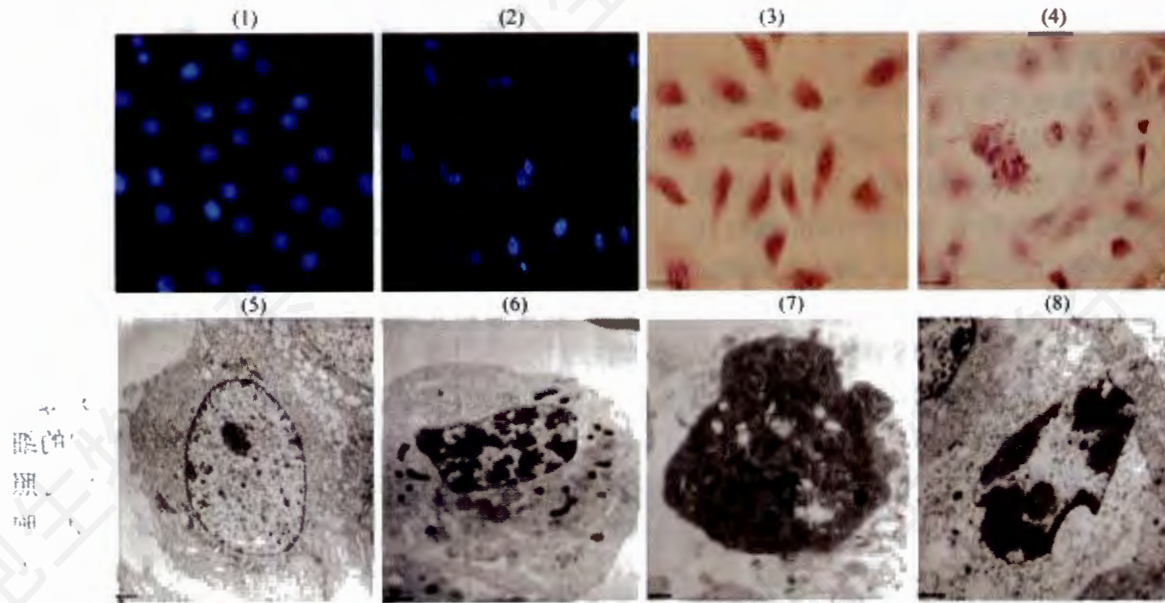


Fig.4 Observation of optic and electron microscope of MG-63 cells previous and after treated with curcumin

1: control MG-63 cells observed by Hoechst 33258 (bar=40 μm); 2: MG-63 cells after treated with curcumin stained by Hoechst 33258 showing that chromatin verge-concentrated and the nucleus structure were disintegrate, and appeared assemble fluorescence (bar=40 μm); 3: control MG-63 cells observed by HE (bar=40 μm); 4: MG-63 cells after treated with curcumin stained by HE showing that cell nucleus concerntrated and cytoplasm with gemmiform protuberance (bar=40 μm); 5: control MG-63 cells observed under electron microscope (bar=1 μm); 6: MG-63 cells after treated with curcumin observed under electron microscope, chromatin concentrated, mitochondria vacuole (bar=1 μm); 7: MG-63 cells after treated with curcumin observed under electron microscope, cell concerntrated, chromatin verge-concentrated, cytoplasmic membrane complete (bar=1 μm); 8: MG-63 cells after treated with curcumin observed under electron microscope, chromatin verge-concentrated, cytoplasm vacuole (bar=1 μm).

较大, 细胞核质比例较大, 细胞核较大, 核膜内陷, 核形状很不规则, 核仁不明显, 核内异染色质较多, 呈团块状散在分布, 常染色质较少, 细胞质内的细胞器较少, 线粒体数量少, 体积小形状不规则, 线粒体嵴不发达且排列不规则。高尔基体较少, 体积较小且形状结构不规则, 极性不明显, 粗糙型内质网数量少, 长度相对较短, 有的扩张, 呈泡状膨大。细胞质内游离的核糖体较少, 而多聚核糖体大量分布。细胞整体形状不规则, 细胞膜不平滑, 细胞表面有大量微绒毛分布(图 4-5)。经过 7.5 mg/L 姜黄素处理之后的 MG-63 细胞体积变小; 细胞核内的异染色质块增多, 大团块边聚, 并出现染色质凝聚, 核内出现了透明区域, 可见明显的致密核; 细胞质电子密度高, 细胞膜皱缩但完整, 有小泡形成, 基质的电子密度增高, 细胞质缩小, 细胞器数目减少, 线粒体肿胀明显, 数目明显增多, 内质网网腔扩大; 可见凋亡小体(图 4-6, 图 4-7, 图 4-8)。

3 讨论

细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程, 受到严格的程序性调控^[6], 其中涉及细胞增殖抑制和细胞周期阻滞以及细胞皱缩、染色质凝集、边缘化、DNA 断裂、凋亡小体形成等一系列变化特征。因此考察这一系列特征的变化是鉴定细胞凋亡的重要指标。

考察对肿瘤细胞增殖活动的抑制和周期调控是鉴定外源性物质抗肿瘤作用的一个基本方面, 也是鉴定外源性物质诱导肿瘤细胞凋亡的一项重要指标。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 7.5 mg/L 姜黄素诱导处理 7 天后, 细胞生长抑制率达到 63.14%, 细胞群体倍增时间由 47.96 h 延长至 67.29 h, 是原来的 1.5 倍。细胞周期各时相的细胞比例发生了显著变化, 对照组 MG-63 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例为 39.5%, S 期细胞占 24.7%, G₂/M 期细胞占 29.4%; 经姜黄素诱导处理之后, 细胞周期出现明显的凋亡峰, 亚 G₁ 期(凋亡峰)细胞比例高达 21.8%, G₀/G₁ 期细胞稍有增加为 40.6%, S 期细胞明显下降仅为 8.78%, G₂/M 期细胞比例则有所减少为 28.8%。本文实验结果表明, 姜黄素诱导处理的人成骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖受到了显著抑制, 细胞周期在 S 期受到阻滞, 出现明显的亚 G₁ 期凋亡峰。这一结果与本实验室研究人胃腺癌 BGC-823 细胞凋亡时观察到的细胞增殖及周期变化相吻合^[7]; 同时也与

前人应用姜黄素诱导人乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、B 细胞淋巴瘤细胞、多潜能骨髓细胞凋亡研究^[8, 9]中观察到的细胞增殖抑制和细胞周期阻滞结果相类似。由此表明, 姜黄素能显著地抑制人成骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖活动, 阻滞细胞周期的运转, 诱导细胞凋亡。

DNA 发生断裂是细胞凋亡的最主要特征, 也是目前判断细胞是否凋亡的一个最有效指标^[10]。DNA 电泳结果显示, 对照组细胞在凝胶电泳时不出现 DNA 降解现象; 经过姜黄素处理的 MG-63 细胞电泳出现了 180~200 bp 或其倍数级左右的小分子 DNA 梯度条带。Hoechst 33258 染色结果显示, 对照组细胞在荧光显微镜下观察细胞核完整, 荧光成弥散状, 比较黯淡, 经姜黄素处理的 MG-63 细胞则染色质凝聚, 细胞核裂解, 荧光比较明亮; 这与人用华蟾素诱导 U937 细胞凋亡时观测到的 DNA 梯度条带、Hoechst 33258 染核出现的染色质凝聚及边集化, 蓝色荧光加深等实验结果^[11]相类似, 也与本实验室用牡蛎天然活性肽 BPO-1 处理人胃腺癌细胞 BGC-823 观察到 DNA 凝胶电泳结果相符合^[5]; 同时也与人用姜黄素处理肝星状细胞 HSC-T6 琼脂糖凝胶电泳可见明显的 DNA 梯度条带相一致^[12]。由此证实姜黄素能引起 MG-63 细胞 DNA 降解、细胞核破裂, 进而诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞走向凋亡。

考察和鉴定细胞凋亡诱导处理前后细胞形态与超微结构特征的变化, 是判断细胞是否凋亡的一个重要指标。本文光镜与透射电镜观察结果显示, MG-63 细胞具有典型的肿瘤细胞形态与超微结构特征, 细胞形态多样, 细胞核质比例较大, 细胞核形状不规则, 核内常见多个核仁, 细胞质内细胞器较少, 细胞群体排列不规则。经姜黄素处理的 MG-63 细胞表面有明显的出芽现象以及核仁减少、染色深、线粒体肿胀, 异染色质团块边聚, 有些细胞可见明显的致密核和残核; 胞膜皱缩但完整, 有小泡形成, 基质的电子密度增高, 细胞质固缩, 细胞器数目减少, 透射电镜下可见体积小、数目多的凋亡小体等明显的凋亡特征。本文研究观察到的 MG-63 细胞的形态和超微结构变化不仅与本实验室诱导人胃腺癌细胞凋亡时观察到的超微结构变化结果^[5]相一致; 也与人用姜黄素诱导处理其他肿瘤细胞凋亡时的研究报道相吻合^[13]。由此更充分证实了姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞形态和超微结构的作用与姜黄素对其他肿瘤细胞诱导凋亡作用以及其他一些凋亡诱导物对肿瘤细胞的

作用是一致的,说明姜黄素具有诱导人成骨肉瘤MG-63细胞凋亡的生物学效应。

本文研究工作充分证实了姜黄素能有效诱导人成骨肉瘤MG-63细胞凋亡,从而为成骨细胞凋亡机制的进一步研究和相关骨骼疾病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] Jilka RL, Weinstrein RS, Bellido T, *et al.* Osteoblast programmed cell death apoptosis: modulation by growth factors and cytokines, *J Bone Miner Res*, 1998, 13(5): 793-802
- [2] 郭卫, Healey JH. 骨肉瘤成骨细胞表型与临床因素的相关研究, *中华骨科杂志*, 2002, 22(7): 410-413
- [3] 刘岩, 张春阳, 姜华茂. 姜黄素抑制人肾癌786-O细胞增殖及对细胞周期影响的研究, *辽宁医学院学报*, 2007, 28(2): 4-9
- [4] Cui SX, Qu XJ, Xie YY, *et al.* Curcumin inhibits telomerase activity in human cancer cell lines, *Int J Mol Med*, 2006, 18: 227-231
- [5] 李鹏, 李祺福, 黄大川, 等. 僧帽牡蛎天然活性多肽BPO-1抗人胃腺癌BGC-823细胞活性研究, *厦门大学学报(自然科学版)*, 2002, 41(5): 618-622
- [6] 欧阳高亮, 李祺福, 洪水根. 细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗, *国外医学肿瘤学分册*, 2000, 27(5): 266-269
- [7] 李鹏, 李祺福, 石松林, 等. 牡蛎天然活性肽对人胃腺癌BGC-823细胞周期与基因表达的调控, *中国海洋药物杂志*, 2007, 26(3): 1-8
- [8] Choudhuri T, Pal S, Das T, *et al.* Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G₂ phase of cell cycle in a p53-dependent manner, *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 20059-20068
- [9] Bharti AC, Donato N, Singh S, *et al.* Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis, *Blood*, 2003, 101(3): 1053-1062
- [10] Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation, *Adv Cancer Res*, 1996, 68: 109-182
- [11] 张莉, 李军民, 钱樱, 等. 华蟾素诱导U937细胞凋亡及其作用机制, *肿瘤*, 2007, 27(5): 341-344
- [12] 舒建昌, 何雅军, 吕霞, 等. 姜黄素诱导肝星状细胞凋亡的相关分子机制的初步研究, *中华消化杂志*, 2006, 26(11): 758-761
- [13] 黄秀榕, 祁明信, 康可人, 等. 姜黄素诱导牛晶状体上皮细胞凋亡的机制, *中华眼科杂志*, 2006, 42(7): 649-653

Apoptosis of Human Osteosarcoma MG-63 Cell Induced by Curcumin

Yan-Bin Zheng, Hai-Bo Yang, Lan-Ying Chen¹, Qi-Fu Li*, Zhen-Li Zhao, Yong-Jin Liu

(School of Life Sciences, Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ¹Pingdingshan Institute of Technology, Pingdingshan 467044, China)

Abstract The apoptosis effects of curcumin (Cur) on human osteosarcoma MG-63 cells have been studied using the methods of cell culture, cell count, flow cytometry analysis, DNA gel electrophoresis, Hoechst33258 staining, HE staining, electron microscope. The results showed that proliferation of MG-63 cells could be inhibited by 7.5 mg/L Cur, and the inhibitory rate is 63.14%. The results of flow cytometry analysis showed that curcumin could induced the emergence of the phase of apoptosis, and the rate is 21.8%. Agarose gel electrophoresis revealed that cell DNA fragment exhibited characteristic "DNA ladder". Cell nucleus concentrated and appeared granular fluorescence by Hoechst33258 staining. Light microscope and electron microscope showed that the morphology of the cells treated with curcumin appeared shranked, cell nucleus concentrated, chromatin agglutination, mitochondria swelling, and apoptosis body forming. This study suggested that curcumin had induced apoptosis of the human osteosarcoma MG-63 cells effectively, and provides important foundation and research proofs to study more about the apoptosis mechanisms of the osteosarcoma cells and the study of disease caused by osteoplast.

Key words curcumin; steosarcoma cells; cell apoptosis; flow cytometry; DNA gel electrophoresis

Received: June 5, 2008 Accepted: September 27, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470877)

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