

黄芩苷对人骨肉瘤MG63细胞凋亡及MMPs表达的影响

沈志华*,郭菁菁(绍兴市中心医院药剂科,浙江 绍兴 312030)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0488-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.18

摘要 目的:研究黄芩苷对人骨肉瘤MG63细胞凋亡及基质金属蛋白酶(MMPs)表达的影响。方法:以0(空白对照)、5、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{g/ml}$ 黄芩苷处理MG63细胞24 h后,检测细胞存活率和细胞中MMP-2、MMP-9的表达量,计算半数抑制浓度(IC_{50}),观察细胞凋亡情况。结果:与空白对照比较,黄芩苷处理MG63细胞后细胞存活率降低,凋亡细胞数量增加,细胞中MMP-2和MMP-9表达量降低,并以320 $\mu\text{g/ml}$ 黄芩苷处理时细胞中MMP-2和MMP-9表达量下降具有统计学意义($P < 0.05$); IC_{50} 为 $(40.21 \pm 9.20) \mu\text{g/ml}$,各作用效应均呈浓度依赖性。结论:黄芩苷可抑制MG63细胞增殖,诱导其凋亡,较高质量浓度时可抑制细胞中MMP-2、MMP-9的表达。

关键词 黄芩苷;人骨肉瘤MG63细胞;基质金属蛋白酶;细胞凋亡

Effects of Baicalin on Human Osteosarcoma MG63 Cells Apoptosis and the Expression of MMPs

SHEN Zhihua, GUO Jingjing (Dept. of Pharmacy, Shaoxing Municipal Central Hospital, Zhejiang Shaoxing 312030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of baicalin on human osteosarcoma MG63 cells apoptosis and the expression of MMPs. METHODS: Treated with 0 (blank control), 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g/ml}$ baicalin for 24 h, the survival rate, the expression amount of MMP-2 and MMP-9 were detected, and IC_{50} was calculated. Cell apoptosis was observed. RESULTS: Compared with blank control group, after treated with baicalin, survival rate of MG63 cells decreased, while apoptotic amount increased, the expression amount of MMP-2 and MMP-9 decreased; there was statistical significance in the expression amount decrease of MMP-2 and MMP-9 in MG63 cells after treated with 320 $\mu\text{g/ml}$ baicalin ($P < 0.05$); IC_{50} was $(40.21 \pm 9.20) \mu\text{g/ml}$, all responses were in concentration-dependent manner. CONCLUSIONS: Baicalin can inhibit the proliferation of MG63 cells, induce cell apoptosis, and inhibit the expression of MMP-2 and MMP-9 in cells under high concentration.

KEYWORDS Baicalin; Human osteosarcoma MG63 cells; Matrix metalloproteinase; Cell apoptosis

综上所述,PRP对HSCs-T6细胞的增殖有一定的抑制作用,其机制可能与其使内源性TGF- β 通路失活从而减少胶原蛋白的生成有关。

参考文献

- [1] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2):209.
- [2] Yin C, Evason KJ, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5):1 902.
- [3] Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. Decorin-TGF- β axis in hepatic fibrosis and cirrhosis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60(4):262.
- [4] Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, et al. TGF- β /Smad signaling in the injured liver[J]. *Z Gastroenterol*, 2006, 44(1):57.
- [5] 朱华,张可锋,高雅.红丝线生药学研究[J].中国药业, 2008, 17(16):65.
- [6] 黄俊敏,李志超.红丝线草对大鼠肝纤维化的作用研究[J].四川中医, 2012, 30(12):54.

- [7] 马官英,张庆月,钟瑞华,等.金银花总黄酮对氧化应激中肝星状细胞的保护作用[J].中国药房, 2014, 25(31):2 895.
- [8] Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(4):1 073.
- [9] Lee HS, Shun CT, Chiou LL, et al. Hydroxyproline content of needle biopsies as an objective measure of liver fibrosis: emphasis on sampling variability[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(7):1 109.
- [10] Dong R, Luo Y, Zheng S. α -SMA overexpression associated with increased liver fibrosis in infants with biliary atresia[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012, 55(6):653.
- [11] Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2):193.
- [12] Warburton D, Shi W, Xu B. TGF- β -Smad3 signaling in emphysema and pulmonary fibrosis: an epigenetic aberration of normal development[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(2):83.

* 副主任药师。研究方向:临床药学、药事管理。E-mail: zh9992@sina.com

(收稿日期:2015-08-12 修回日期:2015-09-29)
(编辑:林 静)

骨肉瘤作为青少年及儿童中最常见的原发性恶性肿瘤,常规的化疗药物治疗效果有限^[1]。肿瘤浸润及转移是恶性肿瘤导致患者死亡的主要原因之一。基质金属蛋白酶(MMPs)作为蛋白水解酶的一类,能几乎降解细胞外基质的各种蛋白成分,在肿瘤侵袭转移中起关键作用。

黄芩主要成分包括黄芩苷、黄芩素等,具有清热、利尿等功能;并且黄芩苷及黄芩素对肿瘤细胞亦有一定的抑制作用,其通过抑制肿瘤细胞增殖,引起肿瘤细胞DNA引物发生多聚和复合体的活性,抑制肿瘤细胞增殖^[2-5]。本文主要研究黄芩苷对人骨肉瘤MG63细胞凋亡及MMPs表达的影响。

1 材料

1.1 仪器

IX-70倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);MK3全自动酶标仪(赛默飞世尔上海科技有限公司);B15细胞培养箱(美国Thermo Scientific公司);Milli-RO Plus超纯水仪(密理博上海贸易有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:21967419,纯度:98%);末端标记细胞凋亡(TUNEL)检测试剂盒(瑞士Roche公司,批号:116848179101);MTT(美国Sigma公司,批号:M2128);MMP-9、MMP-2单克隆抗体(美国PTG公司,批号:MAB2335、MAB7603);通用性链霉素抗生素-过氧化酶法(SP)二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:SPKIT-D1)、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:AR1022);RPMI 1640培养基(美国Gibco公司,批号:11875093)。

1.3 细胞

人骨肉瘤MG63细胞(四川大学生物治疗国家重点实验室细胞培养中心)。

2 方法

2.1 细胞培养

将细胞复苏后,用加入含有100 ml/L胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、0.5%CO₂的细胞培养箱中培养。

2.2 MTT法测定黄芩苷对MG63细胞的抑制作用

制备黄芩苷的终质量浓度分别为0(空白对照)、5、10、20、40、80、160、320 μg/ml的细胞培养基溶液。将MG63细胞用胰酶消化,吹打成细胞悬液,密度调整为6×10⁶ ml⁻¹,每孔200 μl,均匀接种于96孔板中培养24 h后,每孔加入相应质量浓度的细胞培养基溶液200 μl,37℃、5%CO₂条件继续孵育,48 h后每孔加入5 mg/ml MTT 20 ml,孵育4 h。弃上清液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μl,振荡10 min后采用全自动酶标仪在570 nm波长下测定光密度(OD)。计算细胞存活率=给药孔OD/空白对照OD×100%,通过几率单位加权回归法(Bliss法)计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 TUNEL检测MG63细胞凋亡情况

将MG63细胞用胰酶消化,吹打成细胞悬液,密度调整为8×10⁴ ml⁻¹,以每孔1 000 μl均匀接种于放有24孔细胞爬片的细胞培养板中,培养24 h后,以“2.2”项下制备的各质量浓度的细胞培养基溶液1 000 μl替换,再在37℃、5%CO₂条件下继续孵育48 h后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍,制备成细胞涂片。用4%多聚甲醛PBS溶液固定,按TUNEL试剂盒说明书操作,于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况,每个样品孔随机取10个视野,每个视野取500个细胞,并根据IPP图像处理分析软件对细胞进行荧光定量处理。

2.4 免疫组织化学检测细胞中MMP-2、MMP-9表达

按“2.3”项下方法处理细胞,制备成细胞涂片,石蜡包埋,4 μm厚度连续切片。采用SP二抗试剂盒操作检测细胞中MMP-2、MMP-9的表达,以肿瘤细胞出现棕色并且着色强度高于背景作为MMP-2、MMP-9阳性标志,MMP-2、MMP-9定位于细胞浆或者细胞膜。计算阳性细胞数占总细胞数的百分比,以此评价MMP-2、MMP-9的表达量。

2.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,比较采用χ²检验。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率与IC₅₀

5、10、20、40、80、160、320 μg/ml黄芩苷处理后MG63细胞存活率分别为(95.68±3.24)%、(89.42±12.18)%、(76.26±6.26)%、(51.52±8.52)%、(30.19±5.26)%、(13.52±2.52)%、(6.35±3.53)% ,表明黄芩苷能降低MG63细胞的存活率,且与浓度呈正相关(P<0.05)。黄芩苷对MG63细胞的IC₅₀为(40.21±9.20) μg/ml。

3.2 细胞凋亡

与空白对照比较,黄芩苷处理后MG63细胞凋亡数量增加,且与浓度呈正相关(P<0.05)。经不同质量浓度黄芩苷处理后MG63细胞的凋亡染色图见图1。

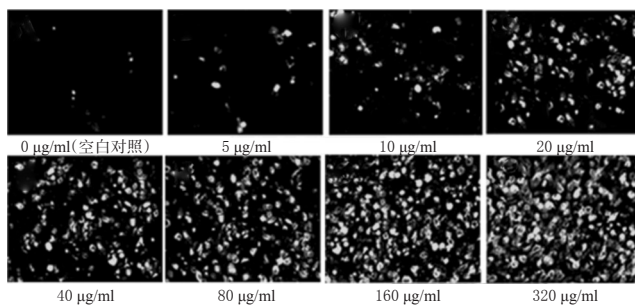


图1 经不同质量浓度黄芩苷处理后MG63细胞的凋亡染色图(×200)

Fig 1 Staining of MG63 cells apoptosis after treated with different concentrations of baicalin (×200)

3.3 细胞中MMP-2、MMP-9表达

与空白对照比较,黄芩苷处理后细胞中MMP-2和MMP-9表达降低,并以320 μg/ml黄芩苷处理时MMP-2和MMP-9表达的降低具有统计学意义(P<0.05)。MG63细胞经不同质量浓度黄芩苷处理后细胞中MMP-2、MMP-9表达量见表1。

表1 经不同质量浓度黄芩苷处理后MG63细胞中MMP-2、MMP-9表达量(%)

Tab 1 Expression of MMP-2 and MMP-9 in MG63 cells after treated with different concentrations of baicalin (%)

MMPs	质量浓度, μg/ml							
	0(空白对照)	5	10	20	40	80	160	320
MMP-2	79.82	67.28	60.45	50.66	32.18	22.58	10.42	5.52*
MMP-9	68.45	65.13	57.29	47.10	29.44	19.27	7.98	3.11*

注:与空白对照比较,*P<0.05

Note: vs. blank control, *P<0.05

4 讨论

骨肉瘤较常发生于20岁以下的青少年或者儿童,是恶性肿瘤中最为常见的一种,主要由间质细胞系发展而来;临床表

现为疼痛、肿块、跛行,还会出现全身发热、不适、贫血、体质量下降等恶性肿瘤全身恶化现象,在儿童及青少年中具有很高的病死率^[6]。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主性程序死亡,主要表现为细胞程序性死亡或者DNA的破坏,使细胞染色质浓集,染色质发生新月形改变,导致细胞碎裂^[7]。其是一个主动过程,是细胞为了更好地适应生存而主动争取的凋亡过程。

黄芩苷是在唇形科食物黄芩中所提取出的黄酮类化合物,是中药黄芩的主要成分,也是其功效发挥的主要成分。近年研究表明,黄芩苷具有抗氧化、抗炎、抗病毒、镇静等功效,且具有广泛抗肿瘤活性^[8]。黄芩苷在抗肿瘤方面主要是通过激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)及p53以及抑制B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)的表达,从而阻滞细胞分裂、诱导细胞凋亡^[4-5]。

肿瘤细胞及微环境分泌的生物因子在肿瘤的复发和转移过程中扮演着重要角色,研究表明,肿瘤的复发及转移首要条件为肿瘤细胞必须具有降解细胞外基质的能力^[9-10]。MMPs是降解细胞外基质的主要成分之一,其中MMP-2、MMP-9是MMPs家族中的关键作用因子^[11-12]。

本研究采用MG63细胞作为研究模型,测定不同浓度黄芩苷对MG63细胞的毒性。研究结果显示,黄芩苷对MG63细胞的IC₅₀为(40.21 ± 9.20) μg/ml,且随着黄芩苷浓度增加,对MG63细胞的毒性也随之增大,表明黄芩苷能显著抑制细胞存活。本研究还通过TUNEL检测黄芩苷对MG63细胞的凋亡作用,结果表明黄芩苷通过促进细胞凋亡从而抑制细胞存活。本研究还通过采用SP二抗试剂盒检测了不同质量浓度黄芩苷作用下MG63细胞中MMP-2、MMP-9表达情况。结果显示,随着黄芩苷质量浓度增加,MMP-2、MMP-9表达量均逐渐降低,但当黄芩苷达到320 μg/ml时,细胞中MMP-2、MMP-9表达量仅为5.52%、3.11%。这表明黄芩苷可通过抑制MMP-2、MMP-9的分泌,抑制肿瘤细胞复发和转移。

综上所述,黄芩苷可抑制MG63细胞增殖,诱导其凋亡,并呈浓度依赖性,且高浓度黄芩苷还能抑制细胞中MMP-2、MMP-9的表达,从而减少MG63细胞的浸润及转移。

参考文献

[1] 李国慧,刘瑞花,李贵霞,等.苦参碱抑制人骨肉瘤细胞

MG63增殖的实验研究[J].河北医科大学学报,2014,35(2):162.

[2] 陈新美,贾强.汉黄芩素体外抗骨肉瘤作用的研究[J].中国药房,2009,20(36):2 813.

[3] 孙吉凤,刘诗音,宋英明,等.黄芩素抗肿瘤作用机制的研究进展[J].中国当代医药,2015,22(14):24.

[4] 黄志军.黄芩苷药理作用研究进展[J].天津药学,2012,24(3):61.

[5] 王英妹,郑海峰,武铁军,等.黄芩苷对肺腺癌细胞多药耐药性的影响及机制[J].河北医药,2012,34(24):3 691.

[6] Di Fiore R, Marcatti M, Drago-Ferrante R, et al. Mutant p53 gain of function can be at the root of dedifferentiation of human osteosarcoma MG63 cells into 3AB-OS cancer stem cells[J]. Bone, 2014, 60(5):198.

[7] 闵玮,林秉奖,骆丹,等.黄芩苷对中波紫外线所致HaCaT细胞凋亡、细胞周期变化及p16、原癌基因c-myc蛋白表达的影响[J].临床皮肤科杂志,2010,39(6):345.

[8] 黄熠,胡火珍.黄芩总苷对肝癌BEL-7402细胞株的抑制作用[J].时珍国医国药,2011,22(5):1 261.

[9] 王晓梅,丁洋,赵玉峰,等.缬沙坦对糖尿病小鼠肾小球组织中Notch信号通路表达及细胞外基质生成的影响[J].临床与实验病理学杂志,2014,11(4):397.

[10] 周建敏,许建英.戒烟对吸烟大鼠气道上皮细胞核因子κB、基质金属蛋白酶9及金属蛋白酶组织抑制物1表达的影响[J].国际呼吸杂志,2010,30(12):715.

[11] 孙晶.醒脑静注射液对脑梗死老年患者的疗效及对血清可溶性肿瘤坏死因子相关性凋亡诱导配体、基质金属蛋白酶-2和-9表达的影响[J].中国老年学杂志,2014,34(9):2 376.

[12] 朱世凯,周玉,范平,等. MT2-MMP基因沉默对缺氧条件下培养的胰腺癌AsPC-1细胞增殖、凋亡及侵袭力的影响[J].中华胰腺病杂志,2013,13(6):378.

(收稿日期:2015-07-31 修回日期:2015-11-01)

(编辑:邹丽娟)

国家食品药品监督管理总局副局长焦红出席中国药科大学国家药物政策与医药产业经济研究中心2015年学术年会

本刊讯 2015年12月26日,国家食品药品监督管理总局副局长焦红在南京出席了中国药科大学国家药物政策与医药产业经济研究中心(NDPE)2015年学术年会,并作了“关于药品管理法修订的几个问题”的主旨演讲。

现行药品管理法于1984年9月20日通过,1985年7月1日实施,2001年2月28日进行了第一次修订。目前,国家食品药品监督管理总局正在组织开展第二次全面修订。

焦红指出,本次修订药品管理法的总体思路是,贯彻落实党中央国务院对药品管理的新精神,适应新时期广大人民群众对药品安全需求不断提升和建立最严格食品药品监管制度的需求,立足当前,着眼长远,保障药品安全有效、质量可靠,促进医药产业转型升级、加快医药强国之路的建设。认真总结药品审评审批改革经验,积极探索药品安全工作规律,明确各方权利和义务,强化责任落实,建立科学、高效、透明的药品

安全治理体系,构建企业负责、行业自律、政府监管、部门协同、社会参与的药品安全社会共治新格局,全面提升药品质量安全水平。

焦红表示,本次修法将坚持以问题为导向、以国际先进经验为借鉴、以国情为基础、以创新为驱动的主要原则,目标是制定出一部能够更好地体现药品安全监管工作实际和发展趋势的良法,不仅理念更加先进,实现从药品“管理”到药品“治理”的转变,坚持全程治理、科学治理、分类治理、责任治理和社会治理;而且制度要更加完善,既贯彻党和国家“四个最严”的要求,又落实国务院简政放权、放管结合、职能转变的要求;还要保证机制更加健全,建立起激励与约束、褒奖和惩戒、自律和他律、动力与压力相结合的有效机制,不断创新监管机制和监管方式,提高监管效能。