

顺铂对人骨肉瘤U2OS细胞增殖、迁移和凋亡的影响

陈继铭¹, 蒋华生¹, 陈祝明², 邹尚浏², 黄虹铭¹, 吴晓静¹, 李 琴³, 何 生^{2*} (1. 广东医科大学附属医院骨科中心, 广东湛江 524001; 2. 广东医科大学附属第二医院骨科, 广东湛江 524003; 3. 广东医科大学, 广东湛江 524023)

摘要:目的 探讨顺铂(DDP)对人骨肉瘤U2OS细胞增殖、迁移和凋亡的影响。方法 U2OS细胞用不同浓度(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) DDP处理6、12、24、48、72 h, 分别用划痕实验、CCK-8法、流式细胞术、Western blot观察细胞迁移、增殖、凋亡、凋亡相关蛋白变化。结果 U2OS细胞迁移能力随DDP浓度增大、时间延长而降低。DDP作用24 h后, U2OS细胞生长活性随着DDP浓度增加而下降($P<0.01$ 或 0.05), 而细胞凋亡率明显升高($P<0.01$ 或 0.05)。U2OS细胞凋亡相关蛋白cleaved-PARP、p-ERK/ERK、caspase-9、Bax表达随DDP浓度升高而增加($P<0.01$), 而Bcl-2表达减少($P<0.01$)。结论 DDP可抑制U2OS细胞增殖和迁移, 并通过上调cleaved-PARP、p-ERK/ERK、caspase-9、Bax表达及下调Bcl-2表达促进细胞凋亡。

关键词: U2OS细胞; 顺铂; 增殖; 凋亡

中图分类号: R 738.1

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)04-0386-05

Effect of cis-platinum on proliferation, migration and apoptosis of human osteosarcoma U2OS cells

CHEN Ji-ming¹, JIANG Hua-sheng¹, CHEN Zhu-ming², ZOU Shang-liu², HUANG Hong-ming¹, WU Xiao-jing¹, LI Qin³, HE Sheng^{2*} (1. Department of Orthopedic Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Orthopedic Surgery, Second Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524003, China; 3. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To study the effect of cis-platinum (DDP) on proliferation, migration and apoptosis of human osteosarcoma U2OS cells. Methods U2OS cells were treated with different concentrations (10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) of DDP for 6, 12, 24, 48, 72 h. The migration, proliferation, apoptosis, and apoptosis-associated proteins of U2OS cells were detected by scratch, CCK-8, flow cytometry, and Western blot, respectively. Results DDP suppressed migration of U2OS cells in concentration- and time-dependent manner. After treated with DDP for 24-72 h, growth activity of U2OS cells decreased, while apoptotic rate increased as incremental DDP concentrations ($P<0.01$ or 0.05). Overexpression of cleaved PARP, p-ERK/ERK, caspase-9 and Bax, and downexpression of Bcl-2 were observed as DDP concentrations ($P<0.01$). Conclusion DDP could inhibit proliferation and migration, and promote apoptosis in U2OS cells through upregulation of cleaved PARP, p-ERK/ERK, caspase-9 and Bax, and downregulation of Bcl-2.

Key words: U2OS cells; cis-platinum; proliferation; apoptosis

骨肉瘤(OS)是儿童和青少年最常见的原发性恶性骨肿瘤, 具有较高的致残率和致死率, 临床上仅表现为局部肿胀和疼痛, 偶伴有关节性功能障碍, 早期在一定程度极有可能发生肺部等其他部位转移, 且发展迅速^[1-2]。目前OS采用以化疗药物为主的

综合治疗方式。然而随着治疗周期的延长, 患者易出现耐药情况, 化疗效果受到极大影响, 这亦成为OS治疗的重点与难点。因此寻求一种安全、有效的药物显得尤为重要。顺铂(DDP)是一种临床上常见的化疗药物, 已被广泛用于治疗多种癌症, 如OS等,

基金项目: 湛江市非资助科技攻关专题(No.2018B101); 湛江市科技专项(No.2017A304)

收稿日期: 2020-02-18; 修订日期: 2020-04-07

作者简介: 陈继铭(1980-), 男, 硕士, 副主任医师

通信作者: 何 生(1969-), 男, 本科, 主任医师, E-mail: 867796788@qq.com

但其作用机制还不明确^[3]。本实验主要通过研究DDP对人骨肉瘤细胞U2OS诱导凋亡的作用及其潜在分子机制,为后续OS的治疗提供用药依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 人骨肉瘤细胞株U2OS购于中国科学院上海细胞库;DDP(江苏豪森药业集团有限公司,中国),胎牛血清、胰蛋白酶、100×青/链霉素和高糖DMEM培养基(Gibco,美国),细胞周期检测试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司,PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, 韩国), AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(BD, 美国), CCK-8、一抗稀释液、二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司, 中国), 鼠抗 α -Tubulin单克隆抗体和兔抗PARP、Bax、Bcl-2(Cell Signaling Technology, 美国), 二抗羊抗兔和羊抗鼠(Santa Cruz, 美国), PVDF膜(Millipore, 美国), 发光液(Thermo scientific, 美国), BD FACSCanto II流式细胞仪(BD, 美国), BX51免疫荧光显微镜(OLYMPUS, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将U2OS细胞接种于10 cm²培养皿, 用含10% FBS、100 U/mL青霉素、100 g/L链霉素H-DMEM培养基, 置于37℃、5% CO₂环境下培养, 24 h后更换培养基, 并每3天更换1次, 待细胞融合度达80%~90%时, PBS清洗细胞2次, 用含0.25%-EDTA胰蛋白酶消化、传代备用。

1.2.2 细胞形态学观察 取对数生长期U2OS细胞接种于培养皿中, 待细胞融合达80%, 用不同浓度DDP(0、2.5、5、10、20、40 μ mol/L)处理细胞24 h后, 光学显微镜观察细胞形态学变化。

1.2.3 细胞划痕实验检测DDP对人骨肉瘤U2OS细胞侵袭及迁移的影响 用不同浓度DDP(0、10、20、40 μ mol/L)作用于U2OS细胞, 并于12、24、48 h后, 倒置显微镜下观察细胞的迁移情况。

1.2.4 CCK-8法检测DDP对人骨肉瘤U2OS细胞增殖的影响 取对数生长期的U2OS细胞接种于96孔板中, 待细胞贴壁后, 更换含不同浓度DDP(0、2.5、5、10、20、40 μ mol/L)完全培养基, 分别处理6、12、24、48、72 h后, 参照CCK-8试剂盒说明书处理细胞, 于492 nm波长酶标仪测定各孔吸光值(OD), 每一浓度设置5个复孔, 计算细胞OD值活力。

1.2.5 AnnexinV-FITC/PI双染检测细胞凋亡^[4] 取对

数生长期的U2OS细胞接种于6孔板中, 细胞贴壁后, 分别用0、10、20、40 μ mol/L DDP处理24 h, 收集上清液, 待胰酶消化贴壁细胞后, 室温下2 000 r/min离心10 min, PBS漂洗, 1×Binding Buffer重悬细胞至1×10⁶个/mL, 取细胞悬液100 μ L至流式管中, 依次加入FITC-Annexin V和PI溶液, 室温避光孵育30 min后, 通过流式细胞仪进行检测。

1.2.6 以Western-blot检测细胞凋亡相关蛋白的表达^[4] 将对数生长期的U2OS细胞接种于培养皿中, 细胞贴壁后, 分别用0、10、20、40 μ mol/L DDP处理24 h后, 收集贴壁和悬浮细胞, 蛋白裂解液提取蛋白, 并通过凝胶电泳将蛋白电转至PVDF膜, 封闭孵育2 h, 一抗4℃摇床过夜, 二抗室温孵育2 h。采用image J软件对蛋白灰度值进行分析。

1.3 统计学处理

数据采用Graphpad Prism 7.0软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DDP对U2OS形态学的影响

与0 μ mol/L比较, DDP其他浓度作用细胞, 细胞形态均出现皱缩, 部分细胞变圆、体积缩小、成团、漂浮、脱落、贴壁细胞间隙变大, 且随DDP浓度的增大, 细胞变化越明显。见图1。

2.2 DDP对U2OS细胞侵袭及迁移情况的影响

同一浓度组比较, 随着DDP作用时间的延长, 贴壁细胞间隙变大, 并且迁移能力降低, DDP浓度越大或作用时间越久, 其变化越明显。见图2。

2.3 DDP对U2OS细胞增殖的影响

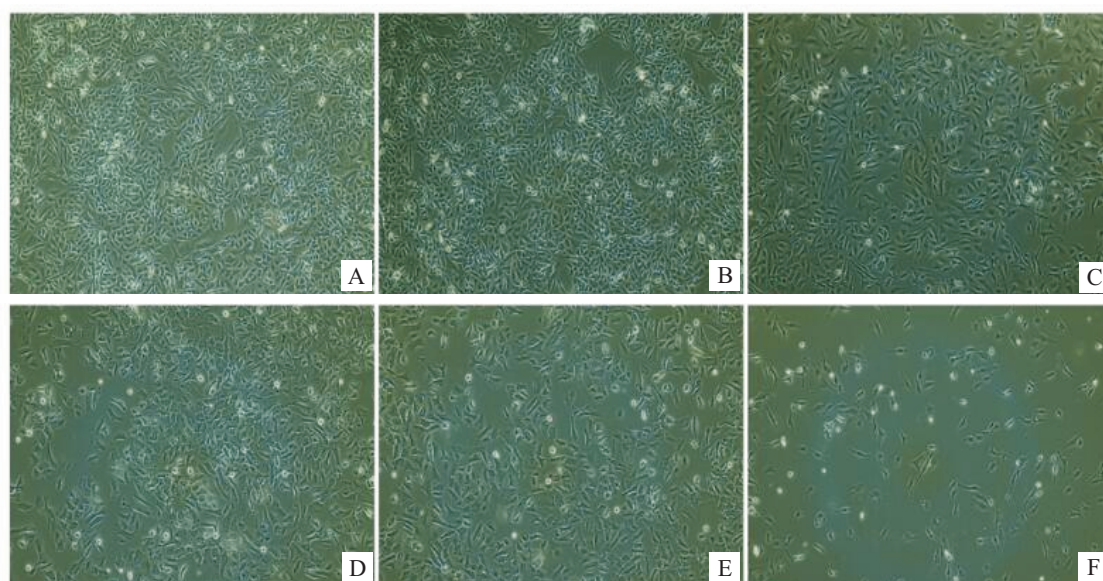
在6 h时间点上, U2OS细胞的生长活性随DDP浓度的增加无明显变化($P > 0.05$), 24 h后, U2OS细胞的生长活性随着DDP浓度的增加而下降($P < 0.05$ 或0.01)。见表1。

2.4 DDP对U2OS细胞凋亡的影响

处理U2OS细胞24 h后, 流式细胞术检测得到AnnexinV-FITC/PI双染双变量散点图, 结果显示早期凋亡率(Q4)和晚期凋亡率(Q2)随DDP浓度的增高而上升, 且以Q2期的变化更为显著, 见图3。U2OS细胞凋亡率(Q2+Q4)随DDP浓度的增加明显升高($P < 0.05$ 或0.01), 见表2。

2.5 DDP对U2OS细胞凋亡的影响

U2OS细胞相关凋亡蛋白cleaved-PARP、p-ERK/



A、B、C、D、E、F分别表示DDP浓度：0、2.5、5、10、20、40 μmol/L

图1 不同浓度DDP处理U2OS细胞24 h后的形态变化 (400×)

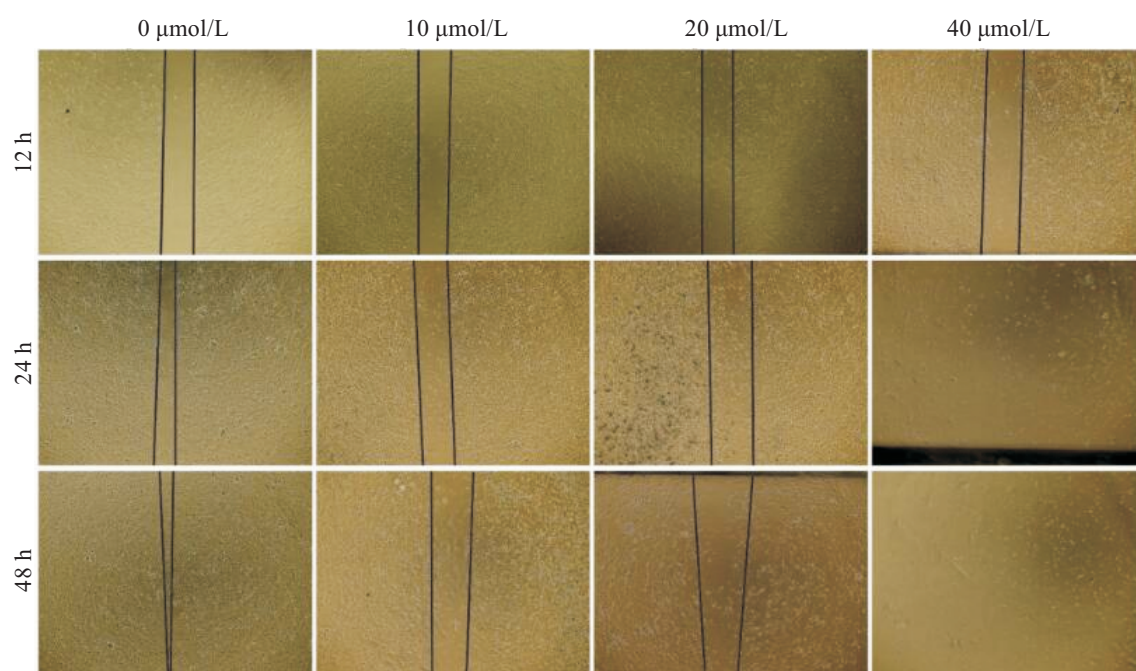


图2 DDP对U2OS细胞侵袭及迁移情况的影响 (400×)

表1 DDP对U2OS细胞增殖的影响

					$\bar{x} \pm s, n=6$
DDP/(μmol/L)	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
0	0.61 ± 0.03	0.86 ± 0.05	1.25 ± 0.07	1.99 ± 0.07	1.97 ± 0.03
2.5	0.61 ± 0.06	0.81 ± 0.07	1.22 ± 0.06	1.87 ± 0.09	1.75 ± 0.06^a
5	0.67 ± 0.03	0.84 ± 0.09	1.17 ± 0.08	1.63 ± 0.12^{ab}	1.51 ± 0.09^{ab}
10	0.63 ± 0.04	0.84 ± 0.04	0.80 ± 0.11^{abc}	0.73 ± 0.11^{abc}	0.54 ± 0.04^{abc}
20	0.65 ± 0.02	0.75 ± 0.09	0.62 ± 0.05^{abcd}	0.38 ± 0.03^{abcd}	0.28 ± 0.01^{abcd}
40	0.60 ± 0.04	0.57 ± 0.05^{abcdf}	0.44 ± 0.05^{abcde}	0.31 ± 0.03^{abcd}	0.20 ± 0.01^{abcd}

同一时间点, 与0 μmol/L比较: ^a $P < 0.01$; 与2.5 μmol/L比较: ^b $P < 0.01$; 与5 μmol/L比较: ^c $P < 0.01$; 与10 μmol/L比较:

^d $P < 0.01$; 与20 μmol/L比较: ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

表2 DDP对U2OS细胞凋亡的影响 $\bar{x} \pm s, n=6$

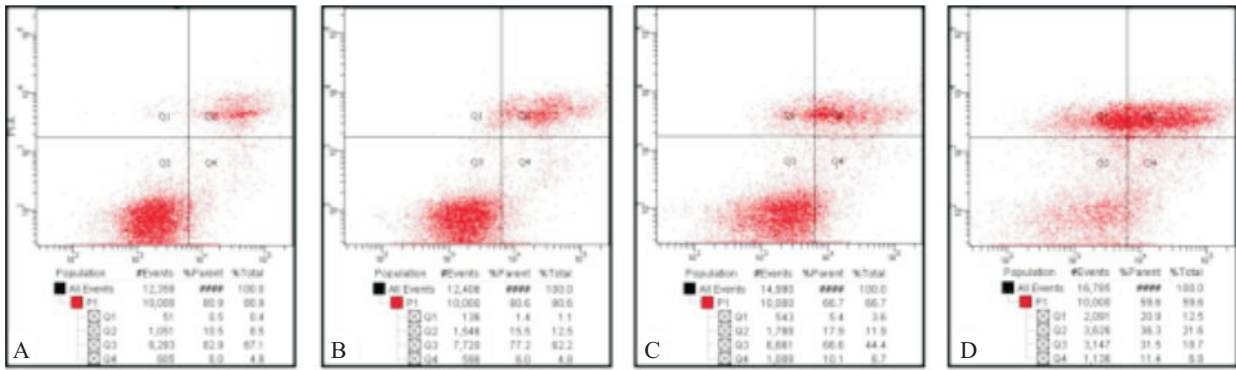
DDP/($\mu\text{mol/L}$)	Q2期	Q4期	Q2+Q4期
0	10.50 $\pm$ 0.50	5.63 $\pm$ 0.55	16.13 $\pm$ 1.00
10	14.57 $\pm$ 1.37 ^a	6.03 $\pm$ 0.45	20.60 $\pm$ 1.73 ^a
20	17.63 $\pm$ 0.74 ^{bc}	10.20 $\pm$ 0.26 ^{ad}	27.83 $\pm$ 0.47 ^{bc}
40	36.23 $\pm$ 0.06 ^{bde}	11.20 $\pm$ 0.26 ^{bd}	47.43 $\pm$ 0.31 ^{bde}

与0 $\mu\text{mol/L}$ 比较: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与10 $\mu\text{mol/L}$ 比较: ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 与20 $\mu\text{mol/L}$ 比较: ^e $P<0.01$

ERK、Casp9、Bax的表达量随DDP浓度的升高而增加($P<0.01$), Bcl-2则随DDP浓度的增加而下降($P<0.01$)。见图4和表3。

3 讨论

OS是一种罕见的高度异质性骨肿瘤之一, 具有侵袭力强、预后差等特点, 其治疗方式主要以化疗



A、B、C、D分别表示DDP浓度: 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$

图3 AnnexinV-FITC/PI双染法检测DDP对U2OS细胞处理24 h后凋亡的影响

表3 凋亡相关蛋白条带灰度值的比较 $\bar{x} \pm s, n=6$

DDP/($\mu\text{mol/L}$)	cleaved-PARP	p-ERK/ERK	Casp9	Bax	Bcl-2
0	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
10	1.69 $\pm$ 0.36	1.48 $\pm$ 0.15	2.04 $\pm$ 0.30 ^a	0.85 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.09 ^a
20	4.78 $\pm$ 1.17 ^{ab}	1.99 $\pm$ 0.32 ^a	2.22 $\pm$ 0.34 ^a	1.92 $\pm$ 0.30 ^{ab}	0.38 $\pm$ 0.06 ^{ab}
40	6.15 $\pm$ 0.82 ^{abc}	6.15 $\pm$ 0.82 ^{abc}	3.38 $\pm$ 0.29 ^{abc}	1.73 $\pm$ 0.15 ^{ab}	0.11 $\pm$ 0.01 ^{abc}

与0 $\mu\text{mol/L}$ 比较: ^a $P<0.01$; 与10 $\mu\text{mol/L}$ 比较: ^b $P<0.01$; 与20 $\mu\text{mol/L}$ 比较: ^c $P<0.01$

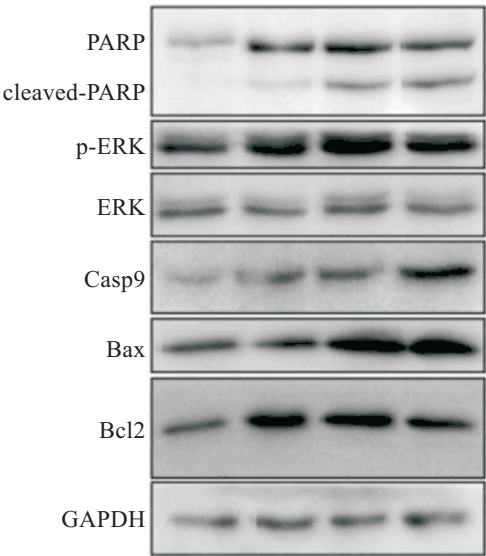


图4 DDP对U2OS细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

用, 容易产生耐药, 降低治愈率。因此, 寻找高效、低毒的抗肿瘤药物是目前研究OS有效治疗的途径之一。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主有序性死亡, 主要表现在细胞染色质凝集并边缘化、细胞浓缩、凋亡小体产生等, 是机体维持体内平衡状态的重要调节方式之一^[6-7]。本实验中我们通过不同浓度DDP作用于U2OS细胞, 细胞形态学及CCK-8检测结果发现在0~40 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围和12~72 h内, DDP体外实验可剂量和时间依赖性抑制人骨肉瘤U2OS细胞的生长。

侵袭和转移是恶性肿瘤的重要特征, 当凋亡不受机体的正常调控时, 细胞的增殖、凋亡将出现异常, 与这患者的生存和预后密切相关^[6, 8]。Annexin V-FITC/PI双标记染色可作为早期检测细胞凋亡的方法, 能够准确反映细胞的凋亡过程。本文研究结果显示DDP可诱导U2OS细胞凋亡, 并随着作用浓度的增加, 凋亡率也逐渐升高。划痕实验检测发现, 随

为主, 其他综合治疗为辅^[5]。但在OS化疗过程中使用的药物大多化疗周期较长, 且具有一定的毒副作

着DDP浓度的增加, U2OS侵袭、转移的细胞数亦逐渐减少, 说明DDP可降低人骨肉瘤U2OS细胞的侵袭和转移能力, 且随浓度的增加而降低。

细胞凋亡是细胞发育的重要调控机制, 主要通过外在和内在的细胞凋亡两条途径进行。第一种是内源性或线粒体途径, 其通过促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的Bcl-2家族介导; 第二种是通过FAS死亡受体介导的外在细胞凋亡途径或细胞质途径^[9-10]。在线粒体通路中, 下游caspase因子的激活受Bcl-2家族成员的调控。其中凋亡相关的线粒体外膜通透性需要促凋亡的Bax蛋白及抗凋亡的Bcl-2蛋白激活。Bax与Bcl-2的比值对于确定线粒体膜间隙中凋亡蛋白(包括激活Casp9因子)的释放具有重要意义^[10]。在本研究中, 我们发现Bcl-2、Bax、Casp9和cleaved-PARP在骨肉瘤U2OS细胞中的表达随DDP浓度的升高而增加, 表明DDP或可通过线粒体途径Bax/Bcl-2比率的变化和Casp9活化的影响, 引起cleaved-PARP的切割以诱导U2OS细胞发生凋亡。

丝裂原活化蛋白激酶通路(MAPK)是结构相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族蛋白协调各种细胞外信号调节细胞生长和凋亡^[11-12]。有研究报道, DDP可诱导的细胞外信号调节激酶(ERK)激活先于p53介导的DNA损伤反应^[11]。我们实验中通过不同浓度DDP作用于U2OS细胞后, p-ERK/ERK表达呈浓度依赖性上调。在调控凋亡基因中, Bcl-2家族与细胞凋亡的发生、发展最为密切^[13]。本研究中我们通过蛋白印迹法证实DDP可通过上调Bax和下调Bcl-2蛋白表达促进U2OS细胞凋亡, 这些结果进一步支持了DDP通过MAPK通路调控Bcl-2家族蛋白调控诱导细胞凋亡。

综上所述, 本研究在细胞层面证实了DDP对人骨肉瘤细胞U2OS增殖有明显的抑制作用, 还具有降低其侵袭和迁移的能力。其作用机制可能是MAPK通路调控Bcl-2家族蛋白表达, 并且在线粒体通路中激活Casp9因子、Bax和Bcl-2蛋白, 导致PARP蛋白在内的多种关键细胞底物发生裂解, 最终促进细胞凋亡, 其具体机制还需进一步研究。

参考文献:

[1] SIMPSON S, DUNNING M D, BROT S, et al. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology,

epidemiology, prognosis, treatment and genetics[J]. *Acta Vet Scand*, 2017, 59(1): 71.

- [2] 张健峰, 刘云霞. 骨肉瘤治疗的研究进展[J]. *浙江医学*, 2019, 41(7): 723-727.
- [3] DASARI S, TCHOUNWOU P B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364-378.
- [4] 孔俊超, 陈祝明, 吕贵何, 等. 虫草素对人骨肉瘤细胞株MG63增殖及凋亡的影响[J]. *广东医学*, 2018, 39(4): 509-510.
- [5] ANDERSON M E. Update on survival in osteosarcoma[J]. *Orthop Clin North Am*, 2016, 47(1): 283-292.
- [6] PISTRITTO G, TRSCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603-619.
- [7] LI J, YANG Z, LI Y, et al. Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44763-44778.
- [8] SONG M, WANG Y, ZHANG Z, et al. PSMC2 is up-regulated in osteosarcoma and regulates osteosarcoma cell proliferation, apoptosis and migration[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 933-953.
- [9] LIU Z, LI G, GOU Y, et al. JS-K, a nitric oxide prodrug, induces DNA damage and apoptosis in HBV-positive hepatocellular carcinoma HepG2.2.15 cell[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 989-997.
- [10] WANG Q, YU X, LI F, et al. Efficacy of celastrol combined with cisplatin in enhancing the apoptosis of U2OS osteosarcoma cells via the mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways of apoptosis[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 3305-3313.
- [11] MUKHERJEE S, DASH S, LOHITESH K, et al. The dynamic role of autophagy and MAPK signaling in determining cell fate under cisplatin stress in osteosarcoma cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179203.
- [12] ACHKAR I W, ABDULRAHMAN N, AL-SULAITI H, et al. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 96.
- [13] TAN G, QIU M, CHEN L, et al. JS-K, a nitric oxide prodrug, regulates growth and apoptosis through the ubiquitin-proteasome pathway in prostate cancer cells[J]. *Bmc Cancer*, 2017, 17(1): 376.