

Tagitinin D 对人骨肉瘤MG63 细胞增殖及凋亡的影响

邹尚浏, 刘昌权, 陈祝明, 叶亲永, 李益丰, 郭庭余, 杨宇宁, 刘思景* (广东医科大学附属第二医院创伤骨科, 广东湛江 524003)

摘要: **目的** 了解不同浓度Tagitinin D 对人骨肉瘤MG63 细胞增殖与凋亡的影响。**方法** 将不同浓度Tagitinin D 作用于MG63 细胞 24 h 后, 倒置显微镜观察细胞形态变化, MTS 法检测Tagitinin D 对MG63 细胞增殖活性的影响, 流式细胞术检测Tagitinin D 对MG63 细胞凋亡和周期的作用, 细胞免疫荧光和Western-blot 检测Tagitinin D 对骨肉瘤细胞凋亡的影响。**结果** 同一时间点, MG63 细胞的生长抑制率随Tagitinin D 浓度增加而升高 ($P<0.05$ 或 0.01)。随着Tagitinin D 浓度升高, G0/G1 期细胞比例下降, G2/M 期和S 期细胞比例升高, 促凋亡蛋白Bax 表达升高, 抗凋亡蛋白Bcl-2 表达降低 ($P<0.05$ 或 0.01)。**结论** Tagitinin D 能够抑制MG63 细胞增殖, 阻滞细胞周期进展, 促进MG63 细胞凋亡。

关键词: MG63 细胞; Tagitinin D; 凋亡; Bcl-2; Bax

中图分类号: R 738

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 06-0626-05

Effects of Tagitinin D on apoptosis of human osteosarcoma cell line MG63

ZOU Shang-liu, LIU Chang-quan, CHEN Zhu-ming, YE Qin-yong, LI Yi-feng, GUO Ting-yu, YANG Yu-ning, LIU Si-jing* (Department of Orthopedic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524003, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of Tagitinin D of different concentrations on the proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell line MG63. **Methods** After MG63 cells were treated with Tagitinin D of different concentrations for 24 h, their morphological changes were observed with inverted microscope. The effect of Tagitinin D on the proliferation of MG63 cells was detected by MTS assay. The effect of Tagitinin D on the cell cycle and apoptosis of MG63 cells was detected with flow cytometry. The effect of Tagitinin D on the apoptosis of osteosarcoma cells was detected with immunofluorescence and Western-blot. **Results** At the same time point, the growth inhibition rate of MG63 cells increased with the increase of Tagitinin D concentration ($P<0.05$ or 0.01). With the increase of Tagitinin D concentration, the proportion of cells in G0/G1 phase decreased, the proportion of cells in G2/M phase and S phase increased, the expression of pro-apoptotic protein Bax increased, and the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased ($P<0.05$ or 0.01). **Conclusion** Tagitinin D can inhibit proliferation, block cell cycle progression, and promote apoptosis of MG63 cells.

Key words: MG63 cells; Tagitinin D; apoptosis; Bcl-2; Bax

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的原发性恶性肿瘤,具有较高的致残率和致死率^[1]。随着手术、新辅助化疗和重建材料等技术的发展,骨肉瘤患者总生存率从 20% 显著提高到 70%,且保肢治疗已成为骨肉瘤的主要治疗策略^[1-2]。然而随着治疗周期延长、药物毒性及耐药等情况出现,患者的化疗效果受到极大影响。因此寻求一种安全且具有抗骨肉瘤作用的药物显得尤

为重要。Tagitinin D (1-Acetyltagitinin D) 属倍半萜内酯类天然小分子化合物,具有抗肿瘤、抗炎、抗菌等作用^[3-5]。目前有关Tagitinin D 在骨肉瘤中的作用机制仍未明了,因此,本研究以人骨肉瘤 MG63 细胞为研究对象,观察Tagitinin D 对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响,旨在了解其抑制肿瘤的发生机制,为开发并利用Tagitinin D 的药用价值提供参考。

收稿日期: 2022-04-14

基金项目: 广东医科大学科研基金项目 (GDMUM202030), 湛江市非资助科技攻关项目 (2020B01451), 湛江市非资助科技攻关项目 (2020B01460)

作者简介: 邹尚浏 (1985-), 男, 学士, 主治医师, E-mail: 13763051071@163.com

通信作者: 刘思景 (1981-), 男, 硕士, 副主任医师, E-mail: 38869266@qq.com

1 材料和方法

1.1 材料

人骨肉瘤 MG63 细胞株(中国科学院上海细胞库),胰蛋白酶、胎牛血清、高糖DMEM 培养基和 100×青/链霉素(Gbico, 美国), Tagitinin D(云南西力生物技术有限公司, 纯度 99%), MTS(Promega, 美国), AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(BD, 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), PVDF 膜(Millipore, 美国)、发光液(Thermo scientific, 美国), 一抗、二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司, 中国), 兔抗 Bax、Bcl-2、GAPDH 单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国), 二抗羊抗兔及羊抗鼠(Santa Cruz, 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 细胞形态学观察 取对数生长期MG63 细胞接种于 10 cm² 培养皿中,待细胞融合达 80% 后(细胞数约 1.0×10⁷ 个),用不同浓度 Tagitinin D (0、10、20、40 μmol/L) 处理细胞 24 h, 光学显微镜记录细胞形态学变化。

1.2.2 MTS 检测 Tagitinin D 对人骨肉瘤细胞 MG63 增殖的影响 取对数生长期MG63 细胞接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后(细胞数约 1.0×10⁵ 个),更换含不同浓度 Tagitinin D (0、10、20、40 μmol/L) 完全培养基,分别处理 12、24、48、72 h 后,收取样本,结合 MTS 试剂盒说明书进行操作,酶标仪测定吸光值(492 nm),每一浓度设置 5 个复孔。计算细胞增殖抑制率^[6],抑制率(IR)=(对照组吸光值-实验组吸光值)/对照组吸光值×100%。

1.2.3 流式细胞术 PI 染色检测细胞周期 取对数生长期 MG63 细胞接种于 6 孔板中(细胞数约 2.5×10⁶ 个),培养 24 h 后,用不同浓度 Tagitinin D (0、10、20、40 μmol/L) 处理细胞 24 h,离心后加入 75% 乙醇,消化混匀重悬后,4 °C 固定过夜。再次离心收集细胞,预冷 PBS 洗涤后离心,200 μL PBS 重悬混匀细胞后加入

20 μL RNase A Solution, 37 °C 水浴孵育 30 min, 400 目筛网过滤后加入 400 μL PI 染色液轻轻混匀,4 °C 避光孵育 30 min,流式细胞仪上机检测。

1.2.4 AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡 取对数生长期的 MG63 细胞接种于 6 孔板中,细胞数约 2.5×10⁶ 个,培养细胞贴壁后,用不同浓度 Tagitinin D (0、10、20、40 μmol/L) 处理,收集上清液,胰酶消化贴壁细胞,离心 10 min,预冷 PBS 漂洗, Binding Buffer 重悬,调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL,同时选取 100 μL 细胞悬液至流式管中,混匀,加入 FITC-Annexin V 和 PI 溶液,室温避光孵育 30 min,流式细胞仪检测^[6]。

1.2.5 细胞免疫荧光染色 将 MG63 细胞接种于预置盖玻片的 12 孔板中,待细胞完全贴壁后,用不同浓度 Tagitinin D (0、10、20、40 μmol/L) 处理 MG63 细胞 24 h 后收集爬片,固定后用 0.1% Triton X-100/PBS 摇床透化 10 min,滴加 DAPI 覆盖爬片,避光孵育 30 min,封片,倒置荧光显微镜采集图像^[6]。

1.2.6 Western-blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达 取对数生长期 MG63 细胞(细胞数约 1.0×10⁷ 个)接种于 10 cm² 培养皿中,细胞贴壁后,用不同浓度 Tagitinin D (0、10、20、40 μmol/L) 处理 MG63 细胞 24 h,收集贴壁和悬浮细胞,离心 10 min 后去上清液,Proprep 蛋白裂解液提取细胞蛋白,SDS-PAGE 电泳后将蛋白电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,摇床孵育 2 h,加入一抗 4 °C 过夜后,加入二抗,室温孵育 2 h。image J 软件分析蛋白条带灰度值^[6]。

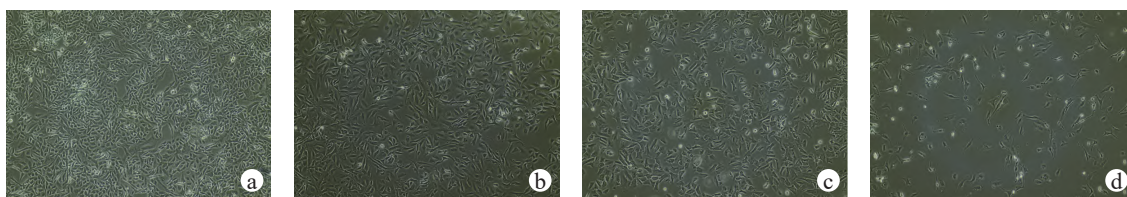
1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 7.0 软件进行统计,结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tagitinin D 对 MG63 形态学的影响

与 0 μmol/L Tagitinin D 比较,10、20、40 μmol/L Tagitinin D 细胞形态出现胞质皱缩,部分细胞体积缩小、变形和脱落漂浮(已去除),贴壁细胞间隙变大,且随 Tagitinin D 剂量增加变化越明显,见图 1。



a、b、c、d 分别表示 0、10、20、40 μmol/L Tagitinin D
图 1 不同浓度 Tagitinin D 处理 MG63 细胞 24 h 后形态变化(×100)

2.2 Tagitinin D 对MG63 细胞增殖的影响

根据酶标仪检测吸光度值计算出 Tagitinin D 作用于 MG63 细胞的 IC₅₀ 值为 (28.33±1.25) μmol/L。同一时间点, MG63 细胞的生长抑制率随 Tagitinin D 浓度增加而升高 ($P<0.05$ 或 0.01), 见表 1。

2.3 Tagitinin D 对MG63 细胞周期的影响

随着 Tagitinin D 浓度升高, G₀/G₁ 期细胞比例下降, G₂/M 期和 S 期细胞比例升高 ($P<0.05$ 或 0.01); 当

Tagitinin D 浓度达 40 μmol/L, 可同时阻滞 MG63 细胞 G₂/M 期和 S 期进展 ($P<0.05$ 或 0.01)。见图 2 和表 2。

2.4 细胞免疫荧光染色观察 Tagitinin D 对MG63 细胞凋亡的影响

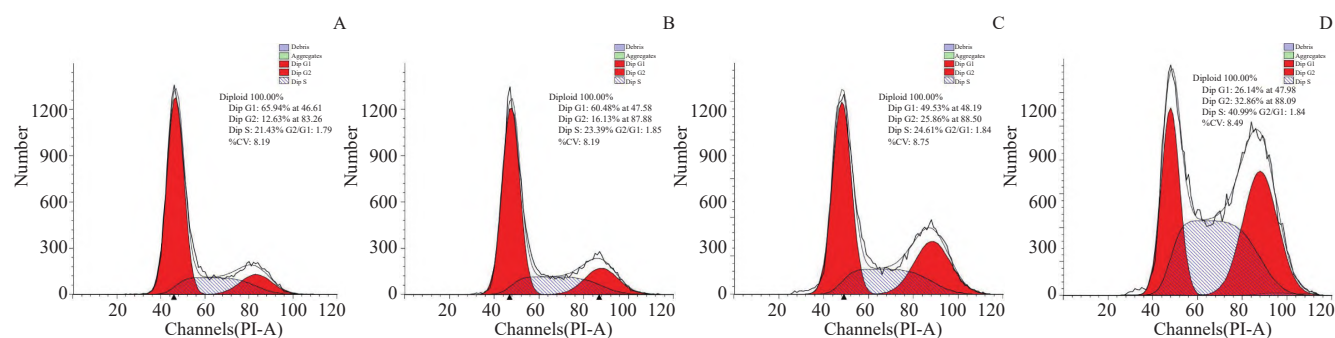
与 0 μmol/L Tagitinin D 比较, 10、20、40 μmol/L Tagitinin D 处理组中的细胞稀疏、细胞间隙增大、细胞核固缩等, 细胞凋亡比例随 Tagitinin D 浓度的增高而增多, 见图 3。

表 1 Tagitinin D 对MG63 细胞增殖的影响

($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tagitinin D 浓度	抑制率(%)			
	12 h	24 h	48 h	72 h
0 μmol/L	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
10 μmol/L	7.10±3.01 ^a	11.01±6.03 ^a	8.20±4.10 ^a	4.20±1.08 ^b
20 μmol/L	13.02±2.20 ^{ac}	14.20±1.25 ^a	34.35±3.12 ^{ac}	29.38±4.22 ^{ac}
40 μmol/L	23.13±2.05 ^{acd}	69.40±9.02 ^{acd}	75.74±5.84 ^{acd}	77.09±3.94 ^{acd}

同一时间点与 0 μmol/L Tagitinin D 比较: ^a $P<0.01$, ^b $P<0.05$; 与 10 μmol/L Tagitinin D 比较: ^c $P<0.01$; 与 20 μmol/L Tagitinin D 比较: ^d $P<0.01$



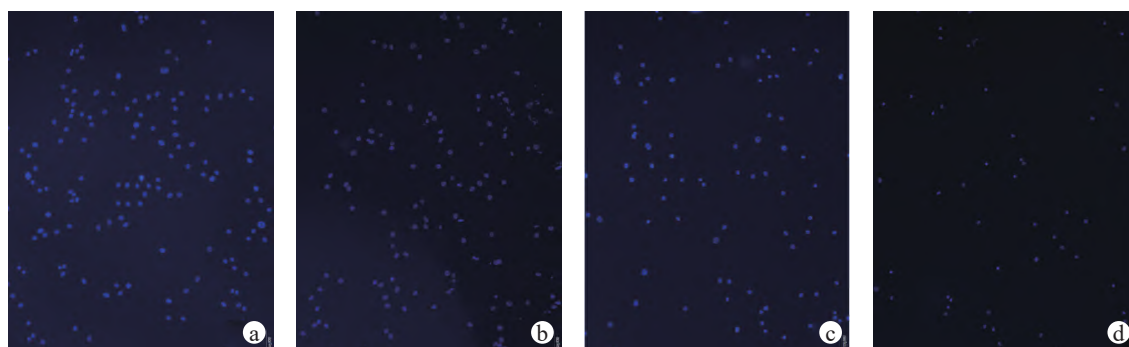
A、B、C、D 分别表示 0、10、20、40 μmol/L Tagitinin D
图 2 PI 单染法检测 Tagitinin D 对MG63 细胞作用 24 h 后周期分布

表 2 Tagitinin D 作用MG63 细胞 24 h 后细胞周期分布

($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tagitinin D 浓度	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期	S 期
0 μmol/L	64.90±0.73	13.14±0.52	21.95±0.57
10 μmol/L	61.53±1.74 ^a	15.59±0.88 ^a	22.87±0.86
20 μmol/L	49.93±0.60 ^{ab}	25.94±0.47 ^{ab}	24.12±0.34 ^{ac}
40 μmol/L	25.35±2.18 ^{acd}	32.32±0.77 ^{acd}	41.56±0.85 ^{acd}

同一时期与 0 μmol/L Tagitinin D 比较: ^a $P<0.01$; 与 10 μmol/L Tagitinin D 比较: ^b $P<0.01$, ^c $P<0.05$; 与 20 μmol/L Tagitinin D 比较: ^d $P<0.01$



a、b、c、d 分别表示 0、10、20、40 μmol/L Tagitinin D
图 3 细胞免疫荧光染色观察 Tagitinin D 处理MG63 细胞 24 h 后胞核形态变化 (×100)

2.5 Tagitinin D 对MG63 细胞凋亡的影响

随着Tagitinin D 浓度的增加,促凋亡蛋白Bax 的表达升高,抗凋亡蛋白Bcl-2 的表达降低($P<0.05$ 或 0.01),见图4 和表3。

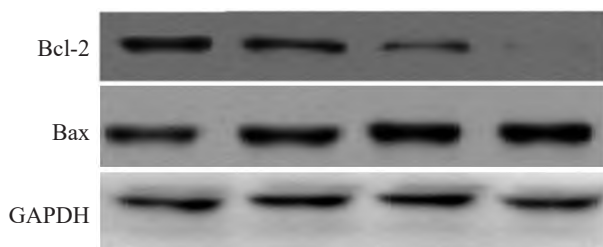


图4 Tagitinin D 对MG63 细胞凋亡相关蛋白表达水平的变化

表3 凋亡相关蛋白条带灰度值比 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tagitinin D 浓度	Bax/GAPDH	Bcl-2/ GAPDH
0 $\mu\text{mol/L}$	0.72 ± 0.19	2.22 ± 0.51
10 $\mu\text{mol/L}$	1.03 ± 0.19^a	1.71 ± 0.26^a
20 $\mu\text{mol/L}$	1.35 ± 0.09^{ab}	0.79 ± 0.26^{ab}
40 $\mu\text{mol/L}$	1.61 ± 0.14^{abc}	0.18 ± 0.61^{abd}

与 0 $\mu\text{mol/L}$ Tagitinin D 比较: $^aP<0.01$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ Tagitinin D 比较: $^bP<0.01$; 与 20 $\mu\text{mol/L}$ Tagitinin D 比较: $^cP<0.01$, $^dP<0.05$

3 讨论

骨肉瘤是一种罕见的高度异质性、恶性骨肿瘤,具有侵袭力强、预后差等特点。目前,临床上治疗骨肉瘤的方式主要以化疗为主同时辅以其他综合治疗。而在骨肉瘤化疗过程中使用的大剂量化疗药物具有一定的毒副作用,化疗周期较长,并且容易导致细胞耐药性增加,影响疾病治愈效果^[6-7]。由于抗癌药物存在的局限性,天然小分子化合物及其衍生物为抗癌新药的研发提供了新的思路。有研究表明抗癌药物中一半来源于天然产物及其衍生物^[8]。因此,研究具有高效且低毒的药物是治疗骨肉瘤的有效途径之一。本文主要从周期阻滞等方面研究Tagitinin D 诱导人骨肉瘤细胞凋亡的作用机制。

本实验中,我们首先用MTS 法检测Tagitinin D 诱导人骨肉瘤MG63 细胞活力的情况,结果提示在同一时间点, MG63 细胞的生长抑制率随Tagitinin D 浓度的增加而升高,说明Tagitinin D 能显著抑制MG63 细胞的活力,从而达到抑制肿瘤细胞增值的可能。

细胞周期中的每一时相顺利转变是细胞进行有丝分裂的关键。Tagitinin D 在 MG63 细胞中产生了G2/M 期和S 期相停滞,引起细胞凋亡。本研究发现,随着Tagitinin D 浓度的升高, MG63 细胞G2/M 期和S

期细胞比例明显增加,表明Tagitinin D 可能通过阻滞MG63 细胞G2/M 期和S 期进展抑制细胞增殖。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^[9]。我们通过免疫荧光染色发现Tagitinin D 可导致MG63 细胞核固缩、细胞间隙变大,提示Tagitinin D 可能诱导MG63 细胞凋亡。

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种途径进行^[10]。第一种途径是内源性或线粒体途径,其通过促凋亡蛋白Bax 和抗凋亡蛋白Bcl-2 家族介导;第二种途径是通过FAS 死亡受体介导的外在细胞凋亡途径或细胞质途径^[10-11]。在调控凋亡基因中, Bcl-2 家族主要引起内在细胞靶向抗凋亡,与凋亡的发生、发展最为密切^[11]。Western-blot 检测结果分析,促凋亡蛋白Bax 表达量呈Tagitinin D 浓度依赖性增加,抗凋亡蛋白Bcl-2 呈Tagitinin D 浓度依赖性下调。本研究中我们通过蛋白质印迹法证实Tagitinin D 可能通过上调Bax 和下调Bcl-2 蛋白表达诱导MG63 细胞凋亡,这些结果可能进一步支持了Tagitinin D 通过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Tagitinin D 对人骨肉瘤细胞MG63 的增殖具有明显的抑制作用,可通过改变MG63 细胞中Bax、Bcl-2 蛋白表达的平衡阻滞细胞周期进展,引发细胞凋亡。

参考文献:

- [1] YANG Y, HAN L, HE Z, et al. Advances in limb salvage treatment of osteosarcoma[J]. J Bone Oncol, 2017, 10: 36-40.
- [2] CORRE I, VERRECCHIA F, CRENN V, et al. The osteosarcoma microenvironment: A complex but targetable ecosystem[J]. Cells, 2020, 9(4): 976.
- [3] WEI R, ZHAO Y, WANG J, et al. Tagitinin C induces ferroptosis through PERK-Nrf2-HO-1 signaling pathway in colorectal cancer cells[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(11): 2703-2717.
- [4] 杨珊, 韦睿然, 陈远志, 等. Tagitinin D 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32: 359-364.
- [5] 王娟, 杨旭, 赵越勤, 等. Tagitinin F 诱导MDA-MB-231 细胞凋亡作用机制研究[J]. 中南药学, 2021, 19(5): 789-794.
- [6] 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): 506-510.
- [7] 陈继铭, 蒋华生, 陈祝明, 等. 顺铂对人骨肉瘤U2OS 细胞增殖、迁移和凋亡的影响[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(4): 386-390.

(下转第 649 页)

临床甲亢的单项诊断指标,具有较高准确性(其AUC分别为0.969、0.905);而原发性甲亢组2项、3项和4项指标联合检测未能提高其诊断效能,但FT3、FT4、TSH联合TGAb、TPOAb作为诊断指标,其AUC为1.000,约登指数最大值为1.000,敏感性和特异性均为100.0%,可准确区分原发性甲亢患者;亚临床甲亢组以FT3、FT4、TSH联合TGAb、TPOAb作为诊断指标时,AUC为0.952,约登指数最大值为0.787,敏感性较好(90.9%),但特异性(87.8%)有待进一步提高。上述结果说明我们在选择检测指标时既要考虑敏感性和特异性的高低,还要考虑准确性的问题。甲状腺疾病多属于自身免疫性疾病,临床上多数患者病情复杂多变。如甲亢并发桥本甲亢较多见,甲减因桥本氏甲状腺炎而引起的也不少见,特别是桥本氏甲状腺炎与桥本甲亢在治疗上不宜采用手术和放射性¹³¹I治疗,药物治疗也与单纯GD有较大差异。因此,建议对初诊患者的甲状腺功能检查,除了检查其TSH、TT3或FT3、TT4或FT4外,还应将甲状腺自身抗体TGAb、TPOAb检测列为常规项目,以免出现治疗上的失误。

综上所述,TSH、FT3、FT4联合TGAb、TPOAb检测,更有利于诊断及鉴别甲状腺疾病,且检测操作简便,值得临床推广。

参考文献:

- [1] 杨芳. 合肥市社区常住居民糖代谢异常人群中甲状腺结节患病特点及影响因素的分析[D]. 安徽医科大学, 2018.
- [2] 潘少霞, 梁妙芝, 舒晴. 甲功八项联合检测在评估甲状腺功能中的应用价值[J]. 当代医学, 2020, 26(10): 42-44.
- [3] 胡应龙, 高鹏. 甲状腺球蛋白、抗甲状腺球蛋白抗体与抗甲状腺过氧化物酶抗体联合检测在甲状腺疾病诊断中的价值[J]. 实用临床医学, 2017, 18(2): 18-19, 22.
- [4] 廖芸, 徐铁龙. 甲状腺彩超联合甲状腺功能检查对甲状腺结节的诊断价值[J]. 现代诊断与治疗, 2019, 30(18): 3265-3267.
- [5] 内分泌系统疾病基层诊疗指南编写专家组. 甲状腺功能亢进症基层诊疗指南(实践版·2019)[J]. 中华全科医师杂志, 2019(12): 1129-1135.
- [6] 内分泌系统疾病基层诊疗指南编写专家组. 甲状腺功能减退症基层诊疗指南(实践版·2019)[J]. 中华全科医师杂志, 2019(11): 1029-1033.
- [7] 康海岩, 任赐菊. 甲功五项测定在甲状腺功能诊断中的临床应用价值分析研究[J]. 现代养生, 2018, 18: 138-139.
- [8] 张蓉, 史海霞. 血清FT3、FT4、TSH及Hcy联合检测诊断甲状腺功能减退的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(17): 2478-2480.
- [9] 黄海涛, 陈婷婷, 黄炳青. 甲状腺功能7项指标联合检测在甲状腺疾病中的诊断价值[J]. 临床合理用药, 2020, 13(5): 149-150.
- [10] 刘丽. 甲状腺球蛋白抗体和甲状腺过氧化物酶抗体诊断甲状腺疾病的临床价值探讨[J]. 当代医学, 2017, 23(9): 117-119.

~~~~~  
(上接第629页)

- [8] PHAM J V, YILMA M A, FELIA A, et al. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1404.
- [9] FU B T, ZHANG P. D-limonene protects pancreatic MIN6 cells against tunicamycin induced cellular damage[J]. Nat Prod Res Dev, 2018, 30: 1793-1797.
- [10] ZHOU Y, ZHOU X, HONG T, et al. Lysosome-mediated

mitochondrial apoptosis induced by tea polysaccharides promotes colon cancer cell death[J]. Food Funct, 2021, 12(21): 10524-10537.

- [11] FOX J L, MACFARLANE M. Targeting cell death signalling in cancer: Minimising 'Collateral damage' [J]. Br J Cancer, 2016, 115(1): 5-11.