

蛇床子素对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用及其机制

姜习凤¹ 李光飞¹ 曹国文^{2△}

[摘要] **目的:**探讨蛇床子素(Osthole, OST)对人骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖、迁移、侵袭的抑制作用及其机制。**方法:**培养人骨肉瘤细胞 U2-OS, 采用不同浓度的 OST 处理细胞, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖情况, 克隆形成实验检测细胞克隆形成的能力, 细胞划痕实验观察细胞迁移能力, Transwell 小室法检测细胞侵袭作用, Western-Blot 法检测 PTEN、pAKT、AKT 蛋白的表达。**结果:**MTT 法结果表明 OST 能够抑制人骨肉瘤细胞 U2-OS 的增殖并呈剂量依赖性; 克隆形成实验结果表明 OST 能够抑制 U2-OS 细胞的克隆形成能力; 细胞划痕实验和细胞侵袭实验结果显示 OST 处理后细胞的迁移和侵袭能力明显降低; Western-Blot 结果显示 OST 处理后 PTEN 蛋白的表达明显增加, pAKT 蛋白的表达明显下降, 并呈现一定的剂量依赖性。**结论:**OST 可抑制人骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖、迁移、侵袭, 其可能的作用机制与调控 PTEN-AKT 信号通路有关。

[关键词] 蛇床子素; 骨肉瘤; 细胞侵袭; 磷酸酶和紧张素同源基因

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)05-0012-04

The Inhibitory Efficacy of Osthole on the Proliferation, Migration and Invasion of Osteosarcoma Cells and Its Mechanisms

JIANG Xifeng¹ LI Guangfei¹ CAO Guowen^{2△}

¹ Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu China;

² Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu China.

Abstract Objective: To explore the inhibitory efficacy of osthole (OST) on the proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma U-2OS cells and its mechanisms. **Methods:** U2-OS were cultured and treated with the different doses of OST. The efficacy of OST on cell proliferation was detected by MTT assay. The efficacy of OST on cell colony formation was detected by colony formation assay. The efficacy of OST on cell migration was tested by wound healing assay. The efficacy of OST on cell invasion was detected by Transwell invasion assay. The efficacy of OST on the expression of PTEN, pAKT and AKT proteins was assessed by Western-Blot assay. **Results:** MTT assay showed that OST could inhibit the proliferation of U2-OS cells in a dose-dependent manner. The colony formation assay showed that OST could significantly inhibit the colony formation capacity of U2-OS cells. The wound healing and Transwell invasion assays showed that OST could greatly decreased the cell migration and invasion of osteosarcoma cells. The Western-Blot assay showed that OST could significantly increase the expression of PTEN, and decreased the expression of pAKT protein in a dose-dependent manner. **Conclusion:** OST could inhibit the proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma U2-OS cells, which may be associated with the regulation of PTEN-AKT signaling.

Keywords: osthole; osteosarcoma; cell invasion; phosphatase and tensin homolog

骨肉瘤在儿童和年轻人中是最常见的原发性恶性肿瘤, 具有恶性程度高, 疾病进展迅速的特点^[1]。骨肉

瘤起源于间充质细胞, 其病理特征是梭形细胞和异常的骨样形成。尽管手术、辅助化疗、放疗等诸多手段用来治疗骨肉瘤, 然而骨肉瘤的预后仍然不太理想, 局部病灶患者的 5 a 生存率约为 60%~80%, 而转移型患者的生存率则低至 15%~30%, 并且肺转移是导致骨肉瘤患者死亡的最常见原因^[2]。目前用于人类骨肉瘤治疗的

¹ 苏州大学附属第二医院骨科(江苏 苏州, 215004)

² 苏州大学附属第二医院药剂科

△通信作者 E-mail: sdfecaoguowen@sina.com

化疗方案涉及多种化疗剂的组合,如高剂量甲氨蝶呤与亚叶酸钙、多柔比星、顺铂与异环磷酰胺、依托泊苷等等。这些方案在骨肉瘤的化疗中发挥了重要作用,但对生存率没有明显的改善^[3],因此研制高效低毒的抗骨肉瘤药物仍然是当前骨肉瘤研究的热点和难点。

在新型抗肿瘤药物的研究中,天然产物已获得相当多的关注。蛇床子素(Osthole)作为中药蛇床子中含量最高的香豆素类化合物,已有报道显示其对心脑血管系统、中枢神经系统、内分泌系统、免疫系统等具有良好的作用,并能以剂量依赖性抑制人胆囊癌、三阴性乳腺癌等肿瘤细胞的增殖、迁移,诱导凋亡^[4-5]。现有研究表明蛇床子素能诱导骨肉瘤细胞发生凋亡^[6],但尚未阐明蛇床子素在骨肉瘤侵袭和迁移过程中的作用及其潜在作用机制,因此本研究拟初步探索蛇床子素对骨肉瘤增殖、迁移和侵袭的抑制作用及其潜在的生物学机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人骨肉瘤细胞 U2-OS 为本实验室保存,培养于 DMEM(高糖)培养基。置培养箱内 5% CO₂、37℃ 下常规培养,2 d 换液 1 次,3~4 d 传代 1 次。

1.2 主要实验药品和试剂

蛇床子素购于上海诗丹德生物公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,用 DMEM(高糖)培养基稀释成所需浓度。DMEM(高糖)培养基购自 HyClone 公司;胎牛血清购自 GIBCO 公司;胰酶(Trypsin)购自 BIO-SHARP 公司;瑞-姬氏染液购自南京建成科技有限公司;M-per 蛋白裂解液、ECL 发光液购自美国 Thermo 公司;MTT 试剂盒购自上海碧云天生物公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;PTEN、pAKT、AKT 和 GAPDH 抗体购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞增殖实验 96 孔板中每孔接种合适数量的人骨肉瘤细胞 U2-OS,培养 24 h 后更换新鲜培养液,同时分别加入不同浓度(20~200 μmol/L)的蛇床子素,对照组加入含 0.2% DMSO 的培养基,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。培养 44 h 后,以 10 μL/孔加入 MTT 试剂,继续培养 4 h 后每孔加入 DMSO 100 μL 充分振荡使结晶充分溶解。在酶标仪上测定荧光 OD 570 nm 的吸光度值,并按照文献报道的方法^[7]计算出抑制率和半数抑制浓度,实验独立重复 3 次。

1.3.2 克隆形成实验 消化 U2-OS 细胞,以细胞密度 1 000 个/孔接种于 6 孔板内,十字法使其均匀分布,待 24 h 细胞贴壁后,对照组加入含 0.2% DMSO 的培养基,实验组加入含 160 μmol/L 蛇床子素的

DMEM 培养基,作用 24 h 后全部换成 DMEM 完全培养基继续培养 10 d,每 2 d 更换 1 次培养基。当培养基中出现肉眼可见克隆且显微镜下可见单个克隆集落细胞计数大于 50 时,终止培养,弃去培养液,PBS 洗 2 次后,4%多聚甲醛固定细胞 10 min,用瑞-姬氏染液进行染色,蒸馏水洗净干燥后倒置显微镜拍照观察计数,实验独立重复 3 次。

1.3.3 细胞划痕实验 取对数生长期的 U2-OS 细胞种于 6 孔板中,待细胞密度达到 80%左右时,用无菌的 200 μL 枪头垂直于板底直线划痕,PBS 清洗 3 遍后加入含不同浓度蛇床子素的无血清 DMEM 培养基继续培养,于 0 h 及 24 h 取样拍照,记录各组细胞划痕宽度,实验独立重复 3 次。

1.3.4 细胞侵袭实验 将 Matrigel 基质胶置于冰上,用无血清 DMEM 培养基以 1:7 稀释,取 25 μL 加入 Transwell 上室膜上铺平,37℃ 培养箱静置 30 min 待其凝固,使用前先用无血清培养基浸润上室膜。在各组 U2-OS 细胞培养 48 h 后消化离心,用无血清培养基重悬并计数,分别加入 1×10⁵ 个细胞,下室加入 DMEM 完全培养基。孵育 24 h 后,用棉签擦去小室内表面未迁移的细胞,PBS 洗 3 次,瑞-姬氏染液染色,风干后用中性树脂封片显微镜拍照,实验独立重复 3 次。

1.3.5 Western Blot 法检测蛋白表达 将 U2-OS 细胞以 2×10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板,待细胞密度到达 80%后给药,加入不同浓度的蛇床子素作用,48 h 后弃去培养基,PBS 洗 3 次,加入 M-per 蛋白裂解液,冰上裂解 30 min,于 4℃、12 000 r/min 下离心 15 min 去上清,用 BCA 法测定蛋白浓度并调平,加入上样缓冲液于 95℃ 变形 3~5 min。10%聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳后,电转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭后孵育一抗 4℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次,加入二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,ECL 显像后于暗室曝光。

1.4 统计学方法

利用 SPSS 20 软件对数据进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖的作用

用 0、20、40、80、120、160、200 μmol/L 浓度的蛇床子素作用于人骨肉瘤 U2-OS 细胞 48 h 后,MTT 结果如图 1 和表 1 所示,随着剂量的增加,蛇床子素对 U2-OS 细胞活力的抑制作用逐渐增强,说明蛇床子素抑制骨肉瘤的作用具有剂量依赖性,48 h 的半数抑制浓度为 97.084 μmol/L。

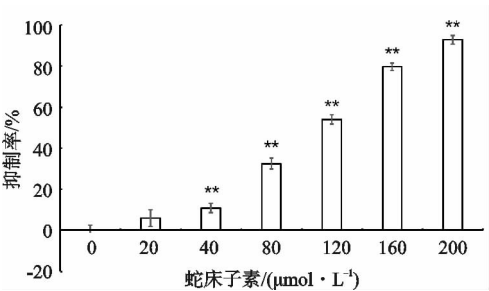


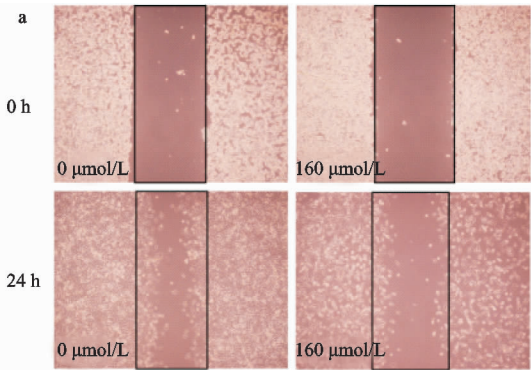
图1 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖的作用
(MTT 方法, * 与 0 μmol/L 组相比, $P<0.01$)

表1 不同浓度蛇床子素处理后对人 U2-OS 增殖的影响

分组	OD 值($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%
0 μmol/L	0.641±0.016	
20 μmol/L	0.605±0.025	6.03
40 μmol/L	0.576±0.014 ¹⁾	10.93
80 μmol/L	0.447±0.015 ¹⁾	32.40
120 μmol/L	0.318±0.014 ¹⁾	54.00
160 μmol/L	0.165±0.011 ¹⁾	79.62
200 μmol/L	0.115±0.010 ¹⁾	88.06
空白组	0.044±0.004	

注:1)与 0 μmol/L 组相比, $P<0.01$ 。

2.2 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 克隆形成的作用



(a) 蛇床子素作用细胞24 h后的显微镜相差图($\times 40$); (b) 蛇床子素对U2-OS细胞体外迁移能力的统计结果(**与 0 μmol/L 组相比, $P<0.01$)

不同浓度的蛇床子素作用后,细胞平板克隆形成率较对照组显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),且随着蛇床子素浓度的升高,U2-OS 细胞平板克隆形成率逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2。

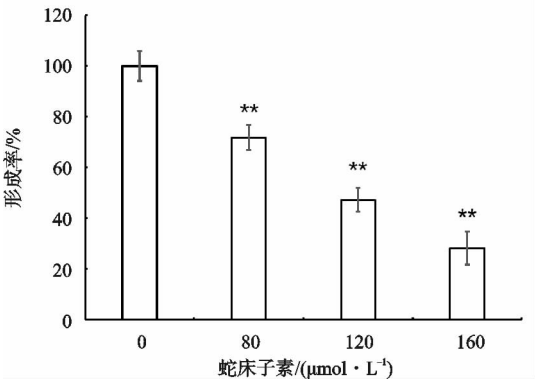


图2 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 克隆形成的作用
(**与 0 μmol/L 组相比, $P<0.01$)

2.3 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 迁移的作用
通过比较对照组和给药组细胞伤口愈合程度来判断迁移能力,以 0 h 作为对照,在 24 h 分别观察其迁移情况(如图 3a 所示),160 μmol/L 的蛇床子素能显著抑制细胞 U2-OS 的迁移,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3b。

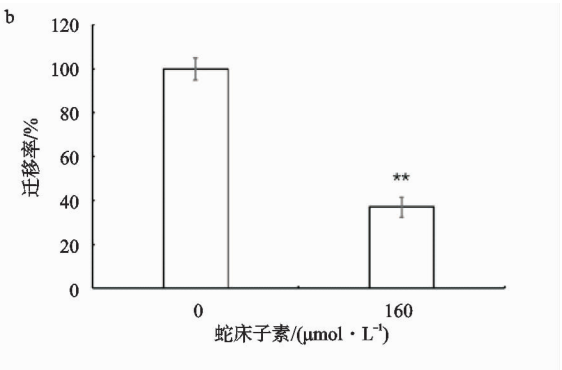
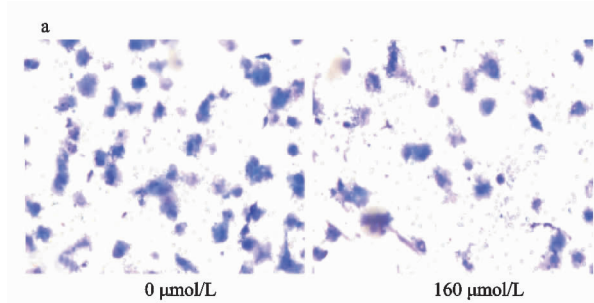


图3 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 迁移的作用

2.4 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 侵袭的作用
与对照组相比,高浓度的蛇床子素作用 U2-OS 细

胞 48 h 后,穿膜细胞数明显减少,侵袭受到显著抑制,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 4。



(a) 蛇床子素作用U2-OS细胞48 h的瑞-姬氏染色图($\times 100$); (b) 蛇床子素对U2-OS细胞体外侵袭能力的统计结果(**与 0 μmol/L 组相比, $P<0.01$)

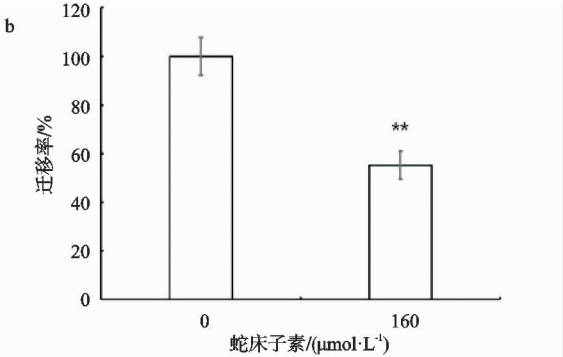


图4 蛇床子素对人骨肉瘤细胞 U2-OS 侵袭的作用

2.5 蛇床子素对 U2-OS 细胞 PTEN/AKT 信号通路的作用

为进一步验证蛇床子素对骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖和迁移的抑制作用,采用 Western Blot 方法检测了相关信号通路蛋白的表达情况。与 0 μmol/L 组相比,不同浓度的蛇床子素作用后,细胞内 PTEN 蛋白表达水平显著上升,高浓度组上升最为明显;pAKT 的表达水平显著下降,高浓度组下降最为明显,见图 5 和表 2。

3 讨论

表 2 蛇床子素对 PTEN、pAKT 和 AKT 蛋白表达的作用(̄x±s,%)

组别	PTEN/GAPDH	pAKT/GAPDH	AKT/GAPDH
0 μmol/L	100.0±4.2	100.0±5.3	100.0±2.4
80 μmol/L	132.6±2.7 ²⁾	88.3±2.4 ¹⁾	99.0±5.5
160 μmol/L	198.1±12.0 ²⁾	65.5±3.0 ²⁾	100.9±9.4

注:1)与 0 μmol/L 组相比,P<0.05;2)与 0 μmol/L 组相比,P<0.01。

骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤。虽然骨肉瘤是一种对某些化疗药物具有敏感性的肿瘤,但癌细胞可能会产生耐药性,并有远处转移的趋势,主要是在肺部。转移与侵袭是恶性肿瘤疗效欠佳、预后较差的主要原因,直接导致肿瘤患者死亡。因此,寻求高疗效、低毒性、抑制肿瘤细胞侵袭转移的药物具有极其重要的临床意义。蛇床子素是从蛇床子等植物中提取出来的香豆素类化合物,具有促进肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞周期阻滞、抑制肿瘤转移等多种抗肿瘤作用^[8]。研究表明,蛇床子素通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路抑制神经细胞凋亡,促进大鼠运动功能恢复^[9]。Abosharaf 等^[10]利用不同浓度的蛇床子素作用人肺腺癌细胞 A549 后发现,蛇床子素可以通过抑制组蛋白去乙酰化酶来诱导细胞凋亡。本研究检测了不同浓度的蛇床子素对人骨肉瘤 U2-OS 细胞增殖、迁移和侵袭的作用,发现蛇床子素能有效地抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,为蛇床子素的深入研究和抗癌药物研发提供了理论依据。

骨肉瘤是一种遗传性不稳定的实体肿瘤,核型高度复杂,染色体结构变异和拷贝数变化频率高,在这些基因组的改变中,磷酸酶和紧张素同源基因(PTEN)是最常见的改变基因之一^[11]。PTEN 是一种重要的肿瘤抑制因子,其蛋白产物具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶的活性,可以通过去磷酸化参与细胞调控。在体内和体外,PTEN 特异性剪切 PIP3 磷酸盐,PTEN 是 PI3K/Akt 信号通路的主要负调控因子,在多种人类肿瘤的发生、发展和转移过程中发挥重要的作用^[12]。有报道称在转染 miR-92a 的骨肉瘤细胞中,过表达 PTEN 可增加 G₀/G₁ 期细胞的数量,并诱导细胞程序性死亡^[13]。此外,PTEN 还可以增加 BAD 的磷酸化

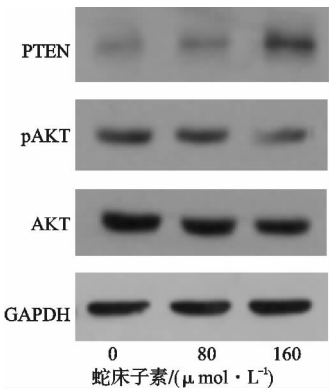


图 5 蛇床子素对 PTEN/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

或过表达 AKT 相关的凋亡蛋白来促进骨肉瘤细胞的凋亡抑制其增殖。PTEN 在阻止骨肉瘤细胞转移的过程中也发挥着重要作用。上皮-间充质转化(EMT)被认为是侵袭-转移级联反应的初始过程,因为它赋予癌细胞迁移和侵袭的特性。研究表明引入 PTEN 基因后 β-catenin 及波形蛋白的表达量极大地下调,E-cadherin 的表达上调,表明 PTEN 可以部分地抑制骨肉瘤细胞 HOS58 的 EMT 进程^[14]。此外,上调 PTEN 的表达还会减少 AKT 的磷酸化,提示 PTEN 可能通过 AKT 通路抑制 EMT 从而抑制细胞的迁移和侵袭。利用 Western Blot 法检测 PTEN、pAKT 和 AKT 的蛋白的表达水平,结果显示蛇床子素处理人骨肉瘤细胞 U-2OS 后,随着蛇床子素剂量的增加,U-2OS 细胞中 PTEN 蛋白的条带逐渐变亮,而 pAKT 蛋白的条带逐渐变浅,可见其能浓度依赖性地上调 U-2OS 细胞中 PTEN 蛋白的表达且下调 pAKT 蛋白的表达。因此,笔者推测蛇床子素能够通过调控 PTEN-AKT 通路来抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述,本研究发现蛇床子素不仅可以抑制骨肉瘤的增殖,还通过调控 PTEN-AKT 通路达到较好地抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的作用,对转移性骨肉瘤的治疗具有潜在的应用前景。

参考文献

[1] MA O, CAI W W, ZENDER L, et al. MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2559-2567.