

[15] 范振群, 刘树民, 周世慧, 等. 帕金森病体外细胞模型的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33 (1): 74-78.

[16] 田林奇, 韩颖, 魏聪, 等. 两种不同细胞毒性检测方法的比较 [J]. 中国医疗器械信息, 2019, 25 (1): 23-24, 39.

• 基础研究 •

白花蛇舌草抗骨肉瘤的有效部位筛选及对 Bcl-2 和 Bax 细胞因子表达的影响

厦门大学附属福州第二医院骨科研究所 (福州 350007) 刘楠楠 伍林招 张 韬¹

【摘要】 目的 考察白花蛇舌草提取物对骨肉瘤细胞生长及 Bcl-2 和 Bax 细胞因子的影响。**方法** 对白花蛇舌草进行不同部位的分离提取, 提取物分为 A、B、C、D 4 组, 采用 MTT 法检测各组对 MG63 细胞活性的影响; 同时用不同部位提取物喂养裸鼠 (骨肉瘤胫骨原位移植瘤模型), 采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测移植瘤细胞中 Bcl-2 和 Bax 因子 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 白花蛇舌草的多部分提取物均能显著抑制 MG63 骨肉瘤细胞的生长 ($P < 0.05$), 促进肉瘤裸鼠模型瘤细胞中促凋亡蛋白 Bax 因子 mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.05$), 抑制凋亡蛋白 Bcl-2 因子 mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.05$), 其中 C 组的效果最明显, 与其他组比较有显著改变 ($P < 0.05$), A、B、D 组间无显著变化 ($P > 0.05$)。**结论** 白花蛇舌草提取物具有抑制 MG-63 细胞生长, 促进 Bax 因子、抑制 Bcl-2 因子表达的作用。

【关键词】 白花蛇舌草; 骨肉瘤; 细胞凋亡; 细胞周期

【中图分类号】 R738.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)03-0119-03

骨肉瘤是青少年最常见的原发恶性骨肿瘤, 发病率约为 3/100 万^[1]。该瘤恶性程度高, 预后差, 给家庭和社会带来极大负担。1970 年之前, 骨肉瘤的治疗采用高位截肢或关节夹层治疗, 给患者的身心造成了极大的创伤。随着新辅助化疗的广泛推广, 骨肉瘤的 5 年生存率达到 60%~80%。在过去的 30 年中, 骨肉瘤研究领域尚未有明确的新药, 治疗计划也无较大进展。手术是目前骨肉瘤最有效的治疗方法, 但患者心理、肉瘤位置、术后转移和经济负担会影响患者治疗效果, 因此寻找其他经济、安全的保肢治疗方案尤为重要。有临床报道证实, 中医也可为骨肉瘤治疗提供有效的方法^[2]。如黄金昶等^[3]采用自制骨瘤消胶囊结合中药汤剂治疗骨肉瘤 22 例, 取得了良好效果。本项目拟对白花蛇舌草不同部位作提取分离, 采用 MTT 法检测不同提取物对 MG63 细胞活性的影响, 同时用不同部位提取物喂养骨肉瘤胫骨原位移植瘤裸鼠, 采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测移植瘤细胞 Bcl-2 和 Bax 因子的 mRNA 和蛋白表达水平, 探讨不同提取物的抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料: 人骨肉瘤 MG-63 细胞株 (南京科佰生

物科技有限公司), BALB/C 裸鼠 [体质量 (18±2) g, 吴氏实验动物中心, 生产许可证号: SCXK (闽) 2016-0003], 白花蛇舌草 (福建省医学科学院药物研究所), 胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司), RIPA 裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒、UltraECL 底物化学发光检测试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 鼠抗人 Bcl-2、Bax 及内参 GAPDH 一抗、羊抗鼠辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗 (英国 Abcam 公司)。

1.2 方法:

1.2.1 白花蛇舌草分离提取: 取 5 kg 白花蛇舌草, 粉碎, 5 倍 80% 乙醇浸泡 24 h, 每次在乙醇综合提取器中提取 2 h, 共提取 2 次。将两次提取液合并混匀, 回收乙醇, 将得到的浸膏溶于水: 乙醇 (2:1) 混合液。采用如下方法作进一步分离提取: A 组: 石油醚萃取 5 次, 浓缩得石油醚提取部位; B 组: 三氯甲烷萃取 5 次, 浓缩得三氯甲烷提取部位; C 组: 乙酸乙酯萃取 5 次, 浓缩得乙酸乙酯提取部位; D 组: 正丁酸萃取 5 次, 浓缩得正丁酸提取部位。

基金项目: 福建省卫健委中医类科研项目 (2017FJZYZY208); 2017 年福建省临床重点专科建设项目 (骨科)

1 通信作者, 副研究员, Email: james155@foxmail.com; 研究方向: 肿瘤细胞与分子生物学

1.2.2 MG63 骨肉瘤细胞的培养: 将 MG63 骨肉瘤细胞置于含有 10% 小牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养液中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、饱和湿度条件下的二氧化碳培养箱中培养, 每隔 2 天换液传代 1 次。

1.2.3 不同提取物对 MG63 细胞活性的影响: 将对数生长期细胞用含有新生小牛血清的 DMEM 培养液稀释成 5×10^4 个/mL 的单细胞悬液, 按 180 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板上, 然后每孔分别加入 20 μ L 的 A、B、C、D 组的白花蛇舌草提取物, 对照组为 200 μ L 新鲜培养液, 每组做 3 个重复。继续培养 48 h, 44 h 时每孔加入 50 μ L 1 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h。培养结束后 2 000 rpm 离心 15 min, 去上清后加入 150 μ L DMSO, 充分溶解 MTT 还原产物, 550 nm 酶标仪测定吸光度。细胞生存率按下式计算: 生存率 = (1 - 药物组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 裸鼠骨肉瘤胫骨原位移植瘤模型的建立及分组:

1.2.4.1 骨肉瘤细胞准备: 取复苏后第 10 代对数生长期细胞, 重悬于无血清高糖 DMEM 培养液中, 将细胞密度调节为 2×10^6 个/mL, 注射前置于 0 $^{\circ}$ C 保存, 时间不得超过 2 h。

1.2.4.2 骨肉瘤胫骨原位移植瘤模型建立: 用无菌蒸馏水稀释氯胺酮和氯丙嗪, 分别按 100 mg/kg 和 50 mg/kg 行裸鼠腹腔内注射, 每次注射量 80~100 μ L。麻醉成功后, 以 75% 酒精消毒右下肢。在将裸鼠右膝关节屈曲的同时将胫骨进行外旋, 取带有 27 号标准针头的 1 mL 注射器, 采取旋转的方式缓慢的钻入到裸鼠胫骨结节和胫骨内侧髁之间的骨皮质中。若阻力突然变小, 意味着已钻出骨皮质, 此时继续将针头向下插入胫骨骨干约 3~5 mm, 用微量注射器将制备好的 30 μ L MG63 细胞悬液注入裸鼠的胫骨髓腔, 注意注射时应同时回退针头, 注射完全后用 5-0 号缝线闭合切口, 隔日观察注射后

裸鼠的体质量变化和肿瘤原位移植瘤形成情况。

1.2.4.3 分组及给药: 将 32 只裸鼠随机分为 A、B、C、D 4 组, 每组 8 只, 按 50 mg/kg 隔日灌胃给药; 对照组采取相同方式灌胃, 予等剂量生理盐水, 20 d 后处死实验组及对照组裸鼠, 剥离移植瘤, 取瘤组织细胞备用。

1.2.5 RT-PCR 检测各组细胞 Bcl-2 和 Bax 因子 mRNA 表达: 取裸鼠瘤组织细胞提取总 RNA, 经逆转录得到 cDNA, 行 RT-PCR。具体反应条件如下: 1) 反应体系: 下游引物 0.4 μ L, 上游引物 0.4 μ L, SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ L, cDNA 2 μ L, dH₂O 6.4 μ L, ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ L; 2) 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 15 min, 40 个循环扩增, 每个循环 15 s 变性, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s。

1.2.6 Western blot 检测各组细胞 Bcl-2 和 Bax 因子蛋白表达: 总蛋白提取后按 Bradford 法测蛋白浓度, 取 10 μ g 蛋白样品与 2X 加样缓冲液等体积混合, 煮沸变性 5 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h, 立即加入一抗溶液, 平缓摇动, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 室温下加二抗溶液孵育 1 h。以 β -actin 作为内参照, 显影参照 ECL 试剂盒说明书操作。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 进行数据处理。计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间的两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同提取物对 MG-63 细胞活性的影响: 结果如表 1 所示, 在药物终质量浓度为 43.5 μ g/mL 时, A、B、C、D 4 个提取部位提取物都对 MG-63 细胞的增殖具有抑制作用 ($P < 0.05$), 其中, C 组对 MG-63 细胞的生长抑制作用最明显, 显著低于 A、B、D 组 ($P < 0.05$), A、B、D 组之间无显著变化。

表 1 不同组的 MG63 细胞生存率 (% , $\bar{x} \pm s$)

	对照组	A 组	B 组	C 组	D 组
细胞生存率	100	67.73 \pm 8.76 [*]	68.94 \pm 7.26 ^{*#}	52.36 \pm 4.74 [*]	71.51 \pm 5.82 ^{*#}

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, # $P < 0.05$ 。

2.2 各组细胞中 Bcl-2 和 Bax 因子 mRNA 表达: 结果见表 2。4 组促凋亡蛋白 Bax 因子 mRNA 表达水平均显著高于对照组, C 组提取物促凋亡蛋白

Bax 因子 mRNA 表达水平显著高于 A、B、D 3 组, 且 A、B、D 组之间无显著变化; 相反, 4 组处理组的促凋亡蛋白 Bcl-2 因子 mRNA 表达水平均显著

低于对照组, C 组的抑制凋亡蛋白 Bcl-2 因子 mRNA 表达水平显著低于 A、B、D 3 组; 且 A、B、D 组之间无显著变化。

表 2 不同裸鼠组细胞中 Bcl-2 和 Bax 因子 mRNA 的相对表达量 (%)

指标	对照组	A 组	B 组	C 组	D 组
Bcl-2	7.36±0.17	5.07±0.15* [#]	4.61±0.42* [#]	2.73±0.32*	4.98±0.59* [#]
Bax	1.78±0.11	6.32±0.54* [#]	5.99±0.28* [#]	9.69±0.58*	6.03±0.21* [#]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$ 。

2.3 不同裸鼠组细胞中 Bcl-2 和 Bax 因子蛋白的表达: 结果见表 3, 4 组处理组的促凋亡蛋白 Bax 因子蛋白表达水平均显著高于对照组, C 组提取物促凋亡蛋白 Bax 因子蛋白表达水平显著高于 A、B、D 3 组, 且 A、B、D 组之间无显著性差异; 相反,

4 组处理组的促凋亡蛋白 Bcl-2 因子蛋白表达水平均显著低于对照组, C 组的抑制凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达水平显著低于 A、B、D 3 组; A、B、D 3 组之间无显著性差异。

表 3 不同裸鼠组细胞中 Bcl-2 和 Bax 因子蛋白的相对表达量 (%)

指标	对照组	A 组	B 组	C 组	D 组
Bcl-2	1.39±0.12	1.19±0.15* [#]	1.11±0.22* [#]	0.72±0.22*	1.02±0.18* [#]
Bax	0.36±0.11	0.98±0.17* [#]	1.05±0.28* [#]	1.27±0.33*	1.09±0.21* [#]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$ 。

3 讨论

白花蛇舌草是一种主要分布于我国东南至西南部各地区的茜草科植物, 别名有蛇舌草、蛇刺草、羊须草等, 始载于《广西中药志》, 其本品性寒、味苦、甘, 干燥或新鲜全草具有清热解毒、抗菌消炎、抗肿瘤等多重功效, 其成分复杂, 主要有萜类化合物、黄酮、烷烃、甾醇、多糖和有机酸类。

近年来, 随着传统中草药在临床上应用的兴起, 白花蛇舌草抗肿瘤治疗, 如肝癌、结肠癌、鼻咽癌等的相关研究在逐步增多。刘志华等^[4]将白花蛇舌草提取物作用于乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 结果表明其能抑制该细胞的增殖, 诱导其凋亡。陈筱凡等^[5]发现, 白花蛇舌草提取物可降低线粒体跨膜电位, 抑制抗凋亡基因的表达, 从而抑制 K562 白血病细胞增殖。张焱等^[6]发现白花蛇舌草能够通过线粒体依赖性途径诱导人胶质瘤 U87 细胞的凋亡。肖云等^[7]发现, 一定剂量范围内的白花蛇舌草乙醇提取物对小鼠 CT-26 结肠癌具有明显的抑瘤作用。目前, 虽然白花蛇舌草在治疗癌症的范围研究在逐步扩展, 但骨肉瘤方面的研究鲜有报道。

本项目对白花蛇舌草作初步提取分离, 得到不同部位产物, 用 MTT 法筛选抗骨肉瘤活性较强的部位, 然后进行体内动物模型实验。结果表明, 白花蛇舌草的多部分提取物均能显著抑制 MG63 骨肉

瘤细胞的生长; 将其喂养骨肉瘤裸鼠后, 能促进瘤细胞中促凋亡蛋白 Bax 因子的表达, 同时抑制凋亡蛋白 Bcl-2 因子的表达, 其中乙酸乙酯提取物相对于石油醚提取物、三氯甲烷提取物及正丁酸提取物的效果更佳。在今后的研究中, 我们将进一步对乙酸乙酯提取物的成分进行细致分析, 同时深入研究白花蛇舌草提取物在抑制骨肉瘤中的作用机制。

参考文献

- [1] Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma) [J]. Orphanet J Rare Dis, 2007, 2: 6.
- [2] 崔树波. 骨肉瘤中西医结合治疗的进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12 (6): 382-384.
- [3] 黄金昶. 中药为主治疗骨肉瘤 22 例浅析 [J]. 中医药学刊, 2002, 22 (10): 22.
- [4] 刘志华, 何成. 白花蛇舌草提取物对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用 [J]. 四川生理科学杂志, 2012, 34 (1): 6-8.
- [5] 陈筱凡. 白花蛇舌草提取物体外抑制 K562 细胞增殖实验研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 23 (1): 14-17.
- [6] 张焱祝, 新根程, 祖珏, 等. 白花蛇舌草诱导人胶质瘤细胞凋亡的作用及机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29 (11): 2222-2224.
- [7] 肖云, 伍治平, 金从国, 等. 白花蛇舌草提取物抗小鼠结直肠癌血管生成的实验研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2013, 34 (10): 53-57.