



槲皮素对人骨肉瘤细胞 U-2OS/MTX300 增殖和凋亡的影响及其机制研究

尹军强¹, 谢显彪¹, 贾强², 王晋¹, 黄纲¹, 邹昌业¹, 沈靖南^{1*}

(1. 中山大学附属第一医院 骨肿瘤科, 广东 广州 510080;

2. 贵州省生物研究所, 贵州 贵阳 550009)

[摘要] 目的:研究槲皮素(querctin, Qu)对骨肉瘤细胞系 U-2OS/MTX300 增殖和凋亡的作用及其机制。方法:MTT 法观察细胞增殖活性;Annexin V/PI 染色检测凋亡;线粒体膜电位及细胞色素 C 的 Western blot 检测线粒体凋亡途径;持续活化 Akt 瞬时转染、Western blot 检测 Akt 通路相关蛋白表达水平变化。结果:槲皮素可明显抑制耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞 U-2OS/MTX300 生长,并呈时间和剂量依赖性;Annexin V/PI 可明显检测到细胞凋亡;进一步发现其作用机制是通过下调线粒体膜电位,促进细胞色素 C 向胞浆释放及抑制 Akt 磷酸化来实现。结论:槲皮素可显著抑制耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞系 U-2OS/MTX300 细胞增殖并诱导其凋亡,其机制与线粒体凋亡途径及抑制 Akt 活性有关。

[关键词] 槲皮素;U-2OS/MTX300 细胞;凋亡

槲皮素作为一种天然的黄酮类化合物,广泛存在于植物及食物中,具有显著抗氧化、自由基清除及肿瘤预防作用,有良好的体外抗巨细胞病毒作用^[1]。近年来研究发现其对乳腺癌、结肠癌、肝癌及肺癌等多种恶性肿瘤具有良好的抗癌功效^[2-6],而目前槲皮素在抗骨肉瘤方面的报道较少,尚未见槲皮素对耐药骨肉瘤细胞的相关报道。本实验研究了槲皮素对耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞系 U-2OS/MTX300 生长、增殖的影响,并对其作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 细胞系 骨肉瘤 MTX 耐药细胞系 U-2OS/MTX300 由意大利 Rizzoli 骨科研究所 Dr. M SERRA 惠赠,小鼠成纤维细胞 PA317 购自中国科学院上海生化细胞所细胞库。

1.2 药物与试剂 槲皮素(Sigma 公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)、甲氨蝶呤(MTX)、聚凝胺(polybrene)及 LY294002 均购于 Sigma 公司;Annexin V/PI 染色试剂盒(南京凯基公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天);pLNCX 及 pLNCX-Myr-Akt retroviral plasmids(Addgene 公司);DOSPER Liposo-

mal Transfection Reagent(Roche 公司);凋亡相关抗体 PARP, cleaved PARP 购自 Abcam 公司,而 cytochrome C, p-Bad, Bad, p-AKT (Ser473), Akt 及 β -actin 均购自 Cell Signaling 公司。

1.3 仪器及设备 细胞培养箱(NAPCO MODEL5410);超净工作台(Holten, 美国);显微镜(日本 Olympus);电子天平(日本 Satorius);低温高速离心机(美国 Ependorff);流式细胞测定仪(美国 Becton-Dickinson);垂直电泳装置以及转膜装置(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 药物配制 槲皮素以二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成储备原液,于 -20°C 保存。工作液以不含血清的培养基稀释,在预试验中, $\leq 0.5\%$ 的 DMSO 对骨肉瘤细胞株生长没有明显影响,与培养基对照组比较没有显著差异性。在药物实验中,作为溶剂的 DMSO 的终浓度均控制在 $\leq 0.5\%$ 。

2.2 细胞培养 U-2OS/MTX300 及 PA317 均在 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中常规培养(37°C , 5% CO_2 , 饱和湿度),其中 U-2OS/MTX300 培养液内含有 $300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTX。槲皮素处理时 U-2OS/MTX300 移至 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中以避免 MTX 对试验结果的影响。

2.3 MTT 法检测细胞增殖抑制 取对数生长期的细胞 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板,培养 24 h 待细胞

[稿件编号] 20110508002

[基金项目] 广东省科技计划项目(2007B031405008)

[通信作者] * 沈靖南,教授, Tel: (020) 87755766-8236, E-mail: shenjn01@hotmail.com

[作者简介] 尹军强,博士,讲师, E-mail: yinjunqiang77@163.com



贴壁后,加入 DMEM 培养液配制的槲皮素,终浓度分别为 10,25,50,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素,对照组为同浓度 DMSO,每组设 3 个复孔。分别培养 24,48,72 h 后,加入 10 μL 的 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT,4 h 后弃去培养液,加入 0.1 mL DMSO,待结晶完全溶解后,在 Bio-Rad 550 酶联免疫检测仪上以 570,630 nm 双波长测定每孔的吸光度。Bliss 法计算抑制细胞生长达 50% 时的药物浓度,以 IC_{50} 表示。

2.4 Annexin V/PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡率 10,25,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的槲皮素(对照组为 0.5% 的 DMSO)处理 U-2OS/MTX300 细胞 48 h 后,收集各组细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min),加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞,再加入 5 μL Annexin V 混匀后,加入 5 μL PI,混匀;室温、避光、反应 15 min 后,1 h 内进行流式细胞仪的检测。

2.5 线粒体膜电位的变化及线粒体细胞色素 C 的释放检测 细胞经 10,25,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的槲皮素(对照组为 0.5% 的 DMSO)处理 48 h 后,PBS 洗涤 2 次,加入 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗丹明 123 染液,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 细胞培养箱孵育 10 min;离心以培养基洗涤细胞 2 次;重悬细胞于培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养 60 min 后,激发波长 480 nm,发射波长 530 nm,流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化。细胞经槲皮素处理后,预冷的细胞裂解液(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES,pH 7.5,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl,1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT,250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖,蛋白酶抑制剂混合物)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\times g$ 离心 5 min,收集上清,进一步 100 000 $\times g$ 离心 30 min,以获得胞浆蛋白成分,并用 Western blot 分析细胞色素 C 水平。

2.6 细胞转染 依照 DOSPER 转染试剂说明书贴壁细胞转染法,按 4 μL DOSPER 与 1.5 μg DNA 的比例配制脂质体/DNA 复合物,将 pLNCX 和 pLNCX-Myr-Akt 质粒转染至 PA317 细胞,转染后 48 h 收集上清。用逆转录病毒上清感染 U-2OS/MTX300 细胞,感染 24 h 后再以对照组为 0.5% 的 DMSO,25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素处理细胞 48 h。

2.7 Western blot 检测蛋白表达 不同浓度槲皮素(对照组为 0.5% 的 DMSO)处理 48 h 后的各组细胞,PBS 洗涤 2 次,NP40 裂解细胞,提取细胞总蛋白、抽提细胞浆蛋白。14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,

加入相同体积的 2 \times SDS 上样缓冲液(2% SDS,20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl,pH 7.4,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA)95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。SDS 电泳后电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后加入第一抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,接着加入第二抗体于室温孵育 2 h,再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,然后加入化学发光剂进行检测,X 线片暗室曝光,常规显影定影。

2.8 统计方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,试验重复 3 次。数据用统计学软件 SPSS 11.5 进行分析,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 槲皮素对 U-2OS/MTX300 具显著增殖抑制作用 槲皮素对 U-2OS/MTX300 的生长抑制作用呈现明显时间及剂量依赖性,随着药物浓度的增加和作用时间的延长,细胞存活率逐渐减低,与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$),具有较好的生长抑制作用(表 1)。

表 1 槲皮素对 U-2OS/MTX300 生长抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Quercetin inhibited the proliferation of U-2OS/MTX300 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

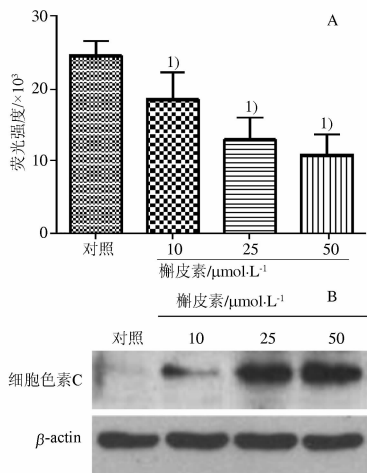
组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
对照	0	100	100	100
槲皮素	10	88.95 \pm 3.14 ¹⁾	85.41 \pm 4.78 ¹⁾	75.47 \pm 6.31 ¹⁾
	25	77.73 \pm 6.67 ¹⁾	64.53 \pm 5.75 ¹⁾	37.56 \pm 7.75 ¹⁾
	50	70.72 \pm 6.58 ¹⁾	51.86 \pm 4.12 ¹⁾	24.83 \pm 8.56 ¹⁾
	100	66.51 \pm 8.79 ¹⁾	44.98 \pm 4.67 ¹⁾	19.87 \pm 6.55 ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 槲皮素诱导 U-2OS/MTX300 细胞凋亡 对照组及 10,25,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素处理组细胞经 Annexin V/PI 流式细胞仪检测可见凋亡率分别为(3.16 \pm 1.78)%, (13.4 \pm 3.87)%, (22.38 \pm 2.44)%, (34.42 \pm 5.37)%, 槲皮素组细胞凋亡率与对照组相比明显增加($P < 0.05$),且随剂量升高而增加,表明槲皮素具有诱导 U-2OS/MTX300 细胞凋亡作用。

3.3 线粒体膜电位的变化及细胞色素 C 的释放 为探讨线粒体途径在槲皮素诱导 U-2OS/MTX300 凋亡中的作用,不同浓度槲皮素处理细胞 48 h 后行

线粒体膜电位检测及胞浆细胞色素 C 水平的 Western blot 检测。结果显示槲皮素作用细胞 48 h 后可显著降低线粒体膜电位 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。Western blot 检测证实细胞色素 C 由线粒体释放至细胞质 (图 1)。这些数据表明线粒体凋亡通路可能参与槲皮素诱导的骨肉瘤 U2-OS/MTX300 细胞凋亡。



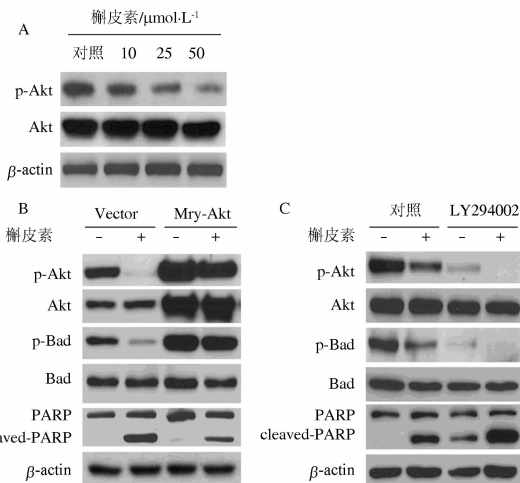
A. 槲皮素能显著降低线粒体膜电位 ($^{(1)}P < 0.05$); B. Western blot 检测细胞色素 C 的释放。

图 1 槲皮素导致线粒体膜电位变化及细胞色素 C 释放
Fig. 1 Mitochondrial membrane potential and cytoplasmic cytochrome C release were examined after quercetin treatment

3.4 Akt 通路蛋白磷酸化水平的变化 不同浓度槲皮素处理细胞 48 h 后, Akt 磷酸化水平随着剂量升高而降低。为了进一步证实 Akt 信号通路在槲皮素诱导骨肉瘤细胞凋亡中的作用, U2-OS/MTX300 细胞转染持续活化 Akt (pLNCX-Myr-Akt) 及空载体后, 分别以 0, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 槲皮素继续处理 48 h, 检测 Akt 通路相关蛋白 Bad 及凋亡蛋白 PARP 变化。持续活化的 Akt 可拮抗槲皮素诱导的 Akt/Bad 去磷酸化及 PARP 裂解。另一方面联合应用 LY294002 (PI3K 阻滞剂用于阻滞 Akt 活性) 及槲皮素后, 结果显示 LY294002 可显著增强槲皮素诱导的 Akt/Bad 去磷酸化及 PARP 降解 (图 2)。这些结果表明, Akt 去磷酸化在槲皮素诱导的细胞凋亡中具有重要作用。

4 讨论

本研究 MTT 结果表明槲皮素能够有效地抑制耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞系 U-2OS/MTX300 的增殖,



A. 不同浓度槲皮素处理 48 h 后, p-Akt 和 Akt 表达水平的变化; B. 持续活化的 Akt 及空质粒载体处理 U2-OS/MTX300 后, 再用槲皮素 0, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 48 h 后, p-Akt, Akt, p-Bad, Bad, PARP 和 cleaved-PARP 蛋白表达变化; C. 槲皮素 (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 LY294002 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后 p-Akt, Akt, p-Bad, Bad, PARP 和 cleaved-PARP 蛋白表达变化。

图 2 槲皮素通过抑制 Akt 磷酸化诱导凋亡
Fig. 2 Quercetin induced apoptosis through dephosphorylation of Akt

通过 Annexin V/PI 流式细胞仪检测证明了槲皮素对耐甲氨蝶呤骨肉瘤的抗肿瘤作用主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡而实现的。

细胞主要凋亡的途径主要有 2 条, 一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase^[7], 另一条则是通过线粒体途径^[8]。线粒体在细胞凋亡过程中发挥重要的内在作用, 线粒体膜电位的降低有导致线粒体膜的开放, 从而导致细胞色素 C 释放至胞浆, 激活 caspase 凋亡途径, 降解胞内的重要蛋白从而引起细胞凋亡^[8-9]。本研究结果显示槲皮素在作用细胞 48 h 后, 能显著降低线粒体膜电位, 且呈剂量依赖性, 同时通过 Western blot 证实细胞色素 C 由线粒体释放至细胞质, 表明线粒体凋亡途径在槲皮素诱导的骨肉瘤细胞系凋亡中发挥重要的作用。

为了进一步阐述槲皮素诱导骨肉瘤细胞的凋亡作用, 作者研究了 Akt 通路蛋白在槲皮素处理后的骨肉瘤细胞中表达水平的变化, 一般认为 Akt 途径可以通过抑制凋亡促进细胞存活, 而且 Akt 还参与了凋亡线粒体途径的条件从而发挥抗凋亡作用。Bad 是首个被发现作为 Akt 作用底物的 Bcl-2 家族促凋亡蛋白, 既往研究还表明, Akt 能磷酸化 Bad, 从



而增加线粒体膜的稳定性^[10]。作者研究表明,槲皮素能明显抑制 Akt 磷酸化从而抑制其活性,持续活化的 Akt 能拮抗槲皮素诱导的 Akt/Bad 蛋白去磷酸化及 PARP 裂解。进一步,应用 Akt 活性阻滞剂 LY294002 及槲皮素后作用细胞后,结果显示 LY294002 能显著增强槲皮素诱导的 Akt/Bad 去磷酸化及 PARP 降解。此结果表明,槲皮素诱导的细胞凋亡是通过 Akt 蛋白的去磷酸化来实现。

本研究结果表明,槲皮素对耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞 U2-OS/MTX300 有显著抑制增殖和诱导凋亡作用。槲皮素诱导骨肉瘤凋亡可能是通过线粒体凋亡途径及抑制 Akt 磷酸化水平来实现。

[参考文献]

[1] 张丹丹,陈娟娟,张亚伟,等. 连翘及其主要有效成分槲皮素体外抗人巨细胞病毒的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 1055.
[2] Chou C C, Yang J S, Lu H F, et al. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(8): 1181.
[3] Pshahoulia F H, Drosopoulos K G, Doubravska L, et al. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by

inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(9): 2591.

[4] 顾远晖,李一平,李安强,等. 槲皮素对人肝癌 SMMC-7721 细胞生长的抑制及细胞凋亡的诱导作用[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2010(3): 9.
[5] 朱茉莉,华文敏,梁中琴. 槲皮素诱导 MCF-7 细胞死亡机制中自噬与凋亡的相关性[J]. 中国药理学杂志, 2010(6): 434.
[6] Kuhar M, Sen S, Singh N. Role of mitochondria in quercetin-enhanced chemotherapeutic response in human non-small cell lung carcinoma H-520 cells [J]. Anticancer Res, 2006, 26(2A): 1297.
[7] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15: 269.
[8] Kantrow S P, Piantadosi C A. Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 232(3): 669.
[9] Kushnareva Y E, Polster B M, Sokolove P M, et al. Mitochondrial precursor signal peptide induces a unique permeability transition and release of cytochrome c from liver and brain mitochondria[J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 386(2): 251.
[10] Datta S R, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery[J]. Cell, 1997, 91(2): 231.

Effect and mechanism of quercetin on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell U-2OS/MTX300

YIN Junqiang¹, XIE Xianbiao¹, JIA Qiang², WANG Jin¹, HUANG Gang¹, ZOU Changye¹, SHEN Jingnan^{1*}

(1. Department of Orthopaedic Oncology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Institute of Biology, Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanisms of quercetin (Qu) on proliferation and apoptosis of human methotrexate resistant osteosarcoma cell U-2OS/MTX300. **Method:** MTT assay was used to observe cell proliferation. The apoptosis was examined by using Annexin V/PI staining. Western blot of mitochondrial membrane potential and cytochrome c were used to detect mitochondria spoptosis pathway. The protein expressions related to Akt pathway was detected by continuous activated Akt transient transfection and western blot. **Result:** Qu can obviously inhibit the growth of human MTX resistant osteosarcoma cell U-2OS/MTX300 cells in a dose- and time-dependent manner. Annexin V/PI staining showed obvious cell apoptosis. Reduction of mitochondrial membrane potential, release of mitochondrial cytochrome c to cytosol and dephosphorylation of Akt were observed after Qu treatment. **Conclusion:** Qu can inhibit proliferation and induce apoptosis of human MTX resistant osteosarcoma cell U-2OS/MTX300, which may be related with mitochondrial apoptosis pathway and Akt activity.

[Key words] quercetin; U-2OS/MTX300 cells; apoptosis

doi:10.4268/cjcm20120515

[责任编辑 张宁宁]