

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.006

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190130.0904.006.html(2019-01-30)

镰形棘豆总黄酮通过 TGF- β /Smad3 通路抑制 骨肉瘤 MG63 细胞 EMT*

马金祥,马金兰,马金华
(青海大学医学院,西宁 810016)

[摘要] 目的 基于 TGF- β /Smad3 通路探讨镰形棘豆总黄酮(FOF)抑制骨肉瘤 MG63 细胞上皮细胞间质转化(EMT)的分子机制。方法 MTT 实验检测细胞增殖抑制情况;Transwell 小室迁移实验观察细胞迁移能力变化;ELISA 实验检测细胞分泌的 TGF- β 1 水平;qPCR 实验检测细胞中 Snail1、Twist mRNA 表达水平变化;Western blot 实验检测细胞中 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、p-Smad3、磷酸化转化生长因子 β 受体 II (p-TGF- β R II) 蛋白表达水平变化。结果 FOF 以时间和浓度依赖的方式抑制 MG63 细胞增殖,降低 MG63 细胞迁移及分泌 TGF- β 1 的能力;并导致 MG63 细胞内 Vimentin、p-Smad3、p-TGF- β R II 蛋白和 Snail1、Twist mRNA 表达水平显著减少(均 $P < 0.05$),而 E-cadherin 蛋白表达水平增加($P < 0.05$)。结论 FOF 对 MG63 细胞增殖具有抑制作用,并可通过抑制 TGF- β 1/Smads 过度激活,逆转 MG63 细胞 EMT,从而降低 MG63 细胞转移能力。

[关键词] 镰形棘豆总黄酮;上皮细胞间质转化;骨肉瘤;TGF- β /Smad3 通路;肿瘤转移

[中图分类号] R733 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)08-1284-04

Inhibitory effect of total flavonoids from *Oxytropis falciformis* on EMT of osteosarcoma MG63 cells via TGF-beta/Smad3 pathway*

MA Jinxiang, MA Jinlan, MA Jinhua

(Medical College of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanism of flavonoids of *Oxytropis falcate* (FOF) inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) in osteosarcoma MG63 cells based on the TGF- β /Smad3 pathway. **Methods** MTT assay was used to detect cell proliferation inhibition; Transwell chamber migration assay was used to observe cell migration ability; ELISA was used to detect the level of TGF- β 1 secreted by cells; qPCR was used to detect the expression of Snail1 and Twist mRNA in cells. **Results** FOF inhibited the proliferation of MG63 cells in a time- and concentration-dependent manner, reduced the migration of MG63 cells and the ability to secrete TGF- β 1, and resulted in a significant decrease in the expression levels of Vimentin, p-Smad3, p-TGF- β R II protein and Snail1, Twist mRNA in MG63 cells, and an increase in E-cadherin protein. **Conclusion** FOF can inhibit the proliferation of MG63 cells and reverse the EMT of MG63 cells by inhibiting the over-activation of TGF- β 1/Smads, thus reducing the metastasis ability of MG63 cells.

[Key words] total flavonoids of *Oxytropis falcate*; EMT; osteosarcoma; TGF- β /Smad3 pathway; neoplasm metastasis

骨肉瘤起源于骨间充质细胞,是最常见的原发性恶性骨肿瘤。其每年发病率在不同年龄段略有不同:在 0~14 岁内为 4.0/百万(3.5/百万~4.6/百万),在 0~19 岁内为 5.0/百万(4.6/百万~5.6/百万)。在儿童易患的癌症中,骨肉瘤发病率排在第 8 位。骨肉瘤发病率男性高于女性,呈双峰型分布,在 10~14 岁时出现第 1 个高峰,与生长激素激增相关;在 65 岁以上人群中出现第 2 个高峰,与佩吉特氏病相关。最常见的部位是股骨、胫骨和肱骨。骨肉瘤的 5 年整体生

存率为 68%。最佳治疗效果是在骨肉瘤转移前手术完整切除。化疗药物和化疗方案对骨肉瘤的复发和转移依然至关重要。骨肉瘤具有发病率高、耐药性强及易转移等特点,导致其预后差^[1]。尽管近年来,科学家们确定了几种分子标记物,但敏感性和特异性欠缺。因此,开发新型药物对原发性骨肉瘤的治疗至关重要。

镰形棘豆(*oxytropis falcate*)属于棘豆属,主要分布在中国西北部,在西藏和内蒙古被广泛用于民间偏

方。其全草在中药中也被广泛使用,主要用于治疗发热、流感、扁桃体炎、咽喉炎、急性慢性支气管炎、便血、痢疾等。现代药理学研究发现其具有抑菌、抗氧化、抗炎、止血和抗肿瘤等药效^[2],有效成分主要包括黄酮类、多酚类、多糖及生物碱等^[3]。近年研究显示镰形棘豆总黄酮(flavonoids of oxytropis falcate, FOF)具有抗肿瘤效果,但主要集中在对肝癌的治疗研究中^[4],对其他肿瘤的作用效果研究少见报道。2016年,李钦^[5]发现 FOF 可抑制由转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)诱导的肾上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)引起的肾纤维化,其主要是通过抑制 TGF- $\beta 1$ /Smads 通路实现的。该通路在大部分转移性肿瘤中被激活,促进肿瘤细胞 EMT 转化^[6]。因此,推测 FOF 可能会通过抑制 TGF- $\beta 1$ /Smads 通路抑制转移性肿瘤的转移能力。

为探索 FOF 是否可通过 TGF- β /Smad3 通路抑制骨肉瘤细胞 EMT 及其分子机制,为 FOF 首次应用于抗骨肉瘤转移提供理论支持,本研究选取骨肉瘤细胞 MG63 细胞系作为研究对象进行实验。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

MG63 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。DMEM 高糖培养液购自美国 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自北京四季青生物科技有限公司,胰蛋白酶、RIPA 裂解液、超敏型 ECL 检测试剂、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 电泳液及蛋白免疫印迹(Western blot)转膜液均购自上海碧云天生物技术有限公司,E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、p-Smad3、磷酸化转化生长因子 β 受体 II(p-TGF- β R II)单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,Transwell 小室购自 Millipore 公司,TRIzol、反转录试剂盒、qPCR 试剂盒均购自日本 Takara 公司,TGF- $\beta 1$ ELISA 试剂盒购自上海酶联生物公司。引物信息:Twist 正向引物 5'-CTT GCC AAT CAG CCA CTG AC-3';反向引物 5'-CCA GTT TGA TCC CAG CGT TT-3';Snail 正向引物 5'-CCT TCA GGC CAC CTT CTT TG-3';反向引物 5'-TCC AGT AAC CAC CCT GCT GA-3';GAPDH 正向引物:5'-CCG AGG GCC CAC TA A AGG-3';反向引物:5'-GCT GTT GAA GTC ACA GGA GAC AA-3',以上引物由日本 Takara 公司合成。FOF 由甘肃省中医药研究院中药研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 MG63 细胞用含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液,置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞贴壁生长至 80%~90% 融合度时传代。

1.2.2 细胞增殖实验

取对数生长期细胞,胰酶消化成单细胞,并用含有 10% FBS 的高糖型 DMEM 培

养基配制成 1×10^5 /mL 浓度的单细胞悬液。于每孔 100 μ L 加入到 96 孔板中,置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,待贴壁后,分别加入 0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ g/mL 的 FOF,其中 0 μ g/mL 组加入相同体积的二甲基亚砜(DMSO)作为空白组,继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的四甲基偶氮唑蓝(MTT) 20 μ L,培养 4 h,弃去培养基,每孔加入 150 μ L DMSO 室温避光溶解 MTT,于 490 nm 处在酶标仪上检测吸光度(OD)值。为排除药物的诱导凋亡作用所引起的对以下实验结果的影响,同时保证药物的作用效果,本研究选取 48 h 作为处理时间、 \leq 半数致死浓度(IC₅₀)的两个梯度浓度(25.0 μ g/mL 组、50.0 μ g/mL 组)作为处理浓度,进行后续实验。

1.2.3 细胞迁移实验

在超净工作台中,将 Transwell 小室放入 24 孔板中,备用。取对数生长期细胞用 0、25% 胰酶消化并用无血清培养基配制成 1.5×10^5 /mL 的单细胞悬液,以每孔 400 μ L 加入到 Transwell 小室上室中,并在下室中加入 600 μ L 含有 20% 血清的培养基,每组设 6 个平行对照。并分别加入 0 μ g/mL、25.0 μ g/mL、50.0 μ g/mL 的 FOF,其中 0 μ g/mL 组加入相同体积的 DMSO 作为空白组,放入 37 °C、含 5% CO₂ 培养箱中,培养 48 h 后,取出培养板,将 Transwell 小室取出,放入 -20 °C 无水甲醇固定 5 min,棉签轻轻拭去上室中未迁移细胞后,0.25% 结晶紫染色 5 min,PBS 洗去未染色结晶紫,显微镜下观察拍照,并随机选取 6 个视野计数细胞,统计迁移细胞数。

1.2.4 ELISA 实验

取各组细胞,胰酶消化并用含有 10% FBS 的高糖型 DMEM 培养基配制成 1×10^4 /mL 的单细胞悬液,以每孔 1 mL 种植于 6 孔板中,置于 37 °C、含 5% CO₂ 培养箱中培养至 80% 融合后,加入不同浓度药物,每组设 6 个平行对照,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h,收集上清液,离心后,按照 ELISA 试剂盒说明书进行实验。

1.2.5 qPCR 实验

MG63 细胞在培养瓶底融合度达到 80% 后,加入不同浓度药物处理 48 h 后,用 TRIzol 法提取总 RNA,步骤如下:PBS 洗涤 MG63 细胞,加入 TRIzol 于冰上裂解 5 min,收集裂解液,13 000 r/min 离心,收集上清液,加入氯仿,静置离心,吸取上清液加入异丙醇,静置离心,弃上清液,75% 乙醇清洗沉淀,离心弃上清液,保留沉淀干燥,用焦碳酸二乙酸(DEPC)水溶解。然后按照日本 Takara 反应试剂盒依次经过去除基因组 DNA 反应、反转录反应和 qPCR 进行扩增,扩增程序为:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 15 s,72 °C、30 s,40 循环数。

1.2.6 Western blot 实验

取各组细胞,PBS 洗涤后,加入 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞,待细胞裂解后收集于离心管中,继续裂解 30 min,13 000 r/min 离心,收集上清液,测定蛋白浓度,加入 4 \times 上样缓冲

液,煮沸 5 min,充分变性,−20 °C 保存备用。制胶:10%分离胶+5%浓缩胶;按蛋白浓度确定上样量;然后经过电泳,转膜,封闭,一抗孵育过夜,PBS 洗涤,二抗室温孵育 1.5 h,PBS 洗涤,ECL 发光液显色,X 射线显影,拍照,用 Image pro plus 软件分析光密度值。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FOF 对 MG63 细胞增殖的影响 在相同时间下,随着 FOF 处理浓度的升高,MG63 细胞增殖抑制率逐渐升高,其中处理 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 80.84、

44.90、31.36 μg/mL;在相同浓度下,随着处理时间的增长,MG63 细胞增殖抑制率也逐渐升高。见图 1。

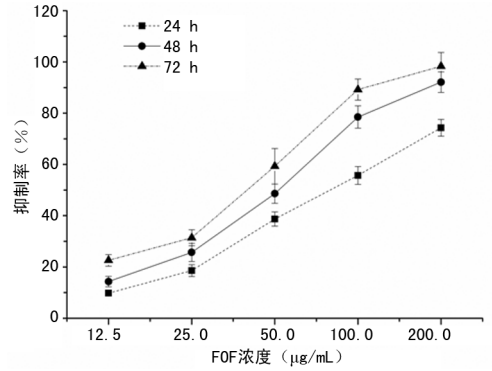
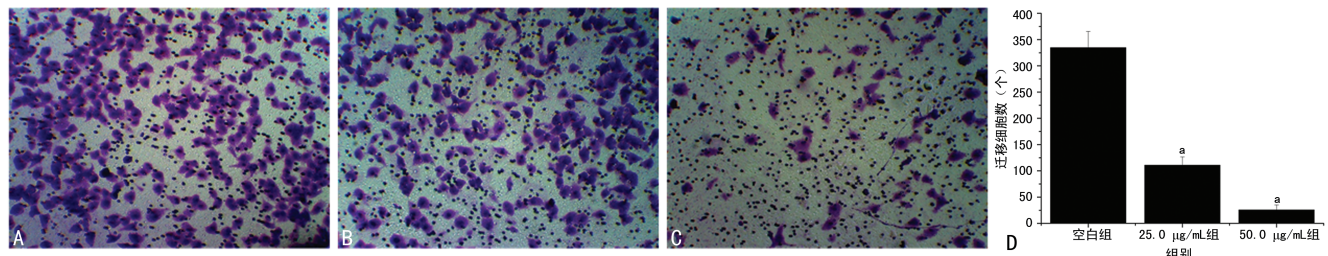


图 1 FOF 对 MG63 细胞增殖的影响



A:空白组;B:25.0 μg/mL 组;C:50.0 μg/mL 组;D:定量分析;^a: $P < 0.05$,与空白组比较

图 2 FOF 对 MG63 细胞迁移的影响

2.2 FOF 对 MG63 细胞迁移的影响 随着 FOF 浓度的增大,迁移细胞逐渐减少,与空白组比较,25.0 μg/mL 组和 50.0 μg/mL 组迁移细胞数均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 FOF 对 MG63 细胞 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响 随着 FOF 浓度的增大,E-cadherin 表达逐渐增多,Vimentin 表达逐渐减少,见图 3。

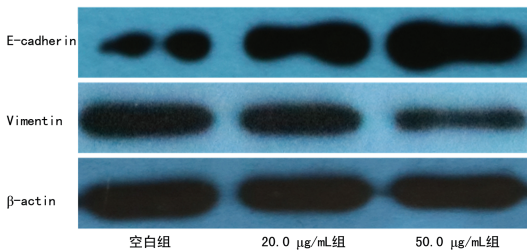
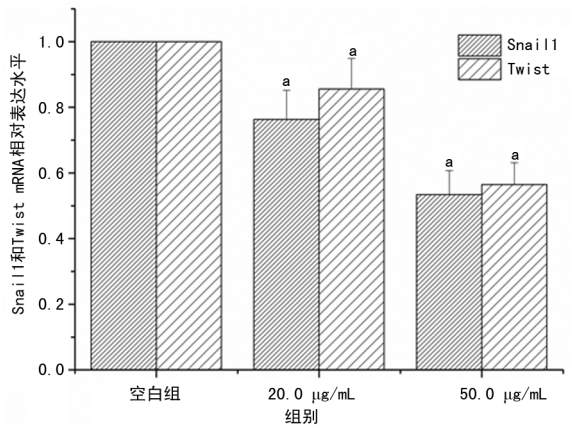


图 3 FOF 对 MG63 细胞中 E-cadherin、Vimentin 蛋白水平的影响

2.4 FOF 对 MG63 细胞 Snail1、Twist mRNA 表达水平的影响 随着 FOF 浓度的增大,Snail1、Twist mRNA 表达水平逐渐减少,经统计,与空白组比较,25.0 μg/mL 组和 50.0 μg/mL 组中 Snail1、Twist mRNA 表达变化差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

2.5 FOF 对 MG63 细胞上清液中 TGF-β1 水平的影响 随着 FOF 浓度的增大,MG63 细胞上清中 TGF-β1 水平逐渐减少。经统计,与空白组[(10.35 ± 1.64) ng/mL]比较,25.0 μg/mL 组[(6.98 ± 0.91) ng/mL]和 50.0 μg/mL 组[(3.70 ± 0.54) ng/mL]中 TGF-β1

水平变化差异有统计学意义($P < 0.05$)。



^a: $P < 0.05$,与空白组同种 mRNA 比较

图 4 FOF 对 MG63 细胞 Snail1、Twist mRNA 表达水平的影响

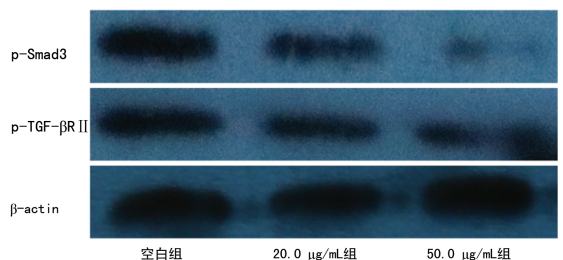


图 5 FOF 对 MG63 细胞中 p-Smad3、p-TGF-βR II 蛋白的影响

2.6 FOF 对 MG63 细胞 p-Smad3、p-TGF-βR II 蛋白表达的影响 随着 FOF 浓度的增大,p-Smad3、p-

TGF- β R II 蛋白水平逐渐减少,见图 5。

3 讨论

近年,由镰形棘豆中提取的黄酮类物质逐步被各研究者发掘出具有抗肿瘤效果。杨光明等^[7]发现 FOF 可通过调控 Bcl-2/Bax 的比率诱导肝癌 SMMC-7 细胞系凋亡。陈晓红等^[8]进一步对 FOF 引起 SMMC-7721 细胞凋亡的途径进行探索,发现 FOF 可诱导细胞内 Caspase-3、Cyt C 蛋白表达水平升高,并伴随线粒体膜电位发生变化,揭示 FOF 可通过线粒体凋亡途径诱导 SMMC-7721 细胞凋亡。但是其对骨肉瘤的抗癌效果及对肿瘤转移的影响并未见报道。因此,本研究选取 MG63 细胞为研究对象探索 FOF 抗骨肿瘤效果及对 EMT 的影响。通过 MTT 细胞增殖实验发现 FOF 以时间和浓度依赖的方式抑制 MG63 细胞增殖,提示 FOF 具有一定的抗 MG63 细胞增殖的能力。考虑到时间过长或浓度过高,细胞凋亡严重,而时间过短或浓度太低,对细胞代谢无影响,因此本研究选取 48 h 时的最接近 IC₅₀ 的左右两个 FOF 浓度处理 MG 细胞。

EMT 能够使上皮细胞获得类似于间质细胞的特征,使其具有较高的转移能力。在大部分肿瘤获得转移能力的过程中,伴随 EMT 转化相关蛋白及通路发生异常^[9]。在 EMT 转化过程中,直接相关的蛋白有 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin,其中 E-cadherin 表达下调,N-cadherin 和 Vimentin 表达上调。本研究发现经 FOF 处理后,MG63 细胞迁移能力下降,E-cadherin 蛋白表达上升,Vimentin 蛋白表达下降。提示 FOF 可逆转 MG63 细胞 EMT,从而抑制 MG63 细胞迁移。研究发现^[10]转录因子 Snail1、Twist 通过特异性识别 E-box 碱基序列下调 E-cadherin mRNA 表达,上调 Vimentin mRNA 表达,促进细胞 EMT。本研究通过 qPCR 实验发现 FOF 具有降低 MG63 细胞中 Snail1、Twist mRNA 的能力。以上提示 FOF 可通过抑制 MG63 细胞中 Snail1、Twist mRNA 表达,降低相应蛋白水平,逆转 EMT,达到抑制 MG63 细胞转移的效果。

研究发现 TGF- β 1/Smads 通路调控 Snail1、Twist 表达^[11]。在多数肿瘤当中异常激活的 TGF- β 1/Smads 通路通过诱导 Snail1 过表达介导 EMT^[12]。TGF- β 1 与细胞表面 TGF 受体结合导致 TGF- β R II 磷酸化激活,并进一步磷酸化激活 Smad3,p-Smad3 进入细胞核启动 Snail1、Twist 表达。基础研究发现很多药物均可通过抑制 TGF- β 1/Smads 通路逆转肿瘤细胞 EMT^[12]。本研究发现 FOF 可降低 MG63 细

胞上清液中 TGF- β 1 的水平及 MG63 细胞中 p-Smad3、p-TGF- β R II 蛋白水平。提示 FOF 可抑制 MG63 细胞分泌 TGF- β 1 的能力,进而抑制 Smad3、TGF- β R II 磷酸化水平。

综上可知 FOF 对 MG63 细胞增殖具有抑制作用,并可通过抑制 TGF- β 1/Smads 过度激活,逆转 MG63 细胞 EMT,从而降低 MG63 细胞转移。由于与 EMT 转化相关的信号通路还涉及其他多条通路,FOF 是否还通过其他途径逆转 EMT 转化,还需进一步实验。

参考文献

- [1] OTTAVIANI G, JAFFE N, DELLING G, et al. The epidemiology of osteosarcoma[J]. *Cancer Treat Res*, 2010, 152:3-13.
- [2] 张丽,姜华,黄聪琳. 藏药黄酮苷元抗炎作用的初步研究[J]. *西部中医药*, 2015(2):50-52.
- [3] 杨欢,王栋,童丽,等. 镰形棘豆的化学成分研究(IV)[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(5):338-340.
- [4] 梁慕华. 镰形棘豆抑制人肝癌细胞增殖和侵袭作用及机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2016(9):2214-2216.
- [5] 李钦. 基于 TGF- β /Smads 信号通路研究镰形棘豆提取物对肾间质纤维化的作用及机制[D]. 兰州:兰州大学, 2016.
- [6] Syed V. TGF- β Signaling in Cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(6):1279-1287.
- [7] 杨光明,燕珂,顾青,等. 藏药镰形棘豆总黄酮对 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 [J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(24):2113-2116.
- [8] 陈晓红,程海清,邓易,等. 镰形棘豆对 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位和凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33(1):54-58.
- [9] CAO Q H, LIU F, LI C Z, et al. Testes-specific protease 50 (TSP50) promotes invasion and metastasis by inducing EMT in gastric cancer [J]. *Bmc Cancer*, 2018, 18(1):94-105.
- [10] KURIOKA K, WATO M, ISEKI T, et al. Differential expression of the epithelial mesenchymal transition factors Snail, Slug, Twist, TGF- β , and E-cadherin in ameloblastoma [J]. *Med Mol Morphol*, 2017, 50(2):68-75.
- [11] 蔡甜甜,潘华峰,张成哲,等. 基于 TGF- β /Smads 信号通路探讨胃痞消逆转 GPL 大鼠胃黏膜 EMT 效应机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(4):424-429.
- [12] NEIMAN J M, WANG X J. Molecular Determinants of Head and Neck Cancer[M]. New York:Springer, 2014.

(收稿日期:2018-12-26 修回日期:2019-01-11)