DOI:10.16016/j.1000-5404.201601003

冬凌草甲素促进骨肉瘤细胞143B凋亡及其可能机制

邹 翔[1],王 星[1],张然熙[1],皮昌军[1],田冬冬[1],吴 念[1],何百成[2],邓忠良[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院骨科[1];400016 重庆,重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 研究冬凌草甲素(oridonin,ORI)对人骨肉瘤细胞株增殖抑制和凋亡诱导作用的分子机制。**方法** 以结晶紫染色和Western blot检测ORI对143B细胞增殖的抑制作用,Annexin V-EGFP染色法和Western blot检测ORI对143B细胞凋亡的促进作用;RT-PCR和Western blot检测ORI对143B细胞内Wnt/β-catenin信号的影响;沉默或过表达β-catenin后,结晶紫染色分析ORI对143B细胞增殖的抑制作用的变化。**结果** ORI能够抑制143B细胞株增殖,并诱导其凋亡($P<0.05$);呈浓度依赖性抑制143B细胞PCNA的表达,同时促进其Caspase3、Bad的表达;能够抑制143B细胞内Wnt/β-catenin信号的表达,沉默或过表达β-catenin后则可以相应地促进或抑制143B细胞的凋亡($P<0.05$)。**结论** ORI能够浓度依赖性抑制143B骨肉瘤细胞株增殖并诱导其凋亡,可能与ORI能够抑制其Wnt/β-catenin信号转导有关。

[关键词] 冬凌草甲素;骨肉瘤;增殖;凋亡;Wnt/β-catenin
[中图法分类号] R282.71; R285.5; R738.1 [文献标志码] A

Oridonin induces apoptosis of human osteosarcoma cell line 143B and related mechanism

Zou Xiang[1], Wang Xing[1], Zhang Ranxi[1], Pi Changjun[1], Tian Dongdong[1], Wu Nian[1], He Baicheng[2], Deng Zhongliang[1] ([1]Department of Orthopaedic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the molecular mechanism of oridonin (ORI) in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human osteosarcoma cell line 143B. **Methods** 143B cells were treated with different doses of ORI in a certain time before being used in the experiment. The proliferation inhibitory effect of ORI was tested by crystal violet staining and Western blotting. The effect of inducing apoptosis was detected by Annexin V-EGFP staining and Western blotting. The influence on WNT/β-catenin signal pathway was investigated by RT-PCR and Western blotting. After Si-β-catenin or Ad-β-catenin was used to silence or over-express β-catenin in 143B cells, the proliferation inhibitory effect of ORI was tested by crystal violet staining again. **Results** ORI could inhibit the proliferation and induce apoptosis of 143B cells in a concentration-dependent manner. It also suppressed the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), promoted the expression of Caspase 3 and Bad, and decreased the level of β-catenin. The apoptosis of 143B cells was promoted or inhibited by silencing or over-expressing β-catenin. **Conclusion** ORI can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of 143B cells in a concentration-dependent manner, which may be associated with the down-regulation of β-catenin.

[**Key words**] oridonin; osteosarcoma; proliferation; apoptosis; Wnt/β-catenin

Corresponding author: Deng Zhongliang, E-mail: dengzhongliang99@163.com

[通信作者] 邓忠良,E-mail:dengzhongliang99@163.comn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160329.0843.005.html(2016-03-29)

冬凌草甲素(oridonin,ORI)是一种贝壳杉烯二萜类天然有机化合物,可从唇形科香茶菜属植物中提取,目前主要从香茶菜、道孚香茶菜、冬凌草等天然植物中提取。作为传统中药提取物,ORI 以其显著的抗肿瘤及低毒副作用等优势[1-2]展现了作为新型抗肿瘤或辅助抗肿瘤药物的良好潜力。目前 ORI 的抗肿瘤作用已成为研究热点,大量研究表明 ORI 能够抑制或杀灭多种肿瘤细胞[3-5],且毒副作用较低,尚少见对骨髓、肝、肾、心、脑等重要脏器有明显损伤作用的报道。但 ORI 抗肿瘤作用的具体机制目前尚不十分清楚。Wnt/β-catenin 信号通路对动物的生长发育至关重要,在生物进化中极为保守。许多研究表明 Wnt/β-catenin 信号通路在各种癌症的发生、发展中有非常重要的作用[6-8]。许多骨及软组织肿瘤的发生与其异常激活有关。有研究表明,在骨肉瘤中 Wnt/β-catenin 的转导异常[9-12],提示其可能是治疗骨肉瘤的一个潜在靶点。本研究检测不同浓度 ORI 对 143B 细胞增殖和凋亡的影响,分析该作用与 Wnt/β-catenin 信号的关系,探索 ORI 调控 Wnt/β-catenin 信号转导的可能机制,以期为 ORI 作为抗肿瘤药物提供新的证据。

1 材料及方法

1.1 药物及试剂

人骨肉瘤细胞株 143B 购自 ATCC,冬凌草甲素购自西安昊轩生物科技有限公司,实验所用抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,重组腺病毒表达红色荧光蛋白(Ad-RFP)、沉默及过表达 β-catenin(Si-β-catenin、Ad-β-catenin)提前通过 AdEasy 系统制备。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 143B 细胞采用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、10^5 U/L 青霉素和 0.1 g/L 链霉素)常规培养于 5% CO_2 饱和湿度、37 ℃ 培养箱中,2 d 换液传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 实验设计及分组 将 143B 细胞分为实验组和对照组,用 DMSO 溶解 ORI,实验组用不同浓度的 ORI 处理,对照组用相同体积 DMSO 或者同体积 Ad-RFP 处理。

1.2.3 结晶紫染色检测细胞增殖 将细胞接种于 24 孔板中,用不同浓度 ORI(5、10、15、20、25 μmol/L)或者 ORI、Si-β-catenin、Ad-β-catenin、ORI + Si-β-catenin、ORI + Ad-β-catenin(ORI 均为 10 μmol/L)处理,分别于 24、48、72 h 进行结晶紫染色,检测细胞增殖情况。弃培养基,用 PBS 小心清洗孔板 1 次,弃 PBS,每孔加入 200 μL 结晶紫饱和溶液,在室温下孵育20 min,弃结晶紫染色液,用 PBS 小心清洗 3 次,室温下将孔板晾干后扫描。每组实验重复 3 次。

1.2.4 结晶紫定量分析 在进行过结晶紫染色的 24 孔板中每孔加入 200 μL 20% 的乙酸溶液,置于摇床上,室温孵育 20 min 以溶解结晶紫,每孔取 100 μL 溶液转移至 96 孔板,于酶标仪检测光密度值,波长定于 570 nm。每组实验重复 3 次。

1.2.5 Annexin V-EGFP 染色法检测细胞凋亡 凋亡早期,细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸翻向外侧。Annexin V 是一种磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,可与细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸结合,可用于特异性检测早期凋亡细胞。将细胞接种于 24 孔板中,用不同浓度的 ORI(5、10、15 μmol/L)处理,24 h 后用 PBS 小心清洗孔板 1 次,弃 PBS,加入染色工作液室温孵育 5 min,工作液按结合缓冲液(binding buffer,BF)和染色液(Annexin V-EGFP)250∶1 比例配制,于荧光显微镜下检测绿色荧光蛋白。每组实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 实验 将细胞接种于 6 孔板中,按实验设计加入不同浓度的 ORI(5、10、15 μmol/L)处理,于 24 h 提取各组总蛋白于 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,按常规操作方法进行 Western blot 实验。最后采用 ECL 试剂盒显影成像。每组实验重复 3 次。

1.2.7 RNA 提取及 RT-PCR 实验 将细胞接种于 T25 培养瓶中,按实验设计加入不同浓度的 ORI(5、10、15 μmol/L)处理,并用含 1% 胎牛血清的完全培养基培养细胞,于相应的时间点(24 h)采用 TRIzol 提取总 RNA,逆转录制备 cDNA,PCR 检测目的基因 mRNA 表达水平。GAPDH 上游引物 5′-CAACGAATTTGGCTACAGCA-3′,下游引物 5′-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3′,片段长度为 170 bp;β-catenin 上游引物 5′-CTGCAGGGGTCCTCTGTG-3′,下游引物 5′-TGCATATGTC-GCCACACC-3′,片段长段 343 bp。每组实验重复 3 次。

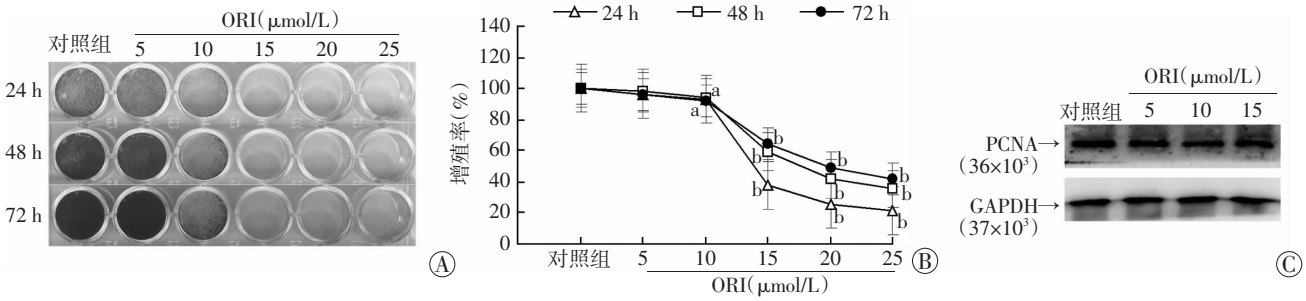
1.3 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

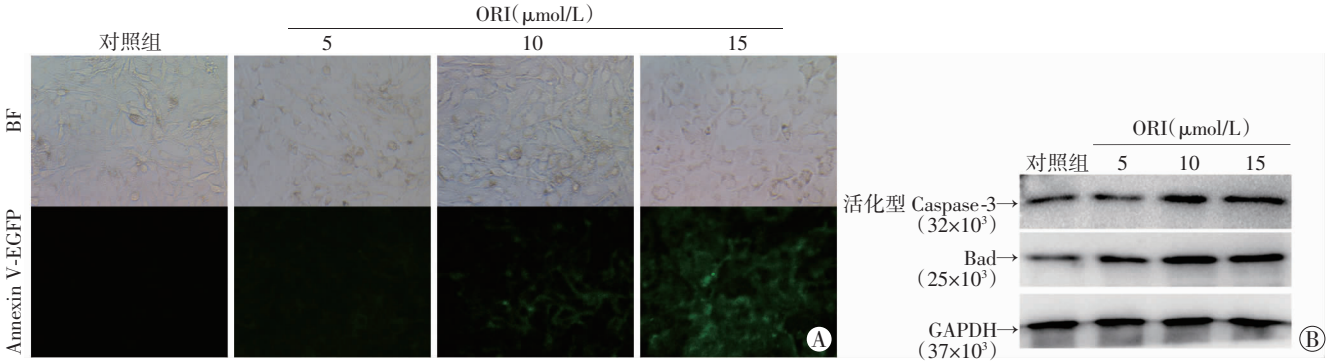
2.1 ORI 对 143B 细胞增殖的影响

结晶紫染色(图 1A)及定量(图 1B)分析结果显示,与对照组相比,ORI 处理组 143B 细胞的增殖受到明显抑制,ORI 在 10 μmol/L 时已能明显抑制 143B 细胞的生长,差异有统计学意义($P<0.05$),并表现出浓度依赖性。Western blot 检测结果显示,ORI 能够明显下调增殖细胞核抗原(proliferatingcell nuclear antigen,PCNA)的表达(图 1C)。这提示 ORI 能抑制 143B 骨肉瘤细胞的增殖。



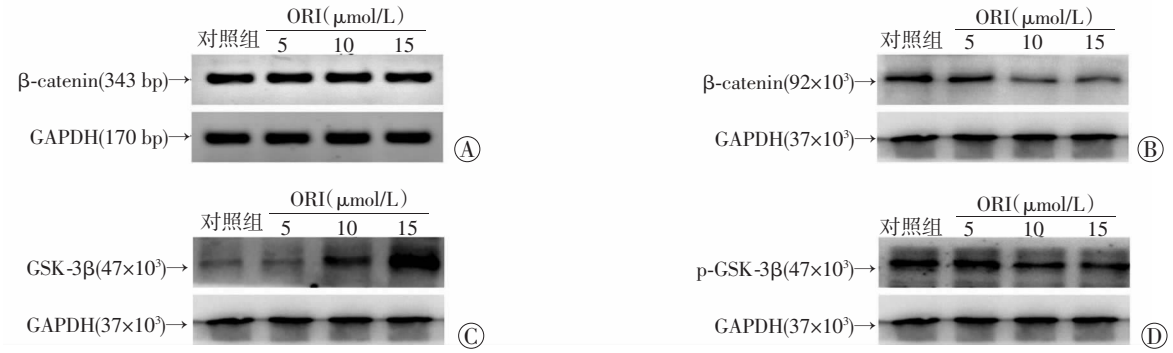
A：结晶紫染色；B：定量分析　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：Western blot 检测

图 1　冬凌草甲素对 143B 细胞增殖的作用



A：Annexin V-EGFP 染色（×200）；B：Western blot 检测

图 2　冬凌草甲素对 143B 细胞凋亡的作用



A：RT-PCR 检测 ORI 对 143B 细胞中 β-catenin mRNA 表达水平的影响；B：Western blot 检测 ORI 对 143B 细胞中 β-catenin 蛋白表达水平的影响；C：Western blot 检测 ORI 对 143B 细胞中 GSK-3β 蛋白表达水平的影响；D：Western blot 检测 ORI 对 143B 细胞中 p-GSK-3β 蛋白表达水平的影响

图 3　冬凌草甲素对 143B 细胞中 Wnt/β-catenin 信号的作用

2.2　ORI 对 143B 细胞凋亡的影响

Annexin V-EGFP 染色结果显示，与对照组相比，ORI 处理组 143B 细胞凋亡显著增加，并随着药物浓度提高而增加（图 2A）。Caspase-3 和 Bad 为重要的细胞凋亡相关蛋白。Western blot 检测结果显示，ORI 不同浓度处理组的 Caspase-3 及其活化型 Caspase-3、Bad 蛋白表达水平明显高于对照组，并呈浓度依赖性增加（图 2B）。这提示 ORI 有诱导 143B 细胞凋亡的作用。

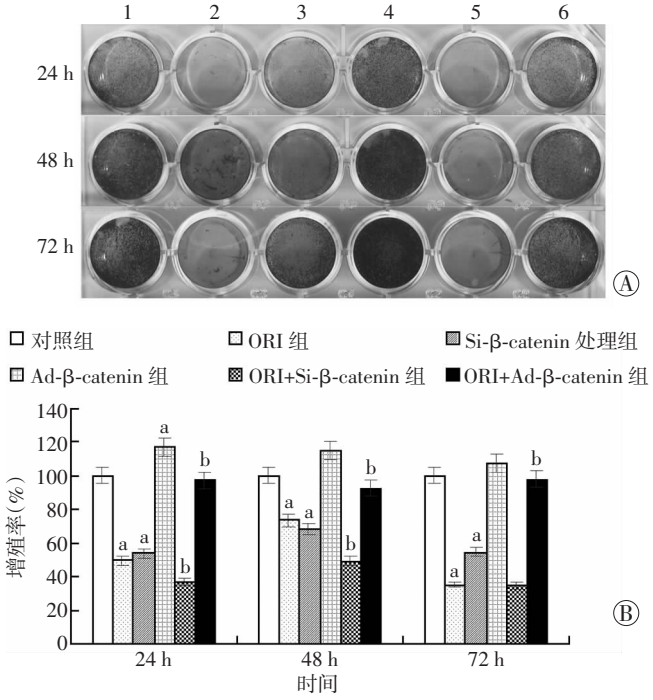
2.3　ORI 对 143B 细胞中 Wnt/β-catenin 信号转导的影响

β-catenin 在 Wnt/β-catenin 信号转导过程中处于中心地位，与细胞内 β-catenin 水平及丝氨酸/苏氨酸激酶糖原合成酶激酶-3β（serin/threonine glycogen synthasekinase 3β，GSK-3β）的表达直接相关。经 ORI 处理后，与对照组相比，RT-PCR 检测结果提示 143B 细胞 β-catenin mRNA 的表达水平并未出现显著变化（图 3A）。但是 Western blot 检测结果提示 β-catenin 蛋白水平随着药物浓度的增加显著降低（图 3B），GSK-3β 随 ORI 浓度增高而增高（图 3C），而 p-GSK-3β 则呈相反趋势，随药物浓度增加降低（图 3D）。这提示 ORI 能抑制 143B 细胞中 β-catenin 的表达，该抑制作用可

能主要通过调控 Axin/腺瘤性结肠息肉病基因(adenomatous polyposis coli,APC)/GSK-3β 复合物实现,而不是通过直接抑制 β-catenin 基因的表达实现。

2.4 沉默或过表达 143B 细胞中 β-catenin 对 ORI 诱导 143B 凋亡作用的影响

结晶紫染色(图 4A)及定量(图 4B)分析结果显示,与对照组相比,ORI 及 Si-β-catenin 处理组 143B 细胞的增殖受到明显抑制,且 Si-β-catenin 后能促进 ORI 对 143B 细胞增殖的抑制作用;Ad-β-catenin 对 143B 细胞增殖的促进作用虽然仅在第 1 天较明显,但能在一定程度上逆转 ORI 对 143B 细胞增殖的抑制作用,差异有统计学意义($P<0.05$)。



1:对照组;2:ORI 组;3:Si-β-catenin 处理组;4:Ad-β-catenin 组;5:ORI + Si-β-catenin 组;6:ORI + Ad-β-catenin 组
A:结晶紫染色;B:定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 ORI 组比较

图 4 沉默和过表达 β-catenin 后冬凌草甲素对 143B 细胞增殖的作用

3 讨论

骨肉瘤好发于青少年,是小儿最常见的原发性恶性骨肿瘤,其致死率和致残率极高,随着手术和放、化疗的进展,其预后有了很大改善[13],但放、化疗的副作用严重影响患者生活质量。因此,寻找有效且低毒的抗骨肉瘤活性药物具有重要的临床意义。

近年研究表明,ORI 对多种肿瘤细胞具有增殖抑制和凋亡诱导作用,如淋巴瘤细胞[3]、结肠癌细胞[4]和乳腺癌[5]细胞等。本研究表明,ORI 能够明显下调 PCNA[14],抑制 143B 细胞增殖。Caspase 和 B 细胞淋巴瘤白血病-2(B-cell leukemia-2,Bcl-2)家族的细胞因子均直接参与调控细胞凋亡过程,Bad 可通过细胞信号通路以及与天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白家族成员作用促进凋亡[15-16],而 ORI 能够促进 Caspase-3 及 Bad 的表达。因此,我们认为 ORI 能够促进 143B 细胞凋亡。

Wnt/β-catenin 信号通路在生物进化过程中高度保守,在个体的生长发育过程中具有至关重要的作用,和许多肿瘤的发生、发展有紧密联系[6-8]。在经典 Wnt 信号通路中,β-catenin 发挥着最为关键的作用,而细胞内 β-catenin 水平受到 Axin、APC 和 GSK-3β 复合物调控[17-18]。其中 GSK-3β 水平与 β-catenin 密切相关,磷酸化后该复合物便无法降解 β-catenin[19-20]。当 β-catenin 进入细胞后被该复合物降解而失去活性,Wnt 信号通路被抑制;而当 GSK-3β 磷酸化,β-catenin 不能被降解,在胞浆内积聚,进而转移至核内与转录因子 TCF/LEF 结合,调节下游靶基因[21]。这些靶基因包括 Survivin、C-myc、Cyclin、Caspase 等,通过这些靶基因 Wnt 信号即可参与调控细胞的增殖、分化、凋亡及癌变等过程。研究表明,Wnt/β-catenin 信号通路与骨肉瘤密切相关[10-12],β-catenin 可作为骨肉瘤治疗的潜在靶点之一。本研究表明,ORI 能够抑制 143B 细胞中 β-catenin 的表达,而过表达 β-catenin 能在一定程度上逆转 ORI 对 143B 增殖的抑制作用,沉默 β-catenin 则进一步促进该作用。

本研究表明,ORI 能够抑制人骨肉瘤细胞株 143B 增殖,诱导其凋亡;该作用可能与其抑制 Wnt/β-catenin 信号转导相关;而 ORI 对 Wnt 信号的抑制作用很可能通过促进 Axin/APC/GSK-3β 复合物降解 β-catenin 实现。

参考文献:

[1] Liu Z, Ouyang L, Peng H, *et al*. Oridonin: targeting programmed cell death pathways as an anti-tumour agent[J]. Cell Prolif, 2012, 45(6): 499 - 507. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2012.00849.x

[2] Li C Y, Wang E Q, Cheng Y, *et al*. Oridonin: An active diterpenoid targeting cell cycle arrest, apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(5): 701 - 704. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.01.020

[3] Xu Z Z, Fu W B, Jin Z, *et al*. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced apoptosis through DNA damage response and activation of JNK pathway in diffuse large B cell lymphoma[J]. Leuk Lymphoma, 2016, 57(4): 888 – 898. DOI: 10.3109/10428194.2015.1061127

[4] Gao F H, Liu F, Wei W, *et al*. Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in colorectal cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(4): 649 – 655. DOI: 10.3892/ijmm.2012.895

[5] Li Y, Wang Y, Wang S, *et al*. Oridonin phosphate-induced autophagy effectively enhances cell apoptosis of human breast cancer cells[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 365. DOI: 10.1007/s12032-014-0365-1

[6] Duraiswamy A J, Lee M A, Madan B, *et al*. Discovery and optimization of a porcupine inhibitor[J]. J Med Chem, 2015,58(15): 5889 – 5899. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00507

[7] Rasmussen N R, Debebe Z, Wright T M, *et al*. Expression of Ror2 mediates invasive phenotypes in renal cell carcinoma [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e116101. DOI: 10.1371/journal.pone.0116101

[8] Anitha P, Priyadarsini R V, Kavitha K, *et al*. Ellagic acid coordinately attenuates Wnt/β-catenin and NF-κB signaling pathways to induce intrinsic apoptosis in an animal model of oral oncogenesis[J]. Eur J Nutr, 2013,52(1): 75 – 84. DOI: 10.1007/s00394-011-0288-y

[9] Basu-Roy U, Seo E, Ramanathapuram L, *et al*. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas [J]. Oncogene, 2011, 31(18): 2270 – 2282. DOI: 10.1038/onc.2011.405

[10] Piskun C M, Muthuswamy A, Huelsmeyer M K, *et al*. Wnt/β-catenin expression does not correlate with serum alkaline phosphatase concentration in canine osteosarcoma patients[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26106. DOI: 10.1371/journal.pone.0026106

[11] Dieudonne F X, Marion A, Marie P J, *et al*. Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(10): 2118 – 2129. DOI: 10.1002/jbmr.1650

[12] Basu-Roy U, Basilico C, Mansukhani A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma[J]. Cancer Lett, 2013, 338(1): 158 – 167. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.05.028

[13] Ando K, Heymann M F, Stresing V, *et al*. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma[J]. Cancers (Basel), 2013, 5(2): 591 – 616. DOI: 10.3390/cancers5020591

[14] Darzynkiewicz Z, Zhao H, Zhang S, *et al*. Initiation and termination of DNA replication during S phase in relation to cyclins D1, E and A, p21WAF1, Cdt1 and the p12 subunit of DNA polymerase δ revealed in individual cells by cytometry[J]. Oncotarget, 2015, 6(14): 11735 – 11750. DOI: 10.18632/oncotarget.4149

[15] Shahinian H, Tholen S, Schilling O. Proteomic identification of protease cleavage sites: cell-biological and biomedical applications[J]. Expert Rev Proteomics, 2013, 10(5): 421 – 433. DOI: 10.1586/14789450.2013.841547

[16] Doerflinger M, Glab J A, Puthalakath H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take[J]. FEBS J, 2015, 282(6): 1006 – 1016. DOI: 10.1111/febs.13190

[17] Li S, Wang C, Liu X, *et al*. The roles of AXIN2 in tumorigenesis and epigenetic regulation[J]. Fam Cancer, 2015, 14(2): 325 – 331. DOI: 10.1007/s10689-014-9775-7

[18] Song X, Wang S, Li L. New insights into the regulation of Axin function in canonical Wnt signaling pathway[J]. Protein Cell, 2014, 5(3): 186 – 193. DOI: 10.1007/s13238-014-0019-2

[19] McCubrey J A, Steelman L S, Bertrand F E, *et al*. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(10): 2881 – 2911. DOI: 10.18632/oncotarget.2037

[20] McCubrey J A, Davis N M, Abrams S L, *et al*. Diverse roles of GSK-3: tumor promoter-tumor suppressor, target in cancer therapy[J]. Adv Biol Regul, 2014, 54: 176 – 196. DOI: 10.1016/j.jbior.2013.09.013

[21] Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments[J]. Nat Med, 2013, 19(2): 179 – 192. DOI: 10.1038/nm.3074

(收稿:2016-01-02;修回:2016-03-16)

(编辑 郭建秀)