

肉桂酸对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和分化的影响

王国红¹, 郭直岳¹, 石松林², 李祺福²

(1. 新乡医学院生理学与神经生物学教研室, 河南 新乡 453003; 2. 厦门大学医学院基础医学部, 福建 厦门 361005)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2012.09.018

文献标志码: A 文章编号: 1001-1978(2012)09-1262-05

中国图书分类号: R284.1; R329.24; R738.1; R979.1

摘要:目的 研究中药有效成分肉桂酸对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和分化的影响。方法 肉桂酸处理 MG-63 细胞前后, 台盼蓝拒染法进行活细胞计数; 流式细胞仪检测细胞周期时相变化; 光镜和电镜观察细胞形态和超微结构; Van Gieson 染色检测细胞 I 型胶原表达; 茜素红染色观察钙化骨结节形成; 免疫细胞化学检测骨粘素和骨钙蛋白表达。结果

肉桂酸明显抑制 MG-63 细胞增殖, D7 抑制率达 54.94% ± 4.69%。周期分析结果显示, 肉桂酸处理后 G₀/G₁ 期细胞比例较对照组明显升高 ($P < 0.01$)。光镜和电镜结果显示, 肉桂酸处理组 MG-63 细胞形态和超微结构发生明显改变, 呈现相应正常细胞的形态和超微结构特征。肉桂酸促进成骨细胞分化标志物 I 型胶原、骨粘素和骨钙蛋白的表达与钙沉积以及典型骨结节的形成。结论 肉桂酸可抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖并诱导其向成骨细胞分化。

关键词: 肉桂酸; 人骨肉瘤 MG-63 细胞; 增殖; 分化; 骨肉瘤; 成骨细胞

肿瘤细胞诱导分化是利用外源的诱导分化物对增殖分化发生紊乱的肿瘤细胞进行干预, 使其向正常或接近正常的细胞方向分化的过程。肿瘤细胞诱导分化作为肿瘤治疗的新途径, 近年来成为研究热点。肿瘤细胞诱导分化研究的发展有赖于高效低毒

诱导分化物的不断发现, 中药因其取材天然、作用靶点多及更具潜在临床应用前景而受到越来越多研究者的关注^[1]。肉桂酸是中药桂皮的主要成分, 长久以来作为食品香剂和调味料广泛应用于食品工业。1995 年, Liu 等^[2]首先报道肉桂酸抑制人胶质母细胞瘤、黑色素瘤和前列腺癌细胞的增殖并诱导黑色素瘤细胞分化。随后研究发现肉桂酸对白血病、胃癌及肝癌细胞有诱导分化的作用^[3]。而肉桂酸对骨肉瘤细胞的作用国内外尚未见报道, 本研究利用前期已经建立的骨肉瘤细胞体外诱导分化模型, 观察肉桂酸对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和分化的影响, 进一步确定和评价肉桂酸对肿瘤细胞分化的诱导作用, 并为其应用于临床骨肉瘤的诱导分化治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 肉桂酸(cinnamic acid, CINN) 购自中国药品生物制品检定所; 骨粘素一抗购自广州基因公司; 骨钙蛋白一抗和免疫组化染色试剂盒购自博士德生物工程有限公司; RNaseA、碘化丙啶(PI)、二甲基亚砜(DMSO) 购自 Sigma 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; RPMI 1640 粉状培养基购自 Gibco 公司。

1.2 细胞培养及诱导分化处理 人骨肉瘤 MG-63 细胞(购自武汉大学动物资源保藏中心) 采用含 15% 小牛血清、 1×10^5 U · L⁻¹ 青霉素、 1×10^5 U · L⁻¹ 链霉素的 RPMI 1640 培养基 37℃ 和 5% CO₂ 饱和湿度培养。肉桂酸先用等当量的 NaOH 溶液转变成可溶性钠盐, 过滤除菌后 4℃ 保存, 临用前培养液稀释成终浓度为 3 mmol · L⁻¹ 的肉桂酸作用液。实验分对照组和肉桂酸处理组, 细胞接种 24 h 后, 对照组换新鲜培养液, 肉桂酸处理组换 3 mmol · L⁻¹

收稿日期: 2012-04-23 修回日期: 2012-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No 81071669)

作者简介: 王国红(1977-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 细胞增殖分化调控与癌细胞生物学, E-mail: homewgh@126.com;

李祺福(1950-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞增殖分化调控与癌细胞生物学, 通讯作者, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

ADM accumulation was much lower and mainly localized in the cytoplasm. From protein/DNA array, 106 transcription factors among the total 345 transcription factors were up-regulated, while 32 transcription factors were down-regulated. **Conclusions** The difference of transcription factors in MCF7/W and MCF7/

ADM cells is probably due to ADM's avoiding in entering the nuclei, so that ADM cannot exert function.

Key words: MCF-7/ADM; adriamycin; IC₅₀; transcription factor; resistant cells; extraction; subcellular localization

肉桂酸作用液。

1.3 生长曲线测定 对数生长期细胞制成 5×10^7 cells \cdot L⁻¹ 浓度的细胞悬液,以每瓶 2 ml 的量接种于一批规格为 25 ml 的细胞培养瓶。接种 24 h 后对照组换新鲜培养液,肉桂酸处理组换 3 mmol \cdot L⁻¹ 肉桂酸作用液,连续培养 7 d,每天两组各取 3 瓶,台盼蓝拒染法进行活细胞计数,每瓶计数 3 次,取平均值。实验重复 3 次并绘制生长曲线。

1.4 细胞周期测定 常规消化收集对照组和肉桂酸处理 7 d 的细胞,1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,去培养液,PBS 洗涤 2 次后细胞重悬于 0.5 ml 的 PBS 液中,5 ml 预冷的体积分数为 0.75 的乙醇 4℃ 固定过夜。次日离心去乙醇,PBS 洗涤 2 次,加入不含 DNase 的 100 mg \cdot L⁻¹ RNaseA 37℃ 孵育 30 min,离心后加入 50 mg \cdot L⁻¹ 的碘化丙啶(PBS 配制) 4℃ 避光染色 30 min,200 目滤网过滤后流式细胞仪进行细胞周期检测。

1.5 细胞形态观察 取对照组细胞和肉桂酸诱导处理 5 d 的细胞,行爬片处理,对照组加新鲜培养基,肉桂酸组加 3 mmol \cdot L⁻¹ 肉桂酸作用液,继续培养 48 h 后,取出爬片,常规 HE 染色,Olympus BH-2 型光学显微镜下观察并拍照。

1.6 细胞超微结构观察 取对照组和肉桂酸处理组的细胞,D-Hank's 液洗涤后,橡皮刮刀刮下细胞移入离心管中,2 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,2.5% 戊二醛 4℃ 预固定 1 h,小心切成约 1 mm³ 见方的细胞小块,2.5% 的戊二醛 4℃ 固定 1 h,PBS 漂洗 3 次,1% 的四氧化锇 4℃ 固定 2 h,乙醇系列脱水,环氧树脂 823 包埋,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后,JEM100-CX 型透射电子显微镜下观察并拍照。

1.7 Van Gieson 染色检测 I 型胶原表达 取对照组与肉桂酸处理组的细胞爬片,参照 Van Gieson 染色方法^[4],略做改动,Bouin-Hollande 液固定过夜,体积分数为 0.70 的乙醇漂洗,Weigert 铁苏木精液染色 5 min,自来水充分冲洗,显微镜下观察胞质胞核分色,Van Gieson 液染色 5 min,体积分数为 0.95 的酒精迅速脱色分化,乙醇脱水,二甲苯透明,封片后光学显微镜下观察拍照。

1.8 茜素红染色检测骨结节形成 取对照组与肉桂酸处理组的细胞爬片,D-Hank's 漂洗后,Bouin-Hollande 液固定过夜,体积分数为 0.70 的乙醇洗涤,茜素红染色 10 min,体积分数为 0.95 的酒精分色,无水乙醇脱水,二甲苯透明,封片后光学显微镜下观察拍照。

1.9 免疫细胞化学检测骨钙蛋白(osteocalcin)与骨粘素(osteonectin)表达 取对照组和肉桂酸处理组细胞爬片,D-Hank's 液漂洗 3 次,冷丙酮 4℃ 固定 20 min 后按试剂盒操作步骤说明进行操作,封片后光学显微镜下观察拍照。

1.10 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,多组间显著性检验用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 肉桂酸对细胞增殖的抑制作用 生长曲线测定结果显示,MG-63 细胞增殖较快。肉桂酸处理 3 d 后即明显抑制 MG-63 细胞增殖($P < 0.05$),随着肉桂酸处理时间延长,其对 MG-63 细胞增殖的抑制作用越来越明显。肉桂酸处理 7 d 后,对 MG-63 细胞的抑制作用达最强($P < 0.01$),细胞抑制率为 $54.94\% \pm 4.69\%$ 。

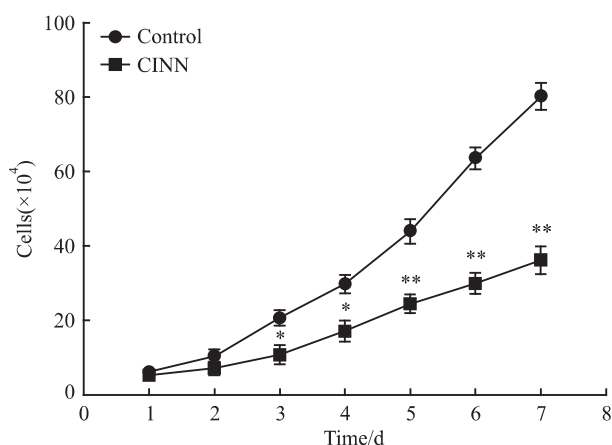


Fig 1 Effect of cinnamic acid (CINN) on the proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 肉桂酸对细胞周期的影响 细胞周期测定结果显示,肉桂酸诱导处理后,人骨肉瘤 MG-63 细胞的细胞周期时相分布出现明显变化。与对照组相比,肉桂酸诱导处理组 G₀/G₁ 期细胞比例明显增多($P < 0.01$),S 期细胞比例则减少($P < 0.01$)。结果表明肉桂酸可诱导 MG-63 细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞。

Tab 1 Effect of cinnamic acid (CINN) on the cell cycle of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	G ₀ /G ₁ /%	S /%	G ₂ /M /%
Control	47.5 \pm 2.3	20.0 \pm 1.4	32.5 \pm 3.1
CINN	59.8 \pm 1.8**	10.3 \pm 1.2**	29.9 \pm 2.0

** $P < 0.01$ vs control group

2.3 肉桂酸对细胞形态的影响 光镜下人骨肉瘤

MG-63 细胞形态多样,癌巨细胞和多极分裂像细胞较常见。细胞体积较小,核质比例大。HE 染色不均匀(Fig 2A)。肉桂酸处理后的 MG-63 细胞形态较为规则一致,胞体增大,细胞质更为铺展,与对照组相比,核质比例减小,偶见癌巨细胞和多核细胞,HE 染色更加均匀(Fig 2B)。

2.4 肉桂酸对细胞超微结构的影响 透射电镜观察显示,MG-63 细胞核质比例较大,核膜内陷且形状极不规则,核内异染色质较多,粗面型内质网数量少且长度较短。胞内无明显的钙化糖原颗粒。细胞形状不规则,细胞膜表面分布有大量微绒毛(Fig 2C、E、G)。肉桂酸处理后,细胞核质比例减小,核膜平滑无内陷,核内常染色质增多且较为均匀。胞质中粗面内质网极为发达,在胞质中平行排列,胞内有大量的钙化糖原颗粒存在,有些部位可见到钙化糖原颗粒的聚集。胞体形状规则,表面平滑,少见微绒毛分布(Fig 2D、F、H)。

2.5 肉桂酸对 I 型胶原表达的影响 Van Gieson 染色结果显示,对照组细胞 I 型胶原染色呈很浅的淡粉红色,表明胶原纤维表达少,且分布不均匀(Fig 2I)。肉桂酸处理后,胞质染色呈较为鲜艳的红色,且染色较为均匀,群体细胞染色均一(Fig 2J)。结果表明,肉桂酸处理后 I 型胶原表达增强。

2.6 肉桂酸对骨结节形成的影响 茜素红染色显示,对照组 MG-63 细胞无典型矿化结节形成,偶见细胞聚集成多层,染色较浅(Fig 2K)。肉桂酸处理后可见有大量细胞聚集而成的编织骨样典型矿化结节形成,结节边缘界限清晰,结节染色呈深红,并有钙盐沉积形成高度矿化的骨基质结构(Fig 2L)。

2.7 肉桂酸对骨粘素表达的影响 免疫细胞化学染色结果显示,对照组骨粘素免疫反应呈弱阳性,反应产物主要分布在核周围的胞质区(Fig 2M)。与对照组相比,肉桂酸处理组骨粘素的免疫显色呈强阳性,大量棕黄色颗粒广布于细胞质中(Fig 2N)。

2.8 肉桂酸对骨钙蛋白表达的影响 免疫细胞化学染色结果显示,对照组 MG-63 细胞骨钙蛋白免疫显色几乎呈阴性,偶见细胞核周围胞质区有少量浅棕色细小颗粒分布(Fig 2O)。肉桂酸处理后,骨钙蛋白免疫显色阳性程度明显增强,反应产物为深棕色颗粒,布满胞质区域(Fig 2P)。

3 讨论

骨肉瘤(osteosarcoma)也称成骨肉瘤,是一种常见的原发性恶性骨肿瘤,多由分化程度较低的肿瘤性成骨细胞所致,好发于青少年。传统的治疗方法有手术、放疗和化疗,存在毒副作用大且预后较差,

易复发等问题。肿瘤诱导分化疗法为骨肉瘤的治疗提供了新思路和新途径。骨肉瘤细胞是具有早期成骨细胞表型特征的一类低分化的恶性肿瘤细胞^[5],肿瘤细胞分裂失控,细胞周期调控发生紊乱,导致细胞不断分裂,持续增殖,细胞不能向正常方向分化而处于低分化状态。本研究结果显示 MG-63 细胞增殖旺盛, G_0/G_1 期细胞比例较少,而处于 DNA 活跃合成的 S 期细胞比例较高。肉桂酸抑制 MG-63 细胞的恶性增殖并使 G_0/G_1 期细胞比例明显升高, S 期细胞比例明显减少。提示肉桂酸可通过抑制增殖和引发 G_0/G_1 期阻滞启动 MG-63 细胞进入正常分化过程。

肿瘤细胞一般具有细胞大小不一,形态不规则,癌巨细胞和分裂像细胞较常见,细胞核质比例较大,胞核畸形,胞内核仁较多,细胞器不发达,胞体表面有大量微绒毛等一系列恶性表型特征与超微结构特征^[6]。能否逆转肿瘤细胞的恶性表型及结构是判断外源诱导物诱导分化作用的重要指标^[7]。本研究光镜与电镜观察显示,人骨肉瘤 MG-63 细胞具有典型的肿瘤细胞恶性表形与超微结构特征,而肉桂酸能有效逆转 MG-63 细胞的恶性表型和结构,使其表现相应正常细胞表型和结构特征。

成骨细胞起源于多能的骨髓基质的间质细胞,由骨祖细胞经前成骨细胞分化而来,正常成骨细胞分化成熟形成骨的过程中要经历细胞增殖、细胞外基质成熟、基质矿化和细胞凋亡四个阶段^[8],在此过程中成骨细胞分化标志物顺序表达于各个阶段, I 型胶原表达于成骨细胞增殖期,占胞外骨基质的 90% 以上,在基质成熟期,胶原继续合成并相互交联、成熟。骨粘素和骨钙蛋白主要表达于成骨细胞分化晚期,在矿化期,骨钙素等非胶原蛋白分泌至胞外基质中,然后沿胶原分子的长轴,钙和磷结合到胶原分子的侧链的氨基酸残基上,形成羟磷灰石结晶,细胞外基质发生矿化,并形成矿化骨结节。长期以来,上述特征常作为鉴定成骨细胞分化的表型标志物^[9-12]。本研究结果显示,对照组 MG-63 细胞 I 型胶原、骨粘素和骨钙蛋白的表达水平低,细胞内无明显的钙化糖原颗粒,钙沉积能力弱,无典型矿化骨结节形成,处于低分化状态,与文献报道结果一致^[5]。肉桂酸处理后, I 型胶原、骨粘素和骨钙蛋白的表达水平明显增高,细胞内出现大量的钙化糖原颗粒,钙沉积能力增强,有典型矿化骨结节形成。表明肉桂酸可增强成骨细胞分化标志物的表达,诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞向正常成骨细胞方向分化。

以上表明,中药有效成分肉桂酸能抑制人骨肉

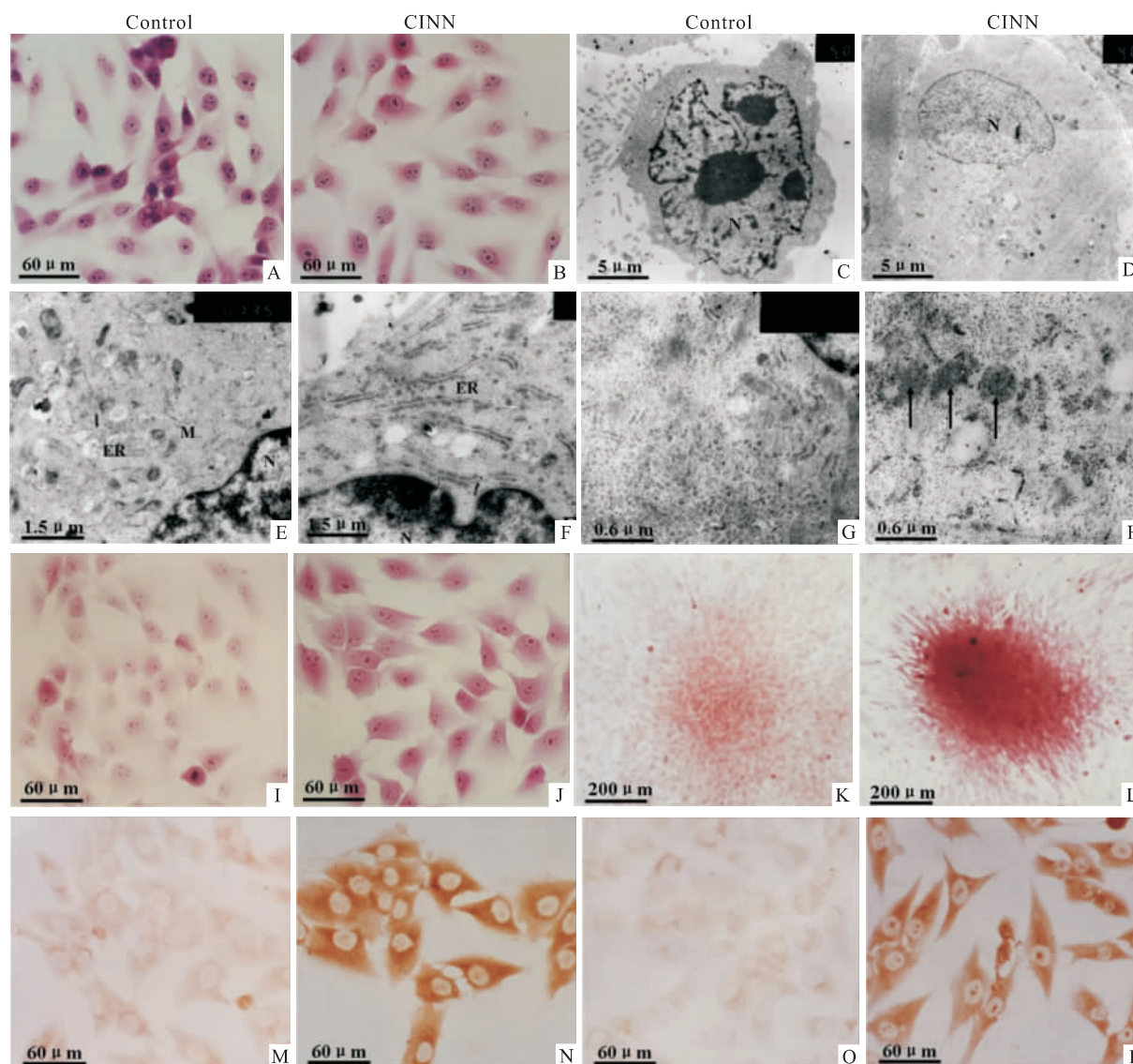


Fig 2 Changes in the morphology, ultrastructure and the expressions of osteoblast markers of MG-63 cells before and after cinnamic acid(CINN) treatment

A ~ B: H. E staining; C ~ H: Ultrastructure under TEM (N: Nucleus; ER: Endoplasmic reticulum; M: Mitochondrion; ↑: Calcified glycogen granules); I ~ J: Expression of type I collagen by Van Gieson staining; K ~ L: Bone nodules by alizarin red staining; M ~ N: Osteonectin expression by immunocytochemical staining; O ~ P: Osteocalcin expression by immunocytochemical staining

瘤 MG-63 细胞的增殖活动, 逆转恶性表型和结构, 促进成骨细胞分化标志物的表达从而诱导其向成骨细胞分化。成骨细胞在分化过程中受到多种调节因子的精细调控, 其中 Runx2/Cbfa1 和 Osx 是成骨细胞分化中的特异性转录因子, 在成骨细胞分化及骨形成中起着非常重要的作用, Runx2/Cbfa1 和 Osx 缺失则成骨细胞分化成熟受阻不能形成骨^[8, 13]。后继实验将从这些调控因子入手, 揭示肉桂酸诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞分化的分子机制, 为其用于临床骨肉瘤的诱导分化治疗提供更为充分的依据。

参考文献:

[1] 张锐, 崔永安, 左小东. 单味中药诱导肿瘤细胞分化的研究

进展[J]. 现代中西医结合杂志 2008, 17(36): 5701-4.

[1] Zhang R, Cui Y A, Zuo X D. Research progress on tumors cell differentiation induced by single Chinese herb [J]. *Mod J Int Tradit Chin West Med*, 2008, 17(36): 5701-4.

[2] Liu L, Hudgins W R, Shack S, et al. Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention [J]. *Int J Cancer*, 1995, 629(3): 345-50.

[3] 卢娟, 汪晖, 卢方安. 肉桂酸对胃腺癌细胞诱导分化的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(2): 237-40.

[3] Lu J, Wang H, Lu F A. Effects of cinnamic acid on differentiation of MGC-803 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2007, 23(2): 237-40.

[4] 张赛霞, 黎晖, 陈东风. Van Gieson 胶原纤维染色方法的探索[J]. 实用医技杂志 2007, 14(12): 1580-1.

- [4] Zhang S X, Li H, Chen D F. Exploration in collagen fiber staining method by Van Gieson [J]. *J Prac Med Tech*, 2007, **14** (12): 1580-1.
- [5] David M T, Sandra A J, Natalie A S, et al. Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma [J]. *J Cell Biol*, 2004, **167** (5): 925-34.
- [6] Birbeck M S C, Symington T, Carter R L (杨简等译). 肿瘤细胞的超微结构: 肿瘤的科学基础 [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 321-6.
- [6] Birbeck M S C, Symington T, Carter R L (Translated by Yang J, et al). *The ultrastructure of tumour cells: Basic science of tumour* [M]. Beijing: Science Press, 1984: 321-6.
- [7] 龚萍, 李红霞, 张素梅. TPA 诱导人卵巢癌细胞株 skov3 分化过程中的形态和超微结构 [J]. 山东医药, 2011, **51** (24): 52-4.
- [7] Gong P, Li H X, Zhang S M. The morphology and ultrastructure of human ovarian cancer cell line skov3 during differentiation induced by TPA [J]. *Shandong Med J*, 2011, **51** (24): 52-4.
- [8] 王勇平, 欧阳元明, 蒋 珪. 成骨细胞分化及增殖调控的研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版) 2011, **31** (10): 1465-8.
- [8] Wang Y P, Ouyang Y M, Jiang Y. Research progress of regulation of osteoblast differentiation and proliferation [J]. *J Shanghai Jiao-tong Univ (Med Sci)*, 2011, **31** (10): 1465-8.
- [9] Aline B, Latifa B, Maria J, et al. Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production [J]. *J Cell Biol*, 2010, **190** (6): 1093-106.
- [10] 卢翔, 陈江宁, 张峻峰. 雷洛昔芬通过促进一氧化氮释放诱导脂肪干细胞向成骨细胞分化 [J]. 中国药理学通报, 2011, **27** (1): 24-8.
- [10] Lu X, Chen J N, Zhang J F. Raloxifene enhances osteoblastic differentiation in adipose derived stem cells via nitric oxide pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, **27** (1): 24-8.
- [11] 杨 玮, 徐道华, 周晨慧. 小檗碱对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, **26** (12): 1560-3.
- [11] Yang W, Xu D H, Zhou C H, et al. Effect of berberine on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, **26** (12): 1560-3.
- [12] Kristina K, Catherine B K, Anne M D, et al. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: Regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2009, **108** (1): 216-24.
- [13] Govoni K E, Linares G R, Chen S T, et al. T-Box 3 negatively regulates osteoblast differentiation by inhibiting expression of osteonectin and runx2 [J]. *J Cell Biochem*, 2009, **106** (3): 482-90.

Effect of cinnamic acid on proliferation and differentiation of human osteosarcoma MG-63 cells

WANG Guo-hong¹, GUO Zhi-yue¹, SHI Song-lin², LI Qi-fu²

(1. Dept of Physiology and Neurobiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang Henan 453003, China;

2. Dept of Basic Medicine, Medical College Xiamen University, Xiamen Fujian 361005, China)

Abstract: **Aim** To investigate the effect of cinnamic acid on proliferation and differentiation of human osteosarcoma MG-63 cells. **Methods** MG-63 cells were treated with cinnamic acid. The living cells were counted by trypan blue staining. The morphology and ultrastructure of MG-63 cells were studied with optical microscope and electron microscope. The changes of cell cycle were analyzed by flow cytometry (FCM). The expression of type I collagen was detected by Van Gieson staining. The formation of mineralized bone nodules was evaluated by alizarin red staining. The expressions of osteocalcin and osteonectin were detected by immunocytochemical staining. **Results** Cinnamic acid inhibited the proliferation of MG-63 cells significantly, the inhibitory rate was $54.94\% \pm 4.69\%$ after treatment with cinnamic acid for 7 days. Flow cytometry a-

nalysis showed that cinnamic acid increased the cell numbers in G_0/G_1 phase significantly ($P < 0.01$). Under optical microscope and electron microscope, the morphology and ultrastructure of MG-63 cells treated with cinnamic acid changed significantly compared with those in control group, showing the characteristics of normal cells. Furthermore, cinnamic acid promoted the expressions of osteoblast markers such as type I collagen, osteonectin and osteocalcin, increased calcium aggradation and facilitated the formation of bone nodules. **Conclusion** Cinnamic acid can inhibit the proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells and induce the differentiation of MG-63 cells into osteoblasts. **Key words:** cinnamic acid; human osteosarcoma MG-63 cells; proliferation; differentiation; osteosarcoma; osteoblasts