

· 基础研究 ·

姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制和凋亡相关基因表达的影响 *

赵振利¹ 郑燕彬¹ 陈兰英² 刘用金¹ 武福云¹ 李祺福^{1△}

(1 厦门大学 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室 福建 厦门 361005 2 河南城建学院 河南 平顶山 467044)

摘要 目的 探讨姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制及凋亡相关基因表达的影响。方法 用姜黄素处理 MG-63 细胞 细胞计数法检测细胞增殖抑制的效果 荧光染色观察细胞的凋亡 流式细胞仪(FCM)进行细胞周期时相分析 免疫细胞化学法和 Western blotting 免疫法检测细胞凋亡相关基因的表达水平。结果 随着姜黄素浓度的增加及其作用时间延长 对细胞的增殖抑制作用增强 最高抑制率可达 89.07% 光镜下可观察到细胞发生染色质浓缩 细胞核凝聚和碎裂等典型的凋亡形态学改变 FCM 检测结果显示细胞经姜黄素处理后出现明显的凋亡峰 免疫反应结果显示 凋亡相关基因 bcl-2 和 P53 表达水平降低 而 bax 和 Fas 表达水平升高。结论 姜黄素能显著抑制 MG-63 细胞增殖并可有效诱导其凋亡 其作用机制可能与 bcl-2 和 bax 二者的比值发生变化从而接受了凋亡刺激信号有关。

关键词 姜黄素 人成骨肉瘤 MG-63 细胞 细胞凋亡 bcl-2 bax

中图分类号 Q279 Q28 R730.5 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2009)12-2201-05

Effects of curcumin on anti-proliferation and expression of apoptosis interrelated gene of Human Osteosarcoma MG-63 Cells*

ZHAO Zhen-li¹, ZHENG Yan-bin¹, CHEN Lan-ying², LIU Yong-jin¹, WU Fu-yun¹, LI Qi-fu^{1△}

(1 The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2 Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467044, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulatory effect of curcumin on proliferation inhibition and apoptosis in human osteosarcoma MG-63 cells. **Methods:** MG-63 cells were treated by curcumin, and the inhibitory effect on cell proliferation was assessed by cell count. The apoptosis was inspected by fluorescent staining. The cell cycle analysis was detected by FCM. The expression level of genes related with apoptosis was observed by immunohistochemistry and western blotting immunoreaction. **Results:** The results showed that the cells growth was inhibited with the increasing of the concentration of curcumin and the elongation of the treated time, and the highest inhibition rate was 89.07%. Parts of cells presented the typical morphological changes of apoptosis: chromatin concentrated and agglutinated, cell nucleus shranked and cataclased under the microscope. The results of FCM analysis showed that curcumin could induce cells into apoptosis, which was proved by the emergence of apoptotic peak. The results of immunoreaction suggested that the expression level of bcl-2 and P53 were down-regulated and the expression level of bax and Fas were upregulated. **Conclusions:** Curcumin not only inhibited cell proliferation but also induced apoptosis of MG-63 cells, which may be related to the ratio of the expression level of bcl-2 and bax as well as reception of the signal of stimulating apoptosis.

Key words: Curcumin; Human osteosarcoma MG-63 cell; Apoptosis; bcl-2; bax

Chinese Library Classification: Q279, Q28, R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2009)12-2201-05

前言

细胞凋亡对于生物机体的正常发育和自身稳定平衡的保持起着非常重要的作用 肿瘤的发生与细胞凋亡的失衡有着密切的关系。研究肿瘤细胞的凋亡对于揭示肿瘤的发生发展及其分子机制有重要意义,是当前抗癌研究领域的一个重要方向,通过诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的重要研究途径。成骨

肉瘤细胞是起源于成骨细胞骨髓间充质干细胞、具有一定成骨细胞表型特征同时兼有肿瘤细胞恶性增殖特征的一类细胞,是成骨细胞研究的良好实验模型^[1],对其进行凋亡研究对于阐明成骨肉瘤细胞凋亡机制、探索和研究骨骼疾病有重要意义,但目前有关成骨肉瘤细胞凋亡的机制尚不明确。姜黄素(curcumin, Cur)是从姜科姜黄属植物的根茎(curcuma longa)姜黄(turmeric)中提取的一种植物多酚^[2],实验研究表明,在体外姜

* 基金项目 国家自然科学基金(30871241)

作者简介 赵振利(1979-)男,博士研究生,主要研究方向 肿瘤细胞分子生物学,

Tel: 0592-2185363, E-mail: zhaozh12006@126.com

△通讯作者 李祺福, E-mail: xhifulee@xmu.edu.cn

(收稿日期: 2009-04-28 接受日期: 2009-05-22)

黄素能诱导多种肿瘤细胞凋亡,我们实验室此前研究表明姜黄素能诱导人胃腺癌 BGC-823 细胞、人食管癌 EC9706 细胞和人永生上皮 HaCaT 细胞的凋亡^[3-5]。本研究以人成骨肉瘤 MG-63 细胞为研究对象,研究姜黄素对其增殖抑制和凋亡诱导的作用,观察细胞的形态结构变化和凋亡相关基因的表达变化,以期为人成骨肉瘤等恶性肿瘤的凋亡机制研究及对其控制和防治提供重要基础和科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

人成骨肉瘤 MG-63 细胞购自上海细胞生物所, RPMI-1640 培养基为 GIBCO 产品,小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品,姜黄素购自中国药品生物制品检定所,免疫反应实验所用一抗和二抗均为 Santa Cruz 产品,即用型 SABC (过氧化物酶)免疫组化试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和诱导处理 人成骨肉瘤 MG-63 细胞培养于 RPMI-1640 培养液中(内含 15%热灭活小牛血清和 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素, pH 7.2),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。姜黄素用二甲亚砜(DMSO)溶解, -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。取对数生长期的人成骨肉瘤 MG-63 细胞进行消化传代,接种 24 h 后,对照组细胞更换新鲜培养液,处理组更换为姜黄素处理液。

1.2.2 细胞的生长抑制实验 取对数生长期细胞,制成 5×10^4 个/mL 浓度的细胞悬液,以每瓶 2 mL 的接种量接种于一批 25 mL 培养瓶中。培养 24 h 后,对照组细胞换上新鲜培养液,处理组换上浓度分别为 5.0、7.5 和 10.0 mg/L 的姜黄素处理液。加药处理后逐日(1-7 d)取对照组和处理组细胞各 3 瓶,用台盼蓝拒染法进行活细胞计数,取其平均值,绘制细胞生长曲线。

1.2.3 细胞周期测定 收集对照组和处理组(7.5 mg/L, 3 d;下同)细胞, 0.01 mol/L PBS 重悬洗涤 3 次,每次 3 min。细胞沉淀重悬于 0.5 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液中,缓慢注入 5 mL 的 75%乙醇(冰预冷)中固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。细胞上机检测前先离心去除乙醇, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,加入不含 DNase 的 10 mg/mL RNaseA(0.01 mol/L PBS 配制)重悬细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min,离心后加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶(PI)4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min, 300 目滤网过滤,然后用流式细胞仪(Beckman 公司产品)进行细胞周期时相动力学检测。

1.2.4 光学显微镜观察 取分别长有对照组和处理组细胞的盖玻片条, 0.01 mol/L PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min; Bouin-Hollande 液中固定过夜, 70%乙醇漂洗,常规苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照。

1.2.5 Hoechst33258-PI 双染色检测细胞凋亡 取分别长有对照组和处理组细胞的盖玻片条, 0.01 mol/L PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min;加入 Hoechst33258 染液,终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 10 min,继续加入 PI 染液,终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 20 min,滴加 4%多聚甲醛(pH 7.2)室温固定 10 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;抗荧光淬灭剂封片。荧光显

微镜(Olympus BH-2)观察拍照。

1.2.6 凋亡相关基因表达产物的免疫细胞化学检测 取分别长有对照组和处理组细胞的盖玻片条, 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;丙酮 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min; 3% H_2O_2 孵育 10 min,蒸馏水冲洗, 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 5% BSA 封闭 10 min;分别滴加 bcl-2、bax、Fas 和 P53 抗体(抗体稀释 1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加生物素标记的二抗(IgG/Bio), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 SABC, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; DAB 显色剂室温显色 5~20 min;蒸馏水充分冲洗,乙醇系列脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。荧光显微镜(Olympus BH-2)观察拍照。

1.2.7 Western blotting 免疫印迹法检测凋亡相关基因表达 收集对照组和处理组细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,与 2 \times SDS 上样缓冲液 1:1 比例混合后沸水浴 5 min,高速瞬时离心后按蛋白量 10 μg 上样。15% SDS-PAGE 凝胶电泳后半干转印法转移蛋白至 PVDF 膜上。4 $^{\circ}\text{C}$ 3%BSA 封闭过夜,然后加入用 2%BSA 稀释的 bcl-2、bax、Fas 和 P53 抗体(抗体稀释 1:2000),室温条件下震荡孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入用 2%BSA 稀释的 HRP 标记的二抗(抗体稀释 1:4000),室温条件下震荡孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min; ECL 显色观察。以 β -actin 做内参照。

2 结果

2.1 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖抑制作用

细胞生长曲线测定结果显示(图 1),人成骨肉瘤 MG-63 细胞对照组细胞增殖速度较快,起始接种细胞数为 5×10^4 个/mL,连续培养至第 7 d,细胞数为 81.76×10^4 个/mL,为原来的 16.35 倍。经不同浓度的姜黄素处理后, MG-63 细胞生长分别受到不同程度的抑制。其中 5.0 mg/L 姜黄素处理 7 d,细胞数为 45.39×10^4 个/mL,原来的 9.08 倍,细胞生长抑制率高达 44.48%; 7.5 mg/L 姜黄素处理 7 d,细胞数为 20.07×10^4 个/mL,为原来的 4.01 倍,细胞生长抑制率为 75.45%,当处理至第 3 d 时,细胞计数结果为 15.93×10^4 个/mL,细胞生长抑制率为 68.56%;而经 10.0 mg/L 姜黄素处理 7 d 后,细胞数 8.94×10^4 个/mL,仅为原来的 1.79 倍,细胞抑制率高达 89.07%。由于 5.0 mg/L 姜黄素对细胞生长的抑制率相对较低, 10.0 mg/L 姜黄素对细胞生长的抑制率又太高,细胞已大量脱落,当 7.5 mg/L 姜黄素处理细胞 3 d 时细胞铺展较为明显,细胞生长受到明显抑制,此时细胞材料也可保障后续实验顺利进行,因此本研究选择 7.5 mg/L 和 3 d 作为姜黄素处理 MG-63 细胞的适宜浓度和时间。

2.2 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞周期的阻滞作用

应用流式细胞仪检测姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞周期分布的影响。经姜黄素处理后结果显示,人成骨肉瘤 MG-63 细胞在细胞周期各个阶段的分布发生了明显变化(图 2-a)。其中,姜黄素诱导 MG-63 细胞后出现了明显的凋亡峰,即 sub-G1 峰,细胞比例为 26.8%;处于 G0/G1 期的细胞比例减少,由 48.2%下降为 41.3%,降低幅度为 14.3%;其中 S 期细胞比例由

25.2%下降为 10% ,降低幅度为 60.3% ,而 G₂/M 期细胞比例减少幅度不大 ,由 25.8%下降为 21.9% ,降低幅度为 15.1%。由细胞周期柱形图可见(图 2-b) ,与对照组相比 ,姜黄素处理组细胞出现明显的凋亡峰 ,G₀/G₁ 期 ,S 期和 G₂/M 期细胞比例都下降 ,其中 S 期细胞比例减少尤为明显 ,说明姜黄素阻止了基因组 DNA 的合成 ,从而抑制了细胞的分裂增殖速度。

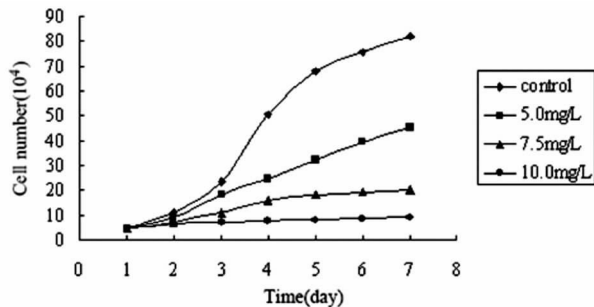


图 1 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的影响

Fig.1 The effect of curcumin on the proliferation of MG-63 cells

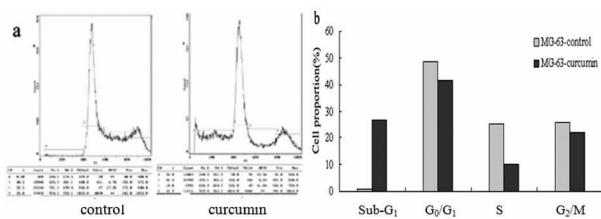


图 2 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞周期的影响

注 a ,FCM 检测 b ,柱形图分析

Fig.2 The effect of curcumin on the cell cycle of MG-63 cells

Note: a, FCM detected; b, Bar chart analyzed

2.3 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞形态的光学显微镜观察

H.E 染色结果显示人成骨肉瘤 MG-63 细胞形态不规则 ,有上皮样、圆形、梭形、三角形等形态 ,细胞表面可见短小的突起 ,细胞质少 ,细胞核均且形状不规则 ,有圆形、椭圆行和

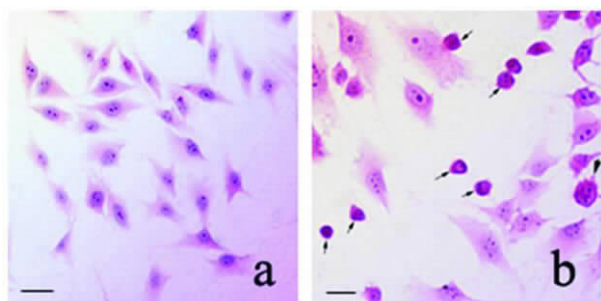


图 3 MG-63 细胞的 H.E 染色观察(Bar=40 μm)

注 a 对照组 b 处理组

Fig.3 MG-63 cells observed by HE (Bar=40 μm)

Note: a, control group; b, treated group

梭形等多种形态 ,具有核偏位 ,核内常见多个核仁 (图 3-a)。姜黄素处理后 ,可见有成群或单独存在的细胞呈现出典型的凋亡特征 ,细胞皱缩呈圆形或椭圆形 ,核染色质浓缩 ,呈紫蓝色致密的球状 ,细胞体积缩小 ,核固缩 ,深染 ,细胞嗜酸性增

强 ,细胞有出芽现象(图 3-b)。

2.4 Hoechst33258-PI 荧光染色

在荧光显微镜下 ,人成骨肉瘤 MG-63 细胞对照组细胞其核结构正常 ,荧光呈弥散、均匀分布(图 4-a)。经姜黄素处理后可见细胞凋亡现象 ,细胞核内荧光着色不均匀 ,早期凋亡细胞 ,染成蓝色 ,染色质浓缩 ,核呈固缩状 ,晚期凋亡细胞 ,被染成红色 ,可见明显的染色质凝集 ,非凋亡的死亡细胞 ,染成红色 ,核呈正常结构(图 4-b)。

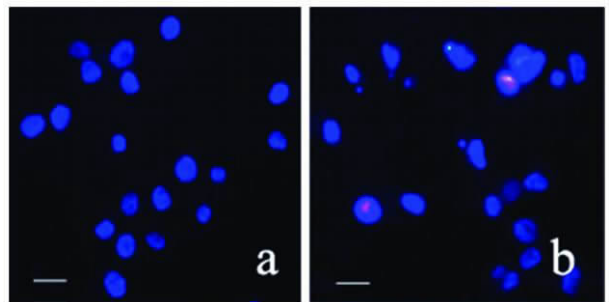


图 4 MG-63 细胞的 Hoechst 33258/PI 染色观察(Bar=40 μm)

注 a 对照组 b 处理组

Fig.4 MG-63 cells observed by Hoechst 33258/PI (Bar=40 μm)

Note: a, control group; b, treated group

2.5 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡相关基因表达的影响

SABC 免疫细胞化学方法研究人成骨肉瘤 MG-63 细胞在姜黄素处理前后凋亡相关基因表达产物变化的实验结果显示 ,对照组细胞中 bcl-2 蛋白含量较高 ,免疫显色反应呈强阳性 ,反应产物为深棕黄色颗粒 ,大量分布于细胞质和细胞核内 ,分布较为致密(图 5-a)。经姜黄素处理后 ,细胞内 bcl-2 蛋白呈弱阳性表达 ,反应产物为黄色 ,其细胞质内分布有所减少 ,细胞核内分布减少更为明显(图 5-b)。

对照组细胞中 bax 蛋白免疫显色反应呈弱阳性 ,反应产物为浅黄色颗粒 ,主要分布于核周边胞质区域 ,细胞质其它区域分布相对较少 ,细胞核内几乎不见分布(图 6-a)。经姜黄素处理后细胞中 bax 蛋白表达量明显上升 ,反应产物为深棕黄色颗粒 ,表达产物分布由核周边胞质区域向远离核区域变化 (图 6-b)。

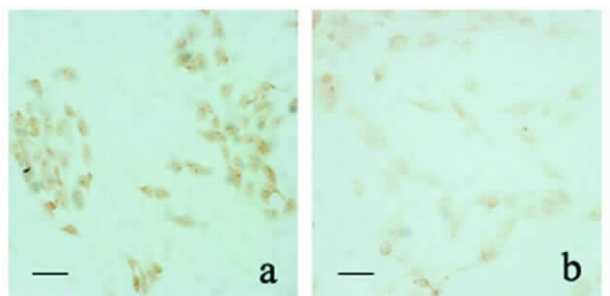


图 5 MG-63 细胞内 bcl-2 蛋白表达(Bar=40 μm)

注 a 对照组 b 处理组

Fig.5 The expression of bcl-2 in MG-63 cells (Bar=40 μm)

Note: a, control group; b, treated group

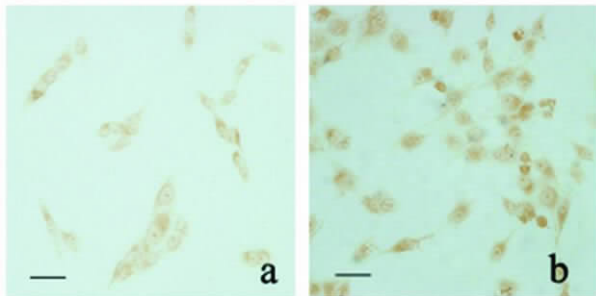


图 6 MG-63 细胞内 bax 蛋白表达(Bar=40 μm)
注 a 对照组 b 处理组

Fig.6 The expression of bax in MG-63 cells (Bar=40 μm)

Note: a, control group; b, treated group

Fas 蛋白在对照组细胞中表达较弱,免疫显色反应呈弱阳性,反应产物为浅黄色颗粒,主要分布于细胞核和核周边细胞质区域(图 7-a)。姜黄素诱导处理可显著促进细胞中 Fas 蛋白表达,其免疫细胞化学显色反应为强阳性,反应产物为深黄色颗粒,主要分布于细胞核和核周边细胞质区域(图 7-b)。

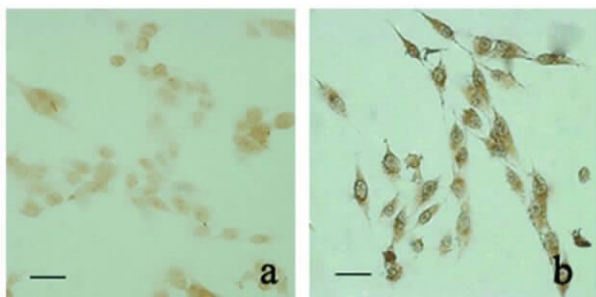


图 7 MG-63 细胞内 Fas 蛋白表达(Bar=40 μm)
注 a 对照组 b 处理组

Fig.7 The expression of Fas in MG-63 cells (Bar=40 μm)

Note: a, control group; b, treated group

对照组细胞 P53 蛋白免疫显色反应呈强阳性,反应产物为深棕色颗粒,主要分布于细胞核和核周边细胞质区域,细胞质其它区域分布相对较少(图 8-a)。经姜黄素处理后细胞中 P53 蛋白表达量明显下降,免疫细胞化学反应为弱阳性,浅黄色反应产物均匀分布于核周边细胞质区域,细胞核内仅有少量分布(图 8-b)。

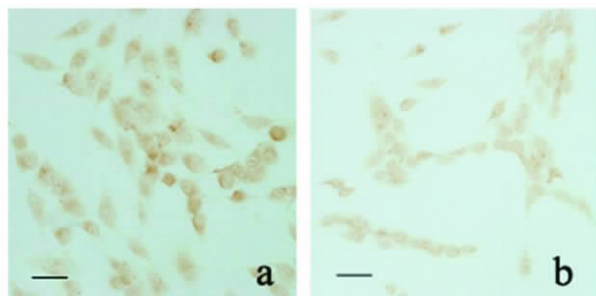


图 8 MG-63 细胞内 P53 蛋白表达(Bar=40 μm)
注 a 对照组 b 处理组

Fig.8 The expression of P53 in MG-63 cells (Bar=40 μm)

Note: a, control group; b, treated group

2.6 免疫印迹法结果分析

Western blotting 免疫印迹分析姜黄素处理人成骨肉瘤 MG-63 细胞后凋亡相关基因的表达情况。结果(图 9)显示细胞经姜黄素处理后,凋亡相关基因的表达发生了变化,其中 bcl-2 蛋白(25 KDa)表达水平下降,而 bax 蛋白(23 KDa)表达水平显著增强,此外姜黄素提高了 Fas 蛋白(48 KDa)的表达水平,而降低了 P53 蛋白(53 KDa)的表达水平。即人成骨肉瘤 MG-63 细胞经姜黄素诱导凋亡后,bcl-2 和 P53 蛋白表达水平减弱,而 bax 和 Fas 蛋白表达水平增强。

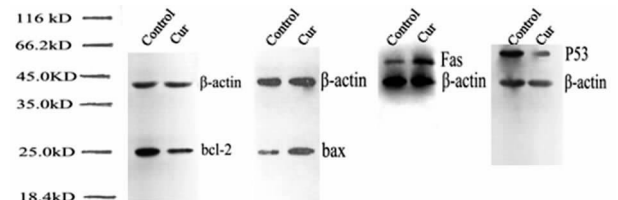


图 9 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞相关凋亡基因表达的影响

Fig.9 Effects of curcumin on the expression of interrelated apoptosis gene in the MG-63 cells

3 讨论

3.1 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制的影响

对细胞增殖活动的抑制和周期调控的考察是鉴定外源性物质诱导细胞凋亡的一项主要指标^[6]。本文研究发现用姜黄素处理人成骨肉瘤 MG-63 细胞后,随着姜黄素浓度的增大和处理时间的延长,细胞增殖受到了不同程度地抑制,其中细胞生长抑制率最高达到 89.07%。细胞周期各时相的细胞比例发生了显著的变化。细胞周期中出现了明显的凋亡峰,即 sub-G1 峰,细胞比例高达 26.8%,G0/G1 期、S 期和 G2/M 期细胞比例都下降,其中 S 期细胞比例减少尤为明显,由 25.2%下降为 10%,降低幅度为 60.3%,表明姜黄素阻止了基因组 DNA 的合成,从而抑制了细胞的分裂增殖速度。实验结果表明,姜黄素诱导处理 MG-63 细胞的增殖受到了显著抑制,细胞周期在 S 期受到阻滞,出现明显的 sub-G1 凋亡峰。这一结果与本实验室研究人胃腺癌 BGC-823 细胞、人食管癌 EC9706 细胞和人永生化上皮细胞 HaCaT 细胞凋亡时观察到的细胞增殖及周期变化相一致^[3-5];同时也与 Radhakris-hna 和谢红等人用姜黄素处理人肺腺癌细胞、人白血病 K562 细胞时观察到的细胞增殖抑制和细胞周期阻滞结果相似^[7,8]。由此表明,姜黄素能显著地抑制人成骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖活动,阻滞细胞周期的运转,诱导细胞凋亡。

观察和鉴定诱导凋亡处理前后细胞形态特征的变化,是判断细胞是否凋亡的一个重要指标,其中涉及细胞固缩、染色质凝集、边缘化、细胞核碎裂等一系列形态变化特征^[9-10]。本文观察结果显示,人成骨肉瘤 MG-63 细胞具有典型的肿瘤细胞形态结构特征,细胞群体排列不规则,细胞形态多样,细胞核形状不规则,核内常见多个核仁。经姜黄素处理后,人成骨肉瘤 MG-63 细胞核染色深,核仁减少,有些细胞可见明显的致密核,胞膜皱缩但完整,呈现出细胞凋亡的典型变化特征。本文研究观察到的 MG-63 细胞的形态结构变化不仅与本实验室诱导人

胃腺癌 BGC-823 细胞凋亡时观察到的结果相一致^[11],也与前人用姜黄素诱导处理人肝癌 HepG-2 细胞凋亡时的报道相类似^[12]。由此说明姜黄素具有诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的生物学效应。

3.2 人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡过程中凋亡相关基因的表达变化

细胞凋亡过程中涉及到凋亡相关基因 bcl-2、bax、Fas 和 P53 的表达水平的变化,其表达异常往往引起细胞的凋亡异常,因此验证其表达水平的变化可阐释细胞凋亡的分子机制。本文免疫细胞化学研究结果显示,用姜黄素处理 MG-63 细胞后 bax 蛋白和 P53 蛋白表达增强,而 bcl-2 蛋白和 Fas 蛋白表达减弱;Western blotting 分析结果也表明 MG-63 细胞利用姜黄素处理后 bax 蛋白表达升高,bcl-2 蛋白表达降低,同时姜黄素能够上调 Fas 蛋白的表达水平,下调 P53 蛋白的表达水平。实验结果与我们诱导人胃腺癌 BGC-823 细胞凋亡时观察到的结果相一致^[3],也与王晶华、丁勇和鲍娟等人研究人胃癌 SGC-7901 细胞、成骨肉瘤细胞和海马神经元凋亡时的结果相类似^[13-15]。本文的 Western blotting 免疫研究结果进一步确证了免疫细胞化学的实验结果,即 MG-63 细胞用姜黄素处理后凋亡相关基因 bcl-2、bax、Fas 和 P53 表达发生了明显变化,这些变化可能导致线粒体膜通透性增加,从而使细胞色素 C 等促凋亡因子释放到胞浆中,引发下游的信号转导,通过线粒体凋亡通路诱导细胞凋亡。

4 结论

综上所述 本研究结果充分证实了姜黄素能有效抑制人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖并诱导其凋亡,并验证了凋亡细胞形态特征的典型变化和凋亡相关基因表达产物的变化。这些凋亡相关基因表达变化的实验结果为人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡机理的研究以及相关骨骼疾病防治研究工作提供重要基础和进一步实验研究的方向。

参考文献(References)

[1] 郭卫, Healey JH. 骨肉瘤成骨细胞表型与临床因素的相关研究[J]. 中华骨科杂志, 2002, 22(7):410-413
Guo Wei, Healey JH. The relationship between osteoblastic phenotype and clinical issues in osteosarcoma [J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 2002, 22(7):410-413

[2] Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of curcuma longa [J]. Planta Med, 1991, 57 (1):1-7

[3] 李鹏, 李祺福, 石松林, 等. 牡蛎天然活性肽对人胃腺癌 BGC-823 细胞周期调控与基因表达的调控 [J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26 (3):1-8
Li Peng, Li Qi-fu, Shi Song-lin, et al. Regulation of bioactive peptides of oyster (BPO) on the cell cycle and gene expression of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 [J]. Chin J Mar Drugs, 2007, 26(3):1-8

[4] 陈兰英, 杨海波, 李祺福, 等. 姜黄素对人食管癌 EC 9706 细胞凋亡的诱导作用[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(9):1601-1604
Chen Lan-ying, Yang Hai-bo, Li Qi-fu, et al. A poptosis ofH um an EsophagealC arcinom a C ellLine EC 9706 Induced by C urcumin[J].

Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(9):1601-1604

[5] 杨海波, 李祺福, 李钟洙, 等. 姜黄素对人永生上皮细胞 HaCaT 细胞凋亡的诱导作用[J]. 解剖学报, 2009, 40(2):64-68
Yang Hai-bo, Li Qi-fu, Li Zhong-zhu, et al. Apoptosis of Immortalized Human Epithelial Cell Line HaCaT Induced by Curcumin [J]. Acta Anatomica Sinica, 2009, 40(2):64-68

[6] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide [J]. Science, 1995,267 (5203): 1445-1449

[7] Radhakrishna PG, Srivastava AS, Hassanein TL. Inhibition of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin [J]. Cancer Lett, 2004, 208 (2):163-170

[8] 谢红, 姚丽, 陈立军, 等. 青蒿素诱导人白血病细胞 K562 凋亡的线粒体机制[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(1):27-29
Xie Hong, Yao Li, Chen Li-jun, et al. Mitochondrial Mechanisms of Apoptosis Induced by Artemisinin in Human Leukemia K562 Cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(1):27-29

[9] Hunot S, Flavell RA. Apoptosis. Death of a monopoly? [J]. Science, 2001, 292 (5518):865-6

[10] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death:critical control points [J]. Cell, 2004, 116 (2):205-219

[11] 李鹏, 李祺福, 黄大川, 等. 僧帽牡蛎天然活性多肽 BPO-1 抗人胃腺癌 BGC-823 细胞活性研究 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2002, 41(5):618-622
Li Peng, Li Qi-fu, Huang Da-chuan, et al. The Research of Isolation Bioactive Peptides from Saccostrea Cucullata and Biological Effects on the Human Gastric Adenocarcinoma BGC-823 Cells[J]. Journal of Xiamen University(Natural Science), 2002, 41(5):618-622

[12] 王威, 贺红光, 范丽, 等. 姜黄素对人肝癌细胞株 HepG-2 生长及超微结构的影响 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2005, 34(3): 323-325
Wang Wei, He Hong-guang, Fan Li, et al. Effect of Curcumin on Growth and Ultrastructure of Human Hepatocarcinoma Cell Line HepG-2 [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong,2005, 34 (3): 323-325

[13] 王晶华, 周景华, 李喜伟, 等. 金雀异黄素合成产物诱导人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡的体外研究 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2265-2266
Wang Jing-hua, Zhou Jing-hua, Li Xi-wei, et al. A Study on Synthetic Genistein in Inducing Gastric Cancer SGC-7901 Apoptosis in Vitro[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(12):2265-2266

[14] 丁勇, 范清宇, 张殿忠, 等. 紫杉醇诱导成骨肉瘤细胞凋亡[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(13) ;1-3
Ding Yong, Fan Qing-yu, Zhang Dian-zhong, et al. Paclitaxelinduced Apoptosis in Human Osteosarcoma Cell Line [J]. China Journal of Modern Medicine, 2002, 12(13) ;1-3

[15] 鲍娟, 杨期东, 罗红波. A β_{1-42} 注射后大鼠海马神经元凋亡及线粒体凋亡途径相关蛋白表达变化的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(2):246-248
Bao Juan, Yang Qi-dong, Luo Hong-bo. Study on Apoptosis of Neurons in Rat Hippocampus and Expression of Related Proteins in Path of Mitochondrion after Injection of A β_{1-42} [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(2):246-248