

• 药理 •

褪黑素对人骨肉瘤细胞 p53、c-Myc 表达的影响

林 晋¹, 唐风华¹, 黄铭珊¹, 许 颖¹, 黄志鸿^{2*} (1. 福建卫生职业技术学院基础部, 福建福州 350101; 2. 福建医科大学公共技术中心, 福建福州 350122)

摘要:目的 研究褪黑素对人骨肉瘤 MG63、U2 细胞 p53、c-Myc 基因表达的调控。方法 体外培养 MG63、U2 细胞 $4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑素干预 24h, 实时荧光定量 PCR 及免疫印迹法检测 p53 及 c-Myc 基因表达情况。结果 褪黑素作用后, U2 细胞上调 p53 基因表达 ($P < 0.05$); MG63、U2 细胞下调 c-Myc 蛋白水平表达 ($P < 0.05$)。结论 褪黑素可能通过上调 p53 基因及下调 c-Myc 蛋白表达促进骨肉瘤细胞凋亡。

关键词: 褪黑素; 骨肉瘤; p53; c-Myc; 实时荧光定量 PCR; 免疫印迹法

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2020)-06-03082-0006-04

Effects of Melatonin on the expression of p53 and c-Myc in Human Osteosarcoma Cells

LIN Jin¹, TANG Feng-hua¹, HUANG Ming-shan¹, XU Ying¹, HUANG Zhi-hong^{2*} (1. Department of Basic Subjects, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China; 2. Public technology service center, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To research the regulation of melatonin on the expression of p53 and c-Myc genes in human osteosarcoma MG63 and U2 cells. **METHODS** MG63 and U2 cells were cultured in vitro and treated with $4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ melatonin for 24h. The expression of p53 and c-Myc gene were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and western blot. **RESULTS** After the treatment of melatonin the expression of p53 gene in U2 cells increased significantly ($P < 0.05$) and the expression of c-Myc protein in MG63 and U2 cells significantly decreased ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Melatonin may promote the apoptosis of osteosarcoma cells by up-regulating the expression of p53 gene and down-regulating the expression of c-Myc protein.

KEY WORDS: Melatonin; Osteosarcoma; p53; c-Myc; Real-time fluorescent quantitative PCR; Western blot

骨肉瘤是骨组织的恶性肿瘤, 常见于青少年, 传统手术联合化疗(阿霉素、顺铂、甲氨蝶呤), 治愈率可达 70%。然而, 骨肉瘤转移及复发患者的生存率却一直没有发生明显变化, 总体 5 年生存率约为 20%^[1]。目前, 骨肉瘤的免疫与基因疗法为人们所关注, 逐渐成为研究的方向与热点, 希望减少骨肉瘤的复发转移, 提升骨肉瘤患者的生存率。

p53 是常见的肿瘤相关因子, 分为野生型和突变型, 野生型 p53 基因是细胞凋亡的调控因子, 控制细胞的凋亡, 从而抑制肿瘤的增殖^[2,4]。c-Myc 是癌基因 myc 家族的重要成员, 与

肿瘤细胞增殖密切相关, 在正常机体中表达量极低, 其蛋白量高表达与机体多种恶性肿瘤发展相关。褪黑素是由松果体分泌的一种神经激素, 具有抗氧化、抗炎、免疫调节及抗肿瘤等多种功能。本课题组前期研究结果表明褪黑素可以抑制人骨肉瘤 MG63、U2 细胞增殖^[5,6], 其上调 p53 基因、下调 c-Myc 表达可能是抑制小鼠前胃癌 MFC 细胞增殖的可能机制^[7]。那么, 褪黑素抑制骨肉瘤细胞的增殖的机制是否也与 p53 及 c-Myc 基因表达相关, 尚未见相关研究报道。众所周知, MG63 为 p53 缺陷型人骨肉瘤细胞, 而 U2 为 p53 野生型人骨肉瘤细胞^[8], 那么褪黑素对骨肉瘤细胞的作用是否依赖于 p53 基因, 决定了褪黑素应用于骨肉瘤辅助治疗的可行性。本研究将体外培养骨肉瘤 MG63、U2 细胞, 褪黑素进行干预, 进一步研究褪黑素对人骨肉瘤细胞 p53 及 c-Myc 基因表达的影响, 进而完善褪黑素的抗肿瘤机制, 为骨肉瘤的免疫治疗提供新思路。

1 材料与与方法

1.1 培养人骨肉瘤细胞株 MG63、U2 培养人骨肉瘤细胞株

作者简介: 林 晋, 女(1980-), 毕业于福建医科大学, 讲师, 从事病理学相关研究。

通讯作者: 黄志鸿。

基金项目: 福建省中青年教育科技项目资助(JAT160796); 福建省中青年教育科技项目资助(JAT180162); 福建卫生职业技术学院“课程思政”试点建设项目(SZ2019013); 福建省卫生职业技术学院课题(2016-2-2)

MG63、U2(中国科学院上海生命科学研究院)培养基分别为含10%胎牛血清(Gibco, Invitrogen公司)的MEM及DMEM(Hyclone)。当细胞融合至80%左右(约2天左右),用0.25%胰酶消化90sec传代,置于37℃、5% CO₂、100%湿度细胞培养箱中,细胞呈贴壁生长。

1.2 褪黑素干预人骨肉瘤细胞株 MG63、U2 褪黑素(Sigma公司, MV232.2)称取0.0464g,用1mL无水乙醇完全溶解,用0.22m滤过膜滤过除菌,配成0.2mol·L⁻¹母液,于-80℃冰箱保存。

两种骨肉瘤细胞均分为褪黑素处理组及阴性对照组。取对数生长期的MG63细胞以6×10⁵/板的密度接种于6cm板,培养至80%融合时,用经CCK8和流式细胞术检测作用显著的4mmol·L⁻¹褪黑素作用24h为褪黑素处理组⁽⁵⁾,用含等体积无水乙醇的MEM培养基作用24h为阴性对照组。取对数生长期的U2细胞以8×10⁵/板的密度接种于6cm板,培养至80%融合时,用经CCK8和流式细胞术检测作用显著的4mmol·L⁻¹褪黑素作用24h为褪黑素处理组⁽⁶⁾,用含等体积无水乙醇的DMEM培养基作用24h为阴性对照组。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测两种细胞 c-Myc mRNA、U2 细胞 p53 mRNA 表达 各组细胞分别吸出培养液,加入Trizol(美国Invitrogen公司)1mL裂解细胞,加入氯仿0.2mL剧烈震荡,静置,离心后吸取上层RNA,先后两次分别加入等体积异丙醇及75%乙醇1mL,洗涤纯化,溶于RNase-Free的DEPC水中。

测RNA浓度,取RNA 1g,分别用PrimeScript™ RT Reagent Kit(日本TaKaRa宝生物公司)试剂盒逆转录为cDNA。c-Myc、p53和GAPDH的序列如下:

c-Myc F: 5'-AATGAAAAGGCCCCCAAGGTAGTTATCC-3' R: 5'-GTCGTTTCGCAACAAGTCCTCTTC-3';

p53 F: 5'-GTTCCGAGAGCTG AATGAGG-3' R: 5'-TTATGGCGGGAGGTAGACTG-3';

GAPDH F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', R: 5'-AGCTCAGGGATGACCTTGCC-3'。

PCR管中先后加入2×SYBR Premix Ex Taq™ 10μL、ddH₂O 6.8μL、cDNA模板2μL、引物对0.8L、50×ROX Reference Dye I 0.4μL(日本TaKaRa宝生物公司),总体积共20μL。混匀后置于荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。按以下条件进行扩增:95℃预变性2min,95℃变性15s,60℃延伸30s,共50个循环。用相对定量方法进行分析:依照公式ΔΔCt=(Ct目的基因-Ct内参基因)实验组-(Ct目的基因-Ct内参基因)对照组,算出2-ΔΔCt值,进行统计学分析。

1.4 免疫印迹法检测两种骨肉瘤细胞 c-Myc 蛋白、U2 细胞 p53 蛋白的表达 两种骨肉瘤细胞的实验组与对照组分别提取胞质蛋白,并测蛋白浓度。取蛋白质样品20μg进行SDS-PAGE电泳,转移至硝酸纤维素膜,用5%脱脂牛奶在室温下封闭1h后,用TBST缓冲液漂洗3次,每次10min。加入一抗:兔抗人多克隆抗体(anti-c-Myc 1:1000稀释; anti-p53 1:2000稀释; Abcam) 4℃孵育过夜。TBST漂洗3次,每次10min。

加入羊抗兔辣根过氧化物标记的二抗(1:1000稀释,碧云天),37℃摇床温育1h, TBST漂洗3次,每次10min。用Easy-See Western Blot Kit进行化学发光,G:BOX多功能荧光凝胶成像仪进行曝光,曝光3次,每次30s。分析条带灰度值(Quantityone(Bio-Rad)软件)进行统计学分析。

1.5 统计学分析 采用SPSS 19.0软件,实时荧光定量PCR检测结果计算出的2-ΔΔCt值用单样本t检验,免疫印迹检测蛋白水平变化的数据用独立样本t检验,均以P<0.05为差别有统计学意义。

2 实验结果

2.1 褪黑素对 MG63 及 U2 细胞 c-Myc mRNA 表达的影响 如图1所示,实时荧光定量PCR的检测结果表明,4mmol·L⁻¹褪黑素作用24h后,与阴性对照组相比, MG63及U2细胞c-Myc基因在mRNA水平表达量未见明显改变,差别无统计学意义(P>0.05)。

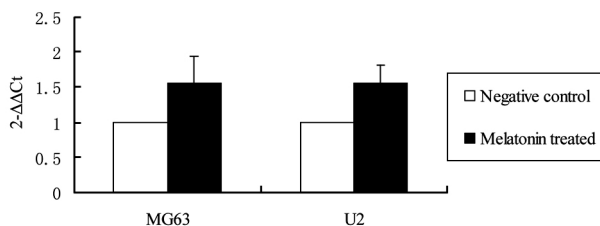


图1 褪黑素对 MG63 及 U2 细胞 c-Myc mRNA 表达的影响

2.2 褪黑素对 U2 细胞 p53 mRNA 表达的影响 如图2所示,实时荧光定量PCR的检测结果表明,4mmol·L⁻¹褪黑素作用24h后,与阴性对照组相比,U2细胞p53基因在mRNA水平表达量明显增高,且差别具有统计学意义(P<0.05)。

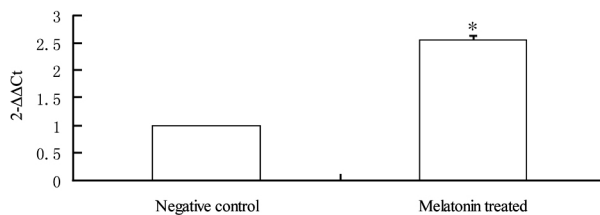


图2 褪黑素对 U2 细胞 p53 mRNA 表达的影响

* : P<0.05 vs the Negative control group

2.3 褪黑素对 MG63、U2 细胞 c-Myc 蛋白表达的影响 如图3所示,免疫印迹法检测结果表明:4mmol·L⁻¹褪黑素干预24h后,与阴性对照组相比, MG63及U2细胞c-Myc基因在蛋白水平表达量均明显减少,差别有统计学意义(P<0.05)。

2.4 褪黑素对 U2 细胞 p53 蛋白表达的影响 如图4所示,免疫印迹法检测结果表明:4mmol·L⁻¹褪黑素组作用24h后,与阴性对照组相比,U2细胞p53基因在蛋白水平上表达明显增加,差别有统计学意义(P<0.05)。

3 讨论

p53属于肿瘤相关基因,其编码一种转录因子,使参与转录的下游靶基因失活,通过细胞凋亡、细胞周期阻滞^(3,9)等途径,从而抑制肿瘤增殖与转移,分为野生型和突变型两种。其中野生型为抑癌基因,抑制肿瘤增殖;突变型即p53基因失

活,抑制肿瘤细胞凋亡,进而导致多种肿瘤的发生。p53 的失活,激活了大量趋化因子和白细胞介素的表达,促进血管生成、侵袭和转移^(10,11)。

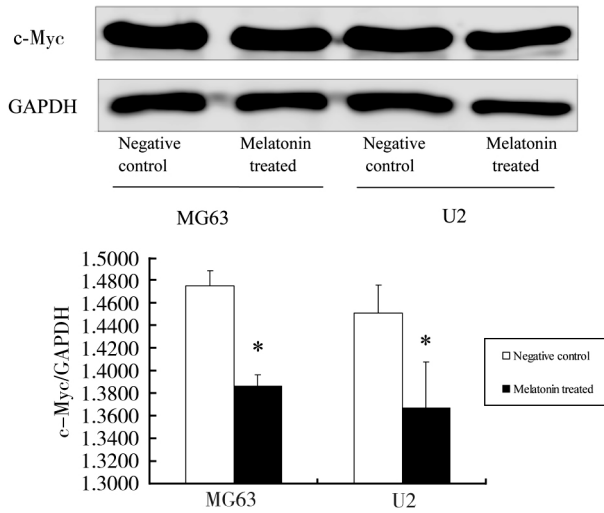


图3 褪黑素对 MG63 及 U2 细胞 c-Myc 蛋白表达的影响
* P < 0.05 vs the Negative control group

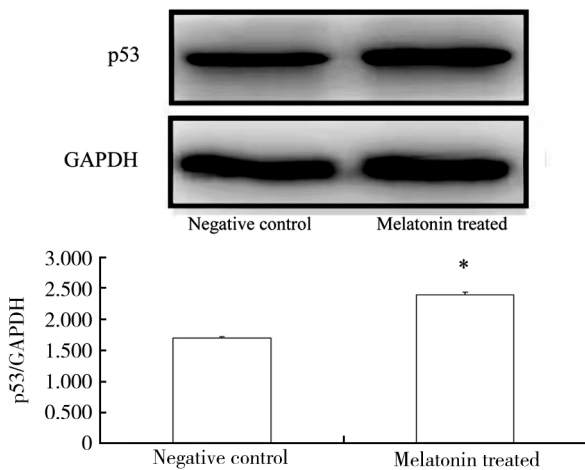


图4 褪黑素对 U2 细胞 p53 蛋白表达的影响
* P < 0.05 vs the Negative control group

MG63 即为 p53 缺陷型骨肉瘤细胞,而 U2 为 p53 野生型骨肉瘤细胞。本课题组前期研究表明,褪黑素可以抑制 MG63 及 U2 细胞增殖,并使其细胞周期阻滞在 G2/M 期^(5,6)。本研究结果表明,4mmol · L⁻¹ 褪黑素组作用 24h 后,与阴性对照组相比,褪黑素作用可以上调骨肉瘤 U2 细胞 p53 基因的表达。目前已有多项研究表明,褪黑素诱导前胃癌 MFC 细胞、肝癌 HepG2 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞等凋亡的可能途径是通过上调 p53 基因的表达^(7,12,13)。Kim CH 等研究也发现褪黑素作用可以通过上调 p53 蛋白表达诱导前列腺癌 LN-Cap 细胞凋亡,而其促凋亡的途径呈 p53 依赖性⁽¹⁴⁾。由此可见,对于 p53 野生型骨肉瘤 U2 细胞,通过上调其 p53 基因在 mRNA 及蛋白水平上的表达,可能也是褪黑素抑制其增殖的

途径。

然而约有 50% 以上的骨肉瘤病人,位于染色体 17p13 区的抑癌基因 p53 出现变异,由于 p53 信号的复杂性,因此,褪黑素对骨肉瘤细胞的抑制作用是否呈 p53 基因,决定了其在临床应用的广泛性。相关研究表明,诱导凋亡的过程中,c-Myc 和 p53 具有协同作用,在许多肿瘤中,c-Myc 的高表达和 p53 功能缺失同存在^(15,16)。Myc 是一种原癌基因,在人类肿瘤中广泛表达,其蛋白是一种转录因子,参与调节细胞生长增殖、细胞周期、转录分化、凋亡等,包括 c-Myc、N-myc 和 L-Myc,其中 c-Myc 与肿瘤的增殖与凋亡密切相关⁽¹⁷⁾。有研究结果表明,c-Myc 在骨肉瘤的复发及转移灶中表达明显增高,其高表达与在骨肉瘤的复发和转移密切相关⁽¹⁸⁾。由此可见,降低 c-Myc 表达,从而抑制骨肉瘤增殖,对于减少骨肉瘤的复发与转移意义重大。

本研究结果表明,4mmol · L⁻¹ 褪黑素组作用 24h 后,与阴性对照组相比,MG63 及 U2 细胞的 c-Myc 基因在 mRNA 水平上表达无明显改变,而在蛋白水平上表达明显降低,改变具有统计学意义。有研究表明,褪黑素通过激活 MT1,可以抑制脑肿瘤干细胞 X02 中 c-Myc、nestin 基因表达和组蛋白甲基化来抑制其增殖,并促进紫杉醇在 X02 细胞中的抗癌作用⁽¹⁹⁾。因此抑制 c-Myc 基因的表达可能是褪黑素抑制肿瘤细胞增殖的一种机制。Xie 等构建表达反义 c-Myc 片段的重组腺病毒 (Myc-AS) 转染 MG-63 细胞,发现 Myc-AS 可诱导 MG63 细胞周期发生 G2/M 期阻滞⁽²⁰⁾。可见,褪黑素抑制骨肉瘤 MG63 及 U2 细胞增殖,并使其细胞周期阻滞在 G2/M 期,可能是通过下调 c-Myc 基因蛋白水平的表达。而褪黑素作用后 c-Myc 基因 mRNA 水平没有明显变化,可能是褪黑素的调控作用发生在 c-Myc 基因从 mRNA 翻译成蛋白的过程,如转录后加工、转录产物降解、翻译、翻译后加工及修饰等几个层面,具体有待于进一步研究。

本课题组前期研究也表明,褪黑素抑制骨肉瘤细胞 MG63 及 U2 增殖还可以通过上调 Fas 蛋白表达,使细胞周期阻滞在 G2/M 期,启动细胞凋亡程序,发挥其抗肿瘤作用。因此褪黑素对骨肉瘤细胞的抑制作用不依赖于 p53 基因,具有良好的应用前景,其具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- (1) Meyers PA, Healey JH, Chou AJ, et al. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma (J). Cancer 2011, 117 (8): 1736-1744.
- (2) Hejnold M, Dyduch G, Biatas M, et al. Selected morphologic features influencing the prognosis of conventional renal cell carcinomas co-expressing P53 and MDM2 (J). Pol J Pathol 2014, 65(1): 29-33.
- (3) Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unraveling mechanisms of p53-mediated tumor suppression (J). Nat. Rev. Cancer, 2014, 14(5): 359-370.
- (4) Anderson K, Williams EM, Kaplan J, et al. Utility of immunohistochemical markers in irradiated breast tissue: an analysis of the role of myo-epithelial markers, p53, and Ki-67 (J). Am J Surg Pathol 2014, 38 (8): 1128-1137.
- (5) 黄宇, 林晋, 周瑞祥, 等. 褪黑素诱导人骨肉瘤 MG63 细胞凋亡

- (J). 解剖学杂志 2014 37(5): 585-589.
- (6) 林晋, 黄宇, 林国威, 等. 褪黑素抑制人骨肉瘤 U2 细胞增殖及其机制 (J). 中国组织化学与细胞化学杂志 2015 24(1): 43-49.
- (7) 官喜. 褪黑素对小鼠胃癌 c-Myc、p53 表达的影响 (D). 福建医科大学: 神经生物学 2012.
- (8) Novello C, Pazzaglia L, Conti A, et al. p53-dependent activation of microRNA-34a in response to etoposide-induced DNA damage in osteosarcoma cell lines not impaired by dominant negative p53 expression (J). PLoS One 2014 9(12): e114757.
- (9) Brady CA, Jiang D, Mello SS, et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression (J). Cell 2011 145(4): 571-583.
- (10) Buganim Y, Solomon H, Rais Y, et al. p53 regulates the Ras circuit to inhibit the expression of a cancer-related gene signature by various molecular pathways (J). Cancer Res 2010 70: 2274-2284.
- (11) Solomon H, Brosh R, Buganim Y, et al. Inactivation of the p53 tumor suppressor gene and activation of the Ras oncogene: cooperative events in tumorigenesis (J). Discov Med 2010 9: 448-454.
- (12) Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, et al. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line (J). J Pineal Res 2008 45(4): 532-540.
- (13) Cos S, Mediavilla MD, Fernández R, et al. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro (J). J Pineal Res 2002 32(2): 90-96.
- (14) Kim CH, Yoo YM. Melatonin Induces Apoptotic Cell Death via p53 in LNCaP Cells (J). Korean J Physiol Pharmacol 2010 14(6): 365-369.
- (15) Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc (J). Proc Natl Acad Sci USA 1993 90(16): 7804-7808.
- (16) Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53 (J). Science 1994 265(5181): 2091-2093.
- (17) Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer (J). Semin Cancer Biol 2006 16(4): 318-330.
- (18) Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, et al. C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression (J). Oncology 1998 55(6): 556-563.
- (19) Lee H, Lee HJ, Jung JH, et al. Melatonin disturbs SUMOylation-mediated crosstalk between c-Myc and nestin via MT1 activation and promotes the sensitivity of paclitaxel in brain cancer stem cells (J). J Pineal Res 2018 65(2): e12496.
- (20) Xie XK, Yang DS, Ye ZM, et al. Enhancement effect of adenovirus-mediated antisense c-myc and caffeine on the cytotoxicity of cisplatin in osteosarcoma cell lines (J). Chemotherapy 2009 55(6): 433-440.

南非叶总黄酮的体外抗肿瘤活性研究

叶雅沁¹, 李泳宁¹, 李小芬¹, 潘大仁^{2*} (1. 福建卫生职业技术学院, 福建福州, 350101; 2. 福建农林大学, 福建福州, 350002)

摘要: 目的 以食管癌细胞为主, 全方位的探究南非叶总黄酮的体外抗肿瘤作用。方法 以人胃癌细胞、人食管癌细胞、人肝癌细胞以及人乳腺癌细胞为对象, 采用 CCK8 法检测南非叶总黄酮对上述细胞增殖抑制活性, 观察细胞所呈现出的形态, 采用 CCK8 法评价南非叶总黄酮对食管癌细胞 (ECA109) 的影响, 并采用流式细胞法检测细胞凋亡情况。结果 南非叶总黄酮可以显著的抑制人食管癌 ECA109 细胞增殖, 同时还呈现出量效及时效关系, 当南非叶总黄酮浓度为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 持续 72h 作用, 抑制率极限情况下可以达到 86.9%; 通过荧光倒置显微镜进行观察后可以发现, 细胞有着相对更少的数量, 细胞质表现出回缩; 流式细胞法检测显示, G_0/G_1 期基因组有着相对更少的水平, S 期与 G_2/M 期基因组有着相对更高的水平。结论 南非叶总黄酮在体外对食管癌 ECA109 细胞具有较强的抑制作用, 可诱导细胞凋亡。

关键词: 南非叶; 总黄酮; 抗肿瘤; 食管癌细胞

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2020)-06-12023-0009-04

The Anti-tumor Activity of Total Flavonoids from Bitter Leaf in Vitro

YE Ya-qin¹, LI Yong-ning¹, LI Xiao-fen¹, PAN Da-ren^{2*} (1. Fujian health college, Fuzhou 350101, China; 2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the anti-tumor activity of total flavonoids of Bitter Leaf on esophageal cancer cell (ECA109). **METHODS** CCK8 was used to detect the proliferation inhibitory activity of Bitter leaf total fla-

作者简介: 叶雅沁, 女 (1982-), 学历: 硕士。职称: 实验师。研究方向: 天然药理学。E-mail: 846564653@qq.com

通讯作者: 潘大仁, 男 (1949-), 职称: 教授。研究方向: 生物技术研究。E-mail: pdr8598@163.com

基金项目: 福建省教育厅中青年教师教育科研项目 (编号: JAT191291) 福建卫生职业技术学院院级科技项目 (编号: 2018-3-3)