

## 槐耳清膏在体外抑制人成骨肉瘤 Saos-2 细胞相关实验研究

何 旭<sup>1</sup>, 公伟勋<sup>1</sup>, 王雁冰<sup>2</sup>, 周 晶<sup>3</sup>, 王立春<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院骨科, 哈尔滨 150086; 2. 吉林大学第二医院骨科, 长春 130000;  
3. 吉林普济医院电诊科, 长春 130000)

**摘要:**目的 探讨槐耳清膏抑制人成骨肉瘤 Saos-2 的作用效果和机制。方法 对数期生长人成骨肉瘤 Saos-2 细胞分为槐耳清膏 2、8、16 g/L 组和空白对照组, 分别采用槐耳清膏 2、8、16 g/L 和生理盐水进行处理, 分别于处理 12、24、36 h 后, 采用 MTT 法检测各组肿瘤细胞体外增殖情况, 采用 RT-PCR 法检测各组肿瘤细胞趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 基因表达情况, 采用 Western blot 检测各组肿瘤细胞血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 蛋白表达水平。结果 槐耳清膏 16 g/L 组 12、24、36 h 时细胞增殖抑制率分别为 (23.30±0.10)%、(43.20±0.53)%、(51.70±0.76)%, 8 g/L 组分别为 (7.10±0.08)%、(34.90±0.33)%、(37.40±0.35)%, 2 g/L 组分别为 (1.20±0.12)%、(2.97±0.11)%、(5.30±0.17)%, 空白对照组分别为 (0.30±0.11)%、(1.10±0.09)%、(1.50±0.15)%, 除 8 g/L 组 24 h 时与 36 h 时比较差异无统计学意义外, 其余各组各时间点两两比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 槐耳清膏 16 g/L 组在 12、24、36 h 细胞 CXCR4 基因和 VEGF 蛋白表达水平明显高于槐耳清膏 2、8 g/L 组和空白对照组 ( $P<0.05$ ), 槐耳清膏 8 g/L 组低于 2 g/L 组和空白对照组, 2 g/L 组低于空白对照组 ( $P<0.05$ ); 槐耳清膏 2、8、16 g/L 组 36 h 时 CXCR4 基因和 VEGF 蛋白表达水平低于 12、24 h, 24 h 时低于 12 h 时 ( $P<0.05$ )。结论 槐耳清膏在体外能抑制人成骨肉瘤 Saos-2 细胞的增殖、生长和转移, 其作用机制可能同抑制血管生成、调节 CXCR4 表达有关。

**关键词:** 骨肿瘤; 槐耳清膏; 血管内皮生长因子; 趋化因子受体 4

## Inhibitory effect of Huaier aqueous extract on osteosarcoma Saos-2 cells *in vitro*

HE Xu\*, GONG Wei-xun, WANG Yan-bing,

ZHOU Jing, WANG Li-chun

(\* Department of Orthopedic Surgery, the Second Affiliated Hospital  
of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

**Abstract: Objective** To explore the inhibitory effect of Huaier aqueous extract on osteosarcoma Saos-2 cells and its mechanism. **Methods** The osteogenesis sarcoma Saos-2 cells in logarithmic growth phase were divided into 2, 8 and 16 g/L groups and control group, processed by 2, 8 and 16 g/L Huaier aqueous extract and normal saline respectively. The osteosarcoma cell proliferation *in vitro* was detected among groups by MTT method after 12, 24 and 36 hours. The gene expression of chemokine receptor 4 (CXCR4) was detected by RT-PCR. The protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was detected by Western blot. **Results** The cellular proliferation inhibition rates of 12, 24 and 36 hours were (23.30±0.10)%, (43.20±0.53)% and (51.70±0.76)% in 16 g/L group, (7.10±0.08)%, (34.90±0.33)% and (37.40±0.35)% in 8 g/L group, (1.20±0.12)%, (2.97±0.11)% and (5.30±0.17)% in 2 g/L group, and (0.30±0.11)%, (1.10±0.09)% and (1.50±0.15)% in control group, showing no significant differences among groups and among time points ( $P<0.05$ ) except the inhibitory rate between the time points of 24 hours and 36 hours in 8 g/L group ( $P>0.05$ ). The expression levels of CXCR4 gene and VEGF protein in 12, 24 and 36 hours were the lowest in 16 g/L group, followed by 8 g/L group, 2 g/L group and control group in turns ( $P<0.05$ ), and were the lowest at the time point of 36 hours, followed by 24 and 12 hours in 2, 8 and 16 g/L groups ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Huaier aqueous extract can inhibit the proliferation, growth and metastasis of osteosarcoma Saos-2 cells by inhibiting angiogenesis and adjusting the CXCR4 expression.

**Key words:** Osteosarcoma; Huaier aqueous extract; vascular endothelial growth factor; chemokine receptor 4

骨肿瘤是发生于骨骼的一种常见肿瘤,恶性骨肿瘤以骨肉瘤、软骨肉瘤多见,约占恶性骨肿瘤的40%,有发展迅速、预后不佳、病死率高等特点,目前除外科手术外,尚无满意、有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。本研究探讨槐耳清膏对人成骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖、生长的抑制作用,报道如下。

### 1 材料与方法

1.1 一般材料 人成骨肉瘤 Saos-2 细胞(购自美国细胞库(ATCC));M-5A(Gebco)培养基、槐耳清膏(美国 Wyeth 公司),TRIZOL 试剂(Invention 公司),PCR 试剂盒(Permentas 公司),调整并配置含不同浓度槐耳清膏培养基 2、8、16 g/L<sup>[2]</sup>,采用光谱法以检测和验证确定药物浓度。

#### 1.2 方法

1.2.1 分组情况 对数期生长的人成骨肉瘤 Saos-2 细胞分为槐耳清膏 2、8、16 g/L 组和空白对照组,分别采用槐耳清膏 2、8、16 g/L 和生理盐水处理。

1.2.2 细胞增殖实验(四唑盐 MTT 比色法) 各组细胞胰酶消化,收集单细胞悬液,质量分数 2% 苜蓿兰染液保证成活细胞 > 95%,调整细胞浓度为  $5 \times 10^3$  个/mL,在 96 孔板上接种细胞每孔 200  $\mu$ L,在 37  $^{\circ}$ C,

体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和孵箱中培养 24 h 后弃上清,槐耳清膏 2、8、16 g/L 组和对照组分别加入 200  $\mu$ L 每孔槐耳清膏培养基 2、8、16 g/L 和生理盐水,均设 12 复孔,温育处理 12、24、36 h 后,每孔加入 20  $\mu$ L (5 g/L MTT 存储液),继续于温箱中培养 4 h 后,弃上清液,每孔加入 M-5A 培养基 150  $\mu$ L,再于室温放置 10 min。通过酶联免疫检测仪在 540 nm 波长处测定吸光度(optical density, OD)值。反复重复试验,抑制率 = 1 - 加药组 OD 值 / 对照组 OD 值。

1.2.3 RT-PCR 法检测趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 基因表达 各组常规消化后,调整细胞数为  $1 \times 10^6$  个/mL 至 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,槐耳清膏 2、8、16 g/L 组和对照组分别加入 200  $\mu$ L 每孔槐耳清膏培养基 2、8、16 g/L 和生理盐水,处理 12、24、36 h 后检测各组 CXCR4 基因表达情况。处理后加入 1 mL TRIZOL 试剂(Invention 公司)裂解细胞后按照操作说明书提取总 RNA,按 Permentas 公司反转录说明书,反转录 cDNA,进行针对目的基因的 PCR 反应。以  $\beta$ -actin 基因为内参观察此基因的相对表达水平,多次监测。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基 因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')	大小/bp
$\beta$ -actin	GACTACCTCATGAAGATC	GATCCACATCTGCTTGAA	192
CXCR4	GGAATCCAGCAGGTAGCAAAGTGACG	GACCCAACATAGACCACCT	561

1.2.4 Western blot 检测血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 蛋白表达情况 收集各组分别处理 12、24、36 h 后的肿瘤细胞,加入 RIPA 裂解液裂解细胞,高速离心提取总蛋白,Braford 法测定蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 电泳法行电泳分离,槽式湿转法转膜,免疫杂交染色。以  $\beta$ -actin 蛋白为内参蛋白,采用天能 GIS 凝胶图像分析系统分析蛋白条带吸光度。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

2.1 各组人成骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖抑制率比较 槐耳清膏 16 g/L 组在 12、24、36 h 细胞增殖抑制率明显高于槐耳清膏 2、8 g/L 组及空白对照组 ( $P < 0.05$ ),槐耳清膏 8 g/L 组高于 2 g/L 组和对照组,2 g/L 组高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。槐耳清膏 2、16 g/L 组 36 h 时细胞增殖抑制率高于 12、24 h 时,24 h

时高于 12 h 时 ( $P < 0.05$ );8 g/L 组 24、36 h 时高于 12 h 时 ( $P < 0.05$ ),24 h 时与 36 h 时比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组人成骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖抑制率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组 别	增殖抑制率		
	12 h	24 h	36 h
空白对照组	0.30 $\pm$ 0.11	1.10 $\pm$ 0.09	1.50 $\pm$ 0.15
槐耳清膏 2 g/L 组	1.20 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.97 $\pm$ 0.11 <sup>ad</sup>	5.30 $\pm$ 0.17 <sup>ade</sup>
槐耳清膏 8 g/L 组	7.10 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	34.90 $\pm$ 0.33 <sup>abd</sup>	37.40 $\pm$ 0.35 <sup>abd</sup>
槐耳清膏 16 g/L 组	23.30 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>	43.20 $\pm$ 0.53 <sup>abcd</sup>	51.70 $\pm$ 0.76 <sup>abcde</sup>

注: a 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 与槐耳清膏 2 g/L 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与槐耳清膏 8 g/L 组比较,  $P < 0.05$ ; d 与 12 h 时比较,  $P < 0.05$ ; e 与 24 h 时比较,  $P < 0.05$ 。

2.2 各组 Saos-2 细胞 CXCR4 基因和 VEGF 蛋白表达比较 槐耳清膏 16 g/L 组在 12、24、36 h 细胞 CXCR4 基因和 VEGF 蛋白表达水平明显低于槐耳清膏 2、8 g/L 组及空白对照组 ( $P < 0.05$ ),槐耳清膏 8 g/L 组低于 2 g/L 组和空白对照组,2 g/L 组低于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。槐耳清膏 2、8、16 g/L 组 36 h 时

CXCR4 基因和 VEGF 蛋白表达水平低于 12、24 h, 24 h 时低于 12 h 时 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组 Saos-2 细胞 CXCR4 基因和 VEGF 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CXCR4			VEGF		
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
空白对照组	7.21±0.13	6.73±0.19	6.95±0.25	1.77±0.15	1.67±0.21	1.72±0.19
槐耳清膏 2 g/L 组	6.17±0.19 <sup>a</sup>	5.41±0.32 <sup>ad</sup>	4.71±0.25 <sup>ade</sup>	1.25±0.04 <sup>a</sup>	1.05±0.09 <sup>ad</sup>	0.95±0.04 <sup>ade</sup>
槐耳清膏 8 g/L 组	5.53±0.17 <sup>ab</sup>	4.16±0.22 <sup>abd</sup>	3.02±0.38 <sup>abde</sup>	1.01±0.13 <sup>ab</sup>	0.87±0.15 <sup>abd</sup>	0.66±0.11 <sup>abde</sup>
槐耳清膏 16 g/L 组	5.03±0.12 <sup>abc</sup>	3.52±0.25 <sup>abcd</sup>	2.18±0.37 <sup>abcde</sup>	0.86±0.01 <sup>abc</sup>	0.49±0.04 <sup>abcd</sup>	0.31±0.02 <sup>abcde</sup>

注: a 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 与槐耳清膏 2 g/L 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与槐耳清膏 8 g/L 组比较,  $P < 0.05$ ; d 与 12 h 时比较,  $P < 0.05$ ; e 与 24 h 时比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

槐耳清膏通过其主要抗癌活性成分多糖蛋白,在肝癌、胃癌、肺癌、乳腺癌等肿瘤中通过增强机体免疫、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成等起抑制肿瘤生长作用<sup>[3-6]</sup>。本研究结果显示,槐耳清膏可较好抑制人成骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖,促进细胞凋亡,在治疗人成骨肉瘤方面有临床意义。

CXCR4 是 1 个有 7 个跨膜 G 蛋白偶联的受体,在维持炎症反应、诱导血管生成、免疫细胞发育、分化和运输中起重要作用<sup>[7-8]</sup>。有学者<sup>[9-10]</sup>研究结果证明 CXCR4 参与多种生理病理过程,其在恶性肿瘤发生、发展、演变过程中起调控作用,且恶性肿瘤复发和转移与 CXCR4 表达呈正相关。本研究通过基因转录水平检测 CXCR4 在成骨肉瘤细胞中明显升高,经过不同浓度槐耳清膏处理后均有不同程度降低,尤其随浓度增加其表达率降低明显。有研究<sup>[11-12]</sup>对肺癌组织和癌旁组织 CXCR4 含量进行比较,结果显示 CXCR4 与肺癌或肿瘤的肺部转移有关。提示 CXCR4 在一定程度上同肿瘤发生及转移存在联系,同时说明槐耳清膏抑制肿瘤的生长和转移与基因水平抑制 CXCR4 具有一定联系。

VEGF 是肿瘤血管生成的关键因子<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,通过槐耳清膏处理成骨肉瘤细胞中 VEGF 蛋白的表达较对照组均明显下降,且随浓度增高下降更明显。本研究再次证明其抑制肿瘤的基本机制可能是通过其多糖蛋白成分参与调节细胞适应缺氧环境的基因转录,从而抑制 VEGF 基因影响其蛋白表达。

本研究结果提示,槐耳清膏能抑制人成骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖、生长和转移,其作用机制可能同抑制肿瘤血管生成、基因水平调控趋化因子受体 CXCR4 表达等作用有关。尽管槐耳清膏目前已在临床抗肿瘤治疗中取得一定效果,但通过本次试验可为中药抗肿瘤治疗提供新实验和理论依据。

### 参考文献

- [1] 刘国雄, 姜楠, 王洋, 等. 长春新碱对人成骨肉瘤 MG63 细胞的增殖抑制和凋亡促进作用及其机制[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(9): 1573-1576.
- [2] Wang X, Zhang N, Huo Q, *et al.* Huaier aqueous extract suppresses human breast cancer cell proliferation through inhibition of estrogen receptor  $\alpha$  signaling[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1): 321-327.
- [3] 白岩. 槐耳清膏抑制结肠癌切除后肿瘤复发机制探讨[J]. 山东医药, 2013, 53(38): 33-35.
- [4] 袁鹏, 黄韬, 田元, 等. 金克对乳腺癌裸鼠移植瘤模型生长转移和凋亡的影响[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(5): 348-350.
- [5] Ren J, Zheng C, Feng G, *et al.* Inhibitory effect of extract of fungi of Huaier on hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(2): 198-201.
- [6] Burger RA, Brady MF, Bookman MA, *et al.* Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(26): 2473-2483.
- [7] 肖奋强, 狄茂军, 孙勤. 趋化因子受体 CXCR4 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(7): 665-666.
- [8] 谢颂平, 曾文慧, 左涛, 等. 趋化因子受体 CXCR4 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. 中华全科医学, 2012, 10(9): 1335-1336.
- [9] 刘莹, 陈璇. CXCL12/CXCR4 生物轴在卵巢癌中作用研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013, 27(11): 1046-1048.
- [10] Gatti M, Pattarozzi A, Bajetto A, *et al.* Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity[J]. *Toxicology*, 2013, 314(2): 209-220.
- [11] Rodriguez-Lara V, Peña-Mirabal E, Baez-Saldaña R, *et al.* Estrogen receptor beta and CXCR4/CXCL12 expression: differences by sex and hormonal status in lung adenocarcinoma [J]. *Arch Med Res*, 2014, 45(2): 158-169.
- [12] Lv H, Jiang Y, Liao M, *et al.* *In vitro* and *in vivo* treatments of *Echinococcus granulosus* with Huaier aqueous extract and albendazole liposome[J]. *Parasitol Res*, 2013, 112(1): 193-198.

收稿日期: 2014-09-28 修回日期: 2014-11-16 本文编辑: 王君秋