

异硫氰酸苯乙酯联合阿霉素诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用研究

范 锲, 李文浩, 丘德赞, 黄孝英, 李浩曦, 何基琛

基金项目: 广西卫健委科研课题(编号:Z2016632)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院脊柱骨病外科
作者简介: 范 锲(1979-),男,医学博士,副主任医师,研究方向:腰椎间盘突出及骨肿瘤的诊疗。E-mail:fanqiel127@126.com
通讯作者: 李浩曦(1983-),男,医学博士,副主任医师,研究方向:脊柱椎间盘退变诊疗。E-mail:volvoxc-90@163.com

[摘要] **目的** 探讨异硫氰酸苯乙酯(PEITC)联合阿霉素(ADM)诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用。**方法** 选用 U2-OS 细胞株,根据处理方法的不同将其分为 PEITC 组、ADM 组、PEITC + ADM 组和空白对照组。采用 MTT 法检测不同处理组药物对 U2-OS 细胞增殖能力的影响。采用 TUNEL 法测定不同处理组 U2-OS 细胞的凋亡情况。采用 Western blot 法检测不同处理组 U2-OS 细胞 Caspase-3、Fas、FasL 蛋白的表达情况。**结果** PEITC 和 ADM 浓度对 U2-OS 细胞的半抑制浓度(IC₅₀)分别为 4.37 μM/ml 和 6.61 μg/ml。与单独使用 PEITC 或 ADM 处理相比,联合使用两种药物对 U2-OS 细胞的增殖抑制率更高($P<0.05$)。低剂量的 PEITC 联合 ADM 产生协同效应,而高剂量的两种药物联合产生相加效应。与单药物处理相比,PEITC 联合 ADM 能够显著提高 U2-OS 细胞凋亡率($P<0.05$),增加 Caspase-3 蛋白的活性及表达($P<0.05$)。**结论** PEITC 增强了 ADM 诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用,可能与 Caspase-3 蛋白活性升高和表达量上调有关,这为 PEITC 联合 ADM 的临床应用提供了参考依据。

[关键词] 阿霉素; 异硫氰酸苯乙酯; 骨肉瘤; 凋亡
[中图分类号] R 738 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2021)03-0287-06
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2021.03.14

A study on the apoptosis of osteosarcoma cells induced by phenethyl isothiocyanate combined with adriamycin
FAN Qie, LI Wen-hao, QIU De-zan, et al. Department of Spine and Bone Diseases, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of phenethyl isothiocyanate(PEITC) combined with adriamycin(ADM) on the apoptosis of osteosarcoma cells. **Methods** Osteosarcoma U2-OS cell line was selected and the cells were divided into PEITC group, ADM group, PEITC + ADM group and blank control group according to different treatment methods. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) method was used to detect the drug effects of different treatment groups on the proliferation of U2-OS cells. Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) method was used to determine the apoptosis of U2-OS cells in different treatment groups. Western blot was used to detect the expressions of Caspase-3, Fas and FasL proteins in U2-OS cells in different treatment groups. **Results** 50% inhibiting concentration(IC₅₀) of PEITC and ADM on U2-OS cells were 4.37 μM and 6.61 μg/ml, respectively. Compared with PEITC or ADM treatment alone, the combined use of the two drugs had a higher proliferation inhibitory rate on U2-OS cells($P<0.05$). Low-dose PEITC combined with ADM produced a synergistic effect, while high-dose PEITC combined with ADM produced an additive effect. Compared with single-drug treatment, PEITC combined with ADM could significantly increase the apoptosis rate of U2-OS cells($P<0.05$), and increased the activity and expression of Caspase-3 protein($P<0.05$). **Conclusion** PEITC enhances the apoptosis of osteosarcoma cells induced by ADM, which may be related to the increased activity and up-regulation of Caspase-3 protein. This provides a reference for the clinical application of PEITC combined with ADM.

[Key words] Adriamycin(ADM); Phenethyl isothiocyanate(PEITC); Osteosarcoma; Apoptosis

骨肉瘤是一种罕见的肉瘤类型,但它也是最为常见骨组织来源的恶性肿瘤,常常因早期的肺转移而导致极差的预后^[1~3]。骨肉瘤可发生在所有年龄段,但儿童发病更为常见,占全球所有儿科恶性肿瘤患者的2.4%^[4]。阿霉素(adriamycin, ADM)属于化疗药物的一种,这种蒽环类抗生素能够减缓或阻滞癌细胞的生长^[5,6],已被临床应用于治疗包括骨肉瘤在内的各种类型的癌症^[7]。与其他化疗药物一样,虽然ADM对癌细胞有杀伤作用,但最终也会因癌细胞对ADM产生耐药性而失效^[8,9]。此外,毒副作用降低了患者治疗的成功率。因此,有必要探讨增强ADM作用的新方法,以降低其临床用量。异硫氰酸苯乙酯(phenethyl isothiocyanate, PEITC)是多种十字花科蔬菜中天然存在的异硫氰酸酯的化合物,是重要的异硫氰酸酯类家族成员之一^[10,11]。PEITC可调节前列腺癌、白血病和骨髓瘤细胞的表现遗传过程,并抑制组蛋白去乙酰酶^[12~14]。有研究^[15]表明,PEITC可抑制不同类型肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡。另外,PEITC在临床中也已被证明可增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,并协同增强化疗药物诱导的癌细胞凋亡^[16]。本研究旨在通过细胞实验探讨PEITC与ADM对骨肉瘤细胞凋亡的协同作用及相关机制,为临床治疗提供科学依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 骨肉瘤U2-OS细胞株购自中国科学院上海细胞库;ADM购自美国Sigma公司;PEITC购自TCI公司;细胞凋亡蛋白酶(Caspase)-3活性检测试剂盒购自中国海门市碧云天生物技术研究;Caspase-3抗体、Caspase-9抗体、细胞表面死亡受体Fas抗体、细胞表面死亡受体配体FasL抗体购自美国genetech公司;二抗购自中国南京金斯瑞生物科技有限公司;甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒购自中国Solarbio公司。

1.2 细胞培养 采用含10%浓度胎牛血清的RPMI1640培养基培养U2-OS细胞,细胞培养箱条件设置为5% CO₂、37℃。根据细胞生长状况进行细胞传代,取处于对数生长期的U2-OS细胞进行后续相关实验。

1.3 MTT法检测细胞增殖能力 选取呈现对数生长的U2-OS细胞,稀释至5×10⁴ cells/ml,以100 μl/孔种植到96孔无菌培养板中,以37℃、5% CO₂条件培养6~12 h,待细胞贴壁。ADM组分别按照1 μg/ml、2.5 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml和25 μg/ml的ADM

药物终浓度对细胞进行干预处理,PEITC组分别按照2 μM/ml、4 μM/ml、8 μM/ml、16 μM/ml、32 μM/ml和64 μM/ml的PEITC药物终浓度对细胞进行干预处理。绘制细胞增殖曲线并分别计算ADM和PEITC的半抑制浓度(IC₅₀)。另外,应用MTT法检测ADM联合PEITC对细胞增殖的影响,选取呈现对数生长的U2-OS细胞,调整细胞浓度为2×10⁴ cells/ml,每孔加入100 μl。分组及干预方法如下:ADM 1组(2 μg/ml ADM)、ADM 2组(3 μg/ml ADM)、ADM 3组(10 μg/ml ADM);PEITC 1组(1 μM/ml PEITC)、PEITC 2组(2 μM/ml PEITC)、PEITC 3组(5 μM/ml PEITC);A + P 1组(2 μg/ml ADM + 1 μM/ml PEITC)、A + P 2组(3 μg/ml ADM + 2 μM/ml PEITC)、A + P 3组(10 μg/ml ADM + 5 μM/ml PEITC)、空白对照组(未添加药)。每孔终体积100 μl,每个浓度设3个重复孔,继续培养24 h后每孔加入20 μl MTT溶液,使用ST360酶标仪(上海科华公司)进行检测,在570 nm波长下检测并记录其OD值。抑制率=(实验孔OD值-空白孔OD值)/空白孔OD值×100%。Q值的计算公式如下:Q = E_{a+b}/(E_a + E_b - E_a × E_b)。E_a和E_b分别表示单独使用ADM和PEITC的抑制率;E_{a+b}为ADM与PEITC联合抑制率。Q值>1.15表示协同效应;0.85 ≤ Q值 ≤ 1.15为相加效应,Q值<0.85为拮抗效应。

1.4 TUNEL法测定U2-OS细胞凋亡 使用荧光素碎片DNA片段检测试剂盒(DeadEnd,美国)进行TUNEL检测。经磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗去U2-OS细胞培养液,4℃条件下使用4%甲醛溶液固定25 min,PBS液洗涤5 min×2次。加入0.2% TritonX-100室温孵育5 min,PBS液洗涤5 min×2次。加入100 μl平衡缓冲液室温平衡10 min。加入50 μl末端脱氧核苷酸转移酶工作液,37℃湿盒内避光孵育60 min。加入预先配置好的SSC溶液洗涤15 min。再次加PBS溶液室温洗涤5 min×3次。在4,6-联脒-2-苯基吡啶染液室温湿盒避光孵育10 min。然后加去离子水室温洗涤5 min×3次。荧光抗淬灭剂封片,使用荧光显微镜(U-REL-T, OLYMPUS)镜检。细胞凋亡率=阳性染色细胞(即凋亡细胞)/总细胞×100%。

1.5 Caspase-3活性检测 按试剂盒提供的对硝基苯胺(p-nitroaniline, pNA;10 mmol/L)用标准品稀释液稀释,测定其405 nm处吸光度(A₄₀₅值),并作出pNA浓度相当于A₄₀₅值的pNA标准曲线,依据pNA

标准曲线定量检测 Caspase-3。取药物处理好的细胞加入裂解液,重悬后冰浴裂解 15 min,使用聚氰基丙烯酸正丁酯蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。按照检测缓冲液 50 μ l + 待测样本 40 μ l + 10 μ l Caspase-3 显色底物(2 mmol/L)配置反应体系,37 $^{\circ}$ C 孵育 120 min 后应用酶标仪(DNM-9602A)测定其 A405 值。样品中 Caspase-3 催化产生的 pNA 产生的吸光度值 = 样品孔 A405 值 - 空白对照孔 A405 值。

1.6 Western blot 检测 Caspase-3、Fas、FasL 蛋白表达 使用含有 60 g/ml 苯甲基磺酰氟的裂解缓冲液提取 U2-OS 细胞的总蛋白。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经 100 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕后将蛋白从胶转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。将膜浸在封闭液中 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。将膜取出放入一抗液中,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。PBST 洗膜,5 min $\times$ 4 次。将膜转入二抗液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用洗脱液洗涤 3 次,前两次 5 min,第三次 10 min,然后用镊子轻轻地将 PVDF 膜放置于曝光盒里,于暗室内压片并冲印成像。应用胶片用凝胶成像系统(ChemiDoc MP Imaging System,美国 BIO-RAD 公司)进行扫描及数据采集。

1.7 统计学方法 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用 SNK-q 检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEITC 和 ADM 对 U2-OS 细胞增殖能力的影响 MTT 检测结果显示,PEITC 和 ADM 浓度对 U2-OS 细胞的 IC₅₀ 分别为 4.37 μ M/ml 和 6.61 μ g/ml。见图 1。与单独使用 PEITC 或 ADM 处理相比,联合使用两种药物对 U2-OS 细胞的增殖抑制率更高($P < 0.05$)。低剂量的 PEITC 联合 ADM 产生协同效应,而高剂量的两种药物联合产生相加效应,见表 1。

2.2 不同处理组 U2-OS 细胞的凋亡情况比较 荧光显微镜观察见较高浓度 PEITC、ADM 处理组的 U2-OS 细胞凋亡数多于较低浓度组,且低浓度 PEITC 联合 ADM 处理组的 U2-OS 细胞凋亡数比单独使用 PEITC 或 ADM 的高浓度处理组更多。见图 2。除 ADM(6.61 μ g/ml)组与 PEITC(4.37 μ M/ml)组的 U2-OS 细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余不同处理组间 U2-OS 细胞的凋亡率比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

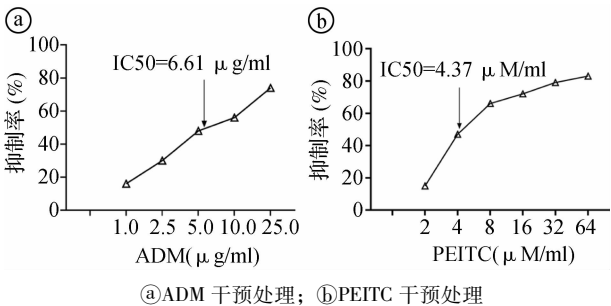
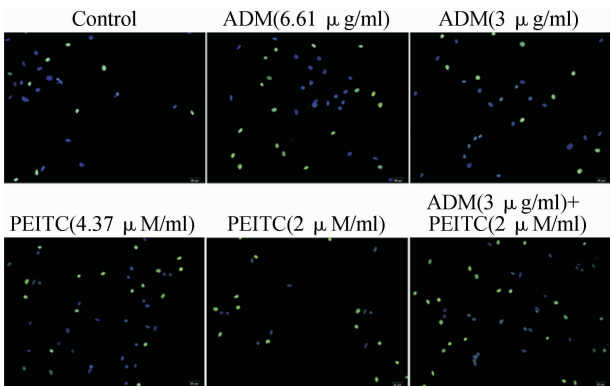


图 1 ADM 和 PEITC 对 U2-OS 细胞增殖的影响图

表 1 不同处理组 U2-OS 细胞增殖抑制率及 Q 值比较[n=3, ($\bar{x} \pm s$)]

组 别	抑制率(%)	Q 值
ADM 1 组	14.60 $\pm$ 0.07	—
ADM 2 组	24.14 $\pm$ 0.06	—
ADM 3 组	43.05 $\pm$ 0.05	—
PEITC 1 组	20.73 $\pm$ 0.07	—
PEITC 2 组	26.36 $\pm$ 0.07	—
PEITC 3 组	44.96 $\pm$ 0.08	—
A + P 1 组	55.40 $\pm$ 0.05 ^{ad}	1.70
A + P 2 组	70.54 $\pm$ 0.02 ^{be}	1.59
A + P 3 组	74.62 $\pm$ 0.02 ^{ef}	1.08
空白对照组	—	—
F	424181.309	—
P	0.000	—

注:与 ADM 1 组比较,^a $P < 0.05$;与 ADM 2 组比较,^b $P < 0.05$;与 ADM 3 组比较,^c $P < 0.05$;与 PEITC 1 组比较,^d $P < 0.05$;与 PEITC 2 组比较,^e $P < 0.05$;与 PEITC 3 组比较,^f $P < 0.05$



蓝色荧光表示正常 U2-OS 细胞,绿色荧光表示凋亡细胞

图 2 荧光显微镜下观察 U2-OS 细胞凋亡情况所见($\times 40$)

表 2 不同处理组 U2-OS 细胞的凋亡率比较[n=3, ($\bar{x} \pm s$)]

组 别	凋亡率(%)
ADM(3 μ g/ml)组	23.23 $\pm$ 1.58 ^a
ADM(6.61 μ g/ml)组	48.60 $\pm$ 0.54 ^{ab}
PEITC(2 μ M/ml)组	19.81 $\pm$ 1.26 ^{abc}
PEITC(4.37 μ M/ml)组	46.69 $\pm$ 2.44 ^{abd}
ADM(3 μ g/ml) + PEITC(2 μ M/ml)组	54.15 $\pm$ 1.47 ^{abcde}
空白对照组	5.07 $\pm$ 0.13
F	554.832
P	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 ADM(3 μ g/ml)组比较,^b $P < 0.05$;与 ADM(6.61 μ g/ml)比较,^c $P < 0.05$;与 PEITC(2 μ M/ml)组比较,^d $P < 0.05$;与 PEITC(4.37 μ M/ml)组比较,^e $P < 0.05$

2.3 不同处理组 Caspase-3 活性比较 单因素方差分析结果显示,ADM(6.61 μg/ml)组和 PEITC(4.37 μM/ml)组的 U2-OS 细胞 Caspase-3 活性显著高于空白对照组,ADM(6.61 μg/ml)联合 PEITC(4.37 μM/ml)处理后,U2-OS 细胞 Caspase-3 活性较单药处理组上升。见表 3。

表 3 不同处理组 Caspase-3 活性比较 [n = 3, ($\bar{x} \pm s$)]

组 别	Caspase-3 活性 [pmol/(min · μg)]
ADM(6.61 μg/ml)组	8.96 ± 0.14 ^a
PEITC(4.37 μM/ml)组	10.32 ± 0.58 ^{ab}
ADM(6.61 μg/ml) + PEITC(4.37 μM/ml)组	13.44 ± 0.37 ^{abc}
空白对照组	5.40 ± 0.15
<i>F</i>	258.394
<i>P</i>	0.000

注:与空白对照组比较,^a*P* < 0.05;与 ADM(6.61 μg/ml)组比较,^b*P* < 0.05;与 PEITC(4.37 μM/ml)组比较,^c*P* < 0.05

2.4 不同处理组 Caspase-3、Fas、FasL 蛋白表达水平比较 Western blot 检测结果显示,ADM(6.61 μg/ml) + PEITC(4.37 μM/ml)组的 Caspase-3 蛋白表达水平显著高于 ADM(6.61 μg/ml)组和 PEITC(4.37 μM/ml)处理组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。另外,ADM(6.61 μg/ml) + PEITC(4.37 μM/ml)组的 Fas 蛋白表达水平显著低于 PEITC(4.37 μM/ml)处理组(*P* < 0.05),FasL 蛋白表达水平显著高于 ADM(6.61 μg/ml)组(*P* < 0.05)。见图 3,表 4。

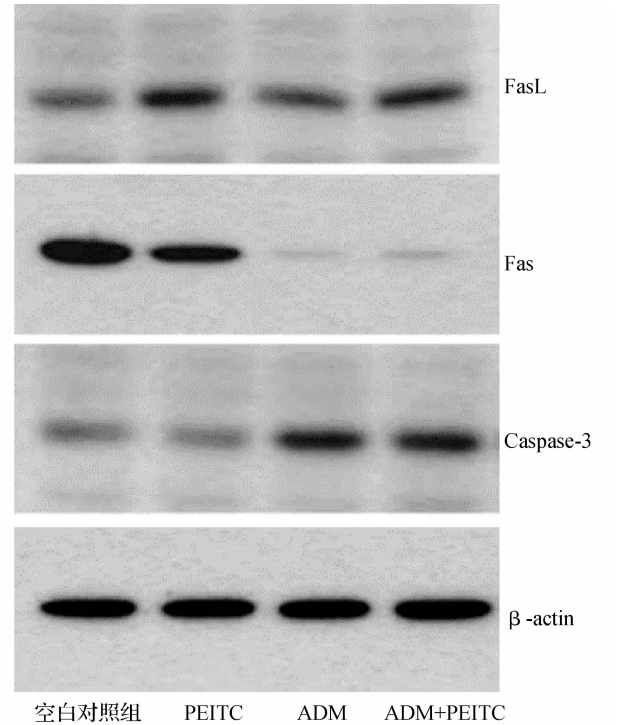


图 3 Western blot 检测结果图

表 4 不同处理组 Caspase-3、Fas、FasL 蛋白表达水平比较 [n = 2, ($\bar{x} \pm s$), 灰度值]

组 别	Caspase-3	Fas	FasL
ADM(6.61 μg/ml)组	0.76 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.75 ± 0.04
PEITC(4.37 μM/ml)组	0.43 ± 0.03 ^{ab}	0.97 ± 0.02 ^{ab}	0.82 ± 0.01
ADM(6.61 μg/ml) + PEITC(4.37 μM/ml)组	0.84 ± 0.02 ^{abc}	0.13 ± 0.03 ^{ac}	0.87 ± 0.03 ^{ab}
空白对照组	0.37 ± 0.02	1.17 ± 0.06	0.77 ± 0.02
<i>F</i>	244.444	486.973	7.711
<i>P</i>	0.000	0.000	0.039

注:与空白对照组比较,^a*P* < 0.05;与 ADM(6.61 μg/ml)组比较,^b*P* < 0.05;与 PEITC(4.37 μM/ml)组比较,^c*P* < 0.05

3 讨论

3.1 骨肉瘤是一种好发于 10 ~ 20 岁的青少年的原发性恶性骨肿瘤,常发生于长骨干骺端。目前对于骨肉瘤的疗法主要是采用手术切除肿瘤联合化疗的方式进行治疗。然而,骨肉瘤的早期肺转移以及较高的复发率也导致了骨肉瘤患者的高病死率和致残率。根据《骨肉瘤临床循证诊疗指南》^[17]的建议,ADM 被推荐作为一线化疗药物,尽管其大大地提高了患者的 5 年生存率及保肢率,但是 ADM 的耐药问题依然严峻,给临床治疗增加了一定的难度。PEITC 是常用的人工合成的抗肿瘤单体,具有良好的抗肿瘤作用。目前,PEITC 在肝癌、乳腺癌及骨髓瘤等恶性肿瘤的体外试验中显示出显著的抗肿瘤效果,诱导细胞凋亡作用明显^[18]。高剂量的 ADM 可能会导致肿瘤耐药或是对机体产生较大的毒副作用,并最终导致治疗失败。本研究结果显示,当 ADM 联合 PEITC 作用于骨肉瘤细胞系时,ADM 能够在一个相对较低的浓度获得一个令人满意的癌细胞增殖的抑制效果,这对指导临床研究的开展有实际意义。

3.2 在本研究中,经 MTT 实验确定了 PEITC 和 ADM 处理 U2-OS 细胞系时的 IC₅₀ 分别为 4.37 μM/ml 和 6.61 μg/ml。并且在药物浓度较低时,两种药物联合表现出显著的协同作用,而当药物浓度上升,协同作用变弱,则表现出相加作用。但无论如何,PEITC 都能增强 ADM 对 U2-OS 细胞增殖的抑制作用。ADM 可诱导多种类型癌细胞凋亡^[19],PEITC 也对肿瘤细胞具有相似的功能效果^[20]。本研究结果显示,PEITC 联合 ADM 处理 U2-OS 细胞可获得比单药处理更高的凋亡率,考虑可能为 PEITC 提高了 U2-OS 细胞对 ADM 凋亡作用的敏感性。

3.3 ADM 诱导癌细胞凋亡可能是多个信号通路共同作用的结果^[21]。例如,ADM 通过 Fas 介导的凋亡通路而诱导甲状腺癌细胞凋亡^[22]。然而也有研究^[23,24]认为,ADM 诱导的细胞凋亡主要依赖肿瘤坏死因子相

关的凋亡诱导配体-TRAIL 受体信号,而并不是通过 FasL、穿孔素、自然杀伤细胞受体 D 或血小板和 T 细胞活化抗原 1 进行。经 PEITC 和 ADM 处理的 U2-OS 细胞没有观察到 FasL 表达增加,且 PEITC 和 ADM 联合处理的 U2-OS 细胞观察到 Fas 表达下降,提示 Fas/FasL 信号通路未参与其凋亡过程。Caspase-3 蛋白被称为死亡蛋白酶,是 Caspases 家族中最重要的细胞凋亡执行者之一。在蛋白酶级联切割过程中,Caspase-3 蛋白发挥着重要的作用,一旦 Caspase-3 蛋白被激活就会导致细胞死亡^[25]。本研究结果显示,经 PEITC 和 ADM 处理后,U2-OS 细胞的 Caspase-3 蛋白活性和表达水平显著增强。活化的 Caspase-3 蛋白可引起与细胞结构、细胞周期及 DNA 修复相关基因或蛋白失活,诱发肿瘤细胞凋亡而抑制癌症的发生^[26]。PEITC 和 ADM 的协同作用(或是相加作用)可在较低药物浓度条件下达到上调 Caspase-3 蛋白表达的效果,并导致肿瘤细胞凋亡,实验结果对 PEITC 的临床应用提供了一定依据。

综上所述,PEITC 联合 ADM 可在较低药物浓度条件下有效抑制 U2-OS 细胞增殖,提高细胞凋亡率,其作用可能与 Caspase-3 蛋白活性升高和表达量上调有关,这为 PEITC 联合 ADM 的临床应用提供了参考依据。

参考文献

- [1] Wang W, Zheng K, Pei Y, et al. Histone demethylase JARID1B is overexpressed in osteosarcoma and upregulates cyclin D1 expression via demethylation of H3K27me3[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(3): 373–384.
- [2] Satterfield L, Shuck R, Kurenbekova L, et al. miR-130b directly targets ARHGAP1 to drive activation of a metastatic CDC42-PAK1-API positive feedback loop in Ewing sarcoma[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(10): 2062–2075.
- [3] Wu J, Cui LL, Yuan J, et al. Clinical significance of the phosphorylation of MAPK and protein expression of cyclin D1 in human osteosarcoma tissues[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 2303–2307.
- [4] Tian L, Yin D, Ren Y, et al. Plumbagin induces apoptosis via the p53 pathway and generation of reactive oxygen species in human osteosarcoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(1): 126–132.
- [5] Ferrari S, Meazza C, Palmerini E, et al. Nonmetastatic osteosarcoma of the extremity. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, doxorubicin and ifosfamide. An Italian Sarcoma Group study (ISG/OS-Oss)[J]. *Tumori*, 2014, 100(6): 612–619.
- [6] Chen C, Dong J, Chen H, et al. Preparation of adriamycin gelatin microsphere-loaded decellularized periosteum that is cytotoxic to human osteosarcoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10771–10781.
- [7] Wu BQ, Cao Y, Bi ZG. Suppression of adriamycin resistance in osteosarcoma by blocking Wnt/ β -catenin signal pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(14): 3185–3192.
- [8] Wang C. Therapeutic effects of adriamycin combined with high-intensity

- focused ultrasound on osteosarcoma[J]. *J BUON*, 2019, 24(2): 826–831.
- [9] Niu F, Zhao S, Xu CY, et al. Potentiation of the antitumor activity of adriamycin against osteosarcoma by cannabinoid WIN-55, 212-2[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2415–2421.
- [10] Yagi M, Nakatsui Y, Maeda A, et al. Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake[J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0206748.
- [11] Wu CL, Huang AC, Yang JS, et al. Benzyl isothiocyanate (BITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC)-mediated generation of reactive oxygen species causes cell cycle arrest and induces apoptosis via activation of Caspase-3, mitochondria dysfunction and nitric oxide (NO) in human osteogenic sarcoma U-2 OS cells[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(8): 1199–1209.
- [12] Tusskorn O, Khunluck T, Prawan A, et al. Suppression of glutathione S-transferases potentiates the cytotoxic effect of phenethyl isothiocyanate in cholangiocarcinoma cells[J]. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2018, 391(6): 657–667.
- [13] Sun M, Shi Y, Dang UJ, et al. Phenethyl isothiocyanate and cisplatin co-encapsulated in a liposomal nanoparticle for treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 801.
- [14] Chou YC, Chang MY, Lee HT, et al. Phenethyl isothiocyanate inhibits in vivo growth of xenograft tumors of human glioblastoma cells[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2305.
- [15] Huang SH, Hsu MH, Hsu SC, et al. Phenethyl isothiocyanate triggers apoptosis in human malignant melanoma A375.S2 cells through reactive oxygen species and the mitochondria-dependent pathways[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(3): 270–283.
- [16] Ranjan A, Ramachandran S, Gupta N, et al. Role of phytochemicals in cancer prevention[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 4981.
- [17] 郭卫, 牛晓辉, 肖建如, 等. 骨肉瘤临床循证诊疗指南[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2018, 11(4): 288–301.
- [18] 朱云涛, 邹玺, 王瑞平. 异硫氰酸苯乙酯抗肿瘤的研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(20): 3689–3690.
- [19] Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, et al. Dendritic cells combined with doxorubicin induces immunogenic cell death and exhibits antitumor effects for osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3): 2169–2175.
- [20] Guo Z, Wang H, Wei J, et al. Sequential treatment of phenethyl isothiocyanate increases sensitivity of temozolomide resistant glioblastoma cells by decreasing expression of MGMT via NF- κ B pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 696–708.
- [21] Wang L, Tang B, Han H, et al. miR-155 affects osteosarcoma MG-63 cell autophagy induced by adriamycin through regulating PTEN-P13K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2018, 33(1): 32–38.
- [22] Xu WC, Chen SR, Huang JX, et al. Expression and distribution of S-100 protein, CD83 and apoptosis-related proteins (Fas, FasL and Bcl-2) in thyroid tissues of autoimmune thyroid diseases[J]. *Eur J Histochem*, 2007, 51(4): 291–300.
- [23] 吴刚, 喻爱喜, 祝少博, 等. TRAIL 及联合阿霉素治疗骨肉瘤的动物实验研究[J]. *中华医学杂志*, 2009, 89(37): 2644–2648.
- [24] Li F, Meng L, Xing H, et al. Essential role of c-Jun-NH2-terminal

kinase on synergy induction of apoptosis by TRAIL plus ADM in ADM resistant MCF-7/ADM cells[J]. Apoptosis, 2006,11(7): 1239-1246.

[25] 袁敏,刘斌,郑秀琪. Caspase-9 和 Caspase-3 在血管性痴呆大鼠海马 CA1 区的表达及意义[J]. 中国临床新医学,2013,6(5):404-408.

[26] 李受南,洗磊,吴正球,等. TCF21 与 Caspase-3 在非小细胞肺

癌组织中的表达及意义[J]. 中国临床新医学,2016,9(4):310-312.

[收稿日期 2019-04-22][本文编辑 余军 吕文娟]

本文引用格式

范 锲,李文浩,丘德赞,等. 异硫氰酸苯乙酯联合阿霉素诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用研究[J]. 中国临床新医学,2021,14(3):287-292.

博硕论坛·论著

肝癌细胞中丛生蛋白的差异性表达检测和启动子表达质粒的构建

于秋丽, 王 峰

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81660510); 广西自然科学基金项目(编号:2014GXNSFBA118206)

作者单位: 530021 南宁,广西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室

作者简介: 于秋丽(1993-),女,在读硕士研究生,研究方向:肝癌差异性表达基因启动子的靶向表达研究。E-mail:1208443369@qq.com

通讯作者: 王 峰(1983-),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤的发生机制和靶向基因治疗。E-mail:bestemail@fox-mail.com

[摘要] **目的** 检测肝癌细胞 HepG2 中丛生蛋白(CLU)的表达情况并构建肝癌差异性表达基因 CLU 启动子表达质粒,为后续进行 CLU 基因差异性表达及机制研究奠定基础。**方法** 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 CLU mRNA 在肝细胞癌(HCC)HepG2 细胞和正常肝细胞 L02 中的表达水平。应用生物信息学分析和序列测序获得 CLU 基因启动子序列,并将其插入到 pGL3-Basic 质粒中。通过酶切、琼脂糖凝胶电泳及测序对构建完成的 pGL3-CLUP 质粒进行验证。**结果** RT-qPCR 结果表明 HepG2 细胞 CLU mRNA 的表达量约是 L02 细胞的 9.38 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。pGL3-CLUP 质粒经单酶切后为一条电泳条带,长度为 5 000 ~ 6 000 bp;双酶切后的质粒为两条电泳条带,一条为 5 000 bp 左右,另一条为 1 000 ~ 1 500 bp,大小与质粒和启动子大小一致。测序结果也表明 CLU 启动子已插入到 pGL3-Basic 质粒启动子区。**结论** CLU 在 HCC 细胞中高表达。pGL3-CLUP 启动子表达质粒构建成功。

[关键词] 肝癌; 差异性表达基因; 启动子; 表达质粒

[中图分类号] R 73-37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2021)03-0292-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2021.03.15

Detection of differential expression of clusterin in hepatoma cells and construction of promoter expression plasmid YU Qiu-li, WANG Feng. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To detect the expression of clusterin(CLU) in liver cancer cell HepG2 and to construct the promoter expression plasmid of liver cancer differential expression gene CLU, so as to lay a foundation for further study on the differential expression and mechanism of CLU gene. **Methods** The expression levels of CLU mRNA in hepatocellular carcinoma(HCC) cell HepG2 and normal hepatocyte L02 were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR). The promoter sequence of CLU gene was obtained by bioinformatics analysis and promoter sequencing, and was constructed into pGL3-Basic plasmid. The constructed pGL3-CLUP plasmid was verified by restriction enzyme digestion, agarose gel electrophoresis and sequencing. **Results** The RT-qPCR results showed that the expression level of CLU mRNA in HepG2 cells was 9.38 times higher than that in L02 cells,