

## EGCG 联合 MicroRNA-34a 抑制骨肉瘤 MG63 细胞的增殖

蒋丽华, 高 华, 马 静(武警宁夏总队医院药械科, 宁夏 银川 750004)

**摘要:** **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]联合 MicroRNA-34a 对骨肉瘤 MG63 细胞的增殖抑制作用。**方法** 将骨肉瘤 MG63 细胞分成 EGCG 组、MicroRNA-34a 组、联合组和生理盐水组。MTT 实验及细胞克隆形成实验研究 EGCG 联合 MicroRNA-34a 对 MG63 细胞的毒性。流式细胞技术研究 EGCG 联合 MicroRNA-34a 诱导 MG63 细胞凋亡作用。构建裸鼠骨肉瘤异位肿瘤模型, 研究 EGCG 联合 RNA 干预对裸鼠肿瘤的生长抑制能力。**结果** 与生理盐水组和单独给药组比较, EGCG 联合 MicroRNA-34a 对 MG63 细胞的生长及克隆形成抑制作用显著强于其他组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。EGCG 联合 MicroRNA-34a 能促进 MG63 细胞的凋亡( $P < 0.01$ )。EGCG 联合 MicroRNA-34a 能够显著延长荷瘤小鼠的中位生存期。**结论** EGCG 联合 MicroRNA-34a 能够有效抑制骨肉瘤 MG63 细胞的增殖。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 骨肉瘤; RNA 干预

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0061-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.015

### Inhibitive Effect of Epigallocatechin-3-gallate Combined with MicroRNA-34a on Proliferation of Osteosarcoma MG63 Cells

JIANG Lihua, GAO Hua, MA Jing (Department of Pharmacy and Equipment, Ningxia General Hospital of Armed Police, Yinchuan 750004 Ningxia, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) combined with MicroRNA-34a on inhibiting the proliferation of osteosarcoma MG63 cells. **Methods** The MG63 cells were divided into four groups, EGCG group, MicroRNA-34a group, combination group (EGCG + MicroRNA-34a), and saline group. MTT assay was used to evaluate the anti-proliferation efficiency of EGCG combined with MicroRNA-34a. Flow cytometry was used to evaluate the MG63 cells apoptosis induced by EGCG + MicroRNA-34a. Osteosarcoma MG63 cells were xenografted into the mice to establish the animal model, which was used to evaluate the anti-tumor effect. **Results** The combination group could inhibit the growth of MG63 cells effectively ( $P < 0.05$ ), promote the apoptosis of MG63 cells, and prolong median survival of the tumor-bearing nude mice compared to saline group, EGCG group and MicroRNA-34a group. **Conclusion** EGCG combined with MicroRNA-34a can inhibit the proliferation of osteosarcoma MG63 cells.

**Keywords:** EGCG; Osteosarcoma; RNA interference

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤, 骨肉瘤的恶性程度甚高, 预后极差, 特点是局部和远处转移发生早, 临床做出骨肉瘤诊断时, 其中大部分患者已经出现肺的微小转移灶, 5 年生存率低<sup>[1-2]</sup>。MicroRNA-34a 是与人类癌症的发生和发展相关的最突出的内源

性 miRNA 之一, 是一种肿瘤抑制基因, 能够有效的抑制肿瘤的发展<sup>[3-4]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯 [(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG] 是提取自茶叶的一种抗肿瘤有效成分, 具有良好的药理活性<sup>[5]</sup>。本实验旨在研究 EGCG 联合 MicroRNA-34a 对外培

收稿日期: 2014-10-01

作者简介: 蒋丽华, 女, 主管药师, 研究方向: 临床药学。Email: 1049933625@qq.com。

养的骨肉瘤 MG63 细胞的增殖抑制作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及细胞** 雄性, SPF 级, 体质量 ( $20 \pm 2$ )g, 成都达硕实验动物公司提供, 动物许可证号: SCDS (川)2012-0032, 动物质量合格证号: 140132; MG63 骨肉瘤细胞购自上海细胞研究所。

**1.2 药物及试剂** 胎牛血清和 DMEM 培养基, 赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; MicroRNA-34a, 北京中原公司, 批号: G223105; MTT 试剂盒, 碧云天生物公司; 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG), 美国 Sigma 公司, 批号: S140021。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 MTT 实验考察不同药物干预对 MG63 的增殖抑制作用** 培养 MG63 细胞接种于 96 孔板中培养 24 h 后加入无菌过滤后的 EGCG ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、MicroRNA-34a ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、EGCG+MicroRNA-34a (EGCG  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , MicroRNA-34a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 20  $\mu\text{L}$ , 分别培养 24 h 和 48 h 后取出, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$   $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT 溶液孵育 4 h 后, 将孔板中液体倒出, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光振荡 15 min, 用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的光密度值 (OD)。

**1.3.2 细胞克隆形成实验** 取对数生长期细胞, 接种于 6 孔板中 (每孔 1000 个细胞), 将孔板移入 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  孵箱中培养 24 h 后, 加入无菌过滤后的 EGCG ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、MicroRNA-34a ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、EGCG+MicroRNA-34a (EGCG  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , MicroRNA-34a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 20  $\mu\text{L}$ 。每天观察细胞生长情况, 当生理盐水组出现细胞克隆时终止培养。显微镜下计数细胞克隆数, 计算克隆率。

**1.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡** 培养 MG63 细胞接种于 96 孔板中培养 24 h 后加入无菌过滤后的 EGCG ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、MicroRNA-34a ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、EGCG+MicroRNA-34a (EGCG  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , MicroRNA-34a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 20  $\mu\text{L}$ 。培养 24 h 后用冰 PBS 清洗细胞 3 次, FITC/PI 双染, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

**1.3.4 骨肉瘤异位肿瘤模型的建立** 取体质量 20~25 g 的雄性裸鼠, 将 MG63 细胞悬液皮下接种于裸鼠背部, 7 d 后出现米粒大肿瘤证实接种成功。将优选后的 24 只荷瘤裸鼠随机分为 4 组: 生理盐水组、EGCG 组 ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、MicroRNA-34a 组 ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和 EGCG+MicroRNA-34a 联合组 (EGCG  $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , MicroRNA-34a  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。第 3, 6, 9 和 12 天腹腔注射给药, 直至裸鼠死亡, 统计生存期。

**1.4 统计学处理方法** 实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析, 两组间比较用  $t$  检验, 多组间比较用方差分析。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 EGCG 联合 MicroRNA-34a 抑制 MG63 细胞的增殖** 见表 1。EGCG 和 MicroRNA-34a 干扰均能抑制 MG63 细胞的增殖。且联合干预对肿瘤细胞的抑制能力大于单独用药。给药 48 h 后, EGCG 组、MicroRNA-34a 组和联合组对肿瘤细胞的抑制率分别为 ( $51.8 \pm 6.5$ )%、( $44.2 \pm 5.6$ )% 和 ( $79.4 \pm 4.8$ )%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与生理盐水组比较, 单独给药组和联合给药组均能有效抑制肿瘤细胞增殖, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 1 不同药物干预对 MG63 细胞的抑制率 ( $\bar{x} \pm s$ , %,  $n=3$ )

组别	抑制率 /%	
	24 h	48 h
生理盐水组	$1.3 \pm 0.4$	$1.9 \pm 0.7$
EGCG 组	$28.7 \pm 3.2^{**}$	$51.8 \pm 6.5^{**}$
MicroRNA-34a 组	$24.8 \pm 2.6^{**}$	$44.2 \pm 5.6^{**}$
EGCG+MicroRNA-34a 联合组	$49.8 \pm 4.2^{**\Delta}$	$79.4 \pm 4.8^{**\Delta\#}$

注: 与生理盐水组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 EGCG 组、MicroRNA-34a 组比较,  $^{\Delta}P < 0.01$ ; 与 EGCG+MicroRNA-34a 联合组在 24 h 比较,  $^{\#}P < 0.01$ 。

**2.2 EGCG 联合 MicroRNA-34a 对 MG63 细胞克隆形成能力的抑制** 见表 2。EGCG 组、MicroRNA-34a 组和 EGCG+MicroRNA-34a 联合组均能有效抑制肿瘤细胞克隆, 与生理盐水组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 其中 EGCG+MicroRNA-34a 联合组克隆数显著少于 EGCG 组和 MicroRNA-34a 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

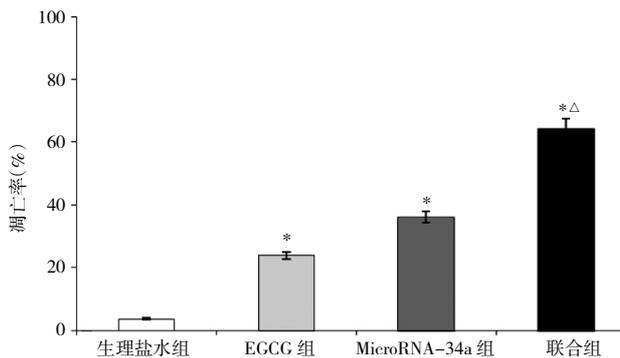
表 2 各处理组细胞克隆形成的抑制情况 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	克隆数	抑制率 /%
生理盐水组	$283 \pm 8.2$	/
EGCG 组	$192 \pm 6.8^{**}$	$32.15^{**}$
MicroRNA-34a 组	$181 \pm 6.1^{**}$	$36.04^{**}$
EGCG+MicroRNA-34a 联合组	$109 \pm 4.8^{**\Delta}$	$61.48^{**\Delta\#}$

注: 与生理盐水组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 EGCG 组和 MicroRNA-34a 组比较,  $^{\Delta}P < 0.01$ ; 与 EGCG+MicroRNA-34a 联合组在 24 h 比较,  $^{\#}P < 0.01$ 。

### 2.3 EGCG 联合 MicroRNA-34a 诱导 MG63 细胞凋

亡 见图 1。EGCG 组、MicroRNA-34a 组和 EGCG+MicroRNA-34a 联合组诱导肿瘤细胞凋亡率分别为 23.8%、36.2% 和 64.3%，而生理盐水组凋亡率为 3.6%。与生理盐水组比较，EGCG 组、MicroRNA-34a 组和 EGCG+MicroRNA-34a 联合组均能诱导 MG63 细胞凋亡，差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 EGCG 组和 MicroRNA-34a 组比较，EGCG+MicroRNA-34a 联合组诱导肿瘤细胞凋亡的能力强于 EGCG 组和 MicroRNA-34a 组，差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。



注：与生理盐水组比较，\* $P < 0.01$ ；与 EGCG 组和 MicroRNA-34a 组比较， $\Delta P < 0.01$ 。

图 1 不同药物干预诱导 MG63 细胞凋亡

Figure 1 The apoptosis of MG63 cells after treatment with different drugs for 24 h

**2.4 EGCG 联合 MicroRNA-34a 对荷瘤裸鼠的中位生存期的影响** 见图 2。荷瘤小鼠给药第 4 次后停止给药，直至裸鼠全部自然死亡，统计生存期。生理盐水组，EGCG 组，MicroRNA-34a 组和 EGCG+MicroRNA-34a 联合组的中位生存期分别为 15，20，19，34 d，联合给药能够显著延长荷瘤裸鼠的生存期。

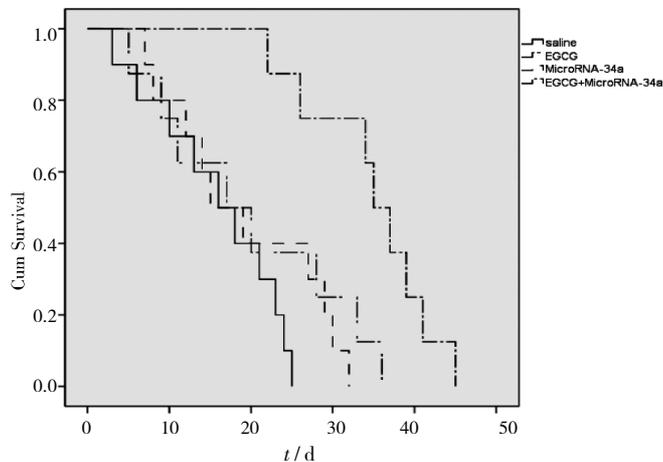


图 2 各组荷瘤小鼠的 kaplan-meier 曲线

Figure 2 The curve of kaplan-meier in tumor-bearing mice after treatment with different drugs

### 3 讨论

骨肉瘤是青少年最常见的原发性恶性肿瘤，占原发恶性骨肿瘤的 22.36%<sup>[6]</sup>。目前对骨肉瘤的治疗主要包括手术治疗和药物化疗。然而化疗药物使用剂量普遍偏大，往往对患者机体其他组织或器官正常细胞仍存造成严重的毒副作用<sup>[7-8]</sup>。中药联合其他药物干预应用于肿瘤的治疗，对于减轻临床症状，延长生存期，显示出良好的治疗效果和应用前景<sup>[9]</sup>。MicroRNA-34a 是当前被广大学者重点关注的抑癌基因，已经被广泛用于肺癌<sup>[10]</sup>、前列腺癌<sup>[11]</sup>和胶质瘤<sup>[12]</sup>的治疗研究。然而在研究过程中也发现了 MicroRNA-34a 在体外对肿瘤细胞具有良好的抑制作用，然而在体内疗效欠佳<sup>[13]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯是一种被广泛研究的抗肿瘤中药提取物。有研究显示表没食子儿茶素没食子酸酯对包括肺癌<sup>[14]</sup>、肝癌<sup>[15]</sup>和胃癌<sup>[16]</sup>在内的多种肿瘤细胞具有良好的抑制作用，是一种优良的抗肿瘤中药提取物。本研究将 EGCG 和 MicroRNA-34a 联合用于骨肉瘤的治疗研究。

研究结果表明，EGCG 和 MicroRNA-34a 各自都能对骨肉瘤细胞产生增殖抑制作用。EGCG 联合 MicroRNA-34a 对骨肉瘤的增殖抑制作用强于 EGCG 和 MicroRNA-34a 单独干预组，二者能够发挥协同增效作用。EGCG 能够促进 MicroRNA-34a 诱导 MG63 细胞凋亡，这与肿瘤细胞增殖抑制作用结果相一致。体内荷瘤鼠治疗实验结果显示，与生理盐水组和各单独给药组相比，联合给药都能够有效延长荷瘤裸鼠的中位生存期。

综上所述，EGCG 联合 MicroRNA-34a 能够增强对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用和诱导细胞凋亡，EGCG 联合 MicroRNA-34a 是一种潜在的骨肉瘤治疗方法。

### 参考文献：

- [1] Yu WX, Zhang ZC. Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19 promotes osteosarcoma growth and metastasis and associates with prognosis[J]. European Journal of Cancer, 2014, 50(6): 1125-1136.
- [2] Yao Q. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for enhancing the brain delivery[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 419(1): 85-95.
- [3] Chen Y. Nanoparticles Modified with Tumor-Targeting scFv Deliver siRNA and miRNA for Cancer Therapy [J]. Mol. Ther, 2010, 18: 1650-1656.
- [4] Shi SJ. Systemic delivery of microRNA-34a for cancer stem cell therapy [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2013, DOI: 10.1002/anie.201208077.

- [5] 刘逸飞, 胡玲娜, 吴兴新, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对肝星状细胞 LX-2 中 STAT1 信号的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(4): 355-359
- [6] Kuai, R. Targeted Delivery of Cargoes into a Murine Solid Tumor by a Cell-Penetrating Peptide and Cleavable Poly (ethylene glycol) Comodified Liposomal Delivery System via Systemic Administration[J]. Mol. Pharmaceutics, 2011, 8(6): 2151-2161.
- [7] 卢坤. 人骨肉瘤细胞特异性结合肽的筛选及验证[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(5): 647-650.
- [8] Jiang XY. Solid tumor penetration by integrin-mediated pegylatedpoly ( trimethylene-carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel [J]. Biomaterials, 2013, 34(6): 1739-1746.
- [9] 张寒, 梁晓莉, 贾敏, 等. 白藜甲醇提取物对骨髓瘤细胞 SP20 增殖及凋亡的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 239-241.
- [10] 赵欣. 载 microRNA-34a 脂质体靶向治疗肺癌干细胞的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(1): 68-71.
- [11] Liu C. The microRNA miR-34a Inhibits Prostate Cancer Stem Cells and Metastasis by Directly Repressing CD44[J]. Nat. Med, 2011, 17: 211-215.
- [12] Gao HL, Shuai Q, Zhi Y, et al. A cascade targeting strategy for brain neuroglial cells employing nanoparticles modified with angiopep-2 peptide and EGFP-EGF1 protein [J]. Biomaterials, 2011, 32(33): 8669-8675.
- [13] Guo J, Gao X, Su L, et al. Aptamer-functionalized PEGPLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery[J]. Biomaterials, 2011, 32(31): 8010-8120.
- [14] Yun J, Song Y, Zhu X, et al. Goblet cell-targeting nanoparticles for oral insulin delivery and the influence of mucus on insulin transport [J]. Biomaterials, 2011, 33(5): 1-10.
- [15] Chen Y, Zhu X, Zhang X, et al. Nanoparticles Modified with Tumor-Targeting scFv Deliver siRNA and miRNA for Cancer Therapy [J]. Mol. Ther, 2010, 18(9): 1650-1656.
- [16] Gao JQ, Lv Q, Li LM, et al. Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes [J]. Biomaterials, 2013, 34(22): 5628-5639.

(编辑: 修春)

## 奥瑞凝胶抗炎作用及对反流性食管炎模型大鼠食管组织 IL-8 的影响

段飞<sup>1,2</sup>, 魏明<sup>2</sup>, 邵明义<sup>2</sup>, 王小晓<sup>2</sup> (1. 湖北中医药大学基础医学院, 湖北 武汉 430065; 2. 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450008)

**摘要:** **目的** 观察奥瑞凝胶的抗炎作用及其对反流性食管炎(RE)模型大鼠白细胞介素-8(IL-8)的影响。**方法** 以二甲苯所致小鼠耳肿胀、白细胞游走抑制及棉球肉芽肿为炎症指标, 观察奥瑞凝胶的抗炎作用; 用半幽门结扎加贲门肌切开术复制 RE 大鼠模型, 观察奥瑞凝胶对 RE 食管黏膜组织中 IL-8 的影响。**结果** 与模型组比较, 奥瑞凝胶高、中、低剂量组能明显抑制耳肿胀( $P < 0.05$ )和白细胞游走( $P < 0.05$ ), 肉芽组织含量显著降低( $P < 0.05$ ); 奥瑞凝胶各组组织中 IL-8 含量明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** 奥瑞凝胶具有明显的抗炎作用, 其作用机制可能与降低食管组织中 IL-8 的含量有关。

**关键词:** 奥瑞凝胶; 反流性食管炎; 抗炎; 白细胞介素-8

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0064-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.016

### Effect of Ori Gel on Anti-inflammatory and IL-8 in Esophagus of Reflux Esophagitis Model Rats

DUAN Fei<sup>1,2</sup>, WEI Ming<sup>2</sup>, SHAO Mingyi<sup>2</sup>, WANG Xiaoxiao<sup>2</sup> (1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065 Hubei, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008 Henan, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the anti-inflammatory effect of Ori gel and its effect on interleukin 8 (IL-8) of reflux esophagitis (RE) rats. **Methods** The anti-inflammatory effect of Ori gel was evaluated by observing xylene-induced mouse ear swelling, rat white blood cell migration inhibition, and cotton-ball induced rat granuloma.

**收稿日期:** 2014-09-12

**作者简介:** 段飞, 男, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病, 中医证候规范化及其方法学研究。Email: kybduanfei@126.com。通讯作者: 魏明, 主任医师, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病及其疗效评价。Email: wmm1383718@126.com。

**基金项目:** 河南省科技厅重点科技攻关项目(082102330025); 河南中医学院科技创新人才基金(2013XCXRC05); 河南中医学院科技创新团队基金(2011XCXTD04)。