

棕榈酸及亚油酸对人成骨肉瘤细胞 MG63 作用的研究

王筱菁 李万根 苏杭 苏涛

摘要：目的 探讨棕榈酸及亚油酸对人成骨肉瘤细胞 MG 63 的作用。方法 取对数生长期的 MG 63 细胞分 5 组进行干预，分别是：①对照 (CON) 组；②棕榈酸 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组；③棕榈酸 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组；④棕榈酸 $10.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组；⑤棕榈酸 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 亚油酸 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。干预 24 h 后用 AO/PI 荧光双染和 TUNEL 法观察细胞凋亡的形态学改变；用 Annexin-V/FITC 流式细胞技术检测早期细胞凋亡；用单细胞凝胶电泳评估细胞损伤和凋亡情况。结果 随着棕榈酸浓度的增加，细胞凋亡比例增加，呈浓度梯度效应。棕榈酸组细胞凋亡百分比明显高于对照组及同时给予亚油酸组 (P 均 < 0.05)。结论 棕榈酸能引起成 MG 63 细胞凋亡，亚油酸则对其有保护作用。

关键词：棕榈酸；亚油酸；MG 63；细胞凋亡

Effects of palmitic acid and linoleic acid on MG 63 WANG Xiaojing, LI Wangen, SU Hang, SU Tao. Dept. of Endocrinology, The 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China

Abstract : Objective To investigate the effects of palmitic acid (PA) and linoleic acid (LA) on MG 63. **Methods**

MG 63 were divided into five groups: control group (CON); PA $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; PA $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; PA $10.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; PA $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + LA $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group. After medicine intervention for 24 hours, we applied double labeled Annexin-V/FITC and PI by flow cytometric analysis to detect early apoptosis. DNA damage was measured by comet assay, scoring by the CASPs image analysis system. Morphological evidence for apoptosis induced by PA were displayed by AO/PI staining and then scanned using a confocal laser scanning microscopy. We applied TUNEL to observe the late apoptosis of MG 63. **Results** Apoptosis in PA $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group were both increased as compared to that in control group ($P < 0.05$) and in PA $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + LA $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group ($P < 0.05$). **Conclusion** PA induce a dose-dependent increase in apoptosis of MG 63 and LA can prevent it.

Key words: Palmitic acid; Linoleic acid; MG 63; Apoptosis

大量的流行病学调查发现骨质疏松症常和动脉粥样硬化并存。著名的 Framingham^[1] 研究就发现，女性冠心病的发病危险性与掌骨的皮质骨面积呈负相关，近年有学者提出骨密度可以作为冠心病的独立预测因子^[2]。大量使用糖皮质激素后能引起血脂明显升高，同时骨细胞内出现脂滴，逐渐扩大以致骨细胞碎裂、坏死，最终导致股骨头坏死^[3]。多项临床研究发现他汀类降脂药能促进骨形态发生蛋白-2

的表达，改善骨代谢，从而降低髌部骨折的危险性^[4]。动物实验还发现 n-3 脂肪酸能增加皮质骨密度，改善悬吊大鼠的骨密度^[5]。我们前期的研究发现，绝经后妇女的骨密度与血甘油三酯水平呈负相关^[6]。这些均说明骨代谢与脂代谢之间有密切的关系。本研究利用体外培养的人成骨肉瘤细胞 MG 63 探讨棕榈酸及亚油酸对该细胞凋亡的影响及其浓度效应。

1 材料和方法

1.1 材料

MG 63 细胞株购自中山医科大学细胞库，H-DMEM L 谷氨酰胺购自 GibcoBRL 公司，棕榈酸 (palmitic acid, PA)、亚油酸 (linoleic acid, LA) 和低熔

基金项目：广东省卫生科研基金 (A2004287)，广州市教育局科研基金 (20041034)，广州医学院科研基金 (2006ZR011)

作者单位：510260 广州，广州医学院第二附属医院内分泌科 (王筱菁、李万根)，广州医学院第二附属医院分子实验室 (苏杭)，广州医学院神经病研究所 (苏涛)

通讯作者：李万根，Email: liwg66@yahoo.com

点琼脂糖凝胶购自 Sigma 公司,胎牛血清购自 TBD 公司,胰蛋白酶、吖啶橙(AO)、碘化丙啶(PI)购自 AMRESCO 公司,原位细胞凋亡检测试剂盒购自 Roche 公司,Annexin-V/FITC 凋亡试剂盒购自 Bind 公司。

1.2 方法

1.2.1 MG 63 细胞的培养 :MG 63 细胞用含 10% 胎牛血清的无酚红 H-DMEM 培养基培养,并静置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中。隔天全量换液,每 3 天用 0.25% 胰酶消化,以 1:3 比例传代。

1.2.2 MG 63 细胞的药物干预 :取对数生长期的 MG 63 细胞以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板,加入 2 mL 新鲜培养液,预培养 1 d 后,分为 5 组用含 0.5% BSA、3% FBS DMEM 的基础培养基加下列药物进行干预:①对照(CON)组;②PA 1.0×10^{-4} mol·L⁻¹(PA 1.0)组;③PA 5.0×10^{-4} mol·L⁻¹(PA 5.0)组;④PA 10.0×10^{-4} mol·L⁻¹(PA 10.0)组;⑤PA 5.0×10^{-4} mol·L⁻¹ + LA 1.0×10^{-5} mol·L⁻¹(PA 5.0 + LA)组。

1.2.3 用 AO/PI 荧光双染法检测 MG 63 凋亡情况 :药物干预 24 h 后弃去培养基,用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 洗 1 遍,分别加入 1 mg·mL⁻¹ AO,1 mg·mL⁻¹ PI,用 PBS 稀释至终浓度为 10 μg·mL⁻¹,行 AO/PI 双染 5 min, PBS 洗 2 遍,立即置于共聚焦显微镜下共定位检测

MG 63 凋亡情况并拍照。

1.2.4 TUNEL 法光镜下检测 MG 63 晚期凋亡情况 :将无菌盖玻片置于 6 孔培养板内,将处于对数生长期的 MG 63 细胞接种于培养孔内制成细胞爬片,分组进行上述药物干预 24 h 后,弃去培养基,4% 多聚甲醛固定 30 min,用原位细胞凋亡检测试剂盒,AP 法检测细胞凋亡,于光学显微镜下随机挑选视野观察并拍照。

1.2.5 流式细胞技术检测 MG 63 早期凋亡情况 :依方法 1.2.2 处理后弃去培养基,用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 洗 2 遍,用 0.25% 胰酶消化 2 min,待胞质回缩,用含血清的培养基终止。离心 1000 r/min 5 min,尽量除去上清,用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。用 Annexin-V/FITC 凋亡试剂盒在流式细胞仪上检测 MG 63 细胞早期凋亡情况。

1.2.6 单细胞凝胶电泳检测 MG 63 凋亡 :参照 Singh^[7]方法并改良,具体操作步骤如下:①样本的制备:药物干预 24 h 后消化细胞,制成浓度为 1×10^5 /mL 的细胞悬液;②制胶:将细胞悬液与 1% 低熔点琼脂糖凝胶以 1:3 比例混匀后平铺在带槽磨砂玻片上,静置于 4℃ 暗盒内 10 min 待凝固;③裂解:待胶凝固后将玻片小心浸入碱性裂解液中 4℃ 避光裂解 1.5 h,使细胞膜、核膜破裂。(碱性裂解液组成:

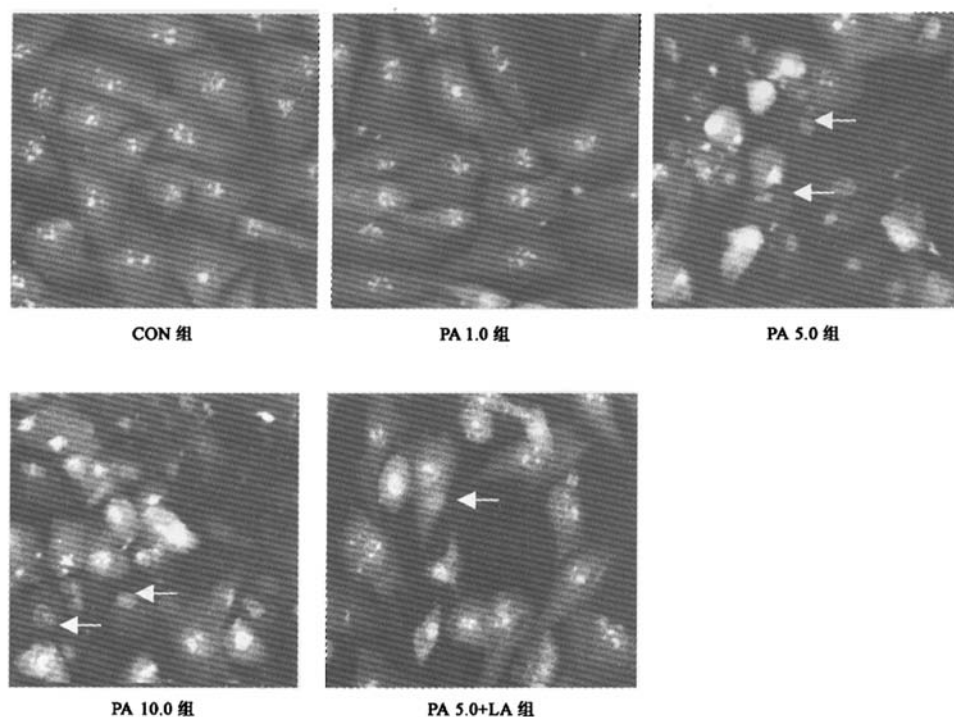


图 1 MG 63 经不同浓度 PA 和 PA + LA 处理后凋亡细胞(箭头所示)(×100)

NaCl $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Na_2EDTA $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris base $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 临用前加入 1% TritonX-100, 10% DMSO) ;④解旋:取出玻片,用 4°C 蒸馏水漂洗 2 遍,放入电泳缓冲液(NaOH $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Na_2EDTA $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 13)中 4°C 避光解旋 20 min,使 DNA 双螺旋结构解开 ;⑤电泳:取出玻片,放入盛有电泳缓冲液的水平电泳槽内 4°C 避光电泳 30 min,电泳条件是 25 V, 200 mA ;⑥漂洗:关掉电源,取出玻片,置于 4°C 中和缓冲液中漂洗 2 遍 ;⑦染色:在胶上滴加 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭,于 4°C 暗盒内染色 10 min,吸去多余的染色液,尽快置于共聚焦荧光显微镜下观察并摄像 ;⑧图像采集和分析:用 CASP 软件分析采集到的图像,计算机将自动计算尾矩(Olive Tail Moment, OTM = 尾部光密度 % $\times$ 头重心与尾中心之间的距离)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,流式细胞计数结果采用单因素方差分

析,组间比较用最小有意义 t 检验;单细胞凝胶电泳结果两两比较采用 Mann-Whitney 两独立样本秩和检验,检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 AO/PI 双染检测细胞凋亡

共聚焦显微镜下观察可见活细胞的细胞核呈弥漫均匀的绿色荧光,凋亡细胞为橙色,可见核固缩,晚期凋亡细胞和死亡细胞核染色质为红色并呈固缩状或圆珠状(箭头所示)。随着 PA 浓度增加,凋亡细胞明显增多。而 PA 5.0 + LA 组较 PA 5.0 组凋亡细胞明显减少,见图 1。

2.2 TUNEL 法检测细胞凋亡

光学显微镜下观察可见伊红复染后正常细胞的胞核和胞浆均染成浅红色,凋亡细胞的细胞核呈蓝黑色致密浓染、核固缩,甚至核碎裂(箭头所示)。随着 PA 浓度增加,凋亡细胞明显增多,而 PA 5.0 + LA 组较 PA 5.0 组凋亡细胞有所减少,见图 2。

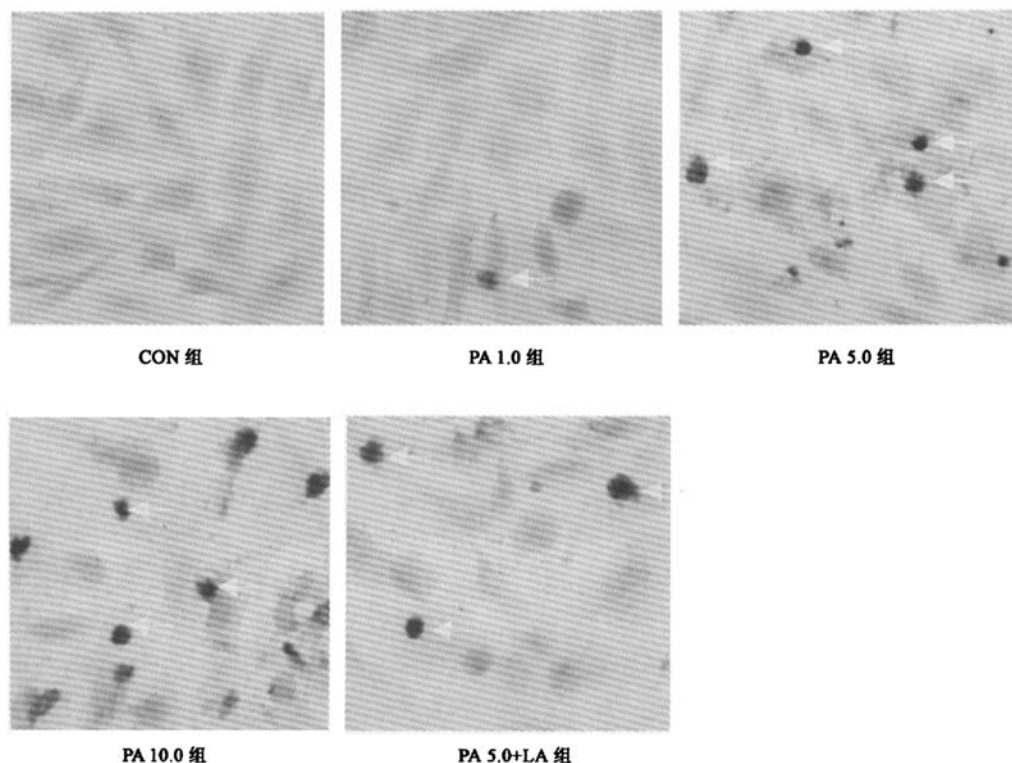


图 2 MG 63 经不同浓度 PA 和 PA + LA 处理后凋亡细胞(箭头所示)($\times 100$)

2.3 Annexin-V/FITC 检测细胞凋亡

通过流式细胞技术检测凋亡细胞(Annexin-V⁺)的百分比、死亡细胞(Annexin-V⁺ /FITC⁺ 双阳)的百分比以及总死亡细胞(总死亡 = 凋亡 + 双阳)的百分

比见表 1。

结果表明,对照组、PA 5.0 组、PA 5.0 + LA 组之间凋亡细胞百分比有显著性差异($P < 0.01$)。PA 组细胞凋亡百分比明显高于对照组及同时给予 LA

组。对照组、PA 1.0 组、PA 5.0 组、PA 5.0 + LA 组之间总死亡细胞百分比差异有显著性($P < 0.01$)。同时给予 LA 组总死亡细胞百分比明显低于单纯给予 PA 组($P < 0.01$)。

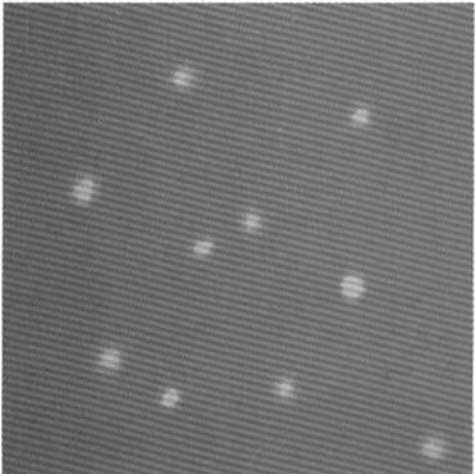
表 1 PA 及 LA 对 MG 63 细胞凋亡率及死亡率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

项目	CON	PA 1.0	PA 5.0	PA 5.0 + LA
凋亡	1.94 ± 0.34	9.87 ± 2.06*	19.87 ± 4.67**	11.62 ± 3.73**#
双阳	0.91 ± 1.19	3.60 ± 1.26	5.61 ± 4.09	5.37 ± 3.83
总死亡	2.09 ± 0.23	13.47 ± 0.86**	25.47 ± 2.17**	17.00 ± 0.97**##

注 :与 CON 比较 : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 PA 5.0 比较 : # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 单细胞凝胶电泳检测细胞凋亡

结果表明 ,PA 5.0 组、PA 10.0 组、PA 5.0 + LA 组 OTM 值较对照组差异有显著性($P < 0.01$)。随着 PA 浓度的增加 ,OTM 值逐渐递增 ,呈浓度梯度效应。



对照组

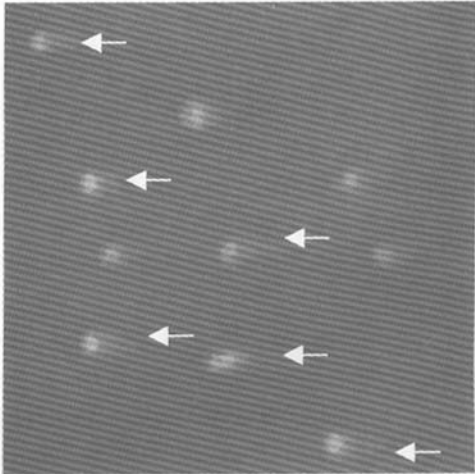
PA 5.0 + LA 组 OTM 值较 PA 5.0 组明显降低 ,差异有显著性($P < 0.01$)。PA 1.0 组与对照组之间差异尚无显著性($P > 0.05$) ,见表 2。

表 2 PA 及 LA 对 MG 63 细胞 OTM 值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	N	OTM
CON	30	0.22 ± 0.25
PA 1.0	30	0.34 ± 0.29
PA 5.0	30	4.64 ± 1.22**
PA 10.0	30	8.24 ± 2.20**
PA 5.0 + LA	30	2.80 ± 0.91**##

注 :与 CON 比较 : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 PA 5.0 比较 : # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

荧光显微镜下观察可见对照组 DNA 分子聚集在细胞核 ,呈红色圆球形 ,几无拖尾。而 PA 5.0 组及 PA 10.0 组 DNA 碎片经电泳扩散后向阳极移动 ,在细胞核周围明显拖尾 ,形似“彗星” ,见图 3。



PA 5.0 组

图 3 单细胞凝胶电泳 ,PA 5.0 组见典型的“彗星”图像(箭头所示)(× 100)

3 讨论

骨质疏松症和动脉粥样硬化是绝经后妇女的常见病且常常共存 ,血脂异常可能是二者共同的病理生理基础之一。我们对广州地区绝经后妇女的研究发现 ,受试对象的甘油三酯水平普遍升高 ,且甘油三酯水平与骨密度呈负相关^[6]。本研究显示 PA 5.0 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ 浓度干预 24 h 就能引起 MG 63 细胞的凋亡比例明显增加 ,与国内报道的 PA 引起胰岛细胞凋亡的浓度(4.0 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹)基本一致^[8]。且随着 PA 浓度的增加 ,对 MG 63 细胞的毒性增强。而在低浓度时(PA 1.0 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹) ,细胞凋亡百分比与对照组差异无显著性 ,说明低浓度时 ,PA 尚

不构成对 MG 63 细胞的毒性 ,当浓度增加到一定范围内 ,PA 对 MG 63 细胞的毒性作用具有明显的浓度效应关系。而 LA 能够有效的改善 PA 对 MG 63 细胞的致凋亡作用。我们的实验结果说明体外高脂环境时能直接引起 MG 63 细胞的凋亡增加 ,能从一定角度解释我们对人群的体内研究结果 ,绝经后妇女载脂蛋白 B、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯水平均高于绝经前女性 ,故绝经后妇女更容易罹患骨质疏松。

目前关于 PA 引起细胞凋亡的机理国外报道不一 ,有学者认为 PA 是通过上调神经酰胺和诱导型一氧化氮合酶的表达 ,抑制一氧化氮生成对细胞产生损伤 ,但目前的观点更趋向于脂质的氧化应激损

伤引起细胞凋亡,应用抗氧化剂能减轻细胞损伤的程度^[9]。

LA 是一类 n-6 多聚不饱和脂肪酸,分子中含有多个不饱和双键。Beeharry^[10]认为 LA 的作用主要有两个方面,它一方面作为脂质过氧化的底物分子,另一方面能抑制氧化应激引起的过氧化损伤。PA 引起细胞凋亡是多途径的,而不仅仅是氧化应激。LA 通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶途径在早期阻断 DNA 损伤,发挥其保护作用。我们在预实验中发现低浓度($1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和高浓度($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 LA 与 PA 共培养时,细胞凋亡均比单纯 PA 组要多,可能是低浓度时,LA 尚不能逆转 PA 的致凋亡损伤,而高浓度时,则作为脂质过氧化的底物分子,通过自身过氧化来加重氧化应激损伤。

【参 考 文 献】

- [1] Samelson EJ, Kiel DP, Broe KE, et al. Metacarpal cortical area and risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Epidemiol*, 2004, 159(6) :589-595.
- [2] Marcovitz PA, Tran HH, Franklin BA, et al. Usefulness of Bone Mineral Density to Predict Significant Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol* 2005 96 :1059-1063.

- [3] Fisher DE, Bickel WH. Corticosteroid-induced avascular necrosis. A clinical study of seventy-seven patients. *J Bone Joint Surg Am*, 1971, 53(5) :859-873.
- [4] Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, et al. Compactin and simvastatin but not pravastatin induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(3) :688-692.
- [5] 郑冬梅,白树民,黄纪明,等.膳食多不饱和脂肪酸(n-6)(n-3)不同比率对尾悬吊大鼠骨代谢的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(3) :284-287.
- [6] 李万根,陈澍,武兆忠,等.绝经后妇女血脂水平及其与骨密度的关系. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(2) :193-194.
- [7] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988, 175(1) :184-191.
- [8] 张丽,高聆,梁军,等.棕榈酸对胰岛的脂毒性及非诺贝特的保护作用. *中华内分泌代谢杂志*, 2005, 21(2) :155-158.
- [9] Beeharry N, Lowe JE, Hernandez AR, et al. Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research*, 2003, 530 :27-33.
- [10] Beeharry N, Chambers JA, Green IC. Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. *Apoptosis*, 2004, 9 :599-607.

(收稿日期:2007-01-08)