

鸦胆子苦醇通过 CC 趋化因子配体 2-C-C 趋化因子受体 2 信号通路对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响

李浩¹ 戎帅¹ 刘连涛¹ 李克伟^{1△}

[摘要] 目的:探讨鸦胆子苦醇(BRU)调节 CC 趋化因子配体 2(CCL2)-C-C 趋化因子受体 2(CCR2)信号通路对骨肉瘤(OS)细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响。方法:将骨肉瘤细胞系 MG-63 分为 MG-63 组(未处理的 MG-63 细胞)、L-BRU 组(25 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 MG-63 细胞)、M-BRU 组(50 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 MG-63 细胞)、H-BRU 组(75 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 MG-63 细胞)、GW0742 组(1 μ mol/L CCL2-CCR2 信号通路激活剂 GW0742 处理 MG-63 细胞)、H-BRU+GW0742 组(1 μ mol/L GW0742 和 75 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 MG-63 细胞),MTT 法检测鸦胆子苦醇对正常人成骨细胞系 hFOB1.19 细胞的毒性,CCK8 法检测 MG-63 细胞增殖,流式细胞仪检测 MG-63 细胞、CD8+T 细胞凋亡,ELISA 法检测外周血单个核细胞(PBMC)上清液 IFN- γ 、TNF- α 水平,Western Blot 法检测 CCL2-CCR2 通路蛋白以及凋亡相关蛋白水平。结果:0~500 nmol/L 鸦胆子苦醇对 hFOB1.19 细胞无明显毒性影响;与 MG-63 组相比,L-BRU 组、M-BRU 组、H-BRU 组光密度(OD)值,Bcl-2、CCL2、CCR2、PD-L1 蛋白水平及 CD8+T 细胞的凋亡率均显著降低($P<0.05$),凋亡率,IFN- γ 、TNF- α 水平及 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平均显著升高($P<0.05$),而 GW0742 组以上指标趋势相反;与 H-BRU 组相比,H-BRU+GW0742 组光密度值,Bcl-2、CCL2、CCR2、PD-L1 蛋白水平及 CD8+T 细胞的凋亡率均显著增加($P<0.05$),凋亡率,IFN- γ 、TNF- α 水平及 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平均显著降低($P<0.05$)。结论:鸦胆子苦醇可能通过抑制 CCL2-CCR2 信号通路对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和免疫逃逸产生影响。
[关键词] 鸦胆子苦醇;骨肉瘤;增殖;凋亡;免疫逃逸;CC 趋化因子配体 2-C-C 趋化因子受体 2 信号通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2023)12-0001-06

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.231201

Effect of Brusatol on the Proliferation, Apoptosis and Immune Escape of Osteosarcoma Cells by CCL2-CCR2 Signal Pathway

LI Hao¹ RONG Shuai¹ LIU Liantao¹ LI Kewei^{1△}

¹Department of Pediatric Orthopedics, Shijiazhuang Third Hospital, Shijiazhuang 050011, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of brusatol (BRU) on the proliferation, apoptosis and immune escape of osteosarcoma (OS) cells by regulating CC chemokine ligand 2 (CCL2)-C-C chemokine receptor 2 (CCR2) signal pathway.

Methods: The osteosarcoma cell line MG-63 were divided into MG-63 group (untreated MG-63 cells), L-BRU group (MG-63 cells treated with 25 nmol/L BRU), M-BRU group (MG-63 cells treated with 50 nmol/L BRU), H-BRU group (MG-63 cells treated with 75 nmol/L BRU), GW0742 group (MG-63 cells treated with 1 μ mol/L CCL2-CCR2 signal pathway activator GW0742), and H-BRU+GW0742 group (MG-63 cells treated with 1 μ mol/L GW0742 and 75 nmol/L BRU), the MTT method was used to detect the toxicity of BRU to normal human osteoblast line hFOB1.19 cells, CCK8 method was applied to detect MG-63 cell proliferation, flow cytometry was applied to detect apoptosis of MG-63 cells and CD8+T cells, ELISA method was applied to detect the levels of IFN- γ and TNF- α in PBMC supernatant, and Western Blot was applied to detect the levels of CCL2-CCR2 pathway proteins and apoptosis-related proteins. **Results:** 0-500 nmol/L BRU

had no obvious toxic effect on hFOB1.19 cells. Compared with MG-63 group, the OD value, Bcl-2, CCL2, CCR2, PD-L1 protein levels and the apoptosis rate of CD8+T cells in L-BRU group, M-BRU group and H-BRU group were obviously lower ($P<$

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(20191425)

¹ 石家庄市第三医院小儿骨科(石家庄,050011)

[△]通信作者 E-mail:10180737@qq.com

0.05), and the apoptosis rate, IFN- γ , TNF- α levels, Bax, Cleaved-Caspase-3 protein levels were obviously higher ($P < 0.05$), the trend of the above indicators in GW0742 group was opposite. Compared with H-BRU group, the OD value, Bcl-2, CCL2, CCR2, PD-L1 protein levels and the apoptosis rate of CD8+T cells in H-BRU+GW0742 group were obviously higher ($P < 0.05$), the apoptosis rate, IFN- γ , TNF- α levels, Bax, Cleaved-Caspase-3 protein levels were obviously lower ($P < 0.05$). **Conclusion:** BRU may affect the proliferation, apoptosis and immune escape of osteosarcoma cells by inhibiting CCL2-CCR2 signal pathway.

Keywords: brusatol; osteosarcoma; proliferation; apoptosis; immune escape; CCL2-CCR2 signal pathway

骨肉瘤(OS)是最常见的原发性骨恶性肿瘤,具有很高的局部浸润和转移倾向。尽管手术与化疗相结合极大地改善了骨肉瘤患者的预后,但转移性或复发性骨肉瘤的预后仍然不能令人满意^[1]。此外,化疗有许多副作用,并且在某些情况下由于化学耐药性而疗效低下,因此研究骨肉瘤的新疗法至关重要^[2]。癌细胞逃避免疫监视的能力在癌症复发和转移中起着关键作用,越来越多的证据表明,化疗后的肿瘤对抗肿瘤免疫力的能力增强^[3]。因此,研究骨肉瘤细胞免疫逃逸机制是必要的。鸦胆子苦醇(BRU)是中草药鸦胆子中的苦木素类三萜化合物,传统上用于治疗肠道炎症、腹泻、疟疾和癌症^[4]。鸦胆子苦醇不仅通过多种药理作用显示出潜在的肿瘤抑制作用(例如促进细胞凋亡),而且在多种癌症类型中(例如结肠癌)与化疗剂联合使用,克服化学耐药性方面表现出显著的协同抗肿瘤作用^[5]。有研究称CC趋化因子配体2(CCL2)与C-C趋化因子受体2(CCR2)相互作用,介导单核细胞和肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的趋化性,从而促进癌症进展^[6],而阻断CCL2-CCR信号传导对骨肉瘤小鼠和狗均具有治疗效果^[7]。对鸦胆子苦醇调节CCL2/CCR2轴对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和免疫逃逸是否产生影响进行了探索,期望可以为骨肉瘤的治疗提供潜在药物。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要材料

鸦胆子苦醇(货号为PB3229)购自北京普非生物科技有限公司;骨肉瘤细胞系MG-63(货号为MY-K5048)、正常人成骨细胞系(hFOB1.19,货号为MY-K5389)购自上海酶研生物科技有限公司;CCL2-CCR2信号通路激活剂GW0742(货号为HY-13928)购自MedChemExpress LLC;人外周血单核细胞(PBMC,货号为Sci-H637)购自上海圻明生物科技有限公司;CD8+T细胞(货号为0322061)购自北京汇智和源生物技术有限公司; γ 干扰素(IFN- γ)ELISA试剂盒(货号为EK-H10294)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒(货号为EK-H12145)购自北京博沃尔斯生物科技有限公司;CCK-8细胞增殖及毒性检测试剂盒(货号为CA1210)购自北京索莱宝科技有限公司;抗体Bax(货号为ab182733)、Bcl-2(货号为ab32124)、Cleaved-Caspase-3

(货号为ab2302)、PD-L1(货号为ab205921)、CCL2(货号为ab7202)、CCR2(货号为ab205921)购自Abcam。

1.2 细胞培养及分组

将购买的骨肉瘤细胞系MG-63和正常人成骨细胞系(hFOB1.19)在DMEM培养基(10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素链霉素)中培养,并在细胞密度达到90%时进行传代培养,对数生长期的细胞用于以下实验。

将MG-63细胞分为MG-63组(未做任何处理的MG-63细胞)、L-BRU组(25 nmol/L鸦胆子苦醇处理MG-63细胞)、M-BRU组(50 nmol/L鸦胆子苦醇处理MG-63细胞)、H-BRU组(75 nmol/L鸦胆子苦醇处理MG-63细胞)^[8]、GW0742组(1 μ mol/L CCL2-CCR2信号通路激活剂GW0742处理MG-63细胞)^[9]、H-BRU+GW0742组(1 μ mol/L GW0742和75 nmol/L鸦胆子苦醇处理MG-63细胞),培养24 h。

1.3 指标检测

1.3.1 MTT法检测鸦胆子苦醇对hFOB1.19细胞的毒性 收集hFOB1.19细胞悬液稀释至 5×10^4 个/mL,取20 μ L细胞悬液接种在96孔板上,培养24 h后,等细胞进入对数生长期添加不同浓度的鸦胆子苦醇(0, 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500 nmol/L)继续培养24 h,然后在每孔中加入浓度为5 mg/mL的MTT溶液25 μ L,室温孵育4 h后,加入100 μ L二甲基亚砜,充分震荡后测量570 nm处光密度(OD)值。

1.3.2 CCK8法检测MG-63细胞增殖 将各组药物处理后的MG-63细胞接种在96孔板上(5 000个细胞/孔),在培养48 h后每孔加入10 μ L CCK8溶液,继续培养2 h后,使用分光光度计测量450 nm处的光密度值。

1.3.3 流式细胞仪检测MG-63细胞凋亡 用胰蛋白酶消化各组MG-63细胞并收集。细胞用离心机以1 000 r/min离心10 min,并用冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两次;然后将细胞用5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L碘化丙啶(PI)在黑暗中染色5 min;最后通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

采用微孔双室共培养系统进行共培养。上腔接种各组MG-63细胞,下腔接种购买的CD8+T细胞,细胞培养箱培养24 h后,使用流式细胞仪检测CD8+T细胞的凋亡率。凋亡率= $[n_1(\text{凋亡细胞数})/n_2(\text{总细胞数})] \times 100\%$ 。

1.3.4 ELISA 试剂盒检测上清液 IFN- γ 、TNF- α 水平 通过植物血凝素(PHA) 处理激活购买的外周血单个核细胞(PBMC),随后与各组 MG-63 细胞共培养。按照 ELISA 试剂盒说明书检测在植物血凝素刺激下外周血单个核细胞释放的 IFN- γ 和 TNF- α 的水平。

1.3.5 Western Blot 检测 CCL2-CCR2 通路蛋白以及凋亡相关蛋白表达 用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液从细胞中提取总蛋白,通过 BCA 蛋白质测定试剂盒对蛋白质进行定量,并通过 SDS-PAGE 电泳进行分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。接下来用 5%脱脂牛奶封闭膜,加入一抗(Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase-3、PD-L1、CCL2、CCR2 和 GAPDH)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,加入二抗,TBST 缓冲液洗膜后加入显色剂,最后用 Image J 软件观察蛋白质条带。

1.4 统计学方法

用 SPSS 25.0 处理本研究数据,符合正态分布则以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两两组间差异比较采用 SNK- q 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鸦胆子苦醇对 hFOB1.19 细胞毒性的影响

由表 1 可知:0~500 nmol/L 鸦胆子苦醇对 hFOB1.19 细胞无明显毒性影响,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞活力的影响

与 MG-63 组相比,L-BRU 组、M-BRU 组及 H-BRU 组光密度值均显著减小,差异有统计学意义($P<0.05$),而 GW0742 组光密度值显著增大,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H-BRU 组相比,H-BRU+GW0742 组光密度值显著增大,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 鸦胆子苦醇对 hFOB1.19 细胞的毒性作用($\bar{x}\pm s,n=6$)

鸦胆子苦醇浓度/(nmol \cdot L $^{-1}$)	OD ₅₇₀
0	0.45 \pm 0.04
25	0.48 \pm 0.03
50	0.44 \pm 0.04
75	0.42 \pm 0.06
100	0.46 \pm 0.04
125	0.47 \pm 0.05
250	0.43 \pm 0.05
500	0.45 \pm 0.05

表 2 各组 MG-63 细胞增殖能力比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	光密度值
MG-63 组	0.87 \pm 0.09
L-BRU 组	0.71 \pm 0.10 ¹⁾
M-BRU 组	0.51 \pm 0.06 ¹⁾²⁾
H-BRU 组	0.33 \pm 0.03 ¹⁾²⁾³⁾
GW0742 组	0.97 \pm 0.09 ¹⁾
H-BRU+GW0742 组	0.80 \pm 0.08 ¹⁾
<i>F</i>	55.287
<i>P</i>	<0.001

注:1)与 MG-63 组比较, $P<0.05$;2)与 L-BRU 组比较, $P<0.05$;3)与 M-BRU 组比较, $P<0.05$;4)与 H-BRU 组比较, $P<0.05$ 。

2.3 鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞凋亡的影响

与 MG-63 组相比,L-BRU 组、M-BRU 组、H-BRU 组凋亡率及 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平均显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$);Bcl-2 蛋白水平均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);而 GW0742 组凋亡率及 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);Bcl-2 蛋白水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 H-BRU 组相比,H-BRU+GW0742 组凋亡率及 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);Bcl-2 蛋白水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1 和图 2 及表 3。

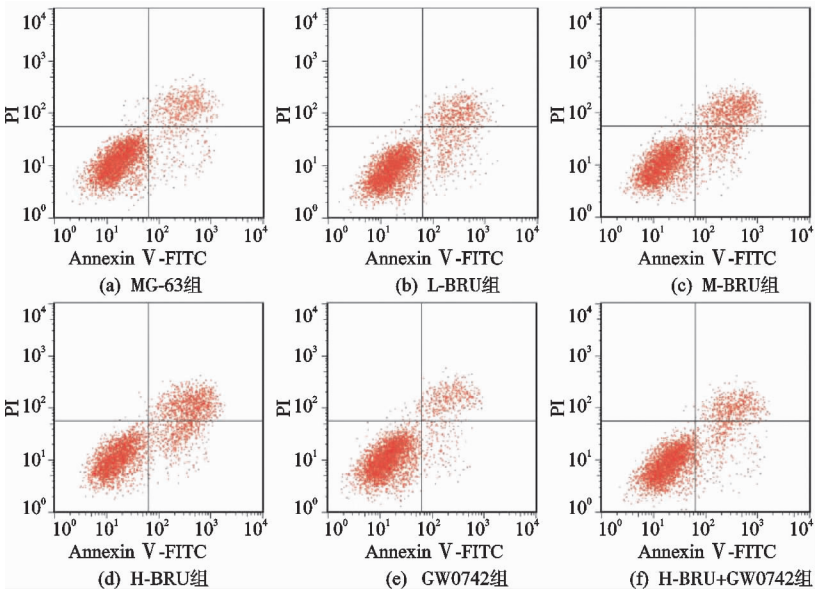


图 1 流式细胞仪检测 MG-63 细胞凋亡

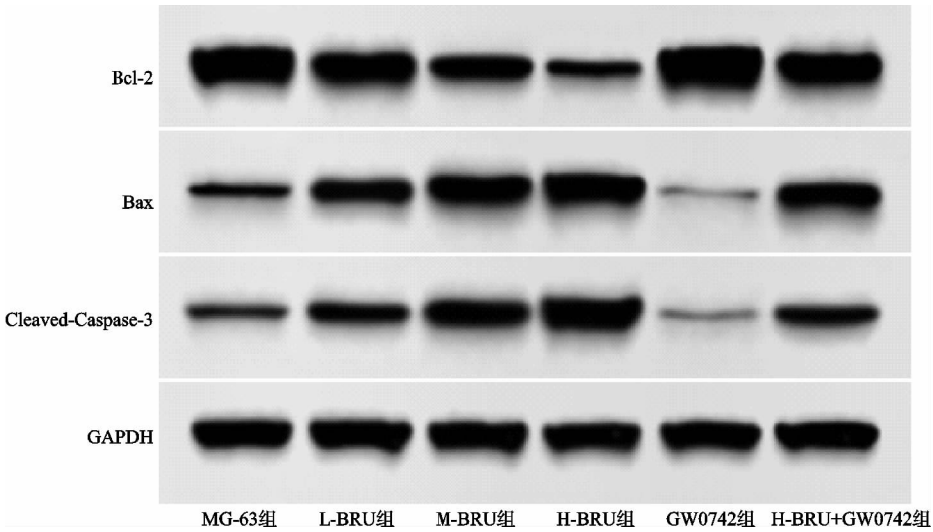


图 2 Western Blot 检测 MG-63 细胞凋亡蛋白表达

表 3 鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞凋亡率及凋亡相关蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	凋亡率/%	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Cleaved-Caspase-3/GAPDH
MG-63 组	14.13±1.21	1.42±0.17	0.38±0.03	0.36±0.02
L-BRU 组	19.53±1.82 ¹⁾	1.12±0.13 ¹⁾	0.74±0.08 ¹⁾	0.69±0.09 ¹⁾
M-BRU 组	24.31±2.37 ¹⁾²⁾	0.81±0.08 ¹⁾²⁾	1.05±0.13 ¹⁾²⁾	0.95±0.11 ¹⁾²⁾
H-BRU 组	29.93±3.21 ¹⁾²⁾³⁾	0.46±0.03 ¹⁾²⁾³⁾	1.32±0.15 ¹⁾²⁾³⁾	1.34±0.18 ¹⁾²⁾³⁾
GW0742 组	10.45±1.13 ¹⁾	1.77±0.19 ¹⁾	0.11±0.02 ¹⁾	0.13±0.01 ¹⁾
H-BRU+GW0742 组	17.95±1.79 ⁴⁾	1.16±0.13 ⁴⁾	0.70±0.06 ⁴⁾	0.61±0.06 ⁴⁾
F	70.054	70.963	135.952	116.622
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与 MG-63 组比较, $P<0.05$;2)与 L-BRU 组比较, $P<0.05$;3)与 M-BRU 组比较, $P<0.05$;4)与 H-BRU 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞免疫逃逸的影响

CD8+T 细胞与 MG-63 细胞共同培养后,CD8+T 细胞凋亡率见表 4,与 MG-63 组相比,L-BRU 组、M-BRU 组及 H-BRU 组 CD8+T 细胞的凋亡率均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),而 GW0742 组 CD8+T 细胞的凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H-BRU 组相比,H-BRU+GW0742 组 CD8+T 细胞的凋亡率显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 4 鸦胆子苦醇对 CD8+T 细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	凋亡率/%
MG-63 组	20.43±2.65
L-BRU 组	15.58±1.85 ¹⁾
M-BRU 组	11.23±1.33 ¹⁾²⁾
H-BRU 组	5.58±0.47 ¹⁾²⁾³⁾
GW0742 组	25.49±3.59 ¹⁾
H-BRU+GW0742 组	18.75±1.93 ⁴⁾
F	61.611
P	<0.001

注:1)与 MG-63 组比较, $P<0.05$;2)与 L-BRU 组比较, $P<0.05$;3)与 M-BRU 组比较, $P<0.05$;4)与 H-BRU 组比较, $P<0.05$ 。

植物血凝素刺激的人外周血单核细胞与 MG-63

细胞共同培养后,IFN- γ 和 TNF- α 水平见表 5,与 MG-63 组相比,L-BRU 组、M-BRU 组及 H-BRU 组 IFN- γ 和 TNF- α 水平均显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),GW0742 组 IFN- γ 和 TNF- α 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H-BRU 组相比,H-BRU+GW0742 组 IFN- γ 和 TNF- α 水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 5 鸦胆子苦醇对 IFN- γ 和 TNF- α 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IFN- γ / (ng·mL ⁻¹)	TNF- α / (ng·mL ⁻¹)
MG-63 组	1.62±0.15	1.46±0.17
L-BRU 组	2.00±0.19 ¹⁾	1.84±0.25 ¹⁾
M-BRU 组	2.54±0.35 ¹⁾²⁾	2.23±0.33 ¹⁾²⁾
H-BRU 组	3.53±0.42 ¹⁾²⁾³⁾	3.01±0.35 ¹⁾²⁾³⁾
GW0742 组	1.01±0.09 ¹⁾	1.05±0.12 ¹⁾
H-BRU+GW0742 组	1.93±0.20 ⁴⁾	1.77±0.19 ⁴⁾
F	65.605	43.923
P	<0.001	<0.001

注:1)与 MG-63 组比较, $P<0.05$;2)与 L-BRU 组比较, $P<0.05$;3)与 M-BRU 组比较, $P<0.05$;4)与 H-BRU 组比较, $P<0.05$ 。

与 MG-63 组相比,L-BRU 组、M-BRU 组及 H-BRU 组 PD-L1 蛋白水平均显著下降,差异有统计学

意义($P<0.05$),GW0742 组 PD-L1 蛋白水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H-BRU 组相比,

H-BRU+GW0742 组 PD-L1 蛋白水平显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3 和表 6。

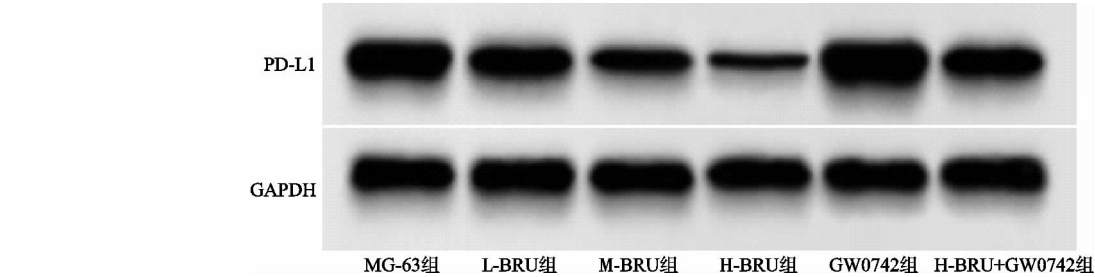


图 3 Western Blot 检测 MG-63 细胞中 PD-L1 水平

表 6 鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞中 PD-L1 水平的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	PD-L1/GAPDH
MG-63 组	1.37±0.16
L-BRU 组	1.06±0.14 ¹⁾
M-BRU 组	0.75±0.09 ¹⁾²⁾
H-BRU 组	0.41±0.03 ¹⁾²⁾³⁾
GW0742 组	1.73±0.19 ¹⁾
H-BRU+GW0742 组	1.09±0.12 ¹⁾
<i>F</i>	73.174
<i>P</i>	<0.001

注:1)与 MG-63 组比较, $P<0.05$;2)与 L-BRU 组比较, $P<0.05$;3)与 M-BRU 组比较, $P<0.05$;4)与 H-BRU 组比较, $P<0.05$ 。

2.5 鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞 CCL2-CCR2 通路蛋白水平的影响

由表 7 和图 4 可知:与 MG-63 组相比,L-BRU 组、M-BRU 组及 H-BRU 组 CCL2 和 CCR2 蛋白水平均显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$),GW0742

组 CCL2 和 CCR2 蛋白水平显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H-BRU 组相比,H-BRU + GW0742 组 CCL2 和 CCR2 蛋白水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 7 鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞中 CCL2 和 CCR2 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	CCL2/GAPDH	CCR2/GAPDH
MG-63 组	1.42±0.16	0.96±0.13
L-BRU 组	1.11±0.13 ¹⁾	0.73±0.09 ¹⁾
M-BRU 组	0.82±0.10 ¹⁾²⁾	0.51±0.07 ¹⁾²⁾
H-BRU 组	0.51±0.05 ¹⁾²⁾³⁾	0.29±0.04 ¹⁾²⁾³⁾
GW0742 组	1.78±0.24 ¹⁾	1.32±0.15 ¹⁾
H-BRU+GW0742 组	1.24±0.16 ⁴⁾	0.84±0.09 ⁴⁾
<i>F</i>	51.990	74.544
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:1)与 MG-63 组比较, $P<0.05$;2)与 L-BRU 组比较, $P<0.05$;3)与 M-BRU 组比较, $P<0.05$;4)与 H-BRU 组比较, $P<0.05$ 。

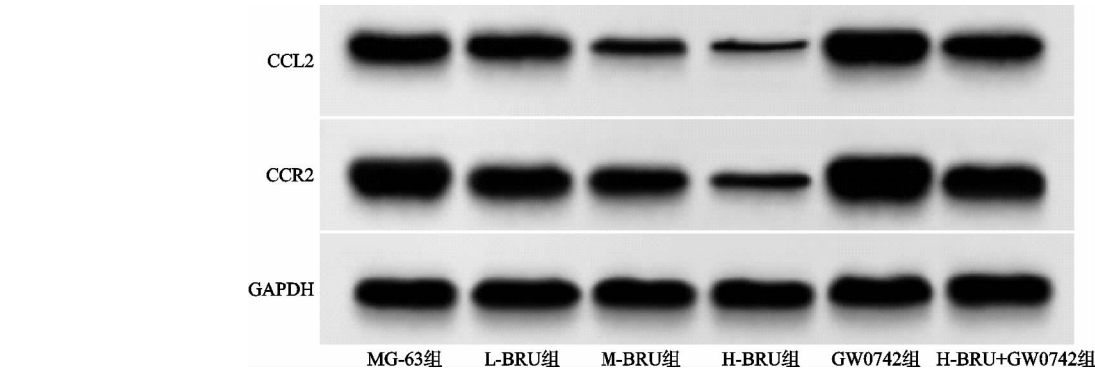


图 4 Western Blot 检测 MG-63 细胞中 CCL2 和 CCR2 蛋白水平

3 讨论

目前骨肉瘤的治疗策略包括手术切除和化疗。对骨骼发育不成熟的幼儿进行肿瘤切除手术存在挑战性,外科手术的选择应考虑肿瘤的位置和转移,以及神经血管浸润和功能障碍^[10]。至于化疗,由于化疗药物具有副作用且细胞存在化学耐药性,因而治疗效果较差^[2],因此开发新颖有效的治疗药物具有重要意义。鸦胆子苦醇在中国已普遍用于治疗各种类型的癌症,

例如肝细胞癌^[11]和结肠癌^[12],且有研究称鸦胆子苦醇可能是对抗化学耐药性和进一步发展为化疗药物有效佐剂的候选药物^[13],然而鸦胆子苦醇是否可用于骨肉瘤治疗仍有待确定。

3.1 鸦胆子苦醇可以抑制 MG-63 细胞增殖,促进细胞凋亡

癌细胞的增殖和分化对肿瘤侵袭很重要^[14],因此抑制骨肉瘤细胞增殖和促进细胞凋亡对于骨肉瘤治疗

至关重要。本研究发现鸦胆子苦醇可以以剂量依赖性的方式显著抑制骨肉瘤细胞的增殖,此外,鸦胆子苦醇对 hFOB1.19 无显著毒性作用,这表明鸦胆子苦醇可能是治疗骨肉瘤的相对安全的天然药物。Bcl-2 蛋白家族根据其功能可分为两类,一些基因(类似于 Bcl-2)可以抑制细胞凋亡,而其他基因(如 Bax)可以促进细胞凋亡^[15]。释放的凋亡分子 Bax 促进了 Caspase-3 的激活,从而诱导细胞凋亡^[16]。在本研究中,鸦胆子苦醇治疗后 MG-63 细胞 Bcl-2 蛋白水平显著下降,凋亡率及 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白水平均显著升高,表明鸦胆子苦醇可以促进骨肉瘤细胞凋亡,进而抑制其进展。

3.2 鸦胆子苦醇可以抑制 MG-63 细胞免疫逃逸

PD-L1 是免疫治疗研究中最受关注的分子,PD-L1 因其抑制 T 细胞功能的能力及其对肿瘤免疫逃逸的辅助作用而备受关注,PD-L1 有助于规避 CD8⁺T 细胞介导的免疫监视^[17]。Yan 等^[18]报道称下调 PD-L1 抑制非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖、侵袭和迁移,并且能够抑制 CD8⁺T 细胞的凋亡,并在与外周血单个核细胞共培养时诱导更高的 IFN- γ 和 TNF- α 水平。Chen 等^[19]也报道称 PD-L1 水平增加会加速非小细胞肺癌恶性进展和免疫逃逸。本研究结果显示,鸦胆子苦醇治疗后,MG-63 细胞 CD8⁺T 细胞凋亡率及 PD-L1 蛋白水平显著下降,IFN- γ 和 TNF- α 水平显著升高,与以上研究结论一致,表明鸦胆子苦醇可能抑制了骨肉瘤细胞的免疫逃逸,进而抑制其进展。

3.3 鸦胆子苦醇抑制 MG-63 细胞增殖和免疫逃逸,促进 MG-63 细胞凋亡,可能与 CCL2-CCR2 信号通路有关

肿瘤上 CCL2-CCR2 信号轴的研究已有多篇报道,Yang 等^[6]发现 CCL2-CCR2 轴募集肿瘤相关巨噬细胞,通过食管癌变中的 PD-1 信号诱导免疫逃逸。Liu 等^[20]也发现调节 CCL2 轴可以诱导小鼠抗肿瘤免疫,使免疫治疗对肝癌敏感。本研究结果显示,鸦胆子苦醇处理的 MG-63 细胞 CCL2 和 CCR2 蛋白水平显著下调,推测鸦胆子苦醇可能通过下调 CCL2-CCR2 信号轴来发挥抑制骨肉瘤发展的作用。为了进一步证实推测,用 CCL2-CCR2 信号通路激活剂 GW0742 处理 MG-63 细胞,结果发现 GW0742 的作用效果与鸦胆子苦醇的作用效果相反,且 GW0742 逆转了鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞的抑癌效果。

综上所述,鸦胆子苦醇可能通过抑制 CCL2-CCR2 信号传导抑制 MG-63 细胞增殖、免疫逃逸,促进 MG-63 细胞凋亡;且在本研究中,鸦胆子苦醇对 MG-63 细胞的影响效果呈现剂量相关性。本研究的不足是缺少临床研究,笔者将在后续研究中深入探索。

参考文献

- [1] CHEN C, XIE L, REN T, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs[J]. *Cancer Lett*, 2021, 500: 1-10.
- [2] HOSSEINI F, SHANEHBANDI D, SOLEIMANPOUR J, et al. Melatonin increases the sensitivity of osteosarcoma cells to chemotherapy drug cisplatin[J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2022, 72(6): 312-318.
- [3] SAMANTA D, PARK Y, NI X, et al. Chemotherapy induces enrichment of CD47/CD73/PDL1 immune evasive triple-negative breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(6): E1239-E1248.
- [4] CHEN H M, LAI Z Q, LIAO H J, et al. Synergistic anti-tumor effect of brusatol combined with cisplatin on colorectal cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1447-1454.
- [5] HE T, ZHOU F, SU A, et al. Brusatol: a potential sensitizing agent for cancer therapy from *brucea javanica*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114134.
- [6] YANG H, ZHANG Q, XU M, et al. CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 41-54.
- [7] REGAN D P, CHOW L, DAS S, et al. Losartan blocks osteosarcoma-elicited monocyte recruitment, and combined with the kinase inhibitor toceranib, exerts significant clinical benefit in canine metastatic osteosarcoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(4): 662-676.
- [8] DAI Z, CAI L, CHEN Y, et al. Brusatol inhibits proliferation and invasion of glioblastoma by down-regulating the expression of ECM1[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 775680.
- [9] DE LIMA C L, AMORIM B R, ROYER C, et al. Investigation of PPAR β/δ within human dental pulp cells: a preliminary in vitro study[J]. *PPAR Res*, 2021: 8854921.
- [10] HARRISON D J, GELLER D S, GILL J D, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(1): 39-50.
- [11] YE R, DAI N, HE Q, et al. Comprehensive anti-tumor effect of Brusatol through inhibition of cell viability and promotion of apoptosis caused by autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 962-973.
- [12] HUANG Q H, ZHANG J, CHO W C S, et al. Brusatol suppresses the tumor growth and metastasis of colorectal cancer via upregulating ARRDC4 expression through modulating PI3K/YAP1/TAZ pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154567.

186-188.

- [11] GUO X, LI H, FENG H, et al. Quality analysis of Ziziphi Spinosae Semen extracts based on high performance liquid chromatography quantitative fingerprint and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2021, 39(9): 989-997.
- [12] 张亚钦, 李辉, 武华红, 等. 父母身高对 7 岁以下儿童身高影响效应的研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2021, 29(6): 584-588.
- [13] NONAKA K, MURATA S, NAKANO H, et al. Association of low bone mass with decreased skeletal muscle mass: a cross-sectional study of community dwelling older women[J]. Healthcare, 2020, 8(3): 77-78.
- [14] 闻亮, 汪灏. 个体化营养教育在 0~6 岁儿童生长发育中的应用效果观察[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(2): 419-421.
- [15] 李子昂, 赵瑞兰, 赵芳芳, 等. 北京学龄儿童青少年身高增长与血压变化性别差异的 10 年纵向研究[J]. 中华预防医学杂志, 2020(12): 1378-1382.
- [16] 卫海燕. 从循证医学证据看生长激素促生长治疗的收益及风险[J]. 中国实用儿科杂志, 2021, 36(8): 607-612.
- [17] ARABZOZANI M, KHEYRANDISH S, RASTGAR A, et

al. A systematic review and meta-analysis of stature growth complications in β -thalassemia major patients[J]. Ann Glob Health, 2021, 87(1): 48.

- [18] 臧建成, 秦泗河. 下肢延长术并发症的分类与治疗策略[J]. 中华骨科杂志, 2021, (11): 728-736.
- [19] HAJZADEH G, GHAEMI N, HADJZADEHM A, et al. The effects of gonadotropin releasing hormone analog and a combination of gonadotropin-releasing hormone analog and recombinant human growth hormone on adult height in girls with early puberty[J]. Adv Biomed Res, 2019, 8: 57.
- [20] BERTELLONI S, MASSART F, MICCOLI M, et al. Adult height after spontaneous pubertal growth or Gn R Hanalog treatment in girls with early puberty: a meta-analysis[J]. Eur J Pediatr, 2017, 176(6): 697-704.
- [21] 卞振华, 张文明, 唐静月, 等. 基于血清代谢组学和网络药理学研究酸枣仁提取物治疗失眠的效应物质及作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 188-202.
- [22] 郭海波, 王慧. 酸枣仁汤治疗失眠现代机制研究进展与探讨[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2963-2966.
- [23] 林如意, 吴林, 赵瑾. 引气归元针法联合涌泉穴艾灸治疗围绝经期失眠症疗效及对患者血清白细胞介素-1 β 、5-HT、FSH 的影响[J]. 陕西中医, 2020, 41(6): 811-814.

(收稿日期: 2023-05-03)

(上接第 6 页)

- [13] OLAYANJU A, COPPLE I M, BRYAN H K, et al. Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity-implications for therapeutic targeting of NRF2[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 78: 202-212.
- [14] MAURI F, SCHEPKENS C, LAPOUGE G, et al. NR2F2 controls malignant squamous cell carcinoma state by promoting stemness and invasion and repressing differentiation[J]. Nat Cancer, 2021, 2(11): 1152-1169.
- [15] JIA X B, ZHANG Q, XU L, et al. Lotus leaf flavonoids induce apoptosis of human lung cancer A549 cells through the ROS/p38 MAPK pathway[J]. Biol Res, 2021, 54(1): 7-21.
- [16] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of Bcl-2 family proteins[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193.
- [17] SHAO L, HE Q, WANG J, et al. MicroRNA-326 attenu-

ates immune escape and prevents metastasis in lung adenocarcinoma by targeting PD-L1 and B7-H3 [J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 145-154.

- [18] YAN J, ZHU J, ZHU X, et al. Circ_0092012 knockdown restrains non-small cell lung cancer progression by inhibiting cell malignant phenotype and immune escape through microRNA-635/programmed death ligand 1 axis[J]. Bio-engineered, 2022, 13(5): 13929-13943.
- [19] CHEN Z, CHEN Z, XU S, et al. LncRNA SOX2-OT/miR-30d-5p/PDK1 regulates PD-L1 checkpoint through the mTOR signaling pathway to promote non-small cell lung cancer progression and immune escape[J]. Front Genet, 2021, 12: 674856.
- [20] LIU C, YANG Y, CHEN C, et al. Environmental eustress modulates β -ARs/CCL2 axis to induce anti-tumor immunity and sensitize immunotherapy against liver cancer in mice[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5725-5739.

(收稿日期: 2023-04-15)