

• 实验研究 •

山姜素调节 Wnt/ β -catenin 信号通路对骨肉瘤
细胞增殖及凋亡的影响陈晋东¹ 杨物鹏^{1△}

[摘要] 目的:探究山姜素调节无翅型 MMTV 整合位点家族成员(Wnt)/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路对骨肉瘤细胞增殖及凋亡的影响。方法:取人骨肉瘤细胞系 MG63,通过皮下接种建立裸鼠模型,将其与 MG63 细胞均随机分为空白组、山姜素组、氯化锂组、山姜素+氯化锂组,以山姜素与 Wnt 激活剂氯化锂分组干预后检测细胞体外凋亡、增殖以及凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达;测量裸鼠移植瘤的瘤体质量与体积后检测裸鼠肿瘤细胞增殖、凋亡以及凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达。结果:与空白组相比,山姜素组细胞凋亡率、TUNEL 阳性比、Bax 与 Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$),细胞活力、Edu 阳性率、瘤体质量与体积、Ki-67 阳性比、Bcl-2 与 Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达降低($P<0.05$);而氯化锂组各指标变化趋势与山姜素组相反($P<0.05$)。与山姜素组相比,山姜素+氯化锂组 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低($P<0.05$),细胞活力、Edu 阳性率、瘤体质量与体积、Ki-67 阳性比、Bcl-2 与 Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达升高($P<0.05$)。结论:山姜素可抑制骨肉瘤细胞增殖、诱导其凋亡,可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活实现的。

[关键词] 山姜素;Wnt/ β -catenin 信号通路;骨肉瘤;增殖;凋亡

[中图分类号] R738.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)12-0001-07

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.251201

The Effects of Alpinetin on the Proliferation and Apoptosis of
Osteosarcoma Cells by Regulating the Wnt/ β -catenin
Signaling PathwayCHEN Jindong¹ YANG Wupeng^{1△}

¹ Ordos Central Hospital, Ordos 017000, Inner Mongolia China.

Abstract Objective: To discuss the effects of alpinetin on the proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells by regulating the wingless-type MMTV integration site family (Wnt)/ β -catenin signaling pathway. **Methods:** Take human osteosarcoma cell line MG63 and establish a nude mouse model by subcutaneous inoculation, which was randomly divided into blank group, alpinetin group, lithium chloride group, and alpinetin+lithium chloride group. After intervention with alpinetin and Wnt activator lithium chloride, to detect cell apoptosis, proliferation in vitro and the expression of proteins related to cell apoptosis, proliferation, Wnt/ β -catenin signaling pathway. Measure the tumor mass and volume of nude mice transplanted tumors, to detect the tumor cell proliferation, apoptosis and the expression of the proteins related to Wnt/ β -catenin signaling pathway in nude mouse transplanted tumors. **Results:** Compared with the blank group, the alpinetin group showed increases in cell apoptosis rate, TUNEL positivity ratio, Bax and cleaved Caspase-3 proteins ($P<0.05$), while decreases in cell viability, Edu positivity rate, tumor mass and volume, Ki-67 positivity ratio, Bcl-2 and Ki-67, Wnt1, and β -catenin proteins ($P<0.05$); the trend of changes in various indicators in the lithium chloride group was opposite to that in the alpinetin group ($P<0.05$). Compared with the alpinetin group, the alpinetin+lithium chloride group showed decreased Bax and cleaved Caspase-3 proteins ($P<0.05$), and increased cell viability, Edu positivity rate, tumor mass and

volume, Ki-67 positivity ratio, Bcl-2 and Ki-67, Wnt1, and β -catenin proteins ($P<0.05$). **Conclusion:** Alpinetin can inhibit the proliferation and induce apoptosis of osteosarcoma cells, possibly by inhibiting the activation of the Wnt/ β -

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2024LHMS08063)

¹ 内蒙古自治区鄂尔多斯市中心医院(内蒙古 鄂尔多斯, 017000)

[△]通信作者 E-mail: yang_wupeng@163.com

catenin signaling pathway.

Keywords: alpinetin; Wnt/ β -catenin signaling pathway; osteosarcoma; proliferation; apoptosis

骨肉瘤是由成骨分化缺陷引起的一种原发性恶性肿瘤,最常发生在儿童和青少年人群中,主要累及长骨干骺端,早期患者生存率高,但很容易复发,导致骨肉瘤患者总体预后并不理想,诱导骨肉瘤细胞凋亡并抑制其增殖可有效延缓骨肉瘤的进展与复发^[1-2]。据报道,Wnt/ β -catenin是在进化中高度保守的一种癌症调控信号通路,可通过调控程序性细胞死亡而介导骨肉瘤的发生与进展^[3],激活Wnt/ β -catenin信号通路可促进骨肉瘤进展,而抑制其激活可抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和体内肿瘤生长^[4-5]。山姜素是姜科植物中含有的一种新型类黄酮成分,通过多种机制在各种人类癌症中表现出很好的抗癌功效^[6],可抑制胰腺癌细胞增殖与侵袭^[7];此外,山姜素可减弱TGF- β 1诱导的 β -catenin表达以及真皮成纤维细胞过度生长^[8]。基于上述研究背景提出以下假设,山姜素可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路激活而治疗骨肉瘤,为解决这一问题,对山姜素调节Wnt/ β -catenin信号通路对骨肉瘤细胞增殖及凋亡的影响进行探究,为山姜素在骨肉瘤临床治疗中的应用提供理论依据,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物与细胞

自重庆腾鑫生物技术有限公司购入的雄性、6周龄、19~21 g的无特定病原体(SPF)级BALB/c-nu裸鼠24只(动物许可证号为SCXK(渝)2022-0005),在温度22~25℃、湿度55~65%、昼夜交替节律的SPF级动物房内适应性饲养。本研究符合动物伦理。自厦门逸漠生物科技有限公司购入人骨肉瘤细胞MG63(货号为IM-H167)。

1.2 主要实验药物及试剂

自美国MCE公司购入山姜素(纯度为99.51%,货号为HY-N0625A)、氯化锂(纯度为99.55%,货号为HY-Y0649)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号为HY-K1073)、MTT试剂(货号为HY-15924)、HRP标记山羊抗兔二抗(货号为HY-P8001)、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(货号为HY-K1091)、Edu通用款细胞增殖检测试剂盒(货号为HY-K1084);自攸碧艾(上海)生物技术有限公司购入HRP-兔-免疫组化试剂盒(货号为YB003);自英国Abcam公司购入Ki-67(货号为ab16667)、Wnt1(货号为ab15251)、Bcl-2(货号为ab194583)、 β -catenin(货号为ab224803)、Bax(货号为ab182733)、 β -actin(货号为

ab8227)与Cleaved Caspase-3(货号为ab32042)兔抗人一抗等。

1.3 主要实验仪器

自德国Miltenyi Biotec公司购入MACSQuant[®]X流式细胞仪;自德国Leica公司购入Mateo FL数字型倒置荧光显微镜、CM1950冰冻切片机;自美国Perkin Elmer公司购入XElx-800酶标仪;自美国Hoefer公司购入SE300miniVE垂直电泳转印仪、PS300B通用型稳定电源等。

1.4 方法

1.4.1 山姜素适宜作用浓度筛选 细胞培养:快速解冻复苏MG63细胞,用含非必需氨基酸的MEM培养基洗涤后接种在T25培养瓶内培养。培养条件为95%空气+5%CO₂,37℃。培养液为含非必需氨基酸的MEM培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素双抗。细胞贴壁生长,融合度为80%左右时进行传代,传代比例为1:3,取传代2次的细胞进行后续实验。

在96孔板接种MG63细胞,用终浓度0,50,100,200,300 μ mol/L的山姜素干预进入对数期的细胞^[9],48 h后加入MTT试剂(10 μ L/孔),混匀培养2 h后弃上清,用DMSO溶解结晶后在562 nm波长处测定各组吸光度(OD),以此作为各组细胞活力评测指标。

1.4.2 MG63移植瘤裸鼠造模方法 参考文献[11]制备MG63移植瘤裸鼠:取对数期MG63细胞值为单细胞悬液,以 2×10^6 个细胞注射接种在裸鼠皮下,注射体积为0.2 mL,1周后皮下长出黄豆大小硬块即表示造模成功。

1.4.3 MG63细胞以及MG63移植瘤裸鼠分组干预方法 在24孔板接种MG63细胞,随机分为空白组、山姜素组、氯化锂组、山姜素+氯化锂组,每组6个重复孔,细胞进入对数期后进行药物干预:空白组细胞不以任何药物干预,山姜素组细胞以终浓度200 μ mol/L的山姜素干预,氯化锂组细胞以终浓度20 mmol/L的氯化锂干预^[10],山姜素+氯化锂组细胞以终浓度200 μ mol/L的山姜素和终浓度20 mmol/L的氯化锂联合干预,细胞干预48 h。

将MG63移植瘤裸鼠随机分为空白组、山姜素组、氯化锂组、山姜素+氯化锂组,每组6只,皮下接种细胞1周后进行药物干预:山姜素组裸鼠以100 mg/kg山姜素干预^[12],氯化锂组裸鼠以1 mg/kg氯化锂干预^[10],山姜素+氯化锂组裸鼠以100 mg/kg山姜素和1 mg/kg氯化锂联合干预,山姜素与氯化锂均用生

理盐水溶解,山姜素进行腹腔注射干预且每 3 d 注射 1 次,氯化锂进行灌胃干预且每天灌胃 1 次,裸鼠均干预 2 周。

1.4.4 标本制作方法 取各组裸鼠移植瘤新鲜瘤体组织约 180 mg 存在液氮以备蛋白检测;剩余瘤体组织进行包埋、速冻后用冰冻切片机切为约 5 μm 厚的切片,将其复温后于冰丙酮内固定,然后用于 Ki-67 免疫组化染色及 TUNEL 染色。

1.5 实验指标测定

1.5.1 流式细胞实验检测细胞凋亡 收集、洗涤分组干预后的各组 MG63 细胞,制为单细胞悬液后测定细胞密度,稀释后每组取约 5×10^5 个细胞重悬在预冷 PBS 内,加入 Annexin V-FITC/PI 进行双染,洗涤后流式上机,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.5.2 MTT 法和 Edu 染色实验检测细胞增殖 MTT 法:在 96 孔板接种 MG63 细胞,按照步骤分组干预 MG63,然后采用 MTT 法检测各组细胞活力。

Edu 染色实验:采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Edu 试剂孵育分组干预后的各组 MG63 细胞,2.5 h 后弃培养液,进行细胞渗透、固定后按 Edu 通用款细胞增殖检测试剂盒说明书中方法行 Edu 染色,用 Hoechst 33342 进行 DNA 复染,洗涤后采用荧光显微镜拍照,对各组细胞总数与 Edu 阳性数进行定量分析,以 Edu 阳性率作为各组细胞增殖情况评测指标。

1.5.3 Western Blot 法检测细胞凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达 收集分组干预后的各组 MG63 细胞,采用预冷 RIPA 试剂于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解提取总蛋白,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴内进行煮沸变性,以每组 30 μg 的上样蛋白量进行电泳,随后进行全湿式电转,即可将各组蛋白分离后印迹到聚偏氟乙烯膜上,室温下封闭后进行抗体孵育,Ki-67 (1:1 000)、Wnt1 (1:1 000)、Bcl-2 (1:2 000)、 β -catenin (1:1 000)、Bax (1:2 000)、 β -actin (1:2 000) 与 Cleaved Caspase-3 (1:2 000) 兔抗人一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,HRP 标记山羊抗兔二抗 (1:1 000) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h,蛋白显色、扫描成像,定量分析各组蛋白条带灰度值后以内参 β -actin 对照量化分析各组凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白相对表达。

1.5.4 检测裸鼠移植瘤的瘤体质量与体积 于药物干预结束后次日对各组 MG63 移植瘤裸鼠进行安乐死,用手术剪取出移植瘤瘤体,采用游标卡尺测定瘤体最长径和最短径,依据“最长径和最短径的平方/2”算出其体积,采用电子天平测定各组移植瘤瘤体质量。

1.5.5 Ki-67 免疫组化染色、TUNEL 染色分别检测裸鼠肿瘤细胞增殖与凋亡 Ki-67 免疫组化染色:用 3% H_2O_2 溶液清除固定后的移植瘤组织切片中内源

性过氧化氢酶,洗片后滴加 5% 山羊血清封闭,配制稀释比为 1:100 的 Ki-67 兔抗人一抗 (1:100) 溶液,覆没切片并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,采用 HRP-兔-免疫组化试剂盒并参照其说明指导进行免疫组化染色,洗片后镜下拍照,对各组细胞总数与 Ki-67 阳性数进行定量分析,以 Ki-67 阳性比作为各组细胞增殖情况评测指标。

TUNEL 染色:用 3% H_2O_2 溶液清除固定后的移植瘤组织切片中内源性过氧化氢酶,洗片后孵育 TUNEL 反应液,按 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书中方法进行染色,洗片后镜下拍照,对各组细胞总数与 TUNEL 阳性数进行定量分析,以 TUNEL 阳性比作为各组细胞增殖情况评测指标。

1.5.6 Western Blot 法检测裸鼠移植瘤凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达 将存在液氮内的移植瘤组织取出投入预冷 RIPA 试剂内,于冰水浴中研磨匀浆提取总蛋白,采用 Western Blot 实验方法检测各组裸鼠移植瘤凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白相对表达。

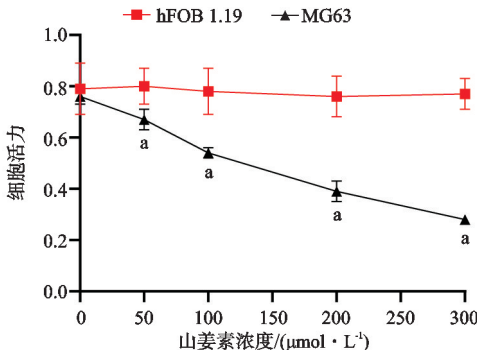
1.6 统计学方法

本研究采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,多组间比较进行单因素方差分析,事后两两进一步比较行 SNK- q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 山姜素可降低 MG63 细胞活力浓度筛选

50,100,200,300 $\mu\text{mol/L}$ 的山姜素可随浓度的升高而逐渐降低 MG63 细胞活力 ($\text{OD}_{562\text{nm}}$),山姜素浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时接近 IC_{50} 值,且 300 $\mu\text{mol/L}$ 的山姜素对 hFOB 1.19 细胞活力无明显影响,因而后续实验选择 200 $\mu\text{mol/L}$ 的山姜素进行,见图 1。



注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 山姜素相比, $^{\ast}P<0.05$ 。hFOB 1.19, $F=0.227$, $P=0.921$; MG63, $F=252.196$, $P<0.001$

图 1 不同浓度山姜素对 MG63 与 hFOB 1.19 细胞活力的影响

2.2 山姜素对 MG63 细胞体外增殖及凋亡的影响

流式细胞术实验检测各组 MG63 细胞凋亡结果见图 2。与空白组裸鼠相比,山姜素组裸鼠凋亡细胞增多,凋亡率升高,从 $3.81\% \pm 1.09\%$ 升至 $49.74\% \pm$

3.10%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 细胞活力降低, 从 $0.76\% \pm 0.07\%$ 降至 $0.41\% \pm 0.05\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 氯化锂组凋亡细胞减少, 凋亡率降低, 从 $3.81\% \pm 1.09\%$ 降至 $0.85\% \pm 0.26\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 细胞活力升高, 从 $0.76\% \pm 0.07\%$ 升至 $1.18\% \pm 0.06\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与山姜素组相比, 山姜素+氯化锂组凋亡细胞减少, 凋亡率降低, 从 $49.74\% \pm 3.10\%$ 降至 $4.93\% \pm 1.14\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 细胞活力升高, 从 $0.41\% \pm 0.05\%$ 升至 $0.73\% \pm 0.08\%$, 差异有统计学意义 (凋亡率, $F = 1074.268$,

$P < 0.001$; 细胞活力, $F = 137.655$, $P < 0.001$)。

Edu 染色实验检测各组 MG63 细胞增殖结果见图 3。与空白组相比, 山姜素组 Edu 阳性细胞减少, Edu 阳性率降低, 从 $61.23\% \pm 4.02\%$ 降至 $24.30\% \pm 2.86\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 氯化锂组 Edu 阳性细胞增多, Edu 阳性率升高, 从 $61.23\% \pm 4.02\%$ 升至 $95.07\% \pm 2.13\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与山姜素组相比, 山姜素+氯化锂组 Edu 阳性细胞增多, Edu 阳性率升高, 从 $24.30\% \pm 2.86\%$ 升至 $58.65\% \pm 3.74\%$, 差异有统计学意义 ($F = 468.003$, $P < 0.001$)。

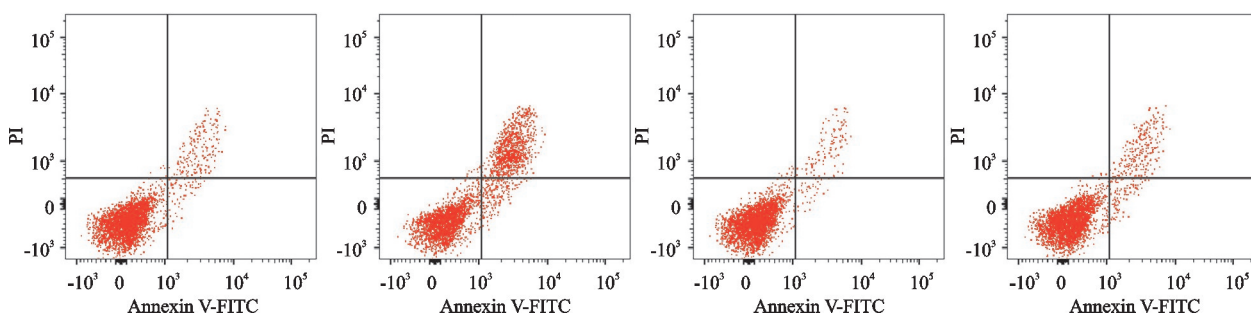


图2 流式细胞术实验检测各组 MG63 细胞凋亡

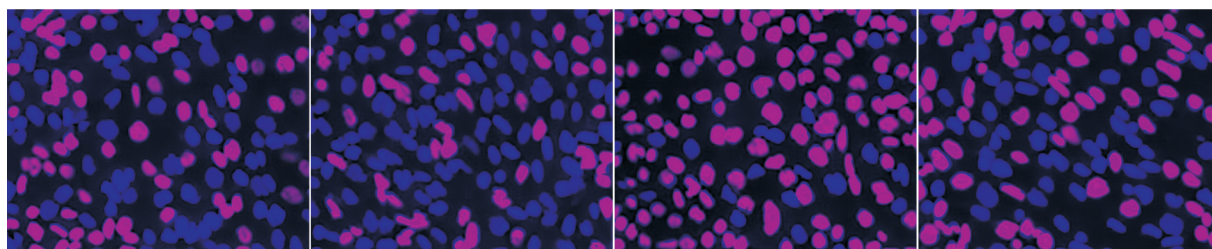


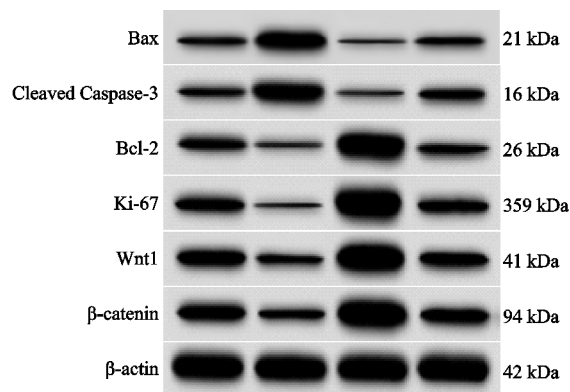
图3 Edu 染色实验检测各组 MG63 细胞增殖 ($\times 200$)

2.3 山姜素对 MG63 细胞凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

山姜素对 MG63 细胞凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响见图 4 及表 1。与空白组相比, 山姜素组 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Bcl-2、Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而氯化锂组凋亡与增殖相关蛋白表达变化趋势与山姜素组相反, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与山姜素组相比, 山姜素+氯化锂组 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Bcl-2、Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 山姜素对 MG63 裸鼠移植瘤生长的影响

山姜素对 MG63 裸鼠移植瘤生长的影响见图 5。与空白组相比, 山姜素组裸鼠皮下移植瘤减小, 瘤体质量与体积降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 分别从 $(1.71 \pm 0.14)g$ 降至 $(0.52 \pm 0.10)g$ 和从 $(851.63 \pm 40.82)mm^3$ 降至 $(310.37 \pm 33.64)mm^3$; 氯化锂组裸鼠皮下移植瘤增大, 瘤体质量与体积升高, 分别从



注: A-空白组; B-山姜素组; C-氯化锂组; D-山姜素+氯化锂组(下同)

图4 Western Blot 法检测各组 MG63 细胞凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达 ($\times 200$)

$(1.71 \pm 0.14)g$ 升至 $(2.96 \pm 0.16)g$ 和从 $(851.63 \pm 40.82)mm^3$ 升至 $(1412.25 \pm 46.39)mm^3$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与山姜素组相比, 山姜素+氯化锂组裸鼠皮下移植瘤增大, 瘤体质量与体积升高, 分别从 $(0.52 \pm 0.10)g$ 升至 $(1.63 \pm 0.12)g$ 和从 $(310.37 \pm 33.64)mm^3$ 升至 $(823.74 \pm 37.53)mm^3$, 差异有统计学

意义($P<0.05$)。质量比较, $F=343.092,P<0.001$;体 积比较, $F=764.987,P<0.001$ 。

表 1 各组 MG63 细胞 Bax、Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白相对表达($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	Bax	Cleaved Caspase-3	Bcl-2	Ki-67	Wnt1	β -catenin
空白组	0.50±0.06	0.55±0.07	0.59±0.07	0.66±0.10	0.79±0.14	0.84±0.10
山姜素组	0.92±0.09 ¹⁾	0.97±0.10 ¹⁾	0.15±0.04 ¹⁾	0.19±0.05 ¹⁾	0.39±0.10 ¹⁾	0.41±0.07 ¹⁾
氯化锂组	0.11±0.03 ¹⁾	0.13±0.03 ¹⁾	1.01±0.09 ¹⁾	1.10±0.12 ¹⁾	1.22±0.12 ¹⁾	1.28±0.12 ¹⁾
山姜素+氯化锂组	0.52±0.07 ²⁾	0.57±0.08 ²⁾	0.58±0.10 ²⁾	0.63±0.11 ²⁾	0.77±0.13 ²⁾	0.82±0.09 ²⁾
<i>F</i>	150.069	127.243	120.285	85.026	45.356	81.043
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与空白组相比, $P<0.05$;2)与山姜素组相比, $P<0.05$ 。

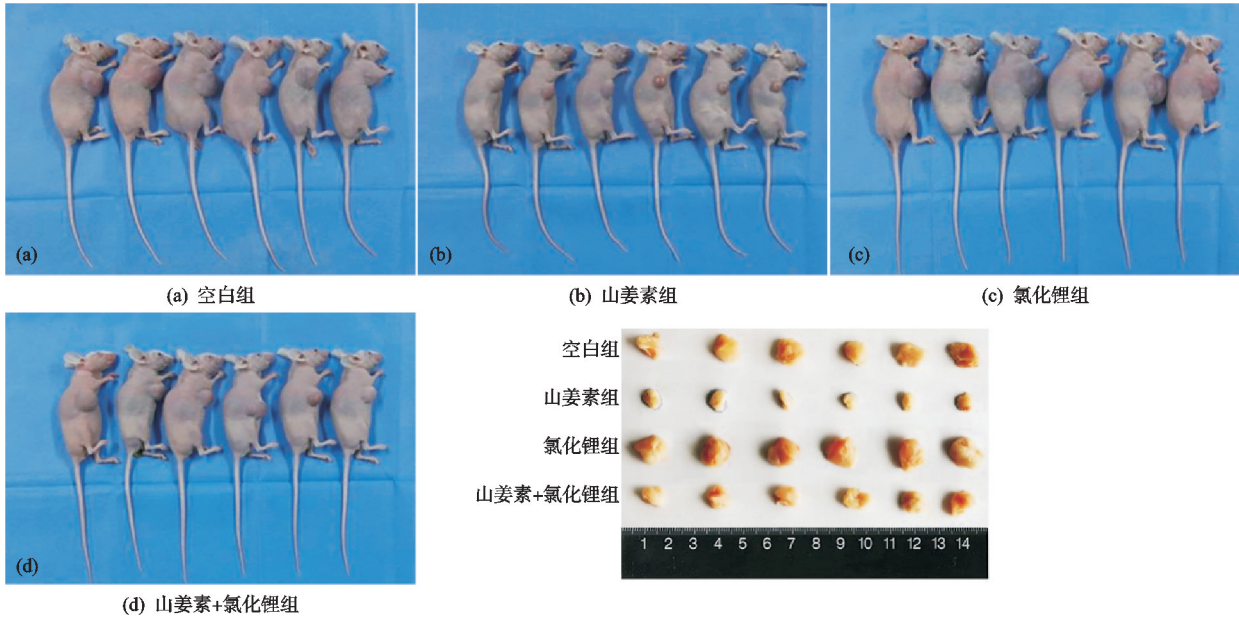


图 5 各组 MG63 裸鼠移植瘤图片

2.5 山姜素对 MG63 裸鼠肿瘤细胞凋亡与增殖的影响

山姜素对 MG63 裸鼠肿瘤细胞凋亡与增殖的影响见图 6 和图 7。与空白组相比,山姜素组裸鼠肿瘤 TUNEL 阳性细胞增多、凋亡增强,TUNEL 阳性比升高,从 $32.74\%\pm5.46\%$ 升至 $54.91\%\pm7.10\%$,差异有统计学意义($P<0.05$);Ki-67 阳性细胞减少、增殖减弱,Ki-67 阳性比降低,从 $57.93\%\pm8.42\%$ 降至 $30.21\%\pm6.84\%$,差异有统计学意义($P<0.05$)。氯化锂组裸鼠肿瘤 TUNEL 阳性细胞减少、凋亡减弱,TUNEL 阳性比降低,从 $32.74\%\pm5.46\%$ 降至 $13.02\%\pm4.39\%$,差异有统计学意义($P<0.05$);Ki-

67 阳性细胞增多、增殖增强,Ki-67 阳性比升高,从 $57.93\%\pm8.42\%$ 升至 $86.54\%\pm10.36\%$,差异有统计学意义($P<0.05$)。与山姜素组相比,山姜素+氯化锂组裸鼠肿瘤 TUNEL 阳性细胞减少、凋亡减弱,TUNEL 阳性比降低,从 $54.91\%\pm7.10\%$ 降至 $36.15\%\pm6.27\%$,差异有统计学意义($P<0.05$);Ki-67 阳性细胞增多、增殖增强,Ki-67 阳性比升高,从 $30.21\%\pm6.84\%$ 升至 $52.60\%\pm9.15\%$,差异有统计学意义($P<0.05$)。Ki-67 阳性比比较, $F=41.729,P<0.001$;TUNEL 阳性比比较, $F=50.916,P<0.001$ 。

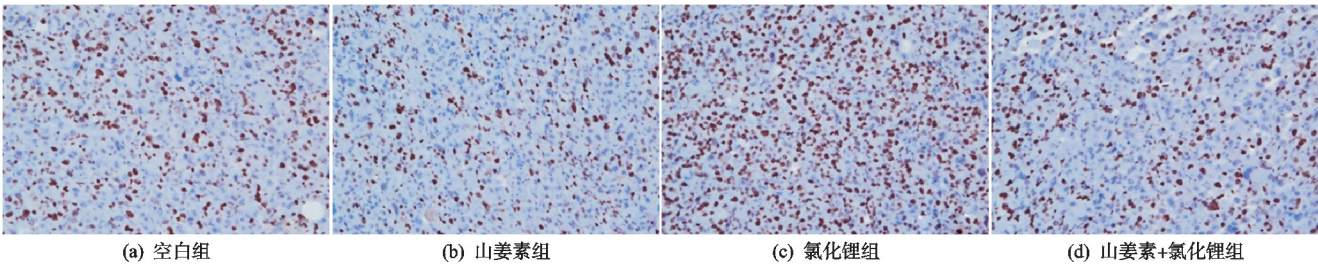


图 6 Ki-67 免疫组化染色检测各组 MG63 裸鼠肿瘤细胞增殖($\times 200$)

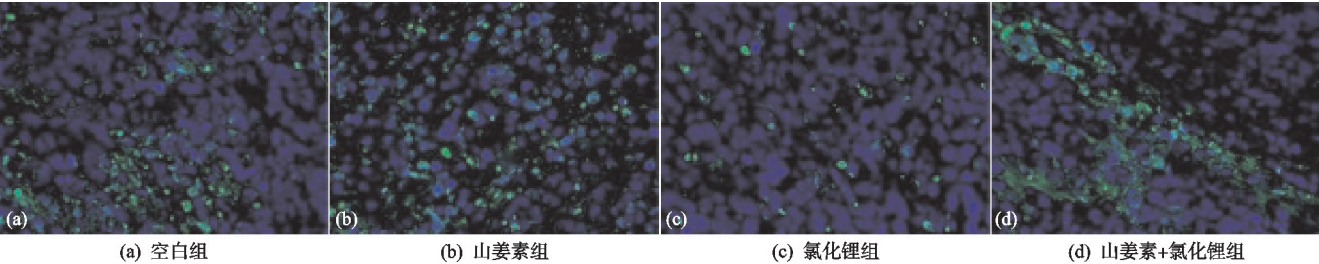


图 7 TUNEL 染色检测各组 MG63 裸鼠肿瘤细胞凋亡(×200)

2.6 山姜素对 MG63 裸鼠移植瘤凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

山姜素对 MG63 裸鼠移植瘤凋亡、增殖与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响见图 8 及表 2。与空白组相比,山姜素组 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$),Bcl-2、Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$);而氯化锂组凋亡与增殖相关蛋白表达变化趋势与山姜素组相反,差异有统计学意义($P<0.05$)。与山姜素组相比,山姜素+氯化锂组 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$),Bcl-2、Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

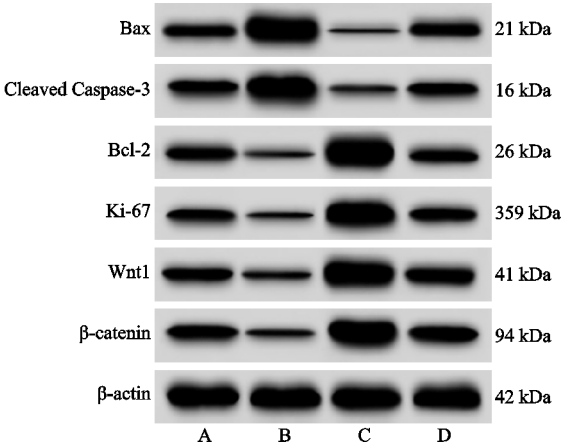


图 8 Western Blot 法检测各组 MG63 裸鼠移植瘤凋亡与增殖相关蛋白表达(×200)

表 2 各组 MG63 裸鼠移植瘤 Bax、Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Ki-67、Wnt1、 β -catenin 蛋白相对表达($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Cleaved Caspase-3	Bcl-2	Ki-67	Wnt1	β -catenin
空白组	0.60±0.05	0.65±0.08	0.69±0.10	0.74±0.12	0.78±0.13	0.81±0.14
山姜素组	1.04±0.08 ¹⁾	1.08±0.11 ¹⁾	0.25±0.07 ¹⁾	0.31±0.08 ¹⁾	0.37±0.09 ¹⁾	0.40±0.10 ¹⁾
氯化锂组	0.18±0.04 ¹⁾	0.24±0.05 ¹⁾	1.13±0.14 ¹⁾	1.17±0.13 ¹⁾	1.21±0.10 ¹⁾	1.23±0.13 ¹⁾
山姜素+氯化锂组	0.61±0.06 ²⁾	0.64±0.09 ²⁾	0.67±0.11 ²⁾	0.72±0.10 ²⁾	0.76±0.11 ²⁾	0.79±0.12 ²⁾
F	209.858	97.065	66.524	62.071	60.025	45.304
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与空白组相比, $P<0.05$;2)与山姜素组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

骨肉瘤目前的临床治疗手段以手术切除和化疗为主^[13],但骨肉瘤的高度异质性会为其临床治疗造成很大负面影响,很多患者治疗效果不佳且复发率很高,如今又开发了免疫治疗、CAR-T 细胞治疗、肿瘤靶向基因治疗和个性化医疗等新型治疗手段,虽有一定效果,但大多数骨肉瘤患者预后仍然很糟糕,因此迫切需要探寻更有效的新型治疗药物来改善骨肉瘤患者预后^[14-15]。山姜素是姜黄、草豆蔻、郁金等姜科植物中的主要活性成分,被证明具有显著的肿瘤抑制作用,相比其他具有抗癌活性的黄酮类化合物,毒性低、特异性强、适合靶向治疗,可呈剂量和时间依赖性地抑制乳腺癌细胞的增殖^[6,16]。山姜素还可对肺癌细胞发挥抗增殖、抗迁移和促凋亡作用^[17]。本研究结果显示,以山姜素干预 MG63 细胞,可降低细胞活力、Edu 阳性率,升高其细胞凋亡率,并上调 Bax 与 Cleaved Caspase-3 蛋白表达,下调 Bcl-2 与 Ki-67 蛋白表达,表明山姜素

可增强促凋亡蛋白表达,减弱增殖标志与抗凋亡蛋白表达,在体外抑制骨肉瘤细胞增殖并诱导其凋亡;以山姜素干预 MG63 移植瘤裸鼠,可对增殖与凋亡相关蛋白起到同样调控作用,还可降低移植瘤的瘤体质量与体积、Ki-67 阳性比,升高其 TUNEL 阳性比,表明山姜素可在体内抑制骨肉瘤细胞增殖并诱导其凋亡,进而延缓肿瘤生长,与相关文献相比,本研究首次证实了山姜素可对骨肉瘤细胞发挥明显抗癌作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路在发育、组织稳态和细胞增殖等生理过程中起着至关重要的作用,正常生理条件下, β -catenin 作为一种细胞骨架蛋白在胞膜处与 E-cadherin 形成复合体来维持同型细胞的黏附、防止细胞移动,当 Wnt 信号激活时,Wnt 信号分子与细胞膜上特异性受体卷曲蛋白结合导致 GSK3 β 失活,减弱 β -catenin 的磷酸化降解,致使 β -catenin 在胞质中积累,进而促使恶性肿瘤的发生和进展^[18],下调 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白表达可诱导骨肉瘤细胞周期

停滞与凋亡,降低其细胞活力、迁移和侵袭活性,显著抑制骨肉瘤生长与进展^[19-20]。本研究结果显示,以山姜素干预 MG63 细胞与移植瘤裸鼠,均可降低 Wnt1 与 β -catenin 蛋白表达,与相关文献相比,本研究首次证实了 Wnt/ β -catenin 信号通路参与介导山姜素对骨肉瘤细胞的抗癌作用;以山姜素与 Wnt 激活剂氯化锂联合干预 MG63 细胞与移植瘤裸鼠,可在体内外减弱山姜素单独干预对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用,在体内外削弱山姜素单独干预对骨肉瘤细胞凋亡的促进作用,逆转山姜素对骨肉瘤细胞的抗癌作用,最终揭示了山姜素对骨肉瘤细胞发挥抗增殖与促凋亡作用是通过抑制 Wnt 信号激活实现的。

总而言之,本研究证实了山姜素可在体内外抑制骨肉瘤细胞增殖,诱导骨肉瘤细胞凋亡,还可抑制骨肉瘤的体内肿瘤生长,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活可能是山姜素对骨肉瘤细胞发挥上述抗癌作用的药理机制。本研究为骨肉瘤的临床治疗提供了山姜素这一新型药物选择,并为山姜素在骨肉瘤的抗癌治疗中的应用提供了理论依据。但本研究只限于临床前研究,对于其临床转化前景并没有涉及,存在一定局限性,后续会对山姜素的生物利用度、水溶性等问题进行深入探讨,并会结合纳米技术对其载药方式进行优化,进而推动其临床应用。

参考文献

- [1] 严伟杰,刘云,罗恺,等.单细胞测序技术在骨肉瘤中的研究进展[J].中华骨科杂志,2024,44(9):636-643.
- [2] 马键飞,李佳桐,商冠宁,等.检查点激酶 1 在骨肉瘤靶向治疗中的研究进展[J].中华骨科杂志,2024,44(16):1118-1124.
- [3] LIU S Q,LIU C T,WANG Y A,et al. The role of programmed cell death in osteosarcoma: From pathogenesis to therapy[J]. Cancer Medicine,2024,13(10):e7303.
- [4] LUO G,CHENG H Y,FAN J G,et al. Up-regulation of NCAPG mediated by E2F1 facilitates the progression of osteosarcoma through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Translational Cancer Research, 2024, 13(5): 2437-2450.
- [5] 李瑞忠,林雁鸿,梁超华,等.黄芪多糖调控 SP1/Wnt/ β -catenin 信号轴抑制骨肉瘤增殖和转移能力的作用机制研究[J].现代检验医学杂志,2025,40(3):37-41.
- [6] GUL S,MAQBOOL M F,ZHENG D Y,et al. Alpinetin: a dietary flavonoid with diverse anticancer effects[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(9): 4220-4243.
- [7] 邬金铃,熊莉,罗兰,等.山姜素介导 NF- κ B 信号通路对胰腺癌细胞 BXP-3 增殖、侵袭和炎症反应的影响[J].临床肿瘤学杂志,2023,28(5):399-405.
- [8] WIKAN N,POTIKANOND S,NIMLAMOOOL W. Alpinetin suppresses effects of TGF- β 1 on stimulating the production and organization of fibrotic markers in human primary dermal fibroblasts[J]. Cells,2022,11(17):2731.
- [9] 石雨鹭,康权,岳小涵,等. LETM1 对骨肉瘤细胞恶性生物学行为的作用及其机制[J].解放军医学杂志,2024,49(10):1163-1173.
- [10] 易琰斐,许美瑾,王琪.红花黄色素对非霍奇金淋巴瘤的作用与机制[J].中国临床药理学杂志,2024,40(6):839-843.
- [11] 薛晓川,周阳云,魏兰懿,等.中药联合化疗药物治疗骨肉瘤的研究进展[J].中成药,2024,46(6):1948-1954.
- [12] 刘曼夷,朱龙,杨扬,等.颌骨骨肉瘤的临床诊断和治疗进展[J].中华口腔医学杂志,2024,59(2):197-203.
- [13] 陈倩倩,蔡小攀.骨肉瘤抗血管生成靶向治疗的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2024,31(3):303-309.
- [14] SONG H M,WEI C K,YANG W,et al. Alpinetin suppresses CYP3A4,2C9, and 2E1 activity in vitro[J]. Pharmaceutical Biology,2022,60(1):1032-1037.
- [15] 刘磊,孙京海,林家茂.山姜素调控 miR-654-3p/HMGB1 轴影响肺癌细胞 A549 增殖、迁移和凋亡[J].中国药理学通报,2024,40(10):1892-1898.
- [16] SONG P,GAO Z R,BAO Y G,et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in carcinogenesis and cancer therapy[J]. Journal of Hematology & Oncology,2024,17(1):46.
- [17] CHANG J L,ZHAO F L,SUN X Y,et al. Polyphyllin I enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced inhibition of human osteosarcoma cell growth via downregulating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine,2024,44(2):251-259.
- [18] JIAN C C,WANG B,MOU H,et al. A GAD1 inhibitor suppresses osteosarcoma growth through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Heliyon,2024,10(10):e31444.

(收稿日期:2025-06-06)