

# 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞迁移和凋亡及相关蛋白表达的影响

秦桂福<sup>1,2</sup> 吴琪<sup>3△</sup> 宋玉<sup>3</sup> 吴高明<sup>4</sup> 李侯琪<sup>1,2</sup>

**[摘要]** 目的:探讨徐长卿丹皮酚(Paeonol)联合顺铂对骨肉瘤 MG-63 细胞迁移和凋亡的影响及其作用机制。方法:培养骨肉瘤 MG-63 细胞,分别加入不同浓度的徐长卿丹皮酚(0.3, 0.6, 1.2 mmol/L)和顺铂(4  $\mu$ mol/L)单独及联合作用,采用 CKK-8 法检测 MG-63 细胞增殖抑制率,并计算两药相互作用指数(CDI),评价两药相互作用性质,细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 MG-63 细胞的迁移和侵袭能力,TUNEL 法检测 MG-63 细胞凋亡情况,Western Blot 法检测骨肉瘤 MG-63 细胞中 Akt 和 mTOR 蛋白表达及磷酸化水平。结果:徐长卿丹皮酚和顺铂联合给药可以显著抑制骨肉瘤细胞增殖,两药存在协同作用,CDI<1,其抑制作用与徐长卿丹皮酚浓度及作用时间相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂给药可显著抑制骨肉瘤细胞迁移,并具有一定的浓度依赖性,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );徐长卿丹皮酚联合顺铂可以显著抑制骨肉瘤细胞的侵袭能力,并具有一定的浓度依赖性;随着徐长卿丹皮酚浓度的增加,呈红色荧光凋亡细胞有明显增多的趋势,以徐长卿丹皮酚中、高浓度与顺铂联用最明显;徐长卿丹皮酚联合顺铂可显著抑制 Akt、mTOR 蛋白磷酸化水平,具有一定的浓度依赖性,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结论:徐长卿丹皮酚增强顺铂抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、迁移、侵袭和诱导凋亡,可能通过抑制 Akt、mTOR 蛋白磷酸化,发挥协同抑瘤作用。

**[关键词]** 徐长卿丹皮酚;顺铂;骨肉瘤;迁移;凋亡;蛋白磷酸化水平

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)09-0010-06

## Efficacy of Cynanchumpaniculatum Paeonol Combined with Cisplatin on Migration and Apoptosis of Osteosarcoma Cells and Expression of Related Proteins

QIN Guifu<sup>1,2</sup> WU Qi<sup>3△</sup> SONG Yu<sup>3</sup> WU Gaoming<sup>4</sup> LI Siqui<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

<sup>2</sup> Hubei Institute of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, China;

<sup>3</sup> Clinical Skills Training Center of Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

<sup>4</sup> Haojiang Hospital, The First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515071, Guangdong China.

**Abstract Objective:** To explore the efficacy of cynanchumpaniculatum paeonol combined with cisplatin on the migration and apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells and its mechanism. **Methods:** MG-63 cells were cultured and treated with paeonol solution of

different concentrations (0.3, 0.6, 1.2 mmol/L) and cisplatin (4  $\mu$ mol/L) separately or in combination. The proliferation inhibition rate of MG-63 cells was measured by CKK-8 method, and the two-drug interaction index (CDI) was calculated to evaluate the nature of the two-drug interaction. The migration and invasion ability of MG-63 cells were detected by Scratch test and Transwell test. The apoptosis of MG-63 cells was detected by TUNEL. Western Blot was used to detect the protein expression and phosphorylation level of Akt and mTOR in osteosarcoma MG-63 cells. **Results:** The

基金项目:湖北省卫生健康委员会中医药科研项目  
(ZY2021Q012)

湖北中医药大学“青苗计划”资助项目(2019ZZX021)

<sup>1</sup> 湖北省中医院(武汉, 430061)

<sup>2</sup> 湖北省中医药研究院

<sup>3</sup> 湖北中医药大学临床技能实训中心

<sup>4</sup> 汕头大学医学院第一附属医院濠江医院

△通信作者 E-mail: wuqi111@163.com

results demonstrated that combination of paeonol and cisplatin could significantly inhibit the proliferation of osteosarcoma cells, and the two drugs had a synergistic effect due to  $CDI < 1$ , which was related to the concentration and duration of paeonol ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Different concentrations of paeonol combined with cisplatin could significantly inhibit the migration of osteosarcoma cells, and there was a certain concentration-dependent ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The combination of paeonol and cisplatin could inhibit the invasion of osteosarcoma cells in a concentration-dependent manner, and with the increase of the concentration of paeonol, the combination of paeonol and cisplatin could significantly inhibit the protein phosphorylation of Akt and mTOR, and the combination of two drugs could significantly inhibit the protein phosphorylation of Akt and mTOR, and there was a certain concentration dependence ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Paeonol can enhance the efficacies of cisplatin on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells, which may play a synergistic role by inhibiting the proteins phosphorylation of Akt and mTOR.

**Keywords:** paeonol; cisplatin; osteosarcoma; migration; apoptosis; protein phosphorylation level

骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)是一种间叶组织来源的好发于儿童和青少年的骨骼系统恶性肿瘤,保肢手术和新辅助化疗的综合治疗是骨肉瘤患者常用的治疗手段,化疗药物对杀伤肿瘤细胞、预防肿瘤复发具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。临床上常用的骨肉瘤化疗药物如顺铂(Cisplatin)具有肾毒性和严重呕吐的毒副作用及肿瘤耐药性,限制其长期使用,是影响化疗效果的主要因素<sup>[3]</sup>。因此,寻找高效低毒的抗肿瘤药物,降低传统化疗药物的使用剂量,可为骨肉瘤的治疗提供更好的策略和方向<sup>[4]</sup>。

萝藦科植物徐长卿的根及根茎或带根全草,性温、味辛,归肝、胃经,有较强的祛风止痛、温经通络和解郁活血的功效,丹皮酚是徐长卿的主要有效成分,研究发现其在体外对多种肿瘤细胞有增殖抑制和诱导凋亡作用<sup>[5]</sup>。PI3K/Akt/mTOR 信号通路的表达失调与肿瘤细胞增殖分化、肿瘤血管形成转移、化疗耐药性关系密切<sup>[6-7]</sup>。本研究通过探讨徐长卿丹皮酚(Paeonol)联合顺铂对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、迁移和凋亡的影响,揭示 PI3K/Akt/mTOR 通路磷酸化与骨肉瘤细胞增殖、迁移和凋亡的关系,为临床上徐长卿丹皮酚和顺铂的联合用药提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

徐长卿丹皮酚(上海阿拉丁公司,批号 H111081,纯度 $>99\%$ );顺铂(美国 Sigma 公司,批号 P4394,纯度 $>99\%$ );0.25% Trypsin、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 15050065 和 10099-141);CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(美国 MCE 公司,批号 HY-K0301);Transwell(美国 BD Biosciences 公司,批号 353097);多聚甲醛、TEMED、SDS(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 80096618、80125336、30166428);细胞凋亡检测试剂盒(南京 Vazyme 有限公司,批号 A113-03);DAPI、磷酸酶抑制剂、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技

术有限公司,批号分别为 C1002、S1873、P0013B、P0010);抗荧光淬灭封片剂(美国 Southernbiotech 公司,批号 0100-01);Trise-Base(德国 Biofroxx 公司,批号 1115GR500);蛋白 marker(上海百赛生物技术有限公司,批号 P12103-2);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号 IPVH00010);兔多抗 GAPDH(杭州贤至生物有限公司,批号 AB-P-R 001);兔单抗 p-Akt、兔单抗 mTOR(美国 CST 公司,批号分别为 13038、2983S);兔多抗 Akt(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号 AF6261);兔单抗 p-mTOR(英国 Abcam 公司,批号 Ab137133);HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1054);ECL 底物液(北京普利莱基因技术有限公司,批号 P1050)。

### 1.2 仪器

ThermoFisher 微量移液器、5702R 型低速离心机(德国 Eppendorf 公司);MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(日本 SANYO 电气公司);Flexstation<sup>®</sup> 3 型全自动酶标仪(美国 Molecular Devices 分子仪器公司);IX51 型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);德国 Leica RM 2016 轮转式切片机;武汉俊杰 JK-6 生物组织摊烤片机;DYCZ-40 型电转仪、DYCZ-24DN 型垂直电泳槽、DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);m $\mu$ lISKANMK3 酶标仪(美国 Thermo 公司);T8-1 型磁力搅拌器(江苏省金坛市中大仪器厂);TS-1 水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);HI650 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);CPA 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

### 1.3 细胞

骨肉瘤细胞系 MG-63,购自武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司,货号 CL-0157,传至第 3~5 代用于实验。

### 1.4 方法

**1.4.1 细胞培养** 取生长状态良好的 MG-63 细胞,使用含 10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及链霉素的

DMEM/F12培养液,在37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行各项实验。

**1.4.2 CCK8 比色法检测细胞活力** 以  $5 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 96 孔板中,每孔加入 100  $\mu$ L 细胞悬液,37℃培养过夜(在细胞孔周围孔内加入 100  $\mu$ L 无菌 PBS)。分为 6 组:空白组(不加药物)、顺铂(4  $\mu$ mol/L)组、徐长卿丹皮酚(0.3 mmol/L)组、徐长卿丹皮酚不同浓度(0.3, 0.6, 1.2 mmol/L)联合顺铂(4  $\mu$ mol/L)组;每组 5 个复孔,37℃分别培养 24、48、72 h。每孔加入 10  $\mu$ L CCK8,37℃培养 4 h,酶标仪测定各孔吸光值 OD 450,根据公式计算细胞活力。计算公式:增殖抑制率 =  $(1 - \text{实验组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值}) \times 100\%$ 。计算两药相互作用指数(Coefficient of Drug Interaction, CDI),公式为<sup>[8]</sup>  $CDI = AB / (AXB)$ ,  $AB$  = 两药联合组 A 值/对照组 A 值;  $A$  (或  $B$ ) = 两药单独使用组 A 值/对照组 A 值。  $CDI < 1$  时两药有协同作用,  $CDI < 0.7$  时协同作用非常明显。

**1.4.3 细胞划痕法检测 MG-63 细胞迁移** 取已按 1.4.2 节分组处理完毕的各组细胞,0.25%胰酶分别消化计数约为  $5 \times 10^5$  个细胞,接种于 6 孔板,确保第 2 天可以铺满,将枪头比着直尺,尽量垂直于背后的横线划痕,用 PBS 洗细胞 3 次,加入无血清培养基,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,分别在 0 h 和 24 h 拍照,用 Image-Pro Plus 软件分析,以最大距离与最小距离的平均值来评估细胞迁移程度。

**1.4.4 Transwell 法检测 MG-63 细胞侵袭** 细胞分组同 1.4.2 节,细胞培养 24 h 后收集细胞,0.25%胰酶消化,终止消化后离心去上清,用无血清培养基重悬细胞,调整细胞浓度至  $5 \times 10^4$  个/mL,在 24 孔板中预先加入 800  $\mu$ L 含 10% FBS 的培养基(含双抗),并放入 Transwell 小室,1 h 后在 Transwell 上室分别接入 200  $\mu$ L 各组细胞悬液,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后取出,用干净的棉球将上室一侧的未迁移的细胞擦干净,用 10% 甲醇溶液固定细胞 30 min。切膜后用 5% 结晶紫染液染色 20 min, PBS 清洗后显微镜下观察,拍照计数。

**1.4.5 TUNEL 法检测 MG-63 细胞凋亡** 细胞分组同 1.4.2 节,细胞培养 24 h 后收集细胞,将爬好细胞的玻片浸入 4% 多聚甲醛溶液,室温固定 25 min 后用 PBS 洗涤 3 次。每个爬片滴加 100  $\mu$ L 浓度为 20  $\mu$ g/mL 的 Proteinase K 溶液,室温孵育 20 min。用去离子水溶液润洗爬片,滴加 100  $\mu$ L 1  $\times$  Equilibration Buffer 使其全部覆盖待检样本区域,室温孵育 15 min。在平衡细胞的同时在冰上解冻 BrightRed Labeling Mix,准备 TdT 孵育缓冲液。将载玻片置于湿盒内,

在 37℃ 下孵育 60 min。将湿盒用铝箔纸包裹以避免光,用 PBS 洗涤 3 次。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行复染核, PBST 5 min  $\times$  4 次洗去多余的 DAPI。用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

**1.4.6 Western Blot 法检测 MG-63 中 Akt 和 mTOR 的蛋白磷酸化水平** 将实验分为 6 组:空白组(不加药物)、顺铂(4  $\mu$ mol/L)组、徐长卿丹皮酚(0.3 mmol/L)单独组、徐长卿丹皮酚不同浓度(0.3, 0.6, 1.2 mmol/L)联合顺铂(4  $\mu$ mol/L)组。细胞培养 24 h 后收集细胞,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白,于 4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min 后收集上清为蛋白悬浮液。将蛋白样品和 BSA 标准蛋白进行适当稀释后,加入 BCA 试剂盒混合液,用 DG-3022A 酶标仪测定 OD568,利用回归方程计算出样品蛋白浓度。采用加热法进行蛋白变性,用 10% SDS-PAGE 进行电泳。取出凝胶根据 Marker 切下目的条带,将蛋白转移到 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,分别加入 GAPDH(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、Akt(1:500)、p-mTOR(1:1 000)、mTOR(1:1 000)一抗,4℃ 孵育过夜。用 TBST 充分洗涤 PVDF 膜,再加入用 HRP 标记的二抗(1:50 000 稀释),室温摇床孵育 2 h。TBST 洗膜后,ECL 显影、定影,扫描胶片,用 BandScan 分析胶片灰度值。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, Origin 8.0 处理图片,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本  $t$  检验。  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 徐长卿丹皮酚联合顺铂增强抑制骨肉瘤细胞增殖

CCK8 结果显示,与空白组比较,徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂组、顺铂和徐长卿丹皮酚单独给药组随着作用时间的延长,细胞增殖抑制率有不同程度的增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与顺铂组比较,徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂各组细胞增殖抑制率逐渐增加,呈时间和浓度依赖性,两药存在协同作用,  $CDI < 1$ ,且作用 72 h 后徐长卿丹皮酚 1.2 mmol/L 联合顺铂对骨肉瘤细胞增殖抑制作用最强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),  $CDI < 0.7$ ,协同效应非常明显。提示徐长卿丹皮酚和顺铂联合给药可以显著抑制骨肉瘤细胞增殖,其抑制作用与徐长卿丹皮酚浓度及作用时间相关,且明显强于顺铂和徐长卿丹皮酚单独给药组(见表 1)。

表 1 各组骨肉瘤细胞增殖抑制率 (x±s)

组别	浓度	细胞增殖抑制率/%			CDI (24 h)
		24 h	48 h	72 h	
空白组	—	0	0	0	
顺铂组	4 μmol/L	25.28±5.46 <sup>1)</sup>	37.59±5.13 <sup>1)</sup>	60.17±5.05 <sup>2)</sup>	
徐长卿丹皮酚组	0.3 mmol/L	24.96±5.67 <sup>1)</sup>	38.23±5.22 <sup>1)</sup>	61.04±4.97 <sup>2)</sup>	
徐长卿丹皮酚低浓度+顺铂组	0.3 mmol/L+4 μmol/L	27.05±5.29 <sup>1)</sup>	48.80±4.36 <sup>2)3)</sup>	64.08±4.51 <sup>2)</sup>	0.712 4
徐长卿丹皮酚中浓度+顺铂组	0.6 mmol/L+4 μmol/L	35.38±4.34 <sup>1)3)</sup>	52.60±3.67 <sup>2)3)</sup>	71.70±3.42 <sup>2)3)</sup>	0.685 3
徐长卿丹皮酚高浓度+顺铂组	1.2 mmol/L+4 μmol/L	43.30±3.58 <sup>2)4)</sup>	61.00±2.81 <sup>2)4)</sup>	75.30±3.11 <sup>2)4)</sup>	0.611 2

注:与空白组比较,1)P<0.05,2)P<0.01;与顺铂组比较,3)P<0.05,4)P<0.01。

2.2 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞迁移的影响

细胞划痕实验结果显示徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂给药可显著抑制骨肉瘤细胞迁移,并具有一定的浓度依赖性,其抑制作用强于顺铂和徐长卿丹皮酚单独给药组,差异有统计学意义(P<0.05),见表 2 及图 1。

表 2 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞迁移的影响 (x±s)

组别	浓度	0 h	24 h
空白组	—	38.23±0.72	6.86±3.21
顺铂组	4 μmol/L	38.52±0.65	13.35±2.44 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚组	0.3 mmol/L	39.61±1.18	14.84±1.91 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚低浓度+顺铂组	0.3 mmol/L+4 μmol/L	39.43±1.02	16.67±1.82 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚中浓度+顺铂组	0.6 mmol/L+4 μmol/L	38.82±0.94	18.07±2.35 <sup>2)3)</sup>
徐长卿丹皮酚高浓度+顺铂组	1.2 mmol/L+4 μmol/L	39.95±1.26	23.26±1.74 <sup>2)4)</sup>

注:与空白组比较,1)P<0.05,2)P<0.01;与顺铂组比较,3)P<0.05,4)P<0.01。

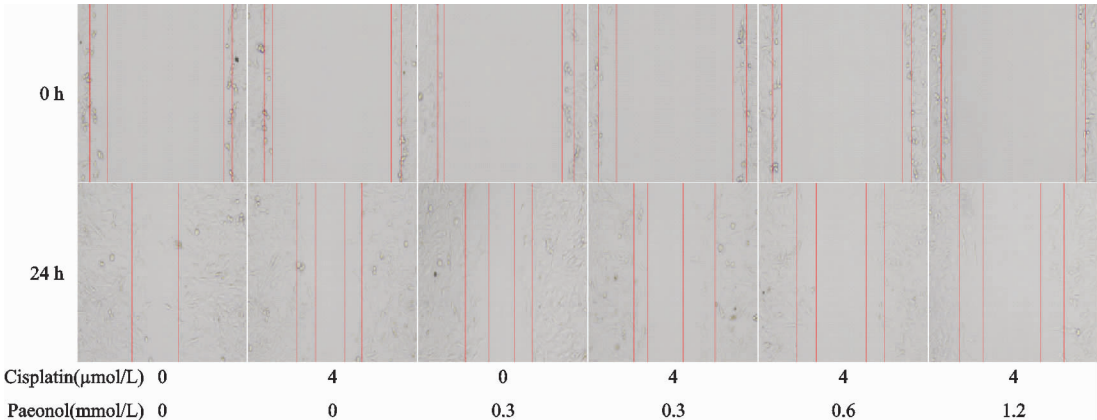


图 1 徐长卿丹皮酚增强顺铂抑制骨肉瘤细胞迁移能力

2.3 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞侵袭的影响

与空白组比较,各药物组细胞的侵袭数目均显著减少,差异有统计学意义(P<0.05,P<0.01)。与顺铂组比较,徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂给药可以显著抑制骨肉瘤细胞的侵袭能力,差异有统计学意义(P<0.05,P<0.01),并具有一定的浓度依赖性,见表 3 及图 2。

表 3 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞侵袭的影响 (x±s)

组别	浓度	0 h	24 h
空白组	—	70±6	76±12
顺铂组	4 μmol/L	71±6	49±8 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚组	0.3 mmol/L	71±5	52±6 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚低浓度+顺铂组	0.3 mmol/L+4 μmol/L	70±6	37±5 <sup>2)3)</sup>
徐长卿丹皮酚中浓度+顺铂组	0.6 mmol/L+4 μmol/L	70±5	25±3 <sup>2)4)</sup>
徐长卿丹皮酚高浓度+顺铂组	1.2 mmol/L+4 μmol/L	71±6	17±2 <sup>2)4)</sup>

注:与空白组比较,1)P<0.05,2)P<0.01;与顺铂组比较,3)P<0.05,4)P<0.01。

2.4 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞凋亡的影响

24 h,荧光显微镜下观察 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色后 MG-63 细胞核的形态变化,可见空白组细胞核为椭圆形蓝色均匀荧光,随着徐长卿丹皮酚浓度

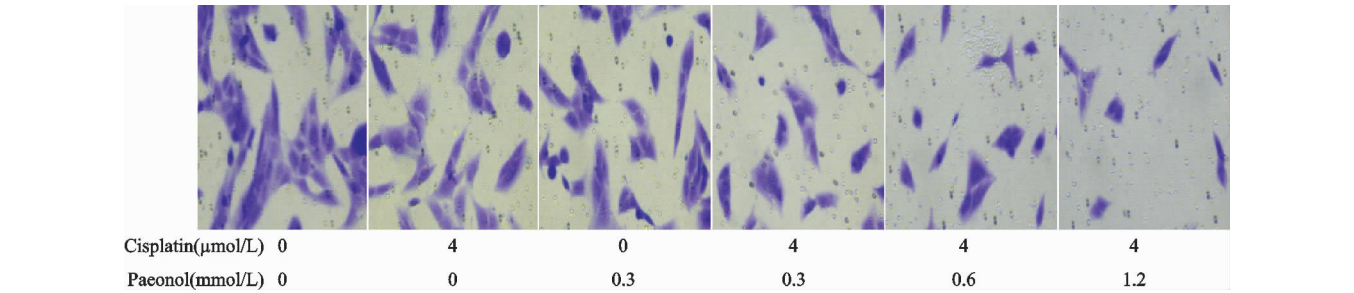


图2 徐长卿丹皮酚增强顺铂抑制骨肉瘤细胞侵袭能力(200 $\times$ )

的增加,呈红色荧光凋亡细胞明显增多,以徐长卿丹皮酚中、高浓度与顺铂联用最明显。与空白组比较,各药物组骨肉瘤细胞的凋亡率均显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与顺铂组比较,徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂给药随着药物浓度升高,细胞凋亡率呈升高趋势( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),具有一定的浓度依赖性(见表4及图3)。

表4 各组骨肉瘤细胞凋亡率( $\bar{x}\pm s$ ,%)

组别	浓度	0 h	24 h
空白组	—	10.49 $\pm$ 1.68	11.26 $\pm$ 1.72
顺铂组	4 $\mu\text{mol/L}$	10.37 $\pm$ 1.91	18.51 $\pm$ 1.06 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚组	0.3 mmol/L	10.23 $\pm$ 1.35	18.68 $\pm$ 1.24 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚低浓度+顺铂组	0.3 mmol/L+4 $\mu\text{mol/L}$	10.44 $\pm$ 1.52	20.82 $\pm$ 1.97 <sup>1)</sup>
徐长卿丹皮酚中浓度+顺铂组	0.6 mmol/L+4 $\mu\text{mol/L}$	10.76 $\pm$ 0.83	27.60 $\pm$ 1.71 <sup>2)3)</sup>
徐长卿丹皮酚高浓度+顺铂组	1.2 mmol/L+4 $\mu\text{mol/L}$	10.36 $\pm$ 1.34	33.58 $\pm$ 1.63 <sup>2)4)</sup>

注:与空白组比较,1) $P<0.05$ ,2) $P<0.01$ ;与顺铂组比较,3) $P<0.05$ ,4) $P<0.01$ 。

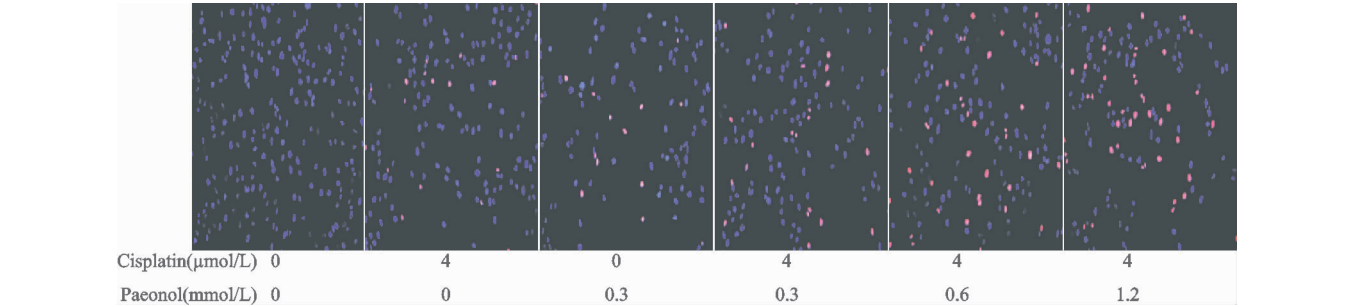


图3 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞凋亡的影响(200 $\times$ )

2.5 徐长卿丹皮酚联合顺铂对 MG-63 细胞中 Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化水平的影响

Western Blot 结果表明:徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂干预 24 h 后,Akt、mTOR 蛋白的表达水平变化不明显;p-Akt、p-mTOR 表达水平随徐长卿丹皮酚浓度增大而减少,提示徐长卿丹皮酚联合顺铂可显著抑制 Akt、mTOR 蛋白磷酸化水平,具有一定的浓度依赖性,并且其抑制作用强于顺铂单独给药组( $P<0.01$ ),见图 4。

3 讨论

近年来随着对骨肉瘤病理、影像及药理等研究的深入,临床上对于局限性骨肉瘤患者,经规范诊疗后 5 a 生存率可达 60%,然而因其具有高转移和增殖能力,临床治疗中容易复发、治疗效果不佳<sup>[9-10]</sup>。化疗药物的毒副作用及肿瘤多药耐药性是导致化疗失败的主要原因。中药在治疗骨肉瘤方面历史悠久,从中寻找治疗骨肉瘤的药物有广阔的应用前景<sup>[11]</sup>。

文献报道显示<sup>[12]</sup>,徐长卿是经动物实验和临床验证后对骨肿瘤有肯定疗效的药物之一,是骨肿瘤中医证候分型中湿毒留滞型、瘀血内阻型和瘀毒热结型的配伍方药<sup>[13]</sup>,主要药理成分丹皮酚药理作用广泛,包括解热镇痛、抗炎、抗氧化、调节细胞免疫、抑制血小板聚集、抗血栓形成及中枢抑制作用,且其不良反应少,而近年来丹皮酚的抗肿瘤活性逐渐被证实。研究发现,丹皮酚能抑制人肝癌细胞 Bel-7404 的增殖,诱导其凋亡,其作用机制可能与通过抑制 PI3K 通路,上调抑癌基因 PTEN 的表达,下调抑癌基因 Akt 的表达有关<sup>[14]</sup>。研究证实,丹皮酚能显著抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖,促进其凋亡,其机制可能和调控凋亡相关蛋白 Survivin、Caspase-3 的表达变化相关<sup>[15]</sup>。研究表明,丹皮酚通过诱导细胞凋亡抑制乳腺癌细胞生长,其机制可能与启动线粒体凋亡途径有关<sup>[16]</sup>。

本研究用不同浓度的徐长卿丹皮酚(0.3、0.6、1.2 mmol/L)联合顺铂处理骨肉瘤 MG-63 细胞后,



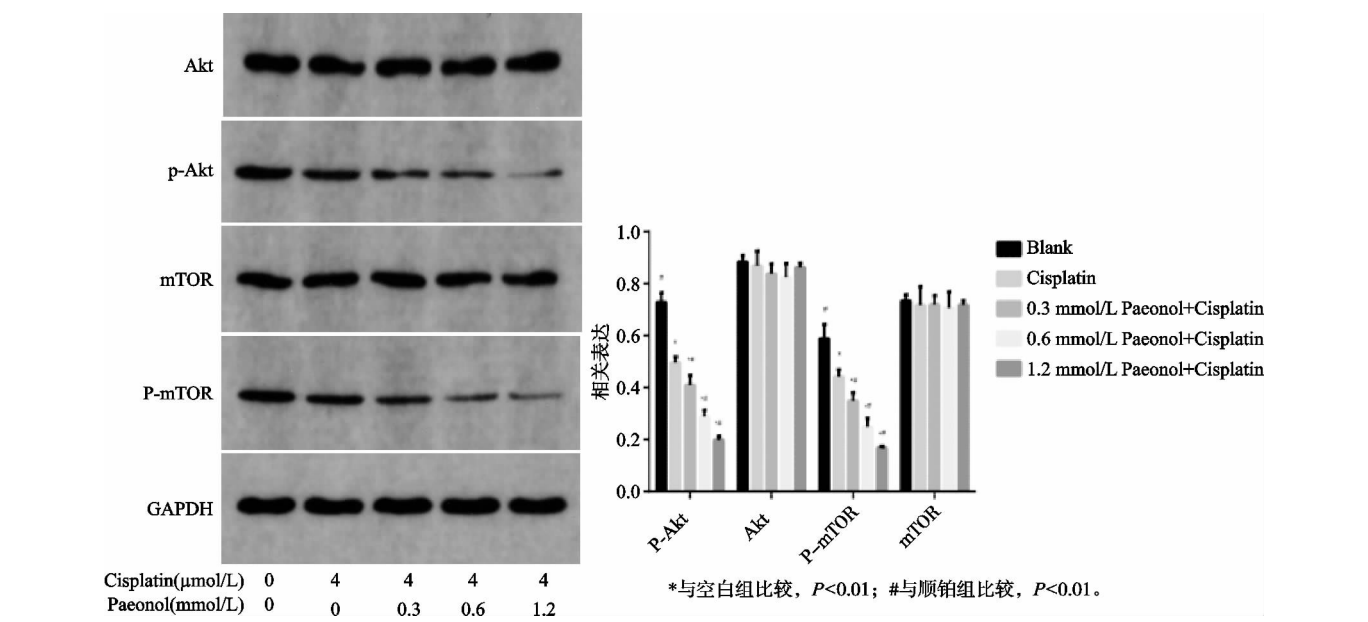


图 4 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞中 AKT 和 mTOR 蛋白磷酸化水平的影响

CCK-8 结果显示,与空白对照组和顺铂单独给药组相比,徐长卿丹皮酚不同浓度联合顺铂各组细胞增殖抑制率逐渐增加,呈时间和浓度依赖性,且作用 72 h 后徐长卿丹皮酚 1.2 mmol/L 联合顺铂对骨肉瘤细胞增殖抑制作用最强,CDI<0.7,说明徐长卿丹皮酚联合顺铂有协同抑瘤作用。用细胞划痕和Transwell实验检测不同浓度徐长卿丹皮酚联合顺铂对 MG-63 细胞迁移和侵袭的影响,结果显示联合用药可以显著抑制骨肉瘤细胞的迁移能力和侵袭能力,并具有一定的浓度依赖性,且其抑制作用强于顺铂单独给药组。用 TUNEL 法检测 MG-63 细胞凋亡,随着徐长卿丹皮酚浓度的增加,呈红色荧光凋亡细胞有明显增多的趋势,以徐长卿丹皮酚中、高浓度与顺铂联用最明显,结果提示徐长卿丹皮酚协同顺铂促进骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡。

为进一步探讨徐长卿丹皮酚联合顺铂协同抗骨肉瘤的作用机制,用 Western Blot 法检测骨肉瘤 MG-63 中 PI3K/Akt/mTOR 通路相关信号蛋白 Akt 和 mTOR 的磷酸化水平,结果表明:徐长卿丹皮酚联合顺铂可能通过抑制 Akt、mTOR 蛋白磷酸化,发挥协同抑瘤作用,并具有一定的浓度依赖性,但对 Akt、mTOR 总蛋白表达无影响。

参考文献

[1] 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.

[2] WANG D Y, WU Y N, HUANG J Q, et al. Hippo/YAP signaling pathway is involved in osteosarcoma chemoresistance[J]. Chin J Cancer, 2016, 35(7): 366-373.

[3] 张在翔, 罗显林, 夏辉, 等. 复方苦参注射液联合培美曲塞加顺铂方案治疗晚期肺腺癌的效果观察[J]. 吉林医学, 2019, 40(10): 2316-2318.

[4] 李明, 谭诗云. 丹皮酚通过下调 COX-2 表达及 PGE2 合成抑制大肠癌细胞增殖及诱导细胞凋亡[J]. 胃肠病学和肝

病学杂志, 2017, 26(2): 128-133.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 235.

[6] 吴琪, 陈运中, 吴高明. 丹皮酚与顺铂联用对人骨肉瘤细胞 MG-63 增殖、凋亡及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. 中国药房, 2021, 32(4): 438-442.

[7] FERREIRA M G, REIS N P, PASCOLI A L, et al. The importance of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in canine neoplasms: literature review[J]. Arch Med Vet, 2016, 48: 139-143.

[8] 李智, 宋美珍, 万梅绪, 等. 注射用益气复脉(冻干)联合顺铂对肺癌细胞 A549 增殖的协同作用研究[J]. 药物评价研究, 2019, 42(7): 1286-1290.

[9] OH J Y, KIME H, LEE Y J, et al. Synergistic autophagy effect of miR-212-3p in zoledronic acid-treated in vitro and orthotopic in vivo models and in patient-derived osteosarcoma cells[J]. Cancers (Basel), 2019, 19(11): 542-557.

[10] SUN J, XU H, QI M, et al. Identification of key genes in osteosarcoma by metaanalysis of gene expression microarray[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3075-3084.

[11] 张秋艳, 黄松丽, 张琳婧, 等. 黄芪和天花粉对小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞增殖和迁移及 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(5): 28-34.

[12] 郝锦锦, 方东. 徐长卿丹皮酚对骨癌痛大鼠镇痛作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11): 1526-1531.

[13] 周维顺, 谢长生. 略论骨肿瘤的诊治原则[J]. 浙江中医学院学报, 1997, 21(3): 10-11.

[14] 张春虎, 胡随瑜, 李云辉, 等. 丹皮酚对人肝癌 Bel-7404 的抑瘤效应及其机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2006(5): 682-686.

[15] 韩立, 郭晓娟, 陈重, 等. 丹皮酚逆转卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞多药耐药性的机制[J]. 药学学报, 2018, 53(9): 1511-1517.

[16] 王建杰, 闰冬梅, 董航, 等. 丹皮酚抑制小鼠乳腺癌细胞生长作用及机制的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(1): 48-51.

(收稿日期: 2021-04-11)