

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^Δ

吴琪^{1*}, 陈运中^{2#}, 吴高明³(1.湖北中医药大学临床技能实训中心, 武汉 430061; 2.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 3.汕头大学医学院第一附属医院濠江医院外二科, 广东汕头 515071)

中图分类号 R361⁺.3; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)04-0438-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.04.09

摘要 目的:研究丹皮酚与顺铂联用对人骨肉瘤细胞MG-63增殖、凋亡的影响及可能的作用机制。方法:取对数生长期MG-63细胞,分为空白对照组、顺铂组(4 μmol/L)、丹皮酚组(50 mg/L)和低、中、高浓度联用组(50、100、200 mg/L丹皮酚+4 μmol/L顺铂)。采用CCK-8法检测经药物作用24、48、72 h时的细胞增殖率,采用膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染法检测经药物作用24 h时的细胞凋亡率;采用实时荧光定量聚合酶链式反应法检测经药物作用24 h时细胞中PI3KCA、Akt、mTOR、P-gp、PTEN mRNA的相对表达量。结果:与空白对照组比较,各药物组细胞各时间点的细胞增殖率和细胞中PI3KCA、Akt、mTOR mRNA的相对表达量均显著降低,细胞凋亡率和细胞中P-gp、PTEN mRNA的相对表达量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与顺铂组和丹皮酚组比较,高浓度联用组细胞各时间点的细胞增殖率和细胞中PI3KCA、Akt、mTOR mRNA的相对表达量均显著降低,细胞凋亡率和细胞中P-gp、PTEN mRNA表达量均显著升高($P < 0.01$),中、低浓度联用组上述部分指标差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:丹皮酚与顺铂联用可抑制MG-63细胞增殖,促进其凋亡;这种作用可能与下调PI3KCA、Akt、mTOR mRNA表达,上调P-gp、PTEN mRNA表达有关。

关键词 丹皮酚;顺铂;骨肉瘤;PI3K/Akt/mTOR信号通路;增殖;凋亡

Effects of Paeonol Combined with Cisplatin on the Proliferation and Apoptosis of Human Osteosarcoma MG-63 Cells as Well as PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway

WU Qi¹, CHEN Yunzhong², WU Gaoming³(1. Clinical Skills Training Center, Hubei University of TCM, Wuhan 430061, China; 2. School of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China; 3. Second Department of Surgery, Haojiang Hospital, the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Guangdong Shantou 515071, China)

- 方法研究进展[J].分析测试学报, 2020, 39(9): 1168-1175.
- [13] 游宇, 罗林, 陈哲杰, 等. 生脉饮多糖提取工艺优化及对脾虚模型大鼠肠道功能调节作用的研究[J]. 中国药房, 2019, 30(4): 493-498.
- [14] 曹宇欣, 李科, 秦雪梅, 等. 基于部分酸水解寡糖特征图谱及免疫活性评价的不同产地黄芪的品质比较[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5598-5606.
- [15] 杨雯, 王嘉, 王栋, 等. 多糖中单糖测定方法的研究进展[J]. 北方药学, 2020, 17(8): 181-183.
- [16] 袁琪, 文红梅, 张前程, 等. 苓桂术甘汤中多糖结构组成及其抗氧化活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 63-70.
- [17] 李子江, 刘慰, 吴磊, 等. 偃松松塔多糖的单糖组成分析及活性研究[J]. 林产化学与工业, 2020, 40(1): 37-44.
- [18] 叶明珠, 吴嘉彩, 游思远, 等. 蜜炙对黄芪分级醇沉多糖及其抗氧化活性的影响[J]. 军事医学, 2019, 43(8): 602-607.
- [19] 吴彩霞, 刘瑜新, 常星, 等. 头状蓼提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国药房, 2009, 20(24): 1845-1847.
- [20] 刘晓燕, 蒋益萍, 张嘉宝, 等. 啤酒花的HPLC指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究[J]. 中国药房, 2020, 31(2): 138-143.
- [21] 谢学明, 李熙灿, 钟远声, 等. 龟板体外抗氧化活性的研究[J]. 中国药房, 2006, 17(18): 1368-1370.
- [22] 戴玥, 郑佳, 郑黎强. 抗氧化物质和自由基产物与脑卒中关系的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(3): 489-491.

Δ 基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究专项(No.2017YFC1701003); 湖北中医药大学“青苗计划”资助项目(No.2019ZZX021)

*高级实验师, 博士。研究方向: 骨关节病的中医药防治。电话: 027-68889070。E-mail: wuqi111@163.com

#通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药及复方的药效物质基础。电话: 027-68890021。E-mail: chyzh6204@126.com

(收稿日期: 2020-11-19 修回日期: 2021-01-08)

(编辑: 林静)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of paeonol combined with cisplatin on the proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell MG-63 and its possible mechanism. METHODS: MG-63 cells in logarithmic growth phase were divided into blank control group, cisplatin group (4 $\mu\text{mol/L}$), paeonol group (50 mg/L), and low, medium, high concentration combined groups (50, 100, 200 mg/L paeonol+4 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin). CCK-8 method was used to detect the cell proliferation rate at 24, 48, and 72 hours of treatment. Annexin V-FITC/PI double staining method was used to detect the cell apoptosis rate at 24 hours of treatment. The relative expression of PI3KCA, Akt, mTOR, P-gp and PTEN mRNA in cells were detected by qRT-PCR. RESULTS: Compared with blank control group, the cell proliferation rate at each time point, and the relative expression of PI3KCA, Akt and mTOR mRNA in cells were significantly reduced and the apoptosis rate and the relative expression of P-gp and PTEN mRNA in the cells were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with cisplatin group and paeonol group, cell proliferation rate at each time point and the relative expression of PI3KCA, Akt and mTOR mRNA in cells were decreased significantly in the high concentration combination group, while the relative expression of P-gp and PTEN mRNA in the cells were significantly increased ($P<0.01$); there were statistical significance in some of the above indicators in the medium and low concentration combination groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: The combination of paeonol and cisplatin could inhibit the proliferation of MG-63 cells and promote their apoptosis, which may be related to the down-regulation of PI3KCA, Akt and mTOR mRNA expression, and the up-regulation of P-gp and PTEN mRNA expression.

KEYWORDS Paeonol; Cisplatin; Osteosarcoma; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Proliferation; Apoptosis

骨肉瘤是起源于间叶组织,以能产生骨样组织的梭形基质细胞为特征的骨骼系统原发性恶性肿瘤^[1],好发于骨生长活跃的青少年^[2]。骨肉瘤恶性程度高、破坏性强,早期便可发生侵袭与转移^[3]。随着保肢手术、放疗和新辅助化疗的发展,骨肉瘤患者的5年生存率已提高到70%左右^[4],但复发患者的生存率仍不足30%^[5]。目前,临床治疗骨肉瘤的化疗药物以阿霉素、顺铂和大剂量甲氨蝶呤为主,然而高剂量化疗药物所致的毒副作用和肿瘤细胞原发或继发的多药耐药严重影响了其临床疗效和患者的长期生存率^[6]。顺铂作为骨肉瘤化疗的常用药物,不仅可以通过细胞毒作用直接杀伤肿瘤细胞,还可以通过诱导细胞凋亡发挥治疗作用^[7-8],但是其肾毒性和致严重呕吐的副作用限制了该药的临床使用^[9]。因此,探索低毒、高效的抗骨肉瘤药物成为目前研究的热点。

丹皮酚是从萝藦科植物徐长卿干燥根或全草和毛茛科植物牡丹、芍药的根皮中提取的小分子酚类化合物,具有广泛的药理活性^[10-11]。既往研究发现,丹皮酚对人乳腺癌细胞EMT6、人食管癌细胞Eca-109、人肝癌细胞Bel-7404、人结肠癌细胞LoVo、人卵巢癌细胞SKOV3等多种肿瘤细胞均具有明显的抑制作用,其抗肿瘤的分子机制之一可能是抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡^[12],可见该成分是一种潜在的多靶点抗癌剂^[13]。最新研究认为,丹皮酚与化疗药物或放疗药物联用可起到协同抗肿瘤作用^[14]。然而,目前关于丹皮酚与化疗药物联用对骨肉瘤细胞的影响尚未见报道。PI3K/Akt/mTOR通路是近年来发现的细胞内重要的信号转导通路之一,该通路的表达失调与肿瘤的发生密切相关^[15]。基于此,本文研究了丹皮酚与顺铂联用对人骨肉瘤细胞MG-63增殖、凋亡的影响,并基于PI3K/Akt/mTOR通路探讨其可能机制,旨在为抗骨肉瘤新药的开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括5702R型低速离心机(德国Eppendorf公司)、MCO-15AC型CO₂恒温培养箱(日本Sanyo公司)、Flexstation[®] 3型全自动酶标仪(美国Molecular Devices公司)、IX51型倒置显微镜(日本Olympus公司)、CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)、QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司)、Nano-100型微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司)、JY300型水平电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

丹皮酚对照品和顺铂对照品(批号分别为H35803、P4394,纯度均大于99%)均购自美国Sigma公司,SYBR Green Master Mix和HiScript逆转录酶(批号分别为Q111-02、R101-01/02)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,脱氧核糖核苷三磷酸(批号P4325)购自北京天根生化科技有限公司,RNA酶抑制剂(批号J11202)购自北京金全生物技术有限公司,MEM培养基(批号PM150410)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液和0.25%胰蛋白酶(批号分别为10091-148、15070-063、15050065)均购自美国Gibco公司,CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号HY-K0301)购自美国MCE公司,膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(批号KGA108)购自南京凯基生物科技发展有限公司,总RNA提取试剂盒(Trizol法,批号15596-026)购自美国Ambion公司,GAPDH、PI3KCA、Akt、mTOR、P-gp、PTEN等基因的PCR引物均由武汉天一辉远生物科技有限公司设计、合成(引物序列及产物长度见表1);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

表1 GAPDH、PI3KCA、Akt、mTOR、P-gp、PTEN基因的引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length of GAPDH, PI3KCA, Akt, mTOR, P-gp and PTEN

基因	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
GAPDH	上游引物: GACCTGCCGTCTAGAAAACC	229
	下游引物: GCTGTAGCCAAATTCGTGTGC	
PI3KCA	上游引物: GTCAATCGGTGACTGTGTGG	233
	下游引物: GACGATCTCCAATCCCAA	
Akt	上游引物: ACACCAGGTAATTTGATGAGGAG	143
	下游引物: TCAGGCCGTGCCGTGGCCGAGTAG	
mTOR	上游引物: GCAACCTTCTTTGACAACATTTTT	297
	下游引物: ATTTCTTCTCTCAGACGCTCTCC	
P-gp	上游引物: ATAGGCTGGTTGATGTGCAC	211
	下游引物: CAGCTGACAGTCCAAGAAGCAG	
PTEN	上游引物: CGACGGGAAGACAAGTTCAT	163
	下游引物: AGGTTTCTCTGGTCTCTGGT	

1.3 细胞

人骨肉瘤细胞MG-63购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 分组与给药

将对数生长期的MG-63细胞分为空白对照组、顺铂组(4 μmol/L)、丹皮酚组(50 mg/L)和低、中、高浓度联用组(50、100、200 mg/L丹皮酚+4 μmol/L顺铂)。空白对照组细胞仅加入完全培养基(即含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的MEM培养基,下同),其余组细胞加入含相应药物的完全培养基。本研究中顺铂和丹皮酚的给药浓度均参考文献[16-17]和前期预试验结果设置。

2.2 细胞增殖率的检测

采用CCK-8法进行检测。取对数生长期且生长状态良好的MG-63细胞,用完全培养基将细胞密度调整为 5×10^4 个/mL,按100 μL/孔接种至96孔板中,于37℃、5%CO₂下培养过夜。将上述细胞按“2.1”项下方法分组、给药,每组设置5个复孔,分别于37℃、5%CO₂下培养24、48、72 h时每孔加入CCK-8试剂10 μL,培养4 h。使用酶标仪于450 nm波长处测定各孔的光密度(OD)值,计算细胞增殖率:细胞增殖率(%)=给药组OD值/空白对照组OD值×100%。试验重复3次。

2.3 细胞凋亡率的检测

采用Annexin V-FITC/PI双染法进行检测。收集“2.2”项下空白对照组、顺铂组、丹皮酚组和低、中、高浓度联用组培养24 h的细胞,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的0.25%胰蛋白酶消化,以1 500 r/min离心5 min,弃去上清液,沉淀加磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)重悬,并用PBS洗涤2次,再以1 500 r/min离心5 min,弃去上清液,沉淀加入Binding buffer 500 μL重悬,分别加入Annexin V-FITC和PI染液各5 μL,混匀后,于室温、避光下反应5~15 min,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。试验重复3次。

2.4 细胞中PI3KCA、Akt、mTOR、P-gp、PTEN mRNA表达水平的检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。收集“2.2”项下空白对照组、顺铂组、丹皮酚组和低、中、高浓度联用组培养24 h的细胞,裂解后,按照Trizol法提取总RNA,逆转录成cDNA,反应条件:25℃反应5 min让引物充分退火结合到RNA模板上;50℃逆转录15 min;85℃灭活逆转录酶5 min;4℃保持10 min。将cDNA用无菌ddH₂O做8倍稀释后进行PCR扩增,反应体系(20 μL):cDNA(8倍稀释)4 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL,SYBR Green Master Mix预混液10 μL,50×ROX Reference Dye2预混液0.4 μL,无菌ddH₂O 4.8 μL。反应条件:50℃预测保温2 min,95℃预变性10 min;95℃变性30 s,60℃退火延伸30 s,共循环40次。采用QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1软件绘制溶解曲线,以GAPDH为内参,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PI3KCA、Akt、mTOR、P-Gp、PTEN mRNA的表达水平,并以空白对照组为标准计算相对表达量。试验重复3次。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丹皮酚与顺铂联用对MG-63细胞增殖率的影响

与空白对照组比较,各药物组细胞各时间点的增殖率均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与顺铂组和丹皮酚组比较,低、中、高浓度联用组细胞各时间点的增殖率(除低浓度联用组给药24 h外)均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表2。

表2 丹皮酚与顺铂联用对MG-63细胞不同时间点增殖率的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Effects of paeonol combined with cisplatin on the proliferation rate of MG-63 cells at different time points($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	100	100	100
顺铂组	74.72±5.51*	62.41±5.25*	39.83±5.03**
丹皮酚组	73.94±5.46*	60.87±5.63*	39.04±5.22**
低浓度联用组	72.95±5.33*	51.12±4.41*** ^Δ	35.92±4.44*** ^{ΔΔ}
中浓度联用组	64.62±4.49*** ^Δ	47.37±3.74*** ^Δ	28.28±3.57*** ^{ΔΔ}
高浓度联用组	56.63±3.71*** ^{ΔΔ}	38.96±2.90*** ^{ΔΔ}	24.62±3.01*** ^{ΔΔ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与顺铂组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与丹皮酚组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. cisplatin group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. paeonol group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

3.2 丹皮酚与顺铂联用对MG-63细胞凋亡率的影响

与空白对照组比较,各药物组细胞的凋亡率均显著升高($P < 0.01$)。与顺铂组和丹皮酚组比较,低、中、高浓度联用组细胞的凋亡率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01), 详见图1、图2。

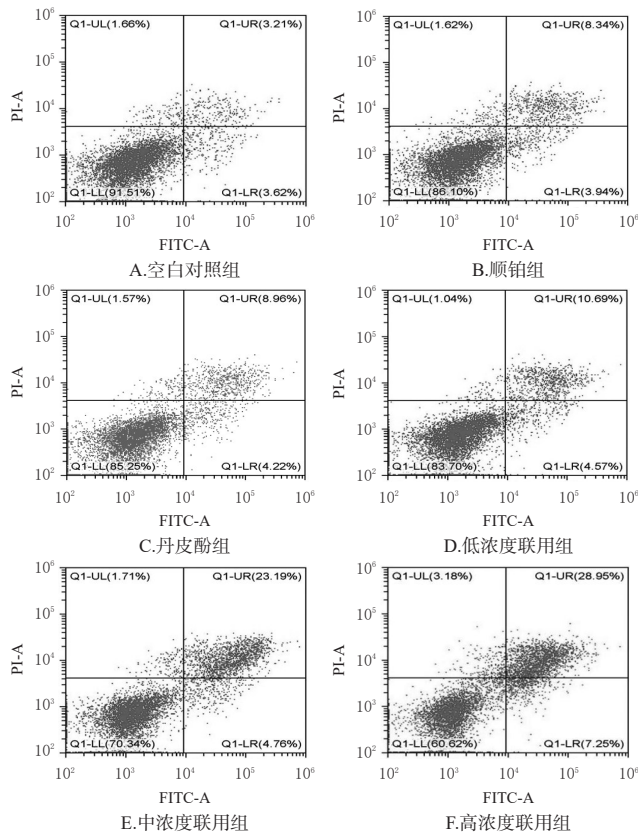
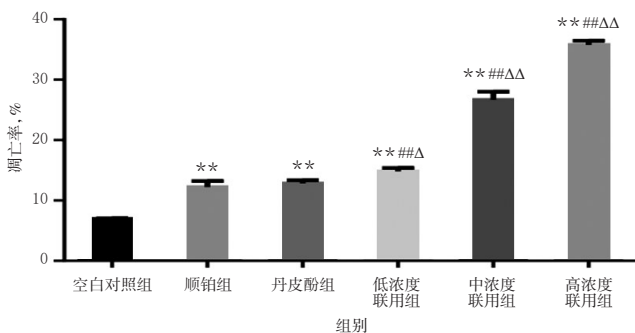


图1 丹皮酚与顺铂联用对MG-63细胞凋亡率影响的流式细胞图

Fig 1 Flow cytometries of the effects of paeonol combined with cisplatin on the apoptotic rate of MG-63 cells



注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$;与顺铂组比较, ## $P < 0.01$;与丹皮酚组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. cisplatin group, ## $P < 0.01$; vs. paeonol group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图2 丹皮酚与顺铂联用对MG-63细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 2 Effects of paeonol combined with cisplatin on the apoptotic rate of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 丹皮酚与顺铂联用对MG-63细胞中PI3KCA、Akt、mTOR、P-gp、PTEN mRNA表达的影响

与空白对照组比较,各药物组细胞中PI3KCA、Akt、mTOR mRNA的相对表达量均显著降低,P-gp、PTEN

mRNA的相对表达量均显著升高($P < 0.01$)。与顺铂组和丹皮酚组比较,低、中、高浓度联用组细胞中PI3KCA mRNA(除低浓度联用组外)、Akt mRNA(除低、中浓度联用组外)、mTOR mRNA的相对表达量均显著降低,P-gp mRNA(除中浓度联用组外)、PTEN mRNA(除低浓度联用组外)的相对表达量均显著升高($P < 0.01$),详见表3。

表3 丹皮酚与顺铂联用对MG-63细胞中PI3KCA、Akt、mTOR、P-gp、PTEN mRNA相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of paeonol combined with cisplatin on relative expression of PI3KCA, Akt, mTOR, P-gp and PTEN mRNA in MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PI3KCA mRNA	Akt mRNA	mTOR mRNA	P-gp mRNA	PTEN mRNA
空白对照组	1	1	1	1	1
顺铂组	0.562 ± 0.051**	0.636 ± 0.069**	0.573 ± 0.091**	1.703 ± 0.112**	1.868 ± 0.231**
丹皮酚组	0.564 ± 0.053**	0.646 ± 0.072**	0.574 ± 0.089**	1.727 ± 0.131**	1.902 ± 0.252**
低浓度联用组	0.465 ± 0.045** Δ	0.509 ± 0.084**	0.442 ± 0.056** $\Delta\Delta$	2.341 ± 0.195** $\Delta\Delta\Delta$	2.398 ± 0.278**
中浓度联用组	0.355 ± 0.046** $\Delta\Delta$	0.443 ± 0.087**	0.339 ± 0.053** $\Delta\Delta\Delta$	2.001 ± 0.314**	3.239 ± 0.351** $\Delta\Delta\Delta$
高浓度联用组	0.277 ± 0.066** $\Delta\Delta\Delta$	0.321 ± 0.067** $\Delta\Delta\Delta$	0.255 ± 0.049** $\Delta\Delta\Delta$	2.284 ± 0.234** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	3.749 ± 0.412** $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$;与顺铂组比较, ## $P < 0.01$;与丹皮酚组比较, $\Delta P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. cisplatin group, ## $P < 0.01$; vs. paeonol group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

4 讨论

本研究通过CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测发现,与空白对照组比较,各药物组骨肉瘤细胞各时间点(24、48、72 h)的增殖率均显著降低;与顺铂组和丹皮酚组比较,低、中、高浓度联用组细胞各时间点的增殖率(除低浓度联用组作用24 h外)均显著降低。这说明丹皮酚与顺铂联用可协同抑制骨肉瘤细胞的增殖,且有浓度依赖性和时间依赖性趋势。

本研究通过Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡情况,结果显示,与空白对照组比较,各药物组骨肉瘤细胞的凋亡率均显著升高;与顺铂组和丹皮酚组比较,低、中、高浓度联用组细胞的凋亡率均显著升高。这说明丹皮酚与顺铂联用可促进骨肉瘤细胞凋亡,且有浓度依赖性趋势。

PI3K是一种可催化磷脂酰肌醇D3位磷酸化的脂类激酶,研究证实骨肉瘤中存在着PI3KCA基因突变,后者可激活PI3K通路,其表达水平与骨肉瘤恶性程度相关^[18]。Akt是一个丝/苏氨酸蛋白激酶,是PI3K关键的下游效应分子^[19]。mTOR是一种与PI3K/Akt通路相关的蛋白激酶^[20]。PI3K活化产生的信使PIP3可激活其下游的Akt,Akt激活使肿瘤细胞对凋亡耐受性增加、细胞生长代谢异常加速;Akt通过磷酸化作用激活其下游的底物mTOR,引起肿瘤细胞癌蛋白分泌增加、细胞周期循环加快、G期时程缩短,导致肿瘤迅速发生、发展。

*PTEN*是具有磷酸酶活性的抑癌基因,在多种肿瘤细胞中异常表达,对PI3K/Akt信号通路起到负向调节作用^[21],上调*PTEN*基因的表达或使用PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制剂,均可逆转肿瘤细胞的多药耐药,从而提高化疗的效果。P-gp是相对分子质量为170 kDa的跨膜转运糖蛋白,由*ABCB1*基因编码,具有12个跨膜区和2个细胞内腺苷三磷酸(ATP)连接点。肿瘤细胞长期接触亲脂类化疗药物,*ABCB1*基因被诱导扩增,P-gp被大量表达,ATP跨膜转运作用将药物转运到细胞外,使细胞内药物集聚减少,作用靶点部位的药物浓度降低,导致化疗效果下降或消失。P-gp在多种恶性肿瘤中均呈较高表达状态^[22]。本研究结果显示,丹皮酚联合顺铂可明显下调骨肉瘤细胞PI3KCA、Akt、mTOR mRNA的表达,上调P-gp、*PTEN* mRNA表达,从而阻断PI3K/Akt/mTOR信号通路靶基因表达,发挥抑瘤作用。其中P-gp mRNA在低、高浓度联用组表达的升高可能与P-gp介导的多药耐药有关^[23],具体机制还需进一步深入研究。

综上所述,丹皮酚联合顺铂可通过调控骨肉瘤细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路中PI3KCA、Akt、mTOR、P-gp、*PTEN* mRNA的表达而抑制骨肉瘤细胞的增殖、诱导其凋亡,下一步可深入探讨丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞多药耐药的影响。

参考文献

[1] GIANFERANTE DM, MIRABELLO L, SAVAGE SA. Germline and somatic genetics of osteosarcoma-connecting aetiology, biology and therapy[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017. DOI:10.1038/nrendo.2017.16.

[2] HUO YQ, LI QB, WANG XQ, et al. MALAT1 predicts poor survival in osteosarcoma patients and promotes cell metastasis through associating with EZH2[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29):46993-47006.

[3] SHAIKH AB, LI FF, LI M, et al. Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2016. DOI: 10.3390/ijms170-40506.

[4] ZHANG Y, YANG J, ZHAO N, et al. Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5):6228-6237.

[5] DASARI S, TCHOUNWOU PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014. DOI:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

[6] LUETKE A, MEYERS PA, LEWIS I, et al. Osteosarcoma treatment: where do we stand: a state of the art review[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4):523-532.

[7] SHANMUGAM V, CHIEN YH, CHENG YS, et al. Oligonucleotides-assembled au nanorod-assisted cancer photothermal ablation and combination chemotherapy with targeted dual-drug delivery of doxorubicin and cisplatin pro-drug[J]. *Acs Appl Mater Inter*, 2014, 6(6):4382-4393.

[8] SUN XL, WEI Q, CHENG J, et al. Enhanced stim1 ex-

pression is associated with acquired chemo-resistance of cisplatin in osteosarcoma cells[J]. *Hum Cell*, 2017. DOI: 10.1007/s13517-017-0169-9.

[9] LINDSE YB, MARKEL JE, KLEINERMAN ES. Osteosarcoma overview[J]. *Rheumatol Ther*, 2017, 4(1):25-43.

[10] 耿帅,赵育林,曾凯,等.丹皮酚的研究进展[J].*中国新药与临床杂志*, 2016, 35(5):310-313.

[11] 吴琪,吴倩,周晓红,等.丹皮酚对强直性脊柱炎模型小鼠Wnt和BMP/Smad信号转导通路的影响[J].*中国药房*, 2018, 29(11):1500-1504.

[12] TSAI CY, KAPOOR M, HUANG YP, et al. Synthesis and evaluation of aminothiazole-paeonol derivatives as potential anticancer agents[J]. *Molecules*, 2016. DOI: 10.3390/molecules21020145.

[13] 李稟枢,付琼,孙青,等.丹皮酚对人卵巢癌细胞A2780s增殖的影响[J].*肿瘤*, 2011, 31(2):122-125.

[14] 张传凤,颜贵明,马克龙.丹皮酚抗癌作用及机制近五年研究进展[J].*辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(10):158-161.

[15] SONG RP, TIAN K, WANG WD, et al. P53 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of osteosarcoma through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Int J Surg*, 2015. DOI: 10.1016/j.ijssu.2015.04.050.

[16] 刘盖为,代国,郭卫春.顺铂影响骨肉瘤143B细胞Notch信号通路的实验研究[J].*临床和实验医学杂志*, 2017, 16(3):209-213.

[17] 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].*胃肠病学和肝病杂志*, 2017, 26(2):128-133.

[18] EDWIN C, FRANCIS H, LAURA M, et al. High-throughput genotyping in osteosarcoma identifies multiple mutations in phosphoinositide-3-kinase and other oncogenes[J]. *Cancer*, 2012, 118(11):2905-2914.

[19] CHEAIB B, AUGUSTE A, LEARY A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges[J]. *Chin J Cancer*, 2015, 34(1):4-16.

[20] PACHOW D, WICK W, GUTMANN DH, et al. The mTOR signaling pathway as a treatment target for intracranial neoplasms[J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(2):189-199.

[21] XI YM, CHEN Y. Oncogenic and therapeutic targeting of PTEN loss in bone malignancies[J]. *J Cell Biochem*, 2015. DOI:10.1002/jcb.25159.

[22] LIN LF, WU MH, PIDUGU VK, et al. P-glycoprotein attenuates DNA repair activity in multidrug-resistant cells by acting through the Cbp-Csk-Src cascade[J]. *Oncotarget*, 2017. DOI:10.18632/oncotarget.15065.

[23] GAO Y, LIAO YF, SHEN JK, et al. Evaluation of P-glycoprotein (Pgp) expression in human osteosarcoma by high-throughput tissue microarray[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(6):1606-1612.

(收稿日期:2020-11-09 修回日期:2021-01-18)

(编辑:邹丽娟)