

紫草素通过内质网应激蛋白抑制人骨肉瘤 U-2 OS 细胞增殖的研究

缪明星¹, 黄莉莉^{2*}, 王欣²

1. 中国药科大学 药学院, 江苏 南京 210098

2. 南京大学医学院附属鼓楼医院 药剂科, 江苏 南京 210008

摘要: 目的 研究紫草素对人骨肉瘤 U-2 OS 细胞存活的抑制和对内质网应激蛋白的调控机制。方法 采用 CCK-8 法检测 0.156 25~4 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素对人骨肉瘤 U-2 OS 细胞抑制率; 取对数生长期 U-2 OS 细胞, 分别给予 0~4 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素诱导 U-2 OS 细胞凋亡, 24 h 后用流式细胞术检测细胞凋亡率; 通过 Western blotting 检测紫草素对内质网应激蛋白 ATF6、IRE1 α 、ATF4、GRP78 的表达调控作用; 将混有质粒或小干扰 RNA 的 Lipofectamine 2000 试剂处理 U-2 OS 细胞 6 h 换液, 加入紫草素处理, 检测 ATF4 或 GRP78 对紫草素处理的细胞活力的影响; 将 ATF4 或空白质粒 (3 μg)、GRP78 报告质粒 (3 μg) 和海肾内参质粒 (4 μg) 均匀混合, 用 Lipofectamine 2000 试剂对人骨肉瘤 U-2 OS 细胞进行转染, 6 h 换液, 加入 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素继续孵育 24 h, 实验结果用各孔海肾荧光做参比进行校正, 检测紫草素对 ATF4 介导的 GRP78 转录的调控作用。结果 紫草素显著抑制人骨肉瘤细胞的活力并能浓度相关性促进细胞凋亡; Western blotting 结果显示, 紫草素能特异性增加 ATF4 和 GRP78 蛋白的表达; 过表达 ATF4 能显著抑制 U-2 OS 细胞活力 ($P < 0.01$); 敲低 ATF4 能部分逆转紫草素对细胞活力的抑制 ($P < 0.01$); 过表达 GRP78 并不影响紫草素对细胞存活的抑制效果, 但敲低 GRP78 可以显著增加紫草素对 U-2 OS 细胞活力的抑制 ($P < 0.01$); 报告基因结果显示紫草素能增加 ATF4 对 GRP78 基因的转录调控。结论 紫草素能显著抑制人骨肉瘤 U-2 OS 细胞活力, 诱导内质网应激蛋白的表达, 敲低 GRP78 能进一步增加紫草素的细胞毒性。

关键词: 紫草素; U-2 OS 细胞; 凋亡率; 内质网应激; ATF6; IRE1 α ; ATF4; GRP78

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)10-2899-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.10.004

Inhibition of shikonin on proliferation of human osteosarcoma U-2OS cells by promoting endoplasmic reticulum stress protein

MIAO Ming-xing¹, HUANG Li-li², WANG Xin²

1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210098, China

2. Department of Pharmacy, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

Abstract: Objective To study the inhibition of shikonin on osteosarcoma U-2 OS cells and regulate the levels of endoplasmic reticulum stress protein in U-2 OS cells. **Methods** CCK-8 assay was used to detect U-2 OS cell viability treated with shikonin (0.156 25 — 4 $\mu\text{mol/L}$). Flow cytometry analysis was used to measure cell apoptosis induced with shikonin 0 — 4 $\mu\text{mol/L}$ during 24 h. The levels of endoplasmic reticulum stress proteins ATF6, IRE1 α , ATF4, and GRP78 stimulated with shikonin were determined by Western blotting method. The U-2OS cells were treated with Lipofectamine 2000 reagent mixed with plasmid or small interfering RNA for 6 h. Shikonin was added to treat U-2OS cells to detect the effect of ATF4 or GRP78 on the cell viability of shikonin-treated cells. ATF4 or blank plasmid (3 μg), GRP78 reporter plasmid (3 μg) and sea kidney reference plasmid (4 μg) were homogeneously mixed, and human osteosarcoma U-2OS cells were transfected with Lipofectamine 2000 reagent. After dyeing for 6 h, adding 0.8 $\mu\text{mol/L}$ shikonin to incubate for 24 h. The results were calibrated with fluorescence of each porous sea kidney as a reference to detect the regulatory effect of shikonin on ATF4-mediated GRP78 transcription. **Results** Shikonin showed inhibitory effect on U-2 OS cells activities, and induced cell apoptosis in a concentration-dependent manner in U-2 OS cells. Western blotting results showed that ATF4 and GRP78 proteins levels were markedly increase treated with shikonin. Overexpression of ATF4 could significantly inhibit the viability of

收稿日期: 2019-07-04

基金项目: 江苏省中医药管理局科技项目 (YB2017046)

作者简介: 缪明星 (1984-), 男, 高级实验师, 硕士, 从事分子药理学及药物代谢动力学研究。E-mail: mmmx0224@cpu.edu.cn

*通信作者 黄莉莉, 副主任药师, 研究方向为药剂学、药房管理。E-mail: 20031269@qq.com

U-2OS cells ($P < 0.01$). Knockdown of ATF4 could partially reverse the inhibition of shikonin on cell viability ($P < 0.01$). Overexpression of GRP78 did not affect the inhibition of shikonin on cell survival, but knockdown of GRP78 could significantly increase inhibitory effects of shikonin on U-2OS cells. Reporter gene results showed that shikonin could increase transcriptional regulation of GRP78 gene by ATF4. **Conclusion** Shikonin can significantly inhibit the viability of osteosarcoma U-2 OS cells, induce the expression of endoplasmic reticulum stress protein, and further increase the cytotoxicity of shikonin by knockdown of GRP78.

Key words: shikonin; osteosarcoma U-2 OS cell; endoplasmic reticulum stress; ATF6; IRE1 α ; ATF4; GRP78

骨肉瘤是起源于间叶组织的恶性肿瘤, 患病人群多集中在儿童、青少年、55 岁以上的中老年人^[1]。骨肉瘤易发生在血运丰富的长管状骨干骺端, 早期极有可能发生肺转移, 且发展迅速^[2]。目前的主要治疗方式为手术切除和化疗相结合^[3], 但由于复发和耐药发生率较高, 严重影响了术后预后^[4]。紫草素属于萘醌类物质, 是紫草中主要活性成分, 又称紫草醌或紫草宁, 因具有抗癌、抗炎、抗菌、抗氧化、神经保护、心脏保护、伤口愈合等作用而被广泛报道, 常用于治疗结肠癌、肝癌、神经胶质瘤、关节炎、哮喘、急性肺损伤等。但紫草素对人骨肉瘤的抑制活性报道较少。本研究探索紫草素通过调控内质网应激蛋白诱导人骨肉瘤细胞死亡的作用及其机制。

1 材料

1.1 仪器

BSA124S 分析天平 (德国 Sartorius 公司); BSC-1000 II A2 生物安全柜 (上海博迅实业有限公司); HEPA Class100 型二氧化碳培养箱、Easy pure II 超纯水仪、Biofuge Primorcentigge 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CKX41 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); Accuri C6 流式细胞仪 (美国 BD 公司); SpectraMax Plus 384 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Mini-Protean Tetra 电泳槽、Mini Trans-Blot 转印槽、ChemiDOC XRS+ 分子成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); YXQ-LS-50S11 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); 化学发光仪 (美国 Turner Designs 公司)。

1.2 试剂

紫草素 (批号 S827904) 购自美国 Selleck Chemicals 公司, 质量分数 99.03%; 胎牛血清 (FBS) (批号 1816937)、Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; RPMI-1640 培养基 (批号 AAF023615) 购自美国 GE 生命科学; 细胞计数试剂盒 (CCK-8) (批号 40203ES60)、细胞凋亡试剂盒 (批号 40302ES20) 购自上海翊圣生

物科技有限公司; 人 ATF4 (ab184909)、ATF6 (ab62576)、GRP78 (ab108615)、IRE1 α (ab124945)、GAPDH (ab181602) 单克隆一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗 (ab6721) 均购自美国 abcam 公司; 干扰 RNA 订购于锐博生物科技有限公司; 质粒订购于通用吉满生物科技有限公司; 海肾荧光素酶报告质粒 (E2231)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (E2920) 购自美国 Promega 公司。

1.3 细胞

人骨肉瘤 U-2 OS 细胞购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

从液氮罐中取出冻存的人骨肉瘤 U-2 OS 细胞, 将冻存管立即放入 37 °C 水浴中, 轻摇使其迅速融化, 解冻后的细胞置于离心机中 1 000 r/min 离心 5 min, 吸弃冻存液, 加入 1 mL 温热的 RPMI-1640 完全培养基轻轻吹打, 转入培养瓶中, 缓慢补加适量完全培养基, 轻轻摇动培养瓶形成单细胞悬液, 放入培养箱中 (37 °C、5% CO₂ 浓度、饱和湿度) 培养。待培养基颜色发生明显变化后使用移液器吸弃培养基, 温热 PBS 润洗 2 次后加入等体积新鲜培养基, 于相同条件下继续培养, 直至达到实验所需细胞汇合度。取汇合度为 80%~90% 的生长状态良好的细胞, 吸弃旧的培养基, 加入 2 mL 温热 PBS 轻轻润洗 2 次, 然后加入 2 mL 温热的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 置于培养箱中孵育 2 min, 取出放置于显微镜下进行观察, 待细胞形态由贴壁状态下的梭形逐渐收缩变圆、间隙增大后吸弃消化液终止消化, 加入适量温热的新鲜完全培养基, 接着用移液器轻轻吹打贴壁细胞, 使之脱落并处于单细胞悬浮状态, 计数后取适量细胞分置于新的无菌培养瓶内继续培养或用于实验。

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率

取处于对数生长期且状态良好的 U-2 OS 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化使贴壁细胞脱落, 新鲜完全培养基轻轻吹打使混匀, 计数, 调整细胞密度 $2.5 \times$

10^4 /mL 的单细胞悬液, 以 200 μ L/孔的体积接种于 96 孔培养板中, 置于 5% CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜; 弃旧培养基, 加入等体积一系列浓度梯度 (0.156 25、0.3125、0.625、0.125、0.25、0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) 紫草素培养基稀释液, 继续培养 48 h 后, 于每孔加入 20 μL CCK-8 溶液, 放入培养箱中继续孵育 4 h, 酶标仪在波长为 490 nm 测定每个孔的吸光度 (A) 值, 计算不同浓度的紫草素对细胞的抑制率。实验重复 3 次, 用 Graphpad Prism 5.0 软件计算紫草素对受试细胞株的 IC_{50} 值。

抑制率 = (1 - 加药孔平均 A 值) / 空白对照孔平均 A 值

2.3 紫草素对 U-2 OS 细胞凋亡的影响

取对数生长期的人骨肉瘤 U-2 OS 细胞, 弃去培养基, PBS 清洗 2 次, 胰蛋白酶消化后, 用新鲜培养基收集细胞, 计数, 以 1×10^5 /mL 细胞密度接种于 6 孔培养板中, 每孔 2 mL, 放入培养箱培养。过夜待细胞贴壁, 分别加入 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素处理, 继续孵育 24 h 后, 收集各孔细胞上清液, 并使用胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞置离心管中与上清液合并, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复一次。往离心管中加入预先配好的 100 μL $1 \times$ Annexin V Binding Solution, 制成细胞悬液, 并依次加入 Annexin V-FITC 结合物和 Propidium Iodide (PI) Solution 各 5 μL , 轻弹离心管混匀试剂, 室温下避光培养 15 min。最后加入 400 μL $1 \times$ Annexin V Binding Solution, 使用流式细胞仪进行检测。

2.4 紫草素对内质网应激蛋白的调控检测

取对数生长期的人骨肉瘤 U-2 OS 细胞, 常规消化后, 用新鲜培养基收集细胞, 计数, 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔培养板中, 放入培养箱培养。过夜待细胞贴壁, 分别加入紫草素 0、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$, 继续孵育 24 h 后, 收集细胞, 加入预配制的含 PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物的 Western、IP 细胞裂解液, 制备蛋白样品, BCA 法测定蛋白浓度。制备 10% 的分离胶和 4% 浓缩胶对蛋白样品进行电泳分离, 转 PVDF 膜, 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入相应的一抗 (1 : 1 000) 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, HRP 标记的二抗 (1 : 10 000) 常温孵育 2 h, 加入增强型化学发光液上机, 对内质网应激蛋白的表达进行检测。

2.5 内质网应激基因敲低和过表达对细胞活力的影响

对数生长期的人骨肉瘤 U-2 OS 细胞调整浓度为 2.5×10^5 /mL 后接种于 6 孔培养板中, 于培养箱

中孵育过夜, 75 pmol siRNA 寡核苷酸或 4、8 μg DNA 质粒与 Lipofectamine 2000 试剂混合后转染细胞, 6 h 换液, 加入 0.4、0.8、1.6 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素继续孵育 48 h, 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。

2.6 报告基因检测

将 ATF4 或空白质粒 (3 μg)、GRP78 报告质粒 (3 μg) 和海肾内参质粒 (4 μg) 均匀混合, 用 Lipofectamine 2000 试剂对人骨肉瘤 U-2 OS 细胞进行转染, 6 h 换液, 加入 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素继续孵育 24 h, 使用温热的 PBS 清洗 2 次, 按说明书先检测萤火虫荧光, 再检测海肾荧光, 实验结果用各孔海肾荧光做参比进行校正。

2.7 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5.0 统计软件进行数据处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 统计方法采用独立样本 t 检验或单因素方差分析。

3 结果

3.1 紫草素的细胞毒性实验

细胞毒性实验显示, 紫草素作用 48 h 后, 对骨肉瘤细胞 U-2 OS 的半数抑制浓度为 (0.83 \pm 0.08) $\mu\text{mol/L}$ 。见图 1。

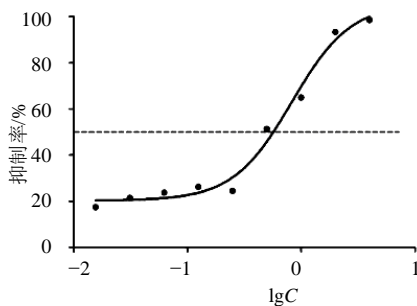


图 1 紫草素抑制人骨肉瘤细胞的 IC_{50} 值

Fig. 1 IC_{50} value of shikonin inhibiting human osteosarcoma cells

3.2 紫草素诱导细胞凋亡检测

流式细胞术检测发现, 紫草素 0~4 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 能浓度相关性地诱导 U-2 OS 细胞凋亡, 凋亡细胞比例分别为 6.30% \pm 0.29%、11.60% \pm 3.21%、42.70% \pm 8.63%、71.29% \pm 10.75% (与 0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组比较)。见图 2。

3.3 Western blotting 法检测内质网应激相关蛋白的表达水平

分别用紫草素 0~2 $\mu\text{mol/L}$ 处理 U-2 OS 细胞 24 h, 提取总蛋白进行免疫印迹分析, 以 GAPDH 为内参。结果显示, 紫草素能选择性上调 ATF4 和

GRP78 的蛋白表达, 并呈现浓度相关性; 对 ATF6 和 IRE1 α 的表达水平无调控效果。见图 3。

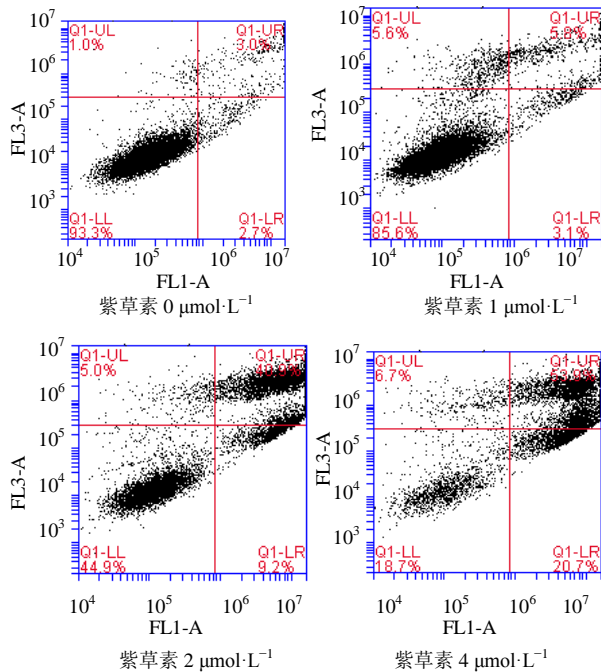


图 2 紫草素诱导人骨肉瘤细胞凋亡

Fig. 2 Shikonin induces apoptosis in human osteosarcoma cells

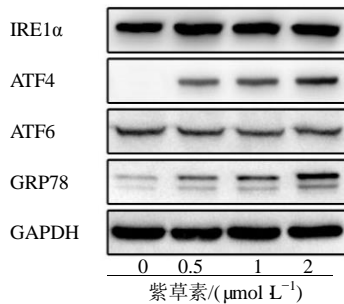


图 3 紫草素影响内质网应激蛋白的表达水平

Fig. 3 Shikonin affects the expression level of endoplasmic reticulum stress protein

3.4 内质网应激蛋白调控细胞死亡检测

细胞活力实验检测显示, 紫草素能浓度相关性抑制 U-2 OS 细胞活力, 与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.01$)。与转染空白质粒相比, 转染 ATF4 表达质粒可直接促进 U-2 OS 细胞死亡, 随着 ATF4 转染剂量的增加, 细胞活力进一步下降, 结果有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

单独敲低 ATF4 并不能影响细胞活力, 但是可以部分逆转紫草素引起的细胞死亡, 与紫草素单独给药组相比, 敲低 ATF4 联合紫草素对细胞活力的影响有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 内质网应激蛋白 ATF4 对细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of endoplasmic reticulum stress protein ATF4 on cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	细胞活力
对照	—	92.00 \pm 2.16
紫草素	0.4	71.00 \pm 5.72**
	0.8	58.67 \pm 4.78**
	1.6	35.67 \pm 4.99**
pRK 空白质粒	—	90.67 \pm 1.70
ATF4	4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	64.33 \pm 6.18**
	8 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	52.67 \pm 3.68**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表 2 敲低内质网应激蛋白 ATF4 对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of endoplasmic reticulum stress protein siATF4 on cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	细胞活力
对照	—	95.00 \pm 1.63
紫草素	0.8	59.00 \pm 6.53
siCtrl	—	93.00 \pm 2.16
siATF4#1	—	94.00 \pm 2.94
siATF4#2	—	93.33 \pm 2.87
紫草素 + siATF4#1	0.8	77.33 \pm 6.34**
紫草素 + siATF4#2	0.8	74.33 \pm 7.59**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

单独过表达或敲低 GRP78 并不能影响细胞活力, 过表达 GRP78 也不能抑制紫草素诱导的细胞死亡 (表 3), 但是敲低 GRP78 并给予紫草素刺激, 细胞活力显著降低 (表 4), 与紫草素单独给药相比有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3.5 报告基因检测

将 GRP78 启动子序列后连接萤火虫荧光素酶基因, 构建 GRP78 报告质粒, 海肾荧光素酶作为参比进行报告基因检测。结果显示, 单独转染 ATF4 质粒可促进 GRP78 基因的转录, 紫草素可增强内源性或外源性 ATF4 对 GRP78 基因的转录促进效果。与第一组转染了空白质粒的对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 5。

表 3 内质网应激蛋白 GRP78 对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 3 Effect of endoplasmic reticulum stress protein GRP78 on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	细胞活力
对照	—	93.00 \pm 3.27
紫草素	0.4	71.00 \pm 8.98**
	0.8	56.00 \pm 9.20**
	1.6	35.33 \pm 12.88**
pcDNA	—	93.67 \pm 2.49
pcGRP78	0.8	95.00 \pm 1.63
紫草素+ pcGRP78	0.8	59.00 \pm 6.53**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group表 4 敲低内质网应激蛋白 GRP78 对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 4 Effect of endoplasmic reticulum stress protein siGRP78 on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	细胞活力
对照	—	94.00 \pm 2.94
紫草素	0.8	60.67 \pm 7.93**
siCtrl	—	94.33 \pm 2.62
siGRP78#1	—	92.33 \pm 1.70
siGRP78#2	—	94.67 \pm 2.05
紫草素+ siGRP78#1	0.8	30.67 \pm 4.64**
紫草素+ siGRP78#1	0.8	31.00 \pm 6.16**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group表 5 紫草素增强 ATF4 介导的 GRP78 转录活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 5 Transcriptional activity of ATF4-mediated GRP78 enhanced by shikonin ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	转录活性
pRK	—	12.67 \pm 3.30
ATF4	—	28.33 \pm 6.94
紫草素+pRK	0.8	32.67 \pm 3.30**
紫草素+ATF4	0.8	47.67 \pm 4.50**

与空白质粒对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs blank plasmid control group

4 讨论

青春期是骨肉瘤的发病高峰期, 男性发病率高于女性, 早期易发生转移^[1]。现阶段骨肉瘤的治疗模式是: 术前新辅助化疗 - 手术切除 - 术后辅助化疗^[3]。化疗常用药物有阿霉素、甲氨蝶呤、顺铂和异环磷酰胺, 通过不同组合联合用药^[5]。对于肿瘤的手术切除, 目前更倾向于广泛切除而非全间室切除, 并保留重要组织, 以最大程度维持肢体功能^[6]。该模式在有效降低骨肉瘤的转移和复发同时还能有效提高患者的生活质量。除了易发生肺转移外, 骨肉瘤的治疗过程还常被突如其来的化疗耐药性阻断, 因此远期生存率低于 30%^[7]。为了改善骨肉瘤患者预后和生存率, 人们从多方面寻找解决办法, 开发新的治疗策略, 包括根据基因测序结果个体化用药、放射治疗、免疫疗法和研究新的化疗药物或耐药逆转剂等。

紫草是一味传统的常用中药, 南北朝《本草经集注》、北宋《本草图经》、唐朝韦宙《集验独行方》和清朝《得配本草》均有收录。紫草性甘、咸、寒, 主归心、肝两经, 具有清热凉血、活血、解毒透疹的功效, 在内外妇儿诸科皆多有应用^[8]。紫草的药用部位是干燥根部, 主要化学成分紫草素及其衍生物已被证实有抗肿瘤、抗炎、免疫调节、抗病毒和抗菌作用^[9-10]。本实验的结果显示, 紫草素能显著抑制人骨肉瘤 U-2 OS 细胞增殖、诱导细胞凋亡, 48 h 的 IC₅₀ 值为 (0.83 \pm 0.08) $\mu\text{mol/L}$ 。

内质网是细胞内不可或缺的细胞器, 具有脂类生物合成、维持细胞内稳态、促进分泌蛋白和跨膜蛋白的正确折叠、修饰和转运等功能。当癌细胞遭受刺激如化疗、放疗、营养不足、缺氧等时, 细胞内会产生大量未折叠或错误装配的蛋白质, 这些蛋白质积累在内质网中会导致内质网应激的发生。当内质网应激后, 细胞启动未折叠蛋白反应 (UPR), 通过 3 条通路: PERK、ATF6、IRE1 促进 GRP78、eIF2 α 、PERK 等蛋白的表达, 抑制新蛋白的合成、加速错误蛋白降解、增强内质网对已合成蛋白的折叠能力, 从而消除内质网应激使细胞存活。当内质网应激消除失败, 细胞通过 UPR 增加 ATF4 和 CHOP 的表达, 诱导细胞自噬、死亡、降解^[11]。本研究中, 紫草素能特异性地诱导 ATF4 蛋白的表达, 促进细胞死亡, 降低细胞存活率。此外, 紫草素还能通过 ATF4 蛋白促进 GRP78 的转录, 使骨肉瘤细胞死亡减少。本实验发现, 紫草素能促进 ATF4 对

GRP78 的转录,这一效果可能会在紫草素诱导细胞死亡和细胞自我修复得以存活之间起平衡作用,阻碍了紫草素疗效的发挥。而敲低 GRP78 可进一步增加紫草素促进细胞死亡的效果。

综上所述,紫草素具有抑制人骨肉瘤 U-2 OS 细胞增殖,促进细胞死亡的作用,提示紫草素对内质网应激蛋白的表达调控可能是该作用的重要分子机制。

参考文献

- [1] 张健烽,刘云霞.骨肉瘤治疗的研究进展 [J]. 浙江医学, 2019, 41(7): 723-727.
- [2] 易生辉,秦刚,黄肖华,等.骨肉瘤的治疗进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(8): 1529-1532.
- [3] Biazzo A, De Paolis M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma [J]. *Acta orthopaed Belg*, 2016, 82(4): 690-698.
- [4] 贾斌,李朝旭,孔祥云,等.骨肉瘤的治疗进展 [J]. 中国临床新医学, 2016, 9(10): 941-944.
- [5] Ferrari S, Palmerini E, Staals E L, *et al*. The Treatment of nonmetastatic high grade osteosarcoma of the extremity: review of the Italian Rizzoli experience. Impact on the future [J]. *Cancer Treatment Res*, 2009, 152: 275-287.
- [6] 耿磊,陈继营,许猛,等.骨肉瘤的治疗进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(21): 1975-1978.
- [7] Yang L, Bai H S, Deng Y, *et al*. High MALAT1 expression predicts a poor prognosis of cervical cancer and promotes cancer cell growth and invasion [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(17): 3187-3193.
- [8] 张凤瑞,杨登科,秦建平,等.紫草素治疗皮肤病的研究进展 [J]. 皮肤病与性病, 2019, 41(1): 29-31.
- [9] 柴冰阳,陈泽慧,张闪闪,等.4种细胞毒活性方法评价紫草素体外肿瘤细胞抑制作用效果 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 172-177.
- [10] 陈阳,陈忠坚,高赞,等.紫草素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3503-3509.
- [11] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.