

重楼提取物抗骨肉瘤作用及机制研究

任可¹, 周静^{2,3}, 李振麟^{2,3}, 钱士辉^{2,3}, 李贺¹, 王宸^{1*}

1. 东南大学附属中大医院 骨科, 江苏 南京 210009

2. 南京中医药大学附属中西医结合医院 中药质量与代谢组研究室, 江苏 南京 210028

3. 江苏省中医药研究院 中药质量与代谢组研究室, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 探讨重楼提取物(PPEE)抗骨肉瘤作用及其机制。**方法** 不同质量浓度的PPEE处理骨肉瘤细胞,采用MTT法、Hoechst 33342染色、流式细胞术、Matrigel培养、免疫印迹法分别检测细胞增殖抑制率、细胞凋亡、细胞周期、血管生成拟态(VM)形成及相关蛋白表达情况。裸鼠移植瘤模型观察PPEE的体内抑瘤效果。**结果** PPEE对骨肉瘤细胞半数抑制浓度(IC₅₀)为10~60 μg/mL,对成骨细胞增殖影响较小。PPEE可浓度依赖性地将骨肉瘤143B细胞阻滞在G₂/M期,上调细胞周期相关蛋白p-CDK1、p-Cdc25C、p-Chk2表达,下调cyclin B1表达;促进细胞凋亡,上调cleaved Caspase-3、8、9和PARP表达,上调Bax/Bcl-2;抑制细胞体外VM形成,下调FAK、Mig-7、MMP-2和MMP-9表达。体内实验显示PPEE能明显抑制骨肉瘤生长和体内VM形成,延长荷瘤裸鼠生存期。**结论** PPEE在体内外均具有良好的抗骨肉瘤活性,其作用机制可能与诱导骨肉瘤细胞凋亡、阻滞细胞周期及破坏骨肉瘤VM形成有关。

关键词: 云南重楼; 骨肉瘤; 凋亡; 细胞周期; 血管生成拟态

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0120-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.019

Effects of *Paris polyphylla* ethanol extract on human osteosarcoma and its mechanism

REN Ke¹, ZHOU Jing^{2,3}, LI Zhen-lin^{2,3}, QIAN Shi-hui^{2,3}, LI He¹, WANG Chen¹

1. Department of Orthopaedics, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

2. Department of Quality and Metabolomics of Chinese Materia Medica, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. Department of Quality and Metabolomics of Chinese Materia Medica, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: **Objective** To evaluate the potential anti-osteosarcoma effects of *Paris polyphylla* ethanol extract (PPEE) and investigate its underlying mechanisms. **Methods** The anti-proliferation activity of PPEE was tested on 143B, MG-63, U-2 OS, and hFOB1.19 cells using MTT assay. The pro-apoptotic and cell cycle arrest effects of PPEE were confirmed by Hoechst 33342 staining and flow cytometry. The anti-vasculogenic mimicry effects of PPEE were investigated by Matrigel culture assays. The related proteins expression was evaluated by Western blotting. **Results** PPEE evidently suppressed cell proliferation of 143B, MG-63, and U-2 OS cells with IC₅₀ values of 10—60 μg/mL, but showed little cytotoxicity against normal osteoblastic cell. PPEE induced G₂/M phase arrest associated with elevated phosphorylation of CDK1, Cdc25C, Chk2 and down-regulation of cyclin B1 expression. It also promoted apoptosis in 143B cells by up-regulating the expression of cleaved Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9, and Bax/Bcl-2 ratio. Additionally, PPEE inhibited 143B cells vasculogenic mimicry formation at non-cytotoxic concentrations through decreasing the expression of FAK, Mig-7, MMP-2, and MMP-9. Finally, four weeks' daily oral administration of PPEE exhibited potent antitumor and anti-vasculogenic mimicry activity in 143B xenograft model with low toxicity. **Conclusion** These findings demonstrated that PPEE possesses anti-osteosarcoma and anti-vasculogenic mimicry activity *in vitro* and *in vivo*, and its underlying mechanisms may be related to inducing apoptosis, blocking cell cycle, and destroying vasculogenic mimicry formation of osteosarcoma cells. Therefore, PPEE is a potential candidate for osteosarcoma treatment.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; osteosarcoma; apoptosis; cell cycle; vasculogenic mimicry

收稿日期: 2018-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673017); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2012775)

作者简介: 任可(1977—),男,副主任医师,从事骨肿瘤治疗研究。Tel: (025)83262343 E-mail: renke1977@sohu.com

*通信作者 王宸(1957—),男,主任医师,从事骨肿瘤骨病研究。Tel: (025)83262343 E-mail: chenwang_southeast@126.com

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤,恶性程度高,早期易发生肺转移,5年整体生存率低于30%^[1],伴有肺转移者的远期生存率甚至仅有19%^[2]。近年出现的新辅助化疗和根治性切除手术仍未达到满意的疗效,不仅副反应严重,还会发生化疗耐药。因此,寻找新疗法仍有重要意义。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是一种全新的肿瘤微循环模式,它不同于经典的内皮依赖性肿瘤血管,而是高侵袭性肿瘤细胞为满足自身营养和代谢需求而形成的功能性血流通道^[3]。由于缺乏内皮,VM壁层的肿瘤细胞直接暴露于血循环,极易发生远处转移^[4]。有研究发现,VM存在于人类骨肉瘤中,并与不良预后密切相关^[5]。因此,VM可作为骨肉瘤临床治疗的潜在靶标。

重楼药用历史悠久,首见于《神农本草经》,《中国药典》2015年版收载的重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎。其味苦,微寒,有小毒,归肝经;具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效,用于疔疮痈肿、蛇虫咬伤、跌扑伤、惊风抽搐等症,是著名中成药云南白药和季德胜蛇药片的主要组成药物。现代药理研究表明,重楼对多种肿瘤均有很强的抗肿瘤作用^[6]。然而,重楼对骨肉瘤细胞增殖和VM的影响尚不明确。本研究采用侵袭性高并有VM形成能力的骨肉瘤细胞株143B,观察重楼醇提取物(*Paris polyphylla* ethanol extract, PPEE)对143B细胞体内外生长及VM的抑制作用,并探讨其可能的作用机制,为骨肉瘤治疗新药研发提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂与药材

DMEM培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)、青-链霉素购自美国Gibco公司;MTT、牛血清白蛋白(BSA)、Hoechst 33342购自美国Sigma公司;基质胶(Matrigel)购于美国BD公司;小鼠单克隆抗体Bax、Bcl-2、Caspase-8、Caspase-9、cleaved Caspase-8、cleaved Caspase-9、cyclin B1、CD31、增殖细胞核抗原(PCNA)均购自美国Santa Cruz公司;兔单克隆抗体cleaved PARP、FAK及兔多克隆抗体Caspase-3、cleaved Caspase-3、MMP-2、MMP-9购自美国Abcam公司;兔单克隆抗体phospho-CDK1、phospho-Cdc25C、phospho-Chk2

购自美国CTS公司;兔多克隆抗体Mig-7购自美国Bioss公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;顺铂注射液(齐鲁制药有限公司,批号EA4A8001A);重楼药材购自南京合力制药有限公司,经江苏省中医药研究院钱士辉教授鉴定为百合科植物云南重楼 *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的干燥根茎,标本(标本号20150027)存放于江苏省中医药研究院中药质量与代谢组研究室。

1.2 细胞与动物

人骨肉瘤细胞株143B、MG-63、U2-OS及人成骨细胞hFOB1.19均购自美国ATCC公司;6~8周龄BALB/C裸鼠购自上海灵畅生物科技有限公司,许可证号SCXK(沪)2008-0113,动物实验取得东南大学附属中大医院伦理委员会批准。

1.3 仪器

AC2-4S1 二级生物安全柜(新加坡ESCO公司);HERAccl 150i 细胞培养箱、Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司);FACSCanto 流式细胞仪(美国BD Bioscience公司) Allegra 64R 控温离心机(美国Beckman公司);MS 205DU 精密电子天平(瑞士Mettler-Tolero公司);Roche Modular DP 全自动生化仪(美国Roche公司);HFU 486 Basic 超低温冰箱(美国Thermo Electron公司);164-5050 Western 电泳仪(美国Bio-Rad公司);Axiovert A1 倒置荧光显微镜(德国Zeiss公司)。

2 方法

2.1 PPEE 的制备

称取1 kg重楼干燥根茎粗粉,用10倍量的80%乙醇加热回流提取3次,每次2 h,合并滤液,减压浓缩得到重楼醇提取物(PPEE, 194.10 g),按《中国药典》2015年版一部重楼药材含量测定项下方法^[7],测得PPEE中重楼皂苷I、II、VI、VII质量分数分别为0.396%、0.126%、0.131%、0.186%。细胞实验使用时PPEE溶于二甲基亚砜(DMSO)稀释至质量浓度为1 mg/mL,0.22 μ m超滤除菌,-20 $^{\circ}$ C储存,使用时用培养基稀释。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 143B、MG-63、U2-OS细胞用含10% FBS的DEME培养基(含青-链霉素各100 U/mL)于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养;hFOB1.19细胞用含10% FBS的DMEM/F12培养基(含青-链霉素各100

U/mL) 中于 34 °C、5% CO₂ 培养箱培养。

2.2.2 MTT 实验检测细胞增殖 分别取对数生长期的上述细胞, 以 5×10^3 个/孔的密度接种在 96 孔板中, 设空白组 (加入等体积细胞培养液)、对照组 (DMSO) 和实验组 (加入 2.5~100 $\mu\text{g/mL}$ PPEE), 每组 6 个复孔, 分别培养 24、48、72 h, 每孔加入 MTT 20 μL , 继续培养 4 h。弃去上清液, 加入 150 μL DMSO 后使用酶标仪检测 570 nm 处吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次, 计算细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 Hoechst 染色检测细胞凋亡 143B 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板内, 待贴壁后加入不同质量浓度 (15、30、60 $\mu\text{g/mL}$) PPEE 作用 24 h, PBS 漂洗 3 次, 用 Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g/mL}$) 室温下避光孵育 15 min。紫外光激发, Zeiss 荧光显微镜观察 ($\times 400$)。

2.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 143B 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板内, 待贴壁后加入不同质量浓度 (15、30、60 $\mu\text{g/mL}$) PPEE 作用 24 h, 收集细胞, 加入预冷的 70% 乙醇, 4 °C 固定过夜。次日收集细胞, 加入 PI, 4 °C 避光孵育 30 min, 将处理好的细胞用 FACSCantoTM 流式细胞仪检测, 结果用 Modifit 软件分析。

2.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 143B 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板内, 待贴壁后加入不同质量浓度 (15、30、60 $\mu\text{g/mL}$) PPEE 作用 24 h, 收集细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 染色, 再加入 5 μL PI, 室温下避光反应 15 min, 将处理好的细胞用流式细胞仪检测。

2.2.6 体外管腔形成实验 取 200 μL 预先于 4 °C 过夜融化的 Matrigel, 加入 24 孔板, 置培养箱内 30 min 使 Matrigel 凝固。制备 143B 细胞悬液, 并加入不同质量浓度 (2.5、5.0、7.5 $\mu\text{g/mL}$) 的 PPEE, 调整细胞数为 6×10^5 个/mL, 并接种到 Matrigel 上, 继续培养 24 h。显微镜下随机选取 5 个视野拍照 ($\times 200$), 计数每个视野的管状结构个数, 取平均值。实验重复 3 次。

2.2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达 取不同质量浓度 (15、30、60 $\mu\text{g/mL}$ 或 2.5、5.0、7.5 $\mu\text{g/mL}$) 的 PPEE 处理 24 h 后的 143B 细胞, 用 RIPA 裂解液置于冰上裂解 10 min, BCA 检测蛋白质质量浓度, 按每孔 50 μg 蛋白量进行 10% SDS-PAGE 电泳, 电泳

后转膜至 PVDF 膜。封闭液封闭 2 h, 孵育不同的一抗 4 °C 过夜, TBST 液洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 在室温下孵育 1 h。化学发光法显影。IPP 软件测定条带灰度值并计算蛋白相对表达量。

2.3 体内实验

2.3.1 143B 荷瘤裸鼠模型制备及给药 对数生长期的 143B 细胞以 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 重悬于 PBS 中, 每只 200 μL 接种至裸鼠右侧腋窝皮下, 接种后第 8 天肿瘤体积达到 100 mm^3 。将裸鼠随机分为 5 组, 分别为溶剂对照组 (0.5% CMC-Na), 50、100、200 mg/kg PPEE 组及顺铂组 (3 mg/kg), 每组 6 只裸鼠。溶剂对照组和 PPEE 各剂量组每天 ig 给药 1 次, 顺铂组按 3 mg/kg 每 4 天 ip 给药 1 次^[8], 各组给药 4 周。每隔 3 天记录裸鼠体质量和肿瘤体积 (V , $V = L \times W^2 \times 0.5$, L 为肿瘤长度, W 为肿瘤宽度)。裸鼠存活时间为从接种开始直至裸鼠死亡的时间。

2.3.2 143B 荷瘤裸鼠相关生化指标检测 在另 1 组实验中, 30 只荷瘤裸鼠用同样方法造模并给药处理。治疗 4 周后, 裸鼠眼眶取血, 自动细胞计数器检测全血白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (HGB) 和血小板计数 (PLT)。使用 Roche P800 自动生化分析仪测定血清 ALT、AST、BUN 和 Cr 水平。

2.3.3 PCNA 免疫组化和 TUNEL 检测 “2.3.2”项下荷瘤裸鼠取血后剥离皮下肿瘤, 称质量, 用 4% 多聚甲醛固定。肿瘤组织石蜡包埋、切片, 经常规脱蜡、水化, H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶, 微波抗原修复, 血清封闭, 滴加 PCNA 抗体孵育, 随后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 DAB 显色后, 苏木素复染, 显微镜下观察 ($\times 200$)。按 TUNEL 检测试剂盒说明书操作, 检测肿瘤组织中的细胞凋亡情况。显微镜下观察 ($\times 200$), 并随机选取 10 个非重叠视野, 计数每个视野内的 PCNA 和 TUNEL 阳性细胞数和细胞总数。

2.3.4 CD31-过碘酸雪夫氏 (periodic acid-Schiff, PAS) 双重染色检测 VM 免疫组化常规染完 CD31 后, 滴加 0.5% 过碘酸溶液孵育 15 min, 然后加入雪夫试剂。苏木精复染, 脱水后封固, 显微镜下观察 ($\times 400$)。VM 判断标准: VM 为肿瘤细胞围成的血管样结构, CD31 染色阴性, PAS 染色阳性, 并选择有红细胞的管腔。VM 定量标准: 显微镜下随机选取 5 个视野计数 VM 密度 (VMD), 取平均值。

2.3.5 组织学检查 多聚甲醛固定的肿瘤组织用石蜡包埋,连续切片,苏木精-伊红(HE)染色,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜下观察拍照。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 Students'*t* 检验,正态性及方差采用齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 法。

3 结果

3.1 PPEE 对人骨肉瘤细胞增殖的影响

PPEE 对人骨肉瘤细胞增殖的抑制作用具有一定的剂量依赖性和时间依赖性(图 1)。并且 PPEE 对人成骨细胞 hFOB1.19 增殖无明显抑制作用($IC_{50} > 200 \mu g/mL$),表明 PPEE 对成骨细胞 hFOB1.19 毒性

较小。由于 PPEE 对 143B 细胞增殖抑制率最高,且 143B 细胞体内均具有高侵袭、高转移的特性,因此选取 143B 细胞进行后续实验。

3.2 PPEE 对 143B 细胞凋亡和细胞周期的影响

Hoechst 法染色后,对照组细胞未见明显凋亡形态,细胞核呈现均匀、淡蓝色的荧光,而不同质量浓度 PPEE 作用细胞后均出现核染色质固缩、核碎裂、凋亡小体及呈现强蓝色荧光等典型凋亡现象(箭头所示),随着 PPEE 质量浓度的增加,凋亡现象越明显(图 2)。

Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况,结果见图 3-A。PPEE 可质量浓度依赖性地诱导 143B 细胞凋亡。流式细胞仪检测细胞周期结果见图 3-B, PPEE 可质量浓度依赖性地将 143B 细胞阻滞在 G_2/M 期。

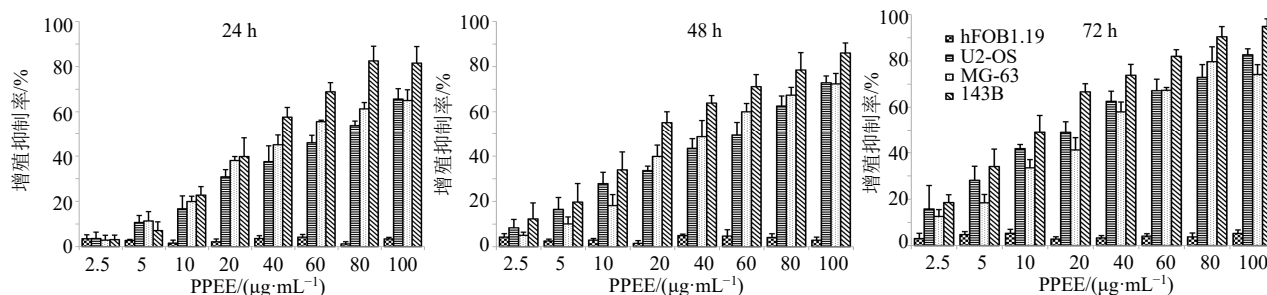


图 1 PPEE 对 3 种人骨肉瘤细胞及人成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of PPEE on proliferation of three human osteosarcoma cells and human osteoblast cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

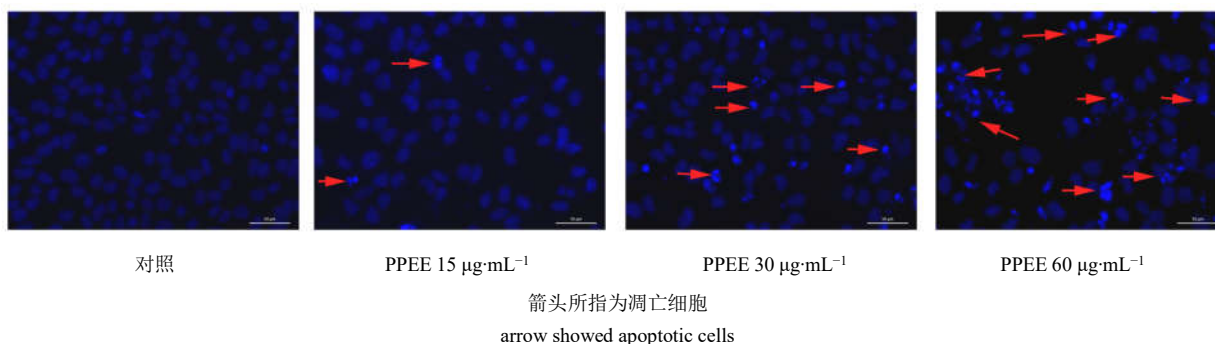


图 2 PPEE 对 143B 细胞凋亡的影响 (Hoechst 染色, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of PPEE on cell apoptosis of 143B cells (Hoechst staining, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

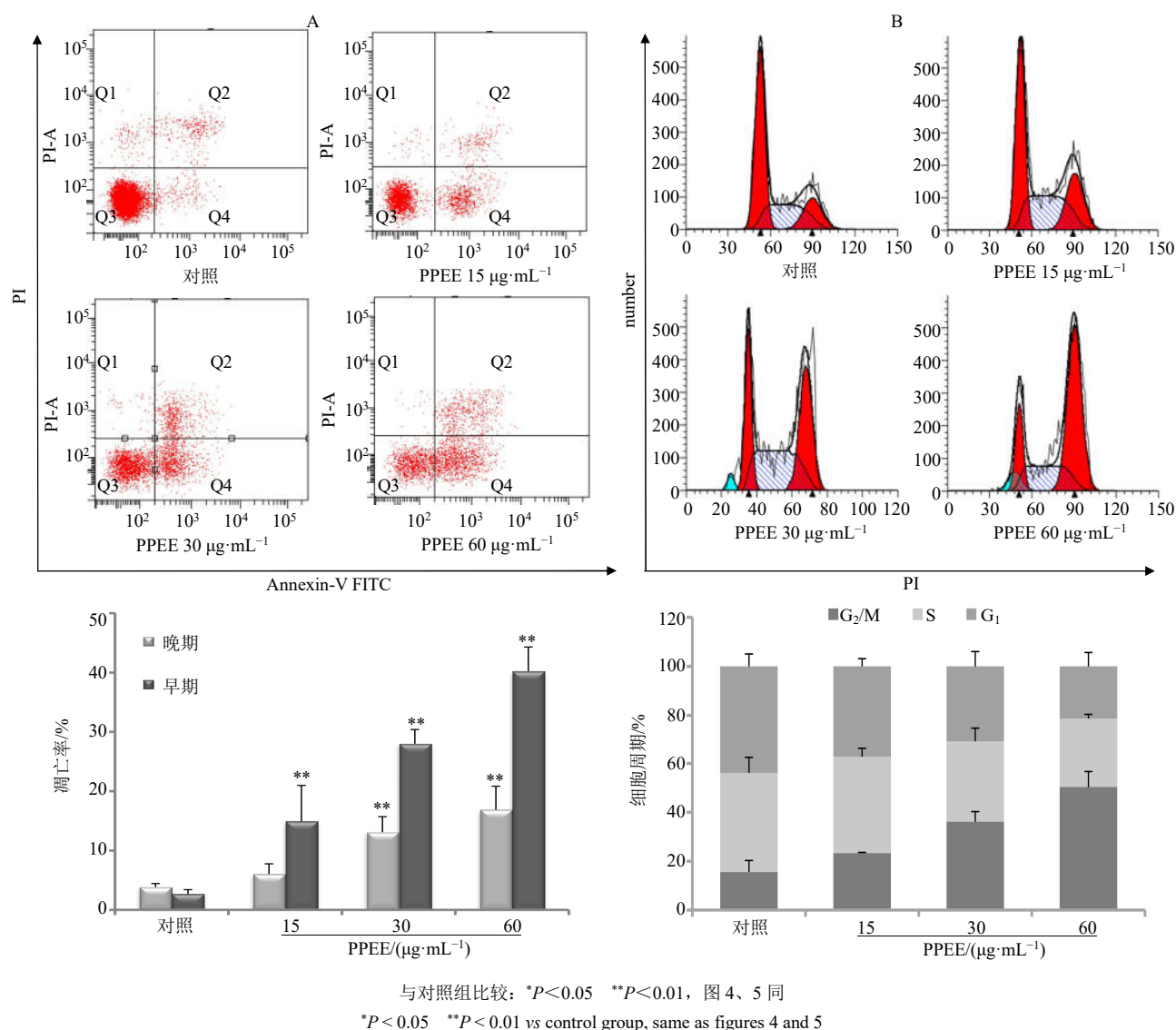
3.3 PPEE 对 143B 细胞体外管腔形成能力的影响

由于 PPEE 在 $2.5 \sim 7.5 \mu g/mL$ 作用于 143B 细胞 24 h,对细胞活性无明显影响(图 4-A),因此选择了该浓度和时间范围,避免 PPEE 高质量浓度导致的 143B 细胞数量减少对实验结果产生干扰。Matrigel 结果显示,143B 细胞在 Matrigel 上可形成明显的类血管三维网管状 VM 结构(图 4-B),PPEE

($2.5, 5.0, 7.5 \mu g/mL$) 使体外 VM 数量分别减少了 18.25%、77.51%、93.21%。

3.4 PPEE 对细胞凋亡、周期及 VM 相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示,随着 PPEE 质量浓度的增加,cleaved Caspase-3、8、9 及 cleaved PARP 表达增加,Bax 表达增加,Bcl-2 表达降低,Bax/Bcl-2

图 3 PPEE 对 143B 细胞凋亡 (A) 和细胞周期 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 3 Effect of PPEE on cell apoptosis (A) and cell cycle (B) of 143B cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

增加。细胞周期相关蛋白 p-CDK1、p-Cdc25C、p-Chk2 表达上调, cyclin B1 表达下调。VM 相关蛋白 FAK、Mig-7、MMP-2、MMP-9 表达降低。结果见图 5。

3.5 PPEE 对 143B 荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响

与溶剂对照组比较, PPEE 各剂量明显抑制 143B 移植瘤的生长, 肿瘤质量显著下降, 抑瘤效果具有剂量依赖性, 高剂量 PPEE 抑瘤作用与阳性药顺铂相当 (图 6), PPEE 50、100、200 mg/kg 组抑瘤率分别为 44.75%、66.79%、76.26% (图 6)。

给药期间, 与溶剂对照组相比, PPEE 各组裸鼠体质量无明显变化, 顺铂组体质量平均减轻 7.43% (图 7-A)。血常规和肝肾功能生化指标结果

显示, PPEE 各组均无明显改变, 顺铂组 WBC、PLT 降低了 47.57% 和 34.44%, BUN 和 Cr 提高了 52.28%、62.91% (表 1)。存活情况显示 (图 7-B), 溶剂对照组裸鼠平均存活时间最短, PPEE 各剂量均能一定程度上延长裸鼠生存期。

3.6 PPEE 对 143B 肿瘤组织中 PCNA、TUNEL 和 VM 的影响

HE 染色显示, 溶剂对照组肿瘤细胞核大浓染, 异型性明显。PPEE 组核质比降低, 核仁部分消失 (图 8)。与溶剂对照组相比, PPEE 各组 PCNA 阳性率显著降低, TUNEL 阳性率明显上升 (图 8)。CD31-PAS 双染可见溶剂对照组存在 CD31 染色阴性而 PAS 染色阳性 (黑色箭头所示) 的 VM 结构,

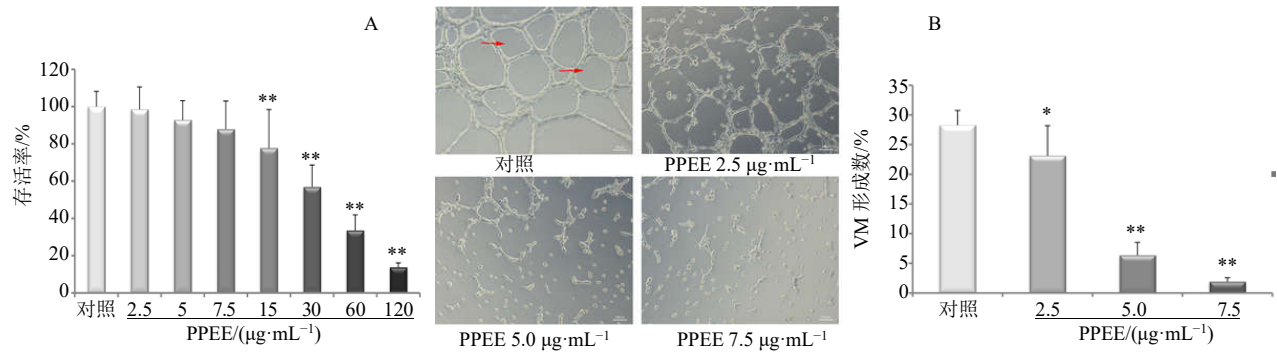


图 4 PPEE 对 143B 细胞活性 (A) 及 VM 形成 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of PPEE on cell viability (A) and vasculogenic mimicry formation (B) of 143B cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

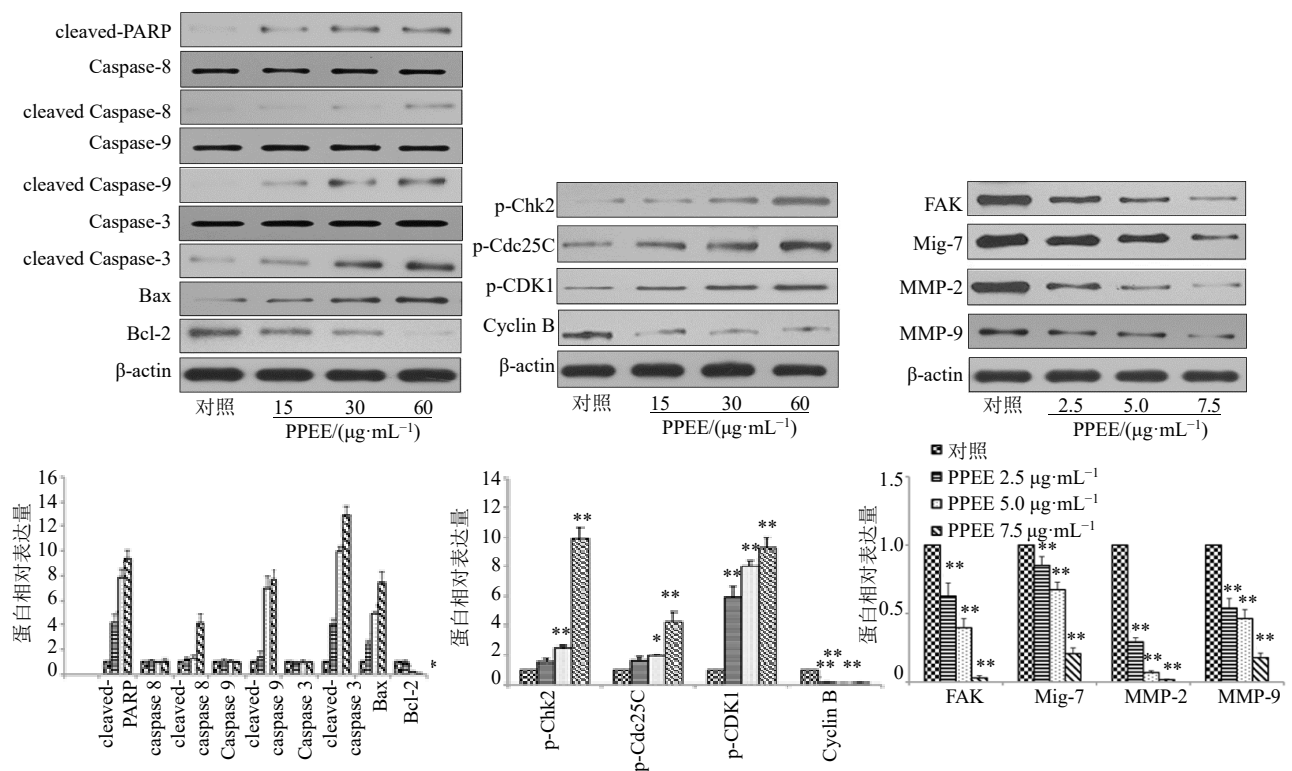
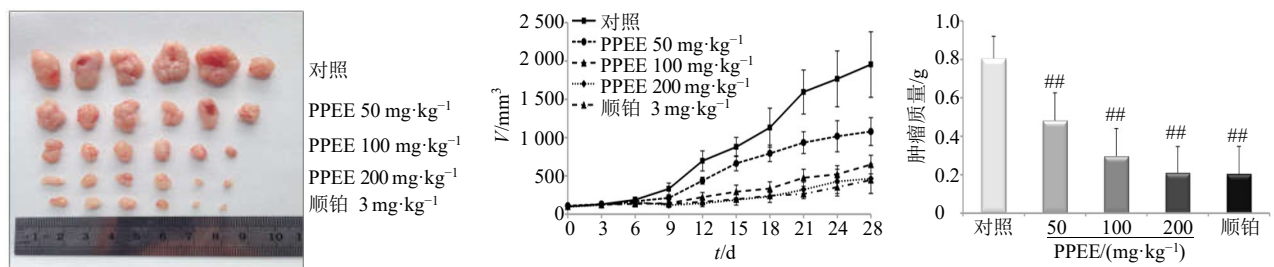


图 5 PPEE 对 143B 细胞周期、凋亡以及 VM 形成相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of PPEE on cell cycle-regulated, apoptosis-regulated, and VM formation-related protein of 143B cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

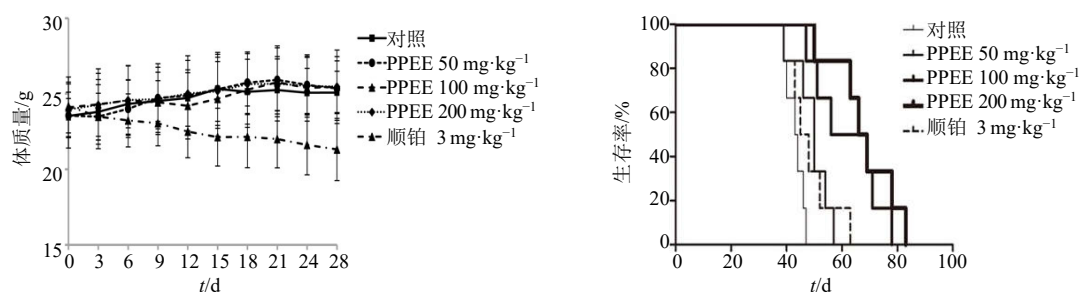


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 表 1 和图 8 同

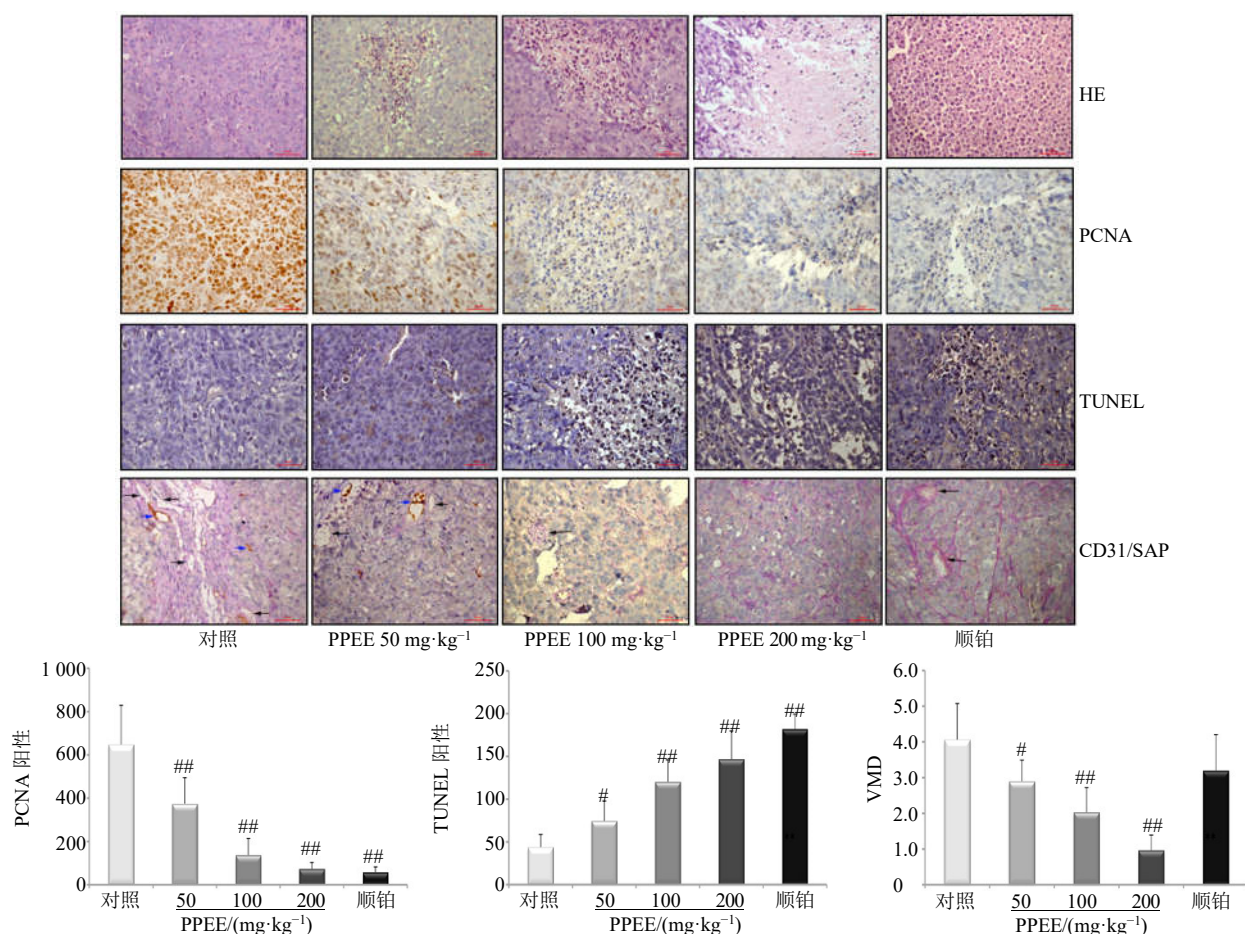
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as table 1 and figure 8

图 6 PPEE 对 143B 荷瘤裸鼠体内肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 In vivo antitumor effect of PPEE in 143B osteosarcoma xenograft nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 7 PPEE 对 143B 荷瘤裸鼠体质量和生存期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 7 Effects of PPEE on body weight and survival time of 143B osteosarcoma xenograft nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)表 1 PPEE 对 143B 荷瘤裸鼠血常规和肝肾生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Effects of PPEE on haematological parameters and biochemical indices of liver and kidney function in 143B tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	WBC/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	RBC/ (×10 ¹² ·L ⁻¹)	HGB/(g·L ⁻¹)	PLT/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	Cr/ (μmol·L ⁻¹)
溶剂对照	—	10.02±2.76	8.10±1.12	129.33±26.88	1 160.17±332.30	26.83±7.14	113.83±15.70	7.77±1.98	9.57±2.43
PPEE	50	9.82±3.53	7.77±0.56	127.83±20.33	1 050.83±150.90	26.50±9.63	118.33±11.00	7.84±1.79	9.00±2.58
	100	9.33±2.60	8.39±1.36	123.00±21.75	946.00±284.34	25.00±8.63	119.67±15.65	8.95±1.89	8.86±2.02
	200	8.56±3.98	6.98±1.40	119.33±24.54	892.00±171.75	28.67±9.07	114.50±8.64	6.96±1.64	7.45±1.12
顺铂	3	6.20±2.33 [#]	7.07±1.11	136.33±10.15	619.33±178.92 ^{##}	30.83±9.87	109.17±11.13	11.83±3.59 [#]	15.59±3.45 ^{##}

图 8 PPEE 对 143B 肿瘤组织中 PCNA、TUNEL 和 VM 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 8 Effects of PPEE on PCNA, TUNEL, and VM in 143B osteosarcoma xenograft ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

PPEE 各组的 VM 结构均有破坏, VMD 呈现剂量依赖性降低 (图 8)。

4 讨论

本研究发现 PPEE 可以显著抑制体外骨肉瘤细胞增殖, 但对成骨细胞的增殖影响较小, 这意味着 PPEE 的临床应用可能相对安全。细胞周期调控异常是肿瘤细胞增殖的重要环节^[9], 流式细胞仪结果显示 PPEE 可阻滞 143B 细胞在 G₂/M 期, 这可能是使 143B 细胞增殖受到抑制的原因。细胞周期检测点激酶 2 (Chk2) 磷酸化可引起 Cdc25C 磷酸化而失活, 磷酸化的 Cdc25C 可以阻止 CDK1 脱磷酸, 使 CDK1 活性抑制, 从而引起 G₂/M 期关键调控因子 CDK1-cyclin B1 复合物活性下降, 发生 G₂/M 期阻滞^[10]。PPEE 一方面使磷酸化 Chk2 水平升高, 失活 Cdc25C、CDK1, 另一方面下调 cyclin B1, 使 143B 细胞阻滞在 G₂/M 期。

有文献报道, 重楼可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[11-12]。Hoechst 染色可见经 PPEE 处理的 143B 细胞出现致密浓染的染色质形态, 流式细胞仪检测进一步证实 PPEE 可诱导凋亡产生。细胞主要通过线粒体途径和死亡受体途径发生凋亡。线粒体途径中最重要的调控因子是 Bcl-2 家族蛋白, Bcl-2 和 Bax 分别是该家族最具代表性的抑凋亡和促凋亡蛋白, Bax/Bcl-2 值增大引起线粒体损伤, 释放细胞色素 C, 募集 Caspase-9, 活化 Caspase-3, 触发 Caspase 级联反应^[13]; 外源性途径通过死亡受体与其配体结合, 激活 Caspase-8、Caspase-3, 启动 Caspase 级联反应, 导致细胞凋亡^[14]。Western blotting 结果显示, PPEE 可能通过调控内源性和外源性途径, 引起 143B 细胞凋亡。

VM 与骨肉瘤生长、侵袭、转移关系密切, 而且与患者预后呈负相关。因此针对 VM 这种独特的恶性肿瘤血供模式的抗癌疗法已成为新的肿瘤治疗策略^[15]。本研究首次报道了 143B 细胞可在体外 matrigel 培养环境及裸鼠肿瘤组织中形成 VM 结构。肿瘤细胞的迁移、重排及细胞外基质结构的重塑是 VM 形成的必要条件^[16], 这使得位于 PI3K/AKT 信号通路下游的 MMP-2 和 MMP-9 都成为 VM 形成过程中重要的调控分子^[17-19]。MMP-2 和 MMP-9 可以降解细胞外基质和基底膜结构, 促使肿瘤细胞迁移和侵袭, 由此促进 VM 的形成^[20]。而黏着斑激酶 (FAK) 是一种胞内非受体酪氨酸激酶, 通过调节细胞与细胞外基质黏附及细胞骨架重组等作用参与了恶性肿瘤的侵袭、转移和血管生成^[21-22]。迁移诱导

蛋白 7 (Mig-7) 是一种在多种恶性肿瘤细胞中表达的富含半胱氨酸的蛋白质, 在正常组织中不表达, 在肿瘤 VM 形成中发挥重要作用^[5,23]。既往研究表明, FAK 和 Mig-7 在 VM 阳性的骨肉瘤患者肿瘤组织中高表达, 使用 RNAi 沉默 FAK 可以显著抑制骨肉瘤细胞迁移和侵袭力^[22,24]。文献表明, FAK 和 Mig-7 参与激活基质金属蛋白酶, 共同降解层黏连蛋白 Ln5y2 链为促迁移片段, 进而促进 VM 形成^[25-26]。本研究发现, PPEE 可剂量依赖性地抑制 143B 细胞体外 VM 形成, 并能有效抑制 MMP-2、MMP-9、FAK 和 Mig-7 等 VM 相关蛋白的表达, 表明 PPEE 的抗 VM 作用可能通过其调控 VM 信号通路来实现。

体内实验表明, PPEE 可抑制 143B 裸鼠移植瘤生长, 其中高剂量组抑瘤率与顺铂组相当。PCNA 和 TUNEL 染色证实 PPEE 可抑制肿瘤细胞增殖, 诱导凋亡, 这与体外结果一致。CD31-PAS 双染发现 PPEE 可破坏骨肉瘤 VM 形成, 且 PPEE 可延长裸鼠生存时间。另外, 在给药过程中未出现明显体质量、血液学和肝肾生化指标改变, 说明 PPEE 具有有效低毒的优点。

综上所述, 重楼提取物在体内外均具有良好的抗骨肉瘤活性, 其作用机制可能是诱导骨肉瘤细胞凋亡、阻滞细胞周期及破坏 VM 形成而实现的。本研究为进一步开发安全有效的骨肉瘤治疗药物提供了新的对象和实验依据。

参考文献

- [1] Guijarro M V, Ghivizzani C S, Gibbs P C. Animal models in osteosarcoma [J]. *Front Oncol*, 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00475
- [2] D'Adamo D R. Appraising the current role of chemotherapy for the treatment of sarcoma [J]. *Semin Oncol*, 2011, 38(Suppl 3): S19-S29.
- [3] Hendrix M J, Seftor E A, Hess A R, et al. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: Lessons from melanoma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 411-421.
- [4] Liu W B, Xu G L, Jia W D, et al. Prognostic significance and mechanisms of patterned matrix vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(Suppl 1): S228-S238.
- [5] Ren K, Yao N, Wang G, et al. Vasculogenic mimicry: A new prognostic sign of human osteosarcoma [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(10): 2120-2129.
- [6] 赵保胜, 朱寅获, 马 勇, 等. 中药重楼研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(11): 267-270.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [8] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 659-661.
- [9] Viallard J F, Lacombe F, Belloc F, *et al.* Molecular mechanisms controlling the cell cycle: Fundamental aspects and implications for oncology [J]. *Cancer Radiother*, 2001, 5(2): 109-129.
- [10] Chow J P, Siu W Y, Ho H T, *et al.* Differential contribution of inhibitory phosphorylation of CDC2 and CDK2 for unperturbed cell cycle control and DNA integrity checkpoints [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 40815-40828.
- [11] Long F Y, Chen Y S, Zhang L, *et al.* Pennogenyl saponins induce cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 112-120.
- [12] Jing S, Wang Y, Li X, *et al.* Chemical constituents and antitumor activity from *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(6): 660-666.
- [13] Hata A N, Engelman J A, Faber A C. The BCL2 Family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(5): 475-487.
- [14] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(6): 487-498.
- [15] Hendrix M J, Seftor E A, Seftor R E, *et al.* Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 159: 83-92.
- [16] Zhu W, Sun W, Zhang J T, *et al.* Norcantharidin enhances TIMP-2 anti-vasculogenic mimicry activity for human gallbladder cancers through downregulating MMP-2 and MT1-MMP [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(2): 627-640.
- [17] Liang X, Sun R, Zhao X, *et al.* Rictor regulates the vasculogenic mimicry of melanoma via the AKT-MMP-2/9 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(12): 3579-3591.
- [18] Qiao L, Liang N, Zhang J, *et al.* Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(2): 315-326.
- [19] Gao Y, Yu H, Liu Y, *et al.* Long non-coding RNA HOXA-AS2 regulates malignant glioma behaviors and vasculogenic mimicry formation via the MiR-373/EGFR axis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(1): 131-147.
- [20] Song X L, Ju R J, Xiao Y, *et al.* Application of multifunctional targeting epirubicin liposomes in the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 7433-7451.
- [21] Tzenaki N, Aivaliotis M, Papakonstanti E A. Focal adhesion kinase phosphorylates the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 under the control of p110 δ phosphoinositide-3 kinase [J]. *FASEB J*, 2015, 29(12): 4840-4852.
- [22] 任可, 姚楠, 陆军, 等. 黏着斑激酶在骨肉瘤中的表达及临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(10): 474-482.
- [23] Petty A P, Garman K L, Winn V D, *et al.* Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell-specific Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(5): 1763-1780.
- [24] Ren K, Lu X, Yao N, *et al.* Focal adhesion kinase overexpression and its impact on human osteosarcoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31085-31103.
- [25] Hess A R, Hendrix M J. Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(5): 478-480.
- [26] Petty A P, Wright S E, Rewers-Felkins K A, *et al.* Targeting migration inducing gene-7 inhibits carcinoma cell invasion, early primary tumor growth, and stimulates monocyte oncolytic activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(8): 2412-2423.