

重楼皂苷 II 通过线粒体与内质网应激途径诱导骨肉瘤细胞凋亡的研究

施亚敏, 李新存, 聂安政, 朱春胜* (郑州大学第一附属医院, 郑州 450052)

摘要:目的 探讨重楼皂苷 II (polyphyllin II, PP II) 对骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 细胞凋亡的影响及作用机制。方法 选取 OS 的 U2OS 和 HOS 细胞株作为研究对象。细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法检测 PP II 对细胞活力的影响; 克隆形成实验检测 PP II 对细胞克隆形成能力的影响; 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 渗入实验检测 PP II 对细胞 DNA 合成的影响; 膜联蛋白 V-异硫氰基荧光素/碘化丙啶 (annexin V-FITC/PI) 双染法检测 PP II 对细胞凋亡率的影响; JC-1 荧光探针检测 PP II 对线粒体膜电位变化的影响; Western blot 法检测 PP II 对 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase 3, Caspase 3)、Caspase 7、Caspase 9、切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, cleaved Caspase 3)、cleaved Caspase 7、cleaved Caspase 9、多腺苷二磷酸多聚酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP]、切割型多腺苷二磷酸多聚酶 [cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cleaved PARP]、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、真核生物翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)、p-PERK 和 p-eIF2 α 蛋白表达水平的影响。结果 PP II 显著性抑制 OS 细胞活力, 并呈时间和剂量相关性; 抑制细胞克隆形成和 DNA 合成; 显著性增加细胞凋亡率, 降低线粒体膜电位 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 显著性提高 Bax/Bcl-2 蛋白比值, 升高 cleaved Caspase 3、cleaved Caspase 7、cleaved Caspase 9、cleaved PARP、p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4 和 CHOP 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 PP II 通过线粒体和内质网应激途径诱导 OS 细胞凋亡。

关键词: 重楼皂苷 II; 骨肉瘤; 细胞凋亡; 线粒体途径; 内质网应激

doi:10.11669/cpj.2024.01.004 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)01-0029-10

Polyphyllin II Induces Apoptosis of Osteosarcoma Cells Through Mitochondrial Pathway and Endoplasmic Reticulum Stress

SHI Yamin, LI Xincun, NIE Anzheng, ZHU Chunsheng* (*The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China*)

ABSTRACT; OBJECTIVE To investigate the effect of polyphyllin II (PP II) on apoptosis of osteosarcoma cells and its mechanism. **METHODS** Osteosarcoma (OS) U2OS and HOS cell lines were selected as the research object. CCK-8 method was used to detect the effect of PP II on cell viability. Colony forming assay was used to detect the effect of PP II on colony formation ability. EdU incorporation assay was used to detect the effect of PP II on DNA synthesis. Annexin V-FITC/PI staining assay was used to detect the effect of PP II on cell apoptosis. JC-1 assay was used to determine the effect of PP II on the mitochondrial membrane potential (MMP). The protein expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Caspase 3), Caspase 7, Caspase 9, cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (cleaved Caspase 3), cleaved Caspase 7, cleaved Caspase 9, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (cleaved PARP), protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase (PERK), eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), C/EBP homologous protein (CHOP), activating transcription factor 4 (ATF4), p-PERK, and p-eIF2 α were analyzed by Western blot. **RESULTS** PP II significantly inhibited the viability of OS cells in a time- and dose-dependent manner, dose-dependently inhibited the colony formation and DNA synthesis, significantly promoted apoptosis rate, decreased MMP ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and increased Bax/Bcl-2 protein ratio and the protein expression levels of cleaved Caspase 3, cleaved Caspase 7, cleaved Caspase 9, cleaved PARP, p-PERK, p-eIF2 α , ATF4, CHOP ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSION** PP II promotes OS cell apoptosis by regulating mitochondrial pathway and mediating endoplasmic reticulum (ER) stress.

KEY WORDS: polyphyllin II; osteosarcoma; apoptosis; mitochondrial pathway; endoplasmic reticulum stress

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目资助(82204701);河南省医学科技攻关计划联合共建项目资助(2018020106)

作者简介:施亚敏,女,硕士,主管药师 研究方向:中药抗肿瘤药理学 ***通讯作者:**朱春胜,男,硕士,主管药师 研究方向:中药防治代谢性疾病 Tel:(0371)66913200

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种易发于儿童和青少年的常见原发性恶性肿瘤,具有隐匿性、侵袭性强和易转移的特点,有统计显示约80%患者确诊时已发生病灶转移,术后效果差^[1];同时由于肺转移和对化疗的耐药性,导致患者的生存率低、总体预后差^[2]。因此,研发治疗OS高效、低毒的药物显得尤为迫切。

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 [*Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara] 的干燥根茎,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效^[3]。重楼中主要含有甾体皂苷类、胆甾烷醇类、C₂₁甾体化合物等多种化学成分,现代研究表明,甾体皂苷是重楼抗肿瘤的主要活性成分,对肺癌、胃癌、肝癌等多种恶性肿瘤均有良好的抗肿瘤作用。重楼皂苷 II (polyphyllin II, PP II) 属于甾体皂苷中的薯蓣皂苷,对黑色素瘤、乳腺癌和肝癌等多种恶性肿瘤具有抑制细胞增殖、迁移侵袭和诱导细胞凋亡等作用^[4],然而关于 PP II 在 OS 中的作用及内在分子机制的相关研究还未见报道。因此,本研究以 OS 细胞为研究对象,从线粒体和内质网应激途径的角度探讨 PP II 对 OS 细胞凋亡的影响及其可能的分子机制,以期 PP II 的开发利用和 OS 的治疗提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 药品与主要试剂

PP II (质量分数≥98%,批号 50773-42-7,成都仪睿生物科技有限公司);细胞计数试剂盒-8 (CCK-8,批号 917P016,北京索莱宝科技有限公司);膜联蛋白 V-异硫氰基荧光素/碘化丙啶凋亡检测试剂盒 (AnnexinV-FITC/PI,批号 027E1210LA,南京诺唯赞生物科技有限公司);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 抗体 (Caspase 3,批号 3)、cleaved Caspase 3 抗体 (批号 22)、多腺苷二磷酸多聚酶抗体 (PARP,批号 15)、cleaved PARP 抗体 (批号 13)、Caspase 7 抗体 (批号 2)、cleaved Caspase 7 抗体 (批号 3)、Caspase 9 抗体 (批号 6)、cleaved Caspase 9 抗体 (批号 2)、蛋白激酶 R 样内质网激酶抗体 (PERK,批号 6)、真核生物翻译起始因子 2 α 抗体 (eIF2 α ,批号 9)、p-eIF2 α 抗体 (批号 6)、C/EBP 同源蛋白抗体 (CHOP,批号 14) (美国 CST 公司);Bcl-2 相关 X 蛋白抗体 (Bax,批号 GR3204974-1)、B 淋巴细胞瘤 2 抗体 (Bcl-2,批号 GR3254866-1) (英国 abcam 公司);

p-PERK 抗体 (批号 #45R6406,北京博奥森生物技术有限公司);内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸 (4-PBA,批号 S359202,美国 selleck 公司);凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK (批号 091521220310)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷染色试剂盒 (EdU,批号 102920201123)、JC-1 检测试剂盒 (批号 102920201123) (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 细胞

上皮形态骨肉瘤细胞系 (U2OS) 和成纤维细胞及上皮样骨肉瘤细胞系 (HOS) (中国科学院上海细胞库)。

1.3 仪器

MR-96A 型酶标仪 (深圳迈瑞公司);YB3002 型分析天平 (上海力能公司);Western 电泳仪电源 (上海天能公司);Bio-rad ChemiDoc XRS + 成像系统 (美国 Bio-rad 公司);BX53 型荧光电子显微镜 (日本 Olympus/奥林巴斯公司);FacsCanto I 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 药物配制

用二甲基亚砜 (DMSO) 作为溶剂,PP II 溶解于 DMSO 配制成母液,各组 DMSO 溶剂浓度不超过体积分数 0.1%。药物分装储存于 -20 °C 冰箱中避光保存。

2.2 细胞培养

U2OS 和 HOS 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清、100 u · mL⁻¹ 青霉素、100 μ g · mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 高糖培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞密度长至 80% ~ 90% 时消化传代,用于后续实验。

2.3 CCK-8 法检测细胞活力

将对数生长期的 U2OS 和 HOS 细胞以每孔 5 × 10³ 个接种至 96 孔板中,待细胞密度长至 60% ~ 70% 时加入不同浓度的 PPII (0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μ mol · L⁻¹),同时设置溶剂对照组,继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液再培养 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测定每个孔的吸光度 (A) 值,每组设 3 个复孔检测细胞活力 (公式 1)。

$$\text{细胞活力}(\%) = (A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{0\text{加药}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

对于研究 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 对 PPII 抑制细胞活力作用的影响时,给药前加入终浓度 10 μ mol · L⁻¹ Z-VAD-FMK 孵育 1 h,其余操作同上。

对于研究内质网应激抑制剂 4-PBA 对 PP II 抑制细胞活力作用的影响时,给药前加入终浓度 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-PBA 孵育 1 h,其余操作同上。

2.4 克隆形成实验

将对数生长期的 U2OS 和 HOS 细胞以每孔 1 000 个接种于 6 孔板中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育过夜,加入含不同浓度的 PP II (5 、 10 、 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的新鲜培养基,设置溶剂对照组,继续培养 24 h 后,换成正常的新鲜培养基继续培养,每隔 2 ~ 3 d 换 1 次液。14 d 后,6 孔板中出现肉眼可见的克隆体时终止培养,弃去培养液,用 PBS 清洗 2 次、4% 多聚甲醛固定 30 min、结晶紫染色液染色 20 min、PBS 缓慢洗去染色液,置于空气中干燥后拍照。

2.5 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 渗入实验

将对数生长期的 U2OS 和 HOS 细胞以每孔 3×10^5 个接种于激光共聚焦平皿中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育过夜,加入含不同浓度的 PP II (5 、 10 、 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的新鲜培养基,设置溶剂对照组,给药 18 h 后,将 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EdU 溶液加入培养基中继续孵育 6 h。弃去上清液,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次、4% 的多聚甲醛固定 30 min、加入 Apollo 荧光染料避光孵育 30 min、PBS 清洗 2 次,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色液继续孵育 30 min、PBS 清洗 2 次后,激光共聚焦进行拍照检测。

2.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测对细胞凋亡的影响

将对数生长期的 U2OS 和 HOS 细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育过夜,加入含不同浓度的 PP II (5 、 10 、 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的新鲜培养基,设置溶剂对照组。给药 24 h 后,离心收集细胞,加入 500 μL Binding buffer 重悬细胞,每个样品管加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶 (PI),室温下避光孵育 15 min,流式细胞仪进行检测。

2.7 JC-1 检测线粒体膜电位变化

将对数生长期的 U2OS 和 HOS 细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育过夜,加入含不同浓度的 PP II (5 、 10 、 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的新鲜培养基,设置溶剂对照组。给药 24 h 后,离心收集各孔细胞,用 500 μL 提前配好的 JC-1 工作液重新悬浮细胞沉淀,室温下避光孵育 20 min,用 Incubation buffer 洗涤细胞 2 次,流式细胞仪进行检测。

2.8 Western blot 法检测蛋白表达

收集细胞,提取总蛋白,采用 BCA 法测定各样

本蛋白浓度。配制体积分数 8% ~ 12% 聚丙烯酰胺凝胶后,上样、电泳、转膜后,质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 一抗孵育过夜 (目的蛋白抗体稀释比例 1:1 000,内参 β -actin 抗体稀释比例 1:3 000)。用 TBST 缓冲溶液清洗 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 1 h 后,继续用 TBST 缓冲溶液清洗 3 次,每次 10 min。用增强型化学发光试剂 (ECL) 显色, Bio-RAD 曝光仪曝光,采集不同时段的显色条带。采用 Image J 软件对蛋白条带的灰度值进行分析,以 β -actin 为内参,以相对灰度值表示目标蛋白的表达。

2.9 统计学方法

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据用 GraphPad Prism 8.3 软件对数据进行统计分析,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用 One-Way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PP II 对 OS 细胞增殖能力的影响

3.1.1 PP II 对 OS 细胞活力的影响 PP II (0.625 、 1.25 、 2.5 、 5 、 10 、 20 、 $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别作用细胞 24、48、72 h, CCK-8 法评估细胞活力,与对照组比较,PP II 显著抑制 U2OS 和 HOS 细胞活力,呈时间和剂量依赖性,且作用 24 h 时 U2OS 细胞对 PP II 较为敏感 (图 1)。PP II 对 U2OS 细胞在 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 7.56 、 5.66 、 $2.97 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 HOS 细胞在 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 10.57 、 4.87 、 $1.87 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。参考以上结果,确定 5、10、 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 PP II 的给药剂量,并选择作用 24 h 作为 PP II 的给药条件。

3.1.2 PP II 对 OS 细胞克隆形成能力的影响 克隆形成实验是测定单个细胞增殖能力的有效方法,细胞克隆能力强也是肿瘤细胞的一大特点^[5]。与对照组比较,PP II (5 、 10 、 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组细胞克隆数目和大小均显著减少,且呈剂量相关性,表明 PP II 能够抑制 U2OS 和 HOS 细胞的克隆形成能力,即抑制 U2OS 和 HOS 细胞增殖,见图 2。

3.1.3 PP II 对 OS 细胞 DNA 合成能力的影响

EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,在细胞增殖期代替 T 渗入正在复制的 DNA 中,通过检测 EdU 标记的细胞多少反映细胞的增殖情况^[6]。EdU 试剂盒进一步验证药物对细胞增殖能力的影响,用不同浓度的 PP II 分别作用后,U2OS 和 HOS 细胞中 EdU 阳性细胞数显著低于对照组,表明 PP II 抑制 OS 细胞增殖的机制可能与抑制 DNA 合成有关,见图 3。

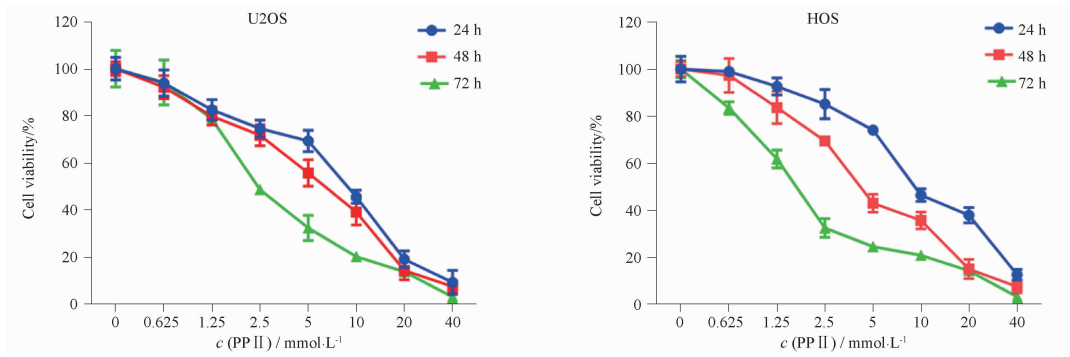


图1 重楼皂苷 II (PP II) 对骨肉瘤 (OS) 细胞活力的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effect of PP II on cell viability in OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

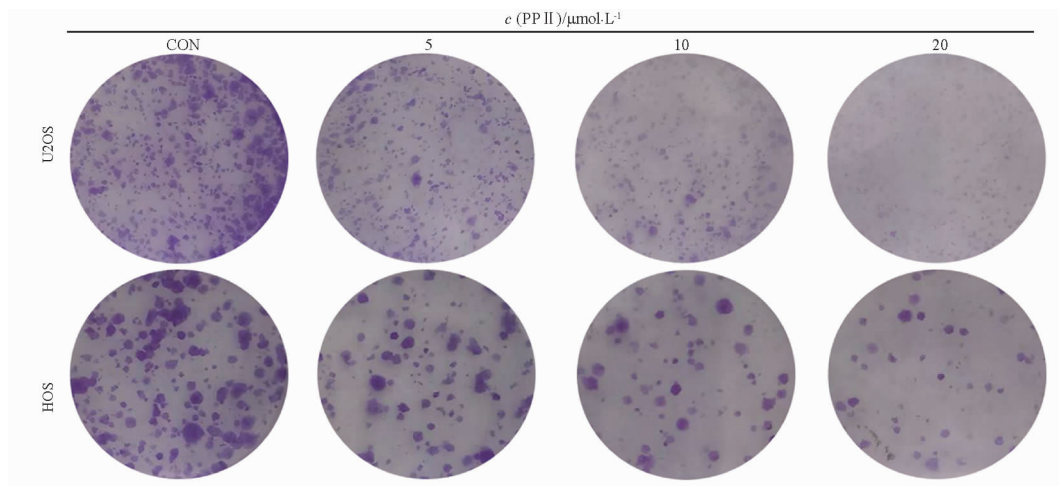


图2 PP II 对 OS 细胞克隆形成能力的影响

Fig. 2 Effect of PP II on the ability of colony formation in OS cells

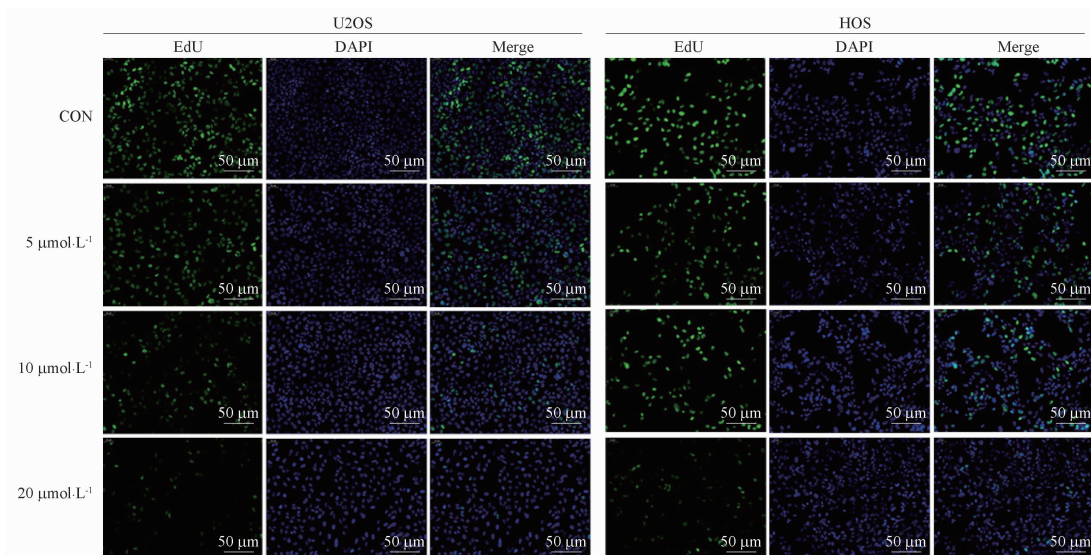


图3 PP II 对 OS 细胞 DNA 合成能力的影响 ($\times 200$, 标尺 $50 \mu\text{m}$)

Fig. 3 Effect of PP II on DNA synthesis in OS cells ($\times 200$, scale bar $50 \mu\text{m}$)

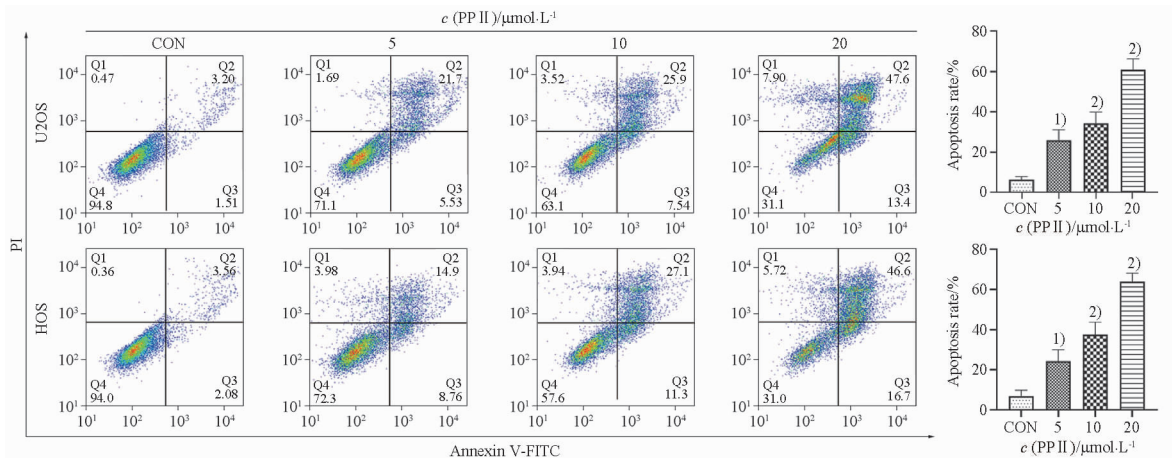
3.2 PP II 对 OS 细胞凋亡的影响

3.2.1 PP II 诱导 OS 细胞凋亡 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 外翻是细胞凋亡的典型特

征^[7]。为了确定 PP II 是否具有促 OS 细胞凋亡的作用, Annexin V-FITC/PI 双染色后用流式细胞仪检测。U2OS 细胞对照组、5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

PP II 组早期凋亡率分别是 1.51%、5.53%、7.54%、13.40%，晚期凋亡率分别是 3.20%、21.70%、25.90%、47.60%，总凋亡率分别是 4.71%、27.23%、33.44%、61.00%。HOS 细胞对照组、5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP II 组早期凋亡率分别是 2.08%、8.76%、11.30%、16.70%，晚期凋亡率

分别是 3.56%、14.9%、27.10%、46.60%，总凋亡率分别是 5.64%、23.66%、38.40%、63.30%。随着 PP II 浓度的增加，细胞早、晚期凋亡率逐渐增加。与对照组相比，不同浓度 PP II 组细胞总凋亡率显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，且呈浓度相关性，见图 4。



与对照组 (CON) 比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

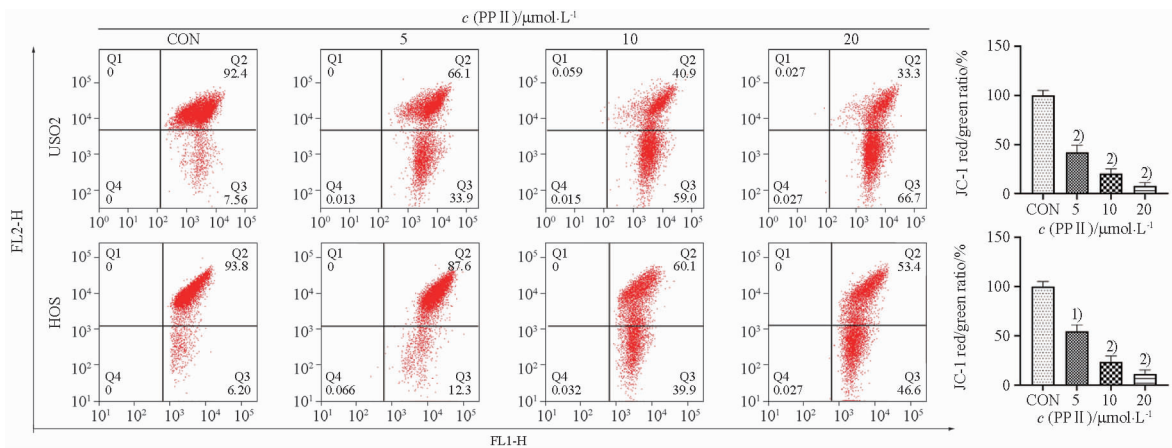
¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs CON group.

图 4 PP II 对 OS 细胞凋亡的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Effect of PP II on cell apoptosis in OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

研究表明,线粒体功能异常和细胞凋亡密切相关,且在细胞凋亡途径中发挥重要作用。细胞凋亡早期,线粒体通透性转换孔的开放增加,进而导致线粒体膜电位的下降^[8]。JC-1 是一种广泛用于检测

线粒体膜电位的理想荧光探针。与对照组相比,PP II 显著性降低红色荧光与绿色荧光的比值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),引起 U2OS 和 HOS 细胞线粒体膜电位的下降,且呈剂量相关性,见图 5。



与 CON 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs CON group.

图 5 PP II 对 OS 细胞线粒体膜电位的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

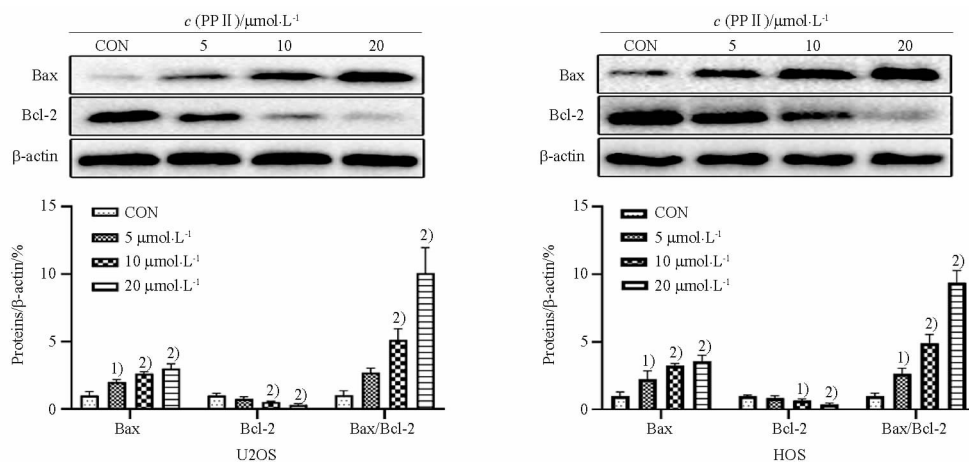
Fig. 5 Effect of PP II on the mitochondrial membrane potential in OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Bcl-2 家族蛋白分为 Bax 等促凋亡蛋白和 Bcl-2 等抗凋亡蛋白,而 Bax/Bcl-2 比例失衡改变线粒体膜通透性,激发细胞色素 c 等凋亡因子从线粒体释

放出来,进而诱导凋亡小体的形成,激活 Caspase 家族蛋白,产生 Caspase 级联反应,诱发细胞发生线粒体凋亡^[9-11],因此本实验进一步考察了 PP II 对凋亡

相关蛋白的表达。Western blot 结果发现,与对照组相比,PP II 组 Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax 蛋白表

达和 Bax/Bcl-2 蛋白比值显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈剂量依赖性,见图 6。



与 CON 组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

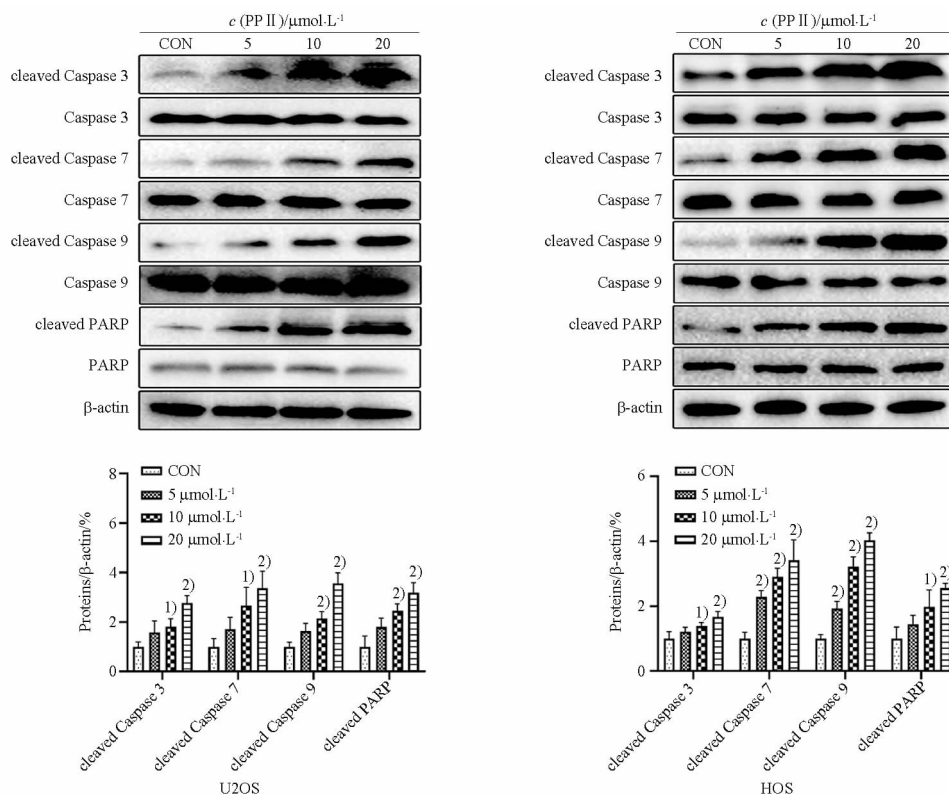
¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$, vs CON group.

图 6 PP II 对 OS 细胞 B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达水平的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Effects of PP II on the protein expression of Bax and Bcl-2 in OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Western blot 结果表明,PP II 显著性促进 Caspase 3、7、9 及 PARP 的剪切活化,即显著性促进 cleaved Caspase 3、7、9 和 cleaved PARP 的蛋白表达

水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈剂量依赖性,进一步明确了 PP II 通过激活 Caspase 级联反应诱导 OS 细胞凋亡,见图 7。



与 CON 组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$, vs CON group.

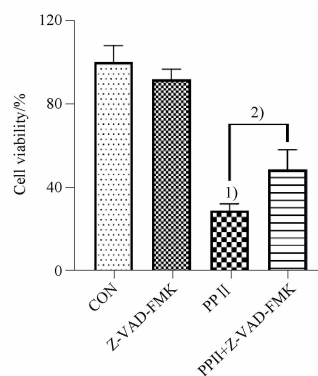
图 7 PP II 对 OS 细胞凋亡相关蛋白表达的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Effects of PP II on apoptosis-related proteins expression in OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.2.2 抑制细胞凋亡对 PP II 诱导的细胞增殖抑制的影响 Caspase 抑制剂 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Z-VAD-FMK 处理 U2OS 细胞后,再给予 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP II 处理,测定细胞活力的变化。与 PP II 组相比,PP II + Z-VAD-FMK 组细胞活力显著性升高($P < 0.05$),表明 Z-VAD-FMK 能部分逆转 PP II 抑制的细胞活力,见图 8。综上,PP II 对 OS 细胞的部分增殖抑制作用是由 Caspase 依赖的凋亡途径介导。

3.3 内质网应激对 PP II 诱导的细胞凋亡的影响

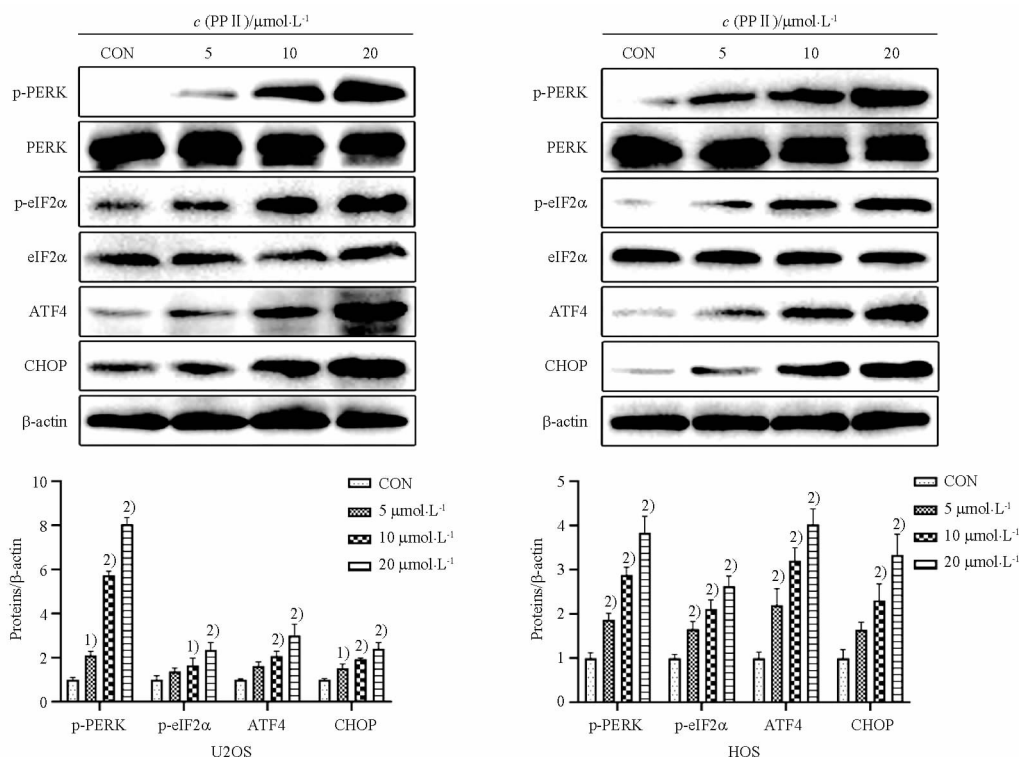
3.3.1 PP II 对 OS 细胞内质网应激的影响 内质网应激是细胞凋亡的重要调控信号,过度的内质网应激会诱导细胞凋亡^[12]。与对照组相比,PP II 组的 p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4 和 CHOP 的蛋白表达水平显著性升高,且呈剂量相关性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明 PP II 可以激活 U2OS 和 HOS 细胞的内质网应激,见图 9。



与 CON 组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 PP II 组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。
¹⁾ $P < 0.01$, vs CON group;²⁾ $P < 0.05$, vs PP II group.

图 8 Caspase 抑制对 PP II 诱导 U2OS 细胞增殖抑制的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Effect of caspase inhibition on the proliferation inhibition of PP II in U2OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$



与 CON 组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

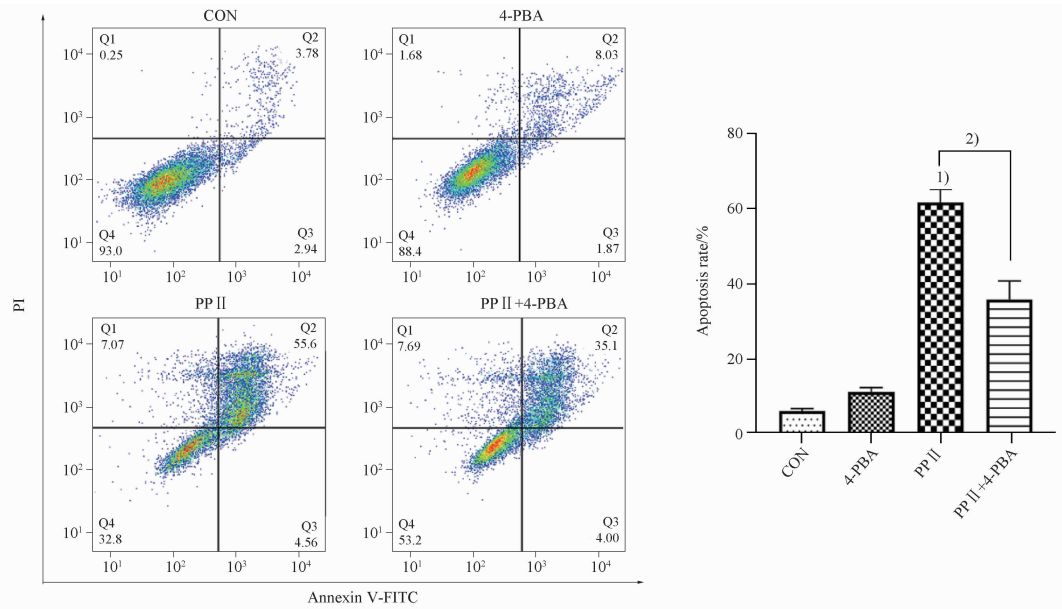
¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$, vs CON group.

图 9 PP II 对 OS 细胞内质网应激相关蛋白表达的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 9 Effects of PP II on ER stress -related proteins expression in OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.3.2 内质网应激抑制对 PP II 诱导细胞凋亡的影响 内质网应激抑制剂 $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-PBA 处理 U2OS 细胞后,再给予 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP II 处理,进一步探讨内质网应激对 PP II 诱导的细胞凋亡的影响。与 PP II 组相比,PP II + 4-PBA 组细胞凋亡率显著降低

($P < 0.01$),见图 10;PP II + 4-PBA 组 cleaved Caspase 3、cleaved PARP 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 11;PP II + 4-PBA 组细胞活力显著升高($P < 0.05$),见图 12。综上,PP II 对 OS 细胞的部分增殖抑制作用和凋亡促进作用由内质网应激途径介导。

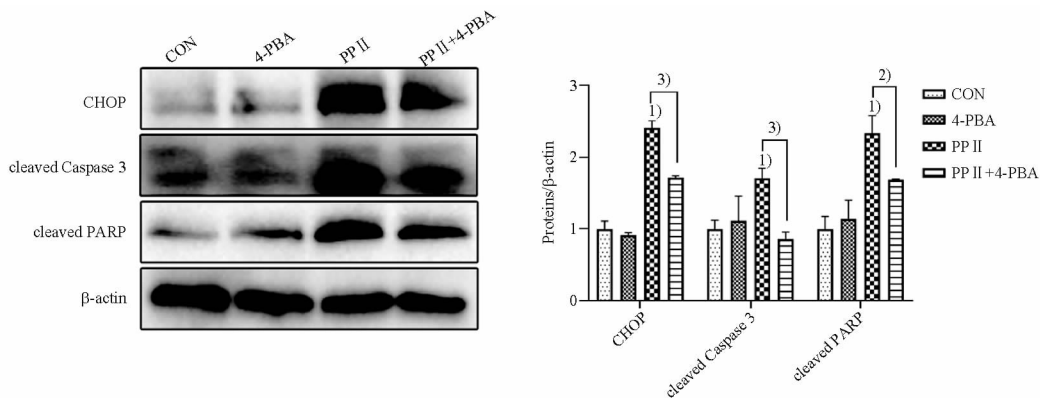


与 CON 组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 PPII 组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, vs CON group;²⁾ $P < 0.01$, vs PPII group.

图 10 内质网应激抑制对 PPII 诱导细胞凋亡的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 10 Effect of ER stress inhibition on apoptosis induced by PPII in U2OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$



与 CON 组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 PPII 组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, vs CON group;²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$, vs PPII group.

图 11 内质网应激抑制对 PPII 诱导细胞凋亡蛋白表达的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 11 Effect of ER stress inhibition on apoptosis protein expression induced by PPII in U2OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

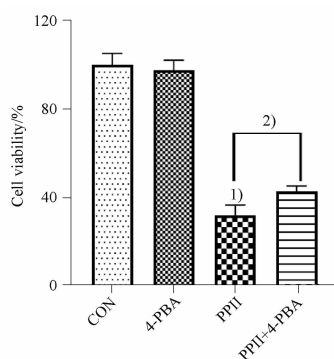
4 讨论

OS 是一种恶性程度极高的原发性恶性骨肿瘤,常发于儿童和青少年,预后差,致残率和死亡率高^[13]。目前,西医临床治疗 OS 的首选治疗手段是手术,由于 OS 易发生转移,多数患者确诊时已发生转移,单纯手术治疗的生存率低^[14]。此外,有报道手术加放疗虽然可以取得短期临床疗效,但易发生骨髓抑制、胃肠道症状等副作用^[15]。中医认为,OS 为“石疔”“骨瘤”“肉瘤”等,对其病因归结为“虚、寒、痰、瘀、毒”5 个方面,证型分为痰瘀互结证、邪毒留滞证、气血两亏证及脾肾亏虚证^[15]。中医药的整体思维和辨证施治观念,能够增强

机体的免疫力、减轻手术的并发症、降低放疗副作用,与西医药互补协同作用,达到提高患者生存质量、延长患者生存期的作用。研究发现,中药单体提取物或中成药制剂在抗肿瘤方面具有多靶点、多途径的作用,能够通过多条途径调节 OS,使中医药在 OS 治疗方面有着广阔的发展前景^[16]。

清热解毒类中药重楼对邪毒留滞证 OS 具有治疗的作用。研究表明,PPII 是重楼的主要抗肿瘤药效成分,对黑色素瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌及膀胱癌等有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用^[17-21],然而关于 PPII 对 OS 细胞的作用机制还未有报道。因此,本研究

首次考察了 PPII 对体外培养的 OS 细胞 U2OS 和 HOS 的细胞增殖和细胞凋亡的影响。CCK-8 结果显示, PPII 时间和剂量依赖性抑制 OS 细胞 U2OS 和 HOS 的细胞活力, 且对 U2OS 细胞在 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 7.56、5.66、2.97 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 HOS 细胞在 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 10.57、4.87、1.87 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。单克隆形成实验结果显示, PPII 显著降低细胞克隆形成数, 从而抑制细胞的克隆形成。EdU 渗入实验结果显示, PPII 剂量依赖性抑制 EdU 阳性细胞数。综上, PPII 对 OS 细胞有抑制细胞增殖的作用。



与 CON 组比较, $^1P < 0.01$; 与 PPII 组比较, $^2P < 0.05$ 。

$^1P < 0.01$, vs CON group; $^2P < 0.05$, vs PPII group.

图 12 内质网应激抑制对 PPII 诱导细胞增殖抑制作用的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 12 Effect of ER stress inhibition on the proliferation inhibition induced by PPII in U2OS cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

细胞凋亡, 又称 I 型程序性细胞死亡, 是维持细胞内环境稳定、调控细胞组织器官发育、对环境因素改变产生的应答反应, 是细胞主动实施的结束细胞生命的正常死亡过程。同时, 凋亡是引起肿瘤细胞在对抗抗肿瘤活性化合物时发生的一种主要死亡过程^[22]。细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由膜内侧翻向外侧, 是细胞凋亡的早期信号^[7]。为了验证 PPII 引起的细胞增殖抑制作用与细胞凋亡是否有关, 本实验采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 PS 外翻, 结果显示, PPII 剂量依赖性增加细胞凋亡率, 提示 PPII 可以诱导 OS 细胞发生细胞凋亡。

细胞凋亡途径主要有外源性凋亡途径、内源性凋亡途径 (又称为线粒体途径)^[23]。线粒体是内源性凋亡途径的调控中心, 其功能受以 Bax 和 Bcl-2 为主要影响因子的 Bcl-2 家族蛋白的靶向调节。细胞受到凋亡信号刺激时, 诱导线粒体损伤, Bax/Bcl-2 比值的高低决定细胞是否开启凋亡途径^[24]。当 Bax/Bcl-2 升高时, 引起线粒体膜通透性和膜电位改变, 刺激细胞色素 c

从线粒体释放至胞浆中, 激活 Caspase 9 酶原剪切活化为 cleaved Caspase 9, 从而进一步激活下游的 Caspase 3 活化为 cleaved Caspase 3, 最终导致细胞凋亡^[-25-27]。本研究考察了 PPII 是否可以引起线粒体损伤。结果发现, PPII 显著性降低线粒体膜电位、升高 Bax/Bcl-2 蛋白表达比例, 并进一步诱导了 Caspase 家族凋亡相关蛋白的显著性剪切活化。综上, PPII 可以诱导 OS 细胞发生线粒体介导的 Caspase 依赖的内源性凋亡途径 (图 13)。

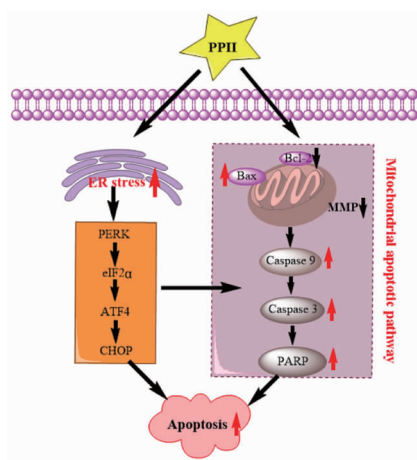


图 13 PPII 诱导 OS 细胞凋亡机制图

Fig. 13 Mechanism of apoptosis induced by PPII in OS cells

内质网应激初期, PERK 发生自磷酸化形成同源二聚体^[28], 二聚化的 PERK 通过磷酸化 eIF2 α , 减弱蛋白翻译, 从而减少蛋白质在内质网腔内的合成。ATF4 基因在磷酸化 eIF2 α 作用下翻译增强。ATF4 能够激活抗氧化应激作用和氨基酸合成转运蛋白等靶基因的表达^[29]。研究结果显示, PPII 通过上调 U2OS 和 HOS 细胞的 p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4、CHOP 蛋白表达水平激活内质网应激。CHOP 是内质网应激诱导细胞凋亡的标志性蛋白, PERK-eIF2 α -ATF4 通路是 CHOP 重要调控因素。过度的内质网应激通过诱导 CHOP 的表达调控 Bcl-2 基因家族蛋白的表达, 提高线粒体对细胞凋亡信号的敏感性, 诱导细胞凋亡^[30]。内质网应激抑制剂 4-PBA 下调 OS 细胞的内质网应激水平后, 结果发现 PPII 所诱导的细胞凋亡率升高、cleaved Caspase 3 和 cleaved PARP 蛋白高表达、细胞活力抑制得到部分缓解。因此, 内质网应激途径可以部分介导 PPII 对 OS 细胞的增殖抑制作用和凋亡促进作用。同时, 作为线粒体途径的上游参与 PPII 诱导的细胞凋亡。

综上所述, PPII 能够抑制 OS 细胞的增殖能力, 诱导 OS 细胞凋亡。其作用机制可能是通过介导线粒体和内质网应激途径诱导细胞凋亡。本研究从线粒体和

内质网应激途径方面揭示了PPII抗OS的活性,为探索OS的治疗提供了新思路。

REFERENCES

- [1] GILL J, GORLICK R. Advancing therapy for osteosarcoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(10):609-624.
- [2] WANG X D, LI X, TONG X Q, *et al.* Inhibition effects of alantolactone on the proliferation of human osteosarcoma cells [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2023, 58(2):151-159.
- [3] *Ch. P*(2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部) [S]. 2020:271-272.
- [4] NIE Q, TAN J, CHEN Q, *et al.* Advances in the study of the chemical composition and anti-tumor effects of rhizoma paridis saponins [J]. *Anti-tumor Pharm* (肿瘤药理学), 2022, 12(3): 337-343.
- [5] OIKE T, KOMATSU S, KOMATSU Y, *et al.* Reporting of methodologies used for clonogenic assays to determine radiosensitivity [J]. *J Radiat Res*, 2020, 61(6):828-831.
- [6] CHEHREHASA F, MEEDEENIYA A C, DWYER P, *et al.* EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system[J]. *J Neurosci Meth*, 2009, 177(1):122-130.
- [7] LI Z, WANG K, WANG K Q, *et al.* Research progress on mitochondrial prevention and treatment of liver cancer mediated by traditional Chinese medicine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53(2):575-589.
- [8] POULAKI A, GIANNOULI S. Mitochondrial lipids: from membrane organization to apoptotic facilitation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7):3738. DOI: 10.3390/ijms23073738.
- [9] GROSS A, MCDONNELL J M, KORSMEYER S J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. *Gene Dev*, 1999, 13(15):1899-1911.
- [10] BRUNELLE J K, LETAI A. Control of mitochondrial apoptosis by the bcl-2 family [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 4):437-441.
- [11] WEINBERG S E, CHANDEL N S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(1): 9-15.
- [12] HARADA M, TAKAHASHI N, AZHARY J M, *et al.* Endoplasmic reticulum stress;a key regulator of the follicular microenvironment in the ovary [J]. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(1): gaaa088. DOI: 10.1093/molehr/gaaa088.
- [13] YIN M C, WANG H S, YANG X, *et al.* A bibliometric analysis and visualization of current research trends in Chinese medicine for osteosarcoma [J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(5):445-452.
- [14] CAO L L, ZHU Y, FAN G T, *et al.* Treatment progress of osteosarcoma [J]. *Chin J Bone Joint* (中国骨与关节杂志), 2020, 9(10):771-778.
- [15] FAN L J, MA Y, LUO Y G, *et al.* Research progress in diagnosis and treatment of osteosarcoma in traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Convalescent Med* (中国疗养医学), 2022, 31(8):845-848.
- [16] DING S H, QIN G, YI S H, *et al.* Research progress of traditional Chinese and Western medicine in the treatment of osteosarcoma [J]. *Hunan J Tradit Chin Med* (湖南中医杂志), 2017, 33(9):175-178.
- [17] JIANG F Q, DENG D Q, WANG J S, *et al.* The effect of polyphyllin II on the proliferation and apoptosis of A375 human melanoma cell [J]. *J Dermatol Venereol* (皮肤性病与性病), 2015, 37(3):125-128.
- [18] YOU L J, SUN F Y, YANG X F, *et al.* Effects of polyphyllin II on apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 Cells [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2021, 28(10):81-85.
- [19] LIU W G, SHENG Y J, LAN T, *et al.* Effects of polyphyllin II in growth inhibition of human breast cancer cells [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2013, 31(4):908-910, 970-971.
- [20] HOU M, CHEN H J T, SU J J, *et al.* Apoptosis of human gastric cancer MGC-803 cells induced by polyphyllin II *in vitro* [J]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2019, 17(5):647-651.
- [21] JIANG F Q, WANG J S, DENG D Q, *et al.* Effects of polyphyllin II on nude mouse bearing human urothelial carcinoma of bladder [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2014, 29(10):3208-3211.
- [22] ZHANG Y, MA Y F, YU J, *et al.* Effects of Eupolyphaga sinensis Walker Hemolymph on proliferation and apoptosis of human erythroleukemia HEL Cells [J], *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2021, 56(7):539-545.
- [23] LI S, ZHANG B D. Research progress of apoptosis pathway [J]. *Shandong Med J* (山东医药), 2017, 57(37):103-106.
- [24] ZUO F, CHEN C, REN Q. Anti-breast cancer effect of ononin and its mechanism *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2020, 55(3):194-198.
- [25] BRECKENRIDGE D G, XUE D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(6): 647-652.
- [26] JI C F, JI Y B. Induction study of laminarin sulfate LAMS-2 on human colon cancer cell line LOVO apoptosis through a mitochondrial pathway [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2018, 53(16):1373-1380.
- [27] FAN Y J, ZHOU Y X, XU J H. Effects of curcumin derivative C1209 on CML cells and its mechanism [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2021, 56(19):1577-1582.
- [28] HUGHES D, MALLUCCI G R. The unfolded protein response in neurodegenerative disorders-therapeutic modulation of the PERK pathway [J]. *FEBS J*, 2019, 286(2): 342-355.
- [29] ROZPEDEK W, PYTEL D, MUCHA B, *et al.* The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(6): 533-544.
- [30] KANG J, WANG J J, TIAN J H, *et al.* Protective effect of intermedin on rat renal tubular epithelial cells hypoxia-reoxygenation injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2020, 55(2):105-110.

(收稿日期:2023-04-22)