

引用本文:杨利,李小健,李朝军.澳洲茄胺对人骨肉瘤移植瘤的抑制作用及其机制[J].安徽医药,2021,25(4):664-668.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.007.



◇ 药学研究 ◇

## 澳洲茄胺对人骨肉瘤移植瘤的抑制作用及其机制

杨利,李小健,李朝军

作者单位:唐山市丰润区第二人民医院骨科,河北 唐山 064000

通信作者:李朝军,男,副主任医师,研究方向为骨肿瘤,Email:lzj731010@126.com

**摘要:** **目的** 探讨澳洲茄胺对人骨肉瘤移植瘤的抑制作用及其机制。**方法** 该研究于2018年1月至2019年3月完成。MG63细胞株购于中科院上海细胞库。将0.2 mL人骨肉瘤MG63细胞悬液(共 $2 \times 10^6$ 个细胞)注射于裸鼠右侧腋窝皮下,建立人骨肉瘤移植瘤模型,实验分为4组,即对照组和澳洲茄胺组(10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg),隔日腹腔注射给药1次,连续4周。测量移植瘤的质量和体积,原位末端标记(TUNEL)染色法检测细胞的凋亡,蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白、血管生成相关因子和磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路的表达。**结果** 与对照组相比,澳洲茄胺组的移植瘤质量( $0.45 \pm 0.12$ )g和在21 d( $510.62 \pm 95.78$ ) $\text{mm}^3$ 和28 d( $579.56 \pm 92.04$ ) $\text{mm}^3$ 的体积降低,且以40 mg/kg组的抑制效应最明显( $P < 0.05$ )。与对照组相比,澳洲茄胺组的原位末端标记的异硫氰酸荧光素(TUNEL-FITC)的荧光强度升高,且以40 mg/kg组最明显。与对照组相比,澳洲茄胺组移植瘤中B细胞淋巴瘤/白血病-2相关X蛋白(Bax)( $3.55 \pm 0.39$ )、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)( $3.94 \pm 0.33$ )、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Cleaved caspase-9)( $3.59 \pm 0.31$ )、凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)( $3.70 \pm 0.41$ )蛋白的表达量上调,B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)( $0.31 \pm 0.15$ )、血管内皮生长因子(VEGF)( $0.25 \pm 0.12$ )、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)( $0.39 \pm 0.12$ )和磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)( $0.33 \pm 0.11$ )蛋白的表达量下调,且以40 mg/kg组的效应最明显( $P < 0.05$ )。**结论** 澳洲茄胺可以抑制人骨肉瘤细胞皮下移植瘤的生长,诱导细胞凋亡,下调VEGF的表达,上调TSP-1的表达,其作用机制可能与PI3K/AKT信号通路的抑制有关。

**关键词:** 澳洲茄胺; 龙葵; 人骨肉瘤细胞; 细胞凋亡; 血管内皮生长因子; 凝血酶敏感蛋白1

### Inhibitory effect of solasodine on human osteosarcoma xenografts and its mechanism

YANG Li, LI Xiaojian, LI Chaojun

Author Affiliation: Department of Orthopaedics, Second People's Hospital of Tangshan Fengrun District, Tangshan, Hebei 064000, China

**Abstract: Objective** To explore the inhibitory effect of solasodine on human osteosarcoma xenografts and its mechanism. **Methods** The study was completed from January 2018 to March 2019. The MG63 cell line was purchased from Shanghai Cell Bank of Chinese Academy of Sciences. The human osteosarcoma MG63 cell suspension (0.2 mL,  $2 \times 10^6$  cells) was injected subcutaneously into the right armpit of nude mice to establish human osteosarcoma xenograft model. The experiment was assigned into four groups: control group and solasodine group (10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg). The mice were injected intraperitoneally once every other day for 4 weeks. The weight and volume of xenografts were measured. Apoptosis was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) staining. The expression of apoptosis-related proteins, angiogenesis-related factors and phosphoinositide-3-kinase/serine-threonine kinase (PI3K/AKT) signaling pathway were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the weight ( $0.45 \pm 0.12$ ) g and volume ( $510.62 \pm 95.78$ )  $\text{mm}^3$  at 21 d and ( $579.56 \pm 92.04$ )  $\text{mm}^3$  at 28 d of the xenografts in the solasodine group decreased, and the inhibitory effect of 40 mg/kg group was the most obvious ( $P < 0.05$ ). The fluorescence intensity of terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling-fluorescein-isothiocyanate (TUNEL-FITC) in the solasodine group was higher than that in the control group, especially in the 40 mg/kg group. The protein expression of B cell lymphoma/leukemia-2 associated X protein (Bax) ( $3.55 \pm 0.39$ ), cleaved cystein-aspartate protease-3 (Cleaved caspase-3) ( $3.94 \pm 0.33$ ), cleaved cystein-aspartate protease-9 (Cleaved caspase-9) ( $3.59 \pm 0.31$ ), thrombospondin 1 (TSP-1) ( $3.70 \pm 0.41$ ) were up-regulated, while the protein expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) ( $0.31 \pm 0.15$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF) ( $0.25 \pm 0.12$ ), phosphorylated phosphoinositide-3-kinase (p-PI3K) ( $0.39 \pm 0.12$ ) and phosphorylated serine-threonine kinase (p-AKT) ( $0.33 \pm 0.11$ ) were down-regulated, and the effect of 40 mg/kg group was the most obvious ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Solasodine can inhibit the growth of human osteosarcoma cells, induce apoptosis, down-regulate the expression of VEGF and up-regulate the expression of TSP-1, which may be related to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathway.

**Key words:** Solasodine; Solanum nigrum; Human osteosarcoma cells; Cell apoptosis; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Thrombospondin 1 (TSP-1)

骨肉瘤是常见的原发性恶性骨肿瘤,常发生于青少年,每年发病率多达1~3人/100万人,恶性程度较高,早期即可发生肺转移。目前对于骨肉瘤的治疗主要为手术切除辅以化疗,但效果并不理想,30%~40%的病人在诊断后5年内死亡,因此亟需寻求新的治疗方法<sup>[1]</sup>。澳洲茄胺是一种来源于茄属植物的甾体生物碱,在我国主要存在于中草药龙葵中,具有免疫调节、抑制基因合成、诱导细胞分化等作用,在一系列肿瘤中发现具有治疗效应,包括宫颈癌、肠癌、肺癌、甲状腺鳞癌等<sup>[2-5]</sup>,如崔焕波、艾金霞<sup>[6]</sup>使用澳洲茄胺处理人宫颈癌ME180细胞24 h,发现细胞存活率降低,细胞周期阻滞于G1期,呈现出典型的细胞凋亡结构。但是,目前澳洲茄胺对人骨肉瘤细胞增殖是否具有抑制作用并未得到实验验证,作用机制也尚不清楚。因此,本研究通过构建人骨肉瘤细胞移植瘤裸鼠模型,观察澳洲茄胺对移植瘤生长是否具有抑制效应以及对细胞凋亡、血管生成相关因子表达的影响,并且初步探讨其作用机制,本研究于2018年1月至2019年3月完成。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 40只健康雌性的Balb/c裸鼠购于北京维通利华实验动物有限公司,生产许可证号SCXK(京)2012-0001,年龄范围4~5周,体质量范围16~18 g,按照SPF(Specific pathogen free)级别饲养。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

**1.2 主要试剂与仪器** 澳洲茄胺购自成都曼思特生物科技有限公司,人骨肉瘤MG63细胞株购于中科院上海细胞库;胎牛血清、Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)购于Gibco公司;一步法原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒购于北京索莱宝;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购于北京中杉金桥;蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒和增强化学发光(ECL)显色液购于上海碧云天;抗B细胞淋巴瘤/白血病-2相关X蛋白(Bax)抗体、抗B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体、抗活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)抗体、抗活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Cleaved caspase-9)抗体购于Abcam公司;抗磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)抗体、抗磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抗体、抗磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)抗体、抗蛋白激酶B(AKT)抗体购于Cell Signaling Technology公司;抗血管内皮生长因子(VEGF)抗体、抗凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)抗体购于Santa Cruz公司;抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体购于Proteintech公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购于武汉博士德;凝胶成像仪Gel Doc XR<sup>+</sup>购于Bio-Rad公司。

**1.3 动物模型的构建与分组** MG63细胞培养于含有10%胎牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养液中,放置于细胞培养箱中(37℃,5%二氧化碳)。将总体积为0.2 mL的 $2 \times 10^6$ 个细胞悬液注射于裸鼠右侧腋窝皮下,3 d后出现皮下结节。

参照文献中澳洲茄胺的使用剂量<sup>[7-8]</sup>,将40只裸鼠随机分为4组,即对照组、低剂量组(10 mg/kg)、中剂量组(20 mg/kg)、高剂量组(40 mg/kg),每组10只。低剂量组、中剂量组、高剂量组裸鼠分别按照10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg的剂量腹腔注射给药,分组后第1天开始给药,隔日给药一次,连续4周,对照组腹腔注射相同体积的磷酸盐缓冲液(PBS)。

**1.4 移植瘤质量和体积的测量** 观察各组裸鼠的饮食、行为、精神状态等一般表现。分组后每7天测量一次移植瘤的长度和宽度,计算移植瘤的体积=(长度×宽度<sup>2</sup>)/2。在末次给药的次日,即分组后第28天,对移植瘤的长度和宽度进行测量后,颈椎脱臼法处死裸鼠,将移植瘤完整剥离后称重。

**1.5 TUNEL染色** 取移植瘤组织放置于4%的多聚甲醛中固定48 h,30%的蔗糖溶液脱水24 h,包埋后使用冰冻切片机制成厚度约为10 μm的切片。按照一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色:PBS洗涤2次,在样品中加入50 μL带有FITC标签的TUNEL检测液,37℃避光孵育60 min。PBS洗涤3次,DAPI复染后封片,使用倒置荧光显微镜观察和拍照。

**1.6 蛋白质印迹法(Western blotting, WB)** 将移植瘤置于液氮中,用研磨钵充分捣碎,每100 mg的组织加入100 μL蛋白裂解液,加入1%的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,冰上裂解2 h,期间每30分钟旋转1 min。待组织裂解充分,12 000 g离心10 min,取上清液获得总蛋白,进行BCA蛋白定量。取40 μg的总蛋白与上样缓冲液混匀,100℃高温变性5 min,按照每孔20 μL上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后转印聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%的脱脂牛奶室温封闭2 h后,孵育抗Bax抗体(1:1 000)、抗Bcl-2抗体(1:1 000)、抗Cleaved caspase-3抗体(1:1 000)、抗Cleaved caspase-9抗体(1:1 000)、抗VEGF抗体(1:1 000)、抗TSP-1抗体(1:500)、抗p-PI3K抗体(1:500)、抗PI3K抗体(1:1 000)、抗p-AKT抗体(1:500)、抗AKT抗体(1:1 000)和抗GAPDH抗体(1:3 000)4℃过夜。次日取出膜,漂洗后室温孵育辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗2 h。漂洗后,滴加ECL显色液,使用凝胶成像仪曝光和拍照。使用Image Pro Plus 6.0软件测量各条带的灰度值,将对照组中目的蛋白条带和内参蛋白GAPDH条带的灰度值之比作为1。

**1.7 统计学方法** 所有数据使用SPSS 20.0软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组以上计量数据的比较使用单因素方差分析,多组间两两比较使用LSD-*t*检验。当 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 澳洲茄胺抑制肿瘤的生长** 四组裸鼠的饮食、行为、精神状态等一般情况无明显异常和差异。10 mg/kg组、20 mg/kg组、40 mg/kg组的移植瘤质量低于对照组,且40 mg/kg组的移植瘤质量低于10 mg/kg组、20 mg/kg组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。10 mg/kg组、20 mg/kg组、40 mg/kg组的移植瘤体积在21 d和28 d时低于对照组,且40 mg/kg组的移植瘤体积在21 d和28 d时低于10 mg/kg组、20 mg/kg组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

**2.2 TUNEL 染色** 10 mg/kg组、20 mg/kg组、40 mg/kg组的TUNEL-FITC的荧光强度高于对照组,且40 mg/kg组的TUNEL-FITC的荧光强度高于10 mg/kg组、20 mg/kg组。

**2.3 澳洲茄胺对凋亡相关蛋白表达的影响** 10 mg/kg组、20 mg/kg组、40 mg/kg组移植瘤中Bax、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9蛋白的表达量高于对照组,Bcl-2蛋白的表达量低于对照组,且40 mg/kg组移植瘤中Bax、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9蛋白的表达量高于10 mg/kg组、20 mg/kg组,Bcl-2蛋白的表达量低于10 mg/kg组、20 mg/kg

组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图1A和表2。

**2.4 澳洲茄胺对VEGF和TSP-1表达的影响** 10 mg/kg组、20 mg/kg组、40 mg/kg组移植瘤中VEGF蛋白的表达量低于对照组,TSP-1蛋白的表达量高于对照组,且40 mg/kg组移植瘤中VEGF蛋白的表达量低于10 mg/kg组、20 mg/kg组,TSP-1蛋白的表达量高于10 mg/kg组、20 mg/kg组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图1B和表3。

**2.5 澳洲茄胺对PI3K/AKT信号通路的影响** 10 mg/kg组、20 mg/kg组、40 mg/kg组移植瘤中p-PI3K和p-AKT蛋白的表达量低于对照组,且40 mg/kg组移植瘤中p-PI3K和p-AKT蛋白的表达量低于10 mg/kg组、20 mg/kg组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但是四组移植瘤中PI3K和AKT蛋白的表达量差异无统计学意义,见图1C和表4。

**3 结论**

澳洲茄胺具有显著的抗肿瘤活性,是一种十分具有应用前景的天然药物<sup>[2-5]</sup>,如李富仁、刘良<sup>[9]</sup>发现,澳洲茄胺对于宫颈癌海拉细胞的生长具有显著的抑制作用。

本研究将处于对数生长期的MG63细胞注射于裸鼠皮下构建动物模型,然后腹腔注射澳洲茄胺盐溶液,观察澳洲茄胺对移植瘤生长的影响。结果发现,澳洲茄胺处理组小鼠的移植瘤质量低于对照组,肿瘤体积增加程度也小于对照组,而且40 mg/kg

表1 40只人骨肉瘤移植瘤模型裸鼠移植瘤质量和体积的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	质量/g	体积/mm <sup>3</sup>			
		7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	1.08±0.19	90.63±38.94	456.41±89.30	789.39±89.47	1044.31±103.97
澳洲茄胺组					
10 mg/kg组	0.76±0.15 <sup>①</sup>	86.48±35.81	395.71±82.19	655.86±77.95 <sup>①</sup>	816.07±109.86 <sup>①</sup>
20 mg/kg组	0.70±0.18 <sup>①</sup>	81.55±32.32	352.13±77.36 <sup>①</sup>	607.95±98.53 <sup>①</sup>	704.14±95.54 <sup>①②</sup>
40 mg/kg组	0.45±0.12 <sup>①②③</sup>	79.64±39.42	307.93±62.54 <sup>①②</sup>	510.62±95.78 <sup>①②③</sup>	579.56±92.04 <sup>①②③</sup>
F值	25.490	0.182	6.519	16.310	38.520
P值	0.000	0.908	0.001	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$ 。②与10 mg/kg组比较, $P < 0.05$ 。③与20 mg/kg组比较, $P < 0.05$ 。

表2 40只人骨肉瘤移植瘤模型裸鼠移植瘤组织中凋亡相关蛋白表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Bax	Bcl-2	Cleaved caspase-3	Cleaved caspase-9
对照组	10	1.00±0.17	1.00±0.22	1.00±0.13	1.00±0.15
澳洲茄胺组					
10 mg/kg组	10	2.11±0.22 <sup>①</sup>	0.72±0.19 <sup>①</sup>	1.98±0.20 <sup>①</sup>	2.01±0.22 <sup>①</sup>
20 mg/kg组	10	2.13±0.28 <sup>①</sup>	0.68±0.16 <sup>①</sup>	2.94±0.21 <sup>①②</sup>	2.82±0.20 <sup>①</sup>
40 mg/kg组	10	3.55±0.39 <sup>①②③</sup>	0.31±0.15 <sup>①②③</sup>	3.94±0.33 <sup>①②③</sup>	3.59±0.31 <sup>①②③</sup>
F值		141.900	24.220	303.800	185.400
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:Bax为B细胞淋巴瘤/白血病-2相关X蛋白,Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2,Cleaved caspase-3为活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3,Cleaved caspase-9为活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9。

①与对照组比较, $P < 0.05$ 。②与10 mg/kg组比较, $P < 0.05$ 。③与20 mg/kg组比较, $P < 0.05$ 。

表3 40只人骨肉瘤移植瘤模型裸鼠移植瘤组织中VEGF和TSP-1表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	VEGF	TSP-1
对照组	10	1.00±0.29	1.00±0.15
澳洲茄胺组			
10mg/kg组	10	0.81±0.22 <sup>①</sup>	1.92±0.21 <sup>①</sup>
20mg/kg组	10	0.59±0.18 <sup>①</sup>	2.86±0.30 <sup>①②</sup>
40mg/kg组	10	0.25±0.12 <sup>①②③</sup>	3.70±0.41 <sup>①②③</sup>
F值		141.900	167.900
P值		0.000	0.000

注: VEGF为血管内皮生长因子, TSP-1为凝血酶敏感蛋白1。  
①与对照组比较,  $P<0.05$ 。②与10mg/kg组比较,  $P<0.05$ 。③与20mg/kg组比较,  $P<0.05$ 。

表4 40只人骨肉瘤移植瘤模型裸鼠移植瘤组织中PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	p-PI3K	PI3K	p-AKT	AKT
对照组	10	1.00±0.25	1.00±0.12	1.00±0.22	1.00±0.15
澳洲茄胺组					
10 mg/kg组	10	0.74±0.22 <sup>①</sup>	1.09±0.13	0.75±0.19 <sup>①</sup>	1.02±0.15
20 mg/kg组	10	0.58±0.16 <sup>①</sup>	1.05±0.13	0.55±0.16 <sup>①②</sup>	1.08±0.16
40 mg/kg组	10	0.39± 0.12 <sup>①②③</sup>	0.99±0.11	0.33± 0.11 <sup>①②③</sup>	1.09±0.16
F值		17.680	1.432	26.700	0.8143
P值		0.000	0.2495	0.000	0.4944

注: p-PI3K为磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶, PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶, p-AKT为磷酸化蛋白激酶B, AKT为蛋白激酶B。

①与对照组比较,  $P<0.05$ 。②与10mg/kg组比较,  $P<0.05$ 。③与20 mg/kg组比较,  $P<0.05$ 。

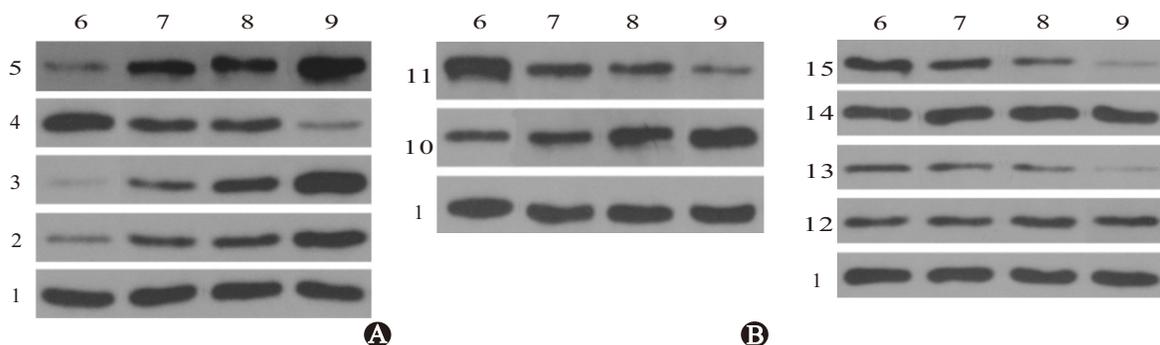
组的移植瘤体积在21 d和28 d时低于10 mg/kg组、20 mg/kg组, 移植瘤质量也低于10 mg/kg组、20 mg/kg组, 表明给予澳洲茄胺的小鼠其移植瘤的生长受到显著抑制, 而且具有剂量依赖效应。同时, 给予澳洲茄胺干预的小鼠, 在饮食、行为和精神状态等方面的表现同对照组无显著差异, 体现出澳洲茄胺良好的生物安全性。

肿瘤的发生发展, 往往是由于多种不同的生理

功能紊乱导致, 其中抗凋亡作为其十分重要的生理特性之一, 使得肿瘤细胞不断增殖且不受凋亡信号控制。我们推测, 澳洲茄胺抑制MG63细胞成瘤的具体机制可能通过促进肿瘤细胞凋亡, 因此我们将小鼠移植瘤取下后制成冰冻切片观察, 发现在给予澳洲茄胺的小鼠移植瘤中, 凋亡的肿瘤细胞高于对照组, 而且随着给药浓度的升高, 凋亡的细胞越多。该结果表明, 澳洲茄胺能够促进MG63细胞凋亡, 从而抑制其在裸鼠体内呈瘤, 具有剂量依赖效应。

细胞凋亡受到多种蛋白的调控, 其中Caspase家族在介导细胞凋亡中扮演着重要作用。当细胞发生凋亡时, 上游多种凋亡活性物质释放, 从而激活Caspase-9, 进而活化Caspase-3产生级联效应, 引起细胞凋亡<sup>[10]</sup>。另一方面, Bcl-2家族众中的Bax和Bcl-2蛋白对细胞凋亡也具有重要的调控作用。其中, Bcl-2可以抑制Caspase家族相关蛋白的活性从而抑制凋亡, 而Bax能够激活Caspase相关蛋白, 从而促进细胞凋亡<sup>[11]</sup>。通过对移植瘤中凋亡相关蛋白进行检测, 发现Caspase-9、Caspase-3以及Bax的表达在给予澳洲茄胺的移植瘤中均显著增加, 但Bcl-2的表达降低, 而且以40mg/kg组的效应最为显著。该结果表明在给予澳洲茄胺的小鼠中, 促进凋亡的相关蛋白发生激活, 然而抑制凋亡的蛋白受到抑制, 使得MG63细胞的凋亡增加, 导致移植瘤的生长受到抑制。

VEGF参与调节皮肤、肺、脑、心脏、脊髓等一系列组织的修复和再生<sup>[12]</sup>。VEGF与骨肉瘤的发生、发展和转移也有密切的关系, 如张黎明发现VEGF在骨肉瘤组织中呈高表达, 可用于骨肉瘤临床病理的辅助诊断和预后评价<sup>[13]</sup>。本研究对移植瘤组织的VEGF表达进行检测, 发现与对照组相比, 澳洲茄胺处理组裸鼠的移植瘤中VEGF的表达量显著降低, 而且剂量越高VEGF的表达量越低, 表明澳洲茄胺可以抑制VEGF的表达, 具有剂量依赖效应。TSP-1是一种强有力的内源性抗血管生成因子, 具



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9; 3—半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; 4—B细胞淋巴瘤/白血病-2; 5—B细胞淋巴瘤/白血病-2相关X蛋白; 6—对照组; 7—10 mg/kg组; 8—20 mg/kg组; 9—40 mg/kg组; 10—凝血酶敏感蛋白1; 11—血管内皮生长因子; 12—蛋白激酶B; 13—磷酸化蛋白激酶B; 14—磷脂酰肌醇3-激酶; 15—磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶。

图1 WB检测40只人骨肉瘤移植瘤模型裸鼠细胞凋亡与相关蛋白的表达情况: A为对凋亡相关蛋白表达的影响, B为对VEGF和TSP-1表达的影响, C为对PI3K/AKT信号通路的影响

有抑制内皮细胞增殖、诱导内皮细胞凋亡、抑制血管生成因子与受体结合等生物学效应,通过抑制血管生成对多种肿瘤的生长具有抑制效应<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,与对照组相比,澳洲茄胺处理组裸鼠的移植瘤中TSP-1的表达量显著升高,而且剂量越高TSP-1的表达量越高,表明澳洲茄胺可以上调TSP-1的表达,具有剂量依赖效应。

作为目前肿瘤相关研究的重要通路之一,PI3K/AKT通路在多种肿瘤发展机制中均扮演重要角色,其中便包括抗肿瘤凋亡。PI3K是一种磷脂酰肌醇激酶,具有丝氨酸/苏氨酸激酶的活性,其下游的AKT是原癌基因c-akt编码的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,活化的AKT能够影响下游多种效应分子,从而发挥多种重要的作用<sup>[15]</sup>。大量研究表明,当PI3K/AKT的过度活化后,能够通过各种转录因子,调节下游Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3等多种凋亡相关蛋白,发挥抗凋亡作用<sup>[16-18]</sup>。我们对移植瘤中PI3K/AKT的相关蛋白进行检测发现,在给予澳洲茄胺后,该通路的PI3K和AKT蛋白表达差异无统计学意义,但是其磷酸化激活程度发生显著减弱,表明澳洲茄胺能够影响PI3K和AKT蛋白的活性,但具体影响其活性的方式还有待继续研究。

本研究的不足和展望:给予澳洲茄胺的浓度梯度不够,不能明确反应药物的浓度-药效关系;本研究仅检测了PI3K/AKT信号通路的表达变化,并认为其可能与澳洲茄胺诱导细胞凋亡、下调VEGF表达、上调TSP-1表达等治疗效应有关,但是未进行基因敲减或过表达的实验,相关结论仍然缺乏足够的证据支持;目前,已有龙葵或其合剂应用于肝癌、骨髓瘤等肿瘤病人的报道,但是尚无龙葵在骨肉瘤病人中应用的报道,而且其活性成分澳洲茄胺也无临床应用的报道,本研究对于明确龙葵的抗肿瘤活性成分以及下一步澳洲茄胺的临床应用提供了理论基础。

综上所述,澳洲茄胺可以抑制MG63细胞皮下移植瘤的生长,诱导细胞凋亡,下调VEGF的表达,上调TSP-1的表达,其作用机制可能与PI3K/AKT信号通路的抑制有关。

### 参考文献

- [1] OTTAVIANI G, JAFFE N. The epidemiology of osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152: 3-13.
- [2] ZHUANG YW, WU CE, ZHOU JY, et al. Solasodine reverses stemness and epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 485-491.
- [3] ZHUANG YW, WU CE, ZHOU JY, et al. Solasodine inhibits human colorectal cancer cells through suppression of the AKT/glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin pathway [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(11): 2248-2264.
- [4] XU XH, ZHANG LL, WU GS, et al. Solasodine induces apoptosis, affects autophagy, and attenuates metastasis in ovarian cancer cells [J]. *Planta Med*, 2017, 83(3-04): 254-260.
- [5] SHEN KH, HUNG JH, CHANG CW, et al. Solasodine inhibits invasion of human lung cancer cell through downregulation of miR-21 and MMPs expression [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 268: 129-135.
- [6] 崔焕波, 艾金霞. SBHL诱导宫颈癌细胞株ME180凋亡的实验研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(6): 992-994.
- [7] 李富仁, 丑莉莉, 刘良. 澳洲茄胺盐酸盐注射剂对小鼠Lewis肺癌抑瘤作用研究 [J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2011, 12(1): 50-52.
- [8] 艾金霞, 王冰梅. 澳洲茄胺盐酸盐对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(13): 1170.
- [9] 李富仁, 刘良. 澳洲茄胺盐酸盐对体外HeLa细胞培养生长抑制作用的研究 [J]. *现代预防医学*, 2008, 35(19): 3821-3822.
- [10] XUE M, JI X, XUE C, et al. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3beta pathway in vivo and in vitro [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 898-908.
- [11] ZHENG Q, WANG B, GAO J, et al. CD155 knockdown promotes apoptosis via AKT/Bcl-2/Bax in colon cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 131-140.
- [12] ROSA AR, STEFFENS D, SANTI B, et al. Development of VEGF-loaded PLGA matrices in association with mesenchymal stem cells for tissue engineering [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(9): e5648. DOI: 10.1590/1414-431X20175648
- [13] 张黎明. Livin、VEGF在骨肉瘤组织中的表达及预后的关系 [J]. *河北医药*, 2015, 37(13): 1944-1947.
- [14] HAM SA, YOO T, LEE WJ, et al. ADAMTS1-mediated targeting of TSP-1 by PPARdelta suppresses migration and invasion of breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 94091-94103.
- [15] ZHANG Z, ZHU J, HUANG Y, et al. MYO18B promotes hepatocellular carcinoma progression by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13(1): 85.
- [16] JING D, BAI H, YIN S. Renoprotective effects of emodin against diabetic nephropathy in rat models are mediated via PI3K/Akt/GSK-3beta and Bax/caspase-3 signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 5163-5169.
- [17] XIE L, WU Y, FAN Z, et al. Astragalus polysaccharide protects human cardiac microvascular endothelial cells from hypoxia/reoxygenation injury: the role of PI3K/AKT, Bax/Bcl-2 and caspase-3 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1): 904-910.
- [18] DU L, MEI HF, YIN X, et al. Delayed growth of glioma by a polysaccharide from aster tataricus involve upregulation of Bax/Bcl-2 ratio, activation of caspase-3/8/9, and downregulation of the Akt [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(3): 1819-1825.

(收稿日期:2019-05-30,修回日期:2019-07-24)