

引用本文:李刚,刘明,王太鹏.唑来膦酸对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制[J].安徽医药,2021,25(9):1723-1727.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.006.



◇ 药学研究 ◇

唑来膦酸对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制

李刚,刘明,王太鹏

作者单位:烟台龙矿中心医院外四科,山东 烟台 265700

摘要: 目的 研究唑来膦酸对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并探讨其作用机制。方法 将对照组(未做任何处理)、唑来膦酸(ZOL)组(50 $\mu\text{mol/L}$ 唑来膦酸处理)、miR-con 组(转染 miR-con)、miR-520a-3p 组(转染 miR-520a-3p mimics)、ZOL+anti-miR-con 组(转染 anti-miR-con 再用唑来膦酸处理)、ZOL+anti-miR-520a-3p 组(转染 anti-miR-520a-3p 再用唑来膦酸处理),均用脂质体法转染至人骨肉瘤细胞(HOS);MTT 法检测各组细胞的增殖;Transwell 法检测各组细胞的迁移、侵袭;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组细胞中 miR-520a-3p 的表达;蛋白质印迹法(Western blotting)检测各组细胞中 T 细胞特异性转录因子 7(TCF7)的蛋白表达。双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性。结果 与对照组相比,ZOL 组 HOS 细胞的吸光度[(1.05 $\pm$ 0.11)比(0.73 $\pm$ 0.07)]、迁移细胞数[(86.49 $\pm$ 9.17)个比(31.67 $\pm$ 4.29)个]、侵袭细胞数[(64.17 $\pm$ 7.72)个比(17.82 $\pm$ 3.19)个]显著降低,miR-520a-3p 的表达明显下调($P<0.05$);过表达 miR-520a-3p 可升高 HOS 细胞的吸光度[(1.09 $\pm$ 0.12)比(0.68 $\pm$ 0.09)]、迁移细胞数[(88.49 $\pm$ 9.17)个比(35.76 $\pm$ 5.14)个]、侵袭细胞数[(64.17 $\pm$ 7.72)个比(19.48 $\pm$ 4.27)个];TCF7 是 miR-520a-3p 的靶标。抑制 miR-520a-3p 可逆转 ZOL 对 HOS 细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用,且可部分逆转 ZOL 对 HOS 细胞中 TCF7 表达的抑制作用。结论 唑来膦酸可能通过调控 miR-520a-3p/TCF7 轴抑制骨肉瘤 HOS 细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 骨肉瘤; 唑来膦酸; 微小 RNA-520a-3p; T 细胞特异性转录因子 7; 增殖; 迁移; 侵袭

Effects of Zoledronate on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells and the mechanism

LI Gang, LIU Ming, WANG Taipeng

Author Affiliation: The Fourth Department of Surgery, The Central Hospital of Yantai Dragon Mine, Yantai, Shandong 265700, China

Abstract: **Objective** To study the effects of Zoledronate on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells, and to explore its mechanism. **Methods** Control group (without any treatment), ZOL group (50 $\mu\text{mol/L}$ Zoledronate treatment), miR-con group (transfected miR-con), miR-520a-3p group (transfected miR-520a-3p mimics), ZOL+anti-miR-con group (transfected anti-miR-con and then treated with Zoledronate), ZOL+anti-miR-520a-3p group (transfected anti-miR-520a-3p and then treated with Zoledronate) were transfected into human osteosarcoma (HOS) cells by liposome method. The proliferation of cells in each group was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, the migration and invasion of cells in each group were detected by Transwell method, the expression of miR-520a-3p was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the protein expression of T cell-specific transcription factor 7 (TCF7) in each group was detected by Western blotting. Double luciferase reporter gene assay was used to detect the fluorescence activity of cells. **Results** Compared with the control group, the absorption [(1.05 $\pm$ 0.11) vs. (0.73 $\pm$ 0.07)], migration [(86.49 $\pm$ 9.17) vs. (31.67 $\pm$ 4.29)] and invasion [(64.17 $\pm$ 7.72) vs. (17.82 $\pm$ 3.19)] number of HOS cells in the ZOL group were significantly decreased, and the expression of miR-520a-3p was significantly down-regulated ($P<0.05$). Overexpression of miR-520a-3p increased the absorption [(1.09 $\pm$ 0.12) vs. (0.68 $\pm$ 0.09)], the number of migration [(88.49 $\pm$ 9.17) vs. (35.76 $\pm$ 5.14)] and invasion [(64.17 $\pm$ 7.72) vs. (19.48 $\pm$ 4.27)] of HOS cells. TCF7 was the target of miR-520a-3p. Inhibition of miR-520a-3p reversed the inhibitory effect of ZOL on proliferation, migration and invasion of HOS cells, and partially reversed the inhibitory effect of ZOL on TCF7 expression in HOS cells. **Conclusion** Zoledronate may inhibit the proliferation, migration and invasion of HOS cells by regulating the miR-520a-3p/TCF7 axis. **Key words:** Osteosarcoma; Zoledronate; miR-520a-3p; TCF7; Proliferation; Migration; Invasion

骨肉瘤是儿童癌症病人死亡的最主要原因之一^[1]。常用的治疗方案为手术前后辅助化疗,但其生存率仍不足 20%^[2-4]。唑来膦酸(ZOL)在癌症中的治疗作用得到普遍认可,但其在骨肉瘤中的作用机

制尚未完全清楚。miRNA 为一种短链非编码内源性微小 RNA,其通过抑制或沉默靶基因转录蛋白过程,而发挥调控癌症发生发展的作用^[5-6]。miR-520a-3p 虽在其他癌症中具有抑癌作用,但其在骨肉瘤中

与唑来膦酸和T细胞特异性转录因子7(TCF7)的调控机制尚未有人报道。本实验旨在研究唑来膦酸对骨肉瘤细胞HOS增殖、迁移和侵袭以及其对miR-520a-3p、TCF7表达的影响,于2018年6月至2019年1月通过过表达miR-520a-3p、抑制miR-520a-3p对唑来膦酸处理的HOS细胞增殖、迁移和侵袭的影响,揭示其机制与唑来膦酸上调miR-520a-3p,抑制TCF7表达有关,将为唑来膦酸治疗骨肉瘤奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人骨肉瘤细胞(HOS)购自美国ATCC;唑来膦酸(密固达,批号S0261,5 mg/100 mL)购自北京诺华制药有限公司;DMEM培养基、胎牛血清、噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶均购自美国Selleck公司;基质胶、Transwell小室购自美国Corning公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司;Lipofectamine™2000、BCA蛋白定量试剂盒、逆转录试剂盒购自大连Takara公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 以含10%胎牛血清的DMEM培养液培养HOS细胞,环境条件为37℃,5%二氧化碳。

1.2.2 细胞转染 将ZOL(50 μmol/L)处理48 h的HOS细胞,标记为ZOL组;未做任何处理的HOS细胞,标记为对照组;将miR-con、miR-520a-3p mimics分别转染到HOS细胞48 h,分别标记为miR-con组、miR-520a-3p组;将anti-miR-con、anti-miR-520a-3p分别转染到HOS细胞48 h,再经50 μmol/L ZOL处理48 h,分别标记为ZOL+anti-miR-con组、ZOL+anti-miR-520a-3p组;将anti-miR-520a-3p分别与si-con、si-TCF7共转染到HOS细胞48 h,再经50 μmol/L ZOL处理48 h,分别标记为ZOL+anti-miR-520a-3p+si-con组、ZOL+anti-miR-520a-3p+si-TCF7组。

1.2.3 MTT法检测细胞活性 取各组细胞,加入20 μL 5 g/L的MTT溶液,培养4 h,弃上清,每孔加入150 μL二甲基亚砷(DMSO),震荡,使结晶溶解,检

测490 nm处的吸光度。

1.2.4 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭 加入100 μL(10⁵个/毫升)HOS细胞于Transwell小室上室,600 μL含血清的培养基加入下室,培养过夜。取出小室,棉签擦去上室内细胞,磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)洗涤,甲醇固定30 min,0.1%结晶紫染色20 min,PBS洗涤。于显微镜下,随机选5个视野计迁移细胞数。

在Transwell小室上表面铺适量厚度的基质胶,按上述操作方法计侵袭细胞数。

1.2.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中miR-520a-3p的表达 提取各组细胞RNA,BCA定量,合成互补DNA(cDNA)后,按qRT-PCR试剂盒说明书检测miR-520a-3p表达,用2^{-ΔΔCt}计算miR-520a-3p表达。

1.2.6 蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞中TCF7的蛋白表达 提取各组细胞蛋白,BCA定量,电泳后转至PVDF膜,5%脱脂奶粉将膜封闭2 h,洗膜,加入I抗,4℃过夜孵育,洗膜,加II抗,4℃2 h。加发光液,曝光。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测实验 构建TCF7 3'UTR-WT(含TCF7 3'UTR片段)和TCF7 3'UTR-MUT(含TCF7 3'UTR片段突变体)荧光素酶报告载体,按双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.3 统计学方法 所有数据均采用SPSS 21.0进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。两组比较采用两独立样本*t*检验。以*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 唑来膦酸抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭 MTT法和Transwell实验检测结果如表1、图1所示,与对照组相比,ZOL组HOS细胞在48、72 h时细胞活性,细胞迁移量和侵袭量均显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

表1 唑来膦酸(ZOL)抑制骨肉瘤细胞增殖、降低细胞迁移数和侵袭数/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	吸光度			迁移数/个	侵袭数/个
		24 h	48 h	72 h		
对照组	3	0.43±0.04	0.68±0.07	1.05±0.11	86.49±9.17	64.17±7.72
ZOL 10 μmol/L	3	0.40±0.05	0.54±0.06 ^①	0.88±0.09 ^①	53.26±6.47 ^①	39.36±4.78 ^①
ZOL 50 μmol/L	3	0.38±0.05	0.49±0.06 ^①	0.76±0.09 ^①	35.76±5.14 ^①	19.48±4.27 ^①
ZOL 250 μmol/L	3	0.37±0.04	0.47±0.05 ^①	0.73±0.07 ^①	31.67±4.29 ^①	17.82±3.19 ^①
<i>F</i> 值		1.024	7.370	7.627	43.755	50.724
<i>P</i> 值		0.432	0.011	0.010	<0.001	<0.001

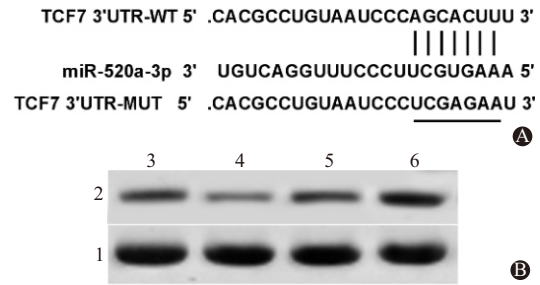
注:①与对照组比较,*P*<0.05。

2.2 唑来膦酸调控骨肉瘤细胞 miR-520a-3p 的表达 与对照组(1.00±0.13)相比,ZOL 10 μmol/L 组(1.88±0.16)、ZOL 50 μmol/L 组(4.73±0.56)、ZOL 250 μmol/L 组(4.95±0.62) HOS 细胞中 miR-520a-3p 的表达量均显著升高($F=64.667, P<0.001$)。

2.3 过表达 miR-520a-3p 抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭 结果如表 2 所示,与 miR-con 组相比,miR-520a-3p 组 HOS 细胞在 48、72 h 时,细胞活性、细胞迁移量和侵袭量显著降低($P<0.05$)。

2.4 miR-520a-3p 靶向骨肉瘤细胞 TCF7 检测结果 miRcode 预测显示,miR-520a-3p 与 TCF7 3' UTR 之间存在结合位点(图 2A);双荧光素酶活性检测结果显示,与 miR-con 组(1.00±0.12)相比,miR-520a-3p 组(0.42±0.06) WT-TCF7 细胞中荧光活性显著降低($t=7.488, P=0.002$), MUT-TCF7 细胞中 miR-con 组(0.95±0.09)与 miR-520a-3p 组(1.13±0.12)的荧光活性不受影响($t=2.079, P=0.106$)。miR-con 组、miR-520a-3p 组、anti-miR-con 组、anti-miR-520a-3p 组 TCF7 蛋白表达水平分别为(0.39±0.05)、(0.17±0.05)、(0.36±0.04)、(0.67±0.06) ($F=49.990, P<0.001$), miR-520a-3p 组低于 miR-con 组($P<0.05$), anti-miR-520a-3p 组高于 anti-miR-con 组($P<0.05$), 说明 miR-520a-3p 靶向负调控 TCF7 表达(图 2B) ($P<0.05$)。

2.5 抑制 miR-520a-3p 逆转唑来膦酸对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用 结果如表 3 所示,与对照组相比,ZOL 组 HOS 细胞在 48、72 h 时,细胞活性、细胞迁移量和侵袭量显著降低;与 ZOL+anti-



注:1—β 肌动蛋白(β-actin);2—TCF7;3—miR-con 组;4—miR-520a-3p 组;5—anti-miR-con 组;6—anti-miR-520a-3p 组。

图 2 miR-520a-3p 靶向调控骨肉瘤细胞 T 细胞特异性转录因子 7 (TCF7) 表达;A 为 miR-520a-3p 与 TCF7 靶向的序列信息,B 为 miR-520a-3p 对骨肉瘤细胞 TCF7 表达的影响

miR-con 组相比,ZOL+anti-miR-520a-3p 组 HOS 细胞在 48、72 h 时,细胞活性、细胞迁移量和侵袭量显著升高;与 ZOL+anti-miR-520a-3p-si-con 组相比,ZZOL+anti-miR-520a-3p-si-TCF7 组 HOS 细胞在 48、72 h 时,细胞活性、细胞迁移量和侵袭量均显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,ZOL 组 TCF7 表达显著降低;与 ZOL 组相比,ZOL+anti-miR-520a-3p 组 TCF7 显著升高;与 ZOL+anti-miR-520a-3p-si-con 组相比,ZZOL+anti-miR-520a-3p-si-TCF7 组 TCF7 显著降低($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

唑来膦酸是一种双磷酸盐类药物,其具有较好的临床疗效,尤其针对发生骨转移的癌症^[7]。李欣晓等^[8]在唑来膦酸治疗骨转移恶性肿瘤的研究中阐明,唑来膦酸联合放射治疗可增强发生骨转移肿瘤的治疗效果,其机制与失活肿瘤信号通路、促进凋

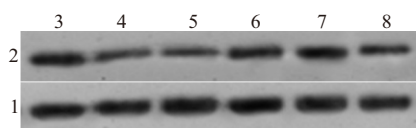
表 2 过表达 miR-520a-3p 抑制骨肉瘤细胞增殖以及减少细胞迁移数和侵袭数的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-520a-3p 表达量	吸光度			迁移数/个	侵袭数/个
			24 h	48 h	72 h		
miR-con 组	3	0.45±0.06	0.42±0.05	0.64±0.07	1.09±0.12	88.49±9.17	64.17±7.72
miR-520a-3p 组	3	2.78±0.25	0.35±0.04	0.47±0.06	0.68±0.09	35.76±5.14	19.48±4.27
t 值		15.697	1.894	3.194	4.734	8.688	8.774
P 值		<0.001	0.131	0.033	0.009	0.001	0.001

表 3 抑制 miR-520a-3p 表达可以逆转唑来膦酸(ZOL)对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-520a-3p 表达量	吸光度			迁移数/个	侵袭数/个	TCF7
			24 h	48 h	72 h			
对照组	3	0.41±0.05	0.46±0.05	0.67±0.07	1.07±0.12	94.52±9.89	68.78±7.72	1.00±0.11
ZOL 组	3	2.16±0.22 ^①	0.39±0.05	0.48±0.05 ^①	0.66±0.07 ^①	38.78±4.55 ^①	20.54±3.46 ^①	0.32±0.05 ^①
ZOL+anti-miR-con 组	3	2.35±0.28	0.40±0.05	0.49±0.05	0.70±0.08	41.39±4.85	25.08±4.29	0.36±0.06
ZOL+anti-miR-520a-3p 组	3	0.71±0.09 ^②	0.44±0.04	0.65±0.07 ^②	0.98±0.11 ^②	72.59±6.21 ^②	49.96±6.44 ^②	0.68±0.07 ^②
ZOL+anti-miR-520a-3p+si-con 组	3	2.84±0.19	0.43±0.05	0.66±0.07	1.07±0.12	79.88±6.97	52.36±5.48	0.73±0.08
ZOL+anti-miR-520a-3p+si-TCF7 组	3	1.14±0.14 ^③	0.41±0.05	0.51±0.05 ^③	0.74±0.08 ^③	52.34±5.56 ^③	35.62±5.58 ^③	0.47±0.06 ^②
F 值		90.112	0.889	6.865	11.181	35.119	31.313	36.537
P 值		<0.001	0.518	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与 ZOL+anti-miR-con 组比较, $P<0.05$ 。③与 ZOL+anti-miR-520a-3p+si-con 组比较, $P<0.05$ 。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—TCF7;3—对照组;4—ZOL组;5—ZOL+anti-miR-con组;6—ZOL+anti-miR-520a-3p组;7—ZOL+anti-miR-520a-3p+si-con组;8—ZOL+anti-miR-520a-3p+si-TCF7组。

图3 抑制miR-520a-3p和唑来膦酸(ZOL)对骨肉瘤细胞T细胞特异性转录因子7(TCF7)表达的影响

亡、调节肿瘤微环境等相关。早在2007年,何贤峰等^[9]、刘家国等^[10]已报道,唑来膦酸可通过抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭,促进其凋亡,抑制骨肉瘤的进一步恶化。最近冷华平等^[11]在骨肉瘤的研究中发现,唑来膦酸可通过调节COX-2(环氧合酶-2)、MMP-9(基质金属蛋白酶9)和TIMP1(金属蛋白酶组织抑制因子-1)的表达呈浓度依赖性抑制骨肉瘤细胞的恶性生物学行为。本研究发现,唑来膦酸可明显抑制HOS细胞增殖、迁移、侵袭,这与前人的研究结果均相似;且唑来膦酸可上调HOS细胞中miR-520a-3p的表达。

现普遍认为,miRNA能调控mRNA的翻译或降解,从而影响蛋白的表达^[12]。miRNA可作为癌基因或抑癌基因参与肿瘤的进展过程^[13-14]。在乳腺癌组织和细胞中,miR-520a-3p表达显著下调,恢复miR-520a-3p表达通过下调CCND1和CD44抑制乳腺癌进展^[15]。过表达miR-520a-3p通过靶向下调EGFR抑制结直肠癌细胞迁移,促进细胞凋亡,并阻滞细胞周期于G₀/G₁期,抑制肿瘤生长^[16]。Wang等^[17]在骨肉瘤的研究中发现,右美托咪定可上调直接靶向蛋白激酶1(AKT1)的miR-520a-3p,miR-520a-3p可抑制MG63细胞增殖和迁移,促进细胞凋亡,揭示右美托咪定可通过上调miR-520a-3p的表达水平来抑制骨肉瘤细胞增殖和迁移并促进细胞凋亡,提示右美托咪定可以作为骨肉瘤治疗中的潜在治疗剂,且miR-520a-3p可以是骨肉瘤治疗中的潜在靶标。本研究发现,过表达miR-520a-3p可抑制HOS细胞的增殖、迁移、侵袭;深入研究发现,抑制miR-520a-3p可逆转唑来膦酸对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用,且miR-520a-3p可靶向负调控TCF7表达,推测miR-520a-3p的功能可能与靶向TCF7存在一定相关性。

TCF7为高迁移率蛋白超家族成员,主要参与调控淋巴细胞的分化^[18-19]。其在多种肿瘤中均出现表达异常升高,参与肿瘤的恶性进程^[20-21]。TCF7在结直肠癌组织和细胞中高表达,敲除TCF7可显著抑制结直肠癌细胞的增殖和侵袭^[22]。在骨肉瘤组织和细胞中,TCF7蛋白过表达,过表达miR-192通过

靶向下调TCF7抑制骨肉瘤细胞的恶性行为^[23]。本研究检测了唑来膦酸处理的HOS细胞中TCF7的表达发现,唑来膦酸可抑制TCF7的表达;深入研究发现,抑制miR-520a-3p可逆转唑来膦酸在HOS细胞中对TCF7表达的抑制作用,敲减TCF7逆转了抑制miR-520a-3p对唑来膦酸的骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

综上所述,唑来膦酸可能通过调控miR-520a-3p/TCF7轴抑制骨肉瘤HOS细胞的增殖、迁移和侵袭,为骨肉瘤治疗提供理论基础。

(本文图1见插图9-2)

参考文献

- [1] MOORE DD, LUU HH. Osteosarcoma [J]. Cancer Treat Res, 2014, 162: 65-92.
- [2] BROWN HK, TELLEZ-GABRIEL M, HEYMANN D. Cancer stem cells in osteosarcoma [J]. Cancer Lett, 2017, 386: 189-195.
- [3] SZEWCZYK M, LECHOWSKI R, ZABIELSKA K. What do we know about canine osteosarcoma treatment? Review [J]. Vet Res Commun, 2015, 39(1): 61-67.
- [4] BOTTER SM, NERI D, FUCHS B. Recent advances in osteosarcoma [J]. Curr Opin Pharmacol, 2014, 16: 15-23.
- [5] LUJAMBIO A, LOWE SW. The microcosmos of cancer [J]. Nature, 2012, 482(7385): 347-355.
- [6] HE Y, LIN J, KONG D, et al. Current state of circulating MicroRNAs as cancer biomarkers [J]. Clin Chem, 2015, 61(9): 1138-1155.
- [7] DERENNE S, AMIOT M, SOPHIE B, et al. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(12): 2048-2056.
- [8] 李欣晓, 梁仁拔, 黄静, 等. 唑来膦酸联合放疗在恶性肿瘤骨转移治疗中研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(2): 188-190.
- [9] 何贤峰, 杨述华, 傅德皓, 等. 唑来膦酸对骨肉瘤细胞增殖凋亡和VEGF表达的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(7): 531-535.
- [10] 刘家国, 杨述华, 何贤峰, 等. 唑来膦酸对骨肉瘤LM8细胞黏附迁移和侵袭力的影响 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2007, 6(2): 93-95.
- [11] 冷华平, 段永壮, 李宽宽, 等. Zometa对骨肉瘤细胞中MMP-9、TIMP-1及COX-2表达的影响 [J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(8): 1224-1228.
- [12] ZHANG J, LIU B, HE J, et al. Inferring functional miRNA-mRNA regulatory modules in epithelial-mesenchymal transition with a probabilistic topic model [J]. Comput Biol Med, 2012, 42(4): 428-437.
- [13] WU X, ZENG R, WU S, et al. Comprehensive expression analysis of miRNA in breast cancer at the miRNA and isomiR levels [J]. Gene, 2015, 557(2): 195-200.
- [14] PASIC MD, SOTIROPOULOU G, YOUSEF GM. The miRNA-kallikrein interactions: adding a new dimension [J]. Cell Cycle, 2015, 14(5): 691-692.

- [15] LI J, WEI J, MEI Z, et al. Suppressing role of miR-520a-3p in breast cancer through CCND1 and CD44 [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(1): 146-154.
- [16] ZHANG R, LIU R, LIU C, et al. A novel role for MiR-520a-3p in regulating EGFR Expression in colorectal cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1559-1574.
- [17] WANG X, XU Y, CHEN X, et al. [ARTICLE WITHDRAWN] Dexmedetomidine inhibits osteosarcoma cell proliferation and migration, and promotes apoptosis by regulating MiR-520a-3p [J]. Oncol Res, 2018, 26(3): 495-502.
- [18] OOSTERWEGEL M, DE WETERING MVAN, TIMMERMAN J, et al. Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis [J]. Development, 1993, 118(2): 439-448.
- [19] BILLIN AN, THIRLWELL H, AYER DE. Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(18): 6882-6890.
- [20] BARKER N, CLEVERS H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(12): 997-1014.
- [21] NIKUŠEVA-MARTIĆ T, SERMAN L, ZELJKO M, et al. Expression of secreted frizzled-related protein 1 and 3, T-cell factor 1 and lymphoid enhancer factor 1 in clear cell renal cell carcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2013, 19(3): 545-551.
- [22] CUI BH, HONG X. miR-6852 serves as a prognostic biomarker in colorectal cancer and inhibits tumor growth and metastasis by targeting TCF7 [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(2): 879-885.
- [23] WANG Y, ZHANG S, XU Y, et al. Upregulation of miR-192 inhibits cell growth and invasion and induces cell apoptosis by targeting TCF7 in human osteosarcoma [J]. Tumour Biol, 2016, 37(11): 15211-15220.

(收稿日期:2019-04-15,修回日期:2019-07-15)

引用本文:葛海,何良霞,朱迎春,等.山茱萸环烯醚萜苷通过介导胞外信号调节激酶信号通路对急性脑梗死小鼠的神经保护作用[J].安徽医药,2021,25(9):1727-1731.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.007.

◇ 药学研究 ◇



山茱萸环烯醚萜苷通过介导胞外信号调节激酶信号通路对急性脑梗死小鼠的神经保护作用

葛海,何良霞,朱迎春,李军

作者单位:安徽省第二人民医院神经内科,安徽 合肥 230041

通信作者:李军,男,副主任医师,研究方向为神经内科常见疾病内科治疗,Email:439712162@qq.com

摘要: 目的 研究山茱萸环烯醚萜苷(CIG)对急性脑梗死小鼠的神经保护作用,并探讨其可能机制。方法 将18只ICR小鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、实验组,每组6只。参考大脑中动脉栓塞法对小鼠进行造模,实验组小鼠腹腔注射150 mg/kg CIG,连续给药7 d,对比三组小鼠的神经损伤评分,并观察小鼠的脑梗死体积,使用TUNEL检测测定小鼠神经元的凋亡率,使用实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法检测脑组织中磷酸化胞外信号调节激酶1/2(p-ERK1/2)蛋白、胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bax)蛋白及mRNA的表达情况。结果 与对照组相比,模型组小鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、神经元凋亡率、Bax mRNA及其蛋白和p-ERK1/2蛋白表达升高,Bcl-2 mRNA及其蛋白表达降低($P < 0.05$),其中神经元凋亡率(79.678 ± 7.203)%、Bax mRNA(3.84 ± 0.29)及其蛋白表达(1.01 ± 0.07)、p-ERK1/2蛋白表达(0.90 ± 0.08)高于对照组的(1.983 ± 1.071)%、(1.04 ± 0.09)、(0.21 ± 0.07)、(0.41 ± 0.08),Bcl-2 mRNA(1.00 ± 0.07)及其蛋白表达(0.50 ± 0.07)低于对照组的(3.86 ± 0.32)、(1.29 ± 0.08)。与模型组相比,实验组小鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、神经元凋亡率、Bax mRNA及其蛋白降低,Bcl-2 mRNA及其蛋白表达和p-ERK1/2蛋白表达升高($P < 0.05$),其中神经元凋亡率(49.171 ± 10.914)%、Bax mRNA(2.04 ± 0.23)及其蛋白表达(0.51 ± 0.08)低于模型组,Bcl-2 mRNA(2.58 ± 0.24)及其蛋白表达(0.93 ± 0.34)、p-ERK1/2蛋白表达(1.52 ± 0.09)高于模型组。结论 CIG可能是通过ERK信号通路发挥对急性脑梗死小鼠的神经保护作用。

关键词: 脑梗死; 山茱萸环烯醚萜苷; ERK信号通路; 神经; 凋亡; 小鼠,近交ICR

Neuroprotective effects of cornel iridoid glycoside on acute cerebral infarction in mice through extracellular regulated protein signaling pathway

GE Hai, HE Genxia, ZHU Yingchun, LI Jun

Author Affiliation: Department of Neurology, Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei, Anhui 230041, China

Abstract: **Objective** To study the neuroprotective effect of cornel iridoid glycoside (CIG) on acute cerebral infarction in mice and explore its possible mechanism. **Methods** Eighteen ICR mice were divided into control group, model group and experiment group by