

杨志强, 陈路, 张雅茜, 等. 紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 68-74, 96.

Yang ZQ, Chen L, Zhang YX, et al. Study on the mechanism of shikonin inhibiting osteosarcoma growth by regulating PI3K/AKT pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 68-74, 96.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 01. 009

紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究

杨志强, 陈路, 张雅茜, 夏先学*

(川北医学院附属医院骨科, 四川 南充 637000)

【摘要】 **目的** 研究紫草素 (shikonin, SK) 的抗骨肉瘤作用及其机制。**方法** 不同浓度的 SK 处理人骨肉瘤 U2OS 和 MG63 细胞及人成骨细胞 HFOB1.19 24 h 或用 SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 24、48 和 72 h 后, CCK-8 检测细胞活性; SK 0、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 处理 U2OS 细胞, 克隆形成实验检测细胞增殖; 流式检测细胞凋亡, Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达; U2OS 细胞分为对照组, SK1 $\mu\text{mol/L}$ 组, PI3K 激活剂胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 组和 SK1 $\mu\text{mol/L}$ + IGF-1 组, Western blot 检测磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 和蛋白激酶 B (AKT) 磷酸化、胱天蛋白酶 (caspase-3, cas3)、cleaved cas3、Ki67 及干细胞标记物 SOX-2、OCT-4 和 Nanog 的表达; 细胞成球实验检测细胞成球能力。右侧腹皮下注射 U2OS 细胞构建移植瘤裸鼠模型并进行体内验证。**结果** 不同浓度的 SK 对 HFOB1.19 细胞无明显毒性作用, 而对 U2OS 和 MG63 细胞有显著毒性作用 ($P < 0.05$), 且具有浓度和时间依赖性。紫草素 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 可显著抑制 U2OS 细胞增殖和干细胞样特征, 诱导细胞凋亡 ($P < 0.05$), 并抑制 PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化 ($P < 0.05$)。IGF-1 明显逆转紫草素对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用, 以及对 U2OS 细胞增殖、凋亡, 干细胞样特征的影响 ($P < 0.05$)。体内实验表明, 紫草素能显著抑制肿瘤的生长 ($P < 0.05$), 并下调瘤组织中 p-AKT 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 紫草素对骨肉瘤 U2OS 细胞生长和干细胞样特征的抑制作用可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活有关。

【关键词】 骨肉瘤; 紫草素; 增殖; 细胞凋亡; 干细胞样特征; 磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0068-07

Study on the mechanism of shikonin inhibiting osteosarcoma growth by regulating PI3K/AKT pathway

YANG Zhiqiang, CHEN Lu, ZHANG Yaxi, XIA Xianxue*

(Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the anti-osteosarcoma effect and mechanism of shikonin (SK). **Methods** After various concentrations of SK were applied to human U2OS and MG63 osteosarcoma cells and human osteoblastic cell line HFOB1.19 for 24 h or SK 1 $\mu\text{mol/L}$ for 24, 48 and 72 h, CCK-8 was used to assay cell viability. U2OS cells were treated with SK at 0, 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ and then colony formation assays were employed to assess cell proliferation. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Western blot was performed to determine the expression of apoptosis-related

【基金项目】 南充市科技局 (19SXHZ0120)。

【作者简介】 杨志强 (1985—), 男, 研究方向: 创伤骨科。E-mail: lyzdz2006@163.com

【通信作者】 夏先学 (1980—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 创伤骨科。E-mail: xiaxianxuexxx@163.com

proteins. U2OS cells were divided into control, SK1 $\mu\text{mol/L}$, PI3K activator insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and SK1 $\mu\text{mol/L}$ +IGF-1 groups. Western blot was used to detect phosphorylation levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT), and expression of caspase-3 (cas3), cleaved cas3, Ki67 and stem cell markers SOX-2, OCT-4 and Nanog. Cell spheroid assay was used to detect the ability of cells to form spheres. U2OS cells were injected subcutaneously into the right abdomen to establish a nude mouse model of tumors and verified *in vivo*. **Results** The various concentrations of SK had no obvious toxic effects on HFOB1.19 cells, but had significant toxic effects on U2OS and MG63 cells ($P<0.05$) in concentration- and time-dependent manners. SK at 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited U2OS cell proliferation and stem cell-like characteristics, induced apoptosis ($P<0.05$), and inhibited phosphorylation of PI3K and AKT proteins ($P<0.05$). IGF-1 obviously reversed the inhibitory effect of SK on the PI3K/AKT signaling pathway and its effect on U2OS cell proliferation, apoptosis, and stem cell-like characteristics ($P<0.05$). *In vivo* experiments showed that SK significantly inhibited tumor growth ($P<0.05$) and downregulated expression of p-AKT in tumor tissues ($P<0.05$). **Conclusions** The inhibitory effect of SK on the growth and stem cell-like characteristics of U2OS osteosarcoma cells may be related to inhibition of PI3K/AKT signaling pathway activation.

【Keywords】 osteosarcoma; shikonin; proliferation; apoptosis; stem cell-like characteristics; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT)

骨肉瘤主要发生在儿童和青少年中,是最常见的原发性骨恶性肿瘤类型^[1]。目前,骨肉瘤的治疗方法包括新辅助化疗、外科手术切除、介入疗法以及冷热消融。但是,由于肺转移和对化疗的耐药性,骨肉瘤的 5 年生存率很难达到 80%^[2]。此外,目前批准的药物表现出严重的副作用。因此,需要在 OS 治疗中开发具有更高效率和降低毒性的新型药物。紫草素 (shikonin, SK) 是从中草药紫草中提纯的天然萘醌成分 (化学结构式如图 1 所示),具有广泛的生物学活性,包括抗炎、增强机体免疫力等。研究表明,紫草素对口腔癌、肝细胞癌等均具有抑癌作用^[3-5]。缪明星等^[6]发现 SK 通过内质网应激蛋白抑制人骨肉瘤 U2OS 细胞的增殖。Yang 等^[7]研究发现 SK 通过上调骨肉瘤中的 caspase-3 和 caspase-8 来促进阿霉素诱导的凋亡,Deng 等^[8]研究发现 SK 通过抑制 MMP13 抑制骨肉瘤的浸润。上述研究结果表明 SK 在骨肉瘤中主要是通过抗增殖、侵袭及促凋亡发挥抗癌作用,但 SK 对骨肉瘤干细胞样特征未曾报道。本研究不仅发现 SK 对骨肉瘤生长、侵袭的抑制作用,而且发现 SK 抑制骨肉瘤的干细胞样特征,并进一步证实 SK 通过抑制 PI3K/AKT 途径发挥抗骨肉瘤的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人骨肉瘤细胞株 MG-63、U2OS 和人成骨细胞 HFOB1.19 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。所有细胞在含有 10% FBS, 100 U/mL 的青霉素和

100 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素的 DMEM 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 的潮湿培养箱中培养。

1.1.2 实验动物

14 只 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 (4~5 周龄, 15~18 g) 由川北医学院提供 [SCXK (川) 2018-18]。将裸鼠饲养于川北医学院 SPF 动物房中并在该处完成动物实验 [SYXK (川) 2018-076], 房间温度控制在 23℃~27℃, 湿度维持在 50%~60%, 光照时间 12 h, 并喂以水和标准实验室食物。在实验之前,所有小鼠适应环境 1 周。实验经北川动物伦理委员会审核批准 (IACUC-20200316-03), 所有实验操作遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

紫草素 (>97%, shikonin, SK) (货号: E-0403) 购自上海同田生物技术有限公司; 胎牛血清 (FBS)、链霉素和青霉素购自美国 Gibco 公司; B27 购自美国 Invitrogen; 人表皮生长因子 (EGF) 人成纤维生长因子 (bFGF) 购自美国 Pepro Tech 公司; CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液、ECL 发光液和 BCA 试剂盒购自上海碧云天公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 兔抗 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) (ab182858)、B 细胞淋巴

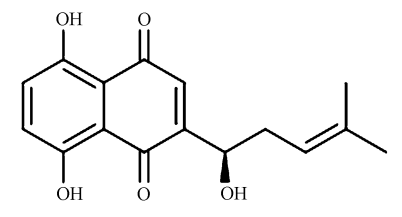


图 1 紫草素结构式
Figure 1 Structure formula of shikonin

瘤 2 相关的 X 蛋白 (Bax) (ab32503)、兔抗磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (p-phosphoinositide 3-kinase, p-PI3K) (ab278545)、兔抗 SOX-2 抗体 (ab92494)、兔抗 OCT-4 抗体 (ab200834)、兔抗 Nanog 抗体 (ab109250)、Ki67 (ab92742) 和 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG 抗体 (ab6721) 购自英国 Abcam 公司; 兔抗 β -肌动蛋白 (β -actin) (#4970); 兔抗胱天蛋白酶-3 (caspase-3, cas3) (#9662)、兔抗活化胱天蛋白酶-3 (cleaved cas3) (#9664)、兔抗蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) (#9272)、兔抗 p-AKT (#4060) 和 PI3K (#4255); 胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) (bs-4588P) 购自北京博奥森生物技术有限公司。iMark 酶标仪及蛋白电泳设备 (美国 Bio-Rad); Accuri C6 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences); BX43 荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司); TanoN5200 凝胶成像仪 (上海天能公司)。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 试验检测细胞活力

将人成骨细胞 HFOB1.19 及人骨肉瘤 U2OS 和 MG63 细胞接种到含有 100 μ L 完全培养基的 96 孔板 (每孔 5×10^3 细胞) 中, 培养 24 h。然后, 用 100 μ L 含有不同浓度 SK 的新鲜培养基处理 24 h 或用含有 SK 1 μ mol/L 的培养基分别处理 24、48 和 72 h 后, 向每个孔中加入 10 μ L CCK-8, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

1.3.2 克隆形成实验检测细胞增殖

将骨肉瘤 U2OS 细胞 (每孔 500 个细胞) 接种到 6 孔板中, 培养过夜。分别用 SK 0、0.01、0.1 和 1 μ mol/L 处理 48 h, 再常规培养 6 d。用 4% 多聚甲醛固定细胞集落, 然后用 0.1% 结晶紫染色, 显微镜下观察。

1.3.3 流式细胞检测细胞凋亡

收集紫草素 SK 0、0.01、0.1 和 1 μ mol/L 处理 24 h 后的 U2OS 细胞, 并用冷 PBS 洗涤 3 次, 然后在暗室中孵育 Annexin V-FITC (5 μ L) 和 PI (5 μ L) 15 min。随后, 使用流式细胞仪分析细胞。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达

使用冷 RIPA 缓冲液裂解细胞, 并在 4 $^{\circ}$ C 离心, 收集上清液。BCA 蛋白质测定试剂盒检测蛋白质浓度。通过 SDS-PAGE 分离等量 (40 μ g) 的总蛋白质, 并转移到 PVDF 膜上, 封闭膜并与相应的一抗 (β -actin 1 : 1000、Bcl-2 1 : 2000、Bax 1 : 1000、cleaved caspase-3 1 : 1000、Ki67 1 : 1000、p-AKT 1 :

2000、AKT 1 : 1000、p-PI3K 1 : 1000、PI3K 1 : 1000、SOX-2 1 : 1000、OCT-4 1 : 10000 和 Nanog 1 : 1000) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 然后与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG (1 : 2000) 在室温下孵育 2 h, 通过 ECL 发光液显影, 使用 Image J 软件进行条带灰度值分析。

1.3.5 细胞成球实验

将 U2OS 细胞以 2000 细胞/孔的密度接种到 6 孔超低附着板中, 在含有 1% B27 补充剂, 10 ng/mL 人 EGF 和 10 ng/mL 人 bFGF 的无血清 DMEM 培养基中培养。1 周后, 观察球体并通过显微镜拍摄照片。

1.3.6 验证 SK 对 U2OS 细胞的作用机制

将 U2OS 细胞分为对照组, SK 1 μ mol/L 组, IGF-1 组和 SK 1 μ mol/L+IGF-1 组, 用 PI3K 途径特异性激活剂 IGF-1 (10 nmol/mL) 将 IGF-1 和 SK 1 μ mol/L+IGF-1 组中的细胞预处理 12 h。然后进行上述实验。

1.3.7 移植瘤实验

将约 3×10^6 U2OS 细胞悬浮在 100 μ L PBS 中, 皮下接种到裸鼠的右侧腹中。注射后 3 d, 将小鼠随机分为对照组, SK 2 mg/kg 组^[9], 每组 7 只, SK 2 mg/kg 组每隔 1 d 腹腔内注射 100 μ L SK (2 mg/kg), 对照组注射等量的生理盐水。每 3 d 测量 1 次肿瘤的长度和宽度, 通过公式 $V = 1/2 \times (\text{宽度}^2 \times \text{长度})$ 计算肿瘤体积。实验结束时, 切除肿瘤并称重。固定肿瘤并包埋在石蜡中, 切成薄片。

1.3.8 免疫组化染色检测 p-AKT 和 Ki67 的表达

将组织切片在二甲苯中脱蜡, 使用梯度乙醇水化, 然后用 3% H_2O_2 处理 15 min。使用沸腾的柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 提取抗原, 10 min 后将组织切片与 10% 山羊血清孵育 15 min, 并与 p-AKT (1 : 100) 和 Ki67 (1 : 500) 的一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将载玻片用 PBS 洗涤 3 次, 使用二抗 (1 : 500) 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育切片 30 min, 并用苏木素复染细胞核。

1.3.9 TUNEL 染色检测瘤组织细胞凋亡

将肿瘤组织切片脱蜡和水合后, 用 PBS 冲洗 2 次, 然后在 37 $^{\circ}$ C 下与 20 μ g/mL 蛋白酶 K 一起孵育 25 min, PBS 洗涤 3 次。按照制造商的说明, 将所有切片与 TUNEL 混合物一起孵育, 显微镜下观察组织切片。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 5 进行数据统计分析。所

有数据均显示为至少 3 次独立实验的平均数±标准差($\bar{x} \pm s$),使用 Student's *t* 检验进行两组之间的比较。 $P<0.05$ 被认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 SK 抑制骨肉瘤细胞增殖

如图 2A、2B 所示,SK 对人成骨细胞 HFOB1.19 无明显细胞毒性,对骨肉瘤细胞 MG63 和 U2OS 均具有明显的细胞毒性作用($P<0.05$),且随着 SK 浓度和处理时间的增加而增强。选择对 SK 更为敏感的 U2OS 细胞系,SK 浓度为 0、0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 继续研究。与 SK 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 明显抑制 U2OS 细胞的克隆形成(图 2C)。

2.2 SK 促进骨肉瘤细胞凋亡

如图 3 所示,与 SK 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 U2OS 细胞凋亡明显增加($P<0.05$),Bax/Bcl-2 和 cleaved cas3/cas3 比值均显著上调($P<0.05$)。SK 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组无显著性差异。

2.3 SK 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路抑制骨肉瘤细胞生长

如图 4 所示,与对照组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 U2OS 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平及 Ki67 表达水平显著降低($P<0.05$),cleaved cas3/cas3 比值显著上调($P<0.05$),IGF-1 组 PI3K 和 AKT 蛋白

磷酸化水平及 Ki67 和 cleaved cas3/cas3 比值无显著差异;与 SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ +IGF-1 组 p-AKT、p-PI3K 和 Ki67 蛋白表达明显上调($P<0.05$),cleaved cas3/cas3 比值显著下调($P<0.05$)。

2.4 SK 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路抑制骨肉瘤细胞的干细胞样特征

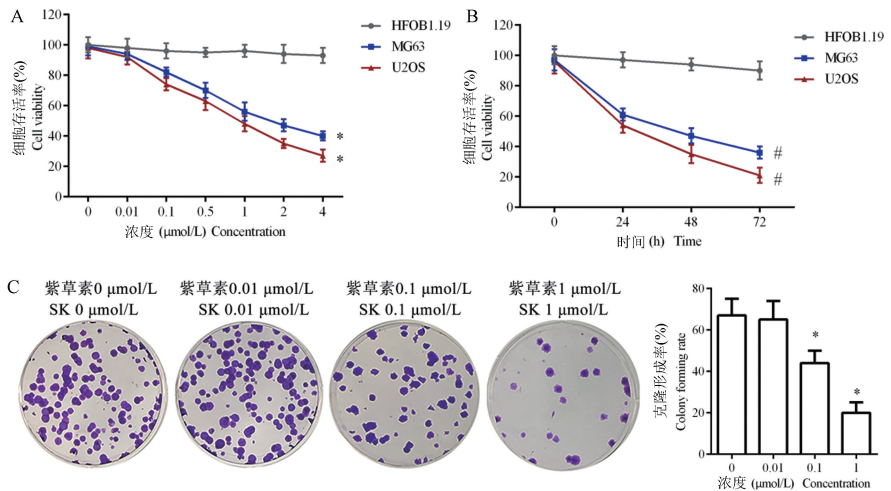
如图 5 所示,与对照组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 U2OS 细胞成球数量减少,成球直径减小($P<0.05$),SOX-2、OCT-4 和 Nanog 蛋白表达显著下调($P<0.05$);与 SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ +IGF-1 组 U2OS 细胞成球数量增多,成球直径增大($P<0.05$),SOX-2、OCT-4 和 Nanog 蛋白表达显著上调($P<0.05$)。

2.5 SK 在体内抑制骨肉瘤肿瘤的生长

如图 6 所示,与对照组比较,SK 2 mg/kg 组肿瘤质量和体积明显减小($P<0.05$),瘤组织中 p-AKT 和 Ki67 的表达显著降低($P<0.05$),凋亡细胞显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

辅助疗法的出现和外科技术的进步,已使骨肉瘤患者的总生存率达到 60%~75%^[2]。由于副作用和耐药性的发展,目前的化学药物受到限制。因此,鉴定副作用较小的有效药物对于骨肉瘤的治疗

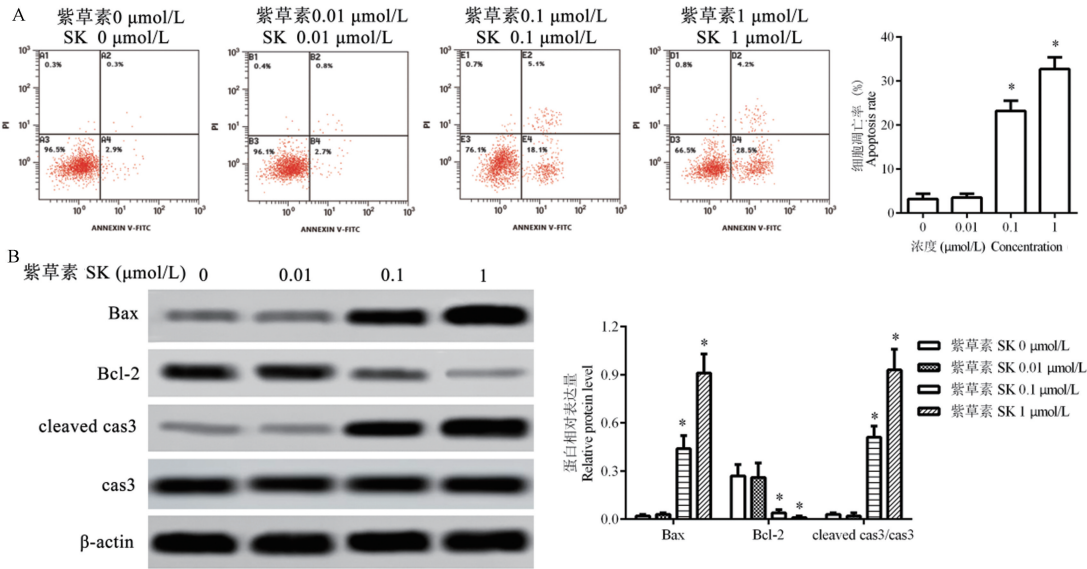


注:A:不同浓度SK对人成骨细胞和骨肉瘤细胞活性的影响;B:不同时间SK对人成骨细胞和骨肉瘤细胞活性的影响;C:各组U2OS细胞克隆形成率。与SK 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,* $P<0.05$;与0 h组相比,# $P<0.05$ 。

图2 SK对骨肉瘤细胞增殖的影响

Note. A, Effect of different concentrations of SK on the viability of human osteoblasts and osteosarcoma cells. B, Effect of SK on the viability of human osteoblasts and osteosarcoma cells at different times. C, Colony forming rate of U2OS cells in each group. Compared with SK 0 $\mu\text{mol/L}$ group, * $P<0.05$. Compared with 0 h group, # $P<0.05$.

Figure 2 Effect of SK on the proliferation of osteosarcoma cells

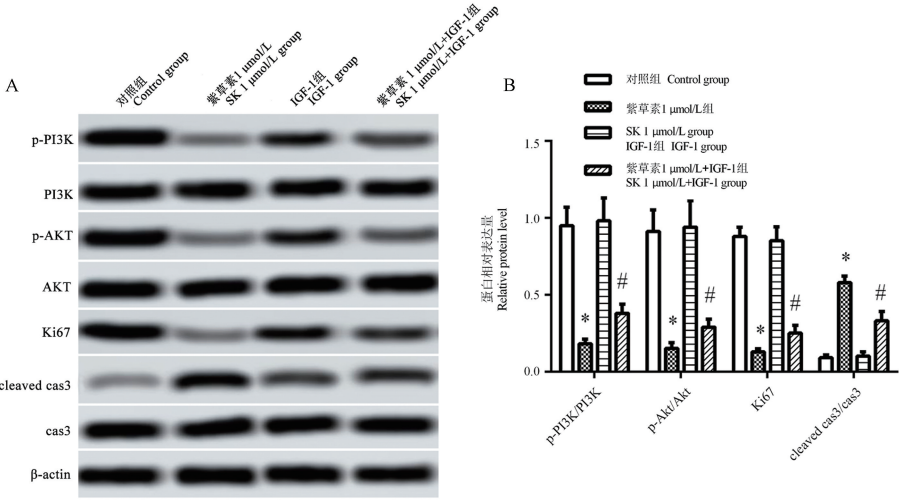


注:A:流式细胞检测各组细胞凋亡率;B:Western blot 检测各组凋亡蛋白的表达。与 SK 0 μmol/L 组相比, * $P<0.05$ 。

图 3 SK 对骨肉瘤细胞凋亡的影响

Note. A, Flow cytometry was commended to detect the apoptosis rate of each group. B, Western blot was used to test the expression of apoptosis protein in each group. Compared with SK 0 μmol/L group, * $P<0.05$.

Figure 3 Effect of SK on apoptosis of osteosarcoma cells



注:A:Western blot 检测各组蛋白表达;B:蛋白相对表达量。与对照组相比, * $P<0.05$;与 SK 1 μmol/L 组相比, # $P<0.05$ 。

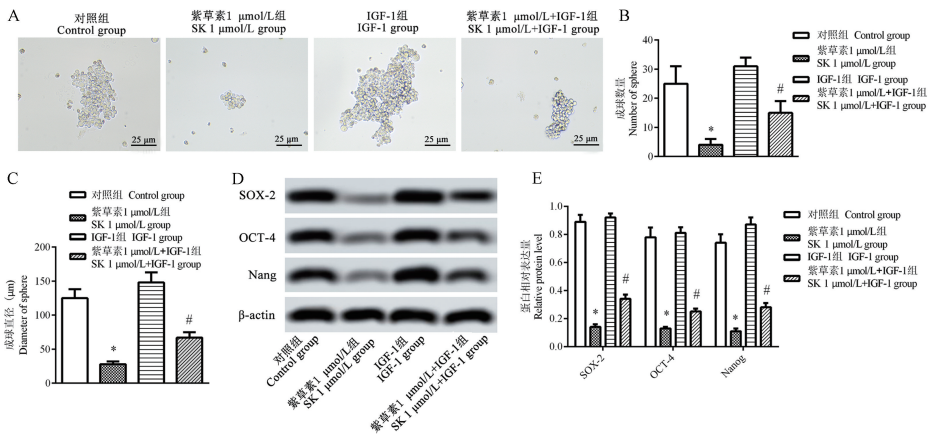
图 4 SK 通过调控 PI3K/AKT 信号通路对骨肉瘤细胞生长的影响

Note. A, Western blot was performed to assay the protein expression in each group. B, Relative protein expression. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the SK 1 μmol/L group, # $P<0.05$.

Figure 4 Effect of SK on the growth of osteosarcoma cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway

至关重要。SK 是中药的主要活性成分之一,研究表明紫草素已被用作化疗增敏剂,以增强传统肝细胞癌化疗药物的抗癌作用,如三氧化二砷、多柔比星和顺铂^[10-11]。已有研究报道 SK 通过抑制骨肉瘤细胞的侵袭和诱导凋亡在骨肉瘤中发挥着抑癌作

用^[7-8]。本研究表明,SK 对人成骨细胞 HFOB1.19 为表现出明显的细胞毒性,对骨肉瘤 U2OS 和 MG63 细胞均表现出显著的细胞毒性,且具有时间和浓度依赖性。本研究结果表明 SK 抑制 U2OS 细胞增殖和骨肉瘤癌症干细胞样特征,诱导细胞凋亡,并进

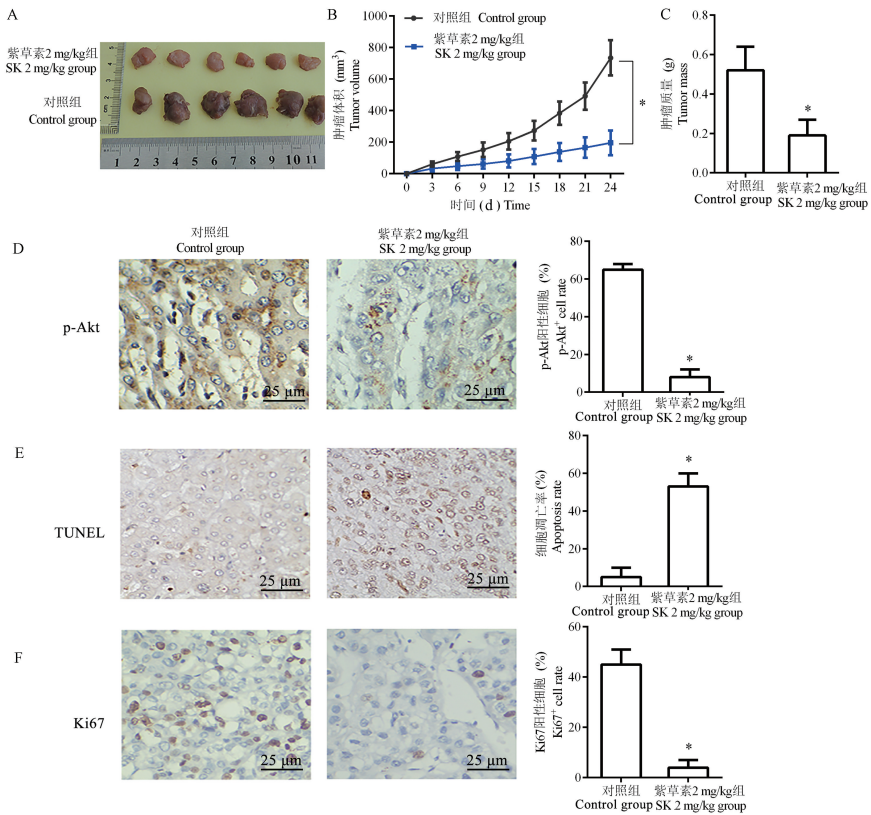


注:A:细胞成球;B:各组成球数量;C:各组成球直径;D:Western blot 检测各组 SOX-2、OCT-4 和 Nanog 蛋白的表达;E:蛋白相对表达量。与对照组相比,* $P<0.05$;与紫草素 1 μmol/L 组相比,# $P<0.05$ 。

图 5 SK 通过调控 PI3K/AKT 信号通路对骨肉瘤细胞干细胞样特征的影响

Note. A, Cell spheroidization. B, Number of spheres of each group. C, Diameter of spheres of each group. D, Western blot was used to detect the expression of SOX-2, OCT-4 and Nanog protein in each group. E, Relative protein expression. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the SK 1 μmol/L group, # $P<0.05$.

Figure 5 Effect of SK on the stem cell-like characteristics of osteosarcoma cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway



注:A:裸鼠移植瘤;B:肿瘤体积;C:肿瘤质量;D:p-AKT 免疫组化染色;E:TUNEL 染色检测瘤组织细胞凋亡;F:Ki67 免疫组化染色。与对照组相比,* $P<0.05$ 。

图 6 SK 在体内对骨肉瘤肿瘤生长的影响

Note. A, Nude mouse transplanted tumor. B, Tumor volume. C, Tumor mass. D, p-AKT immunohistochemical staining. E, TUNEL staining was employed to measure tumor tissue cell apoptosis. F, Ki67 immunohistochemical staining. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 6 Effect of SK on the growth of osteosarcoma tumor *in vivo*

一步探究了 SK 作用的相关分子机制。

Bax 是 Bcl-2 家族的促凋亡成员,它形成的离子通道直接导致线粒体释放细胞色素 c,然后激活 caspase-9 和 caspase-3,从而在末端诱导凋亡^[12]。PI3K/AKT 途径的激活可以促进各种人类癌症的发展,例如卵巢癌、肺癌、黑色素瘤和淋巴瘤^[13-14]。PI3K/AKT 途径通过调节许多下游转录因子在癌症的多个过程中(例如凋亡、增殖和转移)起着至关重要的作用^[15]。我们发现 SK 处理可诱导骨肉瘤 U2OS 细胞明显凋亡,并显著上调 cleaved cas3/cas3 和 Bax/Bcl-2 比值。此外,SK 明显抑制 PI3K/Ak 通路激活及 Ki67 的表达,促进 cleaved cas3 表达,而 PI3K 激活剂 IGF-1 可显著逆转 SK 对 PI3K/AKT 通路及 Ki67 表达的抑制以及 SK 对 cleaved cas3 的上调作用。我们的体内实验结果表明 SK 可明显抑制体内肿瘤的生长,降低瘤组织中 p-AKT 和 Ki67 的表达,诱导细胞凋亡。因此,SK 可能是通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制 U2OS 细胞的生长,与之前的研究一致^[16]。

越来越多的证据表明,骨肉瘤具有癌症干细胞(CSC),这些亚群被认为与化学耐药性,肿瘤转移和复发有关,这应该是开发新药的有希望的目标^[17-18]。有证据表明 PI3K/AKT 信号传导途径可调节干细胞标志物的表达以维持 CSC 特性^[19]。多能干细胞因子,包括 SOX-2、OCT-4 和 Nanog,被确定为诱导多能干细胞形成的核心因子,并在维持正常和癌症干细胞的干性中起关键作用^[20]。这些多能干细胞因子在癌细胞中的过表达被证明参与了肿瘤的发生,转移和癌症复发^[21]。我们的结果表明,SK 明显抑制骨肉瘤干细胞样性状,细胞成球大小和直径显著减小,干细胞标记物 SOX-2、OCT-4 和 Nanog 的表达显著下调,IGF-1 明显逆转 SK 对干细胞样特征的抑制作用。因此,SK 可能是通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤干细胞样特征。

基于体内和体外实验,该研究证明了 SK 在骨肉瘤 U2OS 细胞中发挥着抗癌作用,其潜在机制可能是通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制 U2OS 细胞的生长和干细胞样特征并诱导细胞凋亡,提示 SK 可能是抗人骨肉瘤的有前途的药物。

参考文献:

[1] Lei T, Qian H, Lei P, et al. Ferroptosis-related gene signature associates with immunity and predicts prognosis accurately in patients with osteosarcoma [J]. Cancer Sci, 2021, 112(11):

4785-4798.

- [2] Yao Z, Tan Z, Yang J, et al. Prognostic nomogram for predicting 5-year overall survival in Chinese patients with high-grade osteosarcoma [J]. Sci Rep, 2021, 11(1):17728.
- [3] Guo N, Miao R, Gao X, et al. Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via downregulation of CD147 [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5): 4335-4343.
- [4] 朱丹, 汪立刚, 徐蕾. 紫草素对缺血性脑损伤大鼠脑组织保护作用的研究 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(7): 1-4.
- [5] Liu Y, Kang X, Niu G, et al. Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 626-635.
- [6] 缪明星, 黄莉莉, 王欣. 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 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(10): 2899-2904.
- [7] Yang Q, Li S, Fu Z, et al. Shikonin promotes adriamycin-induced apoptosis by upregulating caspase-3 and caspase-8 in osteosarcoma [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1347-1352.
- [8] Deng B, Qiu B. Shikonin inhibits invasiveness of osteosarcoma through MMP13 suppression [J]. Tumour Biol, 2015, 36(12): 9311-9317.
- [9] Kim HJ, Hwang KE, Park DS, et al. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 123.
- [10] Sha L, Lv Z, Liu Y, et al. Shikonin inhibits the Warburg effect, cell proliferation, invasion and migration by downregulating PFKFB2 expression in lung cancer [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(2): 560.
- [11] Martin SP, Fako V, Dang H, et al. PKM2 inhibition may reverse therapeutic resistance to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 99.
- [12] 陈炜, 陈志刚, 彭君臣, 等. 异鼠李素调控卵巢癌细胞生长、凋亡和氧化应激反应的机制 [J]. 医学分子生物学杂志, 2020, 17(5): 353-358.
- [13] 路晓琳. FSH-PI3K/AKT/NF- κ B 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及作用机制 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(9): 1477-1481.
- [14] 谢圆媛, 胡海峰, 赵莉, 等. 丙泊酚调控 PI3K/AKT 信号通路对肺癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响 [J]. 临床误诊误治, 2021, 34(6): 107-112.
- [15] 赵存玲, 郭凤龙, 谈燕燕, 等. 克唑替尼通过 PI3K/AKT/mTOR 途径抑制肺癌 HCC78 细胞系迁移的研究 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(10): 17-22.
- [16] Wu X, Yu H, Zhou H, et al. Proanthocyanidin B2 inhibits proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells by suppressing the PI3K/AKT pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(20): 11960-11971.