

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.006

· 基础研究 ·

小檗碱和 XAV939 联合应用可抑制骨肉瘤细胞 MG-63 的迁移与凋亡

吴昊越^{1,2}, 康兵^{1,2}, 田志敏², 张浩强², 李旭升² (1. 宁夏医科大学第一临床医学院, 宁夏 银川 750004; 2. 联勤保障部队第九四〇医院 关节外科, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] **目的:** 探讨小檗碱(BBR)联合 XAV939 对骨肉瘤 MG-63 细胞迁移与凋亡的影响及其可能的机制。**方法:** 培养 MG-63 细胞, 分别加入 20~120 $\mu\text{mol/L}$ 的 BBR 和 5~60 $\mu\text{mol/L}$ 的 XAV939, 通过 CCK-8 法测定 BBR 和 XAV939 的细胞毒性, 采用 Chou-Talalay 分析法计算两药的联合指数, 确定后续实验的干预剂量; 将 MG-63 细胞随机分为空白对照(NC)组、BBR 组、XAV939 组和 BBR+XAV939 联合组, 采用划痕愈合实验、Transwell 小室法检测 BBR 与 XAV939 单独或联合处理对 MG-63 细胞迁移能力的影响, Hoechst 33258 染色、JC-1 染色及 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测对细胞线粒体膜电位和凋亡的影响, 免疫荧光法检测 BAX 蛋白的表达, WB 法检测对细胞中 MMP-2 表达的影响, qPCR 法检测对 MMP-2 基因表达的影响。**结果:** BBR 和 XAV939 以剂量依赖方式抑制 MG-63 细胞的增殖, 选定 30 $\mu\text{mol/L}$ BBR、7.5 $\mu\text{mol/L}$ XAV939 用于后续实验。与 NC 组相比, BBR (30 $\mu\text{mol/L}$)、XAV939 (7.5 $\mu\text{mol/L}$) 及 BBR+XAV939 联合处理细胞 24 h 后, MG-63 细胞迁移能力显著降低、凋亡细胞显著增加 (均 $P<0.05$), 线粒体膜电位下降 ($P<0.01$), MMP-2 的基因表达和 MMP-2、BAX 蛋白水平均降低 (均 $P<0.05$), 并且, 联合组的效应明显强于单药处理且 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** BBR 和 XAV939 单独或联合应用可以抑制骨肉瘤 MG-63 细胞的迁移、促进凋亡, 其机制可能与迁移相关蛋白 MMP-2 的表达降低, 凋亡相关蛋白 BAX 的水平增加有关。

[关键词] 小檗碱; XAV939; 骨肉瘤; MG-63 细胞; 迁移; 凋亡

[中图分类号] R738.1; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)05-0469-08

Combined application of berberine and XAV939 inhibits the migration and apoptosis of osteosarcoma cells MG-63

WU Haoyue^{1,2}, KANG Bing^{1,2}, TIAN Zhimin², ZHANG Haoqiang², LI Xusheng² (1. First School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China, 2. Department of Joint Surgery, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of The Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of berberine (BBR) combined with XAV939 on the migration and apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells and its possible mechanisms. **Methods:** MG-63 cells were cultured, and 20~120 $\mu\text{mol/L}$ of BBR and 5~60 $\mu\text{mol/L}$ of XAV939 were added, respectively. The cytotoxicity of BBR and XAV939 was determined by CCK-8 assay, and the combined index of the two was clarified using Chou-Talalay analysis to determine the intervention dose for the subsequent experiments. MG-63 cells were randomly divided into the blank control (NC) group, the BBR group, the XAV939 group, and the BBR+XAV939 combined group. The effects of BBR and XAV939 treatment alone or in combination on the migratory ability of MG-63 cells were detected by the scratch healing assay and the Transwell assay. Hoechst 33258 staining, JC-1 staining and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry were used to detect the effects on cell mitochondrial membrane potential and apoptosis. Immunofluorescence was used to detect the expression of BAX protein, WB assay was used to detect the effects on the expression of MMP-2 and BAX in the cells, and qPCR was used to detect the effects on the expression of the MMP-2 gene. **Results:** BBR and XAV939 inhibited the proliferation of MG-63 cells in a dose-dependent manner, and 30 $\mu\text{mol/L}$ BBR, 7.5 $\mu\text{mol/L}$ XAV939 were selected for subsequent experiments. Compared with the NC group, 24 h after the cells were treated with BBR (30 $\mu\text{mol/L}$), XAV939 (7.5 $\mu\text{mol/L}$) and BBR+XAV939 combination, the migration ability of MG-63 cells was significantly reduced; apoptotic cells were significantly increased (all $P<0.05$); the mitochondrial membrane potential was decreased ($P<0.01$); the gene expression of MMP-2, and MMP-2, BAX protein levels were all reduced (all $P<0.05$). In addition, the effect of the combination group was significantly stronger than that of the monotherapy group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** BBR and XAV939 alone or in combination can inhibit the migration and promote the apoptosis of MG-63 cells. The mechanism may be related to the decreased expression of migration-related protein MMP-2 and

[基金项目] 甘肃省青年科技基金(No.20JR5RA588)

[作者简介] 吴昊越(1997—),男,硕士生,住院医师,主要从事骨肉瘤及关节炎的研究。E-mail: wuhaoyueyisheng@foxmail.com

[通信作者] 李旭升, E-mail: lixush1968@sina.com; 张浩强, E-mail: zhanghaoqiang_fmhu@163.com

increased level of apoptosis-related protein BAX.

[Key words] berberine (BBR); XAV939; osteosarcoma; MG63 cell; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(5): 469-476. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.006]

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤,常发病于长骨干骺端、股骨远端、胫骨近端和肱骨,发病率约0.3/100 000。其主要发生在儿童和青少年,50岁以上者是骨肉瘤发病的第二高峰,肺转移是主要死因^[1]。治疗骨肉瘤的首要方法是截肢,单纯手术治疗的患者生存率为15%~17%,直到20世纪70年代,化疗药品出现并作为术后的主要辅助治疗手段,使患者5年生存率提高了3倍,但转移性患者5年生存率仍仅有10%~30%^[2]。中药和新型分子药物对骨肉瘤发生和转移的影响,可能是一个新的研究方向。小檗碱(berberine, BBR)又名黄连素,长期以来被用作非处方药物治疗肠道感染和腹泻^[3]。随着对其研究的不断深入,一些临床前研究^[4]证明BBR可以抑制结肠癌细胞的增殖。XAV939的化学式为C₁₄H₁₁F₃N₂OS,是一种靶向抑制端锚聚合酶(tankyrase, TNKS)的小分子化合物。TNKS调节Wnt/β-catenin信号通路,该通路的异常激活与包括癌症在内的多种疾病有关^[5]。XAV939通过抑制TNKS干扰Wnt/β-catenin通路,已被用作一种有效的肿瘤治疗策略。有研究发现^[7]XAV939能够抑制乳腺癌^[6]和神经母细胞瘤生长。本研究探索BBR和XAV939单独或联合使用是否对骨肉瘤细胞也有类似的抑制作用,以期BBR和XAV939用于骨肉瘤的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

BBR购自上海源叶生物科技有限公司(货号:B21379,黄色针状晶体,纯度≥98%,使用DMSO溶解配置成所需浓度),XAV939(Wnt通路抑制剂)购自美国targetMol公司(货号:T1878,粉末状,纯度≥99%,使用DMSO溶解配置成所需浓度,并置于-80℃保存),将细胞实验分为实验组(BBR组、XAV939组和BBR+XAV939联合组)与空白对照(NC)组,使用完全培养基梯度稀释溶于DMSO的BBR和XAV939母液,使最终干预处理时DMSO浓度为0.05%。胎牛血清、DMEM培养基、0.25%胰酶均购自美国Gibco公司,CCK-8检测试剂盒、BCA蛋白测定试剂盒购自北京索莱宝生物公司,Transwell®可穿透性细胞培养小室购自美国Corning公司,快速封闭液购自北京索莱宝公司,JC-1线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, ΔΨm)测定试剂盒购自上海懋康生物,Hoechst 33258、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天公司,RNAiso PLUS购自TaKaRa公司,抗GAPDH、MMP-2、BAX一抗及

HRP-山羊抗小鼠二抗、Alexa Fluor® 488山羊抗兔二抗、RIPA裂解液、50×Cocktail蛋白酶抑制剂、PMSF(100 mmol/L)、磷酸化蛋白酶抑制剂、5×蛋白还原型上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、1×PBS、Water Nuclease-Free、SweScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Remover)、2×SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX)、PCR引物均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 细胞培养与分组

人骨肉瘤细胞MG-63购自上海富衡生物科技有限公司。将细胞置于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM高糖培养基中,于5% CO₂、37℃的培养箱内培养。

1.3 CCK-8法检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞增殖的影响

将生长至80%~90%汇合的MG-63细胞用0.25%的胰酶消化,按5×10³个/孔/100 μL接种在96孔板中,分别加入20、40、60、80、120 μmol/L的BBR和5、10、20、40、60 μmol/L的XAV939培养24 h。为了确定BBR和XAV939联合用药对骨肉瘤细胞的影响,选取低浓度(30、40、50 μmol/L)的BBR分别与2.5、5.0、7.5 μmol/L的XAV939混合处理MG-63细胞,培养24 h。各组处理24 h后,每孔加入10 μL CCK-8溶液反应1 h,使用酶标仪检测450 nm处的光密度(D)值,计算细胞增殖率。细胞增殖率=[(D_{实验孔}-D_{空白孔})/(D_{对照孔}-D_{空白孔})]×100%。根据实验结果,选取30 μmol/L BBR和7.5 μmol/L XAV939用于后续实验。后续实验均将MG-63细胞随机分为空白对照(NC)组、BBR组、XAV939组和BBR+XAV939联合组,其中NC组加入含0.05% DMSO的培养基处理细胞。

1.4 划痕愈合实验检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞迁移的影响

将各组对数生长期的MG-63细胞消化为单细胞悬液,以6×10⁴个/孔接种于6孔板,待细胞生长至100%覆盖孔底时用10 μL移液器吸头垂直于孔板划线,洗去脱落的细胞,于显微镜下观察、拍照,记录划痕宽度。按分组加入干预试剂,培养24 h后将6孔板置于显微镜下观察、拍照,测量,使用Image J软件分析划痕宽度,计算划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

1.5 Transwell实验检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞迁移的影响

各组细胞加药处理24 h,常规消化后用无血清培

培养基重悬,并将细胞密度调整至 1×10^5 个/mL。取100 μ L细胞悬液加入Transwell小室上室中,下室加入500 μ L含胎牛血清的培养基,每组设置5个平行孔。常规培养24 h后,取出小室,用棉签擦去微孔膜上室侧的细胞,洗膜后经4%多聚甲醛固定、0.25%结晶紫溶液染色,显微镜下观察细胞、拍照,采用Image J软件进行分析计数。

1.6 免疫荧光法检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞中BAX蛋白表达的影响

取对数生长期的MG-63细胞,按 2×10^4 个/孔接种于载玻片上,置于的完全培养基中培养24 h,随后分别用BBR (30 μ mol/L)、XAV939 (7.5 μ mol/L)、BBR和XAV939联合处理细胞24 h,PBS洗涤后固定。使用0.1% Triton X-100 透化细胞10 min,加入快速封闭液封闭15 min,加入一抗BAX (1:500)抗体,4 $^{\circ}$ C处理过夜,洗膜后加入用Dy-light488标记的二抗(1:1 000)避光处理2 h,洗膜,用Hoechst 33258染色,封片后于显微镜下观察。

1.7 JC-1 染色法检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞 $\Delta\Psi_m$ 的影响

将 1×10^5 个/mL的细胞悬液接种于6孔板中,培养过夜,待细胞贴壁后按分组加干预试剂处理24 h,PBS洗涤细胞后加入1 mL JC-1 工作液,37 $^{\circ}$ C处理20 min,随后用4 $^{\circ}$ C的JC-1 缓冲液洗涤两次,置于显微镜下观察。

将细胞按分组处理24 h,胰酶消化后离心重悬,加入JC-1 工作液,37 $^{\circ}$ C处理20 min,用4 $^{\circ}$ C JC-1 缓冲液洗涤、离心、重悬细胞,荧光分光光度计检测JC-1 单体与聚合物的荧光强度。JC-1 单体激发光波长490 nm、发射光波长530 nm,JC-1 聚合物激发光波长525 nm、发射光波长590 nm。

1.8 流式细胞术检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞凋亡的影响

取对数生长期的MG-63细胞,按 1×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养过夜,按分组加干预试剂处理24 h,消化、收集细胞,用预冷的PBS洗涤2次,随后进行Annexin V -FITC和PI染色,流式细胞仪分析存活细胞(FITC⁻/PI⁻)、早期凋亡细胞(FITC⁺/PI⁻)、晚期凋亡细胞(FITC⁺/PI⁺)和坏死细胞(FITC⁻/PI⁺)的占比。将早期和晚期凋亡细胞均记录为凋亡细胞。

1.9 WB法检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞中MMP-2、BAX蛋白表达的影响

将各组经干预试剂处理27 h后的细胞用PBS冲洗,加入RIPA裂解液,冰上裂解30 min,提取细胞总蛋白,经5%SDS-PAGE分离蛋白,使用300 mA恒定电流、30 min将凝胶中分离的蛋白质转移到PVDF (0.45 μ m)膜上。将转印好的膜用5%脱脂牛奶封闭

后,加入稀释的一抗GAPDH、MMP-2、BAX抗体,4 $^{\circ}$ C下于摇床上过夜处理,用TBS-Tween快速洗膜3次,去除未结合的一抗,将二抗用TBS-Tween按照1:5 000稀释,室温下轻轻振荡处理1 h,洗去二抗后加入化学发光液,用Image J软件进行灰度值分析。

1.10 qPCR法检测BBR与XAV939单独或联用对MG-63细胞中MMP2 mRNA表达的影响

收集分组处理24 h后的MG-63细胞,加入1.5 mL RNAiso PLUS提取总RNA,用Biowave II紫外可见分光光度计检测、定量RNA。使用SweScript All-in-One First-Strand cDNA 试剂盒逆转录合成cDNA,随后配置PCR反应体系,使用95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 30 s循环40次的反应条件,在7300 Real-time PCR system上完成扩增。以GAPDH为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的表达式。引物序列:MMP2正向引物为TGTTGGTGGGAAGCTCAGAAGGT,反向引物为GACGGAAGTTCTTGGTGTAGGTGT;GAPDH正向引物为GGAAGCTTGTCATCAATGGAAATC,反向引物为TGATGACCCTTTTGGCTCCC。

1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用SPSS 26.0软件对数据进行统计处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据间的差异比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组数据间的差异比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 单用BBR或XAV939对MG-63细胞活力的影响

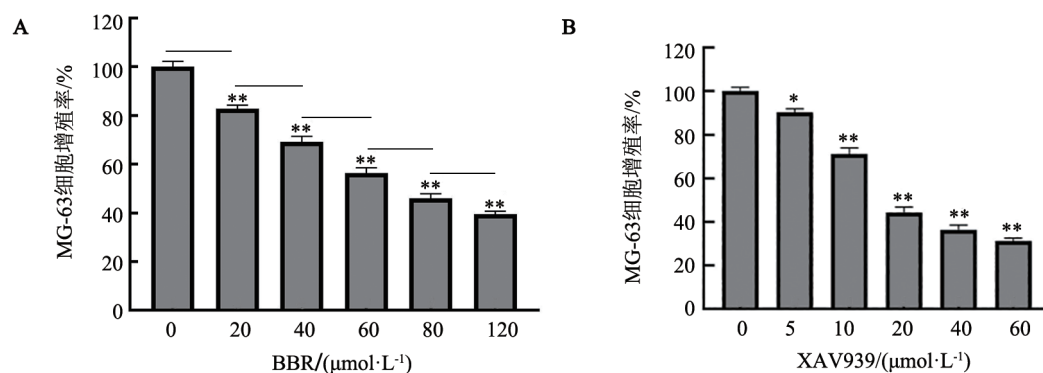
CCK-8法检测结果(图1)显示,使用不同浓度的BBR和XAV939处理MG-63细胞24 h后,细胞存活率随药物浓度的升高而下降,且所有浓度的BBR和XAV939处理组的细胞存活率均显著低于0 μ mol/L组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);BBR杀伤MG-63细胞的 IC_{50} 为72.77 μ mol/L,XAV939的 IC_{50} 为17.17 μ mol/L。

2.2 BBR和XAV939联用对MG63细胞活力的影响

选取30、40、50 μ mol/L的BBR和2.5、5、7.5 μ mol/L XAV939联合处理MG-63细胞24 h,CCK-8法检测结果(图2)显示,与单独使用BBR相比,BBR和XAV939联合处理对MG-63细胞的细胞毒性更高。采用Chou-Talalay法^[8]分析MG-63细胞BBR和XAV939的联合指数(combination index, CI),CI值小于1说明有协同作用。表1总结了两种药物在低浓度下、不同组合的CI值,可见低浓度BBR和XAV939即可协同抑制MG-63细胞的增殖。同时,30 μ mol/L BBR和7.5 μ mol/L XAV939对MG-63细胞的活性抑

制率约为 50% 且 $CI < 1$, 说明两者单独使用时毒性较低, 联合使用时具有显著的协同效应, 因此在接下来

的研究中采用此剂量处理细胞。



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 BBR(A)和 XAV939(B)能显著抑制 MG-63 细胞增殖

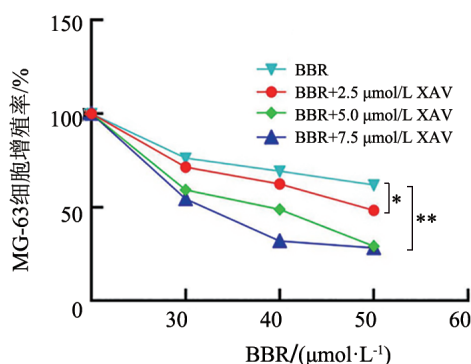


图 2 BBR(30、40 或 50 $\mu\text{mol/L}$)与 XAV939(2.5、5 或 7.5 $\mu\text{mol/L}$)联合处理 24 h 对 MG-63 细胞增殖的影响

表 1 BBR 和 XAV939 联合作用于 MG-63 细胞的协同作用

编号	BBR/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	XAV/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞增殖/%	CI
1	30	2.5	71.5	0.571
2	30	5.0	62.4	0.640
3	30	7.5	48.3	0.699
4	40	2.5	59.2	0.654
5	40	5	48.8	0.719
6	40	7.5	29.3	0.778
7	50	2.5	54.4	0.774
8	50	5	32.0	0.839
9	50	7.5	28.1	0.899

2.3 BBR 和 XAV939 单独或联用均能抑制 MG-63 细胞的迁移能力

划痕愈合实验结果(图 3A)和 Transwell 实验结果(图 3B)显示,与 NC 组相比, XAV939 和 BBR 单用或连用均可显著抑制 MG-63 细胞的迁移($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); BBR+XAV939 联合组对 MG-63 细胞迁移

的抑制作用显著强于 BBR 组和 XAV939 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 BBR 和 XAV939 单独及联用均能抑制 MG-63 细胞 MMP-2 基因及蛋白的表达

WB 法检测结果(图 4A)与 qPCR 检测结果(图 4B)显示,与 NC 组相比, BBR 组、XAV939 组和 BBR+XAV939 联合组 MG-63 细胞中 MMP-2 的蛋白、mRNA 水平均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并且 BBR+XAV939 联合组抑制作用强于 BBR 组和 XAV939 组(均 $P < 0.01$)。

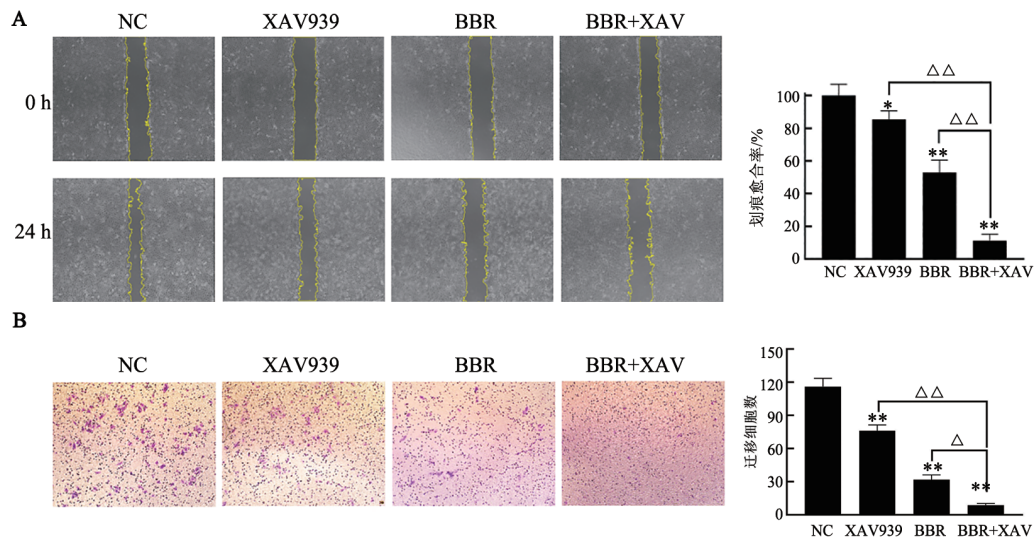
2.5 BBR 和 XAV939 单独或联合使用均可促进 MG-63 细胞凋亡

Hoechst 染色结果(图 5)显示,与 NC 组相比, BR 组、XAV939 组和 BBR+XAV939 联合组 MG-63 细胞蓝色荧光更为明亮,细胞核分裂或固缩,具有明显的凋亡特征。JC-1 染料会在 $\Delta\Psi_m$ 较高的健康细胞线粒体中形成聚集体,发出红色荧光;在 $\Delta\Psi_m$ 降低的细胞中, JC-1 保持单体形式,发出绿色荧光。JC-1 染色结果(图 6)显示,与 NC 组相比, BBR 组和 XAV939 组的红色荧光显著下降,提示 $\Delta\Psi_m$ 下降($P < 0.01$), BBR+XAV939 联合组的 $\Delta\Psi_m$ 下降最明显($P < 0.01$)。流式细胞术检测结果(图 7)所示,与 NC 组相比, BR 组、XAV939 组和 BBR+XAV939 联合组细胞凋亡率均显著升高(均 $P < 0.01$),且 BBR+XAV939 联合组凋亡率显著高于 BR 组和 XAV939 组(均 $P < 0.01$)。

2.6 BBR 和 XAV939 单独及联用均促进 MG-63 细胞中 BAX 蛋白的表达

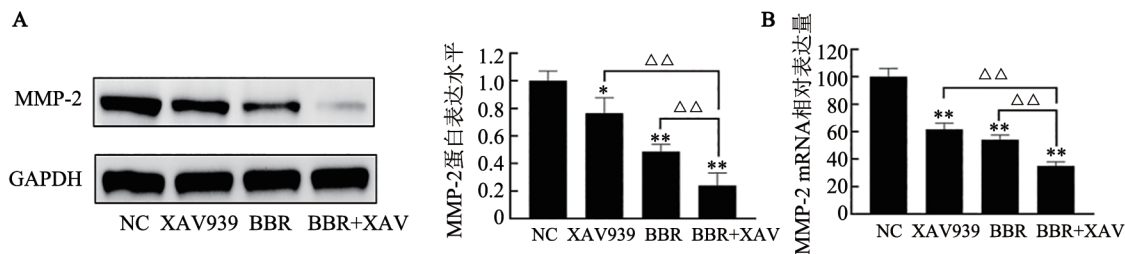
免疫荧光标记的 BAX 蛋白呈绿色,通过 ImageJ 软件分析荧光强度(图 8A)、WB 法检测 BAX 表达(图 8B),结果显示, BR 组、XAV939 组

和 BBR+XAV939 联合组中 BAX 蛋白水平均高于 NC 组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且 BBR+XAV939 联合组 BAX 蛋白水平显著高于 BR 组和 XAV939 组 (均 $P<0.01$)。



A: 划痕愈合实验检测 MG-63 细胞的迁移能力 ($\times 40$); B: Transwell 实验检测 MG-63 细胞的迁移能力 (结晶紫染色, $\times 100$)。与 NC 组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图3 BBR 和 XAV939 单用或联用均能抑制 MG-63 细胞的迁移



与 NC 组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。 $\Delta\Delta P<0.01$ 。
A: WB 法检测 MG-63 细胞中 MMP-2 蛋白的相对表达量; B: qPCR 法检测 MMP-2 mRNA 的相对表达量。

图4 BBR 和 XAV939 单用或联用对 MG-63 细胞中 MMP 蛋白和 mRNA 表达的影响

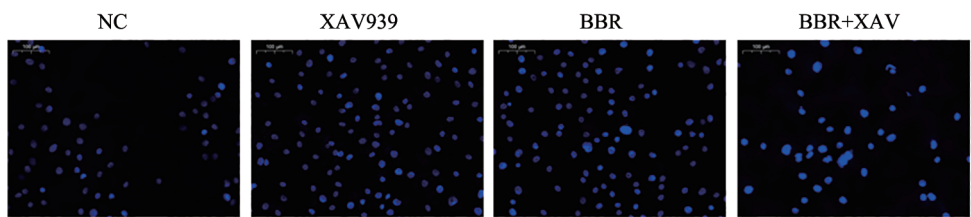
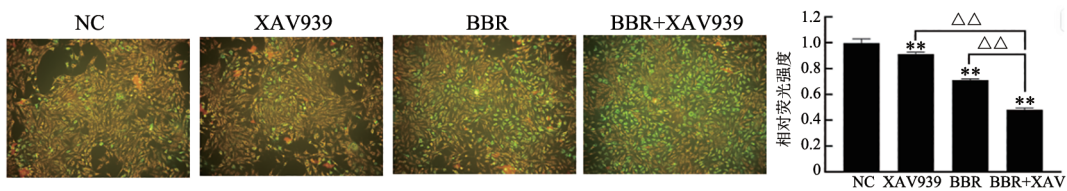


图5 BBR 和 XAV939 单独或联合处理 MG-63 细胞后细胞核形态的改变 (Hoechst 染色, $\times 100$)



与 NC 组相比, $**P<0.01$ 。 $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图6 BBR 和 XAV939 单独或联用均导致 MG-63 细胞 $\Delta\Psi_m$ 降低 ($\times 100$)

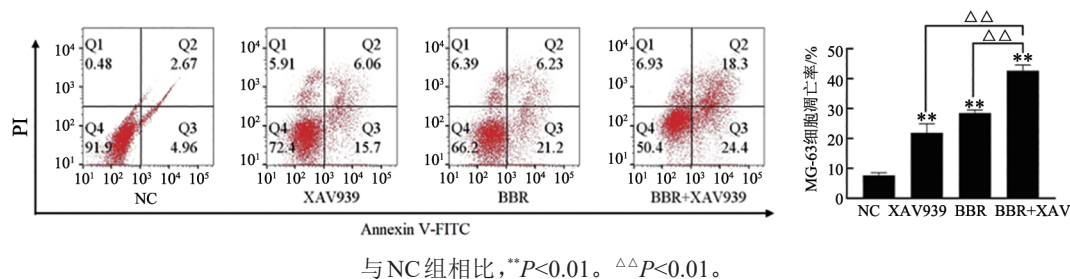
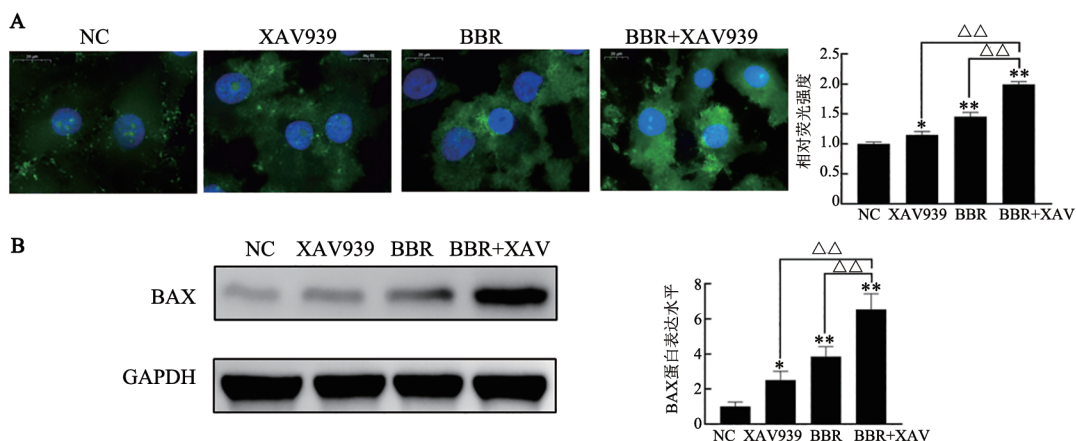


图7 BBR和XAV939单独或联用均促进MG-63细胞凋亡



A: 免疫荧光染色检测BAX蛋白在MG-63细胞中的表达, 绿色荧光为Dy-light488标记的BAX蛋白, 蓝色荧光为细胞核Hoechst染色($\times 600$); B: WB法检测BAX蛋白在MG-63细胞中的表达。与NC组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。△△ $P < 0.01$ 。

图8 BBR和XAV939单独及联用均促进MG-63细胞中BAX蛋白表达

3 讨论

骨肉瘤的恶性程度极高, 约30%的无转移骨肉瘤患者、约80%存在转移的患者会复发。被诊断为转移性或复发性骨肉瘤的患者, 使用手术、多药大剂量化疗(大剂量氨甲蝶呤、顺铂、多柔比星联合治疗)和干细胞移植治疗后, 仍只有不到30%的患者能获得长期生存^[9-10]。此外, 由于骨肉瘤的发病年龄小, 联合治疗的副作用如截肢、周围神经病变、心肺肝肾功能损伤, 会对患儿的生长造成不可逆的危害。因此, 对于局部和转移性高危骨肉瘤, 迫切需要更有效、不良反应更低的抗癌药物^[11-12]。近十年的临床前研究已证明, 传统中药的活性成分BBR具有抗癌活性, 且可提高化疗疗效^[13-14]。有研究结果^[15]显示, BBR能明显增强氨甲蝶呤对Caco-2、HepG2和Mcf-7等人类肿瘤细胞的细胞毒性, 减轻氨甲蝶呤诱导的肾脏损伤。另一项研究结果^[16]证明, BBR可通过抑制细胞蛋白质合成、阻断细胞周期、促进细胞凋亡等方式抑制肝癌和白血病细胞等恶性细胞的活性。2022年, 一项研究^[17]发现, BBR可以调节IL-6/JAK2/STAT3相关信号通路抑制胃癌MKN-45和HGC-27细胞的增殖, 同时抑制MKN-45异种移植小鼠的肿瘤生长。然而, 关于BBR在骨肉瘤发生发展中的作用的报道很少。因

此, 本研究重点探讨BBR联合XAV939对骨肉瘤MG-63细胞增殖、迁移和凋亡的影响, 探索BBR是否能作为治疗骨肉瘤的潜在药物, 为骨肉瘤的临床治疗提供实验依据。

细胞周期依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)是细胞周期调控的关键酶, 其发挥作用需细胞周期蛋白(cyclin)提供酶活性所必需的结构域。多种原因导致的CDK抑制因子缺失、CDK或cyclin过表达, 可导致细胞周期紊乱及增殖失控。因此, 靶向细胞周期蛋白可能是阻止肿瘤生长的有效方法^[18]。在一项对甲状腺癌的研究中, BBR通过下调cyclin D1、cyclin D2和CDK2、诱导细胞周期阻滞在G0/G1期^[19]。此外, BBR可增加细胞周期抑制剂p53和p21的蛋白表达, 从而阻滞肺腺癌细胞周期^[20], 抑制细胞增殖。本研究发现, 单独使用BBR或XAV939均对MG-63细胞具有剂量依赖性抑制作用, 随后采用Chou-Talalay分析法证明亚毒性浓度的BBR(30 $\mu\text{mol/L}$)和XAV939(7.5 $\mu\text{mol/L}$)联合方案对MG-63细胞具有显著的协同抗癌作用, 进一步研究证明联合用药比起单独应用同剂量的药物细胞毒性更强。这些结果表明, 当BBR和XAV939联合使用时, 可能作为一种新型化疗方案来提高对MG-63细胞的抗癌效果。

肿瘤细胞迁移是肿瘤进展和转移的基本过程,在这一过程中肿瘤细胞会发生 EMT, 获得间质特性,从而脱离原发肿瘤,侵入周围组织^[21]。MMP 是一种蛋白水解酶家族,在肿瘤细胞迁移中降解细胞外基质,为肿瘤细胞在组织中迁移开辟通道。有研究^[22]证明,BBR 能够抑制 VEGF 表达从而抑制乳腺癌细胞的转移。MMP-2 和 MMP-9 是降解上皮细胞基底膜的关键,他们促进血管生成、激活细胞黏附分子和趋化因子、裂解并激活整合素,使得癌细胞侵入附近的血管和淋巴管,最终造成远处转移^[23]。通过对人胃腺癌 RF-1 和 RF-48 细胞、SCC-4 人舌鳞状细胞癌细胞和三阴性乳腺癌细胞的研究^[24]发现,BBR 处理可降低其中 MMP-2 和 MMP-9 的水平,从而抑制这些肿瘤细胞的侵袭。本研究发现,经过 BBR 和 XAV939 单独或联合处理后,MG-63 细胞的迁移能力被明显抑制,且加药组细胞 MMP-2 基因和蛋白表达显著性降低,可见,单独使用 BBR、XVA939、或 BBR 和 XAV939 联合应用均可降低 MG-63 细胞的迁移能力。

细胞凋亡是一种复杂的程序性死亡过程,在骨肉瘤细胞恶性化过程中,凋亡率降低有着至关重要的作用^[25]。细胞凋亡可通过内在或外在途径发生,内在途径也称为线粒体途径,由 DNA 损伤、氧化应激、癌基因活化等方式抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2,增加促凋亡蛋白 BAX 的表达^[26],BAX 蛋白会发生构象变化并转运到线粒体外膜并形成孔隙,使线粒体外膜通透性增加,继而将细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中,与凋亡蛋白酶活化因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 结合并形成凋亡体,激活 caspase3 与 caspase9,裂解各种细胞底物,导致细胞凋亡^[27]。在人早幼粒白血病 HL-60 细胞中,BBR 诱导染色质凝聚和 DNA 片段化,并通过激活 caspase-3 和 caspase-8 诱导凋亡细胞死亡^[28]。除此之外,BBR 可能以 Fas-Fadd 依赖的方式促进活性氧(ROS)的生成、或上调 FoxO 的转录活性,激活 caspase-8 和 caspase-9 诱导细胞凋亡^[29-30]。本研究发现,单独使用 BBR、XVA939 或 BBR 和 XAV939 联合应用均会增加 MG-63 细胞凋亡率,促进 BAX 蛋白的表达。

综上所述,BBR、XAV939 单独或联合应用可以下调 MMP-2 蛋白、上调 BAX 蛋白水平,从而抑制 MG-63 细胞迁移、促进细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。本研究结果为 BBR 和 XAV939 应用于骨肉瘤的防治研究提供了实验基础。

【参 考 文 献】

[1] CHEN H F, GONG Z J, ZHOU H, *et al.* Deciphering chemoresistance in osteosarcoma: Unveiling regulatory mechanisms and function

through the lens of noncoding RNA[J/OL]. *Drug Dev Res*, 2024, 85(2): e22167 [2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38444106/>. DOI: 10.1002/ddr.22167.

- [2] CHENG M, JIANG Y, WANG Y, *et al.* Enhancing osteosarcoma therapy through aluminium hydroxide nanosheets-enabled macrophage modulation[J/OL]. *Int J Pharm*, 2024, 649: 123640 [2023-11-10]. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123640>. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123640.
- [3] WANG Y, LI Z R, ZHANG H L, *et al.* Berberine-based self-assembly agents with enhanced synergistic antitumor efficacy[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1333087 [2023-11-10]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1333087>. DOI: 10.3389/fphar.2024.1333087.
- [4] DAVOODVANDI A, SADEGHI S, ALAVI S M A, *et al.* The therapeutic effects of berberine for gastrointestinal cancers[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2024, 20(2): 152-167. DOI: 10.1111/ajco.13941.
- [5] 刘婉琴, 黎萍, 姚凯. Tankyrase 结构和功能的研究进展[J]. *生命科学*, 2021, 33(9): 1071-1081. DOI: 10.13376/j.cbls/20210118.
- [6] SHETTI D, ZHANG B, FAN C H, *et al.* Low dose of paclitaxel combined with XAV939 attenuates metastasis, angiogenesis and growth in breast cancer by suppressing Wnt signaling[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(8): 892[2023-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721645/>. DOI: 10.3390/cells8080892.
- [7] TIAN X H, HOU W J, BAI S L, *et al.* XAV939 promotes apoptosis in a neuroblastoma cell line via telomere shortening[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 1999-2006. DOI: 10.3892/or.2014.3460.
- [8] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
- [9] 郭卫, 牛晓辉, 肖建如, 等. 骨肉瘤临床循证诊疗指南[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2018, 11(4): 288-301.
- [10] PARK J A, CHEUNG N K V. Promise and challenges of T cell immunotherapy for osteosarcoma[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12520[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37569894/>. DOI: 10.3390/ijms241512520.
- [11] VAN DALEN E C, VAN AS J W, DE CAMARGO B. Methotrexate for high-grade osteosarcoma in children and young adults[J/OL]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011, 2011(5): CD006325[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21563152/>. DOI: 10.1002/14651858.CD006325.pub3.
- [12] OUN R, MOUSSA Y E, WHEATE N J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists[J]. *Dalton Trans*, 2018, 47(19): 6645-6653. DOI: 10.1039/c8dt00838h.
- [13] ANWAR S, AHMAD MALIK J, AHMED S, *et al.* Can natural products targeting EMT serve as the future anticancer therapeutics? [J/OL]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7668[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36431766/>. DOI: 10.3390/molecules27227668.
- [14] WANG S M, LONG S Q, DENG Z Y, *et al.* Positive role of Chinese herbal medicine in cancer immune regulation[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(7): 1577-1592. DOI: 10.1142/S0192415X20500780.
- [15] HASSANEIN E H M, SHALKAMI A G S, KHALAF M M, *et al.* The impact of Keap1/Nrf2, P38MAPK/NF- κ B and Bax/Bcl2/caspase-3 signaling pathways in the protective effects of berberine against methotrexate-induced nephrotoxicity[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 47-56. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.088.
- [16] ORTIZ L M G, LOMBARDI P, TILLHON M, *et al.* Berberine, an

- Epiphany against cancer[J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12349-12367. DOI: 10.3390/molecules190812349.
- [17] XU M M, REN L, FAN J H, *et al.* Berberine inhibits gastric cancer development and progression by regulating the JAK2/STAT3 pathway and downregulating IL-6[J/OL]. *Life Sci*, 2022, 290: 120266[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34968467/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120266.
- [18] ASGHAR A, CHOCHAN T A, KHURSHID U, *et al.* A systematic review on understanding the mechanistic pathways and clinical aspects of natural CDK inhibitors on cancer progression.: Unlocking cellular and biochemical mechanisms[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2024, 393: 110940[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38467339/>. DOI: 10.1016/j.cbi.2024.110940.
- [19] LI L, WANG X C, SHARVAN R, *et al.* Berberine could inhibit thyroid carcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis, G0/G1 cell cycle arrest and suppressing migration *via* PI3K-AKT and MAPK signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 1225-1231. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.010.
- [20] ZHENG F, TANG Q, WU J J, *et al.* p38 α MAPK-mediated induction and interaction of FOXO3a and p53 contribute to the inhibited-growth and induced-apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by berberine[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1): 36[2023-11-10]. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-33-36>. DOI: 10.1186/1756-9966-33-36.
- [21] ZHANG G A, HOU S, LI S Y, *et al.* Role of STAT3 in cancer cell epithelial-mesenchymal transition (Review) [J/OL]. *Int J Oncol*, 2024, 64(5): 48[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38488027/>. DOI: 10.3892/ijo.2024.5636.
- [22] KIM S, OH S J, LEE J, *et al.* Berberine suppresses TPA-induced fibronectin expression through the inhibition of VEGF secretion in breast cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(5): 1541-1550. DOI: 10.1159/000356591.
- [23] LI K L, LI D D, HAFEZ B, *et al.* Identifying and validating MMP family members (MMP2, MMP9, MMP12, and MMP16) as therapeutic targets and biomarkers in kidney renal clear cell carcinoma (KIRC)[J]. *Oncol Res*, 2024, 32(4): 737-752. DOI: 10.32604/or.2023.042925.
- [24] SONG D Y, HAO J Y, FAN D M. Biological properties and clinical applications of berberine[J]. *Front Med*, 2020, 14(5): 564-582. DOI: 10.1007/s11684-019-0724-6.
- [25] 李梅, 张余. 细胞凋亡与骨肉瘤[J]. *中国骨科临床与基础研究杂志*, 2011, 3(4): 299-303. DOI: 10.3969/j.issn.1674-666X.2011.04.012.
- [26] SUN H, LIAO F H, TIAN Y C, *et al.* Molecular-scale investigations reveal the effect of natural polyphenols on BAX/bcl-2 interactions [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2474[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38473728/>. DOI: 10.3390/ijms25052474.
- [27] FLORES-ROMERO H, ROS U, GARCIA-SAEZ A J. Pore formation in regulated cell death[J/OL]. *EMBO J*, 2020, 39(23): e105753[2023-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33124082/>. DOI: 10.15252/emboj.2020105753.
- [28] OKUBO S, UTO T, GOTO A, *et al.* Berberine induces apoptotic cell death *via* activation of caspase-3 and -8 in HL-60 human leukemia cells: nuclear localization and structure-activity relationships[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(7): 1497-1511. DOI: 10.1142/s0192415x17500811.
- [29] HSU W H, HSIEH Y S, KUO H C, *et al.* Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL[J]. *Arch Toxicol*, 2007, 81(10): 719-728. DOI: 10.1007/s00204-006-0169-y.
- [30] SHUKLA S, RIZVI F, RAISUDDIN S, *et al.* FoxO proteins' nuclear retention and BH3-only protein Bim induction evoke mitochondrial dysfunction-mediated apoptosis in berberine-treated HepG2 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 76: 185-199. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.039.

[收稿日期] 2023-11-15

[修回日期] 2024-04-05

[本文编辑] 黄静怡