

论著·临床研究

雷公藤内酯醇对脂多糖刺激的人成骨肉瘤细胞 MG-63 血管生成和炎症反应的抑制作用*

林森雄¹, 彭明¹, 杜国友¹, 陈燕², 林惠玲³

(中山市中医院:1. 输血与检验科;2. 外三科;3. 急诊科, 广东中山 528400)

摘要:目的 探索雷公藤内酯醇(TPL)对脂多糖(LPS)刺激的人成骨肉瘤细胞 MG-63 血管生成和炎症细胞因子释放的抑制作用和机制。方法 采用 LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激人成骨肉瘤细胞 MG-63 建立骨肉瘤疾病炎症模型,采用四甲基偶氮唑蓝比色法检测 TPL 对人成骨肉瘤细胞 MG-63 的细胞毒性,实时定量聚合酶链反应检测 TPL 对 LPS 刺激的人成骨肉瘤细胞 MG-63 血管生成和炎症细胞因子表达的抑制作用,酶联免疫吸附试验检测 TPL 对 LPS 刺激的人成骨肉瘤细胞 MG-63 血管生成和炎症细胞因子分泌的影响,Western-blot 法检测 TPL 对 LPS 刺激的人成骨肉瘤细胞 MG-63 磷酸化 p38 蛋白表达的影响。结果 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPL 能显著抑制 LPS 诱导人成骨肉瘤细胞 MG-63 肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6、低氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子的表达和释放。结论 TPL 能抑制人成骨肉瘤细胞 MG-63 血管生成和炎症细胞因子的表达和释放,其机制可能是通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 p38 信号通路而发挥效用。

关键词:雷公藤内酯; 脂多糖类; 骨肉瘤; 新生血管化,病理性; 炎症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.10.016

中图法分类号:R738.1;R446.61

文章编号:1673-4130(2019)10-1216-07

文献标识码:A

Inhibitory effect of Triptolide on angiogenesis and inflammation in LPS-induced human osteosarcoma cells MG-63*

LIN Miaoxiong¹, PENG Ming¹, DU Guoyou¹, CHEN Yan², LIN Huiling³

(1. Department of Blood Transfusion and Clinical Laboratory; 2. Department of Surgery; 3. Department of Emergency, Zhongshan Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of Triptolide on angiogenesis and inflammation in LPS-induced human osteosarcoma cells MG-63 and explore the underlying mechanism of this protective effect. **Methods** LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was adopted to stimulate human osteosarcoma cells MG-63 to establish a model of disease inflammation. MTT assay was used to detect the viability of human osteosarcoma cells MG-63. Angiogenesis and inflammatory cytokines expression were detected by the method of quantitative real time PCR and enzyme linked immunosorbent assay. p-p38 protein expression was examined by the Western blot. **Results** Triptolide (50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could significantly suppress the expression and release of TNF- α , IL-6, HIF-1 α and VEGF. **Conclusion** Triptolide can significantly suppress angiogenesis and inflammatory cytokines expression in LPS-stimulated human osteosarcoma cells MG-63, likely by inhibiting p-p38 signaling pathway.

Key words: triptolide; lipopolysaccharides; osteosarcoma; neovascularization, pathologic; inflammation

骨肉瘤是 20 岁以下青少年或儿童常见的恶性骨肿瘤,是儿童最常见的恶性骨肿瘤,占儿童肿瘤的 5%^[1]。骨肉瘤最突出的症状是肿瘤部位疼痛,主要由肿瘤组织的侵蚀和骨皮质的溶解所致^[2]。骨肉瘤在几个月内有向肺转移的倾向^[3]。肿瘤切除,放、化疗是早期骨肉瘤患者的重要辅助治疗方法,晚期患者往往只能选择截肢。而截肢的 5 年生存率仅为 5%~

15%^[4-5]。因此,迫切需要探索一种安全、有效的骨肉瘤治疗方法。恶性肿瘤的转移是一种复杂的生物学行为,血管生成是肿瘤生长转移的形态学基础。既往有研究表明,微血管密度与肿瘤转移、发生及患者预后密切相关,包括骨肉瘤^[6]。肿瘤细胞可通过直接细胞接触或分泌旁分泌可溶性因子、诱导细胞修饰和细

* 基金项目:2016 年中山市卫生和计划生育局医学科研项目(2016J072)。

作者简介:林森雄,男,主管检验技师,主要从事血液/输血相关疾病研究。

本文引用格式:林森雄,彭明,杜国友,等.雷公藤内酯醇对脂多糖刺激的人成骨肉瘤细胞 MG-63 血管生成和炎症反应的抑制作用[J].国际检验医学杂志,2019,40(10):1216-1222.

胞外基质改变肿瘤微环境^[7],尤其是炎症反应,许多炎症介质可能影响细胞增殖和肿瘤的发展,其通过产生血管生成因子、生长因子、趋化因子、细胞因子和基质金属蛋白酶而促进肿瘤细胞的侵袭和逃避免疫系统的监控^[8]。因此,分子靶向抑制炎症反应和血管增生是治疗骨肉瘤的潜在策略。

雷公藤内酯醇(TPL)是从雷公藤中提取的具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种生物活性的二萜环氧化合物^[9]。TPL在肺癌、结肠癌、骨肉瘤等多种癌症中均具有调控细胞凋亡、迁移和转移的作用^[10-12]。此外,既往有研究表明,TPL是一种很有应用前景的抗血管生成药物^[13]。但TPL是否可通过调控血管生成和炎症反应而发挥其在骨肉瘤中的抗癌作用,目前尚不清楚。本研究探讨了TPL对骨肉瘤细胞血管生成和炎症反应的影响及其可能的作用机制,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂

人成骨肉瘤细胞 MG-63(中科院上海细胞库提供)、杜氏改良 Eagle 培养基(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、胎牛血清(FBS, HyClone, GE Healthcare Life Science, Logan, USA)、TPL(Sigma, St Louis, MO, USA)、二甲基亚砜(DMSO, Sigma, St Louis, MO, USA)、p38 抑制剂——SB203580(Medchem Express, Monmouth Junction, NJ, USA)、p38 激动剂——P79350(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、四甲基偶氮蓝比色法(MTT, Sigma, St Louis, MO, USA)、脂多糖(LPS, Sigma, St Louis, MO, USA)、人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(伊莱瑞特生物科技股份有限公司,武汉,中国)、TrIZOL(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)、DNA 反转录合成试剂盒(Takara Biotechnology, 大连, 中国)、SYBR q 聚合酶链反应(PCR) Master Mix(Vazyme Biotech, 南京, 中国); p38MAPK 抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、辣根过氧化物酶(HRP)、山羊抗兔二抗免疫球蛋白 G(锐抗生物科技有限公司,北京,中国)等。

1.2 方 法

1.2.1 人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养

人成骨肉瘤细胞 MG-63 在含 10% FBS 的培养基, 37 °C、5% 二氧化碳及饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养, 2 d 更换 1 次培养基, 3~4 d 进行 1 次传代, 选取状态良好的处于对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力

选取状态良好处于对数生长期的人成骨肉瘤细胞 MG-63 配制成细胞悬液, 按密度为 6×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 用含 10% FBS 的培养基培养 24 h, 分别用不同浓度的 LPS(10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 TPL(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 24 h。每孔中加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL , 细胞在

37 °C 避光下再培养 4 h。然后, 用 150 μL DMSO 溶解甲醛反应产物, 在 490 nm 处用紫外可见系统测定吸光度, 以光密度(OD)值表达, 计算细胞存活率。细胞存活率 = $\left[1 - \frac{\text{OD}(\lambda)_{\text{无药组}} - \text{OD}(\lambda)_{\text{用药组}}}{\text{OD}(\lambda)_{\text{无药组}}}\right] \times 100\%$ 。

1.2.3 ELISA 检测细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6、HIF-1 α 、VEGF 水平

选取状态良好处于对数生长期的人成骨肉瘤细胞 MG-63 分别加入 TPL(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 TPL(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + P79350(50 000 nM) 预处理 2 h, 加入 LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养 24 h, 收集细胞培养上清液, 离心去除细胞碎片, 采用 ELISA 检测细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6、HIF-1 α 、VEGF 水平, 具体操作步骤参制造商(伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 武汉, 中国)的操作说明书进行。

1.2.4 定量 PCR(Q-PCR) 检测人成骨肉瘤细胞 MG-63 TNF- α 、IL-6、HIF-1 α 、VEGF 表达水平

收集培养上清液后使用 TrIZOL 试剂从人成骨肉瘤细胞 MG-63 提取总 RNA。使用带有互补 DNA 合成试剂盒将 1 μg 总 RNA 反转录成 DNA。PCR 循环参数: 30 °C 10 min, 42 °C 50 min, 95 °C 5 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 使用 SYBR qPCR Master Mix 进行定量 PCR 检测, Q-PCR 的实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行标准化和量化。引物序列: TNF- α 正向引物 5'-GAACTGGCAGAAGAGGCACT-3', 反向引物 5'-GGTCTGGGCCATAGAAGACTGA-3'; IL-6 正向引物 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', 反向引物 5'-CAGAATTGCCATTGCACA-3'; HIF-1 α 正向引物 5'-TCTGGGTTGAAACTCAAGCAACTG-3', 反向引物 5'-CAACCGGTTTAAGGACACATTCTG-3'; VEGF 正向引物 5'-TGCTTCTGAGTTGCCAGGA-3', 反向引物 5'-TGGTTTCAATGGTGTGAGGACATAG-3'; GAPDH 正向引物 5'-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3', 反向引物 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'。

1.2.5 Western-blot 检测 TPL 对磷酸化 p38 蛋白(p-p38)表达的影响

使用 RIPA 裂解液从细胞中提取全细胞蛋白, BCA 法蛋白定量, 用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳分离等量的细胞裂解液, 转入聚偏二氟乙烯膜, 在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h 后用一抗在 4 °C 下孵育过夜, 回收抗体, 用 PBST 洗涤多次后在室温下用相应的二抗孵育 1 h, 最后采用 ECL 系统显示蛋白条带。导入 GeneTool from Syngene 软件分析蛋白条带灰度, 以各组 β -actin 条带的灰度值作为对照, 标化其相应组的 p-p38 蛋白表达量。

1.2.6 免疫组织化学染色检测人骨肉瘤组织 p-p38 蛋白表达水平

对人骨肉瘤患者手术切除的病理组织标本进行脱水石蜡包埋切片, 脱蜡水化, 在 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中煮沸进行抗原提取。用 3% H_2O_2 溶液室温避光孵育 10 min 灭活内

源性过氧化物酶,一抗在 4 ℃下孵育过夜,用 PBST 洗涤多次后在室温下用相应的二抗孵育 1 h,使用 DAB 底物试剂盒进行显色反应,用苏木素复染。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间多重比较采用 Tukey 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Western-blot 检测有差异扫描蛋白条带,对成像结果进行分析。

2 结 果

2.1 LPS 与 TPL 对人成骨肉瘤细胞 MG-63 的毒性检测 不同浓度 LPS(10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用 24 h 人成骨肉瘤细胞 MG-63 细胞活力与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明 LPS(10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对人成骨肉瘤细胞 MG-63 不存在细胞毒性作用。见图 1。故优选 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 作用于人成骨肉瘤细胞 MG-63,建立理想的体外肿瘤细胞致炎模型。不同浓度 TPL(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用 24 h 人成骨肉瘤细胞 MG-63 细胞活力与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。表明在实验条件下,TPL(50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与 LPS(0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均对人成骨肉瘤细胞 MG-63 无明显细胞毒性作用,实验在该药物浓度范围内进行具有科学依据。

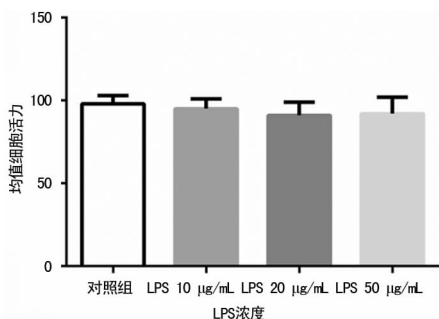


图 1 不同浓度 LPS 对人成骨肉瘤细胞 MG-63 细胞活力的影响

2.2 TPL 对 HIF-1 α 、VEGF 的抑制作用 不同浓度药物干预后人成骨肉瘤细胞 MG-63 HIF-1 α 、VEGF 表达量发生明显变化。见图 3、4。LPS 组 HIF-1 α 、VEGF 表达水平均明显高于对照组和 DMSO 组。LPS 组细胞上清液中 HIF-1 α 表达量 [(205.47 \pm 26.10) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 均明显高于对照组 [(53.85 \pm 7.36) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 和 DMSO 组 [(49.52 \pm 8.33) $\mu\text{g}/\text{mL}$]。见图 5。LPS 组细胞上清液中 VEGF 表达量 [(256.06 \pm 38.52) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 均明显高于对照组 [(60.22 \pm 8.29) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 和 DMSO 组 [(64.70 \pm 9.33) $\mu\text{g}/\text{mL}$]。见图 6。与 LPS 比较,不同浓度 TPL(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)预处理 2 h 细胞上清液中 HIF-1 α 、VEGF 表达量呈浓度依赖性降低。当 TPL 浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 HIF-1 α 、VEGF 表达量与 LPS 单独刺激组比较,差异均有统计学意义

($P < 0.05$)。当 TPL 上升至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差异继续增大,并随 TPL 浓度的增加,差异趋向平稳。见图 3、4。TPL 预处理后人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 HIF-1 α 分泌量分别为 (145.28 \pm 18.36)、(88.10 \pm 11.36)、(64.06 \pm 7.14) $\mu\text{g}/\text{mL}$, VEGF 分泌量分别为 (152.36 \pm 20.42)、(116.74 \pm 16.58)、(72.35 \pm 8.63) $\mu\text{g}/\text{mL}$,与 LPS 组比较,不同浓度 TPL(50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)预处理细胞上清液中 HIF-1 α 分泌量分别降低 29%、57%、68%。VEGF 分泌量分别降低 40%、54%、71%。见图 5、6。TPL 可有效抑制 LPS 诱导的人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 HIF-1 α 、VEGF 的表达。

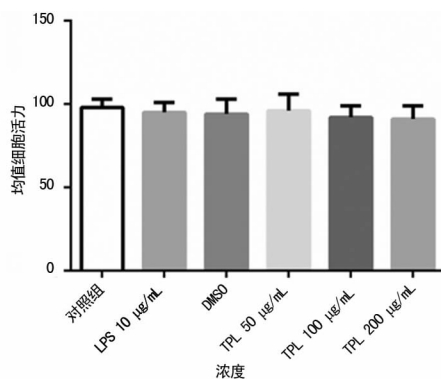
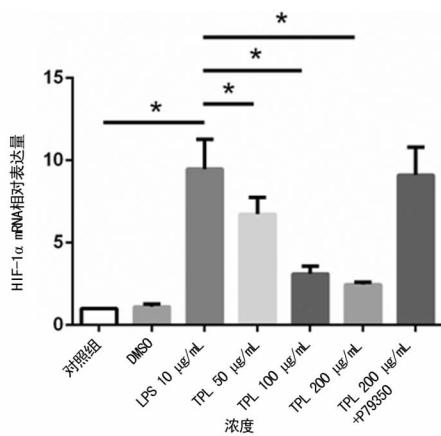


图 2 不同浓度 TPL 对人成骨肉瘤细胞 MG-63 细胞活力的影响

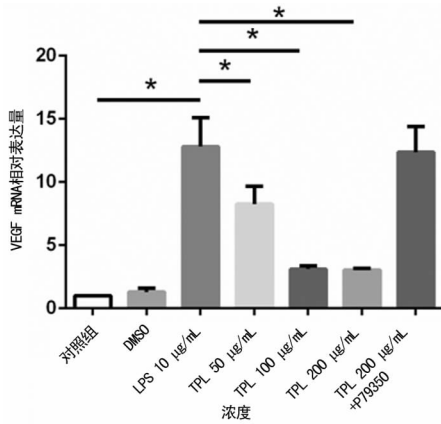


注:与 LPS 组比较, * $P < 0.05$

图 3 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 HIF-1 α mRNA 表达的影响

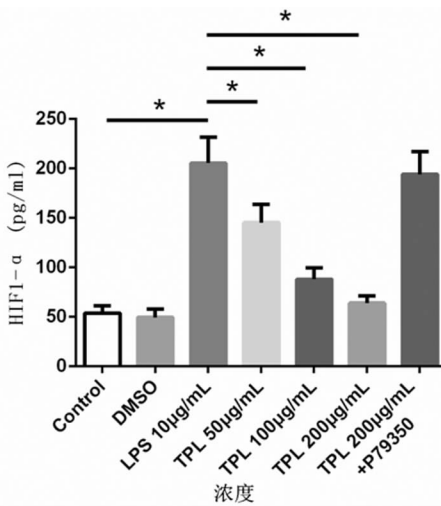
2.3 TPL 对炎性细胞因子——TNF- α 、IL-6 抑制作用 不同浓度药物干预后人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中炎性细胞因子——TNF- α 、IL-6 表达量发生明显变化。LPS 组 TNF- α 、IL-6 表达量明显高于对照组和 DMSO 组。LPS 组细胞上清液中 TNF- α 表达水平 [(228.16 \pm 36.77) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 明显高于对照组 [(53.41 \pm 6.14) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 和 DMSO 组 [(58.37 \pm 10.19) $\mu\text{g}/\text{mL}$]。见图 7。LPS 组细胞上清液中 IL-6 表达量 [(177.85 \pm 30.77) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 明显高于对照组 [(40.41 \pm 3.14) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 和 DMSO 组 [(38.75 \pm

6.19) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。见图 8。与 LPS 比较,不同浓度 TPL (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理 2 h 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 表达量呈浓度依赖性降低。当 TPL 浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时人成骨肉瘤细胞 MG-63 炎性细胞因子表达水平与 LPS 单独刺激组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。当 TPL 浓度逐渐上升到 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差异继续增大。见图 7、8。TPL 预处理后人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 TNF- α 分泌量分别为 (171.38 \pm 24.12)、(115.88 \pm 21.30)、(86.57 \pm 17.24) $\mu\text{g}/\text{mL}$, IL-6 分泌量分别为 (103.38 \pm 18.60)、(68.84 \pm 11.30)、(54.57 \pm 8.11) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与 LPS 组比较,不同浓度 TPL (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理后人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 TNF- α 分泌量分别降低 25%、49%、62%。IL-6 分泌量分别降低 41%、61%、69%。见图 9、10。TPL 能显著抑制 LPS 诱导的人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中炎性细胞因子——TNF- α 、IL-6 的表达。



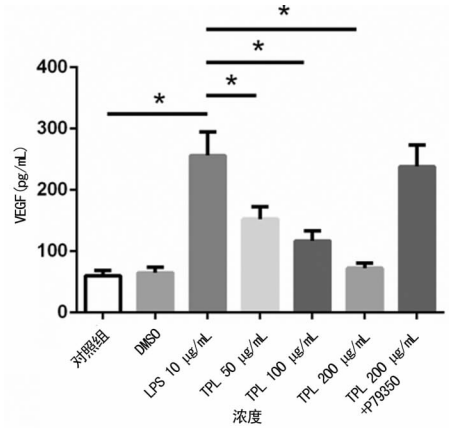
注:与 LPS 组比较, * $P < 0.05$

图 4 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 VEGF mRNA 表达的影响



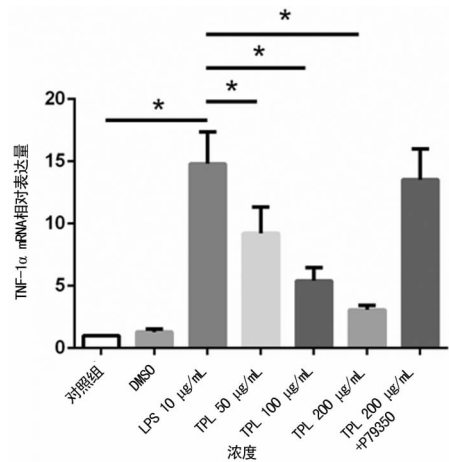
注:与 LPS 组比较, * $P < 0.05$

图 5 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 HIF-1 α 分泌量的影响



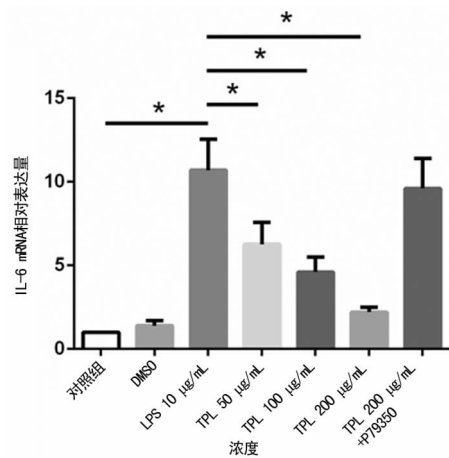
注:与 LPS 组比较, * $P < 0.05$

图 6 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 VEGF 分泌量的影响



注:与 LPS 组比较, * $P < 0.05$

图 7 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 TNF- α mRNA 表达的影响

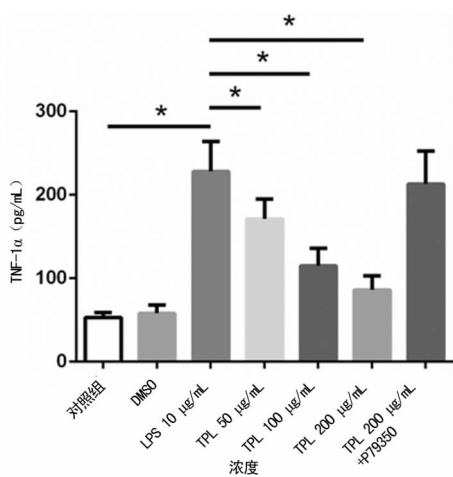


注:与 LPS 组比较, * $P < 0.05$

图 8 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 IL-6 mRNA 表达的影响

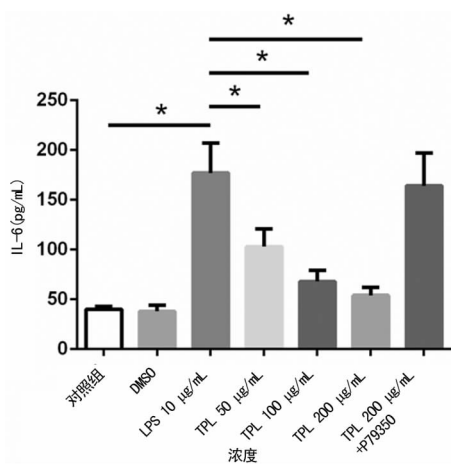
2.4 TPL 通过抑制 p38MAPK 信号通路发挥作用
 各组人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 p-p38 蛋白表达比较,差异有统计学意义 ($F = 94.479, P = 0.001$)。LPS 组与对照组比较,表达量明显增加。与 LPS 组比较,SB203580 组及 TPL 各浓度组预处理 2 h

人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 p-p38 蛋白表达量明显降低,并呈浓度依赖性,表明 TPL 能明显降低 LPS 的作用。TPL(200 μg/mL)组与 SB203580 组比较,差异无统计学意义($q=0.259, P=0.857$), TPL 可有效抑制 p-p38 蛋白的表达。见表 1。此外,与健康组织比较,人骨肉瘤组织 p-p38 蛋白表达量明显增加。见图 11。与 LPS 组比较, TPL、P79350 预处理人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 HIF-1α、VEGF、TNF-α、IL-6 表达水平均未见明显降低。图 3~10。TPL 通过抑制 p38MAPK 信号通路抑制 LPS 刺激介导的人成骨肉瘤细胞 MG-63 血管生成和炎症反应。



注:与 LPS 组比较, * $P<0.05$

图 9 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 TNF-α 分泌量的影响



注:与 LPS 组比较, * $P<0.05$

图 10 不同药物浓度对人成骨肉瘤细胞 MG-63 培养上清液中 IL-6 分泌量的影响

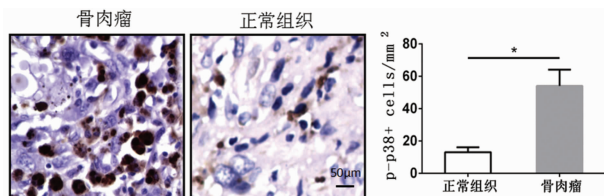
表 1 Western blot 检测 TPL 对人成骨肉瘤细胞 MG-63 p-p38 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	p-p38 蛋白(灰度值)
对照组	2.911 ± 0.105
DMSO 组	3.014 ± 0.163
LPS(10 μg/mL)	12.035 ± 0.426*

续表 1 Western blot 检测 TPL 对人成骨肉瘤细胞 MG-63 p-p38 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	p-p38 蛋白(灰度值)
LPS(10 μg/mL)、TLP(50 μg/mL)	7.527 ± 0.315#
LPS(10 μg/mL)、TLP(100 μg/mL)	5.054 ± 0.293#
LPS(10 μg/mL)、TLP(200 μg/mL)	4.418 ± 0.238#
LPS(10 μg/mL)、SB203580(1 μg/mL)	4.606 ± 0.310#

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 LPS 组(10 μg/mL)比较, # $P<0.05$



注:与正常组织比较, * $P<0.05$

图 11 正常组织与人成骨肉瘤组织 p-p38 蛋白表达情况比较($\times 400$)

3 讨论

3.1 TPL 对 LPS 诱导细胞 MG-63 血管生成的影响

肿瘤组织生长的微环境与肿瘤细胞的增殖和侵袭、转移能力密切相关^[14]。肿瘤组织周围的生长因子、炎症细胞因子和蛋白水解系统的紊乱是微血管形成和肿瘤转移相关的内在因素^[15]。手术切除后的肿瘤转移是骨肉瘤患者疗效和预后欠佳的主要原因,因此,研究肿瘤组织的炎症反应和血管增生是治疗骨肉瘤的潜在靶点和策略^[16]。VEGF 是内皮细胞特异性最高、促生长效果最强的关键调控因子^[17]。大部分侵袭性强的肿瘤 VEGF 的表达量一般均很高。大量的临床前和临床研究数据表明, VEGF 靶向制剂在卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等动物移植模型中具有明显的治疗作用^[18]。有研究表明, TPL 可调控细胞增殖、凋亡、淋巴瘤和甲状腺癌的侵袭、迁移和血管生成^[19]。但 TPL 在骨肉瘤中的抗血管生成作用尚未见相关文献报道。本研究结果显示, TPL 可有效抑制 VEGF 的表达,且抑制效果随剂量增加而增强。此外, VEGF 表观遗传学研究证实,大部分肿瘤存在 HIF-1α 高表达。既往有研究表明, HIF-1α 在红细胞生成、血管生成、细胞存活和肿瘤转移中发挥着重要的调控作用^[20]。因此,将 HIF-1 抑制剂用于靶向治疗癌症是新的治疗策略。本研究通过 TPL 剂量依赖性抑制了 MG-63 细胞培养上清液中 HIF-1α 的表达水平。因此,推测 TPL 可通过抑制 MG-63 细胞培养上清液中 HIF-1α、VEGF 的表达而抑制血管生成,抑制骨肉瘤的生长和转移。

3.2 TPL 对 LPS 诱导 MG-63 细胞炎症反应的影响

肿瘤细胞可通过直接细胞接触或分泌旁分泌可溶性因子、诱导细胞修饰和细胞外基质改变肿瘤微环境^[7],尤其是炎症反应,许多炎症介质可能影响细胞

增殖和肿瘤的发展。TNF- α 参与了免疫系统的维护和体内平衡,炎症和宿主防御。癌症细胞或基质细胞产生 TNF- α 参与了一系列肿瘤的发生与发展。其可激活核因子 κ B(NF- κ B)信号通路,导致肿瘤细胞活化和细胞因子网络失衡。通过 NF- κ B, TNF- α 还可介导肿瘤细胞和巨噬细胞相互作用,增加恶性肿瘤细胞的侵袭性^[21]。肿瘤患者血清 TNF- α 水平往往是升高的,肿瘤或基质细胞产生的 TNF- α 使肿瘤长期处于慢性炎症的微环境^[22];可能会直接导致 DNA 损伤,抗肿瘤细胞凋亡或促肿瘤细胞有丝分裂,调节肿瘤与基质细胞相互作用,诱发一系列基质金属蛋白酶、细胞因子、趋化因子而促进肿瘤发展。TNF- α 的另一作用是促进 IL-6 的合成与释放,尤其是单核细胞和巨噬细胞^[23]。IL-6 是一种糖蛋白和多功能细胞因子,除作为促炎性细胞因子外,其还会影响癌细胞的多种活性。随着 IL-6 在协调先天免疫和适应性免疫方面的生理功能逐渐得到认识,IL-6 已成为维持慢性炎症和自身免疫的关键介质,且越来越多的研究证实,其是连接慢性炎症和癌症发展的关键细胞因子。与 TNF- α 一样,IL-6 可激活 IL-6R/ Janus 激酶/STAT3 信号通路,上调 *Oct 4* 基因的表达,促进非癌细胞在低附着培养条件下转化为肿瘤干细胞,从而促进肿瘤的发展^[24]。晚期癌症患者 IL-6 水平升高,而人血清中 IL-6 水平升高与癌症风险增加有关。因此,IL-6 被认为可作为预测癌症患者预后的标志物^[25]。本研究结果显示,TPL 可剂量依赖性抑制 MG-63 细胞培养上清液 TNF- α 、IL-6 的表达。因此,推测 TPL 可通过抑制 MG-63 细胞炎性反应而抑制肿瘤细胞血管生成和生长。

3.3 TPL 对 p38MAPK 信号通路的影响 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是多种信号通路的中心,是细胞接收、转换与传递信号一类非常重要的分子,在细胞功能活动中具有关键作用,如细胞增殖、分化、凋亡和应对外界环境的刺激^[26]。越来越多的证据表明,MAPK 是调节肿瘤细胞增殖和生长信号通路的关键因子^[27];激活 p38MAPK 能促进细胞凋亡和自噬的发生^[28]。同时,p38MAPK 信号传导级联反应可受活性氧的调控,并参与了调控肿瘤血管的生成^[29-30]。此外,p38MAPK 信号通路还介导了心肌炎、肝炎等炎性反应^[31-32],因而成为开发抗炎药物的靶点。本研究结果显示,经 TPL 处理后 p-p38 蛋白的表达量较 LPS 组下降,提示 TPL 抗 LPS 诱导的促血管生成和炎性反应可能与下调 p38MAPK 信号通路的活性有关,表明 p38MAPK 可能是 TPL 作用的靶点。

4 结 论

TPL 通过抑制 p38MAPK 信号通路转导能有效抑制骨肉瘤细胞的血管生成和炎性反应,为骨肉瘤提供了新的治疗靶点,并为骨肉瘤的治疗提供了研究基础。

参考文献

- [1] LI X, LU Q, XIE W, et al. Anti-tumor effects of triptolide on angiogenesis and cell apoptosis in osteosarcoma cells by inducing autophagy via repressing Wnt/ β -Catenin signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2):443-449.
- [2] SABINO M A, GHILARDI J R, JONGEN J L, et al. Simultaneous reduction in cancer pain, bone destruction, and tumor growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2 [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24):7343-7349.
- [3] LV Y F, YAN G N, MENG G, et al. Enhancer of zeste homolog 2 silencing inhibits tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12999.
- [4] NAGARAJAN R, CLOHISY D R, NEGLIA J P, et al. Function and quality-of-life of survivors of pelvic and lower extremity osteosarcoma and Ewing's sarcoma; the Childhood Cancer Survivor Study[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(11):1858-1865.
- [5] LEE J A, PAIK E K, SEO J, et al. Radiotherapy and gemcitabine-docetaxel chemotherapy in children and adolescents with unresectable recurrent or refractory osteosarcoma[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(2):138-143.
- [6] BOSARI S, LEE A K, DELELLIS R A, et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 1992, 23(7):755-761.
- [7] KIDD S, SPAETH E, WATSON K, et al. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e30563.
- [8] RODRIGUES-LISONI F C, PEITL P JR, VIDOTTO A, et al. Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions [J]. *BMC Med Genomics*, 2010, 3:14.
- [9] LIU Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3):377-383.
- [10] 丁帅,高延征,张广泉,等. Six1 基因 siRNA 联合雷公藤内酯醇对骨肉瘤细胞增殖,凋亡,侵袭的影响及机制[J]. *中国地方病防治杂志*, 2018, 33(3):262.
- [11] 王丽,宋勇. 雷公藤内酯醇与非小细胞肺癌研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(7):378-381.
- [12] 俞萍丽,陈元仲,许建华. 雷公藤内酯醇对人结肠癌细胞株 SW-480、HT-29 体内外作用的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2010, 45(1):28-31.
- [13] HE M F, HUANG Y H, WU L W, et al. Triptolide functions as a potent angiogenesis inhibitor[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(1):266-278.
- [14] JIANG J T, ZHANG L F, ZHOU B, et al. Relationships of uPA and VEGF expression in esophageal cancer and microvascular density with tumorous invasion and metastasis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(7):3379-3383.
- [15] LV J Y, HU T Y, WANG R Y, et al. Deciphering the an-

- ti-angiogenic effect of endostatin/cyclophosphamide to normalize tumor microenvironment through notch signaling pathway in colon cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1):10.
- [16] HU F, SHANG X F, WANG W, et al. High-level expression of periostin is significantly correlated with tumour angiogenesis and poor prognosis in osteosarcoma[J]. *Int J Exp Pathol*, 2016, 97(1):86-92.
- [17] FERRARA N, HOUCK K, JAKEMAN L. The biology of vascular endothelial growth-factor[J]. *Endocr Rev*, 1993, 6(6):687.
- [18] SHARMA T, DHINGRA R, SINGH S, et al. Aflibercept: a novel VEGF targeted agent to explore the future perspectives of Anti-Angiogenic therapy for the treatment of multiple tumors[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13(4):530-540.
- [19] YANG C Y, LIN C K, LIN G J, et al. Triptolide represses oral cancer cell proliferation, invasion, migration, and angiogenesis in co-inoculation with U937 cells[J]. *Clin Oral Investig*, 2017, 21(1):419-427.
- [20] AGANI F, JIANG B H. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(3):245-251.
- [21] WHITESIDE T L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth[J]. *Oncogene*, 2008, 27(45):5904-5912.
- [22] BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(5):361-371.
- [23] LIPPITZ B E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(6):e218-228.
- [24] LANDSKRON G, DE LA FUENTE M, THUWAJIT P, et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014:149185.
- [25] ZAROGOULIDIS P, TSAKIRIDIS K, KARAPANTZOU C, et al. Use of proteins as biomarkers and their role in carcinogenesis[J]. *J Cancer*, 2015, 6(1):9-18.
- [26] RAMAN M, CHEN W, COBB M H. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. *Oncogene*, 2007, 26(22):3100-3112.
- [27] 崔婷婷. MAPK 信号传导通路与肿瘤的发生[J]. *实用肿瘤杂志*, 2013, 28(5):550-552.
- [28] DE LA CRUZ-MORCILLO M A, VALERO M L, CALLEJAS-VALERA J L, et al. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance[J]. *Oncogene*, 2012, 31(9):1073-1085.
- [29] 郝志楠, 郑勇斌, 肖高春, 等. 丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶信号通路与肿瘤血管新生的关系[J]. *中国医药导报*, 2015, 12(1):148-151.
- [30] RAJASHEKHAR G, KAMOCKA M, MARIN A, et al. pro-inflammatory angiogenesis is mediated by p38 MAP kinase[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(3):800-808.
- [31] 王丹, 姜建斌, 陈其, 等. p38MAPK 信号通路对病毒性心肌炎的影响[J]. *温州医学院学报*, 2011, 41(5):439-441.
- [32] MA X, JIA Y T, QIU D K. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates experimental autoimmune hepatitis: Involvement of nuclear factor kappa B [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(31):4249-4254.
- (收稿日期:2018-10-13 修回日期:2019-01-18)
-
- (上接第 1215 页)
- [5] 许爱君, 王子月, 张春阳. 肿瘤生物标志物的超灵敏检测研究进展[J]. *科学通报*, 2017, 62(09):859-870.
- [6] 程晓伟, 杨宇星, 俞小元, 等. SCC-Ag 和 TK1 在中晚期宫颈癌中的表达及在治疗中的意义[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(14):1298-1301.
- [7] 王金华, 郑秀, 陈丽红, 等. 血清鳞癌相关抗原、糖类抗原 125 表达与宫颈癌临床分期的相关性[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(15):1546-1548.
- [8] 许崇安, 李琳, 邢丽丽, 等. 血清癌胚抗原和 CYFRA21-1 预测晚期非小细胞肺癌患者化疗疗效及预后的价值研究[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(4):411-414.
- [9] 刘磊, 刘彬, 朱莉莉, 等. 肺鳞癌患者血清 CYFRA21-1 和 SCC 检测及 ROC 曲线和截断点的理论分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(4):280-283.
- [10] ABDUL-RAHMAN P S, LIM B K, HASHIM O H. Expression of high-abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: analysis using 2-DE with Silver staining and lectin detection methods[J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(12):1989-1996.
- [11] 罗疏薇, 欧春萍, 张莉萍, 等. 应用 ROC 曲线评价 CEA、CYFRA21-1、SCC 对非小细胞肺癌的诊断价值[J]. *重庆医学*, 2011, 40(3):250-252.
- [12] 佟威威, 佟广辉, 王婧, 等. Cyfra21-1、NSE、SCCA 和 CRP 在肺癌诊断中的应用[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(3):396-400.
- [13] 杨琳琳, 王薇, 张红平, 等. 宫颈癌患者治疗前检测外周血细胞角蛋白 19 mRNA 和鳞状细胞癌抗原的临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(8):1940-1941.
- [14] 黄龙, 郑敏, 刘继红, 等. I B—II B 期宫颈癌髂总淋巴结转移高危因素及对预后的影响[J]. *癌症*, 2010, 29(4):475-480.
- (收稿日期:2018-10-02 修回日期:2018-12-30)