

## 积雪草苷对人骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡的影响

吴倩, 江波\*

湖北文理学院附属医院 襄阳市中心医院, 湖北 襄阳 441021

**摘要:** **目的** 研究积雪草苷体外对人骨肉瘤细胞株 Saos-2 细胞生长、凋亡及氧化应激的影响。**方法** 体外培养 Saos-2 细胞, MTT 法检测不同时间(24、48、72 h)和不同浓度(20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )的积雪草苷对细胞生长的抑制作用; Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测对细胞凋亡和细胞周期的影响; Western blotting 法检测磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3Ks)、苏氨酸激酶 (AKT)、p-AKT、糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )、p-GSK-3 $\beta$  水平; Bradford 法检测超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 水平。**结果** 与对照组比较, 积雪草苷 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  对 Saos-2 细胞的增殖抑制率逐渐增加, 且具有时间和浓度相关性; 与对照组比较, 积雪草苷 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组对 Saos-2 细胞的凋亡率明显增加 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 且具有浓度相关性。与对照组比较, 积雪草苷可剂量相关性的增加 S 期细胞比例 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。与对照组比较, 积雪草苷 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组 PI3K、AKT、p-AKT、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  表达均减少, 且各蛋白水平随药物浓度的增加而逐渐降低。与对照组比较, 积雪草苷 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组 SOD 和 GSH 活性均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 MDA 水平则明显降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 均具有浓度相关性。**结论** 积雪草苷具有抗人骨肉瘤 Saos-2 细胞活性的作用, 通过调控 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路和抑制氧化应激抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡。

**关键词:** 积雪草苷; Saos-2; 凋亡; 氧化应激

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)08-2262-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.08.003

## Effect of apoptosis on human osteosarcoma Saos-2 cells induced by asiaticoside

WU Qian, JIANG Bo

Xiangyang Central Hospital, the Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441021, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of asiaticoside on growth, apoptosis, oxidative stress of human osteosarcoma cell line Saos-2 *in vitro*. **Methods** Saos-2 cells were cultured *in vitro*, and MTT was performed to observe the inhibition of cell growth by asiaticoside at different times (24, 48, and 72 h) and different concentrations (20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$ ). Annexin V-FITC/PI flow cytometry was used to determine the apoptosis rate and cell cycle. PI3K, AKT, p-AKT, GSK-3 $\beta$ , and p-GSK-3 $\beta$  contents were detected by Western blotting. Bradford was used to determine the contents of SOD, GSH, and MDA. **Results** Compared with the control group, the inhibition ratio of asiaticoside 20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$  on Saos-2 cells were increased, and had time and concentration correlation. Compared with the control group, the apoptosis rates of asiaticoside 20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$  on Saos-2 cells were significantly increased ( $P < 0.01$ ,  $0.001$ ) with concentration correlation. Compared with the control group, asiaticoside could increase dose-dependent the ratio of S phase cell ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). Compared with the control group, PI3K, AKT, p-AKT, GSK-3 $\beta$ , and p-GSK-3 $\beta$  levels in asiaticoside 20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$  group were significantly decreased. And each protein level were decreased gradually with the increase of drug concentration. Compared with the control group, SOD and GSH levels in asiaticoside 20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$  group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while MDA level were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), and they had concentration correlation. **Conclusion** Asiaticoside has an anti-osteosarcoma Saos-2 cell activity, and induces apoptosis by regulating PI3K/AKT/gsk-3 signaling pathways and inhibiting oxidative stress.

**Key words:** asiaticoside; Saos-2; apoptosis; oxidative stress

收稿日期: 2019-03-25

作者简介: 吴倩, 主管药师, 硕士, 研究方向为临床药学。E-mail: 297040878@qq.com

\*通信作者 江波, 主治医师, 本科, 研究方向为骨科。E-mail: 68237005@qq.com

骨肉瘤是非常常见的源于骨间叶细胞的原发性恶性骨肿瘤，好发于儿童和青少年。骨肉瘤主要累及骨髓腔及骨皮质，波及骨外膜时可形成特征性的三角形隆起。随着新型靶向化疗药物的使用及保肢手术技术的提高，无转移骨肉瘤患者5年生存率可提高至60%~80%<sup>[1]</sup>，而发生肺转移或骨转移的患者，生存率只有25%~50%<sup>[2]</sup>。化疗药物虽在一定剂量内可显著抑制肿瘤细胞，但大剂量的持续使用会增加毒副作用并提高耐药率，使疗效降低。研究发现很多中药具有很好的抑制肿瘤细胞生长的作用，且无毒副作用或毒副作用小，可辅助抗肿瘤治疗，减少化疗药物的毒副作用，增强疗效<sup>[3]</sup>。

积雪草为伞形科积雪草属植物积雪草 *Centella asiatica* (Linn.) Urban 的全草，具有解毒清热、利湿消肿等功效<sup>[4]</sup>，最早用于湿热黄疸和跌倒损伤等。积雪草发挥药理活性的主要成分是积雪草苷，是一种三萜类化合物，具有抗炎、抗氧化、促进伤口愈合并减轻疤痕形成等多种药理活性<sup>[5]</sup>。随着对积雪草苷药理作用研究的不断深入，发现其还具有广泛的抗肿瘤作用。潘金丽<sup>[6]</sup>证实积雪草苷可通过升高 Bax 的表达并降低 Bcl-2 的表达诱导卵巢癌 A2780 细胞的凋亡，从而抑制肿瘤生长。姚锦英<sup>[7]</sup>研究表明积雪草总苷可通过提高 IL-2、TNF- $\alpha$  水平而发挥抗肺癌 A549 细胞的作用。本研究主要观察观察积雪草苷对人骨肉瘤 Saos-2 细胞的影响，并探讨其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 药物与细胞

积雪草苷购于上海金穗生物科技有限公司，产品批号 20151524，质量分数 $\geq 98\%$ 。人骨肉瘤 Saos-2 细胞购于中国科学院上海细胞研究所，于本细胞室进行传代培养。

### 1.2 试剂与仪器

顺铂（江苏豪森药业集团有限公司，产品批号 006013CF）；胎牛血清（德国 PAA，产品批号 A15108-1479）；DMEM 培养液（美国 GIBCO 公司，产品批号 8117050）；青霉素、链霉素（HyClone 公司）；溴化二甲噻唑二苯四氮（MTT，美国 Sigma 公司，产品批号 M2128）；SW-CJ-2F 超净工作台（中国吴江市伟峰净化设备有限公司）；2406-2 型 CO<sub>2</sub> 培养箱（美国 SHEL-LAB 公司）；MK3 型酶联免疫检测仪（Thermo LabSystems）；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（美国 Yeasen 公司）；倒置显微镜

（上海微图仪器科技发展有限公司）；电子分析天平（瑞士 Mettler 公司）。磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3Ks）、苏氨酸激酶（AKT）、p-AKT、糖原合成酶激酶 3 $\beta$ （GSK-3 $\beta$ ）、p-GSK-3 $\beta$  抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司）；IgG（武汉博士德生物工程有限公司）。超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽（GSH）和丙二醛（MDA）试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

Saos-2 细胞保存于液氮中，使用前取出并在 37 °C 水浴箱中快速解冻，而后用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 溶液进行培养，接种于培养瓶后置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中，每隔 2~3 d 用 0.3% 胰酶消化并传代，待传代 2~3 次细胞增殖处于对数生长期时用于以下实验。

### 2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

将培养至对数生长期的 Saos-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 溶液稀释后，以每孔 200  $\mu$ L、 $5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h，取出将各孔上清培养液分别吸出更换成终浓度为 10、20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L 积雪草苷溶液，以及 20  $\mu$ mol/L 顺铂作为阳性对照组，每个浓度设置 6 个复孔，另设仅加溶媒的空白对照组。然后将各板继续置于培养箱中 24、48、72 h 后分别取出，于每孔加入 2 mg/mL 灭菌的 MTT 溶液 20  $\mu$ L，培养 4 h 后更换上清液为 DMSO 150  $\mu$ L，遮光低速振荡使产生的结晶物溶解，最后用酶标仪选择 570 nm 波长处测各孔吸光度（A）值，并按公式细胞增殖抑制率。以 Saos-2 细胞在不同时间点的 A 值绘制生长曲线。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率

将对数生长期的 Saos-2 细胞，用 DMEM 稀释成  $1 \times 10^6$ /mL 接种于培养瓶中培养，24 h 后随机分组，给药组分别加入终浓度为 20、40、80  $\mu$ mol/L 积雪草苷，阳性对照加入 20  $\mu$ mol/L 顺铂，空白对照组加入等量 DMEM，继续培养 48 h 后，用 0.25% 胰酶消化细胞，加入 300  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 试剂盒中 binding buffer 悬浮，再分别加入 Annexin V-FITC 5  $\mu$ L 和 PI 染色液 5  $\mu$ L 使混合均匀，室温避

光条件下培养 15 min, 最后用流式细胞仪对凋亡率进行检测并分析细胞周期。

### 2.4 Western blotting 法检测目的蛋白含量

将 Saos-2 细胞随机分组, 加入积雪草苷使终浓度分别为 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ , 阳性对照组加入 20  $\mu\text{mol/L}$  顺铂, 培养 48 h, 用预冷的 PBS 冲洗 Saos-2 细胞 3 次后加入蛋白裂解液进行裂解细胞, 抽取总蛋白, 置于冰上 30 min。并于 4  $^{\circ}\text{C}$  环境下 12 000 r/min, 离心 10min, 取上清液, 每管取 15  $\mu\text{g}$  总蛋白加入上样缓冲液煮沸 5 min, 行 PVDF 膜(100 V 90 min) 凝胶电泳, 封闭液 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h, 采用兔抗人 PI3K (1:1 000)、AKT (1:1 000)、p-AKT (1:1 000)、GSK-3 $\beta$  (1:1 000)、p-GSK-3 $\beta$  (1:1 000)、 $\beta$ -action (1:1 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  下过夜, TBST 洗 10 min, 重复 3 次, 加入山羊抗兔 IgG(1:1 000) 二抗 20 min, TBST 漂洗, 化学发光, 检测分析条

带灰度值, 用各组目的条带的灰度值和内参的灰度值比值表示蛋白质相对表达水平。

### 2.5 Bradford 法检测 SOD、GSH 和 MDA 水平

将对数生长期的 Saos-2 细胞用胰酶消化洗涤后, 加入等量裂解液, 于冰上孵育 10 min, 离心后分别收集各上清液, 然后分别按照 SOD、GSH 和 MDA 试剂盒说明书对各含量进行检测。

### 2.6 统计学处理

实验数据采用采用 SPSS 软件进行分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 积雪草苷对 Saos-2 细胞生长的影响

MTT 实验结果显示随着培养时间的延长和药物浓度的逐渐增加, 积雪草苷对 Saos-2 细胞增殖的抑制率也逐渐增加, 与对照组相比, *A* 值显著降低, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 见表 1。

表 1 积雪草苷对 Saos-2 细胞增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 1 Inhibitory effect of asiaticoside on proliferation of Saos-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
对照	—	0.789 $\pm$ 0.035	—	0.791 $\pm$ 0.040	—	0.792 $\pm$ 0.034	—
顺铂	20	0.596 $\pm$ 0.090 <sup>***</sup>	24.53	0.459 $\pm$ 0.018 <sup>***</sup>	42.01	0.380 $\pm$ 0.028 <sup>***</sup>	52.08
积雪草苷	10	0.679 $\pm$ 0.042 <sup>**</sup>	14.01	0.617 $\pm$ 0.031 <sup>***</sup>	21.98	0.576 $\pm$ 0.045 <sup>***</sup>	27.29
	20	0.616 $\pm$ 0.040 <sup>***</sup>	21.95	0.557 $\pm$ 0.061 <sup>***</sup>	29.63	0.530 $\pm$ 0.034 <sup>***</sup>	33.08
	40	0.582 $\pm$ 0.024 <sup>***</sup>	26.30	0.526 $\pm$ 0.061 <sup>***</sup>	33.52	0.473 $\pm$ 0.020 <sup>***</sup>	40.30
	80	0.566 $\pm$ 0.042 <sup>***</sup>	28.24	0.525 $\pm$ 0.075 <sup>***</sup>	33.67	0.429 $\pm$ 0.046 <sup>***</sup>	45.88
	160	0.551 $\pm$ 0.065 <sup>***</sup>	30.19	0.467 $\pm$ 0.035 <sup>***</sup>	40.91	0.402 $\pm$ 0.061 <sup>***</sup>	49.31
	320	0.498 $\pm$ 0.086 <sup>***</sup>	36.90	0.434 $\pm$ 0.020 <sup>***</sup>	45.18	0.342 $\pm$ 0.082 <sup>**</sup>	56.78

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$   
\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

### 3.2 积雪草苷对 Saos-2 细胞凋亡的影响

与对照组相比, 积雪草苷 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组 Saos-2 细胞凋亡率明显增加 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 并随药物浓度的增加, 细胞凋亡率逐渐增加。结果见表 2、图 1。

### 3.3 积雪草苷对 Saos-2 细胞周期的影响

与对照组相比, 积雪草苷可剂量相关性的增加 S 期细胞比例 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 各组  $G_0$ - $G_1$  期和  $G_2$ -M 期均略有减少, 但与对照组相比没有显著性差异, 其中降低  $G_2$ -M 期比例呈剂量相关性。提示积雪草苷可通过阻滞细胞周期 S 期而诱导 Saos-2 细胞凋亡, 见表 3。

表 2 积雪草苷对 Saos-2 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Effect of asiaticoside on apoptosis of Saos-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	凋亡率/%
对照	—	7.35 $\pm$ 0.50
顺铂	20	24.59 $\pm$ 1.72 <sup>***</sup>
积雪草苷	20	15.36 $\pm$ 1.48 <sup>**</sup>
	40	23.70 $\pm$ 3.37 <sup>**</sup>
	80	32.66 $\pm$ 3.39 <sup>***</sup>

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$   
\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

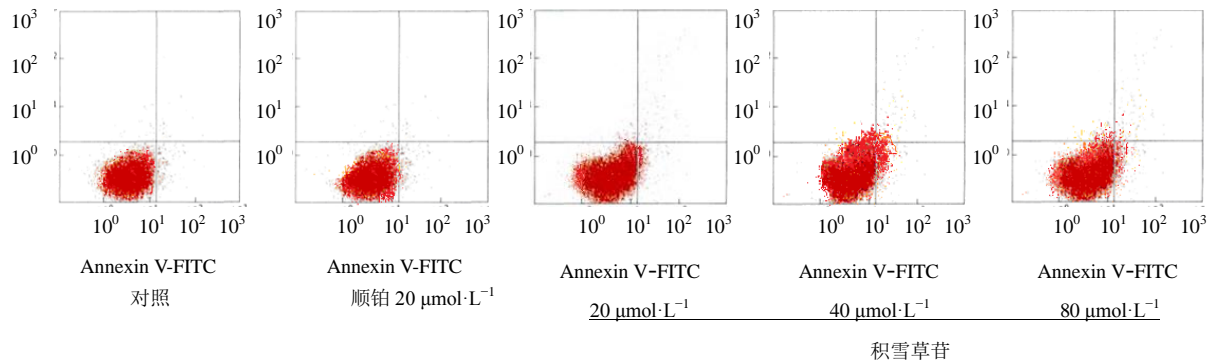


图1 积雪草苷对 Saos-2 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of asiaticoside on apoptosis of Saos-2 cells

表3 积雪草苷对 Saos-2 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of asiaticoside on cell cycle of Saos-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂 量/ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	细胞周期分布比例/%		
		G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> -M 期
对照	—	55.77 ± 0.88	23.66 ± 10.71	20.57 ± 0.99
顺铂	20	54.38 ± 0.65	26.21 ± 0.83**	19.41 ± 1.47
积雪草苷	20	54.62 ± 1.43	25.56 ± 0.92*	19.82 ± 1.79
	40	54.71 ± 1.06	26.09 ± 0.93*	19.20 ± 1.55
	80	53.57 ± 1.16	28.36 ± 0.77**	18.07 ± 1.04

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

3.4 积雪草苷对 Saos-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 积雪草苷 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组 PI3K、AKT、p-AKT、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  表达均减少, 且各蛋白水平随药物浓度的增加而逐渐降低。积雪草苷对 Saos-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响见图 2 和表 4。

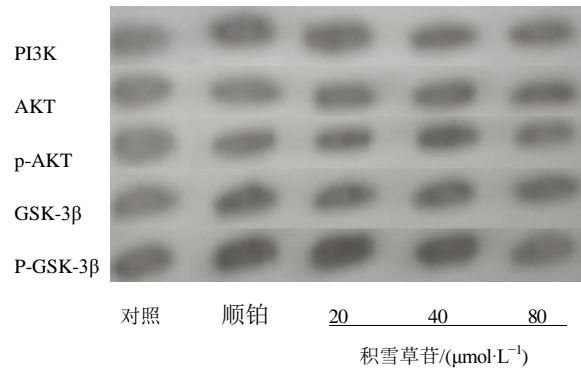


图2 积雪草苷对 Saos-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of asiaticoside on apoptosis-related proteins of Saos-2 cells

3.5 积雪草苷对 Saos-2 细胞 SOD、GSH 和 MDA 水平的影响

与对照组比较, 积雪草苷 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组 SOD 和 GSH 活性均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 MDA 水平则明显降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 均具有浓度相关性, 见表 5。

表4 积雪草苷对 Saos-2 细胞凋亡相关蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effects of asiaticoside on apoptosis-related proteins of Saos-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	蛋白表达水平				
		PI3K	AKT	p-AKT	GSK-3 $\beta$	p-GSK-3 $\beta$
对照	—	2.24 ± 0.11	0.79 ± 0.13	2.06 ± 0.10	1.61 ± 0.18	1.77 ± 0.13
顺铂	20	1.84 ± 0.13*	0.75 ± 0.09	1.62 ± 0.14*	1.46 ± 0.22	1.47 ± 0.25
积雪草苷	20	2.07 ± 0.16	0.76 ± 0.15	1.91 ± 0.14	1.45 ± 0.15	1.49 ± 0.21
	40	1.88 ± 0.15*	0.75 ± 0.21	1.65 ± 0.12*	1.33 ± 0.13	1.27 ± 0.14*
	80	1.68 ± 0.17**	0.73 ± 0.07	1.46 ± 0.12**	1.12 ± 0.14*	1.06 ± 0.16**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

表5 积雪草苷对 Saos-2 细胞 SOD、GSH 和 MDA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 5 Effect of asiaticoside on levels of SOD, GSH, and MDA of Saos-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	SOD/(U $\text{mL}^{-1}$ )	GSH/(U $\text{mL}^{-1}$ )	MDA/(U $\text{mL}^{-1}$ )
对照	—	44.73 $\pm$ 4.17	75.56 $\pm$ 3.16	175.86 $\pm$ 3.98
顺铂	20	31.76 $\pm$ 3.50*	63.89 $\pm$ 3.05*	186.07 $\pm$ 3.61*
积雪草苷	20	52.64 $\pm$ 1.59*	82.91 $\pm$ 1.54*	164.61 $\pm$ 4.96*
	40	55.91 $\pm$ 2.47*	84.94 $\pm$ 1.57*	159.87 $\pm$ 5.05*
	80	56.46 $\pm$ 2.29*	88.27 $\pm$ 4.07*	153.64 $\pm$ 6.05**

与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs control group

#### 4 讨论

肿瘤是现代人类生命的一大杀手,如何提高恶性肿瘤治愈率也是医学界一大难题。近年来,从中草药中提取具有抗肿瘤和抗氧化效应的活性物质已日益成为研究热点。积雪草作为传统中药在我国应用历史悠久,具有保护神经、扩张血管、抗肿瘤等作用,其提取物积雪草苷在医药、美容等行业应用也非常普遍。大量研究表明积雪草苷具有很强的抗癌活性,可有效抑制多种肿瘤的生长,诱导癌细胞凋亡<sup>[8]</sup>,降低癌细胞的侵袭以及迁移能力<sup>[9]</sup>等多种药理活性。

肿瘤在发生和发展过程中会有多个信号通路的异常活化,并在肿瘤的进展中均扮演着重要角色。PI3K/AKT 通路是机体内重要的信号传导通路之一,其在调节细胞生长、凋亡、侵袭和迁移、肿瘤血管生成等过程中均发挥关键性的作用,是一个相对独立和复杂的通路<sup>[10-11]</sup>。PI3K 由一个催化亚基 p110 和一个调节亚基 p85 共同构成的二聚体酯酶<sup>[12]</sup>,该酶作为始动因子具有催化活性。AKT 也叫蛋白激酶 B,能有效调节大量下游目标最终控制关键细胞的存活和代谢过程,是 PI3K 重要的下游分子,也是 PI3K/AKT 通路的关键酶之一,在多种肿瘤组织中均有表达<sup>[13]</sup>。GSK-3 $\beta$  作为细胞内主要的丝氨酸/苏氨酸家族激酶,是 AKT 的重要底物。激活的 PI3K 可催化肌醇环上的 3 位羟基生成 PIP2 和 PIP3,这两者可作为第二信使共同激活 AKT,形成 PI3K/AKT 信号通路,活化的 AKT 又通过调控下游蛋白包括 BAD、GSK-3 $\beta$  和 NF- $\kappa$ B 等来促进细胞增殖和抑制细胞凋亡。PI3K/AKT 通路的失调对肿瘤的形成和发展具有重要的作用,在骨肉瘤中,GSK-3 $\beta$  的表达水平和活化形式较正常高,PI3K/AKT 信号通路也处于异常激活状态。

本实验采用 MTT、Annexin V-FITC/PI 双染流

式细胞仪、Western Blot 法检测不同浓度的积雪草苷对骨肉瘤 Saos-2 细胞的影响,结果确定积雪草苷对骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖的抑制作用具有浓度和时间相关性,并浓度相关性的将细胞周期阻滞在 S 期而诱导其凋亡。Western blot 法检测凋亡相关蛋白,结果 PI3K、AKT、p-AKT、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达均减少,并且各蛋白水平随药物浓度的增加而降低,表明积雪草苷可通过调控 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路诱导骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡,从而抑制骨肉瘤生长。Zhou 等<sup>[14]</sup>也证实了 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路的激活在肿瘤发病机制中具有的重要意义,其广泛参与细胞的生长、增殖、侵袭和迁移,在凋亡调控中具有重要地位。Kong 等<sup>[15]</sup>研究表明,斑蝥酸钠可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活性,从而抑制 MG-63 细胞增殖,及诱导细胞周期阻滞,与本实验机制类似。

氧化应激直接参与致癌基因的突变、原癌基因的活化、肿瘤抑制基因的失活,最直观的表现就是在机体受到各种有害刺激时,ROS 生成加剧导致肿瘤组织中氧化和抗氧化水平失衡,从而对肿瘤组织中的氧化应激产生保护性抑制作用,进而抑制肿瘤生长。ROS、GSH、SOD 都是氧化应激的产物,可作为检测氧化应激的重要指标。SOD 氧化物分解酶,具有抗氧化防御作用,其活性高低可反映机体清除自由基的能力。GSH 是一种三肽,能清除细胞内脂质和通过有机过氧化反应所生成的毒物,以对抗氧自由基对重要脏器的损害。MDA 是脂质过氧化的最终产物,其水平可以间接反应氧自由基的含量和脂质过氧化损伤的程度<sup>[16]</sup>。本实验采用不同剂量的积雪草苷作用 Saos-2 细胞后,SOD 和 GSH 活性与对照组相比均浓度相关性升高 ( $P<0.05$ ),MDA 的水平则明显降低 ( $P<0.05, 0.01$ ),说明积雪草苷可通过提高机体抗氧化酶活性,抑制氧化应

激而发挥抗肿瘤作用。

综上所述, 积雪草苷主要通过 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路和氧化应激在诱导骨肉瘤 Saos-2 细胞的凋亡中起作用, 本研究为将积雪草苷用于临床肿瘤治疗提供了一定的参考依据。

参考文献

[1] Luetke A, Meyers P A, Lewis I, *et al.* Osteosarcoma treatment-where do we stand? A state of the art review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4): 523-532.

[2] Liu Y, He J, Chen X, *et al.* The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells:involvement of inactivation of ERK and Akt pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 637-645.

[3] 严晨, 邬亚华, 王子瑶, 等. 水飞蓟素对人骨肉瘤 Saos-2 细胞的抑制作用及相关机制 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(7): 966-970.

[4] 杨沛霖, 蒋伟哲, 巫玲, 等. 羟基积雪草苷的药理作用研究进展 [J]. *山东医药*, 2017, 57(17): 102-105.

[5] Song J, Xu H, Lu Q, *et al.* Madecassoside suppresses migration of fibroblasts from keloids:involvement of p38 kinase and PI3K signaling pathways [J]. *Burns*, 2012, 38(5): 677-684.

[6] 潘金丽. 积雪草诱导人卵巢癌细胞 A2780 凋亡机制研究 [J]. *中医学报*, 2018, 33(4): 521-524.

[7] 姚锦英. 积雪草总苷抗 A549 肺癌细胞诱导的肿瘤的实验研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20(4): 384-387.

[8] Song D, Jiang X, Liu Y, *et al.* Asiaticoside attenuates cell growth inhibition and apoptosis induced by A $\beta$  via inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in human brain microvascular endothelial cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 28.

[9] Li Z, You K, Li J, *et al.* Madecassoside suppresses proliferation and invasiveness of HGF-induced human hepatocellular carcinoma cells via PKC-cMET-ERK1/2-COX-2-PGE2 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 33: 24-32.

[10] 周笑, 杨鹏, 于雁. PI3K/AKT/mTOR 信号转导通路与肿瘤 [J]. *国际免疫学杂志*, 2016, 39(3): 280-284.

[11] Lim H J, Crowe P, Yang J. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(4): 671-689.

[12] Courtney K D, Corcoran R B, Engelman J A. The PI3K pathway as drug target in human cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 28(6): 1075-1083.

[13] 肖亮, 殷小成. PI3K/AKT/mTOR 信号通路在肿瘤中的研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(12): 1858-1861.

[14] Zhou Y, Shurin G V, Zhong H, *et al.* Schwann cells augment cell spreading and metastasis of lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(20): 5927-5939.

[15] Kong D L, Liu Y, Wang J Y, *et al.* Sodium cantharidinate suppresses human osteosarcoma MG?63 cell proliferation and induces cell cycle arrest by inhibition of PI3K/AKT activation [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(2): 1351-1358.

[16] 孙彦, 熊辉, 宋俊, 等. 血清肿瘤标志物联合 ROS、SOD、MDA、GSH-Px 在消化道恶性肿瘤中的检测意义分析 [J]. *中国医学创新*, 2012, 9(16): 7-9..