

布托啡诺调节 FOXO3-FOXMI 信号轴对骨肉瘤细胞生物活性和化疗药物耐药性的实验研究

奥婷婷, 姜祯珍, 张 熙 (十堰市人民医院麻醉科, 湖北十堰 442000)

摘要: 目的 探究布托啡诺 (BUT) 调节叉头框蛋白 O3 (FOXO3) - 叉头框蛋白 M1 (FOXMI) 信号轴对骨肉瘤细胞生物活性和化疗药物耐药性的影响。方法 将 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 (CDDP) 处理的 CDDP 耐药 MG-63 细胞 (MG-63/CDDP) 分为对照组 (MG-63/CDDP 细胞用含 0.05g/dl DMSO 培养液处理)、BUT 组 (40 $\mu\text{g/ml}$ BUT 处理 MG-63/CDDP 细胞)、JY-2 组 (用 100 $\mu\text{mol/L}$ FOXO3-FOXMI 抑制剂 JY-2 处理 MG-63/CDDP 细胞) 和 BUT+JY-2 组 (用 40 $\mu\text{g/ml}$ BUT 以及 100 $\mu\text{mol/L}$ JY-2 处理 MG-63/CDDP 细胞)。CCK8 法检测 MG-63/CDDP 细胞活性; 流式细胞术检测 MG-63/CDDP 细胞凋亡情况; Transwell 法检测 MG-63/CDDP 细胞迁移、侵袭情况; Western blot 检测自噬蛋白以及 FOXO3-FOXMI 信号通路相关蛋白表达。结果 与 MG-63 细胞相比, MG-63/CDDP 细胞 IC_{50} 增加 ($20.56 \pm 2.52 \mu\text{mol/L}$ vs $0.97 \pm 0.10 \mu\text{mol/L}$), 差异具有统计学意义 ($q=19.017, P<0.05$), 筛选出较适浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 用于后续实验。与对照组相比, BUT 组 MG-63/CDDP 细胞 A 值 (0.43 ± 0.05 vs 0.68 ± 0.06), 细胞迁移数量 (63.63 ± 7.58 个 vs 114.56 ± 10.57 个) 以及侵袭数量 (43.38 ± 4.58 个 vs 79.56 ± 8.48 个)、自噬相关蛋白 Beclin1 (0.31 ± 0.05 vs 0.62 ± 0.07) 和微管相关蛋白轻链 3 (LC3)-II/I 蛋白 (0.51 ± 0.08 vs 0.98 ± 0.11) 水平均下降 ($q=6.763 \sim 9.591$, 均 $P<0.05$), 凋亡率 ($28.57\% \pm 3.14\%$ vs $8.67\% \pm 1.46\%$), FOXO3 (0.72 ± 0.08 vs 0.33 ± 0.04), FOXMI (1.22 ± 0.15 vs 0.70 ± 0.08) 蛋白水平均上升 ($q=14.077, 10.681, 7.493$, 均 $P<0.05$), 而 JY-2 组 MG-63/CDDP 细胞 A 值 (0.99 ± 0.13 vs 0.68 ± 0.06), 细胞迁移数量 (147.59 ± 15.37 个 vs 114.56 ± 10.57 个) 以及侵袭数量 (111.83 ± 12.58 个 vs 79.56 ± 8.48 个), Beclin1 (0.94 ± 0.11 vs 0.62 ± 0.07), LC3-II/I 蛋白 (1.27 ± 0.13 vs 0.98 ± 0.11) 水平均升高 ($q=4.171 \sim 6.012$, 均 $P<0.05$), 凋亡率 ($4.56\% \pm 0.86\%$ vs $8.67\% \pm 1.46\%$), FOXO3 (0.17 ± 0.01 vs 0.33 ± 0.04), FOXMI (0.46 ± 0.03 vs 0.70 ± 0.08) 蛋白水平降低 ($q=5.941, 9.505, 6.881$, 均 $P<0.05$), 差异具有统计学意义。JY-2 逆转了 BUT 对 MG-63/CDDP 细胞活性和化疗耐药性的有利影响。结论 BUT 可能通过激活 FOXO3-FOXMI 信号通路调节骨肉瘤细胞的细胞活性和 CDDP 耐药性。

关键词: 布托啡诺; 叉头框蛋白 O3- 叉头框蛋白 M1 信号通路; 骨肉瘤; 顺铂

中图分类号: R738.1; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 06-037-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.06.006

Experimental Studies Butorphanol on the Biological Activity and Chemotherapy Drug Resistance of Osteosarcoma Cells by Regulating the FOXO3-FOXMI Signal Axis

AO Tingting, JIANG Zhenzhen, ZHANG Xi (Department of Anesthesiology, Shiyan People's Hospital, Hubei Shiyan 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the impacts of butorphanol (BUT) on the biological activity and chemotherapy drug resistance of osteosarcoma cells by regulating the forkhead box protein O3 (FOXO3)-forkhead box protein M1 (FOXMI) signal axis. **Methods** CDDP resistant MG-63 cells (MG-63/CDDP) treated with 2.0 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin (CDDP) were separated into control group (MG-63/CDDP cells were treated with 0.05% DMSO medium), BUT group (MG-63/CDDP cells were treated with 40 $\mu\text{g/mL}$ BUT), JY-2 group (MG-63/CDDP cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ FOXO3-FOXMI inhibitor JY-2), and BUT+JY-2 group (MG-63/CDDP cells were treated with 40 $\mu\text{g/mL}$ BUT and 100 $\mu\text{mol/L}$ JY-2). CCK8 method was applied to detect MG-63/CDDP cell activity. Flow cytometry was used to detect apoptosis in MG-63/CDDP cells. The Transwell method was applied to detect the migration and invasion of MG-63/CDDP cells; Western blot was applied to detect the expression of autophagy proteins and proteins related to the FOXO3-FOXMI signaling pathway. **Results** Compared with MG-63 cells, the IC_{50} ($20.56 \pm 2.52 \mu\text{mol/L}$ vs ($0.97 \pm 0.10 \mu\text{mol/L}$) of MG-63/CDDP cells was increased, and the differences was

基金项目: 湖北省卫生健康委科研项目 (WJ2023F090)。

作者简介: 奥婷婷 (1988-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 麻醉, E-mail: a2q97bw@163.com。

通讯作者: 姜祯珍 (1984-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 麻醉, E-mail: jiangzz3884@163.com。

statistically significant ($q=19.017$, $P<0.05$), and the optimal concentration of $1 \mu\text{mol/L}$ CDDP was selected for subsequent experiments. Compared with the control group, the A value (0.43 ± 0.05 vs 0.68 ± 0.06), numbers of cell migration (63.63 ± 7.58 vs 114.56 ± 10.57) and invasion (43.38 ± 4.58 vs 79.56 ± 8.48), and the levels of autophagy-related protein Beclin1 (0.31 ± 0.05 vs 0.62 ± 0.07) and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-II/I proteins (0.51 ± 0.08 vs 0.98 ± 0.11) in the BUT group were reduced ($q=6.763 \sim 9.591$, all $P<0.05$), the apoptosis rate ($28.57\% \pm 3.14\%$ vs $8.67\% \pm 1.46\%$), the levels of FOXO3 (0.72 ± 0.08 vs 0.33 ± 0.04) and FOXM1 (1.22 ± 0.15 vs 0.70 ± 0.08) proteins were increased ($q=14.077, 10.681, 7.493$, all $P<0.05$), however, in the JY-2 group, the A value (0.99 ± 0.13 vs 0.68 ± 0.06), numbers of cell migration (147.59 ± 15.37 vs 114.56 ± 10.57) and invasion (111.83 ± 12.58 vs 79.56 ± 8.48), and the levels of Beclin1 (0.94 ± 0.11 vs 0.62 ± 0.07) and LC3-II/I (1.27 ± 0.13 vs 0.98 ± 0.11) proteins in the JY-2 group were increased ($q=4.171 \sim 6.012$, all $P<0.05$), the apoptosis rate ($4.56\% \pm 0.86\%$ vs $8.67\% \pm 1.46\%$), the levels of FOXO3 (0.17 ± 0.01 vs 0.33 ± 0.04) and FOXM1 (0.46 ± 0.03 vs 0.70 ± 0.08) proteins were reduced ($q=5.941, 9.505, 6.881$, all $P<0.05$), and the differences were statistically significant, respectively. JY-2 reversed the beneficial effects of BUT on MG-63/CDDP cell activity and chemotherapy resistance. **Conclusion** BUT may regulate the cell activity and CDDP resistance of osteosarcoma cells by activating the FOXO3-FOXM1 signaling pathway.

Keywords: butorphanol; forkhead box protein O3-forkhead box protein M1 signaling pathway; osteosarcoma; cisplatin

骨肉瘤主要发生在青少年和年轻人群, 由于进展和转移迅速, 其患者预后非常差, 五年生存率不到 30%^[1]。化疗如阿霉素 (Doxorubicin)、顺铂 (Cisplatin, CDDP)、甲氨蝶呤 (methotrexate) 已被认为是骨肉瘤的常规治疗方法^[2], 但复发和转移仍无法克服, 化疗耐药性降低了治疗效率^[3]。骨肉瘤耐药的分子机制和病因尚不清楚。因此, 寻找新药物降低骨肉瘤化疗耐药性至关重要。布托啡诺 (Butorphanol, BUT) 是一种人工合成的阿片类受体部分激动剂, 临床上主要用于不同类型疼痛的辅助治疗, 包括术中或术后中度至重度疼痛或急性头痛和偏头痛^[4]。近期发现, BUT 可以在癌症治疗方面起到积极效果, 例如, BUT 降低了肝癌细胞活力、血管生成和迁移^[5]。近期发现, BUT 可抑制骨肉瘤的增殖和迁移^[6], 但 BUT 是否对骨肉瘤细胞的化疗耐药性产生影响尚未见报道。叉头框蛋白 O3 (forkhead box protein O3, FOXO3) - 叉头框蛋白 M1 (forkhead box protein M1, FOXM1) 信号通路是癌症化疗耐药性增敏的关键通路, 如激活 FOXO3-FOXM1 轴不仅可以阻断肺癌细胞周期, 导致癌细胞凋亡, 克服对厄洛替尼的获得性耐药性, 还能使药物转运蛋白致敏, 从而限制 5-氟尿嘧啶耐药结肠肿瘤进展^[7-8]。近期报道称, FOXO3-FOXM1 轴是关键癌症药物靶点和癌症耐药性的调节剂^[9], 那 BUT 是否可以调控 FOXO3-FOXM1 轴减轻骨肉瘤化疗耐药性还未可知。因此本研究旨在探讨 BUT 对骨肉瘤细胞 CDDP 耐药性的影响及机制, 以期为 BUT 应用于骨肉瘤的治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人骨肉瘤细胞系 MG-63 (武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 仪器与试剂 BUT (南京北鱼生物科技有限

公司); CDDP (上海源叶生物科技有限公司); 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8) 试剂盒 (无锡云萃生物科技有限公司); 膜联蛋白 V (Annexin V) - 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) / 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染细胞凋亡检测试剂盒 [弗元 (上海) 生物科技有限公司]; FOXO3, FOXM1, 自噬相关蛋白 Beclin1, 微管相关蛋白轻链 3 (microtubule associated protein light chain 3, LC3) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (Abcam)。Eclipse TiS 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司); iMark680 多功能酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 MG-63/CDDP 细胞培养: 将购买的 MG-63 细胞在补充有 10g/dl 热灭活胎牛血清、青霉素 (100U/ml) 和链霉素 (100U/ml) 的 Dulbecco 改良 Eagle (DMEM) 培养液中培养。为了建立 CDDP 耐药 MG-63 细胞, 将 MG-63 细胞暴露于浓度依次增加的含 CDDP ($0 \sim 5 \mu\text{mol/L}$) 培养液, 并每 1 ~ 2 天更换一次新鲜培养液。在建立结束时, 将细胞维持在含有 $2.0 \mu\text{mol/L}$ CDDP 的培养液中。耐药骨肉瘤细胞系命名为 MG-63/CDDP。实验前三天去除培养液中的 CDDP。

1.3.2 CCK8 法检测 MG-63, MG-63/CDDP 细胞活性: 将 MG-63 和 MG-63/CDDP 细胞接种在含有不同浓度 CDDP ($0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5$ 和 $2.0 \mu\text{mol/L}$) 的 Eagle 培养液培养 72h。用 CCK8 测定法检测 MG-63 和 MG-63/CDDP 细胞活力: 即将细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种在 96 孔板上, 实验结束时, 用含有 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 的 $100 \mu\text{l}$ 新鲜培养液培养。培养 2h 后, 通过使用微孔板读取器测量 450nm 处的

吸光度(A), 计算细胞活力和半数抑制浓度(IC_{50})。所有测定均独立进行, 一式三份。细胞活力($\%$)= $(A_{\text{测量值}}-A_{\text{空白值}})/(A_{\text{对照值}}-A_{\text{空白值}})\times 100$ 。

1.3.3 药物处理及分组: 将 $2.0\mu\text{mol/L}$ 处理的 MG-63/CDDP 细胞分为对照组、BUT 组、JY-2 组和 BUT+JY-2 组。对照组 MG-63/CDDP 细胞用含 0.05g/dl DMSO 的培养液处理; BUT 组用 $40\mu\text{g/ml}$ BUT 处理 MG-63/CDDP 细胞^[10]; JY-2 组用 $100\mu\text{mol/L}$ FOXO3-FOXMI 通路抑制剂 JY-2 处理 MG-63/CDDP 细胞^[11]。BUT+JY-2 组用 $40\mu\text{g/ml}$ BUT 以及 $100\mu\text{mol/L}$ JY-2 处理 MG-63/CDDP 细胞, 培养 24h 后按照 1.3.2 方法测量 MG-63/CDDP 细胞 A 值。

1.3.4 流式细胞术检测 MG-63/CDDP 细胞凋亡情况: 将药物处理的 MG-63/CDDP 细胞经胰蛋白酶消化和离心后, 收集 MG-63/CDDP 细胞 (1×10^6 个/ml) 与 $5\mu\text{l}$ AnnexinV-FITC 和 $5\mu\text{l}$ PI 混合孵育 30min, 通过流式细胞仪分析 MG-63/CDDP 细胞凋亡率。

1.3.5 Transwell 法检测 MG-63/CDDP 细胞迁移、侵袭情况: 将各组 MG-63/CDDP 细胞稀释到 3.0×10^5 个/ml, 吸取 $100\mu\text{l}$ MG-63/CDDP 细胞接种到涂有 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室上室 (在未涂 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室中评估细胞的迁移), 下室添加含有 10g/dl FBS 的 Eagle 培养液, 培养 24h 后使用棉签轻轻拭去上室中细胞, 用 PBS 洗涤, 并在室温下用 4g/dl 多聚甲醛固定、结晶紫染色。最后使用显微镜观察 MG-63/CDDP 细胞迁移、侵袭数量。

1.3.6 Western blot 检测自噬蛋白以及 FOXO3-FOXMI 信号通路相关蛋白表达: 收集各组 MG-63/CDDP 细胞, 使用冷 RIPA 缓冲液使细胞裂解提取总蛋白。接下来, 用 10g/dl SDS-PAGE 凝胶电泳分离 $30\mu\text{g}$ 总蛋白, 然后转移到 PVDF 膜上。将膜在含有 5g/dl 脱脂奶粉的 PBS 中封闭 1h, 然后与一级抗体在 4°C 下孵育过夜: FOXO3 ($1:1000$), FOXMI ($1:1000$), Beclin1 ($1:2000$), LC3 ($1:2000$) 和 GAPDH ($1:2000$)。TBST 洗膜后, 与二抗室温下孵育 2h, 用化学发光试剂显色蛋白质,

用 Image J 软件分析蛋白质灰度。
1.4 统计学分析 所有统计分析均用软件 SPSS 25.0 完成, 计量资料经正态分布和方差齐性检验后以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果
2.1 不同浓度 CDDP 对 MG-63 细胞和 MG-63/CDDP 细胞活力的影响 见图 1。与 MG-63 细胞相比, MG-63/CDDP 细胞 IC_{50} ($20.56\pm 2.52\mu\text{mol/L}$ vs $0.97\pm 0.10\mu\text{mol/L}$) 升高, 差异具有统计学意义 ($q=19.017, P<0.05$)。后续实验选择 $2.0\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CDDP 维持 MG-63/CDDP 细胞耐药性。

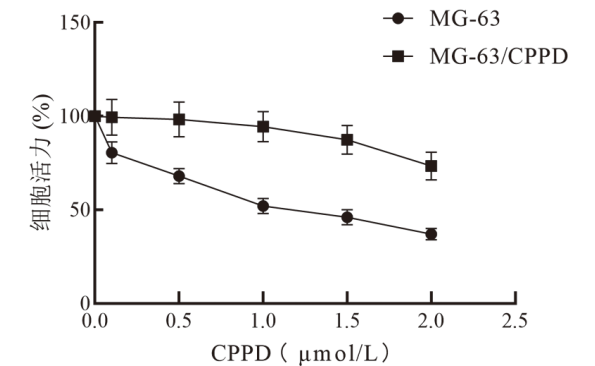


图1 不同浓度 CDDP 对 MG-63 细胞和 MG-63/CDDP 细胞活力的影响

2.2 BUT 对 MG-63/CDDP 细胞活力、细胞凋亡率、细胞迁移数量及细胞侵袭数量的影响 见表 1, 图 2, 3。与对照组相比, BUT 组 MG-63/CDDP 的 A 值降低 ($q=7.841$), 细胞凋亡率上升 ($q=14.077$), 细胞迁移、侵袭数量减少 ($q=9.591, 9.195$), 而 JY-2 组 MG-63/CDDP 细胞的 A 值 ($q=5.303$) 升高, 凋亡率下降 ($q=5.941$), 细胞迁移数量以及侵袭数量增加 ($q=4.337, 5.210$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与 BUT 组相比, BUT+JY-2 组 MG-63/CDDP 细胞的 A 值 ($q=4.077$) 升高, 凋亡率下降 ($q=6.926$), 细胞迁移数量以及侵袭数量增多 ($q=8.162, 5.833$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

表 1 BUT 对 MG-63/CDDP 细胞活力、细胞凋亡率、细胞迁移数量及细胞侵袭数量的影响 ($n=6, \bar{x}\pm s$)						
项目	对照组	BUT 组	JY-2 组	BUT+JY-2 组	F	P
细胞活力 (A 值)	0.68 ± 0.06	0.43 ± 0.05	0.99 ± 0.13	0.56 ± 0.06	51.760	<0.001
细胞凋亡率 (%)	8.67 ± 1.46	28.57 ± 3.14	4.56 ± 0.86	18.42 ± 1.74	175.100	<0.001
迁移细胞数量 (个)	114.56 ± 10.57	63.63 ± 7.58	147.59 ± 15.37	101.43 ± 8.44	60.699	<0.001
侵袭细胞数量 (个)	79.56 ± 8.48	43.38 ± 4.58	111.83 ± 12.58	62.47 ± 6.58	68.800	<0.001

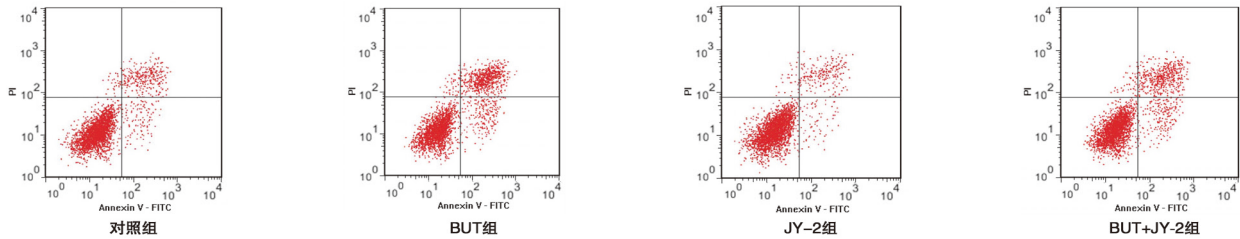


图2 流式细胞术检测各组 MG-63/CDDP 细胞凋亡率

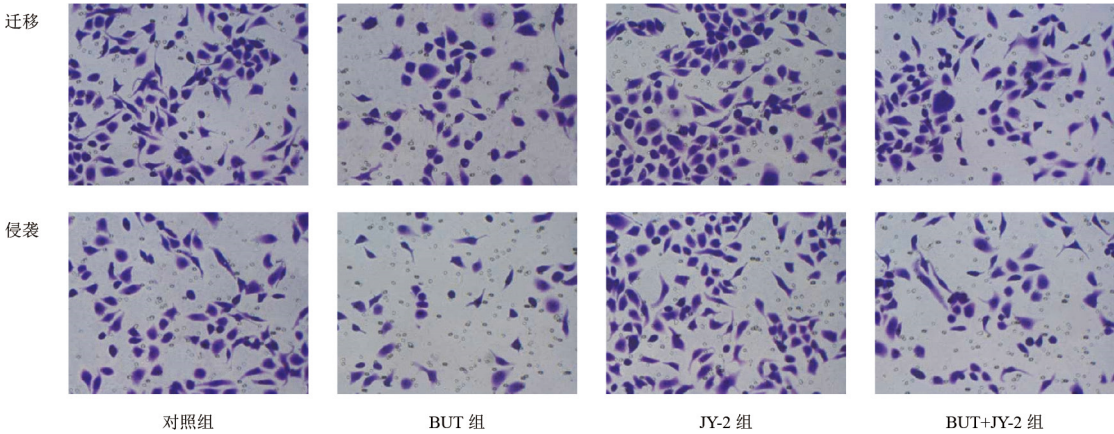


图3 Transwell 法检测各组 MG-63/CDDP 细胞迁移与侵袭

2.3 BUT 对 MG-63/CDDP 细胞自噬蛋白的影响 见表 2, 图 4, 5。与对照组相比, BUT 组 MG-63/CDDP 细胞 Beclin1 和 LC3-II/I 蛋白水平减少 ($q=6.763, 8.464$), FOXO3 和 FOXM1 蛋白水平上调 ($q=10.681, 7.493$), 而 JY-2 组 MG-63/CDDP 细胞 Beclin1 和 LC3-II/I 蛋白水平升高 ($q=6.012, 4.171$), FOXO3 和 FOXM1 蛋白水平下调 ($q=9.505, 6.881$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与 BUT 组相比, BUT+JY-2 组 MG-63/CDDP 细胞 Beclin1 和 LC3-II/I 蛋白水平上调 ($q=6.900, 6.916$), FOXO3 和 FOXM1 蛋白水平下调 ($q=7.010, 5.571$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

表 2 BUT 对 MG-63/CDDP 细胞自噬蛋白、FOXO3/FOXM1 通路相关蛋白表达的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	BUT 组	JY-2 组	BUT+JY-2 组	<i>F</i>	<i>P</i>
Beclin1/GAPDH	0.62 ± 0.07	0.31 ± 0.05	0.94 ± 0.11	0.53 ± 0.06	70.996	<0.001
LC3-II/LC3-I	0.98 ± 0.11	0.51 ± 0.08	1.27 ± 0.13	0.85 ± 0.09	54.782	<0.001
FOXO3	0.33 ± 0.04	0.72 ± 0.08	0.17 ± 0.01	0.45 ± 0.05	121.868	<0.001
FOXM1	0.70 ± 0.08	1.22 ± 0.15	0.46 ± 0.03	0.81 ± 0.10	60.719	<0.001

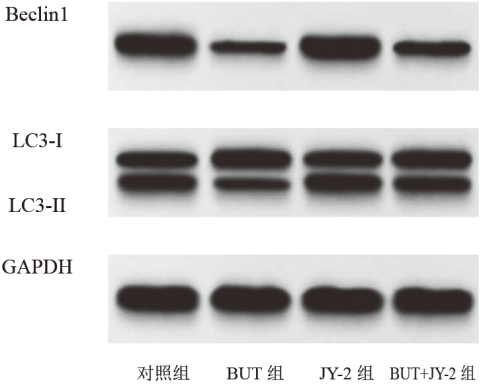


图4 Western blot 检测各组 MG-63/CDDP 细胞自噬蛋白表达

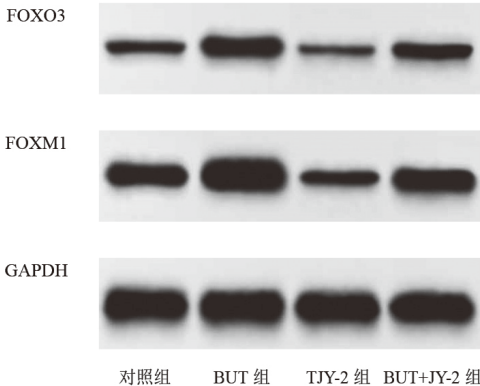


图5 Western blot 检测各组 MG-63/CDDP 细胞 FOXO3/ FOXM1 信号通路相关蛋白表达

3 讨论

BUT 是一种合成阿片类药物,可用作鼻喷雾剂来治疗偏头痛,也可用作中度至重度疼痛麻醉镇痛药或作为全身麻醉的辅助手段^[12-13]。此外,BUT 已被证明可以预防肿瘤生长和转移^[14]。例如,GUO 等^[5]人发现,BUT 在体外可以抑制肝癌细胞的增殖和迁移,BUT 在体内降低了裸鼠肝细胞癌的体内肿瘤生长。近期研究显示,BUT 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭及移植瘤生长^[15]。由此可见,BUT 可能是骨肉瘤的潜在治疗药物。但是 BUT 对骨肉瘤细胞 CDDP 耐药性的影响尚未可知。研究发现,细胞凋亡途径的异常可以导致肿瘤细胞对化疗药物的耐药性增加,例如,Bcl-2 家族蛋白的过度表达会抑制细胞凋亡的发生,从而使癌细胞对化疗药物产生耐药性。此外,一些细胞凋亡途径的调控因子在癌细胞中发生突变,也会使癌细胞对治疗产生抗性。因此,细胞凋亡过程是逆转癌症耐药性的有效靶标^[16-17]。邹志聪等^[18]发现 BUT 可增加白血病耐药细胞对化疗药物的敏感性。本研究发现,BUT 可降低 MG-63/CDDP 细胞活性、迁移及侵袭能力,升高细胞凋亡率,表明 BUT 可改善骨肉瘤细胞 CDDP 耐药性。

此外,自噬与细胞凋亡密切相关,自噬可抑制细胞凋亡^[19]。先前研究发现,可以通过抑制骨肉瘤细胞自噬和诱导骨肉瘤耐药细胞凋亡来降低 CDDP 耐药性^[16]。Beclin1 和 LC3-II/I 是自噬的关键调节蛋白,Beclin1 是由 BECN1 基因编码的,其表达水平在细胞自噬过程中起着决定性的作用,通过上调 Beclin1 在细胞中的表达能够启动自噬的发生,并且能够通过调节自噬活性来影响肿瘤的发生和进展。LC3-II/I 是微管相关蛋白 1 轻链 3 的同源物,LC3 在自噬过程中被修饰成 LC3-I 和 LC3-II 两种形式,其转化过程反映了自噬过程的活动程度^[20]。本研究发现,BUT 可降低 MG-63/CDDP 细胞中 Beclin1 和 LC3-II/I 蛋白水平,表明 BUT 可能通过抑制 MG-63/CDDP 细胞自噬,进而促进细胞凋亡,从而降低骨肉瘤细胞 CDDP 耐药性。

FOXO3-FOXM1 信号轴是近年来研究的一个新发现,涉及了两个转录因子 FOXO3 和 FOXM1,在细胞周期调控、细胞自噬和肿瘤发生中起着重要作用。自噬是一种通过溶酶体降解细胞内受损或多余的蛋白质和细胞器的过程,有助于维持细胞的稳态,FOXO3 和 FOXM1 之间的相互作用可以调节自噬相关基因的表达,从而影响自噬的进程。FOXO1 和 FOXO3 参与自噬的调节,在癌细胞中,为了响应应激反应,FOXO1 可以被沉默信息调节因子 2 (silent information regulator 2, Sirtuin-2) 乙

酰化,其中乙酰化的 FOXO1 可以与自噬相关蛋白 7 (autophagy related protein 7, Atg-7) 结合,从而调控自噬并促进肿瘤抑制^[21]。FOXO3-FOXM1 信号轴已被证实可以对多种癌症的化疗耐药性产生影响,例如,激活 FOXO3-FOXM1 信号传导可以抑制非小细胞肺癌的进展并增强其紫杉醇敏感性^[22]。AIMJONGJUN 等^[23]人也发现,上调 FOXO3 和 FOXM1 的水平可以改善鼻咽癌的拉帕替尼敏感性。FOXM1 在骨肉瘤中高表达,其过表达促进骨肉瘤细胞的 CDDP 耐药^[24-25]。XIE 等^[26]人近期报道称,FOX 家族的泛癌多组学前景与临床肿瘤耐药性相关。本研究发现,BUT 处理后,MG-63/CDDP 细胞 FOXO3 和 FOXM1 蛋白水平升高,由此猜想 BUT 可能通过上调 FOXO3-FOXM1 信号轴抑制 MG-63/CDDP 细胞恶性生物活性。为了进一步证实此猜想,本研究用 FOXO3-FOXM1 信号通路抑制剂 JY-2 处理 MG-63/CDDP 细胞,结果发现 JY-2 干预可降低 MG-63/CDDP 细胞中 FOXO3 和 FOXM1 蛋白水平,且 JY-2 可逆转 BUT 对 MG-63/CDDP 细胞生物活性和化疗药物耐药性的抑制作用。提示 BUT 对 MG-63/CDDP 细胞生物活性和化疗药物耐药性的抑制作用可能是通过上调 FOXO3-FOXM1 信号轴实现的。

综上所述,BUT 可能通过上调 FOXO3-FOXM1 信号轴抑制 MG-63/CDDP 细胞自噬,进而促进细胞凋亡,从而降低骨肉瘤细胞 CDDP 耐药性。本研究证实 BUT 可能是改善骨肉瘤 CDDP 耐药的潜在药物,将为 BUT 的应用提供理论参考。下一步将构建裸鼠移植瘤模型,从体内水平上验证 BUT 的抗骨肉瘤作用与机制。

参考文献:

- [1] 姜富祥,阿尔宾,高飞,等. miR-21 靶向调控 PTEN/PI3K/AKT 通路对骨肉瘤细胞增殖、侵袭和凋亡的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(4): 18-22. JIANG Fuxiang, A Erbin, GAO Fei, et al. Effect of miR-21 targeted regulation of PTEN/PI3K/AKT pathway on the proliferation, invasion and apoptosis of osteosarcoma cells[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(4): 18-22.
- [2] GIACOMINI I, CORTINI M, TINAZZI M, et al. Contribution of mitochondrial activity to doxorubicin-resistance in osteosarcoma cells[J]. Cancers(Basel), 2023, 15(5): 1370.
- [3] NIE Junhua, YANG Tao, LI Hong, et al. Identification of GPC3 mutation and upregulation in a multidrug resistant osteosarcoma and its spheroids as therapeutic target[J]. Journal of Bone Oncology, 2021, 30: 100391.
- [4] ZHU Zhihua, ZHANG Wenyu. Efficacy and safety of butorphanol use in patient-controlled analgesia: a meta-analysis[J]. Evidence-based Complementary and

- Alternative Medicine : 2021, 2021: 5530441.
- [5] GUO Peilei, HU Qiangfu, WANG Jiandong, et al. Butorphanol inhibits angiogenesis and migration of hepatocellular carcinoma and regulates MAPK pathway[J]. Journal of Antibiotics, 2022, 75(11): 626-634.
- [6] CUI Pengfei, XIN Deqian, LI Fu, et al. Butorphanol suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma by promoting the expression of piRNA hsa_piR_006613[J]. Frontiers in Oncology, 2022, 12: 775132.
- [7] LI Junnan, CHEN Pengchen, WU Qiushuang, et al. A novel combination treatment of antiADAM17 antibody and erlotinib to overcome acquired drug resistance in non-small cell lung cancer through the FOXO3a/FOXO1 axis[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2022, 79(12): 614.
- [8] GHOSH S, SINGH R, VANWINKLE Z M, et al. Microbial metabolite restricts 5-fluorouracil-resistant colonic tumor progression by sensitizing drug transporters via regulation of FOXO3-FOXO1 axis[J]. Theranostics, 2022, 12(12): 5574-5595.
- [9] YAO Shang, FAN L Y, LAM E W. The FOXO3-FOXO1 axis: a key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance[J]. Seminars in Cancer Biology, 2018, 50: 77-89.
- [10] WANG Baosheng, LI Yuwen, SHEN Yangyang, et al. Butorphanol inhibits the malignant biological behaviors of ovarian cancer cells via down-regulating the expression of TMEFF1[J]. OncoTargets and Therapy, 2020, 13: 10973-10981.
- [11] CHOI H E, KIM Y, LEE H J, et al. Novel FoxO1 inhibitor, JY-2, ameliorates palmitic acid-induced lipotoxicity and gluconeogenesis in a murine model [J]. European Journal of Pharmacology, 2021, 899: 174011.
- [12] MENG Tao, LIN Xiaowen, LI Ximing, et al. Pre-anesthetic use of Butorphanol for the prevention of emergence agitation in thoracic surgery: A multicenter, randomized controlled trial [J]. Frontiers in Medicine(Lausanne), 2022, 9: 1040168
- [13] THIGPEN J C, ODLE B L, HARIRFOROOSH S. Opioids: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics in neonates, infants, and children [J]. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2019, 44(5):591-609.
- [14] XIE Nan, MATIGIAN N, VITHANAGE T, et al. Effect of perioperative opioids on cancer-relevant circulating parameters:Mmu opioid receptor and toll-like receptor 4 activation potential,and proteolytic profile[J]. Clinical Cancer Research, 2018, 24(10): 2319-2327.
- [15] 杜建国, 张迅, 宗士兰, 等. 布托啡诺通过 Hippo/YAP 信号通路影响骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(9): 797-803.
- DU Jianguo, ZHANG Xun, ZONG Shilan, et al. Butorphanol affects the proliferation,migration and invasion of osteosarcoma MG-63 cells via Hippo/YAP signaling pathway[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2023, 30(9): 797-803.
- [16] MENG Chenyang, ZHAO Zhenqun, BAI Rui, et al. MicroRNA22 regulates autophagy and apoptosis in cisplatin resistance of osteosarcoma[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(5): 3911-3921.
- [17] 刘伟, 周杨, 边超, 等. miR-495 对食管癌细胞株 Eca109 在不同放射剂量和顺铂浓度作用的影响及机制研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(4): 13-17, 29.
- LIU Wei, ZHOU Yang, BIAN Chao, et al. Effect of miR-495 on esophageal cancer cell line Eca109 at different radiation doses and cisplatin concentrations and its mechanism[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(4): 13-17, 29.
- [18] 邹志聪, 温婧, 戴龙彬, 等. 布托啡诺逆转 ABCB1 蛋白诱导的白血病多重耐药的效果和机制 [J]. 中山大学学报 (医学版), 2018, 39(4): 526-531.
- ZOU Zhicong, WEN Jing, DAI Longbin, et al. Efficiency and mechanism sensitizing ABCB1-mediated multidrug resistance of leukemia cells by butorphanol as a synthetic opioid [J]. Journal of Sun Yat-Sen University (Medical Sciences), 2018, 39(4): 526-531.
- [19] MARIÑO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(2): 81-94.
- [20] 曲志梅, 董伟, 刘艳萍. 维奈克拉增强 MDS 细胞系对地西他滨化疗敏感性机制的实验研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(3): 53-57, 78.
- QU Zhimei, DONG Wei, LIU Yanping. Experimental study on the mechanism of venetoclax enhancing the sensitivity of MDS cell lines to decitabine chemotherapy[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(3): 53-57, 78.
- [21] KÖRHOLZ K, RIDINGER J, KRUNIC D, et al. Broad-spectrum HDAC inhibitors promote autophagy through FOXO transcription factors in neuroblastoma[J]. Cells, 2021, 10(5): 1001.
- [22] LI Xiaoping, YANG Bo, REN Haixia, et al. Hsa_circ_0002483 inhibited the progression and enhanced the Taxol sensitivity of non-small cell lung cancer by targeting miR-182-5p[J]. Cell Death Disease, 2019, 10(12): 953.
- [23] AIMJONGJUN S, MAHMUD Z, JIRAMONGKOL Y, et al. Lapatinib sensitivity in nasopharyngeal carcinoma is modulated by SIRT2-mediated FOXO3 deacetylation[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1106.
- [24] SHI Shaoyan, WANG Qian, DU Xiaolong. Comprehensive bioinformatics analysis reveals the oncogenic role of FoxM1 and its impact on prognosis, immune microenvironment, and drug sensitivity in osteosarcoma[J]. Journal of Applied Genetics, 2023, 64(4): 779-796.
- [25] 尹诗源, 李雨晴, 尹玉, 等. 探讨骨肉瘤化疗耐药中 FoxM1 与 C-myc 的关系及其作用机制 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2023, 39(2): 195-200.
- YIN Shiyuan, LI Yuqing, YIN Yu, et al. Correlation of (下转第 66 页)

- Cellular mitophagy: mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation[J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 736-766.
- [4] NAKAHARA Y, MITSUI J, DATE H, et al. Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus in PLA2G4C for multiple system atrophy[J]. *medRxiv*[Preprint], 2023.doi:10.1101/2023.05.02.23289328.
- [5] PENG Zhangxiao, CHANG Yanxin, FAN Jianhui, et al. Phospholipase A2 superfamily in cancer[J]. *Cancer Letters*, 2021, 497: 165-177.
- [6] WARD K E, SENGUPTA R, ROPA J P, et al. The cytosolic phospholipase A2 α N-terminal C2 domain binds and oligomerizes on membranes with positive curvature[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(647): 647.
- [7] OH M, JANG S Y, LEE J Y, et al. The lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor Darapladib sensitises cancer cells to ferroptosis by remodelling lipid metabolism[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5728.
- [8] OLSEN R S, ANDERSSON R E, ZAR N, et al. Prognostic significance of PLA2G4C gene polymorphism in patients with stage II colorectal cancer[J]. *Acta Oncologica*, 2016, 55(4): 474-479.
- [9] NANASHIMA N, YAMADA T, SHIMIZU T, et al. Deletion of phospholipase A2 group IVC induces apoptosis in rat mammary tumour cells by the nuclear factor- κ B/lipocalin 2 pathway[J]. *Biochemical Journal*, 2015, 469(2): 315-324.
- [10] WANG Yunju, CHANG Songbin, WANG C Y, et al. The selective lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib triggers irreversible actions on glioma cell apoptosis and mitochondrial dysfunction[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2020, 402: 115133.
- [11] LIM S C, LEE T B, KANG B S, et al. Extracellular acidity-mediated expression of cPLA2 γ confers resistance in gastric cancer cells[J]. *Anticancer Research*, 2021, 41(1): 211-218.
- [12] 陈思言, 张伶俐, 杨丽华. 弥漫性大B细胞淋巴瘤组织中 miR-448 和 KDM2B 的水平表达及临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(4): 128-133.
CHEN Siyan, ZHANG Lingli, YANG Lihua. Expression levels and clinical significance of miR-448 and KDM2B in diffuse large B-cell lymphoma tissues[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(4): 128-133.
- [13] LI Anqi, GAO Meng, LIU Bilin, et al. Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13(5): 444.
- [14] SMITH A G, MACLEOD K F. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance[J]. *Journal of Pathology*, 2019, 247(5): 708-718.
- [15] PANIGRAHI D P, PRAHARAJ P P, BHOL C S, et al. The emerging, multifaceted role of mitophagy in cancer and cancer therapeutics[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020, 66: 45-58.
- [16] 黄基峰, 张怡, 晏琛. 线粒体自噬在肿瘤干细胞中作用的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(5): 255-259.
HUANG Jifeng, ZHANG Yi, YAN Chen. Research advances in the role of mitophagy in cancer stem cells[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2020, 47(5): 255-259.
- [17] TANG Junwei, PENG Wen, JI Jiangzhou, et al. GPR176 promotes cancer progression by interacting with G protein GNAS to restrain cell mitophagy in colorectal cancer[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(12): e2205627.
- [18] JIANG Ying, KRANTZ S, QIN Xiang, et al. Caveolin-1 controls mitochondrial damage and ROS production by regulating fission - fusion dynamics and mitophagy[J]. *Redox Biology*, 2022, 52: 102304.
- [19] FENG Ji, ZHOU Jing, WU Yong, et al. Targeting mitophagy as a novel therapeutic approach in liver cancer[J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 2164-2165.
- [20] LI Yun, CHEN Hengxing, LU Daning, et al. Mitophagy is a novel protective mechanism for drug-tolerant persister (DTP) cancer cells[J]. *Autophagy*, 2023, 19(9): 2618-2619.
- [21] DENNY W A. Inhibitors and activators of the p38 mitogen-activated MAP kinase (MAPK) family as drugs to treat cancer and inflammation[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2022, 22(3): 209-220.
- [22] LIU Chi, JIANG Shan, XIE Hui, et al. Long non-coding RNA AC245100.4 contributes to prostate cancer migration via regulating PAR2 and activating p38-MAPK pathway[J]. *Medical Oncology*, 2022, 39(5): 94.
- [23] TANIGAWA K, TSUKAMOTO S, KOMA Y I, et al. S100A8/A9 induced by interaction with macrophages in esophageal squamous cell carcinoma promotes the migration and invasion of cancer cells via Akt and p38 MAPK pathways[J]. *American Journal of Pathology*, 2022, 192(3): 536-552.
- [24] KWAK A W, LEE J Y, LEE S O, et al. Echinatin induces reactive Oxygen species-mediated apoptosis via JNK/p38 MAPK signaling pathway in colorectal cancer cells[J]. *Phytotherapy Research*, 2023, 37(2): 563-577.
- (上接第42页)
- FoxM1 and c-myc in chemoresistance of osteosarcoma and its mechanism[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2023, 39(2): 195-200.
- [26] XIE Jindong, ZHANG Junsheng, TIAN Wenwen, et al. The pan-cancer multi-omics landscape of FOXO family relevant to clinical outcome and drug resistance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(24): 15647.

收稿日期: 2024-03-19

修回日期: 2024-04-18

收稿日期: 2023-12-07

修回日期: 2024-04-18