

黄芪多糖调控 SP1/Wnt/ β -catenin 信号轴抑制骨肉瘤增殖和转移能力的作用机制研究

李瑞忠¹, 林雁鸿¹, 梁超华¹, 马鑫雨¹, 赵省省¹, 梁道臣² (1. 广东医科大学第一临床医学院, 广东湛江 524001; 2. 广东医科大学中山市人民医院骨科, 广东中山 528400)

摘要: 目的 研究黄芪多糖 (APS) 抑制骨肉瘤细胞增殖和转移能力的作用机制。方法 细胞计数实验 (CCK8) 检测 APS 抑制骨肉瘤细胞 U2OS, HOS, MG63 和成骨细胞 hFOB1.19 的增殖能力, 选择 APS 对骨肉瘤细胞抑制作用最显著的细胞株进行后续实验; 将骨肉瘤细胞分为对照组 (NC 组)、APS 组、APS 与转染 SP1 敲减质粒共处理组 (APS+sh-SP1) 和 APS 与转染 SP1 过表达质粒共处理组 (APS+oe-SP1 组), 蛋白质免疫印迹 (Western Blotting) 法检测各组细胞 SP1 蛋白的表达水平; CCK8 实验检测各组细胞增殖能力。Transwell 实验检测各组细胞转移能力; TOP/FOP Flash 实验检测各组细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路活性; Western Blotting 法检测各组细胞 Wnt3a, β -catenin, 细胞周期蛋白 (CyclinD1)、cMYC, 基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 和 Snail 蛋白表达。结果 骨肉瘤细胞 U2OS, HOS, MG63 和成骨细胞 hFOB1.19 经 APS 处理 48h 后, 细胞增殖抑制率分别为 $62.93\% \pm 4.79\%$, $20.66\% \pm 1.10\%$, $39.31\% \pm 3.20\%$ 和 $5.97\% \pm 0.72\%$, 与成骨细胞 hFOB1.19 相比, APS 显著抑制骨肉瘤细胞的增殖能力, 差异具有统计学意义 ($F=208.400$, $P < 0.001$), 且对骨肉瘤细胞 U2OS 的抑制作用最显著 ($t=20.380$, $P < 0.001$)。与 NC 组相比, APS 组 SP1 蛋白表达、细胞增殖能力、穿膜细胞数、细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性及 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt3a, β -catenin, 下游增殖相关蛋白 CyclinD1, cMYC, 下游转移相关蛋白 MMP2, Snail 表达均降低, 差异具有统计学意义 ($t=9.740 \sim 90.780$, 均 $P < 0.05$)。与 APS 组相比, APS+sh-SP1 组细胞中 SP1 蛋白表达、细胞增殖能力、穿膜细胞数、细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达进一步降低, 差异具有统计学意义 ($t=3.032 \sim 12.940$, 均 $P < 0.05$), 而 APS+oe-SP1 组细胞中 SP1 蛋白表达、细胞增殖能力、穿膜细胞数、细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性及细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达增加, 差异具有统计学意义 ($t=3.350 \sim 22.450$, 均 $P < 0.05$)。结论 APS 靶向负调控 SP1/Wnt/ β -catenin 信号轴抑制骨肉瘤细胞增殖和转移能力。

关键词: 骨肉瘤; 黄芪多糖; 细胞增殖; 细胞转移; SP1/Wnt/ β -catenin 信号轴

中图分类号: R738.1; R730.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 03-037-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.03.007

Mechanism of the Inhibitory Effect of Astragalus Polysaccharide on the Proliferation and Metastasis of Osteosarcoma Regulate by SP1/Wnt/ β -catenin Signaling Axis

LI Ruizhong¹, LIN Yanhong¹, LIANG Chaohua¹, MA Xinyu¹, ZHAO Shengsheng¹, LIANG Daochen² (1. the First Clinical Medical College of Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524001, China; 2. Department of Orthopedics, Zhongshan People's Hospital of Guangdong Medical University, Guangdong Zhongshan 528400, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of astragalus polysaccharide (APS) in inhibiting the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells. **Methods** Cell counting kit-8 (CCK8) assay was used to detect the inhibitory effect of APS on the proliferation of osteosarcoma cell lines U2OS, HOS, MG63 and osteoblast cell line hFOB1.19, the cell line with the most significant inhibitory effect of APS on osteosarcoma cells was selected for subsequent experiments. Osteosarcoma cells were divided into control group (NC group), APS group, APS+sh-SP1 co treatment group with transfected SP1 knockdown plasmid (APS+sh-SP1), and APS+oeSP1 co treatment group with transfected SP1 overexpression plasmid (APS+oeSP1 group). Western blotting was used to detect the expression of SP1 protein in each group. CCK8 assay was used to detect the proliferation ability of each group. Transwell assay was used to detect the metastatic ability of cells in each group. TOP/FOP Flash assay was used to detect the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway. The protein expressions of Wnt3a, β -catenin, CyclinD1, cMYC,

基金项目: 广东省医学科研基金 (B2023353)。

作者简介: 李瑞忠 (1998-), 男, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 骨肉瘤, E-mail: 1459741483@qq.com。

通讯作者: 梁道臣 (1971-), 男, 博士后, 主任医师, 研究方向: 骨质疏松、骨肿瘤, E-mail: liangdc@126.com。

matrix metalloproteinase 2(MMP2) and Snail were detected by western blotting. **Result** After 48h of APS treatment, the cell proliferation inhibition rates of osteosarcoma cells U2OS, HOS, MG63 and osteoblast cells hFOB1.19 were $62.93\% \pm 4.79\%$, $20.66\% \pm 1.10\%$, $39.31\% \pm 3.20\%$ and $5.97\% \pm 0.72\%$, respectively. Compared with osteoblast hFOB1.19, APS significantly inhibited the proliferation of osteosarcoma cells, and the difference was statistically significant ($F=208.400$, $P < 0.001$), and the inhibitory effect on osteosarcoma U2OS cells was the most significant ($t=20.380$, $P < 0.001$). Compared with NC group, SP1 protein expression, cell proliferation ability, number of transmembrane cells, Wnt/ β -catenin signaling pathway activity in cells, Wnt/ β -catenin signaling pathway key proteins Wnt3a, β -catenin, downstream proliferation-related protein CyclinD1, cMYC, and downstream metastasis related proteins MMP2 and Snail in the APS group were decreased, and the differences were statistically significant ($t=9.740 \sim 90.780$, all $P < 0.05$). Compared with the APS group, the expression of SP1 protein, cell proliferation ability, the number of transmembrane cells, the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway and the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins in the APS+sh-SP1 group were further decreased, and the differences were statistically significant ($t=3.032 \sim 12.940$, all $P < 0.05$). Compared with the APS group, the expression of SP1 protein, cell proliferation ability, the number of transmembrane cells, the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway and the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins in the APS+oe-SP1 group were increased, and the differences were statistically significant ($t=3.350 \sim 22.450$, all $P < 0.05$). **Conclusion** APS inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by targeting SP1/Wnt/ β -catenin signaling axis.

Keywords: osteosarcoma; astragalus polysaccharide; cell proliferation; cell transfer; SP1/Wnt/ β -catenin signaling axis

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是最常见的原发性恶性骨肿瘤之一, 最常见于儿童和青少年, 具有高侵袭性和远处转移的特点^[1]。通过化疗, 患者的五年生存率和生活质量得到提高^[2]。然而, 化疗后的耐药性和手术后的远处转移仍然是导致患者预后不良、治疗失败和肿瘤复发的关键原因^[3]。黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 是黄芪中重要的天然活性成分, 近年来其抗肿瘤活性逐渐被发现并被研究, 在宫颈癌中 APS 通过负调控细胞周期抑制肿瘤的增殖能力^[4], 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中 APS 通过调节 miR-195-5p 抑制肿瘤细胞增殖和转移能力^[5]。有研究显示 APS 在骨代谢紊乱治疗中通过调控 Wnt/ β -catenin, BMP/Smads 等信号通路发挥作用^[6], 而 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活对骨肉瘤的发生发展具有促进作用^[7]。因此, 本文对 APS 在骨肉瘤治疗中的作用及机制进行了研究, 为 APS 作为新型的抗骨肉瘤治疗药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 骨肉瘤细胞 U2OS, HOS, MG63 和成骨细胞 hFOB1.19 均购自美国 ATCC 细胞库。

1.2 仪器与试剂 APS (上海麦克林生化科技股份有限公司); U2OS 细胞和 HOS 细胞专用培养液、DMEM 培养液 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 胎牛血清 (FBS) 和胰蛋白酶 (美国 Gibco 试剂公司); CCK8 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); Transwell 小室 (英国 Corning 公司); 蛋白裂解液和 BCA 蛋白浓度检测试剂 (美国 Thermo Fisher 公司); 10g/dl 的 SDS-PAGE 凝胶 (北京索莱宝试剂公司); TOP/FOP Flash 质粒、SP1 敲减质粒 (sh-SP1)

和 SP1 过表达质粒 (oe-SP1) (上海吉凯基因生物技术有限公司); 蛋白上样缓冲试剂和 TOP/FOP Flash 检测试剂盒 (上海碧云天试剂有限公司); PVDF 膜 (美国 Promega 公司); SP1, Wnt3a, β -catenin, 细胞周期蛋白 (CyclinD1), cMYC, 基质金属蛋白酶 2 (MMP2), Snail 和 GAPDH 抗体 (英国 Abcam 公司); 电化学发光 (ECL) 增强型试剂盒 (中国上海翌圣生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: 骨肉瘤细胞 U2OS, HOS, MG63 和成骨细胞 hFOB1.19 从液氮取出后均放置 37℃ 水浴锅中快速复苏, 800r/min 离心 5min, 去除冻存液后, 其中骨肉瘤细胞 U2OS 和 HOS 重悬至专用的培养液中, 骨肉瘤细胞 MG63 和成骨细胞 hFOB1.19 重悬至 DMEM/F-12 培养液中, 血清浓度均为 10%, 放置在 5% (v/v) CO₂, 37℃, 全湿的培养箱中培养。每隔一天更换新鲜细胞培养液, 并采用胰蛋白酶传代细胞。

1.3.2 细胞分组: 选取 APS 抑制效应最明显的骨肉瘤细胞, 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板内, 分为对照组 (NC 组)、黄芪多糖组 (APS 组)、黄芪多糖与转染 SP1 转录因子 (specificity protein 1, SP1) 敲减质粒共处理组 (APS+sh-SP1) 和黄芪多糖与转染 SP1 过表达质粒共处理组 (APS+oe-SP1 组), 每组均设置 6 个平行复孔, 放置培养箱中培养 12h 后进行相应的处理, 其中 NC 组加入二甲基亚砜 (DMSO) 试剂, APS 组加入 2mg/ml 的 APS, APS+sh-SP1 组加入 2mg/ml 的 APS 的同时采用 lip200 试剂转染 5 μ g 的 SP1 敲减质粒, APS+oe-

SP1组加入2mg/ml的APS的同时采用lip200试剂转染5 μ g的SP1过表达质粒,放置培养箱中转染48h,用于后续的实验研究。

1.3.3 Western Blotting法检测Wnt3a, β -catenin, CyclinD1, cMYC, MMP2和Snail蛋白表达:采用胰蛋白酶消化收集的各组细胞,加入100 μ l的蛋白裂解液,放置超声仪中裂解30min后,放置于低温高速离心机中离心20min,获得的上清液为细胞总蛋白。采用BCA蛋白浓度检测试剂检测细胞蛋白浓度,加入蛋白缓冲液后于沸水中煮沸3min,使得蛋白变性,放置-20 $^{\circ}$ C冰箱中储存。取30 μ g蛋白于SDS-PAGE凝胶中进行电泳蛋白分离,并将蛋白湿转移至PVDF膜上。载有蛋白的PVDF膜分别与封闭液室温孵育1h,目的蛋白一抗试剂4 $^{\circ}$ C孵育过夜、兔二抗常温孵育1h和TBST洗三次后,采用ECL试剂盒曝光蛋白条带,并采用Image J软件分析目的蛋白条带的灰度值。

1.3.4 CCK8检测APS对骨肉瘤细胞增殖能力的影响:取生长状态较好的骨肉瘤细胞U2OS, HOS, MG63和成骨细胞hFOB1.19,分别以每孔1500个细胞接种于96孔板内,每种细胞均设置6个平行复孔,放置培养箱中培养12h后,采用2mg/ml APS处理各种细胞,并设置空白对照(DMSO组)。APS处理48h后,每孔细胞更换90 μ l的新鲜培养液及10 μ l的CCK8试剂,混匀后放置培养箱中培养1h。采用酶标仪检测450nm处的细胞吸光度值(A值),细胞增殖抑制率=(1-APS组细胞平均A值/DMSO组细胞平均A值) \times 100%。以同样的实验方法检测NC组、APS组、APS+sh-SP1组和APS+oe-SP1组细胞的增殖能力。

1.3.5 Transwell实验检测各组细胞转移能力:采用胰酶收集NC组、APS组、APS+sh-SP1组和APS+oe-SP1组细胞,并采用无血清的培养液洗涤细胞3次后进行细胞计数,以 1×10^5 个细胞、100 μ l的无血清培养液混匀后接种于Transwell小室中,并将Transwell小室放置在含有10ml/dl血清培养液的24孔中,使得小室与培养液刚好接触,放置培养箱中培养24h左右,倒置显微镜下观察24孔中是否穿入细胞,观察到NC组24孔板中细胞较多时,终止培养,将Transwell小室膜取下后经过PBS清洗、无水乙醇固定、吉姆萨染色、PBS清洗和干燥封片后,于倒置显微镜下观察各组细胞穿膜的数量。

1.3.6 TOP/FOP Flash实验检测各组细胞Wnt/ β -catenin信号通路的活性:采用胰酶收集NC组、APS组、APS+sh-SP1组和APS+oe-SP1组细胞,PBS洗涤细胞后进行细胞计数,以1500个细胞、100 μ l

的完全培养液混匀后接种于96孔板中,放置细胞培养箱中培养12h,采用lip2000试剂将TOP/FOP Flash质粒转染至各组细胞中,放置细胞培养液中培养24h,并采用荧光素酶检测试剂盒检测各组细胞的TOP/FOP Flash荧光素酶活性。

1.4 统计学分析 采用SPSS17.0软件进行统计学分析,呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用LSD-*t*检验。所有实验均重复三次以上, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 APS抑制骨肉瘤细胞增殖 CCK8实验结果显示,骨肉瘤细胞U2OS, HOS, MG63和成骨细胞hFOB1.19经APS处理48h后,细胞增殖抑制率分别为62.93% \pm 4.79%, 20.66% \pm 1.10%, 39.31% \pm 3.20%和5.97% \pm 0.72%,与成骨细胞hFOB1.19相比,APS显著抑制骨肉瘤细胞的增殖能力,差异具有统计学意义($F=208.400$, $P < 0.001$),且对骨肉瘤细胞U2OS的抑制作用最显著($t=20.380$, $P < 0.001$)。

2.2 APS抑制骨肉瘤细胞U2OS中SP1蛋白的表达 NC组、APS组、APS+sh-SP1组和APS+oe-SP1组骨肉瘤细胞U2OS中SP1蛋白的表达水平分别为0.89 \pm 0.08, 0.32 \pm 0.05, 0.12 \pm 0.03和0.43 \pm 0.03。与NC组相比,APS组SP1蛋白表达下降($t=10.900$, $P < 0.001$),表明APS显著抑制骨肉瘤细胞中SP1蛋白的表达;与APS组相比,APS+sh-SP1组细胞中SP1蛋白表达降低($t=6.736$, $P=0.003$),APS+oe-SP1组细胞中SP1蛋白表达增加($t=3.534$, $P=0.024$),差异具有统计学意义,表明SP1敲减质粒和SP1过表达质粒成功转染至骨肉瘤细胞中,可以进行后续的功能实验。

2.3 APS靶向SP1对骨肉瘤细胞U2OS增殖能力的抑制作用 CCK8实验检测结果显示NC组、AP组、APS+sh-SP1组和APS+oe-SP1组细胞增殖抑制率分别为1.17% \pm 0.25%, 59.15% \pm 1.08%, 73.03% \pm 5.73%和31.41% \pm 3.67%。与NC组相比,APS组细胞增殖能力降低($t=90.780$, $P < 0.001$),表明APS显著抑制骨肉瘤细胞增殖能力。与APS组相比,APS+sh-SP1组细胞增殖能力降低($t=4.127$, $P=0.015$),APS+oe-SP1组细胞增殖能力增加($t=12.550$, $P < 0.001$),差异具有统计学意义,表明APS通过负靶向SP1抑制骨肉瘤细胞U2OS的增殖能力。

2.4 APS靶向SP1对骨肉瘤细胞U2OS转移能力的抑制作用 Transwell实验结果显示,NC组,APS组,APS+sh-SP1组和APS+oe-SP1组穿膜

细胞数(个)分别为 91.67 ± 6.43 , 53.67 ± 2.08 , 31.67 ± 2.08 和 70.00 ± 8.19 , 与 NC 组比较, APS 组穿膜细胞数降低, 差异具有统计学意义 ($t=9.740$, $P < 0.001$)。与 APS 组相比, APS+sh-SP1 组穿膜细胞数降低 ($t=12.940$, $P < 0.001$), APS+oe-SP1 组穿膜细胞数增加 ($t=3.350$, $P=0.029$), 差异具有统计学意义, 表明 APS 通过负靶向 SP1 抑制骨肉瘤细胞 U2OS 的转移能力。

2.5 APS 靶向 SP1 对骨肉瘤细胞 U2OS 中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的抑制作用 TOP/FOP Flash 实验结果显示 NC 组、APS 组、APS+sh-SP1 组和 APS+oe-SP1 组 TOP/FOP Flash 荧光素酶相对活性分别为 0.98 ± 0.02 , 0.51 ± 0.03 , 0.31 ± 0.02 和 0.67 ± 0.05 。与 NC 组相比, APS 组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性降低 ($t=22.450$, $P < 0.001$), 表明 APS 显著抑制骨肉瘤细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性。与 APS 组相比, APS+sh-SP1 组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性降低 ($t=9.327$, $P < 0.001$), APS+oe-SP1 组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性增加 ($t=4.630$, $P=0.010$), 差异具

有统计学意义, 表明 APS 通过负靶向 SP1 抑制骨肉瘤细胞 U2OS 中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性。

2.6 APS 靶向 SP1 对骨肉瘤细胞 U2OS 中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 见表 1。Western Blotting 实验检测结果显示与 NC 组相比, APS 组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt3a, β -catenin, 下游增殖相关蛋白 CyclinD1, cMYC, 下游转移相关蛋白 MMP2, Snail 表达均降低, 差异具有统计学意义 ($t=12.163$, 11.326 , 14.259 , 15.672 , 12.958 , 17.036 , 均 $P < 0.05$), 表明 APS 显著抑制骨肉瘤细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达。与 APS 组相比, APS+sh-SP1 组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达均降低 ($t=5.461$, 4.082 , 3.459 , 3.032 , 3.104 , 3.874), APS+oe-SP1 组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达增加 ($t=3.674$, 11.635 , 22.045 , 10.070 , 17.041 , 13.145), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 表明 APS 通过负靶向 SP1 抑制骨肉瘤细胞 U2OS 中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达。

表 1 WB 实验检测 APS 靶向 SP1 对骨肉瘤细胞中 Wnt/ β catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	NC 组	APS 组	APS+sh-SP1 组	APS+oe-SP1 组	F	P
Wnt3a	0.94 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.33 ± 0.03	393.238	< 0.001
β -catenin	1.06 ± 0.05	0.30 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.49 ± 0.02	509.402	< 0.001
CyclinD1	1.27 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.62 ± 0.02	1934.371	< 0.001
cMYC	1.36 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.59 ± 0.06	624.297	< 0.001
MMP2	1.12 ± 0.06	0.25 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.47 ± 0.02	537.010	< 0.001
Snail	1.43 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.52 ± 0.01	1 504.275	< 0.001

3 讨论

骨肉瘤是一种起源于间充质组织的恶性肿瘤, 是高度恶性的肉瘤, 85% ~ 90% 的骨肉瘤患者发生转移^[1]。近年来, 随着对骨肉瘤发病机制的深入研究和治疗方法的改进, 局限性骨肉瘤患者的五年生存率已提高到 60% ~ 70%, 但转移性骨肉瘤患者的五年生存率仅为 20% ~ 30%^[3]。临床结果显示, 目前化疗药物对转移性骨肉瘤患者的疗效不足^[3]。因此, 研究和开发新的治疗药物对改善骨肉瘤的治疗具有重要意义。中草药是人类医学发展的巨大宝库, 在治疗肿瘤方面显示出明显的抗肿瘤作用^[8]。目前学者利用现代技术挖掘中草药中关键药用成分进行研究, 如菊芋、连翘苷 A 和黄芩苷等越来越多的中草药小分子化合物被发现。黄芪作为中草药之一, 在医学上有着悠久的历史, 而 APS 是从黄芪中分离出来的一种关键活性成分, 其抗炎、抗

氧化应激、抗纤维化、护肝、免疫调节能力和血脂、血糖调节能力在过去被受到广泛的关注^[9], 先前 APS 因其免疫调节活性而被广泛用作佐剂, 以提高肿瘤化疗的疗效和降低化疗的毒性^[10], 而其直接抗肿瘤活性的研究也越来越多的被报道。

研究报告 APS 通过调控肿瘤免疫微环境促进共培养的宫颈癌细胞和外周血单核细胞的增殖能力^[4]。在非小细胞肺癌中, APS 通过调控 miR-195-5p 的作用抑制肿瘤细胞的增殖和转移能力^[5]。李宗杰等^[11]研究显示 APS 抑制食管癌细胞的增殖能力, 并促进其凋亡能力。APS 对常见的恶性肿瘤具有抗癌活性, 但 APS 在骨肉瘤中的作用尚未知。本文采用 APS 处理骨肉瘤细胞和成骨细胞, 结果显示与成骨细胞相比, APS 对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用更为显著, 提示采用 APS 治疗骨肉瘤具有可行性。骨肉瘤具有易转移的特点, 而本文检测结果显示 APS 可以显著

抑制骨肉瘤的转移能力,进一步表明 APS 在骨肉瘤治疗中的应用前景,这也与 TAO 等^[5]在 NSCLC 中的研究一致。APS 抑制骨肉瘤的增殖和转移能力的作用机制需进一步探讨。

ELHAM 等^[4]在宫颈癌中预测了 APS 靶标,包括 POLO 样激酶 1、细胞周期蛋白细胞分裂 20 和细胞周期蛋白依赖性激酶 1 等,在食管癌中 APS 通过与 TP73 蛋白相互结合,通过促进 TP73 蛋白的表达,抑制食管癌细胞增殖,促进其凋亡^[5]。有研究发现 SP1 在原发性骨质疏松症中富集,是成骨细胞的抑制因子,APS 通过抑制 SP1 的表达减轻了股骨头细胞坏死模型中的炎症反应^[12]。SP 家族的八个成员 (SP1 ~ SP8) 是一种进化高度相关的转录因子,SP1 最早在该家族中发现,其基因位于 12q1,在各种组织中广泛表达。同时炎症反应是肿瘤发生的重要机制,并且错综复杂,比如急性炎症最常见的炎症细胞中性粒细胞,在肿瘤细胞中其具有杀伤作用,进而发挥抗肿瘤活性的作用,而中性粒细胞产生的细胞因子通过作用于其它种类的细胞,对免疫微环境产生影响,使得肿瘤细胞发生免疫逃逸,进而其也发挥促肿瘤作用^[13]。APS 可以通过抑制 SP1 减弱炎症反应。本研究发现 APS 显著抑制骨肉瘤细胞中 SP1 蛋白的表达,并且敲减 SP1 蛋白的表达可以增加 APS 对骨肉瘤细胞增殖和转移的抑制作用,过表达 SP1 蛋白的表达减弱 APS 对骨肉瘤细胞增殖和转移的抑制作用,表明 APS 负靶向 SP1 蛋白抑制骨肉瘤细胞的增殖和转移能力,但是其调控的下游作用机制仍需进一步研究。

研究表明包括 APS 在内的大多数多糖植物化学物质,通过调节 PI3K/AKT, MAPK, Fas/FasL, Wnt/ β -catenin, IGF-IR 和 TGF- β 等多种肿瘤相关信号通路,诱导恶性肿瘤细胞凋亡,引起细胞周期阻滞,抑制肿瘤细胞迁移和侵袭能力,达到治疗肿瘤的目的^[13]。而有研究显示 SP1 与 Wnt/ β -catenin 信号传导的激活密切相关,SP1 通过靶向 Wnt/ β -catenin 通路调节重症急性胰腺炎心肌损伤^[14],Wnt/ β -catenin 信号通路的激活促进骨肉瘤的恶性进展^[7],并且 SP1/Wnt/ β -catenin 信号通路轴促进骨肉瘤细胞增殖和转移能力^[15],因此 APS 可能通过调控 SP1/Wnt/ β -catenin 信号通路轴抑制骨肉瘤的增殖和转移能力。本文检测采用 TOP/FOP Flash 实验检测发现 APS 显著抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性,同时抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt3a 和 β -catenin 的表达水平,而且敲减 SP1 蛋白的表达增加了 APS 对 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的抑制作用,而过表达 SP1 作用相反。表明 APS 通过抑制 SP1/Wnt/ β -catenin 信号通路轴抑

制骨肉瘤细胞的增殖和转移能力。

本研究进一步检测了 Wnt/ β -catenin 信号通路下游蛋白的表达,包括与细胞增殖相关的蛋白 CyclinD1, cMYC 和转移相关蛋白 MMP2, Snail 的表达,结果显示 APS 抑制 CyclinD1, cMYC, MMP2 和 Snail 蛋白的表达,与 YANG 等^[16]在鼻咽癌中的 APS 抑制 MMP2 蛋白的表达一致。同样敲减 SP1 蛋白的表达增加 APS 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路下游蛋白的表达,过表达 SP1 蛋白后作用相反,进一步证实了 APS 对 SP1/Wnt/ β -catenin 信号通路轴的调控作用。但是本文的研究存在局限性,未明确研究 APS 是否直接靶向 SP1,及其直接作用的位点,以及如何具体调控 Wnt/ β -catenin 信号通路轴,仍需要进一步深入研究。

综上所述,APS 抑制骨肉瘤细胞的增殖和转移能力,其作用机制是通过抑制 SP1/Wnt/ β -catenin 信号通路轴发挥作用。APS 作为抗骨肉瘤治疗的新型药物具有巨大的应用潜力。

参考文献:

- [1] JIA Yukun, XIONG Yu, PENG Zhan, et al. Risk of cardiovascular death in osteosarcoma[J]. Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan, 2023, 33(3): 266-269.
- [2] LI Shizhe, ZHANG He, LIU Jinxin, et al. Targeted therapy for osteosarcoma: a review[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2023, 149(9): 6785-6797.
- [3] 沈家亮,王琳,尚文强.骨肉瘤患者癌组织中 AHA1 mRNA 和 LOXL2 mRNA 表达与侵袭转移基因 mRNA 表达的相关性及临床意义[J].现代检验医学杂志,2024,39(2):39-45.
- [4] SHEN Jialiang, WANG Lin, SHANG Wenqiang. Correlation between the expression of AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA in osteosarcoma patients tissues with mRNA expression of invasion and metastasis genes and their clinical significance [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2024, 39(2): 39-45.
- [5] ELHAM S, MOHAMMAD-REZA S, KOBRA E, et al. Immunomodulatory effects of astragalus polysaccharide on human peripheral blood mononuclear cells co-cultured with cervical cancer cell line [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 41(5): 684-694.
- [6] TAO Xingkui, ZHANG Xingtao, FENG Fan. Astragalus polysaccharide suppresses cell proliferation and invasion by up-regulation of miR-195-5p in non-small cell lung cancer[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2022, 45(5): 553-560.
- [7] ZHOU Yun, SHENG Yunjie, LI Chengyan, et al. Beneficial effect and mechanism of natural resourced polysaccharides on regulating bone metabolism through intestinal flora: a review[J]. International Journal of

- [12] 陈晓宇, 曾庆维, 陈红林, 等. 子宫内膜癌组织中 miR-3188 和 mTOR 表达量与预后的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(6): 17-21.
CHEN Xiaoyu, ZENG Qingwei, CHEN Honglin, et al. Study on the correlation between the expression levels of miR-3188 and mTOR in endometrial cancer and the prognosis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(6): 17-21.
- [13] YANG Yang, WANG Qi, SONG Dongjian, et al. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to autophagy-related cancer suppressing peptide-induced cytotoxic death of cervical cancer cells through the AMPK/mTOR pathway [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2020, 39(1): 197.
- [14] WU Guangteng, LONG Ying, LU Yan, et al. Kindlin-2 suppresses cervical cancer cell migration through AKT/mTOR-mediated autophagy induction [J]. Oncology Reports, 2020, 44(1): 69-76.
- [15] FANG Xuexian, ARDEHALI H, MIN Junxia, et al. The molecular and metabolic landscape of Iron and ferroptosis in cardiovascular disease [J]. Nature Reviews Cardiology, 2023, 20(1): 7-23.
- [16] LI Jiucui, LU Kongmiao, SUN Fenglan, et al. Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway [J]. Journal of Translational Medicine, 2021, 19(1): 96.
- [17] LEI Guang, ZHUANG Li, GAN Boyi. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2022, 22(7): 381-396.
- [18] HUANG Bingyan, NIE Gaohui, DAI Xueyan, et al. Environmentally relevant levels of Cd and Mo coexposure induces ferroptosis and excess ferritinophagy through AMPK/mTOR axis in duck myocardium [J]. Environmental Toxicology, 2024, 39(8): 4196-4206.
- [19] CHEN Hao, QI Qinqin, WU Nan, et al. Aspirin promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing mTOR/SREBP-1/SCD1-mediated lipogenesis in PIK3CA-mutant colorectal cancer [J]. Redox Biology, 2022, 55: 102426.
- [20] WANG Min, ZENG Guang, XIONG Bingrui, et al. ALOX5 promotes autophagy-dependent ferroptosis by activating the AMPK/mTOR pathway in melanoma [J]. Biochemical Pharmacology, 2023, 212: 115554.
- 收稿日期: 2024-03-14
修回日期: 2024-07-04

(上接第 41 页)

- Biological Macromolecules, 2023, 253(Pt 7): 127428.
- [7] WANG Yao, HE Jing, ZHANG Junwei, et al. Cell migration induces apoptosis in osteosarcoma cell via inhibition of Wnt- β -catenin signaling pathway [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2023, 223: 113142.
- [8] 魏龙艳. 中药治疗恶性肿瘤原理再探讨 [J]. 中国实用医药, 2023, 18(22): 155-157.
WEI Longyan. Restudy on the principle of traditional Chinese medicine in the treatment of malignant tumor [J]. China Practical Medical, 2023, 18(22): 155-157.
- [9] WEI Yi, QI Ming, LIU Chao, et al. Astragalus polysaccharide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting TLR4/ NF- κ B signaling pathway and regulating gut microbiota [J]. European Journal of Pharmacology, 2023, 944: 175594.
- [10] XU Qian, CHENG Wen, WEI Jinrui, et al. Synergist for antitumor therapy: astragalus polysaccharides acting on immune microenvironment [J]. Hormones & Cancer, 2023, 14(1): 179.
- [11] 李宗杰, 朱呈祥, 刘灿辉, 等. 黄芪多糖对食管癌细胞增殖与凋亡的影响及其分子机制研究 [J]. 肿瘤药学, 2022, 12(6): 736-744.
LI Zongjie, ZHU Chengxiang, LIU Canhui, et al. Effects of astragalus polysaccharide on the proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma cells and its molecular mechanism [J]. Anti-Tumor Pharmacy, 2022, 12(6): 736-744.
- [12] ZHANG Shenyao, DONG Kefang, ZENG Xiangjing, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by regulating miR-200b-3p-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway via inhibiting SP1 expression: Astragalus polysaccharide regulates SONFH via SP1 [J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2023, 24(1): 369.
- [13] 王浩泽, 顾炎. 中性粒细胞在肿瘤发生发展及免疫治疗中的作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(5): 507-513.
WANG Haoze, GU Yan. The role of neutrophils in tumor development and immunotherapy [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2024, 31(5): 507-513.
- [14] CHEN Liping, HE Chunrong, ZHOU Min, et al. Research progress on the mechanisms of polysaccharides against gastric cancer [J]. Molecules, 2022, 27(18): 5828.
- [15] SUN Yan, GU Renlian, SHEN Zhong, et al. MALAT1 knockdown alleviates myocardial injury in mice with severe acute pancreatitis via the miR-374a/Sp1/Wnt/ β -catenin pathway [J]. American Journal of Translational Research, 2023, 15(6): 3928-3941.
- [16] YANG Yali, LIN Zhanwen, HE Peiting, et al. Inhibitory effect of astragalus polysaccharide combined with cisplatin on cell cycle and migration of nasopharyngeal carcinoma cell lines [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2021, 44(7): 926-931.
- 收稿日期: 2024-04-16
修回日期: 2025-03-31