氧化苦参碱通过COX-2/PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬对MG63骨肉瘤细胞的促凋亡机制Δ

姬健钧*,邱文奎#(开封市中心医院骨科二病区,河南 开封 475000)

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2024)01-0044-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.01.08

摘 要 目的 基于环氧合酶2(COX-2)/PTEN诱导激酶1(PINK1)/帕金森病蛋白2(Parkin)信号通路介导的线粒体自噬研究氧化苦参碱对人骨肉瘤MG63细胞的促凋亡机制。**方法** 取MG63细胞经2.0、4.0、8.0 mg/mL的氧化苦参碱和6 μmol/L的5-氟尿嘧啶(5-FU)作用后,检测细胞凋亡率、凋亡相关蛋白[B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)]表达水平、线粒体膜电位降低比例、线粒体自噬水平以及PINK1、Parkin、微管相关蛋白1轻链3Ⅱ(LC3-Ⅱ)蛋白表达水平。采用PINK1小干扰RNA(PINK1 siRNA)干扰PINK1的表达,将细胞分为对照组、PINK1 siRNA组、氧化苦参碱组、PINK1 siRNA+氧化苦参碱组,检测细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平和线粒体膜电位降低比例以及细胞凋亡率。采用慢病毒感染使COX-2过表达,将细胞分为对照组、氧化苦参碱组、COX-2组、COX-2+氧化苦参碱组,检测细胞中COX-2、PINK1和Parkin蛋白表达水平以及线粒体膜电位降低比例。**结果** 经氧化苦参碱干预后,细胞凋亡率,Bax、PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平,线粒体自噬水平和线粒体膜电位降低比例均显著升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与氧化苦参碱组比较,PINK1 siRNA+氧化苦参碱组细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平和细胞凋亡率以及线粒体膜电位降低比例均显著降低($P<0.05$)。与氧化苦参碱组比较,COX-2+氧化苦参碱组细胞中COX-2蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),PINK1、Parkin蛋白表达水平和线粒体膜电位降低比例均显著降低($P<0.05$)。**结论** 氧化苦参碱可通过抑制COX-2表达,介导线粒体自噬信号通路PINK1/Parkin的过度活化,从而促进骨肉瘤细胞凋亡。

关键词 氧化苦参碱;骨肉瘤;细胞凋亡;线粒体自噬;环氧合酶2;PTEN诱导激酶1;帕金森病蛋白2

Mechanism of oxymatrine promoting the apoptosis of osteosarcoma MG63 cell line through mitophagy mediated by COX-2/PINK1/Parkin signaling pathway

JI Jianjun, QIU Wenkui (Second Ward of Orthopaedics, Kaifeng Central Hospital, Henan Kaifeng 475000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To study the mechanism of oxymatrine inducing apoptosis of osteosarcoma MG63 cell line based on mitophagy mediated by cyclooxygenase-2 (COX-2)/PTEN-induced putative kinase-1 (PINK1)/Parkinson disease protein-2 (Parkin) signaling pathway. **METHODS** MG63 cells were treated with 2.0, 4.0, 8.0 mg/mL oxymatrine and 6 μmol/L 5-fluorouracil, then the apoptotic rate, the expression of apoptosis-related proteins [B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax)], the proportion of decrease in mitochondrial membrane potential, the level of mitophagy as well as the protein expressions of PINK1, Parkin, and microtubule-associated protein 1 light chain-3Ⅱ (LC3-Ⅱ) were detected. PINK1 small interfering RNA (siRNA) was adopted to intervene in the expression of PINK1, the cells were divided into control group, PINK1 siRNA group, oxymatrine group, and PINK1 siRNA+oxymatrine group; the protein expressions of PINK1, Parkin, and LC3-Ⅱ, the proportion of decrease in mitochondrial membrane potential (MMP) as well as apoptotic rate were detected. The lentivirus infection technique was used to overexpress COX-2, the cells were divided into control group, oxymatrine group, COX-2 group, and COX-2+oxymatrine group. The protein expressions of COX-2, PINK1, and Parkin, as well as the proportion of decrease in MMP were detected. **RESULTS** After being treated with oxymatrine, the apoptotic rate, the protein expressions of Bax, PINK1, Parkin, and LC3-Ⅱ, the level of mitophagy as well as the proportion of decrease in MMP were significantly increased ($P<0.05$), while the protein expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the oxymatrine group, the protein expressions of PINK1, Parkin, and LC3-Ⅱ, apoptotic rate and the proportion of decrease in MMP were significantly decreased in PINK1 siRNA+oxymatrine group ($P<0.05$). Compared with the oxymatrine group, the protein expression of COX-2 in the COX-2+oxymatrine group was increased significantly ($P<0.05$), while the protein expressions of PINK1 and Parkin as well as the proportion of decrease in MMP were decreased significantly ($P<0.05$).

Δ**基金项目** 河南省医学科技攻关计划项目(No.LHGJ20210834)

* **第一作者** 主治医师,硕士。研究方向:骨科学。E-mail:jijianjun653@163.com

通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:骨科学。E-mail:526087266@qq.com

CONCLUSIONS Oxymatrine can mediate the overactivity of mitophagy based on the PINK1/Parkin signaling pathway by inhibiting COX-2 expression, thus promoting the apoptosis of the MG63 osteosarcoma cell line.

KEYWORDS oxymatrine; osteosarcoma; cell apoptosis; mitophagy; cyclooxygenase-2; PTEN-induced putative kinase protein-1; Parkinson disease protein-2

骨肉瘤通常起源于四肢长骨，是儿童与青少年群体最为常见的原发性骨肿瘤。目前，骨肉瘤在全球范围内的发病率为4.3%，且骨肉瘤新发病例以每年0.4%的速度增长[1]。尽管现阶段针对骨肉瘤的治疗已取得较大进展，但骨肉瘤患者的5年总生存率仍然较低。新辅助化疗对骨肉瘤的治疗具有重要意义，但长期化疗容易导致多药耐药的出现，影响化疗的效果[1]。中药因具有高效、低毒、多靶点等优势，在骨肉瘤治疗领域的地位不断提高[2]。

氧化苦参碱是中药苦参*Sophora flavescens* Ait.的主要成分之一，具有广泛的药理作用和多种生物活性，被用于多种疾病的治疗[3]。相关研究发现，氧化苦参碱可通过调节细胞周期进程、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、诱导肿瘤细胞凋亡和自噬等途径来抑制肺癌、肝癌、乳腺癌、黑色素瘤、骨肉瘤等多种肿瘤的生长[4]。线粒体自噬是一种选择性自噬形式，药物可通过影响线粒体自噬信号通路相关蛋白的表达，调控肿瘤细胞的凋亡，最终达到抑制肿瘤细胞增殖的目的[5]。因此，靶向调控线粒体自噬已经成为治疗肿瘤的重要途径。但是，氧化苦参碱是否通过调控线粒体自噬来影响骨肉瘤细胞凋亡尚不清楚。基于此，本研究以人骨肉瘤细胞MG63为对象，基于线粒体自噬，初步探讨氧化苦参碱促进骨肉瘤细胞凋亡的作用机制，以期为骨肉瘤的治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 主要仪器

Thermo371型CO_2恒温培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司；INFINITE 200 PRO型酶标仪购自瑞士Tecan公司；5424R型高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司；Eclipse Ni-U型荧光显微镜购自日本Nikon公司；Mini PROTEAN® Tetra Cell型垂直电泳仪、Mini TransBlot Cell型蛋白转印系统均购自美国Bio-Rad公司；TCS SP5型激光共聚焦显微镜购自德国Leica公司；Pannoramic SCAN型数字玻片扫描系统购自匈牙利3DHISTECH公司；DxFLEX型流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 主要药品与试剂

氧化苦参碱对照品（批号为16837-52-8，纯度≥99%）购自成都曼斯特生物科技有限公司；DMEM培养基（批号11965092）购自美国Gibco公司；胎牛血清（批号为FB15015）购自美国Clark公司；5-氟尿嘧啶（5-FU）对照品（批号343922，纯度≥98%）购自美国Sigma公司；噻吟霉素、噻唑蓝（MTT）粉末、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）溶液、JC-1染液（批号分别为HY-K1057、HY-15924、HY-Y0320、HY-15534）均购自美国MedChemExpress公司；Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒（批号KGA107）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；青-链霉素溶液（100×）、胰酶消化液、4，6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI）、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL发光液检测试剂盒（批号分别为C0222、C0201、C1005、P0010、P0018M）均购自上海碧云天生物技术公司；兔源B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）、PTEN诱导激酶1（PTEN-induced putative kinase-1，PINK1）、帕金森病蛋白2（Parkinson disease protein-2，Parkin）、环氧合酶2（cyclooxygenase-2，COX-2）、β-肌动蛋白（β-cytoskeletal actin，β-actin）一抗和辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）二抗（批号分别为AF6139、AF0120、DF7742、AF0235、AF7003、AF7018、S0001）均购自江苏亲科生物研究中心有限公司；兔源微管相关蛋白1轻链3（microtubule-associated protein 1 light chain-3，LC3）和鼠源细胞色素C氧化酶多肽亚基4（cytochrome C oxidase polypeptide Ⅳ，COX Ⅳ）一抗（批号分别为GTX127375、GTX628886）均购自美国GeneTex公司；Alexa Fluor® 488标记的山羊抗鼠IgG和Alexa Fluor® 594标记的山羊抗兔IgG荧光二抗（批号分别为ab150080、ab150113）均购自英国Abcam公司；Lenti-GFP和Lenti-COX-2-GFP慢病毒均购自上海吉凯基因化学技术有限公司；小干扰RNA（siRNA）-mate转染试剂、阴性对照siRNA（NC siRNA）、PINK1 siRNA（批号分别为G04003、A06001、A01001）均购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.3 细胞

人骨肉瘤MG63细胞株（批号TCHu124）购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

将MG63细胞培养于含1%青-链霉素和10%胎牛血清的DMEM培养基中，置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养，传至第5代进行后续实验。

2.2 氧化苦参碱对MG63细胞增殖的影响考察

采用MTT法检测。取对数生长期的MG63细胞，按5×10^4个/mL的密度接种于96孔板中，将细胞分为空白组（只含培养基）、对照组（不含药物，含细胞、培养基）、氧化苦参碱不同质量浓度组（1.0、2.0、4.0、8.0、12.0、16.0 mg/mL，质量浓度根据前期预实验结果设置）和5-FU组（6 μmol/L，阳性对照组，浓度根据前期预实验结果设置），每组设6个复孔。培养24 h后每孔加入5 mg/mL的MTT工作液10 μL；继续培养4 h后弃掉上清液，加入DMSO 100 μL，置于摇床振荡10 min。采用酶标仪在490 nm波长处检测吸光度（A），计算细胞增殖抑制率：细胞增殖抑制率＝（$A_{对照组}-A_{给药组}$）/（$A_{对照组}-A_{空白组}$）×100%，然后通过CurveExpert软件计算半数抑制浓度（IC_{50}）。

2.3 氧化苦参碱对MG63细胞凋亡的影响考察

2.3.1 细胞凋亡率的检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的MG63细胞，按2×10^5个/mL的密度接种于6孔板中，将细胞分为对照组（不含药物，含细胞、培养基）和氧化苦参碱2.0、4.0、8.0 mg/mL组（质量浓度根据“2.2”项下结果设置）和5-FU组（6 μmol/L），每组设3个复孔。培养24 h后收集各组细胞，按Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书操作，利用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.3.2 细胞中凋亡蛋白Bax、Bcl-2的表达水平检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的MG63细胞，按5×10^5个/mL的密度接种于6孔板中，然后按“2.3.1”项下方法分组和给药，每组设3个复孔。培养24 h后收集各组细胞，向细胞中加入RIPA裂解液以提取总蛋白，并用BCA试剂盒进行蛋白定量分析。蛋白变性后，取20 μg在100 V恒压条件下进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，随后在恒流300 mA条件下转膜100 min，室温封闭1 h；分别加入Bax、Bcl-2、β-actin一抗（稀释度分别为1∶1 000、1∶1 000、1∶5 000），4 ℃孵育过夜；加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗（稀释度为1∶1 000），室温孵育1 h后，利用ECL发光液显色。采用Image J软件进行分析，以目的蛋白与内参β-actin蛋白的灰度值比值表示蛋白表达水平。

2.4 氧化苦参碱对MG63细胞线粒体自噬的影响考察

2.4.1 细胞线粒体膜电位变化的检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的MG63细胞，按2×10^5个/mL的密度接种于6孔板中，然后按“2.3.1”项下方法分组和给药，每组设3个复孔。培养24 h后收集各组细胞，每孔中加入JC-1染液（工作浓度为1 μg/mL）1 mL，避光孵育20 min；以磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤2次后加入新鲜培养液（不含血清和青-链霉素）1 mL重悬细胞，通过流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的变化，并计算细胞线粒体膜电位降低比例：细胞线粒体膜电位降低比例＝线粒体膜电位降低的细胞数/细胞总数×100%。

2.4.2 细胞线粒体自噬水平检测

采用免疫荧光染色法检测。取对数生长期的MG63细胞悬液（1×10^5个/mL）制备细胞爬片，然后按“2.3.1”项下方法分组和给药，每组设3个复孔。培养24 h后收集各组细胞，以4%多聚甲醛固定10 min，然后以PBS洗涤3次；加入0.1% Triton X-100透化15 min，以5%牛血清白蛋白室温封闭1 h；加入LC3、COX Ⅳ一抗（稀释度均为1∶200），4 ℃孵育过夜，以PBS洗涤3次；分别加入Alexa Fluor® 488标记的山羊抗鼠IgG和Alexa Fluor® 594标记的山羊抗兔IgG荧光二抗（稀释度均为1∶100）避光孵育1 h；以DAPI染核5 min，PBS洗涤3次，采用激光共聚焦显微镜观察细胞线粒体自噬情况。细胞核经DAPI染色后呈蓝色，以LC3蛋白（红色）与线粒体标志蛋白COX Ⅳ（绿色）的共定位（黄色）细胞数量表示线粒体自噬水平。

2.4.3 细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的MG63细胞，按“2.3.2”项下方法接种、分组（每组设3个复孔）、给药和处理，检测细胞中PINK1、Parkin和LC3-Ⅱ蛋白（一抗稀释度均为1∶1 000）的表达水平。

2.5 线粒体自噬对氧化苦参碱致MG63细胞凋亡的影响考察

2.5.1 细胞分组及处理

取对数生长期的MG63细胞，按2×10^5个/mL的密度接种于24孔板中，当细胞融合度达50%时，按照转染试剂说明书方法，分别用NC siRNA和PINK1 siRNA转染MG63细胞。转染24 h后，将细胞分为对照组（只转染NC siRNA）、PINK1 siRNA组（只转染PINK1 siRNA）、氧化苦参碱组（转染NC siRNA后，再用8.0 mg/mL的氧化苦参碱处理，质量浓度根据“2.2”项下结果设置）、PINK1 siRNA+氧化苦参碱组（转染PINK1 siRNA后，再用8.0 mg/mL的氧化苦参碱处理），每组设3个复孔。

2.5.2 转染后细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测。将MG63细胞按“2.5.1”项下方法转染、分组、给药、处理，然后按“2.3.2”项下方法检测细胞中PINK1、Parkin和LC3-Ⅱ蛋白（稀释度均为1∶1 000）的表达水平。

2.5.3 转染后细胞线粒体膜电位变化的检测

采用流式细胞术检测。将MG63细胞按“2.5.1”项下方法转染、分组、给药、处理，然后按“2.4.1”项下方法检测其线粒体膜电位降低比例。

2.5.4 转染后MG63细胞凋亡率的检测

采用流式细胞术检测。将MG63细胞按“2.5.1”项

下方法转染、分组、给药、处理，然后按“2.3.1”项下方法检测其凋亡率。

2.6 氧化苦参碱对MG63细胞中COX-2表达的影响考察

采用免疫荧光染色法检测。取对数生长期的MG63细胞，按2×10^{5}个/mL的密度接种于含细胞爬片的24孔板中，然后分为对照组和氧化苦参碱2.0、4.0、8.0 mg/mL组（质量浓度依据“2.2”项下结果设置），每组设3个复孔。培养24 h后收集各组细胞，经固定、透化和封闭后加入COX-2一抗（稀释度为1∶200），4 ℃孵育过夜；以PBS洗涤后，加入Alexa Fluor® 594标记的山羊抗兔IgG荧光二抗（稀释度为1∶100），避光孵育1 h，以DAPI染色。采用数字玻片扫描系统扫描，采用Image J软件对COX-2蛋白的荧光强度进行测定，该数值越大，表示目的蛋白的阳性表达越强。

2.7 COX-2过表达对氧化苦参碱干预MG63细胞PINK1/Parkin信号通路和线粒体膜电位的影响考察

2.7.1 细胞处理及分组

取对数生长期的MG63细胞，按5×10^{5}个/mL的密度接种于6孔板中，根据细胞感染复数（multiplicity of infection，MOI）加入相应量的Lenti-GFP和Lenti-COX-2-GFP慢病毒（根据前期预实验结果确定最佳MOI为20）进行感染；培养3～4 d后更换为含嘌呤霉素（2 mg/L）的培养基，用于构建空载对照（感染Lenti-GFP）和COX-2过表达（感染Lenti-COX-2-GFP）细胞株。具体实验分组如下：对照组（空载对照细胞）、氧化苦参碱组（8.0 mg/mL氧化苦参碱处理空载对照细胞）、COX-2组（COX-2过表达细胞）、COX-2+氧化苦参碱组（8.0 mg/mL氧化苦参碱处理COX过表达细胞），药物处理时间为24 h。

2.7.2 细胞中COX-2、PINK1和Parkin蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的MG63细胞，按2×10^{5}个/mL的密度接种于24孔板中，再按“2.7.1”项下方法分组与处理，每组设3个复孔，然后按“2.3.2”项下方法检测各组细胞中COX-2、PINK、Parkin蛋白（一抗稀释度均为1∶1 000）表达水平。

2.7.3 细胞线粒体膜电位变化的检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的MG63细胞，按2×10^{5}个/mL的密度接种于24孔板中，然后按“2.7.1”项下方法分组与处理，每组设3个复孔，再按“2.4.1”项下方法检测其线粒体膜电位降低比例。

2.8 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 氧化苦参碱对MG63细胞增殖的影响

经1.0、2.0、4.0、8.0、12.0、16.0 mg/mL氧化苦参碱和5-FU处理24 h后，MG63细胞的增殖抑制率分别为（6.49±0.37）%、（15.72±1.41）%、（29.34±2.75）%、（47.19±3.92）%、（62.51±2.68）%、（74.45±5.03）%、（55.80±3.95）%（$n=6$），均较对照组显著升高（$P<0.05$）。氧化苦参碱作用于MG63细胞24 h的IC_{50}为8.71 mg/mL。

3.2 氧化苦参碱对MG63细胞凋亡的影响

3.2.1 细胞凋亡率

与对照组比较，氧化苦参碱各浓度组和5-FU组细胞凋亡率均显著升高（$P<0.05$）。结果见图1（5-FU组图略）、表1。

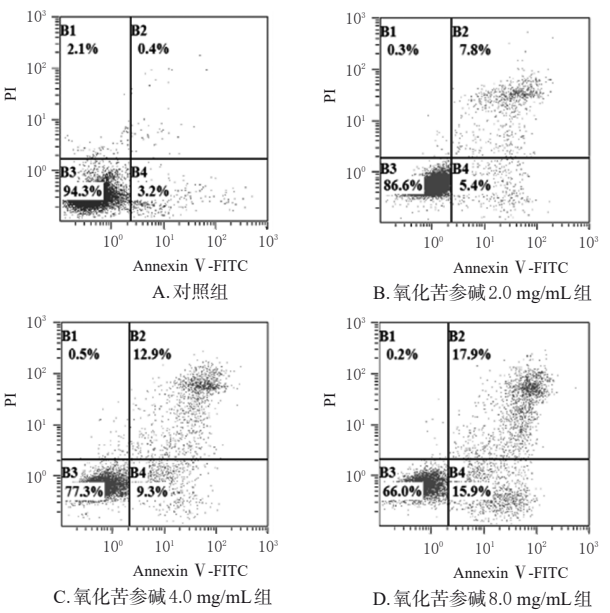


图1 各组细胞凋亡的流式图

表1 各组细胞凋亡率以及Bax、Bcl-2蛋白表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	细胞凋亡率/%	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin
对照组	3.15±0.28	0.214±0.016	0.813±0.041
氧化苦参碱2.0 mg/mL组	12.27±0.95[a]	0.485±0.030[a]	0.532±0.038[a]
氧化苦参碱4.0 mg/mL组	25.83±1.64[a]	0.647±0.045[a]	0.351±0.022[a]
氧化苦参碱8.0 mg/mL组	34.52±1.86[a]	1.077±0.068[a]	0.289±0.015[a]
5-FU组	39.14±2.03[a]	1.119±0.057[a]	0.118±0.011[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

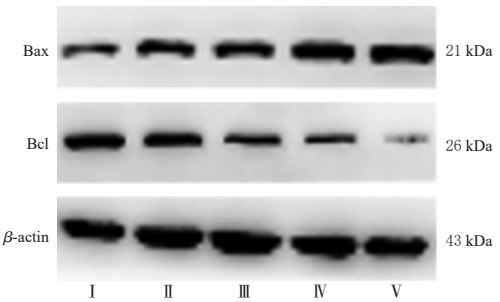
3.2.2 细胞中Bax、Bcl-2蛋白表达水平

与对照组比较，氧化苦参碱各浓度组和5-FU组细胞中Bax蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图2、表1。

3.3 氧化苦参碱对MG63细胞线粒体自噬的影响

3.3.1 细胞线粒体膜电位降低比例

与对照组比较，氧化苦参碱各浓度组和5-FU组细胞的线粒体膜电位降低比例均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：氧化苦参碱2.0 mg/mL组；Ⅲ：氧化苦参碱4.0 mg/mL组；Ⅳ：氧化苦参碱8.0 mg/mL组；Ⅴ：5-FU组。

图2　各组MG63细胞中Bax、Bcl-2蛋白表达的电泳图

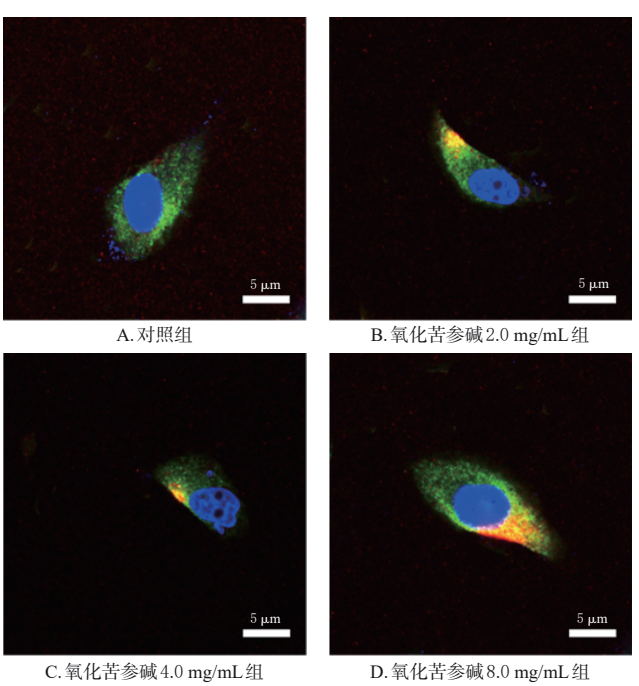
表2　各组MG63细胞线粒体膜电位降低比例和线粒体自噬水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	线粒体膜电位降低比例/%	线粒体自噬水平
对照组	4.37±0.48	1.61±0.39
氧化苦参碱2.0 mg/mL组	38.14±4.21[a]	7.83±0.62[a]
氧化苦参碱4.0 mg/mL组	55.79±4.82[a]	16.39±1.14[a]
氧化苦参碱8.0 mg/mL组	70.90±6.05[a]	24.27±1.48[a]
5-FU组	76.23±5.57[a]	19.52±1.26[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3.3.2　细胞线粒体自噬水平

与对照组比较，氧化苦参碱各浓度组和5-FU组细胞中线粒体自噬水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图3（5-FU组图略）、表2。



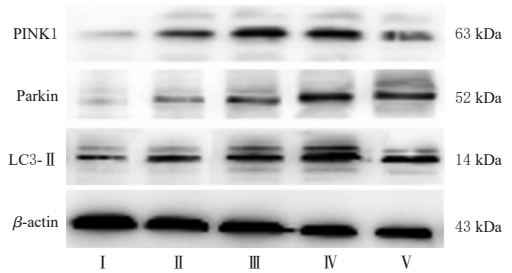
A. 对照组　B. 氧化苦参碱2.0 mg/mL组

C. 氧化苦参碱4.0 mg/mL组　D. 氧化苦参碱8.0 mg/mL组

图3　各组细胞线粒体自噬的显微图

3.3.3　细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平

与对照组比较，氧化苦参碱各浓度组和5-FU组细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图4、表3。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：氧化苦参碱2.0 mg/mL组；Ⅲ：氧化苦参碱4.0 mg/mL组；Ⅳ：氧化苦参碱8.0 mg/mL组；Ⅴ：5-FU组。

图4　各组MG63细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达的电泳图

表3　各组MG63细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

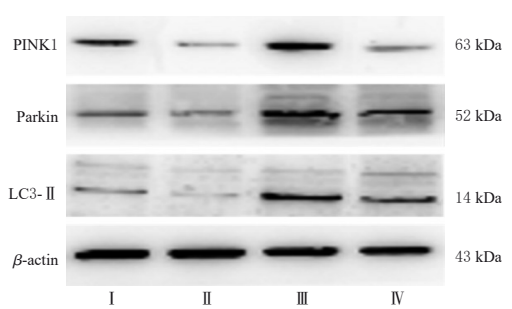
组别	PINK1/β-actin	Parkin/β-actin	LC3-Ⅱ/β-actin
对照组	0.090±0.005	0.041±0.003	0.208±0.009
氧化苦参碱2.0 mg/mL组	0.381±0.014[a]	0.176±0.008[a]	0.383±0.011[a]
氧化苦参碱4.0 mg/mL组	0.824±0.035[a]	0.330±0.010[a]	0.471±0.014[a]
氧化苦参碱8.0 mg/mL组	0.913±0.046[a]	0.484±0.012[a]	0.775±0.029[a]
5-FU组	0.439±0.020[a]	0.432±0.015[a]	0.560±0.022[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3.4　线粒体自噬对氧化苦参碱致MG63细胞凋亡的影响结果

3.4.1　转染后细胞中PINK1、Parkin和LC3-Ⅱ蛋白表达水平

与对照组比较，PINK1 siRNA组细胞中的PINK1蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），Parkin和LC3-Ⅱ蛋白表达水平降低，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。与氧化苦参碱组比较，PINK1 siRNA+氧化苦参碱组细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图5、表4。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：PINK1 siRNA组；Ⅲ：氧化苦参碱组；Ⅳ：PINK1 siRNA+氧化苦参碱组。

图5　转染后MG63细胞中PINK1、Parkin和LC3-Ⅱ蛋白表达的电泳图

表4　转染后MG63细胞中PINK1、Parkin和LC3-Ⅱ蛋白表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	PINK1/β-actin	Parkin/β-actin	LC3-Ⅱ/β-actin
对照组	0.371±0.007	0.119±0.003	0.073±0.002
PINK1 siRNA组	0.015±0.001[a]	0.122±0.005	0.070±0.005
氧化苦参碱组	1.194±0.013	0.936±0.012	0.802±0.011
PINK1 siRNA+氧化苦参碱组	0.079±0.002[b]	0.287±0.008[b]	0.243±0.009[b]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与氧化苦参碱组比较，$P<0.05$。

3.4.2　转染后细胞线粒体膜电位降低比例和凋亡率

与对照组比较，PINK1 siRNA组线粒体膜电位降低比例和细胞凋亡率均升高，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。与氧化苦参碱组比较，PINK1 siRNA+氧化苦参碱组细胞线粒体膜电位降低比例和凋亡率均显著降低（$P<0.05$）。结果见表5。

表5　转染后MG63细胞线粒体膜电位降低比例和凋亡率的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	线粒体膜电位降低比例/%	细胞凋亡率/%
对照组	4.07±0.28	3.46±0.33
PINK1 siRNA组	4.13±0.32	3.61±0.57
氧化苦参碱组	69.85±4.73	33.24±1.71
PINK1 siRNA+氧化苦参碱组	37.64±2.15[a]	17.19±1.42[a]

a：与氧化苦参碱组比较，$P<0.05$。

3.5　氧化苦参碱对MG63细胞中COX-2蛋白表达的影响

与对照组[（100.00±3.36）%]比较，氧化苦参碱2.0、4.0、8.0 mg/mL组细胞中COX-2蛋白的荧光强度[分别为（47.18±2.44）%、（25.72±1.19）%、（19.37±1.02）%]均显著降低（$P<0.05$）。结果见图6。

3.6　COX-2过表达对氧化苦参碱干预MG63细胞PINK1/Parkin信号通路的影响

3.6.1　COX-2过表达后细胞中COX-2、PINK1和Parkin蛋白表达水平

与对照组比较，COX-2组细胞中COX-2蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）；PINK1蛋白表达水平降低，Parkin蛋白表达水平升高，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。与氧化苦参碱组比较，COX-2+氧化苦参碱组细胞中COX-2蛋白表达水平显著升高，PINK1、Parkin蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图7、表6。

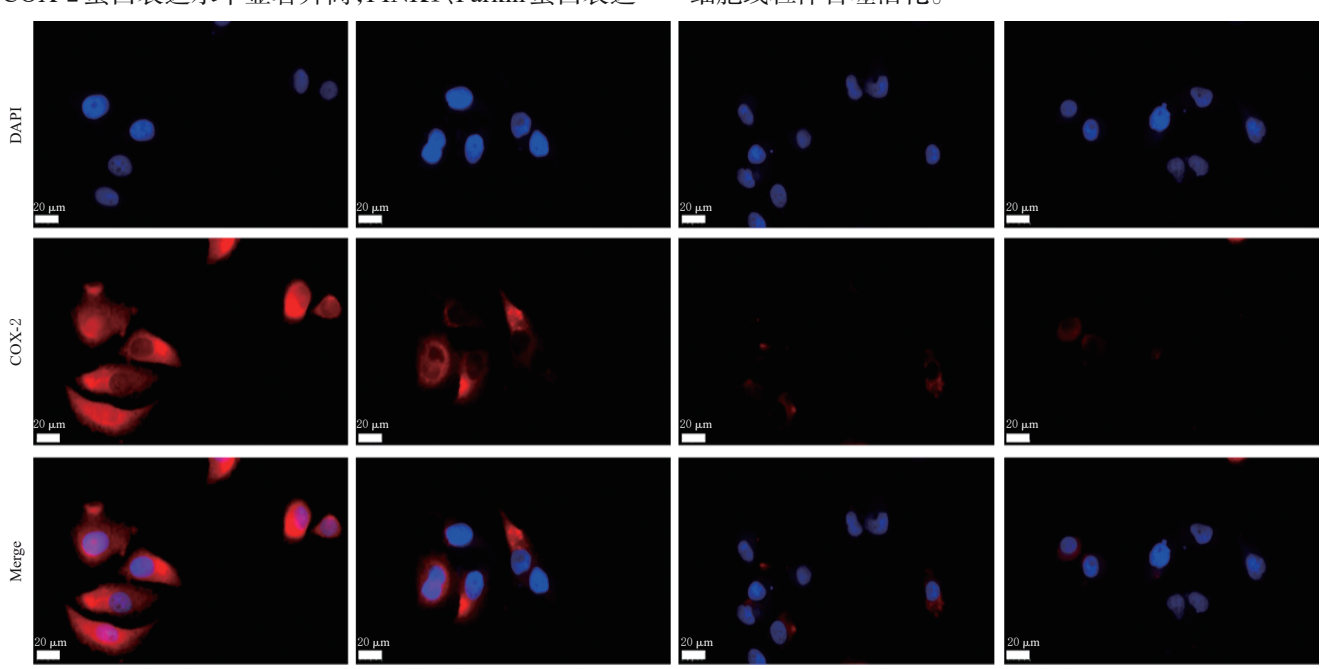
3.6.2　COX-2过表达后细胞线粒体膜电位降低比例

与对照组比较，COX-2组细胞线粒体膜电位降低比例升高，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。与氧化苦参碱组比较，COX-2+氧化苦参碱组细胞线粒体膜电位降低比例显著降低（$P<0.05$）。结果见表6。

4　讨论

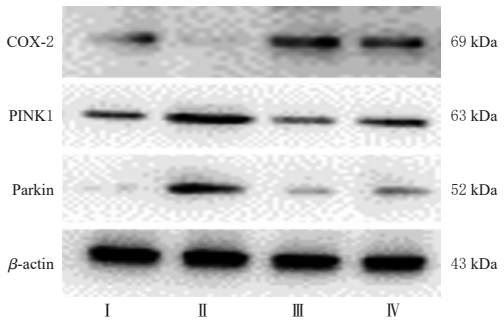
肿瘤细胞凋亡水平的降低与其无限增殖有关[6]。Bcl-2与Bax都属于Bcl-2蛋白家族成员，是肿瘤发生、发展的重要标志之一[7]。本研究结果显示，经氧化苦参碱干预后，MG63细胞的凋亡率显著升高，而凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达水平显著降低，促凋亡蛋白Bax的表达水平显著升高，这表明氧化苦参碱能诱导骨肉瘤细胞的凋亡。

线粒体自噬是一种选择性自噬，其对肿瘤相关性疾病是一把“双刃剑”：一方面，线粒体自噬能提高肿瘤细胞对外界应激的耐受能力；另一方面，线粒体自噬的激活也能促进肿瘤细胞的凋亡，从而抑制肿瘤细胞的增殖[8]。PINK1/Parkin信号通路在诱导线粒体自噬过程中具有重要作用[9−10]。最新的研究指出，氧化苦参碱可激活PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬，从而抑制结直肠癌细胞的增殖[11]。本研究结果显示，经氧化苦参碱干预后，MG63细胞中PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ蛋白表达水平均显著升高。此外，免疫荧光染色结果证实，氧化苦参碱促进了自噬蛋白LC3与线粒体标志物COX Ⅳ的共定位。进一步的PINK1 siRNA干扰实验结果显示，PINK1/Parkin信号通路参与了氧化苦参碱诱导的MG63细胞线粒体自噬活化。



A.对照组　B.氧化苦参碱2.0 mg/mL组　C.氧化苦参碱4.0 mg/mL组　D.氧化苦参碱8.0 mg/mL组

图6　MG63细胞中COX-2蛋白表达的免疫荧光图



Ⅰ：对照组；Ⅱ：氧化苦参碱组；Ⅲ：COX-2组；Ⅳ：COX-2+氧化苦参碱组。

图7　COX-2过表达后MG63细胞中COX-2、PINK1和Parkin蛋白表达的电泳图

表6　COX-2过表达后MG63细胞中COX-2、PINK1、Parkin蛋白表达水平以及线粒体膜电位降低比例的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	COX-2/β-actin	PINK1/β-actin	Parkin/β-actin	线粒体膜电位降低比例/%
对照组	0.226±0.009	0.291±0.013	0.056±0.004	3.87±0.24
氧化苦参碱组	0.018±0.002	0.804±0.035	0.441±0.018	71.15±4.09
COX-2组	0.683±0.035[a]	0.273±0.011	0.062±0.007	4.16±0.35
COX-2+氧化苦参碱组	0.449±0.027[b]	0.385±0.016[b]	0.174±0.010[b]	42.31±2.72[b]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与氧化苦参碱组比较，$P<0.05$。

高水平的COX-2与骨肉瘤的不良预后呈正相关。COX-2表达水平的升高能促进肿瘤的发生、发展，抑制肿瘤细胞凋亡，促使肿瘤细胞侵袭、转移和血管生成[12—13]。最新研究指出，COX-2对PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬活化具有调控作用[14]。有研究指出，氧化苦参碱是一种潜在的COX-2抑制剂[15]。本研究结果表明，氧化苦参碱引起的COX-2表达水平降低在MG63细胞线粒体自噬活化中起着重要作用，而过表达COX-2不仅逆转了氧化苦参碱诱导的PINK1和Parkin蛋白表达水平升高，而且还使细胞线粒体膜电位降低比例显著降低。

综上所述，氧化苦参碱可通过抑制COX-2表达，介导线粒体自噬信号通路PINK1/Parkin的过度活化，从而促进骨肉瘤细胞凋亡。

参考文献

[1] LILIENTHAL I，HEROLD N. Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma：a review of current and future strategies[J]. Int J Mol Sci，2020，21(18)：6885.

[2] ZHANG X Y，QIU H，LI C S，et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer[J]. Biosci Trends，2021，15(5)：283-298.

[3] LAN X，ZHAO J N，ZHANG Y，et al. Oxymatrine exerts organ- and tissue-protective effects by regulating inflammation，oxidative stress，apoptosis，and fibrosis：from bench to bedside[J]. Pharmacol Res，2020，151：104541.

[4] HALIM C E，XINJING S L，FAN L，et al. Anti-cancer effects of oxymatrine are mediated through multiple molecular mechanism（s）in tumor models[J]. Pharmacol Res，2019，147：104327.

[5] SONG C K，PAN S Z，ZHANG J J，et al. Mitophagy：a novel perspective for insighting into cancer and cancer treatment[J]. Cell Prolif，2022，55(12)：e13327.

[6] KASHYAP D，GARG V K，GOEL N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis：role in cancer development and prognosis[J]. Adv Protein Chem Struct Biol，2021，125：73-120.

[7] ZHAO S，ZHANG Y C，LU X Q，et al. CDC20 regulates the cell proliferation and radiosensitivity of P53 mutant HCC cells through the Bcl-2/Bax pathway[J]. Int J Biol Sci，2021，17(13)：3608-3621.

[8] FERRO F，SERVAIS S，BESSON P，et al. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling[J]. Semin Cell Dev Biol，2020，98：129-138.

[9] TANAKA K. The PINK1-parkin axis：an overview[J]. Neurosci Res，2020，159：9-15.

[10] 陆晓华，金桂芳，余河汉，等. 基于PINK1/Parkin信号通路研究细叶远志皂苷对AD模型小鼠脑组织线粒体自噬的影响[J]. 中国药房，2021，32(22)：2748-2754.
LU X H，JIN G F，YU H H，et al. Study on the effects of tenuifolin on brain mitochondrial autophagy in AD model mice based on PINK1/Parkin signaling pathway[J]. China Pharm，2021，32(22)：2748-2754.

[11] LIANG L，SUN W L，WEI X X，et al. Oxymatrine suppresses colorectal cancer progression by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through mitophagy induction *in vitro* and *in vivo*[J]. Phytother Res，2023，37(8)：3342-3362.

[12] ZHANG X L，QU P，ZHAO H，et al. COX-2 promotes epithelial-mesenchymal transition and migration in osteosarcoma MG-63 cells via PI3K/AKT/NF-κB signaling[J]. Mol Med Rep，2019，20(4)：3811-3819.

[13] HASHEMI G N，NAJAFI M，SALEHI E，et al. Cyclooxygenase-2 in cancer：a review [J]. J Cell Physiol，2019，234(5)：5683-5699.

[14] CHEN Y，CHEN H N，WANG K，et al. Ketoconazole exacerbates mitophagy to induce apoptosis by downregulating cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol，2019，70(1)：66-77.

[15] DONG P L，JI X M，HAN W，et al. Oxymatrine exhibits anti-neuroinflammatory effects on $A\beta_{1-42}$-induced primary microglia cells by inhibiting NF-κB and MAPK signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol，2019，74：105686.

（收稿日期：2023-07-14　修回日期：2023-11-17）
（编辑：唐晓莲）