doi:10.11659/jjssx.06E023007

·基础研究·

扁蒴藤素调节Hippo/YAP信号通路对骨肉瘤细胞阿霉素耐药性的影响

李 浩,戎 帅,刘连涛 (石家庄市第三医院小儿骨科,河北 石家庄 050000)

[摘 要] **目的** 探讨扁蒴藤素(PM)对骨肉瘤细胞阿霉素(ADM)耐药性的影响及其作用机制。**方法** 采用ADM浓度梯度递增长期培养法在体外建立ADM耐药细胞MG-63/ADR,CCK-8检测不同浓度ADM对骨肉瘤细胞MG-63和MG-63/ADR细胞活力的影响,验证ADM耐药性;随后将MG-63/ADR细胞随机分为MG-63/ADR组(正常培养)、PM低剂量组(加入0.5 μmol/L PM)、PM中剂量组(加入1.0 μmol/L PM)、PM高剂量组(加入2.0 μmol/L PM),CCK-8检测不同浓度ADM处理下各组细胞活力;平板克隆形成实验检测各组细胞对ADM的敏感性;显微镜下观察细胞形态;流式细胞术检测细胞凋亡水平;Western blot检测磷酸化哺乳动物STE20样蛋白激酶1(p-MST1)、MST1、磷酸化大肿瘤抑制因子1(p-LATS1)、LATS1、磷酸化Yes相关蛋白(p-YAP)、YAP蛋白表达。**结果** 25、125、625、3 125、15 625 ng/mL ADM干预下,MG-63/ADR细胞活力较MG-63细胞显著升高($P<0.05$),说明ADM耐药细胞模型建立成功。与MG-63/ADR组相比,PM低、中、高剂量组细胞数量减少且细胞逐渐皱缩、间距变大,细胞活力、细胞克隆形成率以及p-YAP/YAP水平下降($P<0.05$),细胞凋亡率和p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1水平显著提高($P<0.05$)。**结论** PM对骨肉瘤细胞ADM耐药性具有抑制作用,其可能与激活Hippo通路、下调YAP信号有关。

[关键词] 扁蒴藤素;骨肉瘤;Hippo/Yes相关蛋白;阿霉素耐药性
[中图分类号] R73-37 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-06-01

Effect of pristimerin on adriamycin resistance of osteosarcoma cells by regulating Hippo/YAP signal pathway

LI Hao, RONG Shuai, LIU Lian-tao (Department of Pediatric Orthopedics, Shijiazhuang Third Hospital, Shijiazhuang Hebei 050000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of pristimerin (PM) on adriamycin (ADM) resistance in osteosarcoma cells and its mechanism. **Methods** The ADM resistant cells MG-63/ADR was established in vitro by using the ADM increasing concentration gradient long-term culture method, CCK-8 was used to detect the effects of different concentrations of ADM on the viability of osteosarcoma cells MG-63 and MG-63/ADR cells to verify the drug resistance of ADM; subsequently, MG-63/ADR cells were randomly divided into the MG-63/ADR group (normal culture), low-dose PM group (adding 0.5 μmol/L PM), middle-dose PM group (adding 1.0 μmol/L PM) and high-dose PM group (adding 2.0 μmol/L PM). The cell viability of each group under different concentrations of ADM treatment was detected by CCK-8; the sensitivity of cells to ADM in each group was detected by plate clone formation assay; the cell morphology of each group was observed under microscope; the cell apoptosis level was detected by flow cytometry; Western blot was used to detect the expression of phosphorylated mammalian STE20-like protein kinase 1 (p-MST1), MST1, phosphorylated large tumor suppressor 1 (p-LATS1), LATS1, phosphorylated Yes associated protein (p-YAP) and YAP proteins. **Results** With the intervention of 25, 125, 625, 3 125 and 15 625 ng/mL ADM, the activity of MG-63/ADR cells was significantly higher than that of MG-63 cells ($P<0.05$), which indicated that the ADM resistant cell model was successfully established. Compared with the MG-63/ADR group, the number of cells in the low, middle and high-dose PM groups decreased, and the cells gradually shrank, the spacing between cells became larger, and the cell viability, cell clonal formation rate and p-YAP/YAP level decreased ($P<0.05$), the apoptosis rate and the levels of p-MST1/MST1 and p-LATS1/LATS1 significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** The inhibitory effect of PM on ADM resistance in osteosarcoma cells may be related to the activation of Hippo pathway and the downregulation of YAP signal.

Keywords: pristimerin; osteosarcoma; Hippo/Yes associated protein; adriamycin resistance

骨肉瘤是儿童和青少年中最常见的骨肿瘤类型,每百万肿瘤儿童中约有4.4例骨肉瘤患儿[1]。骨肉瘤的标准治疗主要是多药诱导化疗配合手术切除,放疗仅用于边缘切除或无法切除的患者[2]。然而,化疗药物耐药依然是肿瘤细胞转移和侵袭的主要因素,从而影响骨肉瘤患者的预后和生活质量[3]。扁蒴藤素(pristimerin,PM)是中药过山枫的主要有效成分之一,属醌甲基三萜类化合物,具有抗肿瘤、抗炎等多种药理活性[4]。有研究指出,PM可以在体内外抑制人骨肉瘤的生长,可能成为该病的新型治疗剂[5],且能克服乳腺癌细胞的阿霉素(adriamycin, ADM)耐药性[6],但目前其对骨肉瘤细胞ADM耐药性的研究未见报道。马小雨

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20191425)

等[7]发现,调节Hippo信号通路及其核心分子转录调节因子Yes相关蛋白(Yes associated protein, YAP)对于改善骨肉瘤的临床治疗效果和预后至关重要。而PM能否通过调节Hippo/YAP信号通路影响骨肉瘤细胞ADM耐药性目前尚不清楚。因此,本研究通过探讨PM对骨肉瘤细胞ADM耐药性的影响以及对骨肉瘤相关的Hippo/YAP信号通路的调节作用,以期为逆转ADM耐药治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂与仪器

人骨肉瘤MG-63细胞系购自南京科佰生物科技有限公司。注射用ADM购自美国Pharmacia公司;PM(纯度≥98%)购自成都德思特生物技术有限公司;CCK-8试剂盒购自德国Merck公司;FBS、Giemsa染液购自美国Thermo Fisher公司;胰蛋白酶、青霉素、DMEM培养基、链霉素、4%多聚甲醛、BCA蛋白浓度测定试剂盒、PBS、RIPA裂解液、ECL超敏化学发光液、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗和结晶紫溶液购自上海碧云天生物技术股份有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司;一抗磷酸化哺乳动物STE20样蛋白激酶1(phosphorylated mammalian STE20-like protein kinase 1, p-MST1)、MST1、磷酸化大肿瘤抑制因子1(phosphorylated large tumor suppressor 1, p-LATS1)、LATS1、p-YAP、YAP和GAPDH购自美国Abcam公司。

CO_2培养箱购自德国Memmert公司;细胞板、培养皿、酶标仪、流式细胞仪购自美国Thermo Fisher公司;倒置显微镜、荧光显微镜购自日本Keyence公司;电泳仪和转膜仪购自北京鸿涛基业科技发展有限公司;Tanon 1600全自动凝胶成像分析仪购自长兴天能集团。

1.2 骨肉瘤MG-63细胞ADM耐药细胞株的建立

复苏MG-63细胞后进行无菌培养,取对数生长期细胞接种在含10% FBS、100 U/mL青-链霉素的DMEM培养基中,接种密度为1.0×10^5/mL。细胞贴壁生长后,加入ADM(0.01 μg/mL)诱导15 d。随后采用ADM梯度浓度培养细胞,浓度分别为0.04、0.10、0.40、1.00、4.00 μg/mL,每个浓度培养15 d,获得稳定的ADM耐药细胞株MG-63/ADR。ADM浓度长期设定在4.00 μg/mL以维持MG-63/ADR细胞的耐药性[8]。

1.3 细胞培养及分组

分别在MG-63、MG-63/ADR细胞中加入DMEM培养基,然后于37 ℃、5% CO_2环境下进行无菌培养。上述MG-63/ADR细胞随机分为MG-63/ADR组(正常培养)、PM低剂量组(加入0.5 μmol/L PM)、PM中剂量组(加入1.0 μmol/L PM)、PM高剂量组(加入2.0 μmol/L PM)[9],置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养48 h。

1.4 CCK-8实验检测细胞增殖能力

使用胰蛋白酶将1.3项下各组细胞消化后以2.5×10^3/孔接种于96孔板中,每组设置8个复孔。待细胞贴壁后,在各组复孔中依次加入0、1、5、25、125、625、3 125、15 625 ng/mL的ADM培养48 h,0 ng/mL即为对照组,另设置空白组。待细胞贴壁后,使用含10% CCK-8的培养基替换培养液,37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育1.5 h,使用酶标仪在450 nm波长处检测各孔细胞的吸光度(absorbance, A)值,计算细胞活力,细胞活力(%)=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)×100%。

1.5 平板克隆形成实验

将1.3项下各组细胞以1×10^3/皿接种至培养皿中,加入4.00 μg/mL ADM,无菌培养96 h,每组设置5个皿。弃上清,4%多聚甲醛固定后,Giemsa染液孵育30 min,洗去染液,倒置显微镜下记录细胞克隆数,计算克隆形成率。克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.6 细胞形态观察

将1.3项下各组细胞以1×10^4/孔接种至细胞板中,每组设置6个复孔,加入4.00 μg/mL ADM培养48 h后,倒置显微镜下观察各组细胞形态。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡水平

在1.3项下各组细胞中加入4.00 μg/mL ADM培养48 h后,加入0.25%胰蛋白酶,配制浓度为1×10^9/L的细胞悬液,取100 μL细胞悬液至Falcon试管中,分别加入5 μL Annexin V-FTTC、PI孵育,流式细胞术测定细胞凋亡情况。

1.8 Western blot检测相关蛋白表达

收集1.3项下各组细胞,提取细胞蛋白,BCA法定量蛋白浓度,Western blot法检测蛋白的表达。配制SDS-PAGE凝胶,样品上样量为10 μg,电泳参数设置为80 V 30 min,然后转为120 V 1 h。取下凝胶,转膜仪参数设置为200 V,将已分离的条带转至PVDF膜。封闭后的PVDF膜分别置于p-MST1、MST1、p-LATS1、LATS1、p-YAP、YAP(稀释比例为1∶1 000)和GAPDH(稀释比例为1∶2 000)过夜,再经二抗(稀释比例为1∶500)和ECL超敏化学发光液孵育,使用Tanon 1600软件拍照并分析蛋白表达水平。

1.9 统计学分析

数据使用GraphPad Prism v9.3.1.471软件分析,结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异采用单因素

方差分析，组间两两比较采用t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MG-63/ADR细胞株的验证

25、125、625、3 125、15 625 ng/mL ADM对MG-63细胞活力的抑制显著高于MG-63/ADR（P<0.05），见表1，提示MG-63/ADR细胞株构建成功。

表1 MG-63组和MG-63/ADR组细胞活力比较（$\bar{x}\pm s$，%）

ADM	MG-63细胞	MG-63/ADR细胞
0 ng/mL	100.00±0.00	100.00±0.00
1 ng/mL	95.78±8.35	96.93±12.03
5 ng/mL	90.62±9.36	93.49±10.31
25 ng/mL	62.34±7.31	81.71±9.68*
125 ng/mL	45.47±5.65	70.95±8.13*
625 ng/mL	25.78±3.51	55.37±6.18*
3 125 ng/mL	19.42±2.66	50.76±4.89*
15 625 ng/mL	17.62±2.04	45.81±5.64*

*：与MG-63细胞比较，P<0.05

2.2 各组细胞活力比较

与MG-63/ADR组比较，25、125、625、3 125、15 625 ng/mL的ADM显著抑制PM中、高剂量组MG-63/ADR细胞活力（P<0.05），625、3 125、15 625 ng/mL ADM对PM低剂量组细胞活力也有显著抑制作用（P<0.05），见表2。

表2 各组细胞活力比较（$\bar{x}\pm s$，%）

ADM	MG-63/ADR组	PM低剂量组	PM中剂量组	PM高剂量组
0 ng/mL	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1 ng/mL	97.69±11.47	96.54±10.65	96.18±10.08	95.98±8.87
5 ng/mL	93.59±10.96	92.86±9.66	91.21±10.13	90.67±8.96
25 ng/mL	83.64±8.89	78.64±8.75	70.39±8.40*	63.37±7.56*
125 ng/mL	72.15±8.68	68.14±8.45	61.36±7.53*	52.41±6.88*
625 ng/mL	57.91±6.67	51.58±6.23*	39.16±5.72*	30.41±4.45*
3 125 ng/mL	52.74±6.13	46.36±5.08*	37.56±4.66*	26.96±4.12*
15 625 ng/mL	46.52±5.94	38.23±4.26*	29.43±3.56*	23.35±3.71*

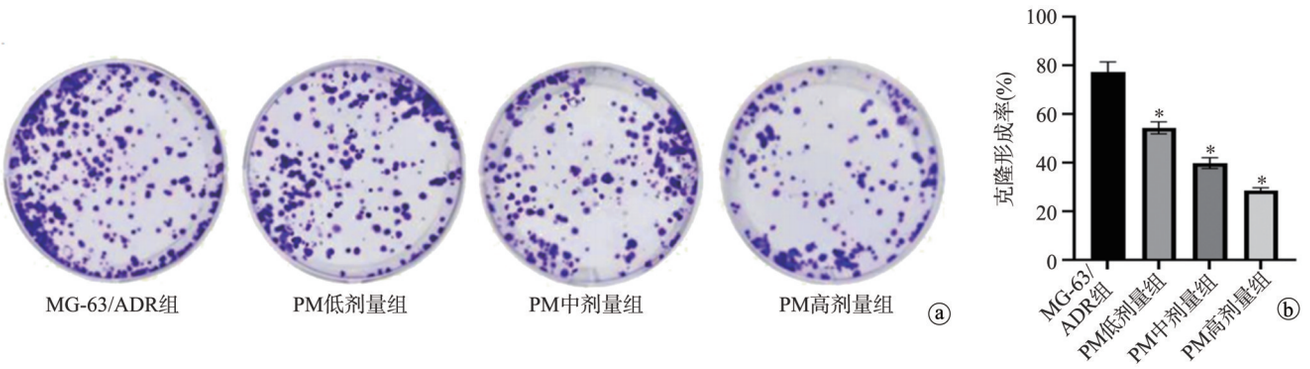
*：与MG-63/ADR组比较，P<0.05

2.3 各组细胞克隆形成能力比较

平板克隆形成实验结果显示，PM低、中、高剂量组细胞克隆形成率低于MG-63/ADR组，差异有统计学意义（P<0.05），见图1。

2.4 各组细胞形态比较

MG-63/ADR组细胞单层贴壁生长，大小均匀，密集成片且折光性好，总体生长状态良好；PM低、中、高剂量组可见悬浮细胞、大部分细胞脱落，细胞皱缩变圆且丝状伪足减少，且随着PM剂量的增加，细胞数量显著减少，细胞逐渐皱缩且间距变大，见图2。



a：克隆形成实验光镜图（×200）；b：各组克隆形成率比较 *：与MG-63/ADR组比较，P<0.05

图1 各组细胞克隆形成能力

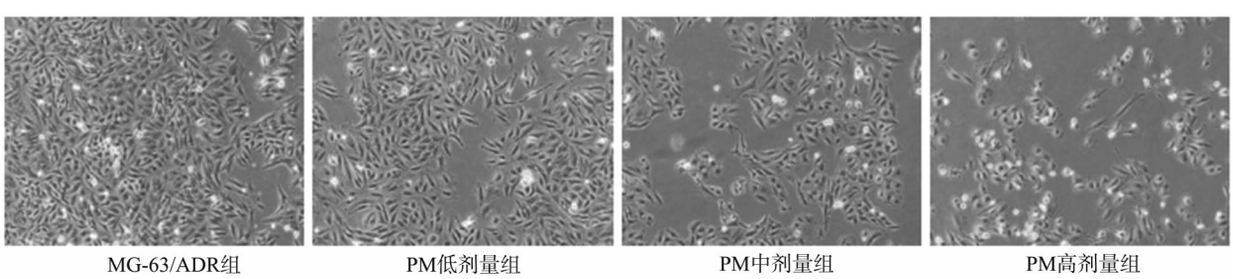


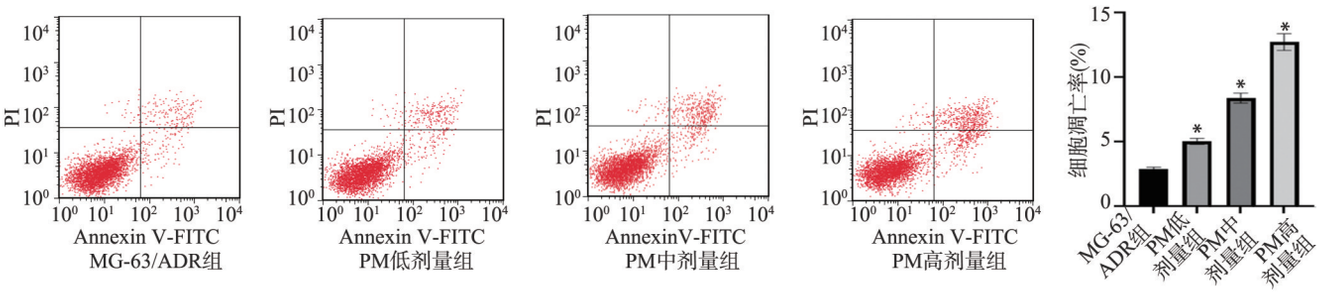
图2 各组细胞形态比较（×200）

2.5 各组细胞凋亡率比较

与MG-63/ADR组比较，PM低、中、高剂量组细胞凋亡率显著提高（P<0.05），见图3。

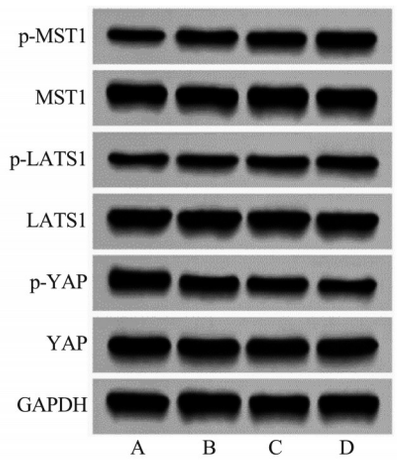
2.6 各组细胞蛋白表达水平比较

与MG-63/ADR组相比，PM低、中、高剂量组细胞中p-MST1/MST1和p-LATS1/LATS1水平显著升高（P<0.05），p-YAP/YAP水平显著下降（P<0.05），见图4、表3。



*:与MG-63/ADR组比较,$P<0.05$

图3 流式细胞术检测各组细胞凋亡率



A:MG-63/ADR组;B:PM低剂量组;C:PM中剂量组;D:PM高剂量组

图4 Western blot检测细胞中相关蛋白的表达

表3 各组细胞中p-MST1/MST1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	p-MST1/MST1	p-LATS1/LATS1	p-YAP/YAP
MG-63/ADR组	0.56±0.06	0.40±0.04	0.98±0.08
PM低剂量组	0.66±0.08*	0.52±0.06*	0.85±0.11*
PM中剂量组	0.75±0.07*	0.64±0.06*	0.69±0.07*
PM高剂量组	0.85±0.08*	0.75±0.08*	0.55±0.07*

*:与MG-63/ADR组比较,$P<0.05$

3 讨论

骨肉瘤是由间质细胞系经软骨阶段直接或间接形成的肿瘤骨样组织或骨组织,且肿瘤细胞增殖快、易转移,极易导致患者全身健康状况恶化[10]。研究指出,ADM可以作为骨肉瘤的一线化疗药物[11]。但是,临床中接受化疗的骨肉瘤患者会很快出现耐药性,使得ADM的治疗有效率低于30%,复发患者的挽救率仅为20%[12]。因此,减少甚至逆转ADM耐药已成为改善骨肉瘤化疗结果的关键。随着研究的不断深入,PM的抗肿瘤药理活性逐渐被人们关注,其能够在体内外抑制人骨肉瘤的生长[5],但其对骨肉瘤细胞ADM耐药性的影响尚不清楚。因此,本研究探讨PM对骨肉瘤ADM耐药细胞株的影响以及作用机制,以期为骨肉瘤的治疗提供参考。

本研究前期在体外培养MG-63细胞,建立ADM耐药细胞MG-63/ADR,MG-63/ADR细胞在ADM处理后增殖活力良好,说明MG-63/ADR细胞株对ADM具有良好的耐药性,可用于后续实验[8]。本研究结果显示,MG-63/ADR细胞经PM处理后,细胞活力下降,提示PM处理后的MG-63/ADR细胞对ADM的敏感性增加;另外,在4.00 μg/mL ADM下,PM处理组细胞逐渐皱缩且间距变大,细胞数量和细胞克隆形成能力下降,细胞凋亡率增加,细胞生长状态变差。这说明PM降低了MG-63/ADR细胞株的ADM耐药性,PM可能具有治疗骨肉瘤的潜力。

本研究进一步从分子机制方面证实PM对MG-63/ADR细胞的影响。Hippo信号通路由蛋白激酶、转录因子、转录共激活因子等构成,通过级联蛋白磷酸化调控细胞信号,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,进而限制肿瘤组织生长[13]。Hippo信号通路的核心成分包括MST1/2、LATS1/2以及下游YAP、转录共激活因子(transcriptional aid activating protein, TAZ)等[14]。其中,YAP/TAZ信号通路是细胞微环境传感器,负责将细胞周围的信号传递到细胞核的转录机制中[15]。从机制上分析,MST1/2激酶首先使其接头蛋白异二聚化,然后磷酸化并激活LATS1/2,从而抑制下游效应子YAP/TAZ信号通路[16]。已有研究发现,敲低YAP显著抑制骨肉瘤模型小鼠中骨肉瘤细胞的致瘤潜力[17]。本研究MG-63/ADR细胞中p-MST1/MST1和p-LATS1/LATS1水平较低,p-YAP/YAP水平较高,提示Hippo信号通路受到抑制;PM处理MG-63/ADR细胞后,p-MST1/MST1和p-LATS1/LATS1水平显著升高,p-YAP/YAP水平显著降低,提示Hippo信号通路被激活,细胞活力和克隆形成能力下降、凋亡率增加,说明PM对MG-63/ADR细胞的抑制可能与激活Hippo信号通路、下调YAP信号有关。

综上所述,PM对骨肉瘤细胞ADM耐药性的抑制作用可能与激活Hippo通路、下调YAP信号有关。PM的药用价值潜力巨大,但在骨肉瘤及ADM耐药性的研究目前较少,可以作进一步挖掘。