

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.30.003

华蟾素联合顺铂对人骨肉瘤 U2OS 细胞增殖和凋亡的影响 *

代 国 陶春杰 郑 迪 余 铃 杨 俭 陶海鹰 郭卫春[△]

(武汉大学人民医院骨科 湖北 武汉 430060)

摘要 目的:研究华蟾素联合顺铂对人骨肉瘤 U2OS 细胞增殖和凋亡的影响,并探寻联合治疗增敏的可能分子机制。**方法:**采用不同浓度的华蟾素、顺铂单药和华蟾素联合顺铂处理人骨肉瘤 U2OS 细胞 1-3 天,通过 CCK-8 法检测其对 U2OS 细胞生长的抑制作用;平板克隆实验检测其对 U2OS 细胞集落形成能力的影响;流式细胞仪检测其对 U2OS 细胞凋亡的影响;RT-PCR 及 Western blotting 检测 Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-9 等凋亡相关分子 mRNA 及蛋白水平的表达。**结果:**单用华蟾素或顺铂均可以浓度和时间依赖的方式抑制骨肉瘤 U2OS 细胞的增殖并诱导其凋亡,两药联合应用具有协同效应,并可以上调促凋亡基因 Bax 下调抑制凋亡基因 Bcl-2 的表达;联合用药组凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-9 的表达较单药组明显增加。**结论:**华蟾素联合顺铂与单一用药相比能够显著抑制人骨肉瘤细胞 U2OS 细胞的增殖,促进其凋亡,两药联合应用对骨肉瘤细胞的杀伤效应具有一定的协同效应,其机制可能与激活凋亡通路有关。

关键词:华蟾素;顺铂;U2OS;增殖;凋亡

中图分类号:R-33; R738 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)30-5812-06

Effect of Cinobufacini plus Cisplatin on the Proliferation and Apoptosis of Osteosarcoma U2OS Cells*

DAI Guo, TAO Chun-jie, ZHENG Di, YU Ling, YANG Jian, TAO Hai-ying, GUO Wei-chun[△]

(Department of Orthopedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Cinobufacini plus Cisplatin (CDDP) on the proliferation and apoptosis of U2OS cell line, and explore the possible molecular mechanism of combination therapy. **Methods:** U2OS cells were treated with different concentrations of Cinobufacini and CDDP or in combination for one to three days. The proliferation of U2OS was tested by CCK-8 assay. The clonality of U2OS was assessed by clone formation assay. The cell apoptosis was detected by flow cytometer. The expression of apoptosis related genes and proteins was detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** Cinobufacini or CDDP could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of U2OS cells in a dose- and time-dependent manner. However, combination of two drugs could inhibit the cell clone formation and markedly promote the cell apoptosis. Combination of two drugs had synergistic effect on the cell proliferation and apoptosis. The pro-apoptosis gene Bax was up-regulated and suppression apoptosis Bcl-2 was significantly down regulated in the combination group. The expression of apoptosis associated proteins caspase-3 and caspase-9 in the combined administration group were obviously increased. **Conclusion:** Cinobufacini and cisplatin could significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of osteosarcoma cell, combination these two drugs had synergistic effect, its mechanism might be related to the activation of apoptosis pathway.

Key words: Cinobufacini; Cisplatin; U2OS; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)30-5812-06

前言

骨肉瘤(osteosarcoma)是一类起源于间叶组织的骨骼系统最多见的原发性恶性骨肿瘤,好发于青少年阶段和 60 岁以上的老龄人群,其发病率占原发骨肿瘤的 35%左右,恶性程度高,发生远处转移早且预后差^[1-3]。自上世纪 70 年代开始引入"新辅助化疗"概念后,使得患者的 5 年生存率从不足 20%提高到 60%,保肢手术的开展,也使得患者的生存质量得到显著

提高^[4]。近 40 年来,虽然治疗方案在不断进步,但是骨肉瘤患者的 5 年生存率并没有显著提高,这使得骨肉瘤治疗处在瓶颈期。

目前,以顺铂(Cisplatin, CDDP)为代表的铂类经典化疗药物已经成为临床上骨肉瘤新辅助化疗治疗方案中的基础一线用药^[5],这些经典化疗药物往往依赖增大剂量而提高疗效,但高剂量化疗药物的应用,伴随而来则是不可避免地导致全身毒副作用的发生,如肾毒性、耳毒性、神经毒性等。除此之外,长时间应用顺铂还会导致耐药性的发生,临床上往往因为内生性或获

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81341078);中央高校基本科研业务费专项基金(2042017kf0163)

作者简介:代国(1986-),男,医学博士研究生,主要研究方向:脊柱外科与骨肿瘤, E-mail: daiguo720@sina.com

[△] 通讯作者:郭卫春(1970-),男,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:脊柱外科与骨肿瘤, E-mail: 2218331865@qq.com

(收稿日期:2017-03-29 接受日期:2017-05-24)

得性耐药以及不能忍受的毒副作用而最终导致化疗失败^[6]。近年来,研究人员逐渐把目光转向联合用药,以减轻单一化疗药物的毒副作用,延缓耐药性的产生,从中寻求突破^[7-9]。国内外大量研究表明,华蟾素(Cinobufacini, CB)能够有效的抑制血液系统肿瘤和实体瘤的生长,其通过多种途径或方式诱导肿瘤细胞发生凋亡^[10-17]。在本研究中,我们应用人成骨肉瘤细胞系 U2OS,观察 CDDP、CB 单药应用和两者联合用药对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响,探讨中药 CB 与传统西药化疗药物 CDDP 的联合作用及其可能的协同效应机制,旨在为骨肉瘤临床化疗联合用药提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系和主要试剂

人成骨肉瘤 U2OS 细胞购自中国典型培养物保藏中心(China Center For Type Culture Collection, CCTCC),于 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清、1%双抗:青霉素 100 U/mL、链霉素 100 ug/mL),37℃,5%CO₂,95%空气的孵箱内培养。DMEM 培养基、新鲜小牛血清为 Hyclone 公司产品;华蟾素注射液购自安徽华润金蟾药业股份公司[国药准字 Z34020273,5 mL/支];CDDP、Giemsa 染液、DMSO、Hoechst 33258 及胰蛋白酶均购自 Sigma 公司(美国);Cell Counting Kit-8 (CCK-8)购自同仁化学研究所(日本);Annexin V-FITC/PI(Propidium Iodide)细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司(南京),一抗 cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, β -Actin 均购自 CST (美国)公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒购于 Thermo(美国)公司。

1.2 CCK-8 法检测细胞增殖

取对数生长期的细胞,制成 1×10^5 mL 的细胞悬液,设 CB 组、CDDP 组、CB+CDDP 组及阴性对照组,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h 待其贴壁后加入不同处理因素。单药组为 1-50 μ L/mL 的 CB 和 1-8 μ mol/L 的 CDDP。联合用药组共分为 3 小组,分别为 1、10、20 μ L/mL 的 CB 对应加入 1、2、4 μ mol/L 的 CDDP,即 (1 μ L/mL CB+1 μ mol/L CDDP), (10 μ L/mL CB +2 μ mol/L CDDP), (20 μ L/mL CB + 4 μ mol/L CDDP),阴性对照组加入等体积的 DMEM 培养基处理(每个浓度设 5 个复孔,并重复进行 3 次实验),每个浓度分别处理 24、48、72 h 后,加入 CCK-8 10 μ L 完全培养基 90 μ L 后继续培养 1.5 h,于酶标仪 450 nm 波长下检测各孔吸光度 OD 值,实验重复 3 次。按下列公式计算细胞存活率,细胞存活率 = (给药组 OD 值 - 空白孔 OD 值)/(阴性对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值) $\times$ 100%。

1.3 平板克隆形成实验

取对数生长期的细胞,制成细胞悬液,细胞计数后,分别将 100 个细胞接种于 6 孔培养板中,然后将 6 孔板移入孵育箱,在 37℃,5%CO₂,95%空气及饱和湿度环境中孵育 24 h,待细胞贴壁后分别给予不同药物或 DMSO(对照组)处理 24 h。然后每隔 5 天更换一次药物和培养液,培养约 14 天,终止培养。移除培养液,用 PBS 轻柔浸洗三次。4%多聚甲醛 5 mL 固定 30 min,然后弃去固定液,加适量瑞士吉姆萨染色液染色 30 min,接着用流水缓慢洗去染色液,空气充分干燥。用克隆计数仪自动计数。按下列公式计算集落形成能力 = (集落数目 / 接种细胞数目) $\times$ 100%,计算出抑制率。

1.4 Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测细胞凋亡

收集处于对数生长阶段的骨肉瘤 U2OS 细胞,胰蛋白酶消化,制备单细胞悬液,计数后调整细胞密度为 2×10^5 mL,按 2 mL/孔接种于 6 孔板,37℃,5%CO₂、饱和湿度培养箱中常规培养 24 h,待细胞完全贴壁后吸除原培养液,按照之前的实验设计处理细胞 24 h,同时设立空白对照组,各组重复 3 次,经胰酶消化,收集细胞于流式管内,1500 r/min 4℃离心 5 min,弃上清,4℃预冷的 PBS 洗涤细胞一次,用稀释好的结合缓冲液(去离子水:结合缓冲液 9:1 的比例稀释配置稀释)0.5 mL 重悬细胞。每管依次加 Annexin V-FITC 5 μ L,再加入 5 μ L PI 染色液,轻轻混匀,室温下避光孵育 5 min,上流式细胞仪进行细胞凋亡检测。以 Annexin V-FITC 为横坐标,PI 为纵坐标,右上象限代表晚期凋亡的细胞(Annexin V - FITC 阳性,PI 阳性),右下象限代表早期凋亡的细胞(Annexin V - FITC 阳性,PI 阴性),左上象限代表坏死细胞碎片(Annexin V - FITC 阳性,PI 阳性),左下象限代表活细胞(Annexin V - FITC 阴性,PI 阴性)。

1.5 RT-PCR

细胞收集方法同流式,参照试剂盒说明提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,扩增合成目的片段。PCR 反应条件:95℃预变性 10 min,95℃变性 15 s,60℃退火 60 s,72℃延伸 5 min,循环 30~50 次。实验重复 3 次。以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目的基因相对表达量。目的基因及内参基因(β -Actin)引物序列详见表 1。

表 1 相关基因引物
Table1 Related gene primers

Genes		Primer sequence
Bax	Forward	5'-GAAGCCGGTGGTGGAGAA-3'
	Reverse	5'-GCTTGGAGTTGGGCTGGT-3'
Bcl-2	Forward	5'-GAAGCAGGTAATGGAGCAAGGA-3'
	Reverse	5'-GAAGCGTAGTTGTTGAGATGCG-3'
β -Actin	Forward	5'-GTCCACCGCAATGCTTCTA-3'
	Reverse	5'-TGCTGTACCTTCACCGTTC-3'

1.6 Western blot

细胞收集方法同流式,提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后,切胶后进行转膜至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温振荡封闭 1.5 h。以一抗稀释液稀释兔抗人 β -Actin 多克隆抗体 (1:500)、兔抗人 cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 (1:1000),4℃孵育过夜。按 1:1 000 稀释二抗溶液,37℃振荡 1 h。TBS 溶液振荡洗 3 $\times$ 10min,在暗室中将 PVDF 膜用发光剂显色后曝光后分析结果。以目的蛋白与 β -Actin 的灰度比值表示蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计学软件进行数据统计分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间进行比较时采用成对 t 检验,多组间比较时采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CB 和 CDDP 单用对 U2OS 细胞增殖的影响

首先,观察不同药物浓度 CB 和 CDDP 单药使用 24、48 和 72 h,对 U2OS 细胞增殖的影响,以筛选药物的最佳作用浓度和时间。结果显示,CB 和 CDDP 处理 U2OS 细胞 24-72 h

后,U2OS 细胞的活力随着药物浓度的逐渐增加而降低,并且随着时间的延长,细胞活性也明显降低。具体来看,CDDP 在 2-8 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内具有明显的增殖抑制作用(图 1)。CB 在 10-50 $\mu\text{L/mL}$ 的浓度范围内有明显的增殖抑制作用(图 1)。所以,单独使用中药 CB 或传统化疗药 CDDP 均对骨肉瘤 U2OS 细胞的增殖产生抑制作用,且呈时间和浓度依赖性。

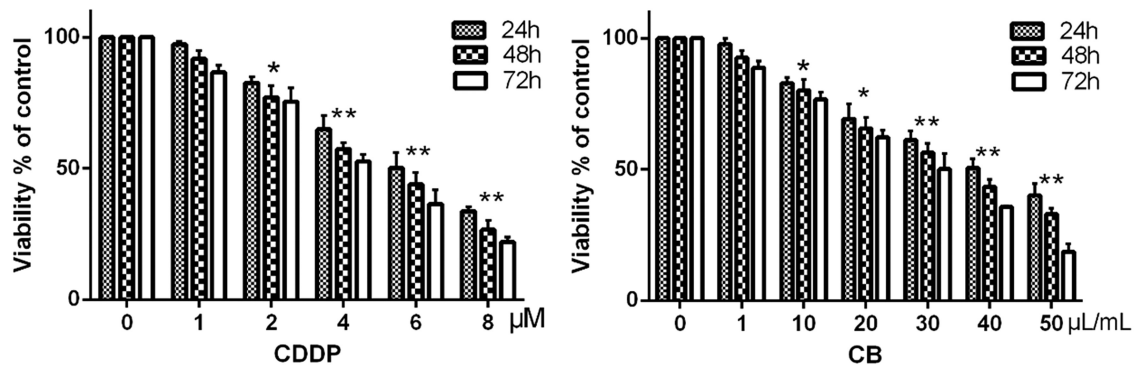


图 1 CCK-8 法检测 CB 或 CDDP 单一用药对 U2OS 细胞增殖的抑制作用(* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与对照组相比)

Fig.1 The effect of Cinobufacini or CDDP alone on the proliferation of U2OS cells(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs control)

2.2 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞增殖的影响

为了观察 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞增殖的影响,我们将 U2OS 细胞用 CB 和 CDDP 分别及联合处理 48 h 后,用 CCK-8 法检测细胞的增殖情况,与单药组相比,CB+CDDP 组对细胞的增殖抑制作用明显增强。具体结果如图 2 所示,与空白对照组相比,单独使用 1, 10, 20 $\mu\text{L/mL}$ CB 使细胞的活力分别降低至 92.32%、78.29%和 64.95%,单独使用 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 使细胞的活力分别降低至 92.36%、76.57%和 57.27%,而当联合应用两药时,细胞活力则分别降低至 80.90%、51.59%和 33.24%,显著低于单药组(* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与对照组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$,与单独用药组相比)(图 2)。在接下来的实验中,我们选取 10 $\mu\text{L/mL}$ 的 CB 以及 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 单独和联合应用 48 h 作为接下来的药物使用浓度和作用时间。

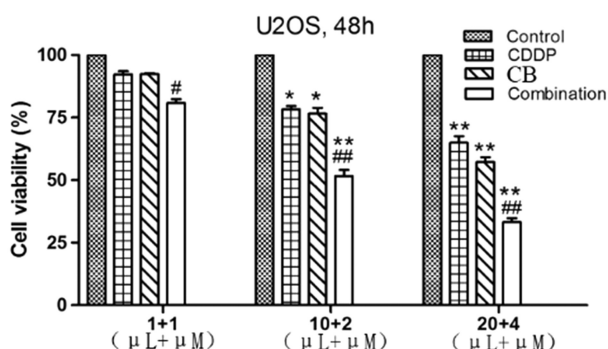


图 2 CCK-8 法检测 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞增殖的影响。(* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与对照组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$,与单独用药组相比)

Fig.2 The effect of Cinobufacini and CDDP on the proliferation of U2OS cells. (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs control, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, vs monotherapy group)

2.3 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞集落形成能力的影响

肿瘤细胞的单细胞集落形成能力不仅体现了肿瘤细胞群体依赖性,而且还反映单细胞的生长情况及其增殖能力。如图 3 所示,与空白对照组相比,单独使用 10 $\mu\text{L/mL}$ CB 和 2 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 处理细胞后,集落形成率分别为 80.2%和 75.3%。而联合使用 CB 和 CDDP 的集落形成率仅为 42.7%,明显低于 CB 组和 CDDP 组,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)由此可见,CB 联合 CDDP 与单药相比能够更加有效地抑制 U2OS 细胞集落形成。

2.4 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞凋亡的影响

接下来我们用 CB 和 CDDP 单用并联合处理 U2OS 细胞 48 h 后,进行细胞凋亡的检测。流式细胞结果分析显示,与空白对照组相比,单独使用 10 $\mu\text{L/mL}$ 的 CB 或 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 能够使 U2OS 细胞的凋亡率达到 14.77%和 16.40%。而使用 10 $\mu\text{L/mL}$ CB 联合 2 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 处理细胞后,细胞凋亡率显著增加,达到 37.0%,与单药组相比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。因此,CB 和 CDDP 单独使用可以促进肿瘤细胞的凋亡,但是两药联用其促凋亡的能力更加明显。

2.5 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞凋亡相关基因表达的影响

为了探寻 CB 和 CDDP 单用及联合用药导致骨肉瘤细胞凋亡的可能机制,我们采用 RT-PCR 的方法检测了用药物处理 U2OS 细胞 48 h 后的 Bax 和 Bcl-2 的表达。结果显示,与空白对照组相比,单独使用 10 $\mu\text{L/mL}$ 的 CB 或 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 促使 U2OS 细胞的促凋亡基因 Bax 的表达增加,而使抑制凋亡基因 Bcl-2 表达下降。但两药联合应用其效果更为显著,与单一用药相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。因此,两药联用比单一用药促凋亡效果更为显著。

2.6 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

接下来我们用 Western blotting 的方法检测 CB 和 CDDP 单用及联合处理 U2OS 细胞 48 h 后,其 caspase 家族中相关蛋

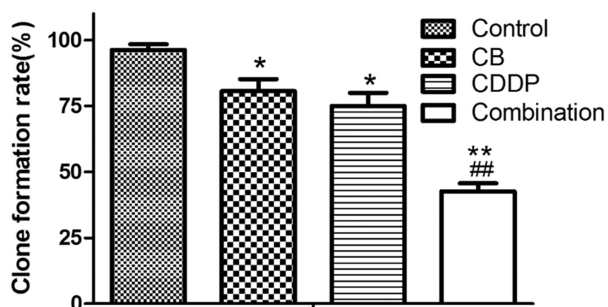


图3 平板克隆检测 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞集落形成能力的影响。(*P<0.05, **P<0.01, 与对照组相比, #P<0.05, ##P<0.01, 与单独用药相比)

Fig.3 The effect of Cinobufacini and CDDP on the clone forming of U2OS cells

(*P<0.05, **P<0.01, vs control, #P<0.05, ##P<0.01, vs monotherapy group)

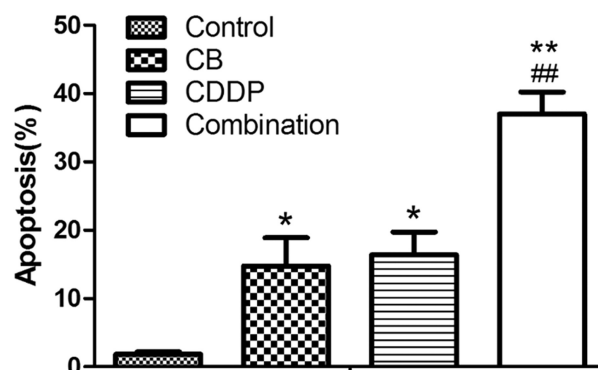


图4 流式细胞仪分析 CB 联合 CDDP 对 U2OS 细胞凋亡的作用。

(*P<0.05, **P<0.01, 与对照组相比, #P<0.05, ##P<0.01, 与单独用药相比)

Fig.4 The effect of Cinobufacini and CDDP on the apoptosis of U2OS cells. (*P<0.05, **P<0.01, vs control, #P<0.05, ##P<0.01, vs monotherapy group)

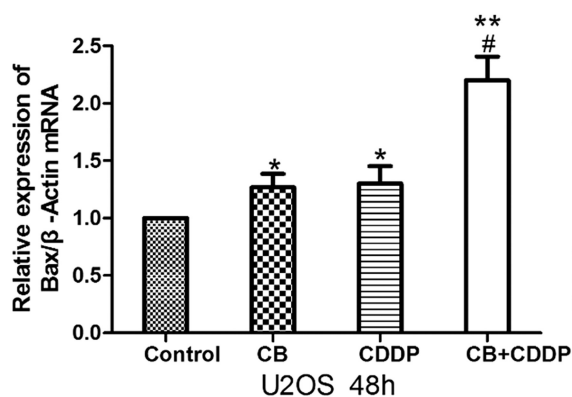


图5-1

图5 RT-PCR 法检测 CB 或 CDDP 单一用药及联合用药对 U2OS 细胞 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

(*P<0.05, **P<0.01, 与对照组相比, #P<0.05, ##P<0.01, 与单独用药相比)

Fig.5 The effect of CB and CDDP alone or in combination on the expression of Bax and Bcl-2 in U2OS cells were detected by RT-PCR

(*P<0.05, **P<0.01, vs control, #P<0.05, ##P<0.01, vs monotherapy group)

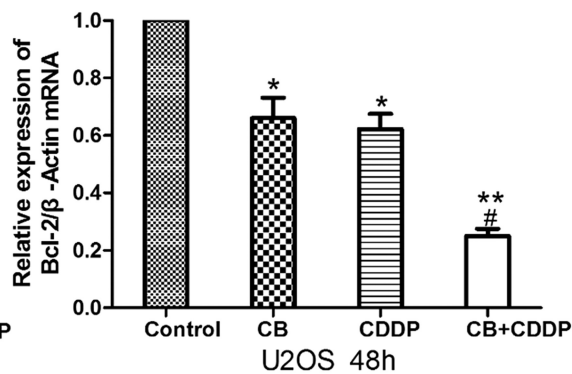


图5-2

白的表达。结果如图6所示,与空白对照组相比,单独使用 10 μL/mL 的 CB 或 2 μmol/L 的 CDDP 能够使 U2OS 细胞的 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白均增加。而使用 10 μL/mL CB 联合 2 μmol/L CDDP 处理细胞后,cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白则明显增加。因此,CB 和 CDDP 单独使用在一定程度上可以促进 caspase 蛋白表达增加,但是两药联用其促凋亡蛋白的增加更加明显。

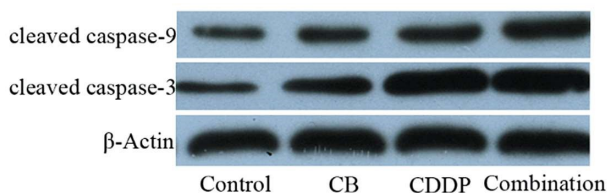


图6 Western blotting 法检测 CB 或 CDDP 单一用药及联合用药对 U2OS 细胞 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 表达的影响。

Fig.6 The effect of CB and CDDP alone or in combination on the expression of cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 in U2OS cells were detected by Western blotting.

3 讨论

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是最常见的骨骼系统原发性恶性肿瘤,有两个发病高峰阶段,一个是儿童和青少年时期,另一个是 60 岁以后的老龄人群,年发病率大约为 3/100 万,其不仅恶性程度高,而且易于发生肺转移,预后较差。对于骨肉瘤的治疗主要以手术和化疗为主。随着新辅助化疗的发展,局部骨肉瘤患者总生存率由 10%提高至 70%^[18,19],但仍有 30%左右的病例会发生复发和转移,常常导致治疗失败。多年来,虽然许多研究人员进行了诸多努力进行各方面的研究,但骨肉瘤患者的 5 年生存率仍旧无法进一步提高,这使得骨肉瘤的治疗处在一个“瓶颈期”,急需需求突破^[1]。CDDP 是一种铂类化疗药,其杀伤癌细胞的主要机制是抑制其 DNA 复制导致 DNA 交联并损伤其细胞膜结构而发挥药理作用,其有效性已得到公认^[20],CDDP 也是新辅助化疗方案中的一线用药,是一种以浓度决定药物疗效的西药制剂,虽然 CDDP 能够有效杀伤骨肉瘤细胞,但是随之而来的严重毒副作用,如耳毒性、神经毒性、肾毒性等以及内在

性和获得性耐药等问题,都在很大程度上限制了其临床大剂量应用。诸多学者在联合用药的方式上进行了许多有益的探索,如刘宏^[7]等研究了中药姜黄素联合 CDDP 对骨肉瘤的治疗作用,侯梦一^[8]则应用 SAHA 联合 CDDP 对骨肉瘤的增殖、凋亡和迁移进行了研究,都显示出良好的治疗效果和应用前景。因此,寻找一种低毒的中药制剂,与经典化疗药物联合使用,通过两者之间的增敏效应,减低 CDDP 的用药剂量,从而减小药物的毒副作用、延缓耐药的产生,增强 CDDP 的化疗效果成为近年来研究的热点和方向^[21]。

CB 是从中华大蟾蜍全皮中提取的蟾毒内酯类物质,是一种具有较强抗肿瘤活性的天然活物质,其广泛应用于临床上各种疾病的治疗,包括恶性肿瘤。研究显示 CB 能够有效抑制体外培养的肝癌细胞的生长,并诱导其凋亡,其机制可能与神经酰胺产生有关^[22]。还有相关研究报道,CB 能抑制人类恶性黑色素瘤的增殖,促进其凋亡,其机制可能与 Caspase 依赖的凋亡通路和线粒体相关的信号通路有关^[23]。这些研究结果均表明 CB 可能通过多种途径对肿瘤细胞产生增殖抑制和促进凋亡,发挥杀伤肿瘤细胞的功效。

在细胞毒性试验中,我们发现经过 72 小时的药物应用,CB 组的药物浓度从 1 $\mu\text{L/mL}$ 增加到 50 $\mu\text{L/mL}$,其细胞活力从 88.65% 下降至 20.42%。CDDP 组药物浓度从 1 μM 增加到 8 μM ,其细胞活力从 86.59% 下降至 21.98%。可见大致相同的下降幅度,CB 的用药浓度提高了 50 倍,而 CDDP 的用药浓度仅提高了 8 倍,说明骨肉瘤细胞对 CB 并不是特别敏感,而对 CDDP 却极为敏感。所有这些结果与临床上的主流观点也是一致的,CDDP 仍然是抗肿瘤的一线用药,而 CB 仅仅是辅助二线用药。但是我们同样发现,当两者联合应用时,其效果却大大超过单一用药,结果见图 2,且明显降低了 CDDP 的用药剂量。所以,我们认为 CB 可以有效提高 CDDP 对骨肉瘤化疗的敏感性,起到了增敏 CDDP 的作用。另外,降低 CDDP 的使用剂量,无疑也部分消除了 CDDP 所带来的胃肠道、神经系统和血液系统的毒副作用。

平板克隆集落形成实验能够直接反映单个肿瘤细胞远期增殖能力,是评价药物抗肿瘤作用的可靠指标^[24],能有效弥补 CCK-8 等短期实验的不足。本实验结果显示,CB 和 CDDP 两药联用与单药应用相比,两药连用其集落形成能力明显降低,且差异具有显著的统计学意义,其结果也说明 CB 对 CDDP 具有增敏作用。

近年来,有关 CB 联合 CDDP 治疗的研究报道较少。宋科官^[25]等的研究表明,CB 能够抑制骨肉瘤细胞的生长,与 CDDP 具有协同效应,两药联合应用杀伤肿瘤细胞的效果显著,并且具有时间和浓度依赖性,但其具体机制不明。Huang Tao^[26]等的研究也表明 CB 联合 CDDP 能够有效杀伤骨肉瘤细胞,其机制可能与上调 Fas 介导的凋亡通路有关。我们的研究结果显示两药联合应用可以明显提高促凋亡基因 Bax 的表达,而降低抑制凋亡基因 Bcl-2 的表达,从而达到激活其下游 Caspase 家族的级联反应。Western blotting 结果也显示 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白在联合用药组较单一用药组显著增加,显示出其明显的协同效应。本研究以人骨肉瘤 U2OS 细胞为研究对象,探讨 CB 联合 CDDP 能否产生增敏效

应,从而降低 CDDP 的使用剂量。结果显示:相同剂量的单药应用与联合用药相比,其杀伤骨肉瘤的效果更为显著,提示达到与大剂量 CDDP 相同的治疗效果,在联合应用 CB 的基础上可以降低 CDDP 的剂量。

虽然 CB 作为一种单一用药应用于骨肉瘤治疗还不太可行,但是作为传统化疗药 CDDP 的增敏剂,则显示出良好的治疗效果。在本研究中,CB 联合 CDDP 大大提高了增殖抑制率和凋亡率,同等效应前提下,可以降低 CDDP 的用药剂量,这可以有效减轻常规化疗过程中大剂量 CDDP 所带来的不能忍受的毒副作用,而且有研究报道 CB 还可以提高机体免疫力,所以两药联合应用,不仅增效明显,而且毒副作用减小。因此,CB 可作为 CDDP 的辅助用药,两药联合作为一种新的化疗方案供临床医生选用。

参考文献(References)

- [1] 郭征. 我国骨肉瘤治疗的现状与问题及发展方向[J]. 中国骨与关节杂志, 2015(05): 338-342
Guo Zheng. Present situation, problems and development in the treatment of osteosarcoma in China [J]. Chinese Journal of Bone and Joint, 2015, 4(5): 338-342
- [2] 马瑞连, 王跃文, 包毅敏, 等. 骨肉瘤治疗新进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(S2): 451-457
Ma Rui-lian, Wang Yue-wen, Bao-Yi et al. Advances in the treatment of osteosarcoma [J]. Journal Of Inner Mongolia Medical University, 2013, 35(S2): 451-457
- [3] Allison D C, Carney S C, Ahlmann E R, et al. A Meta-Analysis of Osteosarcoma Outcomes in the Modern Medical Era [J]. sarcoma, 2012, 2012: 704872
- [4] 赵亚恒, 冯和林, 郑丽华, 等. 骨肉瘤发病机制的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2014(03): 283-286
Zhao Ya-heng, Feng He-ling, Zheng Li-hua, et al. Progress on Osteosarcoma Pathogenesis [J]. Cancer Res Prev Treat, 2014, 41(3): 283-286
- [5] 苏华. 芹菜素对成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡和 GSH 含量的影响[D]. 南华大学, 2011
Su Hua. Effects of apigenin on apoptosis and glutathione content in osteogenic sarcoma MG-63 cell line [D]. University of south china, 2011
- [6] Luetke A, Meyers P A, Lewis I, et al. Osteosarcoma treatment - Where do we stand A state of the art review [J]. Cancer Treatment Reviews, 2014, 40(4): 523-532
- [7] 刘宏, 常玉立, 郑科, 等. 姜黄素联合顺铂对人骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012(36): 7044-7047
Liu Hong, Chang Yu-li, Zheng Ke, et al. Effect of Curcumin plus Cisplatin on the Proliferation and Apoptosis in Osteosarcoma Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(36): 7044-7047
- [8] 侯梦一, 姚娟, 王豪, 等. SAHA 与顺铂联合用药对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和迁移的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(07): 777-785
Hou Meng-yi, Yao Juan, Wang Hao, et al. Effects of Suberoylanilide Hydroxamic Acid Combined with Cisplatin on the Growth, Apoptosis and Migration of Osteosarcoma Cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2016, 38(7): 777-785

- [9] 施剑明, 殷嫦嫦, 孙维君, 等. 槲皮素联合顺铂对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1361-1366
Shi Jian-ming, Yin Chang-chang, Sun Wei-jun, et al. Effect of quercetin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell line MG-63 [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2014, 30(10): 1361-1366
- [10] Emam H, Zhao Q, Furusawa Y, et al. Apoptotic cell death by the novel natural compound, cinobufotalin [J]. Chemico-Biological Interactions, 2012, 199(3): 154-160
- [11] Kai S, Lu J, Hui P, et al. Pre-clinical evaluation of cinobufotalin as a potential anti-lung cancer agent [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 452(3): 768-774
- [12] Qi F, Li A, Inagaki Y, et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad Bufo bufo gargarizans Cantor[J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(3): 342-349
- [13] Sousa L Q, Machado K D, Oliveira S F, et al. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition [J]. Toxicon, 2017, 127: 63-76
- [14] Lu X S, Qiao Y B, Li Y, et al. Preclinical study of cinobufagin as a promising anti-colorectal cancer agent [J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 988-998
- [15] Zhang G, Wang C, Sun M, et al. Cinobufagin inhibits tumor growth by inducing intrinsic apoptosis through AKT signaling pathway in human nonsmall cell lung cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(20): 28935-28946
- [16] Chen T, Yuan S, Wan X N, et al. Chinese herb cinobufagin-reduced cancer pain is associated with increased peripheral opioids by invaded CD3/4/8 lymphocytes[J]. Oncotarget, 2016, 8(1): 11425-11441
- [17] Liu C, Cao W, Chen Y, et al. Comparison of toad skins Bufo bufo gargarizans Cantor from different regions for their active constituents content and cytotoxic activity on lung carcinoma cell lines [J]. Pharmacogn Mag, 2014, 10(39): 207-212
- [18] Isakoff M S, Bielack S S, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27): 3029-3035
- [19] Vijayamurugan N, Bakhshi S. Review of management issues in relapsed osteosarcoma [J]. Expert Review of Anticancer Therapy 2014, 14(2): 151-161
- [20] Yu L, Fan Z, Fang S, et al. Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating notch signaling [J]. oncotarget, 2016, 22(7): 33055-33068
- [21] Quattrini I, Conti A, Pazzaglia L, et al. Metformin inhibits growth and sensitizes osteosarcoma cell lines to cisplatin through cell cycle modulation[J]. Oncol Rep, 2014, 31(1): 370-375
- [22] Cheng L, Chen Y, Peng Y, et al. Ceramide production mediates cinobufotalin-induced growth inhibition and apoptosis in cultured hepatocellular carcinoma cells [J]. Tumor Biology, 2015, 36(8): 5763-5771
- [23] Hsiao Y, Yu C, Yu C, et al. Triggering Apoptotic Death of Human Malignant Melanoma A375.S2 Cells by Bufalin: Involvement of Caspase Cascade-Dependent and Independent Mitochondrial Signaling Pathways [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 2012: 1-9
- [24] Geng X F, Fang M, Liu S P, et al. Quantum dot-based molecular imaging of cancer cell growth using a clone formation assay [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3007-3012
- [25] 宋科官, 张涛, 严峰, 等. 华蟾素和顺铂对骨肉瘤 MG-63 细胞联合杀伤作用的研究[J]. 中国骨与关节杂志, 2014(03): 224-229
Song Ke-guan, Zhang Tao, Yan Feng, et al. A study of combined killing effects of cinobufagin and cisplatin on osteosarcoma MG-63 cells[J]. Chinese Journal of Bone and Joint, 2014, 3(3): 224-229
- [26] Tao H, Gong W, Li X, et al. Efficient Killing Effect of Osteosarcoma Cells by Cinobufacini and Cisplatin in Combination[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012, 13(6): 2847-2851

(上接第 5992 页)

- [38] Lopez-Amado M, Garcia-Caballero T, Lozano-Ramirez A, et al. Human papillomavirus and p53 oncoprotein in verrucous carcinoma of the larynx[J]. J Laryngol Otol, 1996, 110(8): 742-747
- [39] Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial [J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(4): 261-269
- [40] Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymanski M, et al. Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008, 265 Suppl 1: S89-96
- [41] Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, et al. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. Relationship to survival [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1994, 120(7): 743-748
- [42] Holsinger FC, Kies MS, Diaz EM Jr, et al. Durable long-term remission with chemotherapy alone for stage II to IV laryngeal cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(12): 1976-1982
- [43] Holsinger FC, Lin HY, Bassot V, et al. Platin-based exclusive chemotherapy for selected patients with squamous cell carcinoma of the larynx and pharynx[J]. Cancer, 2009, 115(17): 3909-3918