

姜黄素对体内外骨肉瘤细胞增殖和侵袭的影响及其机制研究[△]

颜 泉*(泸州市人民医院骨科,四川 泸州 646000)

中图分类号 R738.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0918-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.13

摘要 目的:研究姜黄素对骨肉瘤细胞增殖和侵袭的影响及其机制。方法:体外细胞试验分为对照组(二甲基亚砜),姜黄素低、中、高浓度组(10、20、40 μmol/L),姜黄素高浓度+内源性微小核糖核酸-21模拟物(agomiR-21)组和姜黄素高浓度+agomiR-21阴性对照(NC)组,分别采用CCK-8和Transwell小室法检测各组人骨肉瘤细胞U-2OS和MG-63的增殖[光密度(OD值)]和侵袭能力(穿膜细胞数),分别采用实时荧光定量聚合酶链式反应法和Western blot法检测各组细胞中miR-21及其靶基因PDCD4蛋白的表达。体内实验将MG-63细胞接种至小鼠体内,然后将小鼠分为空白对照组(生理盐水)、姜黄素组(20 mg/kg)、姜黄素+agomiR-21 NC组(20 mg/kg姜黄素溶液+50 mg/kg agomiR-21 NC溶液)、姜黄素+agomiR-21组(20 mg/kg姜黄素溶液+50 mg/kg agomiR-21溶液),每组8只,分别于瘤内注射相应药物,每天1次,连续给药7 d。测量给药后20 d内的肿瘤体积变化,检测第20天瘤组织中miR-21和PDCD4蛋白的表达。结果:与对照组比较,姜黄素低、中、高浓度组U-2OS、MG-63细胞的OD值和穿膜细胞数均明显减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$);其中姜黄素中、高浓度组U-2OS、MG-63细胞中miR-21的表达明显减弱($P<0.05$ 或 $P<0.01$),PDCD4蛋白表达明显增强($P<0.01$)。与姜黄素高浓度+agomiR-21 NC组比较,姜黄素高浓度+agomiR-21组U-2OS、MG-63细胞的OD值和穿膜细胞数均明显增加($P<0.01$)。与空白对照组比较,姜黄素组和姜黄素+agomiR-21 NC组小鼠给药5 d后肿瘤体积明显减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$);瘤组织中miR-21表达明显减弱($P<0.01$),PDCD4蛋白表达明显增强($P<0.01$)。与姜黄素+agomiR-21 NC组比较,姜黄素+agomiR-21组小鼠给药5 d后肿瘤体积明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);瘤组织中miR-21表达明显增强($P<0.01$),PDCD4蛋白表达明显减弱($P<0.01$)。结论:姜黄素可抑制人骨肉瘤细胞U-2OS、MG-63的增殖和侵袭,其机制可能与下调miR-21表达有关。**关键词** 姜黄素;微小核糖核酸-21;骨肉瘤细胞;增殖;侵袭;体内;体外

Effects of Curcumin on *in vitro* and *in vivo* Proliferation and Invasion of Osteosarcoma Cells and Its Mechanism Study

YAN Quan(Dept. of Orthopaedics, Luzhou Municipal People's Hospital, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of curcumin on proliferation and invasion of osteosarcoma cells and its mechanism. **METHODS:** In *in vitro* cell assay, osteosarcoma cells were divided into control group(dimethyl sulfoxide), curcumin low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (10, 20, 40 μmol/L) and curcumin high-concentration+endogenous miR-21 simulacrum (agomiR-21) group, curcumin high-concentration+agomiR-21 negative control (NC) group. The proliferation (OD value) and invasion ability (transmembrane cells number) of human osteosarcoma cells U-2OS and MG-63 were detected by CCK-8 and Transwell chamber method; the expression of miR-21 and its target gene PDCD4 protein were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot assay. In *in vivo* cell assay, MG-63 cells were inoculated in mice, and the mice were divided into blank control group (normal saline), curcumin group (20 mg/kg), curcumin+agomiR-21 NC group (20 mg/kg curcumin solution+50 mg/kg agomiR-21 NC solution), curcumin+agomiR-21 group (20 mg/kg curcumin solution+50 mg/kg agomiR-21 solution) with 8 mice in each group; they were given intratumoral injection of relevant medicine once a day, for consecutive 7 d. The volume changes of the tumor were measured within 20 d after medication, and the expression of miR-21 and PDCD4 protein in tumor tissue were detected on 20th day. **RESULTS:** Compared with control group, the OD value and transmembrane cells number of U-2OS and MG-63 cells were decreased significantly in curcumin low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups ($P<0.05$ or $P<0.01$); the expression of miR-21 was weakened significantly in curcumin medium-concentration and high-concentration groups of U-2OS and MG-63 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the expression of PDCD4 protein was strengthened significantly ($P<0.01$). Compared with curcumin high-concentration+agomiR-21 NC group, the OD value and transmembrane cells number of U-2OS and MG-63 cells were strengthened significantly in curcumin high-concentration+agomiR-21 group ($P<0.01$). Compared with blank control group, the tumor volume of mice were decreased significantly in curcumin group and curcumin+agomiR-21 NC group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expression of miR-21 was decreased significantly in tumor tissue ($P<0.01$), while the protein expression of PDCD4 was strengthened significantly ($P<0.01$). Compared with curcumin+agomiR-21 NC group, the tumor volume of mice were increased significantly in curcumin+agomiR-21 group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expression of miR-21 in tumor tissue were strengthened significantly ($P<0.01$), while the expression of PDCD4 protein were weakened

[△] 基金项目:四川省科技厅资助项目(No.2015jy0224)

* 副主任医师,副教授。研究方向:骨肿瘤和骨病。电话:0830-2361958。E-mail:2712131923@qq.com

significantly ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Curcumin can inhibit the proliferation and invasion of human osteosarcoma cells U-2OS and MG-63, the mechanism of which may be associated with down-regulating the expression of miR-21.

KEYWORDS Curcumin; miR-21; Osteosarcoma cell; Proliferation; Invasion; *in vivo*; *in vitro*

骨肉瘤(Osteosarcoma)是最常见的原发于骨组织的恶性肿瘤,其恶性程度高、易复发和转移,预后较差。目前骨肉瘤的治疗方法依然是以手术为主,化疗、放射治疗为辅,但手术后局部肿瘤复发、转移和多重耐药性等因素严重影响了术后预后。因此,深入研究骨肉瘤发生发展的分子机制,探索新的、有效的治疗药物及骨肉瘤生物治疗新的分子靶点,对改善骨肉瘤治疗现状有重要意义。

姜黄素(Curcumin)是从姜科植物姜黄的根茎中提取得到的一种酚性色素,是姜黄的主要有效成份之一,具有多方面的药理作用,如抗炎、抗氧化、降脂、抗病毒、清除自由基及抗肿瘤等,其作为一种具有良好开发前景的抗肿瘤药已日益引起人们的重视,成为当今科研的热点^[1]。已有研究发现,姜黄素可通过多种通路抑制肿瘤细胞的增殖、改变细胞周期、诱导细胞凋亡^[2-3],但其具体作用机制仍不清楚。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类非编码RNA,长度约为19~25 bp。miRNA参与调控个体发育和细胞凋亡、增殖及分化等生命活动,与机体多种疾病的发生发展密切相关,在人类肿瘤中存在表达异常,发挥了促癌基因或者抑癌基因的功能^[4]。已有研究发现,miRNA-21(miR-21)在多种肿瘤中表达异常,其通过调控多个肿瘤相关基因,如人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)、程序性细胞凋亡因子4(PDCD4)、自杀相关因子配体(FasL)、超氧化物歧化酶3(SOD3)、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)等^[5-8],发挥重要的促癌作用。已有研究发现,miR-21在骨肉瘤中表达显著升高,与骨肉瘤的发生发展密切相关^[9],有望成为骨肉瘤治疗的重要靶点。基于此,笔者研究了姜黄素对人骨肉瘤细胞增殖和侵袭的影响,及其与miR-21的关系,为阐明姜黄素在骨肉瘤中的抗癌机制提供重要的试验依据,进一步为骨肉瘤的抗癌治疗提供新的靶标。

1 材料

1.1 仪器

H1MF型酶标仪(美国Bio-Tek公司);IX80型倒置显微镜(日本Olympus公司);7500型荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)仪(美国ABI公司);ChemiDoc Touch型蛋白印迹检测分析仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

姜黄素原料药(批号:MFC00008365,纯度:94%)、二甲基亚砜(DMSO,批号:D2650,纯度:99%)均购自美国Sigma公司;内源性miR-21模拟物(agomiR-21,批号:B06001,纯度:99%)和agomiR-21阴性对照(agomiR-21 NC,批号:B04008,纯度:99%)均购自上海

吉玛制药技术有限公司;DMEM细胞培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);CCK-8细胞增殖检测试剂(日本Dojindo公司);Transwell小室(美国Millipore公司);Trizol总RNA提取试剂(美国Invitrogen公司);RIPA细胞裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);miRNA qRT-PCR检测试剂盒(美国Gene Copoeia公司);兔抗人PDCD4多克隆抗体(美国Abcam公司);兔抗人 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(美国CST公司);辣根过氧化物(HRP)酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 细胞

人骨肉瘤细胞U-2OS和MG-63均购自中国科学院上海细胞库,由泸州市人民医院骨科室保存。

1.4 动物

SPF级重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠32只,♂,体质量18~22 g,6~8周龄,均购自泸州医学院实验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(川)2013-065。

2 方法

2.1 细胞培养与分组

U-2OS、MG-63细胞采用含10%胎牛血清、100 u/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基培养,置于5%CO₂,37℃恒温恒湿培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行试验。体外细胞试验分为对照组(DMSO)、姜黄素低、中、高浓度组(10、20、40 μ mol/L,即4、8、16 mg/L)、姜黄素高浓度+agomiR-21 NC组和姜黄素高浓度+agomiR-21组。

2.2 荷瘤小鼠模型建立与分组

将0.2 mL(约 1×10^6 个)MG-63细胞悬液皮下注射于SCID小鼠的左后肢,每天观察小鼠皮下肿瘤生长情况并记录。待小鼠皮下肿瘤结节体积约为100 mm³时,即表明骨肉瘤荷瘤小鼠模型建立成功。将32只造模成功的小鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、姜黄素组(20 mg/kg)、姜黄素+agomiR-21 NC组(20 mg/kg姜黄素溶液+50 mg/kg agomiR-21 NC溶液)、姜黄素+agomiR-21组(20 mg/kg姜黄素溶液+50 mg/kg agomiR-21溶液),每组8只,分别于瘤内注射相应药物,每天1次,连续给药7 d。自第1次给药开始计时,每5天测量肿瘤大小1次,共测量4次,于第20天结束测量。颈椎脱位法处死小鼠,切取肿瘤,测量,按公式计算肿瘤体积,肿瘤体积=($W^2 \times L$) $\times 1/2$,式中, W 为肿瘤最宽部分长度, L 为肿瘤最长部分长度。

2.3 CCK-8法检测细胞增殖能力

2.3.1 姜黄素对人骨肉瘤细胞增殖的影响 取对数生

长期的U-2OS、MG-63细胞,分别以 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,培养12 h后,按“2.1”项下对照组和姜黄素低、中、高浓度组加药,每组3个复孔,作用12、24、48 h后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,使用酶标仪在450 nm波长处测定细胞的光密度(OD)值,OD值越大表示细胞增殖能力越强。

2.3.2 过表达miR-21对姜黄素抑制人骨肉瘤细胞增殖的影响 取对数生长期U-2OS、MG-63细胞,分别以 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,培养12 h后,按“2.1”项下对照组、姜黄素高浓度+agomiR-21 NC组、姜黄素高浓度+agomiR-21组加药,每组3个复孔,作用48 h后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,使用酶标仪在450 nm波长处测定细胞的OD值。

2.4 Transwell小室法检测细胞侵袭能力

取U-2OS、MG-63细胞,按“2.1”项下分组加药,作用24 h后,将各组细胞分别接种于底膜基质胶预铺的24孔板Transwell小室中,上室接种无血清培养基配制的细胞悬液200 μ L(约 1×10^5 个/孔),下室加入含10%胎牛血清的培养基,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育48 h,取出小室用棉签擦去上室内的基质胶和细胞,4%多聚甲醛固定10~30 min后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞3次,再用0.1%结晶紫染色20 min,清水洗3次,于100倍显微镜下观察细胞穿膜细胞数(呈紫红色的细胞),随机选取5个视野计数,取平均数,穿膜细胞数越多表示侵袭能力越强。

2.5 qRT-PCR法检测细胞中miR-21表达

取“2.3.1”项下处理24 h的U-2OS、MG-63细胞和“2.2”项下各组小鼠瘤组织,依据Trizol说明书提取总RNA,按照miRNA qRT-PCR检测试剂盒说明书操作,将所得RNA反转录成cDNA,采用qRT-PCR法检测细胞中miR-21表达水平。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,miR-21上游引物序列为:5'-TAGT-TATCAGACTGATGTTGA-3',下游引物序列为:5'-ACAACATCAGTCTTGATAACTA-3',扩增长度为108 bp; snRNA U6(miRNA检测内参)上游引物序列为:5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTAA-3',下游引物序列为:5'-TATGGAACGCTTCACGAATTTGC-3',扩增长度为120 bp。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,共40循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法(目的基因 C_t 值/内参基因 C_t 值)对miR-21表达进行相对定量。

2.6 Western blot法检测细胞中PDCD4蛋白表达

取“2.3.1”项下处理24 h的U-2OS、MG-63细胞和“2.2”项下各组小鼠瘤组织,经RIPA裂解液裂解,提取蛋白,BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白经10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转入聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,分别经5%脱脂奶粉室温封闭2 h,置于一抗[兔抗人PDCD4、 β -actin多克隆抗体(1:1 000)]中4 $^{\circ}$ C孵育过夜,然后置于二抗[HRP标记山羊抗小鼠

IgG(1:10 000)]中室温孵育2 h,将化学发光底物滴加至PVDF膜上,收集荧光信号,分析目的蛋白PDCD4与内参蛋白 β -actin的灰度值,以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示PDCD4蛋白表达水平。

2.7 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 姜黄素对人骨肉瘤细胞的增殖和侵袭的影响

与对照组比较,姜黄素低、中、高浓度组U-2OS、MG-63细胞作用24、48 h的OD值均显著减小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),作用48 h的穿膜细胞数明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明姜黄素对U-2OS、MG-63细胞增殖和侵袭均有抑制作用。姜黄素对U-2OS、MG-63细胞增殖能力的影响结果见表1,侵袭能力的影响结果见表2。

表1 姜黄素对U-2OS、MG-63细胞增殖能力的影响结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of curcumin on the proliferation of U-2OS and MG-63 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	U-2OS细胞(OD值)			MG-63细胞(OD值)		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.255 \pm 0.023	0.435 \pm 0.042	0.657 \pm 0.073	0.262 \pm 0.028	0.415 \pm 0.043	0.586 \pm 0.073
姜黄素低浓度组	0.235 \pm 0.019	0.335 \pm 0.029*	0.513 \pm 0.043*	0.247 \pm 0.021	0.327 \pm 0.015*	0.471 \pm 0.043*
姜黄素中浓度组	0.221 \pm 0.021	0.275 \pm 0.026**	0.425 \pm 0.045**	0.238 \pm 0.016	0.262 \pm 0.028**	0.365 \pm 0.037**
姜黄素高浓度组	0.198 \pm 0.024	0.218 \pm 0.016**	0.317 \pm 0.029**	0.209 \pm 0.025	0.199 \pm 0.014**	0.247 \pm 0.021**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表2 姜黄素对U-2OS、MG-63细胞侵袭能力的影响结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of curcumin on the invasion of U-2OS and MG-63 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	穿膜细胞数,个	
	U-2OS细胞	MG-63细胞
对照组	151.3 \pm 10.2	162.5 \pm 12.8
姜黄素低浓度组	113.5 \pm 10.3*	126.7 \pm 13.5*
姜黄素中浓度组	86.2 \pm 8.5**	73.4 \pm 8.6**
姜黄素高浓度组	67.9 \pm 7.2**	50.3 \pm 6.2**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 过表达miR-21对姜黄素抑制人骨肉瘤细胞增殖和侵袭的影响

与对照组比较,姜黄素高浓度+agomiR-21 NC组U-2OS、MG-63细胞的OD值和穿膜细胞数明显减小;与姜黄素高剂量+agomiR-21 NC组比较,姜黄素高剂量+agomiR-21组U-2OS、MG-63细胞的OD值和穿膜细胞数明显增加。表明人骨肉瘤细胞中加入姜黄素后,如果再加入agomiR-21使miR-21过表达会减弱姜黄素对人骨肉瘤细胞增殖和侵袭的抑制效果。过表达miR-21对姜黄素抑制U-2OS、MG-63细胞增殖和侵袭的影响见表3。

表3 过表达 miR-21 对姜黄素抑制人骨肉瘤细胞增殖和侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of the overexpression of miR-21 on inhibitory effect of curcumin on the proliferation and invasion of human osteosarcoma cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	增殖能力(OD值)		侵袭能力(穿膜细胞数)	
	U-2OS细胞	MG-63细胞	U-2OS细胞	MG-63细胞
对照组	0.657±0.073	0.586±0.073	151.3±10.2	162.5±12.8
姜黄素高浓度+agomiR-21 NC组	0.325±0.053**	0.256±0.033**	61.2±7.5**	74.5±8.9**
姜黄素高浓度+agomiR-21组	0.582±0.071**	0.497±0.062**	135.6±12.7**	142.7±15.8**

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与姜黄素高浓度+agomiR-21 NC组比较,** $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. curcumin high-concentration+agomiR-21 NC group, ** $P<0.01$

3.3 姜黄素对人骨肉瘤细胞中 miR-21 和 PDCD4 蛋白表达的影响

与对照组比较,姜黄素中、高浓度组 U-2OS、MG-63 细胞中 miR-21 表达明显减弱($P<0.05$ 或 $P<0.01$), PDCD4 蛋白表达明显增强($P<0.01$)。姜黄素对 U-2OS、MG-63 细胞中 miR-21 和 PDCD4 蛋白表达的影响结果见表 4。

表4 姜黄素对 U-2OS、MG-63 细胞中 miR-21 和 PDCD4 蛋白表达的影响结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of curcumin on the expression of miR-21 and PDCD4 protein in U-2OS and MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	U-2OS细胞		MG-63细胞	
	miR-21	PDCD4蛋白	miR-21	PDCD4蛋白
对照组	1.05±0.23	0.67±0.13	1.12±0.18	0.82±0.15
姜黄素低剂量组	0.92±0.12	0.71±0.09	0.97±0.09	0.91±0.21
姜黄素中剂量组	0.71±0.14*	1.23±0.22**	0.68±0.12*	1.47±0.14**
姜黄素高剂量组	0.43±0.19**	2.12±0.52**	0.51±0.17**	1.84±0.25**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.4 姜黄素对小鼠肿瘤生长的影响

与空白对照组比较,姜黄素组和姜黄素+agomiR-21 NC 组小鼠给药 5 d 后肿瘤体积明显减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与姜黄素+agomiR-21 NC 组比较,姜黄素+agomiR-21 组小鼠给药 5 d 后肿瘤体积明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。说明姜黄素能抑制小鼠的肿瘤生长,但是如果过表达 miR-21 就会减弱姜黄素对小鼠肿瘤生长的抑制作用。各组小鼠肿瘤体积的测定结果见表 5。

3.5 姜黄素对小鼠瘤组织中 miR-21 和 PDCD4 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,姜黄素组和姜黄素+agomiR-21 NC 组小鼠瘤组织中 miR-21 表达明显减弱($P<0.01$), PDCD4 蛋白表达明显增强($P<0.01$);与姜黄素+agomiR-21 NC 组比较,姜黄素+agomiR-21 组小鼠瘤组织中 miR-21 表达明显增强($P<0.01$), PDCD4 蛋白表达

明显减弱($P<0.01$)。各组小鼠瘤组织中 miR-21 和 PDCD4 蛋白表达的测定结果见表 6。

表5 各组小鼠肿瘤体积的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8, \text{mm}$)
Tab 5 Tumor volume of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{mm}$)

组别	0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
空白对照组	110.11±9.09	185.78±22.71	245.37±20.61	424.34±30.85	628.67±66.92
姜黄素组	104.08±7.48	129.66±8.66*	162.16±18.03**	197.17±20.15**	234.60±27.36**
姜黄素+agomiR-21 NC组	116.47±6.84	133.84±14.53*	171.16±18.14**	201.58±18.21**	245.03±17.69**
姜黄素+agomiR-21组	108.59±10.31	196.25±21.36*	236.85±17.25**	389.35±31.28**	598.62±43.25**

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与姜黄素+agomiR-21 NC 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. curcumin+agomiR-21 NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表6 各组小鼠瘤组织中 miR-21 和 PDCD4 蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 6 Expression of miR-21 and PDCD4 protein in tumor tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	miR-21	PDCD4蛋白
空白对照组	1.24±0.26	0.87±0.15
姜黄素组	0.46±0.14**	2.12±0.28**
姜黄素+agomiR-21 NC组	0.39±0.18**	2.36±0.32**
姜黄素+agomiR-21组	0.87±0.16**	1.12±0.15**

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与姜黄素+agomiR-21 NC 组比较,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$; vs. curcumin + agomiR-21 NC group, ** $P<0.01$

4 讨论

骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤,致死率及致残率极高。骨肉瘤的治疗包括手术治疗和化疗,目前用于骨肉瘤治疗的化疗药物主要有阿霉素、顺铂、甲氨蝶呤、异环磷酰胺 4 类^[10],但目前用于化疗的药物对骨肉瘤细胞和人体正常细胞均有明显的杀伤作用,不良反应较大,因此新的辅助化疗药物和化疗策略的研究对骨肉瘤的治疗意义重大。

姜黄素对多种肿瘤具有杀伤作用,如骨肉瘤、淋巴瘤、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、肠癌、卵巢癌等^[11]。由于姜黄素是从植物中提取的天然色素,对人体几乎没有副作用,因此可作为一种有潜力的高效低毒抗肿瘤药物应用于临床。但由于姜黄素难溶于水,致使其口服生物利用度低,体内半衰期很短,难以达到有效血药浓度,限制了其应用。因此,提高姜黄素生物利用度,深入阐明其药理机制意义重大。

miRNA 主要通过识别靶标 mRNA 分子的 3' 端非翻译区域(3'-UTR)的特异性结合位点,通过与靶标 mRNA 分子完全互补配对或部分配对来抑制 mRNA 转录后的翻译。已有研究证实,PDCD4 是 miR-21 的直接靶基因,是 miR-21 在多种肿瘤中发挥促癌作用的重要通路之一^[15-18]。本研究发现,姜黄素可以下调骨肉瘤细胞中 miR-21 的表达,从而减弱了 miR-21 对靶基因 PDCD4 的抑制作用,并抑制骨肉瘤细胞的增殖和侵袭,在骨肉瘤

贝伐单抗多囊脂质体的处方优化及体外释放特性研究^Δ

王毅云^{1*}, 慕宏杰¹, 华红臣¹, 姜莹¹, 孟庆庆¹, 王爱萍^{1,2}, 刘沙¹, 孙考祥^{1,2#}(1.烟台大学药学院, 山东烟台 264005; 2.山东绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室, 山东烟台 264003)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0922-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.14

摘要 目的:制备具有缓释作用的贝伐单抗(BEV)多囊脂质体(BEV-MVLs),并对其体外释放特性进行研究。方法:采用复乳法制备BEV-MVLs,以有机相中三油酸甘油酯(TO)的浓度、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)-胆固醇(CH)的比值(mol/mol)、外水相中L-赖氨酸的浓度为因素,以包封率为指标,采用Box-Behnken设计-响应面法对方剂进行优化。采用倒置荧光显微镜和扫描电镜观察BEV-MVLs的形态,激光粒度仪测定其粒径,高效液相色谱法测定BEV含量并计算其包封率和体外累积释放度。结果:最优处方为有机相中TO 2.72 mmol/L、DOPC-CH比值0.67(mol/mol)、外水相中L-赖氨酸40 mmol/L。所制BEV-MVLs的包封率为(80.65±4.42)%($n=3$),与预测值的相对误差为2.54%;脂质体外观呈球形,大小较均匀,为典型的非同心囊泡结构,平均粒径为16.80 μm;30 d的体外累积释放度约为92%。结论:成功制得具有缓释作用的BEV-MVLs,其包封率达到预期效果。

关键词 贝伐单抗;多囊脂质体;复乳法;Box-Behnken设计-响应面法;处方优化;体外释放

Study on Formulation Optimization and *in vitro* Release Characteristics of Bevacizumab Multivesicular Liposomes

WANG Yiyun¹, MU Hongjie¹, HUA Hongchen¹, JIANG Ying¹, MENG Qingqing¹, WANG Aiping^{1,2}, LIU Sha¹, SUN Kaoxiang^{1,2}(1.School of Pharmacy, Yantai University, Shandong Yantai 264005, China; 2.State Key Lab

模型小鼠体内也发现姜黄素能通过下调miR-21而发挥抑制肿瘤生长的抗肿瘤作用。本研究结果从表观遗传学调控方面证实了姜黄素可通过下调促癌基因miR-21的表达,上调PDCD4蛋白表达发挥抗骨肉瘤作用,这为证明姜黄素在骨肉瘤中的抗癌机制提供了实验依据。

参考文献

- [1] 张英,李冬梅,邢颖.姜黄素的药理作用与载体研究进展[J].中国药房,2015,26(13):1850-1852.
- [2] KUNNUMAKKARA AB, BORDOLOI D, PADMAVATHI G, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(11):1325-1348.
- [3] PANDA AK, CHAKRABORTY D, SARKAR I, et al. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin[J]. *J Exp Pharmacol*, 2017. DOI: 10.2147/JEP.S70568.
- [4] SCHICKEL R, BOYERINAS B, PARK SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death[J]. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5959-5974.
- [5] WANG Z, YAO W, LI K, et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation

via PTEN/PDCD4[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4727-4733.

- [6] HUANG JH, CAO Y, ZENG L, et al. Tetramethylpyrazine enhances functional recovery after contusion spinal cord injury by modulation of MicroRNA-21, FasL, PDCD4 and PTEN expression[J]. *Brain Res*, 2016, 1648(Pt A): 35-45.
- [7] ZHANG X, NG WL, WANG P, et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNF α [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(18): 4707-4713.
- [8] HASHIMI ST, FULCHER JA, CHANG MH, et al. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation[J]. *Blood*, 2009, 114(2): 404-414.
- [9] HUA Y, JIN Z, ZHOU F, et al. The expression significance of serum MiR-21 in patients with osteosarcoma and its relationship with chemosensitivity[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(13): 2989-2994.
- [10] ISAKOFF MS, BIELACK SS, MELTZER P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029-3035.
- [11] QADIR MI, NAQVI ST, MUHAMMAD SA. Curcumin: a polyphenol with molecular targets for cancer control[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(6): 2735-2739.

^Δ 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2016HB58)

* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0535-3808266。E-mail:wangyiyun5253@sina.com

通信作者:教授,博士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0535-3946400。E-mail:sunkaoxiang@luye.cn

(收稿日期:2017-08-24 修回日期:2018-01-15)

(编辑:邹丽娟)