

# 肉苁蓉苯乙醇总苷抑制耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠肿瘤生长的作用机制研究



丁聚贤<sup>1</sup>, 谢兴文<sup>2</sup>, 李鼎鹏<sup>1</sup>, 李 宁<sup>2</sup>, 许 伟<sup>3</sup>, 王 凯<sup>4</sup>, 方 岩<sup>1</sup>, 徐世红<sup>3</sup>, 王小强<sup>3</sup>, 李建国<sup>1</sup>, 苏积亮<sup>1</sup>

1. 甘肃省第二人民医院(西北民族大学附属医院)急诊科(兰州 730000)
2. 甘肃中医药大学附属医院骨科(兰州 730000)
3. 甘肃省中医院骨科(兰州 730050)
4. 甘肃省人民医院骨科(兰州 730000)

**【摘要】目的** 探讨肉苁蓉苯乙醇总苷(Cistanche phenylethanol glycosides, CPhGs)对耐药骨肉瘤荷瘤小鼠固有免疫功能、肿瘤生长及肿瘤细胞凋亡的影响机制。**方法** 通过梯度浓度法建立人骨肉瘤 MG-63 细胞耐药株,并构建耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠模型(共 36 只,每组 6 只)。模型组予以生理盐水灌胃;甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)组每三日腹腔注射 MTX(20 mg/kg);联合组每三日腹腔注射 MTX 的同时给予中剂量浓度 CPhGs(250 mg/kg)每日灌胃;CPhGs 高、中、低剂量组分别给予高(500 mg/kg)、中(250 mg/kg)、低(125 mg/kg)剂量浓度的 CPhGs 每日灌胃。观察裸鼠骨肉瘤瘤体大小变化,绘制各组肿瘤平均体积随时间变化曲线图,计算抑瘤率;采用 ELISA 法检测裸鼠血清中 IL-2、TNF- $\alpha$  含量;利用流式细胞术检测肿瘤组织细胞凋亡的情况;Western blot 检测肿瘤组织中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达及 p-AKT、p-mTOR、p-PI3K 表达变化。**结果** 与模型组相比,各实验组肿瘤组织体积及重量显著减小( $P < 0.001$ );与模型组和 MTX 组相比,各 CPhGs 组、联合组裸鼠血清 IL-2、TNF- $\alpha$  含量显著升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,各实验组 Bax 表达显著升高( $P < 0.001$ ),高、中剂量 CPhGs 组及联合组 Bcl-2 表达显著降低( $P < 0.001$ );与模型组和 MTX 组相比,各 CPhGs 组及联合组裸鼠瘤体组织凋亡率均显著升高,且 p-AKT、p-mTOR、p-PI3K 含量显著减少( $P < 0.05$ )。**结论** CPhGs 能显著改善耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠的免疫功能,并通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路及 Bax、Bcl-2 凋亡蛋白的表达促进肿瘤细胞凋亡,从而有效抑制肿瘤生长。

**【关键词】** 骨肉瘤;肉苁蓉苯乙醇总苷;MG-63;肿瘤细胞;凋亡;作用机制;PI3K/AKT/mTOR 信号通路

**【中图分类号】** R 285.5 **【文献标识码】** A

The mechanism of Cistanche phenylethanol glycosides in inhibiting tumor growth in nude mice bearing drug-resistant osteosarcoma

DING Juxian<sup>1</sup>, XIE Xingwen<sup>2</sup>, LI Dingpeng<sup>1</sup>, LI Ning<sup>2</sup>, XU Wei<sup>3</sup>, WANG Kai<sup>4</sup>, FANG Yan<sup>1</sup>, XU Shihong<sup>3</sup>, WANG Xiaoqiang<sup>3</sup>, LI Jianguo<sup>1</sup>, SU Jiliang<sup>1</sup>

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202505085

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81704104);国家自然科学基金地区科学基金项目(82260945);甘肃省青年科技基金计划项目(21JR7RA672);甘肃省自然基金项目(20JR5RA163);兰州市科技计划项目(2023-2-51、2023-4-70)

通信作者:谢兴文,主任医师,博士研究生导师,Email: 827975272@qq.com

1. Department of Emergency, The Second People's Hospital of Gansu Province (The Affiliated Hospital of Northwest Minzu University), Lanzhou 730000, China

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

3. Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

4. Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: XIE Xingwen, Email: 827975272@qq.com

**【Abstract】Objective** To investigate the mechanism of Cistanche phenylethanol glycosides (CPhGs) on innate immune function, tumor growth and tumor cell apoptosis in mice bearing drug-resistant osteosarcoma. **Methods** A drug-resistant strain of human osteosarcoma MG-63 cell was established by the gradient concentration method, and a drug-resistant osteosarcoma loaded tumor model of nude mice were constructed (36 mice, 6 mice in each group). The model group was given daily gavage of saline; the methotrexate (MTX) group was injected intraperitoneally with MTX (20 mg/kg) every three days; the combined group was intraperitoneally injected with MTX every three days and given a medium-dose concentration of CPhGs (250 mg/kg) by gavage daily; the CPhGs high-, medium- and low-dose groups were respectively given daily gavage of high (500 mg/kg), medium (250 mg/kg) and low (125 mg/kg) dose concentrations of CPhGs. The changes in the size of osteosarcoma tumors in nude mice were observed and the average tumor volume of each group was plotted over time to calculate the tumor inhibition rate. The serum levels of IL-2 and TNF- $\alpha$  in nude mice were measured by ELISA. The apoptosis of tumor tissue cells was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax, as well as the expression changes of p-AKT, p-mTOR and p-PI3K were examined in tumor tissues by Western blot. **Results** Compared with the model group, the tumor tissue volume and weight were significantly decreased in all experimental groups ( $P < 0.001$ ). The serum levels of IL-2 and TNF- $\alpha$  in nude mice were significantly higher in each CPhGs group and the combined group than those in both the model group and MTX group ( $P < 0.01$ ). The expression level of apoptosis protein Bax was significantly higher in each test group compared with Methotrexate (MTX) group ( $P < 0.001$ ), while the expression level of Bcl-2 was significantly reduced in the high- and medium- dose CPhGs groups and the combined group ( $P < 0.001$ ). Compared with the model group and the MTX group, the apoptosis rates of the tumor tissue were significantly increased in each CPhGs group and the combination group, and the levels of p-AKT, p-mTOR and p-PI3K were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CPhGs significantly improved the immune function in nude mice bearing drug-resistant osteosarcoma, and inhibited tumor growth by promoting tumor cell apoptosis, which was mediated by inhibiting the expression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and modulating the expression of Bax and Bcl-2 apoptotic proteins.

**【Keywords】** Osteosarcoma; Cistanche phenylethanol glycosides; MG-63; Tumor cells; Apoptosis; Mechanism; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 是一种高度恶性原发性骨肿瘤, 其发病率在青少年原发性恶性骨肿瘤中居首位, 具有极高的致残率和致死率。目前, 术后应用大剂量甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 单药或联合其他化疗药物, 可有效提高 OS 患者的生存率<sup>[1]</sup>。然而, 部分 OS 患者因耐药对化疗不敏感, 导致肿瘤进展。此外, 肿瘤患者体内 T 淋巴细胞亚群常处于免疫失衡状态, 化疗会在短期内进一步加重免疫紊乱及免疫抑制<sup>[2]</sup>。有

研究表明, 从 OS 的生物学特征层面分析, 增强人体免疫反应可能改善 OS 患者的预后<sup>[3]</sup>。化疗耐药是 OS 患者治疗失败最常见且最难解决的问题之一, 免疫功能低下也是导致肿瘤快速进展的关键因素之一<sup>[4]</sup>。

磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (AKT) / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路被认为是人类癌症中最重要的致癌通路之一。该通路在

OS 中常过度激活,可驱动 OS 细胞增殖、侵袭、转移及血管生成,并抑制其凋亡,进而导致 OS 对化疗药物的耐药性<sup>[5]</sup>。研究证实,肉苁蓉主要成分肉苁蓉苯乙醇总苷(Cistanche phenylethanol glycosides, CPhGs)可增强肝癌荷瘤小鼠的免疫功能,抑制肿瘤生长<sup>[6]</sup>。体外研究表明,CPhGs 能显著抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖,并诱导其凋亡<sup>[7]</sup>。诱导细胞凋亡是目前抗肿瘤药物的主要作用机制,也是近年来 OS 治疗的研究热点之一。裸鼠在解剖生理学、生物学等方面与人有较多相似之处,且裸鼠对移植瘤的接受性较强,可以移植某些异源肿瘤细胞,在肿瘤模型建立中应用范围较广<sup>[8-9]</sup>。本研究拟通过构建耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠模型,观察 CPhGs 对耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠模型免疫功能、PI3K/AKT/mTOR 通路的影响及其对肿瘤生长的抑制作用和药理学机制,以期拓宽 OS 的临床治疗思路和基础研究提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级裸鼠 36 只(6~8 周龄,体重 19~25 g),购自常州卡文斯实验动物有限公司,动物合格证号:NO.202367524。本实验经西北民族大学实验动物伦理委员会批准(Xbmu-3m-202306)。

### 1.2 细胞株

MG-63 细胞,购自上海中科院细胞研究所。

### 1.3 药品与试剂

胎牛血清、高糖 DMEM 培养基、0.25% Trypsin-EDTA、MTX(大连美仑生物技术有限公司,批号分别为 PWL001、MA0212、MA0233-1、MB1156-1);CPhGs(陕西森元生物科技有限公司,批号:SY20231212605);p-mTOR 抗体、p-PI3K 抗体、p-AKT 抗体、Bcl-2 抗体、Bax 抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号分别为 HA600094、HA721673、ET1607-73、ET1702-53、ET1603-34);TNF- $\alpha$ 、IL-2 的 ELISA 检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司,批号分别为 EK282、EK202)。

### 1.4 仪器

CT14RD 台式高速冷冻离心机(上海天美生化仪器有限公司);SW-CJ-1 FD 超净台(苏州净化股份有限公司);CO-5AC 细胞培育箱(日本三洋电机公司);AE31 荧光倒置显微镜(厦门

麦克奥迪实业集团有限公司);RT-6100 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);PowerPoc 凝胶电泳仪、ChemiDocTM 凝胶成像分析仪(美国 Bio-rad 公司)。

## 1.5 实验方法

### 1.5.1 建立人骨肉瘤 MG-63 耐药株(MG-63/MTX)

培养 MG-63 细胞至对数生长期,细胞融合率达到 80%。加入预先配制好的含 100 ng/mL MTX 的细胞培养液,48 h 后换液,待细胞重新达到 80% 融合率后,继续加入含相同浓度 MTX 的培养液。重复上述步骤,使 MG-63 骨肉瘤细胞能在含 100 ng/mL MTX 的培养液中稳定生长。接着按照此法逐渐提高培养液中 MTX 的浓度,依次采用 200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL、5 000 ng/mL 及 10 000 ng/mL 的浓度。经过 5 个月的培养,最后选取 10 000 ng/mL MTX 中稳定生长的骨肉瘤耐药系(MG-63/MTX)进行后续实验。

### 1.5.2 构建耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠动物模型

骨肉瘤动物模型造模方法参考文献<sup>[10]</sup>,将 MG-63/MTX 细胞制备成浓度为  $4 \times 10^6/100 \mu\text{L}$  细胞悬液,于裸鼠腋窝皮下注射 100  $\mu\text{L}$  造模,观察成瘤情况。

### 1.5.3 动物分组与干预

将荷瘤模型裸鼠随机分为模型(Model)组、MTX 组、MTX 联合 CPhGs(MTX-CPhGs)组、高剂量 CPhGs(CPhGs-H)组、中剂量 CPhGs(CPhGs-M)组和低剂量 CPhGs(CPhGs-L)组,每组 6 只。造模后第 6 天开始灌胃,模型组小鼠每日灌胃 10  $\mu\text{L/g}$  生理盐水;MTX 组腹腔注射 20 mg/kg MTX,每三天注射一次;MTX-CPhGs 组每日灌胃 250 mg/kg CPhGs,同时腹腔注射 20mg/kg MTX,每三天注射一次;CPhGs-H 组每日灌胃 500 mg/kg CPhGs;CPhGs-M 组每日灌胃 250 mg/kg CPhGs;CPhGs-L 组每日灌胃 125 mg/kg CPhGs。各组裸鼠均连续处理 15 天。

### 1.5.4 测定耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠肿瘤体积及重量

观察并记录各组裸鼠的肿瘤体积,并绘制肿瘤生长曲线。末次给药 24 h 后,采用颈椎脱臼法处死小鼠,剥离肿瘤并称重,计算抑瘤率。抑瘤

率计算方式如下:

瘤体体积 =  $1/2 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$

抑瘤率 =  $[(\text{模型组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重}] \times 100\%$

### 1.5.5 ELISA检测血清IL-2、TNF- $\alpha$ 含量

提取各组裸鼠血清,利用ELISA法检测小鼠血清IL-2与TNF- $\alpha$ 的含量,具体操作按ELISA试剂盒说明书进行。

### 1.5.6 流式细胞术检测肿瘤组织细胞凋亡情况

取各组裸鼠肿瘤组织剪碎、研磨、过滤、离心、裂解红细胞,制备为单细胞悬液置于离心管。并调整细胞浓度至  $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,  $100 \mu\text{L}$  的 Binding Buffer 重悬细胞,加入  $5 \mu\text{L}$  的 AV-FITC 和 PI,避光孵育  $15 \text{ min}$ ,离心重悬后加入  $400 \mu\text{L}$  Binding Buffer,振荡混匀后上机检测。

### 1.5.7 Western blot检测p-AKT、p-mTOR、p-PI3K及凋亡蛋白Bcl-2、Bax表达

将各组肿瘤组织块剪碎后置于匀浆器中,加入蛋白裂解液裂解匀浆,裂解后在  $12\ 000 \text{ r/min}$  条件下离心并提取上清。制备电泳凝胶,电泳分离蛋白质,转膜和封闭。一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,洗膜后用二抗室温孵育  $1 \text{ h}$ 。TBST 缓冲液摇床洗涤,加入 ECL 发光溶液显影,定影后进行凝胶图像分析,并用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

## 1.6 统计分析

采用 GraphPad Prism 7 和 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料以均数和标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,符合正态分布且方差齐者,组间比较采用单因

素方差分析 (one-way ANOVA),不符合正态分布采用非参数检验。采用配对  $t$  检验分析抑瘤率。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 骨肉瘤MG-63耐药系 (MG-63/MTX) 细胞株

原始 MG-63 细胞贴壁生长,体积中等,多呈梭形,偶见不规则形,核大,核仁清晰 (图 1-A)。MG-63/MTX 细胞体积变长,呈梭形或不规则形,有明显伪足 (图 1-B)。

### 2.2 各组小鼠肿瘤生长情况比较

从灌胃第 6 天开始,给药组小鼠肿瘤体积与模型组相比明显缩小。灌胃第 21 天,各组取其中 3 只裸鼠的肿瘤作比较 (图 2-A),各给药组肿瘤体积与模型组相比均减小 ( $P < 0.001$ )。CPhGs-H 组、CPhGs-M 组、CPhGs-L 组及 MTX-CPhGs 组的肿瘤体积均小于 MTX 组 ( $P < 0.001$ )。在 CPhGs 各组中,随着药物浓度的增加,肿瘤体积逐渐减小,与模型组肿瘤体积的差异也越大 (图 2-B)。表明 CPhGs 可明显抑制耐药荷瘤小鼠肿瘤组织的生长,且抑制作用与 CPhGs 浓度呈正相关关系。

与模型组比较,MTX 组、CPhGs-H 组、CPhGs-M 组、CPhGs-L 组及 MTX-CPhGs 组平均瘤重均显著降低 ( $P < 0.001$ )。与 MTX 组相比,CPhGs-H 组、CPhGs-M 组、CPhGs-L 组及 MTX-CPhGs 组抑瘤率显著增高,且在 CPhGs-H 组、CPhGs-M 组、CPhGs-L 组中,抑瘤率随药物浓度增加呈剂量依赖性升高,详见表 1。

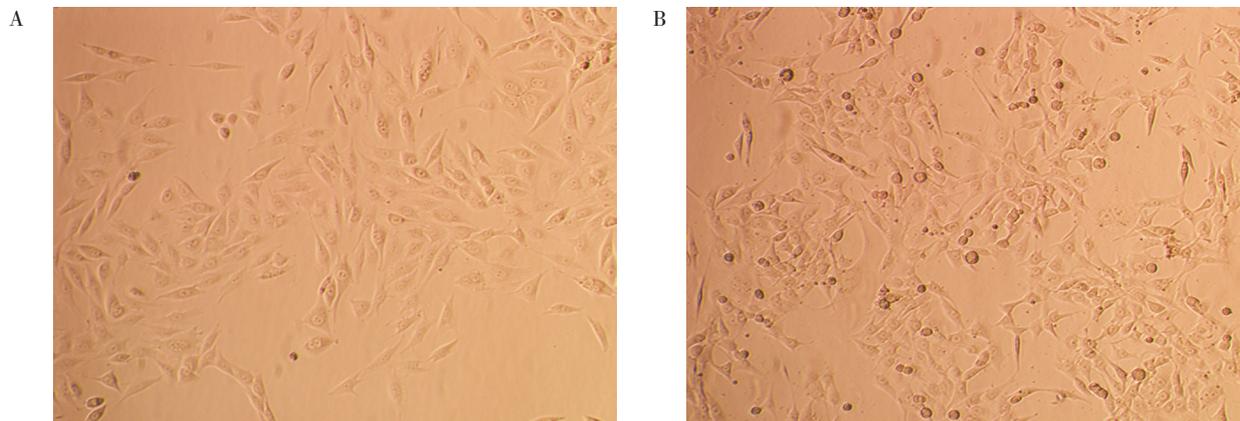


图 1 MG-63与MG-63/MTX细胞形态对比图 ( $\times 200$ )

Figure 1. Morphological comparison of MG-63 and MG-63/MTX cells ( $\times 200$ )

注: A. MG-63细胞; B. MG-63/MTX细胞。

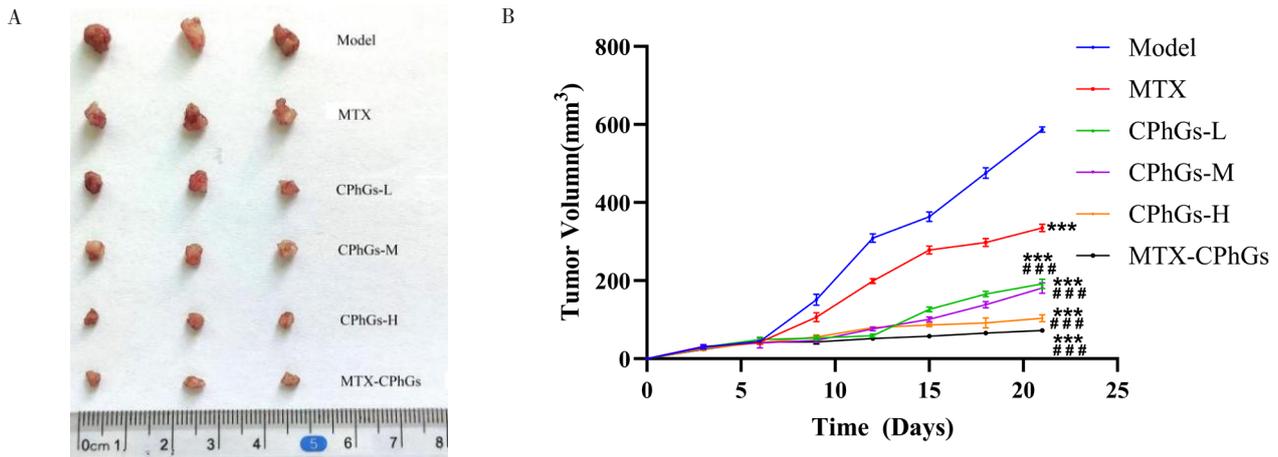


图2 干预后各组荷瘤裸鼠肿瘤体积对比 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \text{mm}^3$ )

Figure 2. Comparison of tumor volumes in nude mice with tumors in each group after intervention ( $\bar{x} \pm s, n=3, \text{mm}^3$ )

注: Model, 模型组; MTX, 甲氨蝶呤组; CPhGs-L, 低剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-M, 中剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-H, 高剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; MTX-CPhGs, 甲氨蝶呤联合肉苁蓉苯乙醇总苷组; 与模型 (Model) 组相比,  $***P < 0.001$ ; 与甲氨蝶呤 (MTX) 组相比,  $###P < 0.001$ 。

表1 肉苁蓉苯乙醇总苷对荷瘤裸鼠肿瘤重量的影响 ( $n=3$ )

Table 1. Effect of Cistanche phenylethanol glycosides on tumor weight in tumor-bearing nude mice in each group ( $n=3$ )

分组	平均瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
Model	0.79 ± 0.04	
MTX	0.49 ± 0.03 <sup>###</sup>	35.73 ± 4.61
CPhGs-L	0.33 ± 0.01 <sup>***###</sup>	58.55 ± 4.02 <sup>###</sup>
CPhGs-M	0.31 ± 0.02 <sup>***###</sup>	60.50 ± 0.98 <sup>###</sup>
CPhGs-H	0.28 ± 0.01 <sup>***###</sup>	64.58 ± 1.77 <sup>###</sup>
MTX-CPhGs	0.18 ± 0.01 <sup>***###</sup>	75.77 ± 1.78 <sup>###</sup>

注: Model, 模型组; MTX, 甲氨蝶呤组; CPhGs-L, 低剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-M, 中剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-H, 高剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; MTX-CPhGs, 甲氨蝶呤联合肉苁蓉苯乙醇总苷组; 与模型 (Model) 组相比,  $***P < 0.001$ ; 与甲氨蝶呤 (MTX) 组相比,  $###P < 0.001$ 。

### 2.3 CPhGs对耐药荷瘤裸鼠血清IL-2、TNF-α含量的影响

与模型组比较, MTX组模型小鼠血清TNF-α含量显著增高 ( $P < 0.05$ ), MTX-CPhGs组模型小鼠血清TNF-α和IL-2含量明显增高 ( $P < 0.01$ )。此外, CPhGs-H组、CPhGs-M组与CPhGs-L组模型小鼠血清TNF-α含量较模型组均显著增高 ( $P < 0.001$ ), 且CPhGs-M组模型小鼠血清IL-2含量增高 ( $P < 0.01$ ), 而CPhGs-H组和CPhGs-L组模型小鼠血清IL-2含量增高更为显著 ( $P < 0.001$ )。与MTX组比较, CPhGs-H组、CPhGs-M组、CPhGs-L组及MTX-CPhGs组小鼠血清TNF-α、IL-2含量均显著增高 ( $P < 0.001$ ), 详见表2。这表明CPhGs可能通过调控TNF-α和IL-2表达水平改善耐药OS荷瘤小鼠固有免疫功能。

### 2.4 CPhGs对耐药荷瘤裸鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响

相较于模型组, MTX组和CPhGs-L组肿瘤组织凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ), CPhGs-H组、CPhGs-M组及MTX-CPhGs组肿瘤组织凋亡率均升高更为显著 ( $P < 0.001$ )。相较于MTX组, CPhGs-H组、CPhGs-M组及MTX-CPhGs组肿瘤组织凋亡率均升高 ( $P < 0.001$ ), 详见图3、表3。以上表明CPhGs可促进耐药荷瘤裸鼠肿瘤组织细胞的凋亡。

### 2.5 CPhGs对耐药荷瘤裸鼠肿瘤组织p-AKT、p-mTOR、p-PI3K蛋白表达的影响

与模型组相比, MTX组耐药裸鼠肿瘤组织中p-AKT表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。MTX-CPhGs组、CPhGs-H组及CPhGs-M组裸鼠肿瘤组织中p-AKT、p-mTOR、p-PI3K表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), CPhGs-L组裸鼠肿瘤组织中p-AKT表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), p-mTOR、

表2 各组血清TNF-α、IL-2表达水平 ( $n=3$ )

Table 2. Serum TNF-α and IL-2 expression levels in each group ( $n=3$ )

分组	TNF-α (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
Model	79.90 ± 3.60	28.36 ± 2.35
MTX	93.71 ± 2.86*	28.87 ± 1.60
MTX-CPhGs	118.00 ± 3.78 <sup>***###</sup>	40.92 ± 1.54 <sup>***###</sup>
CPhGs-H	122.76 ± 2.97 <sup>***###</sup>	45.03 ± 4.95 <sup>***###</sup>
CPhGs-M	117.52 ± 3.60 <sup>***###</sup>	41.44 ± 3.87 <sup>***###</sup>
CPhGs-L	124.19 ± 8.37 <sup>***###</sup>	44.77 ± 2.31 <sup>***###</sup>

注: Model, 模型组; MTX, 甲氨蝶呤组; CPhGs-L, 低剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-M, 中剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-H, 高剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; MTX-CPhGs, 甲氨蝶呤联合肉苁蓉苯乙醇总苷组; 与模型 (Model) 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与甲氨蝶呤 (MTX) 组相比,  $###P < 0.001$ 。

p-PI3K 表达水平降低更为显著 ( $P < 0.001$ )。与 MTX 组比较, MTX-CPhGs 组及 CPhGs-H 组裸鼠肿瘤组织中 p-AKT、p-mTOR、p-PI3K 表达水平亦显著降低 ( $P < 0.001$ ), CPhGs-M 组裸鼠肿瘤组织中 p-AKT 的表达略有下降 ( $P < 0.05$ ), p-mTOR、p-PI3K 表达水平降低更为显著 ( $P < 0.001$ ), CPhGs-L 组裸鼠肿瘤组织中 p-AKT 的表达下降 ( $P < 0.01$ ), p-mTOR、p-PI3K 表达水平降低更为显著 ( $P < 0.001$ ), 详见图 4-A 至图 4-D。

### 2.6 CPhGs对耐药荷瘤裸鼠肿瘤组织 Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

与模型组相比, 各药物组耐药裸鼠肿瘤组织中 Bax 表达水平均显著增高 ( $P < 0.001$ ), MTX 组肿瘤组织中 Bcl-2 表达水平增高 ( $P < 0.05$ ), MTX-CPhGs 组、CPhGs-H 组及 CPhGs-M 组肿瘤组织 Bcl-2 表达显著降低 ( $P < 0.001$ )。与 MTX 组比较, CPhGs-H 组、CPhGs-M 组、

CPhGs-L 组及 MTX-CPhGs 组肿瘤组织 Bcl-2 表达水平均显著降低 ( $P < 0.001$ ), CPhGs-H 组与 CPhGs-M 组肿瘤组织的 Bax 表达水平显著增高 ( $P < 0.001$ ), 详见图 4-A、图 4-E、图 4-F。进一步表明 CPhGs 可通过调控 Bcl-2、Bax 表达水平促进耐药荷瘤裸鼠肿瘤组织细胞的凋亡。

### 3 讨论

OS 患者化疗耐药及免疫功能低下是 OS 临床治疗面临的瓶颈问题。目前, 抗肿瘤药物的作用机制主要是促进肿瘤细胞凋亡, 该过程是化疗有效性的直接体现; 另一方面, 机体免疫力是患者耐受化疗药物的有力保障。因此, 研究如何有效促进耐药 OS 细胞凋亡与减少化疗所致的免疫功能损伤至关重要。

肉苁蓉具有温肾填精、润肠、抗氧化、提高免疫力的药理作用。张洪泉等<sup>[11]</sup>于 1988 年报道了肉苁蓉水提取物具有改善小鼠免疫能力、激发

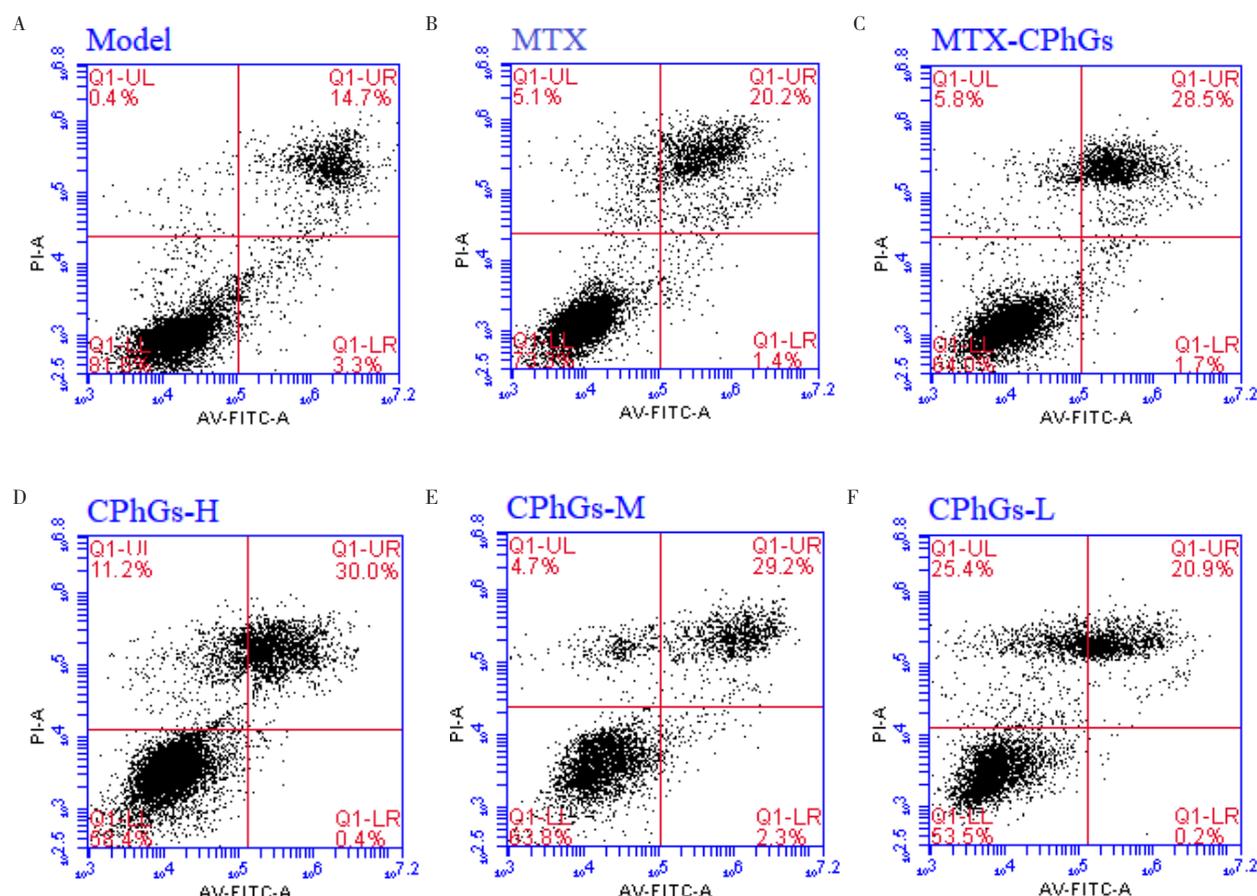


图3 各组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率 ( $n=3$ , %)

Figure 3. The apoptosis rate of tumor tissue cells in each group of mice ( $n=3$ , %)

注: A. 模型 (Model) 组; B. 甲氨蝶呤 (MTX) 组; C. 甲氨蝶呤联合肉苁蓉苯乙醇总苷 (MTX-CPhGs) 组; D. 高剂量肉苁蓉苯乙醇总苷 (CPhGs-H) 组; E. 中剂量肉苁蓉苯乙醇总苷 (CPhGs-M) 组; F. 低剂量肉苁蓉苯乙醇总苷 (CPhGs-L) 组。

表3 各组肿瘤组织细胞凋亡率 (n=3)  
Table 3. The apoptosis rate of tumor tissue cells in each group (n=3)

分组	细胞凋亡率 (%)
Model	14.47 ± 1.10
MTX	19.77 ± 1.32 <sup>*</sup>
MTX-CPhGs	29.21 ± 0.77 <sup>****</sup>
CPhGs-H	31.66 ± 1.93 <sup>****</sup>
CPhGs-M	30.13 ± 2.16 <sup>****</sup>
CPhGs-L	22.49 ± 3.02 <sup>**</sup>

注: Model, 模型组; MTX, 甲氨蝶呤组; MTX-CPhGs, 甲氨蝶呤联合肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-L, 低剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-M, 中剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-H, 高剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; 与模型 (Model) 组相比, <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*\*</sup>P < 0.01, <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001; 与甲氨蝶呤 (MTX) 组相比, <sup>###</sup>P < 0.001。

小鼠免疫功能器官, 如胸腺的发育功能; 后续的体内研究进一步发现肉苁蓉多糖具有抗肺癌、抗肉瘤的作用<sup>[12]</sup>。研究发现, 肉苁蓉的主要成分 CPhGs 具有抗氧化、抗衰老、神经保护、提高免疫力、保肝护肝和治疗生精障碍等药理学作用<sup>[13]</sup>, 还对肝癌、肺癌、乳腺癌和卵巢癌等多种恶性肿瘤具有抗肿瘤及促进免疫功能的作用<sup>[14]</sup>。课题组前期研究发现, 肉苁蓉在体外水平可通过降低 MRP1 及突变型 P53 蛋白的表达促进耐药 OS 细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。本研究发现, 药物处理组肿瘤体积及重量较模型组相比均减小, 不同浓度 CPhGs

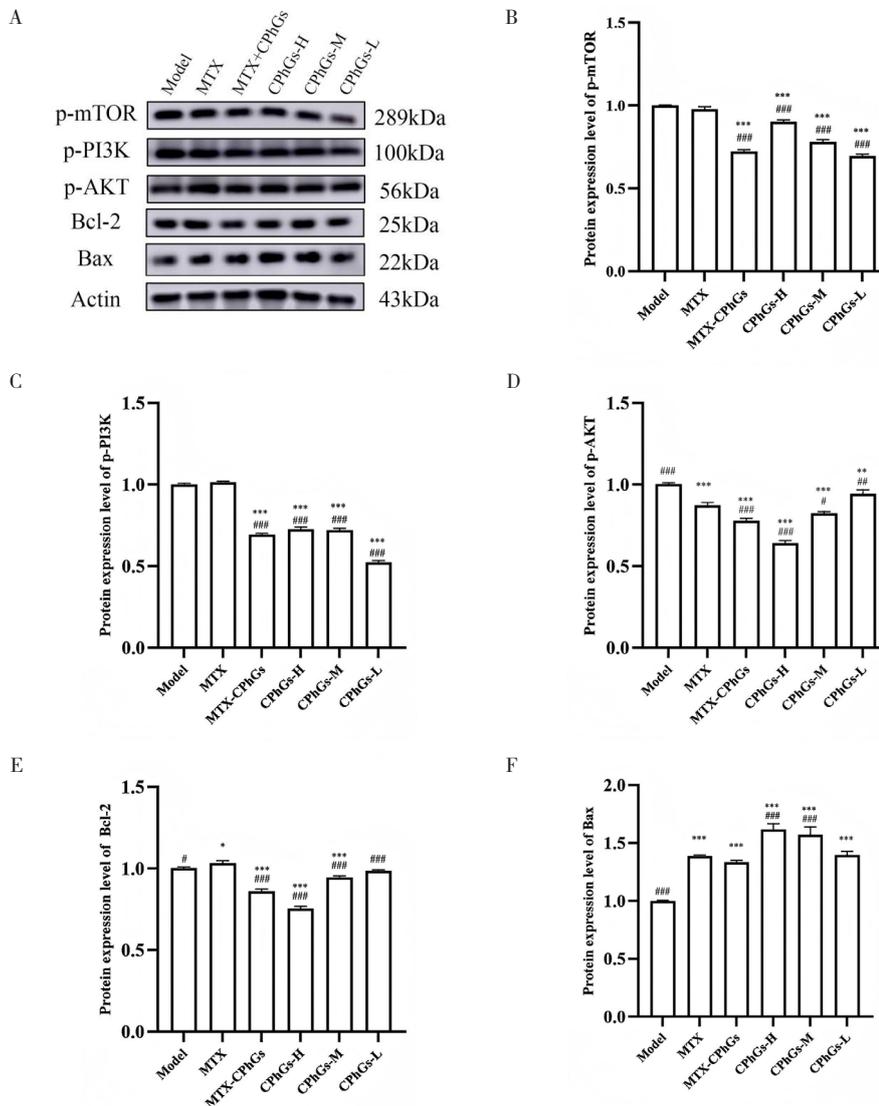


图4 裸鼠肿瘤组织中p-mTOR、p-PI3K、p-AKT、Bcl-2、Bax蛋白电泳结果示意图 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3, mm<sup>3</sup>)

Figure 4. Electrophoresis result diagram of p-mTOR, p-PI3K, p-AKT, Bcl-2 and Bax proteins in tumor tissue of nude mice ( $\bar{x} \pm s$ , n=3, mm<sup>3</sup>)

注: Model, 模型组; MTX, 甲氨蝶呤组; MTX-CPhGs, 甲氨蝶呤联合肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-L, 低剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-M, 中剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; CPhGs-H, 高剂量肉苁蓉苯乙醇总苷组; A. p-mTOR、p-PI3K、p-AKT、Bcl-2和Bax蛋白的Western Blot结果; B. p-mTOR; C. p-PI3K; D. p-AKT; E. Bcl-2; F. Bax; 与模型组相比, <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*\*</sup>P < 0.01, <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001; 与MTX组相比, <sup>#</sup>P < 0.05, <sup>##</sup>P < 0.01, <sup>###</sup>P < 0.001。

组及 MTX-CPhGs 组的肿瘤体积较 MTX 组也有所缩小, 抑瘤率随之升高。这表明 CPhGs 可明显抑制耐药 OS 荷瘤小鼠肿瘤组织的生长, 且抑制作用与 CPhGs 浓度呈正相关。此结果与候晓甜等<sup>[16]</sup>的 CPhGs 抑制 H22 肝癌小鼠皮下移植瘤生长研究结果基本一致。

免疫功能与肿瘤的发生发展密切相关。IL-2 是免疫系统的一类细胞生长因子, 能通过促进 T 细胞增殖分化提高机体的免疫机能, 并产生具有抗肿瘤活性的免疫细胞<sup>[17]</sup>。TNF- $\alpha$  通过与受体结合诱导肿瘤细胞凋亡、增强宿主免疫功能、作用于肿瘤血管内皮细胞、增加血管通透性、诱发程序性死亡, 继而引起肿瘤出血坏死等发挥抗肿瘤作用<sup>[18]</sup>。通过分析各组小鼠血清 IL-2、TNF- $\alpha$  的表达, 发现不同浓度 CPhGs 组、MTX-CPhGs 组荷瘤模型小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-2 表达水平均显著增高。这提示 CPhGs 可能通过调控 TNF- $\alpha$ 、IL-2 表达水平改善耐药 OS 荷瘤小鼠免疫功能, 抑制耐药骨肉瘤细胞增殖, 进而发挥抗肿瘤作用。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路中 AKT 磷酸化可直接或间接调控 Bcl-2 基因家族、X- 连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP)、鼠双微基因 2 (*MDM-2*)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 等一系列凋亡相关因子<sup>[19]</sup>。异常激活的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路能上调膜转运蛋白 ABCB1 和 ABCC1 的表达, 从而降低化疗疗效, 介导 OS 细胞对化疗药物耐药性的产生<sup>[20]</sup>。多种中药单体均可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进 OS 细胞凋亡, 如原花青素 B2、槲皮素、犀草素、松乳菇多糖等<sup>[21]</sup>。本研究发现, 在 MTX 单独作用下, p-AKT 蛋白表达也显著降低, 而 p-mTOR、p-PI3K 蛋白表达未见显著差异, 说明 MTX 对耐药荷瘤裸鼠肿瘤组织中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响较小。而不同浓度 CPhGs 组及 MTX-CPhGs 组耐药 OS 荷瘤裸鼠肿瘤组织中 p-AKT、p-mTOR、p-PI3K 蛋白表达较模型组均降低, 相较于 MTX 组, p-AKT、p-mTOR、p-PI3K 蛋白表达也显著降低, 揭示了 CPhGs 对耐药 OS 细胞的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有显著抑制作用。通过流式细胞术检测肿瘤组织的细胞凋亡情况, 发现药物干预后各组肿瘤组织凋亡率均显著升高。通过检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达, 发现不同浓度 CPhGs 组及 MTX-CPhGs 组耐药 OS 荷瘤裸鼠肿瘤组织中

Bax 表达水平均显著增高, 而 MTX-CPhGs 组、CPhGs-H 组及 CPhGs-M 组模型小鼠肿瘤组织 Bcl-2 表达显著降低。这提示一定浓度的 CPhGs 在体内可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 下调 Bcl-2 表达并上调 Bax 表达促进耐药 OS 细胞的凋亡。

综上, CPhGs 在体内可促进抑制耐药 OS 细胞的凋亡、抑制肿瘤的生长, 其机制可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 调控 Bcl-2、Bax 的表达而实现。同时, CPhGs 可通过上调 TNF- $\alpha$  与 IL-2 的表达水平改善耐药 OS 荷瘤小鼠的免疫功能, 从而发挥协同抗肿瘤的作用, 但其临床应用潜力仍有待进一步探索研究。

## 参考文献

- 1 Zhang C, Hu J, Zhu K, et al. Survival, complications and functional outcomes of cemented megaprotheses for high-grade osteosarcoma around the knee[J]. Int Orthop, 2018, 42(4): 927-938. DOI: 10.1007/s00264-018-3770-9.
- 2 Liu Q, Xu R, Xu X, et al. Characteristics and significance of T lymphocyte subsets in peripheral blood of osteosarcoma mice[J]. Transl Cancer Res, 2022, 11(6): 1503-1509. DOI: 10.21037/ter-22-264.
- 3 吴蔚, 景豆豆, 曹理, 等. 骨肉瘤免疫治疗的现状和前景 [J]. 肿瘤防治研究, 2022, 49(7): 721-726. [Wu W, Jing DD, Cao L, et al. Current status and prospects of immunotherapy for osteosarcoma[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2022, 49(7): 721-726.] DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2022.21.1281.
- 4 王成志, 刘一帆, 张晓青, 等. 黄芪甲苷调控免疫细胞抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(11): 145-149. [Wang CZ, Liu YF, Zhang XQ, et al. Research progress on mechanism of astragaloside IV regulating anti-tumor action of immune cells[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2024, 42(11): 145-149.] DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2024.11.029.
- 5 Zhang J, Yu XH, Yan YG, et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma[J]. Clin Chim Acta, 2015, 444: 182-192. DOI: 10.1016/j.cca.2014.12.041.
- 6 胡琼, 由淑萍, 刘涛, 等. 肉苁蓉苯乙醇总苷抗肝癌作用的实验研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(3): 194-199. [Hu Q, You SP, Liu T, et al. An investigation on the anti-liver cancer effect of cistanche[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2018, 30(3): 194-199.] DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2018.03.006.
- 7 齐鑫鑫, 由淑萍, 何转霞, 等. 肉苁蓉苯乙醇苷对 HepG2 肝癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2021, 44(9): 1041-1047. [Qi XX, You SP, He ZX, et al. Effect of Cistache deserticola phenylethanol glycoside on proliferation and apoptosis of HepG2 cells in vitro[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2021, 44(9): 1041-1047.] DOI: 10.3639/

- j.issn.1009-5551.2021.09.012.
- 8 Panaampon J, Sasamoto K, Kariya R, et al. Establishment of nude mice lacking NK cells and their application for human tumor xenografts[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 22(4): 1069-1074. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.4.1069.
  - 9 于春波, 孙鹏, 张小伟, 等. 胰腺癌裸鼠皮下异种移植动物模型建立研究[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(9): 1648-1650. [Yu CB, Sun P, Zhang XW, et al. The animal model study of pancreatic cancer xenograft in nude mice[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(9): 1648-1650.] DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2012.09.017.
  - 10 徐小茹, 王楠, 孙濛濛, 等. 针刺单穴与膻穴配伍对骨肉瘤模型小鼠的效应差异研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2271-2276. [Xu XR, Wang N, Sun MM, et al. Different effects in osteosarcoma model mice with acupuncture at single point and compatibility of acupoints[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2020, 35(5): 2271-2276.] DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2012.09.017.
  - 11 张洪泉, 张爱香, 堵年生, 等. 肉苁蓉对小白鼠免疫功能的影响[J]. *中西医结合杂志*, 1988, (12): 736-737, 710. [Zhang HQ, Zhang AX, Du NS, et al. Effects of Cistanche deserticola on immune function of mice[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 1988, (12): 736-737, 710.] <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotat-ZZXJ198812019.htm>.
  - 12 张洪泉, 许爱华, 李电东. 肉苁蓉多糖对肿瘤和荷瘤小鼠的药理作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, (S1): 155-156, 294. [Zhang HQ, Xu AH, Li DD. Pharmacological effects of Cistanche polysaccharides on tumors and tumor-bearing mice[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 1997, (S1): 155-156, 294.] [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=mg\\_qcPBBapnmsDqon66yc8-zI2VqwJgixywPNSnA10qboPnZqB4FNuT0bsHSSvs0Dn72KJt\\_\\_SvxLZeQ8vJicy96v2o-S-Wc-bp5ClislhREtATYT6KGBMKP3\\_EreGXg3-BH52ltk0rqWiNksajNzld06uudfRzCDj-utLfgfANyySxJMHM-g=&uniplatform=NZKPT&language=CHS](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=mg_qcPBBapnmsDqon66yc8-zI2VqwJgixywPNSnA10qboPnZqB4FNuT0bsHSSvs0Dn72KJt__SvxLZeQ8vJicy96v2o-S-Wc-bp5ClislhREtATYT6KGBMKP3_EreGXg3-BH52ltk0rqWiNksajNzld06uudfRzCDj-utLfgfANyySxJMHM-g=&uniplatform=NZKPT&language=CHS)
  - 13 薛海燕, 焦婵媛, 姚军. 肉苁蓉总苷药理作用的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(4): 486-488. [Xue HY, Jiao CY, Yao J. Current status of pharmacological effects of glycosides of Cistanches Herba[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 34(4): 486-488.] DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.04.026.
  - 14 唐颖, 武建强. 肉苁蓉苯乙醇苷的抗肿瘤作用[J]. *生物技术进展*, 2023, 13(3): 399-405. [Tang Y, Wu JQ. Anti-tumor effects of phenylethanoid glycosides deprived from Cistanche deserticola[J]. *Current Biotechnology*, 2023, 13(3): 399-405.] DOI: 10.19586/j.2095-2341.2023.0040.
  - 15 许伟, 丁聚贤, 谢兴文, 等. 肉苁蓉对化疗耐药骨肉瘤细胞的逆转作用及 MRP1、P53 表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(3): 551-554. [Xu W, Ding JX, Xie XW, et al. Effect of Cistanche deserticola on chemotherapy-resistant osteosarcoma cells and expression of MRP1 and P53[J]. *Journal of Li-shizhen Traditional Chinese Medicine*, 2021, 32(3): 551-554.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.03.11.
  - 16 候晓甜, 刘涛, 苏德奇. 肉苁蓉苯乙醇总苷对 H22 荷瘤小鼠皮下移植瘤抑制作用的实验研究[J]. *毒理学杂志*, 2021, 35(3): 231-235, 240. [Hou XT, Liu T, Su DQ. Anti-tumor effect of phenylethanol glycosides from Cistanche deserticola on H22 tumor-bearing mice[J]. *Journal of Toxicology*, 2021, 35(3): 231-235, 240.] DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2021.03.010.
  - 17 张欣雨, 王丹, 付春雪, 等. 白细胞介素-2 治疗肿瘤的研究进展[J]. *癌症进展*, 2024, 22(6): 581-585, 618. [Zhang XY, Wang D, Fu CX, et al. Research progress on the treatment of tumors with interleukin-2[J]. *Oncology Progress*, 2024, 22(6): 581-585, 618.] DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2024.22.06.01.
  - 18 高世勇, 李丹. 肿瘤坏死因子与癌症相关研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(9): 1209-1213. [Gao SY, Li D. Research advances in tumor necrosis factor and cancer[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(9): 1209-1213.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.09.006.
  - 19 周慧, 海广范, 张涛, 等. 癌症治疗中 PI3K/AKT/mTOR 通路及靶向抑制剂研究进展[J]. *中国药业*, 2023, 32(5): 127-135. [Zhou H, Hai GF, Zhang T, et al. Research progress of PI3K/AKT/mTOR pathway and its targeted inhibitors in cancer treatment[J]. *China Pharmaceuticals*, 2023, 32(5): 127-135.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-4931.2023.05.030.
  - 20 刘彦娟, 曹雨虹, 匡荣. 肿瘤多药耐药发生机制及中药逆转研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59(7): 561-570. [Liu YJ, Cao YH, Kuang R. Research progress of mechanism of tumor multidrug resistance and reversal by traditional Chinese medicine[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2024, 59(7): 561-570.] DOI: 10.11669/cpj.2024.07.001.
  - 21 杨浩东, 李宁, 谢兴文, 等. 中药单体调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路治疗骨肉瘤的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(3): 254-262. [Yang HD, Li N, Xie XW, et al. Chinese medicine monomers in treatment of osteosarcoma by regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: a review[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2023, 29(3): 254-262.] DOI: 10.13422/j.cnki.syfx.20221527.

收稿日期: 2025 年 05 月 30 日 修回日期: 2025 年 08 月 22 日

本文编辑: 梁亮艺 黄笛

引用本文: 丁聚贤, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 肉苁蓉苯乙醇总苷抑制耐药骨肉瘤荷瘤裸鼠肿瘤生长的作用机制研究[J]. 数理医药学杂志, 2026, 39(2): 92-100. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202505085.  
Ding JX, Xie XW, Li DP, et al. The mechanism of Cistanche phenylethanol glycosides in inhibiting tumor growth in nude mice bearing drug-resistant osteosarcoma[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2026, 39(2): 92-100. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202505085.