

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.06.006

· 基础研究 ·

雷公藤甲素通过 miR-34b-5p/Notch1 轴抑制骨肉瘤 U2OS 细胞增殖并诱导其铁死亡

姜福贵, 伍俊峰, 杨标, 吴中恒, 周平(贵州省黔东南州人民医院 骨科, 贵州 黔东南州 556000)

[摘要] **目的:** 探究雷公藤甲素(TPL)通过 miR-34b-5p 调控 Notch1 表达对骨肉瘤 U2OS 细胞铁死亡影响的机制。**方法:** 常规培养 U2OS 细胞, 将其分为对照组、TPL(10 $\mu\text{mol/L}$)组、TPL(10 $\mu\text{mol/L}$)+Fer-1(铁死亡抑制剂, 20 $\mu\text{mol/L}$)组、miR-NC组、miR-34b-5p组、miR-34b-5p+Fer-1(20 $\mu\text{mol/L}$)组、TPL(10 $\mu\text{mol/L}$)+anti-miR-34b-5p组、anti-miR-34b-5p+Fer-1(20 $\mu\text{mol/L}$)组。qPCR 法、CCK-8法、铁离子检测试剂、DHE-荧光探针和 WB 法分别检测各组 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 的表达、增殖能力、 Fe^{2+} 水平、ROS 水平以及铁死亡相关蛋白(GPX4、SLC7A11 及 Notch1 蛋白)的表达, 双萤光素酶报告基因实验验证 miR-34b-5p 与 Notch1 的靶向结合关系。**结果:** TPL 可促进 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 表达, Fer-1 和 anti-miR-34b-5p 则抑制 miR-34b-5p 的表达(均 $P<0.05$)。TPL 明显抑制 U2OS 细胞的增殖、GPX4、SLC7A11、Notch1 蛋白的表达, 增加细胞中 Fe^{2+} 和 ROS 的含量, Fer-1 可逆转 TPL 对 U2OS 细胞的作用(均 $P<0.05$)。过表达 miR-34b-5p 与 TPL 对 U2OS 细胞的作用相似(均 $P<0.05$)。miR-34b-5p 可靶向结合 Notch1(均 $P<0.05$)。miR-34b-5p 抑制剂可明显抑制 TPL 对 U2OS 细胞的影响, Fer-1 可增强 miR-34b-5p 抑制剂的作用(均 $P<0.05$)。**结论:** TPL 可抑制 U2OS 细胞的增殖能力并促进其铁死亡, 其作用机制可能与 miR-34a-5p 靶向调节 Notch1 表达有关。

[关键词] 雷公藤甲素; 骨肉瘤; U2OS 细胞; miR-34b-5p; Notch1; 铁死亡**[中图分类号]** R738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)06-0579-07

Triptolide inhibits the proliferation and induces ferroptosis of osteosarcoma U2OS cells via the miR-34b-5p/Notch1 axis

JIANG Fugui, WU Junfeng, YANG Biao, WU Zhongheng, ZHOU Ping (Department of Orthopedics; People's Hospital of Guizhou Qiongnan Prefecture, Guizhou Qiongnan Prefecture, 556000, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of triptolide (TPL) regulating Notch1 expression on ferroptosis of osteosarcoma U2OS cells via miR-34b-5p. **Method:** U2OS cells were routinely cultured and divided into the control group, the TPL (10 $\mu\text{mol/L}$) group, the TPL (10 $\mu\text{mol/L}$)+Fer-1 (ferroptosis inhibitor, 20 $\mu\text{mol/L}$) group, the miR-NC, miR-34b-5p, miR-34b-5p+Fer-1 (20 $\mu\text{mol/L}$) group, the TPL (10 $\mu\text{mol/L}$)+anti-miR-34b-5p group, and the anti-miR-34b-5p+Fer-1 (20 $\mu\text{mol/L}$) group. qPCR assay, CCK-8 assay, ferric ion detection reagent, DHE-fluorescent probe, and WB assay were used to detect the expression of miR-34b-5p, the proliferative ability, and the level of Fe^{2+} , ROS levels and the expression of GPX4, SLC7A11 and Notch1 proteins, respectively. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeted binding relationship between miR-34b-5p and Notch1. **Results:** TPL promoted miR-34b-5p expression in U2OS cells, while Fer-1 and anti-miR-34b-5p inhibited miR-34b-5p expression (all $P<0.05$). TPL significantly inhibited the proliferation of U2OS cells, the expression of ferroptosis-related proteins (GPX4, SLC7A11, and Notch1 proteins), and increased the cellular Fe^{2+} and ROS content, and Fer-1 reversed the effect of TPL on U2OS cells (all $P<0.05$). Overexpressing miR-34b-5p had similar effects on U2OS cells as TPL (all $P<0.05$). miR-34b-5p can be targeted to bind Notch1 (all $P<0.05$). miR-34b-5p inhibitor could significantly inhibit the effect of TPL on U2OS cells (all $P<0.05$). Fer-1 could enhance the effect of miR-34b-5p inhibitor (all $P<0.05$). **Conclusion:** TPL inhibits the proliferative capacity and promotes ferroptosis of U2OS cells, and its mechanism may be related to the targeted regulation of Notch1 expression by miR-34a-5p.

[Key words] triptolide (TPL); osteosarcoma (OS); U2OS cell; miR-34b-5p; Notch1; ferroptosis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(6): 579-585. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.06.006]

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种原发性恶性骨肿瘤, 常见于儿童和青少年股骨远端、胫骨近端和肱骨近端的干骺端^[1-2]。目前, 多药化疗法是临床治疗 OS 的主要手段, 但效果仍不理想, 患者生存率无明显

[基金项目] 贵州省科学技术厅黔科合基础(No.ZK[2022]544)**[作者简介]** 姜福贵(1981—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事脊柱脊髓损伤及骨肿瘤的研究。E-mail: jiangfugui22@sina.com**[通信作者]** 姜福贵, E-mail: jiangfugui22@sina.com

改善^[3-4]。铁死亡是新近发现的一种铁依赖性细胞程序性死亡方式, 主要特征是脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)的累积^[5-6]。研究^[7-8]发现, 铁死亡可介导OS的发生发展, 可成为一种新的治疗靶点。因此, 探究有效抑制OS铁死亡的药物尤为重要。雷公藤性凉, 味苦, 归肝肾经, 在杀虫解毒、祛风除湿、消肿止痛和舒筋活络方面具有较好的功效^[9]。雷公藤甲素(triptolide, TPL), 又称雷公藤内酯醇, 是从雷公藤中提取的一种二萜三环氧化物, 药理学研究^[10]表明, TPL具有多种生物学活性, 如抗炎、抗病毒、免疫调节等。研究^[11]发现, TPL可通过调节细胞增殖、周期等抑制肺癌、OS、乳腺癌等多种恶性肿瘤的发生发展, 但其对OS细胞铁死亡的作用机制尚未见报道。miRNA是一类内源性的具有调控功能的非编码RNA, 长度约21~24个核苷酸, 通过干扰mRNA的翻译而下调靶基因的表达, 从而介导早期发育、细胞增殖和凋亡等生物学过程^[12-13]。研究^[14]发现, miR-34b-3p可介导OS的发生发展, 过表达miR-34b-3p延缓肿瘤进展。Notch信号通路在进化上高度保守, 可调节细胞增殖、侵袭等多种生物学过程^[15]。研究^[16]发现, Notch通路的异常表达与OS的不良预后相关, Notch通路增强会促进OS细胞增殖、迁移和侵袭。本研究旨在探究TPL是否通过miR-34b-5p调控Notch信号从而影响OS细胞铁死亡。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞与试剂

人OS细胞U2OS购自中科院上海细胞研究所, TPL(纯度≥98%, 用DMSO稀释成1.0 mmol/L的储存液, 然后用DMEM培养基稀释成所需要的浓度)购自美国Sigma公司, DMEM/F12培养基、胎牛血清购自南京森贝伽生物科技有限公司, CCK-8检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, miR-34b-5p mimic、miR-NC、anti-miR-34b-5p质粒均由沈阳万通生物有限公司构建, 铁死亡抑制剂(ferrostatin-1, Fer-1)购自北京普博欣公司, DHE-荧光探针购自北京百奥莱博科技有限公司, Fe²⁺检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, CCK-8液购自武汉艾美捷科技有限公司, Lipofectamine™2000转染试剂购自美国Invitrogen公司, 兔抗Notch1、GPX4、SLC7A11抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗均购自Proteintech公司。

1.2 细胞培养、分组与转染

U2OS细胞在10%胎牛血清DMEM培养基(含青-链霉素双抗)中, 置于37℃、5% CO₂的培养箱中进行培养。将细胞随机分为对照组(U2OS细胞不转染任何质粒)、TPL组(培养基含10 μmol/L TPL)和

TPL+Fer-1组(培养基含10 μmol/L TPL、20 μmol/L Fer-1)。按转染试剂盒说明书, 用Lipofectamine™2000转染试剂将miR-NC、miR-34b-5p mimic和anti-miR-34b-5p质粒转染到U2OS细胞中, 分别记为miR-NC组、miR-34b-5p组; miR-34b-5p+Fer-1组(培养基中含20 μmol/L Fer-1)、TPL+anti-miR-34b-5p(培养基中含10 μmol/L的TPL)和anti-miR-34b-5p+Fer-1组(培养基中含20 μmol/L Fer-1)。

1.3 qPCR法检测各组U2OS细胞中miR-34b-5p表达水平

用TRIzol液提取各组U2OS细胞中的总RNA, 用反转录试剂盒将其反转录为cDNA。取2 μL cDNA进行qPCR, 反应条件: 95℃ 2 min, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 共40个循环。miR-34b-5上游引物: 5'-ACGATAGACCAACGGCTGAC-3', 下游引物: 5'-CGTGTGCGAGGCGAGCGTAGC-3'; U6上游引物: 5'-CGTGTGCGAGGCGAGCGTAGC-3', 下游引物: 5'-CGAGCCCTAGATTCAGAGG-3'。以U6为内参基因, 用2^{-ΔΔCT}法计算miR-34b-5p的相对表达量。

1.4 CCK-8法检测各组U2OS细胞的增殖能力

将各组U2OS细胞以1.5×10⁴个/mL的密度接种于96孔板中, 每孔约3×10³个细胞, 在37℃、5% CO₂的培养箱中培养48 h, 每孔加入100 μL CCK-8溶液, 继续培养2~4 h, 用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的光密度(D)值, 以D值代表细胞的增殖能力。细胞存活率=(处理组D值-空白对照组D值)/(对照组D值-空白对照组D值)×100%。

1.5 各组U2OS细胞内Fe²⁺水平的检测

将各组U2OS细胞接种于24孔板中, 用提前预冷的PBS冲洗细胞2次, 弃掉PBS, 在孔板中加入200 μL裂解液裂解细胞2 h, 按照说明书配制混合液A并加入细胞中混匀, 后置60℃水浴中处理1 h, 加入30 μL铁离子检测试剂后充分混匀, 在30℃环境中处理细胞30 min, 将上述混合液置于96孔板中, 用酶标仪在520 nm波长处检测各孔的D值, 以D值计算铁离子浓度。Fe²⁺浓度(μmol/L)=[125×(D_{样本}-D_{空白管})/(D_{标准管}-D_{空白管})]。

1.6 DHE-荧光探针检测各组U2OS细胞中ROS水平

将各组U2OS细胞(3×10³个/孔)接种于6孔板中培养1.5 h后, PBS洗涤细胞, 加入10 μmol/L的DCFH探针, 37℃下处理30 min, PBS洗涤, 荧光显微镜下观察各组细胞中ROS荧光强度。ImageJ软件分析各组细胞的相对荧光强度。

1.7 WB法检测各组U2OS细胞中GPX4、SLC7A11、Notch1蛋白的表达

用蛋白裂解液提取各组U2OS细胞中总蛋白, BCA

法测定其蛋白质浓度。将蛋白稀释至 2 μg/mL 后煮沸 10 min, -20 °C 冰箱冻存。上样前将蛋白样本加入上样缓冲液中再次煮沸变性后用 SDS-PAGE 将蛋白样品分离, 并将其转移到 PVDF 膜上, 使用 5% 脱脂牛奶室温下处理 30 min, 加入一抗(均为 1:1 000)4 °C 下处理过夜, 清洗后加入辣根过氧化物酶示记羊抗兔二抗(1:1 000)室温下处理 2 h, ECL 发光液曝光显影, 用 Image Lab 软件分析条带的灰度值。

1.8 双萤光素酶报告基因实验验证 miR-34b-5p 和 Notch1 靶向的直接结合关系

在线靶基因 https://www.targetscan.org/vert_80/ 预测显示, Notch1 的 3'UTR 端与 miR-34b-5p 存在结合点位。设计 Notch1 野生型和突变型质粒, 分别为 WT-Notch1 和 MUT-Notch1。调整对数期的 U2OS 细胞密度为 5×10^6 个/孔, 接种细胞于 6 孔板中, 根据 Lipofectamine™ 2000 说明书, 将 WT-Notch1、MUT-Notch1 质粒与 miR-NC、miR-34b-5p 质粒共转染 U2OS 细胞。分别记作 WT-Notch1+miR-NC 组、WT-Notch1+miR-34b-5p 组、MUT-Notch1+miR-NC 组和 MUT-Notch1+miR-34b-5p 组。培养 24 h 后收集各组细胞检测上清液中萤光素酶活性。

1.9 统计学处理

以上每组实验均独立重复 3 次。实验数据采用 Graphpad priam 8.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同组间数据采用重复测量方差和单因素方差(one-way ANOVA)分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

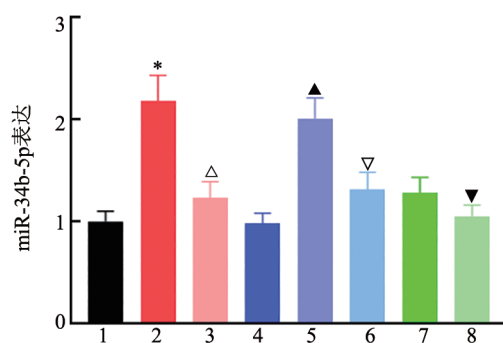
2.1 TPL 可促进 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 表达而 Fer-1 和 anti-miR-34b-5p 的作用与其相反

qPCR 法检测结果(图 1)显示, 与对照组相比, TPL 组 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 表达水平明显升高($P < 0.05$); 与 TPL 组相比, TPL+Fer-1 组和 TPL+anti-miR-34b-5p 组 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$); 与 miR-NC 组相比, miR-34b-5p 组 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 表达量明显升高($P < 0.05$); 与 miR-34b-5p 组相比, miR-34b-5p+Fer-1 组 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 表达水平明显降低($P < 0.05$); 与 TPL+anti-miR-34b-5p 组相比, TPL+anti-miR-34b-5p+Fer-1 组 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 表达水平明显降低($P < 0.05$)。实验结果说明, TPL 可促进 U2OS 细胞表达 miR-34b-5p, 而铁死亡抑制剂 Fer-1 和 anti-miR-34b-5p 则可抑制 U2OS 细胞表达 miR-34b-5p。

2.2 TPL 明显抑制 U2OS 细胞的增殖、铁死亡相关蛋

白的表达、提升细胞中 Fe^{2+} 和 ROS 水平而 Fer-1 可逆转此作用

CCK-8 法、WB 法、 Fe^{2+} 检测试剂和 DHE-荧光探针检测结果(图 2)显示, 与对照组相比, TPL 组 U2OS 细胞的增殖能力和细胞中 GPX4、SLC7A11、Notch1 蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$), Fe^{2+} 相对含量、ROS 相对荧光强度均明显升高(均 $P < 0.05$); 与 TPL 组相比, TPL+Fer-1 组 U2OS 细胞存活率和细胞中 GPX4、SLC7A11、Notch1 蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$), Fe^{2+} 相对含量、ROS 相对荧光强度均明显降低($P < 0.05$) (图 2)。实验结果说明, TPL 明显抑制 U2OS 细胞的增殖、铁死亡相关蛋白的表达、提升细胞中 Fe^{2+} 和 ROS 水平, Fer-1 可逆转 TPL 对 U2OS 细胞的作用。



1:对照组; 2:TPL 组; 3:TPL+Fer-1 组; 4:miR-NC 组; 5:miR-34b-p 组; 6:miR-34b-5p+Fer-1 组; 7:TPL+miR-34b-5p 组; 8:TPL+anti-miR-34b-5p+Fer-1 组; 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 TPL 组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 miR-NC 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 miR-34b-5p 组相比, $\nabla P < 0.05$, 与 TPL+anti-miR-34b-5p 组相比, $\blacktriangledown P < 0.05$ 。

图 1 各组 U2OS 细胞中 miR-34b-5p 的表达

2.3 过表达 miR-34b-5p 与 TPL 对 U2OS 细胞的作用相似

CCK-8 法、WB 法、 Fe^{2+} 检测试剂和 DHE-荧光探针检测结果(图 3)显示, 与 miR-NC 组相比, miR-34b-5p 组 U2OS 细胞存活率和细胞中 GPX4、SLC7A11、Notch1 蛋白均明显降低(均 $P < 0.05$), 细胞中 Fe^{2+} 相对含量、ROS 相对荧光强度均明显升高(均 $P < 0.05$); 与 miR-34b-5p 组相比, miR-34b-5p+Fer-1 组 U2OS 细胞存活率和细胞中 GPX4、SLC7A11、Notch1 蛋白表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$), 细胞中 Fe^{2+} 相对含量、ROS 相对荧光强度均明显降低($P < 0.05$)。实验结果说明, 过表达 miR-34b-5p 明显抑制 U2OS 细胞的增殖、铁死亡相关蛋白的表达、提升细胞中 Fe^{2+} 和 ROS 水平, Fer-1 可逆转过表达 miR-34b-5p 对 U2OS 细胞的作用。

2.4 miR-34b-5p 可靶向结合 Notch1

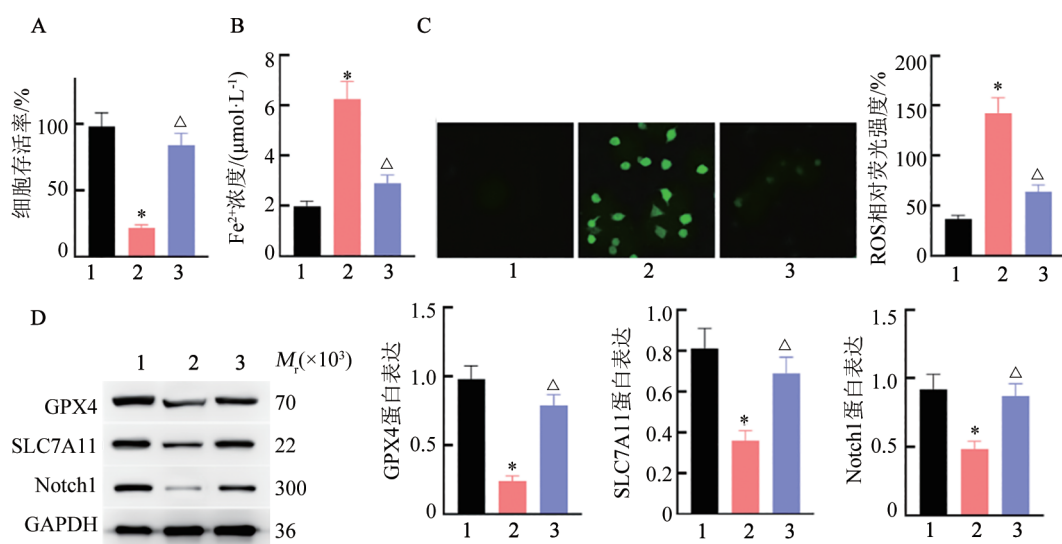
在线靶基因预测 (https://www.targetscan.org/vert_80/) 发现, Notch1 的 3'UTR 端与 miR-34b-5p 有碱

基互补结合点位(图5A)。萤光素酶报告基因实验检测结果(图5B)显示,与WT-Notch1+miR-NC组比较,WT-Notch1+miR-34b-5p组U2OS细胞中萤光素酶活性明显降低($P<0.05$),与MUT-Notch1+miR-34b-5p组比较,MUT-Notch1+miR-34b-5p组U2OS细胞中萤光素酶活性无明显变化。实验结果说明,miR-34b-5p可靶向结合Notch1 mRNA调节其稳定性。

2.5 TPL可调控miR-34b-5p/Notch1轴促进U2OS细胞铁死亡

CCK-8法、WB法、 Fe^{2+} 检测试剂和DHE-荧光探针检测结果(图5)显示,与TPL组相比,TPL+anti-miR-34b-5p组U2OS细胞的增殖能力、铁死亡相关蛋白

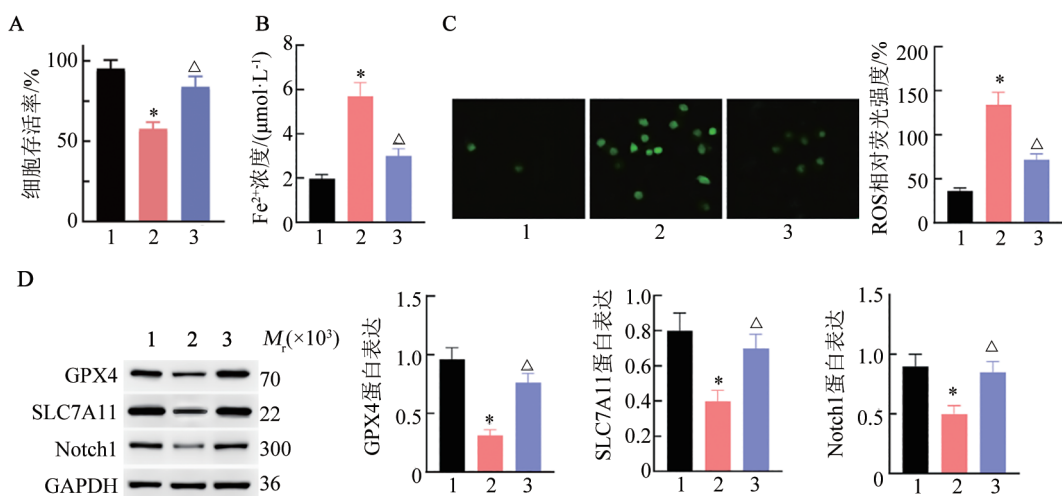
均明显升高(均 $P<0.05$),细胞中 Fe^{2+} 相对含量、ROS相对荧光强度明显降低(均 $P<0.05$),表明miR-34b-5p抑制剂能明显抑制TPL对U2OS细胞的影响,说明TPL是通过提高细胞内miR-34b-5p表达水平产生对U2OS细胞的影响。与TPL+anti-miR-34b-5p组比较,TPL+anti-miR-34b-5p+Fer-1组U2OS细胞的增殖能力、铁死亡相关蛋白表达水平均明显升高(均 $P<0.05$),细胞中 Fe^{2+} 相对含量、ROS相对荧光强度均明显降低(均 $P<0.05$),表明Fer-1能进一步促进U2OS细胞的增殖能力,抑制其铁死亡。实验结果说明,TPL可能通过miR-34b-5p/Notch1轴促进U2OS细胞铁死亡。



1:对照组;2:TPL组;3:TPL+Fer-1组。

A: CCK-8法检测各组细胞的存活率;B:各组细胞中 Fe^{2+} 浓度;C: DCFH探针检测各组细胞中ROS含量;D: WB法检测各组细胞中GPX4、SLC7A11、Notch1蛋白的表达。与对照组相比,* $P<0.05$;与TPL组相比,[△] $P<0.05$ 。

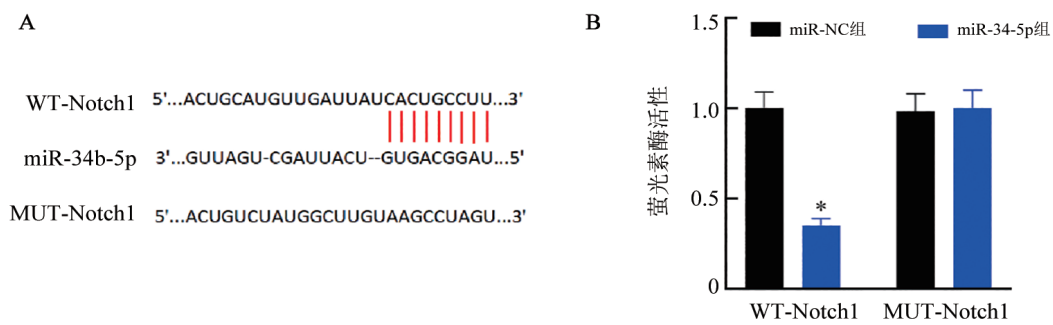
图2 TPL可促进U2OS细胞铁死亡



1:miR-NC组;2:miR-34b-5p组;3:miR-34b-5p+Fer-1组;

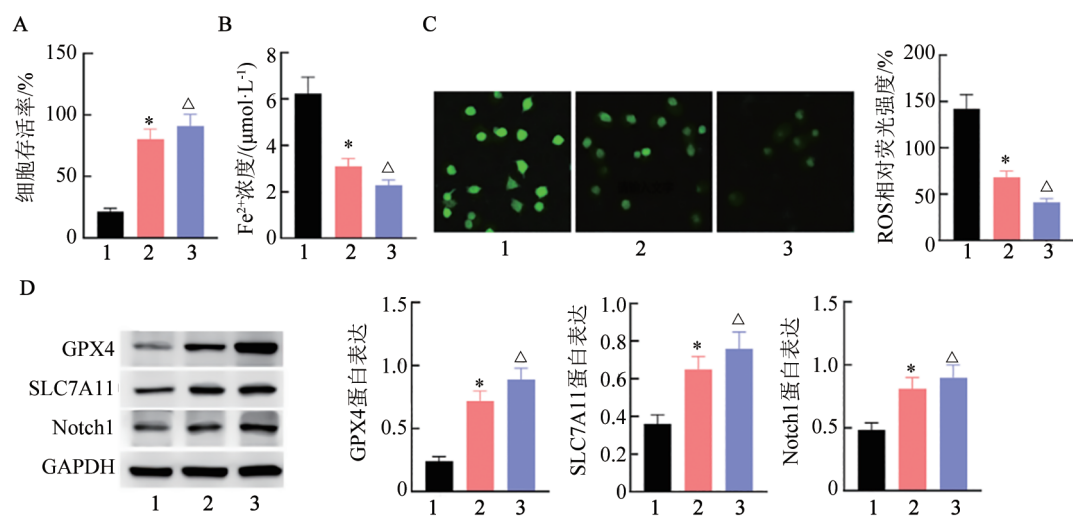
A: CCK-8法检测各组细胞的存活率;B:各组细胞中 Fe^{2+} 浓度;C: DCFH探针检测各组细胞中ROS含量;D: WB法检测各组细胞中GPX4、SLC7A11、Notch1蛋白的表达。与miR-NC组相比,* $P<0.05$;与miR-34b-5p组相比,[△] $P<0.05$ 。

图3 过表达miR-34b-5p可促进U2OS细胞铁死亡



A: miR-34b-5p 与 Notch1 mRNA 的碱基互补结合点位; B: 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-34b-5p 与 Notch1 的靶向结合关系。与 miR-NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图4 miR-34b-5p 可负向调控 Notch1



1: TPL 组; 2: TPL+anti-miR-34b-5p 组; 3: TPL+anti-miR-34b-5p+Fer-1 组;

A: CCK-8 法检测各组细胞存活率; B: 各组细胞中 Fe^{2+} 浓度; C: DCFH 探针检测各组细胞中 ROS 含量; D: WB 法检测各组细胞中 GPX4、SLC7A11、Notch1 蛋白的表达。与 TPL 组比较, * $P < 0.05$; 与 TPL+anti-miR-34b-5p 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

图5 TPL 可调控 miR-34b-5p/Notch1 轴促进 U2OS 细胞铁死亡

3 讨论

新进的研究^[17-18]发现, TPL 是一种广谱的肿瘤抑制剂, 可以增强化疗药物的细胞毒作用。YANG 等^[19]研究证实, TPL 能抑制肺癌细胞的增殖和迁移, 抑制肺癌小鼠肿瘤的转移。高峰等^[20]研究发现, TPL 具有抑制 U2OS/ADR 细胞增殖、提高 U2OS 对 ADR 敏感性的作用。本研究也发现, TPL 能抑制 U2OS 细胞的增殖, 但其对铁死亡的影响还需进一步探究。

铁死亡是一种不同于典型的坏死和凋亡^[21-22]。铁是维持细胞基本和特殊功能不可或缺的元素之一, 但异常累积的 Fe^{2+} 可以通过 Fenton 反应直接产生 ROS, 导致过量的脂质过氧化, 降低细胞抗氧化能力, 从而诱导细胞铁死亡^[23-24]。GPX4 是一种抗氧化酶, 在细胞中具有清除过氧化脂质的作用。当 GPX4 表达下降或功能受损时, 细胞内的过氧化脂质无法得到有效清除, 从而促进细胞铁死亡的发生。

SLC7A11 是一种载体蛋白, 在细胞内参与谷胱甘肽合成和细胞内氧化还原平衡的维持, 当 SLC7A11 的表达下降时, 会通过减少细胞内谷胱甘肽水平增加细胞铁死亡的可能性。本研究结果显示, TPL 可抑制 U2OS 细胞中 GPX4、SLC7A11、Notch1 蛋白表达, 增加细胞中 Fe^{2+} 、ROS 含量, 提示 TPL 促进 U2OS 细胞铁死亡。Fer-1 是一种能够选择性抑制铁死亡的有效药物, 其能通过还原机制来抑制脂质过氧化反应, 通过防止细胞膜脂质的破坏抑制铁死亡的过程。本研究结果表明, Fer-1 可减弱 TPL 对 U2OS 细胞铁死亡的促进作用, 进一步证实了 TPL 促进 U2OS 细胞铁死亡、抑制细胞增殖。

目前, miRNA 在 OS 领域取得了大量的研究进展, 为 OS 的临床诊断、治疗和预后评估提供了新方向。ZHANG 等^[25]研究发现, miR-143 在 OS 组织中呈低表达, 过表达 miR-143 可降低 OS 的发生率, 提高患者整体生存率。LIANG 等^[26]研究证实, miR-377-3p

在 OS 中是一个抑癌基因, 其过表达可促进肿瘤细胞的凋亡, 抑制肿瘤细胞的侵袭和 EMT 进程。由此可见 miRNA 在 OS 临床的诊治中有重大的潜力。miR-34b-5p 是 miRNA 家族成员之一, 现已发现其在多种肿瘤中发挥重要的调控作用。田雪敏等^[27]研究证实, 过表达 miR-34b-5p 可抑制子宫内膜癌细胞增殖和迁移。WANG 等^[28]研究发现, miR-34b-5p 可靶向调节 HuR, 从而抑制 OIP5-AS1/PI3K/Akt 途径和结肠癌的发生发展。由此可见, miR-34b-5p 可作为一种抑癌基因调控肿瘤细胞恶性生物学行为。本研究结果显示, 过表达 miR-34b-5p 也可抑制 U2OS 细胞的增殖, 并促进其铁死亡。

本研究预测发现, Notch1 mRNA 的 3'-UTR 端与 miR-34b-5p 有碱基互补结合点位。Notch 受体是一种控制细胞间通信和组织形态发生的穿膜蛋白家族, 其包含 Notch1~4 等 4 种受体, 该信号通路在不同生理过程中保持稳态才能保证生物体内微环境的正常运转, 当其发生改变会导致不同的病理状态和疾病的发生。现有报道^[29-30]显示, 在肺癌、肝癌、OS、结肠癌等多种肿瘤中 Notch1 表达呈高表达, 活化的 Notch1 能够促进 OS 的增殖和迁移。本研究结果显示, 过表达 miR-34b-5p 对 U2OS 细胞中 Notch1 蛋白表达可发挥抑制作用, 且荧光素酶活性证实, miR-34b-5p 可靶向结合 Notch1 mRNA。基于以上研究推测, miR-34b-5p/Notch1 轴可能是 TPL 抑制 U2OS 细胞增殖, 促进其铁死亡的机制。为了验证这一猜想, 本研究采用 TPL、anti-miR-34b-5p 及 TPL、anti-miR-34b-5p+Fer-1 联合处理 U2OS 细胞, 结果显示, 敲减 miR-34b-5p 表达可减弱 TPL 对 OS 细胞铁死亡的促进作用, 敲减 miR-34b-5p 联合 Fer-1 对 TPL 促进 U2OS 细胞铁死亡的减弱效果更显著。

综上所述, 雷公藤甲素可抑制 U2OS 细胞增殖, 促进其铁死亡, 其作用机制可能与 miR-34a-5p 靶向结合 Notch1 mRNA 有关。

[参 考 文 献]

- [1] SHOAIB Z, FAN T M, IRUDAYARAJ J M K. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets[J/OL]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(2): 201-217[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9305477/>. DOI: 10.1111/bph.15713.
- [2] 杜建国, 张迅, 宗士兰, 等. 布托啡诺通过 Hippo/YAP 信号通路影响骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(9): 797-803. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.008.
- [3] HARRIS M A, HAWKINS C J. Recent and ongoing research into metastatic osteosarcoma treatments[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3817[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8998815/>. DOI: 10.3390/ijms23073817.
- [4] LV Y G, WU L Y, JIAN H, *et al.* Identification and characterization of aging/senescence-induced genes in osteosarcoma and predicting clinical prognosis[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 997765[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9579318/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.997765.
- [5] LIAO P, WANG W M, WANG W C, *et al.* CD8⁺ T cells and fatty acids orchestrate tumor ferroptosis and immunity via ACSL4[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(4): 365-378. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.02.003.
- [6] JIANG M Y, JIKE Y J, LIU K C, *et al.* Exosome-mediated miR-144-3p promotes ferroptosis to inhibit osteosarcoma proliferation, migration, and invasion through regulating ZEB1[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 113[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10351131/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01804-z.
- [7] LEI T, QIAN H, LEI P F, *et al.* Ferroptosis-related gene signature associates with immunity and predicts prognosis accurately in patients with osteosarcoma[J/OL]. *Cancer Sci*, 2021, 112(11): 4785-4798[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8586685/>. DOI: 10.1111/cas.15131.
- [8] LI X J, LIU J Y. FANCD2 inhibits ferroptosis by regulating the JAK2/STAT3 pathway in osteosarcoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 179[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9945409/>. DOI: 10.1186/s12885-023-10626-7.
- [9] ZHU W, LI Y H, ZHAO J J, *et al.* The mechanism of triptolide in the treatment of connective tissue disease-related interstitial lung disease based on network pharmacology and molecular docking[J/OL]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 541-552[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8843192/>. DOI: 10.1080/07853890.2022.2034931.
- [10] FANG W Y, TSENG Y T, LEE T Y, *et al.* Triptolide prevents LPS-induced skeletal muscle atrophy via inhibiting NF- κ B/TNF- α and regulating protein synthesis/degradation pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(15): 2998-3016. DOI: 10.1111/bph.15472.
- [11] ABDULHUSSEIN A H, AL-TAEI M M, RADI H Z A, *et al.* Mechanisms of cancer cell death induction by triptolide[J]. *Biofactors*, 2023, 49(4): 718-735. DOI: 10.1002/biof.1944.
- [12] SARHADI V K, DADDALI R, SEPPÄNEN-KAIJANSINKKO R. Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles in osteosarcoma pathogenesis and therapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 11035[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34681692/>. DOI: 10.3390/ijms222011035.
- [13] WANG C, ZHANG D G, WANG L D, *et al.* MicroRNA-455-3p inhibits osteosarcoma progression via HSF1 downregulation[J]. *J Orthop Sci*, 2023, 28(5): 1157-1164. DOI: 10.1016/j.jos.2022.07.009.
- [14] WANG L, LI S Q, QI L, *et al.* Long noncoding RNA HCG9 promotes osteosarcoma progression through RAD51 by acting as a ceRNA of miR-34b-3p[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 9978882[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8390166/>. DOI: 10.1155/2021/9978882.
- [15] MARTINS-NEVES S R, SAMPAIO-RIBEIRO G, GOMES C M F. Self-renewal and pluripotency in osteosarcoma stem cells' chemoresistance: Notch, hedgehog, and Wnt/ β -catenin interplay with embryonic markers[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8401[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10179672/>. DOI: 10.3390/ijms24098401.
- [16] XU J H, WAN S, CHEN W, *et al.* Relaxin inhibits ¹⁷⁷Lu-EDTMP associated cell death in osteosarcoma cells through Notch-1 pathway[J]. *Acta Pharm*, 2022, 72(4): 575-585. DOI: 10.2478/acph-2022-0032.

- [17] YU D, LIU Y, ZHOU Y Q, *et al.* Triptolide suppresses IDH1-mutated malignancy *via* Nrf2-driven glutathione metabolism[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(18): 9964-9972[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7211987/>. DOI: 10.1073/pnas.1913633117.
- [18] CAI J, YI M, TAN Y X, *et al.* Natural product triptolide induces GSDME-mediated pyroptosis in head and neck cancer through suppressing mitochondrial hexokinase-II[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 190[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8188724/>. DOI: 10.1186/s13046-021-01995-7.
- [19] YANG Q C, ZHAI X J, LV Y. A bibliometric analysis of triptolide and the recent advances in treating non-small cell lung cancer[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 878726[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35721205/>. DOI: 10.3389/fphar.2022.878726.
- [20] 高峰, 王秀会, 夏胜利, 等. 雷公藤甲素对人骨肉瘤细胞阿霉素耐药株的逆转作用及机制研究[J]. *陕西医学杂志*, 2021, 50(6): 648-651, 656. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7377.2021.06.002.
- [21] JIANG M Y, JIKE Y J, GAN F, *et al.* Verification of ferroptosis subcluster-associated genes related to osteosarcoma and exploration of immune targeted therapy[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9942014[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9534693/>. DOI: 10.1155/2022/9942014.
- [22] ZHENG D, XIA K Z, WEI Z, *et al.* Identification of a novel gene signature with regard to ferroptosis, prognosis prediction, and immune microenvironment in osteosarcoma[J/OL]. *Front Genet*, 2022, 13: 944978[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9623102/>. DOI: 10.3389/fgene.2022.944978.
- [23] REN T H, HUANG J, SUN W, *et al.* Zoledronic acid induces ferroptosis by reducing ubiquinone and promoting HMOX1 expression in osteosarcoma cells[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1071946[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9846057/>. DOI: 10.3389/fphar.2022.1071946.
- [24] LIU J Y, LOU C G, ZHEN C X, *et al.* Iron plays a role in sulfasalazine-induced ferroptosis with autophagic flux blockage in K7M2 osteosarcoma cells[J/OL]. *Metallomics*, 2022, 14(5): mfac027[2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35441682/>. DOI: 10.1093/mtomes/mfac027.
- [25] ZHANG P, ZHANG J L, QUAN H H, *et al.* MicroRNA-143 expression inhibits the growth and the invasion of osteosarcoma[J/OL]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1): 236[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9006441/>. DOI: 10.1186/s13018-022-03127-z.
- [26] LIANG K, LIAO L, LIU Q, *et al.* MicroRNA-377-3p inhibits osteosarcoma progression by targeting CUL1 and regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J/OL]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(11): 2350-2357[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/6202490/>. DOI: 10.1007/s12094-021-02633-6.
- [27] 田雪敏, 石璐璐, 董辉, 等. MiR-34b-5p 通过 Gab1 调节 mTOR 通路抑制子宫内膜癌细胞的增殖迁移[J]. *宁夏医科大学学报*, 2022, 44(11): 1094-1099, 1104. DOI: 10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2022.11.003.
- [28] WANG Y, LIN C K, LIU Y. Molecular mechanism of miR-34b-5p and RNA binding protein HuR binding to lncRNA OIP5-AS1 in colon cancer cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(5): 612-624. DOI: 10.1038/s41417-021-00342-4.
- [29] ABBY E, DENTRO S C, HALL M W J, *et al.* Notch1 mutations drive clonal expansion in normal esophageal epithelium but impair tumor growth[J/OL]. *Nat Genet*, 2023, 55(2): 232-245[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9925379/>. DOI: 10.1038/s41588-022-01280-z.
- [30] ZHANG K X, WU S, WU H W, *et al.* Effect of the Notch1-mediated PI3K-Akt-mTOR pathway in human osteosarcoma[J/OL]. *Aging*, 2021, 13(17): 21090-21101[2024-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8457590/>. DOI: 10.18632/aging.203261.

[收稿日期] 2024-01-25

[修回日期] 2024-04-02

[本文编辑] 向正华