

[文章编号] 1671-587X(2025)01-0009-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250102

低剂量甲氨蝶呤联合索拉非尼对小鼠骨肉瘤移植瘤的影响及其机制

王凤娇, 顾超, 胡沙, 冯琴, 郑儒娟, 朱增燕, 王文娟
(苏州大学附属儿童医院药剂科, 江苏 苏州 215000)

[摘要] **目的:** 探讨低剂量甲氨蝶呤(MTX)联合索拉非尼(SFN)对人骨肉瘤(OS)的抗肿瘤作用, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 体外培养4种人OS细胞(143B细胞、HOS细胞、U2OS细胞和MG63细胞), 采用Western blotting法测定各种细胞中的血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)蛋白表达水平; 建立人OS裸鼠皮下移植瘤模型, 并将建模成功的20只BABL/C裸鼠随机分为对照组(给予2%二甲基亚砷+98%玉米油)、低剂量MTX组(给予 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MTX)、SFN组(给予 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SFN)和联合用药组(给予 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MTX+ $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SFN), 每组5只, 测量各组小鼠肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线; HE染色观察4组小鼠肿瘤组织病理形态表现, 免疫组织化学法检测各组小鼠肿瘤组织中VEGFR2、细胞增殖抗原Ki-67和缺氧诱导因子1(HIF-1)蛋白阳性表达率; 人OS 143B细胞分别给予0、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000和 $4.000\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MTX处理, CCK-8法检测各组143B细胞存活率, 计算半数抑制浓度(IC_{50}), 并选取对143B细胞存活无影响的MTX浓度作为低剂量MTX; 人OS 143B细胞分为对照组和低剂量MTX组(给予0和 $0.250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MTX处理), 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组143B细胞中VEGF水平。**结果:** 与143B细胞比较, HOS细胞、U2OS细胞和MG63细胞中VEGF及VEGFR2蛋白表达水平明显降低($P<0.001$)。裸鼠皮下移植瘤模型中, 与对照组比较, SFN组和联合用药组小鼠皮下移植瘤体积减少($P<0.001$), 与低剂量MTX组和SFN组比较, 联合用药组小鼠皮下移植瘤体积减少($P<0.01$)。免疫组织化学法, 与对照组比较, 联合用药组小鼠肿瘤组织中Ki-67、VEGFR2和HIF-1蛋白阳性表达率明显降低($P<0.05$)。CCK-8法, $0.250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MTX对143B细胞增殖无明显改变。ELISA法, 与对照组比较, 低剂量MTX组143B细胞中VEGF水平明显降低($P<0.05$)。**结论:** 低剂量MTX促进了SFN对人OS的抗肿瘤作用, 其可能是通过抑制OS细胞分泌VEGF进而增强SFN对人OS的抗肿瘤作用。

[关键词] 骨肉瘤; 索拉非尼; 甲氨蝶呤; 抗肿瘤; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R738.1 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-02-26 [录用日期] 2024-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(32200775); 江苏省教育厅高等学校基础科学(自然科学)面上项目(21KJB320017); 苏州市科技局科教强卫项目(KJXW2020026)

[作者简介] 王凤娇(1988-), 女, 江苏省南通市人, 副主任药师, 药理硕士, 主要从事骨肉瘤治疗药物药理学方面的研究。

[通信作者] 王文娟, 副主任药师, 硕士研究生导师(E-mail: wangwenjuan1110@163.com); 朱增燕, 主任药师, 硕士研究生导师(E-mail: zhuzengyan7676@suda.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effect of low dose of methotrexate combined with sorafenib on osteosarcoma xenografts of mice and its mechanism

WANG Fengjiao, GU Chao, HU Sha, FENG Qin, ZHENG Rujuan, ZHU Zengyan, WANG Wenjuan
(Department of Pharmacy, Affiliated Children's Hospital, Soochow University, Suzhou 215000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the anti-tumor effect of low dose of methotrexate (MTX) combined with sorafenib (SFN) on the human osteosarcoma (OS), and to clarify the possible mechanism. **Methods:** Four types of human OS cells (143B cells, HOS cells, U2OS cells, and MG63 cells) were cultured *in vitro*. Western blotting method was used to detect the expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) proteins in the above four kinds of cells. The human OS xenograft model was established in the nude mice, and 20 successfully modeled BALB/C nude mice were randomly divided into control group (given 2% dimethyl sulfoxide+98% corn oil), low dose of MTX group (given 2 mg·kg⁻¹ MTX), SFN group (given 15 mg·kg⁻¹ SFN), and combined drug group (given 2 mg·kg⁻¹ MTX+15 mg·kg⁻¹ SFN); there were 5 mice in each group. The tumor volumes of the mice in various groups were detected and tumor growth curves were plotted; HE staining was used to observe the morphology of tumor tissue of the mice in various groups; immunohistochemistry was used to detect the positive expression rates of VEGFR2, proliferation marker Ki-67, and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) proteins in tumor tissue of the mice in various groups. The human OS 143B cells were divided into 0, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000, and 4.000 μmol·L⁻¹ MTX groups (given 0, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000, and 4.000 μmol·L⁻¹ MTX, respectively). CCK-8 method was used to detect the proliferation rates of the 143B cells in various groups, and half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated; the concentration of MTX that had no effect on 143B cell survival was selected as low dose of MTX. The human OS 143B cells were divided into control and low dose of MTX groups (given 0 and 0.250 μmol·L⁻¹ MTX). ELISA method was used to detect the levels of VEGF in the 143B cells in various groups. **Results:** Compared with 143B cells, the expression levels of VEGF and VEGFR2 proteins in the HOS cells, U2OS cells, and MG63 cells were significantly increased ($P < 0.001$). In the xenograft model, compared with control group, the tumor volumes of the mice in SFN group, and combined drug group were decreased ($P < 0.001$); compared with low dose of MTX group and SFN group, the tumor volume of the mice in combined drug group was decreased ($P < 0.01$). The immunohistochemical results showed that compared with control group, the positive expression rates of Ki-67, VEGFR2, and HIF-1 proteins in tumor tissue of the mice in combined drug group were significantly decreased ($P < 0.05$). The CCK-8 results showed that there was no change in the proliferation of the 143B cells treated with 0.25 μmol·L⁻¹ MTX. The ELISA results showed that compared with control group, the level of VEGF in the 143B cells in MTX group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Low dose of MTX enhances the anti-tumor effect of SFN on the human OS, which may be due to the inhibition of VEGF secretion by the OS cells, thereby enhancing the anti-tumor effect of SFN on the human OS.

KEYWORDS Osteosarcoma; Sorafenib; Methotrexate; Anti-tumor; Vascular endothelial growth factor

骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 是一种高度恶性的骨肿瘤, 多发于儿童和青少年。尽管近年来术后的

化疗及靶向药物治疗取得了一定进展, 但部分 OS 患者由于肿瘤的广泛转移或对药物的敏感性及耐受

性差, 使得治疗效果并不理想, 其5年生存率不足30%^[1]。血管生成在OS患者的肿瘤进展中起重要作用^[2-3], 通过阻断血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号传导抑制OS细胞生长并诱导细胞凋亡^[2-4]。其中血管内皮细胞生长因子受体2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2) 是参与血管生成分子VEGF的受体, 与OS细胞增殖和转移存在密切关联^[5-7]。索拉非尼 (sorafenib, SFN) 作为多激酶抑制剂, 可抑制肿瘤细胞的复制及肿瘤血管生成, 美国国立综合癌症网络 (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) 指南已将SFN作为晚期OS的重要治疗药物^[8]。然而临床试验研究^[9]结果提示SFN单药治疗患者的生存获益时间有限。大剂量甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 是OS一线化疗药物, 而低剂量MTX可抑制OS患者肿瘤转移, 其机制可能与低剂量MTX抗血管生成存在关联^[10], 但是目前国内外关于低剂量MTX与SFN联合治疗OS的相关报道较少。因此, 本研究探讨低剂量MTX联合SFN在裸鼠皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用, 阐明其可能的作用机制, 为低剂量MTX联合SFN的抗肿瘤机制研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 20只BALB/C裸鼠, 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级, 5周龄, 体质量 (20±2)g, 购于杭州子源实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (浙) 2019-0004, 饲养于苏州大学附属儿童医院动物中心SPF级动物房, 相对湿度55%~60%。人OS细胞143B细胞 (货号: FH0438)、HOS细胞 (货号: FH0440) 和U2OS细胞 (货号: FH0062) 购于上海富衡生物有限公司, MG63细胞 (货号: CL-0157) 购于武汉普诺赛生物技术公司。MTX (货号: HY-14519) 和SFN (货号: HY-10201) 购于美国MCE公司, 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (货号: UX064ZZR2194) 和细胞活性检测 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒 (货号: AK10985) 购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, MEM/Alpha培养基 (货号: BL306A) 购于北京Biosharp公司, 胰蛋白酶 (货号: C0201) 购于上海碧云天生物技术有限公司, 南美胎牛血清 (货号:

S711001S) 购于苏州双洙生物科技有限公司, VEGF抗体 (货号: 50661S) 和VEGFR2抗体 (货号: 2479S) 购于美国Cell signaling Technology公司, 缺氧诱导因子1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 抗体 (货号: GB113441) 和细胞增殖抗原 (Ki-67) 抗体 (货号: GB114499) 购于武汉赛维尔生物有限公司。二氧化碳培养箱 (型号: C170) 购于美国Thermo Fisher有限公司, 高速冷冻离心机 (型号: 5810R) 购于德国艾本德公司, GE凝胶成像仪 (型号: Imager 600 LAS4010) 购于苏医生物基因技术有限公司, 光学倒置显微镜 (型号: CKX41) 购于日本奥林巴斯公司。

1.2 OS细胞培养 人OS 143B细胞、HOS细胞、U2OS细胞和MG63细胞均培养于含10%胎牛血清及1%青-链霉素的MEM/Alpha培养基中, 于37℃、5% CO₂培养箱中培养。待细胞融合度为80%~90%时, 按比例进行细胞传代。

1.3 Western blotting法检测各种OS细胞中VEGF和VEGFR2蛋白表达水平 收集上述人OS细胞, 双吡啶甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法检测细胞裂解液蛋白浓度, 湿转蛋白至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。TBST溶液配置5%脱脂牛奶, 膜封闭1h, 一抗孵育过夜 (不超过16h)。第2天室温下用TBST溶液洗涤膜3次, 每次10min。加入二抗, 室温孵育2h, TBST溶液漂洗3次, 每次10min, 利用底物化学发光法显影分析, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.4 小鼠OS皮下移植瘤模型的制备及分组 取处于对数生长期的人OS 143B细胞, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 调整细胞密度至 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 皮下注射至裸鼠右前肢腋下, 当小鼠腋下肿瘤体积 $\geq 150 \text{ mm}^3$ 开始给药^[11], 将小鼠随机分为对照组、低剂量MTX组、SFN组和联合用药 (MTX+SFN) 组。对照组: 使用空白溶剂 (2% 二甲基亚砷+98% 玉米油) 给药。低剂量MTX组: 单独使用 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MTX腹腔注射, 每5d 1次, 共2次; SFN组: $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SFN灌胃, 每日1次, 共10d; 联合用药组: 分别用 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MTX和 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SFN治疗, 疗程同上。

1.5 荷瘤小鼠一般情况观察及移植瘤体积测量

每隔1 d测量小鼠移植肿瘤大小和小鼠体质量。肿瘤体积计算方法: 肿瘤体积 $=0.5 \times a \times b^2$, 其中a为肿瘤最长直径(mm), b为肿瘤最短直径(mm)。给药结束后次日, 通过颈椎脱位处死小鼠后, 皮下获取肿瘤, 肿瘤样本送赛维尔生物公司进行HE染色, 观察各组小鼠肿瘤组织病理形态表现。

1.6 免疫组织化学法检测各组小鼠肿瘤组织中Ki-67、VEGFR2和HIF-1蛋白阳性表达率 取小鼠肿瘤组织, 切片脱蜡水化, 利用 H_2O_2 溶液处理以消除内源性过氧化物酶, 微波修复抗原, 一抗 $4^\circ C$ 孵育过夜, 用PBS缓冲液冲洗3次, 加入二抗, $37^\circ C$ 孵育1 h, 二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色, 苏木精复染, 中性树脂封片。Ki-67: 以细胞核染成棕黄色为阳性反应, 采用Image J软件分析细胞阳性表达率; VEGFR2: 以肿瘤细胞的胞质中出现棕黄色颗粒为染色阳性; HIF-1: 以肿瘤细胞的胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒为染色阳性, 每张片子随机选取5个视野, 用Image J软件分析细胞阳性表达率。细胞阳性表达率=棕黄色颗粒染色阳性细胞面积/总面积 $\times 100\%$ 。

1.7 CCK-8法检测不同浓度MTX处理后143B细胞存活率 将143B细胞以每孔 3×10^3 个的密度接种至96孔细胞培养板中。次日使用0、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000和4.000 $\mu mol \cdot L^{-1}$ MTX作用48 h后, 向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液, $37^\circ C$ 继续孵育2 h。于波长450 nm处测量吸光度(A)值, 并计算细胞存活率。细胞存活率=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。采用非线性回归分析自动拟合剂量-反应曲线计算药物半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50})值。

1.8 ELISA法检测各组143B细胞中VEGF水平

将人OS143B细胞分为对照组和低剂量MTX组, 分别给予0和0.250 $\mu mol \cdot L^{-1}$ MTX。将试剂平衡至室温, 30倍浓缩后, 按1:33的比例加入至蒸馏水中, 混匀备用。对应板孔中加入100 μL 标准品工作液或样本, $37^\circ C$ 水浴孵育90 min; 弃掉板内液体, 加入100 μL 生物素化抗体工作液, $37^\circ C$ 孵育60 min; 洗涤3次; 每孔加入100 μL 酶结合物工作液, $37^\circ C$ 孵育30 min, 洗板5次; 每孔加入90 μL 底物溶液, $37^\circ C$ 孵育15 min; 每孔加入50 μL 终

止液, 立即于450 nm波长处测量A值。计算标准品和样本复孔的平均A值并减去空白孔的A值作为校正值。以浓度为横坐标, A值为纵坐标, 在双对数坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线。根据标准曲线方程计算各样本VEGF水平, 结果以 $ng \cdot L^{-1}$ 表示。

1.9 统计学分析 采用SPSS 26.0和Graphpad Prism 7.0统计软件进行统计学分析。各组OS细胞中VEGF和VEGFR2蛋白表达水平, 各组小鼠皮下移植瘤体积和小鼠体质量, 肿瘤组织中Ki-67、VEGFR2和HIF-1阳性表达率, 143B细胞存活率和VEGF水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用SNK-*q*检验; 2组间样本均数比较采用两独立样本*t*检验。所有实验重复3次。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

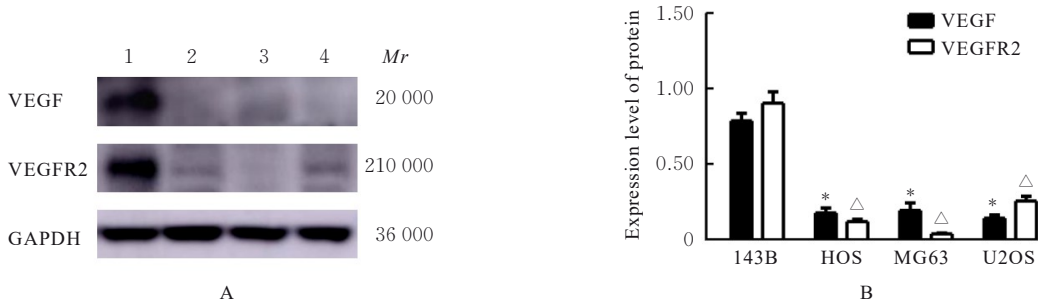
2 结果

2.1 不同人OS细胞中VEGF和VEGFR2蛋白表达水平 与143B细胞比较, HOS、MG63和U2OS细胞中VEGF及VEGFR2蛋白表达水平均明显降低($P < 0.001$)。见图1。以上结果提示: 143B细胞中VEGF信号异常激活。鉴于SFN对VEGFR家族具有抗肿瘤的药理作用, 因此选用143B细胞构建小鼠OS皮下移植瘤模型。

2.2 各组小鼠皮下移植瘤体积 与对照组比较, SFN组和联合用药组小鼠皮下移植瘤体积减少($P < 0.001$), 低剂量MTX组小鼠皮下移植瘤体积未见明显减少, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与低剂量MTX组和SFN组比较, 联合用药组小鼠皮下移植瘤体积减少($P < 0.001$)。见图2。

2.3 各组小鼠不同时间点体质量 对照组、低剂量MTX组、SFN组和联合用药组小鼠体质量分别为(21.56 \pm 0.81)g、(19.66 \pm 0.42)g、(18.60 \pm 1.81)g及(18.50 \pm 1.35)g, SFN和低剂量MTX联合SFN导致小鼠体质量轻微减轻, 但各组小鼠不同时间点的体质量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图3。

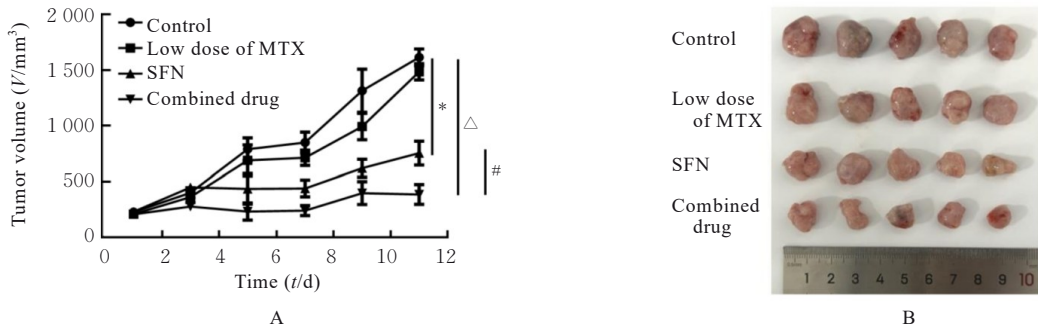
2.4 各组小鼠肿瘤组织病理形态表现及肿瘤组织Ki-67、VEGFR2和HIF-1蛋白阳性表达率 HE染色结果显示: 对照组和低剂量MTX组小鼠肿瘤组织具有高密度的多形性及梭形OS细胞; SFN组小鼠肿瘤细胞呈现中重度坏死为主; 而联合用药组以重度坏死为主, 可见细胞间隙呈空泡状。免疫组织



Lane 1: 143B cells; Lane 2: HOS cells; Lane 3: MG63 cells; Lane 4: U2OS cells. * $P < 0.001$ compared with VEGF protein in 143B cells; $\Delta P < 0.001$ compared with VEGFR2 protein in 143B cells.

图1 不同人OS细胞中VEGF和VEGFR2蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 1 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of VEGF and VEGFR2 proteins in different human OS cells



* $P < 0.01$ compared with control group; $\Delta P < 0.01$ compared with low dose of MTX group; # $P < 0.01$ compared with SFN group.

图2 各组小鼠不同时间点移植瘤体积(A)和移植瘤形态表现(B)

Fig. 2 Volumes(A) and morphology(B) of transplanted tumor of mice in various groups at different time points

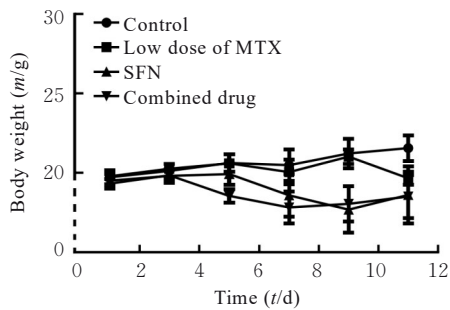


图3 各组裸鼠体质量生长曲线

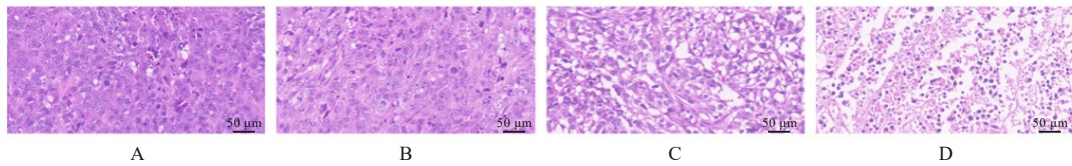
Fig. 3 Growth curves of body weights of nude mice in various groups

化学染色法结果显示: 与对照组、低剂量MTX组和SFN组比较, 联合用药组小鼠肿瘤组织中增殖相关分子Ki-67蛋白阳性表达率减少 ($P < 0.001$); 与对照组比较, 联合用药组和SFN组小鼠肿瘤组织中VEGFR2阳性表达率减少 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 低剂量MTX组和联合用药组小鼠肿瘤组织中HIF-1阳性表达率减少 ($P < 0.05$)。见图4、5和6。

2.5 不同剂量MTX作用下143B细胞存活率及VEGF水平 CCK-8实验检测结果显示: 高剂量MTX对143B细胞的增殖具有抑制作用, 该作用呈剂量依赖性, IC_{50} 为 $1.77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见图7。选取对143B细胞增殖无显著影响(细胞存活率为 $98.81\% \pm 3.18\%$)的低剂量MTX, 浓度为 $0.250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。ELISA法检测结果显示: 与对照组($1178.23 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1} \pm 62.23 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, 低剂量MTX组143B细胞中VEGF水平($822.70 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1} \pm 60.46 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

OS高度依赖血管生成, 传统的治疗方法易产生耐药性, 术后复发和转移是OS预后不良的主要原因^[12]。分子靶向药物SFN作为一种口服多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂, 其可通过靶向VEGF通路抑制血管生成。临床试验^[13]结果显示: OS患者使用SFN可能会出现疾病进展。因此, 寻找能增强SFN抗肿瘤作用的药物具有重要的临床价值。



A: Control group; B: Low dose of MTX group; C: SFN group; D: Combined drug group.

图4 各组小鼠肿瘤组织病理形态表现(HE)

Fig. 4 Pathomorphology of tumor tissue of mice in various groups(HE)

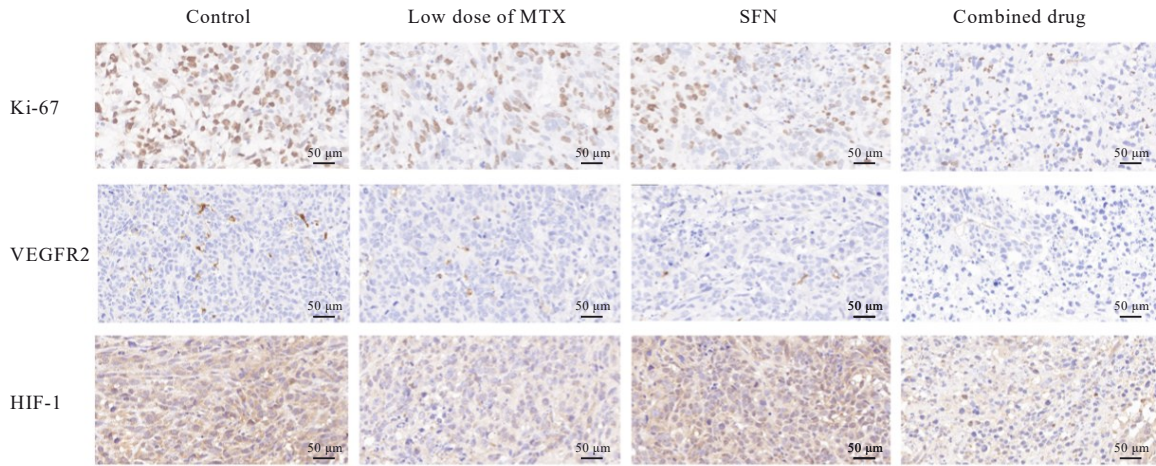
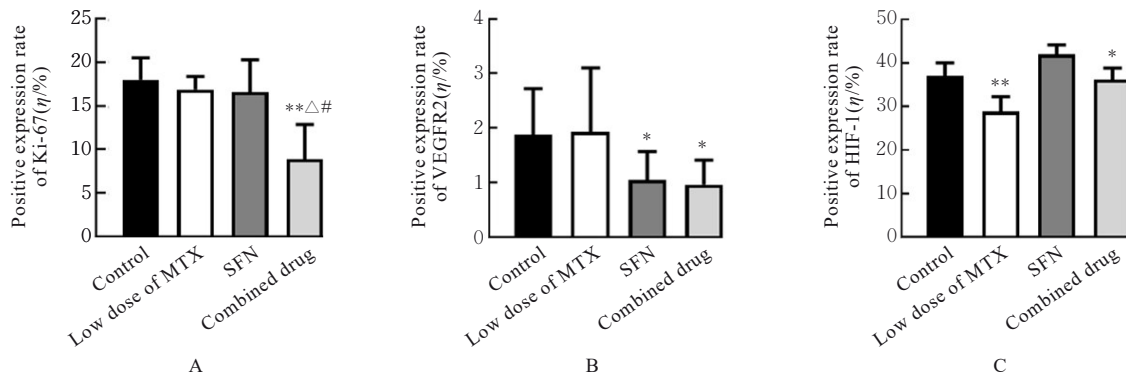


图5 各组小鼠肿瘤组织中病理Ki-67、VEGFR2、HIF-1蛋白表达情况(免疫组织化学)

Fig. 5 Expressions Ki-67, VEGFR2, and HIF-1 proteins in tumor tissue of mice in various groups (Immunohistochemistry)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with control group, $\Delta P < 0.05$ compared with low dose of MTX group, # $P < 0.05$ compared with SFN group.

图6 各组小鼠肿瘤组织中Ki-67、VEGFR2和HIF-1蛋白阳性表达率

Fig. 6 Positive expression rates of Ki-67, VEGFR2, HIF-1 proteins in tumor tissue of mice in various groups

2000年BROWDER等^[14]研究显示:持续低剂量环磷酰胺能使肿瘤血管内皮细胞凋亡,提示低剂量的细胞毒性药物可能具有抗血管生成作用。同年,研究者也证实持续低剂量的长春花碱能够抑制肿瘤血管生成^[15]。在上述2项研究基础上,HANAHAN等^[16]提出了节拍化疗的理念。节拍化疗是指高频度、规律地给予低剂量化疗药物,旨在

维持有效性但不增加额外毒性。然而,尽管节拍化疗毒性较小,但多数节拍化疗作为单一药物用于晚期癌症患者的治疗效果非常有限^[17]。KERBEL等^[17]提出节拍化疗与抗血管生成药物的联合应用不仅可以减轻化疗药物常见的骨髓抑制和心脏毒性等毒副作用,还能提高疗效。本研究结果显示:低剂量MTX联合SFN可以显著抑制小鼠OS移植瘤的生

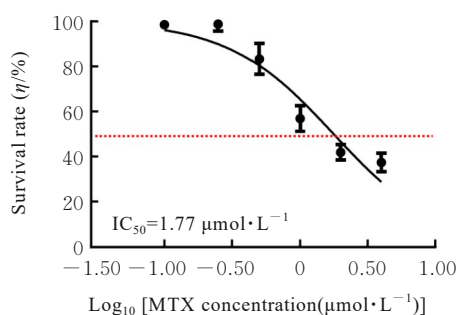


图7 CCK-8法检测不同剂量MTX作用下143B细胞存活率

Fig. 7 Survival rates of 143B cells after treated with different doses of MTX detected by CCK-8 method

长, 且其作用明显强于SFN组; 联合给药对小鼠体质量影响不明显, 表明联合用药组在体内的耐受性良好。

VEGF在肿瘤耐药的过程中起着关键作用, 其通过改变肿瘤微环境和调控肿瘤细胞内信号通路, 促进肿瘤的生长、侵袭性和耐药性^[18]。一方面, 肿瘤本身微环境中高浓度的VEGF可能通过保护肿瘤相关内皮细胞进而促进细胞毒性药物耐药^[19]; 另一方面, 细胞毒性药物也可能通过上调肿瘤相关内皮细胞中VEGF和其他促进生存的内皮细胞生长因子的表达产生自我保护效应^[20-21]; 细胞毒性药物与阻断VEGF或其受体的药物联合, 可选择性地放大细胞毒性药物对肿瘤相关内皮细胞的促凋亡作用, 从而提高治疗指数^[15]。尽管细胞毒性药物对肿瘤相关内皮细胞的作用已有相关报道, 但细胞毒性药物对肿瘤细胞中VEGF的影响及其与靶向药物联合应用的作用机制目前尚未完全阐明。本研究结果显示: 低剂量MTX可能通过抑制肿瘤细胞增殖和血管生成增强SFN的抗肿瘤效果。本研究体外实验结果显示: $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MTX对143B细胞的生长无显著抑制作用, 却能明显降低VEGF的分泌, 而SFN为VEGFR靶点抑制剂, 由此提示低剂量MTX增强SFN抗OS的作用是通过抑制VEGF/VEGFR完成的。研究^[22]显示: 缺氧是包括OS在内的实体肿瘤的普遍特征, 缺氧可通过HIF-1 α 上调VEGF的表达, 促进血管生成和肿瘤生长。敲低HIF-1 α 后, 缺氧诱导的VEGF降低, 且皮下和原位小鼠移植瘤的生长速率均显著减慢^[23]。KARAKUYU等^[24]发现: MTX可以显著降低大鼠肾脏氧化应激模型中HIF-1 α 表达水平, 提示MTX可能是通过抑制HIF-1 α 信号进而抑制

OS细胞分泌VEGF, 免疫组织化学染色检测结果也提示低剂量MTX组和联合用药组HIF-1的表达水平显著低于对照组和SFN组, 其具体作用机制有待进一步研究。

综上所述, 低剂量MTX可能通过抑制OS细胞分泌VEGF进而增强了SFN对移植瘤的抑制作用, 但其作用机制还有待进一步研究。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王凤娇参与论文撰写, 顾超参与论文的统计学分析, 胡沙、冯琴和郑儒娟参与动物实验, 朱增燕和王文娟参与论文的整体设计。

[参考文献]

- [1] BELAYNEH R, FOURMAN M S, BHOGAL S, et al. Update on osteosarcoma[J]. *Curr Oncol Rep*, 2021, 23(6): 71.
- [2] ASSI T, WATSON S, SAMRA B, et al. Targeting the VEGF pathway in osteosarcoma[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1240.
- [3] MELTZER P S, HELMAN L J. New horizons in the treatment of osteosarcoma[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(22): 2066-2076.
- [4] XIE L, JI T, GUO W. Anti-angiogenesis target therapy for advanced osteosarcoma (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 625-636.
- [5] FERRARA N, ADAMIS A P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(6): 385-403.
- [6] GAO F, YANG C. Anti-VEGF/VEGFR2 monoclonal antibodies and their combinations with PD-1/PD-L1 inhibitors in clinic[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2020, 20(1): 3-18.
- [7] MABETA P, STEENKAMP V. The VEGF/VEGFR axis revisited: implications for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15585.
- [8] NI M. Update and interpretation of 2021 national comprehensive cancer network (NCCN) "clinical practice guidelines for bone tumors" [J]. *Chin J Reparative Reconstr Surg*, 2021, 35(9): 1186-1191.
- [9] GRIGNANI G, PALMERINI E, DILEO P, et al. A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(2): 508-516.

- [10] TOMODA R, SETO M, HIOKI Y, et al. Low-dose methotrexate inhibits lung metastasis and lengthens survival in rat osteosarcoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(7): 559-564.
- [11] ZHANG X X, CHEN H E, ZHANG Y, et al. HA-DOPE-modified honokiol-loaded liposomes targeted therapy for osteosarcoma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 5137-5151.
- [12] 那 键, 戴维享, 马 超, 等. 氟尿嘧啶联合顺铂对骨肉瘤MG-63细胞的抑制作用及其对TRPV5和TRPV6蛋白表达的影响 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41(6): 1201-1206.
- [13] RACIBORSKA A, BILSKA K. Sorafenib in patients with progressed and refractory bone tumors [J]. *Med Oncol*, 2018, 35(10): 126.
- [14] BROWDER T, BUTTERFIELD C E, KRÄLING B M, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1878-1886.
- [15] KLEMENT G, BARUCHEL S, RAK J, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(8): R15-R24.
- [16] HANAHAHAN D, BERGERS G, BERGSLAND E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(8): 1045-1047.
- [17] KERBEL R S, KAMEN B A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(6): 423-436.
- [18] LIU Z L, CHEN H H, ZHENG L L, et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 198.
- [19] 李志国, 马 浔, 叶永安, 等. 基于mTOR/HIF-1 α /VEGF信号通路探讨抗纤抑癌方对肝癌前病变大鼠模型的调控作用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(10): 2049-2054.
- [20] CASTILLA M A, CAMELO C, GAZAPO R M, et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents [J]. *Life Sci*, 2000, 67(9): 1003-1013.
- [21] GORSKI D H, BECKETT M A, JASKOWIAK N T, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(14): 3374-3378.
- [22] TIRPE A A, GULEI, CIORTEA S M, et al. Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6140.
- [23] LI J, SHI M X, CAO Y, et al. Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 α in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(4): 1341-1351.
- [24] KARAKUYU N F, ERTUNC O, BEDIR M, et al. Protective role of nebulivolol via AKT1/Hif-1 α /eNOS signaling pathway: nephrotoxicity caused by methotrexate in a rat model [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2023, 101(8): 393-399.