

# 七氟醚调控AKT/FOXO1通路对骨肉瘤细胞增殖、 凋亡及化疗敏感性的影响

张光恒<sup>1</sup> 鲁纲<sup>2\*</sup><sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属梨园医院创面修复血管外科, 武汉 430077;<sup>2</sup>华中科技大学同济医学院附属梨园医院普外科, 武汉 430077)

**摘要** 该文探讨七氟醚(SEVO)调节蛋白激酶B(AKT)/叉头框转录因子O亚族1(FOXO1)通路对骨肉瘤(OS)细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响。将体外培养人OS细胞MG63随机分为Control组(常规培养)、L-SEVO组(2% SEVO)、M-SEVO组(4% SEVO)、H-SEVO组(8% SEVO)、SC79组(8% SEVO+5  $\mu\text{mol/L}$  AKT激动剂SC79)。甲基噻唑基四唑(MTT)与平板克隆实验检测各组细胞的增殖情况; MTT检测各组细胞的顺铂半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ 值); 划痕实验检测各组细胞的迁移情况; Transwell实验检测各组细胞的侵袭情况; 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率; Western blot检测各组细胞中凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax)、AKT/FOXO1通路相关蛋白(p-AKT、AKT、p-FOXO1、FOXO1)、多药耐药相关蛋白1(MRP1)的表达情况。结果显示, 与Control组相比, L-SEVO组、M-SEVO组、H-SEVO组MG63细胞的存活率、克隆数、划痕愈合率、侵袭数、Bcl-2、p-AKT/AKT、p-FOXO1/FOXO1、MRP1、 $\text{IC}_{50}$ 值水平依次降低, 而细胞凋亡率、Bax水平依次升高( $P < 0.05$ ); 与H-SEVO组相比, SC79组MG63细胞的存活率、克隆数、划痕愈合率、侵袭数、Bcl-2、p-AKT/AKT、p-FOXO1/FOXO1、MRP1、 $\text{IC}_{50}$ 值水平升高, 而细胞凋亡率、Bax水平降低( $P < 0.05$ )。以上结果表明, SEVO可能通过抑制AKT/FOXO1通路, 抑制OS细胞MG63的细胞增殖、迁移、侵袭, 促进凋亡发生, 并增强其对顺铂的化疗敏感性。

**关键词** 七氟醚; 蛋白激酶B/叉头框转录因子O亚族1通路; 骨肉瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 化疗敏感性

## Impacts of Sevoflurane on Proliferation, Apoptosis, and Chemotherapy Sensitivity of Osteosarcoma Cells by Regulating the AKT/FOXO1 Pathway

ZHANG Guangheng<sup>1</sup>, LU Gang<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Wound Repair Vascular Surgery, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China; <sup>2</sup>Department of General Surgery, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China)

**Abstract** This study investigated the impacts of SEVO (sevoflurane) on the proliferation, apoptosis, and chemotherapy sensitivity of OS (osteosarcoma) cells by regulating the AKT (protein kinase B)/FOXO1 (forkhead transcription factor O subfamily 1) pathway. Human OS cells MG63 were cultured *in vitro* and randomly assigned into Control group (conventional culture), L-SEVO group (2% SEVO), M-SEVO group (4% SEVO), H-SEVO group (8% SEVO), and SC79 group (8% SEVO+5  $\mu\text{mol/L}$  AKT agonist SC79). MTT (methyl thiazolyl tetrazole)

收稿日期: 2024-12-02

接受日期: 2025-01-06

\*通信作者: Tel: 027-86779910, E-mail: y12uj8@163.com

Received: December 2, 2024

Accepted: January 6, 2025

\*Corresponding author. Tel: +86-27-86779910, E-mail: y12uj8@163.com

and plate cloning experiments were applied to detect the proliferation in each group. MTT was applied to detect the IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) of cisplatin in each group. Scratch experiment was applied to detect the migration in each group. Transwell experiment was applied to detect the invasion of various groups. Flow cytometry was applied to detect the apoptosis rate of each group. Western blot was applied to detect the expression of apoptosis related proteins (Bcl-2, Bax) and AKT/FOXO1 pathway related proteins (p-AKT, AKT, p-FOXO1, FOXO1), multi-drug resistance associated protein 1 (MRP1). The results showed that compared with the Control group, the survival rate, clone number, scratch healing rate, invasion rate, Bcl-2, p-AKT/AKT, p-FOXO1/FOXO1, MRP1, and IC<sub>50</sub> values of MG63 cells in the L-SEVO group, M-SEVO group, and H-SEVO group were reduced, while the apoptosis rate and Bax level were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the H-SEVO group, the survival rate, clone number, scratch healing rate, invasion number, Bcl-2, p-AKT/AKT, p-FOXO1/FOXO1, MRP1, and IC<sub>50</sub> values of MG63 cells in the SC79 group were increased, while the apoptosis rate and Bax levels were decreased ( $P < 0.05$ ). These results suggest that SEVO may inhibit the proliferation, migration, and invasion of OS MG63 cells, promote apoptosis, and enhance its sensitivity to cisplatin chemotherapy by suppressing the AKT/FOXO1 pathway.

**Keywords** sevoflurane; protein kinase B/forkhead transcription factor O subfamily 1 pathway; osteosarcoma; cell proliferation; cell apoptosis; chemotherapy sensitivity

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的恶性原发性骨肿瘤。目前OS患者的治疗通常包括手术联合辅助化疗和新辅助化疗, 尽管治疗策略不断进步, 但转移及其后的复发仍是导致OS患者临床死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。OS的高度细胞异质性和复杂的分子遗传机制, 给开发针对性治疗方法带来了极大挑战<sup>[2]</sup>。因此, 深入探究OS相关机制对于开发新疗法及提高治疗效果具有至关重要的意义。蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在磷酸化作用下转变为p-AKT, 这是其活化形态, 能进一步作用于下游靶标。作为一种潜在的致癌分子, AKT在多种人类癌症中均呈现过度表达与活化状态<sup>[3-4]</sup>。一旦AKT信号通路被激活, 就会加速癌细胞的增殖、病情进展、迁移及侵袭<sup>[5]</sup>。叉头框转录因子O亚族1(forkhead transcription factor O subfamily 1, FOXO1)是FOXO家族的重要成员, 而FOXO则是一类受AKT磷酸化调控的转录因子。此过程会促使FOXO从细胞核迁移至细胞质, 进而调控细胞的存活、生长及凋亡过程<sup>[6]</sup>。AKT/FOXO1信号通路在调节细胞生长、凋亡及化疗耐药方面发挥着关键作用<sup>[7]</sup>。有研究指出, 在OS细胞中降低AKT与FOXO1的磷酸化水平, 可有效抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡, 增强化疗耐药敏感性<sup>[8]</sup>。七氟醚(sevoflurane, SEVO)又名七氟烷, 是一种非易燃、气味香甜的卤代醚麻醉药, 可以诱导和维持全身麻醉, 已被证明具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤的药理作用<sup>[9-10]</sup>。研究报道, SEVO不仅能够抑制

OS细胞的增殖和侵袭, 而且可以降低AKT与FOXO1的磷酸化水平, 诱导细胞凋亡增强神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞对顺铂的化疗敏感性<sup>[11-13]</sup>。然而, SEVO能否通过调控AKT/FOXO1信号通路来对OS细胞增殖、凋亡及化疗敏感性产生影响, 仍需进一步验证。以期为优化癌症患者手术治疗方案、提高治疗效果和降低术后复发及转移的风险提供新的方向。将来SEVO有潜力作为辅助治疗药物, 或与其他抗癌药物协同使用, 以期达到更佳的治疗效果。此外, 基于SEVO对癌细胞的影响机制, 或许能够研发出具有相似作用机制的新型抗癌药物, 为癌症治疗领域带来新的突破。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

MG63细胞(目录号: TCHu124)购自中国科学院上海细胞库; DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(货号: 10566016、A5256701、25200072)购自美国Gibco公司; SEVO(CAS号: 28523-86-6)购自上海羽哂生物科技有限公司; 激活剂SC79、顺铂(CAS号: 305834-79-1、15663-27-1)购自MCE公司; MTT、高效RIPA裂解液(货号: M8180、R0010)购自北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: BL107B)购自安徽白鲨生物科技有限公司; BCA蛋白定量试剂盒(货号: WB6501)购自苏州新赛美生物科技有限公司; SDS-PAGE凝胶制

备试剂盒(货号: CW0022M)购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 抗体p-AKT(Ser473)、AKT、p-FOXO1(Ser256)、FOXO1、MRP1、GAPDH(货号: 4060、9272、84192、2880、72202、2118)购自美国Cell Signaling Technology公司; 抗体Bcl-2、Bax(货号: AF6139、AF0120)、Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) HRP或Goat Anti-Mouse IgG(H+L) HRP(货号: S0001、S0002)购自美国Affinity Biosciences公司; 流式细胞仪(型号: NovoCyte Advanteon)购自安捷伦科技(中国)有限公司; 多功能酶标仪(型号: Spectra Max M5)购自Molecular Devices公司; 凝胶成像系统(型号: GelDoc Go)购自美国Bio-Rad公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 SEVO浓度的筛选** MG63细胞使用含10%胎牛血清、1%青/链霉素的DMEM培养基, 在与麻醉机连接的37 °C密闭培养箱中培养(麻醉机用于向培养箱中供应SEVO), 并用气体监测器检测培养箱中SEVO的浓度。MG63细胞分别暴露于不同浓度(0%、1%、2%、4%、8%、16%)的SEVO中24 h。经MTT筛选SEVO适宜浓度进行后续研究。

**1.2.2 细胞分组** 将体外培养的MG63细胞分为Control组(常规培养)、L-SEVO组(2% SEVO)、M-SEVO(4% SEVO)、H-SEVO组(8% SEVO)、SC79组(8% SEVO+5  $\mu\text{mol/L}$  AKT激动剂SC79<sup>[14]</sup>)。

**1.2.3 MTT和平板克隆实验检测MG63细胞的增殖情况** MTT实验: 将MG63细胞以2 000个/孔的密度接种于96孔板中, 按1.2.2进行相应细胞分组处理。随后, 每孔加入10  $\mu\text{L}$  MTT溶液(5 mg/mL), 37 °C孵育4 h, 加入150  $\mu\text{L}$  DMSO终止反应, 避光振荡, 充分溶解结晶物。在多功能酶标仪490 nm处测量每孔的吸光度( $D_{490}$ )值, 计算细胞存活率。

平板克隆实验: 将MG63细胞以150个/孔的密度接种于6孔板中, 观察至肉眼可见克隆, 使用固定液室温固定30 min, 并进行染色, 计算细胞克隆数。

**1.2.4 MTT检测MG63细胞的顺铂半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ 值)** 将MG63细胞以2 000个/孔的密度接种在96孔板, 按1.2.2进行相应细胞分组处理的同时加入不同浓度梯度顺铂(0、0.5、1、2、4、8  $\mu\text{mol/L}$ )处理24 h<sup>[14]</sup>。按1.2.3中MTT步骤, 在多功能酶标仪490 nm处测量每孔的吸光度( $D_{490}$ )值, 计算半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ 值)。

**1.2.5 划痕实验检测MG63细胞的迁移情况** 将对数生长期的MG63细胞消化, 1 $\times 10^6$ 个/孔密度接种在

6孔板中, 当细胞融合80%~90%时, 用1 mL无菌移液枪头划伤细胞, 在37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱继续培养24 h, 并对0和24 h创面拍照, 计算细胞划痕愈合率= $[(0 \text{ h的初始痕迹面积}-24 \text{ h的最终痕迹面积})/0 \text{ h的初始痕迹面积}]\times 100\%$ 。

**1.2.6 Transwell实验检测MG63细胞的侵袭情况** 将基质胶与无血清DMEM培养基等比例均匀涂于Transwell上室, 并加入重悬于不含血清的培养基的MG63细胞, 下室加入含10%血清的DMEM培养基。随后在37 °C孵育24 h。将插入物上表面未被侵入的细胞用灭菌棉签去除, 将下表面被侵入的细胞用4%多聚甲醛室温固定10 min, 室温下用0.5%结晶紫染色10 min, 在显微镜下观察、拍照, 计算细胞侵袭数。

**1.2.7 流式细胞仪检测MG63细胞的凋亡情况** 将MG63细胞以1 $\times 10^6$ 个/孔的密度接种在6孔板中培养。采用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒进行细胞双染, 并在流式细胞仪中分析细胞凋亡率。

**1.2.8 Western blot检测MG63细胞中Bcl-2、Bax、p-AKT、AKT、p-FOXO1、FOXO1、MRP1蛋白的表达情况** 使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取MG63细胞的总蛋白, 采用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。用SDS-PAGE分离蛋白, 将分离的蛋白质转移到PVDF膜, 在室温下用5%脱脂奶粉封闭2 h, 将膜与以下一抗[Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:2 000)、p-AKT(1:2 000)、AKT(1:1 000)、p-FOXO1(1:1 000)、FOXO1(1:2 000)、MRP1(1:2 000)、GAPDH(1:3 000)]在4 °C孵育过夜。随后, 用TBST洗涤PVDF膜3次, 并与HRP标记的二抗(1:3 000)在37 °C下孵育2 h。在凝胶成像系统中使用ECL化学发光液显示蛋白带, 并拍照, 使用ImageJ软件进行蛋白表达的分析、统计。

## 1.3 统计与分析

采用SPSS 26.0软件进行数据统计分析, 结果以6次重复实验的均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用单因素方差分析进行多组比较, 并采用SNK-*q*检验进一步两两比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SEVO浓度筛选

SEVO对MG63细胞的生长抑制作用呈剂量依赖性, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。计算SEVO的 $\text{IC}_{50}$ 值为8.24%。选取2%、4%、8% SEVO进行后续

表1 不同浓度SEVO对MG63细胞存活率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of SEVO on survival rate of MG63 cells

SEVO浓度/% SEVO concentration /%	存活率/% Survival rate /%
0	99.95±0.05
1	95.46±9.66
2	81.07±7.89*
4	65.32±6.02*
8	52.11±5.21*
16	43.22±4.53*

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与0%相比。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with 0%.

表2 SEVO对MG63细胞顺铂 $IC_{50}$ 值的影响Table 2 Effects of SEVO on  $IC_{50}$  values of cisplatin in MG63 cells

组别 Groups	$IC_{50}$ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Control	2.54±0.21
L-SEVO	2.01±0.20*
M-SEVO	1.60±0.15*#
H-SEVO	1.23±0.13*# $\Delta$
SC79	2.25±0.23 $\blacktriangle$

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与Control组相比; # $P<0.05$ , 与L-SEVO组相比;  $\Delta P<0.05$ , 与M-SEVO组相比;  $\blacktriangle P<0.05$ , 与H-SEVO组相比。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with Control group; # $P<0.05$  compared with L-SEVO group;  $\Delta P<0.05$  compared with M-SEVO group;  $\blacktriangle P<0.05$  compared with H-SEVO group.

实验。见表1。

## 2.2 SEVO对MG63细胞顺铂化疗敏感性的影响

与Control组相比, L-SEVO组、M-SEVO组、H-SEVO组MG63细胞的MRP1表达水平、 $IC_{50}$ 值降低( $P<0.05$ ); 与H-SEVO组相比, SC79组MG63细胞的MRP1表达水平、 $IC_{50}$ 值升高( $P<0.05$ )。见表2、图1。

## 2.3 SEVO对MG63细胞增殖的影响

与Control组相比, L-SEVO组、M-SEVO组、H-SEVO组MG63细胞的存活率、克隆数下降( $P<0.05$ ); 与H-SEVO组相比, SC79组MG63细胞的存活率、克隆数升高( $P<0.05$ )。见表3、图2。

## 2.4 SEVO对MG63细胞迁移的影响

与Control组相比, L-SEVO组、M-SEVO组、H-SEVO组MG63细胞的划痕愈合率降低( $P<0.05$ ); 与H-SEVO组相比, SC79组MG63细胞的划痕愈合率升高( $P<0.05$ )。见表4、图3。

## 2.5 SEVO对MG63细胞侵袭的影响

与Control组相比, L-SEVO组、M-SEVO组、H-SEVO组MG63细胞的侵袭数减少( $P<0.05$ ); 与H-SEVO组相比, SC79组MG63细胞的侵袭数增多

( $P<0.05$ )。见表5、图4。

## 2.6 SEVO对MG63细胞凋亡的影响

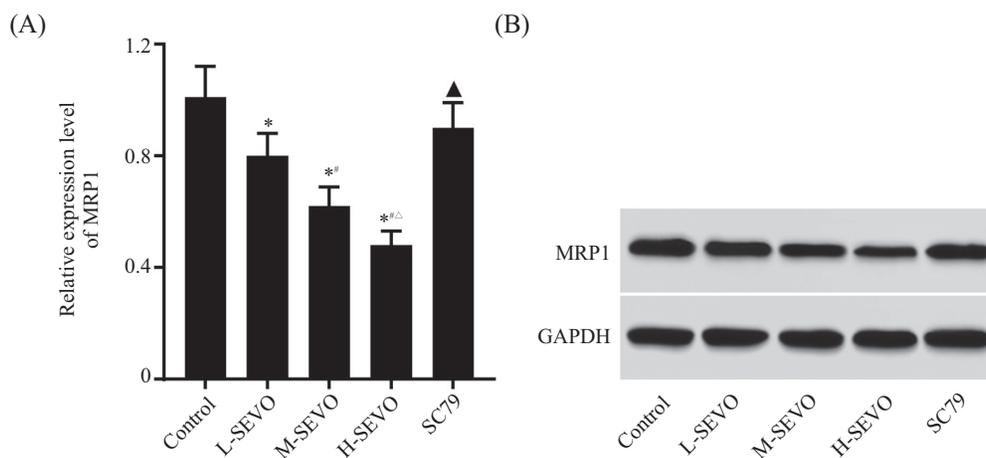
与Control组相比, L-SEVO组、M-SEVO组、H-SEVO组MG63细胞中Bcl-2表达水平降低, 而细胞凋亡率、Bax表达水平升高( $P<0.05$ ); 与H-SEVO组相比, SC79组MG63细胞中Bcl-2表达水平升高, 而细胞凋亡率、Bax表达水平降低( $P<0.05$ )。见表6、图5、图6。

## 2.7 SEVO对MG63细胞中AKT/FOXO1通路相关蛋白表达的影响

与Control组相比, L-SEVO组、M-SEVO组、H-SEVO组MG63细胞中p-AKT/AKT、p-FOXO1/FOXO1水平依次降低( $P<0.05$ ); 与H-SEVO组相比, SC79组MG63细胞中p-AKT/AKT、p-FOXO1/FOXO1水平升高( $P<0.05$ )。见图7。

## 3 讨论

OS可发生于人体任何骨骼部位, 但最常见于膝关节周围及肱骨近端, 同时, 它也可在具有癌症病史的患者中以继发性OS的形式出现, 患者通常表现为



A: 统计MRP1蛋白相对表达量; B: Western blot检测MRP1蛋白的表达情况。  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与Control组相比; # $P<0.05$ , 与L-SEVO组相比; ^ $P<0.05$ , 与M-SEVO组相比; ▲ $P<0.05$ , 与H-SEVO组相比。

A: the relative expression of MRP1 protein was measured; B: Western blot detection of MRP1 protein expression.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with Control group; # $P<0.05$  compared with L-SEVO group; ^ $P<0.05$  compared with M-SEVO group; ▲ $P<0.05$  compared with H-SEVO group.

图1 SEVO对MG63细胞中MRP1蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of SEVO on MRP1 protein expression in MG63 cells

表3 SEVO对MG63细胞增殖的影响

Table 3 Effects of SEVO on proliferation of MG63 cells

组别 Groups	存活率/% Survival rate /%	克隆数 Number of clones
Control	98.99±1.01	152.06±12.19
L-SEVO	80.01±7.78*	120.77±9.09*
M-SEVO	63.56±6.32*#	91.48±9.12*#
H-SEVO	47.84±4.78*#△	74.25±6.56*#△
SC79	86.67±8.43▲	133.19±10.32▲

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与Control组相比; # $P<0.05$ , 与L-SEVO组相比; ^ $P<0.05$ , 与M-SEVO组相比; ▲ $P<0.05$ , 与H-SEVO组相比。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with Control group; # $P<0.05$  compared with L-SEVO group; ^ $P<0.05$  compared with M-SEVO group; ▲ $P<0.05$  compared with H-SEVO group.

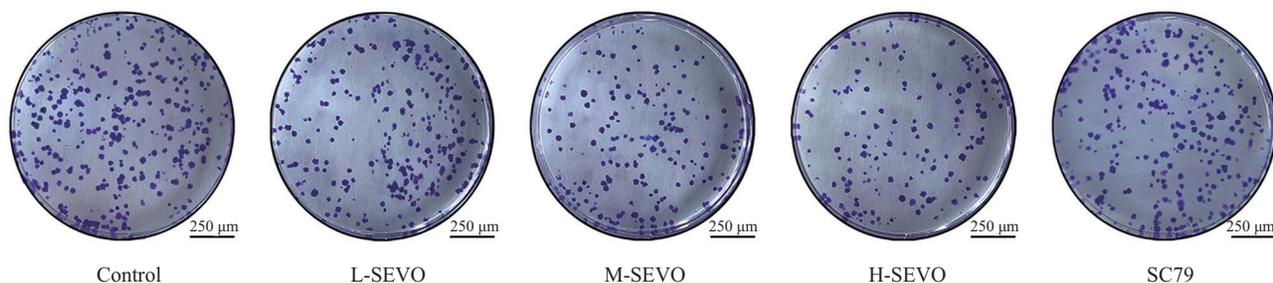


图2 平板克隆实验检测MG63细胞的增殖情况

Fig.2 Proliferation of MG63 cells detected by plate cloning assay

疼痛、活动能力受限,且患者在活动中常可触及肿块。OS可被划分为低、中、高三个级别,肿瘤的分级可作为评估其发展为转移性疾病风险的相对指

标。低级别或骨旁OS通常生长缓慢,一般仅需通过手术切除进行治疗;而高级别肿瘤则具有较高的肺、淋巴结及其他骨骼转移风险,需结合手术与辅助化疗

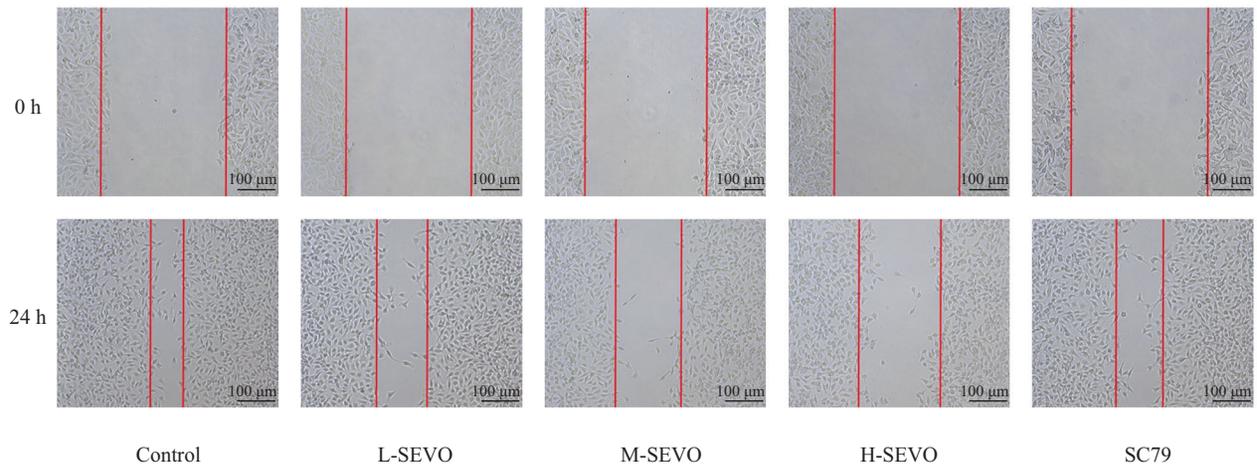


图3 划痕实验检测MG63细胞的迁移情况  
Fig.3 Migration of MG63 cells detected by scratch test

表4 SEVO对MG63细胞迁移的影响  
Table 4 Effects of SEVO on MG63 cell migration

组别 Groups	划痕愈合率/% Scratch healing rate /%
Control	74.68±7.39
L-SEVO	59.99±6.03*
M-SEVO	45.34±4.54*#
H-SEVO	36.17±3.62*#△
SC79	65.35±6.54▲

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与Control组相比; # $P<0.05$ , 与L-SEVO组相比; △ $P<0.05$ , 与M-SEVO组相比; ▲ $P<0.05$ , 与H-SEVO组相比。

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with Control group; # $P<0.05$  compared with L-SEVO group; △ $P<0.05$  compared with M-SEVO group; ▲ $P<0.05$  compared with H-SEVO group.

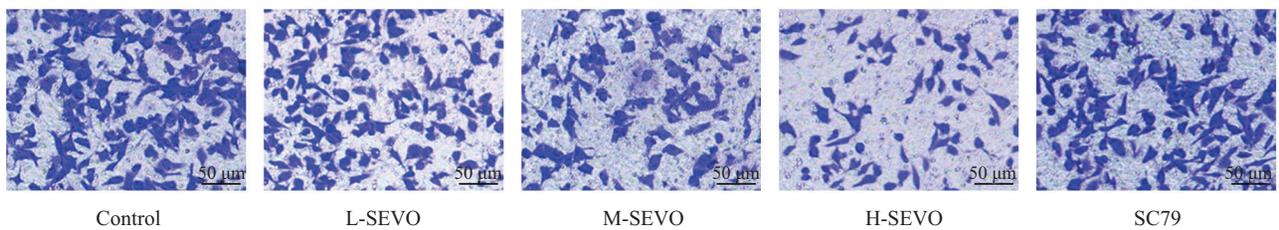


图4 Transwell实验检测MG63细胞的侵袭情况  
Fig.4 Transwell assay to detect MG63 cell invasion

表5 SEVO对MG63细胞侵袭的影响  
Table 5 Effects of SEVO on MG63 cell invasion

组别 Groups	侵袭数 Number of invasions
Control	137.89±10.78
L-SEVO	111.23±11.16*
M-SEVO	85.64±8.55*#
H-SEVO	67.21±6.67*#△
SC79	124.17±13.09▲

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与Control组相比; # $P<0.05$ , 与L-SEVO组相比; △ $P<0.05$ , 与M-SEVO组相比; ▲ $P<0.05$ , 与H-SEVO组相比。

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with Control group; # $P<0.05$  compared with L-SEVO group; △ $P<0.05$  compared with M-SEVO group; ▲ $P<0.05$  compared with H-SEVO group.

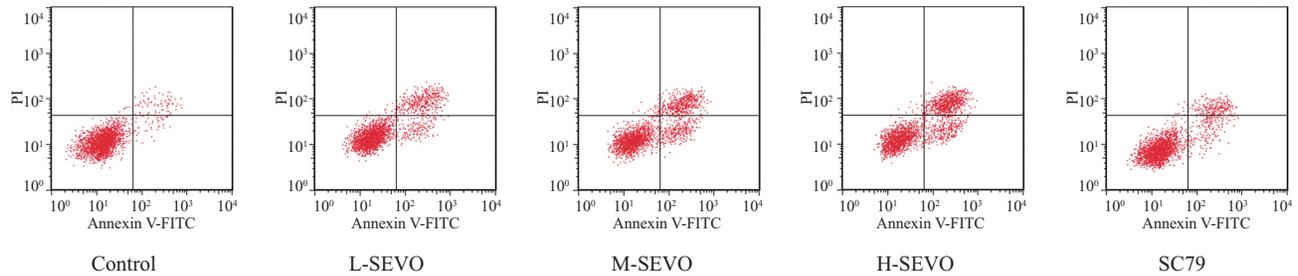


图5 流式细胞仪检测MG63细胞的凋亡

Fig.5 Apoptosis of MG63 cells was detected by flow cytometry

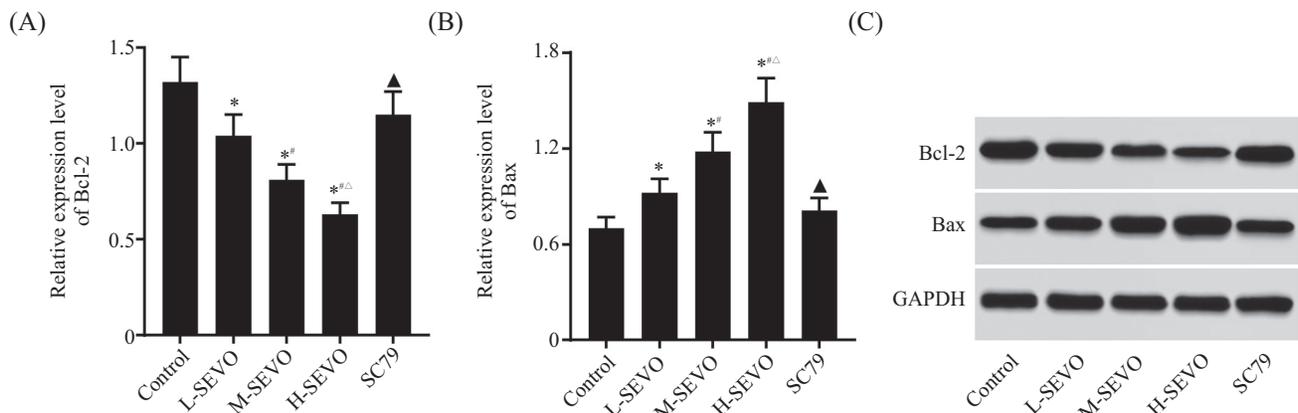
表6 SEVO对MG63细胞凋亡率的影响

Table 6 Effects of SEVO on apoptosis rate of MG63 cells

分组 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control	2.42±0.25
L-SEVO	22.37±2.28*
M-SEVO	34.53±3.38*#
H-SEVO	45.12±4.02*#△
SC79	11.30±1.13▲

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与Control组相比; # $P<0.05$ , 与L-SEVO组相比; △ $P<0.05$ , 与M-SEVO组相比; ▲ $P<0.05$ , 与H-SEVO组相比。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with Control group; # $P<0.05$  compared with L-SEVO group; △ $P<0.05$  compared with M-SEVO group; ▲ $P<0.05$  compared with H-SEVO group.



A: Bcl-2蛋白相对表达量比较; B: Bax蛋白相对表达量比较; C: Western blot检测Bcl-2、Bax蛋白的表达。 $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与Control组相比; # $P<0.05$ , 与L-SEVO组相比; △ $P<0.05$ , 与M-SEVO组相比; ▲ $P<0.05$ , 与H-SEVO组相比。

A: comparison of Bcl-2 protein relative expression; B: comparison of relative expression of Bax protein; C: Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax proteins.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with Control group; # $P<0.05$  compared with L-SEVO group; △ $P<0.05$  compared with M-SEVO group; ▲ $P<0.05$  compared with H-SEVO group.

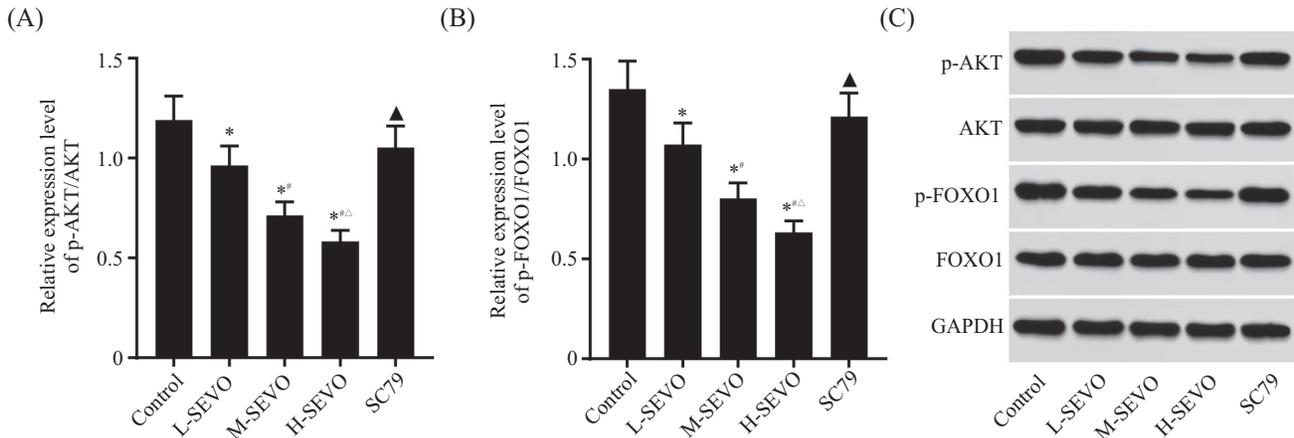
图6 SEVO对MG63细胞中Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of SEVO on the expression of Bcl-2 and Bax proteins in MG63 cells

进行综合治疗<sup>[15]</sup>。尽管现代化疗的出现显著改善了肿瘤患者的生存率,但OS患者的治疗效果仍不太理想<sup>[16]</sup>。然而,对OS生物学认识的不断深入,为开展新一轮创新治疗奠定了基础。

SEVO是一种广泛用于维持肿瘤手术麻醉的吸

入麻醉药,对不同类型的癌症具有不同的细胞生物学效应<sup>[17]</sup>。SONG等<sup>[18]</sup>通过细胞实验证明,SEVO能够通过miR-29a诱导Dnmt3a表达下调,进而降低磷脂酰肌醇3激酶和AKT的磷酸化表达水平,最终降低肝细胞癌Huh7和HepG2细胞的活力,促进细胞凋亡,



A: p-AKT/AKT相对表达量比较; B: p-FOXO1/FOXO1相对表达量比较; C: Western blot检测p-AKT、AKT、p-FOXO1、FOXO1蛋白的表达。  
 $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P < 0.05$ , 与Control组相比; # $P < 0.05$ , 与L-SEVO组相比; △ $P < 0.05$ , 与M-SEVO组相比; ▲ $P < 0.05$ , 与H-SEVO组相比。

A: comparison of the relative expression levels of p-AKT/AKT; B: comparison of p-FOXO1/FOXO1 relative expression levels; C: the expression of p-AKT, AKT, p-FOXO1 and FOXO1 proteins was detected by Western blot.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P < 0.05$  compared with Control group; # $P < 0.05$  compared with L-SEVO group; △ $P < 0.05$  compared with M-SEVO group; ▲ $P < 0.05$  compared with H-SEVO group.

图7 SEVO对MG63细胞中p-AKT/AKT、p-FOXO1/FOXO1表达的影响

Fig.7 Effects of SEVO on the expression of p-AKT/AKT and p-FOXO1/FOXO1 in MG63 cells

并抑制细胞的迁移和侵袭。SUN等<sup>[19]</sup>也证明, SEVO能够通过调控 miR-34a/ADAM10轴抑制结直肠癌细胞的迁移和侵袭。正如本研究中, SEVO可呈剂量依赖性抑制OS细胞MG63的细胞增殖、迁移、侵袭, 并促进凋亡的发生。此外, MRP1是最具特征性的转运蛋白, 通常通过外排化疗药物来保护细胞, 其在癌细胞中的高表达可导致细胞内顺铂浓度的降低, 降低化疗疗效<sup>[20]</sup>。进一步实验表明, SEVO可以降低顺铂IC<sub>50</sub>值及MRP1蛋白的表达水平, 增强OS细胞MG63对顺铂的化疗敏感性。与QUAN等<sup>[21]</sup>研究相似, SEVO可以通过抑制Wnt/β-catenin和PI3K/AKT通路, 显著抑制肺腺癌及肺腺癌顺铂耐药细胞的增殖、侵袭和迁移, 并诱导其凋亡, 从而减缓肺腺癌的发生发展。因此, SEVO能够抑制OS细胞MG63的细胞增殖、迁移、侵袭, 促进凋亡发生, 并增强其对顺铂的化疗敏感性, 有望成为OS的潜在治疗药物, 但关于其具体的分子机制仍需进一步实验探究。

AKT又称蛋白激酶B, 其功能障碍可引起多种疾病, 包括癌症<sup>[22]</sup>。FOXO1是FOXO家族成员之一, 在DNA修复、细胞周期控制、抗逆性、凋亡和细胞代谢等细胞过程中具有重要功能, 其活性是通过AKT的磷酸化介导的, FOXO1磷酸化, 可降低其反式激活潜能, 导致DNA结合受阻, 核排斥, 随后被隔离到细胞质中, 从而抑制靶基因表达<sup>[23]</sup>。WU等<sup>[24]</sup>报道, 促进AKT和FOXO1磷酸化的表达, 激活AKT/FOXO1通

路可促进细胞在血清饥饿条件下存活, 并增强乳腺癌细胞对化疗的抵抗力。然而, JIANG等<sup>[25]</sup>进一步实验证明, 抑制AKT/FOXO1通路可降低紫杉醇IC<sub>50</sub>值和细胞增殖能力来增强子宫内膜癌对紫杉醇的敏感性, 并诱导癌细胞凋亡, 抑制癌症的发展。在本研究中, SEVO降低了AKT和FOXO1磷酸化的表达水平, 抑制了AKT/FOXO1通路, 进而诱导了凋亡发生, 抑制了OS细胞MG63的细胞增殖、迁移、侵袭, 并降低了顺铂IC<sub>50</sub>值及MRP1蛋白的表达水平, 增强了OS细胞MG63对顺铂化疗敏感性; 进一步实验发现, 使用AKT激动剂SC79激活AKT/FOXO1通路可减弱SEVO对MG63细胞的上述作用。与REN等<sup>[4]</sup>报道相似, 敲低C型凝集素结构域家族3成员A可抑制AKT1、mTOR的表达, 抑制OS细胞的增殖和克隆形成, 诱导G<sub>1</sub>期阻滞, 同时增强OS细胞对多柔比星和顺铂的化疗敏感性。然而, AKT激活剂SC79可阻断敲低C型凝集素结构域家族3成员A对OS细胞的上述作用。研究结果揭示, SEVO可以抑制OS细胞MG63的细胞增殖、迁移、侵袭, 促进细胞凋亡, 并增强其对顺铂的化疗敏感性, 这可能与抑制AKT/FOXO1通路有关。

综上所述, SEVO可能是通过抑制AKT/FOXO1通路, 抑制OS细胞MG63的细胞增殖、迁移、侵袭, 促进凋亡发生, 并增强其对顺铂的化疗敏感性, 为OS的治疗提供新的理论依据。然而, 当前的研究仍

仅限于细胞层面, 仅提供了初步的实验性证据。为了全面评估SEVO在生物体内的具体作用机制及其潜在的应用价值, 仍需通过动物模型研究及临床试验进行更为深入的探索。

### 参考文献 (References)

- [1] LI S, ZHANG H, LIU J, et al. Targeted therapy for osteosarcoma: a review [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(9): 6785-97.
- [2] CERSOSIMO F, LONARDI S, BERNARDINI G, et al. Tumor-associated macrophages in osteosarcoma: from mechanisms to therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5207.
- [3] GALBRAITH L C A, MUI E, NIXON C, et al. PPAR-gamma induced AKT3 expression increases levels of mitochondrial biogenesis driving prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2021, 40(13): 2355-66.
- [4] SUN L T, ZHANG L Y, SHAN F Y, et al. Jiedu Sangen decoction inhibits chemoresistance to 5-fluorouracil of colorectal cancer cells by suppressing glycolysis via PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(2): 143-52.
- [5] KUMAR N, MANDAL C C. Cholesterol-lowering drugs on Akt signaling for prevention of tumorigenesis [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 724149.
- [6] GRAVES D T, MILOVANOVA T N. Mucosal immunity and the FOXO1 transcription factors [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2530.
- [7] DENG J L, ZHANG R, ZENG Y, et al. Statins induce cell apoptosis through a modulation of AKT/FOXO1 pathway in prostate cancer cells [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 7231-42.
- [8] LUO M, SU Z, GAO H, et al. Cirsiliol induces autophagy and mitochondrial apoptosis through the AKT/FOXO1 axis and influences methotrexate resistance in osteosarcoma [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 907.
- [9] LIANG T Y, PENG S Y, MA M, et al. Protective effects of sevoflurane in cerebral ischemia reperfusion injury: a narrative review [J]. *Med Gas Res*, 2021, 11(4): 152-4.
- [10] FU B, ZHOU F, ZHANG J, et al. Sevoflurane attenuates proliferative and migratory activity of lung cancer cells via mediating the microRNA-100-3p/sterol O-acyltransferase 1 axis [J]. *Chin J Physiol*, 2023, 66(6): 456-65.
- [11] CHEN M, ZHOU L, LIAO Z, et al. Sevoflurane inhibited osteosarcoma cell proliferation and invasion via targeting miR-203/WNT2B/Wnt/ $\beta$ -Catenin axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 9505-15.
- [12] WANG Q, LI Y, TAN H, et al. Sevoflurane-induced apoptosis in the mouse cerebral cortex follows similar characteristics of physiological apoptosis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 873658.
- [13] LI H, FU X, GUO H, et al. Sevoflurane reverses cisplatin resistance in neuroblastoma cells through the linc00473/miR-490-5p/AKT1 axis [J]. *Saudi Med J*, 2022, 43(11): 1209-16.
- [14] REN C, PAN R, HOU L, et al. Suppression of CLEC3A inhibits osteosarcoma cell proliferation and promotes their chemosensitivity through the AKT1/mTOR/HIF1 $\alpha$  signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(4): 1739-48.
- [15] BEIRD H C, BIELACK S S, FLANAGAN A M, et al. Osteosarcoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 77.
- [16] GILL J, GORLICK R. Advancing therapy for osteosarcoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(10): 609-24.
- [17] XU Y, JIANG W, XIE S, et al. The role of inhaled anesthetics in tumorigenesis and tumor immunity [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 1601-9.
- [18] SONG G, TIAN L, CHENG Y, et al. Antitumor activity of sevoflurane in HCC cell line is mediated by miR-29a-induced suppression of Dnmt3a [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 18152-61.
- [19] SUN S Q, REN L J, LIU J, et al. Sevoflurane inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells by regulating microRNA-34a/ADAM10 axis [J]. *Neoplasia*, 2019, 66(6): 887-95.
- [20] ALALAWY A I. Key genes and molecular mechanisms related to paclitaxel resistance [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 244.
- [21] QUAN Y, LI S, WANG Y, et al. Propofol and sevoflurane alleviate malignant biological behavior and cisplatin resistance of xuanwei lung adenocarcinoma by modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and PI3K/AKT pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(11): 2098-108.
- [22] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [23] YU W, CHEN C, CHENG J. The role and molecular mechanism of FoxO1 in mediating cardiac hypertrophy [J]. *ESC Heart Fail*, 2020, 7(6): 3497-504.
- [24] WU Z, NIU T, XIAO W. Uev1A promotes breast cancer cell survival and chemoresistance through the AKT-FOXO1-BIM pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 331.
- [25] JIANG J, ZHANG C, WANG J, et al. Knockdown of PROM2 enhances paclitaxel sensitivity in endometrial cancer cells by regulating the AKT/FOXO1 pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2023, 23(19): 2127-34.