

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.19.003

甲基莲心碱促进骨肉瘤 143B 细胞凋亡的相关研究 *

周思齐 李皓桓[△] 张宇标 施家奇 蔡伟松

(武汉大学人民医院骨外科 湖北 武汉 430060)

摘要 目的: 研究不同浓度甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞增殖迁移的影响及其诱导凋亡的相关机制。**方法:** 不同浓度甲基莲心碱处理骨肉瘤 143B 之后, CCK-8 法检测甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞的增殖抑制作用; 细胞划痕实验检测不同浓度甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞迁移的影响; 流式细胞术检测甲基莲心碱对癌细胞的凋亡率和周期分布; Western Blot 检测甲基莲心碱对癌细胞相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达。**结果:** CCK-8 显示甲基莲心碱能抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖且以浓度和时间依赖的方式($P<0.05$); 给药组(20, 40, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 24 h 细胞迁移率分别为(62.35 $\pm$ 4.15)%, (40.74 $\pm$ 4.80)%, (25.10 $\pm$ 5.52)%, 较对照组(75.89 $\pm$ 5.24)%明显降低($P<0.05$); 流式细胞术结果显示甲基莲心碱能使骨肉瘤 143B 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 且呈剂量依赖性诱导癌细胞凋亡($P<0.05$); Western Blot 证明甲基莲心碱可促进癌细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达, 而降低抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达($P<0.05$)。**结论:** 甲基莲心碱可能通过激活线粒体凋亡相关蛋白的表达, 发挥抗骨肉瘤 143B 的作用。

关键词: 甲基莲心碱; 骨肉瘤; 增殖; 凋亡

中图分类号: R-33; R738 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)19-3612-06

The Effect of Neferine on the Apoptosis of Osteosarcoma 143B Cells*

ZHOU Si-qi, LI Hao-huan[△], ZHANG Yu-biao, SHI Jia-qi, CAI Wei-song

(Department of Orthopedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of different concentrations of neferine on the proliferation, migration and relative mechanism of apoptosis of osteosarcoma 143B cells. **Methods:** CCK-8 assay was used to detect the the anti-proliferation effect after different concentrations of neferine on 143B cells. Wound healing assay was used to detect the effect of neferine on the migration of osteosarcoma 143B cells. The effect of neferine on cancer cell cycle distribution and apoptosis was analyzed by flow cytometry. Western Blot was used to detect expression of apoptosis-related protein Bax and Bcl-2. **Results:** CCK-8 assay showed that neferine inhibited the proliferation of osteosarcoma 143B cells in a time- and concentration-dependent manner($P<0.05$). The 24-hour cell migration rates of the treated group (20, 40, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were (62.35 $\pm$ 4.15)%, (40.74 $\pm$ 4.80)%, (25.10 $\pm$ 5.52)%, compared with the control group (75.89 $\pm$ 5.24)% were decreased significantly ($P<0.05$). Flow cytometry showed that the cell cycle of 143B cells were arrested at G₀/G₁ phase and induced apoptosis of 143B cells at a concentration-dependent manner ($P<0.05$). Western Blot detection indicated that the expression of pro-apoptotic protein Bax was increased, and anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased in 143B cells when treated with different concentrations of neferine ($P<0.05$). **Conclusion:** Neferine may play a role in anti-osteosarcoma 143B by activating the expression of mitochondrial apoptosis-related protein.

Key words: Neferine; Osteosarcoma; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)19-3612-06

前言

骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)是发生于软骨、骨组织和肌肉的较为罕见的恶性肿瘤, 在所有肿瘤的约占 0.2%^[1], 在男性中的发病率更高^[2]。OS 患者的生存率较低且治疗一直未取得突破^[4-6], 寻找一种安全有效的治疗 OS 的手段是亟待解决的难题。作为从天然植物之中提取的一种生物碱单体, 甲基莲心碱具有广泛的药理作用, 如抗肝纤维化、降血压等^[7]。近年来的研究表明, 甲基莲心碱在抗肿瘤方面也具有显著的作用, 但其抗肿瘤机制还

有待进一步探究^[8]。Zhang^[9]等的研究表明甲基莲心碱可有效抑制成骨肉瘤细胞 U2OS 细胞增殖, 其作用机制可能为甲基莲心碱通过激活 p38 MAPK 信号通路上调 p21 蛋白阻滞癌细胞的 G₁ 期, 从而诱导骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡。但该研究仅对甲基莲心碱诱导骨肉瘤细胞系 U2OS 凋亡的原因进行研究, 未涉及其他细胞系, 且未完全阐明甲基莲心碱对其他凋亡通路的影响。本研究将骨肉瘤细胞 143B 作为研究对象, 通过体外采用不同浓度的甲基莲心碱作用于细胞, 观察其对骨肉瘤 143B 细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡的影响, 对甲基莲心碱抗癌机制进行

* 基金项目: 湖北省自然科学基金项目(ZRMS2017000057)

作者简介: 周思齐(1992-), 硕士, 主要从事骨关节疾病的临床与基础研究, E-mail: 1032759008@qq.com

[△] 通讯作者: 李皓桓(1976-), 博士, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 骨关节炎的基础与临床研究, E-mail: lihaohuan@whu.edu.cn

(收稿日期: 2018-04-28 接受日期: 2018-05-23)

了初步探讨, 以期为甲基莲心碱的临床应用于抗骨肉瘤提供实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

人骨肉瘤 143B 细胞系购自中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC, 中国, 武汉)。甲基莲心碱 (批号: MUST-16080508, 购于成都曼斯特生物科技有限公司, 取甲基莲心碱溶解于 DMSO 中制成浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 于 -20°C 保存); MEM 培养基 (Hyclone 公司), 新生胎牛血清 (Gibco 公司); 1% 双抗 (青霉素 100 U/mL , 链霉素 $100 \mu\text{g/mL}$) (吉诺公司); DMSO、胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司); Cell Counting Kit-8 (CKK-8) 购自同仁化学研究所 (日本); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒与细胞周期检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司 (南京)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 骨肉瘤 143B 细胞培养于含 10% FBS, 1% 青霉素和链霉素的 MEM 培养液中, 于 37°C 、5% 二氧化碳的培养箱中培养, 每 3~4 天按照 1:3 传代一次。取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞增殖试验 取对数生长期的骨肉瘤 143B 细胞, 以 5×10^4 个/mL 浓度接种于 96 孔板中, 每孔总量为 $100 \mu\text{L}$ 每孔。培养 24 h 待细胞贴壁后加入不同浓度甲基莲心碱 ($0, 15, 30, 40, 50, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别处理细胞 12 h、24 h 和 48 h。然后每孔加入 $90 \mu\text{L}$ 培养基, $10 \mu\text{L}$ CCK8 试剂在培养箱中孵育 1 h~1.5 h 左右, 用酶标仪测量每一孔细胞在 450 nm 波长下的吸光度。每孔均设置 3 个复孔。

1.2.3 细胞划痕实验 取处于对数生长期的骨肉瘤 143B 细胞, 按照浓度为 1×10^5 孔接种于 12 孔板中。待细胞贴壁融合达 90% 以上时, 更换无血清培养基, 然后加入不同浓度甲基莲心碱 ($0, 20, 40, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 使用 1 mL 无菌枪头进行细胞划痕, 并继续培养, 分别在 0 h、24 h 镜下观察照相比较, 迁移率按公式计算: 迁移率 (%) = (平均原始宽度 - 平均最终宽度) / 平均原始宽度 $\times 100\%$ 。每孔均设置 3 个复孔。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 双染检测甲基莲心碱对 143B 细胞凋亡的影响 取处于对数生长期的骨肉瘤 143B 细胞, 计数后按照浓度为 1×10^5 个/mL 每孔加入 1 mL 于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后加入不同浓度甲基莲心碱 ($0, 20, 40, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中常规培养 24 h, 各组重复 3 次。经无 EDTA 胰酶消化 1500 r/min 、 4°C 离心 5 min 收集细胞于流式管内。加入 1 mL 4°C 预冷的 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤细胞之后用 $300 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬细胞, 加入 $5 \mu\text{L}$ 的 Annexin V-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ 的 PI 混匀在室温下避光孵育 15 min。最后补加 $200 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 于流式细胞仪上检测。

1.2.5 PI/RNase 单染法检测检测甲基莲心碱对 143B 细胞周期的影响 取处于对数生长期的骨肉瘤 143B 细胞, 计数后按照浓度为 1×10^5 个/mL 每孔加入 1 mL 于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后加入不同浓度甲基莲心碱 ($0, 20, 40, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中常规培养 24 h, 各组重复 3 次。离心收集细胞加入 1 mL -20°C 预冷的 75% 乙醇于 -4°C 冰

箱过夜固定。待细胞用 PBS 洗涤一次后加入 $100 \mu\text{L}$ PBS 重悬, 加入 $2 \mu\text{L}$ 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 RNase A 于 37°C 水浴锅内孵育 40 min。孵育完成后, 加入 $100 \mu\text{L}$ 的 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI 染色液, 室温避光染色 20 min。最后流式细胞仪上检测细胞周期。

1.2.6 Western Blot 取处于对数生长期的骨肉瘤 143B 细胞, 计数后按照浓度为 1×10^5 个/mL 每孔加入 1 mL 于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后加入不同浓度甲基莲心碱 ($0, 20, 40, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中常规培养 24 h, 加入蛋白裂解液提取胞质蛋白并进行 BCA 定量, 待蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转膜后用 5% 的脱脂奶粉于室温封闭 1 h, 加入 Bcl-2、Bax 一抗 4°C 条件下孵育过夜, 然后二抗室温摇床避光孵育 2 h, 最后应用 Odyssey 成像系统进行膜扫描。

1.3 统计学分析

数据分析应用 SPSS20.0 统计软件, 结果使用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数间多重比较采用单因素方差分析, 检验水准设定为 $P=0.05$, 当 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞增殖的抑制作用

CCK-8 法检测发现, 用不同浓度甲基莲心碱处理后, 在 12~48 h 内骨肉瘤 143B 细胞增殖活性受到明显抑制, 并且随着甲基莲心碱作用时间的延长和使用浓度的增加, 其细胞活力不断下降, 差异具有统计学意义, 见图 1 ($P<0.05$)。甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞在 12、24、48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 67.63 ± 2.67 、 38.26 ± 0.95 、 $28.36 \pm 2.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这些结果表明甲基莲心碱能有效抑制骨肉瘤 143B 细胞的生长。

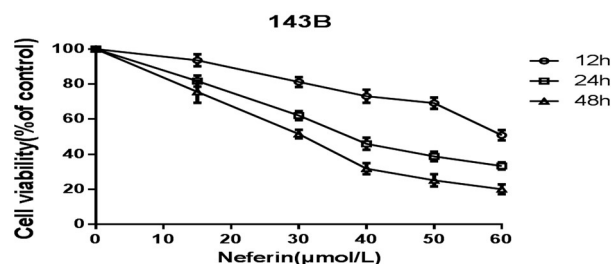


图 1 甲基莲心碱体外细胞增殖抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of neferine on cell proliferation *in vitro*

2.2 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞迁移的影响

细胞划痕实验检测不同浓度甲基莲心碱 ($0, 20, 40, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对骨肉瘤 143B 细胞的迁移的影响, 发现给药组 ($20, 40, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 24 h 细胞迁移率分别为 $(62.35 \pm 4.15)\%$ 、 $(40.74 \pm 4.80)\%$ 、 $(25.10 \pm 5.52)\%$, 较对照组 ($75.89 \pm 5.24\%$) 明显降低, 差异具有统计学意义, 见图 2 ($P<0.05$), 结果表明不同浓度甲基莲心碱能有效抑制骨肉瘤 143B 细胞的迁移。

2.3 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测不同浓度甲基莲心碱 ($0, 20, 40, 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对骨肉瘤 143B 细胞凋亡的影响, 发现甲基莲心碱处理 24 h 之后, 骨肉瘤 143B 细胞的凋亡率随着甲基莲心碱浓度的增加而显著提高, 与对照组比较差异具有统计学意义, 见图 3 ($P<0.05$)。

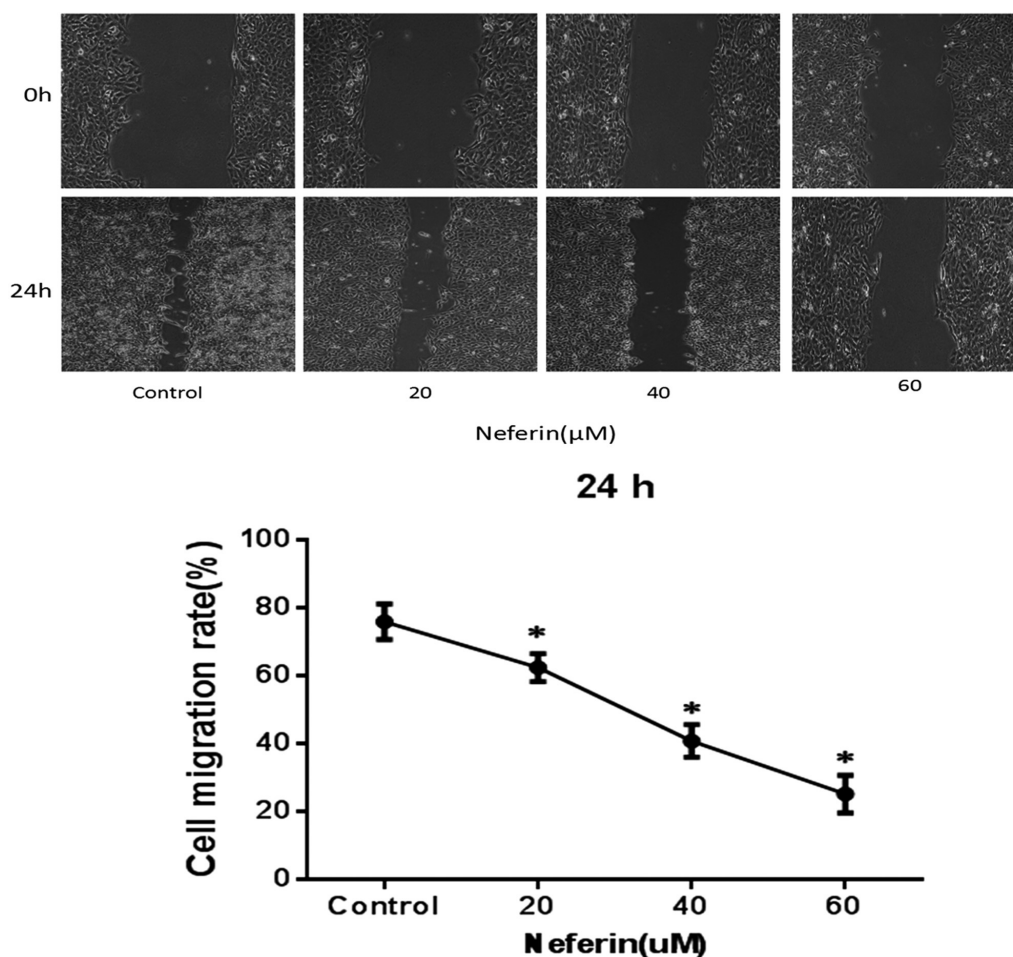


图2 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞迁移的抑制作用(* $P < 0.05$, 与对照组相比)

Fig.2 Inhibitory effect of neferine on the migration of osteosarcoma 143B cells (* $P < 0.05$, vs. control)

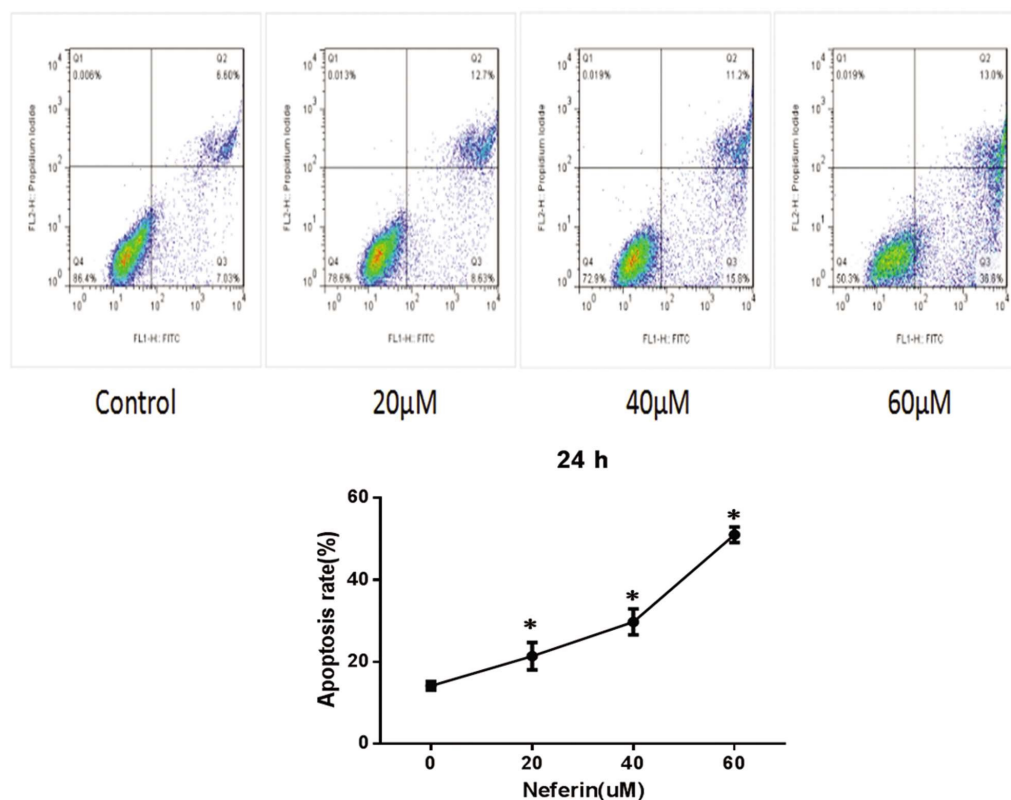


图3 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 凋亡率的影响(* $P < 0.05$, 与对照组相比)

Fig.3 Effect of neferine on the apoptotic rate of osteosarcoma 143B cells(* $P < 0.05$, vs. control)

2.4 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞周期的影响

流式细胞仪检测不同浓度甲基莲心碱(0, 20, 40, 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对骨肉瘤 143B 细胞周期分布的影响,见图 4,发现甲基莲心碱处理 24 h 之后, G_0/G_1 期比例显著升高, S 期细胞比例显著

下降, G_2/M 期比例降低,但变化不是很明显,说明甲基莲心碱可以导致骨肉瘤 143B 细胞 G_0/G_1 期阻滞,与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

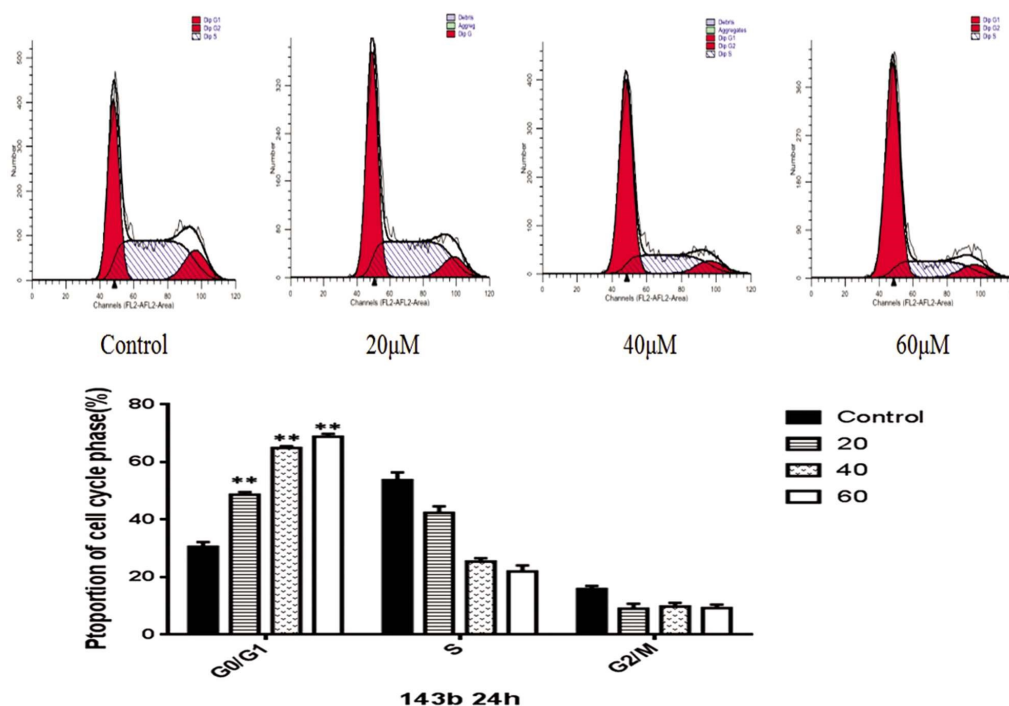


图 4 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞周期的阻滞效应(** $P < 0.01$, 与对照组比较)

Fig.4 Effect of Neferine on the cycle of osteosarcoma 143B Cell(** $P < 0.01$, vs. control)

2.5 甲基莲心碱诱导骨肉瘤 143B 细胞凋亡相关蛋白表达

应用 Western Blot 检测不同浓度甲基莲心碱(0, 20, 40, 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理骨肉瘤 143B 细胞 24 h 之后相关凋亡蛋白的表达情况, 骨肉瘤 143B 细胞中抑制凋亡蛋白 Bcl-2 水平逐渐下

降,促凋亡蛋白 Bax 水平逐渐上升,且表现为剂量依耐性,差异具有统计学意义,见图 5($P < 0.05$)。这一结果说明甲基莲心碱可能通过线粒体通路诱导骨肉瘤 143B 细胞凋亡。

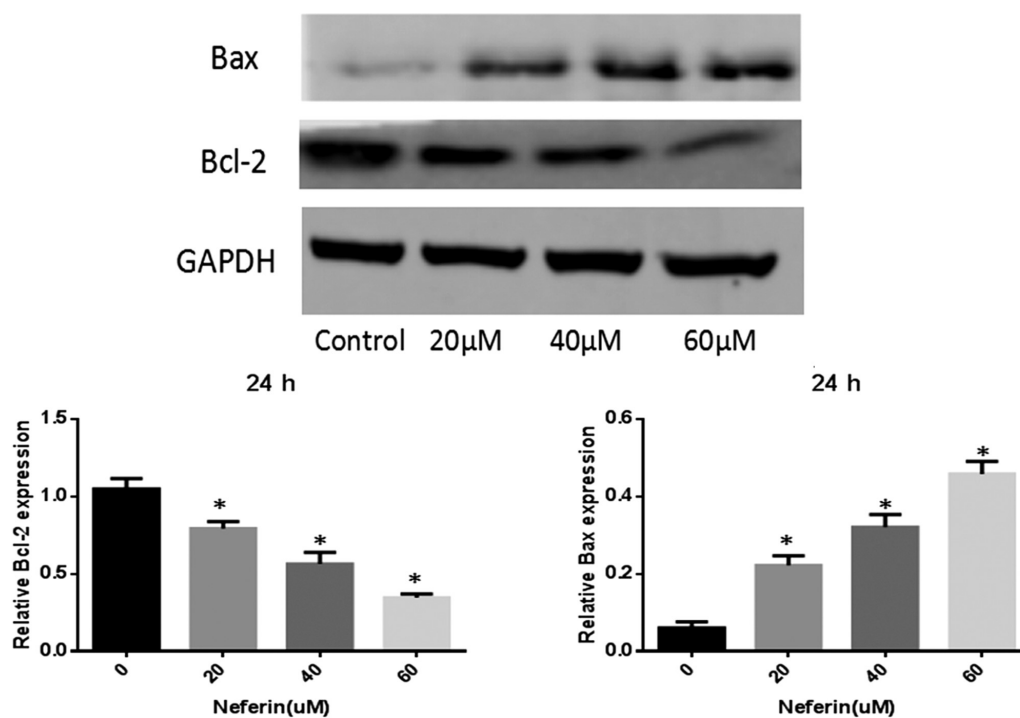


图 5 甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响(* $P < 0.05$, 与对照组比较)

Fig.5 Effects of neferine on the expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax in osteosarcoma 143B cells(* $P < 0.05$, vs. control)

3 讨论

骨肉瘤(OS)是间充质来源的骨质生成的具有侵袭性的肿瘤,其代表最常见的原发性骨恶性肿瘤^[9]。根据肿瘤的转移性分为非转移和转移性 OS。对于非转移性 OS,采用手术切除及辅助化疗后,患者的五年生存率可达 40%~75%;然而大约有 20% 的 OS 患者为转移性 OS,其具有局部浸润和远处转移的特点,因此尽管目前有许多现代疗法,包括化疗、放疗及综合手术治疗等在临床上普遍应用,但是骨肉瘤患者的致残率和死亡率仍较高^[10,11]。一方面,常规的放化疗易带来严重的副作用且常常导致耐药性;另外,由于骨肉瘤早期生长迅速,易向其他组织浸润和转移,进行手术切除治疗后仍存在很大的复发几率;此外,骨肉瘤发病机制尚未明确,且其自身存在的高度异质性,这给靶向治疗带来很大难度^[12,13]。因此,寻找安全低毒且靶向性高的药物,大幅度提高患者的生存率,是治疗骨肉瘤的重大目标。目前,从天然植物当中提取的如紫杉醇、长春新碱等类似物已广泛应用于抗肿瘤的治疗,且疗效确切^[14]。

甲基莲心碱是从天然植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)种子的绿色胚芽及幼叶中提取出的一类双苄基异喹啉生物碱。传统的中医药认为莲子心具有清心安神、止血抗炎等功效^[15]。作为莲子心当中含量较高的生物碱单体,甲基莲心碱也具有广泛的生物活性,如降血压、保护神经、镇静抗炎、抗氧化等多种作用^[16]。近年来的研究表明,甲基莲心碱的抗癌效果显著,对肺癌、乳腺癌、包括骨肉瘤等均有显著的效果^[17,18]。由于不同肿瘤具有其特异性,甲基莲心碱对不同癌细胞的抑制机制也有所差异。有研究^[19]表明甲基莲心碱可有效抑制 A549 人肺癌上皮细胞的增殖,导致其凋亡,其机制可能为甲基莲心碱可抑制 PI3K / Akt / mTOR 信号通路,通过产生过量 ROS 致使细胞发生自噬介导凋亡。另有 Yoon^[20]等研究发现甲基莲心碱对肝癌细胞 Hep3B 细胞具有毒性作用,但对人正常肝细胞无细胞毒性,探究其抗肝癌细胞机制表明甲基莲心碱激活癌细胞内质网应激,阻滞细胞周期停滞于 G₁ 期,从而诱导 Hep3B 细胞凋亡。关于甲基莲心碱对骨肉瘤作用的研究也有报道,Zhang^[9]等的研究表明甲基莲心碱可有效抑制成骨肉瘤细胞 U2OS 细胞增殖,其作用机制可能为甲基莲心碱通过激活 p38 MAPK 信号通路上调 p21 蛋白阻滞癌细胞的 G₁ 期,从而诱导骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡。但该研究仅对甲基莲心碱诱导骨肉瘤细胞系 U2OS 凋亡的原因进行研究,未涉及其他细胞系,且仅对周期蛋白 p21 及周期相关通路进行的阐述,未完全阐明甲基莲心碱对其他凋亡通路的影响。因此,本研究对甲基莲心碱抗骨肉瘤 143B 细胞及其相关凋亡机制进一步探索。

本实验采用不同浓度的甲基莲心碱处理培养的骨肉瘤 143B 细胞系,通过 CCK8 法检测癌细胞增殖活性发现,甲基莲心碱在 48 h 呈浓度和时间依赖性阻滞骨肉瘤 143B 细胞增殖。细胞划痕实验结果表明,甲基莲心碱在 24 h 内可以显著降低骨肉瘤 143B 细胞迁移。流式凋亡结果表明,随着甲基莲心碱浓度的增高,凋亡率逐渐上升。流式周期结果表明,甲基莲心碱可以将骨肉瘤 143B 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,该期肿瘤细胞 RNA 和蛋白质合成代谢活跃,为 S 期 DNA 合成提供能量和物质基础,细胞周期阻滞于该期,肿瘤细胞合成 DNA 受阻,故细胞出

现凋亡。细胞凋亡受多种信号蛋白的调控,目前所熟知的凋亡通路包括死亡受体通路和线粒体凋亡通路,其中线粒体凋亡通路比较多见其诱导细胞凋亡主要依赖 Caspase 级联反应。线粒体通路诱导细胞凋亡主要包括以下几个方面:(1)线粒体膜通透性转换孔激活;(2)细胞色素 C 从线粒体基质释放入细胞质;(3)细胞色素 C 通过与 dATP 形成异源二聚体结合 Apaf-1;(4)Apaf-1 将前 Caspase-9 裂解成 Caspase-9,然后激活的 Caspase-9 裂解 Caspase-3 前体激活 Caspase-3,激活的 Caspase-3 诱导细胞凋亡效应。其中细胞色素 C 的释放依赖 Bcl-2 和 Bax 的相互调节,Bcl-2 和 Bax 定位于线粒体膜上,二者调节失衡可激活线粒体通透性转换孔,改变线粒体膜通透性,从而导致细胞色素 C 的释放,诱导凋亡反应^[21]。Poornima^[23]等研究发现甲基莲心碱可以以剂量依赖性方式对肝癌细胞 HepG2 发挥细胞毒性作用,其具体机制可能是线粒体介导的 ROS 的产生及线粒体相关凋亡蛋白的表达。为了进一步研究甲基莲心碱抗骨肉瘤 143B 细胞的可能作用机制,我们分析了线粒体凋亡相关蛋白的表达,通过 Western Blot 检测发现甲基莲心碱可上调 Bax 的表达,下调 Bcl-2 的表达。这一结果表明甲基莲心碱可诱导线粒体凋亡相关蛋白的表达,从而发挥抗肿瘤特性,这也符合 Poornima^[23]等研究结果。

综上所述,甲基莲心碱可以抑制骨肉瘤 143B 细胞凋亡,阻碍其迁移,诱导骨肉瘤 143B 细胞凋亡,周期阻滞于 G₀/G₁ 期,产生凋亡的机制可能是通过激活线粒体凋亡相关蛋白的表达。总之,我们的研究表明,甲基莲心碱可呈浓度和时间依赖性诱导骨肉瘤 143B 细胞凋亡,为甲基莲心碱的临床用药提供参考,但本文的局限性在于未对甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 细胞周期阻滞的相关机制进行研究,及其在动物体内的相关抗肿瘤特性。在后续研究中,我们将进一步研究甲基莲心碱对骨肉瘤 143B 周期阻滞的相关机制,及其在动物体内的抗肿瘤特性。

参考文献(References)

- [1] Fletcher C D M. WHO classification of tumours of soft tissue and bone [M]. IARC Press, 2013, 46(2): 95-104
- [2] Isakoff M S, Bielack S S, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27): 3029-3035
- [3] Bielack S S, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: An analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols[J]. Clin. Oncol, 2002, 20: 776-790
- [4] Allison D C, Carney S C, Ahlmann E R, et al. A Meta-Analysis of Osteosarcoma Outcomes in the Modern Medical Era[J]. Sarcoma, 2012, 2012(4): 704872
- [5] Savage S A, Mirabello L. Using Epidemiology and Genomics to Understand Osteosarcoma Etiology [J]. Sarcoma, 2011, 2011 (1357-714X): 548151
- [6] Mirabello L, Troisi R S. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program[J]. Cancer, 2009, 115(7): 1531-1543
- [7] 李琴,商晶.甲基莲心碱的药理作用研究进展[J].海峡药学, 2012, 24 (1): 37-39
- Li Qin, Shang Jin. Research of pharmacological action of neferine in

- advances[J]. Strait Pharmaceutical, 2012, 24(1): 37-39
- [8] 李娜,宋金春.莲生物碱抗肿瘤研究进展[J].中国药师, 2016, 19(11): 2141-2143
- Li Na, Song Jin-chun. Anti-tumor research progress of alkaloids in lotus[J]. Chinese Pharmacist, 2016, 19(11): 2141-2143
- [9] Zhang X, Liu Z, Xu B, et al. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization[J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 677(1-3): 47
- [10] Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, et al. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future Perspectives[J]. Biomedicines, 2018, 6(1): 19
- [11] He H, Ni J, Huang J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review)[J]. Oncology Letters, 2014, 7(5): 1352
- [12] Raimondi L, De A L, Costa V, et al. Circulating biomarkers in osteosarcoma: new translational tools for diagnosis and treatment[J]. Oncotarget, 2017, 8(59): 100831
- [13] Aljubran A H, Griffin A, Pintilie M, et al. Osteosarcoma in adolescents and adults: survival analysis with and without lung metastases [J]. Annals of Oncology, 2009, 20(6): 1136-1141
- [14] 陈健,孙伟,华莹奇,等.常见骨原发肿瘤研究新进展[J].中国骨与关节杂志, 2018, (1)
- Chen Jian, Sun Wei, Hua Ying-qi, et al. New advances in common primary bone tumor research [J]. Chinese Journal of Bone and Joint, 2018, (1)
- [15] 曹丽荣,王鸿梅,李军.植物来源抗肿瘤药物药理机制、不良反应与临床应用[J].药学研究, 2013, 32(9): 539-542
- Cao Li-rong, Wang Hong-mei, Li Jun. Pharmacological mechanism, adverse reactions and clinical application of antitumor drugs derived from plants[J]. Pharmaceutical research, 2013, 32(9): 539-542
- [16] 李希珍.莲子心化学成分及生物活性的研究[D].吉林大学, 2016
- Li Xi-zhen. Study on chemical composition and biological activity of lotus seed[D]. Jilin University, 2016
- [17] 孟雪莲,李超,王妹,等.双苄基异喹啉类生物碱的药理活性研究进展[J].辽宁大学学报(自然科学版), 2016, 43(3): 243-247
- Meng Xue-lian, Li Chao, Wang Shu, et al. Advances in research on pharmacological activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids[J]. Journal of Liaoning University (Natural Science Edition), 2016, 43(3): 243-247
- [18] Kadioglu O, Byk L, Swf M, et al. Mode of Action Analyses of Neferine, a Bisbenzylisoquinoline Alkaloid of Lotus (Nelumbo nucifera) against Multidrug-Resistant Tumor Cells[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 238
- [19] Jung H A, Jin S E, Ran J C, et al. Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1[J]. Life Sciences, 2010, 87(14): 420-430
- [20] Poornima P, Weng C F, Padma V V. Neferine from Nelumbo nucifera, induces autophagy through the inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and ROS hyper generation in A549 cells[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3598-3605
- [21] Yoon J S, Kim H M, Yadunandam A K, et al. Neferine isolated from Nelumbo nucifera enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response [J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2013, 20(11): 1013
- [22] Wei Z, Li H H. IGFBP-3 may trigger osteoarthritis by inducing apoptosis of chondrocytes through Nur77 translocation [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(12): 15599
- [23] Poornima P, Quency R S, Padma V V. Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells[J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 659-667

(上接第 3606 页)

- [26] Li, Hongmei, Lisa, et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9 [J]. Stem Cell Reports, 2015, 4(1): 143
- [27] Maruyama T, Dougan S K, Truttmann M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 538
- [28] Chu V T, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 543
- [29] Yu C, Liu Y, Ma T, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2015, 16(2): 142
- [30] Shawlot W, Deng J M, Fohn L E, et al. Restricted beta-galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the beta-actin locus and embryonic lethality of beta-actin mutant mice[J]. Transgenic Research, 1998, 7(2): 95
- [31] Shmerling D, Danzer C P, Mao X, et al. Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the beta-actin locus by Cre/lox cassette replacement[J]. Genesis, 2005, 42(4): 229
- [32] Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, et al. A Highlights from MBoC Selection: β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool [J]. Molecular Biology of the Cell, 2011, 22(21): 4047-4058
- [33] Tomasek J J, Haaksma C J, Schwartz R J, et al. Whole animal knock-out of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition[J]. Wound Repair and Regeneration, 2013, 21(1): 166
- [34] Perrin B J, Sonnemann K J, Ervasti J M. β -Actin and γ -Actin Are Each Dispensable for Auditory Hair Cell Development But Required for Stereocilia Maintenance[J]. Plos Genetics, 2010, 6(10): e1001158