

氧化苦参碱对骨肉瘤 U2OS 细胞增殖的抑制作用及其机制研究

刘伟坤¹ 虞荣昌¹ 杨锐¹ 张恒¹

[摘要] 目的:在分子生物学水平上探讨氧化苦参碱(Oxymatrine, OMT)对骨肉瘤 U2OS 细胞的生长抑制作用和潜在的作用机制。方法:体外培养骨肉瘤 U2OS 细胞,用不同浓度梯度的氧化苦参碱处理细胞,光学显微镜观察骨肉瘤细胞形态的变化;四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测不同浓度氧化苦参碱对 U2OS 细胞增殖的影响;Annexin V-FITC/PI 荧光双标流式细胞仪分析 OMT 处理后的 U2OS 细胞周期阻滞和凋亡的变化;RT-PCR 方法分析凋亡相关分子(p53, bax, Bcl-2)mRNA 的表达水平。结果:MTT 法结果表明氧化苦参碱能够抑制 U2OS 细胞的增殖并呈剂量依赖性;光学显微镜下观察到氧化苦参碱处理后的 U2OS 细胞具有凋亡特征的形态学变化;流式细胞仪检测结果表明氧化苦参碱处理 48 h 后,细胞凋亡率与药物浓度呈正相关;氧化苦参碱还能够诱导细胞周期阻滞于 G0/G1 期,并呈现剂量依赖性;RT-PCR 检测结果表明氧化苦参碱处理后,U2OS 细胞中 p53 mRNA 和 bax mRNA 的表达水平明显上升,Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降,并呈现一定的剂量依赖关系。结论:氧化苦参碱能够明显抑制骨肉瘤 U2OS 细胞的增殖,导致细胞周期阻滞并诱导细胞凋亡,具体分子机制可能和 p53, Bcl-2, bax 等凋亡调控基因相关。

[关键词] 氧化苦参碱;骨肉瘤;细胞增殖;细胞凋亡;细胞周期

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)02-0005-06

Inhibitory Effect of Oxymatrine on the Proliferation of Osteosarcoma U2OS Cell and Its Mechanism

LIU Weikun¹ YU Rongchang¹ YANG Rui¹ ZHANG Heng¹

¹Department of Orthopaedics, People's Hospital of Dongxihu District, Wuhan 430040, China.

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect of oxymatrine (OMT) on the growth of osteosarcoma U2OS cell and its potential mechanism. **Methods:** U2OS cell of osteosarcoma was cultured in vitro and treated with oxymatrine at different concentrations. The morphological change of osteosarcoma cell was observed under light microscope. The effect of oxymatrine on U2OS cell proliferation was examined by MTT assay. The flow cytometry using Annexin V-FITC/PI staining was employed to measure the cell cycle and cell apoptosis of U2OS. RT-PCR was used to detect mRNA expression levels of p53, bax and Bcl-2. **Results:** MTT assay showed that oxymatrine could inhibit the proliferation of U2OS cell in a dose-dependent manner. The morphological change of apoptosis in U2OS cell treated with oxymatrine was observed under light microscope. The result of flow cytometry showed that there was a positive correlation between the apoptosis rate and the concentration of oxymatrine after 48 h treatment. Oxymatrine also induced cell cycle arrest at G0/G1 phase, and it was concentration-dependent. The result of RT-PCR showed that the expression of p53 mRNA and bax mRNA in U2OS cell increased obviously, while the expression of Bcl-2 mRNA decreased obviously, and there was a dose-dependent relationship after oxymatrine treatment. **Conclusion:** Oxymatrine can inhibit the proliferation of osteosarcoma U2OS cell through induction of cell cycle arrest and apoptosis. The detailed molecular mechanism may be related to p53, Bcl-2, bax and other apoptosis-regulating genes.

Keywords: oxymatrine; osteosarcoma; cell proliferation; apoptosis; cell cycle

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的骨恶性肿瘤,其发病率高,较早发生远处转移。尽管目前采用手术联合新

¹ 武汉市东西湖区人民医院骨科(武汉,430040)

辅助化疗将患者的5年生存率提高至60%~70%,但仍有部分患者疗效不佳,其复发和远处转移率高达30%~40%^[1,2]。目前,临床化疗药物可供选择的种类有限,并且大部分患者存在一定的化疗耐药性。临床实践证明,中医药在骨肉瘤的综合治疗中发挥着重要的作用,单独运用中药或联合运用中药复方治疗骨肉瘤的临床疗效较好,还能够降低放化疗引起的毒副反应。现代医学证实,大部分中药能够干扰肿瘤细胞增殖、代谢和生长等,并诱导肿瘤细胞凋亡。氧化苦参碱(Oxymatrine, OMT)是从我国传统中草药苦豆子中提取分离的活性成分生物碱,现代中药药理学研究显示氧化苦参碱具备抗肿瘤作用^[3,4]。本研究探讨氧化苦参碱对骨肉瘤细胞U2OS的增殖抑制作用和潜在的作用机制,为氧化苦参碱的深入研究和药物开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

骨肉瘤U2OS细胞株购买自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 主要试剂与药品

氧化苦参碱(含量≥99%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号16837-52-8),MTT粉(Sigma公司,美国),SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit(Takara公司,日本),Trizol Reagent(Invitrogen公司,美国),细胞周期染液(上海吉凯基因化学技术有限公司),小牛血清(江苏恩莫阿赛生物技术有限公司),流式细胞凋亡试剂盒及流式细胞周期试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司),PCR引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.3 主要仪器设备

ABI Prism 7000实时定量PCR仪(ABI公司,美国),CKX31倒置显微镜(Olympus公司,日本),Eppendorf AG PCR仪(Eppendorf公司,德国),FACS-Calibur流式细胞仪(BD公司,美国)。

1.4 方法

1.4.1 U2OS细胞培养 U2OS细胞使用RPMI 1640培养液,加入10%小牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,于37℃ 5% CO₂培养箱中培养,每2~3 d常规传代。

1.4.2 氧化苦参碱工作液的配制 配制不同浓度梯度的氧化苦参碱溶液(1,2,4,8,16 mg/mL),灭菌后于4℃冰箱中保存备用。

1.5 实验分组

空白组仅用RPMI1640培养液处理,不加细胞和氧化苦参碱。对照组加用RPMI1640培养液和U2OS细胞,不加氧化苦参碱。给药组(实验组)在RPMI 1640培养液和U2OS细胞基础上加不同浓度的氧化

苦参碱分别为1,2,4,8,16 mg/mL。

1.6 细胞形态的观察

将U2OS接种在培养瓶中,细胞贴壁融合至约50%时,采用光学显微镜观察细胞的形态变化,放大倍率为100倍和400倍,拍照记录。

1.6.1 MTT法观察各组对U2OS细胞增殖的影响

根据氧化苦参碱浓度1,2,4,8,16 mg/mL,将调整好的U2OS细胞按2 000个/100 μL/孔接种于96孔板,每个浓度值设置5个复孔,设空白对照孔。三块96孔板分别继续培养24,48,72 h,每孔加入MTT溶液20 μL(5 mg/mL),继续孵育4 h后,每孔加入100 μL DMSO,充分振荡使结晶完全溶解。预热酶标仪后测量并记录每孔在OD 570 nm处的吸光度值。按下列公式计算各组细胞生长抑制率,细胞生长抑制率=[1-(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值)]×100%。

1.6.2 流式细胞仪(FCM)观察早期细胞凋亡率 用不含有EDTA的胰酶消化U2OS细胞后计数1×10⁶个细胞,用预冷的PBS洗涤悬液,按1 500 r/min离心5 min后弃上清,100 μL Annexin V重悬。避光条件下加入5 μL Fluro488和1 μL PI工作液,室温下孵育15 min。加入400 μL Annexin V,轻柔混匀。1 h内用流式细胞仪检测细胞早期凋亡情况。

1.6.3 采用流式细胞仪检测细胞周期分布情况 收集细胞后用1 mL PBS溶液在室温下重悬。用-20℃预冷的4 mL 70%乙醇溶液振匀后-20℃下静置过夜。1 500 r/min离心5 min后弃乙醇,5 mL PBS室温下重悬,水化15 min。1 500 r/min离心5 min,弃上清,避光条件下加入1 mL DNA标记液,室温下孵育30 min。1 h内用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.6.4 RT-PCR检测p53,bax,Bcl-2基因mRNA表达 按Trizol法提取细胞总RNA,采用逆转录反应和PCR反应,基因PCR反应条件如表1所示。100 bp梯度的DNA标记液作为标准参照,PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶110 V电泳,采用凝胶图像分析系统成像并分析。

1.7 统计学方法

所有数据均采用SPSS 16.0软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化苦参碱处理对U2OS细胞增殖的抑制作用

氧化苦参碱处理后U2OS细胞的增殖受到显著抑制,随着氧化苦参碱浓度的增高,其生长抑制作用更显著。尤其在氧化苦参碱作用48 h后,各浓度组增殖

抑制率显著强于 24 h 和 72 h 两个时间点(见图 1-2 及表 2)。结果显示氧化苦参碱抗骨肉瘤 U2OS 细胞增殖呈浓度依赖性,选取氧化苦参碱溶液不同浓度 1,4,16 mg/mL 进行后续实验。

表 1 PCR 引物序列及反应条件

基因名称	引物序列	产物长度/bp	反应条件
β-actin	上游:5'-AACAAGATGAGATTGGCA-3'	251	94 ℃ for 30 s,55 ℃ for 30 s,72 ℃ for 30 s,25 个循环
	下游:5'-AGTGGGGTGGCTTTTAGGAT-3'		
p53	上游:5'-GAAACTACTTCCTGAAAACAACGT-3'	455	94 ℃ for 30 s,56 ℃ for 30 s,72 ℃ for 30 s,30 个循环
	下游:5'-GCCTCACAACCTCCGTCAT-3'		
bax	上游:5'-TTCTGACGGCAACTTCAACTG-3'	188	94 ℃ for 30s,58 ℃ for 30s,72 ℃ for 30 s,35 个循环
	下游:5'-TGAGGAGTCTCACCCAACCA-3'		
Bcl-2	上游:5'-GACGCTTTGCCACGGTGGTG-3'	356	94 ℃ for 30s,65 ℃ for 30 s,72 ℃ for 30 s,35 个循环
	下游:5'-GGGCGAGGCATGTTGACTTCAC-3'		

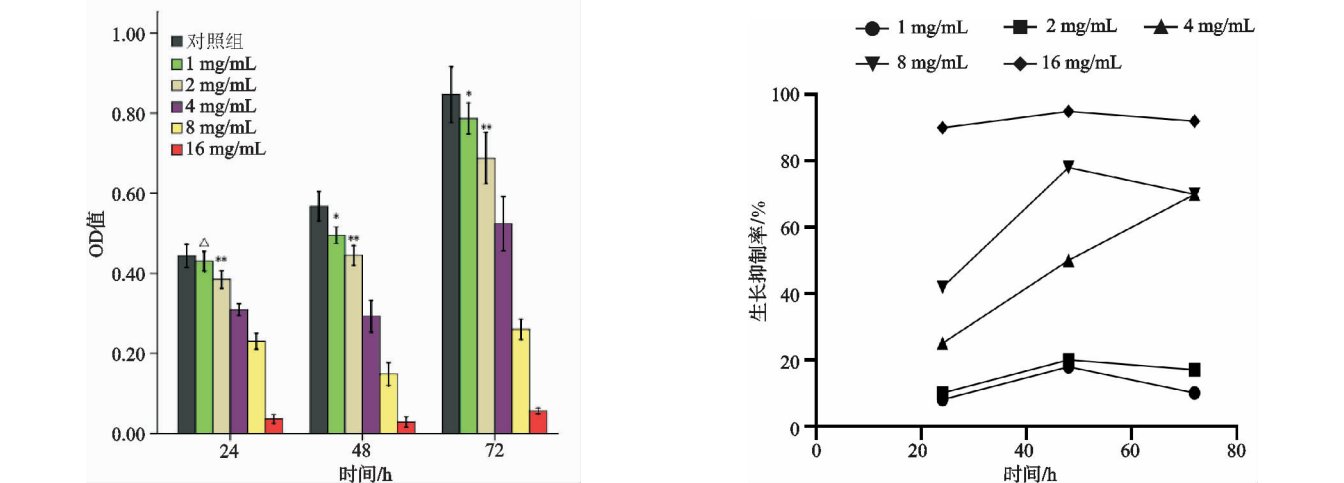


图 1 不同浓度氧化苦参碱处理 24,48,72 h 后对 U2OS 细胞增殖的影响(* 与对照组比较, $P<0.05$; ** 与对照组比较, $P<0.01$;△与对照组比较, $P>0.05$)

图 2 氧化苦参碱处理 U2OS 细胞后的量效反应曲线

表 2 不同浓度氧化苦参碱处理 24,48,72 h 后对 U2OS 细胞增殖的影响

分组	24 h		48 h		72 h	
	OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%
对照组	0.443±0.021	—	0.567±0.021	—	0.846±0.021	—
1 mg/mL	0.430±0.025	2.5	0.495±0.021 ¹⁾	12.9	0.786±0.021 ¹⁾	7.0
2 mg/mL	0.385±0.021 ²⁾	12.9 ²⁾	0.445±0.021 ²⁾	21.9 ²⁾	0.687±0.021 ²⁾	18.9 ¹⁾
4 mg/mL	0.308±0.013 ²⁾	30.2 ²⁾	0.292±0.021 ²⁾	49.3 ²⁾	0.523±0.021 ²⁾	38.5 ²⁾
8 mg/mL	0.230±0.021 ²⁾	48.1 ²⁾	0.148±0.021 ²⁾	75.2 ²⁾	0.260±0.021 ²⁾	69.9 ²⁾
16 mg/mL	0.036±0.021 ²⁾	92.3 ²⁾	0.028±0.021	96.7 ²⁾	0.056±0.021 ²⁾	94.3 ²⁾
空白组	0.003±0.002	—	0.011±0.004	—	0.009±0.005	—

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与对照组比较, $P<0.01$ 。

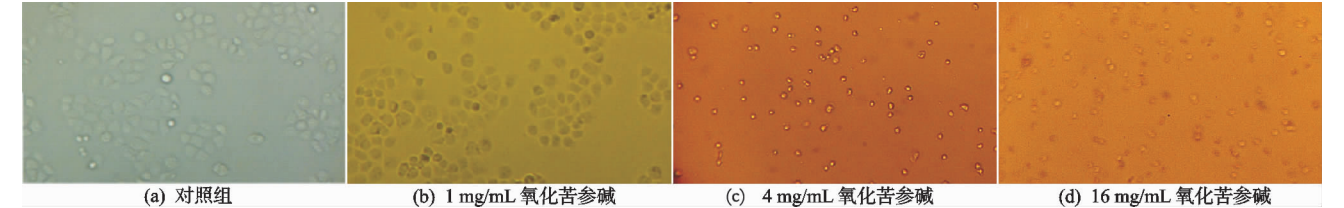
2.2 氧化苦参碱处理对 U2OS 细胞形态学变化的影响

对照组 U2OS 梭形细胞贴壁生长,不同浓度梯度的氧化苦参碱处理细胞 48 h 后,其形态发生明显改变,细胞大小不一,出现不规则细胞轮廓,在 16 mg/mL 氧化苦参碱组中 U2OS 细胞出现整体萎缩变圆、

细胞折光能力下降等典型的细胞凋亡形态改变(见图 3)。

2.3 氧化苦参碱处理对 U2OS 细胞凋亡的影响

氧化苦参碱作用后,各组 U2OS 细胞凋亡数量和凋亡率显著增加,凋亡率与氧化苦参碱浓度正相关,呈现浓度依赖性(见图 4 及表 3)。



(a) 对照组 (b) 1 mg/mL 氧化苦参碱 (c) 4 mg/mL 氧化苦参碱 (d) 16 mg/mL 氧化苦参碱

图 3 氧化苦参碱对 U2OS 细胞处理 48 h 后细胞形态学变化(100×)

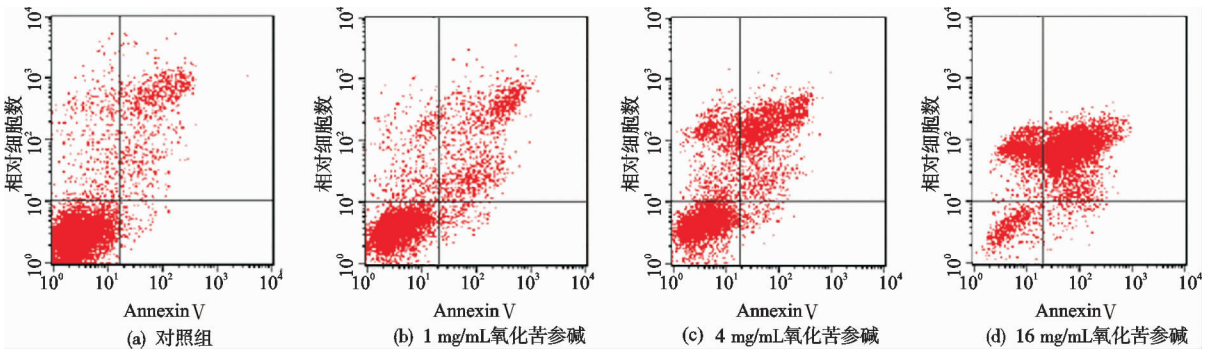


图 4 氧化苦参碱处理 48 h 后流式细胞仪检测的 U2OS 细胞的凋亡情况
表 3 氧化苦参碱处理 48 h 后 U2OS 细胞的凋亡情况($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	坏死细胞	晚期凋亡细胞	存活细胞	早期凋亡细胞
对照组	4.91±1.01	9.77±1.72	84.31±3.04	1.02±0.11
1 mg/mL	6.22±1.25	18.03±1.87 ¹⁾	73.35±2.56 ¹⁾	2.41±0.14 ¹⁾
4 mg/mL	13.38±1.43	27.93±2.01 ²⁾	56.95±2.11 ²⁾	1.74±0.13 ¹⁾
16 mg/mL	17.71±1.88	72.68±3.26 ²⁾	7.91±1.07 ²⁾	1.70±0.09 ¹⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与对照组比较, $P<0.01$.

2.4 氧化苦参碱处理对 U2OS 细胞周期的影响

随着氧化苦参碱处理浓度的增加,U2OS 细胞大部分被阻滞于 G0/G1 期,S 期和 G2/M 期的细胞数量逐渐减少。氧化苦参碱能够影响细胞周期,并呈现浓

度依赖性(见图 5 及表 4)。

氧化苦参碱可改变细胞的周期分布,随着药物浓度的增高,细胞生长更多被阻滞于 G0/G1 期,同样呈现剂量依赖关系。

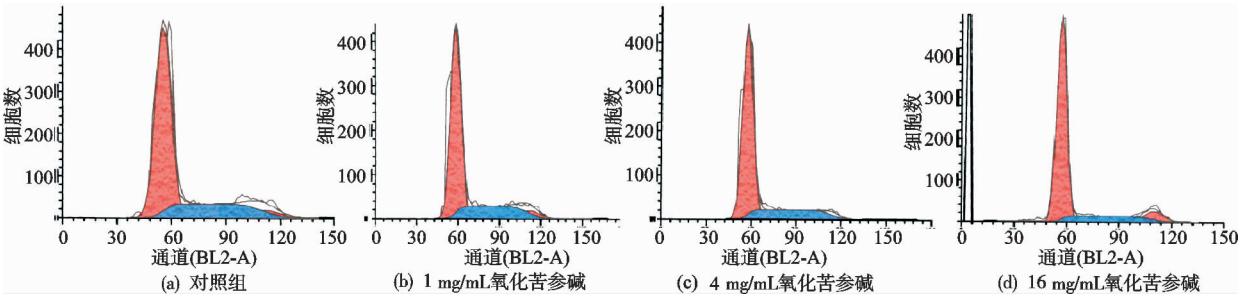


图 5 氧化苦参碱处理对 U2OS 细胞周期的影响
表 4 氧化苦参碱对 U2OS 细胞细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	62.46±4.28	27.52±3.35	10.02±2.21
1 mg/mL	67.02±6.23	24.12±4.54	8.86±1.18
4 mg/mL	77.13±5.71 ¹⁾	16.79±3.09 ¹⁾	6.08±1.02 ¹⁾
16 mg/mL	88.77±5.31 ²⁾	8.10±2.26 ²⁾	3.13±1.21 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与对照组比较, $P<0.01$.

2.5 氧化苦参碱处理对凋亡相关分子 mRNA 表达的影响

氧化苦参碱作用 48 h 后,采用经光密度扫描分析 U2OS 细胞的 p53,Bcl-2,bax mRNA RT-PCR 产物条带,结果发现与对照组相比,氧化苦参碱各浓度组 p53/ β -actin,bax/ β -actin 光密度积分值之比明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),而 Bcl-2/ β -actin 光密度积分值之比显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$).因而推测氧化苦参碱能够增加 U2OS 细胞中 p53 及 bax mRNA 的表达水平并降低 Bcl-2 mRNA 的表达水平,呈现浓度依赖性,实验组与对照组相比,差

异有统计学意义($P<0.05$),见图 6 及表 5。

3 讨论

骨肉瘤是起源于间叶组织的原发性恶性骨肿瘤,其恶性程度较高,早期就可发生远处肺转移,大多出现在儿童和青少年期,给患者及其家庭带来沉重的负担。虽然骨肉瘤的治疗有手术、放疗、化疗、分子靶向治疗、生物治疗等多种方法,然而其生存率仍然不高^[5,6]。因此,寻找新的、经济的、有效的、低毒性的药物,对于骨肉瘤的治疗具有巨大意义。近年来,通过中草药及天然植物提取抗肿瘤药物已成为研究热点。现代药理学研究表明,中药抑制肿瘤生长的可能作用机理包括

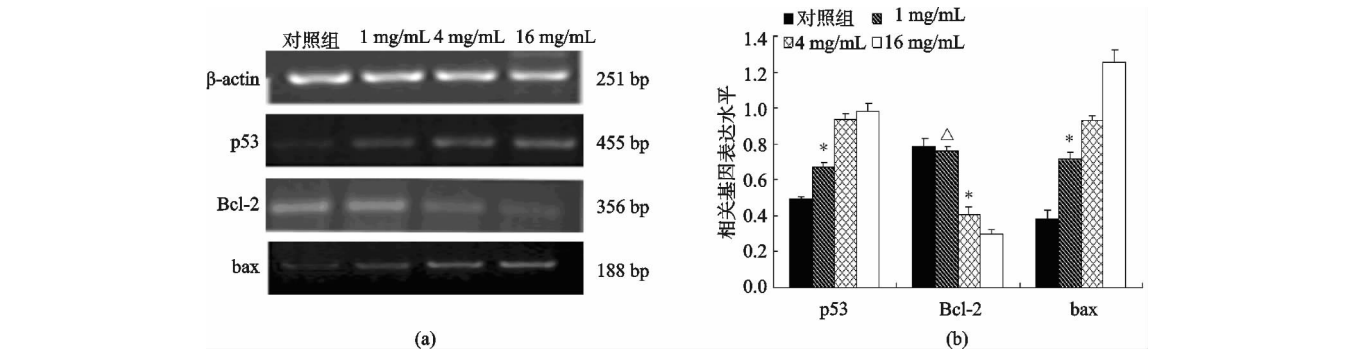


图 6 氧化苦参碱对 U2OS 细胞凋亡调控基因 p53、Bcl-2 及 bax mRNA 的影响
(a) 氧化苦参碱作用 48 h 后,以剂量依赖的方式上调 U2OS 细胞的 p53 和 bax mRNA 水平及下调 Bcl-2 mRNA 水平。(b) 各浓度氧化苦参碱组与对照组比较,差异均有统计学意义,氧化苦参碱各浓度组 p53/β-actin 和 bax/β-actin 光密度积分值之比明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 Bcl-2/β-actin 光密度积分值之比显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$) (* 与对照组比, $P < 0.05$; Δ 与对照组比, $P > 0.05$)

表 5 氧化苦参碱对 U2OS 细胞凋亡调控基因 p53、Bcl-2 及 bax mRNA 的影响(±s, %)			
组别	bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	p53/β-actin
对照组	0.49±0.09	0.78±0.13	0.37±0.07
1 mg/mL	0.66±0.11 ¹⁾	0.76±0.18	0.71±0.10 ²⁾
4 mg/mL	0.94±0.19 ²⁾	0.40±0.08 ²⁾	0.93±0.05 ²⁾
16 mg/mL	0.98±0.11 ²⁾	0.29±0.03 ²⁾	1.25±0.23 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与对照组比较, $P < 0.01$ 。

抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、促进细胞自噬、促进肿瘤细胞分化、抑制肿瘤细胞信号转导、逆转肿瘤多药耐药、增强机体免疫功能等^[7-9]。但是,针对中药药效物质的微观分析和作用规律的研究尚不充分,严重制约了中药的现代化研究进程。本研究通过采用氧化苦参碱处理骨肉瘤 U2OS 细胞株,探讨氧化苦参碱对 U2OS 细胞增殖的抑制作用和可能的分子作用机制,为氧化苦参碱的深入研究和药物开发提供理论依据。

氧化苦参碱是一类苦参碱-15-酮化合物,属于苦参性生物碱,提取自中草药苦豆子和苦参根^[10]。《本草纲目》记载:苦参性寒、味苦,无毒,主治黄疸、溺有余沥等,有补中明目、清热、祛风燥湿、解毒等功效^[11]。临床研究和现代药理学研究显示,氧化苦参碱能够抗肿瘤、抗哮喘、抗炎、抗溃疡、镇痛镇静和调节免疫功能等。其抗肿瘤作用主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、自噬和分化,抑制肿瘤细胞增殖和转移,抑制肿瘤细胞新生血管的生成,抑制端粒酶的活性,抑制肿瘤细胞的多药耐药性,提高机体免疫功能等^[12,13]。严小明等^[14]实验结果表明,给予苦参碱干预的 Saos-2 细胞活性呈时间依赖性和浓度依赖性下降,凋亡抑制蛋白 mRNA 和蛋白的表达水平及 STAT3 的活化水平呈浓度依赖性降低,说明苦参碱可以通过抑制 STAT3 磷酸化下调凋亡抑制蛋白的表达,从而抑制骨肉瘤 Saos-2 细胞的增殖。戴海龙等^[15]观察苦参碱和氧化苦参碱对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖凋亡及酪氨酸激酶(JAK)-信号转导及转录激活因子(STAT)通路的影响,结果显示

苦参碱和氧化苦参碱能显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖、促进其凋亡,其机制可能与下调 STAT3、STATS 的基因表达,抑制细胞信号转导通路有关。苦参碱和氧化苦参碱是苦参主要有效成分,苦参碱和氧化苦参碱在体外可抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡。两者在结构上的差异仅是氧化苦参碱的 1 位 N 上多了一个 O 原子,这增加了它的空间立体作用。两种苦参碱在一定程度上均与嘌呤碱的结构相似,可能竞争性抑制 DNA 的合成,可见苦参碱与氧化苦参碱的电子结构具有相似性和相异性,对生物受体的立体作用、轨道作用和电性作用相近而大小不同,相比而言氧化苦参碱的作用要强一些,其药理活性要大于苦参碱^[11,16]。由于两者化学结构不同,故在对肿瘤细胞的作用方面产生差异,除化学结构差异的影响外,是否还有其他原因目前尚未探明,还需进一步研究。

本实验采用 MTT 法发现氧化苦参碱能够显著抑制 U2OS 细胞增殖,随着药物浓度的增高,其抑制作用更明显,与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);然而,氧化苦参碱对 U2OS 细胞的抑制作用与药物处理的时间无正相关性,氧化苦参碱处理 48 h 的抑制率显著高于 24 h 和 72 h,分析其原因可能与氧化苦参碱体外稳定性不强,作用过程中氧化苦参碱部分分解或变性,有效成分相对减少有一定关系。因此,后续研究中应注意氧化苦参碱性质的不稳定性,不宜一次大量配制或储存,同时应注意避光。本研究通过流式细胞仪检测发现氧化苦参碱低浓度组的死亡率与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),而中高浓度组能

显著诱导细胞凋亡($P < 0.01$)。RT-PCR 检测 p53, bax 及 Bcl-2 mRNA 表达水平,结果显示氧化苦参碱处理 U2OS 细胞后,随着氧化苦参碱浓度的增加,U2OS 细胞 p53 和 bax mRNA RT-PCR 产物条带逐渐变亮,而 Bcl-2 mRNA RT-PCR 产物条带逐渐变暗,可见其上调 U2OS 细胞 p53 mRNA 表达和下调 Bcl-2 mRNA 表达呈浓度依赖性。因此笔者推测,随着氧化苦参碱浓度的增高,氧化苦参碱可能通过上调骨肉瘤 U2OS 细胞 p53 和 bax mRNA 的表达、下调 Bcl-2 mRNA 的表达来诱导肿瘤细胞凋亡。FCM 法对氧化苦参碱处理的 U2OS 细胞检测结果表明,氧化苦参碱呈剂量依赖性地影响 U2OS 细胞周期,随着剂量的增加,G0/G1 期细胞比例增加,细胞周期大部分阻滞在 DNA 合成期,而 S 期和 G2/M 期的细胞比例降低。

本研究初步探讨了氧化苦参碱对骨肉瘤 U2OS 细胞株增殖的抑制和凋亡诱导作用,然而其分子机制研究尚不深入,检测方法略显单一,后期仍需采用更多的方法研究氧化苦参碱对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响,并进一步完成体内试验以对氧化苦参碱的抗肿瘤效应及其安全性进行研究。此外,氧化苦参碱与其他药物的联合应用是否能够提高化疗药及分子靶向药的效用尚缺乏研究,因此有必要对氧化苦参碱与化疗药及分子靶向药联合应用抗肿瘤的作用及机制进行深入的探索。

参考文献

- [1] HARRISON D J, GELLER D S, GILL J D, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(1): 39-50.
- [2] BIAZZO A, DE PAOLIS M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma[J]. *Acta Orthop Belg*, 2016, 82(4): 690-698.
- [3] LU M L, XIANG X H, XIA S H. Potential signaling pathways involved in the clinical application of oxymatrine[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(7): 1104-1112.
- [4] 史艳平, 陈涛, 李丹, 等. 氧化苦参碱药理作用研究进展[J]. *陕西医学杂志*, 2018, 47(2): 271-273.
- [5] SIMPSON S, DUNNING M D, DE BROT S, et al. Com-

parative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics[J]. *Acta Vet Scand*, 2017, 59(1): 71-79.

- [6] ZHANG Y, YANG J, ZHAO N, et al. Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6228-6237.
- [7] LIAO Y H, LI C I, LIN C C, et al. Traditional Chinese medicine as adjunctive therapy improves the long-term survival of lung cancer patients[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(12): 2425-2435.
- [8] QI F, ZHAO L, ZHOU A, et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer[J]. *Biosci Trends*, 2015, 9(1): 16-34.
- [9] 江哲珍, 祝少博, 余黎, 等. 左旋含羞草碱诱导骨肉瘤细胞凋亡作用及机制的体外实验研究[J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2018, 15(2): 1-4.
- [10] LIU Y, XU Y, JI W, et al. Anti-tumor activities of matrine and oxymatrine: literature review[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5111-5119.
- [11] 吴琴, 高云. 氧化苦参碱药理作用的分子机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(6): 759-762.
- [12] HO J W, NGAN HON P L, CHIM W O. Effects of oxymatrine from Kushen on cancer cells[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009, 9(8): 823-826.
- [13] 熊旋, 李磊, 王庆才. 氧化苦参碱对肿瘤抑制作用的研究进展[J]. *海南医学*, 2018, 29(8): 1135-1138.
- [14] 严小明, 连福明, 林智勤, 等. 苦参碱通过下调 STAT3 信号通路抑制骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖的实验研究[J]. *西部医学*, 2015, 27(9): 1286-1289.
- [15] 戴海龙, 董成, 徐玲, 等. 氧化苦参碱和苦参碱通过调控酪氨酸激酶-信号转导及转录激活因子信号通路对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖凋亡的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(1): 61-64.
- [16] CALDWELL C C, TSCHOEP J, LENTSEH A B. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(3): 457-464.

(收稿日期: 2019-06-08)