

• 实验研究 •

黄连素通过基因调控对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

王峰¹ 刘国强¹ 潘浩¹ 季文辉^{1△}

[摘要] **目的:**探究黄连素通过长链非编码 RNA HNF1A-AS1 调控 miRNA-363 对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法:**将骨肉瘤细胞系 U2OS 分为对照组、黄连素组、黄连素+HNF1A-AS1 组和 HNF1A-AS1 组。黄连素+HNF1A-AS1 组和 HNF1A-AS1 组转染 pcDNA-HNF1A-AS1 质粒,黄连素组、黄连素+HNF1A-AS1 组在培养基中加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的黄连素。分别用 CCK-8、流式细胞仪和 Transwell 检测各组细胞增殖、凋亡和侵袭能力。通过双荧光素酶报告验证 HNF1A-AS1 与 miRNA-363 之间的靶向关系。**结果:**与对照组比较,黄连素组的 HNF1A-AS1 表达水平明显降低,miRNA-363 表达水平显著升高,细胞增殖和侵袭能力显著降低,细胞凋亡率明显上升($P<0.05$);HNF1A-AS1 组细胞内 HNF1A-AS1 表达水平、细胞增殖和侵袭能力显著升高,细胞凋亡率和 miRNA-363 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。黄连素+HNF1A-AS1 组细胞内 HNF1A-AS1 表达水平、细胞增殖和侵袭能力显著低于 HNF1A-AS1 组而高于黄连素组,细胞凋亡率和 miRNA-363 表达水平显著高于 HNF1A-AS1 组而低于黄连素组,差异有统计学意义($P<0.05$)。双荧光素酶报告实验证实 HNF1A-AS1 可以直接靶向调控 miRNA-363。**结论:**黄连素可以通过抑制 HNF1A-AS1 上调 miRNA-363 的表达,从而抑制 OS 细胞的增殖、侵袭和促进凋亡。

[关键词] 黄连素;骨肉瘤;增殖;侵袭

[中图分类号] R738.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)05-0016-05

Effects of Berberine on the Proliferation, Apoptosis and Invasion of Osteosarcoma Cells through Gene Regulation

WANG Feng¹ LIU Guoqiang¹ PAN Hao¹ JI Wenhui^{1△}

¹ Department of Orthopedics and Joint Surgery, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061000, Hebei China.

Abstract Objective: To explore the efficacy of berberine on cell proliferation, apoptosis and invasion of osteosarcoma (OS) cells by regulating miRNA-363 through LncRNA HNF1A-AS1. **Methods:** OS cell line U2OS was divided into NC group, Ber group, Ber+HNF1A-AS1 group and HNF1A-AS1 group. PcDNA-HNF1A-AS1 plasmid was transfected into Ber+HNF1A-AS1 group and HNF1A-AS1 group. Ber and Ber+HNF1A-AS1 groups were added into the medium with Ber with a final concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$. CCK-8, flow cytometry and Transwell were used to detect the proliferation, apoptosis and invasion of each group. The targeted relationship between HNF1A-AS1 and miRNA-363 was verified by dual-luciferase report. **Results:** Compared with the NC group, the expression level of HNF1A-AS1 in Ber group was significantly decreased, the expression level of miRNA-363 was significantly increased, cell proliferation and invasion ability were significantly decreased, and cell apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$). In the HNF1A-AS1 group, HNF1A-AS1 expression level, cell proliferation and invasion ability were significantly increased, while cell apoptosis rate and miRNA-363 expression level were significantly decreased ($P<0.05$). In Ber+HNF1A-AS1 group, the HNF1A-AS1 expression level, cell proliferation and invasion ability of HNF1A-AS1 group were significantly lower than those of HNF1A-AS1 group and higher than those of Ber group. The cell apoptosis rate and expression level of miRNA-363 were significantly

higher than those of HNF1A-AS1 group and lower than those of Ber group ($P<0.05$). Double luciferase reporting experiments confirmed that HNF1A-AS1 could directly target miRNA-363. **Conclusion:** Ber can inhibit the proliferation,

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2015296)

¹ 河北沧州中西医结合医院骨关节外科(河北 沧州, 061000)

[△]通信作者 E-mail: wangfeng5782@163.com

invasion and promote apoptosis of OS cells by inhibiting HNF1A-AS1 to up-regulate the expression of miRNA-363.

Keywords: berberine; osteosarcoma; proliferation; invasion

骨肉瘤(OS)是一种起源于间充质细胞的恶性肿瘤^[1]。近些年患者的发病率明显降低,然而病人会出现不同程度的远处转移和复发,因此深入探讨骨肉瘤的发病机制至关重要。微小 RNA 是一类非编码 RNA,可以诱导信使 RNA 的降解和翻译、抑制、调节促癌基因或者抑癌基因的表达,研究表明 miRNA-363 具有抑制骨肉瘤的作用^[2],有文献报道 HNF1A-AS1 可以通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进骨肉瘤的增殖和转移^[3],HNF1A-AS1 可以通过靶向调控 miRNA 实现其促癌作用^[4]。黄连素为一种异喹啉类生物碱,能够调节炎症反应和淋巴免疫等,具有抗肿瘤作用,如黄连素可以在体外抑制肝癌的增殖和转移^[5]。然而有关黄连素与骨肉瘤之间的关系尚不明了,因此本研究主要分析黄连素通过 LncRNA HNF1A-AS1 调控 miRNA-363 对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养、分组和干预方法

将培养在 DMEM 中(37 °C, 5% CO₂)的处于生长期的 U2OS 细胞分为对照组、黄连素组、黄连素 + HNF1A-AS1 组和 HNF1A-AS1 组。黄连素 + HNF1A-AS1 组和 HNF1A-AS1 组转染 HNF1A-AS1 pcDNA 3.1 质粒,根据制造商的说明转染细胞,以感染复数(MOI)为 10 的比例加入细胞和质粒载体,在 24 h 后收集细胞用于后续实验。根据文献^[5],黄连素组、黄连素 + HNF1A-AS1 组在培养基中加入终浓度为 100 μ mol/L 的黄连素,培养 48 h。

1.2 主要材料和仪器

人 OS 细胞系 U2OS(ATCC 公司,美国);DMEM 培养基(Invitrogen 公司,美国);HNF1A-AS1 过表达质粒以及相应的阴性对照(Negative Control, NC)(Thermo Fisher 公司,美国);Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国);PCR 引物由 Genewiz 公司(中国)设计和合成;Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国);逆转录 cDNA 试剂盒和 SYBR Green PCR Master Mix qPCR 试剂盒(Roche 公司,瑞士);MiScript 试剂盒和 MiScript SYBR-Green PCR 试剂盒(QIAGEN 公司,德国);细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8,CCK-8)试剂盒和结晶紫染色试剂盒(Beyotime 生物技术研究,中国);凋亡检测试剂盒和 FACSCalibur™ 流式细胞仪(BD Biosciences 公司,美国);Transwell 小室(Becton Dickinson 公司,美国);光学显微镜(奥林巴斯公司,日本);pMIR-REPORT 荧光素酶载体(Thermo Fisher Scientific,美

国)和分析系统(Promega,美国);双荧光霉素报告基因分析系统(Promega 公司,美国)。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 qPCR 检测 HNF1A-AS1 水平 通过 Trizol 获得细胞中总 RNA 并检测浓度和纯度。使用 cDNA 试剂盒将 1 μ g RNA 逆转录合成 cDNA(42 °C 下 60 min,70 °C 下 5 min,然后 4 °C 保存)。使用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 qPCR 实验(在 95 °C 下 10 min,40 个循环,94 °C 下 15 s,60 °C/1 min,60 °C 下 1 min,4 °C 保存)。以 GAPDH 为内参,通过比较循环阈值分析 HNF1A-AS1 的表达。

1.3.2 CCK-8 检测增殖 将 100 μ L 含有 1×10^4 个细胞的细胞溶液接种于 96 孔板,在培养第 48 h 加入 10 μ L CCK-8 试剂并在 37 °C 下孵育 10 min,检测通过酶标仪 450 nm 处的吸光度(OD)值。

1.3.3 流式细胞术检测凋亡 将 1×10^6 个细胞使用不含 EDTA 的 0.25%胰酶消化,然后分别用预冷的 PBS 和 5%牛血清白蛋白洗涤 3 次,离心收集细胞(2 000 r/min),加入 100 μ L 结合缓冲液和 5 μ L 的 Annexin-V-FITC(20 μ g/mL)静置 15 min 在黑暗中孵化,然后加入 150 μ L 结合缓冲液和 10 μ L 的 PI(50 μ g/mL)静置 15 min 在黑暗中孵化,通过 FACS-Canto II 流式细胞仪测量凋亡率。

1.3.4 Transwell 检测侵袭 在 Transwell 小室的上部腔室和下部腔室中分别添加基质胶和完全培养基,将 1×10^4 个细胞在上室中培养 48 h,培养过程中有侵袭能力的细胞会进入下室,将侵入的细胞用 20%甲醇固定并用 0.1%结晶紫染色。统计 5 个视野中侵入底部室的细胞数目的平均值。

1.3.5 qPCR 检测 miRNA-363b 表达 根据 1.3.1 节的方法获得总 RNA,通过 MiScript 试剂盒合成互补 DNA,并将 MiScript SYBR-Green PCR 试剂盒用于 qPCR,使用 U6 作为内参。

1.3.6 双荧光素酶报告验证 HNF1A-AS1 靶向 miRNA-363 将野生型(Wt)/突变(Mut)HNF1A-AS1 和 miRNA-363 模拟物分别克隆到 pMIR-REPORT 中,然后分别将 miRNA-363 NC/mimic 以及 Wt/Mut-HNF1A-AS1 转染进入细胞中,然后使用双荧光霉素报告基因分析系统评估荧光霉素活性。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析使用 SPSS 19 软件。组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄连素对 OS 细胞中 HNF1A-AS1 的影响

由表 1 可知,黄连素组的 HNF1A-AS1 水平显著低于对照组,表明黄连素能够抑制 OS 细胞中 HNF1A-AS1 表达,差异有统计学意义($t=9.436, P=0.0110, P<0.05$);HNF1A-AS1 组 HNF1A-AS1 水平高于对照组,表明 HNF1A-AS1 质粒转染成功,差异有统计学意义($t=7.203, P=0.0187, P<0.05$);和黄连素+HNF1A-AS1 组比较,黄连素组 HNF1A-AS1 水平明显降低,HNF1A-AS1 组 HNF1A-AS1 水平明显升高,差异有统计学意义($t=5.085, P=0.0366, P<0.05$),结果表明黄连素能够降低 OS 细胞内 HNF1A-AS1 表达。

表 1 各转染组 HNF1A-AS1 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	HNF1A-AS1
对照组	3.05±0.26
黄连素组	1.24±0.14 ¹⁾
黄连素+HNF1A-AS1 组	6.77±0.69 ²⁾³⁾
HNF1A-AS1 组	11.56±1.08 ¹⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与黄连素组比较, $P<0.05$;3)与 HNF1A-AS1 组比较, $P<0.05$ 。

2.2 黄连素通过 HNF1A-AS1 对 OS 细胞增殖的影响

由表 2 可知,与对照组比较,黄连素组的 OD 值降低,HNF1A-AS1 组的 OD 值升高,差异有统计学意义($t=7.800, P=0.0160, P<0.05$);和黄连素+HNF1A-AS1 组相比,黄连素组细胞 OD 值明显降低,HNF1A-AS1 组 OD 值明显升高,差异有统计学意义($t=7.304, P=0.0182, P<0.05$),结果表明黄连素可以通过抑制 HNF1A-AS1 表达来抑制 OS 细胞的增殖。

表 2 各转染组细胞 OD 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	OD 值
对照组	0.68±0.05
黄连素组	0.57±0.06 ¹⁾
黄连素+HNF1A-AS1 组	0.74±0.08 ²⁾³⁾
HNF1A-AS1 组	0.89±0.09 ¹⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与黄连素组比较, $P<0.05$;3)与 HNF1A-AS1 组比较, $P<0.05$ 。

2.3 黄连素通过 HNF1A-AS1 对 OS 细胞凋亡的影响

由表 3 可知,与对照组比较,黄连素组细胞凋亡率升高,HNF1A-AS1 组的凋亡率降低,差异有统计学意义($t=6.656, P=0.0218, P<0.05$);与黄连素+HNF1A-AS1 组相比,黄连素组细胞凋亡率明显升高,HNF1A-AS1 组细胞凋亡率明显降低,差异有统计学意义($t=6.037, P=0.0264, P<0.05$),结果表明黄连素可以通过抑制 HNF1A-AS1 表达来促进 OS 细胞的凋亡。

表 3 各组细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡率/%
对照组	4.58±0.58
黄连素组	14.86±1.34 ¹⁾
黄连素+HNF1A-AS1 组	7.02±0.79 ²⁾³⁾
HNF1A-AS1 组	2.41±0.35 ¹⁾

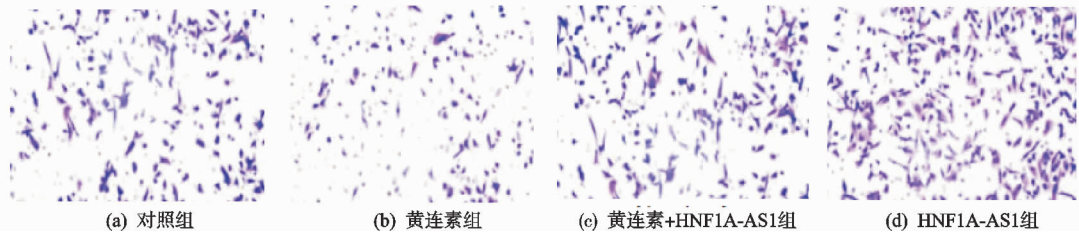
注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与黄连素组比较, $P<0.05$;3)与 HNF1A-AS1 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 黄连素通过 HNF1A-AS1 对 OS 细胞侵袭的影响

由图 1 和表 4 可知,与对照组比较,黄连素组细胞侵袭数目降低,HNF1A-AS1 组细胞侵袭数目升高,差异有统计学意义($t=4.882, P=0.0395, P<0.05$);与黄连素+HNF1A-AS1 组相比,黄连素组细胞侵袭数目明显减少,HNF1A-AS1 组细胞侵袭数目明显增加,差异有统计学意义($t=6.045, P=0.0263, P<0.05$),结果表明黄连素可以通过抑制 HNF1A-AS1 表达来抑制 OS 细胞的侵袭。

2.5 黄连素通过 HNF1A-AS1 对 OS 细胞中 miRNA-363 表达的影响

由表 5 可知,与对照组比较,黄连素组细胞内 miRNA-363 表达水平升高,HNF1A-AS1 组的 miRNA-363 表达水平降低,差异有统计学意义($t=7.207, P=0.0187, P<0.05$);与黄连素+HNF1A-AS1 组相比,黄连素组细胞 miRNA-363 表达水平明显升高,HNF1A-AS1 组细胞 miRNA-363 表达水平明显降低,差异有统计学意义($t=7.475, P=0.0174, P<0.05$),结果表明黄连素可以通过抑制 HNF1A-AS1 表达来上调 miRNA-363 表达。



(紫色为被染色的具有侵袭能力的细胞,细胞侵袭数目排序:HNF1A-AS1 组>黄连素+HNF1A-AS1 组>对照组>黄连素组)

图 1 Transwell 检测黄连素通过 HNF1A-AS1 对 OS 细胞侵袭的影响($\times 200$)

表 4 各转染组细胞侵袭数目比较(̄x±s)

组别	细胞侵袭数目
对照组	142.58±11.87
黄连素组	75.61±8.25 ¹⁾
黄连素+HNF1A-AS1 组	168.87±19.52 ²⁾³⁾
HNF1A-AS1 组	239.52±22.46 ¹⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与黄连素组比较, $P<0.05$;3)与 HNF1A-AS1 组比较, $P<0.05$ 。

表 5 各转染组细胞 miRNA-363 表达水平比较(̄x±s)

组别	miRNA-363 表达水平
对照组	1.12±0.10
黄连素组	2.79±0.28 ¹⁾
黄连素+HNF1A-AS1 组	0.87±0.09 ²⁾³⁾
HNF1A-AS1 组	0.34±0.04 ¹⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与黄连素组比较, $P<0.05$;3)与 HNF1A-AS1 组比较, $P<0.05$ 。

2.6 双荧光素酶报告验证 HNF1A-AS1 与 miRNA-363 之间的靶向关系

预测结果显示 HNF1A-AS1 可以靶向调控 miRNA-363,结合位点见图 2。双荧光素酶报告结果显示同时转染野生型 HNF1A-AS1 和 miRNA-363 模拟物后,相对荧光强度显著降低,差异有统计学意义($t=18.13,P=0.0030,P<0.01$),说明 HNF1A-AS1 和 miRNA-363 之间具有靶向调控作用,见表 6。

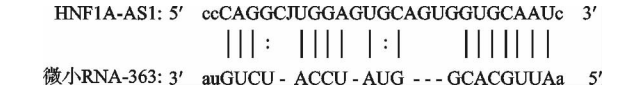


图 2 HNF1A-AS1 与 miRNA-363 的结合位点
表 6 双荧光素酶报告结果(̄x±s)

类型	对照组	miRNA-363 模拟物
HNF1A-AS1 野生型	1.01±0.09	0.31±0.04
HNF1A-AS1 突变型	1.05±0.12	0.97±0.11

3 讨论

现阶段骨肉瘤的主要治疗方法包括手术、化疗、免疫疗法和基因疗法等,然而骨肉瘤的高转移能力和耐药性仍是预后不良的主要原因^[6],因此从分子机制研究骨肉瘤的致病机制能为患者的早期诊断和晚期预后提供理论依据。

近些年研究表明中药在 OS 的治疗中取得了重大进展,如研究发现柴胡垂盆汤在恢复食欲、保护骨肉瘤患者肝功能方面确有良效。另外发现矮地茶具有保护 OS 患者肝细胞的作用,垂盆草有减轻肝细胞损伤、降低谷丙转氨酶水平的作用。八珍汤可以明显降低骨肉瘤患者骨髓抑制的发生率^[7]。黄连素是中草药黄连的主要活性单体,其分子式是 C₂₀H₁₉NO₅,分子量为 353.36,研究显示黄连素具有神经保护、抗炎和抗氧化作用,最近研究显示黄连素可以通过调节 caspase-1/IL-1 β 通路促进 OS 细胞凋亡^[8]。也有研究显示黄连素可以通过调节 Rad51 提高 OS 细胞对放射线的敏感

性,进一步抑制 OS 细胞上皮-间充质转化^[9]。此外,Chen 等^[10]的研究结果也显示黄连素可以通过抑制 PI3K/Akt 途径发挥抑制 OS 的作用。但是关于黄连素抑制 OS 的机制尚不明确。临床研究显示 HNF1A-AS1 在 OS 中过表达,并且高水平的 HNF1A-AS1 与患者预后不良有关^[11]。本次研究结果显示黄连素可以抑制 OS 细胞中 HNF1A-AS1 的水平,可以通过抑制 HNF1A-AS1 表达来抑制 OS 细胞的增殖和侵袭,并促进细胞凋亡,而重新提高 HNF1A-AS1 的表达可以逆转黄连素对 OS 的抑制作用。这提示黄连素抑制 OS 的作用可能与抑制 HNF1A-AS1 的水平有关。

为进一步分析黄连素可能通过抑制 HNF1A-AS1 调控 OS 的机制,本研究检测了细胞中 miRNA-363 的变化。研究表明 miRNA-363 可以通过与 NOB1 结合抑制 OS 细胞的迁移、侵袭和上皮间质转化^[12]。临床研究结果也显示 miRNA-363 具有抑制 OS 的作用^[13]。更重要的是,miRNA-363 的抗癌功能受到 LncRNA 的调控,LncRNA 可以像海绵一样吸附 miRNA-363,从而抑制 miRNA-363 的功能,如 LncRNA MALAT1 可以通过靶向抑制 miRNA-363 促进直肠癌的增殖^[14]。本研究结果显示黄连素可以显著促进 miRNA-363 的表达,而提高 HNF1A-AS1 的水平可以抑制 miRNA-363 且可以逆转黄连素对 miRNA-363 的促进作用。此外,双荧光素酶报告实验也证实了 HNF1A-AS1 可以直接靶向 miRNA-363。过往研究显示 HNF1A-AS1 可以通过抑制 miRNA 发挥促进肿瘤的增殖和转移的作用^[15-16]。也有研究显示黄连素可以通过抑制 LncRNA CASC2 促进大肠癌的凋亡^[17]。此外,黄连素可以通过调节 LncRNA MIAT 调控心肌细胞的自噬。这提示在 OS 中,黄连素可以通过抑制 HNF1A-AS1 提高 miRNA-363 的表达,从而发挥抑制 OS 的作用。

综上所述,黄连素可以通过抑制 HNF1A-AS1 提高 miRNA-363 的表达,并发挥抑制 OS 细胞增殖、侵袭和促进凋亡的作用。关于黄连素对 OS 的抑制作用还需要进一步的体内实验证实,并且其调控 HNF1A-AS1 的机制也值得深入研究。

参考文献

[1] 孙星星,闵大六.间充质干细胞在骨肉瘤发生发展中的作用研究进展[J].癌症进展,2019,17(8):880-882.

[2] WANG K,YAN L,LU F. miRNA-363-3p inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion via targeting SOX4 [J]. Oncol Res,2018,27(2):157-163.

[3] ZHAO H,HOU W,TAO J, et al. Upregulation of lncRNA HNF1A-AS1 promotes cell proliferation and metastasis in osteosarcoma through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Am J Transl Res,2016,8(8):3503-3505.

[4] 吴克,邱明星,王寓.长链非编码 RNA HNF1A-AS1 靶向

- has-miR-1 对膀胱癌细胞生长和侵袭的调节作用及机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(11): 1632-1636.
- [5] 邓守恒, 海晓丫, 张丽娜, 等. 黄连素对体外培养肝癌细胞生物学行为的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 543-545.
 - [6] 朱昆鹏, 张春林, 马小龙. 高通量测序筛选与骨肉瘤化疗耐药相关的环状 RNA 分子表达谱[J]. 中华骨科杂志, 2019, 39(6): 336-345.
 - [7] 陈婧, 刘云霞, 杨洁文, 等. 八珍汤对骨肉瘤大剂量化疗后骨髓的保护作用[J]. 浙江中医杂志, 2015, 50(5): 328-329.
 - [8] JIN H, JIN X, CAO B, et al. Berberine affects osteosarcoma via downregulating the caspase-1/IL-1 β signaling axis[J]. *Oncol Rep*, 2016, 37(2): 729-736.
 - [9] WANG D, ZHANG K F, DU G, et al. Berberine enhances the radiosensitivity of osteosarcoma by targeting Rad51 and epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cancer Res Ther*, 2020, 16(2): 215-221.
 - [10] CHEN Z Z. Berberine induced apoptosis of human osteosarcoma cells by inhibiting phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signal pathway activation[J]. *Iran J Public Health*, 2016, 45(5): 578-585.
 - [11] CAI L, LV J, ZHANG Y, et al. The lncRNA HNF1A-AS1 is a negative prognostic factor and promotes tumorigenesis in osteosarcoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11): 2654-2662.
 - [12] ZHANG Y, WANG F, WANG L, et al. miRNA-363 suppresses cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma by binding to NOB1[J]. *World J Surg Oncol*, 2020, 18(1): 83-84.
 - [13] HE F, FANG L, YIN Q. miRNA-363 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma cells by inhibiting PDZD2[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5): 2729-2738.
 - [14] XIE J J, LI W H, LI X, et al. LncRNA MALAT1 promotes colorectal cancer development by sponging miRNA-363-3p to regulate EZH2 expression[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2019, 33(2): 331-343.
 - [15] 邱云, 郭中叶, 吴学潮, 等. LncRNA HNF1A-AS1 在胶质瘤中的表达及功能研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2020, 25, 238(3): 34-39.
 - [16] 龙武林, 程帆. 长链非编码 RNA HNF1A-AS1 在膀胱癌中的表达水平及其临床意义[J]. 临床泌尿外科杂志, 2019, 34(3): 210-214.
 - [17] DAI W, MU L, CUI Y, et al. Berberine promotes apoptosis of colorectal cancer via regulation of the long non-coding RNA (lncRNA) cancer susceptibility candidate 2 (CASC2)/AU-binding factor 1 (AUF1)/B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) axis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(25): 730-738.

(收稿日期: 2020-07-15)

(上接第 15 页)

- [2] GONCALVES T, ZOUMPOULIDOU G, ALVAREZ-MENDOZA C, et al. Selective elimination of osteosarcoma cell lines with short telomeres by ataxia telangiectasia and Rad3-related inhibitors [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3(6): 1253-1264.
- [3] HEGYI M, GULÁCSI A, CSÁGOLY E, et al. Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(10): 1697-1702.
- [4] LE Z T, WANG H F, REN T, et al. Osthole inhibits the progression of human gallbladder cancer cells through JAK/STAT3 signal pathway both in vitro and in vivo[J]. *Anticancer Drugs*, 2019, 30(10): 1022-1030.
- [5] DAI X, YIN C, ZHANG Y, et al. Osthole inhibits triple negative breast cancer cells by suppressing STAT3[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 322.
- [6] 王锦军. 蛇床子素增强 TNF- α 对骨肉瘤细胞凋亡诱导活性及机制研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(11): 984-987.
- [7] 刘伟坤, 虞荣昌, 杨锐, 等. 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[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(2): 5-10.
- [8] ASHRAFIZADEH M, MOHAMMADINEJAD R, SAMARGHANDIAN S, et al. Anti-tumor effects of osthole on different malignant tissues: a review of molecular mechanisms[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(8): 918-931.
- [9] 邹德峰, 杨晓松, 卜繁旺, 等. 蛇床子素激活 wnt/ β -catenin 信号通路抑制急性脊髓损伤大鼠神经细胞凋亡[J]. 解剖科学进展, 2020, 26(3): 303-306.
- [10] ABOSHARAF H A, DIAB T, ATLAM F M, et al. Osthole extracted from a citrus fruit that affects apoptosis on A549 cell line by histone deacetylase inhibition (HD ACs)[J]. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2020, 28: e00531.
- [11] ZHENG C, TANG F, MIN L, et al. PTEN in osteosarcoma: recent advances and the therapeutic potential[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188405.
- [12] YU C, ZHANG B, LI Y L, et al. SIX1 reduces the expression of PTEN via activating PI3K/AKT signal to promote cell proliferation and tumorigenesis in osteosarcoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 10-17.
- [13] XIAO J, YU W, HU K, et al. miR-92a promotes tumor growth of osteosarcoma by targeting PTEN/AKT signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4): 2513-2521.
- [14] TIAN K, DI R, WANG L. MicroRNA-23a enhances migration and invasion through PTEN in osteosarcoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(7): 351-359.

(收稿日期: 2020-12-18)