

柴胡皂苷-d 促进骨肉瘤细胞凋亡的研究

庄怡富 干耀恺 汤亭亭

【摘要】 目的 探讨柴胡皂苷-d(SS-d)对骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响,并探讨其作用机制。**方法** 经不同浓度 SS-d 处理骨肉瘤 Saos-2 细胞后,采用八肽胆囊收缩素(CCK-8)法检测骨肉瘤细胞增殖情况,采用流式细胞术检测骨肉瘤细胞凋亡情况,采用 Transwell 小室法检测骨肉瘤细胞迁移和侵袭能力,最后采用蛋白质免疫印迹(Western blot)法探讨 SS-d 对核因子- κ B(NF- κ B)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路的作用及其下游凋亡相关蛋白的影响。**结果** SS-d 可呈剂量依赖性地明显抑制骨肉瘤 Saos-2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力(P 均 <0.05),促进骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡($P<0.05$)。SS-d 可抑制 p-I κ B α 和 p-p65 表达,下调 p-Jnk 和 p-p38 表达,进而抑制 NF- κ B/MAPK 信号转导通路激活,促进下游凋亡相关蛋白 Bax 和裂解活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved caspase)-3 表达,减小 Bcl-2/Bax 比值,促进骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡。**结论** SS-d 可明显抑制骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖、迁移和侵袭,促进骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡。这一现象与 SS-d 抑制 NF- κ B/MAPK 信号转导通路激活,减小 Bcl-2/Bax 比值,促进 cleaved caspase-3 表达有关。

【关键词】 骨肉瘤;柴胡皂苷-d;细胞凋亡;核因子- κ B/丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路;Bcl-2/Bax

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2017.02.012

The study of saikosaponin-d promotes apoptosis of osteosarcoma cells ZHUANG Yifu, GAN Yaokai, TANG Tingting. Department of Orthopaedic, the Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implants, Shanghai 200011, China

Corresponding author: GAN Yaokai E-mail: ganyk2004@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of saikosaponin-d (SS-d) on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of the osteosarcoma Saos-2 cells, and the related mechanism. **Methods** Osteosarcoma Saos-2 cells were treated with varying concentrations of SS-d. CCK-8 analysis was used to evaluate the proliferation ability of Saos-2 cells; flow cytometry was employed to investigate the apoptosis ability; Transwell Chamber assay was utilized to explore the migration and invasion ability. Next, Western blot was used to assess the effect of SS-d on activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and the downstream apoptosis-related proteins. **Results** SS-d dose-dependently inhibited osteosarcoma Saos-2 cell proliferation, migration and invasion ($P<0.05$) while promoted apoptosis ($P<0.05$). Western blot revealed that SS-d could inhibit the expressions of p-I κ B α and p-p65, reduce the production of p-Jnk and p-p38, contributing to the inhibition of activated NF- κ B/MAPK signaling, the elevated expressions of apoptosis-related proteins Bax and cleaved caspase-3 with decreased Bcl-2/Bax ratio, and the apoptosis of osteosarcoma Saos-2 cells. **Conclusion** SS-d was capable of downregulating osteosarcoma Saos-2 cells proliferation, migration and invasion, upregulating osteosarcoma Saos-2 cells apoptosis. These effects might be associated with the inhibition of NF- κ B/MAPK signaling, decreased Bcl-2/Bax ratio and increased cleaved caspase-3 by SS-d treatment.

【Key words】 Osteosarcoma; Saikosaponin-d; Apoptosis; NF- κ B/MAPK; Bcl-2/Bax

骨肉瘤起源于间叶组织,是骨骼系统最常见的恶性肿瘤,常见于青少年,好发部位为长骨干骺端^[1]。骨肉瘤治疗经典方法为手术切除,但术后5年生存率仅为20%^[2-3]。近年来,新辅助化疗、放疗、分子靶向治疗、基因治疗和免疫治疗等多种治疗方法提高了骨肉瘤的疗效^[1,4-5]。然而,这些治疗方法尚存在诸多缺陷,如化疗有明显不良反应、放疗不敏感、分子靶向治疗费用昂贵、基因治疗和免疫治疗

尚未广泛应用于临床等^[6-7]。因此,骨肉瘤的有效治疗方法仍需要继续探索。

在中国,中药单体治疗不良反应小,来源广泛方便,疗效较为确切,具有良好的发展前景。柴胡皂苷-d(SS-d)是伞形科植物柴胡的提取物。已有文献^[8-9]证实 SS-d 具有抗炎、保护内脏和抗肿瘤等作用。研究^[10-13]表明,SS-d 对胃癌、肺癌、前列腺癌及肝癌具有抑制肿瘤增殖、诱导细胞凋亡等抗肿瘤作用。然而,SS-d 对骨肉瘤治疗作用的研究报道极少。本研究通过探索 SS-d 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响,研究其对骨肉瘤细

作者单位:200011, 上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科、上海市骨科内植物重点实验室

通信作者:干耀恺 E-mail: ganyk2004@126.com

胞凋亡的调节机制,以期为未来 SS-d 用于骨肉瘤临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

细胞株:人骨肉瘤 Saos-2 细胞(中国科学院上海生命科学研究院)。

试剂:SS-d(美国 Sigma 公司)、Dulbecco 改良 Eagle(DMEM)培养液、胎牛血清(美国 HyClone 公司)、青链霉素双抗、0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);八肽胆囊收缩素(CCK-8)、酶联蛋白 V(Annexin V)/碘化丙啶(PI)染色试剂盒、Transwell 小室、放射免疫分析(RIPA)裂解液和蛋白保护液(碧云天生物技术研究);兔抗人 Erk、Jnk、p38、IKK、p-I κ B α 、p65、Bax、Bcl-2、裂解活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved caspase)-3 和 Gapdh 单克隆抗体、羊抗兔或羊抗鼠荧光二抗(标记有 DylightTM 800 荧光素染料)(美国 Cell Signaling Technology 公司);聚碳酸酯膜小室和聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司);蛋白酶抑制剂(瑞士 Roche 公司);双辛可宁酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo 公司)。

仪器:红外荧光成像系统(美国 LI-COR 公司)、免疫酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 药物配制及细胞培养

使用二甲基亚砜(DMSO)溶液配制 SS-d,避光储存于 -20°C 冰箱,使用时用完全培养液(DMEM 培养液,含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗)稀释至所需药物浓度。Saos-2 细胞放入完全培养液并置于 37°C 含 5% CO_2 的恒温培养箱中培养,每隔 48 h 传代 1 次。实验时将 Saos-2 细胞接种于培养皿中,待细胞充分贴壁进入对数生长期后,进行药物干预实验。

1.3 检测细胞增殖活力

将 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的 Saos-2 细胞接种于 96 孔板中,每孔 100 μL 。在恒温培养箱中培养 24 h 后,进行药物干预。实验组 SS-d 药物浓度分别为 12.5、25、50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$,对照组则加入不含 SS-d 的完全培养液。药物处理 24、48、72 和 96 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。反应 4 h 后,于免疫酶标仪读取 450 nm 波长处各孔的吸光度(OD_{450} 值)。实验重复 3 次,绘制细胞增殖曲线。

1.4 检测细胞凋亡率

细胞凋亡由 Annexin V/PI 双重免疫荧光染色法

及流式细胞仪检测。用不同浓度的 SS-d(25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)刺激 Saos-2 细胞 24 h 后,重悬细胞。在流式管中加 2 mL $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的 Saos-2 细胞悬液,依次加入 3.8 μL Alexa Fluor[®]488 Annexin V 染色剂和 1 μL PI 染色剂,室温避光孵育 10 min 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡百分率。实验重复 3 次。

1.5 检测细胞迁移和侵袭能力

使用 Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力。迁移实验中,100 μL $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的 Saos-2 细胞悬液接种到聚碳酸酯膜小室的上层,同时在上层加入不同浓度的 SS-d(25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)和含 0.2% 胎牛血清白蛋白的 DMEM 培养液,下层中则添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。侵袭实验中,用完全培养液以 1:10 的比例稀释小鼠来源的基质胶,并预铺 50 μL 于聚碳酸酯膜小室的上层,在 37°C 恒温培养箱中放置 4 h 后,在上层加入 100 μL $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的 Saos-2 细胞悬液,后续步骤同迁移实验。Transwell 小室准备好后,置于 37°C 含 5% CO_2 的恒温培养箱中培养 24 h。随后取出小室,用棉签擦拭小室内表面。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 遍后,4% 中性多聚甲醛溶液固定,0.1% 结晶紫染色,光学显微镜下观察和计数。随机选取任意 5 个视野,计数每个视野内的细胞数,以此反映 Saos-2 细胞迁移和侵袭能力。实验重复 3 次。

1.6 核因子- κB /丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路相关蛋白表达

使用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测核因子- κB (NF- κB)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路相关蛋白的表达。用浓度为 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 SS-d 分别刺激 Saos-2 细胞 24 h, PBS 清洗 2 次,并用 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)裂解细胞,提取细胞总蛋白。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量分析蛋白质浓度,然后蛋白保护液稀释,于 99°C 变性 10 min。随后应用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分离蛋白:每孔加入 30 μL 蛋白,先以 80 V 恒定电压电泳,待溴酚蓝移至浓缩胶与分离胶交界面时,调整电压为 120 V,继续电泳 1.5 h。蛋白质转移至 PVDF 膜后,电转移条件为恒流 250 mA 共 2.5 h。使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次后,加入一抗(包括兔抗人 p-Erk/Erk、p-Jnk/Jnk、p-p38/p38、p-IKK/IKK、p-I κ B α 、p-p65/p65、Gapdh、Bax、Bcl-2 和 cleaved caspase-3 单克隆抗体以及鼠抗人 I κ B α 单克

隆抗体, 体积稀释比均为 1 : 1 000), 4℃ 过夜。TBST 洗膜 3 次后, 加入相应的 DylightTM 800 荧光素染料标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG, 室温反应 1 h。TBST 洗膜 3 次, 采用红外荧光成像系统成像, 并进行定量分析。目的蛋白相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法表示。实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

统计软件为 SPSS 13.0。计量资料采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 多组间数据比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SS-d 抑制 Saos-2 细胞增殖

根据 CCK-8 法检测结果, SS-d 可抑制 Saos-2 细胞增殖活力, 抑制效果随药物浓度增加而上升。SS-d 刺激细胞 24 h 后, 与对照组相比, SS-d 12.5 μmol/L 浓度组细胞增殖活力仅有轻微下降, 两者差异无统计学意义 ($t_{12.5} = 1.716, P = 0.14$), 而其他 4 组细胞增殖活力明显下降 ($t_{25} = 8.84, t_{50} = 18.69, t_{100} = 39.11, t_{200} = 39.85, P$ 均 < 0.05)。24 h SS-d 的半

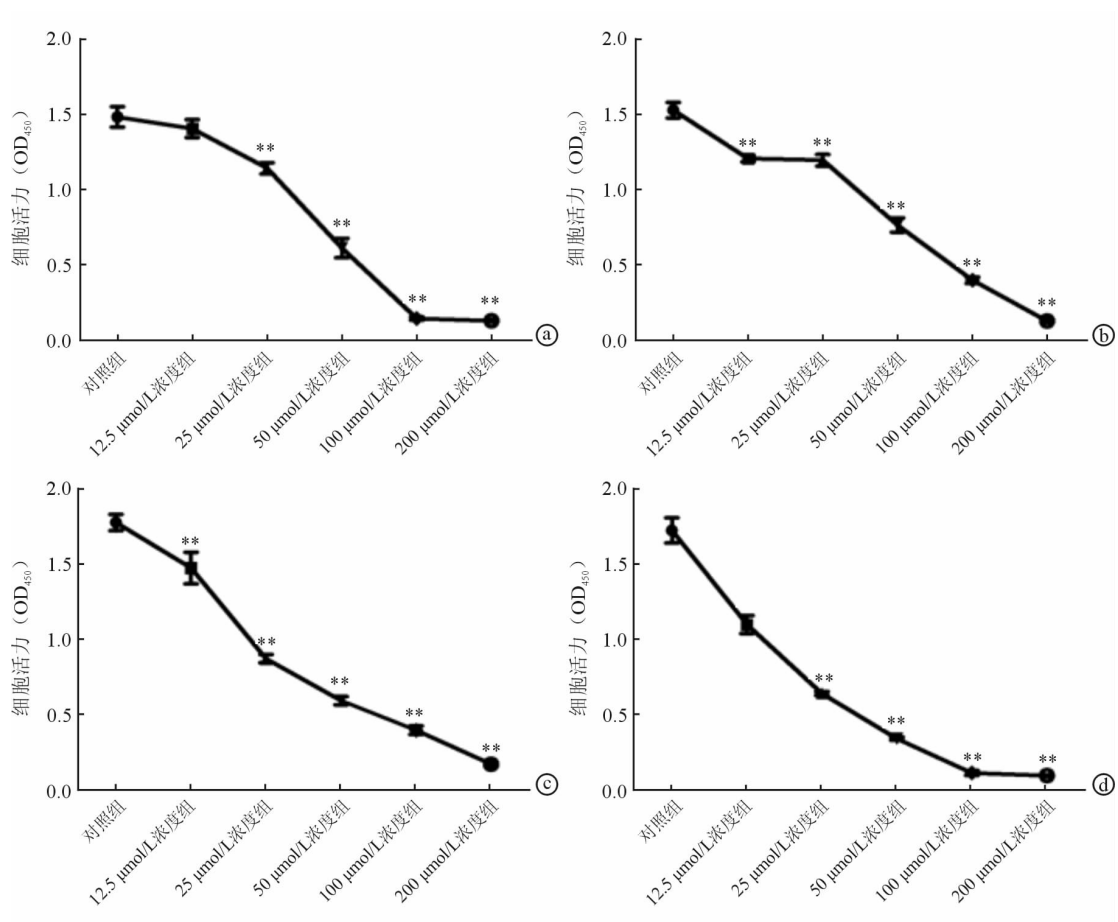
数抑制浓度为 41.37 μmol/L。SS-d 刺激细胞 48、72 和 96 h 后, 所有浓度组细胞增殖活力均明显下降 (P 均 < 0.05), 且 SS-d 浓度越大, 下降越明显。48、72 和 96 h SS-d 半数抑制浓度分别为 48.23、24.21 和 19.08 μmol/L (图 1)。

2.2 SS-d 促进 Saos-2 细胞凋亡

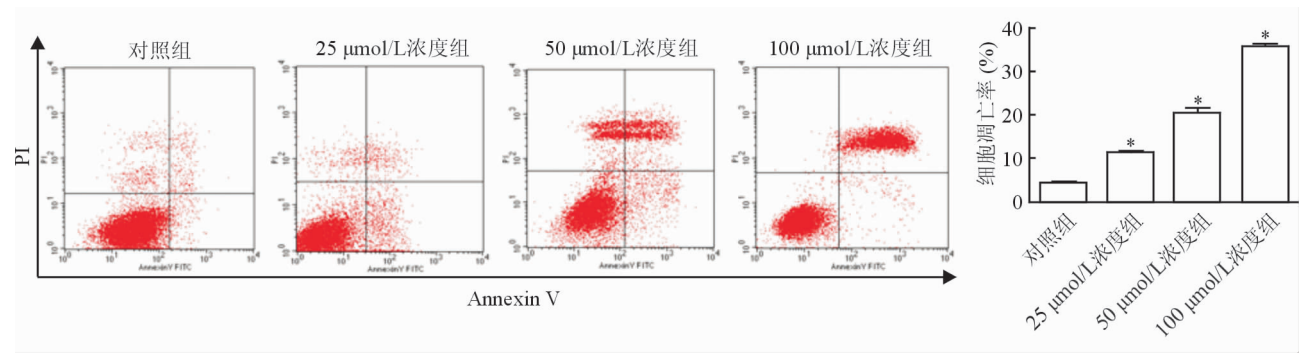
根据细胞流式术法检测结果, 25、50 和 100 μmol/L 浓度的 SS-d 刺激 Saos-2 细胞后, 细胞凋亡率分别为 $11.22\% \pm 1.75\%$ 、 $20.59\% \pm 2.15\%$ 和 $35.45\% \pm 1.33\%$, 差异均具有统计学意义 ($F = 216.87, P = 0.000$)。相比于对照组, 25、50 和 100 μmol/L SS-d 浓度组均可有效促进 Saos-2 细胞凋亡, 而且这种促凋亡作用具有浓度依赖性 (下页图 2)。

2.3 SS-d 抑制 Saos-2 细胞迁移和侵袭

根据 Transwell 小室法检测结果, 与对照组相比, 25、50 和 100 μmol/L 浓度的 SS-d 均可降低 Saos-2 细胞的迁移能力 ($F = 355.35, P = 0.000$) 和侵袭能力 ($F = 415.70, P = 0.000$)。此外, 这种抑制作用可呈浓度依赖性, SS-d 浓度越高, 抑制效果越明显 (下页图 3)。

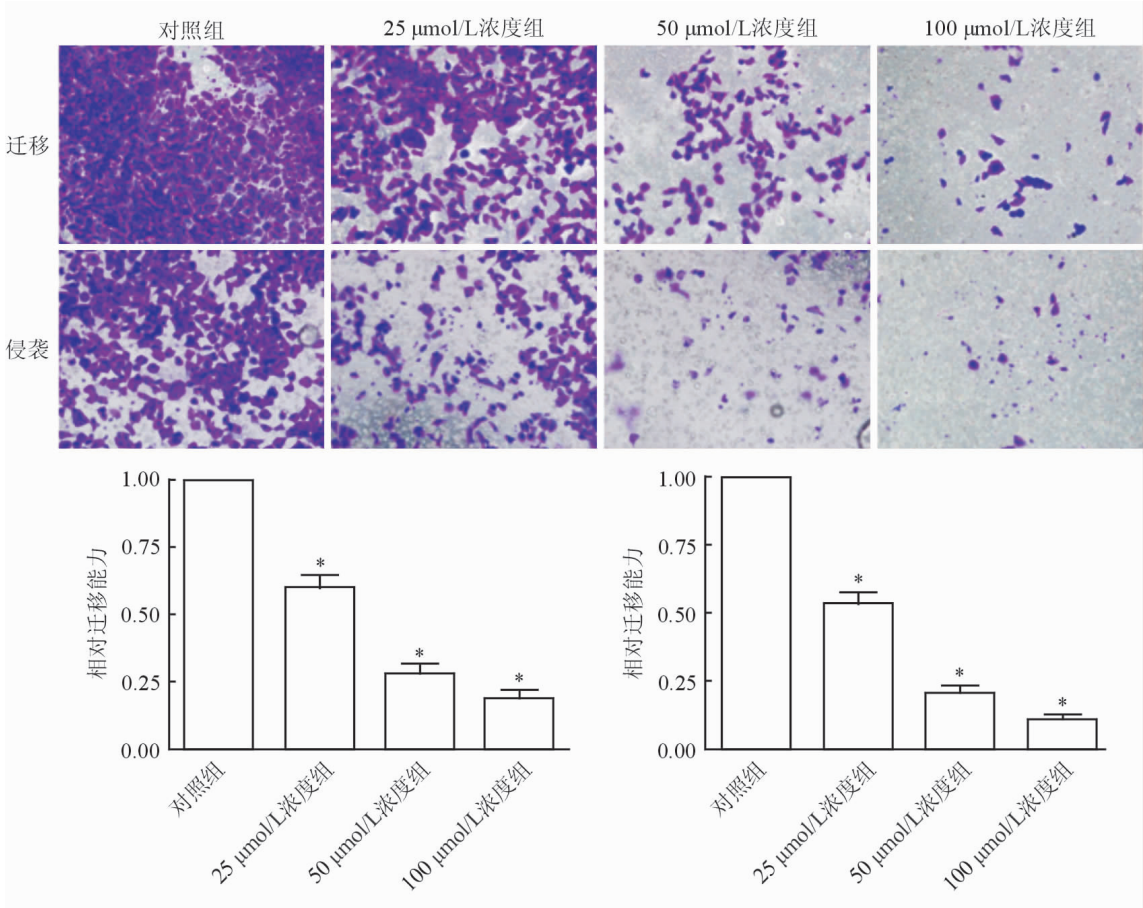


注: ** 表示与对照组相比, $P < 0.05$
图 1 SS-d 对 Saos-2 细胞增殖的抑制作用 a. 作用 24 h b. 作用 48 h c. 作用 72 h d. 作用 96 h



注：* 表示与对照组相比， $P<0.05$

图 2 SS-d 促进 Saos-2 细胞凋亡



注：* 表示与对照组相比， $P<0.05$

图 3 SS-d 抑制 Saos-2 细胞迁移和侵袭

2.4 SS-d 抑制 MAPK 信号转导通路相关蛋白表达

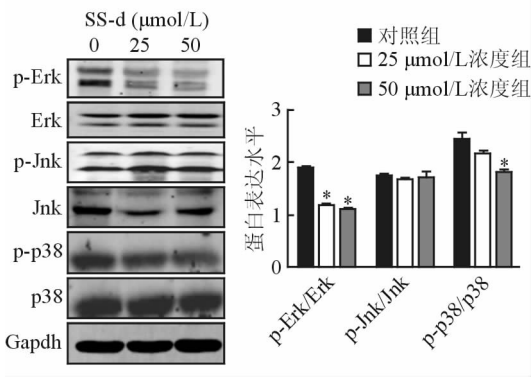
MAPK 信号转导通路中，Jnk、Erk 和 p38 磷酸化活化后可参与调控下游蛋白表达和释放。25、50 μmol/L 浓度的 SS-d 对 Jnk 蛋白激酶磷酸化没有明显影响 ($F=0.679, P=0.571$)，而对 Erk 蛋白激酶和 p38 蛋白激酶磷酸化有明显抑制作用 ($F_{\text{Erk}}=464.183, P_{\text{Erk}}=0.000; F_{\text{p38}}=32.238, P_{\text{p38}}=0.009$) (图 4)。

2.5 SS-d 抑制 NF-κB 信号转导通路相关蛋白表达

NF-κB 信号通路中，信号从上游的 IKK 和 IκBα 蛋白激酶传递至下游的 p65 分子^[14]。25、50 μmol/L 浓度的 SS-d 对 IKK 蛋白激酶磷酸化没有明显影响 ($F=1.027, P=0.457$)，而对 IκBα 蛋白激酶磷酸化有明显抑制作用 ($F=108.299, P=0.002$)，同时 25、50 μmol/L 浓度的 SS-d 对 p65 分子的磷酸化有明显抑制作用 ($F=654.996, P=0.000$) (图 5)。

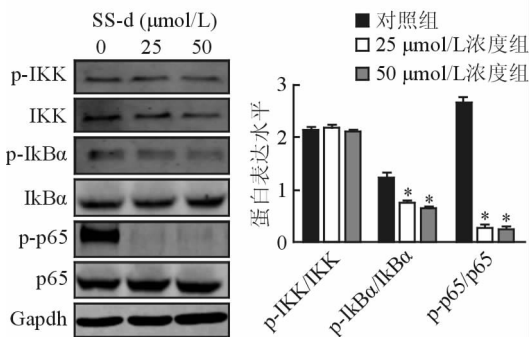
2.6 SS-d 对 NF- κ B/MAPK 信号转导通路下游效应分子的影响

Bax、Bcl-2 和 cleaved caspase-3 是 NF- κ B/MAPK 信号转导通路下游的效应分子,调控细胞增殖和凋亡。其中,Bax 和 cleaved caspase-3 起到促凋亡作用,而 Bcl-2 则抑制凋亡,促进细胞增殖^[15]。25、50 μ mol/L 浓度的 SS-d 对 Bcl-2 表达无明显影响 ($F = 3.237, P = 0.178$),但可促进 Bax 和 cleaved caspase-3 表达 ($F_{\text{Bax}} = 60.395, P_{\text{Bax}} = 0.004; F_{\text{cleaved caspase-3}} = 196.431, P_{\text{cleaved caspase-3}} = 0.001$) (图 6)。



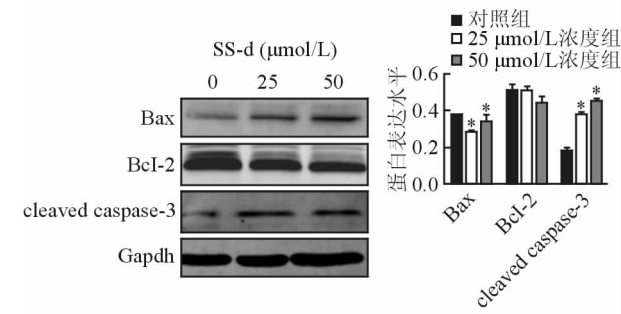
注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$

图 4 SS-d 对 MAPK 信号转导通路相关蛋白表达的影响



注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$

图 5 SS-d 对 NF- κ B 信号转导通路相关蛋白表达的影响



注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$

图 6 SS-d 对 Bax、Bcl-2 和 cleaved caspase-3 表达的影响

3 讨论

随着新辅助化疗的兴起,骨肉瘤临床疗效有了

明显改善,大部分骨肉瘤可进行保肢手术治疗^[16]。然而,大剂量化疗可产生骨髓抑制,造成血液系统紊乱。此外,骨肉瘤术后复发率较高,在中国可达 20%^[17]。因此,仍需进一步研发能有效对抗骨肉瘤的治疗方法。SS-d 具有显著的免疫调节、保护脏器、抗炎和抗肿瘤等生物活性。我们的研究表明,SS-d 可降低骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖活力和转移能力,显著促进骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡,提示 SS-d 在治疗骨肉瘤方面具有良好的应用前景。

MAPK 信号转导通路主要包括由 Erk、Jnk 和 p38 介导的级联反应,该通路激活后参与细胞增殖、分化、迁移、凋亡和肿瘤相关炎症等^[18-19]。Erk 和 Jnk 激酶可调节细胞增殖、分化等生物学行为,磷酸化后 p-Erk 和 p-Jnk 能促进肿瘤细胞增殖。有研究^[20]表明,p38 不仅能促进肿瘤增殖,而且能增强肿瘤侵袭和转移能力。我们发现,SS-d 可明显下调 p-Jnk 和 p-p38 的表达,提示可以将 p-Jnk 和 p-p38 作为进一步研究的重点,深入探讨其在 SS-d 抗骨肉瘤治疗中发挥的作用。NF- κ B 是一种基因多向性转录因子,广泛存在于真核生物内,它能激活多种细胞进程的基因转录,包括炎症反应、细胞增殖、分化及凋亡等^[21]。NF- κ B 信号转导通路激活时,IKK 磷酸化形成 p-IKK,进而使其下游的 I κ B α 蛋白激酶磷酸化,再进一步激活 p65 蛋白激酶。激活后的 p-p65 进入细胞核内,调控相关基因的表达。本研究结果显示,SS-d 能下调 p-I κ B α 和 p-p65 分子的表达,提示 SS-d 可靶向抑制 p-I κ B α ,进而抑制下游 p65 分子的磷酸化,下调 NF- κ B 信号转导通路的激活。NF- κ B/MAPK 信号转导通路活化后,可分泌一系列具有生物学效应的细胞因子,从而促进恶性肿瘤发展。我们发现,SS-d 具有很强的促进骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡的能力,提示可将 NF- κ B/MAPK 相关骨肉瘤凋亡因子作为进一步的研究目标。Bcl-2 家族主要调控细胞凋亡,其中 Bcl-2 为抑凋亡基因,Bax 为促凋亡基因^[22]。有学者^[23]提出,Bcl-2/Bax 比值是细胞凋亡的关键因素。我们的研究显示,尽管 SS-d 对 Bcl-2 无明显抑制作用,但却能显著上调促凋亡基因 Bax 和 cleaved caspase-3 的表达,使 Bcl-2/Bax 比值减小,促进癌细胞凋亡,提示 SS-d 可通过抑制 NF- κ B/MAPK 信号转导通路上调促凋亡基因 Bax 和 cleaved caspase-3 表达,减小 Bcl-2/Bax 比值,从而促进骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡。

综上所述,本研究发 现 SS-d 具有在体外抗骨肉瘤 Saos-2 细胞的作用,可减弱骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖、迁移和侵袭能力,提高 Saos-2 细胞凋亡能力。其机制可能在于调控 NF- κ B/MAPK 信号转导通路,从而上调促凋亡基因(Bax 和 cleaved caspase-3)表达,减小 Bcl-2/Bax 比值,发挥其抗肿瘤活性。然而,SS-d 作为一种较强的抗骨肉瘤药物,其在体内的效应情况尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Moore DD, Luu HH. Osteosarcoma[J]. Cancer Treat Res, 2014, 162:65-92.
- [2] Friedman MA, Carter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future [J]. J Surg Oncol, 1972,4(5):482-510.
- [3] Marcove RC, Mike V, Hajek JV, et al. Osteogenic sarcoma under the age of twenty-one. A review of one hundred and forty-five operative cases [J]. J Bone Joint Surg Am, 1970, 52(3):411-423.
- [4] Zhou W, Hao M, Du X, et al. Advances in targeted therapy for osteosarcoma[J]. Discov Med, 2014, 17(96):301-307.
- [5] Szewczyk M, Lechowski R, Zabielska K. What do we know about canine osteosarcoma treatment? Review[J]. Vet Res Commun, 2015, 39(1):61-67.
- [6] Ozaki T, Flege S, Kevric M, et al. Osteosarcoma of the pelvis: experience of the cooperative osteosarcoma study group[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(2):334-341.
- [7] Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma[J]. Curr Opin Pharmacol, 2014, 16(1):15-23.
- [8] 李晓宇,窦立雯,孙佳惠,等. 柴胡皂苷 d 药理与毒理作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2015, 12(4):207-210.
- [9] Xu XH, Li T, Fong CM, et al. Saponins from Chinese medicines as anticancer agents [J]. Molecules, 2016, 21(10):1326.
- [10] Fujioka T, Yoshida K, Fujii H, et al. Antiproliferative constituents from umbelliferae plants VI. new ursane-type saikosaponin analogs from the fruits of bupleurum rotundifolium[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2003, 51(4):365-372.
- [11] Hsu YL, Kuo PL, Lin CC. The proliferative inhibition and apoptotic mechanism of saikosaponin D in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Life Sci, 2004, 75(10):1231-1242.
- [12] Zhong D, Zhang HJ, Jiang YD, et al. Saikosaponin-d: a potential chemotherapeutics in castration resistant prostate cancer by suppressing cancer metastases and cancer stem cell phenotypes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 474(4):722-729.
- [13] Jia X, Dang S, Cheng Y, et al. Effects of saikosaponin-d on syndecan-2, matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in rats with hepatocellular carcinoma [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(3):415-422.
- [14] Jimi E, Fukushima H. NF-kappaB signaling pathways and the future perspectives of bone disease therapy using selective inhibitors of NF-kappaB[J]. Clin Calcium, 2016, 26(2):298-304.
- [15] Ye QF, Zhang YC, Peng XQ, et al. Silencing notch-1 induces apoptosis and increases the chemosensitivity of prostate cancer cells to docetaxel through Bcl-2 and Bax[J]. Oncology letters, 2012, 3(4):879-884.
- [16] 汪新媛,田京. 骨肉瘤化疗研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2010, 31(3):159-161.
- [17] 于秀淳,吴苏稼,王序全,等. 晚期骨肉瘤术后复发三例报道并文献复习 [J]. 中国骨与关节杂志, 2013, 2(9):490-494.
- [18] Rauch N, Rukhlenko OS, Kolch W, et al. MAPK kinase signalling dynamics regulate cell fate decisions and drug resistance[J]. Curr Opin Struct Biol, 2016, 41:151-158.
- [19] Pereira L, Igea A, Canovas B, et al. Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK[J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(11):1759-1774.
- [20] Kim MS, Lee EJ, Kim HR, et al. p38 kinase is a key signaling molecule for H-ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(17):5454-5461.
- [21] Uwagawa T, Yanaga K. Effect of NF-kappaB inhibition on chemoresistance in biliary-pancreatic cancer[J]. Surg Today, 2015, 45(12):1481-1488.
- [22] Asmarinah A, Paradowska-Dogan A, Kodariah R, et al. Expression of the Bcl-2 family genes and complexes involved in the mitochondrial transport in prostate cancer cells[J]. Int J Oncol, 2014, 45(4):1489-1496.
- [23] Pettersson F, Dalgleish AG, Bissonnette RP, et al. Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of Bcl-2/Bax [J]. Br J Cancer, 2002, 87(5):555-561.

(收稿:2016-12-07;修回:2017-02-24)

(本文编辑:杨晓娟)