

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.004

二膦酸盐对人骨肉瘤细胞诱导凋亡作用的实验研究*

买买提艾力·哈斯木¹,江仁兵¹,白靖平¹,徐万龙^{2△}

(1.新疆医科大学附属肿瘤医院骨与软组织肿瘤科,乌鲁木齐 830011;2.山东大学齐鲁医院,济南 250012)

[摘要] 目的 探讨二膦酸盐对人骨肉瘤细胞的诱导凋亡作用及其可能的作用机制。方法 将人骨肉瘤 MG-63 细胞株培养、传代后将细胞分为两组:二膦酸盐 400 μg/mL 干预组、生理盐水空白对照组,孵育 72 h 后,对两组人骨肉瘤 MG-63 细胞株行免疫荧光检测,观察两组细胞中凋亡因子 Caspase-3、Fas 的表达;行流式细胞术检测,观察两组细胞的细胞凋亡率。结果 二膦酸盐作用于人骨肉瘤 MG-63 细胞株 72 h 后,免疫荧光检测结果可见二膦酸盐 400 μg/mL 干预组细胞中凋亡因子 Caspase-3、Fas 大量表达,而生理盐水空白对照组几乎见不到凋亡因子 Caspase-3、Fas 的表达;流式细胞术检测结果观察到二膦酸盐 400 μg/mL 干预组细胞的细胞凋亡率为 54.00%,远大于生理盐水空白对照组的细胞凋亡率 3.10%,差异有统计学意义($P < 0.05$),存在明显的诱导凋亡现象。结论 二膦酸盐对体外人骨肉瘤 MG-63 细胞株存在很强的诱导凋亡作用。

[关键词] 二膦酸盐类;骨肉瘤;细胞凋亡;MG-63 细胞株**[中图分类号]** R681.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)27-3757-03

Apoptotic effects of bisphosphonate in osteosarcoma MG-63 cells in vitro*

Maimaitaili¹, Jiang Renbing², Bai Jingping², Xu Wanlong^{2△}

(1. Department of Bone and Soft Connective Tissue Tumor, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of bisphosphonate on the inhibit proliferation and the apoptosis effect in osteosarcoma MG-63 cells in vitro, explore the phosphonic acid salt of bone sarcoma cells, induce apoptosis and its possible mechanism. **Methods** Sixty three osteosarcoma MG-63 cells were cultured in vitro. After treated with bisphosphonate 400 μg/mL, without bisphosphonate but normal saline, they were incubated 72 h after the application of the two group cell immunofluorescence test; then observe the expression of apoptosis factors Caspase 3 and Fas; Flow cytometry detection line was used to detect the osteosarcoma cell line MG-63 cells apoptosis rate of each group. **Results** 72 h after treatment with bisphosphonate, the expression of apoptosis factor of Caspase-3 and Fas in osteosarcoma MG-63 cells were strongly expressed, and it was observed by immunofluorescent assay, while in blank control group, we could barely see the expression of apoptosis factors Caspase-3 and Fas; Flow cytometry test results showed that two phosphonic acid salt 400 μg/mL intervention group cell apoptosis rate was 54.00%, far more than normal saline blank control group, of which the apoptosis rate was 3.10%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), there is an obvious phenomenon of induced apoptosis. **Conclusion** Bisphosphonate has a strong apoptotic effects of bisphosphonate in osteosarcoma MG-63 cells in vitro. Bisphosphonate can inhibit osteolysis of osteosarcoma MG-63 cells via regulating the expression of Caspase-3, Fas in osteosarcoma MG-63 cells. Bisphosphonate may serve as a potential therapeutic agent for treatment of osteosarcoma.

[Key words] bisphosphonates; osteosarcoma; apoptosis; MG-63 cells

骨肉瘤(Osteosarcoma)是一种好发于青少年,发病率高、恶性程度高、预后差的恶性肿瘤,但目前用于骨肉瘤的化疗药物缺乏特异性、敏感性,不良反应大^[1-3]。二膦酸盐(Bisphosphonates)最初用于治疗前列腺癌、乳腺癌骨转移的临床治疗,目前二膦酸盐已成为肿瘤研究的热点药物。二膦酸盐已被实验证明可对多种恶性肿瘤细胞产生抑制增殖、诱导凋亡的作用,但其能否对人骨肉瘤细胞产生抑制增殖、诱导凋亡的作用,以及其机制少见其他方面深入的报道。本文应用二膦酸盐直接作用于人骨肉瘤细胞,通过免疫荧光法检测人骨肉瘤细胞中凋亡因子 Caspase-3、Fas 的表达,通过流式细胞术检测细胞凋亡率,探讨二膦酸盐对人骨肉瘤细胞的诱导凋亡作用及其可能的作用机制,以期二膦酸盐应用于骨肉瘤的化疗奠定实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及主要试剂 人骨肉瘤细胞 MG-63 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,二膦酸盐购自瑞士 Novartis Pharma Stein AG 公司,批准文号:注册证号 H20090259。胎牛血清(FBS)购自美国 Sigma 公司。DMEM 高糖培养液(含青霉素和链霉素各 100 U/mL)购自宝信生物制品有限公司。免疫荧光检测 Caspase-3、Fas 试剂购自美国 Qiagen 公司,流式细胞术检测试剂购自美国 BD Syringe 公司。

1.2 细胞培养与分组 细胞培养与传代:MG-63 细胞培养于含体积分数 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液,置于在体积分数 5% CO₂ 孵育箱内 37℃ 恒温培养,待细胞长满瓶底后,弃掉培养液, PBS 冲洗 2 次,用 0.25% 的胰酶消化 7 min,镜下观察胞质回缩、细胞间隙增大,立即加入含血清培养液终止消化,吸

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360276);新疆维吾尔自治区卫生厅青年科技人才专项科研资金(2012Y07);新疆医科大学创新基金(XJC201157)。 作者简介:买买提艾力·哈斯木(1978-),副主任医师,硕士,主要从事骨与软组织肿瘤方面研究工作。 △ 通讯作者, E-mail: xuwanlong20082008@163.com。

管反复吹打成单细胞悬液,细胞计数,分瓶培养,取对数生长期细胞用于实验。细胞每隔 3~5 d 传代。细胞活力测定:细胞加入 0.4% 锥虫蓝,1.0~2.0 min 内在倒置显微镜下计数细胞总数和死亡细胞数,镜下观察,死细胞被染成淡蓝色,而活细胞拒染,以活细胞的百分数代表细胞活力。细胞计数法:采用血细胞计数法。用乙醇清洁计数板及盖玻片,制备单细胞悬液用枪头加入微量细胞悬液,不要溢出盖玻片。在显微镜下,用 10 倍物镜观察计数板四角大方格中的细胞数,细胞压中线时,只计数左侧和上方,不计右侧和下方。将计数结果代入公式:细胞数/毫升原液=(大格细胞总数/4)×10⁴×稀释倍数。每孔接种 5×10⁵ 个 MG-63 细胞于 96 孔板中,并将细胞均分为两组:二磷酸盐(400 μg/mL)干预组、生理盐水空白对照组,孵育 72 h 待用。

1.3 免疫荧光检测两组骨肉瘤细胞株 MG-63 细胞中凋亡因子 Caspase-3、Fas 的表达 将细胞接种于盖玻片上,细胞过夜贴壁,冷丙酮固定 1 min, PBS 洗 3 次,3% BSA 室温封闭 30 min,加一抗(用 1% BSA 稀释)放在湿盒里,4℃ 过夜, PBS 洗 3 次,加二抗(用 1% BSA 稀释)闭光反应 30 min, PBS 洗 3 次,滴入 DAPI,避光干燥后指甲油封片,荧光显微镜下观察两组人骨肉瘤 MG-63 细胞株中凋亡因子 Caspase-3、Fas 的表达情况。

1.4 流式细胞仪检测两组人骨肉瘤 MG-63 细胞株的细胞凋亡率 分别收集磷酸盐 400 μg/mL 干预组、生理盐水空白对照组作用 72 h 的 MG-63 细胞,每样本细胞数为每毫升 1×10⁵ 个,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。用孵育缓冲液洗涤 1 次,用 100 μL 的标记溶液重悬细胞。1 000 r/min 离心 5 min,沉淀细胞孵育缓冲液洗涤 1 次。加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 的 PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min。上 FACS-Claibur 流式细胞仪检测分析。结果判断标准:在双变量流式细胞仪的散点图上,左下象限显示活细胞(FITC-/PI-),右上象限是坏死细胞为(FITC+/PI+),而右下象限为显现凋亡细胞(FITC+/PI-)。

1.5 统计学处理 统计结果的处理采用 SPSS19.0 统计软件。计数资料用率表示,两组之间比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 荧光显微镜下观察两组人骨肉瘤 MG-63 细胞株中凋亡因子 Caspase-3、Fas 的表达 二磷酸盐作用于人骨肉瘤 MG-63 细胞株 72 h 后,免疫荧光检测结果可见二磷酸盐 400 μg/mL 干预组细胞中凋亡因子 Caspase-3、Fas 大量表达,Caspase-3 阳性的细胞均发出绿色荧光,细胞核发出蓝色荧光(图 1),Fas 阳性的细胞均发出绿色红光(图 2),细胞核发出蓝色荧光;而生理盐水空白对照组几乎见不到凋亡因子 Caspase-3、Fas 的阳性表达,只能见到细胞核发出的蓝色荧光(图 3~4)。

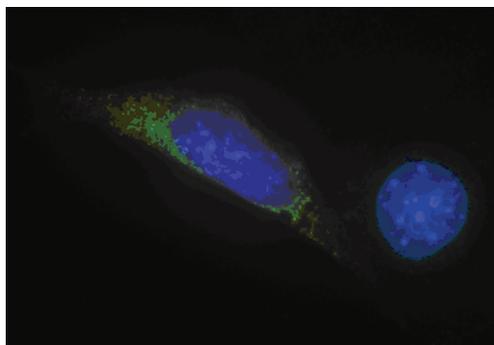


图 1 二磷酸盐干预组细胞中 Caspase-3 表达 (Caspase-3-FITC ×400)

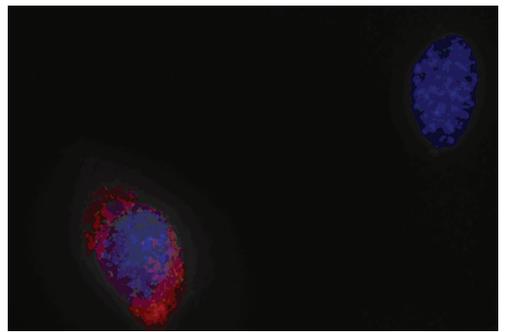


图 2 二磷酸盐干预组细胞中 Fas 表达 (Fas-TRITC ×400)

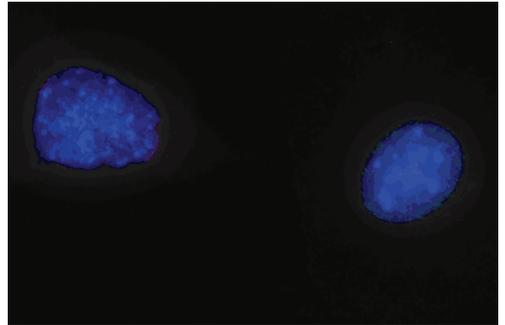


图 3 生理盐水空白对照组细胞中 Caspase-3 表达 (Caspase-3-FITC ×400)

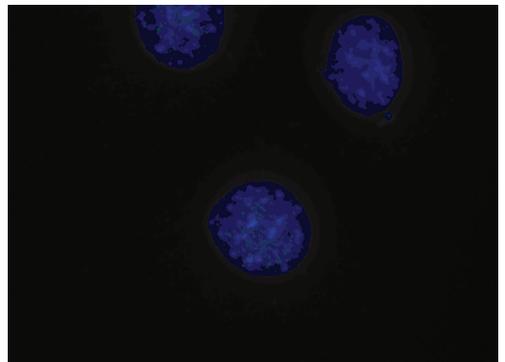


图 4 生理盐水空白对照组细胞中 Fas 表达 (Fas-TRITC ×400)

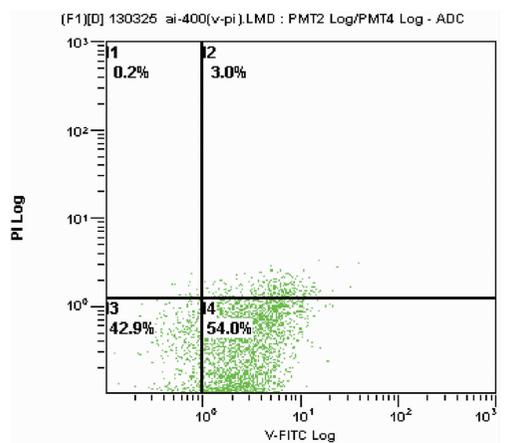


图 5 二磷酸盐干预组细胞凋亡图

2.2 流式细胞仪检测两组人骨肉瘤 MG-63 细胞株的细胞凋亡率 二磷酸盐作用于人骨肉瘤 MG-63 细胞株 72 h 后,流式细胞仪检测结果提示:二磷酸盐干预组细胞的细胞凋亡率为

54.00% (图 5), 远大于生理盐水空白对照组的细胞凋亡率 3.10% (图 6), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 存在明显的诱导凋亡现象。

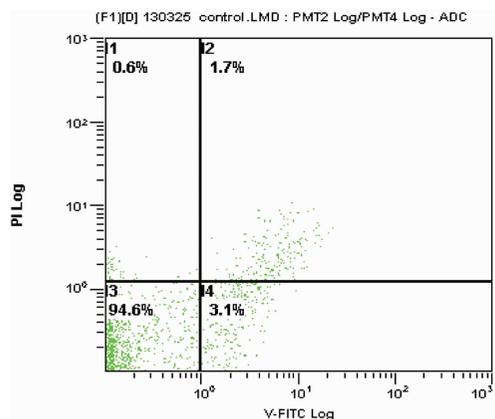


图 6 生理盐水空白对照组细胞凋亡图

3 讨论

在临床上骨肉瘤是一种起源于间叶组织的恶性肿瘤, 在原发性骨肿瘤中发病率最高, 约占 35%, 好发于青少年, 恶性程度高, 远处转移早, 预后差。骨肉瘤细胞的凋亡过程是一个精确调控的过程, 骨肉瘤细胞的凋亡涉及细胞内许多基因的调控, 而某些基因的表达在抑制肿瘤生长、促进骨肉瘤细胞凋亡方面具有重要意义^[4-7]。骨肉瘤细胞的凋亡受多种凋亡通路的调控, 其中 Caspase 和 Fas/FasL 系统在这个过程中起最为关键的作用^[8-9]。细胞的凋亡信号通过细胞膜受体途径 (Fas/FasL) 或线粒体途径传导, 依次激活起始凋亡途径中的 Caspase-8、Caspase-9, 继而连锁激活下游转导通路和信号的关键执行分子 Caspase-3, 最后开启了继而骨肉瘤细胞的启动凋亡过程^[10-12]。

本研究结果可见经二磷酸盐作用于人骨肉瘤 MG-63 细胞株 72 h 后, 细胞中凋亡因子 Caspase-3、Fas 大量表达, 而生理盐水空白对照组几乎见不到以上两种因子的阳性表达, 提示二磷酸盐可以通过激活人骨肉瘤 MG-63 细胞株中的 Caspase 和 Fas/FasL 的细胞凋亡信号通路。这与文献^[13-14]的研究结果相似, 他们认为 Fas 基因是骨肉瘤细胞凋亡的关节调控基因, Fas 基因在人类染色体 10q 区域, 它所产生的小分子属于神经生长因子/肿瘤坏死因子 (NGF/TNF) 的 I 型跨膜受体蛋白。二磷酸盐可以通过诱导 Fas 来开启细胞程序性死亡的开始, 并在人骨肉瘤细胞内不断将此信号逐级放大, 将信号通过相应受体导入细胞核, 从而导致肿瘤细胞的凋亡。这个结果也被 Yang 等^[15]所证实, 他认为数字 Caspase 本质属于天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶, 目前有 14 种 Caspase 家族成员发现, 以上 Caspase 家族成员均具有蛋白质酶切作用, 其中在骨肉瘤凋亡过程中其最重要的便是 Caspase-3 蛋白。Caspase-3 位于凋亡通路的下游, 可被上游的同家族蛋白 Caspase-8、Caspase-9 所激活, 是细胞凋亡的具体执行者。

本研究结果提示, 二磷酸盐作用于人骨肉瘤 MG-63 细胞株 72 h 后, 细胞中凋亡因子 Caspase-3、Fas 大量表达, 表明在骨肉瘤细胞的凋亡过程中, Fas、FasL 和 Caspase 家族在细胞凋亡过程中分别起着发出凋亡死亡信号、感知并转导信号且逐级放大至细胞内部、接受信号激活级联反应并产生效应等一系列作用, 这与赵意华等^[16]的研究结果相同。此系统是细胞凋亡的最主要途径之一, 其中 Caspase 蛋白的表达是各种细胞凋

亡机制的最后共同通路, 在细胞的信号传递过程中处于重要地位。因此作者认为药物治疗恶性骨肉瘤过程中, Caspase 和 Fas/FasL 系统的激活是导致骨肉瘤细胞凋亡最关键的一环。

本文研究结果提示, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的二磷酸盐作用于人骨肉瘤 MG-63 细胞株 72 h 后细胞凋亡率为 54.00%, 表示临床上实用小剂量的二磷酸盐即可对骨肉瘤有很好的治疗作用, 提示二磷酸盐可作为新一类敏感而有效、且全身不良反应小的药物应用于临床。因此作者认为这就可以减少以下临床问题: 现有化疗药大多为细胞毒性药物, 无特异性, 敏感性不高, 新辅助化疗的大剂量长期联合用药不良反应大, 容易出现骨髓抑制、心肌、肾脏、性腺等损害, 肿瘤的耐药性等问题没有解决, 化疗药物的敏感性评价较困难等等。而二磷酸盐低剂量即可有很好的体外骨肉瘤抑制作用, 且敏感性高, 非细胞毒性药物, 全身不良反应小。

本研究结果显示, 二磷酸盐对体外人骨肉瘤 MG-63 细胞株存在很强的诱导凋亡作用, 且结合二磷酸盐处理后的人骨肉瘤 MG-63 细胞株凋亡因子 Caspase-3、Fas 大量表达, 初步证实二磷酸盐有抑制骨肉瘤细胞生长, 促进凋亡的作用; 而且作者认为二磷酸盐是通过上调人骨肉瘤 MG-63 细胞株中促凋亡基因 Fas 的表达, 所以骨肉瘤细胞中的 Fas/FasL 和 Caspase 介导的死亡信号转导系统则可能是其作用机制之一。

二磷酸盐如果被证实对人骨肉瘤细胞具有诱导凋亡作用, 再结合其亦能抑制因破骨活性增加而导致的骨吸收, 那在临床上即可杀灭肿瘤, 又可抑制骨肉瘤的溶骨性破坏, 具有以上双重特点的二磷酸盐将在人骨肉瘤的治疗中具有极高的临床应用价值。

参考文献

- [1] Chang IC, Chiang TI, Lo C, et al. Anemone altaica Induces Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(5): 1031-1042.
- [2] Van De Luijngaarden AC, Kapusta L, Bellersen L, et al. High prevalence of late adverse events in malignant bone tumour survivors diagnosed at adult age[J]. Neth J Med, 2014, 72(10): 516-522.
- [3] Akpinar B, Obuch J, Fukami N, et al. Unusual presentation of a pancreatic cyst resulting from osteosarcoma metastasis[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(27): 8452-8457.
- [4] 徐万龙, 孙治国, 王浩, 等. 醋酸棉酚抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖[J]. 食品与药品, 2011, 13(3): 162-164.
- [5] 徐江波, 孙俊刚, 袁宏, 等. 三维适形调强放疗对骨细粒棘球蚴生发细胞生长及凋亡影响的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(7): 821-823.
- [6] 徐万龙, 孙治国, 王浩, 等. 双磷酸盐对人骨肉瘤细胞株 MG-63 细胞中 OPG/RANKL 表达的影响[J]. 食品与药品, 2011, 13(9): 315-318.
- [7] 樊勤学, 徐江波, 袁宏, 等. IMRT 对新疆大鼠继发性骨棘球蚴杀灭效果的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(7): 824-826, 829.
- [8] Xu WL, Xilinbaoleri, Liu H, et al. Spinal cord biological safety of image-guided radiation therapy versus conventional radiation therapy [J]. Neural Regeneration Research, 2012, 7(35): 2755-2760. (下转第 3762 页)

一。研究发现,偏头痛发作时颈外静脉血中 CGRP 的含量增加,但同一时刻肘静脉血中 CGRP 的含量并无明显变化,此现象提示偏头痛发作时颅内释放 CGRP 增加^[11]。CGRP 在神经系统中具有增强突触传递的作用。动物实验发现,脊髓背角突触后神经元 AMPA 型谷氨酸受体与 CGRP 受体共表达,外源性给予 CGRP 预处理可以明显增加这些神经元对 AMPA 的放电频率,同时也发现 CGRP 拮抗剂 CGRP8-37 可以阻断这种反应^[12]。当 CGRP 水平升高时,感觉传入信号可能被异常放大而超过疼痛的阈值,CGRP 起到传递和扩大痛觉信号的作用^[13]。另外,CGRP 在中脑还可以减弱内源性阿片肽的镇痛效应^[4]。本研究发现,都梁软胶囊预防性治疗的偏头痛大鼠中脑 CGRP mRNA 表达明显低于偏头痛组大鼠,说明都梁软胶囊预防性治疗可以抑制偏头痛发作时模型大鼠中脑 CGRP 的基因表达,这样一方面可以减弱 CGRP 对痛觉信息的传递作用;另一方面可以抵抗 CGRP 对阿片肽镇痛作用的抑制效应。

脑中与痛觉调制相关的脑区均有 CCK 存在,动物实验发现在神经损伤后及摄入阿片后 CCK 水平都会上升,提示 CCK 是阿片拮抗剂,当 CCK 水平升高时,阿片所诱发的镇痛作用便大大减弱了,但若同时使用 CCK 拮抗剂,则阿片的镇痛作用增强^[4]。因此,目前认为 CCK 在内源性痛觉调制系统中的作用主要是拮抗阿片镇痛^[4,14]。本研究显示都梁软胶囊对对照组大鼠中脑 CCK mRNA 拷贝数明显低于对照组和偏头痛组,说明都梁软胶囊可以抑制大鼠中脑 CCK 的基因表达,都梁软胶囊下调 CCK 的表达会减弱 CCK 对阿片镇痛的拮抗作用,从而,一定程度上增强了内源性阿片肽的镇痛效应。但研究结果并未发现都梁软胶囊治疗组大鼠中脑 CCK 基因表达与对照组及偏头痛组有显著性差异,说明大鼠偏头痛发作时中脑 CCK 基因表达并未发生明显的下调,考虑与偏头痛病理生理过程复杂有关,同时也提示都梁软胶囊镇痛机制可能与其调节 CCK 的表达无直接关系。

参考文献

- [1] Schulte LH, May A. Headache research in 2014: advancing migraine therapy[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(1): 6-7.
- [2] 马保成,武凯歌,谢伟彬. 都梁软胶囊治疗偏头痛的 Meta 分析[J]. *中医学报*, 2014, 29(4): 612-614.
- [3] Yao G, Man Y, Luo X, et al. Rizatriptan benzoate influ-

ences the endogenous pain modulatory system in a rat model of migraine [J]. *Neural Regeneration Research*, 2012, 7(2): 131-135.

- [4] 谢启文. 神经肽[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 29-75.
- [5] Yao G, Man Y, Qi J, et al. Effects of toutongning capsule on enkephalin in a rat migraine headache model[J]. *Neural Regeneration Res*, 2011, 6(9): 661-665.
- [6] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2163-2196.
- [7] Yu S, Liu R, Zhao G, et al. The prevalence and burden of primary headaches in China: a population-based door-to-door survey[J]. *Headache*, 2012, 52(4): 582-591.
- [8] 中华医学会疼痛学分会头痛学组. 中国偏头痛诊疗指南[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2011, 17(2): 65-86.
- [9] 郭冉冉,周廷惠,徐李,等. 都梁软胶囊治疗头痛的药理机制及临床疗效[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(2): 48-49.
- [10] 李伟仕,黄志勇,吴修信. 都梁软胶囊预防性治疗偏头痛的临床疗效观察[J]. *中国医药指南*, 2010, 8(9): 12-14.
- [11] Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache [J]. *Ann Neurol*, 1990, 28(2): 183-187.
- [12] Gu XL, Yu LC. The colocalization of CGRP receptor and AMPA receptor in the spinal dorsal Horn neuron of rat: A morphological and electrophysiological study[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 414(3): 237-241.
- [13] Raddant AC, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e36.
- [14] Yao G, Han X, Hao T, et al. Effects of rizatriptan on the expression of calcitonin gene-related peptide and cholecystokinin in the periaqueductal gray of a rat migraine model[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 587(1): 29-34.

(收稿日期: 2016-02-15 修回日期: 2016-04-06)

(上接第 3759 页)

- [9] Xu WL, Tayerjiang JL, Zhao XB, et al. Study of optimal scheme of spinal image-guided radiotherapy based on expression of caspase-3 in spinal cord neurons by orthogonal design[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 3223-3233.
- [10] 江仁兵,徐万龙,锡林宝勒日,等. 经皮椎体成形术治疗对 83 例胸腰椎转移瘤的疗效分析[J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3231-3232, 3235.
- [11] Xu W, Zhao X, Wang Q, et al. Three-dimensional conformal intensity-modulated radiation therapy of left femur foci does not damage the sciatic nerve[J]. *Neural Regeneration Research*, 2014, 9(20): 1824-1829.
- [12] 徐万龙,锡林宝勒日,白靖平. 犬脊柱放疗对脊髓血管形态及血流量的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3168-3169.
- [13] Paronetto MP, Bernardis I, Volpe E, et al. Regulation of

FAS exon definition and apoptosis by the Ewing sarcoma protein[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(4): 1211-1226.

- [14] Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, et al. Valproic acid cooperates with hydralazine to augment the susceptibility of human osteosarcoma cells to Fas- and NK cell-mediated cell death[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 83-91.
- [15] Yang SJ, Lee SA, Park MG, et al. Induction of apoptosis by diphenyldifluoroketone in osteogenic sarcoma cells is associated with activation of caspases [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5): 2286-2292.
- [16] 赵意华,陈清汉,华海婴,等. 氯化锂对人骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖、凋亡及 Fas、Caspase-3mRNA 表达的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2012, 47(4): 502-505.

(收稿日期: 2016-02-10 修回日期: 2016-04-06)