

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.04.010

枸橼苷对人骨肉瘤 U-2 OS 细胞的抑制作用*

唐捷,张丕军,林维,李超艺[△]

(海南医学院第二附属医院骨科二区,海南 海口 570311)

摘要:目的 探讨枸橼苷对人骨肉瘤 U-2 OS 细胞的抑制作用。方法 分别以 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$ 的枸橼苷处理 U-2 OS 细胞,检测细胞活力并计算枸橼苷对 U-2 OS 细胞的半数抑制浓度(IC_{50});U-2 OS 细胞实验分为空白对照组[等体积磷酸盐缓冲液(PBS)]和枸橼苷高、低剂量组(52, 26 $\mu\text{mol/L}$),慢病毒转染细胞实验分为枸橼苷组(A组, 52 $\mu\text{mol/L}$)、空白对照组(B组, 等体积 PBS)、枸橼苷对照组(C组, 52 $\mu\text{mol/L}$ + 50 MOI pLVX-EGFP-C1)、枸橼苷 + FBXO2 组(D组, 52 $\mu\text{mol/L}$ + 50 MOI pLVX-EGFP-C1-FBXO2)。采用 CCK-8 法检测细胞活力,集落形成实验检测细胞增殖情况,反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测细胞 FBXO2 mRNA 表达水平,Western blot 法检测细胞 FBXO2, LC3 I, LC3 II, Beclin1, p62, p-STAT3, STAT3 蛋白表达水平。结果 枸橼苷对 U-2 OS 细胞的 IC_{50} 为 52.08 $\mu\text{mol/L}$ 。与空白对照组比较,枸橼苷高、低剂量组细胞在 24, 48, 72 h 时的细胞活力显著减弱($P < 0.05$),克隆形成数显著减少($P < 0.05$),LC3 II / LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),p62 蛋白表达水平、FBXO2 mRNA 和蛋白表达水平、p-STAT3 / STAT3 均显著降低($P < 0.05$);与 C 组比较, D 组细胞在 24, 48, 72 h 时的活力显著增强($P < 0.05$),克隆形成数显著增加($P < 0.05$),LC3 II / LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),p62 蛋白表达水平、FBXO2 mRNA 和蛋白表达水平、p-STAT3 / STAT3 均显著升高($P < 0.05$)。结论 枸橼苷可抑制 U-2 OS 细胞的增殖,并促进其自噬,其机制可能与抑制 FBXO2 的表达从而抑制 STAT3 通路激活有关。

关键词:骨肉瘤细胞;U-2 OS 细胞;枸橼苷;FBXO2;增殖;自噬

中图分类号:R965

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)04-0037-07

Inhibitory Effect of Poncirin on Human Osteosarcoma U-2 OS Cells

TANG Jie, ZHANG Pijun, LIN Wei, LI Chaoyi

(Department of Orthopedics II, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570311)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of poncirin on human osteosarcoma U-2 OS cells. **Methods** U-2 OS cells were treated with different concentrations of poncirin (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$), the cell viability was detected and the half inhibitory concentration (IC_{50}) of poncirin on U-2 OS cells was calculated. U-2 OS cells were divided into the blank control group [equal volume of phosphate buffer solution (PBS)] and poncirin high- and low-dose groups (52, 26 $\mu\text{mol/L}$). Lentivirus transfection cells were divided into the poncirin group (group A, 52 $\mu\text{mol/L}$ of poncirin), blank control group (group B, equal volume of PBS), poncirin control group (group C, 52 $\mu\text{mol/L}$ + 50 MOI pLVX-EGFP-C1), poncirin + FBXO2 group (group D, 52 $\mu\text{mol/L}$ + 50 MOI pLVX-EGFP-C1-FBXO2). The cell viability was detected by CCK-8 method, cell proliferation was detected by the colony formation assay, and the expression level of FBXO2 mRNA was detected by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression levels of FBXO2, LC3 I, LC3 II, Beclin1, p62, p-STAT3 and STAT3 protein were detected by the Western blot. **Results** The IC_{50} of poncirin on U-2 OS cells was 52.08 $\mu\text{mol/L}$. Compared with those in the blank control group, the cell viability of U-2 OS cells decreased significantly at 24, 48 and 72 h ($P < 0.05$), the number of clone cells decreased significantly ($P < 0.05$), the expression levels of LC3 II / LC3 I and Beclin1 protein increased significantly ($P < 0.05$), while the expression levels of p62 protein, FBXO2 mRNA and protein, and the p-STAT3 / STAT3 decreased significantly in the high- and low-dose groups ($P < 0.05$). Compared with those in group C, the viability of U-2 OS cells increased significantly at 24, 48 and 72 h ($P < 0.05$), the number of clone cells increased significantly ($P < 0.05$), the expression levels of LC3 II / LC3 I and Beclin1 protein decreased significantly ($P < 0.05$), while the expression levels of p62 protein, FBXO2 mRNA and protein, and the levels of p-STAT3 / STAT3 increased significantly in group D ($P < 0.05$). **Conclusion** Poncirin can inhibit the proliferation of U-2 OS cells and promote autophagy. Its mechanism may be related to inhibiting the expression of FBXO2 and inhibiting the activation of the STAT3 pathway.

Key words: osteosarcoma cells; U-2 OS cells; poncirin; FBXO2; proliferation; autophagy

骨肉瘤是常见于儿童和青少年的原发性骨恶性肿瘤,属于肿瘤细胞直接形成的未成熟骨或类骨组织。在过去 10 年中,骨肉瘤发病率每年增长 0.3%^[2]。目前,骨肉

*基金项目:海南省卫生计生行业科研项目[19A20185]。

第一作者:唐捷,男,大学本科,主治医师,研究方向为关节、骨创伤病的治疗,(电子信箱)drift1982@163.com。

[△]通信作者:李超艺,男,大学本科,副主任医师,研究方向为骨创伤病的治疗,(电子信箱)li35499015@126.com。

瘤的治疗方案包括手术切除联合放射治疗和化学治疗(放疗),通过治疗,局部骨肉瘤患者5年生存率提高至60%,但晚期骨肉瘤难以治愈^[3],故探索新的骨肉瘤治疗方案具有重要意义。枸橼苷属黄烷酮苷,具有抗氧化、抗菌、抗炎等多种生物活性^[4]。目前,关于枸橼苷对骨肉瘤细胞的作用及其分子机制的文献报道较少。F-box only protein 2(FBXO2)也称为FBX2, Fbs1, NFB42, 属F-box蛋白家族,是Skp1-Cul1-F-box蛋白E3泛素连接酶复合物的底物识别成分,对高甘露糖糖蛋白具有特异性^[5]。一项关于胃癌的研究表明,FBXO2的表达水平与淋巴结转移高度相关,FBXO2高表达患者的总生存率显著低于FBXO2低表达患者;同时,FBXO2可促进胃癌细胞增殖、迁移和上皮间充质转化^[6]。该研究结果提示了FBXO2在肿瘤发生中的重要作用。本研究中探讨了枸橼苷对人骨肉瘤U-2 OS细胞的抑制作用,及其作用机制是否与调控FBXO2的表达相关。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:Thermo HERA cell 150i型细胞培养箱、7500型反转录聚合酶链反应仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Read Max 1900 plus型酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司);DS-500型微量分光光度计(屹谱仪器制造<上海>有限公司);PowerPac Universal型电泳仪(美国Bio-Rad公司);Tanon 4800型化学发光成像仪(上海天能科技有限公司);MF43-M型显微镜(广州市明美光电技术有限公司)。

试剂:枸橼苷(成都仪睿生物科技有限公司,批号为DG0073,含量 $\geq 98\%$);CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号为C0037);FBXO2过表达载体(pLVX-EGFP-C1-FBXO2)和阴性对照(pLVX-EGFP-C1,NC)及两者对应的慢病毒包装(汉恒生物科技<上海>有限公司);Trizol试剂(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号为15536749);2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix(美国Bimake公司,批号为B21202);FBXO2抗体(批号为ab133717)、LC3B抗体(批号为ab192890)、Beclin1抗体(批号为ab210498)、p62抗体(批号为ab109012),均购自英国Abcam公司;p-STAT3抗体(批号为4074s)、STAT3抗体(批号为9139s),均购自美国Cell Signaling Technology公司;GAPDH抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号为10494-1-AP);超敏ECL化学发光工作液(上海翊圣生物科技有限公司,批号为36208ES60)。

细胞:人骨肉瘤细胞株U-2 OS(上海继和生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

U-2 OS细胞用含10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基,于37℃及5%CO₂培养箱中培养。待细胞密度为80%~90%时,用胰酶液消化细胞,以含10%FBS的RPMI 1640培养基重悬细胞,按1:3比例传代培养。

1.2.2 枸橼苷对U-2 OS细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)

取对数生长期的U-2 OS细胞,接种至96孔板中(5×10^3 个/孔),于37℃及5%CO₂培养箱中继续培养24 h。将细胞分为枸橼苷①组、②组、③组、④组、⑤组、⑥组、⑦组(分别予枸橼苷0,5,10,20,40,80,160 $\mu\text{mol/L}$),每组设3个复孔。另设空白组,仅有培养基和枸橼苷溶液。每孔加入相应药液继续培养24 h,再加入10 μL CCK-8反应液,37℃孵育4 h后,检测450 nm波长处的吸光度(OD),平行操作3次。细胞活力(%) = $(OD_{\text{枸橼苷组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{枸橼苷①组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$,以GraphPad Prism 5.0软件计算枸橼苷对U-2 OS细胞的IC₅₀。

1.2.3 U-2 OS细胞实验

分组:分为空白对照组[等体积磷酸盐缓冲液(PBS)]和枸橼苷低、高剂量组(26 $\mu\text{mol/L}$ 和52 $\mu\text{mol/L}$)。

细胞活力:采用CCK-8法检测。取对数期生长的U-2 OS细胞,接种至96孔板中(5×10^3 个/孔),于37℃及5%CO₂培养箱中分别培养0,24,48,72 h;每孔加入10 μL CCK-8反应液,37℃培养箱中孵育4 h,检测各孔在450 nm波长处的OD。每组设3个复孔,实验重复3次。

细胞增殖:采用集落形成实验。取对数生长期的U-2 OS细胞,接种至24孔板中(300个/孔),于37℃及5%CO₂培养箱中连续培养2周。弃去培养基,以4%多聚甲醛固定细胞,用0.1%结晶紫染液染色1 h,以流水缓慢洗去染液,室温下干燥。记录各组细胞克隆形成数。

FBXO2 mRNA表达水平:采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法。收集转染后的U-2 OS细胞,采用Trizol法提取总RNA。采用微量分光光度计测定RNA的浓度,并反转录制备cDNA。引物序列,FBXO2,上游(5'-3') ACTTGGAAGGCTGGTGTGAC,下游(5'-3') TCAAAGGAGGAGCGGAAGTA;GAPDH,上游(5'-3') GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT,下游(5'-3') GGGGT-CATTGATGGCAACA。反应程序,95℃、5 min;95℃、15 s,60℃、30 s,72℃、30 s,40个循环;95℃、15 s;60℃、60 s;95℃、15 s。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算FBXO2 mRNA的相对表达水平。

细胞中FBXO2, LC3 I, LC3 II, Beclin 1, p62, p-STAT3, STAT3蛋白表达水平:采用Western blot法。收集U-2 OS细胞,以RIPA裂解液裂解细胞。4℃、12 000 r/min离心20 min,取上清液,采用BCA法检测蛋白含量。取30 μg上样,10% SDS-PAGE电泳后电转。以封闭液室温封闭2 h,加入FBXO2(1:1 000, V/V), LC3B(1:1 000, V/V), Beclin1(1:1 000, V/V), p62(1:1 000, V/V), p-STAT3(1:2 000, V/V), STAT3(1:2 000, V/V), GAPDH(1:5 000, V/V)抗体,4℃孵育过夜。以辣根过氧化物酶标记二抗(1:2 000, V/V)室温孵育1 h。加超敏ECL化学发光工作液,采用化学发光成像仪检测蛋白条带。通过Image J软件将条带灰度值数字化,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白的相对表达水平。

1.2.4 慢病毒转染细胞实验

分组:分为枸橼苷组(A组)、空白对照组(B组)、枸橼苷对照组(C组, 52 μmol/L)、枸橼苷+FBXO2组(D组, 52 μmol/L)。A组仅加入枸橼苷(52 μmol/L)及相应培养基;B组仅加入等体积PBS及相应培养基。

慢病毒转染:取对数生长期的U-2 OS细胞,接种至96孔板中(4×10^5 个/孔),于37℃及5% CO₂培养箱中培养48 h;弃去旧培养基,加入含5 μg/mL polybrene和2% FBS的RPMI 1640培养基,C组加入50 MOI NC(pLVX-EGFP-C1),D组加入50 MOI FBXO2(pLVX-EGFP-C1-FBXO2),B组加入等体积PBS,4组均培养48 h;弃去旧培养基,更换含10% FBS的RPMI 1640培养基,各孔加入相应药液,继续培养48 h。

检测指标及方法:同1.2.3项。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 U-2 OS 细胞实验

IC₅₀实验结果显示,枸橼苷对U-2 OS细胞的IC₅₀为52.08 μmol/L。故后续实验中枸橼苷对U-2 OS细胞的抑制浓度选用为26,52 μmol/L。

细胞活力和增殖:与空白对照组比较,枸橼苷低、高剂量组U-2 OS细胞在24,48,72 h时的细胞活力显著减弱,克隆形成数显著减少($P < 0.05$)。详见图1。

细胞自噬:与空白对照组比较,枸橼苷低、高剂量组U-2 OS细胞中LC3 II/LC3 I和Beclin1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),p62蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。详见图2。

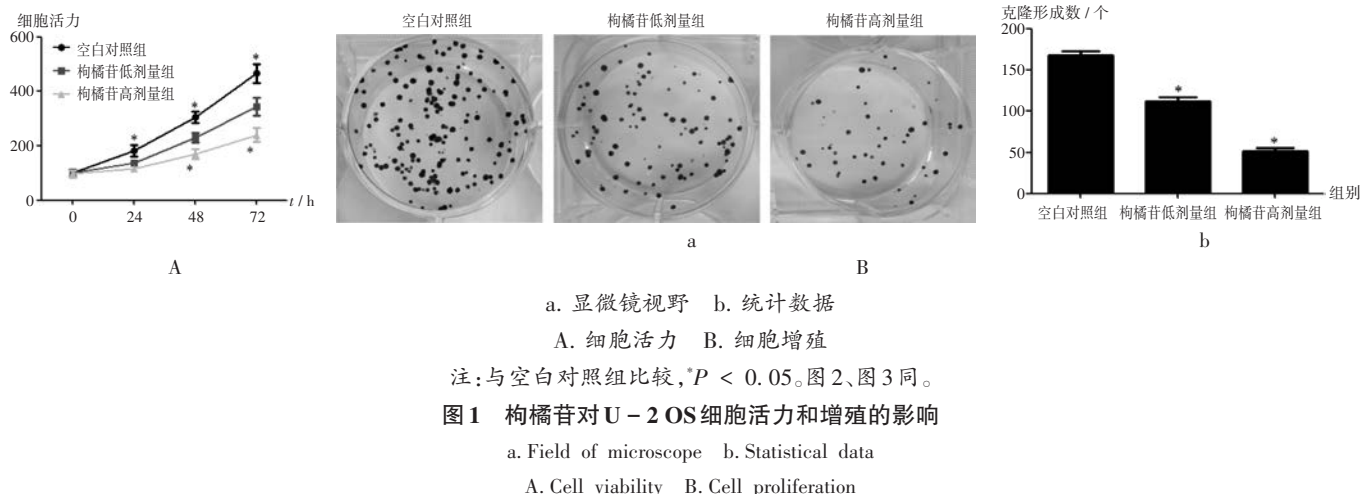
细胞中FBXO2表达和STAT3通路:与空白对照组比较,枸橼苷低、高剂量组U-2 OS细胞中FBXO2 mRNA和蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),p-STAT3/STAT3显著降低($P < 0.05$)。详见图3。

2.2 慢病毒转染细胞实验

细胞活力和增殖:与B组比较,A组U-2 OS细胞在培养24,48,72 h时活力显著减弱($P < 0.05$),克隆形成数显著减少($P < 0.05$);与C组比较,D组U-2 OS细胞在24,48,72 h时的细胞活力显著增强($P < 0.05$),克隆形成数显著增加($P < 0.05$)。详见图4。

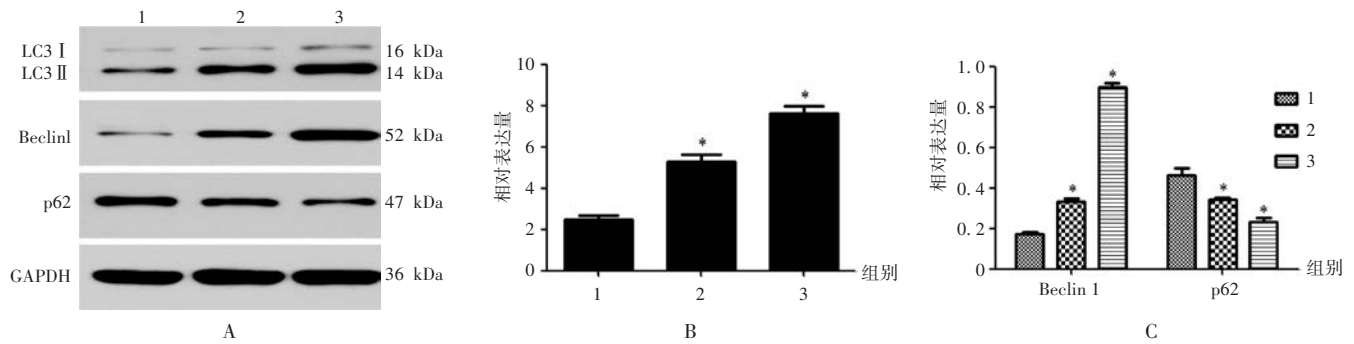
细胞中FBXO2 mRNA和蛋白表达:与B组比较,A组U-2 OS细胞中FBXO2 mRNA和蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与C组比较,D组U-2 OS细胞中FBXO2 mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。详见图5。

细胞自噬:与B组比较,A组U-2 OS细胞中LC3 II/LC3 I和Beclin1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),p62蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与C组比较,



Note: Compared with those in the blank control group, $*P < 0.05$ (for Fig. 1-3).

Fig. 1 Effect of poncirin on the viability and proliferation of U-2 OS cells



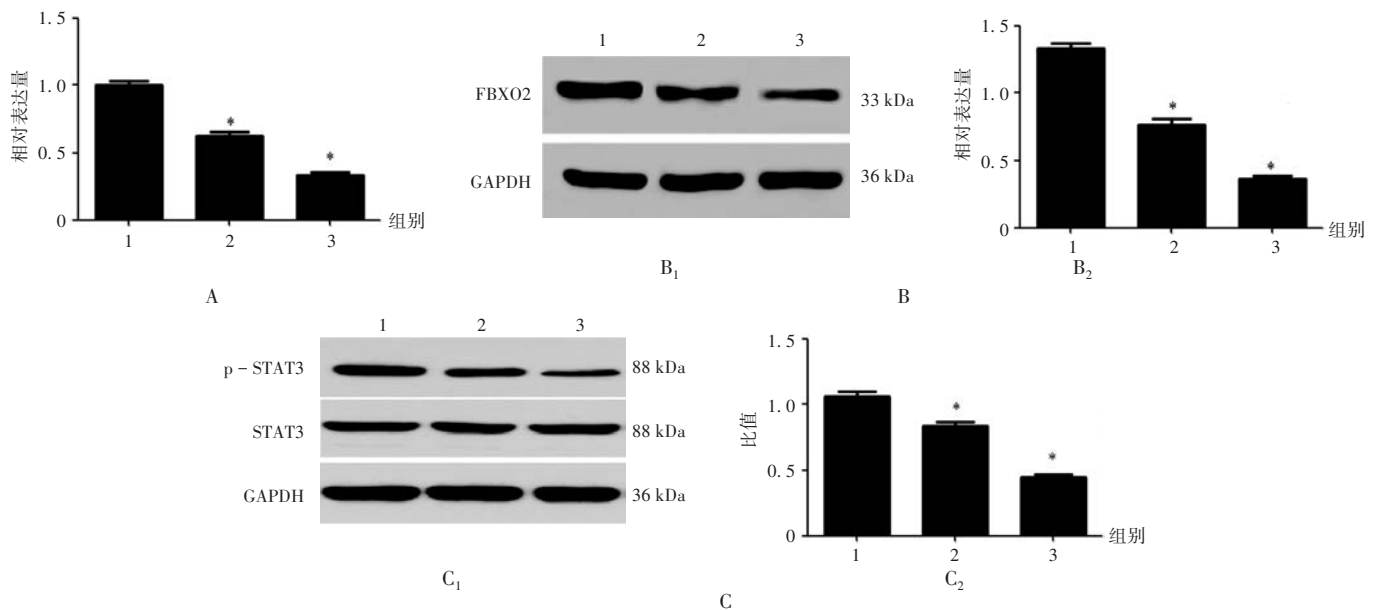
1. 空白对照组 2. 枸橼苷低剂量组 3. 枸橼苷高剂量组

A. 电泳图 B. LC3 II / LC3 I C. Beclin1、p62 蛋白表达

图2 枸橼苷对 U-2 OS 细胞自噬的影响

1. Blank control group 2. Poncirin low-dose group 3. Poncirin high-dose group
A. Electrophoretogram B. LC3 II / LC3 I C. Expression of Beclin1 and p62 protein

Fig. 2 Effect of poncirin on the autophagy of U-2 OS cells



1. 空白对照组 2. 枸橼苷低剂量组 3. 枸橼苷高剂量组

B₁, C₁. 电泳图 B₂, C₂. 统计数据

A. FBXO2 mRNA 表达 B. FBXO2 蛋白表达 C. p-STAT3 / STAT3

图3 枸橼苷对 U-2 OS 细胞 FBXO2 表达和 STAT3 通路的影响

1. Blank control group 2. Poncirin low-dose group 3. Poncirin high-dose group
B₁, C₁. Electrophoretogram B₂, C₂. Statistical data

A. Expression of FBXO2 mRNA B. Expression of FBXO2 protein C. p-STAT3 / STAT3

Fig. 3 Effect of poncirin on the FBXO2 expression and STAT3 pathway in U-2 OS cells

D 组 U-2 OS 细胞中 LC3 II / LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。详见图 6。

慢病毒转染细胞 STAT3 通路: 与 B 组比较, A 组 U-2 OS 细胞中 p-STAT3 / STAT3 显著降低 ($P < 0.05$); 与 C 组比较, D 组 U-2 OS 细胞中 p-STAT3 / STAT3 显著升高 ($P < 0.05$)。详见图 7。

3 讨论

骨肉瘤是原发性骨癌的一种高分级形式, 约 20%

的患者诊断时发现已转移^[7]。现临床采用手术切除原发性肿瘤联合化疗, 但约 1/3 的患者出现转移性疾病^[8]。

类黄酮属多酚类化合物, 包括黄酮类、黄烷醇类、花青素类、原花青素类、异黄酮类等成分^[9]。枸橼苷属富含黄烷酮的苷类物质, 可通过介导胃癌细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用^[10]。此外, 枸橼苷可增强顺铂耐药骨肉瘤细胞对顺铂的敏感性, 促进细胞凋亡^[11]。自噬在肿瘤细胞迁移和侵袭、肿瘤干细胞维持、治疗抵抗及肿瘤细胞与其微环境之间的交互作用中发挥了关键作

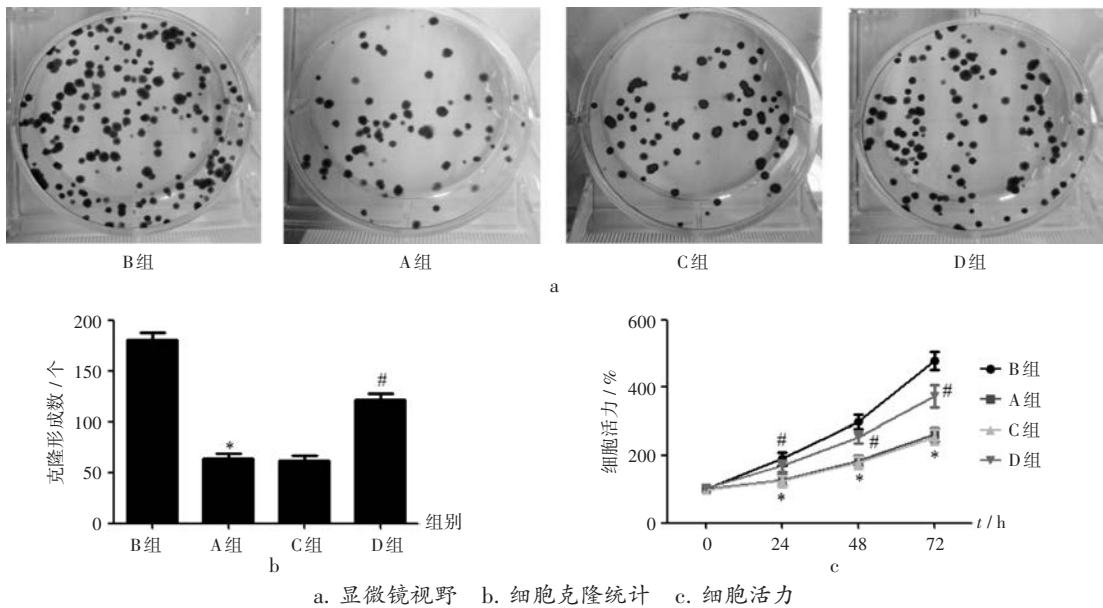


图4 过表达FBXO2逆转枸橼苷对U-2 OS细胞增殖的影响
注:与B组比较,* $P < 0.05$;与C组比较,# $P < 0.05$ 。图5至图7同。

a. Field of microscope b. Statistics data of clone cells c. Cell viability

Fig. 4 Effect of ponciran on the proliferation of U-2 OS cells by the overexpression of FBXO2 reverses

Note: Compared with those in group B, * $P < 0.05$ (for Fig. 4-7); Compared with those in group C, # $P < 0.05$ (for Fig. 4-7).

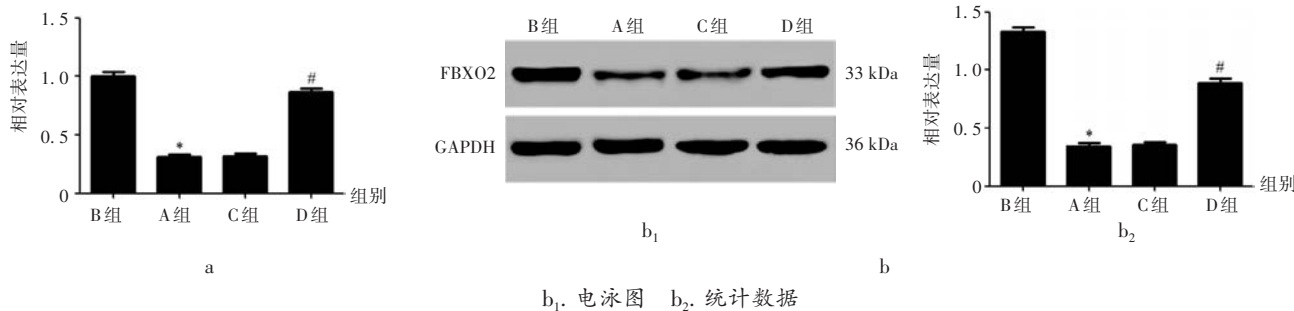


图5 U-2 OS细胞中FBXO2的表达

a. Expression of FBXO2 mRNA b. Expression of FBXO2 protein

Fig. 5 Expression of FBXO2 in U-2 OS cells

用^[12]。有研究表明,虎杖苷可显著抑制骨肉瘤细胞的增殖,增加其自噬通量;暴露于自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤后,虎杖苷诱导的细胞自噬显著减弱,而细胞存活率升高^[13]。本研究结果显示,枸橼苷可抑制U-2 OS细胞增殖,提高U-2 OS细胞中LC3 II / LC3 I 和 Beclin1 蛋白的表达水平,抑制p62蛋白表达水平的升高,提示枸橼苷可抑制U-2 OS细胞增殖并诱导细胞自噬。

大多数F-box蛋白通过调控参与肿瘤标志性途径底物的表达,促进肿瘤细胞的生长、增殖、进展、转移和侵袭^[14]。FBXO2属F-box蛋白家族,其高表达与大肠癌转移和大肠癌细胞分期密切相关,是大肠癌患者的独立预后因素^[15]。在子宫内膜癌中,FBXO2表达的增强与肿瘤分期、肿瘤分级、肿瘤组织学类型及预后不良有关^[16]。本研究结果显示,枸橼苷可抑制FBXO2的表达,提示枸橼苷可通过抑制FBXO2的表达而抑制U-2 OS

细胞的增殖,并诱导其自噬。

STATs是信号传感器和转录激活因子,配体依赖的STATs调节级联激活,通常与细胞生长、分化的调节有关^[17]。STAT家族成员STAT3信号通路能调节肿瘤细胞的增殖、生长和凋亡^[18]。目前已有研究证明,可通过诱导细胞自噬抑制STAT3磷酸化,从而抑制脑肿瘤细胞的生长,并促进其凋亡^[19],激活STAT3通路可促进U-2 OS细胞的增殖和转移^[20]。FBXO2可通过激活STAT3通路促进U-2 OS细胞增殖^[21]。本研究结果显示,枸橼苷可抑制U-2 OS细胞中STAT3的磷酸化,提示枸橼苷可通过抑制FBXO2表达而抑制STAT3通路的激活,从而在骨肉瘤细胞中发挥抑制作用。

综上所述,枸橼苷可抑制U-2 OS细胞增殖,并促进其自噬,其机制可能与抑制FBXO2表达从而抑制STAT3通路激活有关。

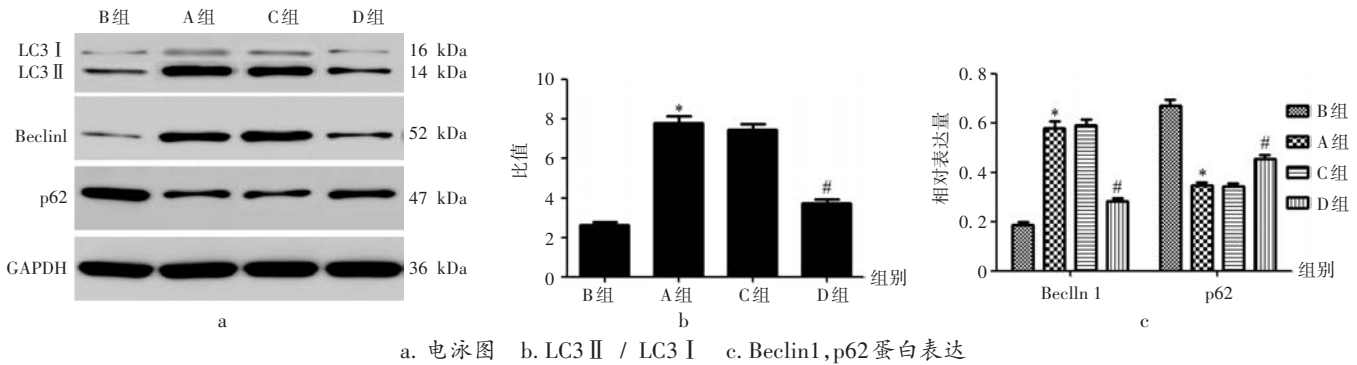


图6 过表达FBXO2逆转枸橼苷对U-2 OS细胞自噬的影响

a. Electrophoretogram b. LC3 II / LC3 I c. Expression of Beclin1 and p62 proteins

Fig. 6 Effect of poncirin on the autophagy of U-2 OS cells by the overexpression of FBXO2 reverses

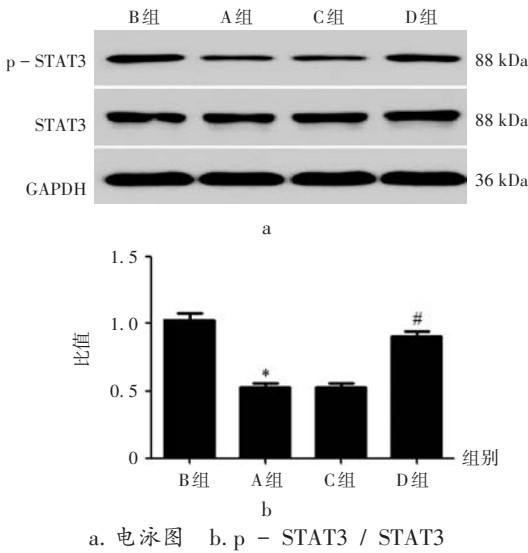


图7 过表达FBXO2逆转枸橼苷对骨肉瘤细胞STAT3通路的影响

a. Electrophoretogram b. p - STAT3 / STAT3

Fig. 7 Effect of poncirin on the STAT3 pathway of osteosarcoma cells by the overexpression of FBXO2 reverses

参考文献

[1] GIANFERANTE DM, MIRABELLO L, SAVAGE SA. Germline and somatic genetics of osteosarcoma - connecting aetiology, biology and therapy[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(8): 480-491.

[2] SADYKOVA LR, NTEKIM AI, MUYANGWA - SEMENOVA M, et al. Epidemiology and Risk Factors of Osteosarcoma[J]. Cancer Invest, 2020, 38(5): 259-269.

[3] HARRISON DJ, GELLER DS, GILL JD, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1): 39-50.

[4] KANG GD, KIM DH. Poncirin and its metabolite ponciretin attenuate colitis in mice by inhibiting LPS binding on TLR4 of macrophages and correcting Th17 / Treg imbalance[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189(3): 175-185.

[5] NGUYEN KM, BUSINO L. The Biology of F - box Proteins: The SCF Family of E3 Ubiquitin Ligases [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1217(5): 111-122.

[6] SUN X, WANG T, GUAN ZR, et al. FBXO2, a novel marker for metastasis in human gastric cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(3): 2158-2164.

[7] TARAN SJ, TARAN R, MALIPATIL NB. Pediatric Osteosarcoma: An Updated Review [J]. Indian J Med Paediatr Oncol, 2017, 38(1): 33-43.

[8] ZHANG Y, YANG J, ZHAO N, et al. Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma [J]. Oncol Lett, 2018, 16(5): 6228-6237.

[9] LIU H, GAO Y, DONG Y, et al. Flavonoids Active Against Osteosarcoma: A Review of the Molecular Mechanisms Involved [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(13): 1993-2001.

[10] SARALAMMA VV, NAGAPPAN A, HONG GE, et al. Poncirin Induces Apoptosis in AGS Human Gastric Cancer Cells through Extrinsic Apoptotic Pathway by up - Regulation of Fas Ligand [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 22676-22691.

[11] ZHAO L, ZHANG W, ZHANG F. Poncirin downregulates ATP - binding cassette transporters to enhance cisplatin sensitivity in cisplatin - resistant osteosarcoma cells [J]. Phytother Res, 2020, 63(7): 282-293.

[12] MOWERS EE, SHARIFI MN, MACLEOD KF. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis [J]. FEBS J, 2018, 285(10): 1751-1766.

[13] JIANG CQ, MA LL, LV ZD, et al. Polydatin induces apoptosis and autophagy via STAT3 signaling in human osteosarcoma MG - 63 cells [J]. J Nat Med, 2020, 74(3): 533-544.

[14] TEKCHAM DS, CHEN D, LIU Y, et al. F - box proteins and cancer: an update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects [J]. Theranostics, 2020, 10(9): 4150-4167.

[15] WEI X, BU J, MO X, et al. The prognostic significance of FBXO2 expression in colorectal cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(10): 5054-5062.

[16] CHE X, JIAN F, WANG Y, et al. FBXO2 Promotes Proliferation of Endometrial Cancer by Ubiquitin - Mediated Degradation of FBN1 in the Regulation of the Cell Cycle and the Au-