

中图分类号: R965; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)07-0042-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.07.010



苦参碱对骨肉瘤细胞凋亡的影响*

王利宁¹, 赵新芝², 宋军帅¹, 王淑燕³, 孙广玉³, 李克明², 杨真真^{4Δ}

(1. 山东省乳山市人民医院, 山东 威海 264599; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014; 3. 山东省滨州市人民医院, 山东 滨州 256600; 4. 山东省济南市第四人民医院, 山东 济南 250031)

摘要:目的 探讨苦参碱在MG-63细胞中促凋亡的作用及机制。方法 实验分为0浓度组和10%苦参碱组,分别灌胃生理盐水和10%苦参碱制备大鼠含药血清,干预人骨肉瘤细胞株MG-63。采用CCK-8法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测c-myc、胱天蛋白酶9(caspase-9)基因的表达,采用免疫印迹(Western blot)法检测细胞外信号调节激酶5(ERK5)信号通路中相关蛋白Nur77、丝裂原活化蛋白激酶5(MEK5)及凋亡相关蛋白c-myc、caspase-9的表达水平。结果 与0浓度组相比,10%苦参碱组能显著抑制MG-63细胞增殖,并促进其凋亡;荧光定量PCR实验结果表明,10%苦参碱组能抑制c-myc转录,并促进caspase-9转录;Western blot实验结果表明,在ERK5信号通路中,10%苦参碱组Nur77、MEK5及c-myc蛋白表达下调,而caspase-9蛋白表达上调。结论 苦参碱可能通过干扰ERK5信号通路,调控c-myc、caspase-9等蛋白的表达,从而抑制MG-63细胞增殖,并促进其凋亡。

关键词:苦参碱;骨肉瘤;MG-63细胞;细胞外信号调节激酶5信号通路;凋亡

Effect of Matrine on Apoptosis of Osteosarcoma Cells

WANG Lining¹, ZHAO Xinzhi², SONG Junshuai¹, WANG Shuyan³, SUN Guangyu³, LI Keming², YANG Zhenzhen⁴

(1. Ruzhan People's Hospital, Weihai, Shandong, China 264599; 2. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, China 250014; 3. Binzhou People's Hospital, Binzhou, Shandong, China 256600; 4. The Fourth People's Hospital of Jinan City, Jinan, Shandong, China 250031)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of matrine in promoting apoptosis in MG-63 cells. **Methods** The experiment was divided into the non-matrine group and the 10% matrine group, and the rats in the two groups were orally administered normal saline and 10% matrine respectively to prepare drug-contained serum, and human osteosarcoma cell line MG-63 was intervened. CCK-8 method was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of c-myc and caspase-9 genes. The expressions of related proteins Nur77, mitogen-activated protein kinase 5 (MEK5), and apoptosis-related proteins c-myc and caspase-9 in extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) signaling pathway were detected by Western blot. **Results** Compared with the non-matrine group, the proliferation of MG-63 cells were significantly inhibited and their apoptosis were promoted in the 10% matrine group. The results of fluorescence quantitative PCR experiments showed that 10% matrine could inhibit c-myc transcription and promote caspase-9 transcription. Western blot experiments showed that in the ERK5 signaling pathway, 10% matrine could downregulate the expression of Nur77, mitogen-activated protein kinase 5 (MEK5), and c-myc protein, and upregulate the expression of caspase-9 protein. **Conclusion** Matrine may inhibit the proliferation of MG-63 cells and promote their apoptosis through interfering with the ERK5 signaling pathway and regulating the expression of proteins such as c-myc and caspase-9.

Key words: matrine; osteosarcoma; MG-63 cells; extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway; apoptosis

骨肉瘤(OS)是儿童和青少年最常见的原发性骨癌,是继软骨肉瘤和脊索瘤后第三大常见骨癌,具有极强的侵袭性和破坏性,临床表现为肿瘤、疼痛、跛行等^[1-2]。且在确诊后的1年内有80%~90%的患者会出现肺转移^[3-6],转移后患者的5年生存率仅有20%~30%^[7-9]。目前,OS的发病机制并未阐明。OS发生早期,主要应用手术切除,但预后较差;化学治疗(简称化疗)有一定的作用,但会产生严重的骨髓抑制、肝肾功能障

碍及高耐药性^[10-11]。中药单体在临床肿瘤治疗上发挥了积极作用。苦参碱提取自苦参,具有抗肿瘤、抗炎、调节免疫等作用^[12-13],能抑制多种肿瘤细胞生长^[14],如通过糖代谢途径抑制胃癌细胞转移^[15]。多项研究表明,苦参碱可通过调控丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT)、Bcl-2关联X蛋白(Bax)等因子的表达,而抑制人OS细胞的增殖与凋亡^[16-21]。细胞外信号调节激酶5(ERK5)属有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族,对细胞存

*基金项目:山东省中医药科技项目[2021M191];青岛大学医疗集团科研专项[YLJT20212020]。

第一作者:王利宁,男,硕士,主治医师,研究方向为中西医结合防治肿瘤,(电子信箱)15563106152@163.com。

Δ通信作者:杨真真,女,主管药师,研究方向为中药临床药理学,(电子信箱)296451616@qq.com。

活、增殖、迁移、分化等多项生物反应均有调节作用^[22],可通过金属蛋白酶9(MMP-9)调节OS细胞的侵袭性^[23],经磷酸化后还可参与细胞凋亡^[24]。丝裂原激活蛋白激酶5(MEK5)是ERK5的唯一调节因子,激活后对下游效应因子c-myc和Nur77具有调节作用^[25],其中c-myc、胱天蛋白酶9(caspase-9)在细胞周期中扮演重要角色^[26],可激活多种信号靶点,并促进细胞凋亡^[27]。为此,本研究中探讨了苦参碱对ERK5信号通路的调控作用及机制,以期OS的治疗提供思路。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、细胞与动物

仪器:Imark-22353型多功能酶标仪,PowerPac Basic电泳仪,均购于美国Bio-Rad公司;C6 Plus型流式细胞仪(美国BD Bioscience公司);CFX 96型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(Bio-Rad Laboratories, Inc.);Hema 9600型基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司);Ni-V型研究级正置荧光显微镜(日本Nikon公司);Tanon5200型全自动化学发光图像分析仪(上海天能科技有限公司)。

试剂:苦参碱(陕西金康泰生物科技有限公司,CAS号为519-02-8,纯度为98%);CCK-8试剂盒(批号为A311-02-AA),凋亡试剂盒(批号为A211-02),均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DMEM培养基(HyClone,批号为SH3002201),胎牛血清(Biological Industries,批号为04-001-1ACS),c-myc(批号为A1309,稀释比例为1:1 000),caspase-9(批号为A11910,稀释比例为1:1 000),Nur77(批号为A6676,稀释比例为1:1 000),均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;内参三磷酸甘油脱氢酶(GAPDH,批号为10494-1-AP,稀释比例为1:20 000),MEK5磷酸化抗体(批号为15758-1-AP,稀释比例为1:1 000),均购于武汉三鹰生物技术有限公司;二抗(Cell Signaling Technology,批号为#7074,稀释比例为1:1 000);XMD-892(Creative Enzymes,批号为CEL-1585);荧光二抗(Cell Signaling Technology,4412S,稀释比例为1:100);荧光定量PCR相关试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),引物由北京擎科生物科技有限公司设计,引物序列见表1。

细胞:人成骨肉瘤细胞株MG-63(ATCC)。

动物:雄性SPF级SD大鼠20只,6~8周龄,体质量160~200 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)20190003。饲养于室温25℃、相对湿度50%~60%、每12 h明暗交替的环境中,均自由摄食、饮水。本研究中动物实验程序均经实验动物福利与伦理委员会批准,实验过程中的所有操作均

表1 mRNA扩增的基因引物序列

Tab. 1 Geneprimer sequences for mRNA amplification

基因	引物序列(5' → 3')
homoβ-actin-250F	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
homoβ-actin-250R	CTCCTTAATGTCACGCACGCT
c-myc-F	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC
c-myc-R	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG
Caspase 9-F	GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT
Caspase 9-R	CAACGTACCAGGAGCCACTCTT

符合“3R”原则。

1.2 方法

苦参碱含药血清制备:SD大鼠适应性喂养1周后,随机分为0浓度组和10%苦参碱组,各10只,分别灌胃生理盐水和10%苦参碱,每日2次,连续3 d。第3天灌胃前,禁食不禁饮12 h,于末次给药1 h后,腹腔注射麻醉药物,腹主动脉取血;血样于4℃条件下离心(转速为3 000 r/min)10 min,收集上层血清,于56℃水浴中灭活30 min,0.22 μm微孔滤膜滤过,保存于-80℃冰箱,待用。

细胞培养:细胞接种于加10%胎牛血清DMEM培养基中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。后续实验均基于对数生长期的细胞开展,均重复3次。

CCK-8法检测苦参碱对MG-63细胞增殖的影响:将细胞混悬液接种至96孔板中,每孔100 μL,培养24 h后,加入0浓度组和10%苦参碱组的苦参碱含药血清。分别于培养24,48,72,96 h时加入CCK-8试剂,于37℃恒温培养箱中继续培养40 min,观察液体颜色是否变黄。采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度(OD)值,计算细胞活力。细胞活力(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)×100%。

流式细胞术检测苦参碱对MG-63细胞凋亡的影响:将细胞混悬液接种至6孔板中培养24 h后弃去废液,加入0浓度组和10%苦参碱组苦参碱含药血清干预48 h后,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次,离心,弃去上清液,轻轻吹打,加300 μL的1×Bind buffer到细胞中,重悬。按试剂盒说明书依次加入Annexin V(FITC,5 μL)和碘化丙啶(PI,5 μL),避光孵育15 min,于1 h内用流式细胞仪测定细胞凋亡数,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=(早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数)/总细胞数×100%。

定量PCR检测MG-63细胞凋亡相关基因转录情况:将细胞接种至6孔板中,培养24 h后加入0浓度组和10%苦参碱组苦参碱含药血清,干预48 h,提取总RNA,按Vazyme逆转录及PCR试剂盒说明书,在荧光定量PCR仪上进行PCR扩增检测。以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,用2^{-ΔΔCt}公式计算目的基因(c-myc,

caspase - 9)的相对表达水平。

免疫印迹(Western blot)法检测MG - 63细胞蛋白表达水平:前期研究证明,苦参碱可抑制ERK5蛋白信号的表达,且MEK5是ERK5信号通路的唯一激活剂^[28];Nur77又受ERK5调控,本研究中检测MEK5和Nur77蛋白表达水平。细胞接种于6孔板中,分为0浓度组和10%苦参碱组,探讨苦参碱促凋亡的分子机制;分为0浓度组,10%苦参碱组,XMD8 - 92组,10%苦参碱 + XMD8 - 92组,探讨苦参碱通过ERK5信号通路调控MG - 63细胞凋亡的作用;分为0浓度组,10%苦参碱组,vector组(10%苦参碱 + CMV - MEK5aCA),MEK5组(CMV - MEK5aCA),探讨过表达ERK5信号通路上游蛋白MEK5时苦参碱如何调控细胞凋亡。分别培养24 h后,提取总蛋白,制备上样缓冲液,取30 μg蛋白上样,电泳条件设置为恒压80 V、30 min,后转为120 V、60 min,转膜条件设置为恒流180 mA、120 min,用5%脱脂牛奶封闭2 h,待封闭结束用TBST缓冲液清洗3次,每次10 min,4℃条件下一抗孵育过夜,回收一抗TBST缓冲液清洗3次,每次10 min,加入二抗,室温慢摇2 h。继续清洗,使用电致化学发光(ECL)剂在凝胶成像系统中进行显影分析。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0.2(263)软件进行数据分析及统计作图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用one - way ANOVA分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 降低MG - 63细胞活力

与0浓度组相比,随着药物作用时间的延长,10%苦参碱组OD值增速逐渐变小,提示细胞活力被逐渐抑制,苦参碱能抑制MG - 63细胞增殖,且呈时间依赖性。详见图1和表2。

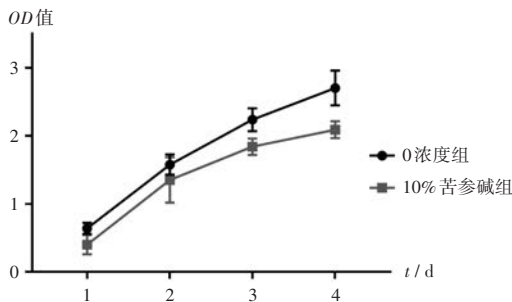


图1 CCK - 8法检测不同浓度苦参碱含药血清对MG - 63细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of matrine - containing serum on the proliferation of MG - 63 cells detected by the CCK - 8 method

2.2 促进MG - 63细胞凋亡

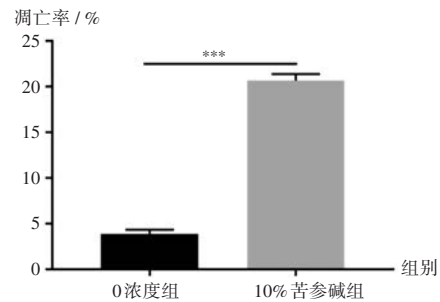
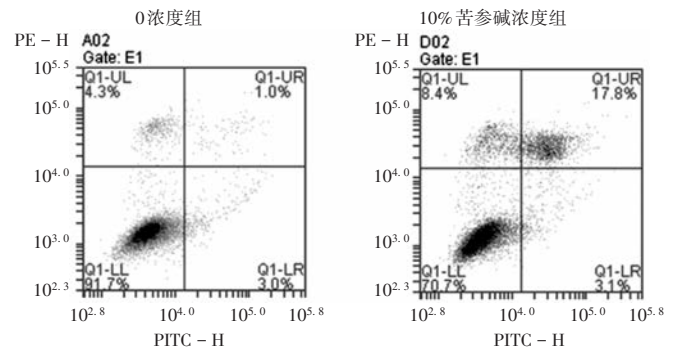
与0浓度组相比,10%苦参碱组细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$),提示苦参碱能显著促进MG - 63细胞凋

亡。详见图2。

表2 不同浓度苦参碱组不同时间OD值比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of OD values in matrine groups with different concentrations at different times ($\bar{x} \pm s$)

时间	0浓度组	10%苦参碱组
第1天	0.667 ± 0.074 6	0.447 ± 0.129
第2天	1.544 ± 0.135	1.313 5 ± 0.303
第3天	2.211 25 ± 0.153	1.802 25 ± 0.11
第4天	2.775 5 ± 0.233	2.090 5 ± 0.112



A. 流式散点图 B. 柱状图

注:与0浓度组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。图3至图6同。

Q1 - LR为早期凋亡细胞,Q1 - UR为晚期凋亡细胞。

图2 苦参碱对MG - 63细胞凋亡率的影响

A. Flow scatter B. Bar chart

Note:Compared with those in the non - matrine group,** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ (for Fig. 2 - 6).Q1 - LR refers to early apoptotic cells,and Q1 - UR refers to late apoptotic cells.

Fig. 2 Effect of matrine on the apoptosis of MG - 63 cells

2.3 调控MG - 63细胞凋亡相关基因转录水平

与0浓度组相比,10%苦参碱组caspase - 9基因表达水平显著升高($P < 0.01$),c - myc基因表达水平显著降低($P < 0.001$),表明苦参碱能通过调控凋亡相关基因促进细胞凋亡。详见图3。

2.4 抑制ERK5信号通路相关蛋白表达

与0浓度组相比,10%苦参碱组MEK5和Nur77蛋白表达水平均显著降低($P < 0.001$),表明苦参碱对ERK5信号通路中上下游蛋白具有明显调控作用。详见图4。

2.5 通过ERK5信号通路调控MG - 63细胞凋亡

与0浓度组相比,10%苦参碱组、XMD8 - 92组、

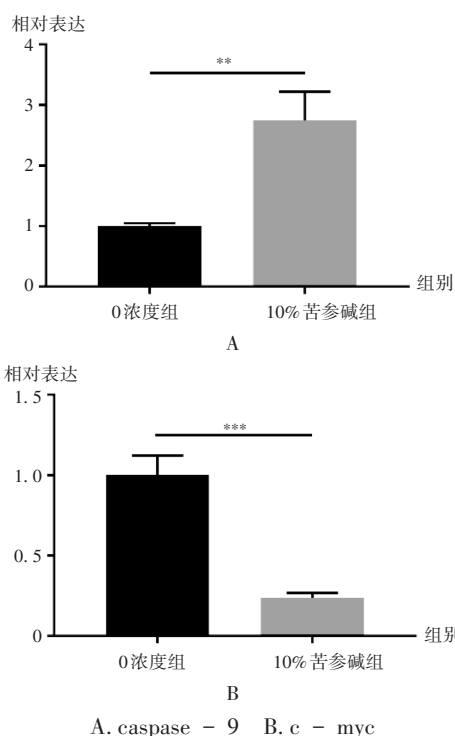


图3 定量PCR检测凋亡相关基因表达
A. caspase - 9 B. c - myc

Fig. 3 Detection of apoptosis - related gene expression by the RT - PCR

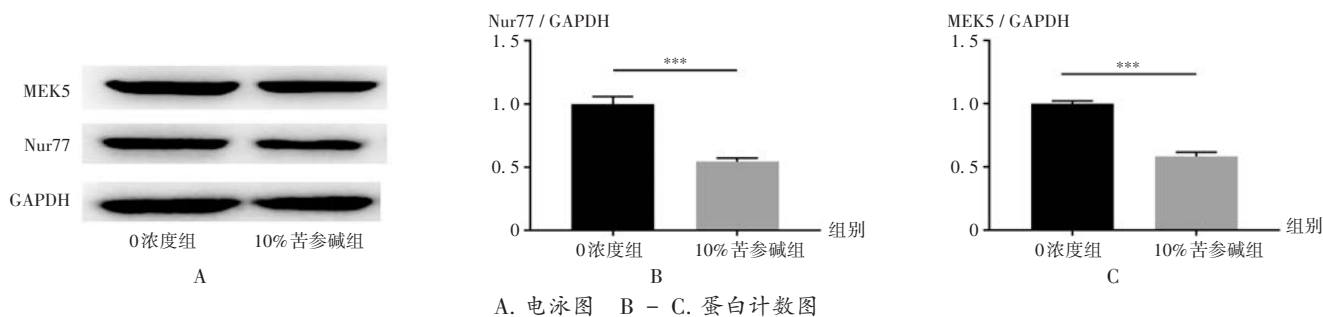


图4 Western blot法检测MEK5和Nur77蛋白表达情况

A. Electropherogram B - C. Protein count

Fig. 4 Detection of MEK5 and Nur77 protein expression by the Western blot

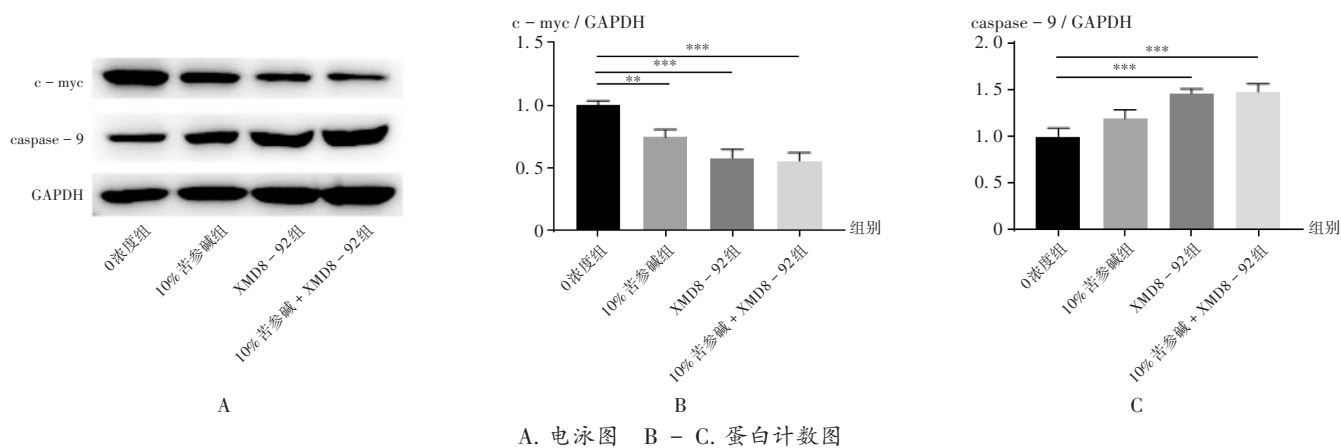


图5 Western blot法检测加入ERK5蛋白抑制剂XMD8-92后凋亡相关蛋白表达情况

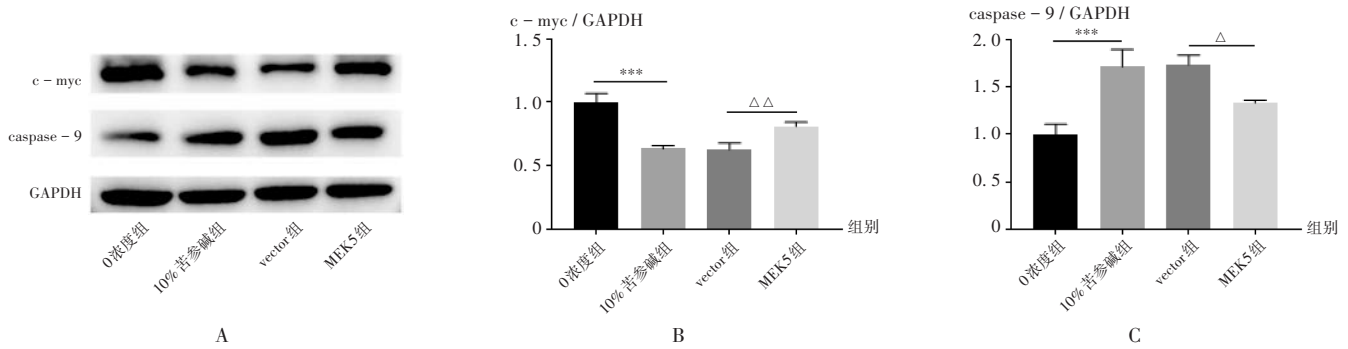
A. Electropherogram B - C. Protein count

Fig. 5 Detection of apoptosis - related protein expression after the addition of ERK5 protein inhibitor XMD8 - 92 by the Western blot

10% 苦参碱 + XMD8 - 92 组 c - myc 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), XMD8 - 92 组、10% 苦参碱 + XMD8 - 92 组 caspase - 9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 表明苦参碱与 ERK5 抑制剂 XMD8 - 92 具有相似性, 对 ERK5 信号通路具有抑制作用。详见图 5。为进一步证明苦参碱通过 ERK5 信号通路调控 MG - 63 细胞周期与凋亡, 通过过表达唯一上游蛋白 MEK5, 并检测 c - myc 和 caspase - 9 蛋白表达水平进行验证。与 0 浓度组相比, 10% 苦参碱组 c - myc 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), caspase - 9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。与 vector 组相比, MEK5 组 c - myc 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), caspase - 9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。表明 ERK5 对 MG - 63 细胞凋亡具有调控作用, 蛋白表达与细胞凋亡呈负相关。详见图 6。

3 讨论

OS 是临床常见恶性肿瘤, 好发于青少年发病率高, 存活率低^[22]。目前治疗手段主要为手术治疗与化疗, 但患者预后效果差, 生活质量低, 且常伴随耐药与疾病复发率高的困扰^[27]。因此, 抑制肿瘤生长及缓解化疗耐药是当前亟待解决的问题, 使肿瘤细胞凋亡是解决以上



A

B

C

A. 电泳图 B - C. 蛋白计数图

注:与 vector 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图6 Western blot 法检测过表达 MEK5 后凋亡相关蛋白的表达情况

A. Electropherogram B - C. Protein count

Note: Compared with those in the vector group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Fig. 6 Detection of apoptosis - related proteins expression after overexpression of MEK5 by the Western blot

问题的重要手段^[24-25]。

苦参始见于《神农本草经》,用于治疗症瘕积聚。主要成分为苦参碱^[27-28]。现代药理学研究发现,苦参碱通过信号转导与转录活化因子3(STAS3)通路增强阿霉素化疗对 OS 的疗效^[29],能促进 OS 细胞凋亡^[30]。与顺铂治疗小鼠 OS 相比,高浓度苦参碱能明显减少肿瘤质量,诱导肿瘤组织凋亡,其主要作用途径可能与 FAS / FASL 的表达及与 caspase - 8 的活化有关。邹敏等^[17]、李国慧等^[15]将苦参碱作用于 MG - 63 细胞后,发现细胞增殖能力下降,其主要原因为细胞凋亡率升高,与本研究结果一致。此外,尚剑等^[16]发现苦参碱抑制 MG - 63 细胞 DNA 合成,阻滞细胞在 S 期,同时激活 caspase - 3, caspase - 8, caspase - 9 蛋白的表达,从而导致细胞程序性死亡。Caspase 家族在细胞凋亡过程中被激活^[31-32],参与内源性 & 外源性凋亡途径^[33-36]。外源性凋亡以线粒体途径为主, caspase - 9 作为本途径的启动蛋白发挥重要作用^[37-38]。

细胞凋亡率降低是化疗耐药性产生的重要因素,因药物促进细胞凋亡是 OS 治疗的研究热点。研究表明, ERK5 属 MAPK 家族,在细胞存活、增殖、迁移、分化等多项生物反应中具有调节作用^[39-40]。MEK5 处于 ERK5 的上游,是其唯一调节因子, ERK5 激活后对下游效应因子 c - myc 和 Nur77 具有调节作用^[24], c - myc 在细胞周期中扮演重要角色^[25],其激活后可激活多种信号靶点促进细胞凋亡^[26]。有研究表明, ERK5 磷酸化后调节 Nur77 可参与细胞凋亡^[27]。

本研究结果显示,苦参碱对细胞增殖的抑制作用明显,同时对细胞凋亡有显著促进作用。抑制细胞周期标志性蛋白 c - myc 表达,而对线粒体凋亡启动蛋白 caspase - 9 具有明显激动作用。c - myc 蛋白表达下调,抑制细胞周期活性,启动细胞凋亡信号通路,从而抑制

细胞增殖,促进凋亡。为验证苦参碱通过 ERK5 信号通路调控 MG - 63 细胞凋亡,分别加入 ERK5 抑制剂 XMD8 - 92、过表达其上游信号 MEK5。过表达 MEK5,周期蛋白 c - myc 降低,凋亡蛋白 caspase - 9 上升;加入 ERK5 抑制剂 XMD8 - 92 后, c - myc 上升, caspase - 9 下降。可见,苦参碱作用于 MG - 63 细胞的效果与抑制剂 XMD8 - 92 相当,且 XMD8 - 92 联合苦参碱的效果更明显。

综上所述,苦参碱通过 ERK5 信号通路调控 MG - 63 细胞凋亡及相关蛋白 caspase - 9 和 c - myc 的表达。本研究结果可为 OS 的治疗提供新思路,拓展中医药治疗恶性疾病的研究方向。

参考文献

- [1] RAIMONDI L, DE LUCA A, COSTA V, et al. Circulating biomarkers in osteosarcoma: new translational tools for diagnosis and treatment[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 100831 - 100851.
- [2] ROBERTS RD, LIZARDO MM, REED DR, et al. Provocative questions in osteosarcoma basic and translational biology: A report from the Children's Oncology Group[J]. *Cancer*, 2019, 125(20): 3514 - 3525.
- [3] FISHER M, FEUERSTEIN G, HOWELLS DW, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations[J]. *Stroke*, 2009, 40(6): 2244 - 2250.
- [4] QI X, ZHANG D, XU X, et al. Oridonin nanosuspension was more effective than free oridonin on G2 / M cell cycle arrest and apoptosis in the human pancreatic cancer PANC - 1 cell line[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 1793 - 1804.
- [5] PALUMBO A, MAGAROTTO V. Novel treatment paradigm for elderly patients with multiple myeloma[J]. *Am J Blood Res*, 2011, 1(2): 190 - 204.
- [6] LIN H, HAO Y, WAN X, et al. Baicalein inhibits cell development, metastasis and EMT and induces apoptosis by regulating ERK signaling pathway in osteosarcoma[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2020, 40(1): 49 - 57.
- [7] SUBRAMANIAN U, NAGARAJAN D. All - Trans Retinoic Acid

- supplementation prevents cardiac fibrosis and cytokines induced by Methylglyoxal[J]. *Glycoconj J*, 2017, 34(2): 255 – 265.
- [8] REN L, KHANNA C. Role of ezrin in osteosarcoma metastasis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 804: 181 – 201.
- [9] SAKAMOTO A, IWAMOTO Y. Current status and perspectives regarding the treatment of osteo – sarcoma: chemotherapy[J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2008, 3(3): 228 – 231.
- [10] 曹莉莉, 朱岩, 樊根涛, 等. 骨肉瘤的治疗进展[J]. *中国骨与关节杂志*, 2020, 9(10): 771 – 778.
- [11] LIU GF, LI GJ, ZHAO H. Efficacy and Toxicity of Different Chemotherapy Regimens in the Treatment of Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer: A Network Meta – Analysis [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 511 – 523.
- [12] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱免疫促进作用的研究进展[J]. *药物评价研究*, 2019, 42(3): 579 – 585.
- [13] LIANG CZ, ZHANG JK, SHI Z, et al. Matrine induces caspase – dependent apoptosis in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* through the upregulation of Bax and Fas / FasL and downregulation of Bcl – 2[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(2): 317 – 331.
- [14] 李国慧, 刘瑞花, 李贵霞, 等. 苦参碱抑制人骨肉瘤细胞 MG63 增殖的实验研究[J]. *河北医科大学学报*, 2014, 35(2): 162 – 165.
- [15] 李国慧, 刘瑞花, 李贵霞, 等. 苦参碱对人骨肉瘤细胞 MG63 凋亡影响的实验研究[J]. *河北医科大学学报*, 2014, 35(1): 53 – 55.
- [16] 尚剑, 何礼, 戴佳伊, 等. 苦参碱对骨肉瘤 MG63 细胞凋亡及 Caspase 蛋白表达的影响[J]. *中医药学报*, 2013, 41(4): 48 – 52.
- [17] 邹敏, 徐金军. 苦参碱对人骨肉瘤 MG63 细胞增殖、凋亡的影响及机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(2): 140 – 142.
- [18] XU GP, ZHAO W, ZHUANG JP, et al. Matrine inhibits the growth and induces apoptosis of osteosarcoma cells *in vitro* by inactivating the Akt pathway[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 1653 – 1659.
- [19] LI Y, ZHANG ZN, ZHAO HM, et al. Matrine inhibits the invasive properties of human osteosarcoma cells by downregulating the ERK – NF – κ B pathway [J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(9): 1035 – 1043.
- [20] PAUDEL R, FUSI L, SCHMIDT M. The MEK5 / ERK5 Pathway in Health and Disease [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7594.
- [21] HOANG VT, YAN TJ, CAVANAUGH JE, et al. Oncogenic signaling of MEK5 – ERK5[J]. *Cancer Lett*, 2017, 392: 51 – 59.
- [22] CORRE I, VERRECCHIA F, CRENN V, et al. The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex But Targetable Ecosystem [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 976.
- [23] SEIFERT A, CLARKE PR. p38alpha – and DYRK1A – dependent phosphorylation of caspase – 9 at an inhibitory site in response to hyperosmotic stress[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(11): 1626 – 1633.
- [24] GREEN DR, LLAMBI F. Cell Death Signaling[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(12): a006080.
- [25] CHEN CL, XIE L, REN TT, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: Fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs[J]. *Cancer Lett*, 2021, 500: 1 – 10.
- [26] BOLD RJ, TERMUHLEN PM, MCCONKEY DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy[J]. *Surg Oncol*, 1997, 6(3): 133 – 142.
- [27] STRASSER A, CORY S, ADAMS JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases[J]. *EMBO J*, 2011, 30(18): 3667 – 3683.
- [28] LU KH, CHEN PN, HSIEH YH, et al. 3 – Hydroxyflavone inhibits human osteosarcoma U2OS and 143B cells metastasis by affecting EMT and repressing u – PA / MMP – 2 via FAK – Src to MEK / ERK and RhoA / MLC2 pathways and reduces 143B tumor growth *in vivo* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 97: 177 – 186.
- [29] YAO J, LIN J, HE L, et al. TNF – α / miR – 155 axis induces the transformation of osteosarcoma cancer stem cells independent of TP53INP1 [J]. *Gene*, 2020, 726: 144224.
- [30] STECCA B, ROVIDA E. Impact of ERK5 on the Hallmarks of Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1426.
- [31] THOMPSON EB. The many roles of c – Myc in apoptosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60: 575 – 600.
- [32] PORTER AG, JÄNICKE RU. Emerging roles of caspase – 3 in apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2): 99 – 104.
- [33] ADAMS JM, CORY S. Bcl – 2 – regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(5): 488 – 496.
- [34] THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1312 – 1316.
- [36] CATLETT – FALCONE R, LANDOWSKI TH, OSHIRO MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells [J]. *Immunity*, 1999, 10(1): 105 – 115.
- [36] HASSA PO, HOTTIGER MO. The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly – ADP – ribose polymerases [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 3046 – 3082.
- [37] WANG SC, CHOW JM, CHIEN MH, et al. Cantharidic acid induces apoptosis of human leukemic HL – 60 cells via c – Jun / N – terminal kinase – regulated caspase – 8 / – 9 / – 3 activation pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(4): 514 – 522.
- [38] MEHRBOD P, ANDE SR, ALIZADEH J, et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections [J]. *Virulence*, 2019, 10(1): 376 – 413.
- [39] JÄRVINEN K, HOTTI A, SANTOS L, et al. Caspase – 8, c – FLIP, and caspase – 9 in c – Myc – induced apoptosis of fibroblasts [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(18): 2602 – 2615.
- [40] FUJII Y, MATSUDA S, TAKAYAMA G, et al. ERK5 is involved in TCR – induced apoptosis through the modification of Nur77 [J]. *Genes Cells*, 2008, 13(5): 411 – 419.

(收稿日期: 2022 – 11 – 02; 修回日期: 2023 – 12 – 03)