

夜香树多糖诱导人骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡作用的探讨

罗发军^{1,2,3}, 赵世元^{1,2,3*}, 钟振国^{1,2,3}

(1. 广西崇左市中医壮医医院, 广西 崇左 532200; 2. 广西医科大学 附属民族医院, 南宁 530001;
3. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] 目的:探讨夜香树多糖对人骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡诱导作用并研究其可能的作用机制。方法:从夜香树叶中提取夜香树多糖,分别用终质量浓度为 2.5, 5, 10 mg·L⁻¹的夜香树多糖处理处于对数生长期的 MG-63 细胞,另设 MG-63 细胞为空白组;不同质量浓度夜香树多糖作用 72 h 后,采用 MTT 法检测 MG-63 细胞增殖抑制作用;不同质量浓度夜香树多糖作用 46 h 后,采用透射电镜观察经处理过的细胞超微结构的改变,采用流式细胞术检测夜香树多糖对 MG-63 细胞凋亡率的影响,Western blot 法分析半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3), Caspase-8, Caspase-9 和 B 细胞淋巴瘤-白血病 2 (Bcl-2) 的蛋白表达水平。结果:夜香树多糖显著抑制人骨肉瘤细胞 MG-63 增生,在 5~10 mg·L⁻¹质量浓度显著抑制细胞增殖,并呈浓度和时间的依赖性;电镜下可发现夜香树多糖能诱导细胞凋亡,胞质内出现大量空泡,细胞核染色质固缩,细胞表面绒毛减少;流式细胞仪检测表明,5 mg·L⁻¹夜香树多糖可使 MG-63 细胞阻滞在 G₀/G₁;夜香树多糖能剂量依赖诱导 MG-63 凋亡,浓度依赖性的降低 MG-63 细胞的 Bcl-2 蛋白表达和升高 Caspase-8 的蛋白表达(P<0.05, P<0.01)。结论:夜香树多糖能抑制 MG-63 细胞增殖,诱导人骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡,与作用剂量和作用时间呈正相关,这一过程可能与夜香树多糖下调 Bcl-2 和激活 Caspase-8 有关。

[关键词] 夜香树多糖; 骨肉瘤; MG-63 细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0160-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030160

Experiment on Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 Induced by Polysaccharide Extracted from *Cestrum nocturnum*

LUO Fa-jun^{1,2,3}, ZHAO Shi-yuan^{1,2,3*}, ZHONG Zhen-guo^{1,2,3}

(1. Hospital of Traditional Chinese Medicine and Zhuang Medicine of Chongzuo City, Chongzuo 532200, China;
2. Affiliated National Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530001, China;
3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of polysaccharide extract obtained from the *Cestrum nocturnum* (PCN) on the apoptosis of human osteosarcoma cell line MG-63 as well as its possible mechanism. **Method:** PCN was separated, and MG-63 cells in logarithmic phase were processed using PCN with the final concentration of 2.5, 5, 10 mg·L⁻¹. Blank group was established with MG-63 cells. After 72 h of PCN (different mass concentration) action, MTT assay was used to determine the inhibition of cell proliferation. After 46 h of PCN (different mass concentration) action, transmission electron microscope was used to observe the morphological changes of processed cells. Its effect on apoptosis of MG-63 cells was detected by flow cytometry, and the protein expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and Bcl-2 were detected by Western blot. **Result:** PCN significantly inhibited the proliferation of MG-63 cells in a time and dose-dependent manner. It could significantly inhibit cells proliferation within the concentration range of 5-10 mg·L⁻¹. Under electron microscopy, it could be found that PCN can induce cell apoptosis, with a large number of vacuoles in cytoplasm, and chromatin pyknosis

[收稿日期] 20150409(001)

[基金项目] 广西科技攻关项目(0816004-17);广西医疗卫生科研课题项目(2007008)

[第一作者] 罗发军,副主任医师,从事骨与软组织肿瘤治疗研究, Tel:13517676933, E-mail:13517676933@163.com

[通讯作者] *赵世元,博士,副主任技师,从事中药新药的研究与开发, Tel:13978647518, E-mail:zhaoshiyuan_1105@163.com

was present for cell nucleus, and villus on cell nucleus surface was reduced. Flow cytometry indicated that $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ can make MG-63 cells blocked in G_0/G_1 . PCN induced apoptosis of MG-63 cells in a dose dependent manner, reduced Bcl-2 expression and increased Caspase-8 expression in a concentration dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** PCN could effectively inhibit cell proliferation and induce MG-63 cells apoptosis, with a direct relation to the dose and time. This process may be associated with down-regulating protein expressions of Bcl-2 and activating the expressions of Caspases-8.

[**Key words**] polysaccharide extracted from *Cestrum nocturnum*; osteosarcoma, MG-62 cells; apoptotic

骨肉瘤是原发性恶性肿瘤中发病率较高,该疾病好发于青少年时期,其恶性程度高,预后差。目前化疗是治疗骨肉瘤的主要手段,患者 5 年生存率仅达 60% 左右,且骨肉瘤细胞有原发或继发的耐药问题^[1-2]。延长骨肉瘤患者的生命是目前研究的主题。开发和选用不良反应低、且对骨肉瘤细胞没有耐药性或耐药较低的药物成为当前药物治疗骨肉瘤的突破点。

课题组前期研究发现,夜香树提取物内外对肿瘤细胞有较好的抑制作用^[3-8]。本研究拟评价夜香树多糖对人骨肉瘤细胞株 MG-6 细胞增殖抑制作用,在此基础上探讨夜香树多糖对 MG-6 细胞的周期和细胞凋亡的影响,并初步探讨夜香树多糖抑制骨肉瘤细胞增殖的分子机制。

1 材料

1.1 细胞株 人骨肉瘤细胞株 MG-63 购自中国科学院上海细胞所。

1.2 药物及试剂 夜香树多糖的提取:夜香树叶和嫩枝,烘干后加 10 倍体积水浸泡 2 h 后水煎 2 h,真空泵减压抽滤,滤液经大孔吸附树脂 D101,浓缩上清液后加三氯乙酸沉淀(按 1:5 比例),沉淀物加 5 倍体积的水,煮沸,冷却后过滤,滤液用 60% ~ 80% 乙醇沉淀,沉淀物反复加水煮和乙醇沉淀,最后得夜香树多糖。将药物溶于生理盐水,配成 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储存液,在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,临用时用培养基稀释至所需浓度。MTT,胎牛血清和 DMSO(批号分别为 120609,110525,110526)购自美国 Sigma 公司,胰蛋白酶购自(美国 Ameisco 公司,批号 201110),RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 1120708),Annexin V-FITC/PI 试剂盒(美国 Biovision 公司,批号 C1042),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)抗体,Caspase-9 抗体,Bax 抗体和 Bcl-2 抗体及 β -actin 抗体(批号分别为 CX1004-2,P4031RB,E-EL-M0178,FK0097A)均购自美国 Santa Cruz 公司,HRP 标记的抗体及抗鼠二抗(北京中杉公司,批号 84-00-02)。

1.3 仪器 381 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),TE2000-U 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司),AE100 型电子分析天平(瑞士 Mettler 公司),FC500 型流式细胞仪(美国库尔特公司),Sunris 型酶标仪(美国 Biocell 公司);PAC200 型电泳转膜系统,Mini-PROTEAN II 型电泳槽和 GelDoc 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 液氮内取出 MG-63 细胞株,培养在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 ,10% 胎牛血清的培养液中,并加庆大霉素($800 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$),细胞传代培养。

2.2 MTT 法检测细胞生长抑制试验 取处于对数生长期的 MG-63 细胞,调整细胞到 5×10^4 个/mL,将细胞接种到 96 孔板,每组设 5 个平行孔,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养过夜。吸去上清液后,分别加入夜香树多糖,使夜香树多糖的终质量浓度分别为 $2.5, 5, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,空白组加入等体积的 DMEM 培养液,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 的培养箱中培养。作用 72 h 后,每孔加入 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT $200 \text{ } \mu\text{L}$ 在相同条件下继续培养 4 h 后离心 5 min,吸去上清液,每孔加入 DMSO $150 \text{ } \mu\text{L}$,另设 1 组仅加 DMSO $150 \text{ } \mu\text{L}$ 的空白,振荡 20 min,用酶标仪于 550 nm 波长处测定各孔的吸光度 A 。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{550 \text{ 对照}} - A_{550 \text{ 实验}}) / A_{550 \text{ 对照}} \times 100\%$$

2.3 细胞超微结构变化 实验分为不同浓度的夜香树多糖处理组和对照组,收集各组夜香树多糖处理 48 h 的 MG-63 细胞,迅速浸入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的戊二醛溶液中固定 24 h,1% 四氧化锇固定 24 h,置丙酮中脱水,环氧树脂包埋,作 0.5 mm 的切片,经 1% NaOH 无水乙醇软化 1 h 后,筛选组织块精修制备超薄切片,醋酸双氧铀和及枸橼酸铅染色,透射电镜下观察细胞超微结构的形态。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率 处于对数生长期的 MG-63 细胞用含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基配成 1×10^4 个/mL。收集终质量浓度 $0, 2.5, 5, 10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 夜香树多糖处理 48 h 的

MG-63 细胞,细胞用胰蛋白酶消化,经 PBS 洗涤, $250 \times g$ 离心 5 min,小心吸除上清,PBS 洗涤 2 次,经 50% 冷乙醇固定,4 °C 冰箱过夜,PBS 洗涤去除乙醇,离心 5 min,弃上清,加入冰浴预冷的 0.5 mL PBS 重悬细胞,用碘化丙啶(PI)染色,用流式细胞仪检测细胞周期各时相细胞的百分比及细胞凋亡率。

2.5 Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡 MG-63 细胞接种在 24 孔板,用含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基配成 75 000 个/孔。收集经夜香树多糖处理 48 h 的 MG-63 细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 Annexin V/PI 避光染色 10 min,离心去上清,加入 Annexin V-FITC 结合液 190 μL 重悬细胞,再加入 10 μL 碘化丙啶,冰浴避光放置 10 min,随即进行流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.6 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达 分别用夜香树多糖 2.5,5.0,10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 MG-63 细胞 48 h 后,收集并裂解细胞,提取细胞总蛋白质,用 BCA 法定量测定蛋白,取等量蛋白样品用 12% SDS-PAGE 进行电泳,恒压将蛋白转移到醋酸纤维膜。室温下将膜在含 5% 奶粉的 PBS 中封闭 1 h,按照一定的稀释度加入各种抗体,4 °C 孵育过夜,HRP 标记的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,应用 ECL Western blot 检测系统测定 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 和 Bcl-2 的表达水平。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 12.0 统计软件对实验结果进行统计分析,实验数据采用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对人骨肉瘤株 MG-63 细胞的增殖抑制作用 分别将不同浓度的夜香树多糖处理 MG-63 细胞 24, 48, 72, 96 h,对照组 MG-63 细胞增殖迅速,夜香树多糖处理各组的细胞增殖受到抑制。60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 夜香树多糖作用 24 h 开始出现抑制,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度 48 h 后明显出现抑制,2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 72 h 后出现明显抑制,随着作用时间的延长,不同浓度的夜香树多糖对 MG-63 细胞的抑制作用也随着增强,具有一定的时间和浓度的依赖性。见图 1。

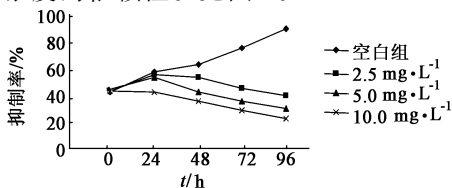
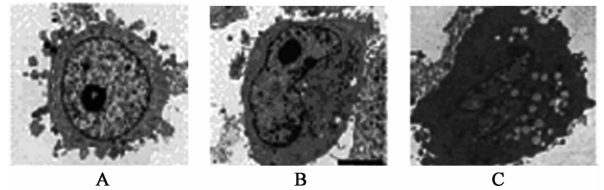


图 1 夜香树多糖对 MG-63 细胞的增殖抑制作用

Fig.1 Effects of polysaccharide from *Cestrum nocturnum* on value-added inhibition of MG-63 cells

3.2 对 MG-63 细胞超微结构的影响 用夜香树多糖处理 MG-63 细胞 48 h 后,镜下发现大量的 MG-63 凋亡细胞,表现为:细胞表面微绒毛缺失,胞质内出现大量空泡,细胞核碎裂,核染色质固缩,密度不均一,核仁变小;而对照组 MG-63 细胞表面有大量的微绒毛突起,胞膜完整,轮廓清晰,细胞核园大,可见核仁。见图 2。



A. 空白组; B. 夜香树多糖 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. 夜香树多糖 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 2 夜香树多糖对 MG-63 细胞超微结构的影响

Fig.2 Effects of polysaccharide from *Cestrum nocturnum* on ultrastructure of MG-63 cells

3.3 对人骨肉瘤细胞 MG-63 细胞的周期和凋亡的影响 0, 2.5, 5.0, 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 夜香树多糖作用 MG-63 细胞 48 h,经流式细胞仪检测,不同浓度的夜香树多糖可以改变 MG-63 细胞的细胞周期的分布,在质量浓度 2.5 ~ 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,PCN 浓度越高, G_0/G_1 期比率就越大,S 和 G_2/M 期比率越小;随着浓度的递增,时间的延长, G_0/G_1 期比率逐渐增高 ($P < 0.01$)。用不同浓度的夜香树多糖处理 MG-63 细胞 48 h 后,细胞经 Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测显示,随着药物浓度的增加,细胞凋亡率也相应增加,最高可达 45.86%,同时,早期凋亡和晚期凋亡率也随着增加;与空白组比较,各浓度组凋亡率有统计学差异 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.4 对 MG-63 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较,不同浓度的夜香树多糖作用 MG-63 细胞 48 h,随着浓度的增加,Bcl-2 蛋白水平递减,有浓度依赖性;Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白水平与空白组相比变化不大, Caspase-8 活性变化明显,质量浓度为 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在 48 h 出现最大活性。见图 3,表 2。

4 讨论

骨肉瘤是临床上最常见的原发性恶性肿瘤,在儿童和 20 岁以下青少年发生率为 8.7/1 万人^[9]。骨肉瘤的病因尚未完全清楚,有实验证明:青春期骨骼增长过快导致发生骨肉瘤;女孩的骨肉瘤发生率较同龄男孩低,可能由于男孩骨骼生长较快;高的男孩骨肉瘤发生率比正常男孩高。骨肉瘤行肺转移发

表 1 夜香树多糖对 MG-63 细胞的细胞周期分布和细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of polysaccharide from *Cestrum nocturnum* on cell cycle distribution and apoptosis rate of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	时间 /h	细胞周期分布/%			凋亡率/%
			G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
空白	-	48	47.21 ± 1.50	30.25 ± 0.85	21.90 ± 1.81	0.25 ± 0.06
夜香树多糖	2.5	48	57.63 ± 1.54 ¹⁾	20.62 ± 0.72	21.50 ± 0.98	12.15 ± 0.85 ²⁾
		24	47.36 ± 1.25	25.32 ± 0.78	27.30 ± 1.02	14.52 ± 1.21
	5.0	48	74.28 ± 2.06 ²⁾	17.58 ± 1.23	8.25 ± 0.58	23.25 ± 0.95 ²⁾
		72	79.36 ± 2.85	9.53 ± 0.54	11.10 ± 1.02	38.20 ± 0.65
	10.0	96	86.52 ± 3.01	7.23 ± 0.46	6.27 ± 0.45	45.86 ± 1.26
		48	80.51 ± 2.86 ²⁾	13.92 ± 0.84	5.66 ± 0.51	37.23 ± 0.75 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(表 2 同)。

表 2 夜香树多糖对 MG-63 细胞 Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 蛋白表达的影响 (n = 3)

Table 2 Effects of polysaccharide from *Cestrum nocturnum* on expression of Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 proteins of MG-63 cells (n = 3)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Bcl-2	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
空白	-	1.29	0.71	0.36	0.79
夜香树多糖	2.5	0.96	0.73	0.62 ¹⁾	0.76
	5.0	0.42 ¹⁾	0.78	0.98 ²⁾	0.78
	10.0	0.17 ²⁾	0.72	0.65 ¹⁾	0.73

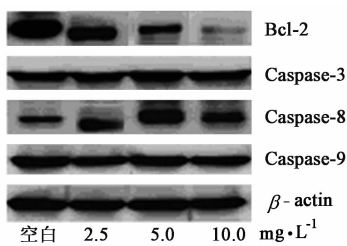


图 3 不同浓度的夜香树多糖对 MG-63 细胞凋亡相关蛋白的影响
Fig. 3 Effects of polysaccharide from *Cestrum nocturnum* on cell apoptosis related proteins of MG-63 cells

生率且早,进展迅速,容易出现复发和转移,是其致死的主要原因之一^[10]。

目前骨肉瘤的治疗一直未能取得较大进展。其主要原因是患者在大量、长期应用后,常引起毒副作用或产生耐药性,往往导致肿瘤复发或转移,严重影响着患者的预后。因此,寻找新的对骨肉瘤敏感的化疗药物显得十分重要。

近年研究发现,夜香树提取物体外对多种肿瘤细胞有增殖抑制作用,夜香树甙体皂苷对肝癌细胞、白血病细胞株 K562 细胞体内有良好的抗肿

瘤作用,但对骨肉瘤的研究尚未报道。本研究结果表明,夜香树甙体皂苷处理人骨肉瘤细胞 MG-63 后,能明显地抑制细胞增殖,随着试验药物浓度的增加,作用时间的延长,呈时间-剂量依赖性。在透射电镜下看到大量的凋亡细胞,通过流式细胞仪分析,夜香树甙体皂苷能使 MG-63 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,且有浓度和时间依赖性。由此可见,夜香树甙体皂苷抑制 MG-63 细胞增殖与诱导细胞凋亡有关。

细胞凋亡是一种由基因调控的细胞主动死亡过程,是机体的正常细胞在受到生理或病理刺激后启动的一种主动死亡过程,抗肿瘤药物作用大多数通过各种细胞因子或药物诱导敏感肿瘤细胞发生凋亡而实现其抑瘤作用的。细胞凋亡通路主要通过 3 种途径:死亡受体通路、线粒体通路、内质网通路。Caspases 与细胞凋亡密切相关,它通过级联反应,最终激活核酸内切酶来实现的。多种刺激因素启动的信号激活 Caspase-3,使胞质、胞核及细胞骨架的重要蛋白质降解失活^[11-12]。在 Caspase-8 的作用下死亡受体途径的死亡-诱导信号复合物被激活,引发线粒体通路的开放。他们裂解和激活下游的 Caspase-3,但这些级联可通过抑制 Bcl-2 抗凋亡成员^[13]。Bcl-2 基因是一种原癌基因,其蛋白定位于细胞的线粒体膜、核膜和内质网上,具有抑制凋亡的作用,Bcl-2 可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡,其过度表达能增强细胞对大多数细胞毒因素的抵抗力;Bax 是一种促凋亡因子,两者相互拮抗,Bax/Bcl-2 的升高能激活 Caspase-9,后者又能激活 Caspase-3,从而启动一系列级联反应,最终导致细胞凋亡^[14]。为探索夜香树甙体皂苷体外对骨肉瘤细胞 MG-63 的抑制机制,笔者用 Western blotting 检测了几种凋亡蛋白在 MG-63 细胞中的表达水平,结果

表明随着药物浓度的增高, Bcl-2 蛋白表达有明显下调趋势; 而 Caspase-8 活性变化明显, 质量浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 在 48 h 出现最大活性。由此证实夜香树甾体皂苷诱导细胞凋亡中, Bcl-2 家族和 Caspase 家族扮演了重要角色。

综上所述, 夜香树多糖对体外培养的骨肉瘤细胞 MG-63 有增殖抑制并诱导其凋亡, 其机制可能与下调 Bcl-2, 激活 Caspase-8 有关。由于人体内部结构比较体外细胞培养的复杂性以及肿瘤的异质性, 在体外结果的基础上, 笔者正在进行体内药理作用及机制研究。

[参考文献]

[1] Mirabello L, Pfeiffer R, Murphy G, et al. Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma [J]. *Cancer Causes Control*, 2011, 22 (6):899-908.

[2] Sánchez-Barceló E J, Mediavilla M D, Tan D X, et al. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone diseases: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis [J]. *Osteoporos*, 2010, 2010:830-831.

[3] 赵世元, 钟振国, 廖文, 等. 夜香树提取物体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20 (1):125-128.

[4] 赵世元, 钟振国, 张雯艳, 等. 夜香树提取物体内抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *中药材*, 2008, 31 (11): 1709-1712.

[5] 赵世元, 农智新, 叶海洪, 等. 夜香树叶甾体皂苷对人肝癌细胞株 BEL-7404 增殖抑制作用机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(7):212-216.

[6] 赵世元, 黄之虎, 叶海洪. 夜香树花甾体皂苷诱导 K562 细胞凋亡机制研究 [J]. *中成药*, 2013, 35 (3): 445-449.

[7] 赵世元, 农智新, 叶海洪, 等. 夜香树叶甾体皂苷的抗肿瘤活性 [J]. *中成药*, 2013, 35 (6):1243-1247.

[8] 赵世元, 张明艳, 李彩萍, 等. 夜香树甾体皂苷抗人肝癌裸鼠移植瘤的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (17):291-294.

[9] Reiter R J, Tan D X, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule [J]. *Prog Brain Res*, 2010, 181: 127-151.

[10] Mirabello L, Troisi R J, Savage S A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125:229-236.

[11] Gnzalo Rodriguez-Berriguete B S, Laura Galvis B S. Immunoreactivity to Caspase-3, Caspase-7, Caspase-8, and Caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors [J]. *Human Pathology*, 2012, 43:229-235.

[12] Chaudhry P, Singh M, Parent S, et al. Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32 (4):826-839.

[13] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48 (6):749-762.

[14] Pongrakhananon V, Nimmannit U, Luanpitpong S, et al. Curcumin sensitizes non-small cell lung cancer cell anoikis through reactive oxygen species-mediated Bcl-2 downregulation [J]. *Apoptosis*, 2010, 15 (5):574-585.

[责任编辑 周冰冰]