

Rasfonin 抑制骨肉瘤细胞 143B 的增殖和迁移

张 帆^{1,2}, 燕太强^{1△}, 郭 卫¹

(1. 北京大学人民医院骨肿瘤科, 北京 100044; 2. 郑州大学附属肿瘤医院骨软组织科, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**研究真菌次级代谢产物 rasfonin 对骨肉瘤 143B 细胞增殖与迁移能力的影响。**方法:**以骨肉瘤细胞系 143B 为模型, 利用 3-(4,5-二甲基)-5-(3-羧甲基苯环)-2-(4-硫基苯)-2H-四唑盐复合物检测法[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS]观察 rasfonin 对细胞活性的影响, 以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)组为对照, 采用 rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$ 和 6 $\mu\text{mol/L}$)处理 12 或 24 h, 观察 143B 细胞活性的变化; 采用克隆形成实验检测 rasfonin 对细胞集落形成能力的影响, 以 DMSO 组为对照, 采用 rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$)处理 1 周, 对比两组克隆形成数目。划痕实验及侵袭实验检测 rasfonin 对细胞侵袭迁移能力的影响, 以 DMSO 组为对照, 采用 rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h, 对比两组的伤痕愈合率及侵袭细胞数。以 DMSO 组为对照, 透射电子显微镜观察 rasfonin(3 $\mu\text{mol/L}$)处理 4 h 后细胞内自噬体含量的变化。蛋白免疫印迹的方法检测 rasfonin 对 p62 蛋白(sequestosome 1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 融合蛋白(microtubule associated protein 1 light chain 3 fusion protein, LC3)及聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶[poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1]表达的影响。**结果:**在 12 和 24 h, 随着 rasfonin 浓度的升高, 骨肉瘤 143B 细胞的细胞活性均逐渐降低, 3 组间差异有统计学意义(12 h: $F=31.36$, $P<0.01$; 24 h: $F=67.07$, $P<0.01$), 任意两组间比较差异也均有统计学意义($P<0.01$)。3 $\mu\text{mol/L}$ 的 rasfonin 可以显著抑制 143B 细胞的集落形成能力($P<0.01$)。Rasfonin 处理后, 143B 细胞在 24 h 内的伤痕愈合比率明显低于 DMSO 对照组(33.91% \pm 0.83% vs. 65.11% \pm 0.94%, $P<0.01$); 同样 24 h 内穿过覆盖有 Matrigel 的基底膜的细胞数明显低于 DMSO 对照组[(21.33 \pm 1.45)个 vs. (49.33 \pm 2.40)个, $P<0.01$]。Rasfonin 处理 4 h 后骨肉瘤 143B 细胞中自噬体增多, p62 水平降低, LC3-II 累积, 自噬抑制剂氯喹存在条件下 LC3-II 累积更为明显, 并且随着 rasfonin 浓度的提高 PARP-1 的切割增多。**结论:**Rasfonin 既可以抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖迁移, 还可以引起细胞的自噬与凋亡, 这些结果为 rasfonin 作为骨肉瘤新的治疗药物提供了初步的实验基础。

[关键词] 骨肉瘤; 增殖; 迁移; 自噬

[中图分类号] R738.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2019)02-0234-05

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2019.02.006

Rasfonin inhibits proliferation and migration of osteosarcoma 143B cells

ZHANG Fan^{1,2}, YAN Tai-qiang^{1△}, GUO Wei¹

(1. Musculoskeletal Tumor Center, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China; 2. Department of Bone and Soft Tissue, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of rasfonin, a fungal secondary metabolite, on the proliferation and migration of osteosarcoma 143B cells. **Methods:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay was performed to examine 143B cell viability following treatment of rasfonin. Using dimethyl sulfoxide (DMSO) group as control, cell viability was detected when 143B cells were treated with rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$ and 6 $\mu\text{mol/L}$) for 12 or 24 hours. The effect of rasfonin on colony forming ability was detected by clone formation assay. 143B cells treated with DMSO or rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$) for one week, and the number of clones formed in the two groups was counted. Wound healing and transwell assay were employed to analyze cell invasion and migration upon rasfonin challenge. The DMSO group was used as control while rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$) was used for 24 hours. The wound healing rate and the number of invasive cells were compared between the two groups. The intracellular autophagosomes were monitored by transmission electron microscopy when 143B cells were treated with DMSO or rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$) for 4 hours. The expression of p62, microtubule-associated protein 1 light chain 3 fusion protein (LC3) and poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in response to rasfonin were detected by immunoblotting assay. **Results:** Rasfonin reduced the viability of 143B cells in a dose-dependent manner (12 h: $F=31.36$, $P<0.01$; 24 h: $F=67.07$, $P<0.01$). Rasfonin (3 $\mu\text{mol/L}$) completely inhibited the clonal formation of 143B cells ($P<0.01$). The wound healing result revealed that rasfonin significantly decreased migratory ability of 143B cells

基金项目: 国家自然科学基金(81272381) Supported by the National Natural Science Foundation of China(81272381)

△ Corresponding author's e-mail, yantqzh@163.com

网络出版时间: 2018-12-17 13:20:02 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20181213.1612.005.html>

(33.91% ± 0.83% vs. 65.11% ± 0.94%, $P < 0.01$), whereas its treatment significantly reduced the number of 143B cells penetrating through Matrigel-containing basement membrane (21.33 ± 1.45 vs. 49.33 ± 2.40, $P < 0.01$). Compared with the control group, rasfonin markedly increased the number of autophagic vacuoles. The immunoblotting results revealed that rasfonin increased LC3-II accumulation and decreased p62 levels. Chloroquine (CQ), an often used autophagic inhibitor, further accumulated rasfonin-induced LC3-II. In addition, rasfonin appeared to cause the cleavage of PARP-1. **Conclusion:** Rasfonin induced autophagy and activated caspase-dependent apoptosis in 143B cells concurring with suppressing the proliferation and migration of the cells; these results provide an experimental basis for rasfonin as a potential therapeutic agent for osteosarcoma.

KEY WORDS Osteosarcoma; Proliferation; Migration; Autophagy

骨肉瘤是起源于间叶组织,以肿瘤细胞直接产生骨或骨样组织为特点的恶性肿瘤,是临床最常见的一种原发性恶性骨肿瘤,70%以上发生于儿童及青少年,恶性程度高,易发生转移,预后极差^[1]。目前的治疗方法主要是术前化疗、手术、术后化疗相结合。为了进一步提高诊疗效果,研究者们正积极开发新的靶向治疗药物^[2]。Rasfonin 是由日本千叶大学和东京大学科学家从真菌的固体发酵提取物中分离出来的新的化合物,可以显著抑制 *ras* 依赖的小鼠 B 细胞系 Ba/F3-V12 细胞的生存^[3];而近年来研究发现,rasfonin 在体内外对胰腺癌细胞 Panc-1 均有抑制作用^[4],还可以在肾癌细胞中通过诱导自噬与凋亡发挥抗肿瘤细胞的活性^[5]。

细胞凋亡、自噬、程序性坏死是程序性细胞死亡的 3 种主要方式^[6]。细胞凋亡是程序性细胞死亡的主要形式,诱导细胞凋亡的途径主要为死亡受体途径和线粒体途径。细胞自噬是对细胞内损坏或衰老的蛋白质或细胞器进行降解并回收再利用的过程^[7]。细胞自噬有助于维持细胞在恶劣环境中的生存,但过度的自噬使细胞内关键蛋白和细胞器消耗过度而导致死亡^[8]。程序性坏死则是以细胞器的肿胀、胞膜的破坏为特点。尽管三者经历不同的生理过程,但三者间关系十分密切,在恶劣环境下细胞中还可以出现多种死亡方式共存^[9]。

目前 rasfonin 在骨肉瘤中的作用还未见报道,本研究旨在明确 rasfonin 对骨肉瘤细胞 143B 的增殖和迁移是否存在抑制作用,并探讨 rasfonin 对骨肉瘤细胞凋亡及自噬的影响,希望为 rasfonin 用于骨肉瘤的治疗提供初步的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 药品和抗体

Rasfonin 由中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所车永胜研究员提供。氯喹 (chloroquine diphosphate salt, CQ, C6628) 和微管相关蛋白 1 轻链 3 融合蛋白 (microtubule associated protein 1

light chain 3 fusion protein, LC3) 抗体 (L7543, 1 : 1 000) 购自美国 Sigma Aldrich 公司, p62 (sequestosome 1) 抗体 (sc-28359, 1 : 1 000) 购自美国 Santa Cruz 公司, 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 [poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1] 抗体 (9542, 1 : 1 000) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Actin 抗体 (TA-09, 1 : 2 000) 购自北京中杉金桥公司。

1.2 试剂耗材

DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 GIBCO 公司, Transwell 侵袭小室购自美国 Corning 公司, 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜及发光液购自美国 Millipore 公司。

1.3 细胞培养

骨肉瘤 143B 细胞采用 DMEM 培养基 [含 10% (质量分数) 胎牛血清和 1% (质量分数) 青链霉素双抗], 于 37 °C、5% CO₂ (体积分数) 细胞培养箱中进行培养。当细胞密度达到 80% 左右时, 用胰酶消化贴壁细胞, 离心后使用新鲜培养基重悬, 将细胞分到六孔板内, 待细胞生长至 60% ~ 70% 密度, 进行加药处理。

1.4 MTS 检测细胞存活率

取对数生长期细胞, 每孔 5 000 ~ 10 000 个细胞均匀接种于 96 孔板中, 体积为 100 μL, 培养过夜后更换不含酚红的 DMEM (含 10% 胎牛血清) 培养基。每组设置 3 个复孔, 以二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 为对照, 加入指定浓度的 rasfonin, 继续培养指定的时间。而后每孔加入 3-(4,5-二甲基)-5-(3-羧甲基苯环)-2-(4-硫基苯)-2H-四唑盐复合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS] 和吩嗪硫酸甲酯 (phenazine methosulfate, PMS) (20 : 1) 混合溶液 20 μL, 使用酶标仪 (波长 492 nm) 测定各孔光密度值。

1.5 克隆形成实验

将 143B 细胞按照 1 000 个/盘接种到 6 cm 培养皿中, 加入 3 μmol/L 的 rasfonin 处理, 每组重复 3

次。37 ℃、5% CO₂细胞培养箱中培养 1 周。弃培养基,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 1 次,加入 2 mL 吉姆萨染液,室温过夜孵育。去除染液,清水洗 1 次,室温干燥后拍照。

1.6 划痕实验

将 143B 细胞接种到 6 孔板中,当细胞密度达到 80% 左右时用 200 μL 枪头划一条直线。PBS 洗去脱落细胞,加入新鲜培养基与 3 μmol/L 的 rasfonin,于 0、24 h 分别拍照。

1.7 侵袭实验

将 143B 细胞消化后重悬在不含血清的 DMEM 培养基中,以 1×10^5 个/200 μL 的量接种于覆盖有基质胶的 Transwell 小室的上室中,以 DMSO 为对照,加入 3 μmol/L 的 rasfonin,下室中加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μL。37 ℃ 培养 24 h 后取出小室,用棉签擦去上室内的细胞,然后使用甲醇固定 20 min,结晶紫染色 20 min,显微镜下拍照并计数。

1.8 透射电镜观察

将 143B 细胞接种于 10 cm 培养皿中,待细胞密度达到 70% 左右。换新鲜培养基,按 3 μmol/L 的浓度加入 rasfonin 或 DMSO 处理 4 h。然后胰酶消化细胞,4 ℃、 $1\ 000 \times g$ 离心 5 min,冷的 PBS 洗两遍。加入 1.5% 的戊二醛溶液,4 ℃ 固定过夜后送检。

1.9 免疫印迹实验(Western blot)

细胞经药物处理后,用冷 PBS 洗 1 遍,加入一

定量的细胞裂解液,进行总蛋白的提取。将等量样品经 8% 或 13.5% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白,而后将胶内蛋白质电转至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(triethanolamine buffered saline solution tween, TBST)洗膜后用相应二抗室温孵育 1 h,经适当漂洗后,化学发光试剂盒显色。

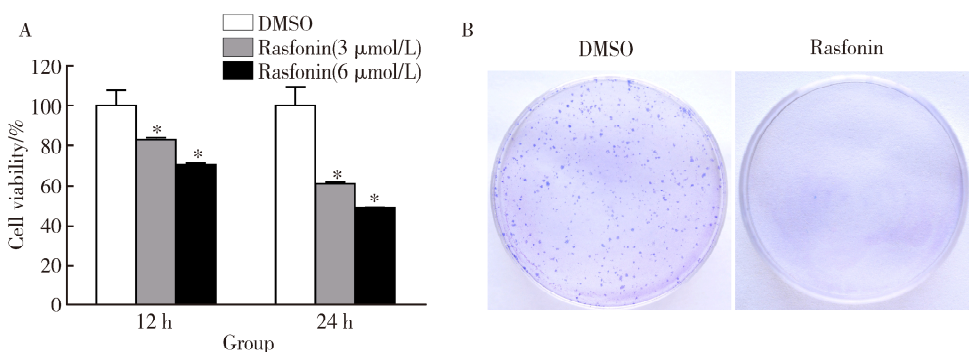
1.10 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差的方式表示,均数间的比较采用独立 *t* 检验,MTS 实验结果以单因素方差分析和 Student-Newman-Keuls (S-N-K) 法两两比较分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rasfonin 抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖

以 DMSO 为对照,采用不同浓度的 rasfonin (3、6 μmol/L) 处理 143B 细胞 12 h 或 24 h。MTS 结果显示,随着 rasfonin 浓度的升高,骨肉瘤 143B 细胞的细胞活性均逐渐降低,3 组间差异有统计学意义(图 1A, 12 h: $F = 31.36$, $P < 0.01$; 24 h: $F = 67.07$, $P < 0.01$),之后使用 SNK 法两两比较发现,任意两组间比较差异也均有统计学意义。克隆形成实验显示,3 μmol/L 的 rasfonin 可以显著抑制 143B 细胞的集落形成能力(图 1B)。



A, 143B cells were treated with rasfonin (3 μmol/L and 6 μmol/L) for up to 24 h, cell viability was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay; B, colony growth assays were performed in 143B cells with rasfonin (3 μmol/L). * $P < 0.01$, vs. DMSO group. DMSO, dimethyl sulfoxide.

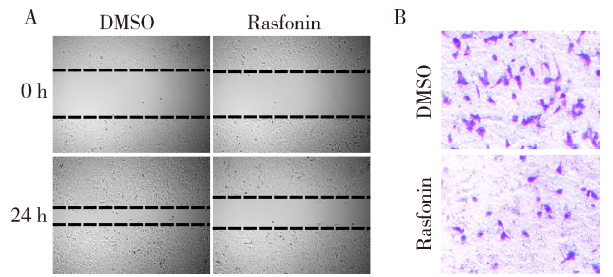
图 1 Rasfonin 抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖

Figure 1 Rasfonin inhibits cell viability of 143B cells

2.2 Rasfonin 抑制骨肉瘤 143B 细胞的侵袭迁移

划痕实验表明,在 3 μmol/L 的 rasfonin 存在条件下,143B 细胞的迁移愈合能力明显减弱,rasfonin 处理组的伤痕愈合比率($33.91\% \pm 0.83\%$)明显低于 DMSO 组($65.11\% \pm 0.94\%$, $P < 0.01$, 图 2A)。

同样,Transwell 结果显示,3 μmol/L 的 rasfonin 使 143B 细胞的侵袭能力也明显减弱,rasfonin 处理组有(21.33 ± 1.45)个细胞穿过覆盖有 Matrigel 的基底膜,明显低于 DMSO 组的(49.33 ± 2.40)个($P < 0.01$, 图 2B)。



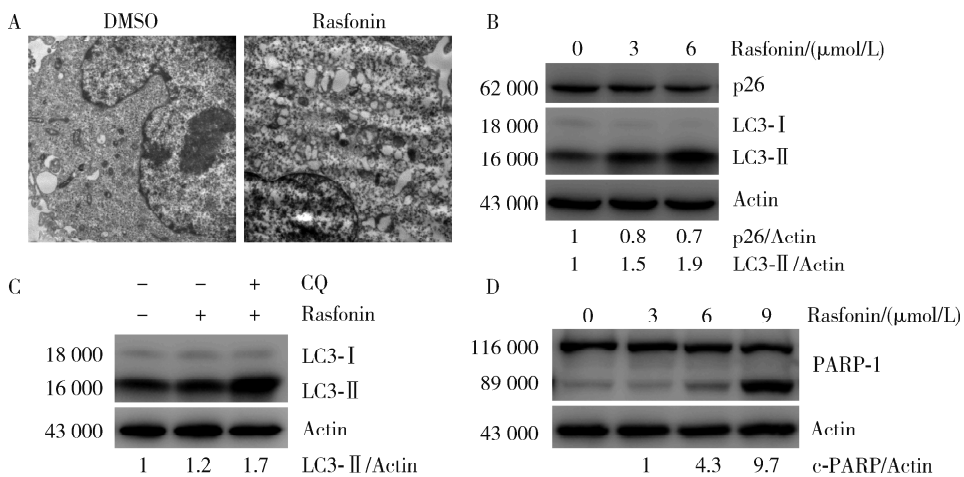
A and B, wound healing assay and transwell assay were performed in 143B cells in the presence of DMSO or rasfonin ($3 \mu\text{mol/L}$); B, stained with crystal violet, $\times 100$. DMSO, dimethyl sulfoxide.

图2 Rasfonin 抑制骨肉瘤 143B 细胞的侵袭迁移

Figure 2 Rasfonin inhibits migratory and invasive abilities of 143B cells

2.3 Rasfonin 诱导 143B 细胞的自噬与凋亡

透射电镜观察发现 $3 \mu\text{mol/L}$ 的 rasfonin 处理 143B 细胞 4 h 后,细胞中自噬体的数量明显增多



A, electron microscopy was performed in 143B cells after exposed to rasfonin ($3 \mu\text{mol/L}$) for 4 h, $\times 9\ 900$; B and C, following treatment of rasfonin (B: $3 \mu\text{mol/L}$ and $6 \mu\text{mol/L}$, C: $3 \mu\text{mol/L}$) for 4 h with or without Chloroquine (CQ), 143B cells were lysed and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Actin was used as a loading control; D, expression of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) was analyzed by immunoblotting after treated by rasfonin for 4 h. Actin was used as a loading control. DMSO, dimethyl sulfoxide; CQ, chloroquine; LC3, microtubule associated protein 1 light chain 3 fusion protein; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase.

图3 Rasfonin 增强 143B 细胞的自噬与凋亡

Figure 3 Rasfonin increases autophagy and apoptosis of 143B cells

3 讨论

新辅助化疗出现以来,骨肉瘤患者的 5 年生存率已由原来的 20% 提高到 70%,且与过去的截肢手术相比,患者大多可以进行保肢手术,提高了患者术后的生活质量^[10]。然而,对于化疗耐药或者发生肺转移的患者,治疗效果依然没有取得很大的进展,预后依然较差,死亡率较高,因此开发新的对骨肉瘤的生长与转移具有抑制作用的治疗药物对骨肉瘤患者具有重要意义。

真菌次级代谢产物 rasfonin 是一种具有肿瘤抑制活性的化合物,研究表明,rasfonin 对胰腺癌细胞 Panc-1 的增殖、迁移均具有抑制作用,并且使丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase,

(图 3A)。LC3 是自噬的标志蛋白,当自噬发生时,LC3-I 脂化形成 LC3-II,而 p62 是自噬的特异性底物,在自噬体内被降解;而氯喹是自噬晚期的抑制剂,可以抑制 LC3-II 的降解。Rasfonin 使 143B 细胞中 p62 蛋白表达减少,LC3-II 的量明显增多(图 3B),而且在氯喹存在的情况下 rasfonin 引起的 LC3-II 继续增多(图 3C),这说明 rasfonin 可以引起 143B 细胞的自噬。PARP-1 是一种脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 修复酶,也是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶-3 (caspase-3) 的切割底物,PARP-1 的切割可以作为 caspase-3 依赖的细胞凋亡的标志。采用 rasfonin 处理 143B 细胞,PARP-1 的切割随着 rasfonin 浓度的升高而增强(图 3D),说明 rasfonin 可以诱导 143B 细胞的凋亡。

MAPK) 通路的活性显著降低,说明 rasfonin 有可能通过该通路发挥抗肿瘤作用^[4]。在肾癌细胞 ACHN 中,rasfonin 可以抑制细胞活性并诱导其凋亡,对信号通路检测发现,rasfonin 导致了蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 活性的升高及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 下游核糖体蛋白 S6 激酶 (ribosomal protein S6 kinase beta-1, S6K1) 和真核翻译起始因子-4E 结合蛋白 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, 4E-BP1) 活性的降低^[5],还使活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) /c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路的活性升高^[11],表明 rasfonin 可能通过多种不同的信号通路发挥抗肿瘤作用,这些结果均表明 rasfonin 具有临床治疗恶

性肿瘤的潜在价值。与这些研究相一致的是, 本研究发现 rasfonin 对骨肉瘤细胞也具有显著的抑制效果, 它不仅可以降低 143B 细胞的活性及克隆形成能力, 还减弱了细胞的迁移与侵袭能力, 并且诱导了 caspase 依赖的细胞凋亡, 下一步可进行体内实验进一步验证 rasfonin 对骨肉瘤的作用。

过度的自噬可以导致细胞的死亡, 自噬是不同于细胞凋亡的第二类程序性细胞死亡^[12]。通过药物诱导自噬性死亡对肿瘤的治疗具有积极作用, 如替莫唑胺 (temozolomide)、姜黄素 (curcumin) 均可以诱导恶性胶质瘤细胞的自噬性死亡^[13-14]; 舒尼替尼 (sunitinib) 诱导的肾癌细胞的自噬增强了其对肾癌细胞的杀伤作用^[15]。在肾癌细胞中, rasfonin 可以诱导细胞的自噬, 抑制其自噬可以挽救 rasfonin 引起的细胞活性降低与凋亡, 这表明自噬可能是 rasfonin 引起细胞死亡的方式之一^[5]。本研究表明, rasfonin 也可以诱导骨肉瘤细胞的自噬, 自噬在 rasfonin 的抗肿瘤效果中可能也起到重要作用, 这其中的具体机制有待进一步阐明。

综上所述, 本实验证明了 rasfonin 在体外对骨肉瘤细胞 143B 的抑制作用, rasfonin 有望成为一种临床治疗骨肉瘤的新药物。

(志谢: 感谢中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所车永胜研究员对 rasfonin 的提供)

参考文献

- [1] Osasan S, Zhang M, Shen F, et al. Osteogenic sarcoma: a 21st century review[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(9): 4391-4398.
- [2] Shaikh AB, Li F, Li M, et al. Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 506.
- [3] Tomikawa T, Shin-Ya K, Furihata K, et al. Rasfonin, a new apoptosis inducer in *ras*-dependent cells from *Talaromyces* sp. [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2000, 53(8): 848-850.

- [4] Xiao Z, Li L, Li Y, et al. Rasfonin, a novel 2-pyrone derivative, induces ras-mutated Panc-1 pancreatic tumor cell death in nude mice[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(5): e1241.
- [5] Lu Q, Yan S, Sun H, et al. Akt inhibition attenuates rasfonin-induced autophagy and apoptosis through the glycolytic pathway in renal cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(12): e2005.
- [6] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(6): 487-498.
- [7] Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, et al. Autophagy: regulation and role in development [J]. *Autophagy*, 2013, 9(7): 951-972.
- [8] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2679-2688.
- [9] Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(7): 966-975.
- [10] 燕太强, 梁伟民, 郭卫. 骨肉瘤的诊疗和研究进展[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012(17): 4988-4990.
- [11] Wang W, Sun H, Che Y, et al. Rasfonin promotes autophagy and apoptosis *via* upregulation of reactive oxygen species (ros)/jnk pathway[J]. *Mycology*, 2016, 7(2): 64.
- [12] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1): 107-120.
- [13] Kanzawa T, Germano IM, Komata T, et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 448-457.
- [14] Shinojima N, Yokoyama T, Kondo Y, et al. Roles of the akt/mTOR/p70s6k and erk1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy[J]. *Autophagy*, 2007, 3(6): 635-637.
- [15] 曹珮, 姜学军, 席志军. 舒尼替尼通过抑制 Akt/mTOR 信号通路诱导肾癌细胞自噬[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2016, 48(4): 584-589.

(2017-04-12 收稿)

(本文编辑: 刘淑萍)