

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.002

◇ 药学研究 ◇

维替泊芬影响骨肉瘤 MG63 细胞增殖和迁移侵袭的作用机制

陈蔚^a, 余铃^b, 陈敬腾^b, 夏露^a, 郭卫春^b作者单位: 武汉大学人民医院,^a骨 3 科,^b骨 1 科, 湖北 武汉 430060

通信作者: 郭卫春, 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为骨肿瘤, E-mail: guoweichun@aliyun.com

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81502575)

摘要:目的 探讨维替泊芬影响骨肉瘤 MG63 细胞增殖及迁移侵袭的作用机制。方法 体外培养骨肉瘤 MG63 细胞, 采用人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)检测不同浓度(0、2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬对骨肉瘤 MG63 细胞增殖影响; 流式细胞术分析(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬对骨肉瘤 MG63 细胞周期分布及凋亡的影响; 划痕实验和 Transwell™ 侵袭实验检测(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬对骨肉瘤 MG63 细胞迁移及侵袭能力的影响; 蛋白质印迹法(Western Blot)检测(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬对 Hippo 信号通路中 Yes-相关蛋白 1(YAP1)、TEA 转录因子 1(TEAD1)、磷酸化 Yes-相关蛋白 1(pYAP1)的蛋白表达水平。结果 CCK-8 结果显示维替泊芬能够抑制骨肉瘤 MG63 细胞的增殖, 24、48、72 h 的半抑制浓度(IC₅₀)分别为(6.592 ± 0.121) $\mu\text{mol/L}$ 、(4.668 ± 0.075) $\mu\text{mol/L}$ 、(2.953 ± 0.078) $\mu\text{mol/L}$, 并呈时间、浓度依赖性; 流式细胞术结果表明维替泊芬以浓度依赖的方式诱导骨肉瘤 MG63 细胞凋亡, 使骨肉瘤 MG63 细胞周期阻滞于 G0/G1 期; 划痕实验和 Transwell™ 侵袭实验结果表明维替泊芬可抑制 MG63 细胞迁移和侵袭; 蛋白质印迹法结果显示维替泊芬处理的 MG63 细胞中 YAP1、TEAD1 蛋白表达水平降低, 而 pYAP1 蛋白表达水平保持不变。结论 维替泊芬能抑制骨肉瘤 MG63 细胞增殖、促进细胞凋亡、导致细胞周期阻滞, 以及抑制细胞迁移和侵袭, 并且下调 YAP1 及 TEAD1 表达, 维替泊芬阻碍 YAP1 和 TEAD1 相互作用可能是抗骨肉瘤的作用机制。

关键词: 骨肉瘤; 维替泊芬; Hippo 信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭; 流式细胞术; 细胞迁移分析; 印迹法, 蛋白质; 人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽

The functional mechanism of veterporfin affecting the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma MG-63 cell line

CHEN Wei^a, YU Ling^b, CHEN Jingteng^b, XIA Lu^a, GUO Weichun^b

Author Affiliation: ^aDepartment 3 of Orthopaedics, ^bDepartment 1 of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China

Abstract: Objective To explore the functional mechanism of veterporfin on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma MG-63 cell line. **Methods** The osteosarcoma MG-63 cells were cultured in vitro. Human cholecystokinin octapeptide (CCK-8) assay was used to detect the anti-proliferative effects of (0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{mol/L}$) veterporfin on osteosarcoma MG-63 cells. The effects of (0, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{mol/L}$) veterporfin on cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The wound healing assay and Transwell™ invasion assay were used to determine the effects of (0, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{mol/L}$) veterporfin on cell migration and invasion capability. The effects of (0, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{mol/L}$) veterporfin on the expression levels of Yes-associated protein 1 (YAP1), TEA domain family member 1 (TEAD1) and phosphorylate Yes-associated protein 1 (pYAP1) in Hippo signaling pathway were determined by Western blotting. **Results** CCK-8 assay results showed that veterporfin inhibited the proliferation of MG-63 cells. The semi-inhibitory concentrations (IC₅₀) at 24, 48, and 72 h were (6.592 ± 0.121) $\mu\text{mol/L}$, (4.668 ± 0.075) $\mu\text{mol/L}$, and (2.953 ± 0.078) $\mu\text{mol/L}$, respectively, which were time- and concentration-dependent. Flow cytometry showed that veterporfin could cause osteosarcoma cell cycle arrest in G0/G1 phase and induce apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells in a concentration-dependent manner. Wound healing assay and Transwell™ invasion assay confirmed that veterporfin could inhibit the migration and invasion ability of MG-63 cells. The Western-blot assay indicated that the expressions of YAP1, TEAD1 were reduced, whereas the expression of pYAP1 kept unchanged. **Conclusions** Veterporfin inhibited the proliferation of osteosarcoma cells, promoted cell apoptosis, led to cell arrest, inhibited cell migration and invasion, and downregulated the expression levels of YAP1 and TEAD1. Veterporfin blocking the interaction of YAP1 and TEAD1 might be the mechanism of targeting osteosarcoma.

Key words: Osteosarcoma; Veterporfin; Hippo signaling pathway; Proliferation; Migration; Invasion; Flow cytometry; Cell migration assays; Blotting, western; Human cholecystokinin octapeptide

骨肉瘤是来源于间叶组织的恶性骨肿瘤,好发于青少年,生长迅速且恶性程度高,预后极差^[1]。20世纪70年代新辅助化疗的引入使病人5年生存率提高到65%~70%,保肢手术的开展也使病人生存质量得到显著改善^[2]。但是出现化疗耐药和远处转移的病人仍预后不良,5年生存率不足20%^[1,3]。因而寻找更加有效的针对骨肉瘤的治疗药物具有十分重要的意义。

Hippo通路是一种进化上高度保守的信号转导通路,通过控制细胞增殖和凋亡起到调节器官大小和维持组织稳态的作用。经典Hippo信号通路核心成分有哺乳动物STE20样蛋白激酶1/2(mammalian STE20-like protein kinase 1/2, MST1/2)、接头蛋白Salvador同源物1(Salvador homolog 1, SAV1)、大肿瘤抑制基因1/2(large tumour suppressor 1/2, LATS1/2)和MOB激酶活化剂1(Mob kinase activator 1, MOB1), Yes-相关蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1)。其中YAP1为Hippo信号通路下游的转录共激活因子,通过调节各种转录因子的活性参与细胞增殖、凋亡、化疗耐药和血管生成等过程^[4-5]。目前越来越多研究证实YAP1在许多恶性肿瘤中高表达,并且参与肿瘤发生、发展以及复发。Wang等^[6]发现YAP1可以调节骨肉瘤细胞的增殖能力及其对化疗药物的敏感性,表明YAP1可能是治疗骨肉瘤的潜在药物靶点,寻找针对YAP1的抑制剂有望为治疗骨肉瘤病人带来新的曙光。

维替泊芬是一种苯并卟啉类衍生物光敏剂,临床上用于治疗新生血管性黄斑变性^[7]。然而有研究表明维替泊芬可作为非光敏激活剂治疗多种疾病^[8],如维替泊芬能抑制YAP1基因的转录和翻译,在没有光激活的情况下破坏YAP1与靶蛋白TEA转录因子(TEADs)相互作用,从而调控多种肿瘤细胞增殖和凋亡,如乳腺癌和前列腺癌等^[9-10]。但目前尚未见维替泊芬作用于骨肉瘤的报道。本研究于2018年6月至2019年3月观察不同浓度维替泊芬对骨肉瘤MG63细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡、侵袭及转移能力的影响,初步探究了维替泊芬抗骨肉瘤作用的相关分子机制,以期维替泊芬治疗骨肉瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人骨肉瘤MG63细胞购于中国科学院细胞库上海保藏中心(批号TCHu124)。维替泊芬购于Selleck公司(批号S1786),DEME高糖培养基购于美国Hyclone公司(批号SH30022.01),新生胎牛血清购于Gibco澳洲公司(批号10099-141);1%双抗(青霉素100 U/mL,链霉素100 μg/mL)(批号

G4003)、二甲基亚砜(DMSO,批号D2650)和胰蛋白酶(批号G4004)购于武汉赛维尔生物科技有限公司;人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)试剂盒购于南京碧云天公司(批号C0038);膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒与细胞周期检测试剂盒(批号KGA108-1,KGA511)购于南京凯基生物科技发展有限公司;8.0 μm孔径Transwell™小室(批号PI8P01250)、聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜,批号ISEQ00010)均购于Millipore公司;兔抗人Yes相关蛋白1(YAP1,批号4912S)、TEA转录因子1(TEAD1,批号D9X2L)、磷酸化Yes相关蛋白1(pYAP1,批号D9W2I)、β-肌动蛋白(β-actin,批号13E5)抗体均购于美国CST公司;实验所用仪器包括自动酶标仪、流式细胞仪和倒置显微镜。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 骨肉瘤MG63细胞培养于含有10%新生胎牛血清,1%青霉素(100 U/mL)及链霉素(100 μg/mL)的DEME高糖培养液中,放置在37℃、5%二氧化碳培养箱中培养,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞增殖能力检测 取对数生长期的骨肉瘤MG63细胞以 5×10^4 /mL浓度接种于96孔板上,每孔100 μL,孵育24 h待细胞贴壁后加入不同浓度的维替泊芬(0、2、4、6、8、10 μmol/L),分别培养24、48、72 h,然后每孔加入10 μL CCK-8试剂,继续孵育2 h,用自动酶标仪测量每孔细胞在450 nm波长的吸光度值。所有试验均进行3次。

1.2.3 细胞周期检测 不同浓度维替泊芬(0、2、4、6、8 μmol/L)处理骨肉瘤MG63细胞24 h后,收集细胞,用冷磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤2次,用70%乙醇固定1 h后再用PBS洗涤1次,然后用200 μL冷PBS重悬细胞,再加入1 mg/mL核糖核酸酶A(RNase A)和50 μg/mL PI,混匀后避光孵育30 min,随即用流式细胞仪分析细胞周期分布。

1.2.4 细胞凋亡分析 不同浓度维替泊芬(0、2、4、6、8 μmol/L)处理骨肉瘤MG63细胞24 h后,收集细胞,用冷PBS洗涤2次,1 000 r/min离心5 min后去上清,将细胞制成单细胞悬液,加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,混匀,避光孵育15 min,然后再加入400 μL结合缓冲液,随即用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.2.5 划痕实验 取对数生长期的MG63细胞,以每孔 5×10^4 个接种于12孔板中,待细胞长到完全融合后,用无菌100 μL枪头在每个孔底划出1条直线,PBS洗涤2次,用倒置显微镜拍照后,分别加入

无血清 DMEM 高糖培养基,并调整维替泊芬浓度为 0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 48 h 后用倒置显微镜观察划痕-愈合度,拍照记录,每组实验重复 3 次,按下列公式计算细胞迁移率:

$$\text{细胞迁移率}(\%) = \frac{1 - \text{药物组细胞迁移面积}}{\text{对照组细胞迁移面积}} \times 100\%.$$

1.2.6 Transwell™ 侵袭实验 将 Transwell™ 小室放入 24 孔板中,每孔上室加入 50 μL 稀释后的基质胶(无血清 DMEM 培养基稀释),然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温无菌培养箱中培养 4 h,吸出基质胶表面的液体。收集维替泊芬处理过的骨肉瘤 MG63 细胞,重悬后加入上室,每孔细胞约 4×10^4 个,下室加入 500 μL 含 150 mL/L 胎牛血清的完全培养基。各组上室中分别加入 DMSO、终浓度为 2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$ 的维替泊芬后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温无菌培养箱中培养 24 h。取出小室,应用无菌棉签擦去小室内残留的细胞,甲醛中固定 20 min,然后用 PBS 清洗,后加入结晶紫染色 10 min,晾干后于倒置显微镜下观察滤膜底附着的细胞数,统计侵袭细胞数。每组随机选取 5 个视野($\times 100$),每组实验均独立重复 3 次。

1.2.7 蛋白质印迹法(Western Blot) 不同浓度维替泊芬(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)处理 MG63 细胞 48 h 后用细胞裂解液提取总蛋白,吸取 40 μg 蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用 5% 脱脂奶粉于室温封闭 1.5 h,加入相应一抗孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。滤膜经 TBS 缓冲液漂洗 3 次后加入相应二抗,室温摇床孵育 2 h。在暗室中将 PVDF 膜用发光剂显色曝光后分析结果, β -actin 蛋白条带作为内参。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维替泊芬抑制骨肉瘤 MG63 细胞增殖 CCK-8 结果显示,随着维替泊芬作用时间延长和使用浓度增加,其细胞活力不断下降,24、48、72 h 的半抑制浓度(IC_{50})分别为(6.592 ± 0.121) $\mu\text{mol/L}$ 、(4.668 ± 0.075) $\mu\text{mol/L}$ 、(2.953 ± 0.078) $\mu\text{mol/L}$ 。说明在 0~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度区间内,维替泊芬可以呈时间、浓度依赖性地抑制 MG63 细胞的增殖。其中 24 h 内各浓度下(2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$)细胞存活率分别为:(81.43 ± 1.70)%、(73.50 ± 1.34)%、(56.10 ± 1.56)%、(39.17 ± 0.78)%、(33.27 ± 8.1)%;48 h 内各浓度下(2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$)细胞存活率分别为:(75.63 ± 1.30)%、(56.87 ± 1.43)%、(44.67 ± 1.83)%、(28.37 ± 0.93)%、(22.97 ± 1.30)%;72 h 内各浓度下(2、4、6、8、10

$\mu\text{mol/L}$)细胞存活率分别为:(63.2 ± 0.90)%、(41.40 ± 1.40)%、(24.00 ± 1.28)%、(17.30 ± 1.28)%、(8.40 ± 1.47)%。见图 1。

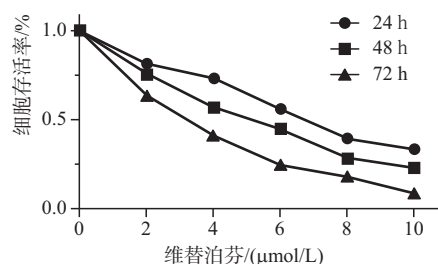
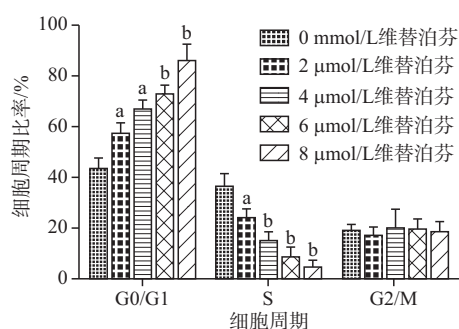


图1 维替泊芬抑制骨肉瘤 MG63 细胞增殖

2.2 维替泊芬导致骨肉瘤 MG63 细胞周期阻滞 流式细胞术结果显示。与对照组相比,不同浓度的维替泊芬处理 24 h 后,处于 G0/G1 的细胞比例显著上升,G2/M 期细胞比例变化不明显,而 S 期细胞比例则明显降低,且呈浓度相关性。这一结果提示维替泊芬可以导致骨肉瘤 MG63 细胞周期阻滞于 G0/G1 期。其中 24 h 内各浓度下(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$) G0/G1 期比率分别为:(43.33 ± 0.89)%、(57.33 ± 0.89)%、(66.67 ± 0.88)%、(72.67 ± 0.88)%、(86.00 ± 1.53)% ($F = 236.61, P < 0.05$);各浓度下(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$) S 期比率分别为:(36.33 ± 1.21)%、(23.67 ± 0.88)%、(14.67 ± 0.88)%、(8.33 ± 0.88)%、(4.33 ± 1.53)% ($F = 194.82, P < 0.05$);各浓度下(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$) G2/M 期比率分别为:(19.00 ± 0.58)%、(16.67 ± 0.88)%、(20.00 ± 1.73)%、(19.33 ± 0.88)%、(18.33 ± 0.81)% ($F = 1.42, P = 0.30$)。见图 2。

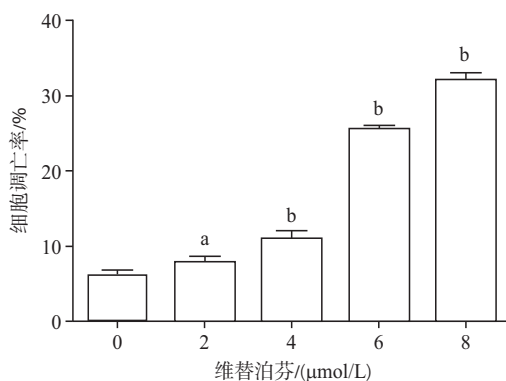


注:与对照组相比, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$

图2 不同浓度维替泊芬影响MG63细胞周期分布

2.3 维替泊芬诱导 MG63 细胞凋亡 不同浓度(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬处理 MG63 细胞 24 h 后,采用 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡率,结果显示不同浓度(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬处理 24 h 均可诱导 MG63 细胞凋亡,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且凋亡率随着维替泊芬浓度的增加而逐渐增高。各浓度下(0、2、4、6、8

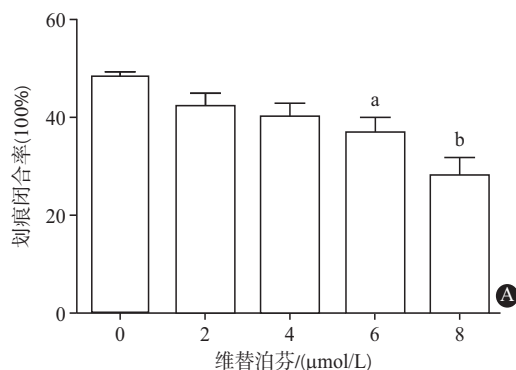
$\mu\text{mol/L}$)细胞凋亡率分别为: $(6.19 \pm 0.52)\%$ 、 $(8.02 \pm 0.43)\%$ 、 $(10.95 \pm 0.95)\%$ 、 $(25.44 \pm 0.40)\%$ 、 $(32.19 \pm 0.82)\%$ ($F = 302.68, P < 0.05$)。见图3。



注:与对照组相比, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$

图3 维替泊芬处理MG63 24 h后对骨肉瘤MG63细胞凋亡率的影响

2.4 维替泊芬抑制骨肉瘤MG63细胞迁移和侵袭
细胞划痕实验结果显示,与对照组相比,不同浓度(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬处理MG63细胞后迁移率均降低,6 $\mu\text{mol/L}$ 和8 $\mu\text{mol/L}$ 维替泊芬处理组开口区域明显增宽,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见图4A)。同样,Transwell实验结果显示维替泊芬处理后MG63细胞侵袭性下降,其中6 $\mu\text{mol/L}$ 和8 $\mu\text{mol/L}$ 处理组较对照组显著降低,差异有统计学意义



注:与对照组相比, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$

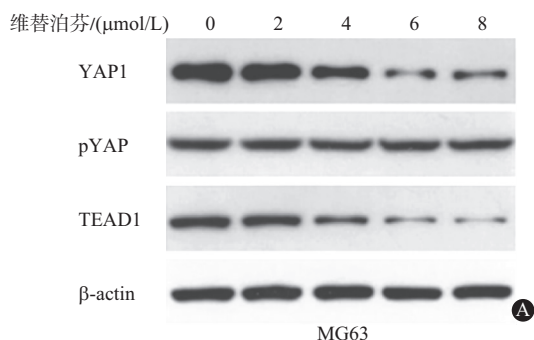
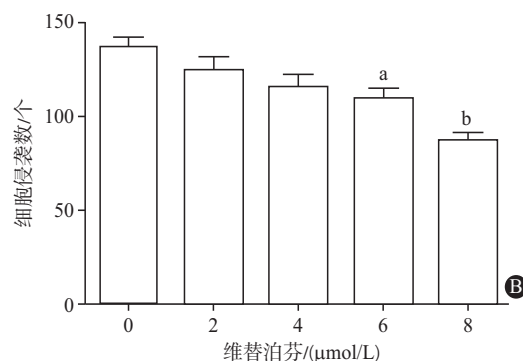
图4 维替泊芬处理MG63 24 h后对骨肉瘤MG63细胞迁移(A)与侵袭(B)的影响

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见图4B)。其中各浓度下(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)划痕闭合率分别为: $(48.33 \pm 0.88)\%$ 、 $(42.33 \pm 2.60)\%$ 、 $(40.00 \pm 2.87)\%$ 、 $(36.67 \pm 3.18)\%$ 、 $(28.00 \pm 3.79)\%$ ($F = 6.99, P = 0.006$)。各浓度下(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)细胞侵袭数分别为: (137.00 ± 5.29) 个、 (124.67 ± 6.77) 个、 (115.67 ± 6.17) 个、 (110 ± 5.13) 个、 (87.33 ± 3.71) 个 ($F = 11.25, P = 0.001$)。

2.5 维替泊芬抑制YAP1及其相关靶基因的表达
采用蛋白质印迹法检测YAP1及TEAD1表达的变化。结果显示,不同浓度(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$)维替泊芬处理MG63细胞24 h后,YAP1及其转录因子TEAD1的表达水平均降低($P < 0.05$),而磷酸化YAP1表达水平不变(见图5),提示维替泊芬能抑制MG63细胞的YAP1及其下游靶基因TEAD1表达。

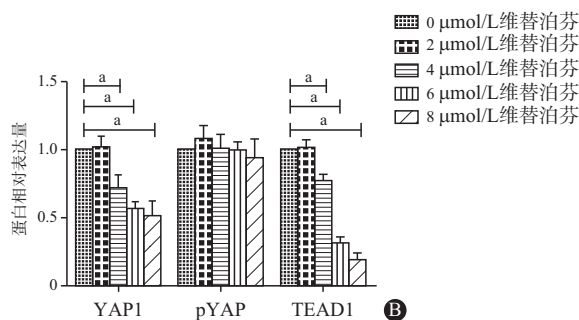
3 讨论

越来越多研究表明细胞信号转导通路介导骨肉瘤耐药,如磷酸酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、Notch、Wnt/ β -catenin及葡萄糖转运蛋白(GLUT1)等^[11-14]。有文献报道Hippo信号通路参与骨肉瘤耐药过程,且其关键分子YAP1可能成为骨肉瘤治疗的药物靶点^[6],寻找Hippo信号通路上游药物作用靶点抑制剂有望为骨肉瘤治疗带来新的希望。



注:与对照组相比, $^a P < 0.01$

图5 维替泊芬对骨肉瘤MG63细胞Yes-相关蛋白(YAP1)、磷酸化Yes-相关蛋白(pYAP1)、TEA转录因子1(TEAD1)蛋白表达的影响:A为蛋白电泳图;B为量化图



目前维替泊芬作为非光敏剂治疗多种肿瘤的研究引起许多学者的注意^[8],蒋玉林等^[9]研究证实维替泊芬可抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖、迁移及侵袭,而Al-Moujahed等^[15]证实维替泊芬可抑制胶质瘤LN229和SNB19细胞体外生长。然而关于维替泊芬对骨肉瘤细胞的影响还尚未有报道。本实验探究了维替泊芬对骨肉瘤细胞株MG63细胞增殖和凋亡的影响,发现维替泊芬能够抑制MG63细胞的增殖,使MG63细胞周期阻滞于G0/G1期,并促进其凋亡,且均呈浓度依赖性,这与Zhang等^[11]在胰腺导管腺癌中的研究结果相一致。同时,本研究发现维替泊芬对MG63细胞的迁移及侵袭能力具有抑制作用,且呈浓度依赖性。

近年来,越来越多研究表明维替泊芬作为YAP1抑制剂在治疗各种肿瘤中发挥着重要作用^[16]。YAP1作为Hippo通路的核心效应蛋白,可转移至细胞核内通过与TEAD1蛋白以及其他转录因子形成复合物,触发下游靶基因如Areg的转录,进而促进肿瘤形成^[4]。研究表明维替泊芬能够作用于YAP1-TEAD1复合物,破坏其结构后预防致癌性生长达到抑制肿瘤的作用^[16]。Liu等^[17]研究证实,体内高表达YAP1或者失活神经纤维瘤病Ⅱ型(NF2)会引起肝脏组织过度生长,而采用维替泊芬治疗后肝脏的生长速度受到抑制。Brodowska等^[18]研究视网膜母细胞瘤细胞的生长和生存能力机制时,发现维替泊芬能够干扰YAP1-TEAD1复合物的形成,从而延长癌细胞的倍增时间。李美娇等^[19]研究发现维替泊芬通过下调YAP1、TEAD1表达抑制鼻息肉细胞生长;Wei等^[10]也发现维替泊芬通过摧毁YAP1-TEAD1复合物可以抑制胰腺导管腺癌存活、血管生成及仿血管发生。本实验采用蛋白质印迹法检测了维替泊芬处理后YAP1、pYAP1、TEAD1的蛋白表达水平,结果显示YAP1、TEAD1表达下调,而pYAP1表达不变,与上述研究结果相符,表明维替泊芬可能通过下调YAP1、TEAD1,阻止YAP1与TEAD1相结合,抑制MG63细胞的增殖、迁移及侵袭能力,而促进其凋亡。

但是本研究也存在一些缺陷。首先,本研究仅采用了一种骨肉瘤细胞系进行研究,是否适用于其他骨肉瘤细胞系及原代骨肉瘤细胞尚需进一步研究;其次,本研究没有进行动物体内实验,是否在体内同样具有良好的效果值得进一步探讨;另外,本研究设置的观察时间和浓度范围较窄,虽然发现了时间、浓度依赖性,但不能排除可能存在平台期和峰值浓度,尚需深入研究。

参考文献

- [1] DUCHMAN KR, GAO Y, MILLER BJ. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39(4): 593-599.
- [2] 中华医学会骨科学分会骨肿瘤学组. 四肢骨肉瘤保肢治疗指南 [J]. *中华骨科杂志*, 2019, 39(1): 1-9.
- [3] 邓必勇, 邱冰, 邓必强. 影响骨肉瘤生存率的多因素回归分析 [J]. *安徽医药*, 2016, 20(6): 1127-1129, 1130.
- [4] 吉新彦, 钟国轩, 赵斌. 哺乳动物Hippo信号通路分子机制研究进展 [J]. *遗传*, 2017, 39(7): 546-567.
- [5] AHMED AA, MOHAMED AD, GENER M, et al. YAP and the Hippo pathway in pediatric cancer [J]. *Mol Cell Oncol*, 2017, 4(3): e1295127. DOI: 10.1080/23723556.2017.1295127.
- [6] WANG DY, WU YN, HUANG JQ, et al. Hippo/YAP signaling pathway is involved in osteosarcoma chemoresistance [J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35: 47.
- [7] BATTAGLIA PM, LA SPINA C, BERCHICCI L, et al. Photosensitizers and photodynamic therapy: verteporfin [J]. *Dev Ophthalmol*, 2016, 55: 330-336.
- [8] GIBAUT F, CORVAISIER M, BAILLY F, et al. Non-photoinduced biological properties of verteporfin [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(11): 1171-1184.
- [9] 蒋玉林, 刘一锋, 张志乾, 等. 维替泊芬通过下调Yes相关蛋白表达抑制MDA-MB-231乳腺癌细胞增殖及侵袭和迁移 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(9): 1223-1227.
- [10] WEI H, WANG F, WANG Y, et al. Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of pancreatic ductal adenocarcinoma via disrupting the YAP-TEAD complex [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(3): 478-487.
- [11] ZHANG J, YU XH, YAN YG, et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 182-192.
- [12] YU L, FAN Z, FANG S, et al. Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating Notch signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 33055-33068.
- [13] 谢晓亮, 李玉梅, 朱海霞, 等. Wnt/ β -catenin信号转导通路对骨肉瘤癌干细胞的调节作用 [J]. *国际骨科学杂志*, 2019, 40(3): 127-130.
- [14] 赵鹏, 李树锋. 葡萄糖转运蛋白-1的表达对骨肉瘤细胞生物学特征的影响 [J]. *安徽医药*, 2018, 22(7): 1273-1277, 后插1.
- [15] AL-MOUJAHED A, BRODOWSKA K, STRYJEWSKI TP, et al. Verteporfin inhibits growth of human glioma in vitro without light activation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7602.
- [16] LIU H, DU S, LEI T, et al. Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(1): 16-28.
- [17] LIU-CHITTENDEN Y, HUANG B, SHIM JS, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(12): 1300-1305.
- [18] BRODOWSKA K, AL-MOUJAHED A, MARMALIDOU A, et al. The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 124: 67-73.
- [19] 李美娇, 邓慧仪, 王玮豪, 等. 维替泊芬对鼻息肉上皮细胞Yes相关蛋白的作用 [J]. *新医学*, 2019, 50(1): 16-21.

(收稿日期: 2019-08-04, 修回日期: 2019-09-17)