

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.05.008

二甲双胍抑制骨肉瘤 MG63 细胞的迁移和侵袭能力*

苏小桃¹,何俊¹,欧军¹,申莹莹^{2△}

(南华大学:1. 附属南华医院脊柱外科;2. 附属第一医院临床医学研究所,湖南衡阳 421001)

[摘要] **目的** 观察二甲双胍对骨肉瘤 MG63 细胞的迁移侵袭能力的影响。**方法** 以骨肉瘤 MG63 细胞株为研究对象,二甲双胍处理后分别采用 transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力的变化,采用明胶酶谱实验检测基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和 MMP-9 的活性,采用 real-time PCR 法检测细胞中埃兹蛋白(Ezrin) mRNA 的表达,采用 Western blot 检测 Ezrin 蛋白的表达;Lipofectamine 2000 转染 Ezrin 质粒到细胞中观察其对二甲双胍诱导的细胞迁移侵袭抑制及对下游信号通路的影响。**结果** 二甲双胍可显著抑制 MG63 细胞的迁移和侵袭,并降低 MMP-2 和 MMP-9 的酶活性。用药 48 h 后,MG63 细胞内 Ezrin 的 mRNA 和蛋白水平均明显下降,且上调 Ezrin 可减弱二甲双胍诱导的骨肉瘤细胞迁移和侵袭抑制及二甲双胍诱导的 MAPK/Erk 信号通路抑制。**结论** 二甲双胍可抑制 MG63 细胞的迁移和侵袭能力,可能是通过下调 Ezrin 和 MAPK/Erk 信号通路而实现。

[关键词] 二甲双胍;骨肉瘤;细胞运动;肿瘤浸润;埃兹蛋白;MAKP/Erk 信号通路

[中图分类号] R73-37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)05-0602-04

Inhibition effect of metformin on migration and invasion in osteosarcoma MG63 cell line*

Su Xiaotao¹, He Jun¹, Ou Jun¹, Shen Yingying^{2△}

(1. Department of Spinal Surgery, Affiliated Nanhua Hospital; 2. Institute of Clinical Medicine, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of metformin on the migration and invasion of osteosarcoma MG63 cells. **Methods** Osteosarcoma MG63 cells as the research objects were treated with metformin and then the transwell chamber assay was used to detect the change of cell migration and invasion ability. The gelatin zymography was used to detect the activity of MMP-2 and MMP-9. Real-time PCR was used to measure the expression level of Ezrin mRNA level. Western blot was used to detect the expression level of Ezrin protein; Ezrin plasmid was transfected into cells by lipofectamine 2000 and its influence on metformin-induced cell migration and invasion inhibition and the downstream signaling pathways was observed. **Results** Metformin could significantly inhibit the migration and invasion of MG63 cells and decreased the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9. The mRNA and protein levels of Ezrin in MG63 cells were decreased remarkably after 48 h medication treatment. Moreover, up-regulating Ezrin could attenuate metformin-induced osteosarcoma cell migration and invasion inhibition and metformin-induced MAPK/Erk signaling pathway inhibition. **Conclusion** Metformin could inhibit the migration and invasion ability of MG63 cells by possibly down-regulating the Ezrin and MAPK/Erk signaling pathway.

[Key words] metformin; osteosarcoma; cell movement; neoplasm invasiveness; Ezrin; MAPK/Erk signaling pathway

骨肉瘤是最常见的原发性骨肿瘤,其特征是具有高度恶性的倾向,能迅速破坏周围的组织,并发生转移^[1]。当骨肉瘤复发或发生转移时预后极差^[2]。尽管目前疗效确切的临床化疗药物不断涌现,如大剂量甲氨蝶呤、多柔比星、顺铂和异环磷酰胺等,但化疗药物较大的毒副作用及逐渐出现的耐药性成为制约其发展的主要问题,而应用血管内皮抑素、端粒酶靶向治疗等较新的方法治疗骨肉瘤的临床研究目前尚处于起步阶段,其有效性和安全性尚需大量临床资料证实^[3-4]。因此,亟待寻找一种安全、有效的药物来延缓骨肉瘤进展,提高骨肉瘤患者生存率。二甲双胍作为一种临床上使用多年的常见降糖药,其安全性已经得到了充分验证。近来,相关研究表明二甲双胍在一定程度上具有抗肿瘤作用^[5-7],基于此,本实验拟研究二甲双胍对骨肉瘤 MG63 细胞迁移和侵袭的影响并探讨其作用机制以期明确其在骨肉瘤治疗的可能性。埃兹蛋白(Ezrin)是ERM家族中重要的成员,它最初是在研究鸡小肠黏膜细胞刷状缘微

绒毛的细胞骨架的主要成分时被首次发现。Ezrin 作为外层细胞骨架为真核细胞质膜结构提供支持作用。Ezrin 是一个相对分子质量为 82×10^3 的磷酸化蛋白质,由 villin-2 基因编码表达。研究显示,Ezrin 在多种肿瘤的转移中发挥着重要的作用^[8-11]。Ezrin 作为一个同时与间叶和上皮来源的多种恶性肿瘤转移高度相关的蛋白,正越来越引起人们的重视。目前的研究表明二甲双胍可通过不同的机制抑制多种不同的肿瘤,如二甲双胍可通过靶向 Stat3 抑制三阴性乳腺癌细胞的生长并诱导细胞的凋亡,还可通过下调 miRNAs 减弱胰腺癌干细胞的功能从而抑制胰腺癌细胞的增殖和侵袭转移能力^[5-6]。为明确二甲双胍抑制骨肉瘤细胞迁移和侵袭能力的分子机制,本研究观察 Ezrin 在二甲双胍处理前后的变化,并探讨其是否为二甲双胍的关键靶点。

1 材料与方法

1.1 材料 人骨肉瘤细胞株 MG63 购于中国科学院上海细

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81502276)。 作者简介:苏小桃(1972—),副主任医师,副教授,硕士研究生,主要从事骨肿瘤与脊柱相关疾病诊治的研究。 △ 通讯作者,Tel:18273435520;E-mail:shenyinying1113@126.com。

胞库。RPMI1640 培养液、胎牛血清购于美国 Gibco 公司,二甲双胍购于 Sigma-Aldrich 公司,Ezrin 抗体和 actin 抗体购于 abcam 公司,Akt 抗体,p-Akt(Ser473)抗体,Erk1/2 抗体,p-Erk1/2(Thr202/Tyr204)抗体,辣根过氧化物酶标记的二抗购于 Cell signaling 公司,Ezrin 质粒购于 Origene 公司,Lipofectamine 2000 购于 invitrogen 公司,transwell 小室购于 corning 公司,基质胶购于 BD 公司,trizol 购于 invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购于 Fermentas 公司,q PCR 试剂盒购于 takara 公司。BCA 蛋白定量试剂盒,RIPA 裂解液,PMSF,上样缓冲液均购于碧云天公司。明胶酶谱试剂盒购于 GENMED 公司。蛋白 Marker 购于 Bio-Rad 公司,PVDF 膜购于 Millipore 公司,ECL 发光液购于 Pierce Biotechnology 公司,胶片购于 Kodak 公司。青霉素、硫酸链霉素购于北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MG63 细胞接种于含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养液中,置于 37 °C,5%CO₂ 及饱和湿度条件的培养箱中培养。

1.2.2 实验分组 于 6 孔细胞培养板每孔接种 2 × 10⁵ 个 MG63 细胞,单层培养至细胞覆盖率为 80% 左右。细胞分为实验组和对照组。对照组:不加药;实验组:加入二甲双胍,使其终浓度为 10 mmol/L,培养 48 h 后收集细胞进行后续实验。浓度选取理由:查阅多篇文献发现二甲双胍抑制多种肿瘤侵袭转移效果较明显时浓度均为 10~30 mmol/L,故采用了最低的整倍数浓度 10 mmol/L^[6,12-13]。

1.2.3 实时荧光定量 PCR MG63 细胞接种于 6 孔板,加入或不加入 10 mmol/L 二甲双胍培养 48 h 后,收集细胞。Trizol 试剂法提取总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录反应。每组取 50 ng cDNA,用 SYBR Premix Ex Taq II Kit 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应。Ezrin 的正向和反向引物分别是 5'-ACG TCT GAG AAT CAA CAA GC-3',5'-TTC TCC TCA TAG TCC TGC AG-3';GAPDH 的正向和反向引物分别是 5'-TGC CAC TCA GAA GAC TGT GG-3',5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT-3'。每孔反应体积为 20 μL,每组 3 个重复孔。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,共计 35 个循环,72 °C 再延伸 10 min。反应在 Roche Lighcycler 480 系统进行,结果处理用 ΔCt 值法。

1.2.4 Western blot 检测 MG63 细胞接种于 6 孔板,加入或不加入 10 mmol/L 二甲双胍培养 48 h 后,收集细胞,PBS 洗

1 次,加入 RIPA(含蛋白酶抑制剂)裂解细胞,冰上放置 30 min,超声断裂 DNA,低温离心取上清于另一 EP 管。二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,取 40 μg 总蛋白变性后 100~130 V 恒压电泳约 90 min,200 mA 恒流转膜约 120 min。5% 牛奶摇床室温封闭 1 h,一抗室温摇床孵育 1 h 后 4 °C 过夜。PBST 洗 3 次,二抗室温摇床孵育 1 h。PBST 洗 2 次,PBS 洗 1 次,曝光。

1.2.5 细胞侵袭和迁移实验 细胞侵袭实验:MG63 细胞种板,加入 10 mmol/L 二甲双胍培养 48 h,将存活的骨肉瘤细胞种入已铺好 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室上层,行无血清培养 36 h,吸去孔中培养基,用 PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,稍微晾干后用结晶紫染色 20 min,用棉签擦去上室面上的细胞,PBS 洗 3 次,取出小室,晾干,镜下拍照。100 倍显微镜下计数上下左右中 5 个随机不同视野的穿膜细胞数,取均值。实验重复 3 次。细胞迁移实验:方法同侵袭实验,只是 transwell 上室不用基质胶处理,观察时间为 24 h。

1.2.6 明胶酶谱实验 MG63 细胞加入 10 mmol/L 二甲双胍处理 48 h 后,每孔加入 1 mL 无血清培养基继续培养 24 h,收集上清液,将上清液移入离心管中 2 000 r/min,4 °C 离心 10 min,上清液用 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Deviceces 浓缩,测定蛋白浓度于一 80 °C 储存备用。配置 8% 分离胶和 5% 浓缩胶(胶中均含 1% 明胶),取 30 μg 蛋白与上样缓冲液(非还原型)混合,不加热。4 °C 电泳,80 V 约 1.5 h。电泳结束后,将凝胶用去离子水洗两次后,用 1 × buffer A 震荡洗脱 2 次,每次 30 min。将凝胶置于孵育液 buffer B 中 37 °C 温箱中孵育 42 h。用考马斯亮蓝染色液染色 2 h,脱色液(冰醋酸:甲醇:去离子水=5:7:88)震荡脱色 2 h 后,显示出基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 约 72 × 10³ 和 MMP-9 约 92 × 10³ 为位于蓝色背景上的白色透亮带,扫描仪扫描图片备用。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制骨肉瘤 MG63 细胞体外的迁移和侵袭能力 当用二甲双胍 10 mmol/L 处理 MG63 细胞 48 h 后细胞的迁移和侵袭能力明显减弱(图 1),迁移从(171.70 ± 6.60)个/视野减少到(50.30 ± 4.30)个/视野,侵袭从(159.30 ± 3.50)个/视野减少到(46.00 ± 4.40)个/视野,处理前、后比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2。

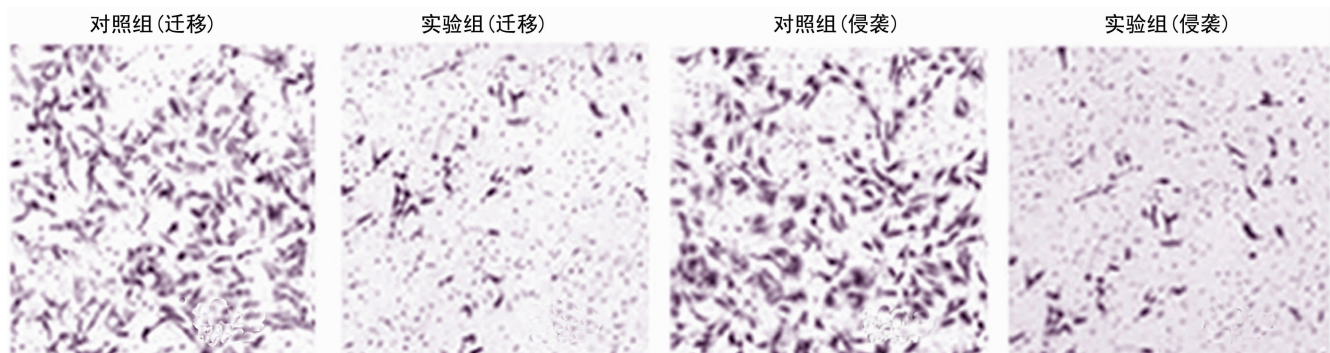
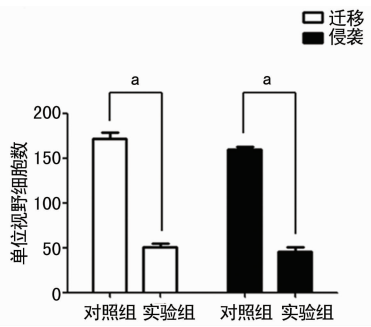


图 1 Transwell 迁移与侵袭实验结果(×200)



^a: $P < 0.01$, 与对照组相比。

图 2 二甲双胍抑制 MG63 细胞的迁移和侵袭能力比较

2.2 二甲双胍抑制 MMP2 和 MMP-9 的酶活性 对照组细胞的上清液均可降解明胶,表现出 72×10^3 和 92×10^3 位置的透明条带;而实验组的细胞上清液降解明胶的能力显著下降,表现为明胶上的消化条带减弱(图 3),结果提示二甲双胍可以降低 MMP-2 和 MMP-9 的酶活性。

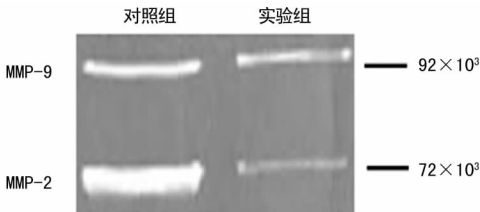
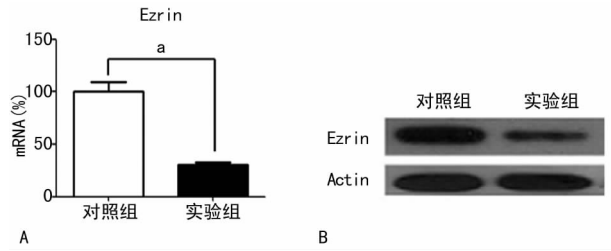


图 3 二甲双胍抑制 MMP-2 和 MMP-9 的酶活性

2.3 二甲双胍抑制 MG63 细胞中 Ezrin 的表达 二甲双胍可

显著降低 MG63 细胞中 Ezrin 基因的 mRNA 表达,从 $(100.00 \pm 5.20)\%$ 降到 $(30.20 \pm 1.70)\%$ (图 4A)。Western blot 结果亦显示,10 mmol/L 二甲双胍处理细胞 48 h 可明显下调 Ezrin 蛋白的表达,见图 4B。



A: Ezrin 的 mRNA 水平, ^a: $P < 0.01$, 与对照组相比; B: Ezrin 蛋白水平。

图 4 二甲双胍下调 Ezrin 的 mRNA 和蛋白水平

2.4 二甲双胍抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭依赖于 Ezrin 的下调 侵袭实验结果显示,上调 Ezrin 可使 MG63 细胞的迁移和侵袭能力均明显增强,迁移从 (175.00 ± 8.70) 个/视野增加到 (300.00 ± 5.80) 个/视野,侵袭从 (153.70 ± 3.50) 个/视野增加到 (290.00 ± 5.20) 个/视野。而上调 Ezrin 还可降低二甲双胍对 MG63 细胞迁移和侵袭的抑制作用,高表达 Ezrin 后,迁移从 (50.00 ± 9.80) 个/视野恢复到 (99.30 ± 5.80) 个/视野,侵袭从 (43.70 ± 3.00) 个/视野恢复到 (90.30 ± 6.10) 个/视野,结果均有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 5、6。

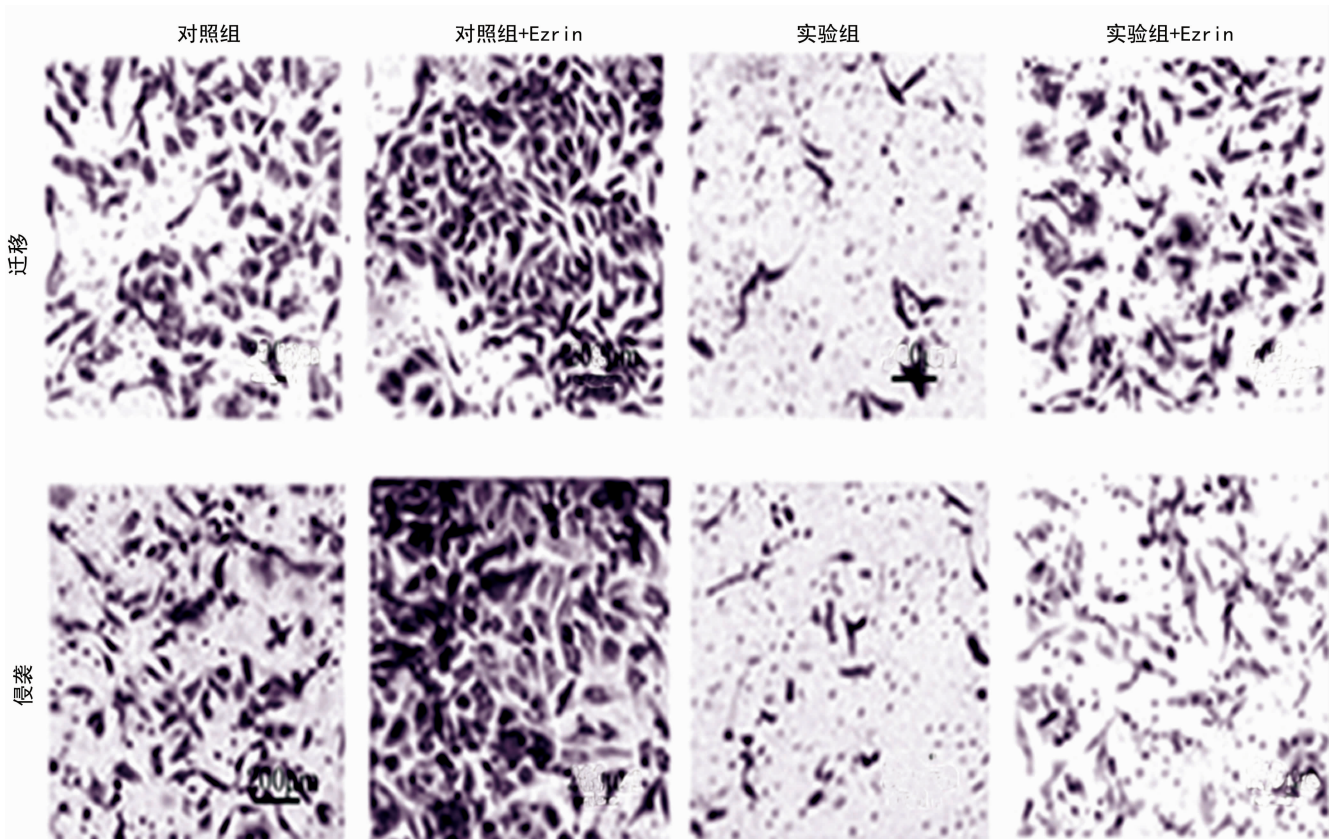
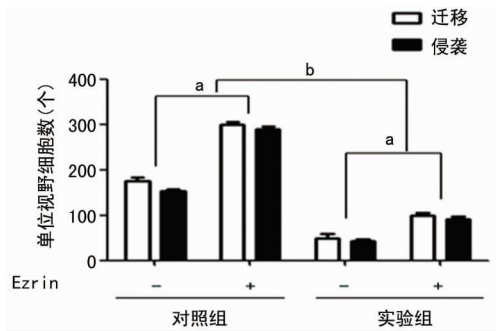


图 5 Transwell 迁移与侵袭实验结果 ($\times 200$)

2.5 二甲双胍通过下调 Ezrin 减弱 MAPK/Erk 信号通路

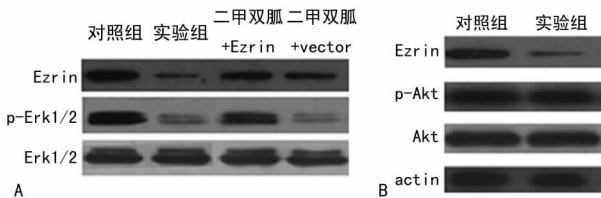
二甲双胍能下调 MG-63 细胞中 p-Erk 的蛋白水平,且不影响

Erk 的总蛋白水平,但 p-Erk 的降低可因过表达 Ezrin 而有所减少,却不会因过表达 vector 而有所变化(图 7A)。而经二甲双胍处理 MG-63 细胞后 Akt 的磷酸化水平和总蛋白水平均未发生明显的改变(图 7B)。



^a: $P < 0.01$, 与同组未加 Ezrin 比较; ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 6 两组骨肉瘤细胞的迁移和侵袭能力比较



A: 二甲双胍对 MAPK/Erk 信号通路的影响及过表达 Ezrin 对此信号通路的影响; B: 二甲双胍对 Akt/mTOR 信号通路的影响。

图 7 二甲双胍通过下调 Ezrin 减弱 MAPK/Erk 信号通路

3 讨论

骨肉瘤常见于儿童和青少年,具有早期远处转移和高度局部复发倾向。尽管近年来在外科手术以及新辅助化疗上取得了很大进展,但病死率仍很高,其主要原因之一是骨肉瘤易复发转移^[14-15]。目前临床治疗骨肉瘤的药物主要是化疗药物,如大剂量甲氨蝶呤、多柔比星、顺铂和异环磷酰胺等,多毒副作用大且易产生耐药性^[3-4,16]。因此,寻找一种新的安全、有效的药物对提高骨肉瘤患者生存具有非常重要的意义。

二甲双胍是一种临床上常用的降血糖药物,近年来人们发现其对多种恶性肿瘤的生长具有抑制作用,可能成为治疗肿瘤的辅助药物,但其作用机制尚不完全清楚^[5-7]。本研究首次发现二甲双胍对骨肉瘤细胞的迁移和侵袭具有抑制作用,并探讨了它的作用机制。Transwell 小室实验结果表明二甲双胍处理骨肉瘤 MG63 细胞后细胞的穿膜能力降低,迁移和侵袭能力减弱。MMP-2 和 MMP-9 的活性是与肿瘤侵袭转移能力密切相关的指标,明胶酶谱实验结果提示二甲双胍降低了 MMP-2 和 MMP-9 的酶活性,即骨肉瘤细胞降解细胞外基质的过程受到了抑制,骨肉瘤的侵袭转移能力减弱。已知 Ezrin 蛋白在多种人类肿瘤的转移中发挥了重要作用^[8-11]。Folio 等^[17]研究表明,Ezrin 蛋白是在一项骨肉瘤配对分析研究中鉴定出来的与骨发病相关的 16 种蛋白中的一种。在本研究中发现二甲双胍可以下调 Ezrin 的表达,并且高表达 Ezrin 可以降低二甲双胍对骨肉瘤细胞的迁移侵袭抑制,这很可能是因为二甲双胍通过下调 Ezrin 的表达从而抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭。此外,还发现二甲双胍可以通过抑制 Ezrin 表达间接下调 MAPK/Erk 信号通路,导致骨肉瘤细胞的迁移和侵袭受到抑制。虽然

有研究认为 Ezrin 蛋白能够调节 Akt 信号^[18],但本研究发现二甲双胍处理骨肉瘤细胞后 Akt 通路的活化没有发生明显的改变,这与以前对胰腺癌细胞的研究相一致^[19]。因此,本研究认为二甲双胍抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭可能是通过下调 Ezrin 和 MAPK/Erk 信号通路而实现。作为一种肿瘤抑制药物,二甲双胍抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭能力是通过下调 Ezrin 的表达,继而抑制 MAPK/Erk 信号通路的激活,即通过二甲双胍-Ezrin-Erk 轴。

二甲双胍抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭能力为骨肉瘤的治疗提供了一个新策略,也为增加骨肉瘤的化疗敏感性提供了一个新方法。二甲双胍通过下调 Ezrin 的表达从而抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭,也提示了 Ezrin 作为骨肉瘤潜在治疗靶点的可能性。

综上所述,本研究的完成为二甲双胍用于临床治疗骨肉瘤患者奠定了理论基础,提供了临床转化方面的有力依据,对于获得新的骨肉瘤治疗靶点、克服骨肉瘤临床药物耐受也具有重要意义。目前骨肉瘤动物模型中二甲双胍的抗肿瘤作用尚不清楚,二甲双胍的抗骨肉瘤作用是否还有其他的分子机制参与也尚不明确,有待进一步深入探讨研究。

参考文献

- [1] Link MP, Goorin AM, Miser AW, et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity[J]. *N Engl J Med*, 1986, 314(25): 1600-1606.
- [2] Meyers PA, Heller G, Healey J, et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience[J]. *J Clin Oncol*, 1992, 10(1): 5-15.
- [3] 杨英年. 骨肉瘤治疗进展[J]. *中国医药科学*, 2014, 4(6): 49-52.
- [4] 王威, 毕文志. 骨肉瘤治疗现状与展望[J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34(2): 198-200.
- [5] Deng XS, Wang S, Deng A, et al. Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(2): 367-376.
- [6] Bao B, Wang Z, Ali S, et al. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5(3): 355-364.
- [7] Tsenq CH. Diabetes, metformin use, and colon cancer: a population-based cohort study in Taiwan[J]. *Eur J Endocrinol*, 2012, 167(3): 409-416.
- [8] Ghaffari A, Hoskin V, Szeto A, et al. A novel role for ezrin in breast cancer angio/lymphangiogenesis[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(5): 438-443.
- [9] Chen MJ, Gao XJ, Xu LN, et al. Ezrin is required for epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in A549 cells[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(4): 1515-1522.
- [10] Lo Vasco VR, Leopizzi M, Puggioni C, (下转第 609 页)

- 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2010, 121(5):684-691.
- [3] Haghikia A, Stapel B, Hoch M, et al. STAT3 and cardiac remodeling[J]. *Heart Fail Rev*, 2011, 16(1):35-47.
- [4] Das A, Salloum FN, Durrant D, et al. Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling pathway[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(6):858-869.
- [5] Betker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction; a randomised trial[J]. *Lancet*, 2010, 375(9716):727-734.
- [6] Hua Y, Richard J. The STATs of cancer new molecular targets come of age[J]. *Nature (Review/Cancer)*, 2004, 4(2):97-105.
- [7] Liu X, Zhang X, Kang N, et al. Diosmin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through activating JAK2/STAT3 signal pathway in mice[J]. *Neuroscience*, 2014, 268(21):318-327.
- [8] Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, et al. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of STAT 3 activation in the protection of neurons [J]. *Neurochemistry*, 2005, 94(2):459-468.
- [9] Smith RM, Suleman N, Lacerda L, et al. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT3 abolishes classical preconditioning[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63:611-616.
- [10] Uehara Y, Mochizuki M, Matsuno K, et al. Novel high-throughput screening system for identifying STAT3-SH2 antagonists[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(3):627-631.
- [11] Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsia RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance[J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72(1):19-44.
- [12] 陈月桥, 王丽, 武建华. 细胞凋亡信号传导途径研究进展[J]. *中国实用医药*, 2007, 33(2):186-187.
- [13] Liang Y, Nylander KD, Yan C, et al. Role of caspase 3-dependent Bcl-2 cleavage in potentiation of apoptosis by Bcl-2[J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 61(1):142-149.
- [14] 李静岩. Caspase-3 与肿瘤关系的研究[J]. *医学综述*, 2005, 11(5):430-432.
- [15] 聂丽霞, 田首元, 孟玉洁, 等. JAK2-STAT3 通路在舒芬太尼后处理减轻犬心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(3):368-370.
- [16] Yang Y, Duan W, Jin Z, et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Pineal Res*, 2013, 55(3):275-286.

(收稿日期:2015-09-01 修回日期:2015-10-28)

(上接第 605 页)

- et al. Ezrin silencing remodulates the expression of Phosphoinositide-specific Phospholipase C enzymes in human osteosarcoma cell lines[J]. *J Cell Commun Signal*, 2014, 8(3):219-229.
- [11] Mao J, Zhang M, Zhong M, et al. MicroRNA-204, a direct negative regulator of ezrin gene expression, inhibits glioma cell migration and invasion[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1/2):117-128.
- [12] Cerezo M, Tichet M, Abbe P, et al. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(8):1605-1615.
- [13] Wu B, Li S, Sheng L, et al. Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3):903-908.
- [14] Whelan J, McTieman A, Cooper N, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(4):508-517.
- [15] Wu PK, Chen WM, Chen CF, et al. Primary osteogenic sarcoma with pulmonary metastasis: clinical results and prognostic factors in 91 patients[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2009, 39(8):514-522.
- [16] Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(7):1161-1168.
- [17] Folio C, Mora MI, Zalacain M, et al. Proteomic analysis of chemo-naive pediatric osteosarcomas and corresponding normal bone reveals multiple altered molecular targets[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(8):3882-3888.
- [18] Khanna C, Wan X, Bose S, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis[J]. *Nat Med*, 2004, 10(2):182-186.
- [19] Meng Y, Lu Z, Yu S, et al. Ezrin promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cell[J]. *J Transl Med*, 2010, 23(8):61-75.

(收稿日期:2015-06-26 修回日期:2015-09-06)