

谭芷芬,张宏方,郝晓霞,等.褪黑素在骨肉瘤治疗中的应用机制[J].中国比较医学杂志,2021,31(12):115-120.

Tan ZF, Zhang HF, Hao XX, et al. Therapeutic mechanism of melatonin in the treatment of osteosarcoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 115-120.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.12.018

褪黑素在骨肉瘤治疗中的应用机制

谭芷芬¹,张宏方^{1*},郝晓霞²,蔡婧³

(1.陕西中医药大学医学技术学院,西安 710000;2.西北大学生命科学院,西安 710000;

3.陕西中医药大学基础医学院,西安 710000)

【摘要】骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的骨肿瘤,主要发病人群为儿童和青少年,发生部位通常位于长骨干骺端,具有发现晚、进展快、浸润与转移早、死亡率高的特点。提高骨肉瘤生存率和骨肉瘤患者的生活质量已成为迫在眉睫的临床问题。褪黑素(melatonin, MT)是一种吲哚类激素,其激素水平的高低与骨骼的形成密切相关,其缺乏可能与骨肉瘤直接相关。本文旨在总结近年来褪黑素在骨肉瘤治疗中的研究进展,希望过该综述为今后褪黑素治疗骨肉瘤的临床应用提供新的思路与方向。

【关键词】骨肉瘤;褪黑素;细胞凋亡;细胞增殖;转移

【中图分类号】R-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2021)12-0115-06

Therapeutic mechanism of melatonin in the treatment of osteosarcoma

TAN Zhifen¹, ZHANG Hongfang^{1*}, HAO Xiaoxia², CAI Jing³

(1. School of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 710000, China.

2. School of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710000. 3. School of Basic Medical Science,

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 710000)

【Abstract】 Osteosarcoma is the most common bone tumor, which mainly occurs in children and adolescents. It usually occurs at the metaphysis of long bones with the characteristics of late discovery, rapid progression, early invasion and metastasis, and high mortality. Clinically, the treatment of osteosarcoma is mainly surgery, but the curative effect is unsatisfactory. Thus, it has become an urgent clinical issue to improve the survival rate and quality of life of osteosarcoma patients. Melatonin is an indole hormone, and melatonin levels are related to bone formation; deficiency of melatonin may be directly related to osteosarcoma. This article summarizes the recent research progress of melatonin in osteosarcoma treatment to provide new ideas and future directions for the clinical application of melatonin in osteosarcoma treatment.

【Keywords】 osteosarcoma; melatonin; apoptosis; proliferation; metastasis

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)大多起源于间充质干细胞(MSC)或更定向的骨祖细胞,占原发性恶性骨肿瘤发生率的25%~30%,是儿童与青少年最常见的骨肿瘤。骨肉瘤病发原因和具体机制目前尚未明确,治疗手段十分有限,而手术治疗是骨肉瘤治

疗的主要手段。对于某些晚期骨肉瘤患者,术后复发患者或处于转移期的患者来说,只能通过药物与大剂量的化疗姑息性治疗。伴随新辅助化疗方案的实施,骨肉瘤患者的5年生存率已有较大提高^[1]。因此,寻找并开发新的有效药物,从而提高

【基金项目】陕西省科技厅自然基础科研基金项目(2019JM-551);陕西省中医管理局科研基金项目(JCP002)。

【作者简介】谭芷芬(1994—),女,硕士研究生,主要从事药物对肿瘤分子传导干预的相关研究。E-mail: 1363619593@qq.com

【通信作者】张宏方(1962—),男,硕士,教授,硕士研究生导师,主要从事中药对肿瘤免疫的调节研究。E-mail: zhanghf968@163.com

骨肉瘤患者的生存率和生存质量是当前临床上亟待解决的重要问题。

褪黑素(melatonin, MT), 又称 N-乙酰基-5-甲氧基色胺, 是一种由松果体产生的吲哚类激素。昼夜的节律变化、四季的更改替换和环境光信号的强弱变化均能影响机体褪黑素的含量。褪黑素在不同生理状态中均发挥着不同的作用, 如调节睡眠-觉醒周期、抗氧化和改善机体免疫功能等^[2]。体内外实验表明, 褪黑素可减缓诸如肝癌、乳腺癌、卵巢癌等疾病的发生发展^[3]。此外, 褪黑素在骨骼的形成中也发挥着至关重要的作用, 其激素水平与骨代谢密切相关, 而褪黑素的缺乏可能与骨肉瘤的形成和发展相关^[4]。因而, 褪黑素能够作为一种潜在的治疗候选或作为佐剂与其它抗肿瘤剂共同作用于骨肉瘤治疗。

1 骨肉瘤发病机制

骨肉瘤的发病原因复杂, 目前认为化学物质、电离辐照、基因突变、相关病原病毒感染等可能与其发病相关^[5], 主要发病人群为儿童和青少年, 发生部位通常位于长骨干骺端, 具有发现晚、进展快、浸润与转移早、死亡率高等特点, 且多数骨肉瘤患者的病因学仍不明确。骨肉瘤患者最初的临床症状表现为关节周围轻度疼痛伴酸胀感, 伴有组织肿胀, 后可触及疼痛部位的肿块, 伴有局部红肿和关节活动受限, 多表现为持续性疼痛, 夜间加重, 通过休息与药物治疗, 疼痛未见明显缓解。临床上尚无统一标准对骨肉瘤分型, 可根据骨肉瘤的具体位置, 肿瘤分化程度, 肿瘤组织特征等进行分类。

1.1 骨肉瘤的发生与基因遗传学相关

基因突变是骨肉瘤发生的重要原因之一。通过基因组范围的预测、基因表达的评估和表观遗传修饰的分析, 研究者们指出骨肉瘤与复杂的克隆性染色体数目和染色体结构异常、乳酸脱氢酶增高、分子遗传学改变和基因产物过度表达相关^[6-7]。最常涉及染色体数量与结构异常及基因的过度表达, 涉及的染色体有 12q13-15、3q26、1p21-23、8p21-23、17p11-12 等; 涉及的基因有细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)、MET 原癌基因(MET)、FOS 基因家族(FOS、FOSB、FOSL1 和 FOSL2)、MDM2 癌基因、MYC 癌基因(C-myc, N-myc, L-myc)等^[8-9]。骨肉瘤中 MYC、CDK4 和 MDM2 基因的过度表达则多表明骨肉瘤预后差^[7]。例如, 许多肿瘤的发生与

WWOX 基因的表达相关, WWOX 作为一种肿瘤抑制因子, 与肿瘤的侵袭性和预后有关。如骨肉瘤患者的病例中, 约有 30% 的病人可观察到 WWOX 基因的减少, 直观的表达了基因的突变与缺失与骨肉瘤密切相关^[10]。此外, 在散发性骨肉瘤中存在 P53 基因和视网膜母细胞瘤基因 1(Rb1) 突变的情况^[9]。Rb1 基因突变导致转录因子 E2F 功能增强。在原发性骨肉瘤中, 高水平的 E2F1 具有生长抑制作用, 如 P73 诱导^[11]。

1.2 骨肉瘤的发生与细胞的异常增殖和凋亡相关

骨肉瘤的发展与调控细胞生长的癌基因的过度表达有关。例如: 参与骨肉瘤的信号通路网络之一细胞外调节蛋白激酶 ERK 是丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 家族中重要的成员, 调节细胞的增殖和凋亡。高天等人证实, 柴胡皂苷 D 可以使 ERK1/2 的表达下降, 肿瘤细胞的增殖作用减弱, 而肿瘤细胞凋亡作用加强^[12]。同时, 骨肉瘤的发生与抑癌基因的变异、丢失和失活有关, 例如野生型 P53 基因是肿瘤相关的抑癌基因, 调控相关转录因子, 参与转录的下游靶基因失活, 并通过细胞凋亡和细胞周期阻滞等途径抑制肿瘤增殖与转移。P53 基因失活(即突变型 P53)能够抑制肿瘤细胞凋亡, 在肿瘤组织与细胞中高表达, 进而发挥血管生成、侵袭和转移的作用。张跃^[13]发现细菌氧化还原蛋白 Azurin 可以结合 P53 基因而稳定 P53 蛋白结构, 其抑制了骨肉瘤的生长。PTEN 基因为双专一性磷酸酶活性抑癌基因, PTEN 蛋白低表达时, 提示恶性肿瘤发生或进行性生长。据报道 PTEN 蛋白在骨肉瘤中低表达, 为 miR-208a-3p 的直接靶点, PTEN 蛋白失活使细胞周期负调控能力异常, 其与 miR-208a-3p 的表达呈负相关, 促进骨肉瘤发生^[14]。

此外, 骨肉瘤的发生与抑制细胞凋亡的癌基因表达高度相关。Bcl-2 家族蛋白受线粒体调节进而发挥促细胞凋亡作用, Bcl-2 与骨肉瘤的预测、预防、发生、发展过程高度相关。高宇等发现, 在骨肉瘤中下调 Bcl-2 的水平可抑制骨肉瘤细胞的增殖。此外, 正常骨组织 Bcl-2 的阳性表达率低, 但在骨肉瘤中高度表达^[14]。Bag-1 是 Bcl-2 结合抗凋亡基因, Bag-1 编码的蛋白可以通过与多种分子靶点相互作用进而调节细胞的生长调控途径(包括凋亡、信号转导、增生、转录和细胞能动性^[15]), 在肿瘤中表现尤甚。多种恶性肿瘤中 Bag-1 阳性表达, 同时 Bag-1 可以与 Bcl-2 结合, 增强 Bcl-2 的抗凋亡作用,

而后者也可单独抑制细胞的凋亡^[13]。Mcl-1 是 Bcl-2 家族蛋白抗凋亡亚家族中的另一种抗凋亡蛋白,并在各种恶性肿瘤中高表达,下调 Mcl-1 可以促进细胞凋亡^[16]。在阿霉素作用下,骨肉瘤中 Mcl-1 蛋白呈高表达,同时经 Mcl-1 转染后,过表达 Mcl-1 可以抑制 Caspase3/7 的活化^[16]。Bcl-xl 表达下调与 caspase-3 的表达上调相关,显著增强了肿瘤的放射敏感性和化学敏感性^[17]。此外,TGF- β 蛋白是五种异构体(转化生长因子- β 1-5)超家族的成员之一,对骨肉瘤细胞系具有促有丝分裂作用。TGF- β 1 生长因子在肿瘤中起着促进与抑制的“双刃剑”作用,即早期抑制肿瘤生长,晚期则促进肿瘤的侵袭、迁移^[18]。同时,青少年在青春期飞速成长,骨生长率与骨肉瘤的发生率可能存在相关性,性激素的紊乱也是骨肉瘤的发生原因之一,大量的性激素与对应的受体可直接影响骨肉瘤的生长^[19]。

2 褪黑素作用于恶性肿瘤的机制研究

褪黑素是哺乳动物的松果体、胃肠道、视网膜和骨髓等器官分泌的一种吲哚类激素。褪黑素在多项实验中均表现出显著的抗肿瘤作用,被认为是治疗肿瘤的潜在药物,具有强大的抗氧化与抗炎作用。在正常细胞中,褪黑素发挥抗凋亡作用,而肿瘤细胞中则发挥促凋亡作用^[20]。

2.1 褪黑素通过促凋亡抑制肿瘤生长的研究

褪黑素诱导肿瘤细胞发生凋亡,可通过坏死、核破碎、核溶解等途径影响细胞,而这正是褪黑素能够发挥肿瘤治疗作用的重要原因。褪黑素能够增强肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 介导的宫颈癌 Hela 细胞凋亡,并与 TNF- α 共同作用引起线粒体能量代谢紊乱,使线粒体凋亡介导的宫颈癌 Hela 细胞凋亡^[21]。细胞朊蛋白(Cellular prion protein, PrPC)在神经、肌肉和心脏等多种组织的细胞中高度表达,而褪黑素能够诱导 PrPC 低表达,从而活化 LKB1/AMPK/mTOR 信号通路,并最终降低膀胱癌的发生^[22]。在 MDAMB-361 乳腺癌细胞中,褪黑素具有促凋亡作用,通过抑制 p300/NF- κ B、COX-2/PGE2 和 PI3K/AKT 信号通路来增加凋亡酶激活因子 Apaf-1 的表达^[23]。此外,褪黑素能够增加 Bax 的表达,并诱导细胞色素 C (cytochrome C)、Bax 和 p53 的释放并抑制 Bcl-2 释放,刺激 caspase3、6、7、9 活性裂解,进而诱导卵巢癌凋亡^[24]。

2.2 褪黑素通过抗增殖抑制肿瘤生长的研究

延缓肿瘤细胞的增殖能力、抑制肿瘤的发生发

展,是褪黑素抗击肿瘤的另一优势。褪黑素能够激活正常细胞中的 ERK1/2 而抑制肿瘤细胞中的 ERK1/2,从而发挥抗肿瘤细胞增殖的作用,并降低肿瘤对化疗的耐药性。研究表明,ERK1/2 可调节细胞分裂,而褪黑素可阻止细胞内 ERK1/2 的表达。在胃癌细胞系 MFC 细胞中,褪黑素干预能够下调 ERK1/2 与 Akt 的磷酸化水平,并发挥胃癌细胞的抗增殖作用。在肿瘤演变过程中,TGF- β 1 信号通路可发生异常,某些肿瘤细胞(如胃癌细胞)可以合成分泌 TGF- β 1。宋军^[25]研究发现,大剂量的褪黑素能够抑制胃癌患者血清中 TGF- β 1 的分泌,下调胸腺中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的表达。凋亡抑制因子 Survivin 的低表达可增加肿瘤的细胞凋亡和化疗敏感性,并发挥抗肿瘤作用。褪黑素可以延长细胞在 G0/G1 期积聚或延迟进入 S 期发挥抗增殖作用。如 HepG2 肝癌细胞中,给予褪黑素干预后,HepG2 细胞中可见周期滞留和凋亡^[26]。鲁倩倩^[26]的研究证明了褪黑素可以使肿瘤细胞滞留于 G1 期,进而减少 S 期细胞。

2.3 褪黑素在肿瘤预防转移中的作用

肿瘤转移一直是临床中迫切解决的问题,褪黑素已被证明有预防各种肿瘤转移的作用。例如在肺癌与前列腺癌的骨转移中,褪黑素可直接减少骨细胞分化,骨吸收活性,促进成熟骨细胞的凋亡,下调 p38/MAPK 通路表达,抑制 RANKL 产生^[27]。基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、人表皮生长因子受体-2 (HER2) 和 MAPK/ERK 信号通路的激活可增加肿瘤细胞的侵袭力,肿瘤血管新生和淋巴管新生促进肿瘤细胞的浸润和转移^[28]。研究表明,褪黑素的使用可显著降低 MAPK/ERK 的表达,抑制肿瘤细胞的生长,并减少肿瘤治疗中化疗和放疗引起的氧化应激和毒性^[29]。在对卵巢癌细胞 SKOV3 的研究中发现,褪黑素能够通过阻止上皮间质转化相关的能力,对卵巢癌细胞 SKOV3 产生一定的毒性,并抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的浸润与转移^[24]。而在联合用药中,褪黑素通过 PI3K/AKT 和 Jak/Stat3 信号通路与脂多糖 (LPS) 联用解除由 M1 型巨噬细胞发生的 LPS 耐受,使巨噬细胞维持 M1 型以实现抗肿瘤的目的^[30]。临床中顺铂 (DDP) 可引起患者耳毒性,使用褪黑素治疗后可降低相应的毒性反应。体内实验研究表明,褪黑素能够降低 DDP 的肾毒性和急性肾损伤^[31]。此外,在人结肠癌细胞实验中,辐射与褪

黑素联合治疗能够显著改善该肿瘤细胞对 γ 射线辐射敏感性,从而对该肿瘤细胞生长有显著抑制效应并发挥其抗肿瘤作用^[32]。以上研究表明,褪黑素具有潜在的肿瘤治疗效应,褪黑素能够作为初级治疗药物用于肿瘤的辅助治疗,或通过联合用药来增加其抗肿瘤作用。

3 褪黑素在骨肉瘤中的应用机制

目前,骨肉瘤的治疗存在手术治疗致残率高、假体功能差、放化疗毒副作用大、治疗晚期骨肉瘤容易产生药物耐受等问题,且复发率较高,患者的生存质量差,生存率低,而褪黑素在骨肉瘤中的研究为临床中骨肉瘤的治疗打开了新视野。

3.1 褪黑素在骨肉瘤中发挥促凋亡的作用

诱导肿瘤细胞凋亡是褪黑素抗击骨肉瘤发生的重要机制之一。林晋等^[33]发现褪黑素能够通过 Survivin 的表达调控骨肉瘤细胞 MG63 和 U2 的凋亡,降低 Survivin 蛋白的活性与提高半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 蛋白的活性可发挥促凋亡作用。另外,骨肉瘤 U2 细胞中,褪黑素能够通过将细胞阻滞于 G2/M 期,同时上调 Fas 蛋白表达来发挥其促凋亡作用^[34]。联合用药时,低浓度的 DDP 与褪黑素联合用药可以实现与甲氨蝶呤 (MTX) 等同的抗肿瘤效应^[35]。褪黑素影响脱乙酰化酶 SIRT1 的表达是实现细胞凋亡的重要路径。SIRT1 主要依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 发挥作用,抑制 SIRT1 的表达可作为治疗骨肉瘤的一种潜在选择^[36]。另外,褪黑素可诱导骨肉瘤 SOSP-9607 细胞凋亡,调控 P53 的乙酰化作用降低 Bcl-2 的水平,上调 Bax 和 Cytochrome C 的水平能够阻断 SIRT1 信号通路,从而触发内在的凋亡途径^[36]。在对骨尤文氏肉瘤细胞的研究中,褪黑素能够通过上调 Fas 死亡受体与其 FasL 配体的表达水平,且同时通过 Fas/FasL 系统诱导骨肉瘤细胞凋亡^[37]。

3.2 褪黑素在骨肉瘤中发挥抗增殖的作用

由于褪黑素受时间调控,因而某些特定的时间点褪黑素的激素水平表达较低时,则伴随着骨肉瘤的高发病率。假设提高褪黑素的激素水平可以降低骨肉瘤的发病率,即褪黑素对骨肉瘤细胞具有抗增殖作用。已有多项研究表明褪黑素可调节多种信号通路来发挥抗骨肉瘤作用。如骨肉瘤细胞 SaOS-2 研究中,褪黑素可抑制细胞活性,阻断 G1 期细胞周期,诱导细胞凋亡,发挥抗增殖作用,且褪黑

素对低浓度 DDP 有拮抗作用,而对 MTX 或高浓度 DDP 有协同作用^[38]。高水平的褪黑素会以时间依赖性方式对骨肉瘤 MG-63 细胞具有抗增殖作用,特异性地下调 ERK1/2 的磷酸化,将显著下调与细胞周期 G1 进程相关的细胞周期蛋白 D1 和 CDK4 蛋白的表达,以及其 G2/M 期有关细胞周期素 B1 和 CDK1 蛋白的表达来充分发挥骨肉瘤中的抗增殖作用^[39-41]。此外,褪黑素抗增殖的另一重要内在机制为上调 P53 的表达,下调 C-myc 基因的表达,且其抗增殖作用与丝裂原激活激酶和 AKT 信号转导有关。同时,一些证据表明褪黑素与抑制剂 PD98059 联合使用对 ERK1/2 具有双重阻断作用,且褪黑素本身可以特异性抑制 ERK 转变为 p-ERK^[39]。同时,褪黑素可以抑制血管内皮生长因子 A (VEGFA) 中对 miR-424-5p 的表达调控,调控肿瘤血管形态,血管原生长因子与周围内皮细胞增殖和迁移。激活 miR-424-5p/VEGFA 轴在肿瘤抑制中起关键作用^[42]。

3.3 褪黑素受体在骨肉瘤中的应用机制

褪黑素受体在不同的肿瘤中有着不同的抗肿瘤作用,其受体属于 G 蛋白偶联受体超家族,包括的亚型有 MT1、MT2、MT3。人类主要有 MT1 和 MT2 两种亚型的褪黑素受体,MT1 (由 MTNR1A 编码) 和 MT2 (由 MTNR1B 编码) 主要负责调节相应的下游效应^[43]。已有的研究认为 MT1 对于肿瘤细胞增殖的调节起重要作用,而 MT2 主要调节昼夜节律、血管舒张、机体免疫功能等,且 MT2 受体广泛分布于成骨细胞、四肢血管和视网膜等。这些分布位置为褪黑素治疗骨肉瘤奠定了基础^[43]。另外,骨肉瘤与 MT1 受体密切相关^[44],MT1-mRNA 和 MT2-mRNA 在骨肉瘤细胞 HOS 和 MG63 中的表达,为褪黑素在骨肉瘤治疗中的应用提供了研究基础。此外,大多数 MT1 受体在骨肉瘤临床试验中呈强阳性表达。例如,在骨软骨瘤中,有 14.2% 的标本 MT1 受体呈弱阳性表达^[45],表明编码 MT1 受体的基因在骨肉瘤的发展过程中被激活,从而表达大量的 MT1 受体。

3.4 褪黑素在骨肉瘤转移中的应用机制

临床治疗骨肉瘤最为棘手的问题之一就是骨肉瘤的转移。研究证明,褪黑素对骨肉瘤细胞浸润与转移有防御作用,并有浓度依赖性,其机制与蛋白激酶 A (PKA) 和肉瘤基因 Src 平行参与介导环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) 依赖性基因转录相关^[46]。SOX9 转录因子是褪黑素介导骨肉瘤的关键

因子之一,在骨骼生长中发挥着重要作用。体内实验研究表明,褪黑素能够显著抑制模型小鼠中骨肉瘤的启动和转移,并调节骨肉瘤细胞的上皮-间充质转化(EMT)标记,并下调 SOX9 参与的信号通路,从而阻止其发生和转移^[47]。此外,褪黑素还可通过细胞骨架重组、细胞外基质重塑、上皮-间充质转化来抵消血管生成反应,从而抑制骨肉瘤肿瘤细胞的转移与浸润^[48]。在骨肉瘤的转移样本中,Notch1 和 Notch2 受体在高度转移的骨肉瘤标本呈高表达^[49]。Fas/Fas 配体通路的下调使细胞促凋亡作用减弱并发生骨肉瘤的转移,而 Src 和 Wnt/ β -Catenin 通路也参与其中^[49]。此外,褪黑素的细胞毒性低,并显著抑制细胞的机动性。如褪黑素可下调骨肉瘤细胞 U2OS 中的趋化因子 CCL24 的表达水平^[50],而 CCL24 的表达水平是影响骨肉瘤细胞迁移的关键。细胞迁移和侵袭,因高表达的 CCL24 而增强,并因 CCL24 的沉默而减弱。减少细胞外 ERK1/2 和 JNK1/2 的激活,可下调 CCL24 的表达^[42]。降低 CCL24 的表达与抑制 JNK 信号通路的转导可预防骨肉瘤的浸润^[50]。综上所述,这些结果说明褪黑素可由多种途径和机制发挥抗骨肉瘤的作用。

4 结语

骨肉瘤最常见的骨原发性恶性肿瘤之一,其近年来 5 年存活率已从 20 世纪 50 年代的 20% 上升至 55%~70%^[1],骨肉瘤晚期患者的生存质量差,多进行姑息疗法。提高患者生存率与生存质量是临床中治疗骨肉瘤最需解决的问题之一。尽管临床有许多可用的抗肿瘤疗法,但临床治疗中出现的副作用也是层出不穷。研究人员试图找到新的药物与治疗方法来克服目前骨肉瘤临床治疗上所面临的问题。由于骨肉瘤的发病率与褪黑素水平相关,同时该激素在多种肿瘤中的运用有着良好的抗肿瘤作用,因而可作为治疗骨肉瘤的新候选药物或潜在药物。总的来说,目前,褪黑素单独或与其他治疗药物联合使用可能是骨肉瘤肿瘤治疗的一个很好的选择。同时,褪黑素治疗骨肉瘤的具体机制尚未完全解开,需要更进一步研究。

参考文献:

[1] Jiang J, Pan H, Li M, et al. Predictive model for the 5-year survival status of osteosarcoma patients based on the SEER database and XGBoost algorithm [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5542.

[2] Moroni I, Garcia-Bennett A, Chapman J, et al. Pharmacokinetics of exogenous melatonin in relation to formulation, and effects on sleep: A systematic review [J]. *Sleep Med Rev*, 2021, 57: 101431.

[3] Lin PH, Tung YT, Chen HY, et al. Melatonin activates cell death programs for the suppression of uterine leiomyoma cell proliferation [J]. *J Pineal Res*, 2020, 68(1): e12620.

[4] Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, et al. Role of melatonin in cancer treatment [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(7): 2747-2753.

[5] 任仰光, 尤建宇, 张宁, 等. 肿瘤标志物在骨肉瘤中的研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2015, 19(11): 1983-1985.

[6] Wu CC, Livingston JA. Genomics and the immune landscape of osteosarcoma [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1258: 21-36.

[7] Yeung C, Gibson AE, Issaq SH, et al. Targeting glycolysis through inhibition of lactate dehydrogenase impairs tumor growth in preclinical models of ewing sarcoma [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(19): 5060-5073.

[8] Shen S, Yao T, Xu Y, et al. CircECE1 activates energy metabolism in osteosarcoma by stabilizing c-Myc [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 151.

[9] Bousquet M, Noirot C, Accadbled F, et al. Whole-exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(4): 738-744.

[10] Yang J, Cogdell D, Yang D, et al. Deletion of the WWOX gene and frequent loss of its protein expression in human osteosarcoma [J]. *Cancer Lett*, 2010, 291(1): 31-38.

[11] Wu SC, Benavente CA. Chromatin remodeling protein HELLS is upregulated by inactivation of the RB-E2F pathway and is nonessential for osteosarcoma tumorigenesis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(66): 32580-32592.

[12] 高天. 单独或联合应用柴胡皂苷 D 和 JNK 抑制剂 SP600125 对骨肉瘤 U-20S 细胞的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.

[13] 张跃. P53 介导的 ROS 及线粒体通路在 Azurin 及其联合化疗药物诱导骨肉瘤细胞凋亡的机制探讨 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.

[14] Fu Y, Wang Y, Bi K, et al. MicroRNA-208a-3p promotes osteosarcoma progression via targeting PTEN [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 255.

[15] 高宇. Bcl-2 及 Bag-1 基因在骨肉瘤中的表达及意义 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009.

[16] 张耘, 陈刚, 戴守达, 等. Mcl-1 在阿霉素诱导骨肉瘤细胞凋亡中的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(5): 492-495.

[17] Wang ZX, Yang JS, Pan X, et al. Functional and biological analysis of Bcl-xL expression in human osteosarcoma [J]. *Bone*, 2010, 47(2): 445-454.

[18] Kurnit KC, Draisey A, Kazen RC, et al. Loss of CD73 shifts transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) from tumor suppressor to promoter in endometrial cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 505: 75-86.

[19] Fathizadeh H, Mirzaei H, Asemi Z. Melatonin: an anti-tumor

- agent for osteosarcoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 319.
- [20] 袁蓉, 王阶, 郭丽丽, 等. 失眠增加心血管病致病因子的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(7): 7-10.
- [21] 赵庆贺. 褪黑素对 TNF- α 介导的宫颈癌 Hela 细胞凋亡的影响及其机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [22] 何可. 褪黑素通过抑制细胞肌蛋白表达促进膀胱癌细胞凋亡 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020.
- [23] Wang J, Xiao X, Zhang Y, et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells [J]. *J Pineal Res*, 2012, 53(1): 77-90.
- [24] 陈亦清, 朱雯婷, 李振华, 等. 褪黑素对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭、迁移和血管生成的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(4): 389-394.
- [25] 宋军. 褪黑素抑制胃癌细胞增殖及抗胃癌免疫的相关分子机制 [D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
- [26] 鲁倩倩. 褪黑素对肝癌细胞 5-氟尿嘧啶耐药的影响及其机制研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [27] Xie WQ, Chen SF, Tao XH, et al. Melatonin: effects on cartilage homeostasis and therapeutic prospects in cartilage-related diseases [J]. *Aging Dis*, 2021, 12(1): 297-307.
- [28] 庄怡富, 干耀恺, 汤亭亭. 柴胡皂苷-d 促进骨肉瘤细胞凋亡的研究 [J]. *国际骨科学杂志*, 2017, 38(2): 115-120.
- [29] Pan Y, Niles LP. Epigenetic mechanisms of melatonin action in human SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 402: 57-63.
- [30] 林玉坤. 褪黑素协同 LPS 调控巨噬细胞防治肿瘤的作用研究 [D]. 郑州: 河南大学, 2020.
- [31] 董龙宝, 薛洁, 黄安乐, 等. 褪黑素通过促凋亡协同增强顺铂对人喉癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(6): 620-626.
- [32] 王芹, 徐畅, 杜利清, 等. 褪黑素对人结肠癌细胞辐射敏感性的影响 [J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2019, 43(6): 544-551.
- [33] 林晋, 黄宇, 唐风华, 等. 褪黑素通过调节 survivin 和 Caspase-3 表达诱导人骨肉瘤细胞凋亡 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2020, 29(1): 28-33.
- [34] 林晋, 黄宇, 林国威, 等. 褪黑素抑制人骨肉瘤 U2 细胞增殖及其机制 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2015, 24(1): 43-49.
- [35] 王亚鹏, 杨志平. 褪黑素联合顺铂、甲氨蝶呤对骨肉瘤 SaOS-2 细胞增殖的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 2015, 37(2): 215-220.
- [36] Cheng Y, Cai L, Jiang P, et al. SIRT1 inhibition by melatonin exerts antitumor activity in human osteosarcoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715(1-3): 219-229.
- [37] García-Santos G, Martín V, Rodríguez-Blanco J, et al. Fas/Fas ligand regulation mediates cell death in human Ewing's sarcoma cells treated with melatonin [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(7): 1288-1296.
- [38] 王亚鹏, 杨志平. 褪黑素联合顺铂、甲氨蝶呤对骨肉瘤 SaOS-2 细胞增殖的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 2015, 37(2): 215-220.
- [39] Liu L, Xu Y, Reiter RJ, et al. Inhibition of ERK1/2 signaling pathway is involved in melatonin's antiproliferative effect on human MG-63 osteosarcoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(6): 2297-2307.
- [40] 刘立峰, 潘玉涛, 陈涤, 等. 褪黑素通过下调细胞周期蛋白及其激酶的表达抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖 [J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(2): 131-135.
- [41] 陈思历, 杨洪彬. 骨肉瘤干细胞来源分泌体对 T 细胞增殖及分化的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(10): 21-29.
- [42] Vimalraj S, Saravanan S, Raghunandhakumar S, et al. Melatonin regulates tumor angiogenesis via miR-424-5p/VEGFA signaling pathway in osteosarcoma [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 118011.
- [43] Lu KH, Lin RC, Yang JS, et al. Molecular and cellular mechanisms of melatonin in osteosarcoma [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1618.
- [44] Toma CD, Svoboda M, Arrich F, et al. Expression of the melatonin receptor (MT) 1 in benign and malignant human bone tumors [J]. *J Pineal Res*, 2007, 43(2): 206-213.
- [45] 段康颖, 杨志平. 褪黑素受体 MT-1 在骨肉瘤中的表达及临床意义 [J]. *医学与哲学(临床决策论坛版)*, 2011, 32(5): 57-58, 68.
- [46] 周思明. 褪黑素通过 Src 和 PKA 平行通路选择性激活 CREB 依赖基因抑制骨肉瘤细胞增殖和迁移的机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [47] Qu H, Xue Y, Lian W, et al. Melatonin inhibits osteosarcoma stem cells by suppressing SOX9-mediated signaling [J]. *Life Sci*, 2018, 207: 253-264.
- [48] Chen Y, Zhang T, Liu X, et al. Melatonin suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in the MG-63 cell line [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3): 1356-1364.
- [49] Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of osteosarcoma and current management [J]. *Rheumatol Ther*, 2016, 3(2): 221-243.
- [50] Lu KH, Su SC, Lin CW, et al. Melatonin attenuates osteosarcoma cell invasion by suppression of C-C motif chemokine ligand 24 through inhibition of the c-Jun N-terminal kinase pathway [J]. *J Pineal Res*, 2018, 65(3): e12507.

[收稿日期] 2021-03-23