

葡萄籽原花青素对人骨肉瘤143B细胞的作用及机制研究

谢佳卿 赵佳丽 李爱芳 谷月 陈露 黄茂 彭棋 曾宗跃 周兰*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文研究葡萄籽原花青素(*grape seed procyanidins*, GSP)对人骨肉瘤143B细胞增殖、凋亡的影响及其机制。用不同剂量GSP处理骨肉瘤143B细胞, 结晶紫染色和集落形成试验分别用于检测细胞增殖和集落形成能力的变化; 流式细胞术检测细胞周期与凋亡, Western blot法检测周期和凋亡相关蛋白; RT-PCR和Western blot法检测Wnt/ β -catenin信号通路相关分子表达的变化; 采用腺病毒Ad β -catenin感染以过表达 β -catenin, 探讨GSP抑制143B细胞增殖的作用是否与Wnt/ β -catenin信号通路相关。结果显示, GSP在20~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量范围内呈剂量和时间依赖性抑制143B细胞增殖活力和降低细胞克隆形成能力; GSP引起 G_0/G_1 周期阻滞和周期相关蛋白cyclin D1下调, 还使细胞凋亡率明显增高, 并伴有活化的凋亡相关蛋白cleaved PARP(*poly ADP-ribose polymerase*)和cleaved caspase-8的水平增高; GSP降低143B细胞中 β -catenin mRNA水平及核内与总 β -catenin蛋白质水平, 抑制GSK3 β 磷酸化并上调GSK3 β 蛋白质水平; 过表达 β -catenin可部分减弱GSP对该细胞增殖活性的抑制作用。结果表明, GSP抑制骨肉瘤143B细胞的增殖和促进其凋亡, 其机制涉及Wnt/ β -catenin信号通路的抑制。

关键词 葡萄籽原花青素; 骨肉瘤细胞; 增殖; 凋亡; Wnt/ β -catenin信号通路

The Effects of Grape Seed Proanthocyanidins on Human Osteosarcoma 143B Cell Line and Its Mechanisms

Xie Jiaqing, Zhao Jiali, Li Aifang, Gu yue, Chen Lu, Huang Mao, Peng Qi, Zeng Zongyue, Zhou Lan*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the effect of grape seed proanthocyanidins (GSP) on cell proliferation and apoptosis, and its relevant mechanisms in human osteosarcoma cells, human osteosarcoma 143B cell line was treated with different concentration of GSP. The cell proliferation activity was detected by crystal violet staining and colony forming assay. The cell cycle and apoptosis of 143B cells were determined by flow cytometry. Overexpressing β -catenin by infection of adenovirus Ad β -catenin was performed to investigate whether Wnt/ β -catenin signaling pathway was involved in the GSP-induced proliferation suppression in 143B cells. RT-PCR and Western blot assay were used to detect the mRNA level and protein level of the related proteins, respectively. The result of crystal violet staining showed that 20~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSP inhibited the cell proliferation activity in a dose- and time-dependent manner. The colony forming assay showed that GSP treatment decreased the number of colony. GSP induced G_0/G_1 phase arrest by the flow cytometry analysis and decreased the cell cycle related protein

收稿日期: 2017-07-30 接受日期: 2017-10-19

*通讯作者. Tel: 18523323947, E-mail: zhoulan0111@foxmail.com

Received: July 30, 2017 Accepted: October 19, 2017

*Corresponding author. Tel: +86-18523323947, E-mail: zhoulan0111@foxmail.com

网络出版时间: 2017-12-04 12:00:11 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1159.004.html>

cyclin D1. The apoptosis rate and the apoptosis related proteins cleaved PARP (poly ADP-ribose polymerase) and cleaved caspase-8 were higher than their controls. At the same time, GSP increased GSK3 β protein and reduced β -catenin mRNA, p-GSK3 β , total β -catenin protein, nuclear β -catenin protein, and cyclin D1 protein. β -catenin overexpression partially attenuated the inhibition effect of GSP on cell proliferation. Our study demonstrated that GSP could inhibit the proliferation and promote the apoptosis in human osteosarcoma 143B cells, and its mechanism of the proliferation inhibition supposed to be related to inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords grape seed proanthocyanidins; osteosarcoma; proliferation; apoptosis; Wnt/ β -catenin signaling pathway

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种常见于儿童和青少年的恶性骨肿瘤,具有高转移潜能。目前,虽然手术联合辅助化疗明显提高患者5年生存率达到70%^[1],但因无法避免常规化疗药物毒副作用所引致的不良反应,患者预后变差^[2]。因此,寻找新治疗靶点与更低毒副作用的抗骨肉瘤药物具有重要的临床意义。葡萄籽原花青素(grape seed procyanidins, GSP)是从葡萄籽中分离出来的一类聚多酚化合物,具有提高免疫、减轻机体损伤、抗氧化和抗炎等活性,且毒性更低^[3-5]。近年又发现,GSP能够抑制肺癌、胃癌和乳腺癌等多种肿瘤细胞的生长^[6-9],但其对骨肉瘤细胞的作用及机制仍不清楚。因此,本文将首先探讨GSP对骨肉瘤143B细胞增殖、凋亡的影响,为GSP成为潜在的治疗骨肉瘤药物提供实验依据。Wnt/ β -catenin信号通路参与多种肿瘤(包括骨肉瘤)的发生、发展,因此是抗癌治疗的一个重要靶点^[10-11]。本研究拟进一步探讨Wnt/ β -catenin信号通路是否参与介导GSP对骨肉瘤的作用,为阐明GSP抗骨肉瘤的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人骨肉瘤143B细胞由本实验室提供。过表达 β -catenin腺病毒由芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠。葡萄籽原花青素(质量分数>950 g/L)购自广东方晟公司;DMEM培养基和胎牛血清购自Hyclone公司;引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;RNA提取和逆转录试剂盒购自TaKaRa公司;蛋白质提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗人cyclin D1单克隆抗体、鼠抗人 β -catenin单克隆抗体、兔抗人p-GSK3 β 多克隆抗体、兔抗人GSK3 β 多克隆抗体、鼠抗人 β -actin单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;兔抗人cleaved PARP、cleaved

caspase-8多克隆抗体购自美国ImmunoWay公司;兔抗人Histone单克隆抗体购自Abmart公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取液氮保存人骨肉瘤143B细胞复苏,用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖完全培养基,于37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的恒温培养箱中培养。当细胞处对数增殖期时,用0.25%胰蛋白酶消化传代,进行后续试验。

1.2.2 结晶紫染色 将生长状态良好的143B细胞接种到24孔板中,培养至细胞贴壁后,加入不同浓度GSP(0、20、40、60 μ g/mL)继续培养。分别在24、48和72 h时,吸弃孔内培养基,PBS洗涤,4%多聚甲醛固定15 min,结晶紫染色20 min,流水洗去多余染液,待室温干燥后扫描成像。每孔加入500 μ L 20%乙酸溶液,振荡以促进结晶紫完全溶解,检测波长590 nm处吸光度(D)值。

1.2.3 克隆形成试验 将143B细胞以1 000/孔接种到6孔板内,细胞贴壁稳定后,加入低浓度GSP(10 μ g/mL)处理7 d。吸弃上清,PBS洗2次,4%多聚甲醛固定和结晶紫染色,扫描成像并计数细胞集落。

1.2.4 流式细胞术 对培养在6孔板中的143B细胞加入GSP(40 μ g/mL)继续培养,48 h后收集细胞,2 000 r/min离心5 min后,弃掉上清液,用1 mL PBS重悬细胞,再2 000 r/min离心5 min,弃上清。检测周期时先用70%乙醇固定,4 $^{\circ}$ C过夜;检测凋亡时直接用PBS重悬;按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒法进行染色,再经流式细胞术检测。

1.2.5 半定量RT-PCR 收集各组细胞并提取总RNA,逆转录合成cDNA进行PCR反应,检测143B细胞中各基因转录水平,引物见表1。反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,62 $^{\circ}$ C-54 $^{\circ}$ C退火30 s,9个

表1 引物信息

基因	引物序列	产物大小
Gene	Primer sequences	Production size
<i>β-catenin</i>	Forward: 5'-CTG CAG GGG TCC TCT GTG-3'	125 bp
	Reverse: 5'-TGC ATA TGT CGC CAC ACC-3'	
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-CAG CGA CAC CCA CTC CTC-3'	120 bp
	Reverse: 5'-TGA GGT CCA CCA CCC TGT-3'	

循环, 每个循环依次降低1 °C, 72 °C延伸30 s; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 22-25个循环; 最后72 °C延伸10 min。2%琼脂糖凝胶电泳并成像, 用Quantity One软件进行灰度值分析。

1.2.6 Western blot法 提取经GSP处理的143B细胞总蛋白, 另按核蛋白提取试剂盒说明书提取核蛋白。上样蛋白质经10% SDS-PAGE分离, 切胶转膜, 封闭并加入一抗, 4 °C孵育过夜, 次日洗膜后加入二抗, 37 °C孵育1 h, 洗膜后显影采集图像, 用Quantity One软件分析灰度值, 以 β -actin或histone为内参, 计算目的蛋白与内参的比值。

1.2.7 统计学处理 各实验独立重复3次, 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 数据以均数±标准

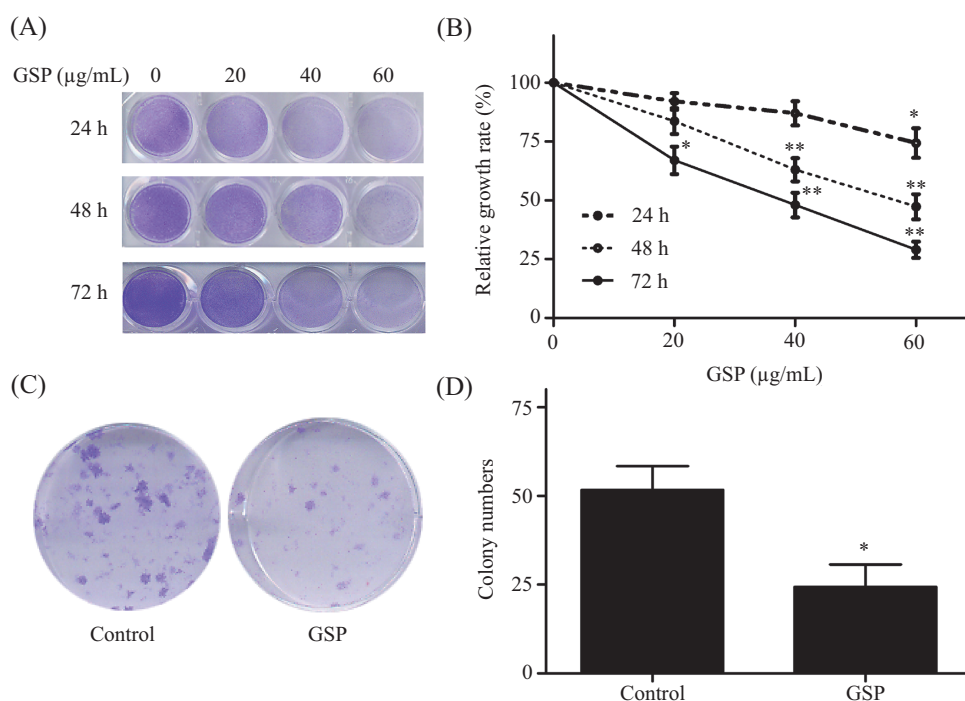
差表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GSP抑制143B细胞增殖

结晶紫试验结果显示, GSP对143B细胞增殖有抑制作用, 并呈时间依赖性和剂量依赖性(图1A和图1B)。GSP处理24 h时, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的GSP处理组开始出现增殖抑制($P < 0.05$); 当处理48 h时, GSP浓度达40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时明显抑制143B细胞增殖($P < 0.01$); 处理72 h时, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSP开始出现增殖抑制作用($P < 0.01$); 其中, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的GSP处理143B细胞, 其增殖抑制作用最明显($P < 0.01$)。

基于上述结果, 参照低浓度药物长期处理模型,



A、B: 结晶紫染色检测143B细胞增殖活力及定量分析结果; C、D: 克隆形成试验检测143B细胞集落形成能力及统计结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组或对照组相比较。

A,B: the proliferation activity of 143B cells were detected by crystal violet staining; C,D: colony forming assay was used to examine the colony forming ability of 143B cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group or control group.

图1 GSP对人骨肉瘤143B细胞增殖的抑制作用

Fig.1 The inhibitory effect of GSP on the proliferation of human osteosarcoma 143B cells

我们选取低浓度GSP(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理143B细胞进行克隆形成试验。7 d后, 对照组与GSP处理组的集落数目分别为 51 ± 12 个和 24 ± 11 个, 表明GSP能够降低143B细胞的集落形成能力($P<0.05$, 图1C和图1D)。

2.2 GSP诱导143B细胞G₀/G₁期阻滞

用40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSP处理143B细胞48 h后, 收集并固定细胞用于细胞周期检测。结果显示, 与对照组相比, GSP处理组的细胞S期比例下降, 而G₀/G₁期比例从45.08到59.86, 明显增高($P<0.05$, 图2A和图2B); 与之相符合的是, Western blot结果显示, GSP处理组的周期相关蛋白cyclin D1水平明显下降39%($P<0.05$, 图2C和图2D)。以上结果表明, GSP可诱导143B细胞周期G₀/G₁期阻滞。

2.3 GSP诱导143B细胞的凋亡

收集各组细胞并用流式细胞术检测细胞凋亡, 以凋亡率(为早期凋亡率与晚期凋亡率之和)表示。该结果显示, 对照组的凋亡率为(24.31 ± 1.98)%, GSP处理组的细胞凋亡率升高到(38.78 ± 7.54)%, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图3A和图3B)。Western blot结果显示, GSP处理组的凋亡相关活化蛋白cleaved PARP和cleaved caspase-8表达量均增高, 分别是对照组的2.70和2.25倍($P<0.05$, 图3C和图3D)。以上结果提示, GSP

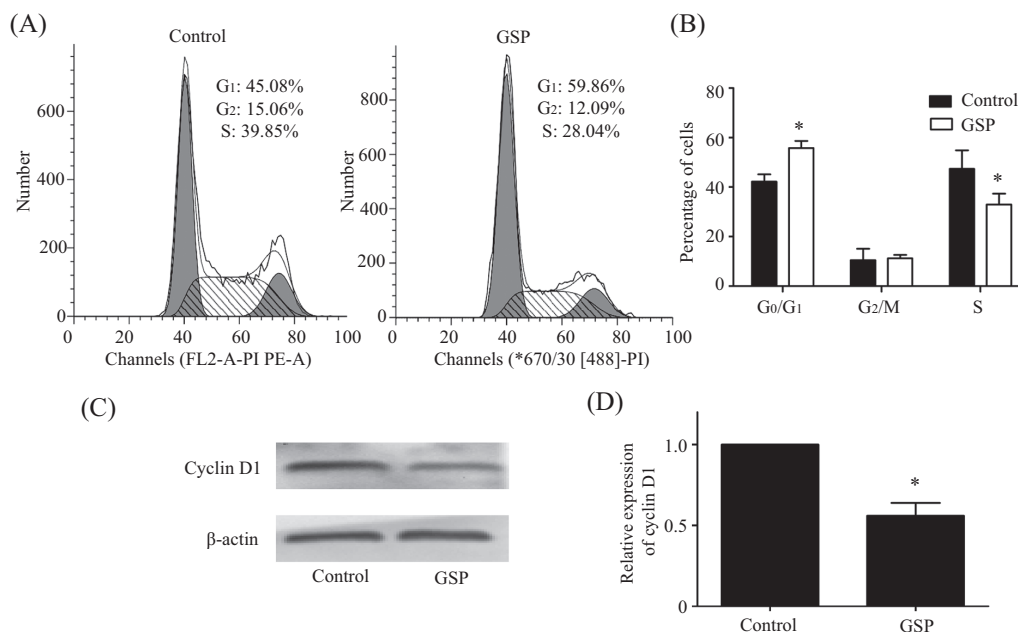
促进143B细胞凋亡, 涉及caspase凋亡途径激活。

2.4 GSP抑制143B细胞Wnt/ β -catenin信号通路活性

RT-PCR法和Western blot法检测Wnt/ β -catenin信号通路相关分子的变化。RT-PCR结果显示, 与对照组相比, GSP处理组 β -catenin mRNA水平降低41.5%($P<0.05$, 图4A和图4B)。Western blot法检测结果显示, GSP处理组细胞内总的 β -catenin和核内 β -catenin表达量均降低, 分别为对照组的45%和64%($P<0.05$, 图4C和图4D)。此外, GSP还抑制该信号通路负调控分子GSK3 β 蛋白质磷酸化水平($P<0.05$), 并明显上调GSK3 β 蛋白质水平($P<0.05$)。以上结果提示, GSP可抑制Wnt/ β -catenin信号通路活性, 其下调机制可能涉及 β -catenin表达抑制和GSK3 β 激活。

2.5 过表达 β -catenin可部分逆转GSP对143B细胞的增殖抑制作用

为进一步验证Wnt/ β -catenin信号通路参与GSP抑制143细胞增殖中的作用, 我们采用腺病毒Ad β -catenin感染143B细胞, 成功过表达 β -catenin($P<0.05$, 图5A和图5B), 再观察GSP对过表达 β -catenin的骨肉瘤细胞增殖的影响。结晶紫染色结果显示, 与GSP单独处理组相比, 在过表达 β -catenin组GSP对143B

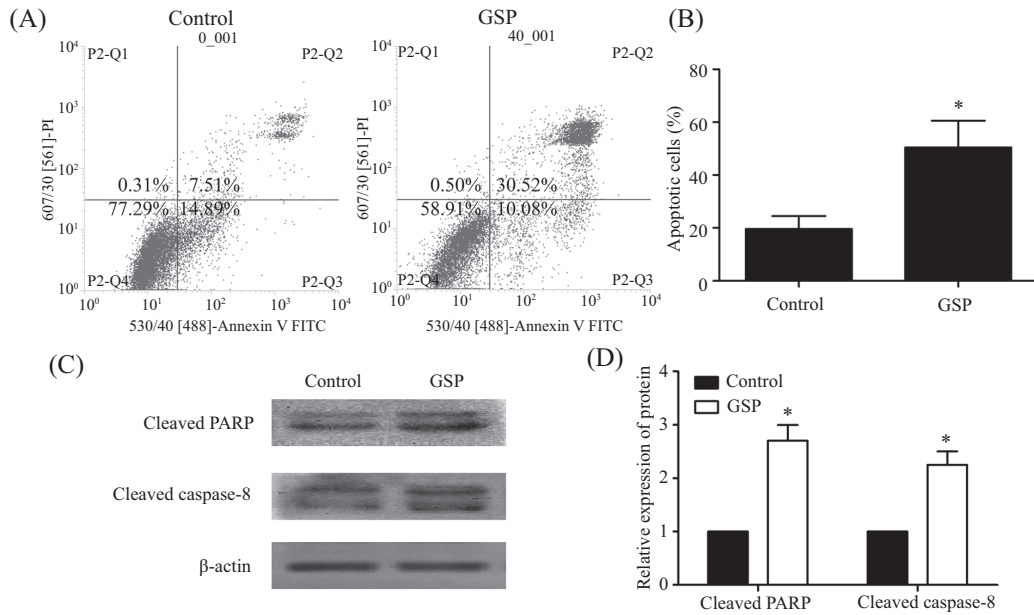


A、B: 流式细胞术检测GSP对143B细胞周期分布的影响; C、D: Western blot法检测cyclin D1蛋白质水平及其相对定量分析。* $P<0.05$, 与对照组相比较。

A,B: the effect of GSP on cell cycle in 143B cells detected by the flow cytometry; C,D: the protein level of cyclin D1 detected by Western blot and its relative quantity. * $P<0.05$ vs control group.

图2 GSP对人骨肉瘤143B细胞周期的阻滞作用

Fig.2 The cell cycle arrest effect of GSP on human osteosarcoma 143B cells

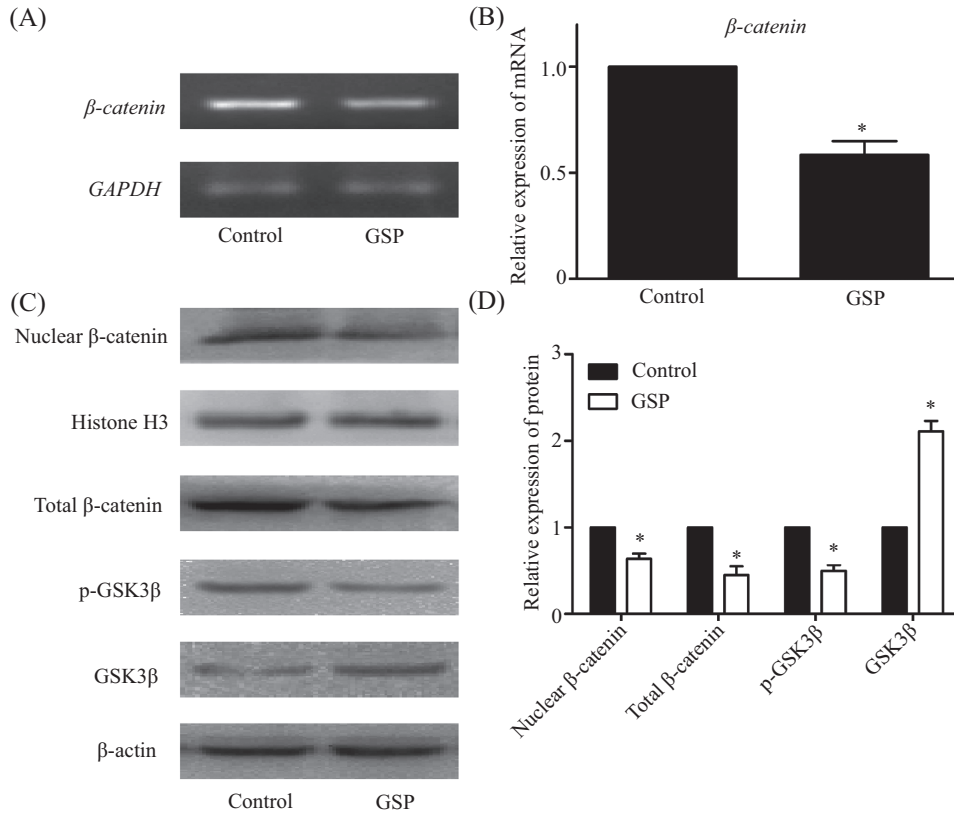


A、B: 流式细胞术检测不同处理组细胞凋亡比例; C、D: Western blot法检测GSP对凋亡相关蛋白表达的影响及其结果的相对定量分析。* $P < 0.05$, 与对照组相比较。

A,B: the apoptosis in different groups detected by the flow cytometry; C,D: the levels of apoptosis related proteins detected by Western blot and their relative quantity. * $P < 0.05$ vs control group.

图3 GSP对人骨肉瘤143B细胞凋亡的促进作用

Fig.3 The promotion effect of GSP on apoptosis of human OS 143B cells

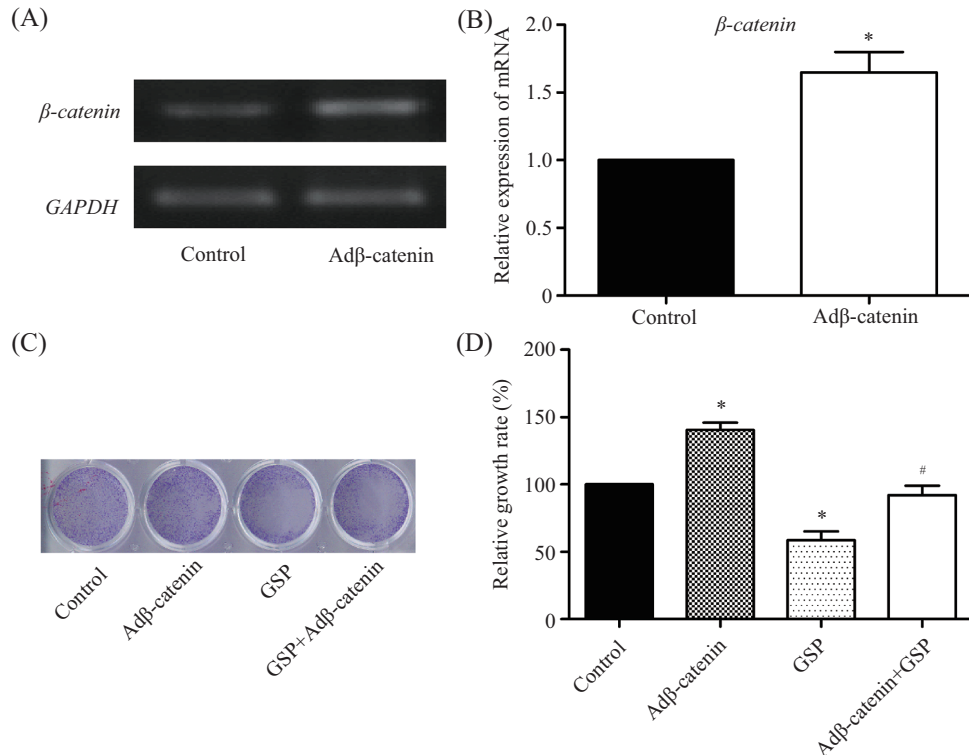


A、B: RT-PCR检测GSP对 β -catenin mRNA的影响; C、D: Western blot法检测GSP对Wnt/ β -catenin通路相关分子水平的影响及结果的相对定量分析。* $P < 0.05$, 与对照组相比较。

A,B: the effect of GSP on the transcription of β -catenin detected by RT-PCR; C,D: the protein levels of the related molecules in Wnt/ β -catenin pathway detected by Western blot and their relative quantity. * $P < 0.05$ vs control group.

图4 GSP对人骨肉瘤143B细胞Wnt/ β -catenin信号通路的抑制作用

Fig.4 The inhibitory effect of GSP on Wnt/ β -catenin signaling pathway in human osteosarcoma 143B cells



A、B: 采用腺病毒感染方法成功过表达 β -catenin; C、D: 结晶紫染色检测过表达 β -catenin对GSP抑制143B细胞增殖活性的影响及其结果的相对定量分析。* P <0.05, 与对照组比较; # P <0.05, 与GSP组比较。

A,B: the β -catenin was overexpressed by adenoviral infection; C,D: the effect of β -catenin overexpression on the proliferation inhibition by GSP was detected by crystal violet staining and their relative quantity. * P <0.05 vs control group; # P <0.05 vs GSP group.

图5 过表达 β -catenin可部分逆转GSP对骨肉瘤143B细胞增殖活性的抑制作用

Fig.5 Overexpression of β -catenin partially reversed the proliferation inhibition by GSP in osteosarcoma 143B cells

细胞的增殖抑制作用明显减弱, 差异有统计学意义 (P <0.05, 图5C和图5D)。这表明, GSP抑制143B细胞增殖作用的机制涉及Wnt/ β -catenin信号通路活性的抑制。

3 讨论

骨肉瘤来源于间叶组织, 是好发于儿童和青少年中的原发恶性骨肿瘤, 具有高肺转移性、高致死率和致残率等特点。目前的临床治疗常以手术切除联合化疗为主, 患者预后得到明显改善, 但是现有常规化疗药物毒副作用大, 包括对血液系统、肝肾和神经系统的毒性等, 这不仅严重影响幸存患者后期健康与生活质量, 还影响患者对治疗的依从性, 导致治疗效果不佳^[2]。因此, 急需寻找新治疗靶点与低毒副作用药物来解决这个临床问题。

原花青素是一类聚多酚类化合物, 在酸性介质中受热可转变为花青素; 它们广泛分布在植物中, 尤以葡萄籽中含量最丰富。葡萄籽原花青素(GSP)是由不同数量的儿茶素、表儿茶素、没食子酸及没食

子酸酯等结合而成的单体或多聚体^[12]。GSP可以抗氧化、抗炎症、调节免疫、预防或减轻化疗损伤, 并且毒副作用小、生物利用度高^[13-14]。近年来, GSP的抗肿瘤作用开始被关注。研究显示, GSP对肺癌、胃癌等多种肿瘤细胞具有促凋亡和抑制增殖作用。GSP通过下调抗凋亡蛋白Bcl-2, 上调促凋亡蛋白Bax、caspase-3和caspase-9表达, 释放细胞色素c介导细胞凋亡^[15]。GSP有明显的抑制人胃癌MGC-803细胞增殖的作用, 还可激活自噬和凋亡^[6]。GSP引起G₀/G₁周期阻滞, 同时下调细胞周期调控因子cyclin E、CDK2和CDK4抑制人膀胱癌T24细胞生长^[9]。然而, GSP在人骨肉瘤细胞中的作用尚未报道。本研究采用不同浓度GSP处理人骨肉瘤143B细胞, 发现GSP能呈时间和剂量依赖性抑制骨肉瘤143B细胞的增殖, 降低细胞克隆形成能力, 使细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 上调凋亡相关蛋白表达水平并促进细胞凋亡, 这些结果提示, GSP可能成为潜在的抗骨肉瘤的药物。

Wnt/ β -catenin信号通路已被证实在肿瘤的发

生、发展中发挥重要作用^[16]。在骨肉瘤中该通路同样也存在异常激活现象, 且与骨肉瘤的分期和转移相关^[10-11,17]。Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂可增加甲氨蝶呤介导的人骨肉瘤Saos2细胞死亡^[18]; 阻断Wnt受体LRP5表达可抑制骨肉瘤生长及转移^[19]。基于此, 我们推测, Wnt/ β -catenin信号通路可能参与介导GSP抑制骨肉瘤增殖的作用。本文研究结果发现, GSP下调143B细胞内总的和胞核内的 β -catenin蛋白质水平, 提示GSP能抑制Wnt/ β -catenin信号通路活性, 并且通路下游靶蛋白cyclin D1水平的降低也支持这一结论; 此外, 过表达 β -catenin可部分逆转GSP对该细胞增殖活性的抑制, 进一步表明下调Wnt/ β -catenin信号通路活性参与介导了GSP对人骨肉瘤143B细胞增殖的抑制作用。同时, 本文发现GSP可抑制143B细胞中 β -catenin表达, 激活并增加该通路负调控因子GSK3 β 蛋白质, 可能正是这两个变化共同作用下调了胞内 β -catenin水平并影响 β -catenin的入核, 这有待进一步证实。

综上所述, 本研究证实, GSP可抑制骨肉瘤143B细胞的增殖、阻滞细胞周期并促其凋亡, 其抑制增殖作用机制涉及Wnt/ β -catenin信号通路的抑制, 为GSP成为潜在的抗骨肉瘤药物以及阐明GSP抑制骨肉瘤的分子机制和Wnt/ β -catenin信号通路作为治疗骨肉瘤的潜在靶点提供了部分实验依据。然而, 仅从体外研究GSP对骨肉瘤细胞143B细胞的作用无法深刻理解GSP抗骨肉瘤的复杂过程, 因此, 后续本课题组将利用其他骨肉瘤细胞系和体内实验进行深入探讨。

参考文献 (References)

- Hossain MS, Begum M, Mian MM, Ferdous S, Kabir S, Sarker HK, *et al.* Epidemiology of childhood and adolescent cancer in Bangladesh, 2001-2014. *BMC Cancer* 2016; 16(1): 104.
- Taran SJ, Taran R, Malipatil NB. Pediatric osteosarcoma: an updated review. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2017; 38(1): 33-43.
- Nandakumar V, Singh T, Katiyar SK. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett* 2008; 269(2): 378-87.
- Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(5): 599-607.
- Stefanovic V, Savic V, Vlahovic P, Cvetkovic T, Najman S, Mitic-Zlatkovic M. Reversal of experimental myoglobinuric acute renal failure with bioflavonoids from seeds of grape. *Ren Fail* 2000; 22(3): 255-66.
- Akhtar S, Meeran SM, Katiyar N, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human non-small cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation, and angiogenic factors. *Clin Cancer Res* 2009; 15(3): 821-31.
- Nie C, Zhou J, Qin X, Shi X, Zeng Q, Liu J, *et al.* Reduction of apoptosis by proanthocyanidin-induced autophagy in the human gastric cancer cell line MGC-803. *Oncol Rep* 2016; 35(2): 649-58.
- Luan YY, Liu ZM, Zhong JY, Yao RY, Yu HS. Effect of grape seed proanthocyanidins on tumor vasculogenic mimicry in human triple-negative breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(2): 531-5.
- Fishman AI, Johnson B, Alexander B, Won J, Choudhury M, Konno S. Additively enhanced antiproliferative effect of interferon combined with proanthocyanidin on bladder cancer cells. *J Cancer* 2012; 3: 107-12.
- Cai Y, Mohseny AB, Karperien M, Hogendoorn PC, Zhou G, Cleton-Jansen AM. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J Pathol* 2010; 220(1): 24-33.
- 李成存, 张 栋, 朱恒杰, 李 敏. β -catenin在骨肉瘤中的表达及其临床意义. *中国骨肿瘤骨病*(Li Chengcun, Zhang Dong, Zhu Hengjie, Li Min. The expression of β -catenin in osteosarcoma and its clinical significance. *Chin J Bone Tumor & Bone Disease*) 2008; 7(1): 26-8.
- Zhang S, Cui Y, Li L, Li Y, Zhou P, Luo L, *et al.* Preparative HSCCC isolation of phloroglucinolysis products from grape seed polymeric proanthocyanidins as new powerful antioxidants. *Food Chem* 2015; 188: 422-9.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuzynski CA, *et al.* Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000; 148(2/3): 187-97.
- Hamidian Jahromi A, Roozbeh J, Bastani B. Potential protective effect of grape seed proanthocyanidine extract in cold ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. *Iran J Kidney Dis* 2013; 7(4): 327-8.
- Roy AM, Baliqa MS, Elmets CA, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax, and caspase-3 pathways. *Neoplasia* 2015; 7(1): 24-36.
- Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(5): 1-10.
- Lu BJ, Wang YQ, Wei XJ, Rong LQ, Wei D, Yan CM, *et al.* Expression of the Wnt-5a and ROR2 correlates with disease severity in osteosarcoma. *Mol Med Rep* 2012; 5(4): 1033-6.
- Ma Y, Ren Y, Han EQ, Li H, Chen D, Jacobs JJ, *et al.* Inhibition of the Wnt-beta-catenin and Notch signaling pathways sensitizes osteosarcoma cells to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 431(2): 274-9.
- Guo Y, Rubin EM, Xie J, Zi X, Hoang BH. Dominant negative LRP5 decreases tumorigenicity and metastasis of osteosarcoma in an animal model. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466(9): 2039-45.