

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.17.006

苦杏仁苷介导人肝癌细胞 HuH-7 凋亡的实验研究 *

王青瑛¹ 王郁金² 邢文文² 闫颖² 王相东^{2Δ}

(1 陕西中医药大学基础医学院中医诊断学实验中心 陕西 咸阳 712046;

2 陕西中医药大学基础医学院中医诊断学教研室 陕西 咸阳 712046)

摘要 目的:通过体内体外实验探讨苦杏仁苷在肝癌中的抗肿瘤作用。方法:MTT 法检测不同浓度的苦杏仁苷对肝癌 HuH-7 细胞存活率的影响;DAPI 染色法观察苦杏仁苷介导 HuH-7 细胞的凋亡形态学变化;流式细胞术检测苦杏仁苷干预后 HuH-7 细胞凋亡率变化;Western Blot 法检测细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达,计算 Bax/Bcl-2 的比值。建立裸鼠 HuH-7 细胞移植瘤模型,观察苦杏仁苷对荷瘤裸鼠移植瘤体积的影响。结果:体外实验结果证实苦杏仁苷能够诱导人肝癌 HuH-7 细胞凋亡的发生($P<0.05$)。随着苦杏仁苷浓度的增加,HuH-7 细胞的存活率降低,凋亡率升高,干预后 Bax/Bcl-2 比值明显升高($P<0.05$)。体内实验结果表明,裸鼠 HuH-7 细胞移植瘤的体积增长速度减慢($P<0.05$)。结论:苦杏仁苷能够诱导人肝癌 HuH-7 细胞和裸鼠 HuH-7 细胞移植瘤细胞发生凋亡,减缓肿瘤生长,从而发挥抗肿瘤作用。

关键词:苦杏仁苷;HuH-7 细胞;凋亡;异体移植

中图分类号:R-33;R735.7;R243 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)17-3227-05

Experimental Study on Amygdalin Mediated Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Huh-7*

WANG Qing-ying¹, WANG Yu-jin², XING Wen-wen², YAN Ying², WANG Xiang-dong^{2Δ}

(1 Experimental Center of Traditional Chinese Medicine Diagnostics, School of Basic Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 712046, China; 2 Teaching and Research Office of Traditional Chinese Medicine Diagnostics, School of Basic Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 712046, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the antitumor effect of Amygdalin in liver cancer through vitro and vivo experiments. **Methods:** MTT assay was used to detect different concentrations of amygdalin on the survival rate of HuH-7 cells; DAPI staining was used to observe the morphological changes of apoptosis induced by amygdalin in HuH-7 cells; flow cytometry was used to detect changes of apoptosis rate of HuH-7 cells after amygdalin intervention; expressions of apoptosis related proteins Bax and Bcl-2 were detected by Western blot, the ratio of Bax / Bcl-2 was calculated. Xenograft tumor model of HuH-7 cells in nude mice was established, and the effect of amygdalin on tumor volume in nude mice was observed. **Results:** The results of in vitro experiment confirmed that amygdalin could induce apoptosis of human hepatoma cell line HuH-7 ($P<0.05$), with the concentration of amygdalin increased, the survival rate of HuH-7 cells decreased, the apoptosis rate increased, and the ratio of Bax/Bcl-2 increased significantly after intervention ($P<0.05$). The results of in vivo experiment showed that the growth rate of transplanted tumor of Huh-7 cells in nude mice slowed down ($P<0.05$). **Conclusion:** Amygdalin can induce apoptosis of HuH-7 cells and transplanted tumor cells of nude mice HuH-7 cells, slow down tumor growth, and play an anti-tumor effect.

Key words: Amygdalin; HuH-7 cells; Apoptosis; Xenograft

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)17-3227-05

前言

据统计报道恶性肿瘤中肝癌的发病率和死亡率分别为第 5 和第 2 位,全球每年死于肝癌的人大约有 70 万^[1,2]。肝癌作为严重危害我国人民健康的恶性肿瘤之一,虽然以手术切除为基础、辅助化疗、放疗等综合治疗改善了肝癌的临床效果,但是肝

癌患者的病情隐匿、潜伏期长导致早期诊断困难^[3-5]。临床上肝癌诊治面临着新的挑战,因此对肝癌的药物研究可以为临床肝癌的治疗提供新的理论基础。苦杏仁苷来自苦杏仁种子的天然维生素 B17,广泛存在于蔷薇科植物果实的种子中,如杏、桃、苹果、梅等,其在杏仁和苦杏仁中的含量最高,因此常用名为苦杏仁苷^[6,7]。苦杏仁苷是苯甲醛和氰化物组成的化合物,可被 β -

* 基金项目:陕西省中医管理局中医药科研项目(JCPT005)

作者简介:王青瑛(1990-),女,硕士研究生,助理实验师,研究方向:中医诊治肝病,E-mail: KXR2020HCC@163.com

Δ 通讯作者:王相东(1974-),男,硕士研究生,副教授,研究方向:中医理论与实践,E-mail: 369061016@qq.com

(收稿日期:2020-12-27 接受日期:2021-01-23)

葡萄糖苷酶分解代谢为有毒的氢氰酸^[9],但人体正常组织和细胞中含硫氰酸酶,硫氰酸酶可将氢氰酸转化为氢氰酸盐。对于恶性肿瘤细胞,苦杏仁苷具有良好的抗癌作用,苦杏仁苷已被临床作为抗肿瘤辅助用药,且被证实具有一定抗肿瘤效果^[9,10]。苦杏仁苷已初步在肝癌细胞中进行了研究,但在肝癌裸鼠中的体内实验尚未见于报道,本文通过实验分析了苦杏仁苷诱导人肝癌 HuH-7 细胞凋亡的发生和抑制裸鼠 HuH-7 细胞移植瘤的生长,为临床上苦杏仁苷的用药提供一定理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

苦杏仁苷(Amygdalin)(Sigma 公司,美国),DMSO(Sigma 公司,美国),胎牛血清(Hyclone 公司,美国),DMEM 培养液(Gibco 公司,美国),MTT(Invitrogen 公司,美国),DAPI 染色试剂盒、Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒和 TUNEL 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物技术公司,中国),鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、兔抗人 Bax 单克隆抗体和鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国)。

1.2 细胞株

人肝癌细胞株 HuH-7 细胞购买于中国科学院上海细胞库。

1.3 实验动物

实验所需裸鼠购买于兵器工业卫生研究所,许可证号[SCXK(陕)2016-001],雌雄纯系 BALB/c 裸鼠各 30 只,由兵器工业卫生研究所无菌培养室内饲养,4-5 周龄,体重 13-15 g。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞离体培养 HuH-7 细胞 - 人肝癌细胞株培养于含 10%胎牛血清(含激素、微量元素、矿物质和脂肪)和 1%抗生素(青霉素)的 DMEM 培养基中,放入含 5% CO₂ 温度 37℃,相对湿度 95%培养箱中培养。待细胞长到 80%左右按 1:3 比例进行传代以备后续实验所用。

1.4.2 MTT 法检测苦杏仁苷对体外培养肿瘤的生长抑制作用 取处于对数生长期的 HuH-7 细胞,消化离心后,用 DMEM 培养液(10%FBS)重悬细胞以调整浓度,接种于 96 孔培养板中,每孔 3×10^3 个细胞,把 96 孔版放入 CO₂ 培养箱中 37℃培养,待细胞贴壁后弃掉原培养液,加入终浓度分别为 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL、16 mg/mL 的用 DMEM 培养液配制的苦杏仁苷,培养 48h,用倒置显微镜观察拍照记录细胞形态。拍照后,向 96 孔版中加入 MTT 溶液(5 μ L/孔),继续培养 3 h 后,离心后移液枪弃掉培养液,每孔加入 100 μ L DMSO 溶解液(南京凯基生物技术公司,中国),待其溶解。酶标仪(Bio-Tek,ELX800)检测选择 96 孔培养板各孔 570 nm 波长下的 OD 值。细胞存活率(%)= 加药组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times$ 100%。

1.4.3 DAPI 染色实验 取处于对数生长期的 HuH-7 细胞,接种于 24 孔板中,每孔细胞数为 5×10^4 个。每孔分别加入 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL、16 mg/mL 的苦杏仁苷作用于细胞 24 h。消化离心细胞,把细胞在固定液中固定,然后把细胞滴加在载玻片上,干燥后细胞会紧贴在载玻片上固定细胞,细胞固定后 DAPI 染液染色 30 min(避光),取出载玻片 PBS 液洗涤两遍,待玻片自然晾干后,激光共聚焦扫描显微镜

(FV500,Olympus)取波长 365 nm 处观察拍照保存。

1.4.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测 HuH-7 细胞凋亡 取处于对数生长期的 HuH-7 细胞,消化重悬细胞后接种于 6 孔版中,每孔 5×10^4 的细胞密度培养于 2 mL DMEM 培养液中。待细胞贴壁后向每孔中分别加入 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL、16 mg/mL 终浓度的苦杏仁苷,培养 24 h。依次加入胰蛋白酶、DMEM 培养液消化和终止消化细胞,PBS 液反复洗涤离心两次,重悬细胞计数制成单个核细胞液悬液,密度至 5×10^5 。每管加入 500 μ L Binding Buffer,5 μ L Annexin V-FITC,5 μ L PI 混匀。室温避光 15min,流式细胞仪(BD,FACSVerse)检测 HuH-7 细胞凋亡情况。

1.4.5 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达水平的影响 取对数生长期的肝癌 HuH-7 细胞,分别加入 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL、16 mg/mL 的苦杏仁苷作用 24 h 提取细胞蛋白。BCA 法测定蛋白质浓度。各组取 50 μ g 总蛋白上样,经 12% SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺)凝胶电泳分离后,将蛋白转至 PVDF 膜上,放入转膜液中进行转膜(80V,90 min)。5%脱脂牛奶-PBST 封闭 2 h。按照目的条带 Bax、Bcl-2 和 β -actin 的位置,进行剪膜。分别加入 Bax、Bcl-2 和 β -actin 的一抗,稀释比例为 1:200,一抗 4℃孵育过夜后,用 PBST 漂洗三遍,每遍 5 min。分别用稀释比例为 1:1000 的对应二抗封闭,37℃摇床反应 1 h,用 PBST 洗三遍 PVDF 膜,每次洗 5 min。辣根过氧化物酶标记化学发光显色,显影于胶片上。采用 LabWorks4.6 软件对目的蛋白和 β -actin 条带行灰度值分析。

1.4.6 荷瘤裸鼠试验 无菌环境中定期给裸鼠喂食灭菌的鼠粮和水,待鼠的体重达到 20 g 左右,酒精消毒裸鼠背部皮肤,开始接种 HuH-7 细胞,制备好的细胞悬液 200 μ L 用 1 mL 注射器接种于裸鼠右侧背部皮下,制成人肝癌裸鼠移植瘤模型。荷瘤模型成功后(注射点无破溃红肿,皮下结节直径大于 0.5 cm 为成瘤标准),将裸鼠随机分成 3 组(生理盐水组,苦杏仁苷组和 5-FU 组),每 20 只裸鼠为一组。正常条件及环境中饲养,观察待肿瘤的体积为 30-50 mm³ 时开始给裸鼠喂药,苦杏仁苷组的裸鼠每次给药 0.2 mL,剂量为 300 mg/kg,连续 14 天给药;5-FU 组每次给药 0.2 mL,剂量为 30 mg/kg,连续 14 天给药;生理盐水组每天每次注射 0.2 mL NaCl,共注射 14 天;均采用腹腔注射,一次/d。测量实体瘤的大小,体积 = $0.5 \times \text{长径} \times (\text{短径})^2$ 。

1.5 统计学处理

使用 SPSS23.0 软件进行数据录入和分析,数据以 Mean $\pm$ SD 表示,采用 t 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦杏仁苷体外抑制肝癌 HuH-7 细胞生长

不同浓度的苦杏仁苷作用 HuH-7 细胞 48 h 镜下(显微镜)观察,结果表明苦杏仁苷对肝癌 HuH-7 细胞株具有明显的细胞毒性作用。由图 1 可见没有添加苦杏仁苷组细胞生长状态良好,添加苦杏仁苷之后细胞生长抑制作用随着苦杏仁苷药物浓度增加,细胞开始变圆变小萎缩并脱壁,存活率逐渐降低。(图 1)。

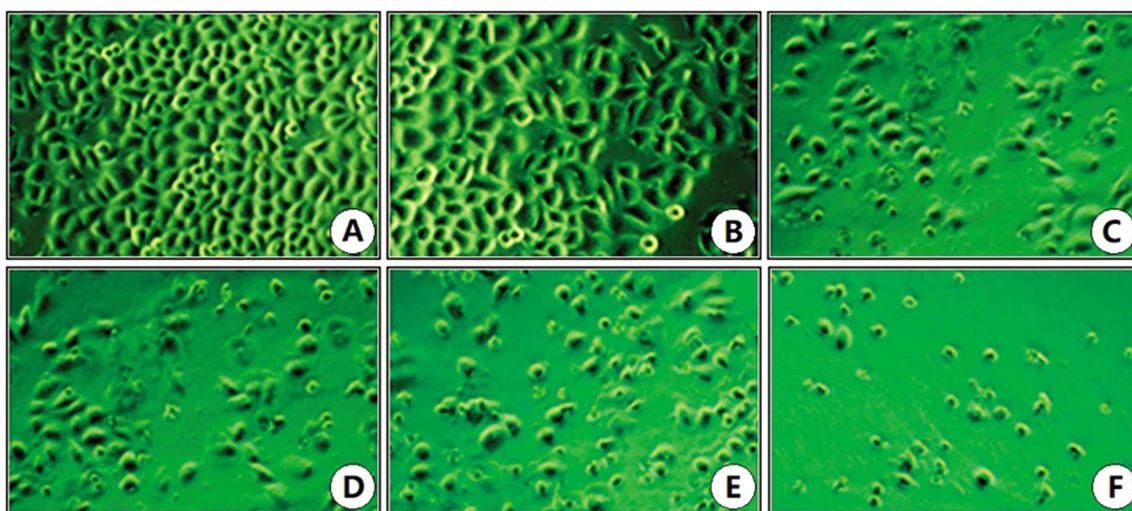


图1 光镜下观察不同浓度苦杏仁苷对肝癌 HuH-7 细胞生长的影响($\times 200$)

Fig.1 The effect of amygdalin on the growth of Huh-7 cells was observed under light microscope($\times 200$)

Note: the corresponding concentrations of amygdalin for A, B, C, D, E and F are 0 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL and 16 mg/mL respectively.

2.2 MTT 法检测苦杏仁苷对体外培养肿瘤的生长抑制作用

苦杏仁苷药物的添加导致 HuH-7 细胞存活率下降。对照组(0 mg/mL)细胞存活率为 $(96.03 \pm 2.50)\%$,苦杏仁苷浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL 和 16 mg/mL 时, HuH-7 细胞的存活率分别是 $(95.53 \pm 1.52)\%$ 、 $(93.17 \pm 4.22)\%$ 、 $(82.26 \pm 6.42)\%$ 、 $(63.56 \pm 7.13)\%$ 、 $(42.01 \pm 5.01)\%$,苦杏仁苷浓度为 4 mg/mL、8 mg/mL 和 16 mg/mL 的细胞存活率低于对照组, 差异有统计学意义($t/P=5.799/0.000, 9.763/0.000, 15.212/0.000$)。随着苦杏仁苷药物浓度的增加,细胞存活率降低。见图 2。

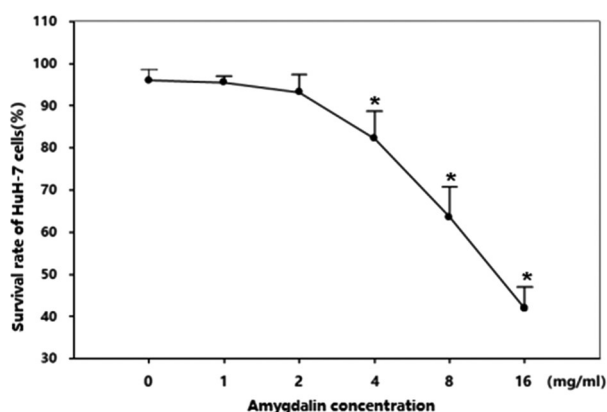


图2 苦杏仁苷对体外培养肿瘤存活率的影响

Fig.2 Effect of amygdalin on tumor survival rate in vitro

Note: Compared with the control group, $*P<0.05$.

2.3 DAPI 染色不同浓度苦杏仁苷对肝癌 HuH-7 细胞凋亡的影响

DAPI 染色结果与显微镜观察结果一致,对照组(0 mg/mL)的细胞核形状为椭圆形,染色较浅;而随着苦杏仁苷浓度的增加染色程度逐渐增加,浓度为 16 mg/mL 苦杏仁苷组呈现凋亡的核形态变化。细胞体积缩小,细胞间连接消失,细胞与周围的细胞开始脱离,细胞核也发生凋亡变化核体积减小,细胞核染

色加深,且出现核固缩和碎裂的现象。见图 3。

2.4 Annexin V -FITC/PI 双染检测 HuH-7 细胞的凋亡情况

根据流式细胞仪检测结果可知,对照组(0 mg/mL)的总凋亡率为 $(13.31 \pm 1.56)\%$ 。苦杏仁苷的浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL、16 mg/mL 时细胞的总凋亡率为 $(15.21 \pm 1.64)\%$ 、 $(21.44 \pm 1.68)\%$ 、 $(25.94 \pm 2.39)\%$ 、 $(33.67 \pm 2.60)\%$ 、 $(37.67 \pm 2.98)\%$ 。苦杏仁苷浓度为 4 mg/mL、8 mg/mL 和 16 mg/mL 的细胞总凋亡率高于对照组,差异有统计学意义($t/P=6.322/0.000, 9.163/0.000, 14.033/0.000$)。

2.5 Western blot 检测苦杏仁苷对凋亡蛋白表达的影响

随着苦杏仁苷药物浓度的增加, HuH-7 细胞中 Bax 蛋白的表达增加, Bcl-2 的表达降低, 见图 5。在苦杏仁苷作用于 HuH-7 细胞 24 h 后, 对照组(0 mg/mL)的细胞中 Bax/Bcl-2 的值为 (0.52 ± 0.07) , 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL 和 16 mg/mL 的苦杏仁苷组 Bax/Bcl-2 的比值依次升高, 分别为: (0.21 ± 0.05) 、 (0.29 ± 0.03) 、 (0.73 ± 0.10) 、 (1.45 ± 0.03) 和 (1.73 ± 0.01) 。苦杏仁苷浓度为 4 mg/mL、8 mg/mL 和 16 mg/mL 的 HuH-7 细胞中表达 Bax/Bcl-2 的值高于对照组,差异有统计学意义($t/P=5.103/0.000, 7.331/0.000, 9.137/0.000$)。

2.6 苦杏仁苷对荷瘤鼠肿瘤体积的影响

肿瘤接种成功后,对各组每只裸鼠进行观察。三组的裸鼠没有出现腹泻症状,生长状况良好,而且没有裸鼠死亡,每组裸鼠活动力减少,且饮食量略有下降。每 2 天对肿瘤的体积进行一次测量,生理盐水组随着天数的增加,肿瘤体积逐渐增加,而与生理盐水组相比,苦杏仁苷组与 5-FU 组肿瘤的体积增长速度均降低,从第 6 天开始,苦杏仁苷组和 5-FU 组肿瘤体积小于生理盐水组($P<0.05$)。见图 6。

3 讨论

苦杏仁苷属于传统中药苦杏仁中的有效成分之一,其具有抗动脉粥样硬化、抗肾间质和肺纤维化,抗高氧诱导肺损伤、抗肿瘤、抗炎以及抗溃疡等药理作用,对免疫系统具有调节的作

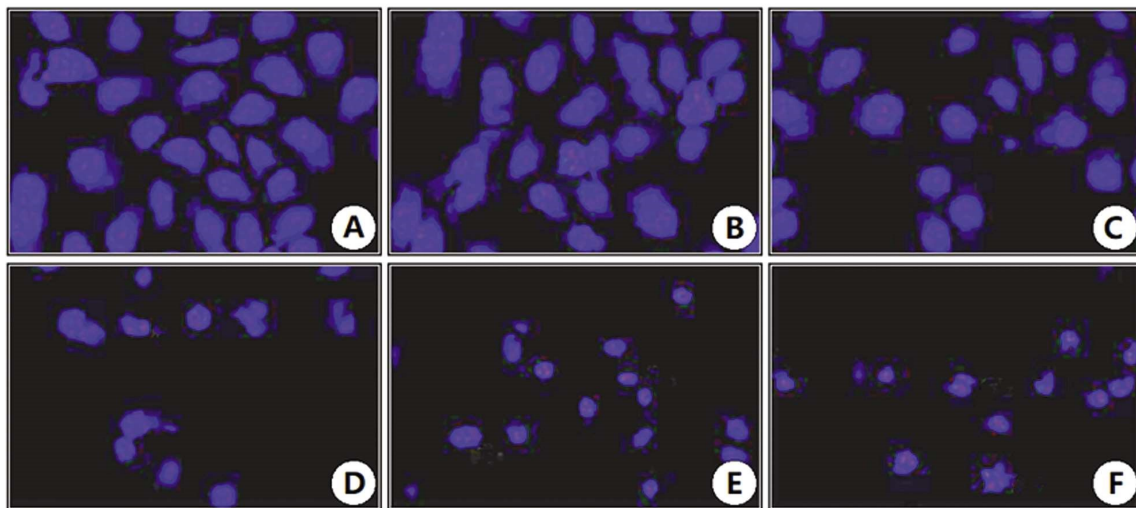


图3 DAPI 染色不同浓度苦杏仁苷对肝癌 HuH-7 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of amygdalin at different concentrations on apoptosis of Huh-7 cells by DAPI staining

Note: The corresponding concentrations of amygdalin for A, B, C, D, E and F are 0 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL and 16 mg/mL respectively

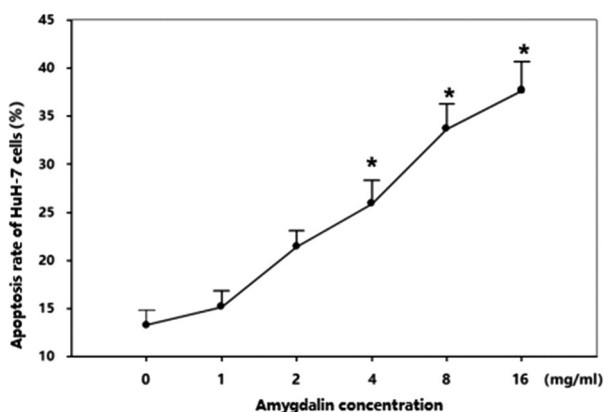


图4 Annexin V-FITC/PI 双染检测 HuH-7 细胞的凋亡情况

Fig. 4 Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect the apoptosis of Huh-7 cells

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.

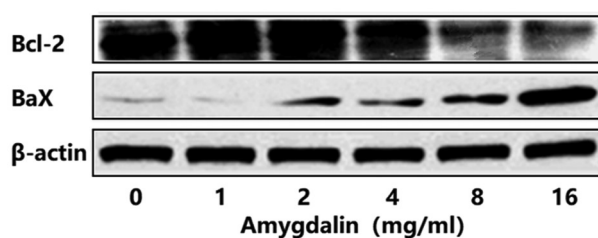


图5 Western blot 检测苦杏仁苷对凋亡蛋白表达的影响

Fig. 5 The effect of amygdalin on the expression of apoptotic protein was detected by Western blot

用^[11-13]。苦杏仁苷作为辅助抗癌药已有二百多年的历史,目前苦杏仁苷抗肿瘤作用被学术界广泛认可,其发挥抗肿瘤作用的机制是苦杏仁苷代谢产物氢氰酸(Hydrocyanic acid,HCN)细胞毒性作用能杀死癌细胞^[14]。苦杏仁苷在肾癌^[15,16]、卵巢癌^[17]、乳腺癌^[18]、宫颈癌^[19]、肺癌^[20]等癌症中已被证明具有杀死肿瘤细胞的作用。苦杏仁苷可通过抑制肿瘤细胞周期,细胞侵袭,迁移等抑制细胞生长发挥其抗肿瘤作用^[21,22],但其在肝癌的研究中甚少,本文通过体内体外实验证明其具有诱导肝癌 HuH-7 细胞凋亡的作用。

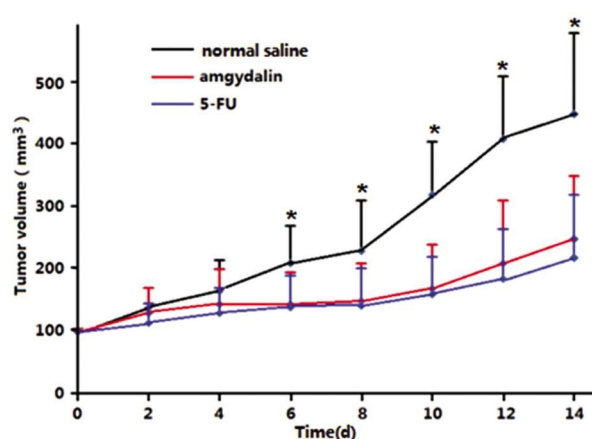


图6 苦杏仁苷对裸鼠肿瘤体积的影响

Fig. 6 Effect of amygdalin on tumor volume in nude mice

Note: Compared with amygdalin group, * $P < 0.05$.

本研究通过体内体外实验证明苦杏仁苷能够诱导人肝癌 HuH-7 细胞凋亡并抑制裸鼠 HuH-7 细胞移植瘤生长。体外细胞实验中显微镜下观察随着苦杏仁苷剂量的增加,细胞死亡增加,细胞固缩变圆脱落,漂浮细胞增加。当苦杏仁苷的剂量达到 4 mg/mL 时细胞存活率明显降低,通过 MTT 法表明苦杏仁苷对人肝癌细胞 HuH-7 具有毒性作用,随着剂量的增加毒性作用增加。通过显微镜和 MTT 实验我们推测苦杏仁苷降低 HUH-7 细胞存活率的原因是通过诱导其凋亡来实现的。进一步进行 DAPI 和 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡。通过 DAPI 实验染色结果可知浓度为 4 mg/mL 苦杏仁苷组细胞核形态出现明显的凋亡,表现为细胞核体积缩小,染色加深,伴核固缩和核碎裂现象。DAPI 染色初步表明苦杏仁苷诱导了 HuH-7 发生凋亡。Annexin V-FITC/PI 双染检测 HuH-7 细胞的凋亡情况,流式细胞仪检测结果表明苦杏仁苷作用细胞 24 h 后,16 mg/mL 剂量时细胞的总凋亡率为 $(37.67 \pm 2.98)\%$,较对照组凋亡率已经有明显的增加。

本研究结果还显示苦杏仁苷浓度为 4 mg/mL 时,凋亡相关蛋白 Bax 表达增加,Bcl-2 表达降低,说明苦杏仁苷促进细胞凋

亡的机制可能与调控凋亡相关蛋白有关。既往研究表明苦杏仁苷对人 DU145 和 LNCaP 前列腺癌细胞具有毒性作用,可通过降低 Bcl-2 mRNA 水平,上调 Bax 表达,提高 Caspase-3 酶活性,发挥杀伤前列腺癌细胞作用^[23,24]。Bcl-2 蛋白家族在调节细胞凋亡的过程中发挥着重要的作用^[25],因此我们推测苦杏仁苷可能通过 Bcl-2 蛋白家族来诱导细胞凋亡的发生。Bcl-2 蛋白家族作为调节内源性凋亡信号通路的重要因子之一^[26],因此从实验结果推测,苦杏仁苷是通过内源线粒体通路诱导人肝癌细胞 HuH-7 凋亡,分析机制为苦杏仁苷在 β -葡萄糖苷酶催化下能产生毒性物质氢氰酸,由于肿瘤细胞中缺乏氢氰酸酶,氢氰酸可直接通过抑制线粒体呼吸中末端酶,抑制三磷酸腺苷合成,诱导肝癌细胞 HuH-7 凋亡^[27]。

肿瘤体内实验研究的理想操作工具为肿瘤裸鼠移植模型,本实验通过建立肝肿瘤裸鼠模型,给药苦杏仁苷后,裸鼠活动力减少,且饮食量下降。给药 14 天后,杀鼠取肿瘤组织,测量肿瘤组织体积,与对照组相比,苦杏仁苷组肿瘤体积明显更小,但与 5-FU 组相比没有差异,说明苦杏仁苷与 5-FU 具有相当的抗肿瘤生长作用。既往研究显示苦杏仁苷可通过调控细胞周期蛋白表达抑制肿瘤细胞增殖,促使肿瘤细胞凋亡^[28]。体外研究发现给予苦杏仁苷干预后前列腺癌细胞细胞周期蛋白 A、B、D3 以及 CDK1、CDK2 和 CDK 4 表达下调,G0/G1 期细胞数目增加,G2/M 期、S 期细胞数目减少^[29]。应用 5 mg/mL 苦杏仁苷作用于结肠癌细胞,发现 EXO1、ABCF2、MRE11A、TOP1、FRAP1 等细胞周期蛋白相关基因表达下调,细胞增殖受到明显抑制^[30],提示苦杏仁苷可能通过调控细胞周期蛋白表达调控癌细胞增殖和凋亡,进而发挥抑制肿瘤生长的作用。

综上所述,能够诱导人肝癌 HuH-7 细胞和裸鼠 HuH-7 细胞移植瘤细胞发生凋亡,减缓肿瘤生长,从而发挥抗肿瘤作用,其机制可能与诱导细胞凋亡有关。

参考文献(References)

- [1] 杨浩,杨连粤. 肝癌术后复发转移相关因素研究进展[J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(10): 868-870, 876
- [2] 范艳芬, 郝义星, 胡梦洁. CT 预测原发性肝细胞癌微血管侵犯研究进展[J]. 临床放射学杂志, 2020, 39(6): 1225-1228
- [3] Orcutt ST, Anaya DA. Liver Resection and Surgical Strategies for Management of Primary Liver Cancer[J]. Cancer Control, 2018, 25(1): 1073274817744621
- [4] Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Semin Diagn Pathol, 2017, 34(2): 153-159
- [5] 张龙虎, 郭平学, 李超, 等. 手术切除联合预防性介入对降低肝癌复发率、提高个体生存率的可行性分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(15): 2872-2876, 2924
- [6] Saleem M, Asif J, Asif M, et al. Amygdalin from Apricot Kernels Induces Apoptosis and Causes Cell Cycle Arrest in Cancer Cells: An Updated Review [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2018, 18(12): 1650-1655
- [7] Tanaka R, Nitta A, Nagatsu A, et al. Application of a quantitative ¹H-NMR method for the determination of amygdalin in Persicae semen, Armeniacae semen, and Mume fructus [J]. J Nat Med, 2014, 68(1): 225-230
- [8] Zdrojewicz Z, Otlewska A, Hackemer P, et al. Amygdalin - structure and clinical significance [J]. Pol Merkur Lekarski, 2015, 38(227): 300-303
- [9] Třísková A, Rudá-Kučerová J. Can Amygdalin Provide any Benefit in Integrative Anticancer Treatment? [J]. Klin Onkol, 2019, 32(5): 360-366
- [10] Shi J, Chen Q, Xu M, et al. Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: A review [J]. Cancer Med, 2019, 8(6): 3004-3011
- [11] 吕建珍, 邓家刚. 苦杏仁苷的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 530-535
- [12] Paoletti I, De Gregorio V, Baroni A, et al. Amygdalin analogues inhibit IFN- γ signalling and reduce the inflammatory response in human epidermal keratinocytes [J]. Inflammation, 2013, 36(6): 1316-1326
- [13] Lv J, Xiong W, Lei T, et al. Amygdalin ameliorates the progression of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 8171-8179
- [14] Li YL, Li QX, Liu RJ, et al. Chinese Medicine Amygdalin and beta-Glucosidase Combined with Antibody Enzymatic Prodrug System As A Feasible Antitumor Therapy[J]. Chin J Integr Med, 2018, 24(3): 237-240
- [15] Juengel E, Thomas A, Rutz J, et al. Amygdalin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells in vitro [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(2): 526-532
- [16] Juengel E, Afschar M, Makarević J, et al. Amygdalin blocks the in vitro adhesion and invasion of renal cell carcinoma cells by an integrin-dependent mechanism[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(3): 843-850
- [17] Halenar M, Medvedova M, Maruniakova N, et al. Assessment of a potential preventive ability of amygdalin in mycotoxin-induced ovarian toxicity[J]. J Environ Sci Health B, 2015, 50(6): 411-416
- [18] Min LH, Aree M. Amygdalin Regulates Apoptosis and Adhesion in Hs578T Triple-Negative Breast Cancer Cells[J]. Biomol Ther(Seoul), 2016, 24(1): 62-66
- [19] Chen Y, Ma J, Wang F, et al. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells [J]. Immunopharmacol immunotoxicol, 2013, 35(1): 43-51
- [20] Qian L, Xie B, Wang Y, et al. Amygdalin-mediated inhibition of non-small cell lung cancer cell invasion in vitro [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 5363-5370
- [21] 史佳民, 范理宏. 苦杏仁苷抗肿瘤机制的研究进展[J]. 生命的化学, 2019, 39(1): 147-152
- [22] Makarević J, Rutz J, Juengel E, et al. Amygdalin influences bladder cancer cell adhesion and invasion in vitro[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110244
- [23] Mani J, Neuschäfer J, Resch C, et al. Amygdalin Modulates Prostate Cancer Cell Adhesion and Migration In Vitro [J]. Nutr Cancer, 2020, 72(3): 528-537
- [24] Chang HK, Shin MS, Yang HY, et al. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(8): 1597-602
- [25] Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 99-109

- e0172719
- [10] Chris Gard, Gloria Gonzalez Curto, Youcef El-Mokhtar Frarma, et al. Pax3- And Pax7-mediated Dbx1 Regulation Orchestrates the Patterning of Intermediate Spinal Interneurons [J]. *Dev Biol*, 2017, 432(1): 24-33
- [11] Masashi Naito, Masaki Mori, Masayo Inagawa, et al. Dnmt3a Regulates Proliferation of Muscle Satellite Cells via p57Kip2 [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(7): e1006167
- [12] Tetsuo Ohnishi, Ikuo Miura, Hisako Ohba, et al. A Spontaneous and Novel Pax3 Mutant Mouse That Models Waardenburg Syndrome and Neural Tube Defects[J]. *Gene*, 2017, 607: 16-22
- [13] Mark D Zarella, Douglas Bowman, Famke Aeffner, et al. A Practical Guide to Whole Slide Imaging: A White Paper From the Digital Pathology Association [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2019, 143 (2): 222-234
- [14] Jason A Hanna, Matthew R Garcia, Alicia Lardennois, et al. PAX3-FOXO1 Drives miR-486-5p and Represses miR-221 Contributing to Pathogenesis of Alveolar Rhabdomyosarcoma [J]. *Oncogene*, 2018, 37(15): 1991-2007
- [15] 孙林琳,杨松林,王晔,等.miR-139 在 Aβ25-35 诱导 Neuro-2a 细胞损伤中的机制研究[J].*中风与神经疾病杂志*, 2019, 36(1): 53-57
- [16] 谢祥军,吴菲菲,王圣明,等.京尼平通过线粒体动力学缓解氧化应激诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡 [J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(3): 320-326
- [17] Hiromi Aoi, Ming Lei, Takeshi Mizuguchi, et al. Nonsense Variants in STAG2 Result in Distinct Sex-Dependent Phenotypes [J]. *J Hum Genet*, 2019, 64(5): 487-492
- [18] 徐娟,吴诚龙,唐爱发.基质抗原 2 在肿瘤中的研究进展[J].*中国现代医学杂志*, 2018, 28(9): 60-64
- [19] Alana Lelo, Frederik Prip, Brent T Harris, et al. STAG2 Is a Biomarker for Prediction of Recurrence and Progression in Papillary Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24 (17): 4145-4153
- [20] Gourish Mondal, Meredith Stevers, Benjamin Goode, et al. A Requirement for STAG2 in Replication Fork Progression Creates a Targetable Synthetic Lethality in Cohesin-Mutant Cancers [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1686
- [21] Balázs Györfi, Lőrinc Pongor, Giulia Bottai, et al. An Integrative Bioinformatics Approach Reveals Coding and Non-Coding Gene Variants Associated With Gene Expression Profiles and Outcome in Breast Cancer Molecular Subtypes [J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(8): 1107-1114
- [22] 冀宏,底旺,李清怀.微小 RNA-1243 直接靶向丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 1 和丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 2 调节甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞迁移[J].*中华实验外科杂志*, 2018, 35(11): 2048-2050
- [23] Claire Marceaux, Dominique Petit, Jacques Bertoglio, et al. Phosphorylation of ARHGAP19 by CDK1 and ROCK Regulates Its Subcellular Localization and Function During Mitosis[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131 (5): jcs208397
- [24] 张立杰,李晓玉,蒲仕明,等.造血干细胞静息的分子调节研究进展 [J].*山东医药*, 2018, 58(34): 104-106
- [25] Jing Ma, Ken Lin, Hong-Chao Jiang, et al. A Novel Mutation of the PAX3 Gene in a Chinese Family With Waardenburg Syndrome Type I[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(7): e00798
- [26] Nurit Yanay, Moran Elbaz 3, Jenya Konikov-Rozenman, et al. Pax7, Pax3 and Mamstr Genes Are Involved in Skeletal Muscle Impaired Regeneration of dy2J/dy2J Mouse Model of Lama2-CMD [J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(20): 3369-3390
- [27] Fang Biao Zhan, Xian Wei Zhang, Shi Long Feng, et al. MicroRNA-206 Reduces Osteosarcoma Cell Malignancy In Vitro by Targeting the PAX3-MET Axis[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(2): 163-173
- [28] 张伟,何薇,赵丁丁,等. D609 对 Neuro-2a 脑神经瘤细胞增殖和细胞周期的影响[J].*现代生物医学进展*, 2016, 16(8): 1447-1449, 1419
- [29] Sylwia Kedziora, Vamsi K Gali, Rosemary HC Wilson, et al. Rif1 acts through Protein Phosphatase 1 but independent of replication timing to suppress telomere extension in budding yeast [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(8): 3993-4003
- [30] P Li, X Ma, I R Adams, et al. A Tight Control of Rif1 by Oct4 and Smad3 Is Critical for Mouse Embryonic Stem Cell Stability [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(1): e1588

(上接第 3231 页)

- [26] 陈松, 储智勇, 汪家春. Bcl-2 家族与肝再生 [J]. *肝脏*, 2013, 18(3): 197-199
- [27] Zhou C, Qian L, Ma H, et al. Enhancement of amygdalin activated with β-D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 516-523
- [28] 柳松, 王晓倩, 廖广辉, 等. 苦杏仁苷抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(7): 99-101
- [29] Makarević J, Tsaur I, Juengel E, et al. Amygdalin delays cell cycle progression and blocks growth of prostate cancer cells in vitro[J]. *Life Sci*, 2016, 147: 137-142
- [30] Cassim W, de Kock M. The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells in vitro [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 32