

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.26.003

一种天然植物抗菌液对 HEPG-2 细胞的杀伤及作用机制研究*

邱瑾怡¹ 黄家明¹ 周毅洁¹ 豆荣昆¹ 毕振飞¹ 杨亚蓝¹ 董银松² 向飞丹州² 茆灿泉^{1Δ}

(1 西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610031; 2 云南民族医药研究所有限公司 云南 昆明 650228)

摘要 目的:采用多种方法探究天然植物抗菌液(PAMs)对人肝癌细胞 HEPG-2 的杀伤及初步分子作用机理。**方法:**运用形态学观察、MTT 法测定 PAMs 对 HEPG-2 的抑制作用, AO/EB 细胞双染、Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 PAMs 作用于 HEPG-2 细胞后细胞的凋亡情况, 再通过 qRT-PCR 与 western blot 检测 HEPG-2 中相关基因在 mRNA 水平和蛋白水平的表达量变化。最后利用划痕实验和 transwell 小室检测 PAMs 对 HEPG-2 细胞迁移能力的抑制。**结果:**PAMs 可以抑制和杀伤 HEPG-2 细胞, 作用效果呈浓度和时间依赖性, 且与细胞的凋亡途径密切相关。PAMs 可下调 HEPG-2 细胞中 *foxm1*、*survivin*、*bcl-2* 的 mRNA 表达水平, 同时在蛋白水平下调 *foxm1* 的表达量, 上调 p53 的表达量。除此之外, PAMs 还能够有效地抑制 HEPG-2 细胞的体外迁移。**结论:**PAMs 杀伤 HEPG-2 细胞的途径之一是通过下调 *foxm1*、上调 p53 基因的表达量, 从而抑制或减少其下游靶基因 *survivin* 和 *bcl-2* 的转录表达, 促进细胞凋亡。本研究为基于 PAMs 抗癌创新民族医药的研发提供了重要的前期工作基础。

关键词:天然植物抗菌液(PAMs); 民族医药; HEPG-2 细胞; 凋亡途径

中国分类号:R-33; R735.7; R29.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)26-5011-06

The Killing Effects and Preliminary Mechanism of Natural Plant-derived Antimicrobial Solution(PAMs) to Human Liver Cancer HEPG-2 Cells*

QIU Jin-yi¹, HUANG Jia-ming¹, ZHOU Yi-jie¹, DOU Rong-kun¹,BI Zhen-fei¹, YANG Ya-lan¹, DONG Yin-song², XIANGFEI Dan-zhou², MAO Can-quan^{1Δ}

(1 Laboratory of Molecular Evolution and Applied Biology, School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031; China; 2 Institute of Yunnan folk medicine Co. Ltd, Kunming, Yunnan, 650228, China)

ABSTRACT Objective: In this study, a series of experiments were conducted to research the mechanism of anticancer and preliminary molecular effects of PAMs on the HEPG-2 cancer cells. **Methods:** Morphological observation and MTT assay were used to explore the inhibition and killing effect of PAMs acting on HEPG-2. AO/EB staining and Annexin V-FITC/PI staining were employed to observe the apoptosis of HEPG-2 treated with PAMs. The expression level of *Foxm1*, *bcl-2* and others genes in HEPG-2 cells were detected by using qRT-PCR and western blot. Wound healing and transwell experiments determined if PAMs can inhibit the migration of HEPG-2. **Results:** PAMs can inhibit and kill HEPG-2 cells in time and dose-dependent manners, and the cytotoxic effects were closely related to the cell apoptosis. The mRNA expression of *foxm1*, *bcl-2* and *surviving* gene were remarkably decreased in HEPG-2 cells after the treatment of PAMs. PAMs decreased the FoXM1 protein expression in HEPG-2 cells, while up-regulating the p53 protein expression, and it could also inhibit the migration of cancer cells. **Conclusions:** The possible molecular mechanism for the killing of HEPG-2 cancer cells by PAMs was proposed. By down-regulating the expression of *foxm1* and up-regulating the expression of p53, the transcriptional expression of their downstream target genes *survivin* and *bcl-2* was inhibited or reduced, hence enhancing the cancer cell apoptosis. This study provides an important foundation for the development of anti-cancer Chinese folk medicine based on PAMs.

Key words: Natural plant-derived antimicrobial solution(PAMs); Folk medicine; HEPG-2 cancer cells; Apoptosis pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7; R29.08 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2017)26-5011-06

前言

WHO 最新出版的《世界癌症报告》显示,全球癌症发病率和死亡率均呈现上升趋势。截止 2012 年,每年约有 1300 万新增癌症患者,其中中国尤为严重,每年新增癌症病例数占全球

的 1/5,约 50% 的肝癌新增病人在中国^[1]。

肝癌是一种常见的恶性肿瘤,具有增殖侵袭快、恶性程度高、早期不易发现、就诊时多已处在晚期的特点^[2],是全球致死率位居前 3 位的癌症。肝癌治疗的常用方法有:手术切除、化疗、生物治疗和中药治疗等,但手术切除、化疗、放疗等方法,都

* 基金项目:科技部 "自然保护区生物标本标准化整理、整合和共享子项目" 资助(2005DKA21404);

云南普洱丹州制药股份有限公司资助项目(VR01HX11131300411130)

作者简介:邱瑾怡(1991-),女,硕士研究生,主要研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: Qiujiy6086@foxmail.com

Δ 通讯作者:茆灿泉(1965-),男,教授,主要研究方向:生物学, E-mail: maocq@home.swjtu.edu.cn, 电话:028-87634296

(收稿日期:2016-03-25 接受日期:2016-04-16)

存在不同程度的副作用或不足。为此,具有简单、高效、低副作用、低费用等特点的中医药和民族医药治疗技术正成为研究的热点。

天然植物抗菌液(Natural plant-derived antimicrobial solution, PAMs)是由云南民族医药研究所股份有限公司研发的一种基于红花、紫草、刺天茄、芸香草等多种天然药用植物功效成分的民族医药复方产品,其升级产品“紫芸解毒止痛酊”已获云南省食品药品监督管理局医院制剂批准文号(滇药制字Z20150009)。民间体验和前期研究证实,PAMs具有抗菌消炎、伤口愈合、溃疡修复等多种功效,体外研究还发现,PAMs对白血病、肝癌、乳腺癌、宫颈癌等所有检测的恶性肿瘤细胞株均有强的杀伤作用^[3,4],揭示 PAMs 在抗肿瘤领域的潜在应用前景。

鉴于 PAMs 抗肝癌作用有待进一步确认,同时,其抗癌分子作用机制尚待深入了解,本研究即以人源肝癌细胞 HEPG-2 为对象,通过 MTT、细胞双染、荧光定量 PCR、Western blot 等多种实验方法,确认了 PAMs 对 HEPG-2 细胞的抑制和杀伤作

用,初步探讨了其抗肝癌的分子作用机理,为 PAMs 作为一种多功效的抗肿瘤新药研发提供了重要的前期工作基础和依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

人源肝癌 HEPG-2 细胞株(本实验室保存);PAMs(天然植物抗菌液,云南普洱丹州制药股份有限公司,(云)卫消证字[2011]第 0004 号,执行标准 Q/YPDZ-01-2013,产品批号:20140901,授权专利号 20110393033.3);AO-EB 双染、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);RNA 提取试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司)、逆转录试剂盒(赛默飞世尔科技公司)、荧光定量 PCR 试剂盒(罗氏诊断产品上海有限公司);抗 FoxM1、p53 鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、羊抗鼠 IgG-Biotin 二抗(武汉博士德公司);ECL 化学发光试剂盒(赛默飞世尔科技公司)。

表 1 qRT-PCR 检测基因及内参β-actin 引物信息

Table 1 Sequences and correlative information of primers used for qRT-PCR

Targeted Gene	Primer Sequence(5' to 3')	Tm/℃	Size/bp
<i>foxm1</i>	F:GGAGGAAATGCCACACTTAGCG	62	22
	R:TAGGACTTCTTGGGTCTTGGGGTG		24
<i>survivin</i>	F:TCAAGGACCACCGCATCTCTA	61	21
	R:TGAAGCAGAAGAACTACTGGGC		22
<i>bcl-2</i>	F:TGGGATGCCTTTGTGGAAC	58	20
	R:GAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC		23
<i>β-actin</i>	F:CGGGAAATCGTGCGTGAC	60	18

1.2 实验方法

1.2.1 PAMs 的制备 称量 25.0 g 紫草、30.0 g 红花、15.0 g 芸香草与 15.0 g 刺天茄等天然药用植物,混合研磨,75 %乙醇暗处理浸提一周,收集滤液,将滤渣重复上次操作。混合两次滤液,1L 定容,4℃存储备用(乙醇含量 50 %)。PAMs 活性成分质量控制标准为总生物碱含量。

1.2.2 细胞培养 人源肝癌细胞 HEPG-2 细胞株由本实验室传代保种,采用 DMEM 培养基(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、10 %FBS)培养于 37℃、5 %CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中。

1.2.3 细胞形态学观察 HEPG-2 细胞铺于 96 孔板(5×10³ 个/孔),过夜培养后加入不同浓度(1 %,2 %,3 %,4 %)的 PAMs。每组浓度设 6 个重复孔,另设与 PAMs 中乙醇含量相对应的乙醇对照组与空白对照组。在 5 %CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中继续培养,观察细胞形态并拍照。

1.2.4 MTT 细胞活力检测 按 2.3 方法(请校对)对 HEPG-2 细胞进行 PAMs 48h 处理后,弃去培养基,预冷 PBS 洗涤,每孔加入 20 μL MTT 试剂与 100 μL 无酚红培养基,37℃作用 4 小时后除去上清液,每孔加入 150 μL DMSO,30 rpm 摇床处理 10 min,测定 A_{490nm}。计算细胞生长抑制率:抑制率=(1-A_{490,PAMs}/A_{490,}

control)×100%

1.2.5 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)细胞双染 HEPG-2 细胞按 2.5×10⁵ 个/孔浓度接种于已放入盖玻片的六孔板中,过夜培养后换入含 3 % PAMs 浓度的培养基,分别作用 24 h、48 h, PBS 洗涤后取出盖玻片,在每张盖玻片上滴入 25 μL 预先配置的 AO/EB 工作液(20 μL AO 储液+20 μL EB 储液+100 μL PBS,混匀后避光储存),将盖玻片置于载玻片上,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.6 Annex in V-FITC/PI 细胞凋亡检测 HEPG-2 细胞中分别加入 3 %、4 %浓度的 PAMs,经作用 24 h、48 h 后,分组收集实验和对照组细胞,PBS 洗涤后从中取 1×10⁵~5×10⁵ 个细胞,离心后去上清,加入 500 μL Annexin V-FITC Binding Buffer 重悬,再次加入 3 μL Annex in V-FITC、PI 混匀,室温避光孵育 10 min,BD accuri C6 流式细胞仪检测分析。

1.2.7 细胞划痕(Wound healing)测定 在六孔板背后按 1cm 间距划线(5 条/孔),按 5×10⁵ 个/孔的浓度将 HEPG-2 细胞接种于已划线的六孔板中,过夜培养后用枪头沿标记垂直划下,预冷 PBS 洗涤 3 次,设置对照组(无血清 DMEM 培养基)、实验组(3 %PAMs 无血清 DMEM 培养基),置于培养箱中继续培养,分别在 0、12、24 小时取样拍照。

1.2.8 Transwell 细胞迁移测定 设置空白对照组、3 %PAMs 组 (24 h、48 h), 作用后调整 HEPG-2 细胞浓度至 2.5×10^4 个/mL, 按 200 μ L/孔将细胞悬液加入到 transwell 小室的上室中, 同时在下室加入 500 μ L 含 10 %FBS 的 DMEM 培养液。培养箱中继续培养 12 h 后, PBS 洗涤 2 次, 加入 4 %多聚甲醛固定 15 min, 1 %结晶紫染色 15 min, 显微镜观察拍照。

1.2.9 qRT-PCR 按 2.5×10^5 个/孔浓度接种 HEPG-2 于六孔板中, 过夜培养后, 设置 3 %药物浓度组、空白对照组和阿霉素阳性对照组 (DOX, 0.15 μ g/mL), 处理 24 h、48 h 后, 参照 Omega RNA 提取试剂盒说明书分别提取样本总 RNA, 再根据 Invitrogen M-MLV 第一链合成试剂盒说明书进行总 cRNA 的合成。参照 FastStart DNA Green Master (Roche) 试剂盒说明书, 在 LightCycler 96 仪 (瑞士 Roche 公司) 上进行 qRT-PCR。实验检测基因及内参 β -actin 引物信息如表 1 所示。

1.2.10 Western blot 3 % PAMs 分别处理 HEPG-2 0、24、48 h 后, 分组收集培养皿中的细胞, PBS 洗涤后提取细胞总蛋白, BCA 法定量蛋白浓度。取 40 μ g 样品蛋白, SDS-PAGE 电泳后, PVDF 膜电转, 5 %脱脂奶封闭 1h, 经一抗 (*p53*、*FoxM1*) 4 $^{\circ}$ C、过夜孵育后, TBST 漂洗, 二抗室温孵育 2 h, 洗膜, ECL 显色

曝光。

1.3 统计学分析

SPSS13.0 软件对实验数据进行统计学分析处理, 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据之间比较采用单因素方差法处理分析, 单独两组数据比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 PAMs 对 HEPG-2 细胞的抑制杀伤作用

经 PAMs 处理的 HEPG-2 细胞与对照组相比, 细胞形态发生了明显的改变。4 个浓度梯度的 PAMs 对 HEPG-2 细胞的体外生长均有抑制作用, 空白对照组的细胞为饱满的圆或多边形, 48 h 小时后视野范围内基本铺满; 各处理浓度乙醇对照组细胞形态、总量也无明显差异, 而 PAMs 组细胞随着处理浓度的增加, 细胞稀疏, 总数下降, 形态发生变化, 边缘模糊, 镜下呈现大量的飘浮死细胞, 如图 1 所示。MTT 细胞活力测定确认, PAMs 对 HEPG-2 细胞的抑制作用呈浓度依赖关系, 4 %浓度达到 68 %的抑制率, 而对应浓度下的乙醇抑制率则较低, 可忽略不计, 见图 2 所示。为此, 在后续实验中, 不再设置乙醇对照组。

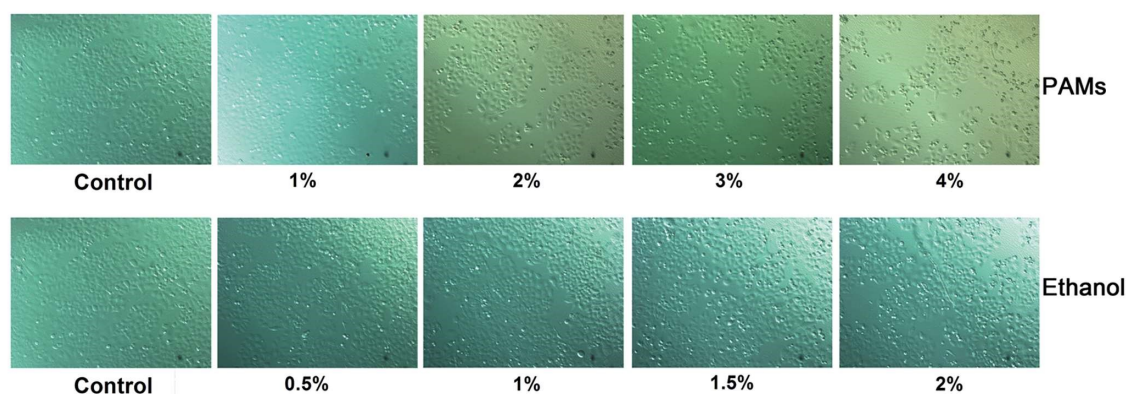


图 1 PAMs 和酒精处理 HEPG-2 细胞 48h 后形态变化 (100 $\times$)

Fig.1 Morphological changes of HEPG-2 treated with different concentrations of PAMs/ethanol at 48h (100 $\times$)

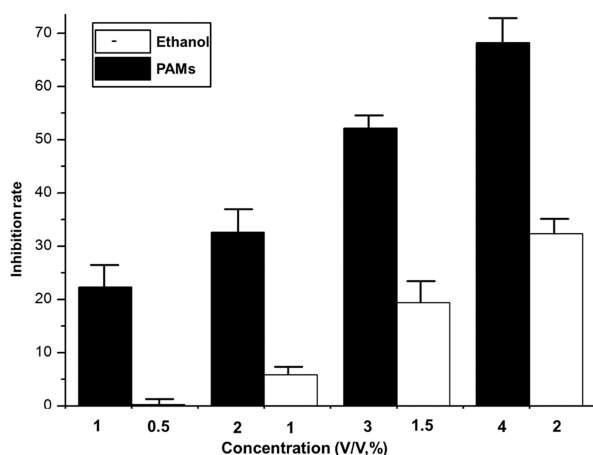


图 2 PAMs 和酒精对 HEPG-2 细胞的抑制率

Fig.2 The inhibition rate of PAMs/ethanol on HEPG-2 cancer cells

2.2 PAMs 处理对 HEPG-2 细胞的促凋亡作用

AO/EB 细胞双染发现, 在荧光显微镜下, 空白对照组细胞

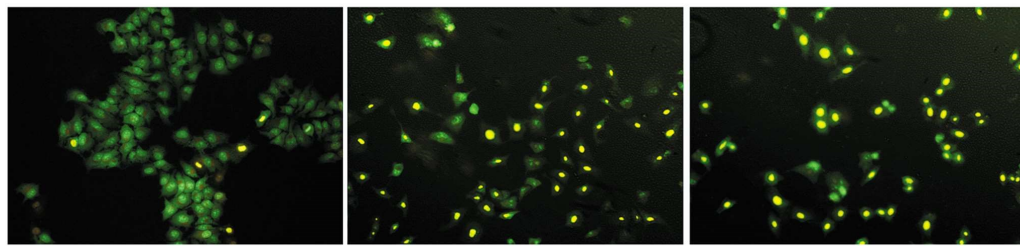
大小、形态均匀, 呈现均一绿色荧光; 而 PAMs 处理后的细胞, 形状呈现不规则的变化, 核染色质出现程度不一的固缩和橙色荧光, 呈现典型的细胞凋亡特征。随着 PAMs 处理浓度的增加, 具有凋亡特征的细胞比例呈上升趋势, 如图 3 所示。这也为进一步的 Annexin V/PI 染色和流式细胞仪检测分析所确认, 见图 4 所示。当 3 %、4 %的 PAMs 作用于细胞时, 凋亡细胞数随着时间的增长而增加, 且细胞凋亡率呈时间、剂量依赖性。

2.3 PAMs 抑制 HEPG-2 细胞的迁移能力

细胞划痕实验结果显示, 3 %浓度的 PAMs 分别作用于 HEPG-2 细胞 12 h、24 h 后, 与空白对照组相比较, 细胞划痕缩小的幅度减少, 划痕的愈合能力减弱, 并呈现极显著的差异。见图 5、6。进一步的 Transwell 迁移实验也验证了这种迁移抑制作用, 从图 7 可见, 3 %PAMs 处理后 24 h、48 h 的实验组与空白对照组相比, 迁移至下室的细胞数目显著降低。

2.4 PAMs 诱导 HEPG-2 细胞凋亡的基因与蛋白水平检测

为了探索 PAMs 对细胞凋亡的初步作用机制, 本研究在分子水平测定了细胞内肿瘤凋亡相关基因与蛋白的变化。



Control

3%PAMs

4%PAMs

图3 AO/EB 荧光染色观察经 PAMs 处理 48 h 后的 HEPG-2 细胞(200×)

Fig. 3 AO/EB fluorescence staining of HEPG-2 treated 48 h with 3% PAMs (200×)

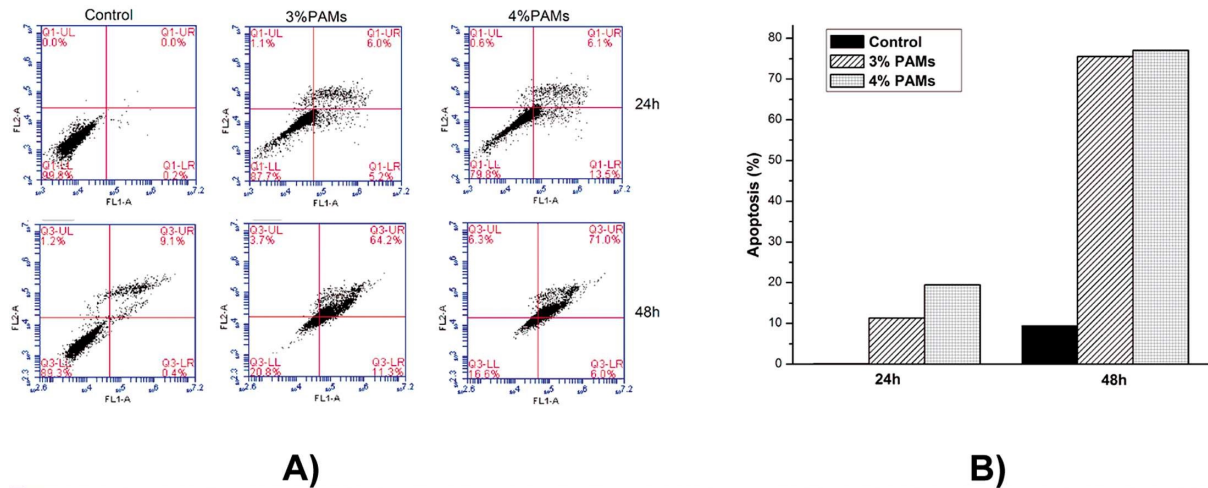


图4 PAMs 的浓度以及处理时间对 HEPG-2 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of different concentrations and times of PAMs on apoptosis of HEPG-2 cells

注: A:3 %,4 % PAMs 处理 HEPG-2 的细胞凋亡 B:不同浓度 PAMs 处理 24, 48 小时后的 HEPG-2 细胞凋亡率

Note: A: FCM assay of HEPG-2 cells treated with 3 % and 4 % PAMs respectively

B: Apoptosis rate of HEPG-2 cells after treated with different concentrations of PAMs at 24h and 48h respectively

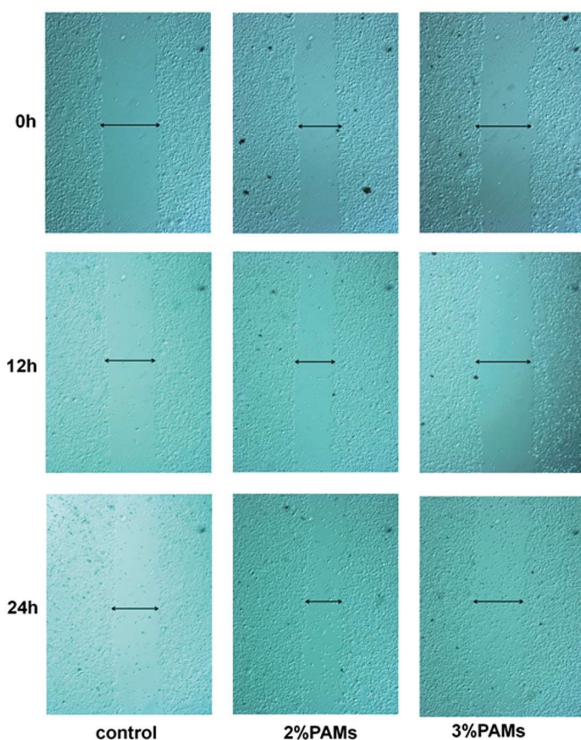


图5 PAMs 处理 HEPG-2 细胞划痕实验结果(100×)

Fig.5 Wound healing of HEPG-2 cell treated with PAMs(100×)

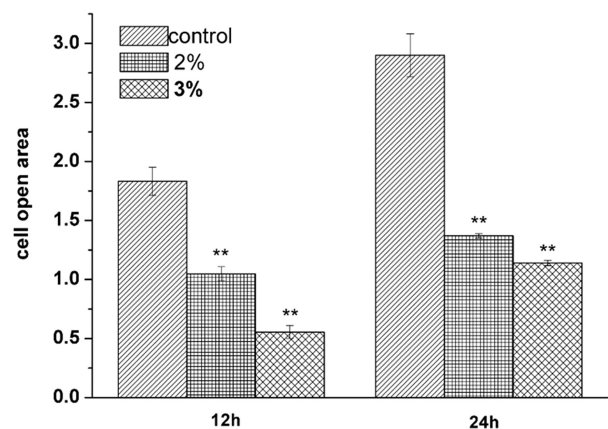


图6 PAMs 对 HEPG-2 细胞迁移的抑制作用

Fig.6 Migration inhibition of HEPG-2 cells after treated with PAMs

(**p<0.01 vs Control)

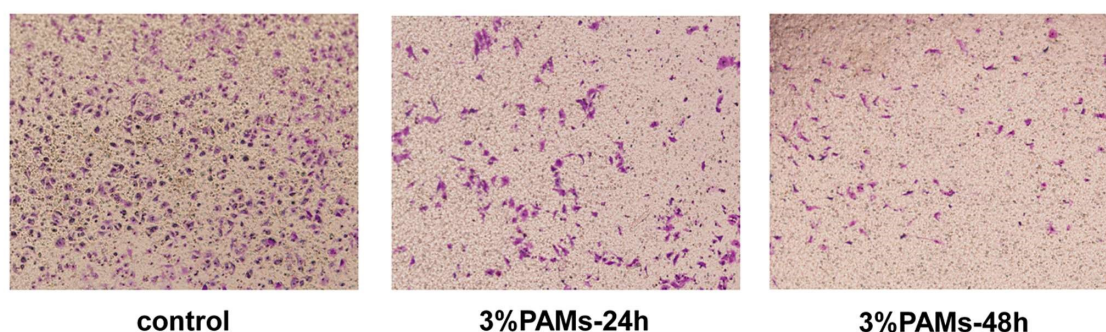


图 7 3%PAMs 处理 HEPG-2 细胞 transwell 实验结果(200×)
Fig.7 Transwell of HEPG-2 cells after treated with 3%PAMs(200×)

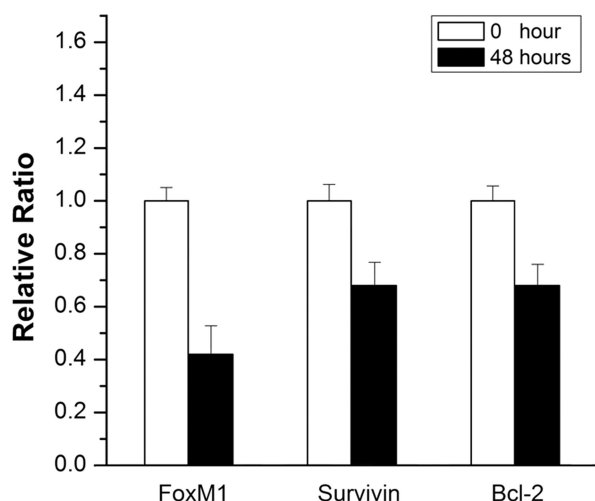


图 8 qRT-PCR 检测 PAMs 对 HEPG-2 细胞相关基因表达的影响
Fig.8 qRT-PCR assay of the effects of 3% PAMs treatment on the mRNA expression of *foxm1*, *survivin* and *bcl-2* gene in HEPG-2 cells

qRT-PCR 结果显示,3 %PAMs 作用于 HEPG-2 细胞 48 h 小时后,与空白对照组相比较,PAMs 组肿瘤相关基因 *foxm1*、抗细胞凋亡基因 *survivin* 和 *bcl-2* 的 mRNA 表达量大幅减少,且差异极显著($P<0.01$),见图 8。FoxM1 与抑癌基因 *p53* 的 Western blot 检测结果也与我们的预期一致,如图 9 所示,与空白对照组相比,3 %PAMs 处理的 HEPG-2 细胞,随着作用时间的增长,*p53* 蛋白的表达量急剧上升,而 FoxM1 的蛋白表达量则随着 PAMs 作用的时间增加而下调,与 mRNA 表达变化相一致。

3 讨论

在抗癌新药的研发过程中,已有多种天然药用植物的有效成分被证实具有抗肿瘤活性。PAMs 是由红花、紫草、刺天茄、芸香草等多种天然和民族药用植物经由乙醇提取精制而成。侯颖等^[5]证实紫草素能够有效抑制 HEPG-2 细胞的体外增殖,李福娟等^[9]发现经水提醇沉法制成的红花注射液,可以通过下调 *Survivin*、*Bcl-2* 的表达从而增加 HEPG-2 细胞的体外凋亡率。

本研究表明,PAMs 作为一种红花、紫草等天然药用植物复方制剂在体外对于 HEPG-2 细胞具有强的抑制杀伤作用,AO-EB 双染、流式细胞术检测揭示了这种抑制杀伤作用与 PAMs 诱导细胞凋亡有关。

细胞凋亡(apoptosis)是一种程序性的细胞死亡方式,它受

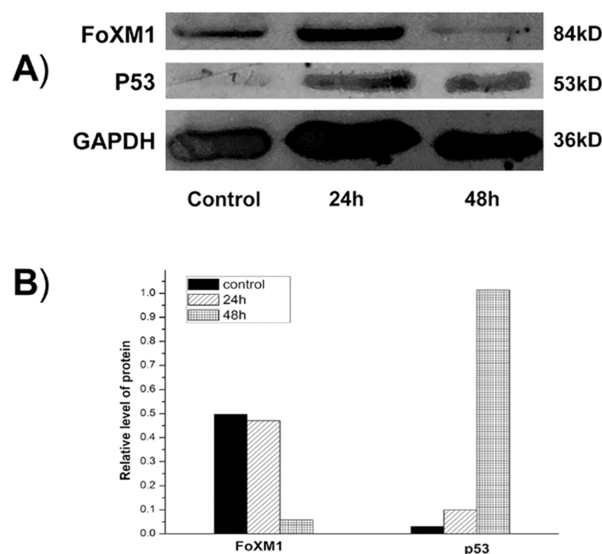


图 9 PAMs 处理对 HEPG-2 细胞 FoxM1, *p53* 蛋白表达的影响
Fig.9 Effects of PAMs on the FoxM1, *p53* protein expression in HEPG-2 cells

注:A: Western blots 检测 PAMs 对 HEPG-2 细胞内蛋白表达的影响
B: 相关蛋白的定量分析

Note: A: Western blots of protein expression in HEPG-2 treated with PAMs

B: Quantification of protein expression referenced to GAPDH protein

到自身多种信号通路的调控与影响。除典型的 *caspase* 家族外, *survivin*、*bcl-2*、*p53* 等均参与细胞凋亡过程。研究发现, *survivin* 能够抑制 *caspase-3*、*caspase-9*^[7,8],从而阻碍细胞凋亡发生^[9]。而 *bcl-2* 可以通过细胞抗氧化作用^[10]、抑制线粒体释放 Cyt c^[11,12]等多条途径抑制细胞凋亡。而 *foxm1* 蛋白在多种恶性肿瘤细胞中均检测出高表达,是肿瘤细胞增殖过程中必需的原癌基因^[13]。近年研究发现, *foxm1* 也参与细胞凋亡的途径。Foxm1 表达量的下调可通过影响其下游如 *survivin* 和 *bcl-2* 等基因的表达量变化^[14,15],从而诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡^[16,17]。*p53* 蛋白能够通过阻滞细胞周期^[18]、诱导细胞凋亡^[19]、抑制细胞增殖信号通路^[20]等多条途径实现抑癌作用。本研究 qRT-PCR 结果表明,当 PAMs 作用于 HEPG-2 肝癌细胞 48 h 后, *foxm1*、*survivin* 和 *bcl-2* 的 mRNA 水平大幅下调,进一步的 Western blot 实验结果也证明了 *foxm1* 在蛋白水平的表达下调。结合 PAMs 作用下 *p53* 抑癌蛋白的上调表达,可推测 PAMs 诱导 HEPG-2 细胞凋

亡的途径之一是通过下调 *foxm1*、上调 *p53* 基因的表达量,从而减少其下游的靶基因 *survivin* 和 *bcl-2* 的转录表达,从而促进细胞凋亡。

综上所述,本研究第一次确认了 PAMs 作为一种民族医药,对肝癌 HEPG-2 细胞的体外抑制和杀伤作用,而且初步揭示了其促细胞凋亡的分子作用机制,*FoxM1*、*p53*、*bcl-2* 家族、*Survivin* 等肿瘤相关基因和蛋白在其中扮演着重要的角色和作用。研究中还发现,PAMs 能够显著抑制 HEPG-2 细胞的迁移能力。需要指出的是,由于 PAMs 成分的复杂性,在研究过程中,除了细胞凋亡特征,我们还发现在 PAMs 处理后,肿瘤细胞也出现碎片等细胞直接死亡的特征。说明 PAMs 能够通过多种途径杀伤抑制 HEPG-2 细胞,为 PAMs 作为一种抗癌新药的进一步研发奠定了研究基础,同时也为进一步探讨 PAMs 杀伤癌症细胞的途径提供了参考。

参考文献(References)

- [1] Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014 [M]. WHO Press, 2014
- [2] Carlos A. Penno, Stuart A. Morgan, Adam J. Rose, Stephan Herzig, Gareth G. Lavery and Alex Odermatt. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is involved in bile acid homeostasis by modulating fatty acid transport protein-5 in the liver of mice [J]. Mol Metab, 2014, 3(5): 554-564
- [3] Bi Zhen-fei, Song Ming-zhu, Liu Zong-ying, et al. Antimicrobial effects and mechanisms of natural plant antimicrobial solution against *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Biology, 2015, 31(4): 50-54
- [4] Zhou Yi-jie, Dou Rong-kun, Bi Zhen-fei, et al. Promotion of apoptosis in leukemia K562 cells by natural plant-derived antimicrobial solutions (PAMs) [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2015, 46(6): 712-718
- [5] Qing-hua Yin, Feng-xiang Yan, Xu-Yu Zu, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2 [J]. Cytotechnology, 2012, 64(1): 43-51
- [6] Li F-J, Shi X-K, Li Y-T, et al. Effects of Safflower Injection on Gene Transcription and Protein Expression of Bcl-2 and Survivin in Human Hepatoma Cell Line HepG-2 [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 11: 218-222
- [7] Wu C, Geng X, Wan S, et al. Cecropin-P17, an analog of Cecropin B, inhibits human hepatocellular carcinoma cell HepG-2 proliferation via regulation of ROS, Caspase, Bax, and Bcl-2 [J]. J Pept Sci, 2015, 21(8): 661-668
- [8] Pennati M, Binda M, Colella G, et al. Ribozyme-mediated inhibition of surviving expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells [J]. Oncogene, 2004, 23(2): 386-394
- [9] Hu Y, Benedict MA, Ding L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis [J]. EMBO J, 1999, 18(13): 3586-3595
- [10] Zamzami N, Brenner C, Marzo I, et al. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins [J]. Oncogene, 1998, 16(17): 2265-2282
- [11] Mengxi D, Hong Y, Nan W, et al. Effect of short hairpin RNA of Bcl-xL gene on biological behaviors of HepG-2 cells [J]. Med Oncol, 2012, 29(2): 1000-1004
- [12] Song T, Li X, Chang X, et al. 3-Thiomorpholin-8-oxo-8H-acenaphtho [1,2-b] pyrrole-9-carbonitrile (S1) derivatives as pan-Bcl-2-inhibitors of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 [J]. Bioorg Med Chem, 2013, 21(1): 11-20
- [13] Li Y-F, Zhu S-Z. FoxM1 research progress in cell cycle and tumor [J]. J Int Oncol, 2011, 38(5): 332-335
- [14] Hua Jin, Man Hee Park, Soo Mi Kim. 3,3'-Diindolylmethane potentiates paclitaxel-induced antitumor effects on gastric cancer cells through the Akt/FOXM1 signaling cascade [J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 2031-2036
- [15] Ning Y, Li Q, Xiang H, et al. Apoptosis induced by 7-difluoromethoxyl-5, 4'-di-n-octyl genistein via the inactivation of FoxM1 in ovarian cancer cells [J]. Oncol Rep, 2012, 27(6): 1857-1864
- [16] Liu Y, Hock JM, Van Beneden RJ, et al. Aberrant overexpression of FOXM1 transcription factor plays a critical role in lung carcinogenesis induced by low doses of arsenic [J]. Mol Carcinog, 2014, 53(5): 380-391
- [17] Li Z, Jia Z, Gao Y, et al. Activation of vitamin D receptor signaling downregulates the expression of nuclear FOXM1 protein and suppresses pancreatic cancer cell stemness [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(4): 844-853
- [18] Achison M, Hupp TR. Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage [J]. Oncogene, 2003, 22(22): 3431-3440
- [19] Can G, Akpınar B, Baran Y, et al. 5-Fluorouracil signaling through a calcium-calmodulin-dependent pathway is required for p53 activation and apoptosis in colon carcinoma cells [J]. Oncogene, 2013, 32(38): 4529-4538
- [20] Frank DK. Intragen advexin therapy halts tumor growth in advanced esophageal cancer patients [J]. News Release, 2003, 6: 2-8