

迷迭香酸通过线粒体通路诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的研究

李 林, 付盈盈*, 司应明

襄阳市中医医院, 湖北 襄阳 441000

摘要: 目的 研究迷迭香酸通过线粒体通路诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的作用。方法 体外培养 MG-63 细胞, 将 10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸作用于 MG-63 细胞, MTT 和 CCK-8 法检测迷迭香酸对细胞生长的影响; AO/EB 染色法观察细胞凋亡; 流式细胞仪检测对细胞凋亡和细胞周期的影响; Western blotting 法检测 Cyt-c、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平。结果 MTT 和 CCK-8 结果显示迷迭香酸可浓度相关性地抑制 MG-63 细胞的生长; AO/BE 染色可看到迷迭香酸组凋亡细胞明显增加; 流式细胞仪检测结果显示迷迭香酸可浓度相关性地促进 MG-63 细胞凋亡, 并将细胞周期阻滞在 S 期; Western blotting 法结果显示与对照组比较, 迷迭香酸 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Bax、Caspase-3 和 Cyt-c 蛋白表达水平明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与对照组比较, 迷迭香酸 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Bcl-2 蛋白表达水平则明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。结论 迷迭香酸可显著促进人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡, 其机制可能与调控线粒体凋亡通路有关。

关键词: 迷迭香酸; 骨肉瘤; MG-63; 线粒体凋亡通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)11-3203-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.11.002

Apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells induced by rosmaric acid through mitochondrial pathway

LI Lin, FU Ying-ying, SI Ying-ming

Xiangyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangyang 441000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of rosmaric acid on apoptosis of human osteosarcoma cell line MG-63 *in vitro* through mitochondrial pathway. **Methods** MG-63 cells were cultured *in vitro*, and MTT and CCK-8 were performed to observe the proliferation after treated with rosmaric acid 10, 20, 30, 40, 50, and 60 $\mu\text{mol/L}$. AO/EB staining was used to detect the morphological changes of apoptotic cells. Flow cytometry was used to determine the apoptosis rate and cell cycle. Cyt-c, Caspase-3, Bax, and Bcl-2 contents were detected by Western blotting. **Results** MTT and CCK-8 results showed that rosmaric acid could inhibit the proliferation of MG-63 cells by concentration-dependent manner. The number of apoptosis cells in rosmaric acid groups was increased after AO/EB staining significantly. Flow cytometry showed that rosmaric acid could promote the apoptosis of MG-63 cells in a concentration-dependent manner and the cell cycle was arrest at S phase. Western blotting results showed that compared with the control group, the levels of Bax, Caspase-3, and Cyt-c in the rosmaric acid 20, 40, and 60 $\mu\text{mol/L}$ groups were increased significantly ($P < 0.05$, 0.01), but the levels of Bcl-2 in the rosmaric acid 20, 40, and 60 $\mu\text{mol/L}$ groups were decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01), and they had the dose-dependence. **Conclusion** Rosmaric acid can promote the apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells significantly, and its mechanism may be related to the regulation of mitochondrial apoptosis pathway.

Key words: rosmaric acid; osteosarcoma; MG-63; mitochondrial apoptosis pathway

骨肉瘤是骨骼系统常见的原发性恶性肿瘤之一, 来源于间叶组织, 多发生在股骨远端、胫骨近端以及肱骨近端等管状骨, 且发病率逐年上升, 预

后差, 病死率高^[1-2]。尽管有外科手术治疗以及放疗等综合治疗的方法, 但因化疗药物所具有的细胞毒性, 除了引起各种毒副作用、影响生活质量外,

收稿日期: 2019-05-30

作者简介: 李 林, 女, 副主任药师, 研究方向为临床药学。E-mail: 524944326@qq.com

*通信作者 付盈盈, 女, 研究方向为临床药学。E-mail: 378800682@qq.com

还会导致细胞耐药性增加,降低疗效或甚至导致治疗失败,尤其是伴有转移的患者。因此,开发高效低毒的辅助抗骨肉瘤的天然药物是有效途径之一。迷迭香酸是一种酚酸类化合物,研究证实其具有抗氧化、抗炎、抗血管化形成等药理活性^[3],并对多种肿瘤细胞具有较强的杀伤作用^[4]。本文主要观察迷迭香酸对线粒体通路的影响及通过调控线粒体通路而影响骨肉瘤 MG-63 细胞活性、凋亡的作用机制,为探讨迷迭香酸抗骨肉瘤作用提供实验依据。

1 材料和仪器

迷迭香酸(中国食品药品检定研究院,产品批号 111871-201704,质量分数 98.6%);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司,产品批号 070226);RPMI 1640 培养粉(Gibco 公司,产品批号 8127050);MTT、胰蛋白酶和 PBS 磷酸盐缓冲液(Sigma 公司,产品批号 M2128、T6424、20170321);吖啶橙(AO)、溴化乙锭(EB)、RIPA 裂解液(北京雷根生物技术有限公司,产品批号 20170124、172015、20161029);CCK-8 试剂盒(美国 BD Biosciences 公司,产品批号 BB18011X);DFC4255C 型倒置荧光显微镜(Leica 公司);一抗兔抗人 Bcl-2、Bax、Caspase-3、细胞色素 C(Cyt-c)和二抗辣根过氧化物酶标记鼠抗兔(bioworld 公司,产品批号 20170127、20160914、20170325、20170216、20170512);ELx800 型酶联免疫检测仪(BIO-TEK 公司);CO₂ 孵箱(Jouan 公司);流式细胞仪 FACS Calibur(Becton Dickinson 公司);其他试剂均为国产分析纯。骨肉瘤 MG-63 细胞株购自上海中科院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养与传代

将骨肉瘤 MG-63 细胞加入 RPMI 1640 (10% FBS+1% PBS) 培养液,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养,每隔一天更换一次培养液。

2.2 MTT 法检测细胞增殖率

取对数生长期的 MG-63 细胞,加入 RPMI 1640 培养液,稀释后以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L,培养 24 h 后取出,随机分组,药物组分别加入迷迭香酸(10、20、30、40、50、60 μ mol/L),对照组加入等量 RPMI 1640 培养液,每个组设置 6 个复孔,继续培养 24 h,在每个孔中加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L,培养 4 h 后把上清液弃掉,加入 DMSO 溶液 100 μ L,遮光震荡充分溶解结晶,于置酶标仪上用 490 nm 波长检测吸光

度(A)值,并按下列公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3 CCK-8 检测细胞增殖活性

取对数生长期的 MG-63 细胞,用 RPMI 1640 培养液进行稀释,以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h 后取出,随机分组,药物组分别加入迷迭香酸(10、20、30、40、50、60 μ mol/L),对照组加入等量 RPMI 1640 培养液,每组设置 6 个复孔。培养 60 h 后各孔加入 CCK-8 10 μ L 混匀,继续培养 2 h 后,采用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处 A 值,并计算 MG-63 细胞的增殖抑制率。

2.4 AO/EB 双染法检测细胞凋亡

将对数生长期的 MG-63 细胞,加入 RPMI 1640 培养液稀释至 1×10^5 个/mL 接种于 12 孔板。培养 24 h 后,随机分组,药物组加入迷迭香酸(20、40、60 μ mol/L),对照组加入等量培养液,每组设置 3 个复孔。继续培养 48 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 100 μ L AO 和 EB 混合染液(以覆盖底板为准),37 °C 避光培养 10 min 后置荧光显微镜下进行形态学观察和拍照。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期

将对数期生长的 MG-63 细胞,加入 RPMI 1640 培养液稀释至 3×10^5 个/mL 接种于培养瓶,每瓶 2 mL,培养 24 h 后随机分组。药物组分别加入迷迭香酸(20、40、60 μ mol/L),对照组加入等量培养液,每组设置 3 个复瓶。继续培养 48 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次后置于柠檬酸缓冲液中 1 h 以上,调整细胞浓度至 3×10^5 个/mL 左右,上流式细胞仪进行检测细胞凋亡率并分析细胞周期。

2.6 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白的表达

将对数生长期 MG-63 细胞,加入 RPMI 1640 培养液稀释至 3×10^5 个/mL 接种于 6 孔板,设未加药的对照组,药物组分别加入迷迭香酸(20、40、60 μ mol/L)进行干预。处理后收集细胞裂解液,进行 BCA 蛋白定量,SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。浸于 5% BSA 封闭 2 h,弃去封闭液,加入一抗 Cyt-c(1:3 000)、Caspase-3(1:3 000)、Bax(1:3 000)、Bcl-2(1:3 000),4 °C 反应过夜。次日漂洗,加入二抗稀释液孵育 30 min(1:5 000,常温),再用 TBST 漂洗,ECL 化学发光、显影,ImageQuant 软件扫描并分析相应灰度值。

2.7 统计学分析

所有数据采用 SPSS 15.0 统计学软件进行处理,

进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 迷迭香酸对 MG-63 细胞生长的抑制作用

同时采用 MTT 和 CCK-8 两种方法检测迷迭香酸对 MG-63 细胞生长的影响,结果显示,两种方法检测结果一致,迷迭香酸体外能浓度相关性的抑制 MG-63 细胞的生长,各组细胞生长抑制率与对照组相比均具有显著性差异 ($P < 0.01$ 、 0.001),因此可见迷迭香酸体外可抑制 MG-63 细胞的生长,并具有浓度相关性,见表 1。并根据体外增值抑制率的结果

选择其中 3 个浓度 (20、40、60 $\mu\text{mol/L}$) 进行后面的研究。

3.2 AO/EB 染色检测迷迭香酸对 MG-63 细胞凋亡的影响

对照组 MG-63 细胞呈现正常形态,发均匀的绿色荧光,无凋亡细胞。而迷迭香酸各浓度组出现凋亡细胞,视野中部分细胞发橘黄色荧光,表明细胞受到损伤,且随着药物浓度的增大,视野内受损伤的细胞数量逐渐增多。提示迷迭香酸可浓度相关性的诱导 MG-63 细胞发生凋亡。见图 1。

表 1 MTT 和 CCK-8 法检测迷迭香酸对 MG-63 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Inhibitory effect of rosmaric acid on proliferation of MG-63 cells by MTT and CCK-8 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	MTT法		CCK-8法	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
对照	—	0.727 ± 0.075	—	0.742 ± 0.073	—
迷迭香酸	10	$0.629 \pm 0.064^{**}$	13.81	$0.626 \pm 0.066^{**}$	15.43
	20	$0.601 \pm 0.056^{***}$	17.63	$0.610 \pm 0.064^{***}$	17.61
	30	$0.514 \pm 0.083^{***}$	29.61	$0.526 \pm 0.084^{***}$	28.99
	40	$0.480 \pm 0.077^{***}$	34.32	$0.493 \pm 0.089^{***}$	33.40
	50	$0.435 \pm 0.073^{***}$	40.41	$0.427 \pm 0.072^{***}$	42.34
	60	$0.395 \pm 0.070^{***}$	45.91	$0.398 \pm 0.073^{***}$	46.19

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$

$^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs control group

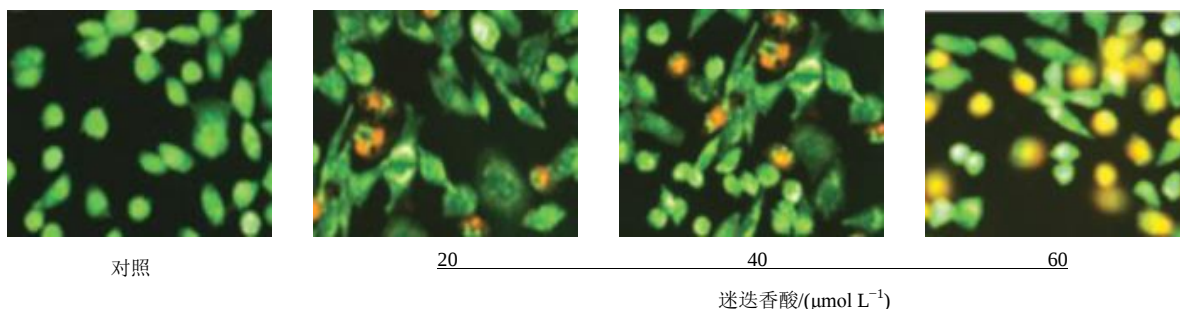


图 1 迷迭香酸对 MG-63 细胞凋亡的作用

Fig. 1 Effect of rosmaric acid on apoptosis of MG-63 cells

3.3 流式细胞仪检测迷迭香酸对 MG-63 细胞凋亡的影响

与对照组比较,迷迭香酸 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.01$ 、 0.001),且随着剂量的增加,细胞凋亡率明显增加,并出现凋亡典型性特征峰。见表 2。

3.4 流式细胞仪检测迷迭香酸对 MG-63 细胞周期的影响

与对照组比较,迷迭香酸 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$

表 2 迷迭香酸对 MG-63 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effects of rosmaric acid on apoptosis of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	凋亡率/%
对照	—	8.10 ± 0.48
迷迭香酸	20	$21.18 \pm 3.16^{**}$
	40	$32.96 \pm 4.59^{***}$
	60	$36.82 \pm 4.81^{***}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$

$^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs control group

组 G_0/G_1 期和 G_2/M 期略有减少, 但无显著性差异; 与对照组比较, 迷迭香酸 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组 S 期细胞比例均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且随着迷迭香酸剂量的增加, S 期的比例也增加。提示迷迭香酸可通过将细胞周期阻滞在 S 期而抑制 MG-63 细胞的生长。迷迭香酸对 MG-63 细胞周期的作用见表 3 和图 2。

表 3 迷迭香酸对 MG-63 细胞周期的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effects of rosmarinic acid on cell cycle of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	G_0/G_1 期/%	S 期/%	G_2/M 期/%
空白对照	—	54.52 ± 1.39	22.93 ± 1.94	22.55 ± 1.50
迷迭香酸	20	52.26 ± 2.61	$26.86 \pm 1.48^*$	20.88 ± 1.56
迷迭香酸	40	51.09 ± 2.27	$29.11 \pm 0.40^{**}$	19.80 ± 1.42
迷迭香酸	60	51.29 ± 2.25	$29.26 \pm 0.80^{**}$	19.45 ± 1.87

与对照组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs control group

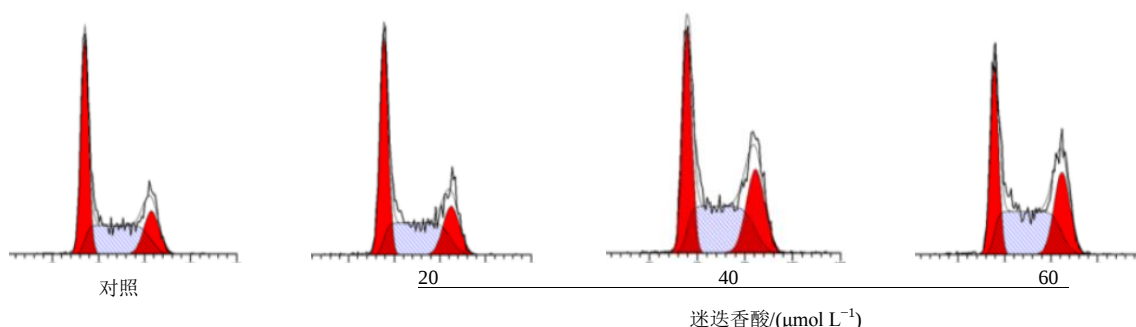


图 2 迷迭香酸对 MG-63 细胞周期的作用

Fig. 2 Effects of rosmarinic acid on cell cycle of MG-63 cells

表 4 迷迭香酸对 MG-63 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of rosmarinic acid on apoptosis related protein expression of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol L}^{-1})$	蛋白表达水平			
		Bax	Bcl-2	Caspase-3	Cyt-c
对照	—	0.42 ± 0.07	1.31 ± 0.12	0.61 ± 0.08	0.40 ± 0.05
迷迭香酸	20	$0.57 \pm 0.06^*$	$0.96 \pm 0.11^*$	0.81 ± 0.12	0.56 ± 0.10
	40	$0.75 \pm 0.12^*$	$0.85 \pm 0.09^{**}$	$1.04 \pm 0.08^{**}$	$0.61 \pm 0.12^*$
	60	$0.99 \pm 0.15^{**}$	$0.67 \pm 0.12^{**}$	$1.11 \pm 0.13^{**}$	$0.71 \pm 0.13^*$

与对照组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs control group

4 讨论

迷迭香 *Rosmarinus officinalis* L. 是一种原产于欧洲地区和非洲北部地中海沿岸的唇形科迷迭香属植物, 自古便被用作天然香料来调味。因迷迭香对人

3.5 Western blotting 法检测迷迭香酸对 MG-63 细胞凋亡相关蛋白的影响

与对照组比较, 迷迭香酸 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Bax、Caspase-3 和 Cyt-c 蛋白表达水平明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与对照组比较, 迷迭香酸 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Bcl-2 蛋白表达水平则明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性, 见表 4。

体健康有益, 也将其入药, 传统医学将其用于健胃、发汗、安神、止痛等。迷迭香酸是迷迭香发挥药理作用的主要有效成分, 是从迷迭香中提取而制得的天然酚酸类化合物, 由咖啡酸和 3,4-二甲基苯基乳

酸组成。研究表明迷迭香酸具有抗肝纤维化^[5],改善氧化应激、抗炎及抑制系膜细胞增生^[6],抑制细菌生长^[7]等天然活性。而近年来,其抗肿瘤的药用活性也逐渐被开发出。娄诤等^[8]研究表明迷迭香酸可通过促进凋亡蛋白 p53、Puma、Bax 和 active Caspase-9 的表达而诱导人结肠癌 HCT-8 细胞。韦立群^[9]等也证实迷迭香酸可通过抑制 PI3K/Akt 和激活 p38 MAPK 信号通路而抑制胃癌 MGC-803 细胞生长。本研究主要考察其对骨肉瘤 MG-63 细胞的影响及机制。

通常具有无限增殖能力的肿瘤细胞都会表现出细胞周期调控机制的异常和细胞分化受阻。而众多研究表明引起肿瘤细胞周期异常阻滞并诱导其凋亡是很多抗肿瘤药物发挥作用的重要机制。细胞增殖和凋亡的平衡被打破是引起肿瘤发生的重要原因。正常细胞和肿瘤细胞的增殖均在细胞周期的运行下进行,当肿瘤细胞的细胞周期受到外界因素的干扰,正常周期被打乱,就会降低其增殖的速度或诱导其走向死亡,这也是肿瘤治疗的关键环节^[10]。本实验同时采用 MTT 和 CCK-8 实验检测迷迭香酸对骨肉瘤 MG-63 细胞生长的影响,结果均表明迷迭香酸能浓度依赖性抑制 MG-63 细胞的生长;AO/EB 染色结果显示,迷迭香酸浓度越高,视野内受损伤的细胞数量越多,表明凋亡细胞数越多;流式细胞仪检测发现,迷迭香酸可通过将 MG-63 细胞周期停滞于 S 期而诱导其凋亡。哺乳动物细胞的生长在细胞周期的不同阶段受到严格调控,而决定细胞生死的主要是在 S 阶段,因该阶段需要严格的复制遗传密码^[11],所以通过 S 期细胞阻滞更容易诱导细胞凋亡。细胞分化的主要标志是合成特异性的功能蛋白,导致细胞类型的功能性变化,并改变细胞的形态结构,细胞的这些变化均于 G₁ 期进行。肿瘤细胞去分化会导致 G₁ 期卡点失常,从而进入 S 期的细胞异常增多。由此提示迷迭香酸抑制 MG-63 细胞增殖的作用与引起细胞周期异常,减少 DNA 合成和有丝分裂,促进肿瘤细胞去分化有关。

线粒体是维持生命活动的重要细胞器,而线粒体凋亡途径是经典的凋亡途径之一。Bax 和 Bcl-2 蛋白均是 Bcl-2 蛋白家族的成员。Bax 是 Bcl-2 家族蛋白的促凋亡因子,能形成足够大的跨膜孔,释放细胞色素 C (Cyt-c)^[12];Bcl-2 是细胞凋亡的抑凋亡因子,在肿瘤细胞中维持线粒体膜电位和抑制线粒体依赖性凋亡,并抑制 Caspase 的激活以阻止细

胞凋亡^[13-14]。当细胞受到凋亡信号刺激时,线粒体外膜通透性增加,线粒体膜上的 Bax 和 Bcl-2 共同调控释放 Cyt-c 到细胞质中,在三磷酸脱氧腺苷(dATP)参与下与凋亡蛋白酶活化因子 Apaf-1 结合形成 Cyt-c/Apaf-1 复合物,激活 Caspase-9 和 Caspase-3,进而诱导细胞凋亡。

为了研究迷迭香酸诱导 MG-63 细胞凋亡的分子机制,本研究采用 Western blotting 法检测了相关凋亡蛋白的表达情况。结果表明迷迭香酸各组 Bax 表达水平均上调,而 Bcl-2 表达水平则显著下降。表明 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达水平平衡,引起了线粒体膜通透性的变化,从而引起线粒体凋亡通路级联反应的发生。而迷迭香酸各组 Cyt-C 和 Caspase-3 表达的上调也验证了这一通路的激活。以上均表明迷迭香酸可通过线粒体凋亡途径诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡。

参考文献

- [1] Siddiqui Y S, Sherwani M K, Khan A Q, et al. Neglected orthopedic oncology:causes, epidemiology and challenges for management in developing countries [J]. *Indian J Cancer*, 2015, 52(3): 325-329.
- [2] Harrison D J, Geller D S, Gill J D, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(1): 39-50.
- [3] 周建国, 严奉祥. 迷迭香酸对癌症预防及治疗的研究进展 [J]. *基层医学论坛*, 2013, 17(10): 1332-1335.
- [4] Huang Y, Cai Y, Huang R, et al. Rosmarinic acid combined with adriamycin induces apoptosis by triggering mitochondria-mediated signaling pathway in HepG2 and Bel-7402 cells [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7898-7908.
- [5] 张瑾锦, 王友磊, 刘文波, 等. 迷迭香酸对免疫性肝纤维化的治疗作用 [J]. *滨州医学院学报*, 2010, 33(3): 178-181.
- [6] 刘广建, 黄荣桂, 李月婷. 迷迭香酸对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 10(2): 151-155.
- [7] Nouri A, Tavakkoli Y M, Ghorbanpour M, et al. Biodegradable κ -carrageenan/nanoclay nanocomposite films containing *Rosmarinus officinalis* L. extract for improved strength and antibacterial performance [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 115: 227-235.
- [8] 娄诤, 陆仲夏, 俞雅蓉, 等. 迷迭香酸对人结肠癌 HCT-8 细胞增殖和凋亡的影响及分子机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(13): 3051-3055.
- [9] 韦立群, 李 清, 甘嘉亮, 等. 迷迭香酸衍生物 RAD-9

- 通过 PI3K/Akt 和 p38 MAPK 信号通路诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(2): 256-260.
- [10] Yogosawa S, Yoshida K. Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(11): 3376-3382.
- [11] Cho Y J, Liang P. S-phase-coupled apoptosis in tumor suppression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(11): 1883-1896.
- [12] Gómez-Crisóstomo N P, López-Marure R, Zapata E, *et al.* Bax induces cytochrome c release by multiple mechanisms in mitochondria from MCF7 cells [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2013, 45(5): 441-448.
- [13] Cory S, Adams J M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life or-death switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9): 647-56.
- [14] Liu M, Jia J, Wang X, *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR promotes cervical cancer progression through regulating BCL2 via targeting miR-143-3p [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018; 6(3): 631-641.