

## 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

娄 铮<sup>1</sup>, 陆仲夏<sup>2</sup>, 俞雅蓉<sup>1</sup>, 王大维<sup>3\*</sup>

1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

3. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

**摘要:** 目的 研究迷迭香酸对人结肠癌 HCT-8 细胞增殖和凋亡的影响, 并探究相关机制。方法 采用 CCK-8 法检测不同浓度迷迭香酸作用不同时间后 HCT-8 细胞的增殖情况; 根据 CCK-8 法结果确定迷迭香酸 15、45、75  $\mu\text{mol/L}$  作用 72 h, 考察 HCT-8 细胞的凋亡和相关基因及蛋白的表达; 通过流式细胞术检测 HCT-8 细胞的凋亡率; 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 p53、Bax 和 Puma 基因的 mRNA 表达; 通过 Western blotting 法检测 p53、Bax、Puma 和 active Caspase-9 的蛋白表达水平。结果 迷迭香酸能够抑制 HCT-8 细胞的增殖, 并呈时间和浓度依赖性。15、45  $\mu\text{mol/L}$  的迷迭香酸主要诱导 HCT-8 细胞早期凋亡 ( $P < 0.01$ ), 75  $\mu\text{mol/L}$  的迷迭香酸主要诱导 HCT-8 细胞晚期凋亡 ( $P < 0.01$ )。迷迭香酸可以使 Puma 的 mRNA 表达上调, 并呈浓度依赖性; 45、75  $\mu\text{mol/L}$  的迷迭香酸可以使 p53 和 Bax 的 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )。迷迭香酸可以上调 Puma、Bax 和 active Caspase-9 的蛋白表达水平, 并呈浓度依赖性; 75  $\mu\text{mol/L}$  的迷迭香酸可以使 p53 的蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论 迷迭香酸对 HCT-8 细胞具有明显的增殖抑制作用, 并且是通过诱导凋亡实现的, 促凋亡蛋白 p53、Puma、Bax 和 active Caspase-9 诱导了凋亡的发生。

**关键词:** 迷迭香酸; HCT-8 细胞; 凋亡; p53; Puma; Bax; active Caspase-9

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-3051-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.014

## Effects of rosmarinic acid on proliferation and apoptosis of HCT-8 cells and its molecular mechanisms

LOU Zheng<sup>1</sup>, LU Zhong-xia<sup>2</sup>, YU Ya-rong<sup>1</sup>, WANG Da-wei<sup>3</sup>

1. The Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. College of Life Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

3. College of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of rosmarinic acid (RosA) on the proliferation and apoptosis of human colon cancer HCT-8 cells, and explore the related mechanisms. **Methods** The proliferation of HCT-8 cells was detected by CCK-8 assay at different concentrations of RosA for different time periods. The apoptosis rates of HCT-8 cells and the expression of related proteins were investigated after the treatment of RosA at 15, 45, and 75  $\mu\text{mol/L}$  for 72 h according to the CCK-8 results. The apoptosis rates of HCT-8 cells were detected by FCM. The mRNA expressions of p53, Bax, and Puma were detected by RT-qPCR. The protein levels of p53, Bax, Puma, and active Caspase-9 were detected by Western blotting. **Results** RosA could inhibit the proliferation of human colon cancer cells HCT-8 in a time- and dose-dependent manner. RosA at 15 and 45  $\mu\text{mol/L}$  mainly induced early apoptosis ( $P < 0.01$ ), RosA at 75  $\mu\text{mol/L}$  mainly induced late apoptosis ( $P < 0.01$ ). RosA could up-regulate the mRNA expression of Puma in a dose-dependent manner. RosA at 45 and 75  $\mu\text{mol/L}$  increased the mRNA expression of p53 and Bax ( $P < 0.05$ ). RosA could up-regulate the protein levels of Puma, Bax, and active Caspase-9 in a dose-dependent manner. RosA at 75  $\mu\text{mol/L}$  could significantly increase the protein expression of p53 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RosA can significantly inhibit the proliferation of HCT-8 cells by inducing the apoptosis. The apoptosis-inducing proteins of p53, Puma, Bax, and active Caspase-9 induce the apoptosis of cells.

**Key words:** rosmarinic acid; HCT-8 cells; apoptosis; p53; Puma; Bax; active Caspase-9

收稿日期: 2018-02-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373633); 浙江中医药大学基础医学院科技创新团队基金 (711200E019)

作者简介: 娄 铮, 本科生, 研究方向为肿瘤的防治及机制研究。E-mail: 920069840@qq.com

\*通信作者 王大维, 硕士, 助理实验师。Tel: 15158871450 E-mail: 602599510@qq.com

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一，全世界每年结肠癌约有一百万新发病例，且呈上升趋势。结肠癌的病死率在我国的恶性肿瘤中占第 3 位。随着我国居民工作方式及饮食结构和食品安全等方面的影响，结肠癌的发病向年轻化发展，向大城市集中，严重影响着我国人民的身体健康。目前最关键的治疗手段是手术，同时给予化疗和中西医结合治疗。由于患者本身重视程度较低，往往是一经确诊就已经是中晚期，错过了手术根治的机会，化疗作为主要的治疗手段必不可少。但耐药的出现，使得开发新的高效抗肿瘤药物显得尤为重要。

迷迭香 *Rosmarinus officinalis* L. 为唇形科迷迭香属多年生草本植物，西餐中常用作辅料。它集食用、药用、保健于一身。近年来发现，迷迭香酸 (rosmarinic acid) 有着广泛的药理作用，如抗氧化、抗菌、抗抑郁等，并且对多种肿瘤细胞具有抑制作用<sup>[1-6]</sup>。但对人结肠癌 HCT-8 细胞增殖的影响尚未见报道，因此本实验选用人结肠癌 HCT-8 细胞，研究迷迭香酸对其增殖的抑制作用及其可能的分子生物学机制，为迷迭香酸临床应用于结肠癌的治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人结肠癌 HCT-8 细胞株购自中国科学院上海细胞研究所。

### 1.2 药品与试剂

迷迭香酸 (HPLC 测得质量分数  $\geq 98\%$ ，批号 0001432843) 购自美国 Sigma 公司；胎牛血清购自美国 Gemini 公司；RPMI 1640 培养基、青霉素/链霉素双抗购自美国 Gibco 公司；二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司；胰蛋白酶、PBS 缓冲液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司；CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PMSF、RIPA、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液均购自碧云天生物技术有限公司；逆转录试剂盒、Realtime-PCR 试剂盒购自 TaKaRa；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司；Resolving Gel Buffer 预混制胶缓冲液 (pH 8.8)、SDS、Stacking Gel Buffer 预混制胶缓冲液 (pH 6.8)、APS、30% Acr-Bis 购自美国 Bio-Rad 公司；TEMED、BSA 购自 Amresco 公司；引物由上海生工生物工程公司合成； $\beta$ -actin 抗体、GAPDH 抗体、p53 抗体、Puma 抗体、Bax 抗体以及 cleaved-Caspase-9 抗体均购自英国 Abcam 公司。

### 1.3 仪器

Scientific Varioskan flash 多功能酶标仪，Thermo 公司；FC500 流式细胞仪，美国 Beckman Coulter 公司；实时荧光定量 PCR 仪，Roche 公司；Odyssey 双色红外激光成像系统，LI-COR 公司。

## 2 方法

### 2.1 CCK-8 法检测迷迭香酸对 HCT-8 细胞增殖的抑制作用

将 HCT-8 细胞培养于含 10% 胎牛血清以及含双抗 (青霉素  $1 \times 10^5$  U/L、链霉素 100 mg/L) 的 RPMI 1640 完全培养基中，培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 的饱和湿度培养箱，融合度约 90% 时传代。待 HCT-8 细胞长至对数生长期时，将细胞用胰酶消化成单细胞悬液，并按照每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 96 孔板。实验分组设置：空白组内只加入含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基，无细胞；阴性对照组为正常培养的 HCT-8 细胞，无迷迭香酸；实验组为不同浓度迷迭香酸干预的 HCT-8 细胞，迷迭香酸 (迷迭香酸溶于 DMSO 中配制成浓度为 100 mmol/L 的储存液，于 4 °C 避光备用，用时以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释) 终浓度分别为 15、30、45、60、75、90  $\mu\text{mol/L}$ 。每组设置 6 个平行孔，药物干预时间分别为 24、48、72 h。终止培养后每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ，避光孵育 1 h 后用酶标仪以 450 nm 波长测各孔吸光度 ( $A$ ) 值，计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 HCT-8 细胞，按照每孔  $5.0 \times 10^5$  个接种于六孔板中。根据“2.1”项增殖抑制率的结果，最终将进行流式细胞术凋亡检测的实验组迷迭香酸浓度设为 15、45、75  $\mu\text{mol/L}$ ，药物作用时间为 72 h；对照组为正常培养的细胞。药物作用结束后，用 0.25% 胰蛋白酶 (不含 EDTA) 消化细胞，并离心收集后用预冷的 PBS 清洗；然后以 100  $\mu\text{L}$  1  $\times$  Binding Buffer 重悬细胞。实验各组的流式管中加入 FITC Annexin V 5  $\mu\text{L}$ ，室温避光孵育 15 min，检测前每管加入 PI 5  $\mu\text{L}$ ，1 h 内检测完毕。

### 2.3 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测凋亡相关基因 mRNA 的表达

细胞培养、分组以及药物干预同“2.2”项。用胰蛋白酶消化离心收集细胞后用 TRIzol 法提取细胞总 RNA，按照 TaKaRa 逆转录试剂说明书将所提取的总 RNA 逆转录为 cDNA 后再进行荧光定量

PCR 反应。采用  $\beta$ -actin 作为内参。实验组的目的基因相对于对照组的表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算得出。所用引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列  
Table 1 Primers sequence of RT-qPCR

基因	引物序列 (3'→5')
$\beta$ -actin	正向: TATGACTTAGTTGCGTTACACC
	反向: CCTTCACCGTTCCAGTTT
p53	正向: CCCAGGTCCAGATGAAC
	反向: CAGACGGAAACCGTAGC
Puma	正向: TCCTCAGCCCTCGCTCTCGC
	反向: CCGATGCTGAGTCCATCAGC
Bax	正向: TTTGCTTCAGGGTTTCATCC
	反向: GCCACTCGGAAAAAGACCTC

### 2.4 Western blotting 法检测细胞内凋亡相关蛋白表达

细胞培养、分组以及药物干预同“2.2”项。实验各组细胞以预冷的 PBS 漂洗后，置冰上，加入 PIPA（含蛋白酶抑制剂）使充分浸润细胞，以细胞刮收取细胞，继续充分裂解后以 BCA 法测蛋白浓度。然后加入  $5\times$  Loading Buffer, 100 °C 水浴 10 min 使蛋白充分变性。经过 SDS-PAGE 凝胶电泳、电转以及封闭步骤后，分别孵育内参一抗以及目的蛋白一抗，后经二抗孵育在红外激光成像系统中进行扫描获得蛋白条带图像。经过 Image J 软件对所获得的条带进行灰度值分析，计算目的蛋白与内参蛋白的灰度比值。将实验组目的蛋白的灰度比与对照组目的蛋白的灰度比进行比较，最终获得目的蛋白的相对表达量。

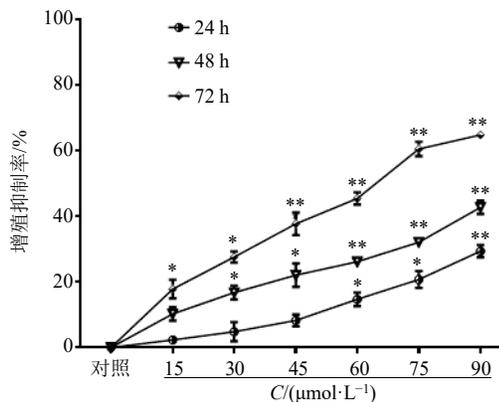
### 2.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对各组数据结果进行分析，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，数据先进行正态性检验和方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 对 HCT-8 细胞增殖的抑制作用

经迷迭香酸处理后的 HCT-8 细胞增殖活性明显受到抑制，其抑制作用呈现时间和浓度依赖性。通过 GraphPad Prism 5.0 软件进行拟合计算得出迷迭香酸作用 72 h 的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 60.62  $\mu\text{mol/L}$ ，95% 可信度区间为 56.58~64.95  $\mu\text{mol/L}$ 。结果见图 1。



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下同  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below

图 1 迷迭香酸对 HCT-8 细胞增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 1 Inhibitory effects of rosmarinic acid on proliferation of HCT-8 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.2 对 HCT-8 细胞凋亡的作用

流式细胞术检测结果显示，迷迭香酸干预 HCT-8 细胞 72 h，总凋亡率随着迷迭香酸的浓度升高而升高 ( $P < 0.05$ )。其中迷迭香酸 15、45  $\mu\text{mol/L}$  组主要引起早期凋亡 ( $P < 0.01$ )，而迷迭香酸 75  $\mu\text{mol/L}$  组则主要引起晚期凋亡 ( $P < 0.01$ )；与对照组相比，迷迭香酸 45  $\mu\text{mol/L}$  组的早期和晚期凋亡均非常显著 ( $P < 0.01$ )。结果见图 2 和表 2。

3.3 对 HCT-8 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达的影响  
由 RT-qPCR 结果 (图 3) 可见，与对照组相比，Puma 表达在迷迭香酸 45、75  $\mu\text{mol/L}$  组升高非常显著

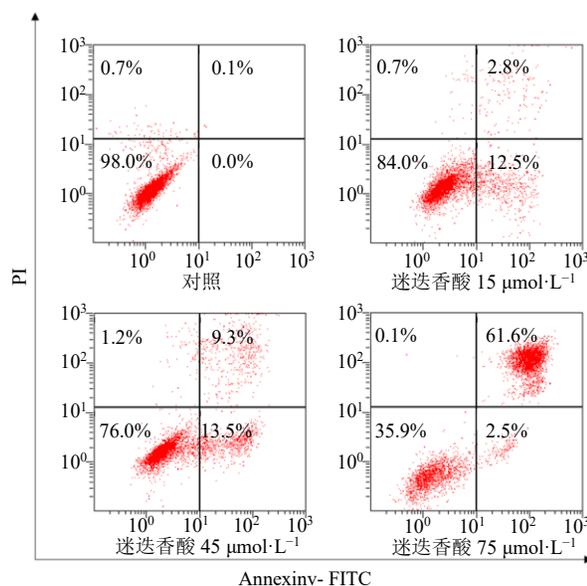


图 2 迷迭香酸诱导 HCT-8 细胞凋亡的流式细胞术结果  
Fig. 2 FCM results of apoptosis of HCT-8 cells induced by rosmarinic acid

表 2 迷迭香酸对 HCT-8 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effects of rosmarinic acid on apoptotic rate of HCT-8 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	C/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照	—	0.40±0.33	0.28±0.15	0.70±0.48
迷迭香酸	15	11.84±1.38**	1.99±0.91*	13.93±2.25*
	45	13.50±1.04**	9.56±0.64**	23.06±0.93*
	75	2.07±0.82**	61.27±0.93**	53.34±0.32*

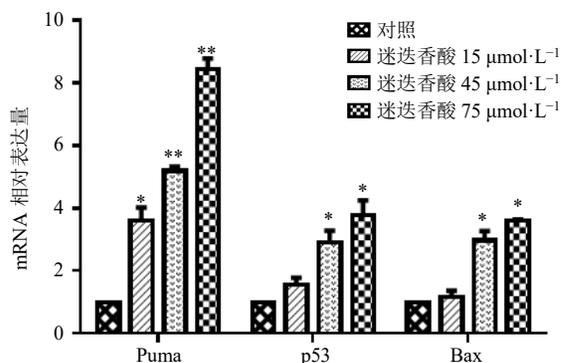


图 3 迷迭香酸对 HCT-8 细胞 Puma、p53 和 Bax mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effects of rosmarinic acid on mRNA expression of Puma, p53, and Bax in HCT-8 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

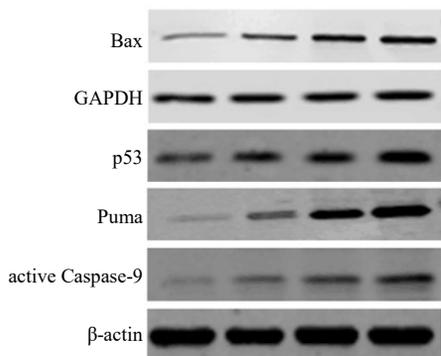


图 4 迷迭香酸对 HCT-8 细胞 Bax、Puma、p53 和 active Caspase-9 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of rosmarinic acid on expression of Bax, Puma, p53, and active Caspase-9 proteins in HCT-8 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

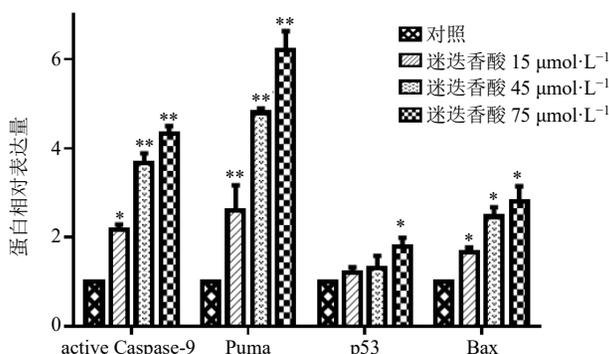
#### 4 讨论

迷迭香始载于《本草拾遗》，用于健脾、安神、止痛等。最近的研究发现，迷迭香酸对乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、人白血病 HL60 等肿瘤细胞株有较好的增殖抑制作用<sup>[4,7-8]</sup>。本研究的结果显示，迷迭香酸对人结肠癌 HCT-8 细胞有较好的增殖抑制作用，并呈剂量和时间依赖性。流式细胞术检测结果表明，15、45  $\mu\text{mol/L}$  的迷迭香酸主要引起 HCT-8 细胞的早期凋亡，而 75  $\mu\text{mol/L}$  的迷迭香酸主要引起晚期凋亡。由此推断，迷迭香酸对 HCT-8 细胞的

( $P < 0.01$ )，在迷迭香酸 15  $\mu\text{mol/L}$  组也显著升高 ( $P < 0.05$ )，呈浓度依赖性；p53 基因和 Bax 基因表达只在迷迭香酸 45、75  $\mu\text{mol/L}$  组升高比较显著 ( $P < 0.05$ )。

#### 3.4 对 HCT-8 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

由图 4 可见，相比于对照组，迷迭香酸组 HCT-8 细胞 active Caspase-9、Bax、Puma 以及 p53 蛋白表达均有一定程度上调，其中前 3 者的表达升高呈现明显的浓度依赖性。与对照组相比，Puma 在各迷迭香酸组的表达升高最明显 ( $P < 0.01$ )；Bax 也显著升高 ( $P < 0.05$ )；active Caspase-9 的表达在迷迭香酸 45、75  $\mu\text{mol/L}$  组的表达上调非常显著 ( $P < 0.01$ )，在迷迭香酸 15  $\mu\text{mol/L}$  组的表达升高显著 ( $P < 0.05$ )；p53 的表达仅在迷迭香酸 75  $\mu\text{mol/L}$  组上调显著 ( $P < 0.05$ )。



增殖抑制作用主要是由凋亡所导致的。

细胞凋亡是受一系列基因调控的主动性细胞死亡；在机体发育和维持内环境稳定中发挥重要作用，是正常生理条件下的细胞死亡，不造成炎症反应；也是抗肿瘤研究中的热点。迷迭香酸在抗肿瘤机制方面据文献报道，它可以增加 PARP 等凋亡相关因子的表达，诱导肾癌细胞的凋亡<sup>[9]</sup>。本研究的结果显示，迷迭香酸可以使 HCT-8 细胞 Bax 的蛋白表达呈剂量依赖性升高；mRNA 表达在 45、75  $\mu\text{mol/L}$  组升高明显。Bax 在线粒体诱发的凋亡中起重要作用

用,通常存在于胞浆中处于被抑制的状态,当细胞受到凋亡信号的刺激之后,Bax的构象发生变化,并转至线粒体表面发生聚合并形成孔道,使线粒体内的促凋亡因子和细胞色素C释放入细胞质引发凋亡<sup>[10]</sup>。而Puma可以与Bax直接结合而激活Bax,并使Bax在线粒体外膜正确定位<sup>[11-12]</sup>。本研究的结果显示,迷迭香酸可以使HCT-8细胞中Puma的mRNA和蛋白质的表达均显著上调并具有剂量依赖性。由此推测,迷迭香酸诱导的HCT-8细胞的凋亡也许主要是线粒体途径。Active Caspase-9的Western blotting结果显示,迷迭香酸可以使其水平显著升高并且呈浓度依赖性。而Caspase-9是凋亡的线粒体途径中的效应Caspase,这进一步证明该凋亡或许主要由线粒体途径诱发。p53与线粒体途径的凋亡关系也很密切,它可以促进Noxa、Puma和Bax等凋亡相关基因的表达<sup>[13]</sup>;也可以和抑凋亡蛋白Bcl-xL等结合而将Bax释放出来<sup>[14]</sup>;还可以直接和Bax、Bak结合并使之激活<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,45、75 μmol/L的迷迭香酸可以使HCT-8细胞的p53 mRNA表达明显升高;75 μmol/L的迷迭香酸使p53的蛋白表达显著升高。这表明,p53参与了迷迭香酸诱导的HCT-8细胞凋亡,但是p53具体是以哪一种方式诱导的凋亡,还需要进一步研究。

综上所述,本研究结果表明迷迭香酸对HCT-8细胞具有明显的增殖抑制作用,并且是通过诱导凋亡实现的;促凋亡蛋白p53、Puma、Bax和active Caspase-9诱导了凋亡的发生。本研究采用的是体外实验方法,关于迷迭香酸对结肠癌的影响和机制尚需体内实验进行更深入的研究。

#### 参考文献

- [1] Slobodníková L, Fialová S, Hupková H, et al. Rosmarinic acid interaction with planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus* [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(8): 1747-1750.
- [2] Garcíacontreras R, Martínezvázquez M, Velázquez Guadarrama N, et al. Resistance to the quorum-quenching compounds brominated furanone C-30 and 5-fluorouracil in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates [J]. *Fems Immunol Med Mic*, 2013, 68(1): 8-11.
- [3] 曾慧婷, 宿树兰, 沙秀秀, 等. 丹参茎叶提取物抗氧化活性物质基础与量效关系研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(22): 4688-4694.
- [4] Kontogianni V G, Goran T, Ivana N, et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 120-129.
- [5] Rahnema M, Mahmoudi M, Zamani T R S, et al. Evaluation of anti-cancer and immunomodulatory effects of carnosol in a Balb/c WEHI-164 fibrosarcoma model [J]. *J Immunotoxicol*, 2015, 12(3): 1-8.
- [6] Cattaneo L, Cicconi R, Mignogna G, et al. Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132439.
- [7] Elansary H O, Mahmoud E A. Egyptian herbal tea infusions' antioxidants and their antiproliferative and cytotoxic activities against cancer cells [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(5): 474-479.
- [8] Saiko P, Steinmann M T, Schuster H, et al. Epigallocatechin gallate, ellagic acid, and rosmarinic acid perturb dNTP pools and inhibit *de novo*, DNA synthesis and proliferation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells: Synergism with arabinofuranosylcytosine [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(1): 213-222.
- [9] Stanojković T P, Konić-Ristić A, Juranić Z D, et al. Cytotoxic and cell cycle effects induced by two herbal extracts on human cervix carcinoma and human breast cancer cell lines [J]. *J Med Food*, 2010, 13(2): 291-297.
- [10] Dingeldein A P G, Šárka P, Lidman M, et al. Apoptotic Bax at oxidatively stressed mitochondrial membranes: Lipid dynamics and permeabilization [J]. *Biophys J*, 2017, 112(10): 2147-2158.
- [11] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.
- [12] Leshchiner E S, Braun C R, Bird G H, et al. Direct activation of full-length proapoptotic BAK [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(11): E986-E995.
- [13] Mccubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1263-1284.
- [14] Deng J. How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers? [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(1): 18-26.
- [15] Ying Y, Padanilam B J. Regulation of necrotic cell death: p53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(11/12): 2309-2324.