构树绿原酸样化合物诱导胃癌细胞凋亡的机制研究

朱泽欣[1]，赵云涛[2]，陈绍红[2]，刘艳芬[1*]，刘　铀[2*]

1. 广东海洋大学农学院，广东 湛江　524088
2. 广东海洋大学食品科技学院，广东 湛江　524088

摘　要：目的　研究构树绿原酸样化合物诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的作用及机制。**方法**　采用 MTT 法检测构树绿原酸样化合物对 SGC-7901 细胞增殖的影响，DAPI 染色法观察细胞形态，Annexin V/PI 双染色法结合流式细胞术检测细胞凋亡，PI 染色结合流式细胞术检测细胞周期，DCHF-DA 探针荧光显微镜观察细胞内活性氧（ROS）变化，JC-1 染色荧光显微镜观察细胞线粒体膜电位变化，Western blotting 检测细胞 p53、Bcl-2、Bax、Cytochrome C、p-p38、p-JNK、JNK、细胞外调节蛋白激酶（ERK）、p-ERK 蛋白表达量。**结果**　构树绿原酸样化合物能显著抑制 SGC-7901 细胞增殖，且呈时间和剂量依赖性；给药组细胞内出现染色质浓缩和凋亡小体，细胞周期被阻滞在 G_2/M 期，且线粒体膜电位显著下降（P＜0.05、0.01），ROS 水平显著升高（P＜0.05、0.01）。构树绿原酸样化合物能显著上调 SGC-7901 细胞 p53、Bax、Cytochrome C 和 p-p38 蛋白表达水平（P＜0.05、0.01、0.001），显著下调 p-ERK 和 Bcl-2 表达水平（P＜0.01、0.001）。**结论**　构树绿原酸样化合物可能通过 p38-MAPK 和 ERK-MAPK 信号通路介导线粒体氧化应激途径诱导胃癌细胞 SGC-7901 凋亡。

关键词：构树；绿原酸样化合物；细胞凋亡；氧化应激；丝裂原活化蛋白激酶信号通路

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2018)22 - 5345 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.019

Mechanism of gastric carcinoma cell apoptosis induced by chlorogenic acid-like compounds extracted from *Broussonetia papyrifera*

ZHU Ze-xin[1], ZHAO Yun-tao[2], CHEN Shao-hong[2], LIU Yan-fen[1], LIU You[2]

1. College of Agricultural, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China
2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Objective　To explore the mechanism of gastric carcinoma cell SGC-7901 apoptosis induced by chlorogenic acid-like compounds extracted from *Broussonetia papyrifera* (CALCBP) bark. **Methods**　The SGC-7901 cells were used to evaluate the anti-tumour activity of the extract *in vivo*, and the proliferation of cells was examined by MTT assay. The cell morphological changes of cells were observed by DAPI staining; The cell apoptosis and the cell cycle were detected respectively by flow cytometry after PI and Annexin V/PI staining; The intracellular ROS were determined under the fluorescence microscope using DCHF-DA probe, the changes of mitochondrial membrane potential were observed by JC-1 staining. The protein expression of p53, Bcl-2, Bax, and Cytochrome C, p-p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK were analyzed by Western blotting. **Results**　The proliferation of SGC-7901 cells was inhibited significantly by CALCBP in dose-dependent and time-dependent manner, the condensed chromosome and apoptotic body can be observed in the treated cells and the cell cycle was arrested in G_2/M phase, the mitochondrial membrane potential was significantly decreased, whereas the cellular ROS levels of the treated cells were significantly increased. Moreover, the protein expression of p53, Bax, Cytochrome C, and p-p38 were significantly up-regulated and p-ERK and Bcl-2 expression were significantly down-regulated. **Conclusion**　The apoptosis of gastric cancer cell SGC-7901 induced by CALCBP was probably related to oxidative stress of the cell mitochondrial via p38-MAPK and ERK-MAPK signal pathways.

Key words: *Broussonetia papyrifera* (Linn.) L'Hér. ex Vent.; chlorogenic acid-like compounds; cell apoptosis; oxidative stress; MAPK signal pathway

收稿日期：2018-03-24

基金项目：广东省农业科技计划项目“构树综合加工利用技术研究”（0809035）

作者简介：朱泽欣（1991—），男，硕士研究生，研究方向为动物营养与免疫。E-mail: 805115926@qq.com

***通信作者**　刘艳芬（1963—），女，教授，研究方向为动物营养与免疫。E-mail: lyf9314@163.com

刘　铀（1966—），男，教授，主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: liuy6254282@163.com

胃癌是发生于胃黏膜上皮细胞的恶性肿瘤，是多种体内外因素共同作用的结果，有很高的发病率和死亡率，严重威胁人类健康。

构树 *Broussonetia papyrifera* (Linn.) L'Hér. ex Vent. 是一种传统中药，含有多种生物活性成分，具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎和抗肿瘤等生物活性[1]。本课题组前期研究中采用乙醇提取、大孔树脂柱色谱、透析、冷冻干燥等工艺获得的构树皮提取物具有较强的抗肿瘤活性，可诱导体外培养的肝癌 HepG2 细胞凋亡[2]。结构分析表明构树皮提取物主要化学成分为绿原酸样化合物，质量分数达 83.78%。本研究以胃癌 SGC-7901 细胞为模型，探讨构树绿原酸样化合物（CALCBP）对 SGC-7901 细胞的抑制效果及其作用机制，旨在为研究、开发天然抗胃癌药物提供理论依据。

1 材料

1.1 药品

构树采自广东湛江湖光岩东广东海洋大学校园，经广东海洋大学吴钿教授鉴定为构树 *Broussonetia papyrifera* (Linn.) L'Hér. ex Vent.。CALCBP 由本实验室制备，其中绿原酸样化合物总质量分数为 83.78%。

1.2 细胞

SGC-7901 细胞购于中山大学医学实验中心。

1.3 试剂

RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司；胎牛血清（FBS）购自 HyClone 公司；AnnexinV FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海 BestBio 贝博生物公司；DCFH-DA、DAPI 购自 Sigma 公司；JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒购自碧云天生物技术公司；GAPDH、p53、Bcl-2、Bax、Cytochrome C、p-p38、p38、HRP 偶联山羊抗兔抗体购自 CST 公司；p-JNK、JNK、细胞外调节蛋白激酶（ERK）、p-ERK 抗体购自 Santa Cruz 公司；HRP 偶联山羊抗鼠抗体购自 Jack Immuno Research 公司。

1.4 仪器

UPLC-Triple-TOF/MS 系统与 Acquity^{TM} ultra 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Triple TOF 5600^{+} 型飞行质谱（美国 AB Sciex 公司）；DMI30008B 倒置荧光显微镜（德国 Leica 公司）；Epoch 全波长酶标仪（美国 BioTek 公司）；BD FACSCantoTM II Flow Cytometer 流式细胞仪（美国 Becton Diskon 公司）。

2 方法

2.1 CALCBP 的提取与分析

参照豆沉着等[2]的方法，取新鲜构树皮 50 ℃烘干、粉碎，过 60 目筛，按料液比 1∶30 加入 60% 乙醇，超声波浸提 3 次，每次 2 h，滤过，滤液于 50 ℃旋转蒸发浓缩，获得构树粗提取物。粗提取物经 AB-8 大孔吸附树脂柱色谱分离，洗脱液经旋转蒸发浓缩后用截留相对分子质量为 1 000 的透析袋透析，透析液浓缩、冷冻干燥，得到 CALCBP，−70 ℃冻存。样品由青岛正信检测分析有限公司进行成分分析和结构解析。

2.2 MTT 法测定细胞活力

SGC-7901 细胞用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液于 37 ℃、5% CO_2 培养。将处于对数生长期的细胞调整为 1×10^5 个/mL，接种于 96 孔板，每孔 100 μL，培养 24 h 后弃去上清液，加入 CALCBP 使其终质量浓度分别为 50、100、200、400 μg/mL，同时设置对照组，分别培养 24、48、72 h，用 MTT 法测定细胞存活率。

2.3 细胞周期检测

调整细胞密度为 5×10^5 个/mL，接种于 6 孔板，每孔 1 mL，培养 24 h 待细胞充分贴壁，加入 CALCBP 使其终质量浓度为 50、100、200 μg/mL，同时设置对照组。继续培养 24 h，按常规方法消化、收集细胞，PBS 清洗 2 次，用 70%乙醇于−20 ℃处理 24 h，PI 染色液（100 μg/mL RNase 和 50 μg/mL PI）染色 0.5 h，流式细胞仪检测细胞周期。

2.4 DAPI 染色法观察细胞凋亡形态

取对数生长期细胞，接种于盖玻片上，培养 24 h 待细胞充分贴壁，弃去上清液，加入 CALCBP 使其终质量浓度分别为 50、100、200 μg/mL，同时设置对照组。继续培养 24 h 后，弃上清液，用预冷 PBS 清洗 2 次，4%多聚甲醛固定 10 min。除去多聚甲醛，加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液洗涤 10 min，用 100 ng/mL 的 DAPI 避光常温孵育 10 min。0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液洗涤 2 次，取出盖玻片封片，荧光显微镜观察细胞形态。

2.5 流式细胞术（AnnexinV FITC/PI 双染色法）检测细胞凋亡

调整细胞密度为 5×10^5 个/mL，接种于 6 孔板，每孔 1 mL。培养 24 h 待细胞充分贴壁，加入 CALCBP 使其终质量浓度分别为 50、100、200 μg/mL，同时设对照组。继续培养 24 h，用不含 EDTA 的胰蛋白酶消

化收集细胞，按试剂盒说明书测定细胞凋亡率。

2.6 细胞内活性氧（ROS）水平检测

调整细胞密度为 5×10^5 个/mL，接种 6 孔板，每孔 1 mL。培养 24 h 待细胞充分贴壁，加入 CALCBP 使其终质量浓度分别为 50、100、200 μg/mL，同时设置对照组。继续培养 4 h，弃上清，每孔加入 1 mL 10 μmol/mL 的 DCFH-DA，37 ℃避光孵育 30 min，预冷 PBS 清洗 2 次，每孔加入 200 μL PBS，荧光显微镜观察。

2.7 细胞线粒体膜电位检测

调整细胞密度为 5×10^5 个/mL，接种于 6 孔板，每孔 1 mL。培养 24 h 待细胞充分贴壁，加入 CALCBP 使其终质量浓度分别为 50、100、200 μg/mL，同时设置对照组。继续培养 24 h，弃上清，预冷的 PBS 洗涤 2 次。按 JC-1 试剂盒说明书操作，荧光显微镜观察。

2.8 Western blotting 检测细胞相关蛋白表达

调整细胞密度为 5×10^5 个/mL，接种于 6 孔板，每孔 1 mL。细胞培养 24 h，待细胞贴壁后，加入 CALCBP 使其终质量浓度为 50、100、200 μg/mL，同时设置对照组。继续培养 24 h，收集细胞提取总蛋白，BCA 法测定蛋白质质量浓度。SDS-PAGE 分离蛋白，转印至 PVDF 膜，用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h，分别加入 GAPDH、Bcl-2、Bax、Cytochrome C、p-p38、p38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK 和 p53 抗体（1∶1 000），4 ℃过夜，用 TBST 洗膜，加入二抗（1∶2 000）常温孵育 1 h，TBST 洗涤，采用化学发光检测，记录结果。

2.9 统计学方法

数据采用 Origin 8.0 软件进行统计分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用 t 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 CALCBP 的组成

CALCBP 中绿原酸质量分数为 61.48%，隐绿原酸为 9.75%，顺式-5-咖啡酰绿原酸为 10.15%，新绿原酸为 2.4%，绿原酸样化合物总质量分数达 83.78%。

3.2 CALCBP 对 SGC-7901 细胞活力的影响

对照组细胞存活率为（86.93 ± 3.26）%，CALCBP 100、200 μg/mL 处理 24 h 后细胞存活率分别为（74.32±3.18）%和（34.25±2.55）%，与对照组比较差异显著（P＜0.05、0.01）。提示 CALCBP 能显著抑制 SGC-7901 细胞增殖，且呈剂量依赖性。当 CALCBP 质量浓度达到 400 μg/mL 时，出现细胞坏死现象，表现为细胞变圆、皱缩、脱落。相同浓度下，随作用时间延长，细胞存活率也随之显著降低，说明 CALCBP 能以时间依赖方式抑制 SGC-7901 细胞增殖，见图 1。

3.3 CALCBP 对 SGC-7901 细胞周期的影响

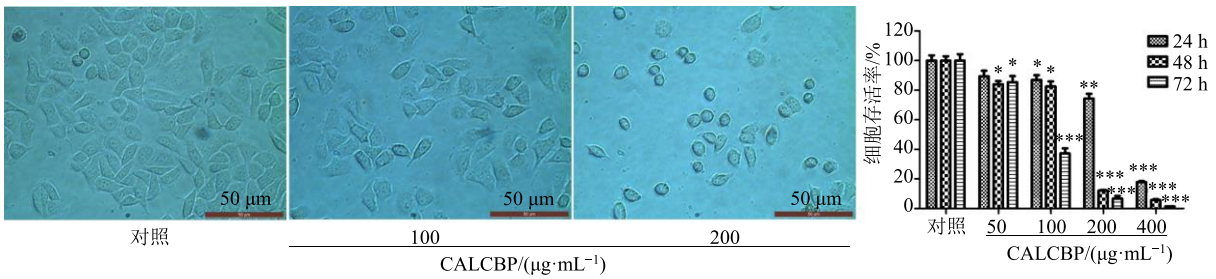
由图 2 可见，与对照组比较，CALCBP 50、100、200 μg/mL 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后，S 期细胞减少，G_2/M 期细胞增加，其中 CALCBP 100、200 μg/mL 组差异显著（P＜0.05、0.01、0.001）。提示较高剂量的 CALCBP 可将 SGC-7901 细胞阻滞于 G_2/M 期。

3.4 CALCBP 对 SGC-7901 细胞凋亡形态的影响

由图 3 可见，对照组细胞核染色均匀，呈现低强度荧光；CALCBP 50、100、200 μg/mL 处理 24 h 后，SGC-7901 细胞大部分出现浓缩的染色体和凋亡小体，荧光强度增加，且随 CALCBP 质量浓度增大，荧光强度有增加的趋势。表明 CALCBP 以剂量依赖方式诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

3.5 CALCBP 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

CALCBP 50、100、200 μg/mL 处理 24 h 后，



与对照组比较：*P＜0.05 **P＜0.01 ***P＜0.001，下同

*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 *vs* control group, same as below

图 1 CALCBP 对 SGC-7901 细胞形态及细胞活力的影响（$\bar{x} \pm s$, n = 3）

Fig. 1 Effect of CALCBP on morphology and cell viability of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

SGC-7901 细胞凋亡率分别为（7.63±4.54）%、（11.37±2.70）%、（18.47±1.97）%，其中 100、200 μg/mL 处理组与对照组 [（3.27±1.48）%] 比较差异显著（P<0.05、0.001）。且随着 CALCBP 质量浓度增加，细胞凋亡率呈上升趋势。提示 CALCBP 以剂量依赖方式诱导 SGC-7901 细胞凋亡，见图 4。

3.6　CALCBP 对 SGC-7901 细胞 ROS 水平的影响

由图 5 可见，对照组绿色荧光的细胞最少。与对照组比较，CALCBP 各质量浓度组绿色荧光细胞显著增多（P<0.05、0.01），表明随着 CALCBP 质

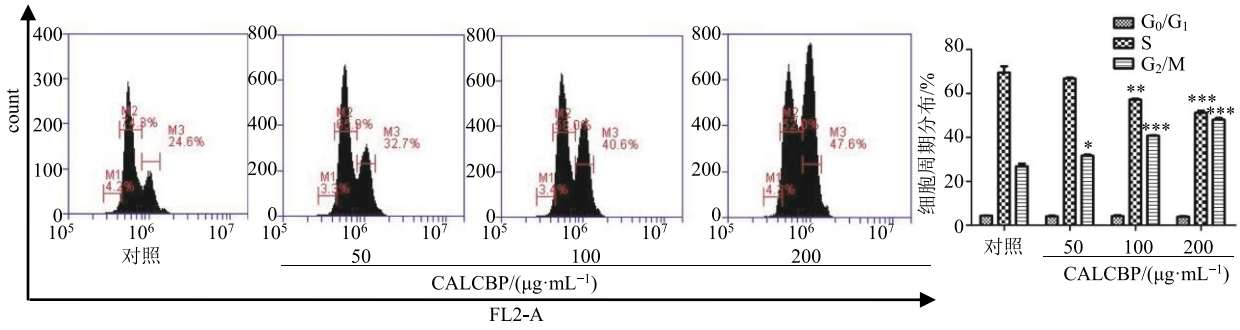


图 2　CALCBP 对 SGC-7901 细胞周期的影响（$\bar{x}$ ±s, n = 3）

Fig. 2　Effect of CALCBP on cell cycle arrest of SGC-7901 cells ($\bar{x}$ ±s, n = 3)

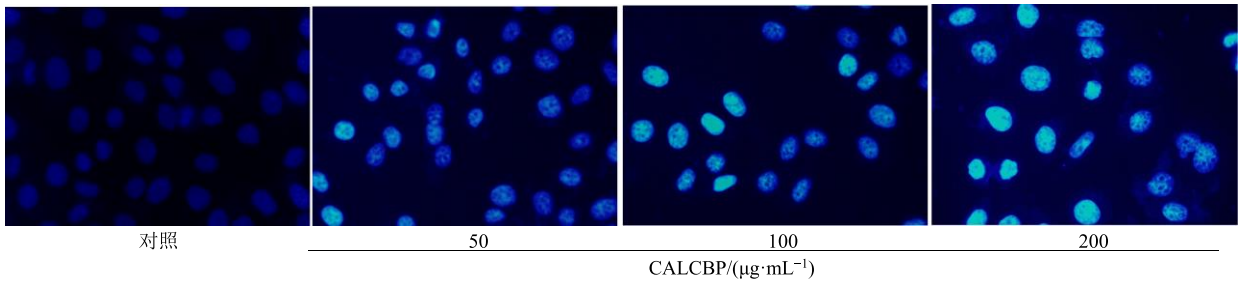


图 3　CALCBP 对 SGC-7901 细胞凋亡形态的影响

Fig. 3　Effect of CALCBP on apoptotic morphology of SGC-7901 cells

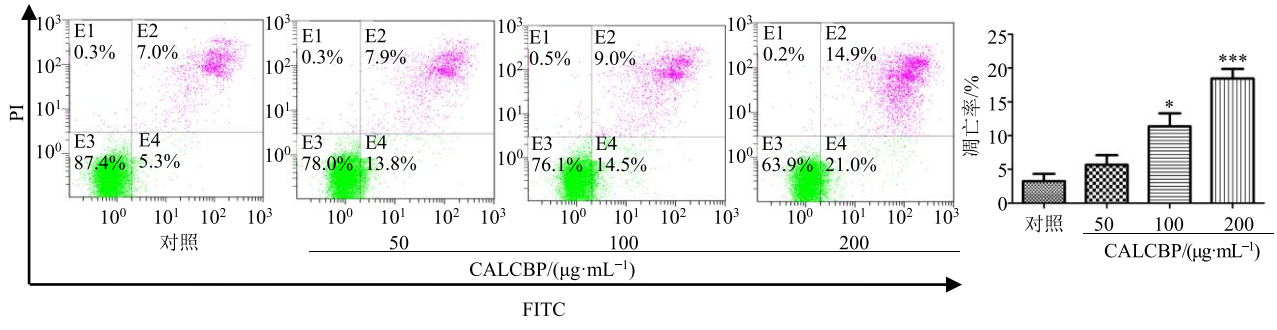


图 4　CALCBP 对 SGC-7901 细胞凋亡率的影响（$\bar{x}$ ±s, n = 3）

Fig. 4　Effect of CALCBP on apoptosis of SGC-7901 cells ($\bar{x}$ ±s, n = 3)

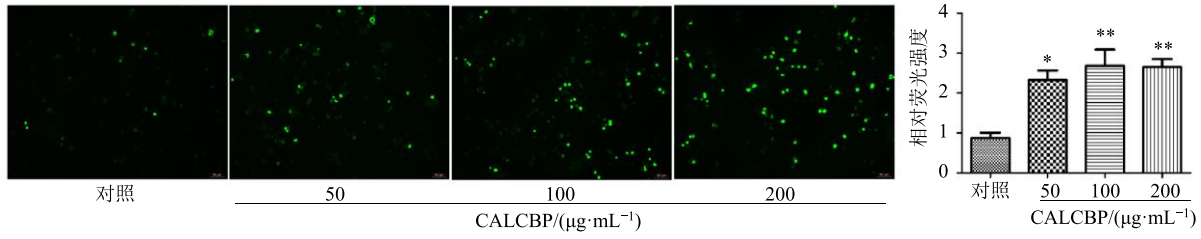


图 5　CALCBP 对 SGC-7901 细胞内 ROS 水平的影响（$\bar{x}$ ±s, n = 3）

Fig. 5　Effect of CALCBP on intracellular ROS level of SGC-7901 cells ($\bar{x}$ ±s, n = 3)

量浓度增加，细胞内 ROS 水平显著升高。

3.7 CALCBP 对 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的影响

细胞线粒体膜电位的变化是细胞早期凋亡的显著特征。JC-1 是一种检测线粒体膜电位的理想探针，在线粒体膜电位较高时，JC-1 聚集在线粒体基质中，形成聚合物（J-aggregates），并产生红色荧光；在线粒体膜电位较低时，此时 JC-1 为单体，不能聚集在线粒体基质，呈现绿色荧光。可以通过红绿荧光的相对比例来衡量线粒体膜电位去极化的比例。由图 6 可见，随着 CALCBP 质量浓度增加，红色荧光强度下降，绿色荧光强度增强，证实 CALCBP 能促进 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的去极化，并呈剂量依赖关系。

3.8 CALCBP 对 SGC-7901 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

由图 7 可见，与对照组比较，CALCBP 能上调 SGC-7901 细胞线粒体凋亡途径相关的 Bax 蛋白表

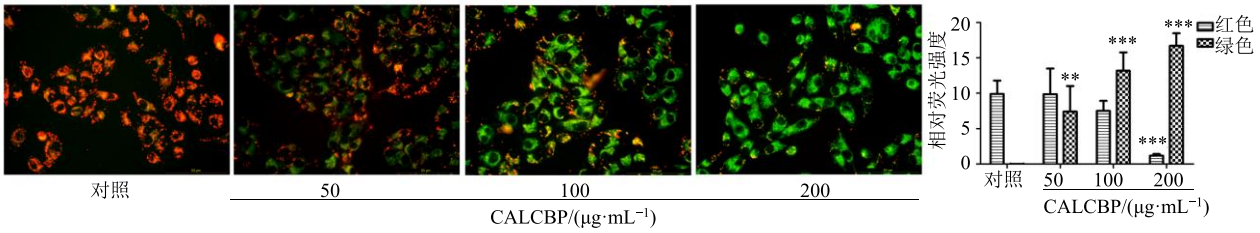


图 6 CALCBP 对 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of CALCBP on cell mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

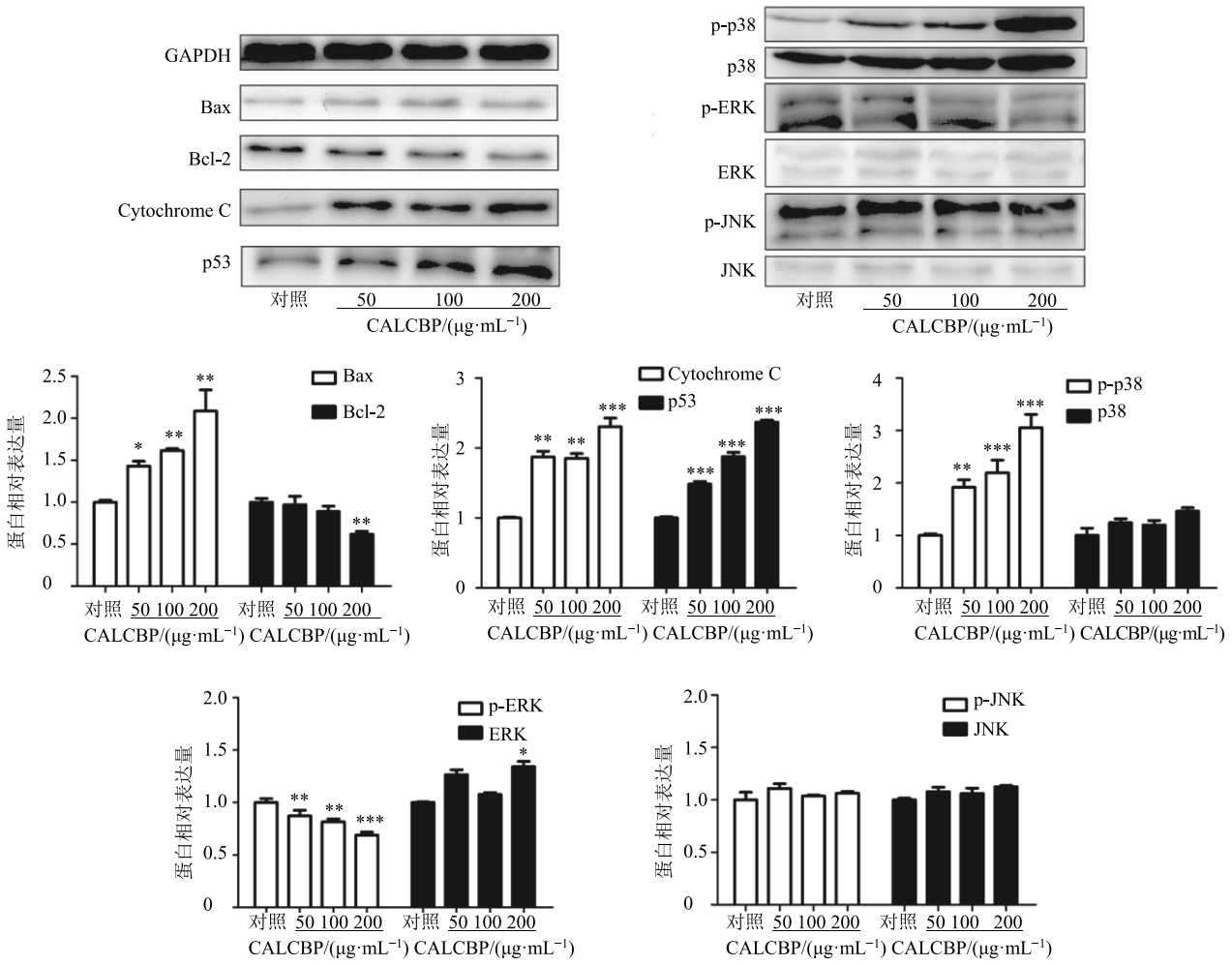


图 7 CALCBP 对 SGC-7901 细胞相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of CALCBP on relative protein expression of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

达水平（P＜0.05、0.01），下调 Bcl-2 表达水平（P＜0.01），由线粒体释放到胞浆的 Cytochrome C 显著增加（P＜0.01、0.001）；对于 p53 信号通路和 MAPK 信号通路，CALCBP 能显著上调 SGC-7901 细胞 p53 和 p-p38 表达水平（P＜0.01、0.001），下调 p-ERK 表达水平（P＜0.01、0.001），但对 p38、JNK、p-JNK 的表达无影响。虽然 CALCBP 有上调 ERK 表达的趋势，在 200 μg/mL 质量浓度时达到显著水平，但 p-ERK/ERK 的相对表达量显著下调，证明 pERK-MAPK 信号通路被抑制。提示 CALCBP 能通过激活 p38-MAPK 信号通路、抑制 pERK-MAPK 信号通路，上调核转录因子 p53 表达，使细胞周期阻滞于 G_2/M 期，并启动细胞凋亡。

4 讨论

绿原酸是由奎尼酸和某些反式羟基肉桂酸形成的一种可食用酚酸，广泛存在于咖啡、李子、梨、苹果等多种植物中[3]。本研究发现构树提取物中含有绿原酸、隐绿原酸、顺式-5-咖啡酰绿原酸、新绿原酸等多种绿原酸样结构类似物。并证实 CALCBP 能以剂量和时间依赖方式显著抑制体外培养的 SGC-7901 细胞增殖，诱导细胞凋亡，其有效质量浓度为 50～200 μg/mL，更高质量浓度的 CALCBP 则引起细胞变性和坏死。

细胞凋亡是多基因调控的细胞程序性死亡。已发现多种细胞凋亡途径，包括线粒体、内质网、死亡受体和一氧化氮（NO）介导的细胞凋亡途径[4]。线粒体作为细胞能量代谢的重要场所，其功能紊乱直接影响到细胞的生命活动，导致细胞凋亡[5]。线粒体介导的凋亡途径以线粒体膜电位下降、Cytochrome C 的释放和 Caspase-3 的切割开始，最终导致细胞凋亡。同时，MAPK 的激活参与细胞凋亡过程。本研究发现，在 CALCBP 作用下，SGC-7901 细胞线粒体膜电位显著降低，Cytochrome C 的释放显著增加；同时线粒体外膜上 Bax 蛋白表达水平升高，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下降，从而引发 SGC-7901 细胞凋亡。

ROS 是线粒体代谢过程中产生的，但过多的 ROS 产生和积累会导致细胞产生氧化应激，从而破坏细胞中生物大分子物质，并引发一系列的疾病，如动脉粥样硬化、糖尿病和肿瘤等[6]。ROS 又可以作为一种信号分子，调节细胞信号通路，影响细胞的增殖和存活。过量 ROS 积累会导致 DNA 发生氧化损伤，致使细胞周期发生延迟或阻滞。Vitaglione 等[7]研究表明咖啡的绿原酸可以降低结肠直肠癌风险，增加结肠运动，增强抗氧化能力。Hou 等[8]也已证明，绿原酸能促进结肠癌细胞 ROS 的释放和抑制细胞增殖。Qi 等[9]提取的猴腿菜有效成分绿原酸能引起肝癌 HepG2 细胞线粒体功能紊乱和氧化应激，从而促进细胞凋亡。本研究证实，CALCBP 具有相似的抗肿瘤效果，CALCBP 处理 SGC-7901 细胞后，胞内 ROS 水平显著升高，并使其细胞阻滞在 G_2/M 期，细胞凋亡率显著升高。可见构树绿原酸诱导 SGC-7901 细胞凋亡可能与线粒体介导的凋亡途径有关。

本研究证实，CALCBP 通过激活 SGC-7901 细胞 p38-MAPK 信号途径激活 p53，上调 Bax 表达和抑制 Bcl-2 的表达，被激活的 p38-MAPK 途径会导致线粒体 Cytochrome C 的释放[10]，并在细胞质中与 Apaf-1 结合，形成 Cytochrome C/Apaf-1 复合物激活 Caspase-9，进而激活 Caspase-3 和下游其他 Caspases 分子，从而引起细胞凋亡。Yamagata 等[3]发现绿原酸能减少 Bcl-2 和增加 Bax、Caspase-3 基因的表达，并通过诱导 p38-MAPK 表达，抑制肺癌 A549 细胞的增殖，与本研究结果具有相同之处。

作为众多肿瘤细胞重要的分子靶点，p53 在肿瘤细胞凋亡与细胞周期中发挥极其重要的作用[11]。当细胞处于应激状态下，p53 被激活并以稳定的形式与 DNA 形成四聚体，以序列特异性的方式介导细胞基因转录，调控细胞活动[12]，使细胞周期阻滞以完成 DNA 修复或介导细胞凋亡。另一方面，CALCBP 能抑制 SGC-7901 细胞 ERK-MAPK 信号通路，从而抑制细胞生长并诱导细胞凋亡。研究证实 JNK 不仅参与 p53 调节，而且磷酸化的 JNK 介导的翻译后修饰使随后的 Bcl-2 发生蛋白水解。但从本研究结果来看，CALCBP 对 SGC-7901 细胞 JNK 信号通路影响不大。

参考文献

[1] Park S, Fudhaili A, Oh S S, *et al*. Cytotoxic effects of kazinol A derived from *Broussonetia papyrifera* on human bladder cancer cells, T24 and T24R2 [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(12): 1462-1468.

[2] 豆沉着, 赵云涛, 陈绍红, 等. 构树总黄酮诱导 HepG2 细胞凋亡及其机理研究 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 109-113.

[3] Yamagata K, Izawa Y, Onodera D, *et al*. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene

expression in A549 human lung cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, doi: 10.1007/s11010-017-3171-1.

[4] Kuo C T, Hsu M J, Chen B C, *et al*. Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 177(1): 48-58.

[5] Yan F, Wang M, Li J, *et al*. Gambogenic acid induced mitochondrial-dependent apoptosis and referred to phospho-Erk1/2 and phospho-p38 MAPK in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 33(2): 181-190.

[6] Ray P D, Huang B W, Yoshiaki T. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(5): 981-990.

[7] Vitaglione P, Fogliano V, Pellegrini N. Coffee, colon function and colorectal cancer [J]. *Food Funct*, 2012, 3(9): 916-922.

[8] Hou N, Liu N, Han J, *et al*. Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells [J]. *Anticancer Drug*, 2017, 28(1): 59-65.

[9] Qi G, Liu Z, Fan R, *et al*. *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching extract induce apoptosis via mitochondrial dysfunction and oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2275-2289.

[10] Jiang X, Zhu X, Huang W, *et al*. Garlic-derived organosulfur compound exerts antitumor efficacy via activation of MAPK pathway and modulation of cytokines in SGC-7901 tumor-bearing mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.intimp.2017.05.004.

[11] Li Y, Jenkins C W, Nichols M A, *et al*. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 [J]. *Oncogene*, 1994, 9(8): 2261-2268.

[12] Vazquez A, Bond E E, Levine A J, *et al*. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 979-987.