

β -羟基异戊酰紫草素对人肺癌 A549 裸鼠移植瘤生长的影响及其机制研究

鲍敏^{1,2,3,4}, 杨文龙^{1,3,4}, 潘枢^{1,3,4}, 史宏灿^{1,3,4*}

1. 扬州大学临床医学院 胸心外科, 江苏 扬州 225001

2. 安徽医学高等专科学校, 安徽 合肥 230000

3. 江苏省老年病中西医结合医学重点实验室, 江苏 扬州 225001

4. 扬州大学 转化医学中心, 江苏 扬州 225001

摘要:目的 探讨 β -羟基异戊酰紫草素 (β -HIVS) 对人肺癌 A549 裸鼠移植瘤生长的影响, 并探讨其可能机制。方法 建立人肺癌裸鼠移植瘤模型, 随机分为对照组, β -HIVS 低、中、高剂量 (10、20、40 mg/kg) 组和紫杉醇 (30 mg/kg) 组, 每组 6 只。各组 ip 给药, 每次 0.2 mL, 每周 2 次, 连续用药 4 周。检测裸鼠体质量、肿瘤体积、瘤质量等, 绘制肿瘤生长曲线, 并计算抑瘤率。TUNEL 法检测 β -HIVS 处理后各组移植瘤组织中的细胞凋亡情况; 免疫组化法、Western blotting 和实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 检测各组移植瘤组织中 p53、Bcl-2 蛋白和 mRNA 的表达。结果 β -HIVS 能够较好地抑制肺癌裸鼠移植瘤的生长, 能明显缩小肿瘤体积, 且呈剂量依赖性。TUNEL 法显示 β -HIVS 处理后肿瘤细胞凋亡较对照组明显增多。免疫组化结果显示 β -HIVS 处理后移植瘤组织中 p53 蛋白表达有升高的趋势, 而 Bcl-2 蛋白表达有降低的趋势。Western blotting 和 qRT-PCR 结果与免疫组化有相同的变化趋势。结论 β -HIVS 对人肺癌 A549 裸鼠移植瘤具有明显的抑制作用, 其机制可能与上调 p53 的表达和下调 Bcl-2 的表达, 诱导肺癌细胞凋亡有关。

关键词: β -羟基异戊酰紫草素; 肺癌; 裸鼠; 移植瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5339-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.018

Effect of β -hydroxyisovaleryl shikonin on growth of lung adenocarcinoma cells A549 in nude mice and its mechanism

BAO Min^{1,2,3,4}, YANG Wen-long^{1,3,4}, PAN Shu^{1,3,4}, SHI Hong-can^{1,3,4}

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Clinical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

2. Anhui Medical College, Hefei 230000, China

3. Key Laboratory of Integrative Medicine in Geriatrics Control of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

4. Center of Translational Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Abstract: Objective To study the effects of β -hydroxyisovaleryl shikonin (β -HIVS) on the growth of human lung cancer A549 cells in nude mice and explore its mechanism. **Methods** Thirty mice with subcutaneous xenografts of a lung cancer cell line (A549) were randomly divided into five groups: negative control group, positive control group (paclitaxel), and low-dose, medium-dose, and high-dose β -HIVS groups (10, 20, and 40 mg/kg, respectively). There were six mice in each group. Tumor volume, tumor weight, and body weight were measured to draw up tumor growth curves and the tumor weight inhibition rates were calculated. The apoptosis rates were measured by TUNEL staining method. The protein and mRNA expression of p53 and Bcl-2 were assessed by immunohistochemical staining, Western blot, and quantitative real-time PCR analysis. The mice in each group were administrated with β -HIVS (0.2 mL, ip) twice each week for four consecutive weeks. **Results** The β -HIVS could inhibit the growth of A549 xenografts in a dose-dependent manner. TUNEL assay showed that the apoptotic rate of tumor cells in β -HIVS-treated mice were significantly higher than the negative control group. The protein and mRNA expression of p53 was up-regulated, while the expression of Bcl-2 was down-regulated in nude mice after the treatment with β -HIVS. **Conclusion** β -HIVS significantly inhibited the growth of

收稿日期: 2018-04-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81701825, 81770018); 江苏省临床医学科技专项项目 (2013023); 江苏省研究生教育创新项目 (KYLX16-1410)

作者简介: 鲍敏 (1979—), 女, 博士研究生, 研究方向为中西医结合基础。E-mail: baomin7156@163.com

*通信作者 史宏灿, 博士生导师, 扬州大学医学院。E-mail: shihongcan@hotmail.com

A549 cell xenografts in nude mice, which might be related with the up-regulation of p53 expression and down-regulation of Bcl-2 expression.

Key words: β -hydroxyisovaleryl shikonin; lung cancer; nude mice; xenograft; apoptosis

肺癌是当今世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,严重危害人类健康^[1]。目前临床上主要采用手术、放疗和化疗方法治疗肺癌,但放疗和化疗在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常组织和细胞也有较大的杀伤作用,治疗效果不理想。对于失去最佳手术时机的晚期肺癌患者,中西医结合治疗方式则成为最佳选择,因此从传统中药中寻求毒性较低的治疗药物已成为研究的热点^[2-3]。紫草素是从紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 中提取的萘醌类化合物,具有解毒、抗炎、抗菌和抗肿瘤作用^[4-5],主要通过细胞毒作用、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移、抑制肿瘤血管生成等多种机制发挥抗肿瘤作用^[6]。但由于其毒性较大且特异性较差,故未能在临床广泛应用^[7]。 β -羟基异戊酰紫草素(β -HIVS)是天然存在的紫草素衍生物之一,研究报道 β -HIVS 对多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用,但其具体作用机制尚不完全清楚^[8-9]。本实验在前期体外实验研究^[10]的基础上,选用裸鼠 A549 肺癌皮下移植瘤模型,进一步探讨 β -HIVS 抑制肺癌生长的效应,并对其机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 药品

β -HIVS 购自日本 WAKO 公司,使用时用二甲基亚砜(DMSO)溶解,并使 DMSO 的终质量浓度 <0.01 g/L, -20 °C 避光保存。紫杉醇注射液(批号 16122401)购于天津一方科技有限公司。

1.2 细胞与试剂

人肺腺癌 A549 细胞由中国科学院细胞库提供;胎牛血清(美国 Gibco 公司);DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒及 qRT-PCR 技术检测试剂盒(Takara 公司);p53、Bcl-2、GAPDH 单克隆抗体(英国 Abcam 公司);p53、Bcl-2、GAPDH 引物由上海生工生物技术股份有限公司合成;免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色剂购于南京凯基生物技术公司;一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)购自上海碧云天生物技术研究。

1.3 动物

SPF 级裸鼠 30 只,雌性,4 周龄,体质量 18~

20 g,由扬州大学动物实验中心提供,许可证号 SCXK(苏 2017-0007),在扬州大学比较医学中心屏障系统辅以洁净层流柜环境中饲养。动物实验取得扬州大学医学伦理委员会的批准。

1.4 仪器

Synergy 型全自动酶标板分析仪(美国 Bio-Tek 公司);801 正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);小型垂直电泳槽、Power Pac Basic 型电转移装置、Molecular Imager ChemiDoc XRS+Image Lab 2.0 型成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 裸鼠成瘤、实验分组及给药

取对数生长期的 A549 细胞,用无血清培养基调整细胞密度至 1×10^7 个/mL,于每只裸鼠右侧腋下 sc 0.2 mL。接种时局部出现明显皮丘,3~5 d 后被接种裸鼠皮下出现肉眼可见的结节,边界清楚,直径 2~3 mm,提示裸鼠人肺癌皮下移植瘤模型制备成功。取荷瘤裸鼠 30 只,随机分为 5 组:对照组(含 1% DMSO 的生理盐水), β -HIVS 低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg)组,紫杉醇(30 mg/kg)组,每组 6 只。各组 ip 给药,每次 0.2 mL,每周 2 次,连续用药 4 周。给药过程中定时观察裸鼠精神、活动、饮食等一般情况。

2.2 肿瘤体积及质量测定

从给药当天开始,每隔 2 d 称量并记录裸鼠体质量,并用游标卡尺测量移植瘤的长径(a)及与之垂直的短径(b),计算肿瘤体积($V=a \times b^2/2$),绘制移植瘤的生长曲线。治疗结束后,颈椎脱臼处死裸鼠,完整剥离肿瘤组织,称取瘤质量,并计算抑瘤率。

抑瘤率=(对照组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量

2.3 TUNEL 法检测肿瘤组织中细胞凋亡情况

将取出的肿瘤组织进行固定、石蜡包埋,并按 4 μ m 厚切片,然后按 TUNEL 检测试剂盒说明书操作,检测肿瘤组织中的细胞凋亡情况。每张切片随机选取 5 个视野($\times 400$),计数细胞总数和凋亡细胞数,并计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率=凋亡细胞数/肿瘤细胞总数

2.4 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 p53、Bcl-2 蛋白表达

取各组肿瘤组织, 10% 甲醛固定、石蜡包埋后, 进行免疫组化染色。每张切片按照试剂盒说明书加入适当比例一抗, 如 p53 (1:200)、Bcl-2 (1:500), 并用 PBS 代替一抗作为阴性对照, 二抗采用辣根过氧化物酶标记, 然后加新鲜配制的 DAB 溶液进行显色, 苏木素复染后封片。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对结果进行判定, 每张切片在 400 倍下随机选取 5 个视野, 对视野内棕黄色阳性信号进行图像分析, 测定平均积分吸光度值。

2.5 Western blotting 检测肿瘤组织中 p53、Bcl-2 蛋白的表达

取各组新鲜肿瘤组织 250 mg, 置入离心管中, 加入适量 PBS, 冰上匀浆机小心研磨, 提取细胞总蛋白, BCA 法定量, 进行 SDS-PAGE 电泳, 将分离后的蛋白质电转移到 PVDF 膜, 封闭液室温封闭 2 h, 分别加入 1:1 000 稀释的 p53 和 Bcl-2 的抗体, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入 1:2 000 稀释的二抗, 孵育 2 h。Molecular Imager ChemiDoc XRS + Imaging System 成像系统中采集图像。以 GAPDH 为内参, 分析目的条带代表的蛋白表达水平。

2.6 qRT-PCR 检测 p53、Bcl-2 mRNA 的表达

取各组新鲜肿瘤组织 250 mg, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录为 cDNA。采用 qRT-PCR 技术检测 p53、Bcl-2 的 mRNA 水平。以 GAPDH 为内参, 进行数据分析。反应条件为 95 °C、5 min, 95 °C、10 s, 60 °C、34 s, 40 °C、10 s, 40 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析待测样品中各基因的相对表达程度。

2.7 统计分析

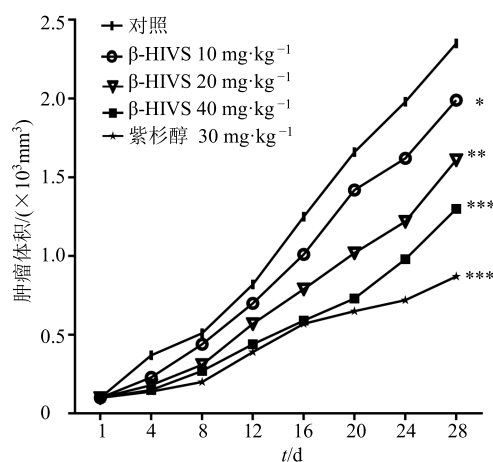
所有实验均重复 3 次以上, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 21.0 和 Graph Pad Prism 7.0 统计软件分析, 单因素两均数的比较采用 t 检验, 多均数的比较采用方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 β -HIVS 对人肺癌裸鼠移植瘤生长的影响

移植瘤模型建立初期, 裸鼠饮食、行为和精神状态均表现正常。在给予 β -HIVS 及紫杉醇治疗后, 裸鼠的饮食、行为和精神状态并无明显异常, 且治疗过程中各给药组裸鼠体质量与对照组相比也无显著性差异。实验期间, 各组裸鼠移植瘤体积均不同程度的增长, 其中对照组移植瘤生长迅速,

β -HIVS 各组及紫杉醇组移植瘤生长相对缓慢。如图 1 所示, 各给药组在给药后第 4 周与对照组比较, 肿瘤体积具有显著差异。各组肿瘤质量结果见表 1, β -HIVS 各组及紫杉醇组的肿瘤质量较对照组明显减轻。 β -HIVS 低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 17.1%、44.7%、55.3%。以上结果说明 β -HIVS 在体内能够抑制肺癌裸鼠移植瘤的生长, 并且呈现剂量依赖性。



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 β -HIVS 对 A549 荷瘤裸鼠肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Fig. 1 Effect of β -HIVS on tumor volume of A549 xenograft in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 1 β -HIVS 对 A549 荷瘤裸鼠肿瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Table 1 Effect of β -HIVS on tumor weight of A549 xenograft in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
对照	—	1.23 ± 0.12	—
β -HIVS	10	1.02 ± 0.09*	17.1
	20	0.68 ± 0.11**	44.7
	40	0.55 ± 0.05***	55.3
紫杉醇	30	0.51 ± 0.12***	58.5

3.2 β -HIVS 对移植瘤组织中细胞凋亡的影响

荧光显微镜下观察各组移植瘤组织中的细胞凋亡情况, 结果见图 2。TUNEL 染色法检测的阳性的凋亡细胞其细胞核呈蓝绿色, 且细胞核突出在细胞边缘; 非凋亡细胞的细胞核呈蓝色。计算各组移植瘤组织中的细胞凋亡率, 对照组为 (6.57 ± 0.76)%, β -HIVS 低、中、高剂量组依次为 (8.98 ± 1.12)%, (24.21 ± 2.04)%, (33.56 ± 1.17)%, 紫杉醇组为 (36.02 ± 1.07)%。 β -HIV 各给药组与对照组相比, 差异均显著 ($P < 0.05$)。

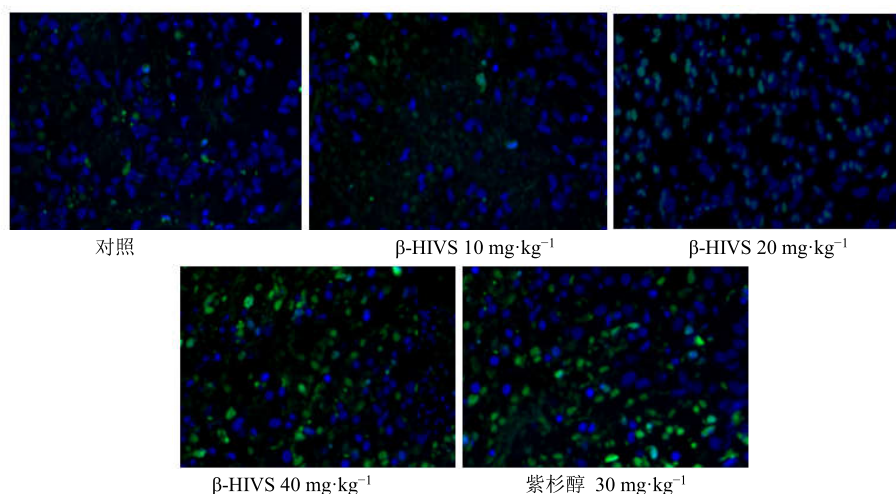


图 2 TUNEL 法检测肿瘤组织中细胞凋亡

Fig. 2 Cell apoptosis in tumor tissue by TUNEL

3.3 β-HIVS 对移植瘤组织中 p53 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

免疫组化染色结果见图 3, p53、Bcl-2 蛋白的阳性反应均为棕黄色颗粒染色, 其中 p53 阳性定位于细胞核, Bcl-2 阳性表达定位于细胞浆。通过比较各组肿瘤组织中蛋白表达的平均积分吸光度值 (表 2), 与对照组比较, β-HIV 各给药组的 p53 表达明显增高, Bcl-2 的表达明显降低。Western blotting 法检测结果如图 4 所示, 与对照组相比, 随着 β-HIVS 剂量的增加, 移植瘤组织中 p53 蛋白的

表达水平逐渐升高, Bcl-2 蛋白表达水平逐渐降低, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

3.4 β-HIVS 对移植瘤组织中 p53 和 Bcl-2 的 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果显示 p53 和 Bcl-2 和 GAPDH 基因的熔解曲线均为单峰, 说明为单一片段扩增特异性较好。对照组比较, β-HIV 各给药组及紫杉醇组的 p53 mRNA 表达明显增高, Bcl-2 的 mRNA 表达明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 见图 5。

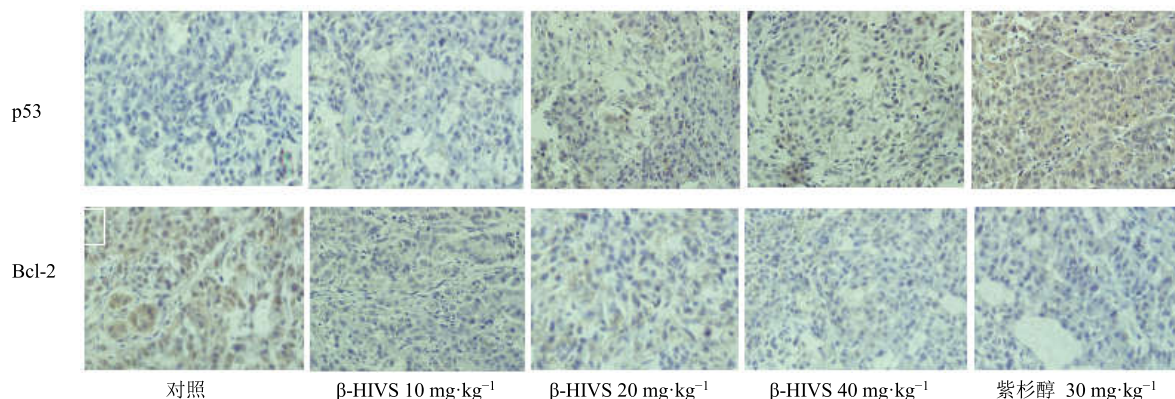


图 3 免疫组化实验检测 β-HIVS 对移植瘤组织中 p53 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of β-HIVS on expression of p53 and Bcl-2 in tumor tissues by immunohistochemical staining method

表 2 β-HIV 对肿瘤组织中 p53 和 Bcl-2 表达平均积分吸光度值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 2 Effect of β-HIV on mean integrated absorbance value in expression of p53 and Bcl-2 in tumor tissues ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	p53	Bcl-2
对照	—	0.003 89±0.000 12	0.141 6±0.004 2
β-HIVS	10	0.011 20±0.001 90**	0.115 8±0.001 7**
	20	0.036 80±0.001 10**	0.088 7±0.005 1***
	40	0.075 50±0.003 50***	0.059 6±0.003 9***
	紫杉醇	0.079 50±0.001 20***	0.049 7±0.004 2***

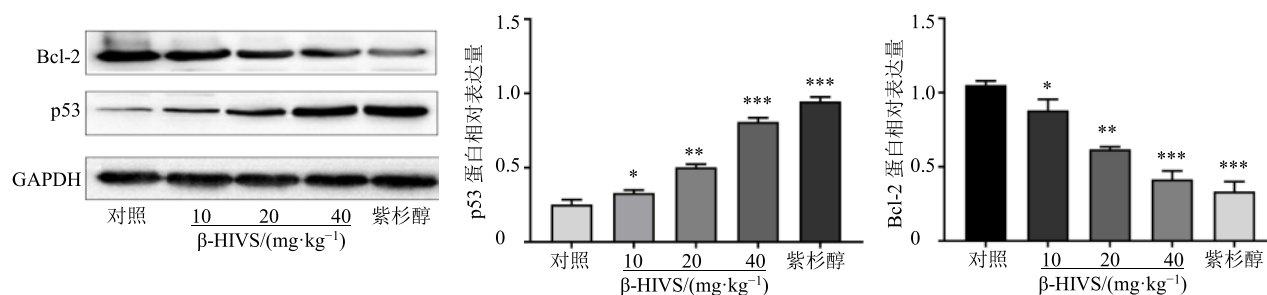


图 4 Western blotting 检测 β -HIVS 对移植瘤组织中 p53 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of β -HIVS on protein expression of p53 and Bcl-2 in tumor tissues by using Western blot ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

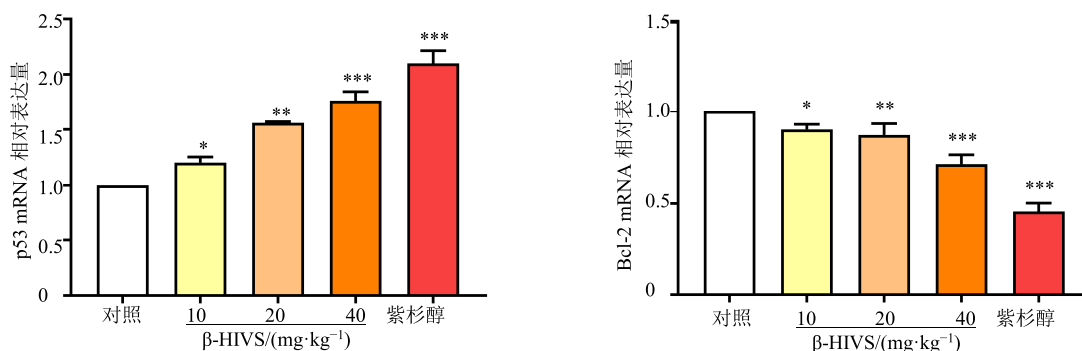


图 5 β -HIVS 对移植瘤组织中 p53 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of β -HIVS on mRNA expression of p53 and Bcl-2 in tumor tissues ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

本研究前期体外实验结果显示, β -HIVS 呈浓度和时间依赖性抑制肺癌 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移, 抑制细胞从 G₀/G₁ 期向 S 期转变, 并诱导细胞凋亡。但由于肿瘤细胞在体外的生长环境与体内不同, 所以研究所得出的结论也有着一定的局限性。动物在体实验能够更加贴合实际模拟肿瘤的生长环境, 在肿瘤学、免疫学及药物实验等方面有着重要意义, 成为肿瘤研究中至关重要的一部分^[11]。裸鼠是一种免疫缺陷动物, 具有无毛、无胸腺、裸体和免疫功能低下等特点, 对异种移植几乎不产生免疫排斥反应, 特别适用于人类肿瘤异种移植实验及相关研究^[12]。本研究发现与对照组相比, β -HIVS 在裸鼠体内能够抑制肺癌的生长, 这与体外实验的研究结论一致, 为 β -HIVS 用于临床肺癌防治提供新的实验依据。

有文献报道, β -HIVS 抑制肿瘤生长可能的作用机制是其作为一种 ATP 非竞争性蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 活性抑制剂, 抑制表皮生长因子受体 (EGFR) 等调控细胞周期和凋亡相关蛋白的活性, 降低 dUTP 核苷酸水解酶 (dUTPase) 活性, 以及抑制血

管内皮生长因子受体 (VEGFR) 的活性^[6]。在本研究中, 利用 Western blotting 技术和 qRT-PCR 技术检测 β -HIVS 对 A549 细胞裸鼠移植瘤组织中蛋白和 mRNA 的表达的影响, 发现与对照组相比, β -HIVS 用药组 p53 蛋白及 mRNA 的表达明显上调。p53 蛋白是细胞内重要的肿瘤抑制因子, 当细胞处于基因组损伤、致癌基因表达以及某些化学抗癌药物处理的情况下, p53 蛋白会被激活并诱导细胞凋亡来杀死异常细胞^[13]。在本研究结果提示, β -HIVS 抑制肺癌细胞增殖, 促进其凋亡的机制可能与上调 p53 蛋白的表达有关。Bcl-2 为 p53 的下游基因, p53 基因可通过调节 Caspase-3 蛋白酶调节 Bcl-2 的基因表达^[14-15]。Bcl-2 家族分子在细胞凋亡的调控中也起着重要的作用, 其中 Bcl-2 和 Bax 分别是最具代表性的抑制凋亡基因和促进凋亡基因。当 Bax 蛋白在细胞中表达较高时, 可形成同源二聚体 Bax/Bax, 从而促进细胞凋亡; 当 Bcl-2 蛋白表达量较高时, 可形成异源二聚体 Bcl-2/Bax, 从而抑制细胞凋亡^[16]。在本实验中, Bcl-2 蛋白以及 mRNA 的表达随着 β -HIVS 剂量的增加而逐渐降低。由此推测 β -HIVS 作用于肺癌细胞, 可以上调 p53 的表达, 下调 Bcl-2 的表

达,减少 Bcl-2/Bax 异源二聚体的形成,从而诱导移植瘤中的细胞发生凋亡。这可能是 β -HIVS 抑制肺癌细胞生长并诱导凋亡的重要作用机制之一。

综上所述, β -HIVS 能够抑制肺癌移植瘤的生长,可能通过增加 p53 基因的表达,降低 Bcl-2 基因的表达,促进肺癌细胞凋亡,从而发挥抗癌的作用,这为开发低毒高效的抗肿瘤药物提供了新的实验依据。 β -HIVS 是否直接作用于 p53 基因,还是通过调节其他信号分子而间接发挥作用仍不清楚,此外 β -HIVS 除通过调节 p53 基因外,是否还可调节其他信号通路促进细胞凋亡仍需进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Rovenská E. Importance of lymph angiogenesis and ultra structure of lymphatic capillaries in metastasis of malignant melanoma [J]. *Vnitr Lek*, 2014, 60(7/8): 582-585.
- [2] Garon E B, Ciuleanu T E, Arrieta O, *et al*. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): A multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2014, 384(9944): 665-673.
- [3] 周岱翰, 林丽珠, 周宜强, 等. 中西医结合治疗非小细胞肺癌近期疗效观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 25(2): 1061-1065.
- [4] Chen H M, Wang P H, Chen S S, *et al*. Shikonin induces immunogenic cell death in tumor cells and enhances dendritic cell-based cancer vaccine [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11): 1989-2002.
- [5] Dan L U, Jing Q, Wei L I, *et al*. β -hydroxyisovalerylshikonin induces human cervical cancer cell apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(6): 3434-3442.
- [6] Ha J H, Jang J, Chung S I, *et al*. AMPK and SREBP-1c mediate the anti-adipogenic effect of β -hydroxyisovalerylshikonin [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3): 816-824.
- [7] Duan D, Zhang B, Yao J, *et al*. Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *Free Rad Biol Med*, 2014, 70(5): 182-193.
- [8] Wang L, Li Z, Zhang X, *et al*. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: Attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF- κ B, TNF- α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(1): 97-106.
- [9] Jayasooriya R G, Lee K T, Lee H J, *et al*. Anti-inflammatory effects of β -hydroxyisovalerylshikonin in BV2 microglia are mediated through suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway and activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 65: 82-89.
- [10] 鲍敏, 杨文龙, 虞茜, 等. β -羟基异戊酰紫草素对肺腺癌 A549 细胞的生长抑制作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1634-1639.
- [11] Wang X, An Z, Geller J, *et al*. High-malignancy orthotopic nude mouse model of human prostate cancer LNCaP [J]. *Prostate*, 2015, 39(3): 182-186.
- [12] Xu N, Wang Y S, Pan W B, *et al*. Human-defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice [J]. *Mol Cancer Therap*, 2016, 7(6): 1588-1597.
- [13] Klemi P, Pylkkänen L, Kiilholma P, *et al*. p53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma [J]. *Cancer*, 2015, 76(7): 1201-1208.
- [14] Koukourakis M I, Giatromanolaki A, O'Byrne K J, *et al*. Potential role of bcl-2 as a suppressor of tumour angiogenesis in non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2015, 74(6): 565-570.
- [15] Levenson J D, Phillips D C, Mitten M J, *et al*. Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy [J]. *Sci Transl Med*, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4642.
- [16] Jin Y T, Kayser S, Kemp B L, *et al*. The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2015, 82(11): 2159-2165.