

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

鲍敏^{1,2,3,4}, 杨文龙³, 虞茜³, 万子衿³, 陈帅³, 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 通过体外实验研究 β -羟基异戊酰紫草素 (β -HIVS) 对人肺腺癌 A549 细胞生长的抑制作用, 并对其机制进行初步探讨。方法 体外培养 A549 细胞, 分为对照组和不同浓度的 β -HIVS 组。采用 CCK-8 法、流式细胞术、Transwell 小室法检测 β -HIVS 对 A549 细胞增殖、周期、凋亡、侵袭和迁移的影响; 实时荧光定量 PCR 技术和 Western blotting 法检测 β -HIVS 处理后 A549 细胞 p53、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达情况。结果 β -HIVS 能抑制 A549 细胞的增殖; 诱导 A549 细胞凋亡; 阻滞细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期的发展; 抑制细胞侵袭和迁移; 呈浓度依赖性地上调 p53 蛋白和 mRNA 的表达, 下调 Bcl-2 蛋白和 mRNA 的表达。结论 β -HIVS 可显著抑制 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移, 并诱导细胞凋亡, 其机制可能与上调 p53 的表达和下调 Bcl-2 的表达有关。

关键词: β -羟基异戊酰紫草素; 肺腺癌; 凋亡; 侵袭; 迁移

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)07-1634-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.022

Inhibitory effect of β -hydroxyisovaleryl shikonin on growth of human lung adenocarcinoma A549 cells and its mechanism

BAO Min^{1,2,3,4}, YANG Wen-long³, YU Xi³, WAN Zi-jin³, CHEN Shuai³, 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 vitro*, and to explore its mechanism. **Methods** A549 cells were cultured *in vitro* and divided into control group and β -HIVS groups. The effect of β -HIV on cell viability, cycle and apoptosis, invasion and migration of cells were studied by CCK-8 assay, flow cytometric and Transwell assay, respectively. The expression of p53 and Bcl-2 protein, and mRNAs were assessed by Western blotting and quantitative real-time PCR analysis. **Results** β -HIV could inhibit the proliferation of A549 cells, induce the apoptosis of A549 cells, block the G₀/G₁ phase progression to S phase, inhibit cell invasion and migration, upregulate the expression of p53 protein and mRNA in a concentration-dependent manner, and down-regulate the expression of Bcl-2 protein mRNA expression. **Conclusion** β -HIV can significantly inhibit the proliferation, invasion and migration of A549 cells and induce the apoptosis by regulating the expression of p53 and Bcl-2.

Key words: β -hydroxyisovaleryl shikonin; lung adenocarcinoma; apoptosis; invasion; migration

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^[1]。但由于其毒性较大且特异性较差, 故而未能在临床广泛应用^[2]。 β -羟基

收稿日期: 2018-01-07

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。Tel: 18919697156 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

异戊酰紫草素 (β -HIVS) 是天然存在的紫草素衍生物之一^[3]。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^[4]。本研究选择人肺腺癌 A549 细胞, 研究 β -HIVS 对 A549 细胞生长的影响及其可能的机制。

1 材料

1.1 药品

β -HIVS 购自日本 WAOK 公司 (批号 PEL2204, 质量分数为 98%), 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。

1.2 细胞与试剂

A549 细胞由中国科学院细胞库提供; 胎牛血清 (Gibco 公司); DMEM 培养基 (Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (Sigma 公司); Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购自日本同仁化学研究所; Transwell 小室 (Corning 公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司; 细胞周期检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司); 逆转录 (RT) 试剂盒及实时荧光定量 PCR 技术检测试剂盒 (Takara 公司); p53、Bcl-2、GAPDH 单克隆抗体 (Cell Signaling 公司); p53、Bcl-2、GAPDH 引物由上海生工生物技术公司合成。

1.3 仪器

Synergy 型全自动酶标板分析仪 (美国 Bio Tek 公司); Mini Protean Tetra System 型蛋白电泳槽、Power Pac Basic 型电转移装置、Molecular Imager ChemiDoc XRS+Image Lab 2.0 型成像系统均为 Bio Rad 公司产品; FACS Calibur 型流式细胞测定仪 (美国 Becton Dickinson 公司); 801 型正置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测 β -HIVS 对 A549 细胞增殖的影响

收集对数生长期 A549 细胞, 以 5×10^4 /mL 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L。加入不同浓度 β -HIVS (0、2、4、8、16、32 μ mol/L), 每组设 5 个平行孔, 分别在 0、12、24、48、96 h 时加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂, 37 °C 培养箱放置 2 h 后使用自动酶联免疫测定仪于 450 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次。以对照组细胞活性为参照, 计算各处理组细胞活性及抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 流式细胞术检测 β -HIVS 对 A549 细胞周期及凋亡的影响

取对数生长期 A549 细胞接种培养瓶, 设对照组及不同浓度给药组 (加入 0、2、4、8、16、32 μ mol/L 的 β -HIVS), 培养 24 h 后制成单细胞悬液, 细胞周期检测试剂固定及染色, 流式细胞仪检测细胞周期。检测细胞凋亡时每管加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 染液, 避光孵育 15 min 后流式细胞仪检测。计算凋亡率。

$$\text{凋亡率} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}$$

2.3 Western blotting 检测 A549 细胞 p53、Bcl-2 蛋白表达

取对数生长期的 A549 细胞, 以 5×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养过夜待其贴壁后, 分别用不同浓度 (0、2、4、8、16、32 μ mol/L) 的 β -HIVS 处理细胞, 24 h 后提取总蛋白, BCA 法定量, 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 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, 分析目的蛋白表达水平。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 A549 细胞 p53、Bcl-2 mRNA 的表达

取对数生长期的 A549 细胞, 以 5×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养过夜待其贴壁后, 分别用不同浓度 (0、2、4、8、16、32 μ mol/L) 的 β -HIVS 处理 A549 细胞, 24 h 后收集细胞, 用 TRIzol 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA。采用荧光实时定量 PCR 法检测 p53、Bcl-2 mRNA 表达水平。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量。

2.5 Transwell 小室法检测 A549 细胞侵袭和迁移能力

用无血清培养基将 Matrigel 胶 (11 mg/mL) 按 5:1 稀释, 取 40 μ L 稀释液均匀铺在 Transwell 小室的上室, 超净台内干燥过夜。实验前加入 30 μ L 无血清培养基 37 °C, 30 min 水化基底膜。用无血清培养液将细胞密度调整到 5×10^5 /mL, 加 200 μ L 到 Transwell 上室, 加 500 μ L 含 20% 胎牛血清的培养液到地下室。分别以终浓度为 0、2、4、8、16、32

$\mu\text{mol/L}$ 的 $\beta\text{-HIVS}$ 处理细胞, 每种浓度设 5 个复孔, 细胞继续培养 12 h, 取出 Transwell 小室, PBS 洗 2 遍, 棉签擦去上室表面细胞, 甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫室温下染色 30 min, 在高倍镜下计数小室膜下侵袭的细胞数, 计数中间和四周 5 个视野, 取平均值。迁移实验不铺 Matrigel 胶, 其余步骤同侵袭实验。

2.6 统计学方法

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 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞增殖的影响

对照组 A549 细胞体外生长活跃, $\beta\text{-HIVS}$ 对细

胞生长呈现抑制作用, 并且呈一定的浓度及时间依赖性 (表 1, 96 h 细胞抑制率均 $>95\%$, 表中未展示)。 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞在 12、24、48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 17.47、16.22、15.76 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞周期及凋亡的影响

由流式细胞仪检测结果可知, $\beta\text{-HIVS}$ 主要抑制 A549 细胞周期从 G_0/G_1 期向 S 期转变, 且细胞凋亡率明显升高 (表 2)。

3.3 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞侵袭和迁移能力的影响

Transwell 小室实验观察 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞侵袭和迁移能力的影响。与对照组比较, 经不同浓度 (0、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 的 $\beta\text{-HIVS}$ 处理细胞 24 h 后, 转移到膜下表面的细胞数目明显减少, 且呈现一定的浓度依赖性。提示 $\beta\text{-HIVS}$ 可抑制细胞的侵袭和迁移能力 (图 1、2 和表 3)。

表 1 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of $\beta\text{-HIVS}$ on cell viability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$C/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A 值			抑制率/%		
		12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
对照	—	1.32 ± 0.02	1.26 ± 0.01	1.18 ± 0.02	—	—	—
$\beta\text{-HIVS}$	2	1.24 ± 0.03	1.17 ± 0.02	$1.06 \pm 0.02^*$	$6.06 \pm 0.03^*$	$7.14 \pm 0.31^*$	$10.17 \pm 0.08^*$
	4	$1.15 \pm 0.02^*$	$1.07 \pm 0.01^*$	$0.95 \pm 0.01^*$	$12.87 \pm 1.05^*$	$15.08 \pm 1.06^{**}$	$19.49 \pm 1.05^{**}$
	8	$1.06 \pm 0.02^*$	$0.99 \pm 0.02^{**}$	$0.89 \pm 0.03^{**}$	$19.69 \pm 2.01^{**}$	$21.43 \pm 2.11^{**}$	$24.58 \pm 2.15^{**}$
	16	$0.63 \pm 0.02^{**}$	$0.61 \pm 0.01^{**}$	$0.59 \pm 0.02^{**}$	$52.27 \pm 6.05^{**}$	$52.38 \pm 1.42^{***}$	$53.45 \pm 3.76^{***}$
	32	$0.41 \pm 0.01^{***}$	$0.37 \pm 0.02^{***}$	$0.34 \pm 0.01^{***}$	$68.93 \pm 0.77^{***}$	$70.63 \pm 2.53^{***}$	$71.19 \pm 5.17^{***}$

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

表 2 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞周期及凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of $\beta\text{-HIVS}$ on cell cycle and apoptosis rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$C/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞比例/%			凋亡率/%
		G_0/G_1	S	G_2/M	
对照	—	54.46 ± 0.25	29.97 ± 0.35	15.57 ± 0.08	8.76 ± 0.12
$\beta\text{-HIVS}$	2	55.02 ± 0.41	29.59 ± 0.48	15.39 ± 0.06	$18.31 \pm 0.61^{**}$
	4	58.45 ± 0.13	$26.34 \pm 0.57^*$	15.21 ± 0.05	$25.67 \pm 0.43^{**}$
	8	$62.77 \pm 0.63^*$	$22.11 \pm 0.61^*$	15.12 ± 0.11	$32.51 \pm 0.58^{***}$
	16	$64.18 \pm 0.49^*$	$20.78 \pm 0.55^{**}$	$15.04 \pm 0.36^*$	$57.73 \pm 0.62^{***}$
	32	$65.15 \pm 0.37^{**}$	$19.87 \pm 0.42^{***}$	$14.98 \pm 0.54^*$	$68.84 \pm 0.57^{***}$

3.4 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞 p53 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Western blotting 法检测结果如图 3 所示, 与对照组比较, 随着 $\beta\text{-HIVS}$ 浓度的增加, A549 细胞中 p53 蛋白的表达水平逐渐升高, Bcl-2 蛋白表达水平逐渐降低 (图 3)。

3.5 $\beta\text{-HIVS}$ 对 A549 细胞 p53、Bcl-2 mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果 (图 4) 显示, p53、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。不同浓度 (0、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 的 $\beta\text{-HIVS}$ 作用 A549 细胞 24 h 后, 细胞

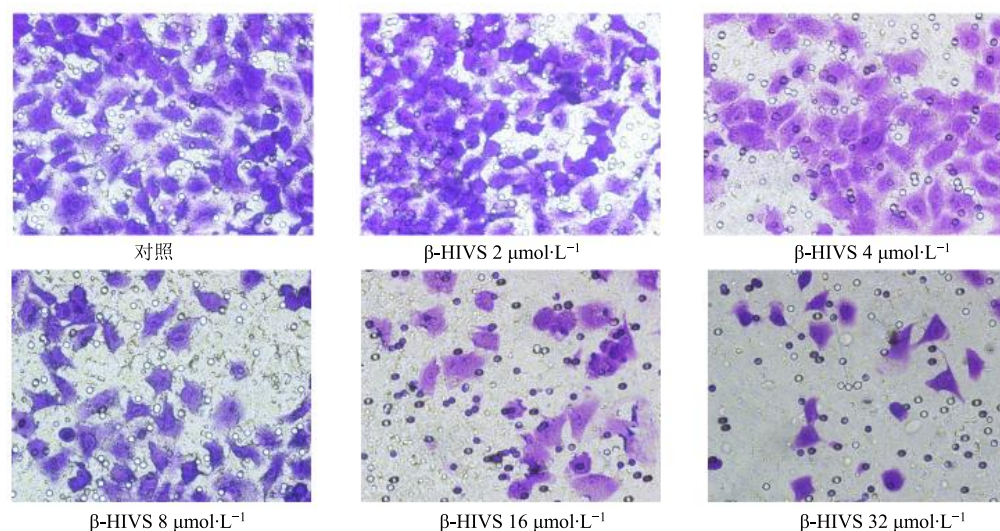


图 1 β -HIVS 对 A549 细胞迁移能力的影响
Fig. 1 Effect of β -HIVS on migration of A549 cells

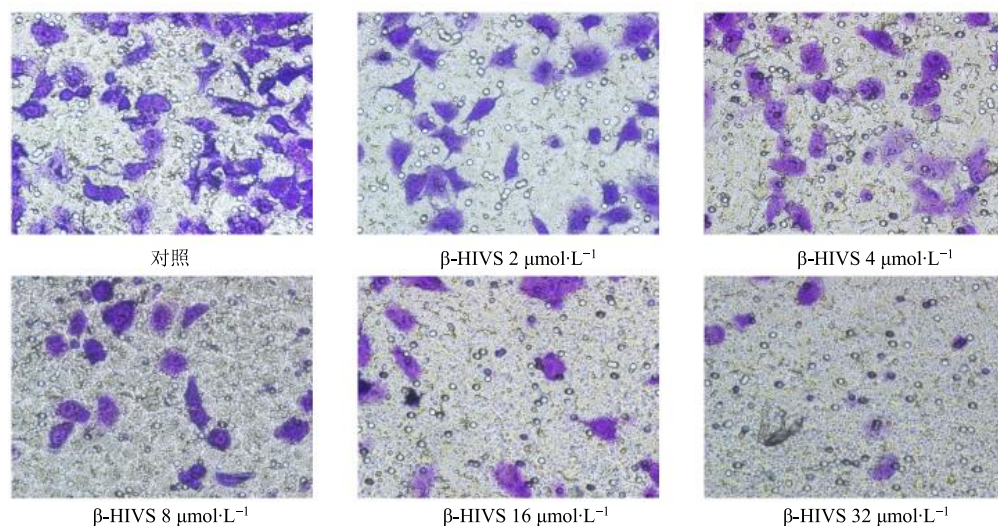


图 2 β -HIVS 对 A549 细胞侵袭能力的影响
Fig. 1 Effect of β -HIVS on invasion of A549 cells

表 3 β -HIVS 对 A549 细胞侵袭力和迁移力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of β -HIVS on cell invasion and metastasis of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$C/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	侵袭透膜细胞数	迁移透膜细胞数
对照	—	66.35 ± 2.17	78.33 ± 5.77
β -HIVS	2	$41.33 \pm 4.59^*$	$66.11 \pm 2.87^*$
	4	$30.23 \pm 3.66^{**}$	$53.58 \pm 6.02^{**}$
	8	$20.56 \pm 5.15^{***}$	$42.97 \pm 5.41^{***}$
	16	$14.69 \pm 2.13^{***}$	$26.63 \pm 4.01^{***}$
	32	$5.52 \pm 1.11^{***}$	$17.11 \pm 1.17^{***}$

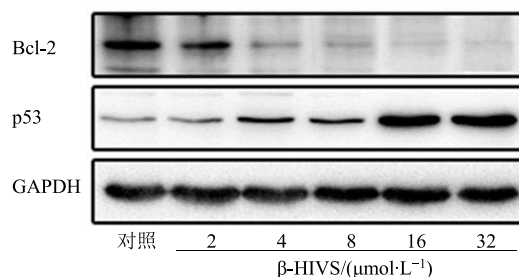


图 3 β -HIVS 对 A549 细胞 p53 和 Bcl-2 蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of β -HIVS on protein expression of p53 and Bcl-2 in A549 cells

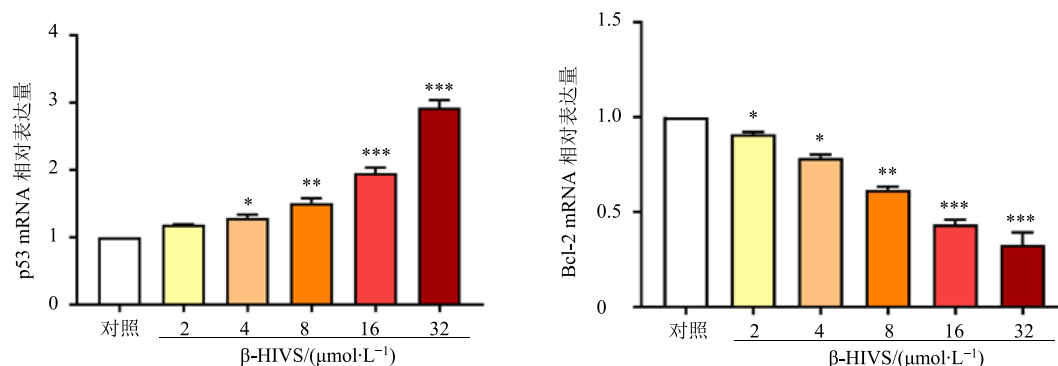


图 4 β-HIVS 对 A549 细胞 p53、Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of β-HIVS on expression of p53 and Bcl-2 mRNA in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

内 p53 mRNA 的表达水平均升高, 而 Bcl-2 mRNA 的表达水平均下降, 且呈浓度依赖性。

4 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率居全球癌症首位, 严重威胁人类的生命和健康^[5]。目前临床上治疗肺癌主要采用手术、放疗和化疗综合治疗的方法, 并取得了一定的效果^[6]。但化疗药物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, 治疗效果不尽人意, 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。近年来国内外研究表明, 从紫草中提取的萘醌类化合物紫草素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^[7-9]。β-HIVS 是天然存在的紫草素衍生物之一, 研究发现其有抑制白血病、黑色素瘤、子宫内膜癌和卵巢癌等多种肿瘤细胞体外生长作用和诱导细胞凋亡作用^[4], 但其对肺癌细胞的作用目前未见报道。本实验结果显示, β-HIVS 呈浓度和时间依赖性的抑制 A549 细胞的增殖, 抑制细胞从 G₀/G₁ 期向 S 期转变, 并诱导细胞凋亡。研究还发现 β-HIVS 呈浓度依赖性地减少透膜细胞数目, 提示 β-HIVS 能够抑制 A549 细胞的侵袭和迁移能力。以上结论进一步证实了 β-HIVS 的对肺癌细胞生长的抑制作用。

有文献报道^[2], 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, 能够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。在本研究中, 利用 Western blotting 技术和实时荧光

定量 PCR 技术检测 β-HIVS 处理后 A549 细胞中相关蛋白和 mRNA 的表达情况, 发现 β-HIVS 作用 A549 细胞后 p53 蛋白及 mRNA 的表达水平明显上调。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进而杀死异常细胞^[10]。本研究结果提示, β-HIVS 抑制 A549 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^[11-12]。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^[13-14]。在本实验中, Bcl-2 蛋白以及 mRNA 的表达随着 β-HIVS 浓度的增加而逐渐降低, 由此推测 β-HIVS 作用于 A549 细胞后, 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, 从而诱导细胞发生凋亡。这可能是 β-HIVS 抑制 A549 细胞生长并诱导凋亡的重要作用机制之一。

总之, β-HIVS 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。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。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, β-HIVS 抑制肿瘤细胞的侵袭、迁移机制以及抑制肿瘤血管生成机制仍需进行更深入的研究。此外, 本实验采用了体外细胞水

平研究方法, 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一定的局限性, 后期将进行体内实验研究, 建立裸鼠移植瘤模型, 研究 β -HIVS 对移植瘤生长的影响, 完善和证实其抗癌活性, 为开发低毒高效的抗肿瘤药物提供实验依据。

参考文献

- [1] 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 Immun*, 2012, 61(11): 1989-2002.
- [2] Ha J H, Jang J, Chung S I, *et al.* AMPK and SREBP-1c mediate the anti-adipogenic effect of β -hydroxyisovalerylshikonin [J]. *Inter J Mol Med*, 2016, 37(3): 816-824.
- [3] 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.
- [4] 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, doi: 10.1016/j.fct.2013.12.011.
- [5] 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, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60845-X.
- [6] 王 丽. 中国原发性肺癌诊疗规范 (2015 年版) 解读 [J]. 世界临床药物, 2016, 37(7): 433-436.
- [7] 徐 佳, 伍春莲. 紫草素药理作用研究进展 [J]. 药物生物技术, 2015(1): 87-90.
- [8] 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 Radical Biol Med*, 2014, 70(5): 182-193.
- [9] 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.
- [10] Kleini P, Pytkänen 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.
- [11] 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]. *Inter J Cancer*, 2015, 74(6): 565-570.
- [12] 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 Trans Med*, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4642.
- [13] 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.
- [14] 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.