

华蟾毒配基联合索拉非尼通过 AURKA/Ras/Raf/ERK 信号通路对肝癌 Huh7 细胞增殖与凋亡的影响

侯晓洁¹, 徐忠伟¹, 王佳宝², 王志美², 包 军¹, 赵 蕾¹, 代二庆^{3*}, 徐瑞成^{1,4*}

1. 中国人民武装警察部队后勤学院, 天津 300309

2. 锦州医科大学中国人民武装警察部队后勤学院附属医院 研究生培养基地, 天津 300162

3. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院 军人医疗保健中心, 天津 300162

4. 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室, 天津 300309

摘要: 目的 研究华蟾毒配基联合索拉非尼对肝癌 Huh7 细胞增殖与凋亡的影响及作用机制。方法 MTT 法检测 Huh7 细胞增殖; Hoechst33342/PI 荧光双染法检测 Huh7 细胞凋亡形态变化; 流式细胞仪检测细胞周期; 免疫细胞化学法检测 Ki67 蛋白表达; Western blotting 法检测 Bax、Bcl-2、Caspase-8、极光激酶 A (AURKA)、Ras、Raf、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 和 p-ERK 蛋白的表达变化。结果 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞的增殖均有抑制作用, 联合用药组的增殖抑制作用更明显, 具有协同效应; 荧光染色可见细胞凋亡形态变化; 索拉非尼引起 Huh7 细胞周期 S 期阻滞, 华蟾毒配基和联合用药引起 Huh7 细胞周期 G₂/M 期阻滞, 联合用药组 G₂/M 期阻滞较单药组更明显; 华蟾毒配基和索拉非尼均能减弱 Ki67 表达, 联合用药组的作用更为显著; 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药上调 Bax 和 Caspase-8 蛋白表达, 下调 Bcl-2 蛋白表达, 上调 Bax/Bcl-2 比例, 对 ERK 蛋白表达无明显影响, 显著下调 AURKA、Ras、Raf 和 p-ERK 蛋白表达, 联合用药组的作用更为显著 ($P < 0.05$)。结论 华蟾毒配基联合索拉非尼通过 AURKA/Ras/Raf/ERK 信号通路抑制肝癌 Huh7 细胞增殖, 诱导其凋亡。

关键词: 华蟾毒配基; 索拉非尼; Huh7 细胞; 极光激酶 A; Ras; 肝癌

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)17-4106-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.021

Effect of cinobufagin combined with Sorafenib on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma Huh7 cells via AURKA/Ras/Raf/ERK signaling pathway

HOU Xiao-jie¹, XU Zhong-wei¹, WANG Jia-bao², WANG Zhi-mei², BAO Jun¹, ZHAO Lei¹, DAI Er-qing³, XU Rui-cheng^{1,4}

1. Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

2. Postgraduate Culture Base of Jinzhou Medical University, The Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

3. Military Health Care Center, The Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

4. Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Tianjin 300309, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of cinobufagin combined with Sorafenib on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma Huh7 cells. **Methods** The proliferation of Huh7 cells was measured using MTT assay; The apoptosis morphological changes of Huh7 cells were detected using Hoechst33342/PI fluorescence staining; The cells cycle was detected by flow cytometry; The expression of Ki67 protein was detected by immunocytochemistry; The expressions of Bax, Bcl-2, Caspase-8, AURKA, Ras, Raf, ERK, and p-ERK proteins were measured using Western blotting. **Results** Cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy inhibited the proliferation of Huh7 cells, and the inhibitory effect of the combination group was

收稿日期: 2018-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673651, 81273552, 81273745); 天津市自然科学基金重点项目 (18JCZDJC36500); 武警后勤学院博士启动金项目 (WHB201501)

作者简介: 侯晓洁 (1990—), 女, 在读硕士, 研究方向为中西医结合临床。Tel: 15922113989 E-mail: 15922113989@163.com

***通信作者** 代二庆 (1969—), 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为中西医结合临床。E-mail: 13502136445@163.com

徐瑞成 (1968—), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为细胞信号转导。E-mail: xu_rc@sohu.com

more obvious with synergistic effect. Fluorescence staining showed morphological changes of apoptosis. Sorafenib induced the cell cycle S phase arrest, cinobufagin and combination therapy induced the cell cycle G₂/M phase arrest, combination group had more obvious cell cycle arrest in G₂/M phase than single drug groups. Both cinobufagin and Sorafenib attenuated the expression of Ki67, and the effect of combination group was more significant. Cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy up-regulated the expression of Bax and Caspase-8 proteins; down-regulated the expression of Bcl-2 protein; up-regulated the ratio of Bax/Bcl-2; had no obvious effect on the expression of ERK protein; significantly down-regulated the expression of AURKA, Ras, Raf, and p-ERK proteins; And the effect of combination group was more significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Cinobufagin combined with Sorafenib could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of hepatocellular carcinoma Huh7 cells through AURKA/Ras/Raf/ERK signaling pathway.

Key words: cinobufagin; Sorafenib; Huh7 cells; AURKA; Ras; hepatocellular carcinoma

肝细胞癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一，是世界范围内癌症死亡的第 3 大原因^[1]，其恶性程度高，发病率呈逐年上升趋势^[2]，严重危害人类健康。索拉非尼是批准用于肝癌的分子靶向治疗药物，可延长患者的中位生存期约 3 个月^[3]，其可通过抑制 Ras/Raf/丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路抑制肿瘤细胞增殖，也可通过抑制血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 和血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 信号传导从而减缓肿瘤内新血管的生成^[4]，起到双重抗肿瘤作用。有报道描述了索拉非尼治疗可延长癌症患者的无进展生存期^[5]。但在应用过程中也易产生耐药。华蟾毒配基是中药蟾酥的主要单体成分，属强心苷类固醇物质，课题组前期研究发现，强心苷类药物通过调节极光激酶 A (AURKA) 的表达，抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖^[6]。AURKA 是丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员之一，可调控细胞的有丝分裂。有文献表明，AURKA 的敲低与 MAPK 信号传导减少有关^[7]。因此，本研究以 Huh7 细胞为靶细胞，探讨华蟾毒配基联合索拉非尼通过 AURKA/Ras/Raf/细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 通路抑制细胞增殖与诱导凋亡的可能机制，为进一步的临床用药提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌 Huh7 细胞购自中国医学科学院基础所。

1.2 药品与试剂

华蟾毒配基(美国 Sigma 公司)、索拉非尼(MCE 公司)，均用 DMSO 溶解成母液，浓度为 0.01 mol/L，-20 ℃避光贮藏；H-DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司)；二甲基亚砜 (DMSO)、碘化丙啶 (PI) 和 DAPI (北京索莱宝公司)；四甲基偶氮唑盐 (MTT)、Hoechst33342 (美国 Sigma 公司)；Ki67 抗体，一抗兔抗人 Bax、Bcl-2、Caspase-8、AURKA、Raf、ERK 和 p-ERK 单克隆抗体(英国 Abcam 公司)；

一抗鼠抗人 Ras 和 GAPDH 单克隆抗体(英国 Abcam 公司)；二抗和 ECL 化学发光试剂(美国 KPL 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与分组

Huh7 细胞常规复苏后，于 37 ℃、5% CO₂ 温箱孵育培养，2~3 d 传代 1 次，取对数生长期细胞用于实验。根据课题组前期进行 MTT 筛选所测浓度，将实验分为对照组、索拉非尼 (0.1 μmol/L) 组、华蟾毒配基 (1 μmol/L) 组和联合用药 (0.1 μmol/L 索拉非尼+1 μmol/L 华蟾毒配基) 组。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期 Huh7 细胞消化、离心制成单细胞悬液，以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板，每组设 5 个复孔，同时设空白组 (只加培养基)，常规培养 24 h 待细胞贴壁后，空白组和对照组加入 H-DMEM 培养基 (10% 胎牛血清)，实验组加入相应浓度药物，培养 24 h 后，加 20 μL MTT，4 h 后 1 500 r/min 离心 10 min，弃上清，每孔加 150 μL DMSO，避光震荡 10 min，全自动酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值。计算细胞增殖率和抑制率，增殖率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$ ，抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$ ，并根据 q 值判断两药的联合效应， q 值参照金式公式^[8]： $q = E_{(A+B)} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$ [式中 E_A 为单用索拉非尼的抑制率、 E_B 为单用华蟾毒配基的抑制率， $E_{(A+B)}$ 为两药联合抑制率]。 q 值大于 1.15 为协同作用，在 0.85~1.15 之间为相加作用，小于 0.85 为拮抗作用。实验独立重复 3 次。

2.3 Hoechst33342/PI 荧光双染法检测细胞凋亡形态变化

将处于对数生长期的细胞接种于细胞培养皿，常规培养细胞，待细胞融合至 80% 时，按“2.1”项下分组加药处理。药物作用 24 h 后，用不含 EDTA 的胰酶消化，离心，收集细胞，PBS 清洗 3 次，用 PBS 配制 Hoechst33342/PI (Hoechst33342 终质量浓

度 10 $\mu\text{g/mL}$, PI 终质量浓度 5 $\mu\text{g/mL}$) 染液, 每组细胞加入 100 μL , 室温避光孵育 15 min, 离心, 弃上清, 加适量 PBS 重悬, 滴片, 荧光显微镜下观察细胞形态, 每组随机取 3 个视野拍照。实验独立重复 3 次。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期

将处于对数生长期的细胞接种于细胞培养皿, 待细胞融合至 80% 时, 按“2.1”项下分组加药处理。药物作用 24 h 后, 用不含 EDTA 胰酶消化, 离心, 收集细胞, 预冷 PBS 清洗 2 次, 弃上清, 加入 75% 预冷乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃乙醇, 预冷 PBS 清洗 1 次, 每管加入 100 μL 染色剂混液 (50 $\mu\text{g/mL}$ PI 和 100 $\mu\text{g/mL}$ RNase A), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 加 500 μL 预冷 PBS, 过 300 目筛网后用流式细胞仪检测。实验独立重复 3 次。

2.5 免疫细胞化学法检测 Ki67 蛋白表达

将处于对数生长期的细胞接种于共聚焦平皿中, 待细胞融合至 80% 时, 按“2.1”项下分组加药处理 24 h。PBS 清洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗 2 次, 0.1% Triton X-100 PBS 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱通透 5 min, PBS 清洗 3 次, 在 1% BSA-PBST 中封闭 1 h, 加 Ki67 抗体 (1:100) 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜, PBS 避光清洗 3 次, DAPI (1 $\mu\text{g/mL}$) 避光复染 5 min, PBS 避光清洗 3 次后, 共聚焦显微镜下观察, 每组随机取 3 个视野拍照。实验独立重复 3 次。

2.6 Western blotting 法检测相关蛋白表达水平

将处于对数生长期的细胞接种于细胞培养皿, 常规培养细胞, 待细胞融合至 80% 时, 按“2.1”项下分组加药处理 24 h。预冷 PBS 清洗 2 遍, 每皿加入 300 μL RIPA 裂解混合液, 用细胞刮将细胞刮下, 超声细胞粉碎机裂解细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 重复此步骤 1 遍, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。BCA 蛋白定量, 加入上样缓冲液, 每组取 60 μg 蛋白, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 进行 SDS-PAGE, 转膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入一抗 Bax、Bcl-2、Caspase-8、AURKA、Ras、Raf、ERK、p-ERK 和 GAPDH (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, PBS 清洗 4 次, 每次 10 min, 经 ECL 液化学发光显影, Scion Image 软件进行灰度值分析, 以目的蛋白与 GAPDH 的灰度比值为蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

2.7 统计学方法

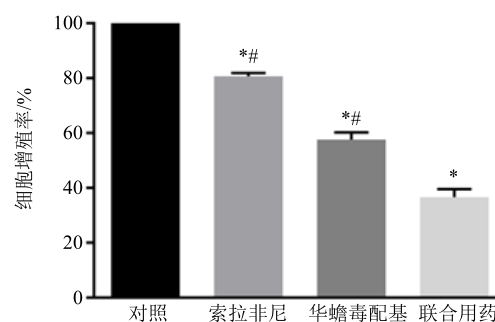
用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。实验数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞增殖活性的影响

MTT 法检测结果显示, 与对照组比较, Huh7 细胞经过华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药处理后细胞增殖受到显著抑制 ($P < 0.05$), 其中联合用药的增殖抑制作用较单药更明显 ($P < 0.05$), 见图 1。华蟾毒配基联合索拉非尼作用 24 h 时, q 值为 1.19, 表现为协同作用。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与联合用药组比较: ** $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.05$ vs combination therapy group, same as below

图1 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy on proliferation of Huh7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞凋亡形态的影响

经 Hoechst33342/PI 荧光染色后可见, 对照组细胞呈现均匀的蓝色荧光, 细胞形态规整, 核较大, 经华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药作用后, 可见细胞核蓝色荧光加深, 染色质的凝集, 晚期凋亡细胞可着红色, 联合用药组细胞凋亡形态改变更加明显, 见图 2。

3.3 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞周期的影响

流式细胞仪检测细胞周期分布, S 期细胞比例对照组为 (26.36 $\pm$ 1.21) %, 索拉非尼组为 (31.63 $\pm$ 2.93) %, 与对照组比较, 索拉非尼将 Huh7 细胞周期阻滞于 S 期 ($P < 0.05$)。G₂/M 期细胞比例对照组为 (20.42 $\pm$ 0.98) %, 索拉非尼组为 (16.21 $\pm$ 2.94) %, 华蟾毒配基组为 (34.01 $\pm$ 1.17) %, 联合用药组为 (37.82 $\pm$ 2.22) %, 与对照组比较, 华蟾毒配基和联合

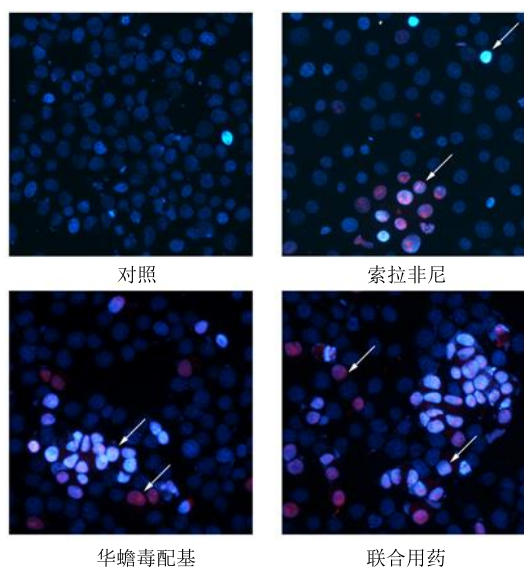


图 2 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞凋亡形态的影响 ($\times 200$)

Fig. 2 Effects of cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy on apoptosis of Huh7 cells ($\times 200$)

用药将 Huh7 细胞周期阻滞于 G₂/M 期 ($P < 0.05$)；联合用药组将细胞周期阻滞于 G₂/M 期较索拉非尼组和华蟾毒配基组更明显 ($P < 0.05$)，见图 3。

3.4 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞 Ki67 表达的影响

激光共聚焦显微镜结果显示，对照组 Ki67 蛋白表达较强，华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药可减弱 Ki67 表达 ($P < 0.05$)，联合用药组较单药组作用更明显 ($P < 0.05$)，见图 4。

3.5 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 法检测结果显示，与对照组比

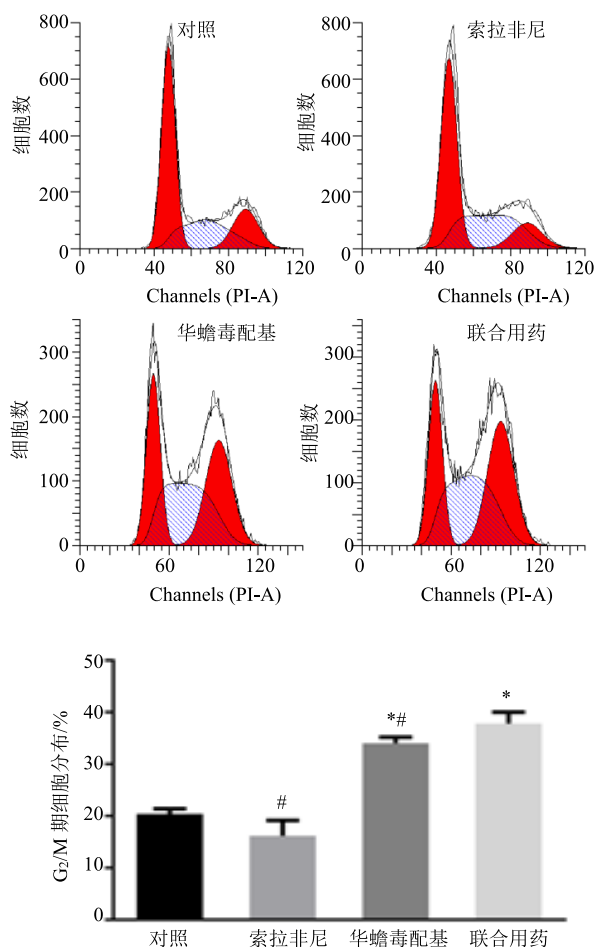


图 3 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy on cell cycle of Huh7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

较，华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药均可上调 Bax 和 Caspase-8 蛋白表达，下调 Bcl-2 蛋白表达，上调 Bax/Bcl-2 比例 ($P < 0.05$)，联合用药组较单药组作

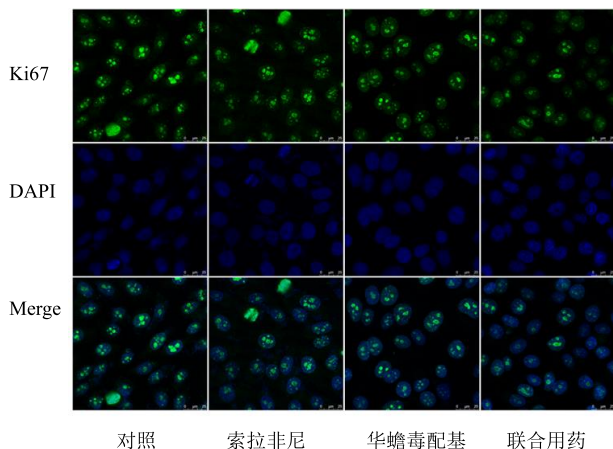
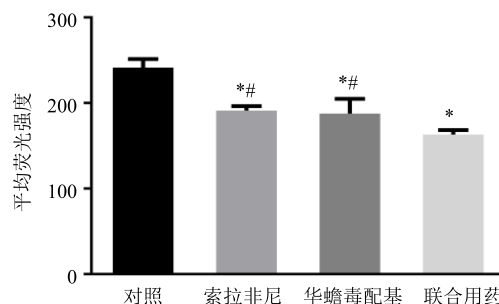


图 4 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Ki67 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy on expression of Ki67 protein ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



用更明显 ($P < 0.05$), 见图 5。

3.6 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞 AURKA/Ras/Raf/ERK 通路相关蛋白表达的影响

Western blotting 法检测结果显示, 与对照组比较, 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 ERK 蛋白表达无明显影响, 下调 AURKA、Ras、Raf、p-ERK 蛋白表达 ($P < 0.05$), 联合用药组较单药组作用更明显 ($P < 0.05$), 见图 6。

4 讨论

肝细胞癌患者确诊时大多已处于中晚期, 索拉非尼是批准用于晚期肝细胞癌的分子靶向治疗药

物, 但在应用过程中易产生耐药。华蟾毒配基属强心苷类固醇物质, 是细胞膜表面 Na^+ , K^+ -ATP 酶的天然抑制剂^[9]。本研究结果证实, 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞均有增殖抑制作用, 联合用药的增殖抑制作用更明显。药物作用后可见染色质凝集等典型的凋亡形态特征。索拉非尼可使 Huh7 细胞周期阻滞于 S 期, 华蟾毒配基及联合用药可使细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 联合用药 G₂/M 期阻滞较单药更明显。Ki67 是与细胞周期相关的在增殖细胞中表达的抗原, 大量实验证明 Ki67 是预后不良的重要指标之一^[10]。实验结果显示, 华蟾毒配基、

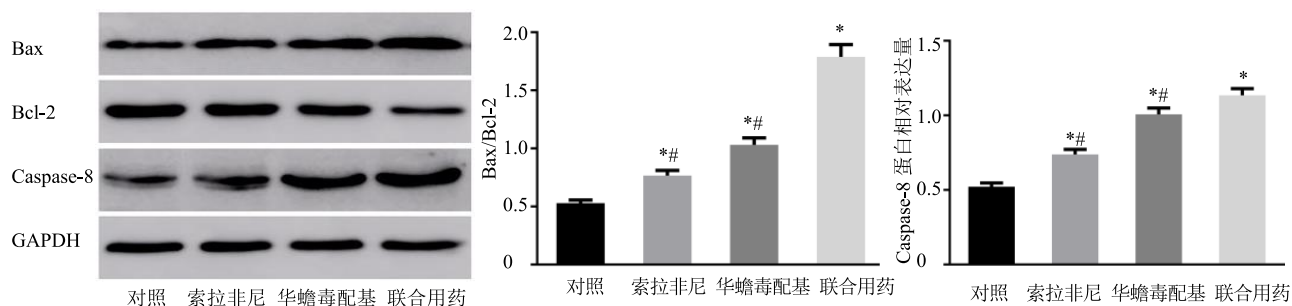


图 5 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy on expression of apoptosis related proteins in Huh7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

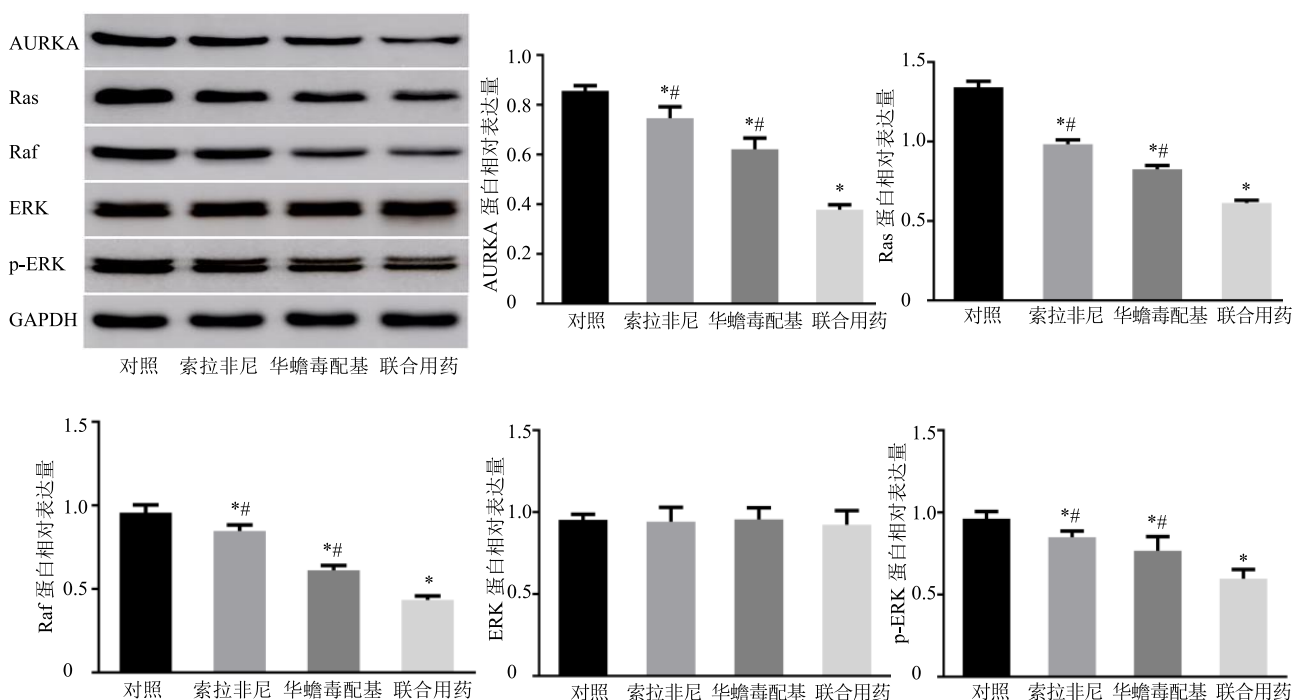


图 6 华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞 AURKA/Ras/Raf/ERK 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of cinobufagin, Sorafenib, and combination therapy on expression of AURKA/Ras/Raf/ERK pathway proteins in Huh7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

索拉非尼及联合用药可降低 Ki67 的表达,联合用药后作用更明显。以上研究结果均表明,华蟾毒配基联合索拉非尼可抑制 Huh7 细胞增殖,诱导其凋亡。

Bax 是促凋亡因子, Bcl-2 是抗凋亡因子, Bax 与 Bcl-2 比值是细胞凋亡过程的关键因素^[11]。Bax 与 Bcl-2 的改变可引起细胞色素 C 从线粒体释放,激活 caspase 级联反应,引起细胞凋亡。有实验证明,强心苷类固醇物质作用于子宫内膜肿瘤细胞后可下调 Bcl-2 表达水平,上调 Bax 表达水平,激活 caspase 家族,诱导细胞凋亡^[12]。Caspase-8 是 caspase 家族成员之一,是启动细胞凋亡途径的关键因子。可使死亡受体通路和线粒体通路结合,凋亡信号被放大,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。本研究结果显示,华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药可上调 Huh7 细胞 Bax 和 Caspase-8 蛋白表达水平,下调 Bcl-2 蛋白表达水平,上调 Bax 与 Bcl-2 比值,联合用药组作用更明显,这提示华蟾毒配基联合索拉非尼可诱导细胞凋亡。

Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路在调节细胞增殖,分化和存活方面起着核心作用^[14]。Ras 募集并激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Raf, Raf 促进 MEK1/2 和 ERK1/2 的激活,激活的 ERK1/2 磷酸化数个底物并调节不同的转录因子,导致不同的基因表达^[15]。Ras/Raf/MEK/ERK 通路的激活可能导致肝癌的发展^[16]。AURKA 在肝癌组织中表达上调^[17],其过表达患者的预后和结果较差^[18-19]。有文献表明, AURKA 是一种新型的 Ras 结合蛋白, AURKA 与 H-Ras 相互作用,在 MAPK 通路中 Ras 上游起作用以增强 Ras 介导的 MAPK 信号传导^[20],因此推测抑制 AURKA/Ras/Raf/ERK 通路可能是肝癌治疗的 1 个新靶点。本研究结果表明,华蟾毒配基、索拉非尼及联合用药对 Huh7 细胞 ERK 蛋白表达无明显影响,可显著下调 AURKA、Ras、Raf、p-ERK 蛋白的表达水平,联合用药组作用更明显,这提示联合用药组 AURKA/Ras/Raf/ERK 通路进一步受到抑制,进而抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡。由此推断,抑制 AURKA/Ras/Raf/ERK 信号传导途径可能是两药联合产生协同作用的机制之一。

综上,华蟾毒配基联合索拉非尼作用于 Huh7 细胞具有协同效应,其机制可能是通过 AURKA/Ras/Raf/ERK 信号通路抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡。但其具体机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al.* Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29.
- [3] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-390.
- [4] Muntane J. Targeting cell death and survival receptors in hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(6): 576-584.
- [5] Escudier B, Eisen T, Stadler W M, *et al.* Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(2): 125-134.
- [6] Xu Z, Wang F, Fan F, *et al.* Quantitative proteomics reveals that the inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity affects S-phase progression leading to a chromosome segregation disorder by attenuating the aurora a function in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(11): 4594-4602.
- [7] Wan X B, Long Z J, Yan M, *et al.* Inhibition of aurora-A suppresses epithelial-mesenchymal transition and invasion by downregulating MAPK in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(10): 1930-1937.
- [8] 金正均. 合并用药中的相加 [J]. *中国药理学报*, 1980, 1(2): 70-76.
- [9] Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, *et al.* Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776(1): 32-57.
- [10] Luo Y, Ren F, Liu Y, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: A meta-analysis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 10235-10247.
- [11] Tomasin R, Gomes-Marcondes M C. Oral administration of Aloe vera and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(4): 619-623.
- [12] Alonso E, Cano-Abad M F, Moreno-Ortega A J, *et al.* Nanomolar ouabain elicits apoptosis through a direct action on HeLa cell mitochondria [J]. *Steroids*, 2013, 78(11): 1110-1118.
- [13] Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, *et al.* Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(4): 731-740.
- [14] Yu P, Ye L, Wang H, *et al.* NSK-01105 inhibits proliferation and induces apoptosis of prostate cancer

- cells by blocking the Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signal pathways [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 2143-2153.
- [15] Zhang Z, Zhou X, Shen H, *et al.* Phosphorylated ERK is a potential predictor of sensitivity to sorafenib when treating hepatocellular carcinoma: Evidence from an *in vitro* study [J]. *BMC Med*, 2009, doi: 10.1186/1741-7015-7-41.
- [16] Yang S, Liu G. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1041-1047.
- [17] Zhang K, Chen J, Chen D, *et al.* Aurora-A promotes chemoresistance in hepatocellular carcinoma by targeting NF-kappaB/microRNA-21/PTEN signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(24): 12916-12935.
- [18] Lassus H, Staff S, Leminen A, *et al.* Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2011; 120(1): 11-17.
- [19] Zeng B, Lei Y, Zhu H, *et al.* Aurora-A is a novel predictor of poor prognosis in patients with resected lung adenocarcinoma [J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26(2): 166-173.
- [20] Umstead M, Xiong J, Qi Q, *et al.* Aurora kinase A interacts with H-Ras and potentiates Ras-MAPK signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28359-28372.