

芒柄花素对人非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡的影响及相关机制探讨

李自全^{1*}, 孟祥娇²

(1. 四川省肿瘤医院, 成都 610041; 2. 山东省医学科学院, 济南 250062)

[摘要] 目的:探讨芒柄花素对人非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖、凋亡的影响,并探讨其作用机制。方法:培养人NSCLC细胞株A549,分别按10,20,40,80,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 梯度浓度加入芒柄花素,另设不含药物空白组,培养48 h后采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖活力,利用Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双标法检测细胞凋亡情况,利用流式细胞仪检测细胞周期,利用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)和免疫印迹法(Western blot)分别检测细胞中周期蛋白E₁(cyclin E₁),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)mRNA和蛋白表达。结果:40,80,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组细胞生长抑制率和细胞凋亡率均高于空白组($P < 0.05$)。与空白组比较,40,80,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组G₀/G₁期细胞比例上升,S期细胞比例下降,80,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组下降更为明显($P < 0.05$);40,80,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组cyclin E₁,Bcl-2 mRNA和蛋白表达量均较空白组降低,Bax mRNA和蛋白表达量升高,与40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组比较,80,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组cyclin E₁,Bcl-2 mRNA和蛋白表达量均降低,Bax mRNA和蛋白表达量升高($P < 0.05$)。结论:芒柄花素可抑制NSCLC细胞增殖,加速细胞凋亡发生,可能通过下调cyclin E₁表达而影响细胞周期,并通过调控Bcl-2和Bax表达而促使细胞凋亡发生。

[关键词] 芒柄花素; 人非小细胞肺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0138-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200138

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160829.1648.002.html>

[网络出版时间] 2016-08-29 16:48

Effect of Formononetin on Proliferation and Apoptosis of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell and Its Relevant Mechanism

LI Zi-quan^{1*}, MENG Xiang-jiao²

(1. The Second People's Hospital of Sichuan, Chengdu 610041, China;

2. Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of formononetin on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer cells and its relevant mechanism. **Method:** The human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line A549 was cultured, and added with formononetin with the concentrations of 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The blank group was only added PBS. After cultured for 48 h, the cell proliferations were detected by using methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, the cell apoptosis were tested by using Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) double staining, the cell cycles were detected by using flow cytometry, the expressions of cyclin E₁, Bcl-2 and Bax mRNA and proteins were detected by using Real-time PCR and Western blot method. **Result:** The cell growth inhibition rates and the cell apoptosis rates at the concentrations of 40, 80 and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of formononetin were higher than the blank group ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the proportions of G₀/G₁ phase at the concentrations of 40, 80 and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of formononetin were increased,

[收稿日期] 20160117(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81301868)

[通讯作者] *李自全, 硕士, 主治医师, 从事中医肿瘤临床研究, Tel:13348800390, E-mail:3269594507@qq.com

while the proportions of S phase were decreased, especially the concentrations of 80 and 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of formononetin ($P < 0.05$). The gene and protein expressions of cyclin E_1 and Bcl-2 at the concentrations of 40, 80 and 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were lower than the blank group, while the mRNA and protein expressions of Bax were increased; compared with 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of formononetin, the expression levels of cyclin E_1 and Bcl-2 mRNA and protein expressions were decreased at the concentrations of 80, 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of formononetin, but with increase in Bax mRNA and protein expressions ($P < 0.05$). **Conclusion:** Formononetin could inhibit the proliferation of NSCLC cells, and accelerate cell apoptosis. It might affect the cell cycle by down-regulating cyclin E_1 expression, and promote cell apoptosis by regulating the expressions of Bcl-2 and Bax.

[**Key words**] formononetin; human non-small cell lung cancer; cell proliferation; cell apoptosis; mechanism

非小细胞肺癌(NSCLC)作为肺癌的主要病理类型,约占肺癌的85%,由于多数患者早期症状不明显,确诊时已处于中晚期,错失手术切除治疗的最佳时期,晚期肺癌患者对放化疗治疗敏感性不佳,且毒副反应较大^[1],因此,积极寻找天然治疗药物以改善晚期肺癌患者的生存质量,已成为临床研究的重点。芒柄花素是弱极性异黄酮类化合物,主要存在于黄芪、葛根、鸡血藤等中药材中,采用二次通用旋转组化设计优化提取工艺可有效提取中药材中芒柄花素成分^[2]。芒柄花素具有抗癌功效,已被应用于乳腺癌^[3]、结肠癌^[4]等治疗,但具体作用机制尚未研究清楚。本课题组前期将芒柄花素应用于晚期肺癌患者,可在一定程度上缓解患者症状,改善患者预后。研究表明,细胞增殖和凋亡调控失衡是导致肿瘤发生及侵袭、转移的基础^[5]。周期蛋白 E_1 (cyclin E_1) 是重要的细胞周期调控因子,可加速细胞增殖过程,在恶性肿瘤发生时,常出现表达失衡^[6],B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 作为一对重要的凋亡调控基因,其平衡失衡可调控细胞凋亡并参与肿瘤发生进展过程^[7]。本实验尝试从细胞生物学角度研究芒柄花素抗肿瘤作用,观察芒柄花素对 NSCLC 细胞株 A549 增殖、凋亡的影响,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 细胞株 人 NSCLC 细胞株 A549, 购自中科院上海细胞生物研究所。

1.2 药物及试剂 芒柄花素(中国食品药品检定研究院,批号 111703-200603); RPMI1640, 胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 B01084901, 314722); 胰蛋白酶, 碘化丙啶(PI), 二甲基亚砜(美国 Sigma 公司,批号分别为 H20100116, B1227012, 0000306); 噻唑蓝(MTT)比色法细胞增殖检测试剂盒(上海居里生物科技有限公司,批号 120609);

Annexin V-FICT/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(美国 Biovision 公司,批号 C1042), Trizol 总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 AXF39386), 鼠抗 cyclin E_1 单克隆抗体, 鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体(福建迈新生物技术开发有限公司,批号分别为 8121054111, 606770747B1); 鼠抗人 Bax 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechno Logy 公司,批号 L1709), HRP 标记的抗体及抗鼠二抗(北京中杉公司,批号 84-00-02)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, cyclin E_1 (109 bp): 上游 5'-TGACC GGTATATGGCGACAC-3', 下游 5'-CTCCTGAACAA GCTCCATCTG-3'; Bcl-2 (207 bp): 上游 5'-AACAT CGCCCTGTGGATGAC-3', 下游 5'-AGAGTCTTCAG AGACAGCCAGGAG-3'; Bax (221 bp): 上游 5'-AG ATGTGGTCTATAATGCGTTTTCC-3', 下游 5'-CAG AAGGCACTAATCAAGTCAAGGT-3'; β -肌动蛋白(β -actin, 152 bp): 上游 5'-ACAGAGCCTCGCC TTTGCCGAT-3', 下游 5'-CTTGCACATGCCGGAGC CGTT-3'。

1.3 仪器 381 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司), FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司), ABI7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), PAC200 型电泳转膜细胞, Mini-PROTENAN II 型电泳槽及 GelDoc 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), 680 型酶标仪(美国 Bio-Red 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人 NSCLC 细胞株 A549 置于 RPMI-1640 培养液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养,细胞贴壁生长良好时用 0.25% 胰蛋白酶消化,取对数生长期细胞完成后续实验。

2.2 MTT 比色法检测细胞增殖活力 调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,取 100 μL 接种于 96 孔培养板中,培养过夜,待细胞贴壁生长,将培养液换成无血

清培养液对细胞进行饥饿培养 24 h, 分别加入 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素培养, 空白组不加药, 每个浓度均设 3 个复孔。连续培养 48 h, 加入 MTT 液培养 4 h, 除去上清液, 加入二甲基亚砜, 用酶标分析仪于 490 nm 波长测定吸光度 A , 计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = (1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.3 Annexin V-FIFC/PI 双标法检测细胞周期及凋亡 调整细胞密度为 5×10^5 个/mL, 将细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 分别加入 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素培养 48 h, 空白组不加药, 每个浓度设 3 个复孔。加入缓冲液重悬后, 分别加入 2.0×10^4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Annexin V-FIFC 10 μL 和 5.0×10^4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PI 5 μL , 避光染色 20 min。在 60 min 内上流式细胞仪对细胞周期和凋亡率变化进行分析。

2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 cyclin E₁, Bcl-2, Bax mRNA 表达 细胞培养及芒柄花素处理方法同 2.3 项。收集细胞, 用细胞裂解液对细胞进行裂解, 采用试剂盒提取总 RNA 并检测浓度, 逆转录获得模板链 cDNA, 进行 PCR, 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 74 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 38 个循环, 每个样品均设置 3 个复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得细胞中 cyclin E₁, Bcl-2, Bax mRNA 相对表达量。

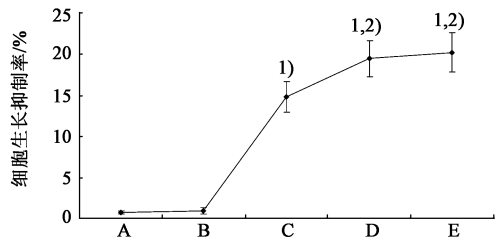
2.5 免疫印迹法 (Western blot) 检测 cyclin E₁, Bcl-2, Bax 蛋白相对表达 用细胞裂解液将各组细胞裂解, 提取蛋白并定量。蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 室温下封闭 1 h, 分别加入一抗 cyclin E₁, Bcl-2 和 Bax 单克隆抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗涤 3 次, 加入二抗 (1:2 000) 室温下孵育 60 min, 洗涤 3 次, 显影, 采用 Image J 图像分析软件对各条带进行分析, 获得 cyclin E₁, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计分析软件。组间比较采用 t 检验, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芒柄花素对细胞增殖活力的影响 与空白组比较, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组细胞生长抑制率均升高 ($P < 0.01$), 与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组比较, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组细胞生长抑制率均升高 ($P < 0.01$)。见图 1。

3.2 芒柄花素对细胞凋亡的影响 与空白组比较, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组细胞凋亡率均升高 ($P < 0.01$)。与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组比较, 80,



A. 空白组; B~E. 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 (图 2~3 同)。与 A 组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 C 组比较²⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)

图 1 芒柄花素对细胞增殖活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of formononetin on cell proliferation activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率均升高 ($P < 0.01$)。见图 2。

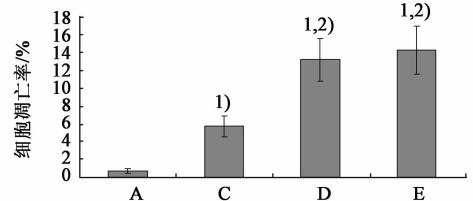


图 2 芒柄花素对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of formononetin on cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 芒柄花素对细胞周期的影响 与空白组比较, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 G_0/G_1 期细胞比例上升 ($P < 0.01$), S 期细胞比例下降 ($P < 0.01$)。与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组比较, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 G_0/G_1 期细胞比例均上升 ($P < 0.01$), S 期细胞比例均下降 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 芒柄花素对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of formononetin on cell cycle ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白	-	69.4 \pm 2.8	20.5 \pm 3.7	10.1 \pm 2.2
芒柄花素	40	73.5 \pm 3.2 ¹⁾	15.7 \pm 2.9 ¹⁾	10.8 \pm 2.6
	80	77.8 \pm 3.4 ^{1,2)}	12.6 \pm 3.1 ^{1,2)}	9.6 \pm 2.4
	160	78.6 \pm 3.6 ^{1,2)}	11.6 \pm 2.8 ^{1,2)}	9.8 \pm 2.1

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.4 芒柄花素对细胞中 cyclin E₁, Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响 与空白组比较, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 cyclin E₁, Bcl-2 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.01$), Bax mRNA 表达量升高 ($P < 0.01$)。与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组比较, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 cyclin E₁, Bcl-2 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.01$), Bax mRNA 表达量升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 芒柄花素对细胞中 cyclin E₁, Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of formononetin on cyclin E₁, Bcl-2 and Bax mRNA expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	cyclin E ₁ mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
空白	-	1.05 ± 0.24	1.07 ± 0.18	0.93 ± 0.11
芒柄花素	40	0.91 ± 0.17 ¹⁾	0.89 ± 0.15 ¹⁾	1.07 ± 0.17 ¹⁾
	80	0.79 ± 0.15 ^{1,2)}	0.74 ± 0.11 ^{1,2)}	1.18 ± 0.19 ^{1,2)}
	160	0.77 ± 0.13 ^{1,2)}	0.72 ± 0.09 ^{1,2)}	1.19 ± 0.21 ^{1,2)}

3.5 芒柄花素对细胞中 cyclin E₁, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 与空白组比较,芒柄花素浓度为 40,80 和 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 cyclin E₁ 和 Bcl-2 蛋白表达量均降低 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达量升高 ($P <$

0.01), 与芒柄花素浓度 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较,芒柄花素浓度 80 和 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 cyclin E₁ 和 Bcl-2 蛋白表达量均降低 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达量升高 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 3。

表 3 芒柄花素对细胞中 cyclin E₁, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of formononetin on cyclin E₁, Bcl-2 and Bax protein expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	cyclin E ₁ 蛋白	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
空白	-	0.96 ± 0.12	0.93 ± 0.13	0.51 ± 0.08
芒柄花素	40	0.82 ± 0.11 ¹⁾	0.78 ± 0.14 ¹⁾	0.72 ± 0.13 ¹⁾
	80	0.69 ± 0.14 ^{1,2)}	0.62 ± 0.09 ^{1,2)}	0.87 ± 0.15 ^{1,2)}
	160	0.71 ± 0.15 ^{1,2)}	0.63 ± 0.10 ^{1,2)}	0.85 ± 0.12 ^{1,2)}

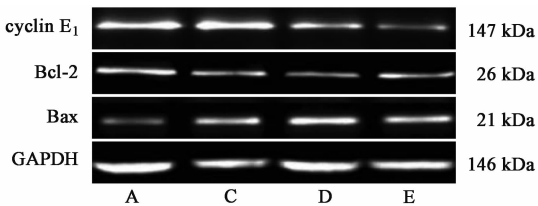


图 3 芒柄花素对细胞中 cyclin E₁, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达电泳
Fig. 3 Effect of formononetin on electrophoresis of cyclin E₁, Bcl-2 and Bax protein expressions

4 讨论

NSCLC 患者由于确诊时错过了最佳的手术时机而往往需进行化疗等,肿瘤细胞耐药及所产生的毒副作用又限制了化疗的应用及效果发挥^[8]。中医药在改善晚期肺癌患者生存质量、延长生存时间及提高患者免疫力等方面发挥了重要作用^[9], 中药亦可改善化疗毒性、逆转肿瘤细胞对化疗药物抗药性,增强化疗效果^[10]。芒柄花素为鸡血藤、黄芪等中药材中主要的异黄酮类化合物,在抗肿瘤治疗中具有重要意义^[11]。本研究结果显示,芒柄花素在抑制 NSCLC 细胞株增殖时具有剂量依赖性,40,80,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素细胞生长抑制率均高于空白组,说明芒柄花素在 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时具有明显的抑制 NSCLC 细胞株增殖的作用,且这种抑制作用不会随着芒柄花素浓度增加而无限增大,80 $\mu\text{mol} \cdot$

L^{-1} 及以上时基本达到峰值。

本研究结果显示,40,80,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组细胞凋亡率均高于空白组,且 80,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组细胞凋亡率相当,说明芒柄花素可促进 NSCLC 细胞株凋亡的发生,同时,40,80,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 G₀/G₁ 期细胞比例上升,S 期细胞比例下降,0,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组更为显著,提示芒柄花素可能通过阻滞细胞周期、加速细胞凋亡而抑制肿瘤的生长^[12]。

cyclin E₁ 为细胞周期重要的调控因子,可促进细胞由 G₁ 期向 S 期转换,从而加速细胞增殖过程^[13],研究表明,cyclin E₁ 在多数肿瘤中呈高表达,与肿瘤侵袭、转移关系密切^[14]。本研究显示,40,80,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 cyclin E₁ mRNA 和蛋白表达量均较空白组降低,80,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 cyclin E₁ mRNA 和蛋白表达量均低于 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组,说明芒柄花素可通过抑制 cyclin E₁ 表达,从而影响细胞周期,抑制 NSCLC 细胞分裂和增殖过程。Bcl-2 为凋亡抑制基因,通过抗凋亡作用而参与肿瘤发生、进展过程^[15], Bax 促凋亡基因,可与 Bcl-2 形成二聚体达到平衡状态而对细胞凋亡进行调控^[16],本研究显示,40,80,160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达量均较空白组降

低, Bax mRNA 和蛋白表达量升高, 与 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组比较, $80, 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素组 cyclin E_1 , Bcl-2 mRNA 和蛋白表达量均降低, Bax mRNA 和蛋白表达量升高, 说明芒柄花素可能通过抑制 Bcl-2 表达, 促进 Bax 表达, 促使肿瘤细胞凋亡发生。

综上所述, 芒柄花素可抑制 NSCLC 细胞株 A549 增殖, 加速细胞凋亡发生, 可能通过下调 cyclin E_1 表达而影响细胞周期, 并通过调控 Bcl-2 和 Bax 表达而促使细胞凋亡发生。

[参考文献]

[1] García-Campelo R, Bernabé R, Cobo M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015 [J]. Clin Transl Oncol, 2015, 17(12): 1020-1029.

[2] 王继龙, 陈方圆, 魏舒畅, 等. 二次通用旋转组合设计优化红芪中芒柄花素和总皂苷的酶解提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1926-1931.

[3] 盛佳钰, 陈红风. 芒柄花素联合 MK2206 对不同亚型乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(13): 998.

[4] 胡昆, 徐华金, 辛文群, 等. 刺芒柄花素氮芥衍生物的合成及抗肿瘤活性[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(2): 113-119.

[5] 毛盛勋, 何楠, 辛林, 等. 反义 miR-224 对胃癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(2): 92-96.

[6] Karst A M, Jones P M, Vena N, et al. Cyclin E_1 deregulation occurs early in secretory cell transformation to promote formation of fallopian tube-derived high-grade serous ovarian cancers [J]. Cancer Res, 2014, 74(4): 1141-1152.

[7] Alfatlawi A A, Alfatlawi A A, Irshad M, et al. Rice bran phytyc acid induced apoptosis through regulation of Bcl-2/Bax and p53 genes in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15

(8): 3731-3736.

[8] Lei L, Huang Y, Gong W. MiR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN [J]. Oncol Rep, 2013, 30(6): 2897-2902.

[9] 王小静, 杨桂存, 陈红霞, 等. 川芎嗪对白血病 U937 细胞增殖和凋亡的作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2186-2190.

[10] 濮文渊, 凌云, 张曦, 等. 抗肿瘤中药的耐药潜质——假说的建立及对未来研究的思考 [J]. 中医杂志, 2013, 54(19): 1627-1629.

[11] 程悦, 王志宇, 王冬梅, 等. 不同溶剂对鸡血藤提取物总黄酮含量及抗肿瘤活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 142-145.

[12] 张幸, 梁梅花, 黄文君, 等. 芒柄花黄素诱导膀胱癌细胞凋亡作用 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 314-317.

[13] Taylor-Harding B, Aspuria P J, Agadjanian H, et al. Cyclin E_1 and RTK/RAS signaling drive CDK inhibitor resistance via activation of E2F and ETS [J]. Oncotarget, 2015, 6(2): 696-317.

[14] Smina T P, Mohan A, Ayyappa K A, et al. Hesperetin exerts apoptotic effect on A431 skin carcinoma cells by regulating mitogen activated protein kinases and cyclins [J]. Cell Mol Biol: Noisy-le-grand, 2015, 61(6): 92-99.

[15] Kumar M, Singh G, Sharma S, et al. Intracellular delivery of peptide cargos using iron oxide based nanoparticles: studies on antitumor efficacy of a Bcl-2 converting peptide, NuBCP-9 [J]. Nanoscale, 2014, 6(23): 14473-14483.

[16] Zhao L W, Zhong X H, Yang S Y, et al. Inotodiol inhabits proliferation and induces apoptosis through modulating expression of cyclin E, p27, Bcl-2, and Bax in human cervical cancer HeLa cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(7): 3195-3199.

[责任编辑 张丰丰]