

南蛇藤茎提取物对人胶质母细胞瘤细胞株 U251 增殖和凋亡的影响及机制

顾昊^{1,2}, 王海波¹, 冯俊¹, 钱亚云¹, 金凤¹, 陈珏¹,
史有阳¹, 陆松花¹, 徐佩¹, 刘延庆^{1*}

(1. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225009; 2. 南京脑科医院, 南京 210009)

[摘要] 目的:探讨南蛇藤茎乙酸乙酯提取物(*Celastrus orbiculatus* extract, COE)抗人胶质母细胞瘤 U251 细胞株的增殖和凋亡作用,研究 COE 抗肿瘤的分子机制,为寻找新的治疗胶质母细胞瘤药物提供依据。方法:以人胶质母细胞瘤细胞株 U251 为研究对象,设空白组和 COE 组,应用噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]比色法观察 COE 对细胞活力的抑制作用;5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxy uridine, BrdU)标记检测 COE 对 U251 细胞增殖的影响;Annexin V/碘化丙啶(PI)双标法检测 COE 对 U251 细胞凋亡的作用;透射电镜下观察经 COE 干预后 U251 细胞超微结构变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 COE 对凋亡标志基因 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X, Bax)和半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达的影响。结果:与空白组比较,COE 能够明显抑制 U251 细胞的增殖($P < 0.05$);诱导 U251 细胞的早期凋亡,电镜下可见到凋亡小体,影响并改变 U251 细胞超微结构;COE 能促进 Caspase-3, Bax 蛋白表达,降低 Bcl-2, Bcl-2/Bax 蛋白表达($P < 0.05$)。结论:COE 能有效抑制胶质母细胞瘤 U251 细胞株的增殖,促进肿瘤细胞凋亡,其作用机制与调节 Bcl-2 和 Caspase-3 表达有关。

[关键词] 南蛇藤茎提取物; 胶质母细胞瘤; U251 细胞株; 增殖; 凋亡; 透射电镜

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0115-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170115

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1046.060.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 10:46

Effect of *Celastrus orbiculatus* Extract on Cell Proliferation and Apoptosis of U251 Cells and Its Molecular Mechanism

GU Hao^{1,2}, WANG Hai-bo¹, FENG Jun¹, QIAN Ya-yun¹, JIN Feng¹, CHEN Jue¹,
SHI You-yang¹, LU Song-hua¹, XU Pei¹, LIU Yan-qing^{1*}

(1. Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Nanjing Brain Hospital, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of different concentrations of *Celastrus orbiculatus* extract (COE) on proliferation and apoptosis of U251 cells (a glioblastoma cancer cell line), and its possible molecular mechanism. **Method:** U251 cells at the logarithmic growth phase were divided into control group and COE-treated group. 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay and 5-bromo-2-deoxy uridine (BrdU) incorporation experiment were performed to observe the inhibitory effect on cell viability and proliferation, respectively. Annexin V/PI double staining was used to detect the effect of COE on U251 cell

[收稿日期] 20161222(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274141, 81450051, 81403232, 81573656);江苏省自然科学基金项目(BK20141280);江苏省中医药科技项目(LZ11210);江苏省普通高校研究生科研创新项目(KYZZ_0370)

[第一作者] 顾昊, 在读博士, 主治医师, 从事肿瘤方面研究, Tel:18114455503, E-mail: guhao1980@126.com

[通讯作者] *刘延庆, 博士, 教授, 从事中西医结合抗肿瘤研究, Tel:13905278844, E-mail: liuyq@yzu.edu.cn

apoptosis. Ultrastructural changes of U251 cells after COE treatment were observed under transmission electron microscope; the protein expressions of apoptosis marker B-cell lymphoma-2/Bcl-2-associated X (Bcl-2/Bax) and Caspase-3 were detected by Western blot. **Result:** Compared to control group, the proliferation of U251 cells in COE-treated group were significant inhibited by COE ($P < 0.05$). COE could induce the early apoptosis and ultrastructure changes of U251 cells, and apoptotic bodies were observed under transmission electron microscope. The protein expressions of Bcl-2/Bax and Caspase-3 were changed in a concentration dependent manner. **Conclusion:** COE can effectively inhibit the proliferation of U251 cells by down-regulating the expression of Bcl-2/Bax and increasing the protein expression of Caspase-3, and promoting the apoptosis of cell, suggesting that COE can be used as a drug candidate for treating glioblastoma.

[**Key words**] *Celastrus orbiculatus* extract (COE); glioblastoma; U251 cell line; proliferation; apoptosis; transmission electron microscope

胶质瘤是一种源于脑或脊髓胶质细胞的常见原发性脑肿瘤,是人类恶性肿瘤中最具侵袭性的肿瘤之一,约占神经系统恶性肿瘤的 40% ~ 60%^[1]。胶质母细胞瘤 (GBM) 是胶质瘤中最具侵袭力的类型,其高复发率为该肿瘤的恶性特征^[2-3]。现有治疗手段包括手术、放疗和化疗等方法均无法完全清除胶质母细胞瘤所产生的大量肿瘤细胞,且对正常脑组织的副作用大,是导致患者复发和死亡恶性预后的重要原因,多数患者中位生存期仅为 9 ~ 10 个月^[4-5]。药物在胶质母细胞瘤治疗领域的使用并不是很广泛,大部分原因是西药作用于脑部后的毒副作用让不少研究者却步。故从天然物质中寻找高效低毒抗肿瘤药物,成为长期以来关注的研究热点。中药低毒副作用一直是其最突出的优势之一,能否在中药中找到有效低毒副作用的抗肿瘤药物显得尤为重要。南蛇藤又名过山风、降龙草、黄藤等,为卫矛科南蛇藤属植物,始载于清代《植物名实图考》,其茎、根、叶、果实、种子均可入药。课题组前期已获得“南蛇藤茎总萜提取物及其制备方法及应用”的发明专利授权(授权号 200710025343.3)。前期研究发现南蛇藤茎乙酸乙酯提取物 (COE) 能抑制多种恶性肿瘤细胞侵袭转移和增殖^[6-8]。对于 COE 是否能够抑制神经系统肿瘤的恶性行为,有待进一步研究。本研究采用人胶质母细胞瘤 U251 细胞株,通过细胞与分子生物学方法探讨 COE 对 U251 细胞的增殖及凋亡作用,阐明 COE 如何诱导胶质母细胞瘤细胞的凋亡,调节细胞信号转导的分子机制。深入研究 COE 对 U251 细胞增殖和凋亡的作用和机制。

1 材料

1.1 南蛇藤药物成分提取 南蛇藤购自广州致信药业有限公司(批号 070510),由中国药科大学中药

资源研究所王强教授鉴定为卫矛科落叶木质藤本植物 *Celastrus orbiculatus* 干燥根茎。南蛇藤根、茎、叶均可入药,经本课题合作方中国药科大学王强教授课题组完成南蛇藤茎总萜类化合物的提取和鉴定^[9]。其成分提取的主要流程如下,将南蛇藤、茎切断,粉碎成粉,烘干,95% 乙醇回流提取 3 次,旋转蒸发仪回收溶剂得到浸膏,拌入硅藻土,真空低温抽干,再用乙酸乙酯热水浴加热回流,过滤,回收得到乙酸乙酯浸膏(其中总萜类化合物含量 68.3%),提取物获得率约 2%。COE 0.16 g 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 1 mL 中,配制成 $160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,以无血清培养基配成实验所需要浓度工作液,常压过滤除菌,根据实验需求进行浓度梯度稀释。

1.2 细胞 人脑胶质细胞瘤细胞株 U251,购自中国中国科学院上海细胞库,编号 RG130224.05。

1.3 试剂及试剂盒 RPMI 1640 细胞培养基(美国 Hyclone 公司,批号 SH308009);胎牛血清,胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 232700, M2128); Annexin V-FITC 流式试剂盒(美国 BD 公司,批号 MACS130093060);B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax),半胱氨酶蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体,二抗(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 4223, 5023, 9662, 364257);5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 流式试剂盒(上海贝基生物科技有限公司,批号 8811-6600-42);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号 062716161024);ECL 发光试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 160223002)。

1.4 仪器 SERIES 8000 WJ 型 CO_2 恒温培养箱(美国 Thermo 公司);IX73 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);FACSAria II u 型流式细胞仪(美国 BD 公司);CM100 型透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司);iMark 型全自动酶标板分析仪,mini X25 型

垂直电泳仪, Universar Hood III 蛋白凝胶分析仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与传代 将人脑胶质细胞瘤 U251 细胞株置 RPMI 1640 培养基中, 于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 倒置显微镜下观察细胞形态, 取对数生长期细胞备用。

2.2 噻唑蓝 (MTT) 比色法检测细胞株活力 取对数生长期的 U251 细胞, 消化细胞并进行细胞计数, 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基制备单细胞悬液, 调整细胞密度为 3×10^5 个/mL, 并以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁生长后随机分为空白组和 COE (10, 20, 40, 80, 160, 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组。COE 组分别加入相应药物, 各种浓度设 5 个复孔。细胞于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 避光条件下加入 $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 15 μ L, 继续培养 4 h 后, 弃上清后加入 DMSO 100 μ L, 酶标仪上选择 490 nm 波长, 读出每孔吸光度 *A*, 计算药物抑制率, 利用概率单位法计算半数抑制率 (IC₅₀)。上述实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = [1 - (A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}})] \times 100\%$$

2.3 流式细胞法检测细胞株增殖 取对数生长期的 U251 细胞, 接种于 96 孔板上, 常规培养 24 h 后, 加入 40, 80, 160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 干预 24 h, 冰上解冻 BrdU, 调节浓度至 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每孔 1×10^6 个 U251 细胞加入 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BrdU, 培养 10 h, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 2.5% 胰酶消化收集细胞, BrdU staining Buffer 1 mL 混匀后暗室孵育 15 min, PBS 洗涤 2 次, 冰上加入 DNaseI 100 μ L, 室温暗室孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清, 加入 Anti-BrdU 5 μ L 混匀室温暗室孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次, PBS 200 μ L 重悬后上流式细胞仪检测。

2.4 流式细胞法检测细胞株凋亡 将传代 24 h 后的 U251 细胞经由 RPMI 1640 重悬浮, 接种于 6 孔板上, 常规培养 24 h 后, 加入 40, 80, 160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 干预 24 h, 消化收集细胞, $1 \times$ Binding Buffer 1 mL 重悬, $300 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 用 $1 \times$ Binding Buffer 100 μ L 重悬后加入 Annexin V-FITC 轻摇混匀后, 室温下避光孵育 15 min, $1 \times$ Binding Buffer 洗涤 2 次, 加入 PI 5 μ L 染色后, 置流式细胞仪上分析。

2.5 透射电镜法检测细胞株形态学变化 取对数期 U251 细胞接种于培养瓶, 培养 24 h, 加入 80, 160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 干预 24 h, 胰酶消化收集细胞, 以

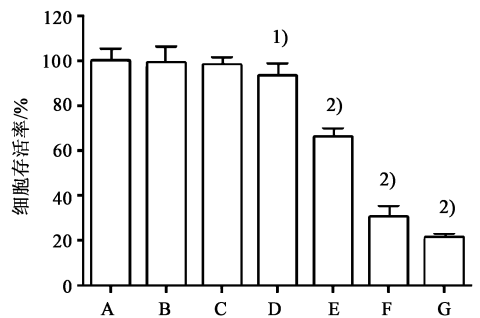
2% 戊二醛固定, 1% 二酸后固定, Spurr 树脂包埋, 置透射电镜观察、照相。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Caspases-3, Bcl-2 及 Bax 蛋白表达 细胞凋亡相关蛋白包括 Caspases-3, Bax 等促凋亡蛋白, Bcl-2 等抗凋亡蛋白, Bcl-2/Bax 直接反映细胞凋亡情况。取对数期 U251 细胞, 加入 40, 80, 160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE, 24 h 后提取细胞总蛋白, BCA 法定量后进行 SDS-PAGE 电泳, 将分离后蛋白质转移到 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 然后加一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加二抗 (1:1 000) 室温孵育 2 h, ECL 发光试剂盒进行显色检测相关蛋白条带, 采用蛋白凝胶分析仪进行拍照分析。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及 *T* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 COE 对细胞活力的影响 经 10 ~ 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 处理 24 h 后, U-251 细胞数量与药物浓度呈负相关, 细胞生长受到不同程度抑制。与空白组比较, 10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 组细胞抑制不明显, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 组细胞生长抑制明显升高 ($P < 0.05$); 80, 160, 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 组抑制率显著升高 ($P < 0.01$)。见图 1。根据 COE 对 U-251 细胞增殖的抑制率, 计算 COE 半数抑制浓度 (IC₅₀), U251 细胞 IC₅₀ 为 107.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



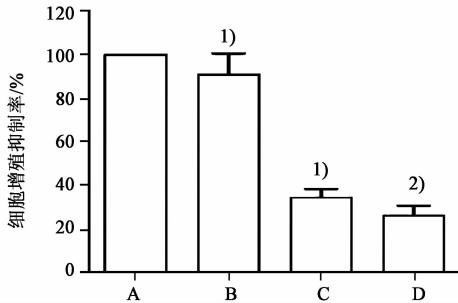
A. 空白组; B ~ G. COE 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 1 COE 作用 24 h 对 U251 细胞活力的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory effect of COE on viability of glioblastoma U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 COE 对细胞增殖的影响 经 BrdU 掺入法检测, BrdU 可掺入到 S 期细胞所合成 DNA 链中, 利用荧光标记的抗 BrdU 抗体可显示 BrdU 掺入情况, 检测细胞处于 S 期, 反映 U251 细胞增殖速度。与空

白组比较, 40, 80 mg·L⁻¹ COE 组细胞增殖明显受到抑制 ($P < 0.05$)。160 mg·L⁻¹ COE 组细胞增殖抑制更显著 ($P < 0.01$)。见图 2。COE 能够干预并抑制 U251 细胞株的增殖, 随着质量浓度递增, 增殖抑制作用增强。



A. 空白组; B~D. COE 40, 80, 160 mg·L⁻¹ 组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3, 5 同)

图 2 COE 对 U251 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of COE on proliferation of U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 COE 对人胶质母细胞瘤 U251 细胞凋亡的影响 与空白组比较, COE 40, 80, 160 mg·L⁻¹ 组细胞早期凋亡率为 6.8%, 20.1%, 38.4%, 晚期凋亡率为 5.4%, 24.3%, 43.6%。随着 COE 浓度的加大, 凋亡细胞数逐步增加, 与空白组比较, COE 80, 160 mg·L⁻¹ 组细胞早期凋亡和晚期凋亡显著增多 ($P < 0.01$)。COE 具有促进 U251 细胞早期凋亡作用, 并呈药物浓度依赖。见图 3。

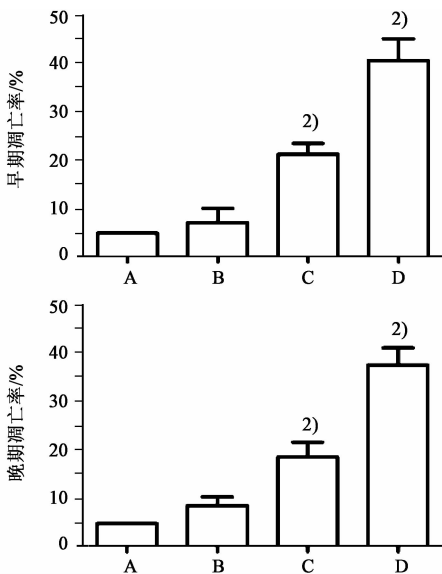
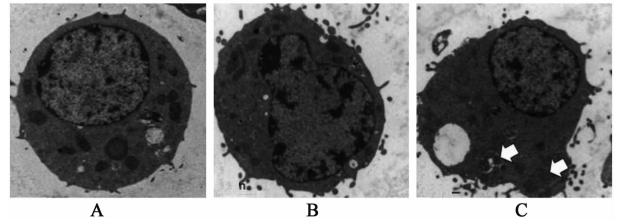


图 3 COE 对胶质母细胞瘤细胞 U 251 细胞株凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of COE on apoptosis of glioblastoma U251 cells after treated for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 COE 对人胶质母细胞瘤 U251 细胞株超微结

构形态的影响 透射电镜下观察发现, 空白组中细胞形态呈圆形, 细胞核形态不规则, 细胞膜清晰完整, 染色质分布均匀, 核仁较大, 可见多个核仁, 核糖体丰富; COE 80, 160 mg·L⁻¹ 干预下肿瘤细胞体积固缩、外形不规则, 细胞膜表面微绒毛减少, 细胞核内染色质溶解, 线粒体肿胀, 细胞质空泡增多, 染色质凝聚、边集, 细胞电子密度增加, 可见部分有胞膜的细胞器凋亡小体。见图 4。



A. 空白组; B, C. COE 80, 160 mg·L⁻¹ 组

图 4 COE 对人胶质母细胞瘤 U251 细胞株超微形态的影响 (电镜, ×5 600)

Fig. 4 Effect of COE on ultrastructural of human glioblastoma cell line U251 (transmission electron microscope, ×5 600)

3.5 COE 对 U251 细胞凋亡相关蛋白的影响 与空白组比较, 随着 COE 药物浓度增高, Caspase-3 表达显著增加, Bcl-2 蛋白表达, Bcl-2/Bax 显著降低 ($P < 0.01$), 说明 COE 能促进 Caspase-3, Bax 蛋白表达, 促进了 U251 细胞株凋亡, 呈浓度依赖。见图 5。

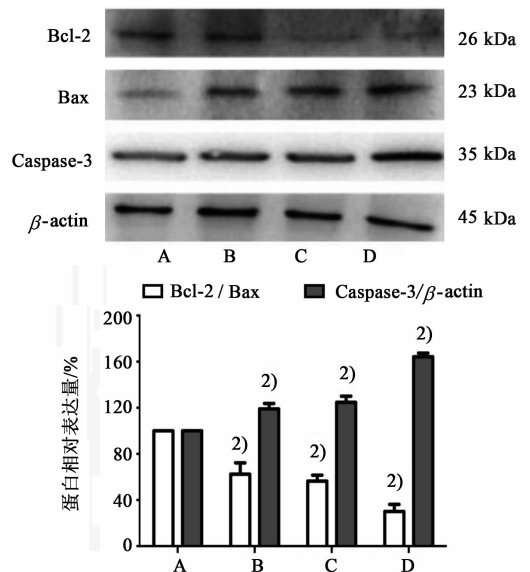


图 5 COE 对人胶质母细胞瘤 U251 细胞株 Caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of COE on protein expressions of Caspase-3, Bcl-2, Bax ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

胶质瘤作为最常见的颅内恶性肿瘤之一, 尤其

是胶质母细胞瘤,表现为恶性程度最高、最具侵袭性和最差预后、胶质瘤浸润性生长、边界不清的病理特征,更因其生长在脑内的重要功能区,使目前的手术等方法无法完全清除肿瘤细胞,是导致该肿瘤极易复发的重要原因。恶性肿瘤的共同生物学特征是失控性生长,其主要的分子机制是细胞周期紊乱,导致细胞增殖过度和凋亡减少,因此抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡已成为肿瘤治疗的重要手段之一。我国传统中药无论是单药或中药组方的抗肿瘤作用被长期关注,筛选低毒有效抗肿瘤药物,及中药如何通过抑制恶性肿瘤增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制成为当前研究的热点^[10-11]。

本课题前期研究发现从中药南蛇藤茎中提取的主要有效成分二萜类、三萜类化合物及生物碱,具有很好的抑制肝癌等恶性肿瘤细胞活性的作用。认为其作用机制主要与通过细胞毒作用、诱导凋亡、抑制肿瘤细胞黏附和迁移等途径发挥该药的抗肿瘤作用有关^[12]。本文选择能表达胶质母细胞瘤特性的 U251 细胞株,以多种分子生物学实验方法研究 COE 抗胶质母细胞瘤的增殖和促进细胞凋亡的作用。

本研究结果显示 COE 对 U251 细胞活力有明显抑制作用,可促进肿瘤细胞的早期凋亡,呈浓度依赖性。由于形态学改变是反映细胞凋亡最直接的证据之一,本实验采用电镜检测结果发现,未经药物处理的空白组 U251 细胞形态结构正常,未见有明显凋亡现象。经 $80,160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 处理 24 h 后细胞数量减少,电镜下细胞核皱缩、核质聚集、边集,可以观察到凋亡小体等现象,均表明肿瘤细胞凋亡。反映了 COE 通过细胞毒作用,抑制了胶质母细胞瘤的细胞增殖、诱导凋亡。

肿瘤细胞的高增殖能力和凋亡力降低与恶性肿瘤的发生发展密切相关。正常细胞基因及其表达产物对细胞的生理功能极其重要,当原癌基因发生结构改变或过度表达时,导致细胞癌变。Bcl-2 表达的蛋白能通过广泛抑制各种刺激诱导细胞凋亡,延长细胞活力,从而使受损的细胞获得不死性,进一步分化而形成肿瘤^[13]。Bcl-2 能够增强细胞对大多数 DNA 损失性因子的抵抗性,抑制多种化疗药物所致的靶细胞凋亡。Bcl-2 过量表达常导致化疗药物的耐药,阻止细胞的凋亡,影响治疗的效果。一旦发生细胞凋亡,Bcl-2 表达即明显降低。Bcl-2 家族可分为 2 个亚族,一类是抗凋亡蛋白如 Bcl-2,另一种是促进凋亡蛋白 Bax。数据表明,许多抗癌药物发挥诱导细胞凋亡的作用与 Bcl-2/Bax 有关,以决定

细胞是否进行凋亡程序^[14]。本研究发现,与空白组比较,COE 组 Bcl-2 表达明显降低,且随着药物浓度的升高而降低,与此同时,Bax 表达水平随着 COE 浓度的提高也明显增高。Bcl-2/Bax 随 COE 药物干预浓度增高而降低。结果提示,COE 能够通过降低 Bcl-2 和促进 Bax 产生来诱导胶质母细胞瘤细胞的凋亡。

Caspase 家族是引起细胞凋亡的关键酶,一旦其信号通路被激活,将可导致细胞的不可逆性死亡^[15]。Caspase-3 是位于细胞凋亡通路下游的一个凋亡相关蛋白酶,Caspase-3 表达的增加将直接导致细胞凋亡通路的活化。Caspase-3 也是细胞凋亡的关键酶和主要执行者。本实验中检测到 COE 干预后 Caspase-3 蛋白表达量增加,说明 COE 很可能是通过抑制 Caspase-3 通路实现功能。

综上所述,本研究用 COE 干预人胶质母细胞瘤细胞株 U251,观察其对细胞增殖、凋亡及相关蛋白的表达的影响。研究显示 COE 能够促进 U251 细胞的凋亡率,高浓度时效果显著,呈递增性剂量依赖,提示 COE 能够使胶质母细胞瘤细胞的增殖活性受到抑制,诱导凋亡。其 COE 抗胶质瘤的作用机制为上调 Caspase-3 的表达活性,降低 Bcl-2,促进 Bax 的表达,其抑制肿瘤增殖和凋亡作用与浓度有关。

[参考文献]

- [1] Pallud J, Roux A, Zanella M. Relationship between tumor location and preoperative seizure incidence depends on glioma grade of malignancy [J]. *Epileptic Disord*, 2016, 18(1):107-108.
- [2] Konar S K, Bir S C, Maiti T K, et al. A systematic review of overall survival in pediatric primary glioblastomamultiforme of the spinal cord [J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2016, 11(4):1-10.
- [3] Faraz S, Pannullo S, Rosenblum M, et al. Long-term survival in a patient with glioblastoma on antipsychotic therapy for schizophrenia: a case report and literature review [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2016, 8(6):421-428.
- [4] Uhl M, Schwab S, Efferth T. Fatal liver and bone marrow toxicity by combination treatment of dichloroacetate and artesunate in a glioblastoma multiforme patient: case report and review of the literature [J]. *Front Oncol*, 2016, 10(7):204-210.
- [5] Anil R, Colen R R. Imaging cenomics in glioblastoma multiforme: a predictive tool for patients prognosis, survival, and outcome [J]. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, 2016, 24(4):731-740.

- [6] WANG M, ZHANG X, XIONG X, et al. Efficacy of the Chinese traditional medicinal herb *Celastrus orbiculatus* Thunb on human hepatocellular carcinoma in an orthotopic fluorescent nude mouse model [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(4) : 1213-1220.
- [7] WANG W, LIU Y, DAI X, et al. Apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells induced by *Celastrus orbiculatus* Thunb extract and mechanism of induction [J]. *ISTIC*, 2010, 23(2) : 154-156.
- [8] MA H, QIAN Y, ZHANG H, et al. *Celastrus orbiculatus* extract could inhibit human colorectal carcinoma HT-29 cells metastasis via suppression of the mTOR signaling pathway [J]. *Life Sci J*, 2013, 10(2) : 168-172.
- [9] QIAN Y Y, ZHANG H, LIU Y, et al. *Celastrus orbiculatus* extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathway and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(10) : 752-760.
- [10] ZHUANG Q, HONG F, SHEN A, et al. Pientze Huang inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis via suppressing the STAT3 pathway in colorectal cancer mouse model [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40 (5) : 1569-1574.
- [11] ZHENG L, WANG X, LUO W, et al. Brucine, an effective natural compound derived from nux-vomica, induces G₁ phase arrest and apoptosis in LoVo cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58(8) : 332-339.
- [12] ZHU Y, LIU Y, QIAN Y, et al. Hisamitsu Tadashi. Research on the efficacy of *Celastrus orbiculatus* in suppressing TGF- β_1 -induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting HSP27 and TNF- α -induced NF- κ B/ Snail signaling pathway in human gastric adenocarcinoma [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 11(14) : 433-443.
- [13] Laulier C, Lopez B S. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members [J]. *Mutat Res*, 2012, 751(2) : 247-257.
- [14] ZHANG G, WANG Y, ZHANG Y, et al. Anti-cancer activities of teaepigallocatechin-3-gallate in breast cancer patients under radiotherapy [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(2) : 163-176.
- [15] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G, et al. Caspase-3 and prostaglandins signal fortumor regrowth in cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2012, 31(23) : 2805-2808.

[责任编辑 张丰丰]