

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.009

桔梗皂苷 D 诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡

孔亚, 王佳佳, 卢宗亮, 周蕊, 宋伟, 王贺, 许红霞(第三军医大学大坪医院野战外科研究所营养科, 重庆 400042)

[摘要] **目的:** 研究来自桔梗的天然单体化合物桔梗皂苷 D (platycodin D, PD) 对高转移性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡的影响, 初步探索其可能的作用机制。 **方法:** 以不同浓度 (0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) PD 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后, 采用 MTT 法检测细胞增殖率并计算 IC_{50} 值, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达水平。 **结果:** PD 呈剂量依赖性显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 作用 72 h 的 IC_{50} 值为 $(7.30 \pm 2.67) \mu\text{mol/L}$ 。与对照组相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD 可显著促进 MDA-MB-231 细胞的凋亡 ($P < 0.05$)。PD 激活了 caspase 家族蛋白, 上调有活性的 cleaved caspase-3、cleaved caspase-8 和 cleaved caspase-9 的表达, 下调无活性的 caspase-8 和 caspase-9 的表达; PD 同时减少 Bcl-2 的表达, 增加 Bax 的表达, 使 Bcl-2/Bax 的比值降低。研究还发现 PD 使突变型 P53 蛋白的表达减少、E2F1 的表达增加。 **结论:** PD 抑制乳腺癌细胞增殖具有明显的抗肿瘤效应, 而诱导凋亡的发生可能是其发挥抗肿瘤效应的机制之一。

[关键词] 桔梗皂苷 D; 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0350-05

Platycodin D induced apoptosis of breast cancer MDA-MB-231 cell

KONG Ya, WANG Jiajia, LU Zongliang, ZHOU Rui, SONG Wei, WANG He, XU Hongxia (Department of Nutrition, Research Institute of Surgery, Daping Hospital Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective:** This study was designed to estimate the role of platycodin D (PD), a natural monomeric compound derived from platycodin grandiflorum, in apoptosis of highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 and to primarily explore the possible mechanisms. **Methods:** MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations of PD (0, 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$), cell proliferation rate was detected by MTT and IC_{50} value was calculated; cell apoptosis was evaluated by Flow cytometry, and the expressions of apoptosis-related proteins were assessed by Western blotting. **Results:** PD significantly inhibited MDA-MB-231 cell proliferation ($P < 0.01$) in a dose-dependent manner with a IC_{50} value of $(7.30 \pm 2.67) \mu\text{mol/L}$ at 72 h. Compared with control group, 10 $\mu\text{mol/L}$ PD could significantly promote the apoptosis of MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$). PD increased the caspase protein activity by up-regulating active cleaved caspase-3, -8 and -9 and down-regulating inactive caspase-8 and -9. PD also decreased the expression level of Bcl-2 and increased Bax expression, resulting in the decrease of Bcl-2/Bax ratio in MDA-MB-231 cells. The protein expression of mutant P53 was down-regulated after treated with PD; otherwise, the expression of E2F1 was up-regulated. **Conclusion:** PD had an obvious anticancer effect by inhibiting breast cancer cell proliferation, and inducing apoptosis might be a potential mechanism of anti-cancer effects.

[Key words] platycodin D; breast cancer; MDA-MB-231 cells; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 350-354. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.009]

乳腺癌是全球女性发病率最高的恶性肿瘤之一, 是导致女性癌症死亡的主要原因, 2012 年乳腺癌患者占全部癌症患者的 25%, 乳腺癌患者死亡占全部癌症死亡的 15%^[1]。在中国, 乳腺癌同样居于女性恶性肿瘤发病的第一位, 占女性癌症新发病例的 15%^[2]。因此, 对乳腺癌的防治研究显得至关重要。许多天然化合物都具有不同的抗肿瘤效应, 芬维 A 胺 (fenretinide) 可促进乳腺癌细胞发生 caspase-非依赖

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81171991)。Projects supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171991)

[作者简介] 孔亚 (1990 -), 女, 重庆市垫江县人, 硕士生, 主要从事天然及人工合成化合物抗肿瘤的研究, E-mail: 1024133585@qq.com

[通信作者] 许红霞 (XU Hongxia, corresponding author), E-mail: hx_xu2015@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160428.1647.004.html>

性的凋亡^[3],百里香醌(thymoquinone)可引起 G₁ 期细胞周期阻滞^[3],人参皂苷可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖并促进其凋亡^[4],大豆异黄酮的次级代谢产物 S-雌马酚可抑制前列腺癌细胞的生长^[5]。桔梗属于双子叶植物桔梗科,可药食两用,其天然单体化合物桔梗皂苷 D(platycodin D, PD)是来源于桔梗根部的三萜皂苷。据报道,PD 对人体健康有多种益处,包括抗炎^[6]、降胆固醇和减肥^[7]、体外杀精和避孕^[8]及抗癌^[9-13]等;因其对多种人类恶性肿瘤细胞都具有抗肿瘤作用,且对正常细胞相对安全而备受关注。MDA-MB-231 细胞是三阴性高转移的人乳腺癌细胞系,它同时缺失雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体-2。该类乳腺癌具有术后易复发、易转移以及预后较差等特点,目前尚无满意的治疗方案。已有研究发现,PD 可抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移、侵袭和生长^[11];通过抑制破骨细胞生成以及肿瘤细胞的生长而阻碍乳腺癌引起的骨破坏^[14]。但 PD 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响目前尚无报道。本实验研究 PD 对高转移性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响,并初步探讨 PD 抑制乳腺癌细胞生长的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

PD 购自成都曼思特生物科技有限公司(纯度 > 98%)。改良型 RPMI 1640 培养基、胰酶、胎牛血清(FBS)均购自 Hyclone 公司,MTT 购自 Sigma 公司,凋亡试剂盒购自上海贝博生物,caspase-3、-8、-9 和 PARP、Bax、Bcl-2 抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司,抗 P53 抗体购自圣克鲁斯生物技术有限公司,抗 E2F1 抗体购自博士德生物工程有限公司,抗 GAPDH 购自杭州贤至生物科技有限公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠/兔 IgG(H+L)购自北京中杉金桥公司。

1.2 细胞株和细胞培养

高转移性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购自中国科学院上海细胞库,用含 10% 胎牛血清的改良型 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,根据细胞生长情况每 2~3 d 进行传代。

1.3 MTT 法检测 PD 处理对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

将对数生长期 MDA-MB-231 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,置于细胞培养箱中过夜使其贴壁,以不同浓度的 PD(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)分别处理细胞 24、48 和 72 h。到达药物处理时间点时加入 10 μl 5 mg/ml 的 MTT 溶液,于细胞培养箱中继续培

养 4 h 后,去除上清,加入 100 μl 二甲基亚砷溶解甲臞晶体。多功能酶标仪测定 570 nm 处光密度(D)值,计算细胞增殖率及 50% 细胞增殖抑制所需的药物浓度(IC₅₀ 值)。细胞增殖率(%) = [(干预组 D 值 - 空白组 D 值) / (对照组 D 值 - 空白组 D 值)] $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测 PD 处理对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

将对数生长期 MDA-MB-231 细胞以 1.2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待其贴壁后用 PD(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h,根据凋亡试剂盒说明书进行后续处理。到达处理时间点时收集细胞和上清,低速离心弃上清,用冰 PBS 洗涤 2 次,400 μl Annexin V 结合液重悬细胞,并加入 5 μl Annexin V-FITC 染色液,混匀后于 2~8 °C 避光孵育 15 min,加入 10 μl PI 染色液,混匀后继续孵育 5 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。凋亡指数 = 干预组凋亡百分率 / 对照组凋亡百分率。

1.5 Western blotting 检测 PD 处理对 MDA-MB-231 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

取对数生长期 MDA-MB-231 细胞接种于 25 cm² 培养瓶中(1×10^6 个/瓶),待其贴壁后分别用不同浓度 PD(0、5、10 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 24 h,到达时间点时收集细胞,低速离心 5 min,用 PBS 洗涤 2 次,加入 200 μl 含 2 μl PMSF 的 RIPA 裂解液在冰上裂解 45 min。用细胞刮刮下细胞,收集于 1.5 ml EP 管中,在预冷的高速离心机中以 $13\,400 \times g$ 离心 15 min,取上清。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后,以湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 4 h,一抗 4 °C 孵育过夜。用 TBST 洗脱液洗膜(10 min \times 4 次),孵育辣根过氧化物酶共轭的山羊抗鼠/兔二抗 2 h,再次洗膜(10 min \times 4 次),于暗室中发光、显影,运用 LabWorks-46 进行灰度值的扫描,计算蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD 明显抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖

MTT 法检测结果(图 1)显示,MDA-MB-231 细胞经不同浓度 PD 处理 24、48 和 72 h 后,PD 对 MDA-MB-231 细胞增殖有明显的抑制作用,并呈浓度依赖性,但时间依赖性不明显。5 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD

即可显著抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD 处理 72 h 可抑制 (79.33 \pm 9.07) % 的细胞增殖 ($P < 0.01$)。PD 作用 72 h 时抑制高转移性 MDA-MB-231 细胞增殖的 IC_{50} 值为 (7.30 \pm 2.67) $\mu\text{mol/L}$ 。

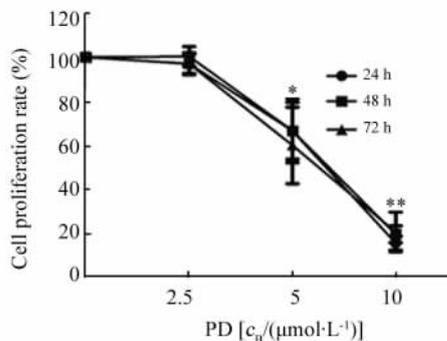


图1 PD 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖
Fig. 1 PD inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$

2.2 PD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图2)显示,与空白对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ PD 处理组 MDA-MB-231 细胞的凋亡率显著增加 [(12.12 \pm 2.84) % vs (6.1 \pm 0.37) %, $P < 0.05$]; 凋亡指数达到 2。提示 PD 诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡。

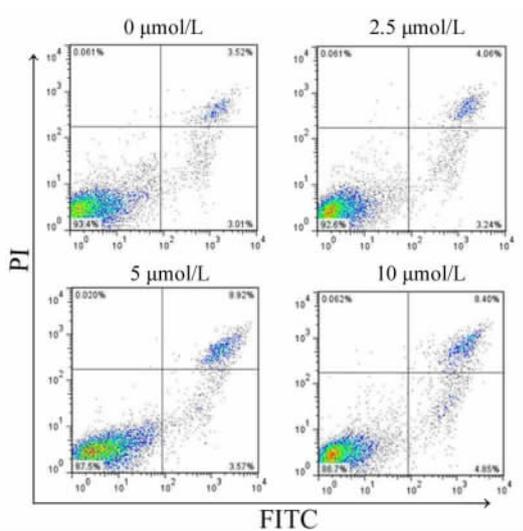


图2 PD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡
Fig. 2 Apoptosis of MDA-MB-231 cells induced by PD

2.3 PD 调节 MDA-MB-231 细胞凋亡相关蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示,凋亡总效应蛋

白 cleaved caspase-3 的表达上调(图3A),表明 PD 可明显诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡 ($P < 0.05$); PD 还可明显减少 PARP 及增加 cleaved PARP 的表达 (均 $P < 0.05$),表明 PARP 发生剪切。PARP 是 caspase-3 的特异性底物,PARP 的激活进一步验证了凋亡的发生。同时,PD 可下调无活性的 caspase-8 和 caspase-9 的表达 (均 $P < 0.05$),并促进 cleaved caspase-8 和 cleaved caspase-9 的表达 (均 $P < 0.05$; 图3B、C); PD 还可显著下调 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$),并上调 Bax 的表达 ($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 的比值显著减少 [(0.20 \pm 0.03) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$] (图4)。上述结果提示,PD 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡可能与死亡受体途径和线粒体途径两条通路均有关。

此外,不同表型的 P53 在肿瘤细胞中发挥着重要的作用。野生型 P53 抑制肿瘤的发生,而突变性 P53 则促进肿瘤的发生。MDA-MB-231 细胞中的 P53 为突变型,PD 作用于 MDA-MB-231 细胞,可显著下调 P53 蛋白的表达水平 [(0.48 \pm 0.13) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$]; 同时,还观察到 PD 可明显上调 E2F1 蛋白的表达 [(2.29 \pm 0.19) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$] (图5)。

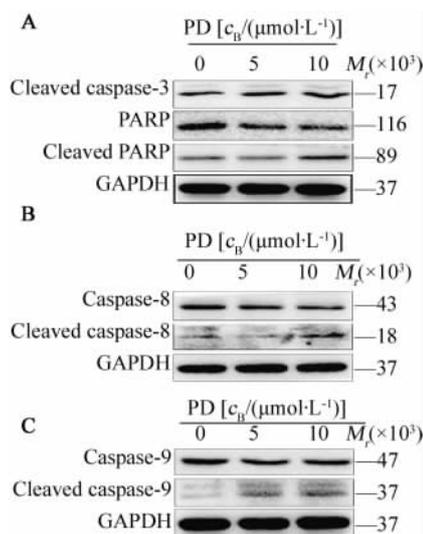


图3 PD 激活 MDA-MB-231 细胞中 caspase 家族蛋白表达

Fig. 3 PD activated the caspase protein expression in MDA-MB-231 cells

A: The expressions of caspase-3 and PARP;
B: The expression of caspase-8;
C: The expression of caspase-9

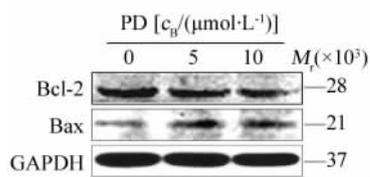


图 4 PD 影响 MDA-MB-231 细胞中 Bax 和 Bcl-2 的表达

Fig. 4 PD affected the expressions of Bax and Bcl-2 in MDA-MB-231 cells

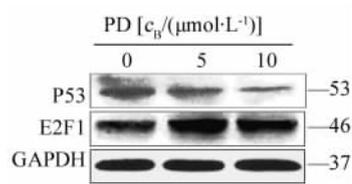


图 5 PD 影响 MDA-MB-231 细胞中 P53、E2F1 蛋白表达

Fig. 5 PD affected the expressions of P53 and E2F1 in MDA-MB-231 cells

3 讨论

癌症是重要的全球性公共卫生问题,严重威胁人类健康。手术治疗以及放、化疗是治疗癌症的主要方法。诱导癌症细胞发生凋亡是放化疗药物发挥作用的重要途径之一。本研究结果显示,PD 以浓度依赖方式显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖,72 h IC_{50} 值小于 10 $\mu\text{mol/L}$;10 $\mu\text{mol/L}$ PD 即可显著诱导乳腺癌细胞发生凋亡。

细胞凋亡主要有两种途径:细胞膜死亡受体介导的外源性途径和线粒体释放细胞色素 C 介导的内源性途径。凋亡是由多种基因严格调控的过程,如 caspase 家族、Bcl-2 家族、IAPs 家族、PARP、P53 等。在 caspase 家族中 caspase-3 属于效应 caspase,是各凋亡通路的靶蛋白,凋亡死亡受体途径和线粒体途径被激活后,引起相应的 caspase 蛋白表达水平的改变,最终都将激活 caspase-3 诱导细胞凋亡的发生。因此,caspase-3 的激活是判断细胞凋亡的重要指标。本研究发现,PD 上调了 cleaved caspase-3 的表达,从蛋白水平初步验证了 PD 可明显促进 MDA-MB-231 细胞凋亡。

死亡受体信号发生途径由细胞外死亡配体与膜上相应的死亡受体结合而传入细胞内部,使细胞内部 caspase-2、-8、-10 等分子被募集激活,从而产生下游一连串生物学效应。其中 caspase-8 是参与死亡受体介导的外源性凋亡途径的重要蛋白^[15]。PARP

定位在细胞核内,与应激条件下 DNA 修复密切相关,是 caspase-3 的主要剪切对象。当 PARP 发生剪切后失去酶活性,不再具有 DNA 修复、维持细胞稳定性等功能,加速了细胞的不稳定最终引起细胞凋亡。因此,PARP 发生剪切是细胞凋亡的重要指标,也是 caspase-3 激活的指标。本研究结果显示,经 PD 处理的 MDA-MB-231 细胞中 PARP 发生剪切,有活性的 cleaved caspase-3 和 -8 的表达上调,提示 PD 可能通过死亡受体途径促进 MDA-MB-231 细胞的凋亡。

线粒体信号途径是线粒体上游信号分子作用于线粒体膜,Bcl-2 蛋白家族活化形成蛋白通道,线粒体 PT 孔开放,凋亡活性物质释放引起下游 caspase 家族蛋白活化并作用于相应底物引起细胞凋亡。Caspase-9 是参与线粒体介导的内源性凋亡途径的重要蛋白^[16]。Bcl-2 家族是 caspase 的上游信号^[17],其中 Bax 是促凋亡类蛋白,Bcl-2 是抗凋亡蛋白^[18]。本实验结果显示 PD 下调 Bcl-2 的表达,上调 Bax 的表达,Bcl-2/Bax 的比值减少;同时 PD 上调了有活性的 cleaved caspase-3 和 -9 的表达,使 PARP 发生剪切。以上结果提示,PD 同时通过线粒体信号途径促进 MDA-MB-231 细胞的凋亡。

P53 基因是一个经典的肿瘤抑制基因,当 DNA 发生损伤时,P53 通过调节靶基因引起细胞周期阻滞、凋亡、自噬和死亡,从而发挥肿瘤抑制作用。在人类多种恶性肿瘤中 50% 以上的 P53 基因发生突变,在 MDA-MB-231 细胞中,P53 即发生突变,失去肿瘤抑制功能反而促进肿瘤的发生^[19]。突变的 P53 在乳腺癌细胞中发挥抑制凋亡的作用,当 P53 受到抑制时,乳腺癌细胞发生凋亡^[20]。本研究发现 PD 抑制了 P53 蛋白的表达,进一步验证了凋亡的存在。

本实验还检测了 MDA-MB-231 细胞中 E2F1 蛋白的表达。E2F1 是 E2Fs 转录因子家族的重要成员,具有特异性诱导细胞发生凋亡的功能,与多种凋亡相关蛋白有关,现已成为肿瘤治疗的新靶点^[21]。本实验显示,PD 上调了 E2F1 的表达水平,表明其在诱导凋亡发生时引起了与 E2F1 蛋白相关的改变。

综上,PD 可显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖能力,具有明显的抗肿瘤效应,其诱导乳腺癌细胞凋亡的发生可能是其发挥抗肿瘤效应的机制之一。诸多分子与细胞凋亡之间存在密切关系,其内在的相互关联还需要进一步研究。PD 作为高效低毒广谱的抗肿瘤自然化合物,具有巨大的应用前景。

[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. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [3] SAFDARI Y, KHALILI M, EBRAHIMZADEH M A, et al. Natural inhibitors of PI3K/AKT signaling in breast cancer: emphasis on newly-discovered molecular mechanisms of action [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 93: 1-10. DOI:10.1016/j.phrs.2014.12.004.
- [4] KIM B M, KIM D H, PARK J H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits constitutive activation of NF- κ B signaling in human breast cancer (MDA-MB-231) cells: ERK and Akt as potential upstream targets [J]. *J Cancer Prev*, 2014, 19(1): 23-30. PMID:25337569.
- [5] LU Z, ZHOU R, KONG Y, et al. S-equal, a secondary metabolite of natural anticancer isoflavone daidzein, inhibits prostate cancer growth in vitro and in vivo, though activating the Akt/FOXO3a pathway [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015 [Epub ahead of print]. DOI: 10.2174/1568009616666151207105720.
- [6] CHUNG J W, NOH E J, ZHAO H L, et al. Anti-inflammatory activity of prosapogenin methyl ester of platycodin D via nuclear factor-kappaB pathway inhibition [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(11): 2114-2120. DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.31.2114>.
- [7] ZHAO H L, HARDING S V, MARINANGELI C P, et al. Hypocholesterolemic and anti-obesity effects of saponins from *Platycodon grandiflorum* in hamsters fed atherogenic diets [J]. *J Food Sci*, 2008, 73(8): H195-200. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00915.x.
- [8] LU Z, WANG L, ZHOU R, et al. Evaluation of the spermicidal and contraceptive activity of Platycodin D, a saponin from *platycodon grandiflorum* [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e82068 [2015-11-05]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082068>. DOI: 10.1371/journal.pone.0082068.
- [9] PARK J C, LEE Y J, CHOI H Y, et al. In vivo and in vitro anti-tumor effects of platycodin d, a saponin purified from platycodi radix on the h520 lung cancer cell [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 478653. DOI: 10.1155/2014/478653.
- [10] ZHOU R, LU Z, LIU K, et al. Platycodin D induces tumor growth arrest by activating FOXO3a expression in prostate cancer in vitro and in vivo [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015, 14(9): 860-871. DOI: 10.2174/1568009614666141128104642.
- [11] CHUN J, KIM Y S. Platycodin D inhibits migration, invasion, and growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells via suppression of EGFR-mediated Akt and MAPK pathways [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 205(3): 212-221. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.07.002.
- [12] CHUN J, JOO E J, KANG M, et al. Platycodin D induces anoikis and caspase-mediated apoptosis via p38 MAPK in AGS human gastric cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(2): 456-470. DOI: 10.1002/jcb.24386.
- [13] KIM M O, MOON D O, CHOI Y H, et al. Platycodin D induces apoptosis and decreases telomerase activity in human leukemia cells [J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(1): 98-107. DOI:10.1016/j.canlet.2007.11.010.
- [14] LEE S K, PARK K K, KIM H J, et al. Platycodin D blocks breast cancer-induced bone destruction by inhibiting osteoclastogenesis and the growth of breast cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(5): 1809-1820. DOI:10.1159/000430152.
- [15] ESTORNES Y, AGUILETA M A, DUBUISSON C, et al. RIPK1 promotes death receptor-independent caspase-8-mediated apoptosis under unresolved ER stress conditions [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1798 [2015-11-06]. <http://www.nature.com/cddis/journal/v6/n6/fulldis2015175a.html>. DOI: 10.1038/cddis.2015.175.
- [16] DU R H, CUI J T, WANG T, et al. Trichothecin induces apoptosis of HepG2 cells viacaspase-9 mediated activation of the mitochondrial death pathway [J]. *Toxicol*, 2012, 59(1): 143-150. DOI: 10.1016/j.toxicol.2011.11.003.
- [17] SASI N, HWANG M, JABOIN J, et al. Regulated cell death pathways: new twists in modulation of Bcl-2 family function [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(6): 1421-1429. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0895.
- [18] MARTINO J C, YOULE R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.06.017.
- [19] RIVLIN N, BROSH R, OREN M, et al. Mutations in the P53 tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(4): 466-474. DOI: 10.1177/1947601911408889.
- [20] AL DHAHERI Y, EID A, ABUQAMAR S, et al. Mitotic arrest and apoptosis in breast cancer cells induced by *origanummajorana* extract: upregulation of TNF- α and downregulation of survivin and mutant P53 [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e56649 [2015-12-10]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056649>. DOI :10.1371/journal.pone.0056649.
- [21] ZHAN L, ZHANG Y, WANG W, et al. E2F1: a promising regulator in ovarian carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016 [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s13277-015-4770-7.

[收稿日期] 2016-03-10 [修回日期] 2016-04-10

[本文编辑] 阮芳铭