

新型硫色满酮衍生物抑制胃癌细胞生长与诱导胃癌细胞凋亡机制研究

孙新利¹, 刘立涛², 刘雅涵², 哈思宁², 牛征², 孙谦², 靳小石²
(1.河北大学医学院, 河北保定 071000; 2.河北大学附属医院, 河北保定 071000)

摘要: [目的] 研究(顺)-3-(氯代亚甲基)-5,7-二氯-硫色满-4-酮[(Z)-3-(chloromethyl-ene)-5,7-(dichloro)-thiochroman-4-ketone, CMDCT]对体外低、中、高分化的人胃癌细胞株生长抑制作用与诱导胃癌细胞凋亡机制研究。[方法] MTT法测试CMDCT对3种胃癌细胞株的生长抑制;以中分化胃癌细胞(SGC-7901)为例,流式细胞术(FCM)和缺口末端核苷酸标记法(TUNEL)检测胃癌SGC-7901细胞的凋亡;ELISA法测定胃癌SGC-7901细胞内被激活的人半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)的量;PCR检测Bcl-2、Bax、p53、Caspase-3基因表达;Western blot检测胃癌SGC-7901细胞中Bcl-2、Bax、p53、Caspase-3蛋白表达情况。[结果] CMDCT对3种胃癌细胞的生长具有显著抑制作用,随CMDCT浓度升高细胞生长的抑制率越高,当药物浓度为40 μ mol/L时,抑制率在(66.53% $\pm$ 2.47%)~(76.12% $\pm$ 1.35%)之间,和同浓度顺铂(DDP)组相比有较大差异;TUNEL检测胃癌SGC-7901细胞的凋亡指数:对照组为1.61% $\pm$ 0.23%;低浓度组为12.55% $\pm$ 1.44%;高浓度组61.15% $\pm$ 1.77%,加药组细胞凋亡指数明显高于对照组;流式细胞术结果显示,对照组凋亡率为4.78% $\pm$ 0.41%;加药组加入浓度10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L药物后,凋亡率分别为(9.42% $\pm$ 1.27%), (21.07% $\pm$ 1.35%), (55.8% $\pm$ 10.03%),明显高于对照组细胞凋亡率;PCR和Western blot检测,与对照组对比,加药组的Bax、p53和Caspase-3基因和蛋白表达量均增高,均具有上调作用,Bcl-2基因和蛋白表达降低,呈下调趋势。[结论] CMDCT对体外人低、中、高分化的3种胃癌细胞株均具有生长抑制作用,且可以诱导细胞凋亡,通过使具有促凋亡作用的p53、Bax、Caspase-3高表达,及抗细胞凋亡作用的Bcl-2的低表达,有效地诱导了胃癌SGC-7901细胞凋亡。

关键词: 硫色满酮衍生物;抗肿瘤作用;胃癌细胞;Bcl-2;Bax;p53;Caspase-3

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2019)11-0869-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.11.A010

Effect of Novel Thiochromanone Derivatives on Growth and Apoptosis of Gastric Cancer Cells

SUN Xin-li¹, LIU Li-tao², LIU Ya-han², HA Si-ning², NIU Zheng², SUN Qian², JIN Xiao-shi²

(1. Medical College of Hebei University, Baoding 071000, China; 2. Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of (cis)-3-(chloromethylene)-5,7-dichloro-thiochroman-4-ketone (CMDCT) on the growth and apoptosis of gastric cancer cells. [Methods] The low, medium and high differentiated human gastric cancer MKN-28, SGC-7901 and BGC-823 cells were treated with CMDCT. MTT assay was used to detect the growth of gastric cancer cells; flow cytometry (FCM) and nick end nucleotide labeling (TUNEL) were used to detect the apoptosis of the SGC-7901 cells, and ELISA was used to determine the amount of Caspase-3 activated in SGC-7901 cells. The expressions of Bcl-2, Bax, p53 and Caspase-3 genes were detected by PCR, and the expressions of Bcl-2, Bax, p53 and Caspase-3 proteins in SGC-7901 cells were detected by Western blot. [Results] CMDCT inhibited the growth of MKN-28, SGC-7901 and BGC-823 cells in a concentration-effect manner. When the concentration of CMDCT was 40 μ mol/L, the inhibition rate was between (66.53% $\pm$ 2.47%) and (76.12% $\pm$ 1.35%), which was significantly higher than that of the same concentration of cisplatin (DDP). There were significant differences in apoptotic index of SGC-7901 cells among control group (1.61% $\pm$ 0.23%), low concentration group (12.55% $\pm$ 1.44%) and high concentration group (61.15% $\pm$ 1.77%). Flow cytometry showed that the apoptotic rates of the control group and 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 40 μ mol/L CMDCT treated groups were (4.78% $\pm$ 0.41%), (9.42% $\pm$ 1.27%), (21.07% $\pm$ 1.35%) and (55.8% $\pm$ 10.03%), respectively. Compared with the control group, the

收稿日期: 2019-08-13; 修回日期: 2019-09-10

基金项目: 河北省重点研发计划(172777224); 河北省2017年政府资助临床医学优秀人才培养和

基础课题研究项目(2017043604-2)

通信作者: 刘立涛, E-mail: lltzgg@sina.com

expressions of Bax, p53 and Caspase-3 genes and proteins in the CMDCT treated groups were increased, while expression of Bcl-2 gene and protein decreased as demonstrated by PCR and Western blot methods. [Conclusion] CMDCT can inhibit the growth of human gastric cancer cell lines with low, medium and high differentiation in vitro, and induce apoptosis. By increasing the expressions of p53, Bax, Caspase-3 and decreasing bcl-2, CMDCT can effectively induce the apoptosis of SGC-7901 cells.

Key words: thiochromanone derivatives; anti-tumor effect; gastric cancer cells; Bcl-2; Bax; p53; Caspase-3

近年来,很多学者对于胃癌的治疗方式都提倡多学科、多方法的综合性治疗,但化学药物治疗依然是大部分胃癌患者的最重要治疗方法之一,而且现阶段各种化学合成药物仍然是治疗胃癌的主要化疗药^[1]。硫色满酮是一类具有抗炎、抗菌、抗 HIV 病毒、抗癌、抗血小板凝聚等多种生物活性含硫晶体的化合物^[2-5]。从硫色满酮类衍生物被合成以来,人们对各类硫色满酮衍生物的研究与合成产生了浓厚兴趣,通过化学、药剂合成等方法研发了一系列具有抗肿瘤活性化合物,国内不少学者已经证实了含多种取代基的新式硫色满酮衍生物(如 FMTK、CFTK、CMTK)均具有不同程度的癌细胞活性抑制作用。为探究新合成衍生物(顺)-3(氯代亚甲基)-5,7-二氯-硫色满-4-酮(CMDCT)(Figure 1)是否可以抑制胃癌细胞活性并诱导凋亡,本次试验将对此进行研究,为未来深入探讨 CMDCT 抗胃癌作用的靶点机制提供试验数据。

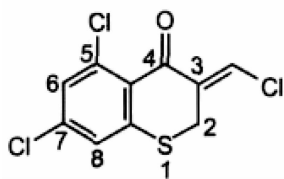


Figure 1 (Z)-3(chloromethylene)-5,7(dichloro)-thiochroman-4- ketone

1 材料与方法

1.1 细胞株

低分化、中分化、高分化的人胃癌细胞株 BGC-823、SGC-7901、MKN-28 由本实验常规传代培养,为

贴壁生长(由河北大学药学院赠予)。

1.2 药品与试剂

新生牛血清、二甲基亚砷(DMSO)、DMEM 细胞培养基、苏木素染色液、RIPA 裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF)均购自北京索莱宝公司;胰蛋白酶(1:250)和 MTT 均购自美国 Amersco 公司;顺铂(DDP)购自齐鲁制药;ELISA 试剂盒购自 R/D 公司;Annexin V-FITC/PI 试剂盒、辣根过氧化氢酶显色试剂盒购自 B&D 公司;反转录试剂盒购自 TKR 公司;Bcl-2、Bax、p53、Caspase-3 和 GAPDH 内参基因引物均购于上海生物工程技术公司;PCR 试剂盒购于美国 A&B 公司;PBS 自行配备;试验药物来自于河北大学药学院重点实验室。

1.3 试验药物的配制

用 1%的 DMSO 液溶解试验药物,与培养液配比制得试验液,浓度配伍为 80.0、40.0、20.0、10.0、8.0、4.0、2.0、1.0 及 0.5 μmol/L;顺铂组用 1% DMSO 溶解顺铂至浓度为 40.0 μmol/L;对照组溶液中 DMSO 含量均为 1%。

1.4 MTT 法测定细胞增殖抑制情况

取 3 种对数期胃癌细胞,悬液密度调整为每孔 10^5 个/ml,各孔加入 100 μl,置于 96 孔板。培养于孵育箱中,12h 后分别加药。DDP 组:胃癌细胞和 DDP 溶液;对照组:胃癌细胞和培养液(1% DMSO);加药组:胃癌细胞和受试药物溶液,给药组同时设 9 个浓度,各浓度分设 5 复孔。孵化箱培养 24h 后各孔加入浓度为 5.0 mg/ml 的 MTT 液 10 μl,继续孵化箱培养 4h,各孔加 DMSO 溶液 100 μl,震荡时间 8~10 min,将酶标仪波长调至 490 nm^[6],检测光密度值。

1.5 缺口末端核苷酸标记法(TUNEL)法与 DAB 染色法结合检测 CMDCT 诱导 SGC-7901 细胞凋亡

取对数期胃癌 SGC-7901 细胞(以下实验均以

SGC-7901 为例),悬液密度同 1.4 中,各孔加入 1ml,置于 24 孔板,培养 12h 后加入 10、20、40 μ mol/L 药物,设对照组(加入同浓度 DMSO 溶液),均设 3 复孔,再培养 24h。去上清液处理,用固定液固定 30min,PBS 洗 2~3 遍。对细胞凋亡进行检测。随机选取 5 个镜下视野,计数细胞(以 500 个为标准)及细胞核显棕黄色的细胞,最终计算细胞凋亡指数(棕黄色细胞核的细胞数/500 $\times$ 100%)。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率及 ELISA 法测定细胞内 Caspase-3 浓度

取对数期 SGC-7901 细胞,悬液密度调整为每孔 10^6 个/ml,各孔加入 3ml,置于 6 孔板,培养于孵箱中 12h,加入浓度为 10、20、40 μ mol/L 药物,再次培养于培养箱中 24h,PBS 洗涤 2~3 次,调试好流式细胞仪,检测分析细胞的凋亡情况。加药组细胞培养、加药、收集、洗涤步骤同前,设对照组,即胃癌 SGC-7901 细胞和培养液(1% DMSO)。分别加入预冷好的裂解液、蛋白酶抑制剂,离心上清液,用 ELISA 试剂盒,按说明书操作,酶标仪读取光密度值,绘制标准曲线,根据曲线算得各样本中 Caspase-3 浓度值。

1.7 实时定量 qRT-PCR 检测 Bcl-2、Bax、p53、Caspase-3 基因表达

取对数期 SGC-7901 细胞,悬液密度调整为每孔 10^6 个/ml,置于 6 孔板中,培养于孵箱中 24h,去除培养基,加入浓度为 10、20、40 μ mol/L 药物。对照组:SGC-7901 细胞和培养液(1% DMSO)。继续培养于孵箱 48h,提取总 RNA 采用 TRIZOL 法,按操作说明,将 RNA 逆转录为 cDNA,内参:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因,进行 RT-PCR 反应。引物序列: Bax 上游引物:5'-TTTCTGACGGCAACTTCAAC-3',下游引物:5'-AGTCCAATGTCCAGCCCAT-3'; Bcl-2 上游引物:5'-GGAGGATTGTGGCCTTCTTTG-3',下游引物:5'-GCATCCCAGCCTCCGTTATC-3'; p53 上游引物:5'-CGGTGCGTTGCTTTACTTGT-3',下游引物:5'-TTGCTCGGGTGTATGGCGTCTGAT-3'; Caspase-3 上游引物:5'-TGGAAGCGAATCAATGGACTCT-3',下游引物:5'-TGAATGTTTCCCTGAGGTTTGC-3'; GAPDH 上游引物:5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3',下游引物:5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'。试验 3 次。扩增的条件为预变性:95 $^{\circ}$ C 8min;变性:95 $^{\circ}$ C 15s;退火:60 $^{\circ}$ C 40s;延伸:72 $^{\circ}$ C 25s,35~

40 个循环。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.8 Western blot 检测胃癌 SGC-7901 细胞中 Bcl-2、Bax、p53、Caspase-3 蛋白表达

取对数期 SGC-7901 细胞,对照组与加药组中细胞的培养、加药、收集、洗涤细胞步骤与 1.6 中步骤一致。加入细胞裂解液,离心上清液,取各组胃癌细胞 SGC-7901 总蛋白。以 GAPDH 为内参进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳结束后转至 PVNF 膜上,滴加一抗后于 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜,加入二抗后 37 $^{\circ}$ C 放置 1h,采集图像分析 Bcl-2、Bax、p53、Caspase-3 蛋白表达情况。

1.9 统计学处理

SPSS19.0 软件分析处理数据资料,计量资料采用 *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。凋亡数据用 CellQuestPro 软件处理分析;半数抑制浓度用 IC_{50} 计算。

2 结 果

2.1 体外抗人胃癌细胞活性

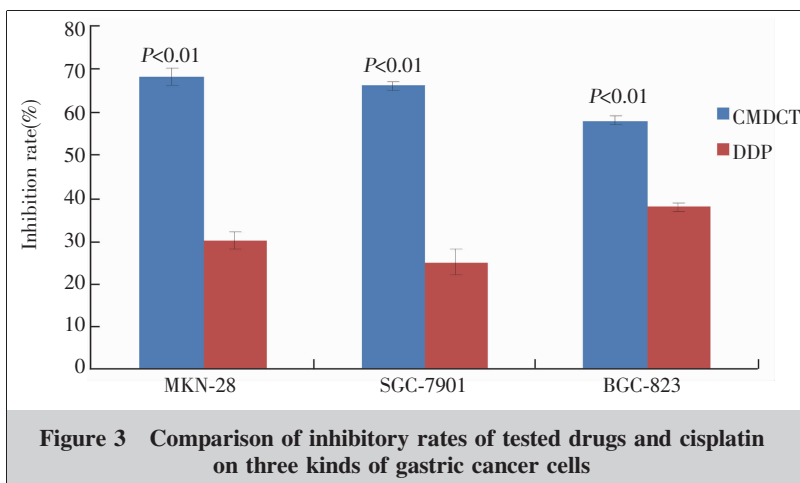
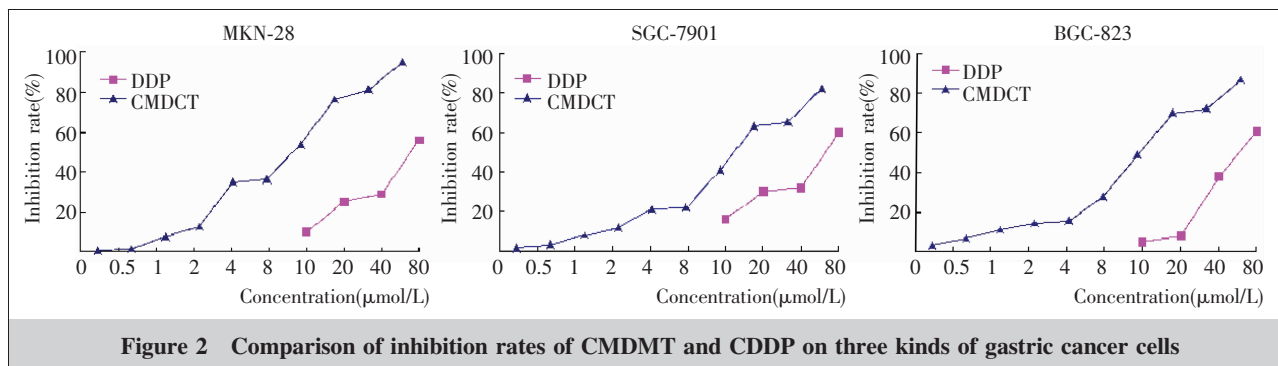
CMDCT 对 MKN-28 细胞、SGC-7901 细胞、BGC-823 细胞的生长有显著抑制作用,且 CMDCT 浓度越高,对胃癌细胞生长的抑制率越高(Figure 2)。当 CMDCT 的浓度为 40 μ mol/L 时,抑制率在(66.53% $\pm$ 2.47%)~(76.12% $\pm$ 1.35%)之间,和浓度为 40 μ mol/L 的 DDP 组相比有较大的差异($P < 0.01$),说明在抗胃癌细胞活性方面 CMDCT 明显好于 DDP(Figure 2,3)。计算 CMDCT 对 SGC-7901 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})见表 1(Table 1)。

Table 1 IC_{50} values of CMDCT and DDP (n=3, $\bar{x} \pm s$)(μ mol/L)

Cell lines	CMDCT	DDP
MKN-28	10.53 $\pm$ 0.23	65.35 $\pm$ 1.17
SGC-7901	11.34 $\pm$ 0.31	67.48 $\pm$ 2.86
BGC-823	15.76 $\pm$ 0.41	60.75 $\pm$ 1.79

2.2 检测 CMDCT 诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡

TUNEL 检测胃癌 SGC-7901 细胞株的凋亡指数:对照组(1.61% $\pm$ 0.23%);低浓度组(12.55% $\pm$ 1.44%);高浓度组(61.15% $\pm$ 1.77%),结果显示加药组细胞凋亡指数明显高于对照组,证明 CMDMT 能够诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡,且凋亡指数随试验



药物浓度增加而升高(Figure 4A,4C)。流式细胞仪检测细胞凋亡时,镜下观察药物作用后细胞凋亡情况。如图 4B(Figure4B)中,第一象限:晚期凋亡细胞(有异硫氰酸荧光素染色、有 PI);第二象限:坏死细胞(无异硫氰酸荧光素染色、有 PI);第三象限:正常细胞(无异硫氰酸荧光素染色、有 PI);第四象限:早期凋亡细胞(有异硫氰酸荧光素染色、无 PI)。结果表明,对照组大部分为正常细胞,其凋亡率为(4.78%±0.41%);加入浓度 10、20、40μmol/L 药物后,凋亡细胞增多,凋亡率分别为 (9.42%±1.27%), (21.07%±1.35%), (55.8%±10.03%), 明显高于对照组细胞凋亡率,经过统计学处理差异有统计学意义。胃癌 SGC-7901 细胞凋亡率随着 CMDCT 浓度增高而升高(Figure 4B,4C,5)。

2.3 测定胃癌 SGC-7901 细胞内 Caspase-3 浓度值

试验结果显示:加药组与对照组进行对比,加药组的胃癌 SGC-7901 细胞内 Caspase-3 浓度随药物浓度升高而逐渐增加,呈浓度依赖性;当药物浓度为 40μmol/L 时,加药组细胞内 Caspase-3 浓度大约是对照组细胞内 Caspase-3 浓度的 2 倍(Figure 6)。

2.4 PCR 测定 *Bcl-2*、*Bax*、*p53*、*Caspase-3* 基因的相对表达量

与对照组对比,加药组的 *Bax* 基因、*p53* 基因和 *Caspase-3* 基因相对表达量增高,CMDCT 对 3 种抑癌基因的表达均具有上调作用,其表达量随药物浓度升高而增加,在试验药物浓度为 40μmol/L 时表达量最高;CMDCT 明显抑制 *Bcl-2*mRNA 表达,且其表达量随药物浓度升高而减低(Figure 7)。

2.5 Western blot 检测胃癌 SGC-7901 细胞中 *Bax*、*Bcl-2*、*p53* 和 *Caspase-3* 蛋白表达

白表达

细胞内 *Bax*、*Bcl-2*、*p53* 和 *Caspase-3* 蛋白表达与 mRNA 表达情况一致(Figure 8)。其中,*Bax*、*p53* 和 *Caspase-3* 蛋白表达量增高,且表达量随药物浓度升高而增加,具有浓度依赖性;*Bcl-2* 蛋白表达量降低,并随药物浓度升高而减低。

3 讨论

对于胃癌来说,有效的化疗药物治疗是最关键治疗方法之一。目前大部分用于抗癌的化学合成药物作用机制基本相同,就是诱导癌细胞凋亡,所以对于这类化学药物的研究与合成,为抗恶性肿瘤药物治疗开辟了新的方向和角度^[7]。硫色满酮是一类具有高脂溶性的杂环化合物,不少国内外文献均已报道证实了此类衍生物具有体外抗多种肿瘤细胞活性作用,大部分衍生物是将甲基或氯原子单独引入 5 或 6 位碳原子处,其抗癌效果亦是各不相同,本试验研究的新型化合物是在 5 和 7 位碳原子处同时引进氯原子。

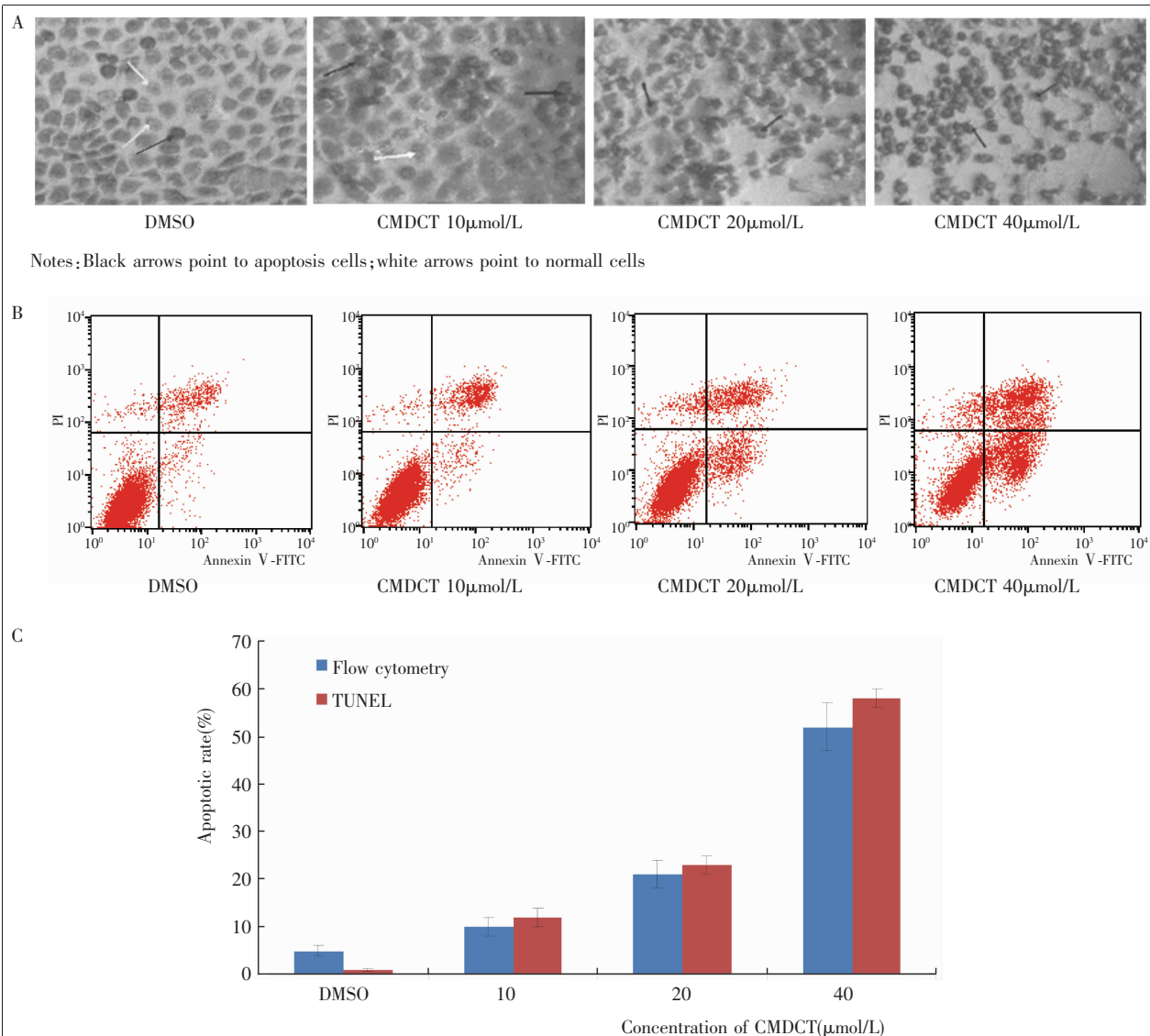


Figure 4 Survival of gastric cancer SGC-7901 cells treated with CMDCT

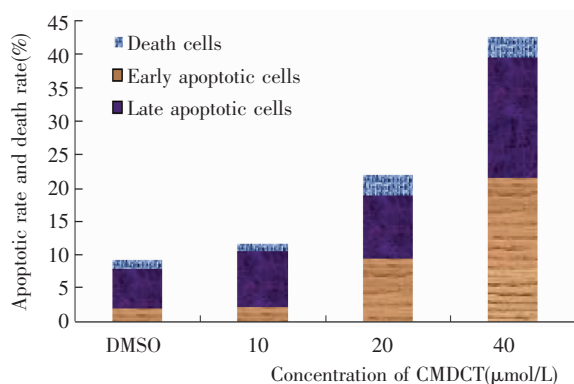


Figure 5 Flow cytometry analysis of apoptosis in gastric cancer SGC-7601 cells

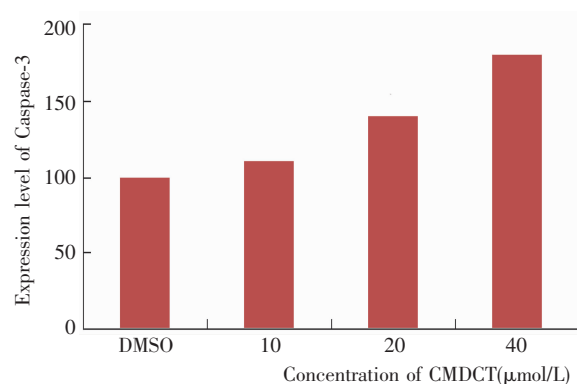


Figure 6 Changes of Caspase-3 in gastric cancer SGC-7901 cells treated with CMDCT

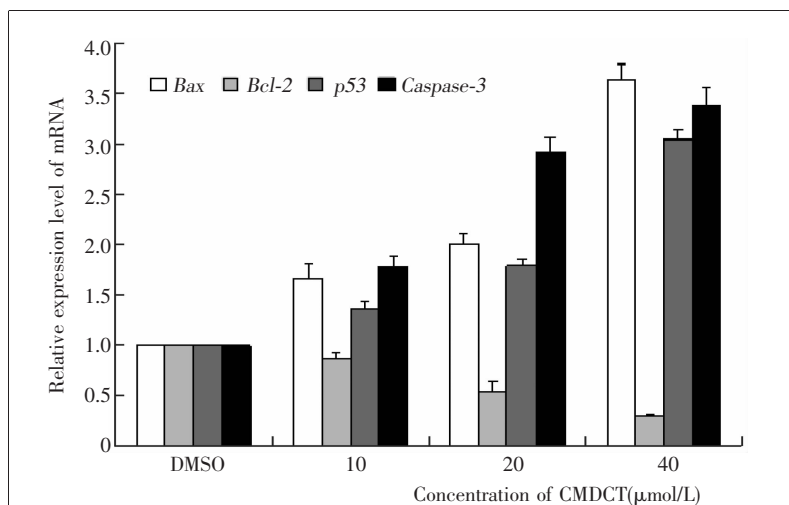


Figure 7 The expression of *Bax*, *Bcl-2*, *p53* and *Caspase-3* genes in gastric cancer SGC-7901 cells treated with CMDCT

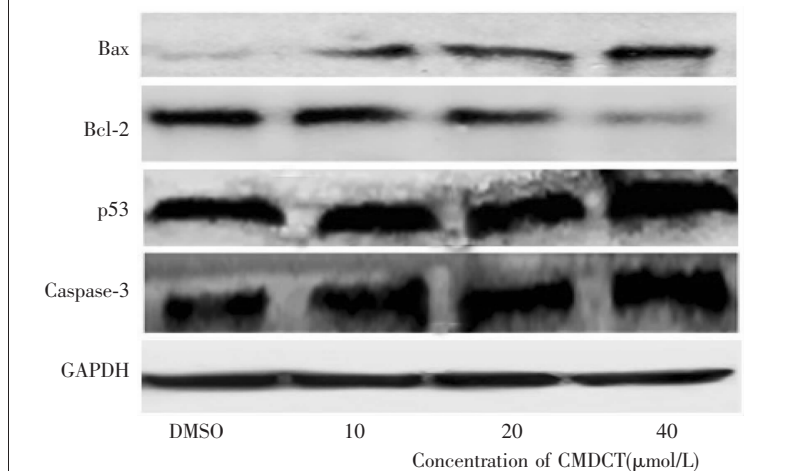


Figure 8 Effects of different concentrations of CMDCT on the expression of *Bax*, *Bcl-2*, *p53* and *Caspase-3* proteins

从细胞代谢角度来看,肿瘤细胞出现的原因在于此类细胞因某个或某些因素导致其凋亡过程受到了限制,使得细胞不能正常进行死亡清除,最终导致了肿瘤的产生。因此,能够诱导肿瘤细胞凋亡就是我们研究探讨的方向。DDP具有细胞毒性,目前作为广谱抗癌药物应用于临床治疗中,本实验中用MTT法将CMDCT与DDP进行比较,结果表明CMDCT对3种胃癌细胞均具有较强生长抑制作用,且抗胃癌细胞活性方面CMDCT明显优于DDP;并可诱导癌细胞凋亡。流式细胞仪检测和TUNEL法证实CMDCT可以诱导胃癌细胞凋亡,分析发现调

亡指数随CMDCT剂量增加而升高。Caspase-3是凋亡过程中最关键的凋亡因子,它能够活化切断DNA链的相关蛋白酶,最终导致细胞脱落和细胞形态异常,从而诱导细胞凋亡^[8]。实验结果发现,当药物浓度为40 μmol/L时,加药组细胞内Caspase-3浓度大约是对照组细胞内Caspase-3浓度的2倍,Caspase-3蛋白大量合成促进细胞凋亡^[9]。

野生型p53是可以对细胞凋亡进行调控作用的促凋亡基因^[10],其能减少Bcl-2转录,拮抗Bcl-2蛋白表达,从而可以诱导细胞的凋亡。Bcl-2族是一类与细胞死亡有关的调控因子,其中Bcl-2、Bax是最具有代表性的两种重要因子^[11]。Bax为促进凋亡基因^[12],Bcl-2为抑制凋亡基因^[13],二者具有拮抗作用。Bcl-2能够阻止凋亡因子(如细胞色素C等)从细胞线粒体中释放,具有抗凋亡作用;而Bax可与细胞内某种离子通道相互作用,增加凋亡因子(细胞色素C)的释放,具有促凋亡作用,p53则可以通过上调Bax的表达水平,以及下调Bcl-2的表达共同完成促细胞凋亡作用。试验表明,CMDCT作用SGC-7901细胞后,细胞内p53、Bax表达量均升高,当药物浓度为40 μmol/L时,其表达量远远高于对照组,细胞内Bcl-2的表达量则呈

下降趋势,CMDCT能够有效地促进SGC-7901细胞死亡机制可能与上调p53和Bax的表达从而拮抗了Bcl-2的表达^[14]有关。

总之,根据本实验研究表明,新型硫色满酮衍生物CMDCT对3种胃癌细胞增殖抑制具有显著活性,且增殖抑制呈现药物浓度依赖性;CMDCT通过激活具有促凋亡作用的p53、Bax、Caspase-3高表达,及拮抗细胞凋亡Bcl-2的低表达,有效地诱导了胃癌SGC-7901细胞凋亡,对CMDCT诱导胃癌细胞凋亡机制进行了初步研究,为今后深入探讨CMDCT抗胃癌作用的靶点机制提供了依据。

参考文献:

- [1] Zhai L, Chen HQ, Lu JW, et al. Analysis of the related factors of severe adverse reactions to chemotherapy for advanced gastric cancer [J]. *Clinical Rational Drug Use*, 2018, 11(2): 16–17, 135. [翟璐, 陈环球, 陆建伟, 等. 晚期胃癌化疗严重不良反应的相关因素分析[J]. *临床合理用药*, 2018, 11(2): 16–17, 135.]
- [2] Li SB, Qi H, Zhang CC, et al. (E)-3-[(1,3,4-thiadiazole-2-yl) amino] methylene-thiochroman-4-one compounds: synthesis, antifungal activity determination and molecular docking [J]. *Journal of Pharmacy*, 2018, 53(9): 1518–1525. [李生彬, 齐慧, 张超超, 等. (E)-3-[(1,3,4-噻二唑-2-基)氨基]亚甲基-硫色满-4-酮类化合物的合成、抗真菌活性测定及分子对接研究[J]. *药学报*, 2018, 53(9): 1518–1525.]
- [3] Liang GC, Zhou G, Zhong YF, et al. Synthesis and antifungal activity of novel thiochromanone derivatives containing 1,3,4-thiadiazole [J]. *Synthetic Chemistry*, 2015, 23(12): 1100–1105. [梁国超, 周冠, 钟一凡, 等. 新型含 1,3,4-噻二唑的硫色满酮衍生物的合成及其抗真菌活性[J]. *合成化学*, 2015, 23(12): 1100–1105.]
- [4] Demirayak S, Yurtas L, Gundogdu-Karaburun N, et al. New chroman-4-one/thiochroman-4-one derivatives as potential anticancer agents [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(7): 1063–1072.
- [5] Zhang XX, Song YL, Liu HX, et al. Synthesis and antitumor activity of 6,11-dihydrobenzothian [4,3-b] indoles [J]. *Synthetic Chemistry*, 2015, 23(4): 284–288. [张晓旭, 宋亚丽, 刘海霞, 等. 6,11-二氢苯并噻喃并[4,3-b]吲哚类化合物的合成及其抗肿瘤活性 [J]. *合成化学*, 2015, 23(4): 284–288.]
- [6] Su LM, Liu YX, Huang X, et al. Anti-tumor activity and mechanism of novel thiochromanone derivatives in vitro [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2012, 21(6): 675–680. [苏立敏, 刘玉欣, 黄鑫, 等. 新型硫色满酮衍生物的体外抗肿瘤活性及作用机制[J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(6): 675–680.]
- [7] Santos CMM, Silva VLM, Silva AMS, et al. Synthesis of chromone-related pyrazole compounds [J]. *Molecules*, 2017, 22(10): E1665.
- [8] Yan P, Lyu G, Hu M, et al. Role of cytochrome C release and Caspase-3 expression in neuronal apoptosis after spinal cord injury [J]. *Shandong Medicine*, 2009, 49(52): 46–48. [闫鹏, 吕刚, 胡萌, 等. 细胞色素 C 释放与 Caspase-3 表达在脊髓损伤后神经元细胞凋亡过程中的作用[J]. *山东医药*, 2009, 49(52): 46–48.]
- [9] Zhu WH, Zhang HN, Wang HR, et al. Inhibitory effects of pyrethrin on gastric cancer cell line BGC-823 and its mechanism [J]. *Journal of Precision Medicine*, 2019, 34(2): 173–178. [祝文浩, 张涵妮, 王慧茹, 等. 小白菊内酯对胃癌细胞 BGC-823 的抑制作用及其机制 [J]. *精准医学杂志*, 2019, 34(2): 173–178.]
- [10] Ling JM, Wang J, Xu XL, et al. P53 protein phosphorylation and its function [J]. *Life Science*, 2018, 30(3): 233–240. [令吉明, 王建, 徐晓琳, 等. P53 蛋白磷酸化及其功能[J]. *生命科学*, 2018, 30(3): 233–240.]
- [11] Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, et al. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? [J]. *Iran Biomed J*, 2015, 19(2): 69–75.
- [12] Tian S, Yu HD. The effect of cordycepin on human gastric cancer cell line HGC-27 and its molecular mechanism [J]. *Modern Applied Pharmacy of China*, 2019, 36(12): 1468–1472. [田爽, 于洪丹. 虫草素对人胃癌细胞系 HGC-27 的影响及分子机制 [J]. *中国现代应用药理学*, 2019, 36(12): 1468–1472.]
- [13] Ren LP, Li XJ, Jin SJ, et al. Influence of sophoridine on proliferation and caspase-3/Bcl-2/Bax signaling pathway of human pancreatic cancer cell line capan-1 cells [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2017, 34(3): 325–328. [任立平, 李晓杰, 金圣杰, 等. 槐定对人胰腺癌细胞株 capan-1 细胞增殖及 caspase-3/bcl-2/bax 信号通路的影响[J]. *中国现代应用药理学*, 2017, 34(3): 325–328.]
- [14] Li WQ, Hou ZC, Guan F, et al. Effects of compound Lizard Powder and SD rat serum containing compound Lizard Powder on p53 and Bax of human BGC-823 gastric cancer cells [J]. *Jiangsu Traditional Chinese Medicine*, 2017, 49(7): 76–78, 79. [李卫强, 侯卓成, 关芳, 等. 复方蜥蜴散及其拆方 SD 大鼠含药血清对人 BGC-823 胃癌细胞 p53, Bax 的影响 [J]. *江苏中医药*, 2017, 49(7): 76–78, 79.]