

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.09.003

紫草素促进肺癌 A549 细胞凋亡 *

李发凯¹ 张 芳¹ 陆 远¹ 王 媛¹ 李 昂² 吴健雄¹ 任新玲^{1Δ}

(1 第四军医大学第一附属医院呼吸与危重症医学科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学免疫学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨紫草素对 A549 人肺癌细胞凋亡的影响和可能的作用机制。**方法:**采用不同浓度的紫草素对体外培养的 A549 人肺癌细胞进行干预, CCK-8 法和流式细胞术分别检测紫草素对 A549 细胞增殖和凋亡的影响, Western blot 观察凋亡相关蛋白 (Bcl-2 和 Bax) 表达水平的变化, 激光共聚焦显微镜检测紫草素处理 12 h 并用 JC-1 染色的 A549 细胞线粒体膜电位改变。**结果:** CCK-8 分析显示, 0.5 μM 、1 μM 、2 μM 、4 μM 和 6 μM 实验组 A549 细胞相对存活率分别为 (83.71 $\pm$ 1.02)%、(57.47 $\pm$ 2.78)%、(27.39 $\pm$ 1.96)%、(16.96 $\pm$ 1.47)%和(14.72 $\pm$ 1.93)%, 与对照组相比实验组 A549 细胞相对存活率明显降低; 流式细胞术结果表明, 1 μM 、2 μM 、4 μM 实验组 A549 细胞的凋亡率分别为(13.80 $\pm$ 1.76)%、(40.90 $\pm$ 3.48)%和(78.80 $\pm$ 2.52)%, 与对照组相比紫草素呈剂量依赖型促进 A549 细胞凋亡; Western blot 结果证实, 紫草素能降低 A549 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达量, 而升高 Bax 蛋白的水平; 激光共聚焦显微镜扫描结果显示紫草素能降低 A549 细胞的线粒体膜电位, 呈剂量依赖型。**结论:**紫草素能显著促进 A549 细胞凋亡, 其机制可能与下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达和上调促凋亡蛋白 Bax 的表达有关。

关键词:紫草素; 肺癌; 凋亡**中图分类号:**R-33; R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)09-1611-05

Shikonin Promotes the Apoptosis of A549 Human Lung Cancer Cells*

LI Fa-kai¹, ZHANG Fang¹, LU Yuan¹, WANG Yuan¹, LI Ang², WU Jian-xiong¹, REN Xin-ling^{1Δ}

(1 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Immunology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of shikonin on apoptosis of A549 human lung cancer cells, as well as the mechanism.

Methods: The A549 cells were treated with different concentrations of shikonin in vitro. The cell viability was assessed by CCK-8 Assay, and the cell apoptosis was determined by flow cytometry. The expression of apoptosis associated proteins (Bcl-2 and Bax), was observed by Western blot. The MMP (mitochondrial membrane potential) of A549 cells was detected by Laser scanning Confocal Microscopy (LSCM) using JC-1 probes 12 h after shikonin treatment. **Results:** After exposure to various concentrations of shikonin(0.5 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM and 6 μM), as the results of CCK-8 showed, the survival rates of A549 cells were (83.71 $\pm$ 1.02)%, (57.47 $\pm$ 2.78)%, (27.39 $\pm$ 1.96)%, (16.96 $\pm$ 1.47)% and (14.72 $\pm$ 1.93)%, respectively, which were obviously lower than those in the control group. Further study on shikonin showed that it induced apoptosis of A549 cells in a dose-dependent manner; the apoptosis rates in shikonin-treated groups(1 μM , 2 μM , 4 μM) were (13.80 $\pm$ 1.76)%, (40.90 $\pm$ 3.48)% and (78.80 $\pm$ 2.52)%, respectively, compared to those in the control group. In addition, a western blot analysis indicated that shikonin decreased the expression of protein Bcl-2, but increased the expression of protein Bax. Moreover, shikonin depolarized the MMP of A549 cells in a dose-dependent manner too. **Conclusion:** Our results indicated that shikonin significantly induced apoptosis of A549 cells, the mechanism may be related to the down-regulation of anti-apoptotic protein Bcl-2 and up-regulation of apoptotic protein Bax.

Key words: Shikonin; Lung cancer; Apoptosis**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R734.2 **Document code:** A**ArticleID:** 1673-6273(2018)09-1611-05

前言

肺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率均位居恶性肿瘤的前列;肺癌患者五年生存率不足 20%,晚期患者仅为 4%左右^[1-3]。随着技术的进步,部分肺癌可得到及时诊断,患者可行根治性手术而痊愈;但大部分患者明确诊断时

已属于晚期^[4],对晚期肺癌患者而言,化疗仍然是重要的治疗手段^[5,6]。然而目前的化疗方案对肺癌患者的疗效有限,新药开发势在必行。紫草素是一种从紫草科植物紫草的根部提取出来或人工生产的结晶性粉末,具有抗菌、抗炎和抗肿瘤等作用^[7-10]。国内外研究表明,紫草素对多种恶性肿瘤,如前列腺癌、胃癌、肝癌、卵巢癌、神经胶质细胞瘤和肺癌等均有较好的抗肿瘤作

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172222)

作者简介:李发凯(1980-),硕士研究生,主要研究方向:肺癌, E-mail: lfk523@126.com

 Δ 通讯作者:任新玲(1965-),硕士生导师,副教授,主要研究方向:肺癌, E-mail: majRenXL@fmmu.edu.cn, 电话: 029-84771132

(收稿日期:2017-10-18 接受日期:2017-11-12)

用^[11-14],但是其作用机制并未完全清楚。本研究以肺癌 A549 细胞为研究对象,检测紫草素对其增殖和凋亡的影响,并初步探讨紫草素可能的作用机制,为紫草素应用于临床提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞株 A549 来源于第四军医大学分子生物学实验室;紫草素购于上海源叶生物科技有限公司(纯度为 98%);高糖 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自 Biological Industries (BI);CCK-8 试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司;AnnexinV/PI 试剂盒购于 Biovision 公司;蛋白定量试剂盒 BCA(bicinchoninic acid)、细胞裂解液 RIPA、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)购自碧云天生物技术有限公司;兔抗人 Bax、Bcl-2 和 β -actin 一抗购自美国 CST (Cell Signaling Technology)公司;丙酮酰胺凝胶试剂盒和羊抗兔二抗购自西安晶彩生物科技有限公司;全自动酶标仪、电泳转印系统和流式细胞仪购自美国 bio-rad 公司,激光共聚焦显微镜购自日本尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 细胞复苏后接种于含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。根据细胞生长情况,约 1-2 天换液传代。

1.2.2 CCK-8 比色法检测细胞存活率 取处于对数生长期的 A549 细胞,细胞消化和离心后计数,重悬至 4×10^4 /mL,以 100 μ L/孔接种至 96 孔板中。于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 小时后,每组(6 个复孔)分别加入相应剂量的紫草素(终浓度分别为 0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M、6 μ M);紫草素用 DMSO 溶解,以含 0.1%DMSO 和 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基组作为实验对照。继续于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h,然后在每孔中分别加入 10 μ L CCK-8 试剂溶液,孵箱中培养 1 h 左右待液体变黄时取出,用全自动酶标仪于 450 nm 处测定吸光度(A)。设定对照组 A549 细胞的存活率为 100%,细胞相对存活率=(实验组吸光度-空白孔组吸光度)/(对照组吸光度-空白孔组吸光度)×100%。

1.2.3 流式细胞仪测定细胞凋亡 取对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中继续培养 24 h 后加入相应剂量的紫草素(终浓度分别为 1 μ M、2 μ M、4 μ M),每组 2 个平行,以含 0.1%DMSO 和 10%胎牛血清的高糖 DMEM 溶液组为实验对照组。紫草素作用 24 h 后收集各组细胞,1000 rpm 离心 5 min,弃上清,用预冷的 PBS 重悬和洗涤细胞 2 次,然后进行细胞计数。按照 AnnexinV/PI 试剂盒说明书加入细胞重悬结合液 190 μ L,再加入 10 μ L PI,避光孵育 5-10 min,然后用流式细胞仪检测并分析细胞凋亡情况。凋亡率(%)=早期凋亡率(%) + 晚期凋亡率(%)。

1.2.4 Western blot 检测 A549 细胞中凋亡相关蛋白的表达 取对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中,放入 37℃、5% CO₂ 孵箱培养,24 h 后吸去原培养基,分别加入紫草素终浓度为 0 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M 的含 10%血清 DMEM 高糖培养液。继续培养 24 h 后提取细胞蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量,然后把 5× 上样缓冲液按 1:4 比例加入到蛋白样品中,混匀后

加热至 95℃煮 10 min 使蛋白变性,处理后的样品放入 -20℃冰箱保存。配胶和蛋白上样后依次进行电泳、转膜。转膜结束后使用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,然后将 PVDF 膜置于 1:1000 稀释的 Bax、Bcl-2 和 β -actin 单克隆一抗稀释液中,4℃孵育过夜。次日,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后用 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,再次用 TBST 洗膜 3 次,10 min/次,最后采用化学发光法成像。

1.2.5 共聚焦显微镜检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) 取对数生长期的 A549 细胞接种于激光共聚焦专用培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后分组进行药物处理。对照组加入含 0.1%DMSO 和 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液;实验组分别加入紫草素终浓度为 2 μ M、4 μ M 的含 10%胎牛血清高糖 DMEM 培养液。继续培养 12 h 后用 PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 细胞培养液和 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀,在 37℃、5% CO₂ 孵箱中孵育 30 min,然后用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,最后加入 1 mL 细胞培养液,于激光共聚焦显微镜下检测 A549 细胞线粒体膜电位。

1.3 统计学分析

采用 IBM SPSS 19.0 软件对数据进行处理和统计学分析,计量资料以(Mean±SD)表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行不同组间比较,采用 Tukey 检验进行两组间比较,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫草素有效降低 A549 细胞的活力

用不同浓度的紫草素(0 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M 和 6 μ M)分别处理 A549 细胞 24 h,CCK-8 比色法检测结果显示,以对照组 A549 细胞的存活率为 100%,则实验组(0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M 和 6 μ M)的相对存活率分别为(83.71±1.02)%、(57.47±2.78)%、(27.39±1.96)%、(16.96±1.47)%、(14.72±1.93)%,单因素方差分析显示紫草素干预后各组间的存活率有差异(P<0.05),Tukey 检验分别比较 0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M 和 6 μ M 实验组与对照组的存活率,结果表明均有统计学差异(P 值均小于 0.05)。同时统计分析显示紫草素对 A549 细胞 24 小时 IC₅₀ 为 1.325 μ M。见图 1。

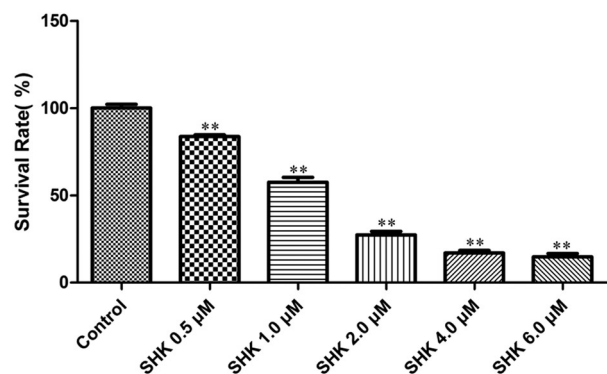


图 1 紫草素抑制 A549 细胞增殖

Fig.1 Shikonin inhibits the proliferation of A549 cells(n=6,**P<0.01 vs. Control)

2.2 紫草素促进 A549 细胞凋亡

分别以 0 μM 、1 μM 、2 μM 、4 μM 紫草素处理 A549 细胞 24 h, 收集细胞并用流式细胞仪检测凋亡, 结果显示对照组 (0 μM) 的凋亡率为 $(6.30 \pm 1.25)\%$, 1 μM 实验组的凋亡率升至 $(13.80 \pm 1.76)\%$, 2 μM 实验组的凋亡率达到 $(40.90 \pm 3.48)\%$, 4

μM 实验组的凋亡率高达 $(78.80 \pm 2.52)\%$ 。研究表明紫草素呈剂量依赖型促进 A549 细胞凋亡, 与对照组比较, 1 μM 、2 μM 、4 μM 实验组的凋亡率均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。见图 2。

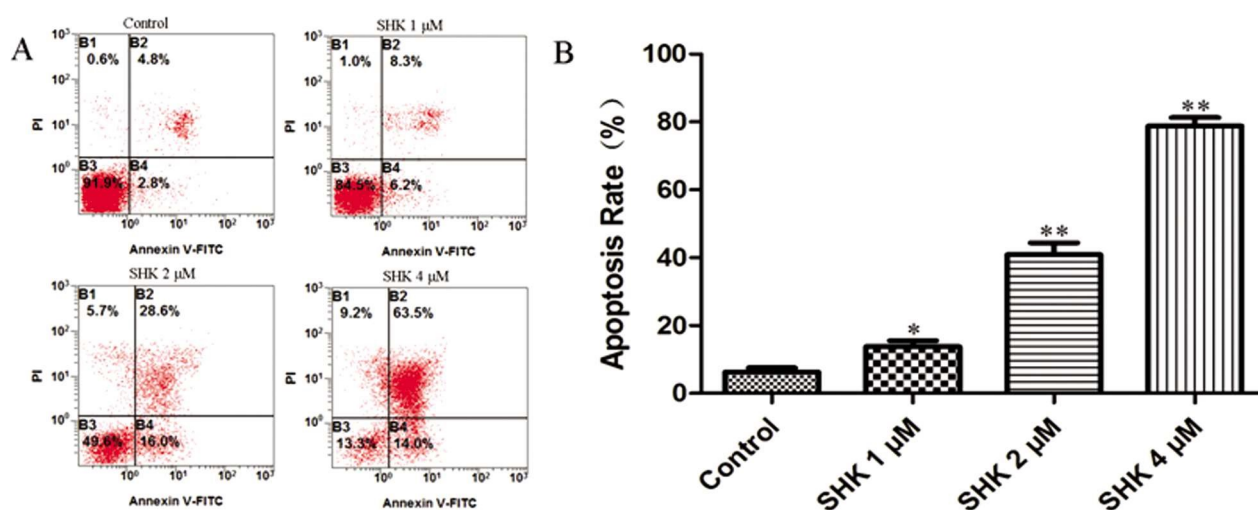


图2 紫草素促进 A549 细胞凋亡

Fig.2 Shikonin promotes apoptosis of A549 cells($n=3$, * $P < 0.05$ vs. Control, ** $P < 0.01$ vs. Control)

2.3 紫草素能降低 A549 细胞 Bcl-2 蛋白的表达, 同时升高 Bax 蛋白的水平

分别以 0 μM 、1 μM 、2 μM 、4 μM 紫草素处理 A549 细胞, 24 h 后提取蛋白并应用 Western blot 检测 A549 细胞中凋亡相关蛋白的表达。半定量分析显示, 在对照组和 1 μM 、2 μM 、4 μM 紫草素实验组中, Bcl-2 蛋白相对 β -actin 蛋白的表达量分

别为 0.5933、0.4121、0.2375、0.2014, 与对照组相比实验组 Bcl-2 蛋白相对表达量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); 在上述对照组和实验组中, Bax 蛋白相对 β -actin 蛋白的表达量分别为 0.0971、0.1716、0.2169、0.2771, 与对照组相比实验组 Bax 蛋白的相对表达量逐渐升高 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 3。

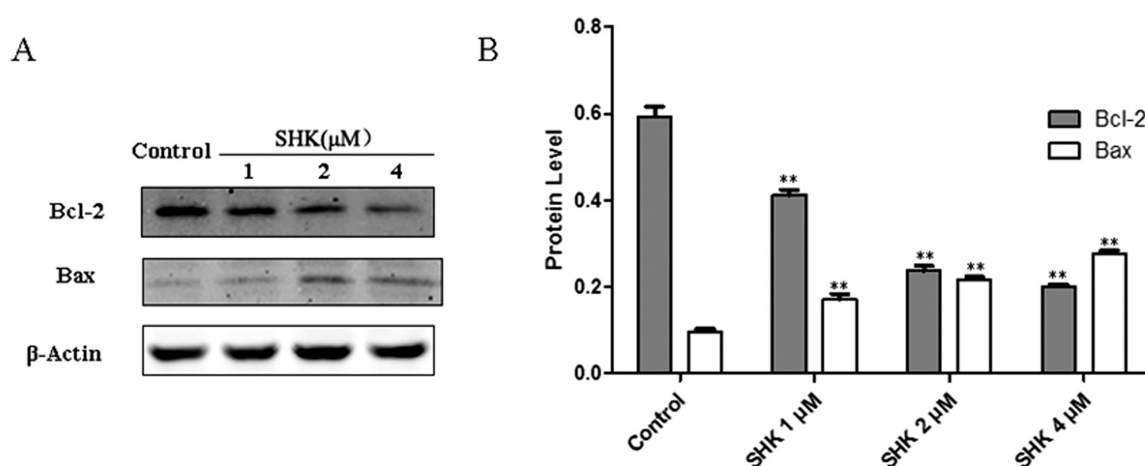


图3 紫草素对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig.3 Shikonin affects the protein expression of Bcl-2 and Bax

Note: A: Protein expression of Bcl-2 and Bax were detected by Western blot;

B: Relative expression level of Bcl-2 and Bax($n=3$, ** $P < 0.01$ vs. Control)

2.4 紫草素降低 A549 细胞的线粒体膜电位, 呈剂量依赖型

分别以 0 μM 、2 μM 、4 μM 紫草素处理 A549 细胞 12 h, 然后用 JC-1 染料对细胞进行染色; 激光共聚焦显微镜扫描结果显示, 随着紫草素浓度的增加 A549 细胞红色荧光逐渐减弱而绿色荧光逐渐增强。半定量分析显示, 对照组和 2 μM 、4 μM 紫草素实验组的红色荧光平均光密度分别为 0.0795 ± 0.0179 、

0.0195 ± 0.0058 、 0.0112 ± 0.0032 , 与对照组相比, 实验组平均光密度降低 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); 上述三组绿色荧光平均光密度分别为 0.0088 ± 0.0037 、 0.0204 ± 0.0050 、 0.0519 ± 0.0052 , 与对照组相比, 实验组平均光密度升高 ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。这表明紫草素处理 A549 细胞后, 线粒体膜通透性增加, 膜电位耗散下降, 呈剂量依赖型。见图 4。

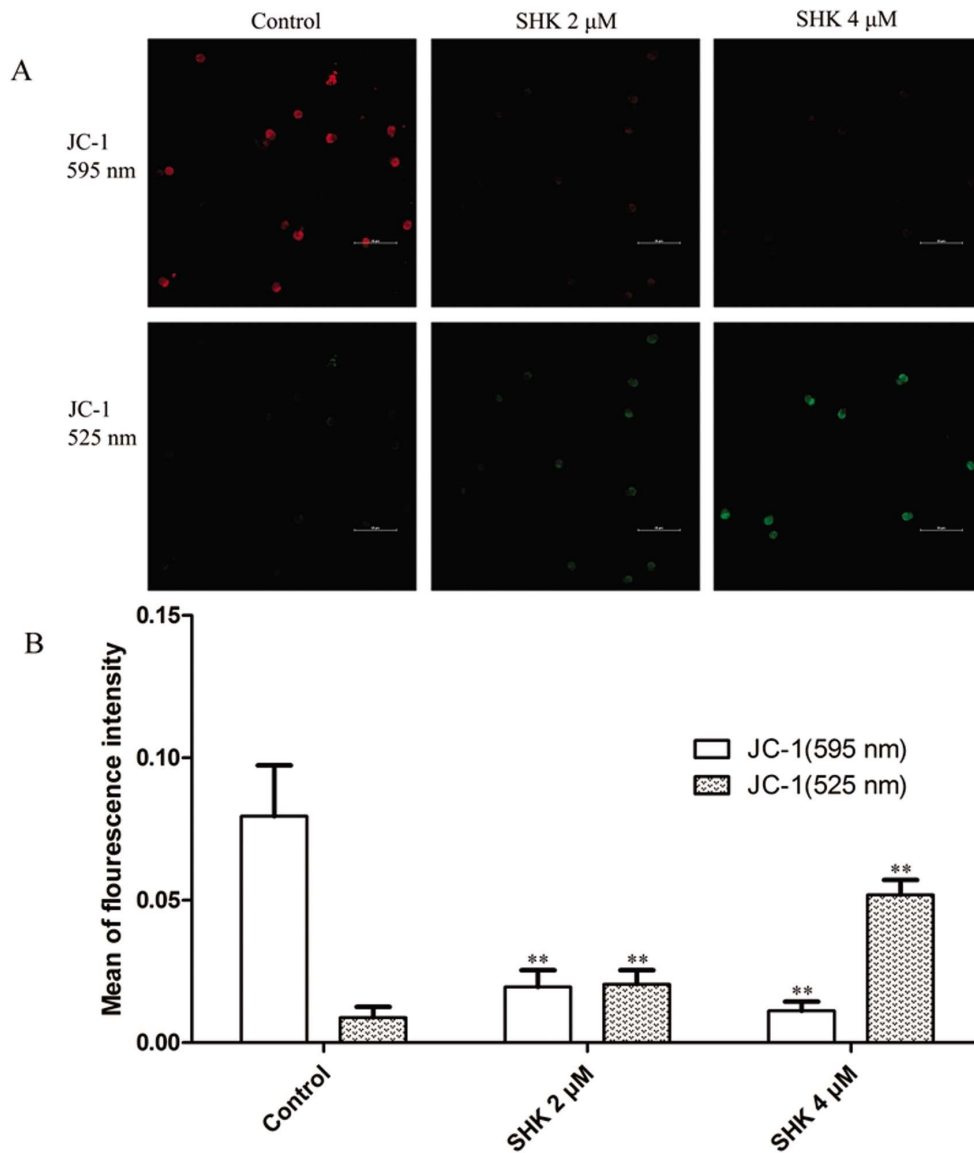


图4 紫草素对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.4 Shikonin induces loss of MMP in A549 cells

Note: A: MMP were detected by LSCM; B: Mean of fluorescence intensity (**P<0.01 vs.Control)

3 讨论

国内外多个研究表明,天然植物提取化合物,如姜黄素、雷公藤甲素、大黄素和紫杉醇等在促进肿瘤细胞凋亡方面表现出色,而且以紫杉醇为代表的部分药物已进入临床,并在抗肿瘤治疗中发挥着重要的作用^[15-18]。发掘更多具有良好抗肿瘤作用的天然植物化合物,并进一步通过实验证明其抗肿瘤效果和明确其作用机制,是一条抗肿瘤药物研发和进一步提高肿瘤患者生存率的可行之路。

紫草素是一种从紫草根部分提取的或人工生产的萘醌类化合物,具有抗炎、抗菌和保护肝功能等作用,也能明显抑制肿瘤细胞增殖和促进凋亡^[19]。既往研究表明,紫草素对乳腺癌、神经胶质瘤、骨肉瘤、胃癌、白血病等均具有较好的抗肿瘤作用^[11,12,20-22]。在肺癌中,紫草素也被证实具有良好的抗肿瘤效果。Kim HJ 等人的研究显示,体外实验中紫草素可以诱使肺癌细胞产生自噬和坏死,而自噬抑制剂则能进一步提高药物对肺癌细胞的杀伤

效果,在动物实验中紫草素也能有效抑制肿瘤生长^[23]。Hsieh YS 等人证实,紫草素可以逆转 c-Met 介导的上皮间质化过程,从而抑制 c-Met 高表达肺癌细胞的迁移和侵袭^[24]。Yeh YC 的研究结果表明,紫草素可以通过上调 P53 的表达而促进肺癌细胞的凋亡和坏死^[25]。我们研究团队在前期的研究中也发现,紫草素可以促进具有 T790M 突变的 H1975 细胞凋亡,低剂量紫草素可通过抑制 EGFR、ERK 和 Akt 的活化而增强 H1975 细胞对埃克替尼的敏感性^[26]。

本研究中我们进一步检测了紫草素对肺癌 A549 细胞的作用效果,结果显示紫草素具有抑制增殖和促进凋亡的作用,并呈剂量依赖型;这与既往的研究结论一致^[23,25]。本实验还进一步通过 Western blot 和线粒体膜电位检测探讨紫草素促进肺癌 A549 细胞凋亡可能的机制。

在哺乳动物细胞中,凋亡途径主要包括外源性和内源性凋亡途径,即死亡受体途径和线粒体途径^[27]。线粒体途径的凋亡,主要是由细胞内相关凋亡蛋白的浓度和比例的改变,如下调

Bcl-2/Bax 的表达比例^[28],引起线粒体膜通透性的改变,释放促凋亡蛋白及相关因子,进而启动凋亡程序。Bcl-2 蛋白一般被认为是抑制凋亡的蛋白,其定位于线粒体膜上,能够通过控制线粒体外膜通透转换孔(PT)孔道的开关而控制促凋亡蛋白和相关因子的释放,从而使细胞免于凋亡;而 Bax 蛋白通常被视为促凋亡蛋白,正常状态下其多以非活性状态分布在细胞胞质中,受到凋亡信号的刺激后转变为活化形式,移位并插入到线粒体外膜形成 Bax 大孔道,破坏线粒体膜的完整性,进而促进促凋亡蛋白(如细胞色素 C 等)和相关因子的释放,激活下游相关凋亡信号通路,如 Caspase-3 凋亡通路等^[29,30]。

在本实验中,随着紫草素作用浓度的增大,Bcl-2 蛋白表达逐渐降低,同时 Bax 蛋白表达升高,提示 A549 肺癌细胞的线粒体膜通透性可能发生了改变,凋亡因子和相关促凋亡蛋白释放增多。而线粒体膜电位检测结果也从另一方面印证了上述推论。JC-1 对细胞染色后用激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位,正常的肿瘤细胞表现为红色荧光(595 nm)强度高而绿色荧光(525 nm)强度弱,而处于凋亡进程的肿瘤细胞随着线粒体膜电位的下降则表现为红色荧光逐渐减弱、绿色荧光逐渐增强^[12]。共聚焦扫描结果显示随着紫草素作用浓度的增大,A549 细胞呈现红色荧光减弱和绿色荧光增强的变化,表明线粒体膜电位逐渐下降,提示线粒体膜通透性升高。

上述结果表明,紫草素可以通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达比例调控线粒体膜的通透性,从而诱导和促进 A549 细胞的凋亡。A549 细胞同时具有 K-ras 突变和 c-Met 扩增,而这两种基因的改变在肺癌中较为常见,它们对肺癌的发生发展具有促进作用,在治疗中则可能导致肿瘤耐药的发生,最终出现疾病进展。本研究可能对抗肺癌新药筛选具有一定的参考价值。

当然,本实验仅研究了紫草素对 A549 肺癌细胞的抗肿瘤作用,还需要在其他肺癌细胞株中通过体外实验和动物实验进一步验证紫草素的抗肿瘤效果,同时探讨其可能的作用机制、评估毒副作用等,从而为紫草素应用于临床提供理论基础和实验依据。

参考文献(References)

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108
- [2] Korpanty G J, Graham D M, Vincent M D, et al. Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS[J]. Frontiers in Oncology, 2014, 4: 204
- [3] Steuer C E, Ramalingam S S. ALK-positive non-small cell lung cancer: Mechanisms of resistance and emerging treatment options[J]. Cancer, 2014, 120(16): 2392-2402
- [4] Koren A, Rijavec M, Kern I, et al. BMI1, ALDH1A1, and CD133 Transcripts Connect Epithelial-Mesenchymal Transition to Cancer Stem Cells in Lung Carcinoma[J]. Stem Cells International, 2016, 2016: 1-9
- [5] Olaussen K A, Postel-Vinay S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape[J]. Annals of Oncology, 2016, 27(11): 2004-2016
- [6] Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson A G, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2016, 375(19): 1823-1833
- [7] Liao P, Lin C, Li C, et al. Anti-inflammatory properties of shikonin

contribute to improved early-stage diabetic retinopathy [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44985

- [8] Sun W, Liu Y, Zhou W, et al. Shikonin inhibits TNF- α production through suppressing PKC-NF- κ B-dependent decrease of IL-10 in rheumatoid arthritis-like cell model[J]. Journal of Natural Medicines, 2017, 71(2): 349-356
- [9] Shindo S, Hosokawa Y, Hosokawa I, et al. Shikonin Inhibits Inflammatory Cytokine Production in Human Periodontal Ligament Cells[J]. Inflammation, 2016, 39(3): 1124-1129
- [10] Zhao Q, Assimopoulou A N, Klauck S M, et al. Inhibition of c-MYC with involvement of ERK/JNK/MAPK and AKT pathways as a novel mechanism for shikonin and its derivatives in killing leukemia cells [J]. Oncotarget, 2015, 6(36): 38934-38951
- [11] Zhou Z, Lu B, Wang C, et al. RIP1 and RIP3 contribute to shikonin-induced DNA double-strand breaks in glioma cells via increase of intracellular reactive oxygen species [J]. Cancer Letters, 2017, 390: 77-90
- [12] Liang W, Cai A, Chen G, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity of gastric cancer through reactive oxygen species[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 38267
- [13] Li X, Fan X, Jiang Z, et al. Shikonin inhibits gefitinib-resistant non-small cell lung cancer by inhibiting TrxR and activating the EGFR proteasomal degradation pathway [J]. Pharmacological Research, 2017, 115: 45-55
- [14] Song J, Zhao Z, Fan X, et al. Shikonin potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. Oncotarget, 2016, 7(43): 70504-70515
- [15] Chen Y, Li J, Chen S, et al. Nab-Paclitaxel in combination with Cisplatin Versus Docetaxel Plus Cisplatin as First-Line Therapy in Non-small Cell Lung Cancer[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10760
- [16] Shahabipour F, Caraglia M, Majeed M, et al. Naturally occurring anti-cancer agents targeting EZH2[J]. Cancer Letters, 2017, 400: 325-335
- [17] Zhang J Y, Lin M T, Tung H Y, et al. Bruceine D induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia K562 cells via mitochondrial pathway[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(4): 819-826
- [18] Pan X, Wang H, Tong D, et al. Physcion induces apoptosis in hepatocellular carcinoma by modulating miR-370 [J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(12): 2919-2931
- [19] Andžar I, Ríos J, Giner R, et al. Pharmacological Properties of Shikonin-A Review of Literature since 2002[J]. Planta Medica, 2013, 79(18): 1685-1697
- [20] Qiu H, Zhu X, Luo Y, et al. Identification of New Shikonin Derivatives as Antitumor Agents Targeting STAT3 SH2 Domain [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2863
- [21] Fu Z, Deng B, Liao Y, et al. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis [J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 580
- [22] Chao T, Huang T, Liao Y, et al. Pyruvate kinase M2 is a poor prognostic marker of and a therapeutic target in ovarian cancer [J]. PLOS ONE, 2017, 12(7): e182166
- [23] Kim H, Hwang K, Park D, et al. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells[J]. Journal of Translational Medicine, 2017, 15(1): 123

- [6] Zhang M, Zhao Z, Shen M, et al. Polydatin protects cardiomyocytes against myocardial infarction injury by activating Sirt3 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863(8): 1962-1972
- [7] Zhang M, Zhang L, Hu J, et al. MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(11): 2435-2447
- [8] Holscher ME, Bode C, Bugger H. Diabetic Cardiomyopathy: Does the Type of Diabetes Matter?[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 159-161
- [9] Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment[J]. *Heart Fail Rev*, 2012, 17(3): 325-344
- [10] Bando YK, Murohara T. Diabetes-related heart failure [J]. *Circ J*, 2014, 78(3): 576-583
- [11] Bertoni AG, Hundley WG, Massing MW, et al. Heart failure prevalence, incidence, and mortality in the elderly with diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(3): 699-703
- [12] Jarosz J, Ghosh S, Delbridge LM, et al. Changes in mitochondrial morphology and organization can enhance energy supply from mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic cardiomyopathy[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312(2): C190-C197
- [13] Mizamtsidi M, Paschou SA, Grapsa J, et al. Diabetic cardiomyopathy: a clinical entity or a cluster of molecular heart changes?[J]. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46(11): 947-953
- [14] Sahoo S, Emanueli C. Exosomes in Diabetic Cardiomyopathy: The Next-Generation Therapeutic Targets? [J]. *Diabetes*, 2016, 65 (10): 2829-2831
- [15] Bai T, Wang F, Mellen N, et al. Diabetic cardiomyopathy: role of the E3 ubiquitin ligase[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 310(7): E473-E483
- [16] Wang HL, Cui XH, Yu HL, et al. Synergistic effects of polydatin and vitamin C in inhibiting cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2017, 31(3): 280-291
- [17] Wang HL, Gao JP, Han YL, et al. Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(5): 553-559
- [18] Gao Y, Gao J, Chen C, et al. Cardioprotective effect of polydatin on ventricular remodeling after myocardial infarction in coronary artery ligation rats[J]. *Planta Med*, 2015, 81(7): 568-577
- [19] Zhang Q, Tan Y, Zhang N, et al. Polydatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and myocardial superoxide generation[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2015, 240(10): 1352-1361
- [20] Van de Ven R, Santos D, Haigis MC. Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(4): 320-331
- [21] Grabowska W, Sikora E, Bielak-Zmijewska A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process[J]. *Biogerontology*, 2017, 6 (41): 145-150
- [22] Xiong Y, Wang M, Zhao J, et al. Sirtuin 3: A Janus face in cancer (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6): 2227-2235
- [23] Ye X, Li M, Hou T, et al. Sirtuins in glucose and lipid metabolism[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1845-1859
- [24] Correia M, Perestrelo T, Rodrigues AS, et al. Sirtuins in metabolism, stemness and differentiation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861(1 Pt A): 3444-3455
- [25] Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle[J]. *Aging (Albany NY)*, 2009, 1(9): 771-783
- [26] Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, et al. SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction [J]. *Circulation*, 2016, 133(8): 717-731
- [27] Carlstrom M, Lundberg JO. Letter by Carlstrom and Lundberg Regarding Article, "SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction"[J]. *Circulation*, 2016, 134(6): e77-e78
- [28] Hou X, Zeng H, He X, et al. Sirt3 is essential for apelin-induced angiogenesis in post-myocardial infarction of diabetes [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(1): 53-61
- [29] Zeng Z, Yang Y, Dai X, et al. Polydatin ameliorates injury to the small intestine induced by hemorrhagic shock via SIRT3 activation-mediated mitochondrial protection [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(6): 645-652

(上接第 1615 页)

- [24] Hsieh Y, Liao C, Chen W, et al. Shikonin Inhibited Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cells via Suppression of c-Met-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(12): 4639-4651
- [25] Yeh Y, Liu T, Lai H. Shikonin Induces Apoptosis, Necrosis, and Premature Senescence of Human A549 Lung Cancer Cells through Up-regulation of p53 Expression[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 2015: 1-13
- [26] 王媛, 刘莉, 陆远, 等. 紫草素逆转埃克替尼对肺癌 EGFR-TKI 耐药及其机制的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(16): 3044-3047
- Wang Yuan, Liu Li, Lu Yuan, et al. Shikonin Sensitizes EGFR-TKI Resistant Lung Cancer Adenocarcinoma Cell to Icotinib [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(16): 3044-3047
- [27] 李响, 李郑, 程毅, 等. 三七总皂甙对人急性髓系白血病细胞株 U937 的抑制增殖及诱导凋亡作用 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(04): 657-660
- Li Xiang, Li Zheng, Cheng Yi, et al. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Panax Notoginsenosides on Acute Myelogenous Leukemia Cells U937 [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16 (04): 657-660
- [28] Yao X, Lu B, Lu C, et al. Taraxerol Induces Cell Apoptosis through A Mitochondria-Mediated Pathway in HeLa Cells[J]. *Cell J*, 2017, 19 (3): 512-519
- [29] Birkinshaw R W, Czabotar P E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017[Epub ahead of print]
- [30] Yamaguchi M. The anti-apoptotic effect of regucalcin is mediated through multisignaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2013, 18 (10): 1145-1153