

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.013

香鳞毛蕨苷提取物 E 对人肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响 *

张 健¹ 王 巨^{1Δ} 廖 飞¹ 孙天浩¹ 王 磊¹ 曲俊峰¹ 隋嘉泽¹ 赵智宏¹ 刘宏宇²

(1 哈尔滨医科大学第一临床医学院胸外科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学第一临床医学院心血管外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究香鳞毛蕨苷提取物 E(Fragranoside E)对人肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响。**方法:**将体外培养的人肺癌 A549 细胞分为对照组(0.1 %DMSO、100 nM 紫杉醇)和实验组,通过 CCK-8 实验、克隆形成实验检测细胞增殖情况;检测乳酸脱氢酶(LDH)水平以探讨 Fragranoside E 的细胞毒性;透射电镜及流式细胞术检测 A549 细胞的凋亡情况。进一步采用 5mM N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)预处理 A549 细胞 2 h 后,采用荧光显微镜观察细胞内 ROS 的释放情况。**结果:**CCK8 及克隆形成实验结果提示 Fragranoside E 呈浓度和时间依赖性抑制 A549 细胞增殖($P<0.05$); $\leq 40 \mu\text{M}$ Fragranoside E 处理 A549 细胞对其 LDH 的释放无显著影响($P>0.05$);而 $40 \mu\text{M}$ Fragranoside E 可诱导 A549 细胞凋亡,细胞内 ROS 升高, NAC(5 mM)预处理 2 h 后,细胞内 ROS($112.6\% \pm 12.3\%$)较 Fragranoside E 处理组显著降低($P<0.05$)。**结论:**Fragranoside E 能够抑制 A549 细胞增殖,诱导其凋亡,其抗肿瘤活性可能与细胞内 ROS 释放有关。

关键词:香鳞毛蕨苷提取物 E;肺癌;增殖;凋亡

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)12-2262-05

Effect of Compound E from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott on the Proliferation and Apoptosis of Human Lung Cancer A549 Cells*

ZHANG Jian¹, WANG Ju^{1Δ}, LIAO Fei¹, SUN Tian-hao¹, WANG Lei¹, QU Jun-feng¹, SUI Jia-ze¹, ZHAO Zhi-hong¹, LIU Hong-yu²

(1 Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Fragranoside E from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott on the proliferation and apoptosis of human lung cancer of A549 cells. **Methods:** Human lung cancer A549 cells cultured in vitro were divided into the control group (0.1 %DMSO, 100 nM paclitaxel) and the Fragranoside E group. Cell proliferation was examined by Cell counting kit (CCK-8) assay and clone formation assay; cytotoxicity was tested by LDH assay; cell apoptosis was detected by transmission electron microscope and flow cytometry assay; releasing of ROS was observed by fluorescence microscopy, after some cells were pretreated with N-acetylcysteine (NAC) for 2 h. **Results:** The results of CCK8 and clone formation experiments suggested that Fragranoside E inhibited the proliferation of A549 cells in a dose-dependent and time-dependent manner ($P<0.05$), without any obvious cytotoxic below $40 \mu\text{M}$ concentration in LDH assay. Fragranoside E ($40 \mu\text{M}$) induced A549 cell apoptosis and the increasing of ROS, which was significantly reduced ($112.6\% \pm 12.3\%$) in cells pretreated with NAC ($P<0.05$). **Conclusion:** Fragranoside E inhibited the proliferation and induced the apoptosis of A549 cells, which might be closely related to the releasing of ROS.

Key words: Fragranoside E; Lung cancer; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2262-05

前言

肺癌发病率占全世界癌症发病率的首位,目前已成为对人类健康威胁最大的恶性肿瘤,是众多恶性肿瘤的"头号杀手"^[1]。针对不同类型、不同分期的肺癌采取综合的治疗措施可最大程度的改善肺癌的治疗效果,但肺癌患者的五年生存率仍仅为 20 %左右,尚不尽人意^[2]。我国传统中草药是珍贵的天然药物资

源宝库,多种药物可通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤的作用^[3,4]。香鳞毛蕨(*Dryopteris fragrans*(L.)Schott)化学成分较为复杂,可提取、分离得到多种类型的化学成分,主要有间苯三酚类、萜类、黄酮类等^[5],多篇研究报道多种香鳞毛蕨提取物具有抗肿瘤生物活性^[6-10]。本研究以人肺腺癌 A549 细胞为研究对象,探讨了香鳞毛蕨提取物 E(Fragranoside E)对其增殖和凋亡的影响。

* 基金项目:黑龙江省卫生健康委科研项目(2014-270);哈尔滨医科大学第一临床医院资助科研项目(2014Y003)

作者简介:张健(1978-),男,副主任医师,医学博士,研究方向:肺癌的诊断及治疗, E-mail: doczhang2003@163.com

Δ 通讯作者:王巨,男,主任医师,医学博士,研究方向:胸部疾病诊治, E-mail: 15705190@qq.com

(收稿日期:2019-01-08 接受日期:2019-01-31)

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

香鳞毛蕨提取物 E(Fragranoside E)由黑龙江大学张彦龙教授赠予。胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、RPMI-1640 培养基购自美国 Sigma-Aldrich Gibco 公司, Cell Counting Kit-8 购自碧云天生物技术公司, 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术公司, 活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术公司。日本 Olympus 倒置、荧光显微镜, 美国 Bio-Rad 酶标仪, 美国 BD 流式细胞仪。

1.2 细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞用 RPMI-1640 培养基, 含 10 %FBS、抗生素 (100 u/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素), 在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \pm 0.1\% \text{CO}_2$ 以及 $\geq 95\%$ 湿度的培养箱中, 常规培养。倒置显微镜每日观察细胞生长情况, 3 日换液, 适时传代。

1.3 CCK-8 实验

应用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒检测 Fragranoside E 对 A549 细胞增殖能力的影响。细胞接种于 96 孔板中, 3×10^3 个/孔。样品孔分别加入不同浓度的 Fragranoside E (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 和 80 μ M), DMSO (0.1 %) 为阴性对照, 紫杉醇 (100 nM) 为阳性对照。常规培养 24 h, 48 h 或 72 h。避光, 每孔分别加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续常规培养 2 h。酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 计算细胞存活率(%), 依据 R&M 方法计算各自的 IC₅₀ 值。

1.4 克隆形成实验

细胞接种于 6 孔板中, 5×10^2 个/孔。常规培养过夜, Fragranoside E (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 和 80 μ M) 处理 A549 细胞, DMSO (0.1 %) 为阴性对照, 紫杉醇 (100 nM) 为阳性对照, 继续常规培养 10 d。10 d 后吸净培养液, 4°C 预冷 PBS 液漂洗三次, 冰乙酸、甲醇混合液 (1:3), 4°C 固定 15 min, 1:1000 结晶紫溶液 2 mL 染色 15 min。自来水冲净, 干燥, 倒置显微镜下拍照, 统计大于 50 个细胞数的克隆数, 计算 A549 细胞的克隆形成率(%). 依据 R&M 方法计算 IC₅₀ 值。

1.5 乳酸脱氢酶实验

细胞接种于 6 孔板中, 5×10^5 个/孔, 培养过夜。Fragranoside E (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 和 80 μ M) 处理 A549 细胞, DMSO (0.1 %) 为阴性对照, 紫杉醇 (100 nM) 为阳性对照, 继续常规培养 48 h。弃细胞培养液, PBS 液漂洗三遍, 0.25 % 胰蛋白酶 2 mL 消化, 将完全脱落的细胞转移至离心管内, 1000 r/min, 离心 5 min, 收集上清。参照说明书, 酶标仪检测每孔的 OD₄₅₀ 值, 依据公式分别计算人肺癌 A549 细胞的相对细胞毒(%).

1.6 透射电镜检测细胞超微结构

细胞接种于 6.0 cm 培养皿中, Fragranoside E (40 μ M) 处理 A549 细胞, DMSO (0.1 %) 为阴性对照, 常规培养 48 h。PBS 液漂洗三遍, 0.25 % 胰蛋白酶 2 mL 充分消化, 离心, 收沉淀。2.5 % 戊二醛磷酸缓冲液 4°C 固定 12 h。0.2 M 磷酸缓冲液洗涤三遍, 1 % 锇酸 4°C 固定 3 h。0.2 M 磷酸缓冲液洗涤三遍, 丙酮 (50 %、70 %、90 %、100 %) 依次脱水, ERL-4206 环氧树脂渗透, 包埋,

70°C 烤箱内聚合 8 h。超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, 透射电镜下观察, 拍照, 图片保存待用。

1.7 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡率

细胞接种于 6.0 cm 培养皿中, 20 μ M Fragranoside E 组, 40 μ M Fragranoside E 组, (40 μ M Fragranoside E+5 mM NAC) 组 (使用 5 mM NAC 预处理细胞 2 h) 和 DMSO (0.1 %) 阴性对照组, 继续培养 48 h。漂洗, 消化, 离心, 收集沉淀。PBS 重悬 A549 细胞, 计数。取约 5×10^5 个 A549 细胞至另一 1.5 mL 离心管中, 4°C , 1000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清。195 μ L Annexin V/FITC 结合液重悬细胞, 再加 5 μ L Annexin V/FITC 轻混。10 μ L PI 染色液轻混, 避光冰浴, 流式细胞仪检测。

1.8 细胞活性氧的检测

细胞接种于 6.0 cm 培养皿中, 40 μ M Fragranoside E 组, (40 μ M Fragranoside E+5 mM NAC) 组 (使用 5 mM NAC 预处理细胞 2 h) 和 DMSO (0.1 %) 阴性对照组, 继续培养 48 h。弃培养液, 用 PBS 液漂洗两次。培养皿内加入 0.1 % DCFH-DA 1 mL, 37°C 孵育 15 min。无血清培养基洗涤三次, 荧光显微镜检测, 保存实验数据。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计学分析, 所有实验均独立重复三遍, 各参数的定量资料均用平均数 $\pm$ 标准差 (mean values $\pm$ standard deviation) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Fragranoside E 显著降低 A549 细胞的存活率

依据不同浓度 Fragranoside E (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 和 80 μ M) 和培养不同的时间 (24 h, 48 h 或 72 h) 进行分组, CCK-8 试剂盒按说明操作, 分光光度计测定 OD₄₅₀ 值, 计算细胞存活率(%). 如图 1 所示, Fragranoside E 以浓度及时间依赖性抑制 A549 细胞增殖。Fragranoside E 作用 A549 细胞 24 h 的 IC₅₀ 值是 $43.1 \pm 4.5 \mu\text{M}$, 作用 48 h 的 IC₅₀ 值是 $19.1 \pm 3.7 \mu\text{M}$, 作用 72 h 的 IC₅₀ 值是 $10.2 \pm 2.3 \mu\text{M}$ 。

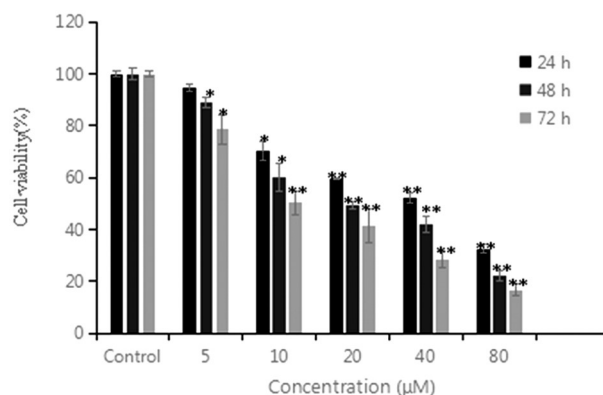


图 1 Fragranoside E 对 A549 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of Fragranoside E on the proliferation of A549 cells

注: 结果以 Means $\pm$ SD (n=3) 表示, * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

Note: Results represented as means $\pm$ s.d (n=3). * indicates $P < 0.05$ and ** indicates $P < 0.01$.

2.2 Fraganoside E 抑制 A549 细胞的克隆形成

为了研究 Fraganoside E 对 A549 细胞的长效抑制作用,应用不同浓度 Fraganoside E(5、10、20、40 和 80 μM)处理 A549 细胞,细胞克隆形成实验结果显示随着 Fraganoside E 浓度的

增加,A549 的细胞克隆数逐渐减少(图 2),克隆形成率显著降低(图 3, $P<0.05$),说明 Fraganoside E 能够长效抑制 A549 细胞的克隆形成,并呈现浓度依赖性。Fraganoside E 克隆形成实验的 IC_{50} 值是 $6.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 。

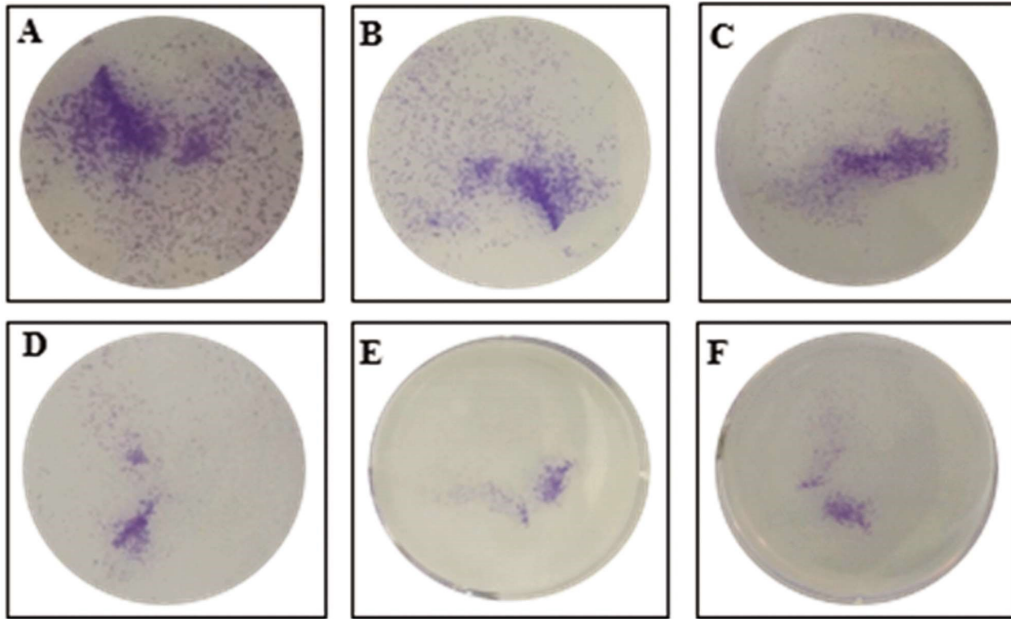


图 2 细胞克隆图

Fig.2 Colony formation efficiency of A549 cells

2.3 Fraganoside E 对 A549 细胞 LDH 释放的影响

采用 Fraganoside E 处理 A549 细胞 48 h,检测细胞上清液中 LDH 的含量,如图 4 所示;高浓度 Fraganoside E(80 μM)可显著增加 A549 细胞 LDH 的释放 ($P<0.05$),而较低浓度

Fraganoside E($\leq 40 \mu\text{M}$)对 A549 细胞 LDH 的释放影响不明显($P>0.05$)。为避免 Fraganoside E 的细胞毒作用干扰,后续实验选用 $\leq 40 \mu\text{M}$ Fraganoside E 浓度。

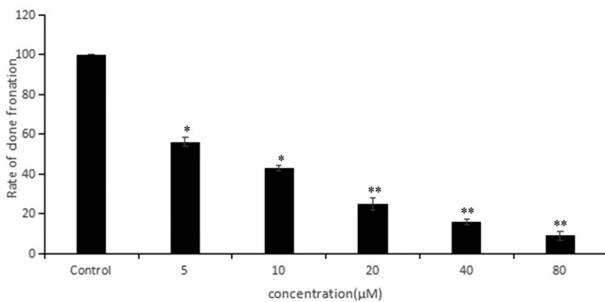


图 3 克隆形成率图

Fig.3 Clone formation rate of A549 cells

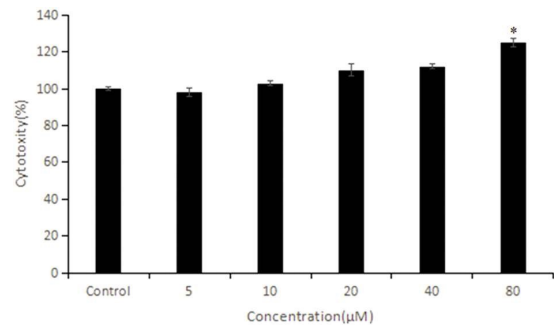


图 4 LDH 法检测 Fraganoside E 对 A549 的细胞毒性

Fig.4 Cytotoxicity effects of Fraganoside E on A549 cells by LDH assay

2.4 Fraganoside E 对 A549 细胞凋亡的影响

如图 5 显示,对照组细胞膜完整、光滑,可见微绒毛明显突起,细胞核染色质均匀分布,细胞器清晰呈现;Fraganoside E 处理组肿瘤细胞体积缩小,凋亡小体形成,细胞质染色加深,核固缩,染色质团集,线粒体变形,溶酶体吞噬线粒体形成自噬溶酶体,核糖体脱颗粒。凋亡小体的出现提示 Fraganoside E 处理 A549 细胞可诱导细胞凋亡。

如图 6 所示,20 μM Fraganoside E 诱导 A549 细胞的凋亡率为 $20.5 \% \pm 3.8 \%$,40 μM Fraganoside E 诱导 A549 细胞的凋亡率为 $57.6 \% \pm 4.4 \%$,显著高于 20 μM Fraganoside E 处理

组($P<0.05$)。(40 μM Fraganoside E+5mM NAC)组诱导 A549 细胞的凋亡率为 $12.9 \% \pm 2.3 \%$,显著低于 40 μM Fraganoside E 处理组($P<0.05$)。

2.5 Fraganoside E 促进 A549 细胞释放 ROS

细胞内 ROS 参与多种恶性肿瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡^[11]。图 7 显示,Fraganoside E(40 μM)处理 A549 细胞后,细胞内 ROS 较对照组显著增多($153.6 \% \pm 17.5 \%$),且 A549 细胞被活性氧抑制剂 NAC (5mM) 预处理 2 h 后,细胞内 ROS ($112.6 \% \pm 12.3 \%$, $P<0.05$) 显著低于 Fraganoside E 处理组 ($P<0.05$)提示 Fraganoside E 促进 A549 细胞释放 ROS。

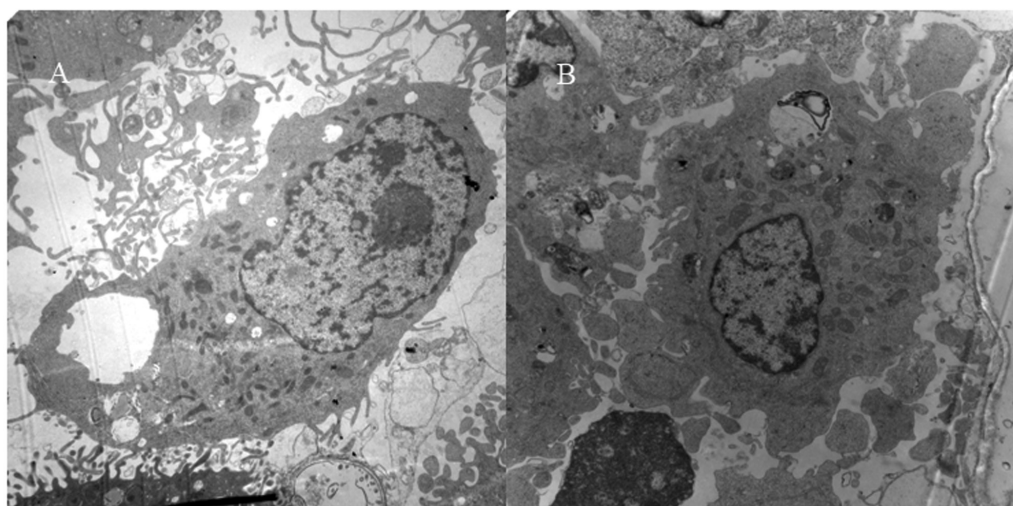


图5 A549 细胞透射电子显微镜图片。(A) DMSO (0.1 %);(B) 40 μ M Fraganoside E

Fig.5 A549 cells scanned under transmission electron microscopy. A549 cells in logarithmic growth phase were treated with 0.1 % DMSO (A) and 40 μ M Fraganoside E (B)

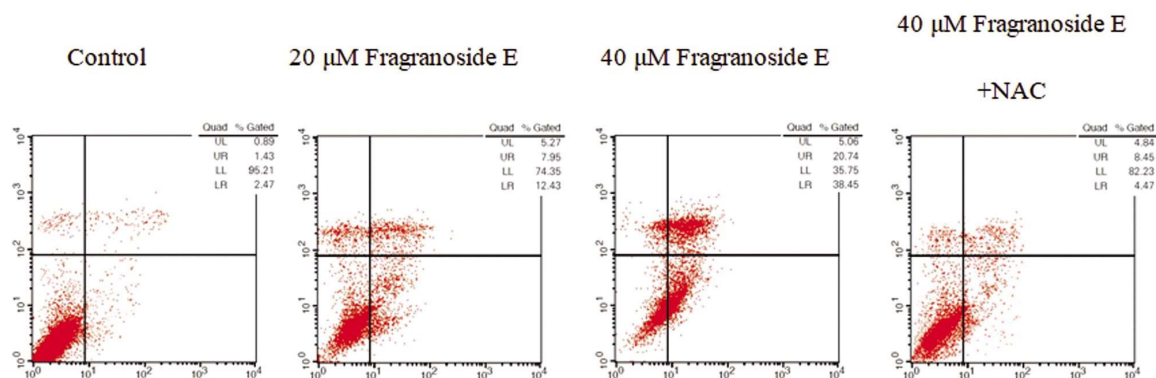


图6 Fraganoside E 诱导 A549 细胞凋亡 Annexin V/PI 双染检测图

Fig.6 Annexin V/FITC and PI double dye images of apoptosis in A549 cells

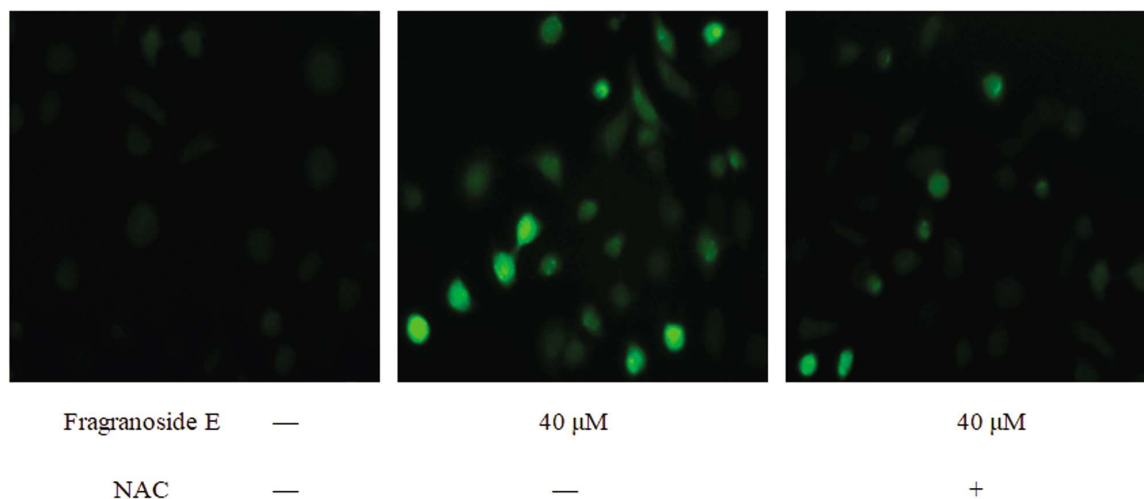


图7 A549 细胞内 ROS 检测

Fig.7 ROS detection in A549 cells

3 讨论

香鳞毛蕨是鳞毛蕨科,鳞毛蕨属,为多年生落叶草本植物,主要分布在高寒地区的滑石坡、碎石坡及火山周围的岩浆缝隙中,世界范围内广泛分布。我国北方居民用其治疗皮肤病和关节炎,因其疗效显著受到学者们的广泛关注。近年来,香鳞毛蕨

的生物活性研究主要涉及抗肿瘤^[12]、抗炎^[13]、风湿及皮肤病相关治疗^[14-16]等。本研究以人肺癌 A549 细胞为研究对象,发现 Fraganoside E 对 A549 细胞起到增殖抑制及诱导凋亡的作用。

CCK-8 实验结果间接反映 Fraganoside E 处理 A549 细胞后活细胞的数量,代表 Fraganoside E 对 A549 细胞的短期抑制作用。细胞克隆形成实验是细胞增殖的长效抑制指标。

CCK-8 及细胞克隆形成实验的结果证实 Frangranoside E 对 A549 细胞起增殖抑制作用,并且呈浓度时间依赖性增高。 IC_{50} (半数有效抑制浓度)是评价抗肿瘤药物体外初筛活性最有效的标准^[17]。A549 细胞的克隆形成实验 IC_{50} 值($6.9 \pm 0.6 \mu M$)低于 CCK-8 实验(72 h) IC_{50} 值($10.2 \pm 2.3 \mu M$),因此 Frangranoside E 可致 A549 细胞长效且不可逆的增殖抑制。

细胞凋亡是细胞程序性死亡,对维持哺乳动物正常发育和细胞稳态起着重要的作用,诱导肿瘤细胞凋亡是很有前景的肿瘤治疗方式^[18]。透射电镜检测 Frangranoside E 对 A549 细胞超微结构的影响,发现肿瘤细胞体积缩小,凋亡小体形成。细胞质染色加深。核固缩,染色质边集,线粒体变形,溶酶体吞噬线粒体形成自噬溶酶体,核糖体脱颗粒,提示 A549 细胞发生凋亡^[19]。通过对细胞凋亡率检测,进一步证实 Frangranoside E 可诱导 A549 细胞发生凋亡,且呈浓度依赖性。

ROS 的升高通过下调线粒体外膜上的 Bcl-2 诱发凋亡,ROS 下调可降低凋亡发生率^[20-23],ROS 是介导凋亡的关键因素,在诸多抗癌药物的作用机制中 ROS 直接或间接参与其中^[24-28]。NAC 是还原型谷胱甘肽(GSH)前体,在体外又是 ROS 的直接清除剂,NAC 预处理可一定程度上清除外界刺激因素导致的 ROS 升高^[29,30]。本实验证实 $40 \mu M$ Frangranoside E 处理 A549 细胞后,ROS 释放增加,应用 NAC 预处理 A549 细胞后 ROS 明显减少,说明 A549 细胞内的 ROS 升高,主要是由 Frangranoside E 诱发,结合细胞凋亡率的检测结果($40 \mu M$ Frangranoside E 使 A549 细胞细胞凋亡率增加,而 NAC 可以逆转 A549 细胞凋亡率的增加),由此推测 A549 细胞的凋亡可能与细胞内的 ROS 释放有关。而 ROS 通过何种途径诱发 A549 细胞凋亡是我们下一步研究重点。

本研究以人肺癌 A549 细胞为研究对象,发现 Frangranoside E 对 A549 细胞起到增殖抑制及诱导凋亡的作用,且其抗肿瘤生物活性与 Frangranoside 的浓度和作用时间有关,Frangranoside E 抗 A549 细胞的肿瘤生物活性,可能与激活细胞内 ROS 有关。

参考文献(References)

- [1] Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, et al. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide [J]. Ann Transl Med, 2016, 4(8): 150-161
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29
- [3] Jin-Yi Q, Jia-Ming H, Yi-Jie Z, et al. The Killing Effects and Preliminary Mechanism of Natural Plant-derived Antimicrobial Solution (PAMs) to Human Liver Cancer HEPG-2 Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(26): 5011-5016
- [4] Pin F, Qing-Lin Y, Xiao-Guang W, et al. Arsenic Trioxide Induces Apoptotic Cell Death through Mitochondrial Pathway in Human Leukemia HL-60 Cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(24): 4621-4624
- [5] 高增平,李瑞峰,王宝华,等. 鳞毛蕨属植物化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3): 50-55
- [6] Zhong ZC, Zhao DD, Liu ZD, et al. A New Human Cancer Cell Proliferation Inhibition Sesquiterpene, Dryofraterpene A, from Medicinal Plant Dryopteris fragrans Schott[J]. Molecules, 2017, 22(1): E180
- [7] Liu ZD, Zhao DD, Jiang S, et al. Anticancer Phenolics from Dryopteris fragrans Schott[J]. Molecules, 2018, 23(3): E680

- [8] Sun Y, Gao G, Luo M, et al. Aspidin PB, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 cells by modulating PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. Chem Biol Interact, 2013, 201(1-3): 1-8
- [9] Zhao DD, Zhao QS, Liu L, et al. Compounds from Dryopteris fragrans Schott with cytotoxic activity[J]. Molecules, 2014, 19(3): 3345-3355
- [10] Su Y, Wan D, Song W. Dryofragin inhibits the migration and invasion of human osteosarcoma U2OS cells by suppressing MMP-2/9 and elevating TIMP-1/2 through PI3K/AKT and p38 MAPK signaling pathways[J]. Anti-Cancer Drugs, 2016, 27(7): 660-668
- [11] Zhang J, Wang J, Jiang JY, et al. Tanshinone IIA induces cytochrome-mediated caspase cascade apoptosis in A549 human lung cancer cells via the JNK pathway [J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 683-690
- [12] Wan D, Jiang C, Hua X, et al. Cell cycle arrest and apoptosis induced by aspidin PB through the p53/p21 and mitochondria-dependent pathways in human osteosarcoma cells[J]. Anti-cancer drugs, 2015, 26(9): 931-941
- [13] Gao C, Guo N, Li N, et al. Investigation of antibacterial activity of aspidin BB against Propionibacterium acnes [J]. Archives of Dermatological Research, 2016, 308(2): 79-86
- [14] 赵丹丹,张彦龙,陆欣媛,等. 香鳞毛蕨化学成分的研究[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(5): 353-355
- [15] 朱冲冲,彭冰,曾祖平,等. 香鳞毛蕨的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(10): 1418-1422
- [16] 朱冲冲,彭冰,曾祖平,等. 香鳞毛蕨 95%乙醇提取物的急性毒性研究[J]. 世界中医药, 2017, 12(9): 204-206
- [17] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, et al. Clonogenic assay of cells in vitro[J]. Nat Protoc, 2006, 11(5): 2315-2319
- [18] Hassan M, Watari H, Abualmaaty A, et al. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer[J]. BioMed Research International, 2014, (2014): 1-23
- [19] Kroemer G, Petit P, Zamzami N, et al. The biochemistry of programmed cell death[J]. FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1995, 9(13): 1277-1287
- [20] Chong S J F, Low I C C, Pervaiz S. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator [J]. Mitochondrion, 2014, 19(1): 39-48
- [21] Zhe-Hua S, Zhi-Guo L, Hui-Nan L I, et al. Effect of 17 β -estradiol on the Proliferation and Apoptosis of SH-SY5Y Cells induced by Glutamate[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(3): 429-432
- [22] Lu L, Dong J, Wang L, et al. Activation of STAT3 and Bcl-2 and reduction of reactive oxygen species (ROS) promote radioresistance in breast cancer and overcome of radioresistance with niclosamide[J]. Oncogene, 2018, 37(39): 5292-5304
- [23] Mahendra S, Ankita R, Sharma A K, et al. ROS mediated ER stress induces Bax-Bak dependent and independent apoptosis in response to Thioridazine [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 106(10): 200-209
- [24] Kovacic P, Somanathan R. Recent Developments in the Mechanism of Anticancer Agents Based on Electron Transfer, Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(7): 658-668

- [J].中国急救医学, 2016, 11(3): 193-206
- [3] 赵昕, 徐凯智, 张咏晖. 限制性输液与充分液体复苏在感染性休克患者中的应用比较[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(2): 411-412
- [4] Lipcsey M, Castegren M, Bellomo R. Hemodynamic management of septic shock[J]. Minerva Anestesiol, 2015, 81(11): 1262-1272
- [5] Cvetkovic M, Lutman D, Ramnarayan P, et al. Timing of death in children referred for intensive care with severe sepsis: implications for interventional studies[J]. Pediatr Crit Care Med, 2015, 16(23): 410-417
- [6] Inwald DP, Butt W, Tasker RC. Fluid resuscitation of shock in children: what, whence and whither? [J]. Intensive Care Med, 2015, 41(32): 1457-1459
- [7] O'Hara CB, Canter RR, Mouncey PR, et al. A qualitative feasibility study to inform a randomised controlled trial of fluid bolus therapy in septic shock[J]. Arch Dis Child, 2018, 103(7): 28-32
- [8] 丁显飞, 万有栋, 孙谋, 等. 脓毒性休克中血管活性药物的应用进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(19): 13-15
- [9] 高戈, 冯喆, 常志刚, 等. 2012 国际严重脓毒症及脓毒性休克诊疗指南[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(8): 501-505
- [10] Gelbart B, Glassford NJ, Bellomo R. Fluid bolus therapy-based resuscitation for severe sepsis in hospitalized children: a systematic review [J]. Pediatr Crit Care Med, 2015, 16(8): 297-307
- [11] Gordon AC, Mason AJ, Thirunavukkarasu N, et al. Effect of early vasopressin vs norepinephrine on kidney failure in patients with septic shock: the VANISH randomized clinical trial [J]. JAMA, 2016, 316(5): 509-518
- [12] Simpson N, Lamontagne F, Shankar-Hari M. Septic shock resuscitation in the first hour[J]. Curr Opin Crit Care, 2017, 23(6): 561-566
- [13] Nunes TS, Ladeira RT, Bafi AT, et al. Duration of hemodynamic effects of crystalloids in patients with circulatory shock after initial resuscitation[J]. Ann Intensive Care, 2014, 4(12): 25-29
- [14] Bihari S, Prakash S, Bersten AD. Post resuscitation fluid boluses in severe sepsis or septic shock: prevalence and efficacy (price study)[J]. Shock, 2013, 40(1): 28-34
- [15] Inwald DP, Canter R, Woolfall K, et al. Restricted fluid bolus volume in early septic shock: results of the Fluids in Shock pilot trial[J]. Arch Dis Child, 2018, 7(23): 314-324
- [16] Bjerregaard MR, Hjortrup PB, Perner A. Indications for fluid resuscitation in patients with septic shock: Post-hoc analyses of the CLASSIC trial[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2018, 14(12): 114-119
- [17] Gelbart B, Glassford NJ, Bellomo R. Fluid bolus therapy-based resuscitation for severe sepsis in hospitalized children: a systematic review [J]. Pediatr Crit Care Med, 2015, 16(4): e297-307
- [18] 中国医师协会急诊医师分会, 中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会. 中国脓毒症 / 脓毒性休克急诊治疗指南 (2018)[J]. 临床急诊杂志, 2018, 19 (9): 423-443
- [19] 刘艳萍, 李红军, 吴亚辉. 限制性输液在中毒性休克患者手术中应用的疗效评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(19): 4856-4858
- [20] Liu YP, Li HJ, Wu YH. Evaluation on effect of restrictive infusion in surgery for toxic shock [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2014, 24(19): 4856-4858
- [20] Avni T, Lador A, Lev S, et al. Vasopressors for the Treatment of Septic Shock: Systematic Review and Meta-Analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0129305
- [21] Simpson N, Lamontagne F, Shankar-Hari M. Septic shock resuscitation in the first hour[J]. Curr Opin Crit Care, 2017, 23(6): 561-566
- [22] Hilton AK, Bellomo R. A critique of fluid bolus resuscitation in severe sepsis[J]. Crit Care, 2012, 16(22): 302-308
- [23] Myburgh J, Finfer S. Causes of death after fluid bolus resuscitation: new insights from FEAST[J]. BMC Med, 2013, 11(14): 67-71
- [24] 李蒙蒙, 张庆. 去氧肾上腺素与去甲肾上腺素对限制性输液老年患者组织氧代谢的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2016, 13(11): 1068-1072
- [25] 周飞虎, 宋青. 去甲肾上腺素与多巴胺对脓毒性休克应用疗效的 Meta 分析[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(8): 449-454

(上接第 2266 页)

- [25] Rodic S, Vincent M D. Reactive Oxygen Species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype[J]. International Journal of Cancer, 2018, 142(3): 440-448
- [26] Wang C, Li P, Xuan J, et al. Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 42(2): 729-742
- [27] Suo Xiao-dong, Peng Hai, Dang Ying-nan, et al. HIV-1 Tat Protein induces DNA Damage in Human Peripheral Blood B Lymphocytes by Producing Mitochondrial ROS [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018, 18(20): 3845-3848
- [28] Xiao Ga, Yang Rui, Wu Tao, et al. Bakuchiol Enhanced TRAIL Induced HepG2 Cell Apoptosis through Activating Oxidative Stress[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018, 18(20): 3835-3839
- [29] Kawagishi H, Finkel T. Unraveling the Truth About Antioxidants: ROS and disease: finding the right balance[J]. Nature Medicine, 2014, 20(7): 711-713
- [30] Jensen M K, Skriver K. NAC transcription factor gene regulatory and protein-protein interaction networks in plant stress responses and senescence[J]. Iubmb Life, 2014, 66(3): 156-166