

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.007

华蟾素通过下调 PIM3 的表达抑制高转移胃癌细胞的实验研究 *

王国俊 王灼印 朱天宇 高不郎 李瑞欣 王敬涛 张云飞 丁恒轩

(郑州大学第一附属医院胃肠外科 河南 郑州 450022)

摘要 目的:胃癌(GC)是全球第四大常见癌症。丁硫磷是华蟾酥的主要活性成分,从蟾蜍的皮肤和腮腺毒腺中提取,在体外具有抗癌活性。然而,丁硫磷是否对胃癌有抗癌作用尚不清楚。本研究旨在评价丁硫磷对GC的抑制作用。**方法:**以高转移性MKN28 GC细胞为细胞模型,研究华蟾素的抗癌作用。使用CCK-8测定细胞活力,LDH检测丁硫磷对细胞膜完整性的影响。Hoechst/PI双染色和Annexin V-FITC/PI染色检测细胞凋亡,随后使用流式细胞仪进行分析。western blotting检测相关蛋白的表达水平。通过iTRAQ分析,确定丁硫磷处理后GC细胞的差异表达基因。**结果:**丁硫磷能抑制高转移性GC MKN28细胞的生长,破坏细胞膜,促进GC细胞凋亡。iTRAQ分析表明PIM3是丁硫磷素抗癌作用的分子靶点。研究还发现,PIM3基因敲除显著增强了丁硫磷对GC细胞的抗生长和促凋亡作用。相反,异位PIM3的表达明显抑制了丁硫磷的抗肿瘤活性。**结论:**华蟾素对高转移性的GC具有抗癌活性是通过下调PIM3表达而实现的。

关键词:胃癌;华蟾素;丁硫磷;PIM3;细胞活性

中图分类号:R-33;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)03-436-07

Experimental Study of Bufothionine Inhibits Highly Metastatic Gastric Cancer Cells by Down Regulating PIM3 Expression*

WANG Guo-jun, WANG Zhuo-yin, ZHU Tian-yu, GAO Bu-lang, LI Rui-xin, WANG Jing-tao, ZHANG Yun-fei, DING Heng-xuan
(Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450022, China)

ABSTRACT Objective: Gastric cancer (GC) is the fourth most common cancer globally. Bufothionine is a major active constituent of Cinobufacini, which is extracted from the skin and parotid gland of the toad *Bufo bufo* Cantor. It exhibits anti-cancer activities in vitro. However, whether bufothionine exerts anti-cancer activities against GC is unknown. To evaluate the inhibitory effect of bufothionine on GC. **Methods:** MKN28 GC cells were chosen as cell models to study the anti-cancer effect of bufothionine. Cell viability was determined by CCK-8 assay, while the effect of bufothionine on cell membrane integrity was examined by LDH assay. Cell apoptosis was detected by Hoechst/PI staining and Annexin V-FITC/PI staining followed by flow cytometry analysis. The expression levels of proteins involved were examined using western blotting. iTRAQ analysis was conducted to identify the differentially expressed genes in AGS cells following bufothionine treatment. **Results:** The results revealed that bufothionine prevented the growth, destroyed cell membrane, and promoted apoptotic cell death of GC cells. iTRAQ analysis revealed that PIM3 might be a molecular target responsible for the anti-cancer effects of bufothionine. PIM3 knockdown significantly augmented the anti-growth and pro-apoptotic effects of bufothionine in GC cells. In contrast, ectopic PIM3 expression markedly dampened the anti-neoplastic activities of bufothionine. **Conclusion:** Bufothionine exhibits anti-cancer activities in vitro GC cells via downregulating PIM3.

Key words: Gastric cancer; Cinobufacini; Bufothionine; PIM3; Cell activity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)03-436-07

前言

作为消化系统最常见的恶性肿瘤之一,胃癌(GC)是全球第四大最常见肿瘤、第三大引起死亡的恶性肿瘤^[1,2]。在我国,GC发病率很高,严重威胁着人们的身体健康。不同时期的GC治疗方式不同,早期GC的治疗方法主要是内镜下切除和外科手术,尽管目前治疗技术日新月异、有了长足的发展,但GC的根治性切除术后五年生存率也只有43.4%。晚期GC全身扩

散时则只有药物疗法,化疗虽然能够提高患者的生存率,但经济成本高、对患者的身心也造成极大的伤害,因此寻找新的疗效高、副作用小的药物则具有极其重要的意义。华蟾素是中华大蟾蜍表皮提取的重要复方制剂,具有清热解毒、利水消肿、化瘀止血以及抗肿瘤作用,目前在肿瘤的治疗方面有很多临床应用和研究^[3-7]。丁硫磷(bufothionine)是丁二烯内酯、是华蟾素的生物活性成分,具有抗癌活性^[2,8,9],但其对GC的抗癌作用及其作用机制尚无深入研究。PIM是一个Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋

* 基金项目:河南省高等学校重点科研计划项目(17A320045)

作者简介:王国俊(1969-),男,博士,主任医师,研究方向:上消化道肿瘤,E-mail:fcwangji@zzu.edu.cn

(收稿日期:2020-08-23 接受日期:2020-09-18)

白激酶家族,具有丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性,有三种形式,具有抗凋亡、调节细胞生长、促进细胞增生进展、促进癌症进展的作用^[10]。作为 PIM 家族的一个成员,PIM3 具有抗凋亡、促进细胞存活的作用。PIM3 在一些内皮源性肿瘤如肝细胞癌、腺癌和胰腺癌中高表达,但在正常器官中几乎没有检测到^[2,10]。据报道,PIM3 的高表达与肿瘤的过度生长或过度存活有关,而 PIM3 的敲除或抑制可预防或抑制肿瘤的发生^[11],在 GC 的侵袭和转移中也发现了异常增高的 PIM3 表达^[12]。本研究拟使用华蟾素的活性成分丁硫磷研究其对人 GC 高转移细胞株 MKN28 的抑制作用并探讨其通过下调 PIM3 表达的分子作用机制。

1 材料方法

1.1 实验材料和细胞培养

高转移性人 MKN28 GC 细胞购自 GeneChem 公司(中国上海),胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。将购买的高转移性人 GCMKN28 细胞加入到含有 10% 胎牛血清的 PRPMI116640 培养液细胞液中,在 37℃、5% 二氧化碳、饱和湿度的培养箱中培养。

1.2 细胞活性检测与 LDH 活性检测

(1) 细胞活性检测: 将 100 μL 的细胞以每毫升 1.2×10^5 的密度种植在 96 孔板上, 使用不同浓度的(20 μg/mL、50 μg/mL 和 100 μg/mL) 丁硫磷处理细胞后, 使用美国 Promega 公司的非放射性细胞增殖检测试剂盒按照说明书的操作方法检测细胞活力, 并在 570 nm 处用微板阅读器测定吸光度。(2) LDH 活性检测: 使用乳酸脱氢酶活性测定试剂盒(中国建城生物科技)测定乳酸脱氢酶活性。将 MKN28 细胞以每孔 2×10^5 的密度种植在 6 孔板上, 使用不同浓度的丁硫磷处理细胞后, 在培养基中加入 NADH 和丙酮酸盐, 在 37℃ 下培育 15 分钟, 然后加入 0.4M 的 NaOH 终止反应, 再使用微板阅读器测定 450 nm 处的吸光度。

1.3 Hoechst 33342/PI 双染色

使用丁硫磷处理细胞后, 用冷的 PBS 冲洗细胞两次, 并用 Hoechst/PI 染色液在 25℃ 的黑暗中培养 15 分钟。然后观察凋亡细胞的死亡水平。

1.4 流式细胞仪分析

使用美国 BD 公司的 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测盒来检测细胞的凋亡情况。将细胞以 2×10^5 的密度接种于培养皿内, 与 Annexin V-FITC 和 PI 染色液一起培养 15 分钟, 之后使用流式细胞仪检测凋亡细胞数。

1.5 Western blotting 免疫印迹法

收集不同浓度丁硫磷处理后的 MKN28 细胞, 用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离细胞裂解液中的蛋白质, 然后转移到聚偏氟乙烯膜上。随后在 4℃ 下将膜与一级抗体孵育过夜。山羊抗兔 IgG-HRP(中国上海贝奥蒂姆)作为第二抗体, GAPDH 作为内部对照, 使蛋白水平正常化。然后用化学发光基底(英国吉尔福德 KPL)观察分析信号。

1.6 iTRAQ 分析

将裂解后的 MKN28 细胞的蛋白提取后, 使用美国 ABI 公司开发的同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ), 按照 iTRAQ 说明书, 标记蛋白质样品, 并分别采用液相色谱法和串

联质谱法分析蛋白质样本。使用 Oebiotech 技术(中国上海)进行蛋白质鉴定和相对 iTRAQ 定量。不同表达蛋白的截断值为 $P < 0.05$, 折叠变化 >2.0 或 <0.5 。

1.7 RNA 提取与 qRT-PCR 定量

收集不同浓度丁硫磷处理后的 MKN28 细胞, 用 Trizol(美国)提取总 RNA, 使用 Prime Script™ RT 试剂盒把总 RNA 反转成 cDNA。以 GAPDH 为对照, 用 Power-SYBR-Green-PCR-Master-Mix(美国)对靶基因进行 qRT-PCR 检测。从 Sangon(中国上海)购买的引物如下: 正向, 5'-aaggacaaaaatctgcttgtgg-3'; 反向, 5'-cgaagtccgttagactgtgg-3'^[13]。靶基因的表达用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法定量。

1.8 小发夹 RNA(shRNA)压制与异位 PIM3 表达

(1) 小发夹 RNA(shRNA)压制: 根据以前描述的序列和方法合成 shRNA 靶向的 PIM3^[14]。用 shRNA(30nM)沉默压制 PIM3, 以无意义序列为对照。用 lipofectamine3000 转染 48 h 后, 取细胞进行进一步分析。用 shRNA(30nM)沉默 PIM3, 以无意义序列为对照。使用 lipofectamine3000 转染 48 h 后, 取细胞进行进一步分析。(2) 异位 PIM3 表达: 将全长野生型人 Pim-3cDNA 亚克隆到 pMEI-5 新逆转录病毒表达载体中, 根据以前的报道进行逆转录病毒的制作和转导^[15]。转染 48 h 后, 用 western blot 检测 PIM3 水平。

1.9 统计学处理

本研究的所有资料均使用 SPSS19.0(IBM, 美国芝加哥)统计学分析软件进行处理分析。通过单因素方差分析和 Dunnett t 检验对各组进行比较, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丁硫磷降低了 MKN28 高转移性 GC 细胞的活性

使用不同浓度的丁硫磷(20 μg/mL、50 μg/mL 和 100 μg/mL)处理 MKN28 细胞。在使用丁硫磷处理细胞 24 小时后, 50 μg/mL 和 100 μg/mL 浓度的丁硫磷能够显著降低 MKN28GC 细胞的活性($P < 0.01$), 而在处理 48 小时后, 20 μg/mL、50 μg/mL 和 100 μg/mL 的丁硫磷均能显著降低 MKN28 细胞的活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并呈现一种剂量依赖的抑制方式(图 1A)。对正常胃上皮细胞的抑制试验显示, 100 μg/mL 丁硫磷在 48 小时后能够显著抑制上皮细胞的活性($P < 0.05$)(图 1B)。因此, 本实验选择 20 μg/mL 和 50 μg/mL 的丁硫磷处理 GC 细胞 24 小时以观察丁硫磷的生物作用。细胞膜完整性受损是细胞死亡的一个特征, 使用乳酸脱氢酶(LDH)渗漏法检测丁硫磷对细胞膜的破坏作用。如图 1C 所示, 丁硫磷以浓度依赖的方式促进 MKN28 细胞的 LDH 渗漏。这些发现支持了丁硫磷促进 GC 细胞死亡的假说。

2.2 丁硫磷促进 MKN28 高转移性 GC 细胞的凋亡

使用 Hoechst/PI 染色检测丁硫磷在诱导细胞凋亡中的作用。如图 2A 所示, 使用丁硫磷处理 48 h 后, 在 MKN28 细胞中观察到核碎裂和染色质浓缩。如图 2B 所示, 使用流式细胞仪检测凋亡细胞百分率, 20 μg/mL 和 50 μg/mL 的丁硫磷处理显著增加了 MKN28 细胞的凋亡率, 分别达到了 10% 和 20%。因此, 使用凋亡相关蛋白进一步验证了丁硫磷对 MKN28 细胞的促凋亡活性。丁硫磷处理后, 细胞中 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的裂解率显著升高。此外, 丁硫磷处理导致浓度依赖性

的 Bcl-2 上调和 Bax 下调, 这进一步揭示了丁硫磷的促凋亡活性(图 2C)。用 10 μM 特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂 z-VAD-FMK 预处理 MKN28 细胞 2 小时, 然后用 50 μg/mL 丁硫磷孵育 48 h。如图 2D 所示, z-VAD-FMK 对凋亡细胞的数量

没有任何显著的改变。然而, z-VAD-FMK 预处理显著阻断了丁硫磷在 MKN28 细胞中的促凋亡活性, 这表明丁硫磷以 caspase 依赖的方式促进细胞的凋亡。

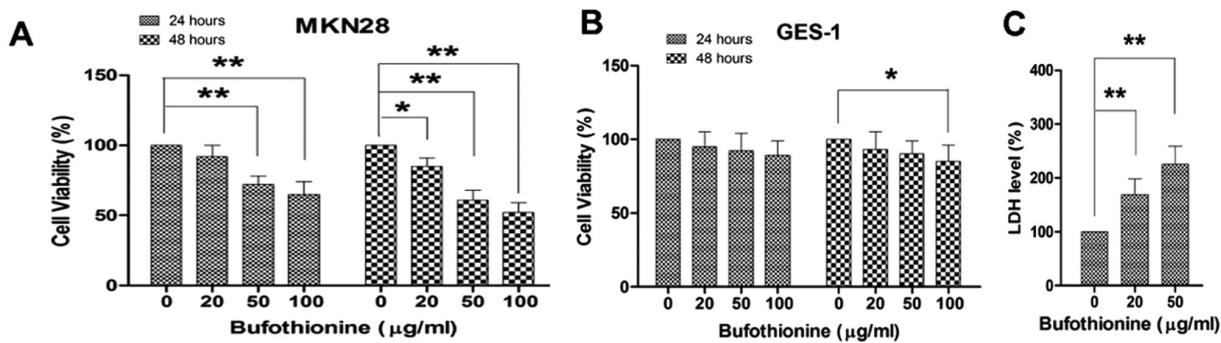


图 1 丁硫磷降低 GCMKN28 细胞的活性、破坏细胞膜的完整性

Fig.1 Bufothionine reduces cell viability and disrupts cell membrane integrity in MKN28 cells

Note: FigA. Treatment with bufothionine at 20, 50 and 100 μg/mL for 24 or 48 h followed by cell viability assessment by CCK-8 assay; FigB. GES-1 cells were treated with bufothionine at 20, 50 and 100 μg/mL for 24 or 48 h. Cell viability was assessed by CCK-8 assay; FigC. MKN28 cells were treated with bufothionine at 20 and 50 μg/mL for 48 h. The effect of bufothionine on cell membrane integrity was assessed by LDH assay. *P<0.05, **P<0.01.

2.3 丁硫磷下调了 MKN28 细胞的 PIM3 的表达

用 50 μg/mL 丁硫磷孵育 48h 后, MKN28 细胞中 PIM3 的表达受到了显著抑制。因此, 用 qRT-PCR 方法检测 MKN28 细胞中 PIM3 的 mRNA 水平, 在丁硫磷处理后, MKN28 细胞中 PIM3 的 mRNA 水平以浓度依赖的方式下调(图 3A), 相应地, PIM3 蛋白表达水平也受到了丁硫磷的抑制(图 3B)。

2.4 PIM3 下调加剧了丁硫磷的抗肿瘤作用

随后, 检测 PIM3 下调对 MKN28 细胞的抗肿瘤作用, 靶向 siRNA 的处理下调了 PIM3 的表达(图 4A), 而在 PIM3 敲除后, 丁硫磷能够显著地降低 MKN28 细胞的活性($P<0.01$)(图 4B)。LDH 渗漏试验也证实了在 PIM3 敲除后, 细胞膜的渗漏作用增强, 说明丁硫磷对 MKN28 细胞的细胞毒性更为显著(图 4C); 流式细胞仪检测证实 PIM3 敲除能够显著增强丁硫磷对 MKN28 细胞的凋亡作用(图 4D)。而且, PIM3 基因敲除加剧了丁硫磷诱导的 caspase-3 裂解表达(图 4E)。随后将 MKN28 细胞转染了 PIM3 过表达载体, 从而将 PIM3 的表达比亲代细胞提高了 >150%(图 5A)。CCK-8 法检测显示, 异位 PIM3 表达能够显著缓解丁硫磷诱导的 MNK28 细胞的死亡(图 5B)、降低其引起的细胞膜破坏和渗漏作用(图 5C)。异位 PIM3 表达显著抑制了丁硫磷对 MKN28 细胞的凋亡诱导作用(图 5D), 通过 western blotting 蛋白印迹分析裂解的 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达也证实了这一点(图 5E)。上述实验表明 PIM3 下调能够加剧丁硫磷对 MKN28 细胞的抗癌作用。

3 讨论

华蟾素是一种动物源性药物, 用于治疗人类恶性肿瘤, 并具有抑制 GC 细胞增殖、促进凋亡的作用^[16,17]。华蟾蜍素还被尝试作为 GC 患者常规化疗的辅助治疗, 这表明华蟾素可以提高晚期 GC 患者治疗的有效率和疾病的化疗控制率^[18]。尽管二烯内酯是华蟾蜍素的主要生物活性成分, 目前尚不清楚哪种化合物在 GC 治疗中起主要的抑制作用。本研究结果显示, 华蟾蜍

素中的二烯内酯类化合物丁硫磷能促进 GC 细胞凋亡和细胞死亡, 而 PIM3 是华蟾素丁硫磷抗癌活性的主要靶点, 华蟾素丁硫磷是通过下调 PIM3 水平来影响 GC 的进展。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡, 可由外部或内部刺激引起, 而大多数化疗药物是通过诱导细胞凋亡来消灭恶性肿瘤细胞、从而起到治疗作用的。本研究发现丁硫磷增加了核染色质的密度, 这反映了核染色质的凝聚、凝固和碎裂, 这是细胞凋亡。流式细胞仪检测证实丁硫磷能显著促进 GC 细胞的凋亡。caspase 级联的激活是凋亡细胞死亡的标志^[19]。在 caspases 中, caspase-8 和 caspase-9 的激活分别导致外源性和内源性的凋亡^[20]。实验显示丁硫磷可显著提高细胞内 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的裂解水平, 提示细胞内存在内源性和外源性凋亡途径。此外, caspase 抑制剂阻断了丁硫磷诱导的细胞凋亡, 提示丁硫磷能诱导 caspase 依赖性凋亡。凋亡过程也受到一系列促凋亡和抗凋亡蛋白的严格调控, 包括 Bax、Bak、Bid、Bcl-2 和 Bcl-xL。尤其是 Bax 和 Bcl-2 之间的相互作用触发线粒体膜破裂, 随后线粒体细胞色素 c 释放到细胞质中, 从而导致 caspase 级联的激活^[21]。本文观察到丁硫磷能上调促凋亡蛋白 Bax 和下调抗凋亡蛋白 Bcl-2, 提示线粒体功能障碍参与了华蟾素丁硫磷诱导的细胞凋亡。这些发现与 Xie R F 的研究结果一致, 该报告显示丁硫磷通过激活线粒体凋亡信号来促进小鼠肝肿瘤细胞的凋亡^[22]。

PIM 家族成员具有丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性, 目前发现该家族有三种激酶 PIM1、PIM2 和 PIM3。PIM1 作为 Moloney 小鼠白血病病毒 T 细胞淋巴瘤的前体插入位点, 对淋巴瘤的发生有积极作用。PIM2 最初被认定为前病毒整合位点, 而 PIM3 最初被认定为致癌基因; 后来发现 PIM3 在正常脑和心脏组织中也有表达^[23]。有趣的是, PIM3 在癌组织中是不受调控的, 尤其是内胚层来源的肿瘤, 包括结肠、肝脏、胰腺和胃肿瘤^[24]。之后, 开发了小分子 PIM 激酶抑制剂并对其抗癌活性加以研究; 而一项早期的研究表明, 阿司他胺合成中间体 T18 是通过作为

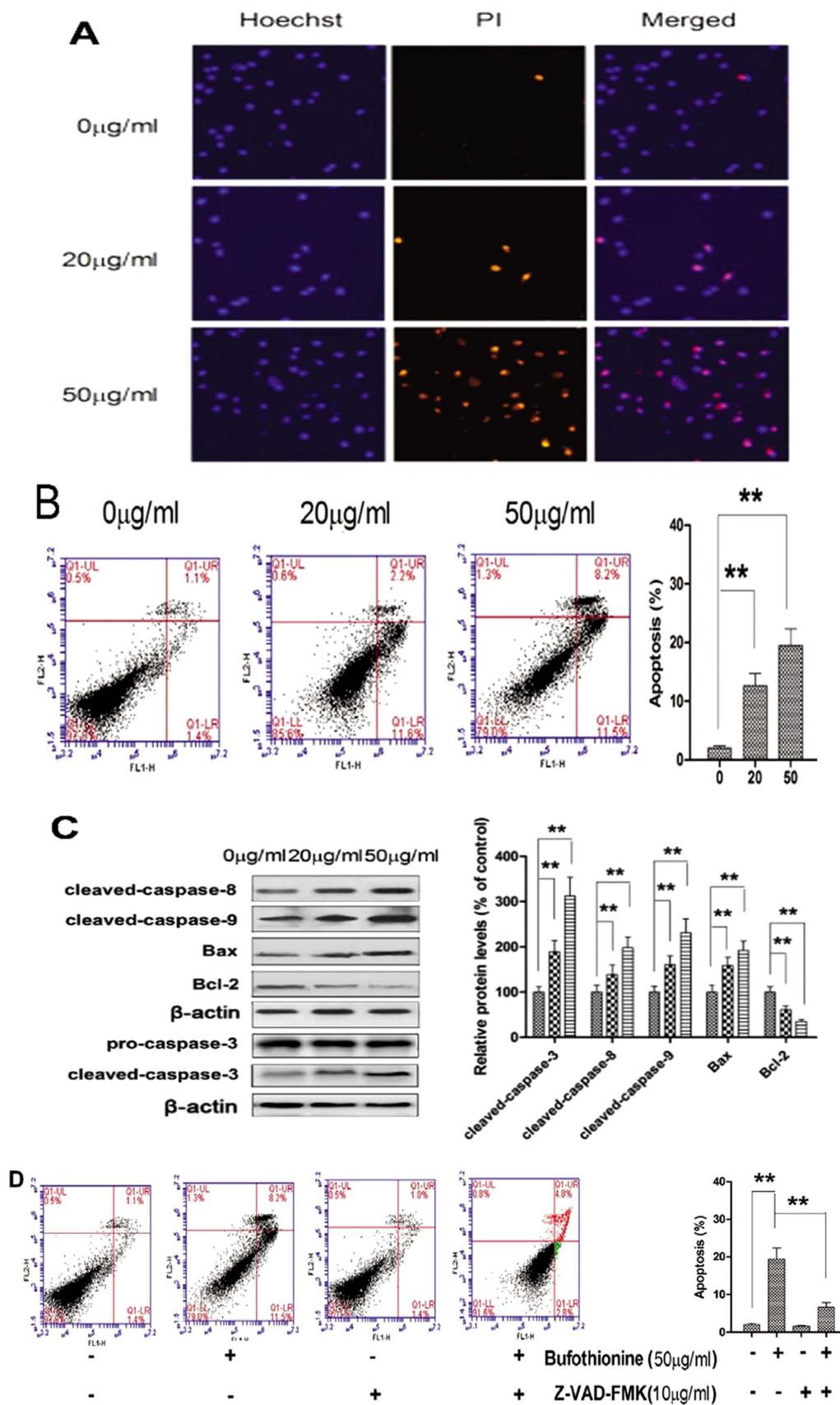


图 2 丁硫磷促进 MKN28GC 细胞凋亡

Fig.2 Bufothionine promotes caspase-dependent apoptosis in MKN28 cells

Note: MKN28 cells were treated with bufothionine at 20 and 50 μ g/mL for 48 h. FigA. Apoptotic cell population was assessed by Hoechst33342/PI double staining; FigB. Cell apoptosis was detected using Annexin V-FITC/PI apoptosis kit; FigC. The cleavage of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 as well as expression of Bcl-2 and Bax was determined by western blotting; FigD. Pretreatment with specific caspase inhibitor z-VAD-FMK (10 μ M, 4 h) blocked bufothionine-promoted cell apoptosis. **P<0.01.

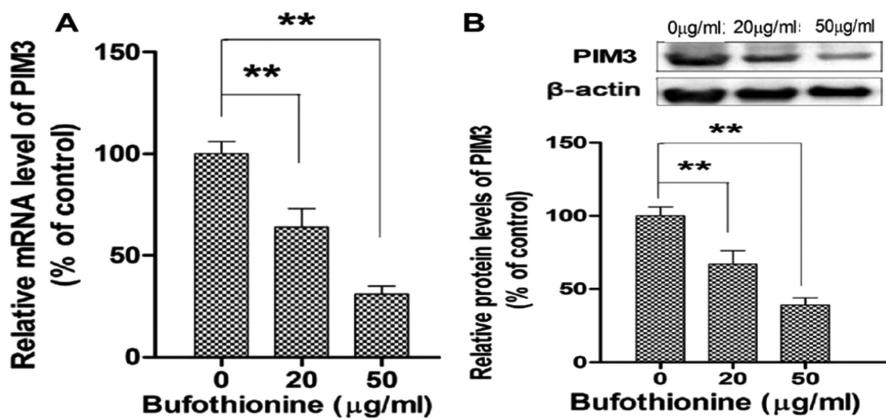


图 3 丁硫磷下调 MKN28GC 细胞中 PIM3 的表达

Fig.3 Bufothionine downregulates PIM3 in GC cells

Note: MKN28 cells were treated with bufothionine at 20 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48h. FigA.the expression levels of PIM3 mRNA ;FigB.the expression levels of PIM3 protein. ** $P<0.01$.

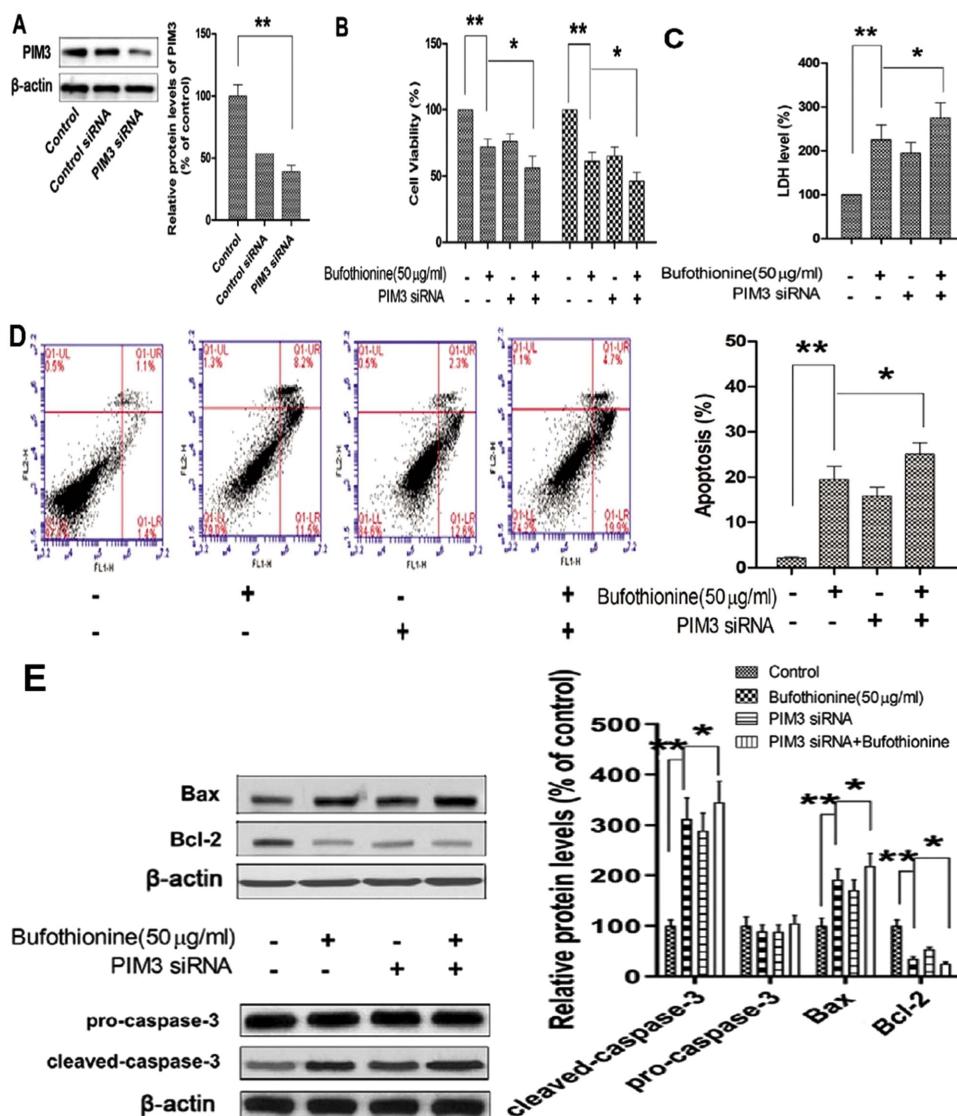


图 4 丁硫磷对 PIM3 siRNA 转染 MKN28GC 细胞的影响

Fig.4 Effect of bufothionine on MKN28 cells after transfection with PIM3 siRNA

Note: MKN28 cells were transfected with PIM3 siRNA, and bufothionine treatment was started 48 h after transfection. FigA. 48 h post transfection, the protein expression of PIM3 was assessed by western blotting; FigB. Effect of the combination of bufothionine and PIM3 knockdown on cell viability was assessed by CCK-8 assay; FigC. Cytotoxicity of the combination of bufothionine and PIM3 knockdown on cell viability was examined by LDH assay; FigD. Pro-apoptotic activities of the combination of bufothionine and PIM3 knockdown were examined using Annexin V-FITC/PI apoptosis kit; FigE. Effect of the combination of bufothionine and PIM3 knockdown on the protein levels of cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2. ** $P<0.01$.

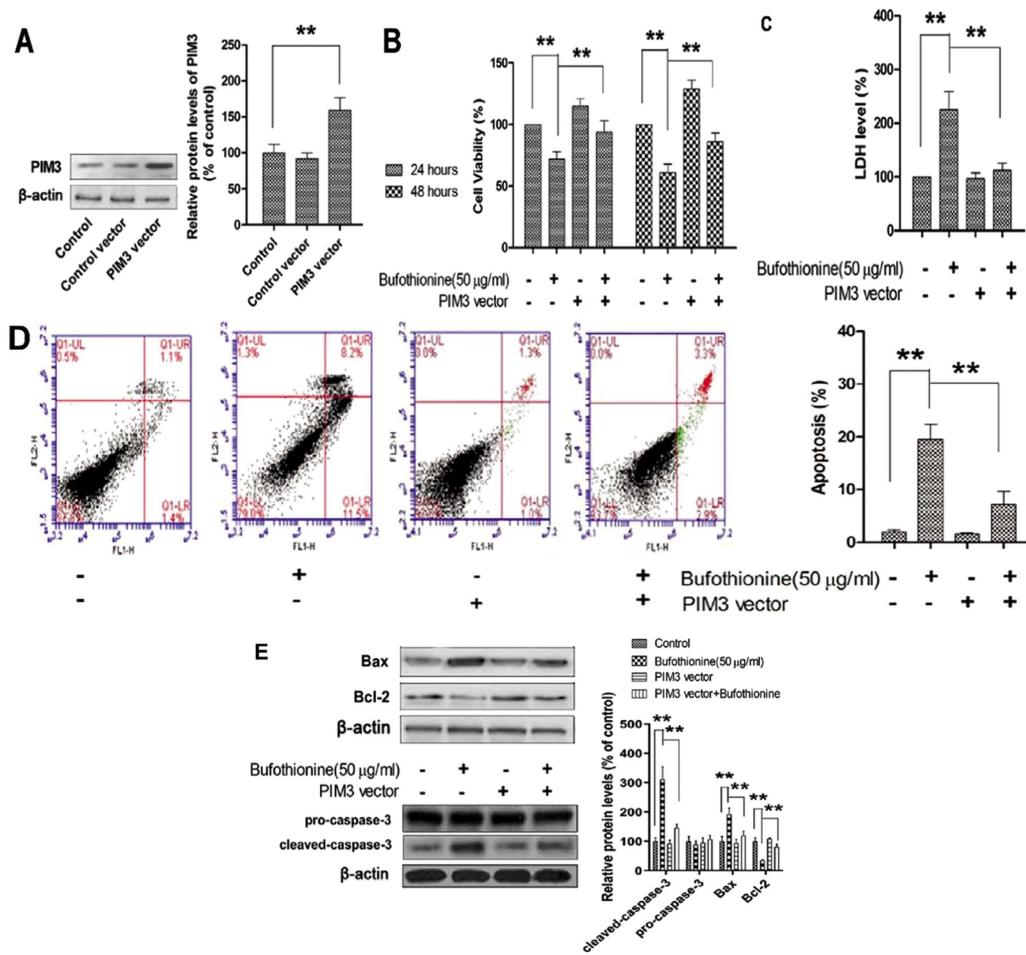


图 5 丁硫磷对 PIM3 高表达载体转染 MKN28GC 细胞的影响

Fig.5 Effect of bufothionine on MKN28 and AGS cells after transfection with PIM3 overexpressing vector

Note: GC cells were transfected with PIM3 overexpressing vector and bufothionine treatment was started 48h after transfection. FigA. 48 h post transfection, the protein level of PIM3 was assessed by western blotting; FigB. Effect of the combination of bufothionine and ectopic PIM3 expression on cell viability was assessed by CCK-8 assay; FigC. Cytotoxicity of the combination of bufothionine and ectopic PIM3 expression was assessed by LDH assay of cell viability; FigD. Pro-apoptotic activity of the combination of bufothionine and ectopic PIM3 expression was examined using Annexin V-FITC/PI apoptosis kit; FigE. Effect of the combination of bufothionine and ectopic PIM3 expression on the protein levels of cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2 was examined by western blotting. **P<0.01.

PIM3 抑制剂而发挥抗癌活性的^[23-25]。我们的研究表明 PIM3 是 GC 治疗的一个潜在靶点，而华蟾素丁硫磷的抗生长和促凋亡活性归因于 PIM3 的下调。此外，我们的研究结果提供了令人信服的证据，PIM3 是丁硫磷诱导 GC 细胞凋亡的关键介质，这与结直肠癌、胶质瘤和胰腺癌的有关研究结果一致^[10,24,26]。一些研究表明 PIM3 对肿瘤转移^[10]、化疗耐药^[27,28]和放射耐药^[29,30]都有积极作用。因此，我们有理由相信，丁硫磷可能通过下调 PIM3 而发挥抗转移活性或提高对化疗和放疗的敏感性。

综上所述，本研究的发现表明，丁硫磷在体外能够抑制高转移性 GC 细胞株的生长，而 PIM3 可能是介导丁硫磷对 GC 抗癌活性的主要分子靶点。这些发现为丁硫磷在 GC 治疗中的化疗潜力提供了新的见解。

参考文献(References)

- [1] Marino V, Riccardo V, Theodoros R, et al. Gastric cancer: epidemiology, prevention, and therapy[J]. Helicobacter, 2018, 23(1): e12518
- [2] Wang G, Liu G, Ye Y, et al. Bufothionine exerts anti-cancer activities in gastric cancer through Pim3[J]. Life Sci, 2019, 232: 116615
- [3] 巴茜远,周诗旸,罗欣欣,等.华蟾素抗癌性疼痛的药理作用及作用机制的研究进展[J].中国疼痛医学杂志,2019,25(9): 695-698
- [4] 陈海婷,卞伟钢,周小宁,等.华蟾素胶囊对中晚期癌症患者癌性疼痛的改善作用[J].中医药临床杂志,2019, 31(5): 947-949
- [5] 殷欣欣,山丹.华蟾素诱导人胶质瘤 U87 细胞凋亡的作用机制研究[J].卒中与神经疾病,2019, 26(6): 653-656
- [6] 王子健,蒋树龙.华蟾素抗肿瘤作用机制研究进展[J].世界中西医结合杂志,2020, 15(2): 385-387, 392
- [7] 刘旭,邵瑞,田晓轩,等.华蟾素抗肿瘤研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019, 25(5): 229-234
- [8] 于秀荣,陈钧泽,李慧杰,等.华蟾素抗肿瘤研究[J].中医学报,2019, 34(6): 1174-1178
- [9] Li X, Liu Y, Shen A, et al. Efficient purification of active bufadienolides by a class separation method based on hydrophilic solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 97: 54-64
- [10] Qi Q, Pan Y, Han S, et al. PIM3 Functions as Oncogenic Factor and Promotes the Tumor Growth and Metastasis in Colorectal Cancer[J].

- Anat Rec (Hoboken), 2019, 302(9): 1552-1560
- [11] Guo Q, Lan P, Yu X, et al. Immunotherapy for hepatoma using a dual-function vector with both immunostimulatory and pim-3-silencing effects[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(6): 1503-1513
- [12] Zheng HC, Tsuneyama K, Takahashi H, et al. Aberrant Pim-3 expression is involved in gastric adenoma-adenocarcinoma sequence and cancer progression [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134 (4): 481-488
- [13] Yu X, Zou Y, Li Q, et al. Decorin-mediated inhibition of cholangiocarcinoma cell growth and migration and promotion of apoptosis are associated with E-cadherin in vitro [J]. Tumour Biol, 2014, 35 (4): 3103-3112
- [14] Popivanova BK, Li YY, Zheng H, et al. Proto-oncogene Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis[J]. Cancer Sci, 2007, 98(3): 321-328
- [15] Liu B, Wang Z, Li HY, et al. Pim-3 promotes human pancreatic cancer growth by regulating tumor vasculogenesis [J]. Oncol Rep, 2014, 31(6): 2625-2634
- [16] Shen Z, Li Y, Zhao C, et al. miR494BAG1 axis is involved in cinobufacini-induced cell proliferation and apoptosis in gastric cancer[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 7435-7441
- [17] Zhou RP, Chen G, Shen ZL, et al. Cinobufacin Suppresses Cell Proliferation via miR-494 in BGC-823 Gastric Cancer Cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(3): 1241-1245
- [18] Zhang X, Yuan Y, Xi Y, et al. Cinobufacini Injection Improves the Efficacy of Chemotherapy on Advanced Stage Gastric Cancer: A Systemic Review and Meta-Analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 7362340
- [19] Gao H, Gao MQ, Peng JJ, et al. Hispidulin mediates apoptosis in human renal cell carcinoma by inducing ceramide accumulation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(12): 1618-1631
- [20] Gao H, Xie J, Peng J, et al. Hispidulin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of gallbladder cancer cells by targeting HIF-1 α [J]. Exp Cell Res, 2015, 332(2): 236-246
- [21] Han M, Gao H, Xie J, et al. Hispidulin induces ER stress-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo by activating AMPK signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(5): 666-676
- [22] Xie RF, Li ZC, Chen PP, et al. Bufothionine induced the mitochondria-mediated apoptosis in H22 liver tumor and acute liver injury [J]. Chin Med, 2015, 10: 5
- [23] Wang Z, Li XM, Shang K, et al. T-18, a stemonamide synthetic intermediate inhibits Pim kinase activity and induces cell apoptosis, acting as a potent anticancer drug[J]. Oncol Rep, 2013, 29(3): 1245-1251
- [24] Quan J, Zhou L, Qu J. Knockdown of Pim-3 Suppresses the Tumorigenicity of Glioblastoma by Regulating Cell Cycle and Apoptosis[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2015, 61(1): 42-50
- [25] Li YY, Mukaida N. Pathophysiological roles of Pim-3 kinase in pancreatic cancer development and progression [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(28): 9392-9404
- [26] Chang W, Liu M, Xu J, et al. MiR-377 inhibits the proliferation of pancreatic cancer by targeting Pim-3 [J]. Tumour Biol, 2016, 37(11): 14813-14824
- [27] Ai J, Li W, Zeng R, et al. Blockage of SSRP1/Ets-1/Pim-3 signalling enhances chemosensitivity of nasopharyngeal carcinoma to docetaxel in vitro[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 1022-1031
- [28] Liang C, Yu XJ, Guo XZ, et al. MicroRNA-33a-mediated downregulation of Pim-3 kinase expression renders human pancreatic cancer cells sensitivity to gemcitabine [J]. Oncotarget, 2015, 6 (16): 14440-14455
- [29] Chen XY, Wang Z, Li B, et al. Pim-3 contributes to radioresistance through regulation of the cell cycle and DNA damage repair in pancreatic cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(1): 296-302
- [30] Nakano H, Hasegawa T, Saito N, et al. Design and synthesis of an in vivo-efficacious PIM3 kinase inhibitor as a candidate anti-pancreatic cancer agent[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(24): 5687-93

(上接第 413 页)

- [28] Rosendahl AH, Forsberg G. IGF-I and IGFBP-3 augment transforming growth factor-beta actions in human renal carcinoma cells [J]. Kidney Int, 2006, 70(9): 1584-1590
- [29] Grafe I, Alexander S, Peterson JR, et al. TGF-beta Family Signaling in Mesenchymal Differentiation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(5): a022202
- [30] Wang C, Li X, Dang H, et al. Insulin-like growth factor 2 regulates the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stromal cells via IGF-1R and IR [J]. Cytotherapy, 2019, 21(6): 619-630
- [31] Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011, 12(11): 722-734
- [32] Landberg A, Falt A, Montgomery S, et al. Overweight and obesity during adolescence increases the risk of renal cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2019, 145(5): 1232-1237
- [33] Callahan CL, Hofmann JN, Corley DA, et al. Obesity and renal cell carcinoma risk by histologic subtype: A nested case-control study and meta-analysis [J]. Cancer Epidemiol, 2018, 56: 31-37
- [34] Koizume S, Miyagi Y. Lipid Droplets: A Key Cellular Organelle Associated with Cancer Cell Survival under Normoxia and Hypoxia [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1430