

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.003

γ -生育三烯酚联合亚砷酸对急性早幼粒细胞 NB4 生长的抑制作用及机制*

李 洋 史 策 杨东光 卫 佳 王振坤 张 鑫

(哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对急性早幼粒细胞 NB4 生长的抑制作用及可能的分子机制。**方法:**采用 CCK-8、细胞周期实验检测细胞增殖、利用激光共聚焦显微镜、Annexin V/PI 染色、Caspase 活性检测、Western Blot 等方法测定细胞凋亡。采用 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO 及不同浓度(0、15、30、45 $\mu\text{mol/L}$)的 γ -生育三烯酚处理 NB4 细胞 24、48 和 72 小时,通过 CCK-8 检测细胞的增殖情况,流式细胞术、激光共聚焦显微镜检测细胞周期和凋亡情况,检测 Caspase3、8、9 的活性,Western Blot 检测细胞中 c-caspase-3、Bcl-2 和 survivin 的蛋白表达。**结果:** γ -生育三烯酚联合亚砷酸显著抑制 NB4 细胞增殖($P<0.01$),且随着作用时间延长和 γ -生育三烯酚浓度的增加,其增殖抑制作用增强;细胞周期阻滞在 S 期,S 期的比例由 $38.21\% \pm 2.99$ 上升到 $50.31\% \pm 5.03$; γ -生育三烯酚联合亚砷酸诱导 NB4 细胞凋亡,1 $\mu\text{mol/L}$ ATO 联合 15、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 γ -生育三烯酚处理 48h 后,细胞活率分别为 $82.27\% \pm 3.16$ 、 $66.97\% \pm 3.17$ 、 $12.63\% \pm 2.66$;1 $\mu\text{mol/L}$ ATO 联合 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 γ -生育三烯酚处理后,NB4 细胞 caspase-3、-8、-9 的活性均较 ATO 单独用药组显著增高,c-caspase-3 表达增高而 Bcl-2 和 survivin 蛋白的表达无明显变化。**结论:**生育三烯酚联合亚砷酸对急性早幼粒细胞 NB4 的生长具有抑制作用,此作用可能与抑制增殖并诱导凋亡相关,其作用靶点可能与促进 Cas-pase 诱导的凋亡有关。

关键词: γ -生育三烯酚;亚砷酸;NB4 细胞;凋亡;caspase-3

中图分类号:R-33;R733.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)05-812-05

Inhibitory Effect and Mechanism of γ -tocotrienol in Combination with Arsenic Trioxide on the Growth of Acute Promyelocytic Leukimia Cell Line NB4*

LI Yang, SHI Ce, YANG Dong-guang, WEI Jia, WANG Zhen-kun, ZHANG Xin

(Department of Central Laboratory, the Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the inhibitory effect and possible mechanism of γ -tocotrienol in combination with ATO on the acute promyelocytic leukemia cell line NB4. **Methods:** NB4 cells were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO in combination with different concentrations of γ -tocotrienol (15, 30 and 45 $\mu\text{mol/L}$) for 24, 48, 72h respectively. The proliferation of NB4 cells were tested by CCK-8 assay. Flow cytometry and Confocal microscopy were used to evaluate the cell cycle and apoptosis of γ -tocotrienol in combination with ATO on NB4 cells. The activity of Caspase3, 8, 9 and the protein expression of c-caspase-3, Bcl-2 and survivin were evaluated by Western Blot. **Results:** ATO in combination with different concentrations of γ -tocotrienol significantly suppressed proliferation on NB4 cells. The cell cycle arrested at the S phase, The proportion at the S phase from $38.21\% \pm 2.99$ to $50.31\% \pm 5.03$ compared with 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO treated cells. Various apoptotic assessment assays have shown that combination of ATO and γ -tocotrienol significantly induced apoptosis in a dose-dependent manner in NB4 cells. The cell viability was $82.27\% \pm 3.16$, $66.97\% \pm 3.17$, $12.63\% \pm 2.66$ in NB4 cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO and in combination with 15, 30 $\mu\text{mol/L}$ γ -tocotrienol for 48 h, respectively. In addition, caspase activity assay and western blot have shown that ATO + γ -tocotrienol induced apoptosis in NB4 cells by activation of caspase-3, -8, and -9. However, γ -tocotrienol had no significant effect on Bcl-2 and survivin expression. **Conclusion:** These data suggest that γ -tocotrienol as a potential, new support treatment for the APL patients. Moreover, caspase-3 could be a promising target for γ -tocotrienol in an effective method of chemoprevention and chemotherapy in APL patients.

Key words: γ -tocotrienol; ATO; NB4; Apoptosis; Caspase-3

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R733.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)05-812-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81402666);中国博士后面上项目(2015M571447);黑龙江省博士后基金项目(Z14150);

哈尔滨医科大学创新科学研究资助项目(2016LCZX47)

作者简介:李洋(1982-),女,硕士研究生导师,副研究员,主要研究方向:食物中的活性物质的抗肿瘤作用,

E-mail: 396510083@qq.com, 电话: 13946094066

(收稿日期:2017-12-06 接受日期:2017-12-28)

前言

急性早幼粒细胞白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia, APL)是以 t(15;17)和融合基因 PML-RARA 为诊断依据、显著的致死性出血为临床特征的一种特殊的急性髓系白血病。亚砷酸(Arsenic trioxide, ATO)作为治疗 APL 的临床一线药物取得了良好的治疗效果。但亚砷酸作为传统的毒性药物,其临床应用不良反应引起了人们的普遍关注。如何降低亚砷酸的不良反应,增加其疗效,是亚砷酸临床应用的关键因素。

生育三烯酚(Tocotrienols, T3)是维生素 E 的一个亚族,与生育酚(Tocopherols, Tp)的区别在于生育三烯酚尾链上有三个不饱和键,这决定了生育三烯酚的生物活性优于生育酚。生育三烯酚富含于大米麸皮、棕榈油中^[1],具有潜在的抗肿瘤作用。研究显示生育三烯酚单体和富含生育三烯酚的棕榈油对不同种系来源(人、鼠)和不同组织来源的肿瘤细胞(包括肝癌、乳腺癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌等)均有抑制增殖和诱导凋亡的作用^[2-9],且对正常组织上皮细胞无明显毒副作用。此外,生育三烯酚还表现出降低胆固醇和神经保护的特性。

本研究以 APL 细胞株 NB4 细胞为离体实验模型,研究 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对其增殖的抑制作用并初步探讨其分子机制,以期天然抗肿瘤药物的开发和应用提供参考依据,为富含生育三烯酚食物资源的开发和利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 γ -生育三烯酚(Cayman)、亚砷酸(伊泰达)、凋亡检测试剂盒(BD)、细胞周期检测试剂盒(BD)、CCK-8 试剂(日本同仁)、半胱氨酸-天冬氨酸特异性蛋白酶 (cysteinyI aspartate specific proteinase, caspase) 活性检测试剂盒(碧云天)、Caspase-3 抗体 (Cell Signaling)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (Cell Signaling)、生存素 (survivin) 抗体 (Cell Signaling)。

1.1.2 细胞 急性早幼粒白血病细胞株 NB4 由哈尔滨医科大学附属第一医院血液实验室提供,该细胞在含 1%青霉素、10% 胎牛血清 RPMI 1640(Gibco 公司)培养液中,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养、传代。

1.2 方法

1.2.1 细胞生长曲线测定 取 NB4 细胞,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种至 96 孔板中,每孔 5×10^3 个细胞,培养过夜,更换浓度 1 μ mol/L ATO 及浓度分别为 0、15、30、45、60 μ mol/L 的 γ -生育三烯酚的培养液,每个剂量组设 5 个平行孔,另设乙醇溶剂对照组和空白组,置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 24、48 和 72h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L,在相同条件下继续培养 2 h,用酶标仪 (450 nm)测定各孔的吸光度(OD)值。

1.2.2 细胞周期测定 NB4 细胞接种至 24 孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,1 μ mol/L ATO 联合 γ -生育三烯酚(0、15、30 μ mol/L)处理细胞 48 h 后,收集 NB4 细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤并收集于 Eppendorf 管中。加入 100 μ L 的 PBS,使细胞悬浮,并将其快速加入到 1 mL 预冷的 70%乙醇中,于 4℃ 固定过夜。PBS 洗涤,加 800 μ L

PBS 使细胞重悬。加入 4 μ L 核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase) (终浓度为 20 μ g/mL),37℃ 水浴 30min。向细胞悬液中加入 PI 染液 100 μ L,另补加 96 μ L 的 PBS,室温避光染色 15 min,流式细胞仪测定细胞周期。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡 收集 1 μ mol/L ATO 联合 0、15、30、45 μ mol/L γ -生育三烯酚作用 48h 的 NB4 细胞, PBS 缓冲液洗 2 次重悬后加入膜连蛋白 V(Annexin V) 10 μ L,避光 20 min 后, PBS 缓冲液洗 2 次后加入碘化丙啶(Propidium, PI) 5 μ L,激光共聚焦显微镜观察经过 Annexin V/PI 双染的 NB4 细胞形态变化。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集 1 μ mol/L ATO 联合 0、15、30、45 μ mol/L γ -生育三烯酚作用 48 h 的 NB4 细胞, PBS 缓冲液洗 2 次, PBS 缓冲液重悬后加入 Annexin V 10 μ L,避光 20 min 后, PBS 缓冲液洗 2 次, 200 μ L $1 \times$ Banding 缓冲液重悬后加入 PI 5 μ L,流式细胞仪检测细胞凋亡 $1 \times$ Banding 缓冲液重悬后加入 PI 5 μ L,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 caspase 试剂盒检测 Caspase 活性 收集 1 μ mol/L ATO 联合 30 μ mol/L γ -生育三烯酚作用 48 h 的 NB4 细胞,加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 min, 4℃ 12000 $\times$ g 离心 15 min,取上清,加入 Caspase-3 显色底物(Ac-DEVD-pNA)、Caspase-8 显色底物(Ac-IETD-pNA)、Caspase-3 显色底物(Ac-IEVD-pNA)于 37℃ 孵育 120 min,酶标仪测定 A405 的吸光度。

1.2.6 Western Blot 检测凋亡相关蛋白表达 将 NB4 细胞接种于 100 mL 培养瓶中,每瓶 1×10^6 个细胞,培养 24 h 后,换成含 1 μ mol/L ATO 及不同剂量的 γ -生育三烯酚培养液作用 48 h,收集细胞。加细胞裂解液,4℃ 裂解 2 h, 12000 $\times$ g 离心 15 min,取上清,测定蛋白含量,调整蛋白含量为 5 μ g/ μ L。经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜,含 1%小牛血清白蛋白的 TBST,37℃ 封闭 1 h,多克隆抗体 Caspase-3、Bcl-2、抗体,37℃ 2 h,二抗杂交,37℃ 1 h,碱性磷酸酶标记显色,数字成像仪分析蛋白的光密度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,多组间差异采用方差分析进行处理,两组间比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞的增殖的抑制作用

CCK-8 实验结果显示(如图 1 所示):与 1 μ mol/L 亚砷酸联用 24、48 和 72 h 后,随 γ -生育三烯酚浓度(15、30、45、60 μ mol/L)的增加,NB4 细胞的增殖率逐渐降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),具有明显的时间-剂量依赖性。

2.2 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞周期的影响

采用流式细胞仪对 NB4 细胞周期分布进行检测分析,结果显示:1 μ mol/L ATO 使细胞周期阻滞在 G2 期,G2 期的比例由 $18.35\% \pm 7.62$ 上升到 $36.45\% \pm 5.23$ 联合用药处理 48 h 的 NB4 细胞周期分布出现显著变化,细胞周期阻滞在 S 期,S 期的比例由 $38.21\% \pm 2.99$ 上升到 $50.31\% \pm 5.03$ 。此外,流式细胞术检测到了联合用药处理 48 h 后典型的前 G1 期亚二倍凋亡峰(如图 2 所示)。

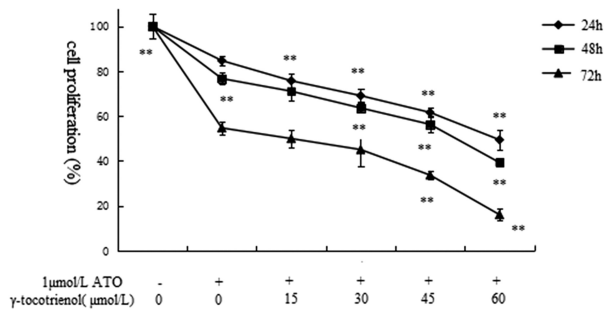


图1 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 增殖的影响

Fig.1 Effect of γ -tocotrienol in combination with ATO on proliferation of NB4 cells

注:与对照组(1 $\mu\text{mol/L}$ ATO)相比 ** $P < 0.01$ 。

Note: compared with the control(1 $\mu\text{mol/L}$ ATO), ** $P < 0.01$.

2.3 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞凋亡的影响

激光共聚焦观察 NB4 凋亡(如图 3 所示):凋亡早期细胞呈 Annexin V 高染而 PI 低染,细胞膜呈绿色而细胞核不着色;随

着 γ -生育三烯酚浓度增加,NB4 细胞 Annexin V 和 PI 均为高染;细胞膜呈绿色而细胞核呈红色;部分细胞的核呈碎片状或梅花状,为典型的细胞凋亡形态。

药物联合处理 NB4 细胞 48 h 后,利用 Annexin-V /PI 双染方法检测细胞凋亡情况,如图 4 所示,随着 γ -生育三烯酚浓度的增加,NB4 细胞凋亡显著增加,细胞活率分别为 $95.90\% \pm 1.56$ 、 $82.27\% \pm 3.16$ 、 $66.97\% \pm 3.17$ 、 $12.63\% \pm 2.66$ 。

2.4 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞 Caspase 活性的影响

药物联合处理 NB4 细胞 48h 后,利用 Caspase 试剂盒方法检测 Caspase 活性的变化情况,结果如图 5 所示,Caspase-3、-8、-9 活性均较对照组显著升高($P < 0.05$)。

2.5 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

γ -生育三烯酚联合亚砷酸联合作用 NB4 细胞 48 h,随 γ -生育三烯酚剂量的增加,c-caspase-3 的表达较对照组(1 $\mu\text{mol/L}$ ATO)增加,而 Bcl-2、survivin 蛋白表达无明显变化。

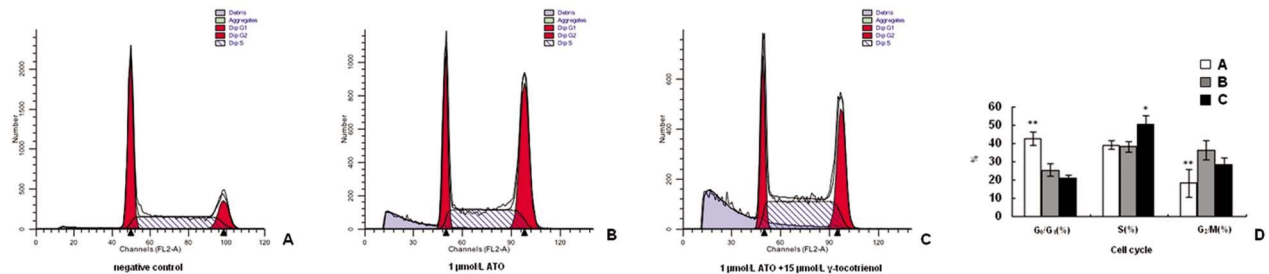


图2 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞周期的影响

Fig.2 Cell cycle distribution in NB4 cells treated by tocotrienol in combination with ATO

注:A:阴性对照 B:1 $\mu\text{mol/L}$ ATO C:1 $\mu\text{mol/L}$ ATO+20 $\mu\text{mol/L}$ γ -生育三烯酚

D:与阴性对照相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: A: Negative control B: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO C: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO and 20 $\mu\text{mol/L}$ γ -tocotrienol.

D: compared with the control , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

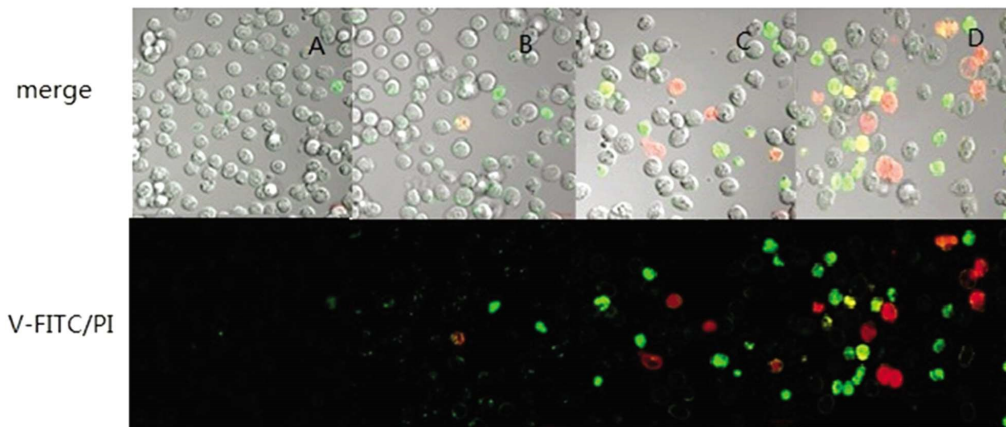


图3 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞凋亡的形态学影响

Fig.3 The morphologic changes of cells treated by γ -tocotrienol in combination with ATO

注: A: 阴性对照 B: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO C: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO+15 $\mu\text{mol/L}$ γ -生育三烯酚.

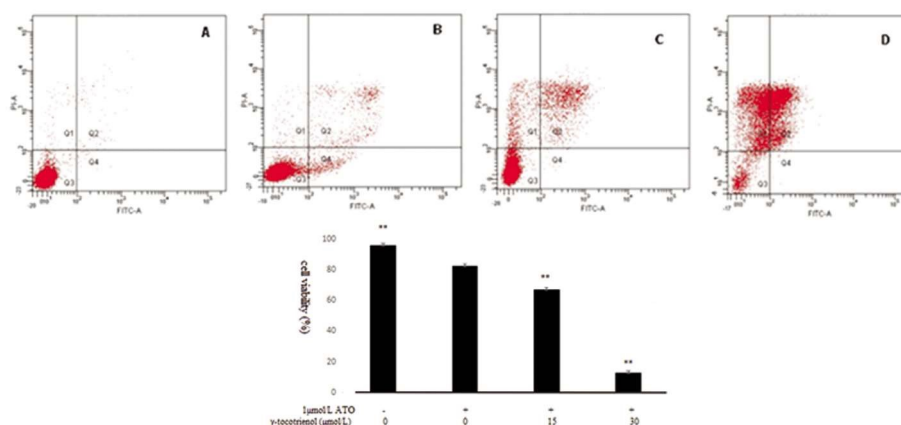
D: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO+30 $\mu\text{mol/L}$ γ -生育三烯酚。

Note: A: Negative control B: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO C: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO and 15 $\mu\text{mol/L}$ γ -tocotrienol

D: 1 $\mu\text{mol/L}$ ATO and 15 $\mu\text{mol/L}$ γ -tocotrienol.

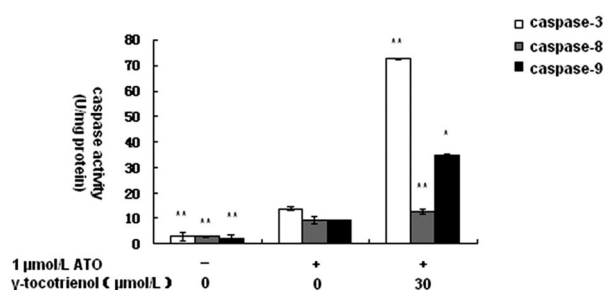
3 讨论

亚砷酸是中药砒霜的提取物,化学成分是 As_2O_3 ,可以通过维甲酸受体信号通路使 PML-RARA 融合蛋白降解,并下调端

图4 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对NB4细胞凋亡的影响Fig.4 The effect of γ -tocotrienol in combination with ATO on the apoptosis of NB4 cells

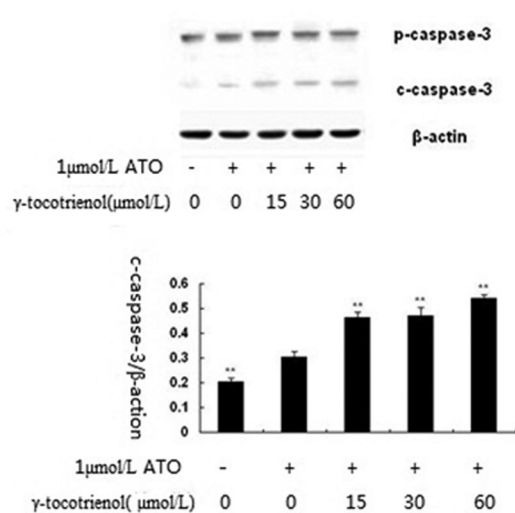
注:A: 阴性对照; B: $1 \mu\text{mol/L}$ ATO; C: $1 \mu\text{mol/L}$ ATO+ $15 \mu\text{mol/L}$ γ -生育三烯酚; D: $1 \mu\text{mol/L}$ ATO+ $30 \mu\text{mol/L}$ γ -生育三烯酚; 与对照组($1 \mu\text{mol/L}$ ATO)相比 ** $P < 0.01$ 。

Note: A: Negative control; B: $1 \mu\text{mol/L}$ ATO; C: $1 \mu\text{mol/L}$ ATO and $15 \mu\text{mol/L}$ γ -tocotrienol; D: $1 \mu\text{mol/L}$ ATO and $30 \mu\text{mol/L}$ γ -tocotrienol; compared with the control ($1 \mu\text{mol/L}$ ATO), ** $P < 0.01$.

图5 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对Caspase活性的影响Fig.5 Effect of γ -tocotrienol in combination with ATO on caspase activation

注:与对照组($1 \mu\text{mol/L}$ ATO)相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: compared with the control ($1 \mu\text{mol/L}$ ATO), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

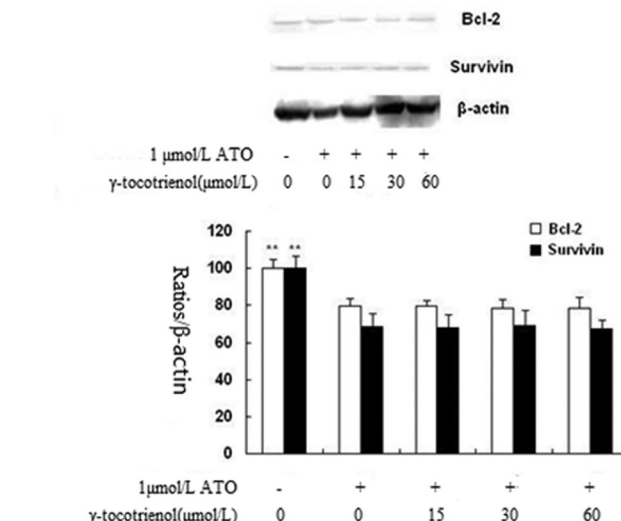
图6 γ -生育三烯酚联合亚砷酸对Caspase-3、Bcl-2、Survivin蛋白的影响Fig.6 Expression of Caspase-3, Bcl-2, Survivin in NB4 cells treated by $1 \mu\text{mol/L}$ ATO in combination with different concentrations of γ -tocotrienol

注:与对照组($1 \mu\text{mol/L}$ ATO)相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: compared with the control ($1 \mu\text{mol/L}$ ATO), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

的热点。生育三烯酚的抑制肿瘤活性比生育酚强,此外,生育三烯酚抗肿瘤活性的发挥与其抗氧化活性无关。大量研究表明生

粒酶的活性使白血病细胞部分分化^[1-3]。此外,亚砷酸抑制肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞凋亡,砷化合物使NB4细胞周期阻滞于G2/M期;亚砷酸诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制主要通过巯基依赖性途径。通过激活Caspase家族、调节MAPKs、Fas/FasL信号通路、抑制NF- κ B活化、升高胞质 Ca^{2+} 浓度等方式诱导肿瘤细胞凋亡^[4-10]。亚砷酸是目前治疗急性早幼粒细胞白血病的临床一线药物,治疗效果显著。但其作为传统的毒性药物,临床应用的不良反应引起了人们的普遍关注,主要针对血液系统、心血管系统、神经系统、消化系统、体液潴留、皮肤损害及肾功能损害。降低亚砷酸的不良反应并增加其疗效是亚砷酸临床应用的关键因素。利用食物中的天然抑癌成分干预肿瘤形成的某些环节阻止其向肿瘤进一步发展成为目前肿瘤研究



育三烯酚能够在低浓度下,微摩尔级浓度即能抑制肿瘤细胞生长,可抑制乳腺癌、结肠癌、胃腺癌、肝癌、前列腺癌等肿瘤细胞

的增殖并诱导其凋亡^[11-22]。

细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下,为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的、有序的程序化死亡。引起肿瘤细胞凋亡被认为是肿瘤治疗的有效途径之一。本研究结果显示随着 γ -生育三烯酚浓度增加,NB4 细胞 Annexin V 和 PI 均为高染,出现典型的凋亡状态,细胞活率分别为 $66.97\% \pm 3.17$ 、 $12.63\% \pm 2.66$,提示凋亡诱导作用是联合用药对 NB4 细胞作用的主要机制之一。此外,CCK-8 和细胞周期实验结果表明联合用药能够抑制 NB4 细胞增殖,细胞周期阻滞在 S 期。Caspase 是一类在结构和功能上比较保守的蛋白酶,在细胞凋亡的起始和过程中都有非常重要的作用。其中,Caspase-8 和 Caspase-9 首先被激活,随后 Caspase-3 被激活。Caspase-3 是一类天冬氨酸残基特异性的半胱氨酸蛋白酶家族,在细胞凋亡过程中起重要作用,随着 Caspase-3 的激活,PARP 开始被裂解。因此,PARP 裂解片断的出现,被作为凋亡的标志^[27]。有研究显示富含 γ -生育三烯酚的棕榈油可以增加 Caspase-3 的活性,诱导人结直肠癌细胞和人乳腺癌细胞凋亡^[23,24]。 γ -生育三烯酚还可以通过激活 Caspase-3,-8,-9 诱导肝癌细胞 Hep38 细胞凋亡^[25]。本研究结果表明联合用药可以激活 Caspase-3,-8,-9,与报道的生育三烯酚诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制一致。

综上所述, γ -生育三烯酚联合亚砷酸对 NB4 细胞的生长有抑制作用,且抑制作用主要与其诱导细胞凋亡有关,Caspase 有可能是其诱导凋亡作用的作用靶点。

参考文献(References)

- [1] Wang Y, Wu N, Liu D, et al. Recurrent Fusion Genes in Leukemia: An Attractive Target for Diagnosis and Treatment [J]. *Curr Genomics*, 2017, 18(5): 378-384
- [2] Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, et al. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL[J]. *Oncogene*, 2001, 20(49): 7146-7153
- [3] Mackenzie KL, Franco S, May C. Mass cultured human fibroblasts over expressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation[J]. *Exp Cell Res*, 2000, 259(2): 336-350
- [4] Noguera NI, Pelosi E, Angelini DF, et al. High-dose ascorbate and arsenic trioxide selectively kill acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia blasts in vitro [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 32550-32565
- [5] Asghari-Kia L, Bashash D, Safaroghlil-Azar A, et al. Targeting human telomerase RNA component using antisense oligonucleotide induces rapid cell death and increases ATO-induced apoptosis in APL cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 809: 215-223
- [6] Qu H, Tong D, Zhang Y, et al. The synergistic antitumor activity of arsenic trioxide and vitamin K2 in HL-60 cells involves increased ROS generation and regulation of the ROS-dependent MAPK signaling pathway[J]. *Pharmazie*, 2013, 68(10): 839-845
- [7] Mandegary A, Torshabi M, Seyedabadi M, et al. Indomethacin-enhanced anticancer effect of arsenic trioxide in A549 cell line: involvement of apoptosis and phospho-ERK and p38 MAPK pathways[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 237543
- [8] Zhu J, Okumura H, Ohtake S. Arsenic induces apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines via the CD95/CD95L system [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(3): 705-709
- [9] Ghaffari SH, Yousefi M, Dizaji MZ, et al. Arsenic Trioxide Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation and Invasive Properties of U87MG Glioblastoma Cells through a Possible NF- κ B-Mediated Mechanism[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(3): 1553-1564
- [10] Shen ZY, Shen WY, Chen HM, et al. Mitochondria, calcium and nitric oxide in the apoptotic pathway of esophageal carcinoma cells induced by As_2O_3 [J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(4): 385-390
- [11] Burdeos GC1, Ito J1, Eitsuka T, et al. δ and ϵ -Tocopherols suppress human hepatocellular carcinoma cell proliferation via regulation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway-associated upstream signaling [J]. *J Food Funct*, 2016, 7(10): 4170-4174
- [12] Sato C, Kaneko S, Sato A, et al. Combination Effect of δ -Tocotrienol and γ -Tocopherol on Prostate Cancer Cell Growth [J]. *Nutr Sci Vitaminol*, 2017, 63(5): 349-354
- [13] Alawin OA, Ahmed RA, Ibrahim BA, et al. Antiproliferative effects of γ -tocotrienol are associated with lipid raft disruption in HER2-positive human breast cancer cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 27: 266-277
- [14] Sitti Rahma Abdul Hafid, Srikumar Chakravarthi, Kalanithi Nesaret-nam, et al. Tocotrienol-Adjuvanted Dendritic Cells Inhibit Tumor Growth and Metastasis: A Murine Model of Breast Cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74753
- [15] Jing-Shu Zhang, Da-Ming Li, Yue Ma, et al. γ -Tocotrienol induces Paraptosis-Like Cell Death in Human Colon Carcinoma SW620 Cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57779
- [16] Xu W, Mi Y, He P, et al. γ -Tocotrienol Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis Via the Mitochondrial Pathway in Human Cervical Cancer HeLa Cells[J]. *Molecules*, 2017, 22(8)
- [17] Abubakar IB, Lim KH, Kam TS. Synergistic cytotoxic effects of combined δ -tocotrienol and jerantinine B on human brain and colon cancers[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 184: 107-118
- [18] Comitato R, Ambra R, Virgili F. Tocotrienols: A Family of Molecules with Specific Biological Activities [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2017, 6(4): pii: E93
- [19] Jiang Q. Natural Forms of Vitamin E as Effective Agents for Cancer Prevention and Therapy[J]. *Adv Nutr*, 2017, 8(6): 850-867
- [20] Montagnani Marelli M, Marzagalli M, Moretti RM, et al. Vitamin E δ -tocotrienol triggers endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human melanoma cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30502
- [21] Tan JK, Then SM, Mazlan M, et al. Gamma-tocotrienol acts as a BH3 mimetic to induce apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 31: 28-37
- [22] Jang Y, Park NY, Rostgaard-Hansen AL, et al. Vitamin E metabolite 13'-carboxychromanols inhibit pro-inflammatory enzymes, induce apoptosis and autophagy in human cancer cells by modulating sphingolipids and suppress colon tumor development in mice [J]. *Free Radic Biol Me*, 2016, 95: 190-199
- [23] Shah S, Gapor A, Sylvester PW, et al. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E induced apoptosis in murine mammary cancer cells[J]. *Nutr Cancer*, 2003, 45: 236-246
- [24] Agarwal MK, Agarwal ML, Athar M, et al. Tocotrienol-rich fraction of palm oil activates P53,modulates Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis independent of cell cycle association[J]. *Cell cycle*, 2004, 3: 205-211
- [25] Sakai M, Okabe M, Tachibana H, et al. Apoptosis induction by γ -tocotrienol in human hepatoma Hep3B cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17: 672-676