

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.20.001

• 基础研究 •

萝卜硫素诱导 RASD1 的表达促进宫颈癌 HELA 细胞凋亡
及周期阻滞的机制研究 *王士玉 王小云 靳成娟 徐圣杰 刘湘楠 邬素芳[△]

(上海交通大学附属第一人民医院妇产科 上海 200000)

摘要 目的:探讨萝卜硫素靶向 RASD1,对宫颈癌细胞(HELA)凋亡及周期的影响机制。**方法:**不同浓度的萝卜硫素(SFN)作用于 HELA 细胞 48h,采用 CCK-8 法检测 SFN 对 HELA 细胞增殖的影响;采用 RT-PCR 法检测 SFN 对 RASD1 基因 mRNA 表达水平的影响;采用 Western 印迹法检测 SFN 对 RASD1 蛋白表达水平的影响;采用流式细胞技术检测加药以及过表达 RASD1 对 HELA 细胞凋亡及周期的影响,采用 Western blot 检测 HELA 中 cleaved-caspase3 和 cleaved-parp 相关凋亡蛋白以及 p21 和 cdc2 周期相关蛋白的影响。**结果:**SFN 抑制宫颈癌细胞增殖,且加药组中 RASD1 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞凋亡分析结果提示:加 SFN 或是过表达 RASD1 细胞组凋亡率明显高于对照组,Western blot 结果表明加 SFN 或过表达 RASD1 后细胞 cleaved-caspase3 以及 cleaved-parp 蛋白水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);ModFit LT 软件分析结果表明加 SFN 或过表达 RASD1 细胞 S 期显著低于对照组,G2/M 期细胞增多,同时 Western blot 结果显示 p21 蛋白的表达水平增高,而 cdc2 蛋白表达降低,其差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**在宫颈癌 HELA 细胞中 RASD1 作为 SFN 的作用靶点,诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞。

关键词:萝卜硫素(SFN); RASD1; 凋亡; 细胞周期阻滞

中图分类号:R-33; R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)20-3801-06

Inhibition of Sulforaphane on the Proliferation of Cervical Cancer HELA
Cells Via Up-regulating RASD1*WANG Shi-yu, WANG Xiao-yun, JIN Cheng-juan, XU Sheng-jie, LIU Xiang-nan, WU Su-fang[△](Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine,
Shanghai, 200000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of SFN targeting RASD1 on apoptosis and cell cycle of human cervical cancer HELA cells. **Methods:** HELA cells were treated with different concentrations of SFN for 48h. Cell proliferation was measured by CCK-8 assay. The mRNA and protein expression of RASD1 in HELA cells were detected by real time-PCR and Western blot, respectively. Then HELA cells were treated with SFN or not, transfected with RASD1 and Control vector for 48h, cells apoptosis and cycle were detected by Flow cytometry, Western blot detected the relative protein level. **Results:** SFN inhibited the proliferation of HELA cells in a concentration-time dependent manner. Furthermore, SFN treatment could induce the expression of RASD1 at the mRNA and protein levels. Flow cytometry results suggested that the apoptosis ratio of cells with SFN or over-expression RASD1 cells was significantly higher than their control group. Western blot results suggested that the expression levels of cleaved-caspase3 and cleaved-parp were up-regulated than control group ($P<0.05$). ModFit LT analysis demonstrated that in the SFN plus group or RASD1 over-expression group the percentage of cells in S phase less than control group, and more than in G2/M phase clearly. Western blot shows cells with SFN or over expressing RASD1 remarkable increasing the level of p21 protein and decreasing the level of cdc2 protein ($P<0.05$). **Conclusions:** RASD1 as a target of SFN inducing HELA cells apoptosis and cell cycle arrest.

Key words: Sulforaphane(SFN); RASD1; Apoptosis; Cell cycle arrest

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)20-3801-06

前言

萝卜硫素(SFN),主要从西兰花中提取的一种硫氰酸盐^[1]。
萝卜硫苷作为 SFN 的前体,抑制 I 相 P450 细胞色素酶,激活

* 基金项目:国家重点研发计划 " 宫颈癌筛查与干预新技术及方案的研究 " 项目(2016YFC1302900)

作者简介:王士玉(1990-),硕士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:13262626871,E-mail: wangshiyu1108@sina.com

[△] 通讯作者:邬素芳,博士生导师,主任医师,主要研究方向:妇科肿瘤,E-mail: fangsw@163.com

(收稿日期:2019-03-28 接受日期:2019-04-23)

细胞内某些Ⅱ相金属还原酶,调节致癌物的代谢。最初张等研究发现 SFN 除了在体外起抑癌作用,在大鼠体内也能够抑制肿瘤形成^[2,3]。异硫氰酸酯可以在 DNA 水平起作用或影响信号转导通路,以剂量依赖的方式诱导细胞周期停滞,然后启动细胞凋亡程序导致细胞死亡^[4-8]。至今 SFN 影响致癌物的代谢起到的抑癌作用机制仍然不确定。RAS 信号通路在细胞增殖调控中起着关键作用^[9]。RASD1 是 RAS 超家族中编码小 GTP 酶的 30 kDa 的 G 蛋白成员,Kemppainen 等最初在地塞米松诱导的 at-20 小鼠细胞中发现 RASD1 基因最早发生特异性改变,所以也叫 Dexras1^[10]。已有研究发现 RASD1 抑制小鼠肺癌及腺癌细胞的生长,且抑制胶质瘤细胞迁移和侵袭^[11,12]。Sanjeev 等发现 RASD1 在前列腺癌细胞中通过抑制 G1/S 期进展来抑制细胞增殖^[13]。但是 Both 等研究发现 RASD1 在骨肉瘤细胞中作为候选癌基因过表达后促进细胞增殖^[14]。Kim 等发现 RASD1 参与脂肪的生成^[15]。在宫颈癌中的 RASD1 作用机制的研究未见报道。本实验以宫颈癌 HELA 细胞为体外研究对象,探讨 SFN 靶向 RASD1 对宫颈癌细胞凋亡及周期的影响的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

宫颈癌细胞株购置上海科学生物研究所(从美国 ATCC 细胞库引进)。SFN(赣州华汉生物有限公司,≥ 95%);DMEM/F12 培养基(GIBCO);胎牛血清(GIBCO 公司);胰蛋白酶(GIBCO 公司);CCK8 试剂盒(日本同仁);RIPA 裂解液(上海碧云天生物有限公司);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物有限公司);anti-cleaved-caspase3、anti-cleaved-parp(美国 ABCAM 公司),anti-RASD1(北京博奥森有限公司),anti-p21、anti-cdc2(美国 CST 公司),GAPDH、二抗(武汉三鹰生物有限公司);Annexin V-FITC / PI 试剂盒(美国 BD 公司);RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。

1.2 仪器

细胞二氧化碳细胞培养箱(MCO-17A1C,日本 Nikon 公司);蛋白电泳槽、电泳仪(DYCP-3Ldn,DYY-6C,美国 Bio-Rad 公司),转膜仪(Mini Trans-Blot Cell 美国 Bio-Rad 公司);多功能酶标检测仪(Multiskam FC,美国 Thermo 公司);流式细胞仪(BD Accuri C6,美国 BD 公司);Real-time PCR 仪器(美国 Allied Biosystems 公司);凝胶成像系统(Gel Doc XR 美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 HELA 细胞传代培养 HELA 细胞采用 DMEM/F12 完全培养基培养,含 10%FBS、1%双抗(100 U/mL 青霉素 / 链霉素),置于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养,75%-85%时,用 0.25%胰酶消化,待细胞变圆加入新培养基终止消化,并以 1:3 比例进行传代培养。

1.3.2 CCK8 检测 SFN 对 HELA 细胞增殖的影响 取对数生长期的 HELA 细胞经胰蛋白酶消化、重悬后,以 3×10^3 个 / 孔细胞数接种于 96 孔板中,待细胞贴壁密度为 50%-60%时后,弃去旧培养基,分别加入不同浓度的 SFN 培养液(0、10、20、30、50 μmol/L),继续置于培养箱中培养 48 h 后弃去旧培养基,加入 90 μL DMEM 培养基,再加入 10 μL CCK8 试剂,轻轻震荡

混匀后置于培养箱中继续培养 30 min,然后放置酶标仪中于 450 nm 处测定吸光度(A)值,设 4 个复孔。计算细胞相对存活率 = (实验组 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照组 A 值 - 空白孔 A 值) × 100%。

1.3.3 RASD1 在 HELA 细胞中的过表达 RASD1 重组质粒的设计上海基凯基因有限公司完成,LIPO3000 转染剂,最后采用 RT-PCR 和 Western blot 方法对稳定转染的 HELA 细胞中 RASD1 mRNA 和蛋白表达水平进行检测。

1.3.4 RT-PCR 检测 HELA 细胞中 RASD1 表达水平 将处理后的 HELA 细胞用胰酶消化溶于 1 mL Trizol 中。氯仿、异丙醇、无水乙醇三步法提取细胞 RNA,DEPC 水溶解。分光光度计对提取的 RNA 进行浓度测定及定量,将所得 RNA 经反转录试剂盒逆转录为 cDNA。设计合成所需的引物,以反转录 cDNA 为模板,使用 Real-time 试剂盒,检测 RASD1 的 mRNA 水平表达。

1.3.5 Western-blot 检测 将所得变性的蛋白上样经 10% PAGE 胶跑电泳后,PVDF 膜转 1.5 h,脱脂奶粉抗原封闭 60 min,分别与兔源性 cleaved-caspase3、RASD1、p21、GAPDH、鼠源性 cleaved-parp、cdc2 于 4℃孵育 10 h,与兔 / 鼠二抗(1:5000 稀释)室温孵育 1 h,发光显影。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡 收取经过 SFN0、30 μmol/L 处理 48h 的细胞以及转染 RASD1、空白质粒 48 h 的 HELA 细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 500 μL binding buffer 和 5 μL Annexin V-FITC,室温避光孵育 15 min 再加入 PI 染液 5 μL 孵育 5 min,上机检测,计算细胞凋亡率,实验重复 3 次。

1.3.7 流式细胞术检测细胞周期 收取经过 SFN0、30 μmol/L 处理 48h 的细胞以及转染 RASD1、空白质粒 48 h 的 HELA 细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 75%乙醇于 -20℃过夜,700 rpm 离心 3 min,PBS 洗 2 次,加 500 μL PI 染液避光孵育 15 min,上机检测,ModFit LT 软件计算各周期细胞比率,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用统计学软件 SPSS20.0 对统计数据进行分析,两组间比较采用 t 检验,各组间采用 Bartlett's 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 SFN 对于 HELA 细胞增殖的影响以及对 RASD1 表达的影响

CCK8 实验结果由图 1 所示,SFN 处理 HELA 细胞 48 h 后,SFN 浓度为 10 μmol/L 时对 HELA 细胞的增殖有明显的抑制作用,且随 SFN 浓度增高 HELA 细胞的相对存活率降低越明显,与空白对照组比较以及各组件比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1A)。SFN 处理的 HELA 细胞中 RASD1 的 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)(图 1B),且随着 SFN 的浓度增高,升高更明显。SFN 细胞组中 RASD1 蛋白表达水平显著高于空白对照组($P < 0.05$)(图 1C),说明 SFN 诱导 RASD1 的表达。

2.2 过表达 RASD1 对于 HELA 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡结果,见图 2 示细胞加 30 μmol/L 的 SFN,细胞凋亡率增高 ($3.733 \pm 0.3844\%$, vs $12.637 \pm 0.5885\%$, $P < 0.05$),主要发生在早期凋亡阶段(图 2A)。RASD1 过表达后 HELA 细胞细胞凋亡率也增高 ($9.033 \pm 0.809\%$, vs $2.400 \pm 0.152\%$, $P < 0.05$),且主要发生在早期凋亡阶段(图

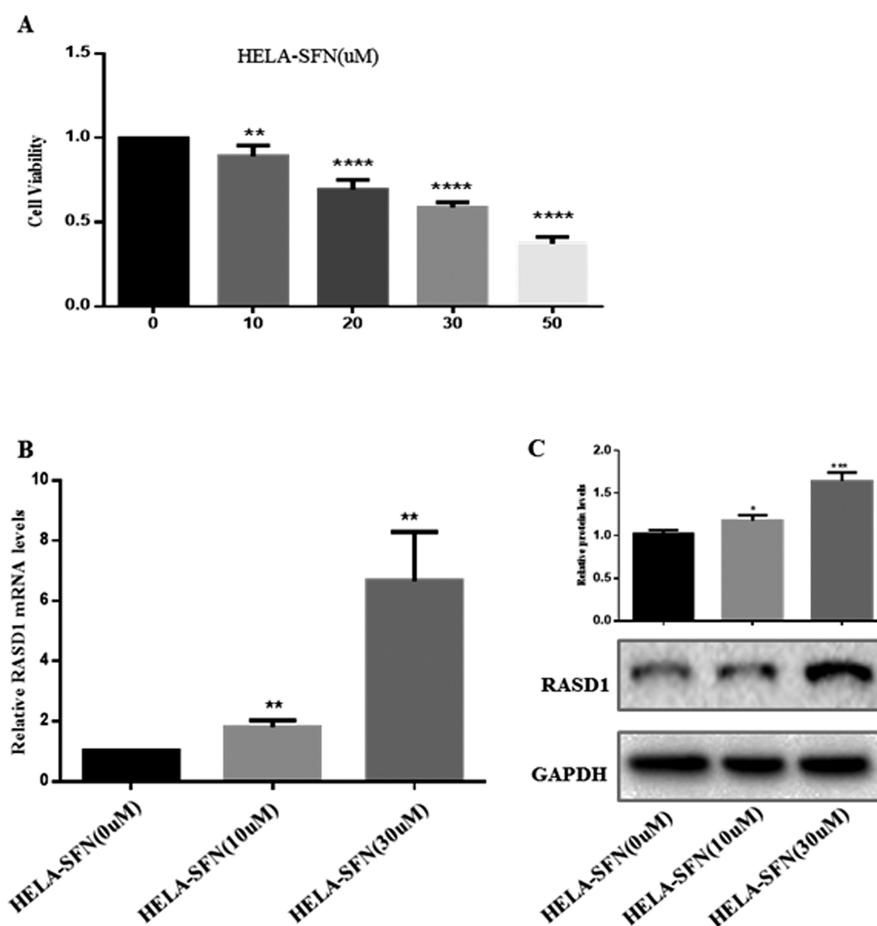


图1 SFN对宫颈癌 HELA 细胞的增殖的影响(A),以及对 RASD1 的 mRNA 水平和蛋白水平的影响(B,C)

Fig.1 Effects of sulforaphane on the proliferation of HELA cells, and the mRNA and protein expression of RASD1(B, C)

SFN: Sulforaphane, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$ compared with 0 μM group; $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

2B)。加 SFN 后或 RASD1 过表达细胞中 cleaved-caspase3 以及 cleaved-parp 蛋白表达相对于各自对照组都显著升高 ($P < 0.05$) (图 2C, D), 说明 SFN 以及 RASD1 是通过激活 cleaved-caspase3 以及 cleaved-parp 的表达诱导 HELA 细胞凋亡。

2.3 过表达 RASD1 对于 HELA 细胞周期的影响

流式细胞仪检测细胞周期, ModFit LT 软件分析各时相细胞的含量, G0/G1/S/G2/M 期细胞的百分比, 结果见图 3 显示加 SFN 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 HELA 细胞组, 相比于其对照组, S 期细胞明显减少 ($16.32 \pm 2.391\%$, vs $3.050 \pm 0.4822\%$, $P < 0.05$), G2/M 显著增多 ($21.05 \pm 1.495\%$, vs $51.32 \pm 0.7990\%$, $P < 0.05$), G0/G1 期细胞减少 ($62.30 \pm 0.7033\%$, vs $45.36 \pm 0.1367\%$, $P < 0.05$) (图 3A)。RASD1 过表达后 HELA 细胞中 S 期细胞较对照转染组明显减少 ($22.68 \pm 0.078\%$, vs $17.42 \pm 0.1946\%$, $P < 0.05$), G2/M 增高 ($20.24 \pm 0.693\%$, vs $25.73 \pm 1.391\%$, $P < 0.05$), G0/G1 期无明显变化 ($57.06 \pm 0.656\%$, vs $57.77 \pm 0.702\%$) (图 3B)。SFN 以及 RASD1 过表达细胞中 cdc2 蛋白表达明显降低, p21 表达增高, 相比于各自对照组 ($P < 0.05$) (图 3C, D), 说明 SFN 以及 RASD1 可能通过上调 p21 以及下调 cdc2 蛋白的表达诱导 HELA 细胞 G2/M 期阻滞。

3 讨论

SFN 是目前在蔬菜中发现的抗癌活性最强的天然物质, 已

有大量实验研究表明 SFN 对肿瘤细胞各个阶段作用不同, 通过转录因子 NRF2 的介导在癌变起始期阶段具有抗炎、抗氧化应激作用, 防止细胞癌变的功能^[16,17]。在肝癌 HepG2 细胞中 SFN 主要是通过线粒体介导的途径, 细胞接收到凋亡信号后, Bcl-2 家族蛋白增加线粒体膜的通透性, Ca^{2+} 以及细胞色素 C 被释放到胞质中, 进而激活 caspase-3/7 和 caspase-9, 进一步剪切其底物多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 parp 成 cleaved parp 活体, DNA 修复被终止, 诱导凋亡^[18]。在非小细胞肺癌 H1299 中通过调节细胞周期相关蛋白 cyclin B1, cyclin D1 和 cyclin K 表达, 引起细胞周期的阻滞^[11,12]。同时在肺癌 A549 细胞中 SFN 不仅抑制细胞增殖, 在抗细胞迁移方面也有重要作用^[19]。据报道 SFN 抑制肿瘤血管形成, 是治疗转移性黑色素瘤的天然产品^[20]。SFN 通过抑制水通道蛋白 -8 和 NOX 2 的表达, 从而降低了白血病细胞 B1647 细胞的存活率^[21]。其也能通过抑制肿瘤细胞自噬, 上调 HSP70 的表达诱导细胞凋亡^[22]。SFN 的代谢物通过 caspase-3 的激活引起的微管蛋白降解, 促进肿瘤细胞凋亡, 降低紫杉醇耐药性^[23]。除了对癌细胞增殖凋亡起作用, Axelsson 等研究发现 SFN 还能通过核转录因子 NRF 2 抑制糖异生关键酶的表达, 抑制肝细胞中葡萄糖的生成, 从而可降低 2 型糖尿病患者的空腹血糖和糖化血红蛋白水平^[24]。细胞周期分为 G0/G1、S、G2/M, S 期为 DNA 复制期及损伤修复期; G2 期为细胞快速增长期以及有丝分裂准备期; M 期则是细胞生长停止期

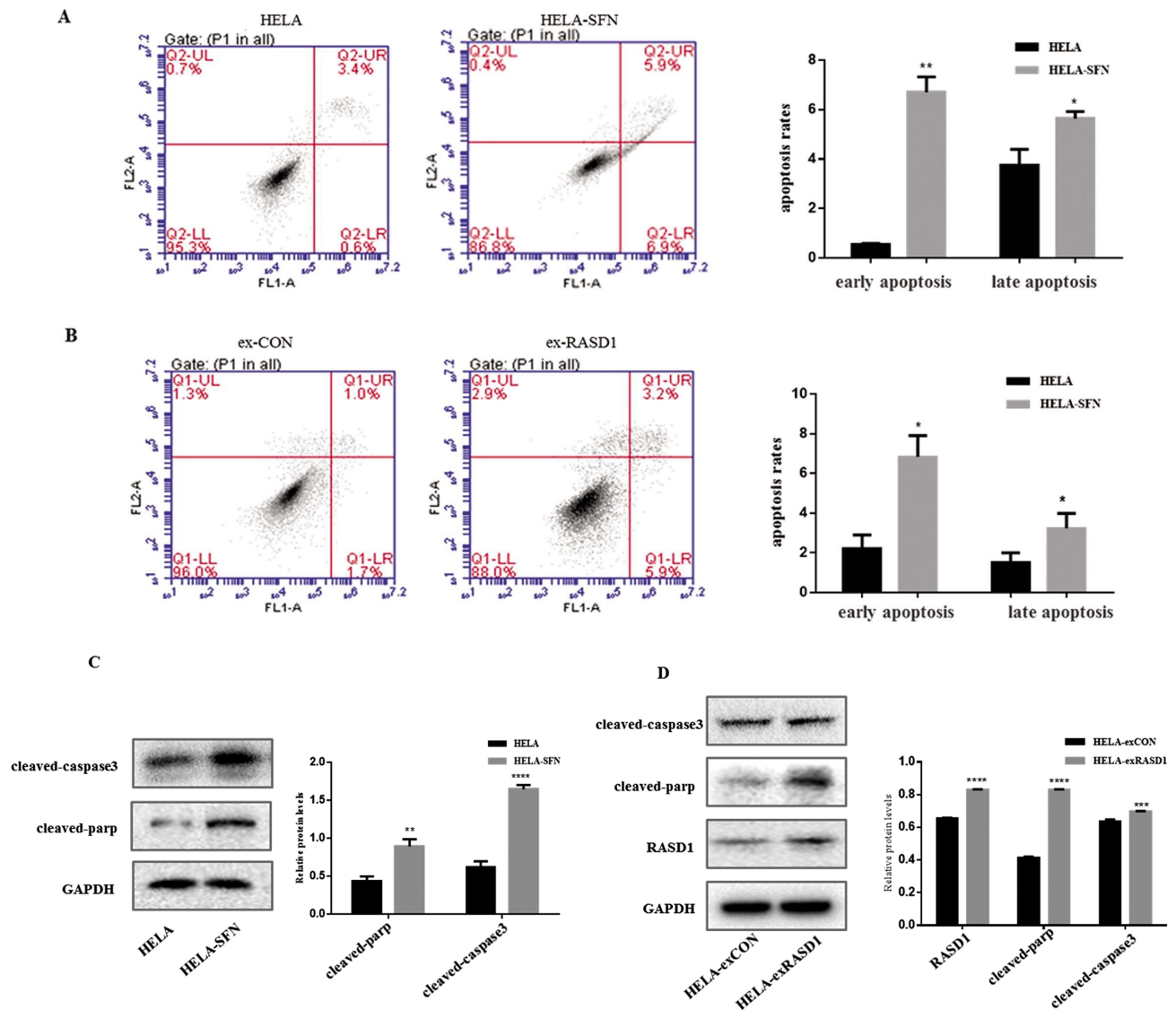


图2 SFN、过表达 RASD1 对 HELA 细胞的凋亡率的影响 (A,B)以及对凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3 和 cleaved-parp 表达的影响 (C,D) 及其统计学分析。

Fig.2 Effects of SFN and over-expressed RASD1 on the HELA cell apoptotic rates (A, B) and the protein expression of cleaved-caspase3 and cleaved-parp investigated by Western blot assay (C, D) and statistical analysis.

HELA-exCON: control group; HELA-exRASD1: transfected with RASD1 group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

以及进行有序的有丝分裂期。细胞 DNA 损伤或复制不完全时, 细胞内 p21 蛋白表达被促进且积聚增多, p21 作为一种重要的细胞周期调控蛋白, 它参与细胞的分裂、生长、分化、衰老及死亡过程, 同时又与肿瘤的发生关系密切, 它通过作用其他相关周期蛋白 cyclin 以及 CDK, 使得细胞停滞在 G1 或是 G2 期, 以维持细胞基因组稳定性^[25]; 同时 DNA 损伤主要发生在 G1 或 G2 期, DNA 断裂后形成片段, 细胞解体形成凋亡小体, 最终导致细胞走向凋亡^[26]。可见细胞周期阻滞和凋亡的发生是相互联系的。在宫颈癌中已有相关研究证明 SFN 下调 CyclinB1 的表达诱导其细胞 G2/M 阻滞, 进而抑制细胞增殖^[27]。

RASD1 作为 RAS 家族的小 G 蛋白, 有研究表明其通过 ERK 1/2 信号通路抑制小鼠支持细胞的增殖^[28]。Govindan 等研究发现 RASD1 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞以及肺腺癌 A549 细胞克隆集落的形成, 腺病毒感染 A549 细胞后其生长受到抑制, 细胞凋亡率增高, 并且裸鼠皮下成瘤也被抑制^[11,12]。Dalgin

等研究表明 RASD1 的丢失导致肾癌细胞对抑癌信号的反应不敏感, 而对生长信号的敏感性增高^[29]。Gao 等在胶质瘤细胞中研究发现过表达 RASD1 后, 细胞的增殖以及细胞周期没有受到影响, 细胞骨架重排抑制细胞迁徙转移, 同时介导 AKT/mTOR 信号通路的活性^[11,12]。但是现有研究证据表明在不同细胞中 RASD1 的生物学功能不一致, 在骨肉瘤中发现其作为癌基因, 具有促癌作用^[14]。近年来, RASD1 作为一种新型的雌激素信号传感器, 在包括女性生殖器官在内的各种系统中得到了广泛的关注, Tian 等研究发现花萼素在乳腺癌雌激素受体阳性 MCF-7、T47D 细胞中, 上调 RASD1 的表达, 抑制细胞增殖, 在阴性细胞中未发现相同作用^[30,31], 另外研究发现 RASD1 通过介导 MAPK 依赖通路, 控制昼夜节律对光输入的反应及反应敏感性, 在周期昼夜调节方面影响深远^[32], 但是 RASD1 在妇科肿瘤中的研究未见报道。

本实验结果发现, SFN 作用宫颈癌 HELA 细胞 48 h 后, 细

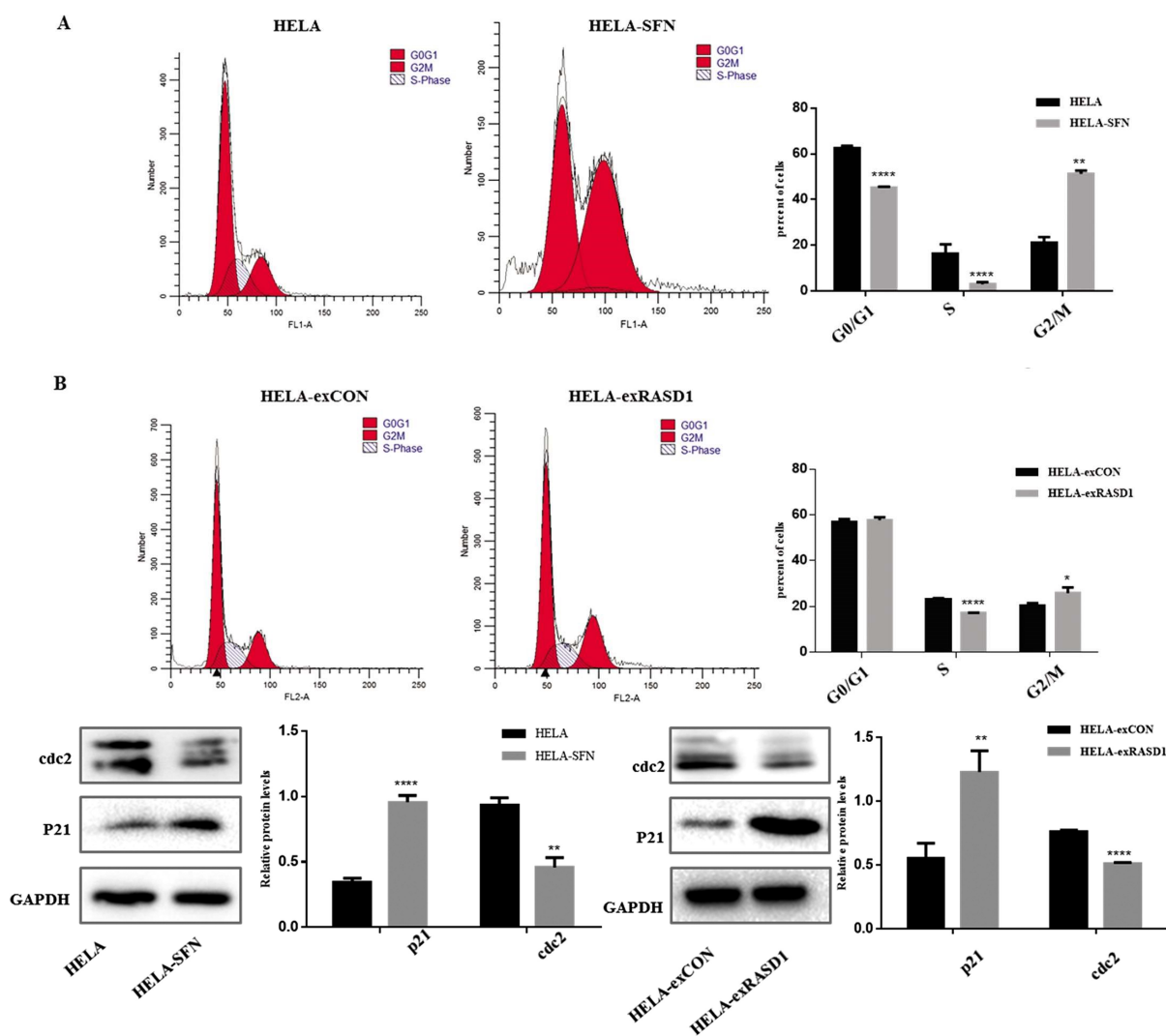


图3 SFN 以及过表达 RASD1 对 HELA 细胞周期的影响(A,B),周期相关蛋白 cdc2 以及 p21 的表达情况(C,D),统计学分析。

Fig.3 Effects of SFN and over-expression RASD1 on the HELA cell cycle progression(A, B), and the protein expression of cdc2 and p21 investigated by Western blot assay(C, D)and statistical analysis.

HELA-exCON: control group; HELA-exRASD1: over-expression RASD1 group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

胞存活率下降,具有浓度依赖性,同时我们发现且 HELA 细胞中的 RASD1 的 mRNA 以及蛋白水平的表达增高。另外 SFN 或是过表达 RASD1 后细胞凋亡率均增加,且主要发生在早期凋亡阶段,伴随着细胞中促凋亡蛋白 cleaved-caspase3 蛋白水平上升,作为 caspase3 的剪切体蛋白增多,说明内源性凋亡途径被激活,以及 parp 的剪切体 cleaved-parp 蛋白水平上升表明 DNA 修复被终止,进一步启动下游凋亡进程,导致 HELA 细胞的最终凋亡。SFN 促使细胞凋亡增加幅度大于过表达 RASD1 细胞的凋亡增加幅度,有可能是因为 SFN 还通过其他靶点或者途径来促进凋亡。Hsu 等在结直肠癌细胞中研究发现 cdc2 蛋白介导细胞周期的 G1 期和 G2/M 期的进程,cdc2 蛋白表达水平的下调以及降解会引起细胞周期阻滞^[3]。本实验细胞周期结果显示,细胞经过 SFN 处理或是过表达 RASD1 后,细胞周期调控蛋白 p21 蛋白水平上升以及 cdc2 蛋白表达水平降低,S 期细胞所占比率减少,G2/M 期增多,且 SFN 使得细胞 G1 期减少以及 G2/M 期阻滞更加明显,而 G1 期细胞所占比率变化不明显,也说明 RASD1 可能不是 SFN 的唯一作用靶点,还存

在其它的靶点。对于 RASD1 诱导细胞 G2/M 期阻滞,这与 Gao 等在胶质瘤细胞中研究结果证据不一致,可能是和不同肿瘤以及不同细胞系特性有关,有待于进一步探索。本实验证实了 SFN 靶向 RASD1 促进 HELA 细胞凋亡的同时也诱导其细胞周期 G2/M 期阻滞,从而抑制细胞增殖,也只是在宫颈癌 HELA 细胞中进行实验研究,RASD1 是否能在其他宫颈癌细胞系中以及体内也具有相同的作用及机制,还需要进一步研究证实。现已证明 RASD1 通过凋亡内源性途径来介导的,是否也参与其他两条途径来调节细胞凋亡以及内源性凋亡途径验证有待于进一步详细实验研究,并且 RASD1 可能是 SFN 作用下游的靶点之一,有待于进一步探索 SFN 作用的其他靶点。

总之,本研究首次证明萝卜硫素可通过诱导 RASD1 的表达促进宫颈癌 HELA 细胞的早期凋亡及诱导细胞周期 G2/M 期阻滞,为将来探讨萝卜硫素以及 RASD1 在宫颈癌细胞中的作用机制的研究提供了一定的实验依据。

参考文献(References)

[1] Deweerdt S. Food: The omnivore's labyrinth [J]. Nature, 2011, 471

- (7339): S22-24
- [2] Zhang Y, Talalay P, Cho C G, et al. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(6): 2399-403
 - [3] Zhang Y, Kensler T W, CHO C G, et al. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(8): 3147-3150
 - [4] Zuryn A, Krajewski A, Klimaszewska-Wisniewska A, et al. Expression of cyclin B1, D1 and K in nonsmall cell lung cancer H1299 cells following treatment with sulforaphane[J]. *Oncology reports*, 2019, 41 (2): 1313-1323
 - [5] Castro N P, Rangel M C. Sulforaphane Suppresses the Growth of Triple-negative Breast Cancer Stem-like Cells In vitro and In vivo[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2019 [Epub ahead of print]
 - [6] Gamet-Payrastré L, Li P, Lumeau S, et al. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (5): 1426-1433
 - [7] Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Deregowska A, et al. Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells [J]. *Theranostics*, 2017, 7 (14): 3461-3477
 - [8] Dandawate P R, Subramaniam D, Jensen R A, et al. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy [J]. *Seminars in cancer biology*, 2016, 40-41: 192-208
 - [9] Moll H P, Pranz K. Afatinib restrains K-RAS-driven lung tumorigenesis[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(446)
 - [10] Kempainen R J, Behrend E N. Dexamethasone rapidly induces a novel ras superfamily member-related gene in AtT-20 cells [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(6): 3129-3131
 - [11] Vaidyanathan G, Cismowski M J, Wang G, et al. The Ras-related protein AGS1/RASD1 suppresses cell growth[J]. *Oncogene*, 2004, 23 (34): 5858-5863
 - [12] Gao S, Jin L, Liu G, et al. Overexpression of RASD1 inhibits glioma cell migration/invasion and inactivates the AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 3202
 - [13] Baniwal S K, Khalid O, Gabet Y, et al. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis [J]. *Molecular cancer*, 2010, 9: 258
 - [14] Both J, Wu T, Ten Asroek A L, et al. Oncogenic Properties of Candidate Oncogenes in Chromosome Region 17p11.2p12 in Human Osteosarcoma [J]. *Cytogenetic and genome research*, 2016, 150(1): 52-59
 - [15] Kim H J, Cha J Y, Seok J W, et al. Dexas1 links glucocorticoids to insulin-like growth factor-1 signaling in adipogenesis [J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 28648
 - [16] Mitsioglanni M, Amery T, Franco R, et al. From chemo-prevention to epigenetic regulation: The role of isothiocyanates in skin cancer prevention[J]. *Pharmacology & therapeutics*, 2018, 190: 187-201
 - [17] Lampe J W. Sulforaphane: from chemoprevention to pancreatic cancer treatment?[J]. *Gut*, 2009, 58(7): 900-902
 - [18] Tait S W, Green D R. Mitochondrial regulation of cell death[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013, 5(9)
 - [19] Rakariyatham K, Yang X, Gao Z, et al. Synergistic chemopreventive effect of allyl isothiocyanate and sulforaphane on non-small cell lung carcinoma cells[J]. *Food Funct*, 2019, 10(2): 893-902
 - [20] Alqathama A, Pritto J M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis [J]. *Natural product reports*, 2015, 32 (8): 1170-1182
 - [21] Prata C, Facchini C, Leoncini E, et al. Sulforaphane Modulates AQP8-Linked Redox Signalling in Leukemia Cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 4125297
 - [22] Hu Y, Zhou Y, Yang G, et al. Sulforaphane-N-Acetyl-Cysteine inhibited autophagy leading to apoptosis via Hsp70-mediated microtubule disruption[J]. *Cancer letters*, 2018, 431: 85-95
 - [23] Wang Y, Zhou Y, Zheng Z, et al. Sulforaphane metabolites reduce resistance to paclitaxel via microtubule disruption [J]. *Cell death & disease*, 2018, 9(11): 1134
 - [24] Axelsson A S, Tubbs E. Sulforaphane reduces hepatic glucose production and improves glucose control in patients with type 2 diabetes[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(394)
 - [25] Barr A R, Cooper S, Heldt F S. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression[J]. *Nat Commun*, 2017 8: 14728
 - [26] Zheng P, Chen Q, Tian X, et al. DNA damage triggers tubular endoplasmic reticulum extension to promote apoptosis by facilitating ER-mitochondria signaling[J]. *Cell Res*, 2018, 28(8): 833-854
 - [27] Cheng Y M, Tsai C C, Hsu Y C. Sulforaphane, a Dietary Isothiocyanate, Induces G (2)/M Arrest in Cervical Cancer Cells through CyclinB1 Downregulation and GADD45beta/CDC2 Association [J]. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17 (9)
 - [28] Yin X, Ma T, Han R, et al. MiR-301b-3p/3584-5p enhances low-dose mono-n-butyl phthalate (MBP)-induced proliferation by targeting Rasd1 in Sertoli cells[J]. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 2018, 47: 79-88
 - [29] Dalgin G S, Holloway D T, Liou L S, et al. Identification and characterization of renal cell carcinoma gene markers [J]. *Cancer informatics*, 2007, 3: 65-92
 - [30] Tian J, Wang Y, Zhang X, et al. Calycosin inhibits the in vitro and in vivo growth of breast cancer cells through WDR7-7-GPR30 Signaling [J]. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 2017, 36 (1): 153
 - [31] Hu Y, Shmygelska A, Tran D, et al. GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person[J]. *Nature communications*, 2016, 7: 10448
 - [32] Cheng H Y, Obrietan K, Cain S W, et al. Dexas1 potentiates photic and suppresses nonphotic responses of the circadian clock[J]. *Neuron*, 2004, 43(5): 715-728
 - [33] Hsu Y C, Huang T Y, Chen M J. Therapeutic ROS targeting of GADD45gamma in the induction of G2/M arrest in primary human colorectal cancer cell lines by cucurbitacin E[J]. *Cell death & disease*, 2014, 5: e1198