

二氢青蒿素联合放疗对肺癌 GLC-82 细胞凋亡的影响及机制研究

左占杰¹ 王松涛² 江莉祥¹ 辛永祥¹ 李 伟¹ 徐子豪¹ 王蛟龙¹ 王建东¹

摘要 **目的** 研究二氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)联合放疗对人肺腺癌 GLC-82 细胞周期和凋亡的影响及其机制。**方法** MTT 法检测不同浓度 DHA 分别在 24、48、72 h 对 GLC-82 细胞的抑制作用;克隆形成实验分析,多靶单击拟合模型方程计算放射增敏比,评价增敏效果;流式细胞术检测 DHA 联合放疗对 GLC-82 细胞周期和凋亡的影响;Western blot 检测 P53、P21、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。**结果** 不同浓度 DHA (4、8、16、32、64、128 $\mu\text{g/mL}$) 作用 24、48 和 72 h 的 IC_{50} 值分别为:38.25、20.58、10.36 $\mu\text{g/mL}$,对 GLC-82 细胞的毒性有明显剂量和时间依赖性,抑制率较空白对照组明显增加($P < 0.01$, $P < 0.05$);DHA 对 GLC-82 细胞具有放射增敏作用,其增敏比为 1.4。DHA 联合放疗可使 GLC-82 细胞周期的构成发生明显的变化并诱导细胞凋亡,凋亡率为 21.5%,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 表明,DHA 联合放疗作用 GLC-82 细胞后 P53 和 P21 的蛋白水平表达增加,同时下调 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** DHA 对肺腺癌 GLC-82 细胞有较强的细胞毒性和放射增敏作用,其作用机制可能是使 GLC-82 细胞生长停滞在 G_0/G_1 期并诱导细胞凋亡,使 S 期细胞比例降低;使 P53 功能恢复,通过抑制 Bcl-2 蛋白的表达促使凋亡,从而起到杀伤肿瘤的作用。

关键词 肺癌;GLC-82 细胞;二氢青蒿素;放射增敏;细胞凋亡;P53 蛋白;Bcl-2 蛋白

Effect of Dihydroartemisinin Combined Irradiation on the Apoptosis of Human Lung Cancer GLC-82 Cells and Its Mechanism Study ZUO Zhan-jie¹, WANG Song-tao², JIANG Li-xiang¹, XIN Yong-xiang¹, LI Wei¹, XU Zi-hao¹, WANG Jiao-long¹, and WANG Jian-dong¹ 1 Thoracic Tumor Treatment Center of Beijing Armed Police Corps Hospital, Beijing (100027), China; 2 Medical Department of Beijing Armed Police Corps Hospital, Beijing (100027), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Dihydroartemisinin (DHA) combined irradiation on the apoptosis of human lung cancer GLC-82 cells and to study its mechanism. **Methods** The growth inhibition rate of GLC-82 cells acted by different concentrations DHA was detected using MTT assay at 24, 48, and 72 h, respectively. Clone forming test was used. With multi-target single-hit model, the radiosensitization effect was assessed by calculating sensitizing enhancement ratio (SER). The effect of DHA combined irradiation on the apoptosis of GLC-82 cell cycle distribution and apoptosis were measured by flow cytometry. The protein expression of p53, p21, Bcl-2, and Bax were detected by Western blot. **Results** Different concentrations DHA (4, 8, 16, 32, 64, and 128 $\mu\text{g/mL}$) had cytotoxicity on GLC-82 cells. The IC_{50} for 24, 48, and 72 h was 38.25, 20.58, and 10.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively, in obvious dose- and time-dependent manner. The growth inhibition rate was more significantly increased than that of the blank control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). DHA had sensitization enhancement effect on GLC-82 cells, with SER of 1.4. DHA combined irradiation could obviously change the structure of GLC-82 cells cell cycle and induce apoptosis (with the apoptosis rate of 21.5%), which was significantly different from that of the blank control group ($P < 0.05$). Western blot showed the expression of p53 and p21 protein could be increased by DHA combined irradiation, and the expression of Bcl-2 protein down-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions** DHA had stronger cytotoxicity and radiosensitization on GLC-82 cells. Its mechanisms might lie in making the arrest

作者单位:1. 武警北京总队医院胸部肿瘤治疗中心(北京 100027);2. 武警北京总队医院医疗科(北京 100027)

通讯作者:王建东, Tel: 010-64161188, E-mail: wangjd6688@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.10.1220

of GLC-82 cells' growth at G_0/G_1 phase, decreasing the ratio of cells at S phase, restoring the function of p53, decreasing the expression of Bcl-2 protein, and inducing apoptosis in GLC-82 cells.

KEYWORDS lung cancer; GLC-82 cell; Dihydroartemisinin; radiosensitization; apoptosis; P53; Bcl-2 protein

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占支气管肺癌的 80%。化疗能够延长患者的生存期,是主要的治疗方案之一。二氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 是青蒿素的重要衍生物之一,也是青蒿素药物在体内的主要代谢物,内含有独特的过氧化物桥,可以与亚铁离子结合反应形成氧自由基,诱导细胞发生分子损伤和细胞死亡,具有水溶性强、抗疟活性好的特点^[1]。DHA 除了具有抗疟作用外,还具有抗炎、调节免疫、抑制瘢痕增生及抗肿瘤作用,尤其体外抗肿瘤活性强,而对正常组织细胞的毒性很低^[2-4]。通过化学药物有目的地改变细胞周期,进而增强放疗敏感性,对肿瘤的治疗可能有重要意义。本实验通过研究 DHA 对表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 免疫组化染色阴性的肺癌 GLC-82 细胞毒性、放射增敏作用及对细胞周期和凋亡的影响,探讨其可能的作用机制,为 DHA 在肺癌的临床应用提供实验依据。

材料与方法

1 细胞株 人肺腺癌 GLC-82 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

2 试剂及仪器 DHA (北京万辉双鹤药业有限责任公司,批号:20120603); RPMI-1640 培养液 (北京百诺克医药生物技术有限责任公司,批号:1262036); MTT (四氮唑嘧啶兰,上海生物工程有限公司,批号:M2128); 胎牛血清 (美国 Hyclone,批号:121125); PBS (美国 Hyclone,批号:SH30256.01B); Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒 (美国 BD 公司,批号:20121015); P53、P21、Bcl-2 和 Bax 蛋白 (美国 BD 公司,批号:20121125); 二甲基亚砜 (DMSO,中国医药公司,批号:121016); CO_2 培养箱 (美国 Thermo Electron Corporation); 流式细胞仪 (美国 Beckman Altra II); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); BIO-RAD MODE 1680 型酶标仪 (基因公司); AE2405 电子分析天平 (上海美特勒-托利多仪器有限公司); 细胞培养板 (日本 IWAKI); 加拿大 Gamma II 40 照射仪 (以 ^{137}Cs 为照射源,照射剂量率 0.78 Gy/min)。

3 细胞培养 GLC-82 细胞接种于 RPMI-1640

培养液 (含 10% 新生牛血清及青霉素、链霉素各 100 IU/mL), 置于 37 °C, 5% CO_2 饱和湿度的孵箱中培养,细胞为卵圆形,贴壁生长,孵育 2 ~ 3 天后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,选对数生长期的细胞进行实验。

4 干预方法 DHA 用少量 DMSO 将纯品溶解配制成 1 mg/mL 的母液,超声 30 min 助溶,过滤除菌,4 °C 保存,实验前用 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度 (DMSO 终浓度 < 0.1%)。

5 观察指标及方法

5.1 DHA 对 GLC-82 细胞增殖抑制作用检测

采用 MTT 法检测。取对数生长期的 GLC-82 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液后细胞计数,将细胞浓度调整为 2×10^4 /mL,空白对照组给予等体积的 PBS; 给药组分别加入不同浓度 (4、8、16、32、64、128 μ g/mL) 的 DHA,每个浓度设 6 个复孔。分别培养 24、48、72 h 后,加入 5 mg/mL 的 MTT 液 (20 μ L/孔) 4 h 后,吸去上清加入 DMSO 150 μ L/孔,微型震荡器震荡 10 min,使完全混匀溶解结晶,在酶标仪上于波长 492 nm 处测其吸光度,每个剂量设平行重复 6 孔,实验重复 3 次。按以下公式计算抑制率,拟合后求 IC_{50} 值和 IC_{20} 值。细胞增殖抑制率 (%) = $(1 - \text{给药组 A 平均值} / \text{空白对照组 A 平均值}) \times 100\%$ 。

5.2 放射生物学参数检测 采用克隆形成实验。药物作用后,细胞生长抑制率在 < 20% 时,药物对细胞的毒性作用可相对忽略,故选择 DHA 作用 24 h 时, IC_{20} 进行试验。设单照射 (IR) 组、5-FU 阳性对照组和 DHA (13.68 μ g/mL) + IR 组,照射剂量分别为 0、1、2、4、8 Gy。孵箱中培养贴壁后加药。加药 24 h 后照射,后更换无药培养基,置培养箱中继续培养 8 ~ 10 天,甲醇固定后 Giemsa 染色,计数各组细胞数 ≥ 50 个细胞的克隆数。计算克隆形成率 (plating efficiency, PE) 和细胞存活分数 (surviving fraction, SF)。每个剂量点设 3 个平行样本,取均数。应用多靶单击模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线,计算各组放射敏感性参数:终斜率 (D_0)、准阈剂量 (D_q)、外推值 (N) 和放射增敏比 (sensitization enhancement ratio, SER)。克隆形成率 (PE) = 集落数/接种细胞数 $\times 100\%$; 细胞生存分数 (SF) = 各照

射剂量 PE/未照射 PE $\times 100\%$; 放射增敏比 (SER) = 单纯照射的 SF 值/照射加药的 SF 值。

5.3 GLC-82 细胞周期检测 采用流式细胞术检测细胞周期及早期凋亡。取对数生长的 GLC-82 细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板, 分别设空白对照组、DHA 组、IR 组 (2 Gy)、DHA + IR 组。DHA 给药浓度为 $13.68 \mu\text{g}/\text{mL}$ (取作用 24 h 的 IC_{20} 值), 空白对照组给予等体积的 PBS。培养 24 h 后, 胰酶消化, $1\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min, PBS 洗 2 次, 用 70% 的冷乙醇使细胞悬浮固定, 置 4°C 存 30 min, -20°C 过夜。经 RNase 消化, PI 染色 (4°C 避光染 30 min) 后, 流式细胞仪监测分析, 每组实验重复 3 次。

5.4 GLC-82 细胞凋亡率检测 采用 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡。取对数生长的 GLC-82 细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板中, 分别设空白对照组、DHA 组、IR 组 (2 Gy)、DHA + IR 组 (2 Gy)。DHA 给药浓度为 $13.68 \mu\text{g}/\text{mL}$ (取作用 24 h 的 IC_{20} 值), 空白对照组给予等体积的 PBS。培养 24 h 后, 胰酶消化, $1\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min, 用 PBS 洗 2 次, 加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V, 4°C 避光染色 5 min, 再加入 PI 避光染色 15 min, 上流式细胞仪检测, 分析细胞凋亡比例, 每组实验重复 3 次。

5.5 GLC-82 细胞相关蛋白表达检测 采用 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax、P21、P53 蛋白表达。分别设空白对照组、DHA 组、IR 组 (2 Gy)、DHA + IR 组 (2 Gy)。DHA ($13.68 \mu\text{g}/\text{mL}$) 给药后作用不同时间, 收集对数生长的 GLC-82 细胞, 加入细胞裂解液, 冰上放置 15 min, $12\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 15 min, 取上清, 以 Bradford 法作蛋白定量后置 -80°C 贮存备用。灌制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 常规电泳, 转膜, 封闭。一抗 (1:500), 4°C 孵育过夜, 二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h, ECL 显色。β-actin 检测作为内对照。

6 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析。重复试验 3 次, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度 DHA 对 GLC-82 细胞增殖的抑制作用比较 (图 1、2) 不同浓度的 DHA 分别给药 24、48 和 72 h 后, 对 GLC-82 细胞的生长呈明显抑制作用。药物作用 24、48 和 72 h 的 IC_{50} 值分别为: 38.25 、 20.58 、 $10.36 \mu\text{g}/\text{mL}$; IC_{20} 值分别为: 13.68 、

6.51 、 $3.87 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞增殖的抑制率与药物浓度及作用时间密切相关, 不同药物浓度与空白对照组比较, 细胞抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

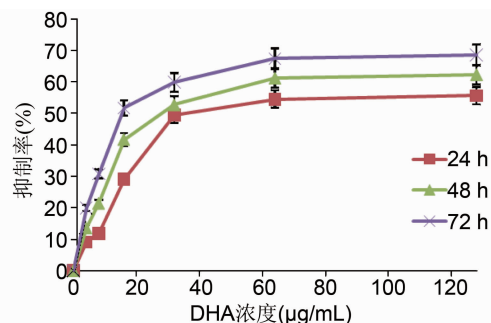
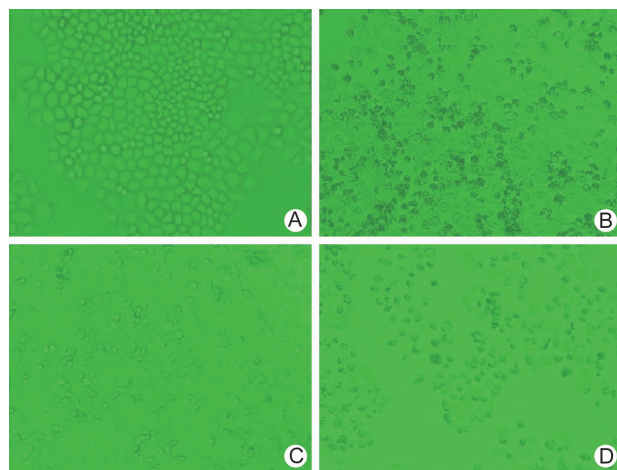


图 1 不同浓度 DHA 对 GLC-82 细胞毒性作用的影响



注: A 为空白对照组; B 为 DHA 作用 24 h; C 为 DHA 作用 48 h; D 为 DHA 作用 72 h

图 2 DHA ($32 \mu\text{g}/\text{mL}$) 作用不同时间肺腺癌 GLC-82 细胞的形态变化 ($\times 200$)

2 各组放射生物学参数比较 (图 3, 表 1) 5-FU 阳性对照组 SER 为 1.75, DHA 组 SER 为 1.40, 与 IR 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

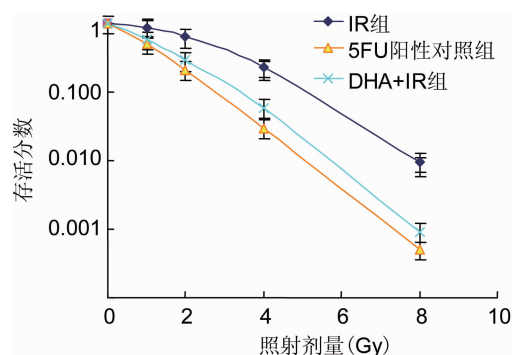


图 3 各组细胞存活曲线

表 1 各组放射生物学参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	D ₀	D _q	N	SF	SER
IR	3	2.64 ± 0.11	0.458 ± 0.031	1.09 ± 0.05	0.492 ± 0.032	—
5-Fu 阳性对照	3	1.89 ± 0.05 *	0.202 ± 0.017 *	0.73 ± 0.03	0.279 ± 0.021 *	1.75
DHA + IR	3	1.96 ± 0.10 *	0.261 ± 0.019 *	0.98 ± 0.04	0.352 ± 0.013	1.40

注:与 IR 组比较, *P < 0.05

3 各组 GLC-82 细胞周期比较(表 2) 与空白对照组比较,DHA + IR 组效果更加显著,使 GLC-82 细胞生长产生 G₀/G₁ 期阻滞,S 期所占比例随给药时间的延长不断减少(P < 0.01)。G₁ 峰前出现了亚二倍体峰(hypodiploid peak),此为细胞发生凋亡的标志。

表 2 各组 GLC-82 细胞周期比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白对照	3	47.5 ± 2.6	33.6 ± 1.2	18.9 ± 1.2
DHA	3	55.9 ± 3.0	17.6 ± 1.0 *	26.5 ± 1.0
IR	3	64.0 ± 2.1 *	18.7 ± 1.0 *	17.3 ± 0.7
DHA + IR	3	71.4 ± 2.7 **	11.2 ± 0.4 **	18.4 ± 0.7

注:与空白对照组比较, *P < 0.05, **P < 0.01;下表同

4 各组 GLC-82 细胞凋亡率比较(表 3) DHA 可以诱导细胞凋亡,联合照射后诱导细胞凋亡的作用逐渐增强。与空白对照组比较,IR 组及 DHA + IR 组凋亡率明显增加,差异有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。

表 3 各组 GLC-82 细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率 (%)
空白对照	3	0.32 ± 0.03
DHA	3	3.24 ± 0.12
IR	3	10.43 ± 0.16 *
DHA + IR	3	21.49 ± 0.24 **

5 各组 Bcl-2、Bax、P21、P53 蛋白表达比较(图 4,表 4) DHA 联合 IR 作用后,Bax 蛋白表达无明显变化,P53 和 P21 蛋白的表达增加,同时 Bcl-2 蛋白表达减少。与空白对照组比较,DHA 组、IR 组、DHA + IR 组 P21、P53 蛋白表达升高,DHA 组及 DHA + IR 组 Bcl-2 蛋白表达降低,差异均有统计学意义(P < 0.01, P < 0.05)。

表 4 各组 Bcl-2、Bax、P21、P53 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2	Bax	P21	P53
空白对照	3	1.000 ± 0.049	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04
DHA	3	0.613 ± 0.028 *	1.02 ± 0.03	1.63 ± 0.06 *	2.23 ± 0.10 **
IR	3	0.803 ± 0.062	1.13 ± 0.08	2.42 ± 0.09 **	4.57 ± 0.09 **
DHA + IR	3	0.224 ± 0.018 **	0.94 ± 0.05	3.78 ± 0.11 **	6.48 ± 0.14 **

讨 论

DHA 是青蒿素药物在体内的主要代谢物,除了具有抗疟作用以外,对人类多种肿瘤细胞在体外有杀伤作用或抑制作用。将青蒿素结构中将羰基改为羟基,临床疗效可大幅度提高。研究表明,DHA 能有效抑制卵巢癌细胞的生长,同时 DHA 可以作为化疗药物增敏剂,明显提高卵巢癌一线化疗药卡铂的疗效^[5-7]。DHA 可以降低细胞膜上的转铁蛋白受体 1(TfR1)水平,通过脂筏介导的内吞作用对其进行调控,减弱细胞对铁的吸收从而杀伤肿瘤细胞^[8,9]。研究表明:组蛋白去乙酰酶抑制剂(HDACI)通过增加体外和体内肿瘤细胞的凋亡显著增强 DHA 的抗肿瘤作用。DHA 诱导细胞凋亡归因于抑制 ERK 磷酸化,联用 ERK 磷酸化抑制剂 PD98059 能增加 DHA 诱导凋亡功效。DHA 与 HDACI 综合治疗能降低线粒体膜电位,释放细胞色素 c 到细胞质中,减少 Mcl-1 和 p-ERK 表达,同时 caspase-3 和 PARP 的活化也增加,这些效应一致诱导肿瘤细胞凋亡^[10]。

细胞凋亡与肿瘤发生、发展与消退有密切关系,某些抗肿瘤药物作用的强弱就与其诱导肿瘤细胞凋亡的活性成正比。细胞周期的阻滞与细胞凋亡、分化密切相关^[11]。多种化疗药物可以引起肿瘤细胞特定靶成分的损伤或功能丧失,从而传递信号引起细胞周期阻滞及进入细胞凋亡^[12,13]。国内外有关放射增敏剂的研究越来越广泛,许多分化诱导剂能抑制肿瘤细胞生长及诱导其分化,主要是由某些癌基因及抑癌基因的表达抑制、失活和活化所致,抑制细胞进入 S 期及 DNA 合成,从而诱导肿瘤细胞分化^[14,15]。本实验中 DHA + IR 组使 GLC-82 细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞、S 期细胞比例下降、诱导细胞凋亡,表明 DHA 干预后使肿瘤细胞的增殖速度减慢,倍增时间明显延长,抑制 DNA 的合成。

空白对照 DHA IR DHA+IR

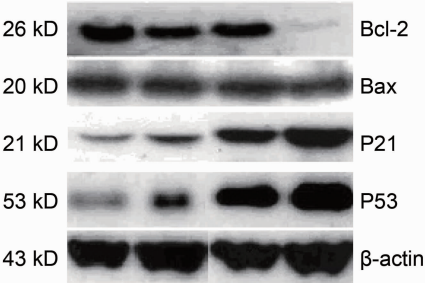


图 4 各组 GLC-82 细胞相关蛋白表达

随着分子靶向药物和个体化治疗的研发和临床使用,肿瘤的基因靶向检测和治疗已成为肿瘤治疗的热点。尤其是针对表 EGFR 信号通路相关基因、DNA 复制相关基因、纺锤体形成相关基因、细胞代谢过程相关基因等分子靶向检测和治疗^[16]。野生型 p53 基因定位于 17P13, 编码 wtp53 蛋白, 为四聚体核内磷蛋白, 在维护基因组的完整性方面具有重要的作用。p53 是 ATM 蛋白和 DNA-PK 的重要靶作用物, 在 DNA 损伤后, 由于 DNA-PK 的作用, 使 p53 或 Mdm-2 磷酸化, 从而上调 p21 及其他 CDIs, 抑制 CDKs, 发生细胞周期阻滞, 以便形成 DNA 修复或细胞凋亡, p21 基因是 p53 的效应基因。Bcl-2 基因是 Bcl-2 家族中最重要的基因, 可抑制细胞凋亡。Bax 是 Bcl-2 的同源基因, 可与 Bcl-2 形成异源二聚体, 能促进凋亡^[17]。本实验 Western blot 结果表明, DHA 联合放疗能显著增加 p53 蛋白表达, 诱导上调其下游的 p21 蛋白表达, Bax 蛋白表达无明显变化, p53 和 p21 蛋白的表达逐渐增加同时, Bcl-2 蛋白表达逐渐减少。

综上所述, DHA 能明显抑制肺腺癌 GLC-82 细胞的增殖, 且与放疗联合有明显的增敏作用, 联合放疗后使 GLC-82 细胞生长停滞在 G₀/G₁ 期并诱导细胞凋亡, 使 S 期细胞比例降低, 其作用机制可能是通过使 p53 和 p21 的蛋白水平表达增加, 使 p53 功能恢复, 通过抑制 Bcl-2 蛋白的表达促使 GLC-82 细胞凋亡。DHA 是青蒿素药物在体内的主要代谢物, 在体外对肺癌细胞有一定抑制作用, 但其确切的作用机制还需体内试验的进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Chen H, Sun B, Pan S, et al. Dihydroartemisinin inhibits growth of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(2): 131–140.
- [2] Kim SJ, Kim MS, Lee JW, et al. Dihydroartemisinin enhances radiosensitivity of human glioma cells *in vitro* [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132(2): 129–135.
- [3] 张泽舜, 陈忠平. 青蒿素类化合物抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *中国神经肿瘤杂志*, 2011, 9(1): 57–60.
- [4] Galal AM, Gul W, Slade D, et al. Synthesis and evaluation of dihydroartemisinin and dihydroartemisinin acetate dimers showing antitumor and antiprotozoal activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(2): 741–751.
- [5] Paik IH, Xie S, Shapiro TA, et al. Second generation, orally active, antimalarial, artemisinin derived trioxane dimers with high stability, efficacy, and anticancer activity [J]. *J Med Chem*, 2006, 49(9): 2731–2734.
- [6] Buommino E, Baroni A, Canozo N, et al. Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating α V β 3 integrin and reducing metalloproteinase 2 production [J]. *Invest New Drugs*, 2009, 27(5): 412–418.
- [7] 杨涵, 田攀, 余明莲. 青蒿素及其衍生物抗肿瘤的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(19): 3785–3787.
- [8] Chen T, Li M, Zhang R, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(7): 1358–1370.
- [9] Cai MB, Han HQ, Bei JX, et al. Expression of human leukocyte antigen G is associated with prognosis in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Bio Sci*, 2012, 8(6): 891–900.
- [10] Zhang CZ, Pan Y, Cao Y, et al. Histone deacetylase inhibitors facilitate dihydroartemisinin-induced apoptosis in liver cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Plos One*, 2012, 7(6): e39870.
- [11] 叶因涛, 徐文清, 杨福军, 等. 隐丹参酮对宫颈癌 Hela 细胞增殖及细胞凋亡的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(1): 118–121.
- [12] Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumor clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas [J]. *Nature*, 2007, 445(7128): 656–660.
- [13] Willoughby JA Sr, Sundar SN, Cheung M, et al. Artemisinin blocks prostate cancer growth and cell cycle progression by disrupting Sp1 interactions with the cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) promoter and inhibiting CDK4 gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(4): 2203–2213.
- [14] Fuhrman CB, Kilgore J, LaCoursiere YD, et al. Radiosensitization of cervical cancer cells via double-strand DNA break repair inhibition [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 11(10): 93–98.
- [15] Kamer S, Ren Q, Dicker AP. Differential radiation sensitization of human cervical cancer cell lines by the proteasome inhibitor velcade (bortezomib, PS-341) [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2009, 279(1): 41–46.
- [16] Cao X, Wang AH, Jiao RZ, et al. Surfactin induces apoptosis and G₂/M arrest in human breast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2009, 55(3): 163–171.
- [17] Yuen HF, Chan KK, Grills C, et al. Ran is a potential therapeutic target for cancer cells with molecular changes associated with activation of the PI3K/Akt/mTORC1 and Ras/MEK/ERK pathways [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(2): 380–391.

(收稿: 2013-11-28 修回: 2014-07-09)