



鱼腥草注射液介导 p38MAPK 信号转导诱导人肝癌程序性死亡

曾红波 黄波 李兵峰 高风华 刘庆华 陈凯 杨文伦

天门市第二人民医院外科 湖北天门 431700

【摘要】目的 探究鱼腥草注射液诱导人肝癌细胞程序性死亡和程序性死亡相关基因表达的 P38MAPK 信号转导通路, 阐明肝癌治疗的分子机理。**方法** 将 5、10、20mg/L 鱼腥草注射液分别培养人肝癌 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 通过免疫组织染色观察细胞程序性死亡的情况; 通过琼脂糖凝胶电泳分析和观察程序性死亡细胞特征性 DNA 区带; 流式细胞仪法 (Flow cytometry, FCM) 检测细胞程序性死亡和细胞周期; 荧光定量 PCR 检测 Fas 和 Caspase-9 基因 mRNA 的表达水平, 并比较阻断 p38MAPK 信号通路后鱼腥草注射液对肝癌细胞凋亡和 Fas 和 Caspase-9 基因 mRNA 的表达。**结果** 鱼腥草注射液作用 48h 后, 荧光显微镜下观察到经 Hoechst 染色的典型程序性死亡细胞, 琼脂糖凝胶电泳可见程序性死亡细胞 DNA 呈规律性的梯状条带。5、10、20mg/L 浓度鱼腥草注射液作用人肝癌细胞后的细胞程序性死亡率分别为 12.83%±1.51%, 17.86%±2.70% 和 29.24%±7.58%, 与对照组 6.30%±2.08% 比较均有显著性差异 ($P<0.01$), 阻断 p38MAPK 信号通路后, 程序性死亡率和 G0/G1 期细胞比例明显降低 ($P<0.01$)。10 mg/L 鱼腥草注射液作用人肝癌细胞 48h 后 Fas mRNA 和 Caspase-9 mRNA 的表达明显上升, 阻断 p38MAPK 信号通路后, 鱼腥草注射液作用人肝癌细胞的 Fas mRNA 和 Caspase-9 mRNA 的表达明显下降。**结论** 鱼腥草注射液能诱导人肝癌细胞株 SMMC-7721 程序性死亡, 阻滞肝癌细胞于 G₀/G₁ 期, 通过 P38MAPK 信号转导通路上调 Fas、Caspase-9 mRNA 的表达可能是其诱导肝癌细胞程序性死亡的重要机制。

【关键词】 p38MAPK 信号; 肝癌; 程序性死亡

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-9561 (2016) 07-005-04

鱼腥草注射液作为中草药提取液临床应用多年, 中医辨证认为其有温辛、去湿解毒的良效, 还能除去肢体疼痛, 治疗皮肤溃疡等疾病, 对心血管病人特别是心脏泵功能不佳患者, 能够通过去湿排除水利尿的药效而减轻心脏负荷而改善患者的心功能, 对于消化功能不佳的胃热型、脾热型患者也能通过温辛解热从而起到一定的健脾胃作用。国内外有报道鱼腥草注射液能对肿瘤起到一定的抵抗作用, 特别在胃癌、中晚期肺癌、绒毛膜上皮癌有一定的抗性作用, 能抑制肿瘤的增长, 众多研究证实恶性葡萄胎、直肠癌也能起到抑制肿瘤的作用^[1,2]。本次研究从细胞信号转导角度对鱼腥草注射液介入的肝癌细胞程序性死亡的相关机制, 现将相关资料汇报如下:

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 SMMC-7721 购于武汉大学生命科学院; 鱼腥草注射液购自湖北省中医学实验室, 纯度 ≥ 98% (批号: 2012110101), p38 MAPK 特异性的抑制剂 SB203580 购于博士德公司; 总 RNA 抽提试剂 Beyozol (购自碧云天公司, 批号 R0011)、荧光定量 PCR 试剂购自上海硕盟生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、Fas 和 Caspase 上下游引物和探针由广州迈博生物科技有限公司设计并合成, 其中 5' 端标记上报告荧光基团 FAM, (Fas): 5'-TCTACATCCAGTCGCAAACA-3', 下游引物 (Fas): 5'-AAAGGGACGGTGAAACCCGA-3'; 上游引物 (Caspase-9): 5'-ACCGGTTAAGACGGTATTCG-3', 下游引物: 5'-CCAAGCTAGACTCACTTTGAC-3', 内参 GAPDH 作为对照, 上游引物: 5'-CCACTCTCCACCTTTGAC-3', 下游引物: 5'-ACCCTGTGTGTAGCCA-3', 氯仿、异丙醇、无水乙醇均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 膜联蛋白凋亡探测器 V-FITC 观察细胞凋亡百分率: 凋亡细胞的制备: 小鼠腹腔注射地塞米松 25mg/kg 体重, 10h 后解剖取胸腺, 分离胸腺细胞。用 PBS 洗两遍, 调整待测细胞的浓度为 2×10^6 /ml, 备用。200 μl 细胞悬液加入 1ml 冷 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮, 1000rpm 4℃离心 10 分钟, 弃上清。重复步骤 2 两次。将细胞重悬于 200 μl 标记缓冲液。加

入 10 μl Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 分钟或 4℃反应 30 分钟。加入 300 μl 标记缓冲液, 立即上机 (流式细胞仪) 或荧光显微镜观察检测。用荧光显微镜观察, 凋亡细胞细胞膜上可见黄绿色光环。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所特有的, 也可发生在细胞坏死中。以 FITC 标记的 Annexin V, 可以同时结合使用 PI (碘化丙啶) 拒染法, 用流式细胞仪分析可检测凋亡细胞的百分率。

1.2.2 凋亡细胞 DNA 梯度分析: 不同浓度 TS II A (5, 10, 20mg/L) 作用 SMMC-7721 细胞 48h 后, 收集细胞, 用 PBS 离心洗涤, 加入细胞裂解液, 37℃过夜, 酚/氯仿纯化, 无水乙醇沉淀 DNA, 4℃过夜, 最后将沉淀溶解在 TE 缓冲液中, 18g/L 琼脂糖凝胶电泳 2h, 紫外灯下观察。

1.2.3 流式细胞仪检测: 人肝癌 SMMC-7721 细胞常规培养至对数生长期, 换无血清培养液培养 12h 使细胞周期同步化, 设 5、10、20mg/L 鱼腥草注射组, 20 μmol/L 的 p38MAPK 抑制剂 SB203580 组, 20 μmol/L 的 p38MAPK 抑制剂 SB203580+8mg/L 鱼腥草注射液组, 培养 48h 后, 制成单细胞悬液, 离心弃上清, 沿管壁缓慢加入 700ml/L 预冷 (-20℃) 乙醇固定, 上机检测前 RNA 酶消化, 再入 PI 染色液, 4℃避光 30min, FCM 检测凋亡率及细胞周期。

1.2.4 荧光定量 PCR: 将鱼腥草注射稀释至终浓度为 10mg/L, 处理人肝癌细胞 48h 后加胰酶消化离心收集细胞, 将各组细胞分别加入 2ml RNAiso, 按说明书提取总 RNA, 1 μl 总 RNA 在 20 μl 体系中按照标准程序进行反转录, 反应条件: 37℃ 15min, 85℃ 5s, Fas、Caspase-9 和 GAPDH 基因荧光定量 PCR 反应体系均如下: Premix EX TaqTM10 μl, Rox Reference Dye 0.4 μl, 上下游引物各 0.4 μl, 荧光探针 0.8 μl, dH₂O 6 μl, cDNA 2 μl, 20 μl 体系。数据采用 ABI 7300 SDS Software 分析, 相对 mRNA 表达 = $2^{-\Delta Ct}$, ΔCt 值 = 靶基因 Ct 值 - GAPDH Ct 值, 以 GAPDH 作为内参照, 同时以 SMMC-7721 细胞作为基准, 各组细胞 mRNA 的表达量表示成 SMMC-7721 细胞的 N 倍。N = 样品表达量 / 基准表达量 = $2^{-\Delta Ct}$ / $2^{-\Delta Ct}$ - 基准 ΔCt , 各组留取 3 份样本, 然后计算均数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 医学统计软件包进行统计分析, 采用计量资料以均数 ± 标准差表示, 多样本比较采用单因素方差分析, Student's t, Rank sum test, SNK 检验方法进行统计分析, 组间比较用 t 或 t' 检验, $P<0.05$ 具有统计学差异。

作者简介: 曾红波, 男, 1977-12, 湖北, 天门, 主治医师, 本科, 研究方向: 乳腺, 邮箱地址: 1332483966@qq.com。



表 1 鱼腥草注射液介导 p38MAPK 信号转导诱导人肝癌程序性死亡 (均数 ± S)

分组	凋亡率	细胞周期		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	5.2 ± 2.01	50.13 ± 1.48	31.03 ± 1.2	8.83 ± 0.89
鱼腥草注射 (5mg/l)	11.23 ± 1.38 [*]	71.31 ± 0.58 [*]	14.86 ± 1.42	7.02 ± 0.72
鱼腥草注射 (10mg/l)	16.31 ± 1.78 ^{**}	78.46 ± 0.39 ^{**}	11.28 ± 1.58	6.56 ± 1.02
鱼腥草注射 (20mg/l)	23.13 ± 7.23 ^{**△}	80.72 ± 0.63 ^{**△}	8.1 ± 1.36	3.88 ± 0.89

^{*}P<0.01VS 鱼腥草注射 (5mg/l), ^{**}P<0.01VS 鱼腥草注射 (5mg/l), [△]P<0.01VS 鱼腥草注射 (10mg/l)。

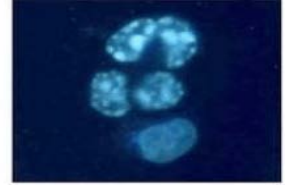
2 结果

2.1 微观下程序性细胞死亡的观察

荧光显微镜下对照组 SMMC-7721 细胞 (即无任何处理) 的胞核呈弥漫均匀的蓝色荧光染色, 未见凋亡荧光染色细胞。5、10、20mg/L 剂量的鱼腥草注射作用于人肝癌 SMMC-7721 细胞后, 均可见程序性死亡细胞。细胞程序性死亡的微观表现: 核固缩、核碎裂、核溶解。于是在程序性死亡的细胞的胞核或胞质内内染致密的颗粒荧光及块状荧光清晰可见 (DNA 荧光碎片, 图 1)。



程序性死亡 2 期

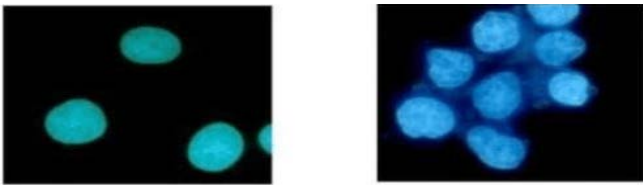


程序性死亡 3 期

图 1 肝癌 SMMC-7721 细胞程序性死亡核染色质的变化过程

2.2 DNA 区带电泳评估程序性死亡细胞

以不同浓度鱼腥草注射液 (5、10、20mg/L) 作用 SMMC-7721 细胞 48h, 分别观察 DNA 断裂情况 (经典的细胞程序性死亡 DNA 断裂电泳不能观察到梯状条带)。5mg/L 鱼腥草注射液作用 SMMC-7721 细胞, 未见 DNA 梯状条带, 10mg/L 以上剂量能明显抑制细胞的程序性死亡故出现典型的 DNA 梯状条带。



对照组

程序性死亡 1 期

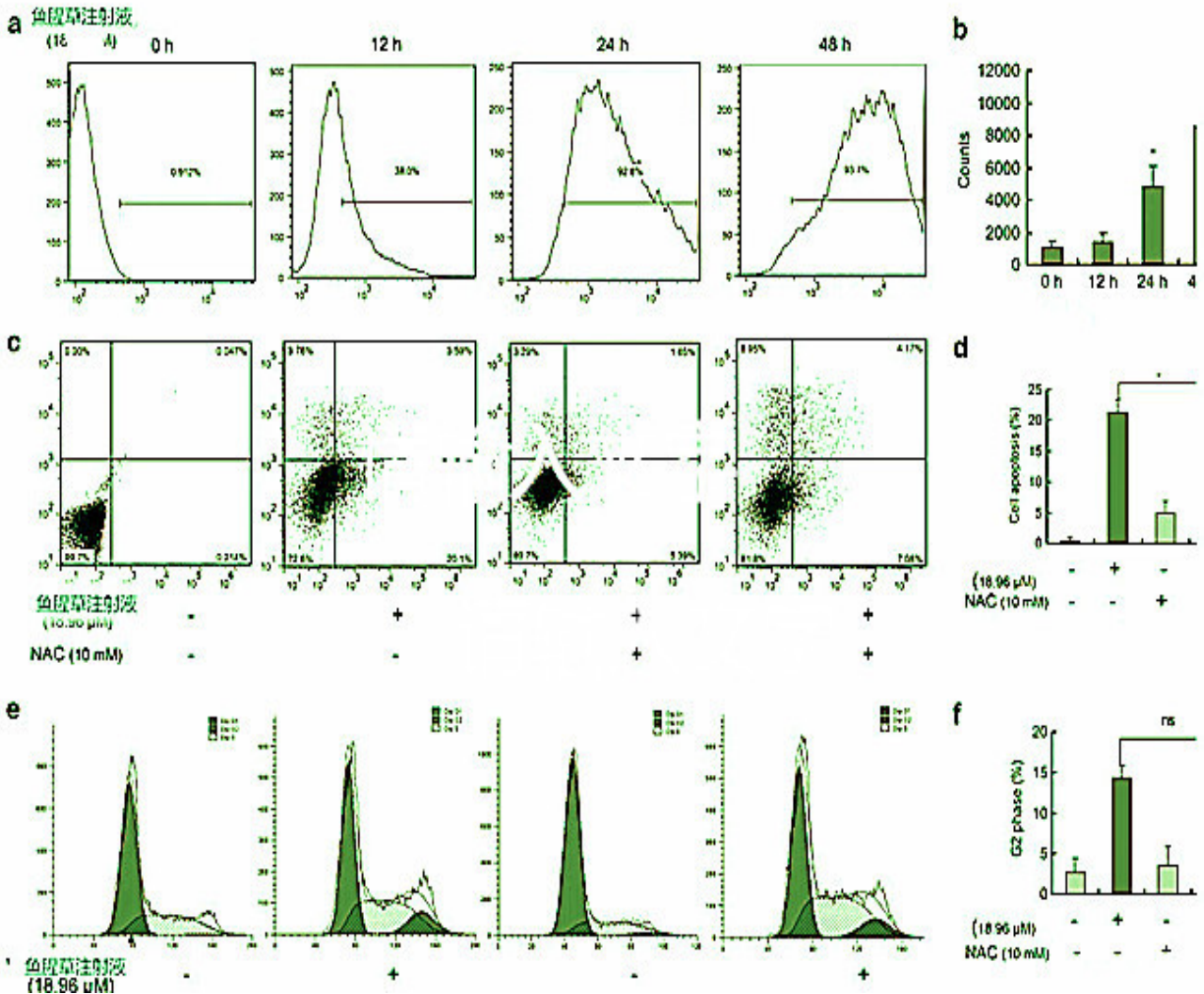


图 1. a, b. SMMC-7721 细胞通过鱼腥草注射液治疗, 已标明时间点, 平均 DCF 荧光通过流式细胞仪测量; c, d. 3 个独立试



验的 DCF 荧光在直方图中的百分比; * $P < 0.05$ 。流式细胞仪检测对照组及不同剂量鱼腥草注射液对 SMMC-7721 细胞的细胞程序性死亡的情况; e, f. 不同组别流式细胞仪分析细胞周期分布, * $P < 0.05$ 。

2.3 鱼腥草注射液对肝癌细胞程序性死亡和细胞周期的诱导

5、10、20mg/L 浓度的鱼腥草注射液作用人肝癌细胞后的细胞程序性死亡率明显高于对照组的程序性死亡率 (5.39%, 7.08%, 20.1% vs 0.214%), 并出现程序性死亡典型性特征峰。对照组 G_0/G_1 期细胞所占百分率为 0.5, 10, 20mg/L 浓度的鱼腥草注射液作用后 G_0/G_1 期细胞所占百分率分别为 3.29%, 3.76%, 6.95%, 20mg/L 浓度的鱼腥草注射液作用后出现的 G_0/G_1 期阻滞最为明显。结果显示随着鱼腥草注射液剂量的增加, 细胞的程序性死亡率上升, G_0/G_1 期细胞比例增加 (表 1, 图 1)。

2.4 P38MAPK 信号通路在鱼腥草注射液诱导肝癌细胞程序性死亡中的作用

鱼腥草注射液组作用人肝癌细胞后凋亡率显著提高 (0.214% vs 5.38%, $P < 0.01$), 并且 G_0/G_1 期细胞阻滞明显 (0.047% vs 1.65%, $P < 0.01$); 阻断 p38MAPK 信号转导通路后鱼腥草注射液作用人肝癌细胞后凋亡率和 G_0/G_1 期细胞所占百分率明显降低 ($P < 0.01$)。提示鱼腥草注射液通过肝癌细胞内 p38MAPK 信号转导途径诱导细胞凋亡调控细胞周期 (表 1, 图 1)。

2.5 鱼腥草注射液通过 P38MAPK 信号通路对肝癌细胞凋亡 Fas、Caspase-9mRNA 的影响

荧光定量 PCR 结果显示, 鱼腥草注射液作用人肝癌细胞 48h 后 Fas、Caspase-9mRNA 的表达明显上调 ($P < 0.01$), 分别为正常细胞的 15.9 倍、24.3 倍; 阻断 p38MAPK 信号通路后, Fas、Caspase-3 mRNA 的表达明显下调 ($P < 0.01$, 图 2)。

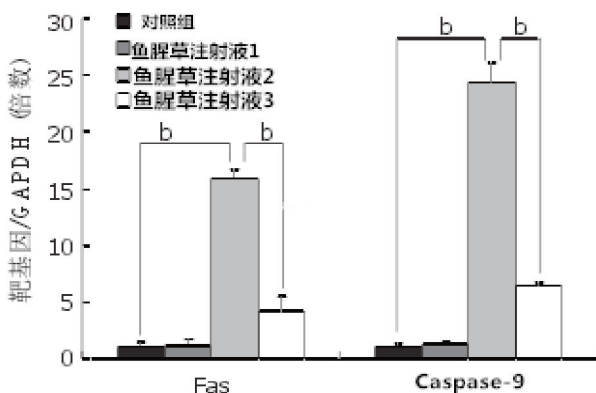


图 2 鱼腥草注射液对肝癌细胞凋亡 Fas、Caspase-9mRNA 的影响

3 讨论

鱼腥草注射液作为中草药提取液临床应用多年, 中医辨证认为其有温辛、去湿解毒的良效, 还能除去肢体疼痛, 治疗皮肤溃疡等疾病, 对心血管病人特别是心脏泵功能不佳患者, 能够通过去湿排除水利尿的药效而减轻心脏负荷而改善患者的心功能, 对于消化功能不佳的胃热型、脾热型患者也能通过温辛解热从而起到一定的健脾胃作用。国内外有报道鱼腥草注射液能对肿瘤起到一定的抵抗作用, 特别在胃癌、中晚期肺癌、绒毛膜上皮癌有一定的抗性作用, 能抑制肿瘤的增长, 众多研究证实恶性葡萄胎、直肠癌也能起到抑制肿瘤的作用。众多药理研究证实提取物中含有一种挥发油和癸酰乙醛鱼腥草素等几种重要的配分。对多种细菌比如一体一毒二菌 (钩端螺旋体、流感病毒、致病杆菌、球菌) 都有一定

的抑制和杀伤作用, 并能增强人体免疫调节功能、抗炎等效应。鱼腥草注射液通常配制成 1: 40000 浓度, 对耐青霉素的金黄色葡萄球菌仍有强烈的杀伤和抑制效应来发挥抗菌、消炎作用。由于鱼腥草的多种药效作用经常在临床中配置成多种形式共用如雾化型、针剂型、片剂型等, 对于机体的多种脏器如消化、泌尿、呼吸道、生殖系统等感染治疗起到一定的疗效。国内外的资料表明鱼腥草在抑癌、抗癌方面有较好的成效。在日本医学中, 鱼腥草也应用广泛, 日本学者提出鱼腥草有抗菌、消炎、助消化、清热、解毒、抗过敏、抗辐射、防癌抗癌等明显作用 [3-6]。

肿瘤的生长速度各种肿瘤的生长速度有极大的差异, 主要决定于肿瘤细胞的分化成熟程度。一般来讲, 成熟程度高、分化好的良性肿瘤生长较缓慢, 几年甚至几十年。如果其生长速度突然加快, 就要考虑发生恶性转变的可能。成熟程度低、分化差的恶性肿瘤生长较快, 短期内即可形成明显的肿块, 并且由于血管形成及营养供应相对不足, 易发生坏死, 出血等继发改变 [7]。细胞内磷酸化级联反应的最后一步是由于 MAPK 的激活。MAPK / ERK 激酶催化 MAPK 的激活主要发生在酪氨酸和苏氨酸残基处的磷酸化生化反应过程。ERK1 / 2 的活性成份则是 MEK1 和 MEK2, ERK5 的活性成份则是 MEK5, JNK 的活性成份是 MKK4 和 MKK7, P38MAPKs 的活性成分 MKK3 和 MKK6 [8], 所谓或成分则是酶的前身酶原在一些信号通路激活后磷酸化为酶而发挥其活性效应。细胞内蛋白激酶激活的经典程序激活途径: 丝氨酸 / 苏氨酸激酶途径; MAPK 激酶途径; 苏氨酸和酪氨酸的双重磷酸化而激活途径。不同的细胞外信号如疼痛、寒冷、热效应、炎症等因素的效应可以通过不同的信号通路来活化 MAPK 通路, 不同的信号激活不同的底物从而启动不同的细胞内生理效应而发挥特异的生物学功能。P38 蛋白激酶作为分离纯化的酪氨酸磷酸蛋白激酶主要是通过大量的试验上利用内毒素刺激哺乳动物细胞后产生生理效应后提起。P38 作为 MAPK 家族最重要的成员 [抑制免疫炎症反应 [9]。生理性应激、脂多糖、渗透性应激和紫外线照射等生物理化因素均可激活 P38。P38 通路可能在 Caspase 上游和下游启动细胞凋亡程序, 可以说 P38 信号通路在细胞增殖、分化方面起了重要的作用, 同时也对细胞凋亡发挥了相应的生理程序 [10, 11]。

在目前的研究中, 我们已证实无论在体内还是在体外鱼腥草注射液能明显肿瘤生长, 而且, 鱼腥草注射液通过不同的 MAPK 信号通路触发细胞循环的停滞在 G2 期和诱导了细胞的凋亡。

鱼腥草注射液对 SMMC-7721 细胞的治疗引起细胞停滞在 G2 期, 这种导致细胞的停滞存在时间和剂量依赖性。明显地关注聚焦于 MAPK 通路这个重要的角色, 几个关键的信号元件和磷酸化活动扮演着调节细胞周期、细胞程序性死亡以及肿瘤的发生的角色。在 MAPK 亚家族中, P38 已经显示了在支持 G2/M 周期的停滞和通过各种抗癌成份诱发细胞的程序性死亡不可缺少的成份。但是, 我们的试验充分展示了 Fas、Caspase-9 参与了鱼腥草注射液介入的细胞的程序性死亡和 G2/M 期的停滞。我们在实验中发现鱼腥草注射液作用人肝癌细胞后, 荧光显微镜下观察到经 Hoechst 染色的典型凋亡细胞; 琼脂糖凝胶电泳可见凋亡细胞 DNA 呈规律性的梯状条带; PI 染色流式细胞仪检测出现明显的肝癌细胞凋亡 ($P < 0.01$), G_0/G_1 期细胞比例相对增多 ($P < 0.01$), 阻断 p38MAPK 信号转导通路后, 凋亡率和 G_0/G_1 期细胞比例明显降低 ($P < 0.01$)。鱼腥草注射液作用人肝癌细胞后, Fas、Caspase-9 mRNA 的表达明显上调 ($P < 0.01$), 阻断 p38MAPK 信号通路后, Fas、Caspase-9 mRNA 的表达明显下调 ($P < 0.01$)。提示鱼腥草注射液治疗肝癌的机

(下转第 9 页)



② 1-3 分症状明显好转, 仍有轻微疼痛; ③ 4-6 分症状有所好转, 有中度疼痛; ④ 7-10 分症状无改善, 有明显疼痛。

4 疗效标准

4.1 明显好转

腰腿疼消失, 直腿抬高试验阴性, 恢复原正常工作。

4.2 显效

腰腿疼减轻, 腰部活动功能改善, 直腿抬高试验可疑阳性, 胜任部分工作。

4.3 无效

腰腿疼的症状和体征无改变, 直腿抬高试验阳性, 不能胜任工作。

5 治疗结果

本组 65 例, 明显好转 45 例, 占 69.23%; 显效 17 例, 占 26.15%; 无效 3 例, 占 4.62%。总有效率 95.38%。

6 讨论

6.1 腰椎间盘突出症是临床常见病、多发病, 是腰腿痛常见的原因之一。目前对于腰椎间盘突出症的治疗大体分为手术治疗及非手术治疗两种方式^[6]。手术治疗可能发生椎间盘感染、血管或神经根损伤, 以及手术后局部粘连症状复发等并发症, 因此临床上往往优先采用非手术治疗。非手术治疗的目的是使突出的椎间盘和受压迫的神经根炎性水肿消退, 减轻或解除对神经根的刺激或压迫, 从而达到临床缓解或治愈的目的。目前非手术治疗的方法有限, 主要包括卧床休息、康复理疗、甘露醇脱水消肿、激素抗炎等, 临床疗效尚不满意。因此, 我们进行了身痛逐瘀汤汤疗腰椎间盘突出症的临床研究。

6.2 腰椎间盘突出症属于中医腰痛范畴。古文献中把它分为寒湿腰痛、气滞血瘀腰痛、湿热腰痛、肝肾亏虚腰痛。病因多为腰部受伤、气血瘀滞、经络闭阻不通、血行不畅、不通则痛, 同时与机体受寒湿、湿热及自身亏损关系密切。身痛逐瘀汤方中, 秦艽、羌活祛风除湿, 当归、川芎、红花、桃仁、五灵脂养血活血, 消肿止痛, 使旧瘀得去, 新血始生; 没药、香附行气血; 牛膝、地龙疏通经络以利关节; 甘草调和诸药,

降低药物烈性, 不伤正。全方配合辨证用药共奏活血祛瘀、通经活络的功效^[7-8]。《内经》云“经脉者, 所以能决死生, 处百病, 调虚实, 不可不通。”^[9-10]临床观察结果表明, 身痛逐瘀汤辨证治疗腰椎间盘突出症疗效确切, 如再配合功能锻炼, 进一步改善腰椎间盘的生理曲度, 有利于髓核的复位, 更可达到骨正筋柔、经脉通畅、营卫调和的作用, 值得临床推广。

参考文献:

[1] 姚军, 李建红, 针尖配合牵引治疗腰椎间盘突出症 60 例临床观察 [J]. 中国民族医药, 2010, (11): 167-168.

[2] 胡有谷, 腰椎间盘突出症 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 247-362.

[3] 国家中医药管理局, 中医病证诊疗标准 [M] 南京: 南京大学出版社. 1994.2002.

[4] 黄锦军, 彭文琦, 雷龙鸣, 等. 中医综合疗法治疗腰椎间盘突出症的系统评价 [J]. 中医药信息, 2009, 26(5):65-69.

[5] 王林华, 卢敏. 中药熏蒸配合牵引治疗腰椎间盘突出症的系统评价与 Meta 分析 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(8):13-15.

[6] 李林, 詹红生, 张明才, 等. 手法治疗腰椎间盘突出症临床随机对照试验系统评价 [J]. 中国骨伤, 2010, 23(9):696-700.

[7] 李林, 詹红生, 高宁阳等. 电针治疗腰间盘突出症临床随机对照试验系统评价 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12):1949-1952.

[8] 罗胜, 罗思文. 针灸治疗腰椎间盘突出症的系统分析 [J]. 针灸临床杂志, 2005, 21(6):10-14.

[9] 熊俊, 陈日新, 付勇, 等. 热敏灸治疗腰椎间盘突出症随机对照试验的系统评价 [J]. 江西中医药, 2011, 42(339):48-51.

[10] 穆敬平, 刘莉, 方伟, 等. 针刀治疗腰椎间盘突出症的系统评价 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(7):31-35.

(上接第 7 页)

制与诱导肝癌细胞凋亡、阻滞肝癌细胞于 G0/G1 期有关, 通过 p38MAPK 信号转导上调 Fas、Caspase-9mRNA 是鱼腥草注射液诱导肝癌细胞凋亡的重要机制之一。本实验显示鱼腥草注射液具有较好的诱导肝癌细胞凋亡的作用, 在治疗肝癌方面具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin 2011;61: 212-236.

[2] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010;7: 448-458.

[3] Carr BI. Hepatocellular carcinoma: current management and future trends. Gastroenterology 2004;127: S218-S224.

[4] Tang TC, Man S, Lee CR, Xu P, Kerbel RS. Impact of metronomic UFT/cyclophosphamide chemotherapy and antiangiogenic drug assessed in a new preclinical model of locally advanced orthotopic hepatocellular carcinoma. Neoplasia 2010;12: 264-274.

[5] Gamet-Payrastré L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S et al. Sulforaphane, a naturally occurring

isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. Cancer Res 2000;60: 1426-1433.

[6] Huang WW, Ko SW, Tsai HY, Chung JG, Chiang JH, Chen KT et al. Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways. Int J Oncol 2011;38: 1067-1073.

[7] Dore'e M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. FASEB J 1994;8: 1114-1121.

[8] Parker LL, Piwnicka-Worms H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. Science 1992;257: 1955-1957.

[9] Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. Science 1997;277: 1501-1505.

[10] Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. Crit Rev Toxicol, 2000;30: 609-627.

[11] Liu B, Cheng Y, Bian HJ, Bao JK. Molecular mechanisms of Polygonatum cyrtoneura lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. Autophagy 2009;5: 253-255.