

慢病毒介导的 FLOT1 基因表达对胃癌细胞侵袭凋亡的机制研究

范友杰, 王付钦, 陈颢(新乡市中心医院普外科, 河南 新乡 453000)

摘要:目的 探讨抑制 FLOT1 基因表达对胃癌细胞侵袭、凋亡的影响及机制。方法 将设计合成的 FLOT1 siRNA 慢病毒载体 (si-FLOT1 组) 转染入胃癌 MKN-45 细胞, 同时转染阴性对照慢病毒载体 (阴性组), 并设置空白组。Western blotting 检测转染 48 h 后细胞 FLOT1、E-cadherin、 α -SMA、cleaved caspase 3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。CCK-8 法检测转染 24、48、72 和 96 h 的细胞活力。Transwell 小室、流式细胞术及 DCFH-DA 法分别检测转染 48 h 的细胞侵袭能力、凋亡率及活性氧 (ROS) 含量。结果 FLOT1 siRNA 慢病毒载体可明显抑制 MKN-45 细胞 FLOT1 表达, 与空白组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。si-FLOT1 组与空白组比较, 细胞活力降低, 细胞侵袭能力降低, 细胞凋亡率升高, E-cadherin、cleaved caspase 3 和 Bax 蛋白表达升高, α -SMA 和 Bcl-2 蛋白表达降低, ROS 含量升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 下调 FLOT1 基因表达可通过抑制 EMT 降低胃癌细胞侵袭能力, 通过调控凋亡相关蛋白表达及提高细胞 ROS 含量促进细胞凋亡。

关键词:胃癌; FLOT1 基因; 侵袭; 凋亡; 上皮细胞间质转化

doi:10.11669/cpj.2019.16.004 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)16-1299-06

Mechanism of Lentivirus Mediated FLOT1 Gene Expression on Invasion and Apoptosis of Gastric Cancer Cells

FAN You-jie, WANG Fu-qin, CHEN Hao (Department of General Surgery, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To investigate inhibitory effect of FLOT1 gene expression on invasion and apoptosis of gastric cancer cells. **METHODS** The designed FLOT1 siRNA lentiviral vector (si-FLOT1 group) was transfected into human gastric cancer MKN-45 cells, at the same time, the negative control lentivirus vector (negative group) was transfected, and the blank group was set up. Western blotting was used to detect the expression of FLOT1, E-cadherin, α -SMA, cleaved caspase 3, Bcl-2 and Bax proteins. After cells were transfected for 24, 48, 72 and 96 h, cell viability was detected by CCK-8 assay. After cells were transfected for 48 h, transwell chamber, flow cytometry and DCFH-DA assay were used to detect the invasiveness, apoptosis rate and ROS content, respectively. **RESULTS** FLOT1 siRNA lentiviral vector inhibited significantly the expression of FLOT1 in MKN-45 cells, which was significantly different from the blank group ($P < 0.05$). Compared with si-FLOT1 group and the blank group, the cell vitality decreased, the invasion ability decreased, the apoptosis rate increased, the expression of E-cadherin, cleaved caspase 3 and Bax protein increased, the expression of α -SMA and Bcl-2 protein decreased, and the content of ROS increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Down regulation of FLOT1 gene expression can reduce the invasiveness of gastric cancer cells by inhibiting EMT, and promote apoptosis by regulating the expression of apoptosis related proteins and increasing the ROS content of cells. **KEY WORDS:** gastric cancer; FLOT1 gene; invasion; apoptosis; epithelial mesenchyme transformation

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 发病隐匿, 早期症状不明显, 就诊时多数患者已处于中晚期, 预后不佳, 5 年生存率低, 严重威胁人民的健康及生命^[1]。恶性肿瘤发生发展是多阶段、多因素及多基因改变的结果, 近些年分子靶向治疗肿瘤成为研究热点。脂筏 (lipid raft) 是生物膜表面富含鞘糖脂及胆固醇的微结构域, flotillin 是脂筏的一种标记蛋白, 由 flotillin-1 (FLOT1) 和 flotillin-2 (FLOT2) 2 种特征蛋白组成, 人 FLOT1 基因定位于染色体 6p21.3

区段, 是一种高度保守的蛋白, 几乎在所有细胞型中都能表达^[2]。最近研究表明, 多种癌细胞中 FLOT1 表达上调, 其表达与临床病理特征有关, 其高表达患者预后较差^[3-4]。而下调 FLOT1 表达可抑制肿瘤细胞生长^[5]。胃癌中 FLOT1 研究较少, 有研究表明, 胃癌 FLOT1 的高表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移和肿瘤临床分期有关^[6]; miR-485-5p 可靶向 FLOT1 抑制胃癌细胞增殖、迁移及上皮细胞间质转化 (epithelial mesenchyme transformation,

作者简介: 范友杰, 男, 硕士, 主治医师 研究方向: 胃肠道肿瘤 Tel: 18790595038 E-mail: 527148572@qq.com

EMT)^[7]。本实验旨在 FLOT1 表达抑制对胃癌细胞侵袭、凋亡影响,并进一步研究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

人胃癌 MKN-45 细胞(美国 ATCC 公司); RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);FLOT1、E-cadherin、 α -SMA、cleaved caspase 3、Bcl-2 和 Bax 抗体(美国 Abcam 公司); CCK-8 试剂盒(上海碧云天公司); Transwell 小室(美国 Corning 公司); Matrigel 胶及酶标仪均(美国 Bio-Rad 公司); DCFH-DA(美国 Sigma 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养及转染

FLOT1 siRNA 慢病毒载体由美国 Sigma 设计合成及包装。MKN-45 细胞在 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱,使用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液连续培养。实验为生长至对数期的细胞。随机将 MKN-45 细胞分为 3 个处理组,即空白组、阴性组和实验组。空白组不特殊处理,阴性组和实验组分别转染阴性对照慢病毒载体及 FLOT1 基因的 siRNA 慢病毒载体。用绿色荧光染料 CFSE 标记生长状态良好的细胞,以 2×10^5 个·孔⁻¹接种细胞于 6 孔板,不含抗生素的培养液培养细胞 24 h,细胞汇合度达 40% ~ 60% 时,参照 Lipofectamine™ RNAi MAX 转染试剂盒说明将 siRNA 慢病毒转染细胞,含 siRNA 慢病毒转染试剂与细胞共孵育 5 h,加新鲜培养基继续孵育。48 h 后,收集细胞,用于后续实验研究。

1.3 Western blotting

收集转染 siRNA 慢病毒 48 h 的细胞,加适量蛋白裂解液在冰上反应 15 ~ 20 min,离心,上清液即为蛋白质。BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白,每孔上样 40 μ g 蛋白,经 SDS-PAGE 分离,电转 PVDF 膜,电转完成后将膜置于 5% 封闭液中缓慢摇动 2 h,洗膜,加一抗(FLOT1、E-cadherin、 α -SMA、cleaved caspase 3、Bcl-2 和 Bax 抗体,稀释比例均为 1:500),使一抗能充分淹没 PVDF 膜为准,4 °C 冰箱过夜,洗膜,加二抗(稀释比例 1:2 000),洗膜,ECL 显色剂滴加至 PVDF 膜,在凝胶成像仪内显影。通过 Quantity One 计算各个条带灰度值。以目的蛋白与内参 GAPDH 灰度比值代表各个目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.4 CCK-8 实验检测细胞增殖

每组 5 个复孔、每孔 5×10^3 个细胞接种生长至

对数期的 MKN-45 细胞于 96 孔板,常规培养 24 h 同步化处理细胞,将 FLOT1 基因的 siRNA 慢病毒载体转染 MKN-45 细胞,在转染的 24、48、72 和 96 h,向各孔加 CCK-8 溶液,每孔 10 μ L,孵育 1 h 后,避光条件及 450 nm 使用酶标仪测定吸光度。实验重复 3 次。

1.5 Transwell 细胞侵袭实验

将 50 mg·L⁻¹的 Matrigel 胶铺在 Transwell 小室底部,37 °C 条件下 3 h 以使稀释液干燥,形成固体“薄膜”。无血清的培养液将转染 FLOT1 基因 siRNA 慢病毒载体的 MKN-45 细胞制备成单细胞悬液,以每孔 5×10^3 个接种细胞悬液于 Transwell 小室上室,下室加 600 μ L 含 10% 胎牛血清的培养液,每组 3 个复孔,将 24 孔板放置于培养箱中过夜,24 h 后,取出 24 孔板,棉签轻拭去上室,以将基质胶和细胞除去,PBS 洗涤,结晶紫染色及甲醇固定后,光学显微镜下随机选择 5 个视野观察并计数。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术测定细胞凋亡率

胰酶消化、计数转染 FLOT1 基因 siRNA 慢病毒载体 48 h 的 MKN-45 细胞,使 1 mL 细胞悬液至少含有 1×10^6 个细胞,预冷 PBS 洗涤,离心,弃掉上清,300 μ L 结合缓冲液将管底部的细胞沉淀制作为细胞悬液,使其浓度大于 1×10^5 个·mL⁻¹,避光条件,在流式管中分别加入 100 μ L 细胞悬液、5 μ L AnnexinV-FITC 及 5 μ L PI,混匀,避光反应 15 min,流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.7 DCFH-DA 法测定细胞活性氧(ROS)含量

收集转染 FLOT1 基因 siRNA 慢病毒载体 48 h 的 MKN-45 细胞,加终浓度为 10 μ mol·L⁻¹的 DCFH-DA,37 °C、避光条件下孵育 20 min,PBS 洗涤 2 遍,流式细胞仪检测 DCF 荧光强度,以此反映细胞内 ROS 含量。实验重复 3 次。

1.8 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS21.0 软件进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组差异比较采用单因素方差分析,两两比较采 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效果检测结果

通过 Western blotting 检测转染 FLOT1 siRNA 慢病毒的 MKN-45 细胞 FLOT1 蛋白表达,结果见图 1 和表 1,si-FLOT1 组 FLOT1 表达明显低于空白组($P < 0.05$),而阴性组 FLOT1 表达与空白组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞活力的影响

通过 CCK-8 法检测抑制 FLOT1 表达后 MKN-45 细胞活力,结果见图 2,转染 FLOT1 siRNA 慢病毒 24~96 h 的细胞活力均明显降低,与空白组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞侵袭能力的影响

通过 Transwell 小室检测各组细胞侵袭能力,结果见表 2,si-FLOT1 组细胞侵袭能力明显低于空白组($P < 0.05$)。

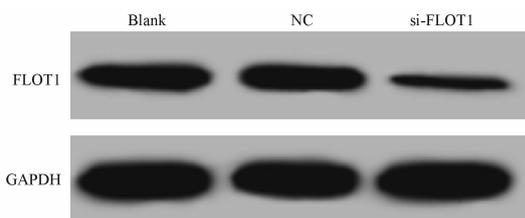


图 1 Western blotting 检测转染 FLOT1 siRNA 慢病毒的 MKN-45 细胞 FLOT1 蛋白表达

Fig. 1 Western blotting was used to detect FLOT1 expression in MKN-45 cells transfected with FLOT1 siRNA lentivirus

表 1 FLOT1 蛋白相对表达量. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Relative expression of FLOT1 protein. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	Relative expression of FLOT1 protein
Blank	0.463 ± 0.045
NC	0.476 ± 0.047
si-FLOT1	0.095 ± 0.012 ¹⁾

注:与空白组比,¹⁾ $P < 0.05$

Note:¹⁾ $P < 0.05$, vs blank group

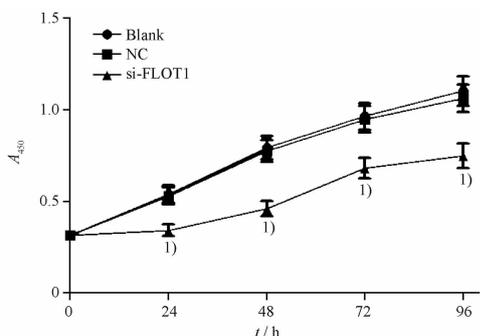


图 2 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞活力的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Fig. 2 Effects of FLOT1 siRNA lentivirus on the viability of MKN-45 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs blank group

表 2 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞侵袭能力的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Effects of FLOT1 siRNA lentivirus on invasive ability of MKN-45 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	Number of invasive cells
Blank	226.5 ± 15.3
NC	222.9 ± 14.4
si-FLOT1	111.2 ± 7.1 ¹⁾

注:与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Note:¹⁾ $P < 0.05$, vs blank group

2.4 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测转染 FLOT1 siRNA 慢病毒的 MKN-45 细胞凋亡率,结果见图 3,si-FLOT1 组细胞凋亡率明显高于空白组($P < 0.05$)。

2.5 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

通过 Western blotting 检测各组细胞 EMT 相关 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白表达,结果见图 4,与空白组比较,si-FLOT1 组 E-cadherin 表达明显升高, α -SMA 表达明显降低($P < 0.05$)。

2.6 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞凋亡相关蛋白表达影响

Western blotting 检测各组细胞凋亡相关的 Bax、Bcl-2 和 cleaved caspase 3 蛋白表达,结果见图 5,与空白组比较,si-FLOT1 组 Bax 和 cleaved caspase 3 表达明显升高,Bcl-2 表达明显降低($P < 0.05$)。

2.7 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞 ROS 含量的影响

FLOT1 siRNA 慢病毒转染 MKN-45 细胞 48 h,细胞加 DCFH-DA,流式细胞术检测 DCF 荧光强度,以此反映细胞的 ROS 含量,结果见表 3,与空白组比较,si-FLOT1 组 ROS 含量明显升高($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来的大量研究表明,FLOT1 与肿瘤发生发展密切相关。舌癌、肝癌中 FLOT1 呈现高表达,与患者预后密切相关^[8-9]。上调 FLOT1 表达可促进鼻咽癌细胞侵袭和迁移能力^[10]。而也有多项研究表明,抑制 FLOT1 表达可降低肿瘤细胞生长。如抑制小细胞肺癌 FLOT1 表达可降低细胞活性、克隆形成能力、侵袭和转移能力,并可诱导细胞凋亡^[11]。本实验将 FLOT1 siRNA 慢病毒转染胃癌 MKN-45 细胞,试图证实 FLOT1 表达抑制对胃癌细胞生长

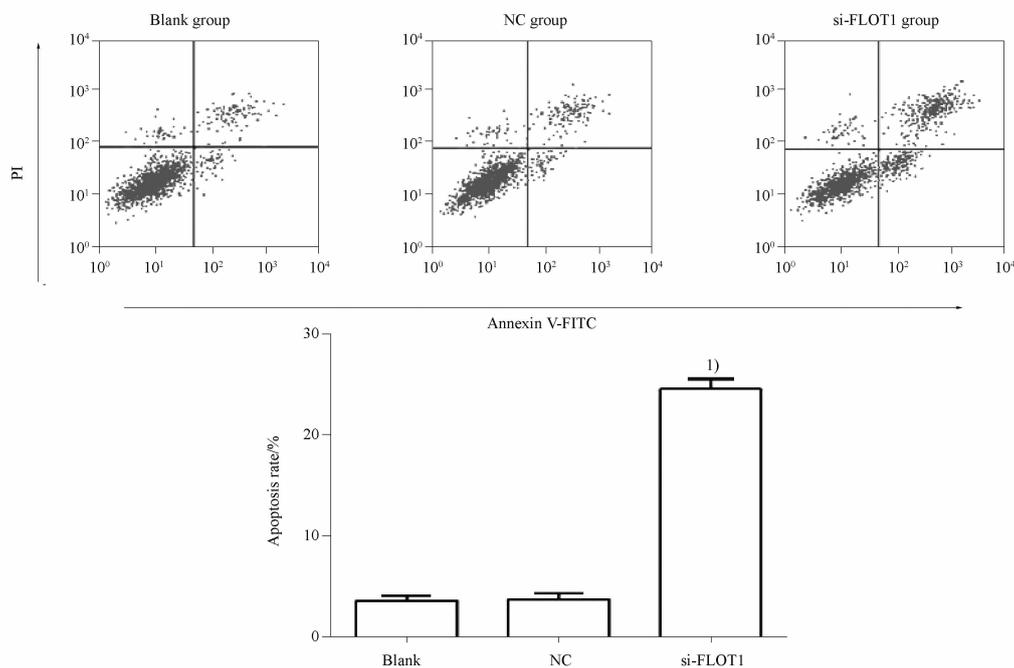


图3 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞凋亡的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$ 与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Fig. 3 Effects of FLOT1 siRNA lentivirus on apoptosis of MKN-45 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs blank group

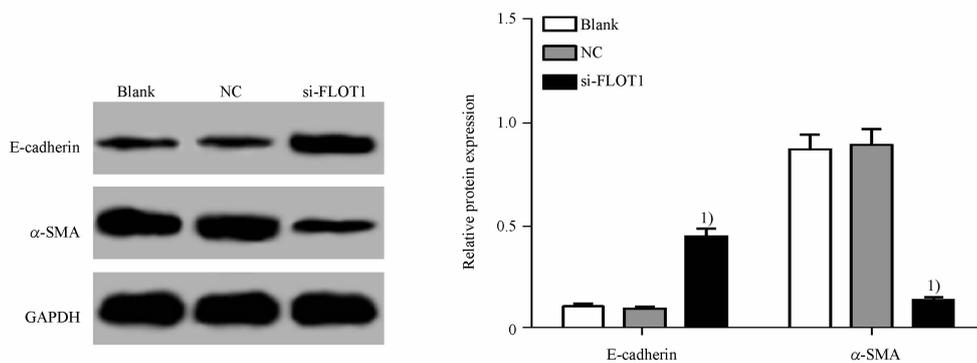


图4 Western blotting 检测各组细胞 EMT 相关蛋白表达. $n = 3, \bar{x} \pm s$ 与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Fig. 4 Western blotting was used to detect the expression of EMT-related proteins. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs blank group

影响,结果发现,FLOT1 表达被抑制后的 MKN-45 细胞活力、侵袭能力均明显降低,凋亡率升高,这与 FLOT1 在其他肿瘤中的研究结果一致。

肿瘤侵袭能力增强是肿瘤进展及转移的一个启动因素。EMT 是指上皮细胞在特定的生理病理条件下,转化为具有间质样表型细胞的生物学过程,参与肿瘤侵袭转移、胚胎发育、组织纤维化等多种生理病理过程^[12]。有研究表明,中断或逆转 EMT,可抑制肿瘤细胞的侵袭能力,从而降低细胞的转移

率^[13]。因此,EMT 已是肿瘤侵袭转移调控机制研究的一个热点。EMT 过程涉及大量蛋白表达变化,如 E-cadherin、ZO-1 等上皮表型蛋白下调; α -SMA、Vimentin 等间质表型蛋白上调^[14]。E-cadherin 是 EMT 发生的重要标志,其表达减少,可导致细胞间黏附减弱及细胞活性增强,在胃癌、食管癌等多种肿瘤中 E-cadherin 表达减少,而重新表达 E-cadherin 可降低肿瘤细胞侵袭性^[15-16]。多种肿瘤 α -SMA 表达明显升高,抑制 α -SMA 表达可降低肿瘤细胞

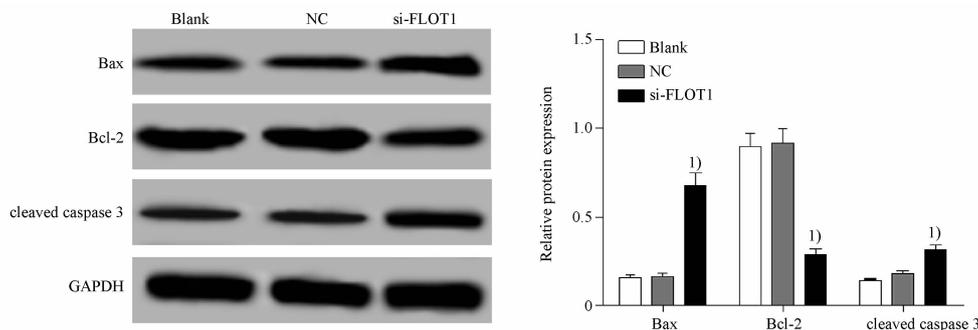


图5 Western blotting 检测各组细胞凋亡相对蛋白表达. $n = 3, \bar{x} \pm s$ 与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Fig. 5 Western blotting was used to detect expression of apoptotic relative protein in each group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs blank group

表3 FLOT1 siRNA 慢病毒对 MKN-45 细胞 ROS 含量的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Effects of FLOT1 siRNA lentivirus on ROS content in MKN-45 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	DCF fluorescence intensity
Blank	312.4 ± 25.9
NC	308.7 ± 24.1
si-FLOT1	521.3 ± 34.5 ¹⁾

注:与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Note:¹⁾ $P < 0.05$, vs blank group

侵袭性^[17]。本实验结果显示,抑制 FLOT1 表达可上调 E-cadherin 表达,下调 α -SMA。有研究表明, FLOT1 可通过 Wnt/ β -catenin 及 NF- κ B 信号调控的 EMT 促进宫颈癌细胞转移^[18]。因此,本实验提示下调 FLOT1 表达可通过抑制 EMT 降低胃癌细胞的侵袭能力。

近年来大量研究表明,线粒体途径在细胞存亡机制中发挥重要作用,Bcl-2 及 caspase 蛋白家族在众多凋亡调控基因中最受关注。Bcl-2 及 Bax 属于 Bcl-2 家族成员,发挥抑凋亡及促凋亡作用^[19]。研究发现,细胞内 Bax 超表达时可启动凋亡,Bcl-2 高表达时可抑制细胞凋亡,因此多项研究认为 Bcl-2 及 Bax 间的比率是决定细胞存亡的关键^[20]。caspase 3 是 caspase 家族成员之一,是多种凋亡途径共同下游的效应部分,被称为“死亡执行蛋白酶”^[21]。目前 Bcl-2、Bax 及 caspase 3 广泛的应用于肿瘤凋亡机制研究。本实验结果显示,下调 FLOT1 表达可上调 cleaved caspase 3 和 Bax,下调 Bcl-2 表达。提示下调 FLOT1 表达同样可通过对 Bcl-2、Bax 及 caspase 3 调控诱导胃癌细胞凋亡。ROS 是一类具有很高生物活性的氧分子,大量研究表明,ROS 在

凋亡过程中发挥重要作用^[22-23]。多项研究表明,提高胃癌细胞 ROS 含量可促进癌细胞凋亡^[24-25]。本实验发现,下调 FLOT1 表达可提高胃癌细胞 ROS 含量,提示提高 ROS 含量可能是 FLOT1 诱导胃癌细胞凋亡的另一机制。

综上所述,下调 FLOT1 表达可通过抑制 EMT 途径降低胃癌细胞凋亡,通过提高细胞 ROS 含量、激活 caspase 3、上调 Bax 表达及下调 Bcl-2 表达诱导胃癌细胞凋亡。提示 FLOT1 可能是胃癌分子诊疗的有效靶点,值得我们进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHOU X, WANG W, LI P, *et al.* Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in inducing gastric cancer cell apoptosis both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Res*, 2016, 23(1): 29-34.
- [2] KOH M, YONG H Y, KIM E S, *et al.* A novel role for flotillin-1 in H-ras-regulated breast cancer aggressiveness [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(5):1232-1245.
- [3] LI H, WANG R M, LIU S G, *et al.* Abnormal expression of FLOT1 correlates with tumor progression and poor survival in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(4):3311-3315.
- [4] ZHANG Y, LI J, SONG Y, *et al.* Flotillin-1 expression in human clear-cell renal cell carcinoma is associated with cancer progression and poor patient survival[J]. *Mol Med Reports*, 2014, 10(2):860-866.
- [5] QIN Y, MIN Z, ZI W, *et al.* 4.1N is involved in a flotillin-1/ β -catenin/Wnt pathway and suppresses cell proliferation and migration in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(9):12713-12723.
- [6] CAO C L, LI T Y, CAO C, *et al.* Expression and clinical significance of FLOT1 protein in gastric cancer[J]. *World Chin J Digestol*(世界华人消化杂志), 2015, 23(32):5141-5147.
- [7] KANG M, REN M P, ZHAO L, *et al.* miR-485-5p Acts as a negative regulator in gastric cancer progression by targeting flotillin-1[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(11):2212-2222.
- [8] LI H, ZHANG Y, CHEN S W, *et al.* Prognostic significance of flotillin1 expression in clinically NO tongue squamous cell cancer

- [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(3):996-1003.
- [9] ZHANG S H, WANG C J, SHI L, *et al.* High expression of FLOT1 is associated with progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e64709.
- [10] CAO S, CUI Y, XIAO H, *et al.* Upregulation of flotillin-1 promotes invasion and metastasis by activating TGF- β signaling in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4):4252-4264.
- [11] LI J. Expression and function of flotillin-1 in small cell lung cancer[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2016.
- [12] BREYER J, GIERTH M, SHALEKENOV S, *et al.* Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma[J]. *World J Urol*, 2016, 34(5):709-716.
- [13] LIU F, KORC M. Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(10):2138-2148.
- [14] SHIN H W, CHO K, KIM D W, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 mediates nasal polyposis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Am J Respir Critic Care Med*, 2012, 185(9):944-954.
- [15] SITARZ R, LEGUIT R J, DE LENG W W, *et al.* Cyclooxygenase-2 mediated regulation of E-cadherin occurs in conventional but not early-onset gastric cancer cell lines [J]. *Cell Oncol*, 2016, 31(6):475-485.
- [16] LIN Y, SHEN L Y, FU H, *et al.* P21, COX-2, and E-cadherin are potential prognostic factors for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis Esophagus*, 2016, 30(2):1-10.
- [17] INOUE H, TSUCHIYA H, MIYAZAKI Y, *et al.* Podoplanin expressing cancer-associated fibroblasts in oral cancer[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(11):11345-11352.
- [18] LI Z, YANG Y, GAO Y, *et al.* Elevated expression of flotillin-1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in early-stage cervical cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 6(1):38-50.
- [19] ZHAO S C, WU Q W, CHENG Y F, *et al.* Protective effect and mechanism of butylphthalide on SH-SY5Y cell apoptosis induced by MPP⁺ [J]. *Chin J Gerontol*(中国老年学杂志), 2017, 37(2):316-318.
- [20] LI K, XU G, LIU C, *et al.* Bcl-2/Bax switch was flipped during apoptosis of HCT116 colon cancer cells induced by a traditional Chinese medicine, Banxia Xiexin decoction[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(7):10535-10541.
- [21] CHECINSKA A, HOOGELAND B S J, RODRIGUEZ J A, *et al.* Role of XIAP in inhibiting cisplatin-induced caspase activation in non-small cell lung cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 313(6):1215-1224.
- [22] KOUL M, MEENA S, KUMAR A, *et al.* Secondary metabolites from endophytic fungus *Penicillium pinophilum* induce ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in pancreatic cancer cells[J]. *Planta Med*, 2016, 82(4):344-355.
- [23] SEO B R, MIN K J, WOO S M, *et al.* Inhibition of cathepsin S induces mitochondrial ROS that sensitizes TRAIL-mediated apoptosis through p53-mediated downregulation of Bcl-2 and c-FLIP [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(4):215-233.
- [24] LIANG T, ZHANG X, XUE W, *et al.* Curcumin induced human gastric cancer BGC-823 cells apoptosis by ROS-Mediated ASK1-MKK4-JNK stress signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9):15754-15765.
- [25] LIU C, SUN H N, LUO Y H, *et al.* Cryptotanshinone induces ROS-mediated apoptosis in human gastric cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70):115398-115412.

(收稿日期:2018-09-28)