

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.05.004

· 基础研究 ·

积雪草酸通过细胞周期阻滞和诱导凋亡抑制人肝癌 Huh7 细胞

郭冰洁, 赵沙沙[△], 凌昌全(海军军医大学 中医系, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 探究积雪草酸(asiatic acid, AA)对人肝癌细胞恶性生物学行为的抑制作用及其机制。**方法:** 选择人肝癌 Huh7 细胞作为研究对象, 体外培养过程中分别给予 0、5、10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AA 处理, 采用 CCK-8 法和 EdU 实验测定其对细胞增殖的影响, 流式细胞术检测凋亡和细胞周期的变化, WB 检测凋亡相关蛋白 p-AKT、p-ERK1/2、p-p38、cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、BAX、Bcl-2、AKT、ERK、p38、pro-caspase3 和 pro-caspase9 表达的变化。**结果:** AA 能够以剂量和时间依赖的方式抑制 Huh7 细胞的增殖(均 $P < 0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ AA 孵育 Huh7 细胞 24 h 后细胞增殖被显著抑制($P < 0.05$)、凋亡率显著升高($P < 0.05$)、细胞周期阻滞于 G1 期($P < 0.05$)。AA 可诱导 p-p38 的表达, 但以剂量依赖的方式抑制 p-AKT 和 p-ERK 的表达(均 $P < 0.05$); 随着 AA 浓度的增加, cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、BAX 的水平增加, 而 Bcl-2 的水平降低(均 $P < 0.05$)。**结论:** AA 抑制人肝癌细胞的增殖并促使其凋亡, 该作用与 MAPK 和 PI3K/AKT 通路有关。

[关键词] 积雪草酸; 肝癌; Huh7 细胞; 增殖; 凋亡; MAPK; PI3K/AKT

[中图分类号] R735.7; R730.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)05-0506-06

Inhibitory effect of asiatic acid on human liver carcinoma cells *via* cell cycle blockage and apoptosis induction

GUO Bingjie, ZHAO Shasha[△], LING Changquan (Department of Traditional Chinese Medicine, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of asiatic acid (AA) on malignant biological behaviors of human liver cancer cells and to explore the mechanism. **Methods:** Human liver cancer cell line (Huh7) was used as research subject, and treated with different concentrations of AA (0, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) *in vitro*. The effect of AA on cell proliferation was determined by CCK-8 and EdU assay; the apoptosis and cell cycle distribution were detected by flow cytometry, while the expressions of apoptosis-related proteins (AKT, P-ERK 1/2, p38, cleaved-caspase3, cleaved-caspase9, BAX, Bcl-2, AKT, ERK, p38, pro-caspase 3 and pro-caspase 9) were examined by WB. **Results:** AA could inhibit the proliferation of Huh7 cells in a dose- and time-dependent manner (all $P < 0.05$). After being incubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ AA for 24 h, the proliferation of Huh7 cells was significantly inhibited ($P < 0.05$), the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$), and cell cycle was arrested in G1 phase ($P < 0.05$). AA induced p-p38 expression, but inhibited the expression of p-AKT and p-ERK in a dose-dependent manner (all $P < 0.05$). In addition, as the concentration of AA increased, the levels of cleaved-caspase 3, cleaved-caspase 9 and BAX increased, while the level of Bcl-2 decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** AA inhibits the proliferation of human liver cancer cells and promotes its apoptosis, which is associated with the MAPK and PI3K/AKT pathways.

[Key words] asiatic acid(AA); liver carcinoma; Huh7 cell; proliferation; apoptosis; MAPK; PI3K/AKT

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(5): 506-511. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.05.004]

肝细胞癌是一种发病率和病死率均较高的癌症^[1], 就诊时, 只有 20%~30% 的患者可以接受手术切除或肝移植。然而, 由于发病较为隐秘, 早期很难检测到肝细胞癌的发生^[2]。尽管医学技术取得了很大进展, 但肝细胞癌的复发率和病死率仍然很高并且预后很差^[3-4]。常规疗法或靶向疗法不仅对癌细胞有毒性, 对正常细胞也存在杀伤作用, 限制了这些药物的临床应用。因此, 探索副作用较少的低毒新疗法非常迫切。

[基金项目] 国家自然科学基金资助(No. 81430101)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81430101)

[作者简介] 郭冰洁(1992-), 女, 硕士生, 主要从事中医药抗肝癌发生发展的机制及治疗研究, E-mail: jimgbj@163.com; 赵沙沙(1990-), 女, 博士生, 中医药抗肝癌发生发展的机制及治疗研究, E-mail: zss12017142@163.com。△为共同第一作者

[通信作者] 凌昌全(LING Changquan, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 要从事中医药抗肝癌发生发展的机制及治疗研究, E-mail: changquanling@smmu.edu.cn

目前越来越多的研究者认为植物来源抗癌药物是一个很好的发展方向, 例如喜树碱和紫杉醇。积雪草酸(asiatic acid, AA)作为治疗疾病的潜在草药, 存在于积雪草(*Centella asiatica*)和夏枯草(*Prunella vulgaris*)等许多植物中^[1]。AA是积雪草提取物中含量最丰富的成分, 属于五环三萜类^[5]。以往的研究表明AA具有多种药理作用, 如抑制炎症^[6]、降低结肠炎的炎症反应^[7]、保护神经^[8]和抗肿瘤^[9-11]等。然而, 到目前为止, 还没有关于AA在肝细胞癌治疗中的相关研究。本研究旨在探索AA对人肝癌细胞增殖和凋亡的影响, 以及其与MAPK和PI3K/AKT信号转导相关的特定机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人肝癌细胞系 Huh7 和人正常肝细胞系 LO2 由海军军医大学附属长海医院中医药实验室保存。将细胞培养于 10%FBS 的 DMEM 中, 在含 5%CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。

AA 白色粉末购自于 Sigma-Aldrich 公司(分子式: C₃₀H₄₈O₅, 相对分子质量: 488.70, 纯度: 98%), 将其溶解在二甲基亚砜(DMSO; Sigma-Aldrich)中, 浓度为 100 mmol/L, 在 -20 °C 下保存。一抗(p-AKT、AKT、p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38、BAX、Bcl-2、β-actin、cleaved-caspase3、pro-caspase3、cleaved-caspase9、pro-caspase9 抗体)均购自于 Cell Signaling Technology 公司。CCK-8 检测试剂盒、BCA 测定试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司, EdU 检测试剂盒、PI 均购自美国 Invitrogen 公司, 增强的化学发光检测试剂盒购自 Sigma-Aldrich 公司。流式细胞仪 FACS Calibur 购自美国 BD 公司。

1.2 CCK-8 法、EdU 法检测 AA 对 Huh7 细胞活力和增殖的影响

CCK-8 测定和 EdU 试剂盒检测细胞活力。将 1 × 10⁵ 个细胞接种到 96 孔板中并在 37 °C 下培养 24 h, 用不同浓度(0、5、10、25、50、100 μmol/L)的 AA 处理细胞并孵育 12、24 和 48 h, 向每个孔中加入 20 μl CCK-8 染料孵育 0.5 h, 使用酶标仪在 450 nm 处测定光密度(D)值。

EdU 检测细胞增殖。将应用 AA(0、10、50、100 μmol/L)处理的 Huh7 细胞孵育 24 h, 然后在含有 20 mmol/L EdU 的培养基中再孵育 2 h。根据试剂盒说明书进行 EdU 检测, 使用流式细胞术记录数据。

1.3 流式细胞术检测 AA 对 Huh7 细胞周期和凋亡的影响

将 3 × 10⁵ 个 Huh7 细胞接种到 6 孔板的每个孔中, 并向各孔中加入各种浓度的 AA(0、10、50、100 μmol/L), 在 37 °C 下孵育 24 h。收获细胞并悬浮于 500 μl 缓冲液中。加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 并在黑暗中温育 15 min。通过流式细胞术分析染色的细胞, 测定细胞凋亡率。

1.4 WB 检测 AA 对 Huh 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

用 PBS(pH7.4)将 Huh7 细胞清洗 2 次, 然后在含有 1 nmol/L PMSF 的 RIPA 中在冰上裂解 10 min, 然后在 4 °C 离心 10 min 来获取总蛋白质。通过 BCA 测定试剂盒测定蛋白质浓度。使用 10% SDS-PAGE 分离 18 μg 蛋白质, 转移至 PVDF 膜, 并与相关的一抗(1:1 000)在 4 °C 孵育过夜。将膜用 TBST 洗涤 3 次, 持续 15 min, 并与用辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗小鼠, 1:5 000; 山羊抗兔, 1:2 000)在室温下孵育 2 h。使用增强的化学发光检测试剂盒检测免疫反应条带。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 所有细胞实验均设 3 平行孔且独立重复 3 次, 所有数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用配对 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AA 抑制肝癌 Huh7 细胞的细胞增殖活力

CCK-8 检测结果(图 1A)显示, 与对照组相比, 25 μmol/L 的 AA 处理细胞 12 h 后, Huh7 细胞增殖活力开始显著降低($P < 0.05$); 并且随着孵育时间延长, 细胞增殖活力逐渐降低: 12 h 时 IC₅₀ = (42.11 ± 3.17) μmol/L, 24 h 时 IC₅₀ = (29.08 ± 11.51) μmol/L, 48 h 时 IC₅₀ = (18.93 ± 7.22) μmol/L (均 $P < 0.05$)。

进一步检测了 AA 对正常人肝细胞(LO2)的影响以评估毒性, 结果(图 1B)显示, 浓度 50 μmol/L 以下、作用 24 h 以内, AA 对 LO2 细胞的增殖无明显影响(均 $P > 0.05$)。

2.2 AA 抑制 Huh 细胞的增殖并诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期

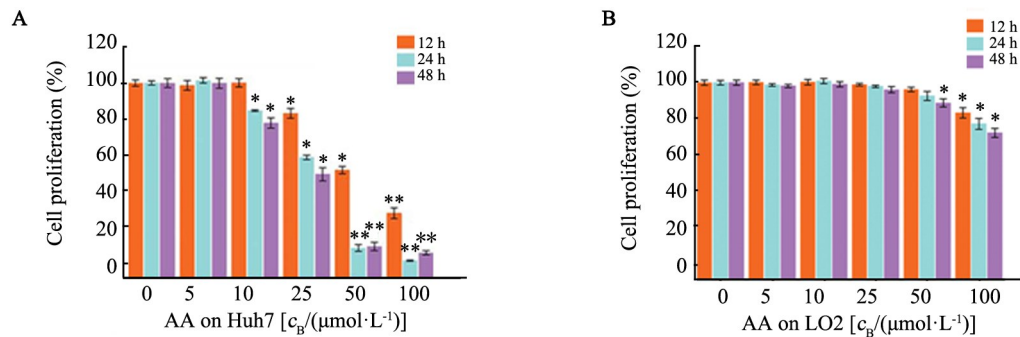
EdU 染色分析结果(图 2A)显示, Huh7 与 AA 孵育 24 h 后, EdU 阳性的 Huh7 细胞百分比显著降低($P < 0.05$); 计算各浓度下的增殖抑制率(图 2B), AA 在 10、50、100 μmol/L 时 Huh7 细胞增殖抑制率分别为 (27.39 ± 1.98)%、(49.37 ± 3.75)% 和 (80.37 ± 2.34)%, 均显著高于对照组(均 $P < 0.05$)。

流式细胞术检测结果(图 2C、D)显示, 用各种浓度(0、10、50、100 μmol/L)的 AA 孵育 Huh7 细胞 24 h

后,随着AA浓度的增加,凋亡率显著增加[(0.94±0.11)%、(9.31±0.20)%、(14.32±0.28)%、(35.36±0.33)%],均P<0.05]。

流式细胞术检测细胞周期分布,在用不同浓度

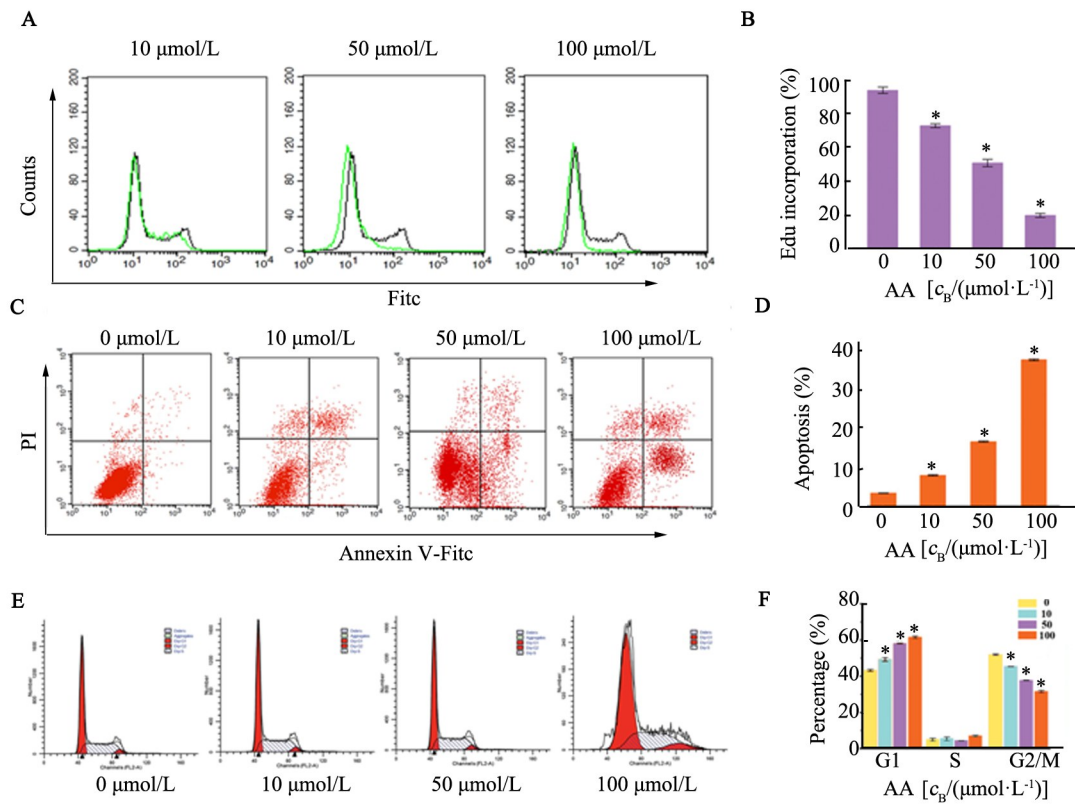
的AA(0、10、50、100 μmol/L)孵育24 h后,与对照组相比,AA以剂量依赖性方式引起G1期延长和G2/M期缩短(均P<0.005,图2E、F),而S期未观察到变化(图2F)。



*P<0.05, **P<0.01 vs 0 μmol/L group

图1 AA对Huh7细胞增殖活力的影响

Fig. 1 Effect of AA on cell viability of Huh7 cells



*P<0.05 vs AA 0 μmol/L group

A: EdU incorporation in Huh7 cells with different concentrations of AA for 24 h measured by flow cytometry. Black curve is 0 μmol/L AA, green curve is 10 μmol/L AA (left), 50 μmol/L AA (middle), 100 μmol/L AA (right); B: Quantification of EdU incorporation in Huh7 cells; C: Effect of different concentrations of AA (0, 10, 50 and 100 μmol/L) treatment for 24 h on Huh7 cells was detected by FITC-Annexin V/PI Flow Cytometry; D: Quantification of apoptosis of Huh7; E: Flow cytometry data revealed cell cycle distributions of Huh7 after incubation with AA (0, 10, 50 and 100 μmol/L) for 24 h; F: Quantification of cell cycle distributions of Huh7

图2 AA对Huh7细胞增殖和凋亡的影响。

Fig. 2 Effect of AA on Huh7 cell proliferation and apoptosis

2.3 AA 调节凋亡相关蛋白质表达

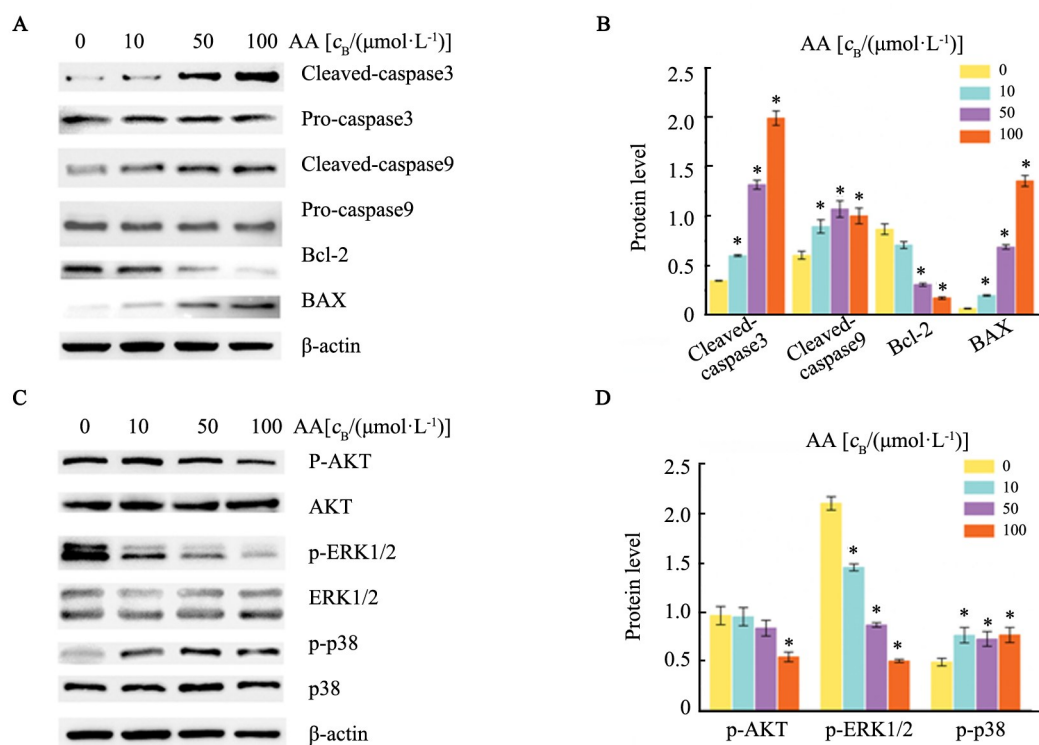
WB 实验结果显示, caspase 激活是细胞凋亡的标志之一。在 Huh7 细胞中, cleaved-caspase3 和 cleaved-caspase9 的蛋白质水平以 AA 剂量依赖性方式增加(均 $P < 0.05$), 而 cleaved-caspase9 的水平在 AA 达到 50 $\mu\text{mol/L}$ 后没有增加(图 3A、B)。此外, 随着 AA 浓度的增加, pro-caspase3 和 pro-caspase9 的水平无明显变化。

BAX 和 Bcl-2 是重要的凋亡相关蛋白, BAX 的表

达水平以 AA 剂量依赖性方式增加, 而 Bcl-2 相反(均 $P < 0.05$)。

2.4 AA 改变肝癌细胞中的信号通路

WB 检测结果显示, Huh7 细胞用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AA 孵育 24 h 后, p-AKT 的水平显著降低($P < 0.05$, 图 3C、D)。随着 AA 浓度的增加, Huh7 细胞中 p-ERK1/2 水平以剂量依赖性方式显著降低(均 $P < 0.05$); p-p38 的表达在 AA 浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 或更高时显著增加(均 $P < 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs AA 0 $\mu\text{mol/L}$ group

A: The expression level of cleaved-caspase3, pro-caspase3, cleaved-caspase9, pro-caspase9, BAX and Bcl-2; B: Quantification of the relative protein expression levels were normalized against the value of β -actin protein expression. Signal pathways associated with MAPK and PI3K/AKT; C: The expression level of p-AKT, AKT, p-ERK1/2, ERK1/2, p-p38 and p38; D: Quantification of the relative protein expression levels were normalized against the value of β -actin protein expression

图3 AA对凋亡分子和信号通路表达的影响

Fig. 3 Effect of AA on the expression of apoptotic molecules and signaling pathways

3 讨论

到目前为止, 手术和局部治疗已被认为是治疗肝癌的两种有效疗法。然而, 由于肝癌早期难以诊断, 一些患者错过了接受手术和治疗的机会。此外, 患者对某些靶向药物有不良反应, 且耐受性差^[12]。因此, 植物化学药物越来越多地进入人们的视线。近年来的报道^[13-14]认为, AA对胆管癌和肺癌等各种肿瘤有一定的缓解作用。然而, 关于AA治疗肝癌的报道还很少见^[11,15]。据报道^[6], AA可通过下调NDR1/2

激酶的水平来增强p21^{WAF1/CIP1}的稳定性, 其在ser-146磷酸化p21^{WAF1/CIP1}并抑制HepG2细胞的增殖。p21^{WAF1/CIP1}是一种细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂, 可通过抑制细胞周期蛋白-CDK复合物的形成来阻止细胞周期进程。在本研究中发现, AA还可以通过抑制细胞从G1向G2/M期转化, 进而阻断细胞增殖, 表明AA对肝细胞癌的具有治疗作用。

为了进一步探讨AA在Huh7细胞凋亡中的作用机制, 本研究使用WB检测相关信号通路: MAPK和PI3K/AKT信号通路, 发现AA可诱导p-p38的表达,

并且以剂量依赖的方式抑制 p-AKT 和 p-ERK 的表达。此外,随着 AA 浓度的增加,cleaved-caspase3,cleaved-caspase9 和 BAX 的水平增加,而 Bcl-2 的水平降低。

PI3K/AKT 信号通路是调节细胞增殖,分化和凋亡的重要通路,主要作用为促进细胞存活,增殖,抗凋亡,血管生成和化疗耐受^[17-19]。AKT 被认为是 PI3K/AKT 信号传导途径的关键下游分子。AKT 的激活可促进细胞增殖并抑制细胞凋亡,从而促进肿瘤生长^[20]。在本研究中,p-AKT 的表达随着 AA 浓度的增加而降低,表明 AA 可以下调 AKT 并进一步抑制 Huh7 的生长。

MAPK 信号通路是细胞中重要的信号通路,主要由细胞外调节蛋白激酶(ERK),p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)介导^[21,22]。ERK 信号传导途径涉及肝细胞癌细胞的增殖。因此,抑制 ERK 信号通路为开发治疗肝细胞癌的新型靶向药物提供了新的思路^[23]。p38 MAPK 是 MAPK 信号传导途径家族的重要成员,该通路的激活与肿瘤细胞凋亡有关^[24]。基于这些知识,本研究检测了 AA 对 p-ERK1/2 和 p-p38 的影响,发现 P-ERK1/2 的表达降低,p-p38 的表达呈剂量依赖性增加,表明 AA 可能通过调节 ERK 以及 p38 信号通路抑制 Huh7 的增殖。

BAX 和 Bcl-2 是细胞凋亡过程中的重要蛋白质^[25]。在凋亡过程中,caspase3 充当关键的执行蛋白。Bcl-2 基因家族可分为 3 类:抑制细胞凋亡的 Bcl-2 亚家族,促进细胞凋亡的 BAX 亚家族和促凋亡蛋白的特殊成员 BH3 亚家族^[26]。Caspase3 可作为 Bcl-2 调节细胞凋亡的上游调节机制。BAX 的高表达和 Bcl-2 的低表达可刺激线粒体释放细胞色素 c 并激活 caspase9,从而刺激 caspase3 的活化并导致细胞凋亡^[27-28]。在本研究中发现,AA 可以通过上调 BAX 和下调 Bcl-2 以剂量依赖性方式诱导细胞凋亡。

总之,本研究结果表明,AA 可通过调节 MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路抑制肝细胞癌细胞的增殖、阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡。然而,由于潜在的机制很复杂,因此需要今后更深入的研究进一步探讨。

[参考文献]

- [1] NAGOOR MEERAN M F, GOYAL S N, SUCHAL K, et al. Pharmacological properties, molecular mechanisms, and pharmaceutical development of asiatic acid: A pentacyclic triterpenoid of therapeutic promise[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 892[2019-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6131672/>. DOI: 10.3389/fphar.2018.00892.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [3] DANG H, TAKAI A, FORGUES M, et al. Oncogenic activation of the RNA binding protein NELFE and MYC signaling in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Cancer Cell*, 2017, 32(1): 101-114.e8[2019-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5539779/>. DOI:10.1016/j.ccell.2017.06.002.
- [4] HOSHIDA Y, FUCHS B C, BARDEESY N, et al. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma[J/OL]. *J Hepatol*, 2014, 61(1 Suppl): S79-S90[2019-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435677/>. DOI:10.1016/j.jhep.2014.07.010.
- [5] PARK J H, SEO Y H, JANG J H, et al. Asiatic acid attenuates methamphetamine-induced neuroinflammation and neurotoxicity through blocking of NF- κ B/STAT3/ERK and mitochondria-mediated apoptosis pathway[J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 240[2019-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725763/>. DOI: 10.1186/s12974-017-1009-0.
- [6] XIONG Y Y, CHENG X, YIN Q, et al. Asiatic acid attenuates lipopolysaccharide-induced injury by suppressing activation of the Notch signaling pathway[J/OL]. *Oncotarget*, 2018, 9(19): 15036-15046[2019-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871095/>. DOI:10.18632/oncotarget.24542.
- [7] GUO W J, LIU W, JIN B, et al. Asiatic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via suppressing mitochondria-mediated NLRP3 inflammasome activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 232-238. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.12.009.
- [8] HAO Y J, HUANG J W, MA Y, et al. Asiatic acid inhibits proliferation, migration and induces apoptosis by regulating Pcd4 via the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway in human colon carcinoma cells[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8223-8230[2019-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5950025/>. DOI:10.3892/ol.2018.8417.
- [9] MA K F, ZHANG Y Y, ZHU D Y, et al. Protective effects of asiatic acid against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity in hepatocytes and kupffer cells co-cultured system via redox-regulated leukotriene C4 synthase expression pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603(1/2/3): 98-107. DOI:10.1016/j.ejphar.2008.11.054.
- [10] PARK B C, BOSIRE K O, LEE E S, et al. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2005, 218(1): 81-90. DOI:10.1016/j.canlet.2004.06.039.
- [11] CHEN J Y, CHEN J Y, XU Q W, et al. Asiatic acid promotes p21 (WAF1/CIP1) protein stability through attenuation of NDR1/2 dependent phosphorylation of p21(WAF1/CIP1) in HepG2 human hepatoma cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2): 963-967.
- [12] LING C Q, YUE X Q, LING C. Three advantages of using traditional Chinese medicine to prevent and treat tumor[J]. *J Integr Med*, 2014, 12(4): 331-335. DOI:10.1016/S2095-4964(14)60038-8.
- [13] SAKONSINSIRI C, KAEWLERT W, ARMARTMUNTREE N, et al. Anti-cancer activity of asiatic acid against human cholangiocarcinoma cells through inhibition of proliferation and induction of apoptosis[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64(10): 28-33.
- [14] WU T C, GENG J, GUO W J, et al. Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro and in vivo by destroying mitochondria[J/OL].

- Acta Pharm Sin B, 2017, 7(1): 65-72[2019-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5237705/>. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.04.003.
- [15] LEE Y S, JIN D Q, KWON E J, et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca^{2+} release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2002, 186(1): 83-91.
- [16] ZHANG P H, LI J, QI Y W, et al. Vitamin C promotes the proliferation of human adipose-derived stem cells via p53-p21 pathway[J]. *Organogenesis*, 2016, 12(3): 143-151. DOI: 10.1080/15476278.2016.1194148.
- [17] MIZOGUCHI A. Animal models of inflammatory bowel disease [M]/MIZOGUCHI A. eds. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, 2012: 263-320. DOI:10.1016/b978-0-12-394596-9.00009-3.
- [18] TSO P, LIU M. Apolipoprotein (apo) A-IV/apoE[M]/TSO P, LIU M. eds. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier, 2013: 1057-1063. DOI:10.1016/b978-0-12-385095-9.00141-x.
- [19] SEARS R M, SCHIFF H C, LEDOUX J E. Molecular mechanisms of threat learning in the lateral nucleus of the amygdala[M]/SEARS R M, SCHIFF H C, LEDOUX J E. eds. *Progress in molecular biology and translational science*. Elsevier, 2014: 263-304. DOI: 10.1016/b978-0-12-420170-5.00010-6.
- [20] BOCCALINI G, SASSOLI C, BANI D, et al. Relaxin induces up-regulation of ADAM10 metalloprotease in RXFP1-expressing cells by PI3K/AKT signaling[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 472: 80-86. DOI:10.1016/j.mce.2017.11.021.
- [21] GOLDSMITH C S, BELL-PEDERSEN D. Diverse roles for mapk signaling in circadian clocks[M]/GOLDSMITH C S, BELL-PEDERSEN D. eds. *Advances in genetics*. Elsevier, 2013: 1-39. DOI: 10.1016/b978-0-12-407703-4.00001-3.
- [22] UGRINOVA I, PETROVA M, CHALABI-DCHAR M, et al. Multifaceted nucleolin protein and its molecular partners in oncogenesis [M]/UGRINOVA I, PETROVA M, CHALABI-DCHAR M, et al. eds. *Advances in protein chemistry and structural biology*. Elsevier, 2018: 133-164. DOI:10.1016/bs.apcsb.2017.08.001.
- [23] SON Y, KIM S, CHUNG H T, et al. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases[M]/SON Y, KIM S, CHUNG H T, et al. eds. *Hydrogen peroxide and cell signaling, part C*. Elsevier, 2013: 27-48. DOI:10.1016/b978-0-12-405881-1.00002-1.
- [24] GIORDANI L, PARISI A, LE GRAND F. Satellite cell self-renewal [M]/GIORDANI L, PARISI A, LE GRAND F. eds. *Current topics in developmental biology*. Elsevier, 2018: 177-203. DOI:10.1016/bs.ctdb.2017.08.001.
- [25] LUO J. Role of autophagy activation in alleviating alcohol neurotoxicity[M]/LUO J. eds. *Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging*. Elsevier, 2017: 419-434. DOI:10.1016/b978-0-12-812146-7.00021-4.
- [26] SUN H. Chapter 3 structure-based ligand design II with structure of Protein/Lead compound complex unavailable[J]. *A Practical Guide to Rational Drug Design*, 2016: 61-108. DOI:10.1016/B978-0-08-100098-4.00003-X.
- [27] DAGBAY K, ERON S J, SERRANO B P, et al. A multipronged approach for compiling a global map of allosteric regulation in the apoptotic caspases[M]/DAGBAY K, ERON S J, SERRANO B P, et al. eds. *Regulated cell death part a: apoptotic mechanisms*. Elsevier, 2014: 215-249. DOI:10.1016/b978-0-12-417158-9.00009-1.
- [28] SEERVI M, XUE D. Mitochondrial cell death pathways in *Caenorhabditis elegans*[M]/SEERVI M, XUE D. eds. *Current topics in developmental biology*. Elsevier, 2015: 43-65. DOI:10.1016/bs.ctdb.2015.07.019.

[收稿日期] 2019-03-21

[修回日期] 2019-04-20

[本文编辑] 黄静怡