

# 乌贼墨多肽诱导人前列腺癌 DU-145 细胞凋亡的 机制研究

景奕文, 杨最素, 黄芳芳, 郁迪, 丁国芳

(浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江舟山 316004)

**摘要:** 本文探讨了乌贼墨多肽(SHP)诱导 DU-145细胞凋亡机制。采用 CCK-8法检测 SHP 对 DU-145细胞增殖的影响; 采用 HE 染色和 AO/EB 荧光染色观察 DU-145细胞的形态学的变化; 采用流式细胞术检测细胞早期凋亡率; 并通过 Western Blotting 检测细胞中 *p53*、*Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3*、*VEGF* 的蛋白表达变化。结果表明, SHP 对 DU-145细胞的增殖具有明显的抑制作用且呈现剂量和时间依赖性; SHP 作用后的 DU-145细胞出现凋亡的形态学特征; 流式细胞术结果显示, 随着 SHP 浓度和作用时间的增加, DU-145细胞的早期凋亡率从12.25%增加到34.20%; Western Blotting 结果显示, 当 SHP 作用24 h后, *VEGF*、*Bcl-2*蛋白表达量降低, *p53*、*Bax*、*Caspase-3*蛋白表达量增加。综上可知, SHP 能够诱导 DU-145细胞凋亡, 其机制有可能是通过激活抑癌基因 *p53*, 下调 *Bcl-2/Bax* 比例; 下调 *VEGF*, 激活凋亡蛋白酶 *Caspase-3*, 诱发凋亡级联反应来实现的。

**关键词:** 乌贼墨; 多肽; 凋亡

文章编号: 1673-9078(2014)9-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.001

## Mechanism of Sepia Ink Polypeptide-induced Apoptosis in DU-145 Prostate Cancer Cells

JING Yi-wen, YANG Zui-su, HUANG Fang-fang, YU Di, DING Guo-fang

(School of Food Science and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan 316004, China)

**Abstract:** In this study, the mechanism of apoptosis induced by sepia ink polypeptide (SHP) in DU-145 prostate cancer cells was explored. The effect of SHP on the proliferation of DU-145 cells was examined by the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. Typical morphological changes in DU-145 cells were observed with hematoxylin and eosin (HE) and acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining. The early-stage apoptosis rate was measure using flow cytometry (FCM), and the changes in the expression of apoptosis-related genes (*p53*, *Bcl-2*, *Bax*, *Caspase-3*, and *VEGF*) were evaluated via western blotting. The results showed that SHP significantly inhibited the proliferation of DU-145 cells in a time-and dose-dependent manner. DU-145 cells developed morphological features of apoptosis after treated with SHP. FCM studies revealed that the early-stage apoptosis rate of DU-145 cells increased from 12.25% to 34.20% with increasing SHP concentration and duration of treatment. Western blotting results showed that after 24 h treatment with SHP, the expression of anti-apoptotic proteins *Bcl-2* and *VEGF* decreased, while the expression of *p53*, *Bax*, and *Caspase-3* increased. Collectively, these results suggest that SHP induced apoptosis in DU-145 cells. The mechanism might involve the decrease in *Bcl-2/Bax* expression ratio by activation of the tumor suppressor gene *p53*. Moreover, *VEGF* expression was down regulated, and apoptotic protease *Caspase-3* was activated, thus triggering the apoptosis cascade reaction.

**Key words:** sepia ink; polypeptides; apoptosis

收稿日期: 2014-02-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81273429); 浙江省科技厅重大专项(2010C13009; 2011002003); 浙江省自然科学基金立项(LY12C20005; LY12C20008); 舟山市科技计划项目(2012C23023)

作者简介: 景奕文(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋药物、海洋功能食品

通讯作者: 丁国芳(1958-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 海洋药物、海洋功能食品

前列腺癌是危害男性健康的常见恶性肿瘤之一,其发病率、死亡率在全球男性全部恶性肿瘤中均居高位;我国是前列腺癌发病及死亡较低的国家之一,但近年来,我国男性前列腺癌发病率有明显上升趋势,因此,如何有效预防和治疗前列腺癌成为科学家们研究的热点<sup>[1]</sup>。乌贼墨(*Sepia Ink*)是乌贼抵御外敌入侵时喷射的一种黑色物质,在《本草拾遗》中就有“腹中墨,主治血刺心痛”的记载,作为一味传统止血药,历史悠久。上世纪90年代,日本学者研究表明,乌贼墨具有很好的抗肿瘤活性。近年来,越来越多的研究表明,乌贼墨及其提取物能够通过多种途径来实现抗肿瘤作用,比如诱生多种肿瘤坏死因子、白介素、干扰素等多种抗肿瘤细胞因子,增强自然杀伤细胞、巨噬细胞、红细胞等免疫细胞的功能活性等<sup>[2]</sup>,本实验室先前研究表明一定浓度的乌贼墨寡肽、肽聚糖均能通过诱导DU-145细胞凋亡而抑制其增殖生长<sup>[3-5]</sup>。但尚未见乌贼墨多肽(*sepia ink polypeptides*, SHP)对人前列腺癌DU-145细胞株研究的报道。本实验旨在探讨SHP对DU-145细胞增殖的影响,是否诱导细胞凋亡及相关的机制,以期研究乌贼墨多肽抗前列腺癌作用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

乌贼墨,购于舟山市农贸市场,由浙江海洋学院赵盛龙教授进行种类鉴定;本研究采用正交设计方法,经过超滤得到SH-1(小于1 kd)、SH-2(1~3 kd)、SH-3(3~5 kd)、SH-4(5~10 kd)、SH-5(大于10 kd)五个组分,对抗肿瘤活性最高的组分SH-2进行进一步的分离纯化,经过G-25凝胶柱(2.6×65 cm)层析分离得到SH-2-1、SH-2-2、SH-2-3三个洗脱峰,将活性最高的组分SH-2-2进行高效液相进行分离纯化,将纯化肽进行氨基酸序列分析,得到的氨基酸序列为Leu-Lys-Glu-Glu-Asn-Arg-Arg-Arg-Asp。

CCK-8 购于日本同仁化学研究所, F12 培养基购于 Gibco 公司, 胎牛血清(FBS)购于杭州四季青生物科技公司。Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒购于上海贝博生物, *p53*、*Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 抗体均购自 Cell Signaling 公司、VEGF 抗体购自 Santa Crus 公司, 辣根酶标记的山羊抗小鼠辣根酶标记抗体、山羊抗兔辣根酶标记抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 细胞株

人前列腺癌 DU-145 细胞株购于中科院上海细胞库, 由本实验室传代保存。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

DU-145 细胞接种于含有 10% FBS、双抗溶液的 F12 培养基中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 饱和湿度条件下的培养箱中常规培养; 当细胞生长饱和度超过 80% 时, 按 1:2 的比例进行传代培养。

### 2.2 细胞增殖抑制实验 (CCK-8 法)

将 DU-145 细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞数接种于 96 孔培养板中, 每孔培养液 200  $\mu$ L。设对照组和加药组, 加药组药物浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL、20 mg/mL 的 SHP, 同时设置 4 个平行对照, 常规条件下培养 24 h、48 h、72 h 后, 弃培养液, 每孔加入加 PBS 90  $\mu$ L, CCK-8 溶液 10  $\mu$ L, 孵育 4 h 终止培养。选择 450 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔光密度值 A, 重复试验 3 次。细胞增殖抑制率 IR 公式如下:

$$IR/\% = [(对照组A值 - 加药组A值) / 对照组A值] \times 100\%$$

### 2.3 HE染色观察细胞形态

于 6 孔培养板内放入经处理过的盖玻片, 将浓度为  $1 \times 10^5$  cells/mL DU-145 细胞悬浮液接种于培养板中的盖玻片上, 常规条件下培养 24 h, 弃培养液, 加入 5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL 的 SHP, 并设立空白对照组。24 h 后, 取出盖玻片, 95% 乙醇固定 20 min。PBS 洗 2 次, 苏木素染色 5 min, 自来水浸洗使细胞核蓝化, 伊红复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察并拍片。

### 2.4 AO/EB 荧光染色观察细胞形态

细胞培养及对照组设置方法同 2.3, 实验结束, 用 95% 乙醇固定 30 min。取 AO 和 EB 各 1 mg 分别溶解于 10 mL pH 7.2 的 PBS 缓冲液中, 摇匀混合, 现配现用, 避光保存。观察前于载玻片上滴加 40  $\mu$ L PBS 和 10  $\mu$ L AO/EB 混合液, 有细胞的一面朝下, 荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.5 流式细胞仪分析细胞凋亡率

DU-145 细胞以  $1 \times 10^5$  接种在 25 mL 的培养瓶中, 常规培养 24 h 后加入浓度分别为 5 mg/mL、10 mg/mL 和 15 mg/mL 的 SHP 溶液, 设立空白对照组。细胞凋亡检测方法参照试剂盒中的操作方法进行。培养结束,

用 0.25% 的胰蛋白酶液进行消化, 将用预冷的 PBS 制成的细胞悬液移入离心管, 1000 r/min 离心 5 min。吸去上清液, 加入 1×Annexin V 结合液 400  $\mu$ L, 吹打成细胞悬液。加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 染液, 轻轻混匀后, 避光孵育 15 min 后, 加入 5  $\mu$ L 的 PI, 室温下放入暗室静置 5 min 后上机分析。

## 2.6 Western Blotting 检测蛋白表达

药物浓度及分组设置同 2.3, 加入 RIPA(500  $\mu$ L/75  $\text{mm}^2$ )+PMSF(10  $\mu$ L/mL)后反复吹打, 冰上孵育 30 min 使细胞充分裂解, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 收集细胞裂解液, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。按照测定的蛋白含量取等体积的蛋白提取液, 与 6×蛋白上缓冲液按 1:5 的比例混合, 沸水浴 5 min 后, -20  $^{\circ}\text{C}$  储存备用。采用 SDS-PAGE 法, 按照实验需要先后配置分离胶和浓缩胶; 取蛋白样品各 20  $\mu$ L 经上样缓冲液处理后上样, 电压 60 V 电泳 20 min 后转换电压 100 V, 电泳 60 min; 采用电半干方法在转膜溶液中将蛋白转印至 PVDF 膜上, 用含 20% Tween-20 的 TBST 溶液漂洗 1~2 次后, 将 PVDF 膜至于 5% 脱脂奶粉中 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜; TBST 溶液洗膜 1~2 次, 将膜置于 1% BSA 溶液稀释后的一抗(稀释比例参照使用说明书)的杂交袋, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 洗膜后加入 1% BSA 的溶液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例参照说明书), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后, ECL 显影, 应用 Alpha 化学发光仪进行扫描并记录光密度强度。以  $\beta$ -actin 作为内参对照校正并做相对量分析, 数值以两者的光密度值积分比值表示。

## 2.7 数据分析

所有实验组均进行 3 次平行试验 ( $n=3$ ), 实验数据使用 SPSS 18.0 统计软件分析处理, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

### 3.1 SHP 对 DU-145 细胞增殖活性的影响

不同浓度 SHP 作用后对 DU-145 细胞的增殖的影响如图 1 所示, 当 SHP 浓度为 5 mg/mL 作用细胞 24 h 时, 细胞增殖抑制率为 23.65%, 浓度增加至 20 mg/mL 时, 抑制率达到 85.79%, 半数抑制浓度率 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为 8.53 mg/mL; 随着作用时间的延长, 作用 48 h 时,  $\text{IC}_{50}$  为 7.4 mg/mL; 作用 72 h 时,  $\text{IC}_{50}$  为 6.10 mg/mL。随着 SHP 浓度的增加和作用时间的延长, 增殖抑制指数明显上升, 与对照组相比有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

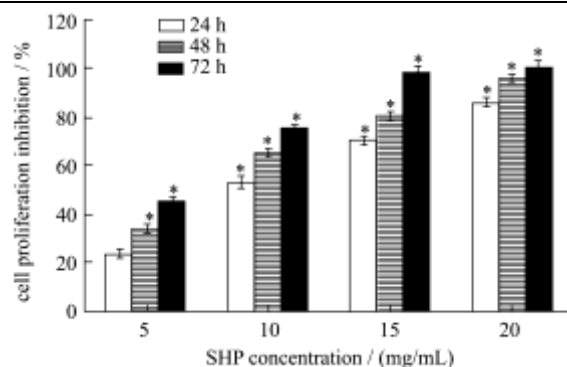


图 1 SHP 对 DU-145 细胞增殖的影响

Fig.1 The effect on the proliferation of DU-145 cells treated with SHP

### 3.2 DU-145 细胞光镜下观察结果

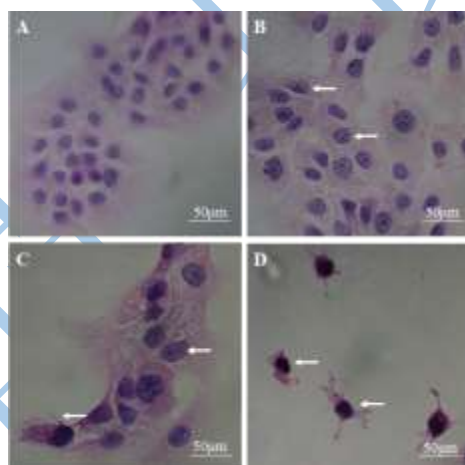


图 2 SHP 对 DU-145 细胞形态的影响 (HE 染色,  $\times 400$ )

Fig.2 Effects on Morphologic changes in DU-145 cells treated with SHP (HE,  $\times 400$ )

注: A-空白对照组; B-5 mg/mL 组; C-10 mg/mL 组; D-15 mg/mL 组。

HE 染色结果如图 2 所示, 正常组的 DU-145 细胞生长良好, 细胞间排列紧密, 形态饱满, 细胞质染色均一, 细胞核大小均较规则, 核仁数目多。SHP 作用 24 h 后, DU-145 细胞出现细胞间隙增大, 轮廓模糊, 形态不规则, 较多突起等现象, 胞质出现空泡, 异染色质增多, 核质比增大, 核仁数目减少; 高浓度组还出现了染色质凝聚, 核固缩等细胞凋亡的形态学变化。

### 3.3 AO/EB 荧光观察结果

SHP 作用于 DU-145 细胞 24 h 后, 细胞经 AO/EB 染色, 用药组细胞出现了明显的早期凋亡的形态学特征。实验结果如图 3 所示, 正常对照组无明显凋亡细胞出现。细胞大小均匀, 细胞核形态规则, 胞核及胞浆均呈现绿色荧光; SHP 作用 24 h 时, 细胞出现早期凋亡的现象, 细胞出现明显的出芽现象, 胞质及胞核

发生了变化,胞质出现空泡,胞核浓缩成颗粒状,并呈现黄绿色荧光。随着用药浓度的增加,早期凋亡的细胞和晚期凋亡的细胞明显增多,细胞核呈固缩状或圆珠状,呈现偏橙黄色,出现了凋亡小体。

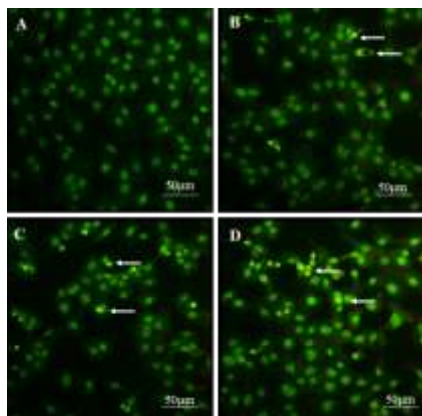


图3 SHP对DU-145细胞凋亡形态的影响(AO/EB染色,×400)

Fig.3 The apoptosis morphologic observation of DU-145 cells treated with SHP (AO/EB staining, ×400)

注: A-空白对照组; B-5 mg/mL组; C-10 mg/mL组; D-15 mg/mL组。

### 3.4 流式细胞术检测结果

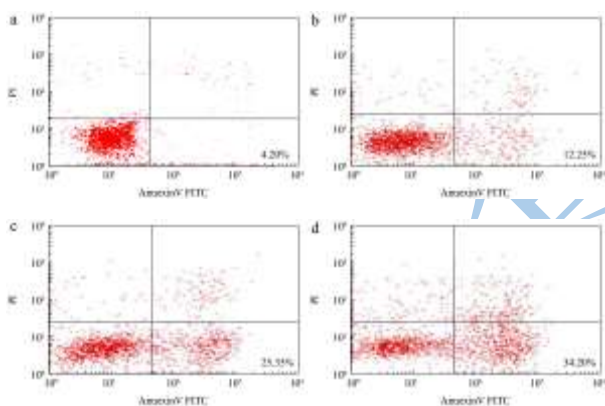


图4 SHP对DU-145细胞早期凋亡的影响, Annexin V-FITC/PI双染

Fig.4 The percentage of early apoptotic DU-145 cells incubated with SHP, Annexin V-FITC/PT staining

注: a-空白对照组; b-5 mg/mL组; c-10 mg/mL组; d-15 mg/mL组。

本实验采用 Annexin V-FITC/PI 双染的方法检测细胞早期凋亡率。如图4所示,以 FITC 和 PI 荧光作双参数点图,细胞分成4个区:左下象限(LL) Annexin V-FITC/PI<sup>-</sup>,代表正常细胞;左上象限(UL) Annexin V-FITC/PI<sup>+</sup>,代表机械损伤细胞;右下象限(LR) Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>,为早期凋亡细胞;右上象限(UR) Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>凋亡晚期或坏死细胞。如图4所示,阴性对照组细胞基本分布在 LL 区域,加以

不同浓度的 SHP 作用于 DU-145 细胞 24 h 后, LR 的细胞明显增多,即是早期凋亡细胞增多,随用药浓度的增加, DU-145 细胞的早期凋亡率也随之增加。当 SHP 浓度达到 15 mg/mL 时,细胞早期凋亡率达到 34.20%。

### 3.5 Western blotting 结果

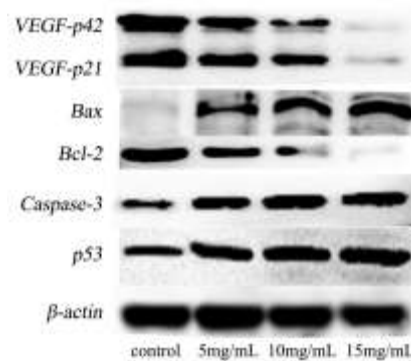


图5 SHP作用24h后,DU-145细胞中p53、Bcl-2、Bax、Caspase-3、VEGF的蛋白表达

Fig.5 Expression of p53, Bcl-2, Bax, Caspase-3, VEGF proteins in DU-145 cells treated with SHP for 24 h

DU-145 细胞经不同浓度的 SHP (5、10、15 mg/mL)作用 24 h 后, p53、caspase3、Bcl-2/Bax、VEGF 的蛋白电泳条带结果如图5所示。经 Alpha 化学发光系统数据分析后各基因的蛋白水平表达如图6所示。

Western blot 结果显示,肿瘤抑制基因 p53 的表达量随着 SHP 浓度的增加而逐渐增加, 15 mg/mL 时其相对表达量增至 0.44±0.01, 较对照组差异具有显著性 (P<0.05); 15 mg/mL SHP 组细胞中的 Bcl-2 蛋白表达水平较对照组明显降低, Bax 蛋白表达水平也显著增加; Caspase 3 被明显激活, 相对表达量分别达到对照组的 2.15 倍; 15 mg/mL SHP 对细胞中 VEGF 的表达也有显著的下调作用。结果表明一定浓度的 SHP 对 p53、Caspase-3 及 Bax 蛋白表达量均具有明显的上调作用,对 Bcl-2、VEGF 蛋白表达具有明显的下调作用。

### 4 讨论

本实验室先前研究表明, 乌贼墨寡肽能抑制 DU-145 细胞增殖, 阻滞细胞在 S 和 G<sub>2</sub>/M 期, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与 Bcl-2 表达的下调, Bax 和 Caspase-3 表达水平的增加有关<sup>[4]</sup>。本实验从乌贼墨酶解物中提取分离得到一种抗前列腺癌活性的多肽 SHP, CCK-8 法结果表明 SHP 对 DU-145 细胞具有明显的增殖抑制作用, 且呈现明显的剂量和时间依赖性。我们进一步利用 HE 染色和 AO/EB 实验证实了 SHP 能够诱导 DU-145 细胞凋亡。我们同时采用了流式细

胞术检测 SHP 对 DU-145 细胞早期凋亡的影响, 结果表明 5 mg/mL SHP 有促进 DU-145 细胞凋亡作用, 且凋亡率随其浓度的升高而逐渐增加。

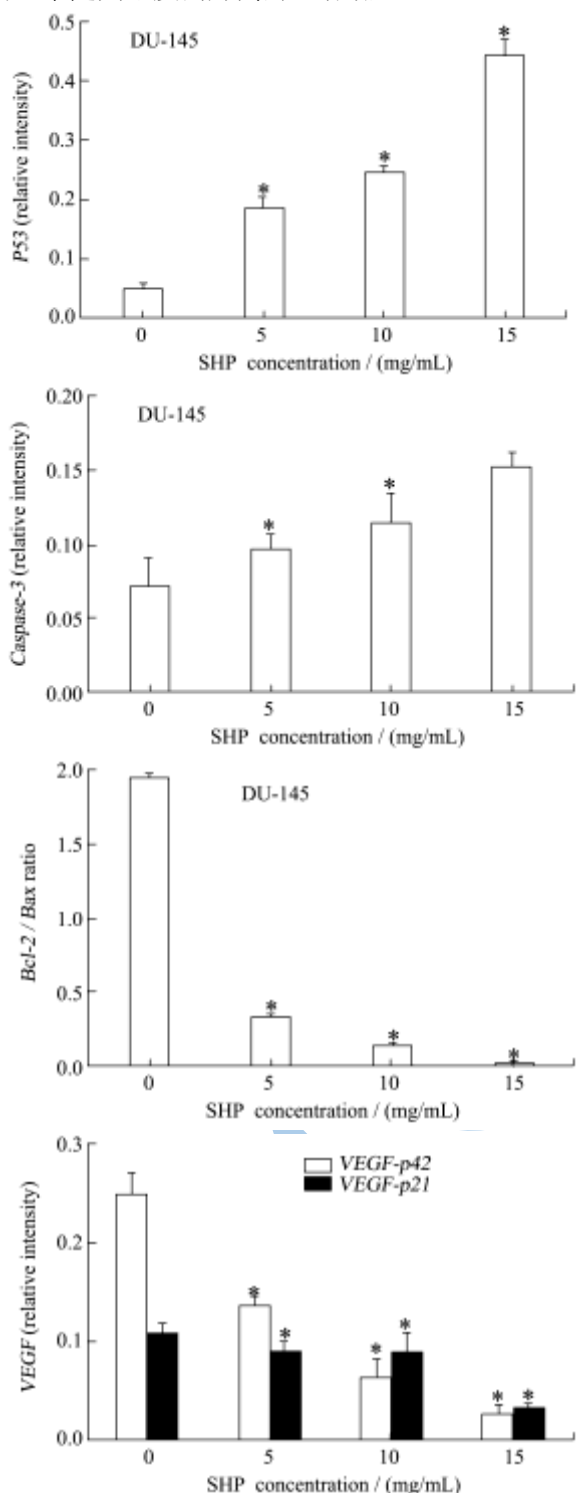


图 6 SHP 作用 DU-145 细胞后各凋亡相关基因的蛋白表达水平示意图

Fig.6 The proteins expression level of related- apoptosis genes in DU-145 cells treated with SHP for 24 h

注: a: p53 蛋白表达含量增加示意图; b: Caspase-3 蛋白表达示意图; c: Bcl-2/Bax 比值变化示意图; d: VEGF-p42、

VEGF-21 蛋白表达示意图。

细胞凋亡是一种由基因控制的程序化细胞死亡的方式, 其过程伴随着一系列与凋亡相关的基因、蛋白的影响和调控等复杂的分子生物机制, 与肿瘤的肿瘤的发生、发展和治疗过程与细胞凋亡有着密不可分的联系。细胞凋亡通常包括外源性(死亡受体介导)和内源性(线粒体凋亡)两条经典途径<sup>[6]</sup>。本研究采用 Western blotting 技术, 探讨 SHP 诱导 DU-145 凋亡的作用机制。

Bcl-2 家族是在细胞凋亡中有非常重要作用的一类蛋白质, Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抗凋亡和促凋亡基因, 在细胞凋亡信号传导途径中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。而且 Bcl-2/Bax 比值对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义, 当其比值降低时, 细胞趋于凋亡<sup>[8]</sup>。本实验显示经 5 mg/mL、10 mg/mL 及 15 mg/mL 浓度 SHP 作用后, Bax 蛋白表达水平上升, Bcl-2 蛋白表达量明显下降, 且 Bcl-2/Bax 比值降低, 提示 SHP 通过上调 Bax 蛋白表达, 下调 Bcl-2 蛋白表达, 破坏了 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达平衡, 即显著降低其比值, 促使 DU-145 细胞凋亡。

Caspase 是一类细胞凋亡过程中发挥着重要作用的半胱氨酸蛋白酶。Caspase-3 是 Caspase 家族中执行细胞凋亡的主要蛋白酶之一, 细胞凋亡过程中的主要效应因子, 绝大多数的触发细胞凋亡因素最终都通过 Caspase-3 介导的信号传递途径导致细胞凋亡<sup>[9]</sup>。实验结果表明, 不同浓度的 SHP 均能够上调 Caspase-3 蛋白表达量。提示, SHP 通过促进细胞凋亡途径关键半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3 的活化诱导 DU-145 细胞凋亡。

血管内皮生长因子 VEGF 又称为血管通透性因子, 是一种高度特异性的促血管生长因子, 对内皮细胞的增生有强烈的刺激作用, 能够增加血管通透性, 促进肿瘤血管形成<sup>[10]</sup>。本实验结果显示, 不同浓度的 SHP 作用 DU-145 细胞后, VEGF-p21 和 VEGF-p42 蛋白相对表达量均显著降低。提示: SHP 通过抑制血管通透性因子来抑制 DU-145 细胞增殖的。

p53 基因作为一个肿瘤抑制基因而备受关注, 野生型 p53 基因与多种促凋亡和抗凋亡基因之间相互调节构成 p53 基因网络, 诱导肿瘤细胞凋亡引发凋亡级联反应等功能<sup>[11~12]</sup>。比如, 野生型 p53 可通过调节 Bax 和 Bcl-2 的平衡状态来实现其对细胞凋亡的调控作用; p53 能够通过一系列途径下调血管内皮生长因子 VEGF 蛋白的表达, 在肿瘤血管生成过程中起到至关重要的作用<sup>[13]</sup>。本实验中, 肿瘤抑制基因 p53 蛋白表达随着 SHP 浓度的增加而升高。提示: SHP 作用于

DU-145 细胞后, 激活细胞中的肿瘤抑制基因 *p53*, 从而诱发了与 *p53* 基因相关的信号传导通路, 最终导致 DU-145 细胞的凋亡。

综上所述, SHP 可能通过激活肿瘤抑制基因 *p53*, 下调促凋亡基因 *Bcl-2*、*VEGF* 蛋白表达, 上调 *Bax* 蛋白表达, 且下调 *Bcl-2/Bax* 比值, 活化细胞凋亡执行蛋白酶 *Caspase-3*, 激活与其相关的凋亡信号通路, 最终诱导 DU-145 细胞凋亡。

## 5 结论

乌贼墨多肽 SHP 可以显著抑制 DU-145 细胞的增殖, 且能够诱导 DU-145 细胞凋亡, 凋亡的机制是激活 *p53* 基因, 调节 *VEGF*、*Bcl-2*、*Bax* 与细胞凋亡相关基因的蛋白表达水平, 活化细胞凋亡执行蛋白酶 *Caspase-3*, 诱发相关的级联凋亡程序, 最终诱导 DU-145 细胞凋亡。而 SHP 是否诱导体内前列腺癌细胞凋亡, 还有待于下一步的体内实验探讨研究。

## 参考文献

- [1] Zhang L, Yang B X, Zhang H T, et al. Prostate cancer: an emerging threat to the health of aging man in Asia [J]. *Asian J. Androl.*, 2011, 13(4): 574-578
- [2] 张倩, 张建民, 田蕊. 乌贼墨抗肿瘤活性研究进展[J]. *中国海洋药物学杂志*, 2012, 31(5): 59-62  
ZHANG Qian, ZHANG Jian-min, TIAN Rui. Researches on the antitumor activities of squid ink [J]. *Chin. J. Mar. Drugs*, 2012, 31(5): 59-62
- [3] HUANG Fang-fang, YANG Zui-su, DING Guo-fang, et al. Anticancer activity of an oligopeptide isolated from hydrolysates of sepia ink [J]. *Chin. Nat. Med.*, 2011, 9: 151-155
- [4] HUANG Fang-fang, YANG Zui-su, DING Guo-fang, et al. Sepia ink oligopeptide induces apoptosis in prostate cancer cell lines via caspase-3 activation and elevation of bax/bcl-2 ratio [J]. *Marine Drugs*, 2012, 10(10): 2153-2165
- [5] 郑玉寅. 乌贼墨肽聚糖对前列腺癌 PC-3、DU-145 细胞作用机制研究[J]. *食品科学*, 2012, 34(13): 251-256
- [6] ZHENG Yu-yin. Apoptosis induction and underlying mechanism of peptidoglycan from cuttlefish ink on prostate cancer PC-3 and DU-145 cells [J]. *Food Science*, 2012, 34(13): 251-256
- [7] Chio S, Lew KL, Xiao H, et al. D, L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1 [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 151-162
- [8] Martinou J C, Youle R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. *Dev. Cell*, 2011, 21(1): 92-101
- [9] 杨连君, 曹雪涛, 于益芝. Bcl-2, Bax 与肿瘤细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(3): 232-234  
YANG Lian-jun, CAO Xue-tao, YU Yi-zhi. Bcl-2, Bax and their roles in tumor apoptosis [J]. *Chin. J. Cancer Biother.*, 2003, 10(3): 232-234
- [10] Carmeliet P, An, Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer [J]. *Cell Death Differ.*, 2011, 18(9): 1441-1449
- [11] Giogenesis in health and disease [J]. *Nat. Med.*, 2003, 9(6): 653-660
- [12] 周桔, 罗荣保, 汤长发, 等. Bcl-2 蛋白家族和 p53 基因在细胞凋亡中的调控效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(10): 1950-1952  
ZHOU Jie, LUO Rong-bao, TANG Chang-fa, et al. Effect of Bcl-2 protein family and p53 gene on regulating and controlling cell apoptosis [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, 11(10): 1950-1952
- [13] Fridman J S, Lowe S W. Control of apoptosis by p53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22(56): 9030-9040
- [14] Tian Y, Ding R Y, Zhi Y H, et al. Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for the determination of tumor vascularity [J]. *World J. Gastroenterology*, 2006, 12(3): 415-419