

硒酸壳聚糖通过线粒体途径诱导 A549 细胞凋亡的初步研究

张少净, 刘安军, 王鹏飞, 郑国强

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文研究了硒酸壳聚糖 (SC) 对非小细胞肺癌 A549 增殖抑制及诱导凋亡作用, 并进一步研究了 SC 对其凋亡前后蛋白差异表达。采用 MTT 法检测了 SC 对 A549 细胞的增殖抑制作用; 并用激光共聚焦分别观察了 Hoechst33342/PI 染色后 A549 细胞形态的变化以及钙黄绿素染色后细胞线粒体 MPTP 的开放状况; 流式细胞仪检测了 SC 对 A549 细胞线粒体跨膜电位的影响; 利用 2-DE 结合 MALDI-TOF 质谱技术检测了细胞凋亡相关蛋白的差异表达。结果表明: SC 对 A549 细胞具有显著的增殖抑制作用, 并在一定范围内呈现时间和浓度依赖性; SC 可使 A549 细胞发生形态改变, 使细胞变得不规则, 染色质固缩和边集; 经 SC 处理后, 细胞的线粒体膜通道逐渐开放; 经 MALDI-TOF 鉴定发现了 2 个差异表达的蛋白, 即抗增殖蛋白 (prohibitin isoform 1), 细胞内热休克蛋白 (heat shock protein)。

关键词: 硒酸壳聚糖; A549 细胞; 凋亡

文章编号: 1673-9078(2017)4-46-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.008

Preliminary Study of Seleno-chitosan-induced Apoptosis in A549 Cells through a Mitochondrial Signaling Pathway

ZHANG Shao-jing, LIU An-jun, WANG Peng-fei, ZHENG Guo-qiang

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effects of seleno-chitosan (SC) on cell proliferation inhibition and apoptosis in human non-small-cell lung cancer A549 cells were investigated, and the differential expression of proteins in SC-treated and untreated cells were determined. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was employed to determine the inhibitory effect of SC on the proliferation of A549 cells. Morphological changes in the A549 cells after Hoechst 33342/PI staining and the opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) after calcein staining were observed by laser scanning confocal fluorescence microscopy. The effect of SC on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was analyzed by flow cytometry (FCM). Furthermore, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) combined with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) was used to identify the differential expression of apoptosis-related proteins. The results showed that SC could significantly suppress the proliferation of A549 cells in a time- and concentration-dependent manner. Morphological changes of A549 cells could be induced by SC; the cell shape became irregular and chromatin condensation and margination occurred. After SC treatment, the MPTP of A549 cells was gradually opened. Additionally, two differentially expressed proteins, prohibitin isoform 1 and heat shock protein, were identified by MALDI-TOF.

Key words: seleno-chitosan, A549 cells, apoptosis

肺癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一, 已成为恶性肿瘤中发病率和死亡率最高的肿瘤。其中非小细胞

收稿日期: 2016-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271975)

作者简介: 张少净 (1990-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事食品功能因子调控与机体免疫研究

通讯作者: 刘安军 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事食品功能因子调控与机体免疫研究

肺癌 (Non-small-cell lung cancer, NSCLC) 占肺癌总数的三分之二以上, 但由于其早期症状不明显, 发病隐匿, 诊断相对比较困难, 已严重威胁到人类的生命健康^[1]。目前, 放疗和化疗仍是癌症治疗的主要手段, 但由于其治疗方式副作用大且容易产生依赖性, 因此, 寻找新的天然或者合成的抗肿瘤药物成为近几年的研究热点。壳聚糖作为人体细胞活化因子, 不仅能改善人体酸碱平衡更具有多种生物活性, 并且多项研究证

实壳聚糖具有抗肿瘤的活性。Maeda 等^[2]研究发现低分子壳聚糖和壳寡糖能抑制小鼠 S180 肿瘤细胞的生长,何学斌等^[3]研究发现相对质量在 1×10^4 左右的壳聚糖对 H22 细胞具有明显的杀伤作用,并且动物实验发现水溶性壳聚糖不仅能提高小鼠的非特异性免疫并可明显抑制小鼠 S180 肿瘤细胞的生长^[4]。但是对硒酸壳聚糖的抗肿瘤活性研究的报道并不多见。

硒是生物体中一种必要的微量元素,硒的存在形式分为无机硒和有机硒,都具有明显的抗衰老、抗肿瘤及增强免疫力等功效,被誉为“抗癌之王”^[5]。硒多糖同时具有硒和多糖双生物活性,与无机硒相比,硒多糖不仅毒性低且更易于吸收。天然硒多糖广泛分布于动植物和微生物体内,使人们对硒多糖的研究在一定程度上受到了制约。所以,通过化学方式合成硒多糖已成为研究热点。如硒酸软骨多糖能诱导 K562 细胞凋亡同时导致其细胞线粒体膜电位降低^[6]。Hector Estevez 等^[7]研究发现纳米级的硒化壳聚糖可诱导 HepG2 细胞凋亡,并导致细胞周期阻滞在 S-G₂/M 期。本文以人肺癌 A549 细胞作为研究对象,探究硒酸壳聚糖对肺癌细胞的生长抑制作用及凋亡前后蛋白差异表达,并初步研究其诱导 A549 细胞凋亡的机制。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品

非小细胞肺癌 A549 细胞株,购自北京协和医院;硒酸壳聚糖,本实验室自制;RPMI-1640 培养基,购自 Gibco 公司;胎牛血清,购自杭州四季青生物工程有限公司;Hoechst33342/PI,购自美国 Sigma 公司;Fluo-3AM、MPTP 荧光检测试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司;IPG 干胶条 (13 cm, pH 3~10),美国 GE 公司。

1.1.2 主要仪器设备

Mco-18AIC(UV)CO₂ 培养箱,日本三洋;激光共聚焦显微镜,日本 Nikon;流式细胞仪,美国 Becton Dickson 公司;SE260 电泳槽,美国 GE 公司;Ettan IPGphor III 等电聚焦系统,美国 GE 公司;MALDI-TOF/TOF,美国 Bruker 公司。

1.2 硒酸壳聚糖的制备

壳聚糖(脱乙酰度为 50%以上)溶解于 5%的乙酸中,调节 pH 至 8.0,使壳聚糖成为絮状沉淀,将纤维化的壳聚糖置于用 6%过氧化氢配制的硒酸溶液中,真空,45 °C 以下低温反应 24 h,之后向反应液中加入

80%乙醇沉淀絮状壳聚糖,通过离心、超滤后获得硒酸壳聚糖。合成的硒酸壳聚糖是在壳聚糖的 C₆-OH-基团和 NH₂-基团处共同导入性质稳定的硒酸根而制成,分子量为 5 ku,硒酸程度为 0.1 g/g^[8]。

1.3 MTT 法检测硒酸壳聚糖对 A549 细胞增殖活性的影响

取对数期生长细胞,以密度为 5×10^3 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。培养过夜后,加入硒酸壳聚糖,使其终浓度分别为 50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL 和 800 μ g/mL。同时设置只加空白培养基孔作为空白对照组及不加硒酸壳聚糖的细胞作为阴性对照组。每组 5 个复孔,于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后,加入 20 μ L、5 mg/mL MTT 继续于 37 °C 培养箱中孵育 4 h。培养结束后弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO 以溶解甲瓚结晶。混匀后于波长为 570 nm 的酶标仪下测量其吸光度。

抑制率按如下公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = [(A_{\text{对照组}} - A_{\text{加药组}}) / A_{\text{对照组}}] \times 100\%$$

1.4 Hoechst 33342/PI 染色观察细胞形态变化

取对数生长期的 A549 细胞加入硒酸壳聚糖,使其终浓度为 200 μ g/mL,于培养箱中培养 48 h,同时设空白对照组,培养结束后进行 Hoechst 33342/PI 常规染色,利用激光共聚焦显微镜观察细胞形态的变化。

1.5 硒酸壳聚糖诱导 A549 细胞线粒体膜通道孔开放

取对数生长期的 A549 细胞加入终浓度为 200 μ g/mL 的硒酸壳聚糖并培养 48 h,同时设空白对照组,培养结束后离心收集细胞,参照线粒体分离试剂盒进行细胞线粒体的提取,并按照线粒体膜通道孔(MPTP)荧光检测试剂盒染色后,在激光共聚焦显微镜下观察细胞 MPTP 的开放。

1.6 Rhodamin-123 检测细胞线粒体跨膜电位的变化

将处于对数期的 A549 细胞中加入终浓度为 200 μ g/mL 硒酸壳聚糖并培养 48 h,设空白对照组。离心收集细胞后以 PBS 调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,取 500 μ L 细胞悬液加入终浓度为 10 μ g/mL 的 Rhodamin-

123, 37 °C避光孵育 30 min。PBS 清洗细胞三次后用流式细胞仪检测 A549 细胞线粒体跨膜电位。

1.7 双向凝胶电泳 (2-DE) 结合质谱鉴定细胞

凋亡前后蛋白差异表达

1.7.1 细胞蛋白样品的制备

离心收集空白对照组和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硒酸壳聚糖共培养 48 h 的细胞, 按照比例为 1×10^7 个/mL 加入细胞裂解, 移液枪上下吹打 6 次后置于冰上裂解 30 min, 随后于液氮中反复冻融 3 次, 4 °C、14000 r/min 离心 15 min, 收集上清液存放于 -80 °C, 并根据 Bradford 法测定蛋白质浓度。

1.7.2 第一向等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF)

取 0.5 mg 上述提取的蛋白样品, 用水化上样缓冲液分别调整蛋白样品体积至 250 μL 后, 将蛋白样品加入到 IPG-Box 胶条槽中并将 IPG 胶条覆盖至蛋白样品中进行等电聚焦, 等电聚焦程序如表 1。

表 1 等电聚焦程序设置

Table 1 Program settings for isoelectric focusing

Step	Mold	Voltage/V	Time/h
S1	Step and Hold	500	4
S2	Gradient	1000	1
S3	Gradient	8000	3
S4	Step and Hold	8000	5
S5	Step and Hold	500	0.5

1.7.3 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

配制 12% 的聚丙烯酰胺分离胶, 将平衡后的胶条放置于分离胶上端, 并用 0.5% 的低熔点琼脂糖封胶后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 设置起始电流 15 mA/gel, 当样品进入分离胶后改为 45 mA/gel, 电泳结束后利用考马斯亮蓝 R250 进行染色, 脱色, 固定。

1.7.4 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定与数据库检索

使用 PDQuest 8.0.1 软件对图像进行分析, 找到硒酸壳聚糖处理前后蛋白差异表达点, 扣取蛋白差异点置于 Eppendorf 管中进行胶内酶解, 并进行质谱分析。

1.8 数据处理

试验结果以 $\bar{x} \pm \text{sd}$ 表示, 采用 SPSS 进行统计分析, Origin 软件作图, $p < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 硒酸壳聚糖对 A549 细胞增殖抑制作用

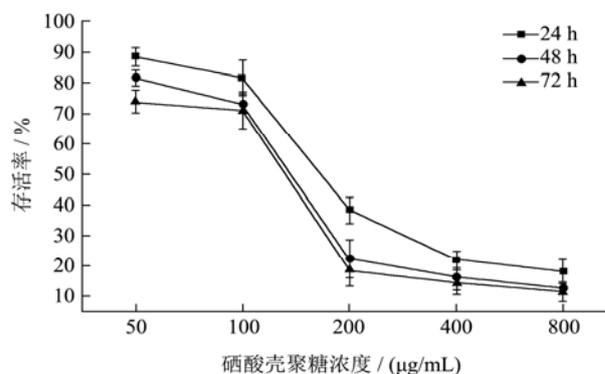


图 1 硒酸壳聚糖对 A549 细胞生长抑制

Fig.1 Effect of seleno-chitosan on A549 cell viability

采用 MTT 法检测硒酸壳聚糖对 A549 细胞的增殖抑制作用, 实验结果如图 1, 硒酸壳聚糖对 A549 细胞的抑制作用在一定范围内呈时间和浓度依赖性。当硒酸壳聚糖的浓度较低时 (50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 细胞的存活率仍高于 70%, 说明低浓度的硒酸壳聚糖对 A549 细胞的抑制作用较低。然而, 随着硒酸壳聚糖浓度和培养时间的增加, 细胞存活率明显降低。200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硒酸壳聚糖培养细胞培养 48 h 后, 细胞存活率仅为 23% 左右。但值得注意的是当硒酸壳聚糖的浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养 48 h 时, 其对 A549 细胞的增殖抑制作用与 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度并无明显差异, 因此, 选择 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硒酸壳聚糖用于后期研究。

2.2 Hoechst 33342/PI 染色观察细胞凋亡情况

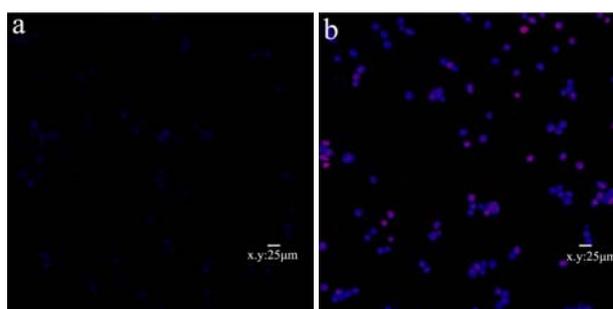


图 2 硒酸壳聚糖对 A549 细胞 Hoechst33342/PI 染色

Fig.2 Hoechst33342/PI staining of A549 cells (200 \times)

注: a 表示 0 h; b 表示 48 h。

Hoechst 33342 常用于细胞凋亡检测, 是一种蓝色荧光染料, 能够穿透细胞膜并且对细胞的毒性较低, 与细胞核内 DNA 结合可使活细胞呈现淡蓝色。而碘化丙啶 (Propidine Iodide, PI) 不能穿透完整的细胞膜, 是一种核酸染料, 但它能穿过凋亡细胞和死细胞的细胞膜而将细胞核染红。Hoechst 33342 与凋亡细胞 DNA

结合后, 凝聚的染色质会比正常细胞中的染色质染色更深、更加明亮。PI 只能渗透进入死亡细胞, 两种染料结合使用, 通过荧光显微镜检测就可以区分出正常细胞, 凋亡细胞和死亡细胞。图 2 可以看出, 未加硒酸壳聚糖的正常细胞, 只被少量 Hoechst33342 染色, 因此呈现淡蓝色。但经硒酸壳聚糖处理 48 h 后, 细胞大部分出现亮蓝色和淡紫色, 即同时被 Hoechst33342 和 PI 着色, 并同时出现少量红色细胞, 可见与硒酸壳聚糖共培养 48 h 可以导致 A549 细胞凋亡, 并有部分细胞死亡。结果表明, 硒酸壳聚糖能诱导细胞凋亡。

2.3 硒酸壳聚糖诱导 A549 细胞线粒体膜通道开放

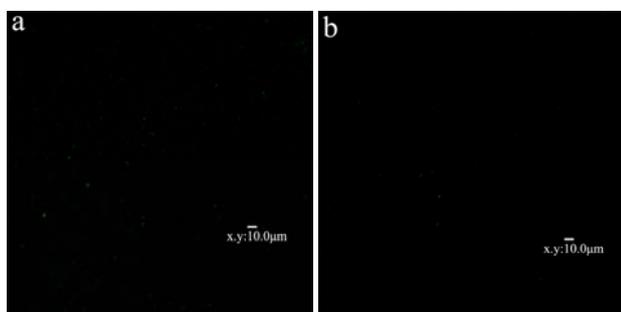


图 3 硒酸壳聚糖导致 A549 细胞 MPTP 开放
Fig.3 Effect of seleno-chitosan on MPTP (400×)

注: a 表示 0 h; b 表示 48 h。

由线粒体膜内外成分构成的线粒体膜通道 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 是非特异性钙离子依赖性通道。在凋亡细胞或者死亡细胞中, 线粒体内容物可通过 MPTP 释放到胞浆中。线粒体膜通道的持续开放可导致细胞色素 C 释放至细胞浆中, 并造成细胞线粒体跨膜电位的降低。钙黄绿素-AM 是一种荧光探针, 当探针进入线粒体后会被内酯酶切离而被线粒体俘获, 从而产生荧光较强的钙黄绿素。然而存在于线粒体外的钙黄绿素可以通过离心或者钴离子淬灭, 所以, 线粒体内钙黄绿素荧光强度可以间接性表明 MPTP 开放程度。实验结果如图 3, 在未经硒酸壳聚糖处理的 A549 细胞中, 钙黄绿素的荧光强度较亮。但经硒酸壳聚糖培养 48 h 后, 可以看到线粒体内钙黄绿素的荧光强度明显减弱, 表明硒酸壳聚糖可导致线粒体膜通道开放, 使部分钙黄绿素释放出线粒体。

2.4 Rhodamin-123 检测细胞线粒体跨膜电位

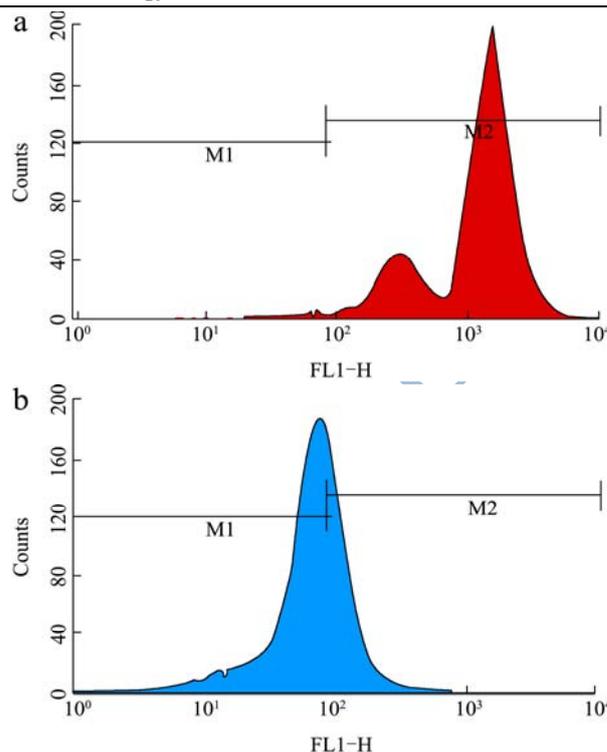


图 4 硒酸壳聚糖对 A549 细胞线粒体跨膜电位的影响
Fig.4 Effect of seleno-chitosan on the mitochondrial membrane potential of A549 cells

注: a 表示 0 h; b 表示 48 h。

表 2 硒酸壳聚糖对 A549 细胞跨膜电位的影响
Table 2 Effect of SC on the mitochondrial membrane potential of A549 cells

组别	0 h	48 h
线粒体跨膜电位/%	99.56±0.04	32.92±4.02**

研究表明, 诱导细胞凋亡的途径可分为死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径, 当细胞受到凋亡信号刺激, 诱导细胞发生线粒体途径凋亡时, MPTP 的不可逆开放可导致细胞线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的降低, 并进一步引起一系列联级反应导致细胞凋亡^[9]。为了进一步研究硒酸壳聚糖对 A549 细胞线粒体的影响, Rhodamin-123 被用于检测硒酸壳聚糖作用细胞前后细胞 $\Delta\Psi_m$ 的变化。Rhodamin-123 作为一种线粒体跨膜电位指示剂, 在正常细胞中能依赖线粒体跨膜电位而进入线粒体基质中, 从而具有较强的荧光强度。然而当线粒体膜遭到破坏后, 线粒体膜通道的开放会引起跨膜电位的崩溃, 使 Rhodamin-123 重新释放进而发出较弱的荧光, 并通过流式细胞仪检测到。如图 4 所示, 与 0 h 对照组相比, 经硒酸壳聚糖处理 48 h 后, A549 细胞荧光强度明显降低而导致峰往左移。由表 2 可以看出, 与 0 h 对照组相比, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的硒酸壳聚糖

糖处理细胞 48 h 后细胞线粒体膜电位由 99.56% 下降至 32.96%，差异显著。Fernandes 等^[10]报道发现硒化合物能通过降低细胞线粒体跨膜电位而诱导细胞凋亡。由此表明，硒酸壳聚糖诱导的 A549 细胞凋亡与细胞线粒体跨膜电位的降低相关。

2.5 二维电泳结合质谱分析鉴定细胞凋亡前后蛋白差异表达

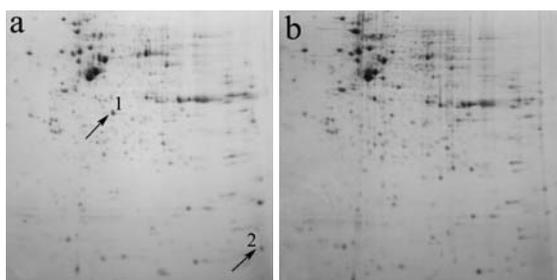


图5 A549 全细胞蛋白凋亡 2-DE 图谱

Fig.5 2-DE images of A549 cells

注：a 表示 0 h；b 表示 48 h。

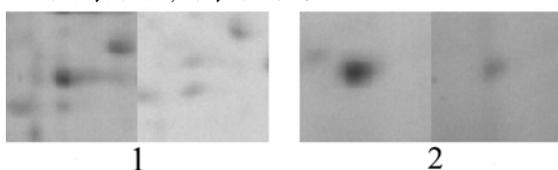


图6 差异蛋白局部放大图

Fig.6 Partially magnified images of the specific proteins

采用二维电泳技术构建全细胞蛋白二维图谱，研究硒酸壳聚糖作用 A549 细胞前后蛋白差异表达，结果见图 5。经过 PDQuest 8.0.1 软件分析，发现共有 14 个蛋白差异表达点在 1.5 倍以上，且具有统计学意义。其中表达上调的蛋白点有 11 个，表达下调的蛋白点有 3 个。选取 2 个差异表达在 2 倍以上的蛋白点，这 2 个差异蛋白点局部放大图如图 6，使用辅助激光解吸电离飞行时间谱 (MALDI-TOF-MS/MS) 进行分析和鉴定。结果表明，这 2 个蛋白点都有质谱信号，将肽量

表3 差异蛋白点 MALDI-TOF-MS/MS 质谱分析结果

Table 3 Identification of differentially expressed proteins by MALDI-TOF-MS/MS

编号	蛋白质名称	NCBI 登陆号	分子量/ku	等电点 (pI)	得分
1	prohibitin isoform 1	gi 4505773	29	5.57	113
2	heat shock protein	gi 395831992	11	8.91	133

3 结论

本文对硒酸壳聚糖诱导 A549 细胞的凋亡作用及线粒体机制进行了初步研究。MTT 实验表明硒酸壳聚糖能显著抑制 A549 细胞的增殖，且在一定范围内呈现出时间和浓度依赖性。其次，Hoechst 33342/PI 染色

指纹图在数据库进行检索对比，比对分子量与等电点，成功鉴定蛋白结果见表 3。结果表明，1 号蛋白点与抗增殖蛋白家族 (prohibitin isoform 1) 具有高度同源序列，推测为抗增殖蛋白 prohibitin isoform 1，2 号蛋白点与细胞内热休克蛋白家族 (heat shock protein) 高度同源，推测为细胞内热休克蛋白 HSP。

抗增殖蛋白 (prohibitin, PHB) 广泛存在于多种生物细胞中，具有明显的抗细胞增殖作用，主要位于细胞膜、线粒体内膜、细胞核中，分为抗增殖蛋白 1 (prohibitin isoform 1) 和抗增殖蛋白 2 (prohibitin isoform 2) 两个同源亚型^[11]。在人类细胞中，抗增殖蛋白 1 与抗增殖蛋白 2 共定位于线粒体。G. Fusaro 等研究发现，在调节细胞凋亡过程中，PHB 能够与 P53 结合，进而激活 P53 凋亡途径，使 DNA 的复制被阻止，进而促进细胞的凋亡^[12]。在对 ROS 诱导细胞凋亡的研究中，Schleicher M 等^[13]发现抗增殖蛋白调节 Rac1 激活可通过 PI3K-Akt 途径使细胞衰老或凋亡。1 号蛋白点的下调可能是由于硒酸壳聚糖对细胞产生刺激，使细胞 ROS 增多，并导致线粒体膜的开放后，诱导细胞发生内源性凋亡通道，进而降低了抗增殖蛋白表达。

细胞内热休克蛋白 HSP (heat shock protein) 是存在于生物体内高度保守的蛋白质，具有抗肿瘤作用，当机体产生肿瘤抗原时能将信息传递至细胞膜上，从而诱导机体产生特异性的抗肿瘤免疫。吴伟忠等^[14]研究发现热休克蛋白 70-多肽复合物能诱导小鼠产生特异性 CTL，具有特异性抑制小鼠肝癌 H22 细胞增殖的效应。同时，对热休克蛋白 70 的研究报道发现其能促进小鼠 C2C12 肌原细胞内 Bcl-2 的表达，从而抑制细胞的凋亡^[15]。经过硒酸壳聚糖处理 A549 细胞 48 h 后，细胞内热休克蛋白出现显著性降低，可能是由于硒酸壳聚糖诱导的细胞线粒体膜被破坏，使 Bcl-2 表达减小，促进了细胞发生凋亡，进而导致内休克蛋白表达量的下降。

观察到硒酸壳聚糖可导致 A549 细胞发生典型的凋亡特征。另外，硒酸壳聚糖可导致细胞线粒体膜通道孔逐渐开放，并引起线粒体跨膜电位显著性降低。最后，为了进一步研究硒酸壳聚糖对 A549 细胞的凋亡机制，利用二维电泳技术构建了空白组和硒酸壳聚糖作用 48 h 细胞组的全细胞蛋白图谱，确定了细胞凋亡前后

2个具有2倍差异表达的蛋白点,并通过MALDI-TOF-MS/MS成功鉴定出这两个差异蛋白其中一种为抗增殖蛋白(prohibitin isoform 1),推测其表达下调是由于硒酸壳聚糖导致细胞体内ROS增多,诱导细胞产生内源性凋亡引起的,另一种是内热休克蛋白(heat shock protein),推测其表达下降是由于硒酸壳聚糖导致细胞线粒体膜的完整性被破坏,使Bcl-2表达降低所导致的。本实验为深入研究硒酸壳聚糖诱导肺癌细胞凋亡机制奠定了基础,并为硒酸壳聚糖的应用提供了理论基础。

参考文献

- [1] Jung M J, Rho J K, Kim Y M, et al. Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32(2): 209-221
- [2] Y Maeda, Y Kimura. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(4): 945-950
- [3] 何学斌,薛存宽,杜予民,等.壳多糖抗肿瘤作用的实验研究[J].*中成药*,2003,25(7):564-567
HE Xue-bin, XUE Cun-kuan, DU Yu-min, et al. Experimental study of anti-tumor with chitosan [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2003, 25(7): 564-567
- [4] 刘艳如,余萍.水溶性壳聚糖对小鼠免疫功能与移植肿瘤的影响[J].*福建师范大学学报:自然科学版*,1999,15(4):66-70
LIU Yan-ru, YU Ping. Effect of water soluble chitosan on mice's immune function and transplanted tumor [J]. *Journal of Fujian Teachers University: Nature Science*, 1999, 15(4): 66-70
- [5] H Zeng, G F Combs. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2008, 19(1): 1-7
- [6] 朱红,刘安军,郑国强,等.硒酸软骨多糖对K562细胞线粒体膜电位及凋亡的影响[J].*现代食品科技*,2015,10(31):35-39
ZHU Hong, LIU An-jun, ZHENG Guo-qiang, et al. Effects of selenic acid cartilage polysaccharide on mitochondrial membrane potential and cell apoptosis of K562 cells [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 10(31): 35-39
- [7] H Estevez, J C Garcia-Lidon, J L Luque-Garcia, et al. Effects of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: comparison with other selenospecies [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 122: 184-193
- [8] A Liu, W Song, D Cao, et al. Growth inhibition and apoptosis of human leukemia K562 cells induced by seleno-short-chain chitosan [J]. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 2008, 30(3): 181-186
- [9] C K Chan, H Supriady, B H Goh, et al. Elephantopus scaber induces apoptosis through ROS-dependent mitochondrial signaling pathway in HCT116 human colorectal carcinoma cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 168: 291-304
- [10] A P Fernandes, V Gandin. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2015, 1850(8): 1642-1660
- [11] 祝丽晶,潘旭东,王翎.抗增殖蛋白抗肿瘤及抗衰老的研究进展[J].*中国老年学杂志*,2010,30(21):3197-3200
ZHU Li-jing, PAN Xu-dong, WANG Ling. Research progress of prohibitin on antitumor and anti-aging [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2010, 30(21): 3197-3200
- [12] G Fusaro, P Dasgupta, S Rastogi, et al. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(48): 47853-47861
- [13] M Schleicher, B R Shepherd, Y Suarez, et al. Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 180(1): 101-112
- [14] 吴伟忠,刘康达.热休克蛋白 70 的纯化及其抗小鼠肝癌作用的研究[J].*中华肿瘤杂志*, 2000,22(2):96-98
WU Wei-zhong, LIU Kang-da. Purification of hsp70 and its immunoprotective effect against mouse hepatocyte [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2000, 22(2): 96-98
- [15] 张彬,邓红兵,周斌,等.热休克蛋白 70 通过 Bcl-2 抑制氧化应激所致 C2C12 细胞凋亡[J].*中国动脉硬化杂志*,2010, 8:621-624
ZHANG Bin, ZHENG Hong-bing, ZHOU Bin, et al. Heat shock protein to protect against oxidative stress-induced apoptosis in C2C12 myogenic cells by upregulation of Bcl-2 [J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2010, 8: 621-624