

百里醌联合吉西他滨对胰腺癌 BxPC-3 细胞体外生长的影响

慕刚刚 于红刚 李红艳 张玲利

摘要 **目的** 探讨百里醌联合吉西他滨对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖和凋亡的影响,并探讨其作用机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测细胞相对活性, Hoechst 染色法及流式细胞术检测细胞凋亡情况, Western blot 法检测凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bax、XIAP)、半胱天冬酶 (cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9)、PTEN、Akt 及 phospho-Akt 蛋白的表达。**结果** 百里醌呈浓度依赖性抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖,诱导细胞凋亡。吉西他滨组 (GEM)、百里醌组 (TQ)、百里醌联合吉西他滨组 (TQ+GEM)、百里醌与吉西他滨序贯给药组 (TQ-GEM) 相对细胞活性分别为 $83.7\% \pm 4.1\%$ 、 $51.8\% \pm 6.0\%$ 、 $48.25\% \pm 6.50\%$ 、 $33.3\% \pm 3.9\%$;早期凋亡率分别为 $12.2\% \pm 3.8\%$ 、 $30.4\% \pm 4.3\%$ 、 $43.5\% \pm 5.7\%$ 、 $58.3\% \pm 6.1\%$;各组相对细胞活性均明显低于对照组 ($P < 0.05$),而细胞凋亡率显著增高 ($P < 0.05$);与 GEM 组比较, TQ-GEM 组与 TQ+GEM 组相对细胞活性明显下调 ($P < 0.001$),凋亡率明显上调 ($P < 0.001$);TQ-GEM 组较 TQ+GEM 组出现更明显的增殖受抑 ($P < 0.001$),更高的细胞凋亡率 ($P < 0.001$)。百里醌-吉西他滨序贯给药作用于胰腺癌 BxPC-3 细胞后, BxPC-3 细胞中 Bax 蛋白表达明显下调,而 Bcl-2、XIAP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白表达明显上调。百里醌可显著上调 BxPC-3 细胞 PTEN 的表达,明显抑制 Akt 磷酸化。**结论** 百里醌可明显增强吉西他滨对体外胰腺癌细胞生长抑制作用,可能是通过上调 PTEN, Akt 去磷酸化,促使 Bcl-2、XIAP 表达上调及 Bax 表达下调,活化 caspase-3、caspase-9 诱导细胞凋亡而实现。

关键词 胰腺癌 百里醌 吉西他滨 细胞凋亡 序贯治疗

[中图分类号] R576

[文献标识码] A

Thymoquinone Potentiates Antitumor Activity of Gemcitabine in Pancreatic Cancer BxPC-3 Cells in vitro. Mu Ganggang, Yu Honggang, Li Hongyan, Zhang Lingli. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of thymoquinone on the sensitization of pancreatic cancer cells to gemcitabine and explore its mechanism. **Methods** Human pancreatic cancer PANC-1 cells were cultured in vitro and treated with thymoquinone, gemcitabine, thymoquinone combined with gemcitabine, and sequential administration of thymoquinone and gemcitabine. The relative cell viability, cell apoptosis, expression of Bcl-2, Bax, XIAP, cleaved caspase-3, -9, PTEN and the phosphorylated Akt of BxPC-3 cells were determined respectively by Cell Counting Kit 8 (CCK-8) assay, flow cytometry, and western blotting assay. **Results** Thymoquinone dose-dependently inhibited the proliferation and increased the apoptosis of pancreatic cancer BxPC-3 cells. The relative cell viabilities of gemcitabine treated group (GEM), thymoquinone treated group (TQ), the group with combination treatment of the both (TQ+GEM), and group of sequential administration of the two drugs (TQ-GEM) were $83.7\% \pm 4.1\%$, $51.8\% \pm 6.0\%$, $48.25\% \pm 6.50\%$, $33.3\% \pm 3.9\%$ respectively and the early apoptosis of which were $12.2\% \pm 3.8\%$, $30.4\% \pm 4.3\%$, $43.5\% \pm 5.7\%$, $58.3\% \pm 6.1\%$ respectively. The relative cell viabilities in every treated groups were significantly lower than the control untreated group ($P < 0.05$), while the early apoptosis increase noticeably ($P < 0.05$). Compared with GEM group, the proliferation was suppressed and the apoptosis was aggrandized significantly in TQ+GEM and TQ-GEM groups ($P < 0.001$). The cells of TQ-GEM group had higher apoptosis rate and lower proliferation index than TQ+GEM group ($P < 0.001$). Thymoquinone up-regulated expressions of Bcl-2, XIAP, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and suppressed Bax. Thymoquinone noticeably up-regulated PTEN expression and inactivated the phosphorylation of Akt in BxPC-3 cells. **Conclusion** Thymoquinone enhances the chemosensitivity of BxPC-3 cell to gemcitabine with more apoptosis through up-regulation of PTEN expression and inactivation of Akt.

Key words Pancreatic cancer; Thymoquinone; Gemcitabine; Cell apoptosis; Sequential therapy

基金项目:武汉大学研究生自主科研基金资助项目(2012302020214)

作者单位:430060 武汉大学人民医院消化内科(慕刚刚、于红刚、张玲利);730030 兰州大学第二医院综合内科(李红艳)

通讯作者:于红刚,博士生导师,教授,电子信箱:yuhonggang1968@hotmail.com

胰腺癌是极度恶性的消化道肿瘤,是癌症死亡的第4大原因,全世界平均每年有227000人死于胰腺癌^[1]。胰腺癌侵袭、转移能力强,多数患者无法实现早期诊断、早期治疗,而根治性手术切除率仅有15%~20%。吉西他滨(gemcitabine, GEM)作为一线化疗药主要用于进展期或手术无法切除的胰腺癌的辅助治疗,存在较为严重的化疗耐药性,治疗效果欠佳,5年生存率<6%^[2, 3]。因而,探寻更为有效的化疗药物成为胰腺癌治疗的研究热点。

百里醌(thymoquinone, TQ), 1963年人们首次从中东生长的黑草草籽中提取出的一种具有多种生物活性的有效成分^[4]。众多研究已经证实百里醌能有效抗氧化、炎症、糖尿病、动脉粥样硬化^[5], 以及有效抑制肿瘤的多种生物学特性, 如肿瘤的无限增殖、运动和迁移、新生血管生成、诱导多种炎症等^[6]。另有大量体内实验表明百里醌能抑制乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、白血病及多发性骨髓瘤等多种恶性肿瘤的生长和转移^[7-10]。但百里醌抑制肿瘤的增殖、诱导凋亡的具体机制目前尚不完全明确, 本研究将探讨百里醌对人胰腺癌细胞的作用及其具体调控机制, 为以后百里醌能应用于胰腺癌的临床辅助化疗提高有效依据。

材料与方法

1. 材料: 胎牛血清、RPMI-1640、青霉素-链霉素抗生素购自美国GIBCO公司; 兔抗 β -actin、Akt、phospho-Akt、PTEN抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 小鼠抗Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-9、XIAP抗体, HRP标记羊抗小鼠、羊抗兔二抗均购自美国Santa Cruz公司; Hoechst试剂盒、CCK-8试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物研究所; 百里醌购自美国Sigma公司, 用无菌处理的无水乙醇配制成10mmol/L的储存液, -20℃储存6个月; 吉西他滨购自法国Lily公司, 用0.9% NaCl溶液配制过滤无菌处理, 4℃储存1周。

2. 细胞培养: 人胰腺癌细胞系BxPC-3购自上海中科院典型培养物保藏中心。BxPC-3培养在含10%胎牛血清的RPMI-1640, 37℃, 5% CO₂, 适合湿度培养箱中, 细胞贴壁生长至密度约70%~80%, 胰酶消化传代培养。

3. 细胞分组处理: 细胞给予如下处理: ①TQ组: 25 μ mol/L百里醌培养24h; ②GEM组: 10 μ mol/L吉西他滨组培养24h; ③TQ+GEM联合给药组: 25 μ mol/L百里醌与10 μ mol/L吉西他滨共培养24h; ④TQ-GEM序贯给药组: 25 μ mol/L百里醌培养24h后, PBS洗去细胞培养孔中百里醌, 换10 μ mol/L吉西他滨继续培养24h。

4. CCK-8检测: BxPC-3细胞贴壁生长至70%~80%密度, 胰酶消化用含10%胎牛血清的RPMI-1640重悬为单细

胞悬液, 按 5×10^3 细胞/孔, 200微升/孔, 接种至96孔板, 细胞培养过夜后给予以下分组处理: ①不同浓度百里醌(0.1、1、10、25、50 μ mol/L)培养24h; ②不同浓度吉西他滨(0.01、0.1、1、10、50 μ mol/L)培养24h; ③TQ+GEM联合给药组; ④TQ-GEM序贯给药组。每个培养板同时设置空白调零孔(磷酸盐缓冲液, PBS)、阴性对照组(药物溶媒), 每个分组设置5个复孔。培养时间终止后, 每孔加入20 μ l CCK-8溶液, 37℃继续培养4h, 在酶标仪450nm处测定吸光度值。

5. Hoechst染色: 选对数生长期BxPC-3细胞, 将 1×10^5 个细胞接种到6孔板, 培养过夜后加入最适浓度百里醌刺激24h。加入1ml 4%多聚甲醛固定15min, 再加入5 μ g/ml Hoechst染色液染色15min, 置于Olympus倒置荧光显微镜下观察。

6. 流式细胞术检测细胞凋亡: 选择对数生长期的BxPC-3细胞, 将 5×10^3 个细胞接种到6孔板待细胞生长密度至80%时, 给予如方法3描述的药物治疗。调整细胞数约 1×10^3 个/组, 转移至离心管, 1×10^3 r/min离心弃上清并加入195 μ l Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞, 加入5 μ l Annexin V-FITC并轻轻混匀, 室温避光孵育10min。将细胞悬液离心弃上清, 加入190 μ l Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞, 再加入10 μ l 碘化丙啶染色液混匀。进行流式细胞仪检测, 激发波长488nm, 发射波长530nm, Multicycle软件分析细胞凋亡率。

7. 细胞总蛋白提取及免疫印迹检测: 选择对数生长期的BxPC-3细胞, 按 5×10^4 个细胞/孔接种细胞至6孔板, 待细胞贴壁生长至70%~80%密度, 依材料与方法中细胞分组处理所述给予药物治疗, 待培养时间终止, PBS洗涤细胞2次, 去掉PBS并加入细胞裂解液50mmol/L Tris (pH值7.4)、1mmol/L EDTA、150mmol/L NaCl、1% Triton X-100、50mmol/L NaF、1mmol/L 原钒酸钠、1mmol/L PMSF、1 $\times$ 蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂cocktail (Roche公司)。充分裂解后提取总蛋白。选择BCA法测定总蛋白浓度, 取40 μ g总蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜(NC膜), 用5%脱脂奶粉或10%牛血清白蛋白封闭非特异性位点。一抗用5% BSA/TBST溶液1:1000稀释后, 4℃孵育NC膜过夜, 再经TBS洗涤后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗稀释液室温孵育1h, 漂洗后经ECL法显色, X线胶片曝光。以 β -actin蛋白为内参对照, 每个实验独立重复3次。

8. 统计学方法: 应用SPSS 18.0统计软件分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异采用方差分析, 若不符合正态性或者方差齐性, 则采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 百里醌对胰腺癌BxPC-3细胞增殖的影响: CCK-8检测结果显示, 百里醌浓度依赖性抑制胰腺癌BxPC-3细胞增殖。BxPC-3细胞给予不同浓度

的百里醌(0.1、1、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$)刺激24h后,其中10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组细胞存活率分别为 $57.5\% \pm 6.3\%$ 、 $48.5\% \pm 3.5\%$ 、 $25.6\% \pm 3.2\%$,与

空白对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图1A)。25 $\mu\text{mol/L}$ 百里醌抑制细胞增殖接近50%,后续实验均采用25 $\mu\text{mol/L}$ 的百里醌浓度作用。

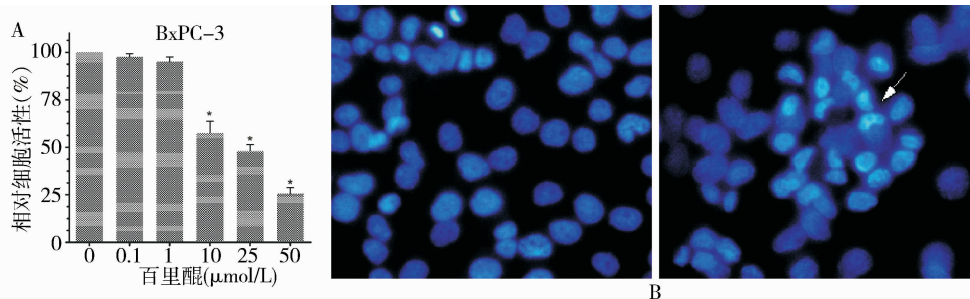


图1 百里醌对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖和凋亡的影响

A. CCK-8 法检测不同浓度百里醌对体外培养的胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖的影响;B. BxPC-3 细胞经 Hoechst 染色后观察百里醌诱导细胞的凋亡,白色箭头显示固缩的凋亡细胞核;与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,* $P < 0.05$

2. 百里醌作用后胰腺癌 BxPC-3 细胞核形态的改变:正常生长的 BxPC-3 细胞经 Hoechst 染色后,在荧光显微镜下呈现出细胞核圆形或椭圆形,染色质分别均匀、较少见强的蓝色荧光的细胞核(有丝分裂细胞核因染色体聚集可出现强蓝色荧光)。BxPC-3 细胞给予 25 $\mu\text{mol/L}$ 百里醌刺激 24h 后,大量脱落细胞悬浮在培养皿底部,细胞体积缩小,形态不规则,Hoechst 染色后发现细胞核明显固缩、染色质浓缩至斑块状伴强蓝色荧光,并出现凋亡小体,凋亡细胞比例明显增高(图1B)。

3. 百里醌、吉西他滨单用或联合、序贯给药对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖的影响:上述实验提示百里醌能明显抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞的增殖,进一步采用百里醌联合胰腺癌一线基础化疗药物吉西他滨,采用联合或序贯给药方式,观察 BxPC-3 细胞相对活性的改变。依材料与方法中细胞分组处理所述,BxPC-3 细胞给予不同分组药物刺激:吉西他滨组(GEM)、百里醌组(TQ)、百里醌联合吉西他滨组(TQ+GEM)、百里醌与吉西他滨序贯给药组(TQ-GEM),CCK-8 法检测其相对细胞活性分别为 $83.7\% \pm 4.1\%$ 、 $51.8\% \pm 6.0\%$ 、 $48.25\% \pm 6.50\%$ 、 $33.3\% \pm 3.9\%$,与对照组相比均具有统计学差异($P < 0.05$,图2)。TQ+GEM 组、TQ-GEM 组较 GEM 单用组能明显抑制 BxPC-3 细胞增殖($P < 0.001$,图2)。TQ-GEM 组细胞相对活性明显低于 TQ+GEM 组($P < 0.001$,图2),提示百里醌-吉西他滨的序贯给药方式较联合给药方式更有效抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖。

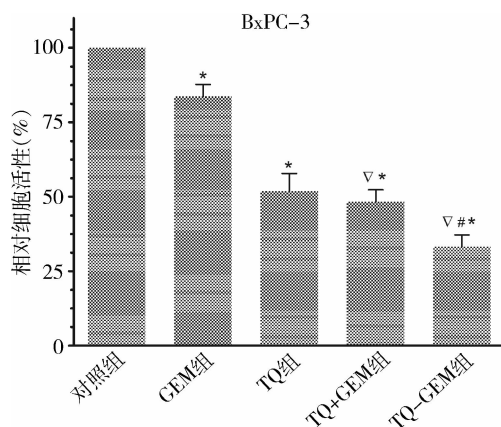


图2 CCK-8 法检测百里醌、吉西他滨单用或联合、序贯给药对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖的影响

与对照组相比,* $P < 0.05$;与 GEM 组相比, $\nabla P < 0.001$;与 TQ+GEM 组相比, $\#P < 0.001$

4. 百里醌、吉西他滨单用或联合、序贯给药对胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡的影响:进一步检测细胞凋亡情况。采用流式细胞术检测表明,不同药物分组对胰腺癌 BxPC-3 细胞的凋亡影响明显不同。流式细胞术检测显示 GEM、TQ、TQ+GEM、TQ-GEM 组细胞凋亡率分别为 $12.2\% \pm 3.8\%$ 、 $30.4\% \pm 4.3\%$ 、 $43.5\% \pm 5.7\%$ 、 $58.3\% \pm 6.1\%$,与对照组相比,均能明显诱导 BxPC-3 细胞凋亡($P < 0.05$,表1)。TQ+GEM 组和 TQ-GEM 组较 GEM 组能诱发更多的 BxPC-3 细胞发生早期凋亡($P < 0.001$,表1)。与 TQ+GEM 组比较,TQ-GEM 组能更有效的促进胰腺癌 BxPC-3 细胞的早期凋亡($P < 0.001$,表1)。

表 1 百里醌、吉西他滨单用或联合、序贯给药对胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡的影响

分组	对照组	GEM 组 [*]	TQ 组 ^{*▽}	TQ + GEM 组 ^{*▽}	TQ - GEM 组 ^{*▽#}
细胞凋亡率(%)	4.3 ± 2.1	12.2 ± 3.8	30.4 ± 4.3	43.5 ± 5.7	58.3 ± 6.1

与对照组相比,^{*}*P* < 0.05;与 GEM 组相比,[▽]*P* < 0.001;与 TQ + GEM 组相比,[#]*P* < 0.001

5. 百里醌、吉西他滨对胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡相关蛋白表达的影响:Western blot 法检测结果表明,与对照组相比,百里醌(TQ,25μmol/L)、吉西他滨(GEM,10μmol/L)单独作用 24h 可上调胰腺癌 BxPC-3 细胞促凋亡蛋白 Bax 的表达,但以百里醌效果最明显,TQ - GEM 组同样能明显诱导 Bax 蛋白的表达。而对于 BxPC-3 细胞中凋亡抑制蛋白 Bcl-2 和抗凋亡蛋白 XIAP 的表达,TQ 组和 TQ - GEM 组明显下调。各组间组前 caspase-3、组前 caspase-9 蛋白表达差异无统计学意义,经百里醌单独给药和百里醌-吉西他滨序贯给药刺激后,胰腺癌 BxPC-3 细胞的活性片段 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9 较对照细胞组表达明显上调,说明百里醌诱发细胞凋亡途径,百里醌-吉西他滨序贯给药方式能明显诱导肿瘤细胞的凋亡。Western blot 法检测以 β-actin 蛋白为衡量内参(图 3)。

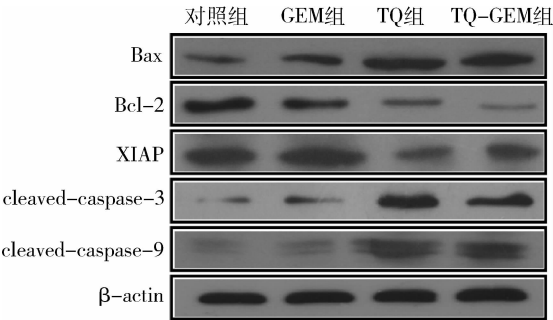


图 3 Western blot 法检测百里醌、吉西他滨对胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

6. 百里醌、吉西他滨对胰腺癌 BxPC-3 细胞中 PTEN、Akt 蛋白表达和激活的影响:为探讨百里醌诱导胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡的调控机制,BxPC-3 细胞经过百里醌、吉西他滨单药处理及两者序贯给药刺激后,通过 Western blot 法检测 PTEN、Akt 表达以及 Akt 磷酸化水平的改变。TQ 组及 TQ - GEM 组在上调 PTEN 蛋白表达的同时能明显抑制 Akt 磷酸化水平,而各组间总的 Akt 蛋白水平无改变,说明百里醌能明显抑制 Akt 的激活。TQ 组与 TQ - GEM 组间磷酸化 Akt 蛋白、PTEN 蛋白的表达无统计学差异(图 4)。

讨 论

传统的化疗药物主要通过诱导细胞凋亡、抑制细

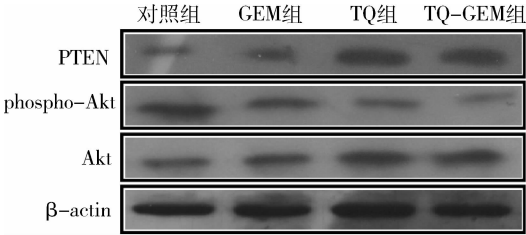


图 4 Western blot 法检测百里醌、吉西他滨对胰腺癌 PTEN、Akt 蛋白表达和激活的影响

胞增殖发挥对肿瘤细胞的细胞毒性作用,吉西他滨仍是胰腺癌辅助化疗的一线基础用药,但其原发性和获得性化疗耐药性问题已严重困扰临床治疗效果^[11]。临床研究旨在探寻一种安全性好、无化疗耐药性的辅助化疗药物联合吉西他滨治疗胰腺癌。已有研究证明百里醌对人正常胰腺导管上皮细胞(HPDE)、前列腺上皮细胞(BPH-1)、小肠细胞(FHs74Int)活性无影响,这促使百里醌成为辅助化疗药物的热衷选择^[8,12,13]。本研究中,百里醌可抑制体外胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖,同时流式细胞术结果表明百里醌能明显诱导肿瘤细胞凋亡,这与众多研究结果一致^[7,8,14]。本研究还发现百里醌联合吉西他滨治疗能显著的促进胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡,抑制细胞增殖。另外,百里醌-吉西他滨序贯给药方式较联合同时使用两种药物更能有效杀伤肿瘤细胞,有效降低胰腺癌化疗耐药性的产生,而且单药序贯给予能降低药物对正常细胞的细胞毒性作用。本研究的发现为以后百里醌应用于临床抗胰腺癌治疗提供了有力证据。

肿瘤细胞的凋亡受多种因素影响和调节,随着肿瘤分子生物学研究的不断深入,细胞凋亡已被认为是评估抗肿瘤药物疗效的一个重要指标。研究表明,Bcl-2 家族和凋亡抑制蛋白(IAPs)家族在调控肿瘤细胞凋亡方面起重要作用^[15],XIAP 蛋白是 IPAs 家族新成员,XIAP 通过抑制半胱氨酸蛋白酶(caspase)级联反应,尤其是 caspase-3 的激活而抑制细胞凋亡,XIAP 与化疗耐药性密切相关,而抑制 XIAP 的表达能显著诱导肿瘤细胞的凋亡坏死^[16,17]。胰腺癌中 Bcl-2、XIAP 蛋白的过表达多提示转移、预后不良。本实验发现百里醌能显著抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞

Bcl-2、XIAP 蛋白表达,促进 Bax 蛋白的表达上调, caspase-3、caspase-9 活性片段表达也明显上调,说明百里醌通过下调凋亡抑制蛋白 XIAP、Bcl-2 来诱发线粒体途径介导的肿瘤细胞凋亡。

除外抗凋亡参与肿瘤细胞化疗耐药性,肿瘤细胞 PI_3K/Akt 的持续激活也是一个重要机制^[18]。本研究证实百里醌能显著下调胰腺癌 BxPC-3 细胞 Akt 磷酸化水平,导致 Akt 蛋白失活状态。而大量研究证实百里醌诱导的 Akt 失活存在于多种肿瘤细胞,如乳腺癌、食管癌、结直肠癌等^[14, 19, 20]。前期有研究发现百里醌上调乳腺癌细胞 MCF-7/DOX 中 PTEN 的表达,PTEN 是最早发现的肿瘤抑癌基因,通过 MAPK 途径、 PI_3K 途径以及 FAK 途径发挥抑癌作用,而本研究亦发现百里醌能明显促进胰腺癌 BxPC-3 细胞 PI_3K/Akt 上游抑癌基因 PTEN 的表达^[21-23]。百里醌上调 PTEN 的表达,继而使 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP_3)去磷酸化,磷脂酰肌醇激酶(PI_3K)的磷酸化受到抑制,丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 B(PKB/Akt)的磷酸化进一步下调,从而使细胞凋亡抑制蛋白 Bcl-2、XIAP 的表达受抑制、caspase-9 失活,最终抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞的增殖、促进细胞凋亡。

本研究发现百里醌联合吉西他滨序贯治疗能更有效抑制胰腺癌细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,序贯给药是否能够在体内环境或在其他肿瘤中发挥相同的效应,还有待进一步研究。本研究也证实百里醌通过 PTEN- PI_3K/Akt 通路下调抗凋亡蛋白的表达,从而抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖,促进细胞凋亡。总之,本研究给百里醌未来应用于胰腺癌辅助化疗提供了有力证据。

参考文献

- Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, *et al.* Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2012, 51 (1): 3-13
- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics [J]. *CA*, 2011, 61 (2): 69-90
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA*, 2013, 63 (1): 11-30
- Gali - Muhtasib H, Roessner A, Schneider - Stock R. Thymoquinone: a promising anti - cancer drug from natural sources [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 38 (8): 1249 - 1253
- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed [J]. *International Immunopharmacology*, 2005, 5 (13 - 14): 1749 - 1770
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144 (5): 646 - 674
- Gali - Muhtasib H, Diab - Assaf M, Boltze C, *et al.* Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53 - dependent mechanism [J]. *International Journal of Oncology*, 2004, 25 (4): 857 - 866
- Koka PS, Mondal D, Schultz M, *et al.* Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species [J]. *Experimental biology and Medicine*, 2010, 235 (6): 751 - 760
- Odeh F, Ismail SI, Abu - Dahab R, *et al.* Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer [J]. *Drug Delivery*, 2012, 19 (8): 371 - 377
- Alhosin M, Abusnina A, Achour M, *et al.* Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73 - dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1 [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 79 (9): 1251 - 1260
- Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2010, 7 (3): 163 - 172
- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, *et al.* Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. *Cancer Research*, 2009, 69 (13): 5575 - 5583
- Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, *et al.* Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone - refractory prostate cancer [J]. *Cancer Research*, 2007, 67 (16): 7782 - 7788
- Rajput S, Kumar BN, Dey KK, *et al.* Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G(1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells [J]. *Life Sciences*, 2013, 93 (21): 783 - 790
- Nakamura H, Kumei Y, Morita S, *et al.* Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl-2) and anti - apoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vector - averaged gravity condition [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, 1010: 143 - 147
- Wong WW, Vince JE, Lalaoui N, *et al.* cIAPs and XIAP regulate myelopoiesis through cytokine production in a RIPK1 and RIPK3 dependent manner [J]. *Blood*, 2014, 123 (16): 2562 - 2572
- Castells M, Milhas D, Gandy C, *et al.* Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation [J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4: e887
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (47): 7265 - 7279
- Das S, Dey KK, Dey G, *et al.* Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma [J]. *PloS one*, 2012, 7 (10): e46641
- Attoub S, Sperandio O, Raza H, *et al.* Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo [J]. *Fund Clin Pharmacol*, 2013, 27 (5): 557 - 569
- Arafael SA, Zhu Q, Shah ZI, *et al.* Thymoquinone up - regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin - resistant human breast cancer cells [J]. *Mutation Research*, 2011, 706 (1 - 2): 28 - 35
- Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3 - kinase/AKT pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (8): 4240 - 4245
- Zhang LL, Liu J, Lei S, *et al.* PTEN inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer via downregulation of FAK expression [J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26 (5): 1011 - 1020

(收稿日期:2014-03-08)

(修回日期:2014-03-24)