

蛇床子素通过促进胃癌细胞 N87 凋亡和细胞周期阻滞而抑制细胞增殖

杨 赞*, 杨 柳, 李晓静, 丁彦柯, 赵芳玉, 张子恒, 田子音, 周 贝*

(新乡医学院基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 河南 新乡 453000)

摘要 蛇床子素是从伞形科植物蛇床中提取的一类具有生物活性的化合物。研究显示,蛇床子素对多种肿瘤细胞具有抑制作用,然而尚未有研究揭示其对胃癌 N87 细胞的抗肿瘤活性。本文研究了蛇床子素在体外和荷瘤小鼠体内对胃癌 N87 细胞的抗肿瘤效应,并进一步利用流式细胞术、TUNEL 试验及 Western 印迹检测分析其对细胞周期及细胞凋亡的影响,以探索其作用机制。研究表明,蛇床子素有效地抑制了体外培养的 N87 细胞生长,并呈浓度依赖效应。本文还建立了 N87 的荷瘤小鼠模型。结果显示,无论是在低剂量(50 mg/kg)或高剂量(100 mg/kg)情况下,蛇床子素均显示了有效的肿瘤生长抑制效果。流式细胞术及 Western 印迹的结果表明,蛇床子素诱导 N87 细胞阻滞在 G₂/M 期。通过流式细胞术、TUNEL 测试及 Western 印迹结果证明,蛇床子素通过激活胱天蛋白酶-3 依赖的凋亡通路,最终导致了 N87 细胞凋亡的发生。综上所述,本研究显示,蛇床子素在胃癌 N87 细胞中通过促进细胞凋亡而发挥其抗肿瘤活性,这将为应用于胃癌的临床治疗提供理论参考。

关键词 蛇床子素; 胃癌; 抗肿瘤作用; 细胞周期阻滞; 细胞凋亡

中图分类号 R456

Osthole Inhibits Cell Proliferation by Promoting Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Gastric Cancer Cell Line N87

YANG Yun*, YANG Liu, LI Xiao-Jing, DING Yan-Ke, ZHAO Fang-Yu,
ZHANG Zi-Heng, TIAN Zi-Yin, ZHOU Bei*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University,
Xinxiang 453000, Henan, China)

Abstract Osthole is a natural active coumarin, which was first derived from *Cnidium monnieri* (L.) Cusson. Recent studies revealed that osthole possesses potent anti-tumor activity in several types of cancers. However, the anti-tumor effects of osthole against N87 gastric cancer cells have not been reported. We studied the anti-tumor effects of osthole on N87 cells *in vitro* and *in vivo*, and further explored the mechanism. The effects of osthole on cell cycle arrest and apoptosis were examined by flow cytometry and Western blotting assays. Results showed that osthole was effective in inhibiting the growth of N87 cells in a dose-dependent manner. Notably, we found that osthole also exert its anti-tumor effects on N87 tumor xenografts at both low and high doses. Furthermore, we investigated its mechanism using

收稿日期: 2018-08-21; 修回日期: 2018-11-12; 接受日期: 2018-11-15

国家自然科学基金(No.81703054); 新乡医学院博士启动基金(No.XYBSKYZZ201506)和国家级大学生创新训练计划(No.201810472005)资助

* 通讯作者 Tel: 0373-3029127; E-mail: jamesyangyun1@126.com; 326072773@qq.com

Received: August 21, 2018; Revised: November 12, 2018; Accepted: November 15, 2018

Supported by National Science Foundation of China (No. 81703054), Doctoral Scientific Research Foundation of Xinxiang Medical University (No.XYBSKYZZ201506) and National Undergraduate Innovative Training Program (No.201810472005)

* Corresponding author Tel: 0373-3029127; E-mail: jamesyangyun1@126.com; 326072773@qq.com

flow cytometry, Western blotting and TUNEL assays. Results indicated that osthole caused cell cycle arrest in the G₂/M phase and finally resulted in caspase-3 dependent apoptosis in N87 cells. To conclude, these results revealed the anti-tumor activity of osthole on N87 gastric cancer cells and uncovered the mechanism of action, suggesting the potential of osthole in gastric cancer treatment in the future.

Key words osthole; gastric cancer; anti-tumor effects; cell cycle arrest; apoptosis

胃癌是全世界范围内最常见的恶性肿瘤之一。据研究机构统计,其发病率位居第4位,死亡率位居第2位^[1]。我国是胃癌的高发国家,发病和死亡例数均占全世界的50%,是需要重点防治的癌症之一^[2]。根治性手术是治疗早期胃癌的主要手段,但因胃癌初期症状隐匿,约半数以上患者是在进展期被确诊,从而错失手术机会。化疗药物对中晚期胃癌有着较好的疗效,但其毒副作用和长期使用产生耐药性的问题也限制其应用。胃癌肿瘤微环境的复杂性及基因不稳定性也导致靶向治疗药物疗效受限^[3]。因此,更为有效的治疗手段或药物仍有待开发。

中医学是我国的传统医学,作为肿瘤综合治疗措施中的一个重要组成部分,在改善肿瘤患者的生存质量、延长生存期及对控制病情进展方面均显示其良好的效果^[4]。许多中草药提取物,如甾体皂苷类、裙带菜多糖及香豆素类化合物等都具有较好的抗肿瘤活性^[5]。香豆素是一类具有苯骈- δ 吡喃内酯环结构的有机化合物,广泛存在于伞形科、瑞香科及芸香科等植物中。已经证实,这类化合物具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤等多种生物活性^[6-8]。研究表明,它的抗肿瘤活性往往具有肿瘤细胞的选择性及对正常细胞低毒性的特点^[9]。

蛇床子素(osthole)为一种线型呋喃香豆素化合物,其化学结构如图1A所示。蛇床子素是从伞形科植物蛇床(*Cnidium monnieri* (L.) Cusson)的果实蛇床子中提取到的具有生物活性的香豆素类化合物^[10]。作为一种传统的中药,中医往往将其用于治疗皮肤瘙痒、湿疹及男性功能障碍等^[10, 11]。研究还发现,蛇床子素具有抗骨质疏松、抑制血小板聚集及抗氧化等多种药理学活性^[12-14]。最近的研究表明,其还显示了较强的抗肿瘤活性^[15-17]。研究表明,蛇床子素可以抑制肺癌 A549 细胞的生长,其作用机制是通过抑制 PI3K/AKT 通路,引发细胞凋亡^[18]。此外,蛇床子素也可通过抑制 c-Met/AKT/mTOR 通路,抑制 HER2 过表达的乳腺癌生长和进展^[19, 20]。关于蛇床子素对胃癌抑制作用的报道较少。本课题组研究了蛇床子素对胃癌 N87 细胞的

体外和体内的作用效果,进一步阐释了其发挥抗肿瘤的可能作用机制,以期将来应用于临床治疗胃癌提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌 N87 细胞株购自美国菌种保藏中心(ATCC);蛇床子素购自上海麦克林生化科技有限公司;细胞凋亡检测试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术公司;CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司;RIPA 细胞裂解液购自北京鼎国昌盛生物技术公司;所有抗体均购自美国 Cell signaling 公司。ECL 发光液购自上海碧云天生物技术公司。

Balb/C 裸鼠购自北京维通利华公司。所有动物试验方案都经过了新乡医学院动物实验伦理委员会批准。

1.2 细胞毒性检测

在 96 孔板中,每孔加入 5×10^3 个细胞的 N87 细胞悬液 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 12 h,实验组分别加入不同浓度的蛇床子素药液孵育,使蛇床子素终浓度分别为 0.05、0.2、0.8、12.5 及 50 μ mol/L,同时设定空白对照组(药物溶剂组)和阴性对照组(不加药组)。在上述条件下培养 48 h,每孔加入 CCK-8 试剂,培养 2 h。酶标仪 450 nm 处测定每孔的吸光值(A 值)。按照公式:抑制率(100%) = $1 - (\text{实验组吸光值} - \text{空白对照组吸光值}) / (\text{阴性对照组吸光值} - \text{空白对照组吸光值})$,计算相应的抑制率。试验进行 3 次重复。

1.3 体内抑瘤检测

在 6~8 周龄雌性裸鼠右背部皮下接种 1×10^7 个 N87 细胞。在接种细胞后,肿瘤体积达到平均 120~150 mm³ 时,对荷瘤小鼠进行分组并给药:将它们随机分为 3 组,以对裸鼠剪耳作为分组标记,每组 5 只裸鼠。实验组以腹腔给药方式注射蛇床子素药液,剂量为(50 或 100 mg/kg),对照组注射 PBS 溶液,每天 1 次,共给药 2 周。每隔 2 d 使用游标卡尺测量瘤体长(mm)与

宽(mm)。应用公式:瘤体体积=[长×(宽)²]/2对肿瘤体积进行测量计算;以每组肿瘤平均大小对时间进行肿瘤生长曲线的绘制。试验结束,处死小鼠,分离瘤体。

1.4 免疫印迹分析

取对数生长期胃癌 N87 细胞,按 4×10⁵ 个/mL 接种于 6 孔培养板,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养 12 h,之后在实验组中加入蛇床子素药液至终浓度为 50 和 100 μmol/L。以不加药细胞为空白对照组。培养 24 h,收集细胞,加入 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白质,应用 BCA 法测定裂解液中总蛋白质浓度。经 SDS-PAGE 后,转移至 PVDF 膜上,用 10% 脱脂奶粉封闭 1 h,再用对应的一抗孵育 1~2 h,用 TBST 洗涤 4 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,再用 TBST 洗涤 4 次后显影。以 β-肌动蛋白为内参。试验进行 3 次重复。

1.5 细胞周期检测

取对数生长期细胞,按 4×10⁵ 个/mL 接种于 6 孔板中,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养 12 h。实验组加入蛇床子素药液,至终浓度为 40 μmol/L。在上述条件下培养 0 h,6 h 及 12 h。用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞,用预冷 PBS 洗涤。之后使用预冷的 75%乙醇固定 20 min,离心弃乙醇,PBS 洗 2 次,加入碘化丙啶(PI)溶液 1 mL;室温避光孵育 45 min,利用流式细胞仪进行检测,用 Flowjo7.6 软件进行数据分析。试验进行 3 次重复。

1.6 凋亡检测

取对数生长期的胃癌 N87 细胞,按 4×10⁵ 个/mL 接种于 6 孔培养板,置于 37 ℃,5%的 CO₂ 培养

箱培养 12 h,之后在实验组中加入蛇床子素药液至终浓度为 50 和 100 μmol/L。以不加药的细胞为空白对照组。培养 30 h,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2~3 次。之后加入 200 μL 含有 1%胎牛血清的 PBS 重悬细胞,加入 5 μL 连接素(Annexin V-FITC)和 5 μL 碘化丙啶(PI)溶液混匀,4 ℃避光孵育 10 min,利用流式细胞术检测。试验进行 3 次重复。

1.7 TUNEL 试验

收集经蛇床子素(终浓度为 50 μmol/L)处理 24 h 后的胃癌 N87 细胞。PBS 漂洗 1 次,重悬细胞,用 4%的多聚甲醛固定 25 min;固定后用 PBS 浸洗 2 次,每次 5 min;然后在 0.2%的 Triton X-100 中处理 5 min;PBS 浸洗 2 次,每次 5 min。加 TUNEL 反应混合液 50 μL,湿盒中 37 ℃反应 1 h;PBS 漂洗后,在荧光显微镜下观察。

1.8 统计学方法

图中的统计学数据都以平均值±标准差(mean±SD)表示。除非有特殊说明,即使用双尾非配对的 *T* 检验进行统计学分析。以 *P*<0.05(*)作为差异显著性的判断标准。所有的统计学分析皆应用了 GraphPad Prism 5 软件。

2 结果

2.1 蛇床子素抑制 N87 细胞的生长

蛇床子素的结构如 Fig. 1A 所示。利用 CCK-8 试验测定了蛇床子素处理 48 h 后对胃癌 N87 细胞生长的作用(Fig. 1B)。结果显示,蛇床子素显著抑制 N87 细胞的生长,且生长抑制曲线呈现了浓度依赖效应。

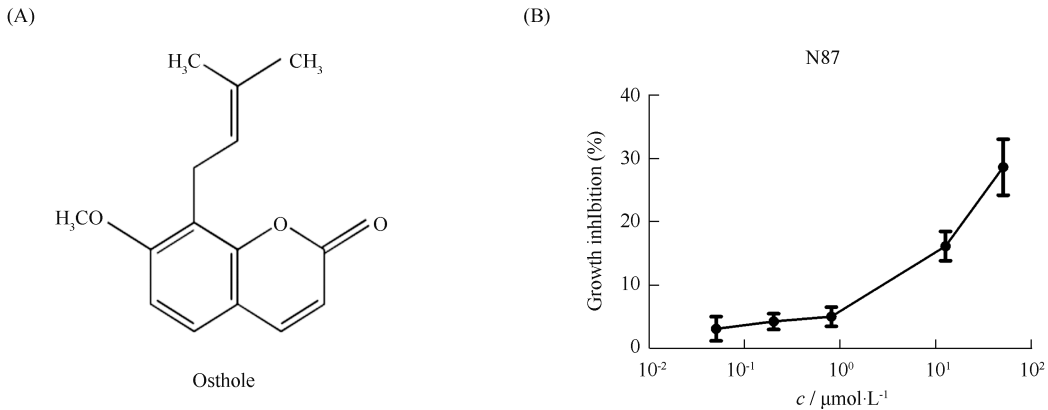


Fig.1 Osthole inhibited the growth of N87 cells in a dose-dependent manner (A) Structure of Osthole. (B) CCK-8 assays evaluating the growth of N87 cells upon treatment with increasing concentrations of osthole for 48 hours

2.2 蛇床子素引起 N87 细胞周期阻滞

为进一步探讨蛇床子素抑制胃癌 N87 细胞的作用机制,观察蛇床子素对细胞周期的影响。结果显示,40 $\mu\text{mol/L}$ 的蛇床子素作用 6 h 和 12 h 时,与对照组相比, G_2/M 期细胞数显著提升, G_2/M 期细胞比例从平均 16.25% 上升到 28.43% (Fig. 2A,

2B)。另外,我们检测了 N87 细胞接受蛇床子素处理后,细胞周期相关蛋白细胞周期蛋白 B1 的变化。结果显示,随着蛇床子素浓度的增高,细胞周期蛋白 B1 的表达显著下调(Fig.4C,4D)。综合上述结果的数据表明,蛇床子素可引起胃癌 N87 细胞的 G_2/M 期阻滞。

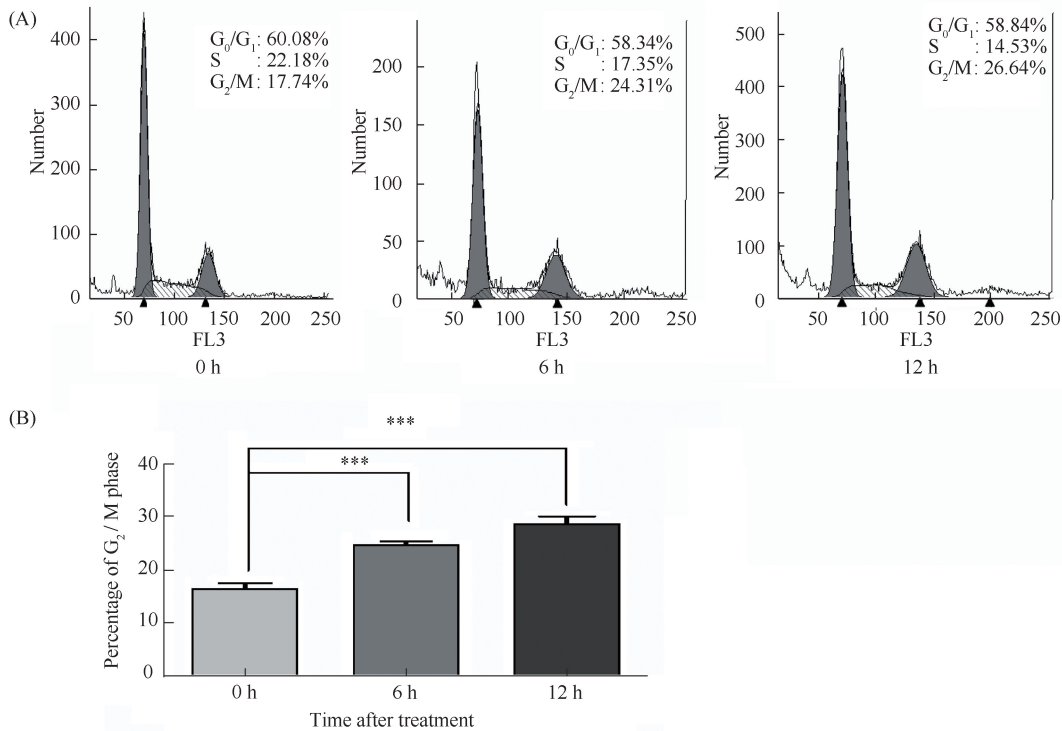


Fig.2 Osthole treatment induced cell cycle arrest (A) Cell cycle analysis of N87 cells following 40 $\mu\text{mol/L}$ osthole treatment for 0, 6 and 12 hours by flow cytometry. (B) Quantification of the percentage of G_2/M phase in N87 cells. Data show the mean \pm SD (3 independent experiments). *** $P < 0.001$

2.3 蛇床子素促进 N87 细胞的细胞凋亡

鉴于上述结果,继续探讨蛇床子素对胃癌 N87 细胞凋亡的影响。首先观察了蛇床子素处理 24 h 时,N87 细胞形态的变化。镜下观察结果显示,贴壁细胞随着药物浓度的提高逐渐变圆并漂浮在培养液中 (Fig. 3A)。TUNEL 试验的检测结果表明,蛇床子素加入 24 h 后诱导了部分 N87 细胞的凋亡 (Fig. 3B)。更重要的是,流式细胞术结果显示,不同浓度的蛇床子素(0, 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用 30 h,N87 细胞的总凋亡比例显著升高,从 3.24% 上升到 35.74% (Fig. 4A, 4B)。胱天蛋白酶-3 是细胞凋亡的主要效应分子^[21]。Bcl-2 为著名的抑制凋亡分子,而 Bax 则可以促进凋亡的进程^[22, 23]。进一步通过免疫印迹检测蛇床子素处理后,观察这 3 种蛋白质水平变化。结果显示,活化后的胱天蛋白酶-3

剪切片段水平显著增强 (Fig. 4C, 4D)。此外,随着蛇床子素药液浓度升高,Bcl-2 及 Bcl-xL 的水平呈现下调,而 Bax 的水平呈现上升的趋势 (Fig. 4C, 4D)。以上结果表明,蛇床子素可能通过激活胱天蛋白酶-3 依赖的细胞凋亡信号通路而促进 N87 细胞凋亡的效应。

2.4 蛇床子素抑制 N87 荷瘤小鼠体内的肿瘤生长

最后,本文测试了蛇床子素对 N87 荷瘤小鼠的体内抑制肿瘤生长效果。在经过 2 周的蛇床子素治疗后,实验组小鼠肿瘤平均大小为 330.3 mm^3 ,对照组为 592.6 mm^3 (Fig. 5A, 5B)。蛇床子素在 N87 荷瘤小鼠体内显示了显著的抑瘤效果,且呈现剂量依赖效应。因此,蛇床子素在体外和体内均有对胃癌 N87 细胞显著的抑瘤效果,是一种有潜力的抗肿瘤候选药物。

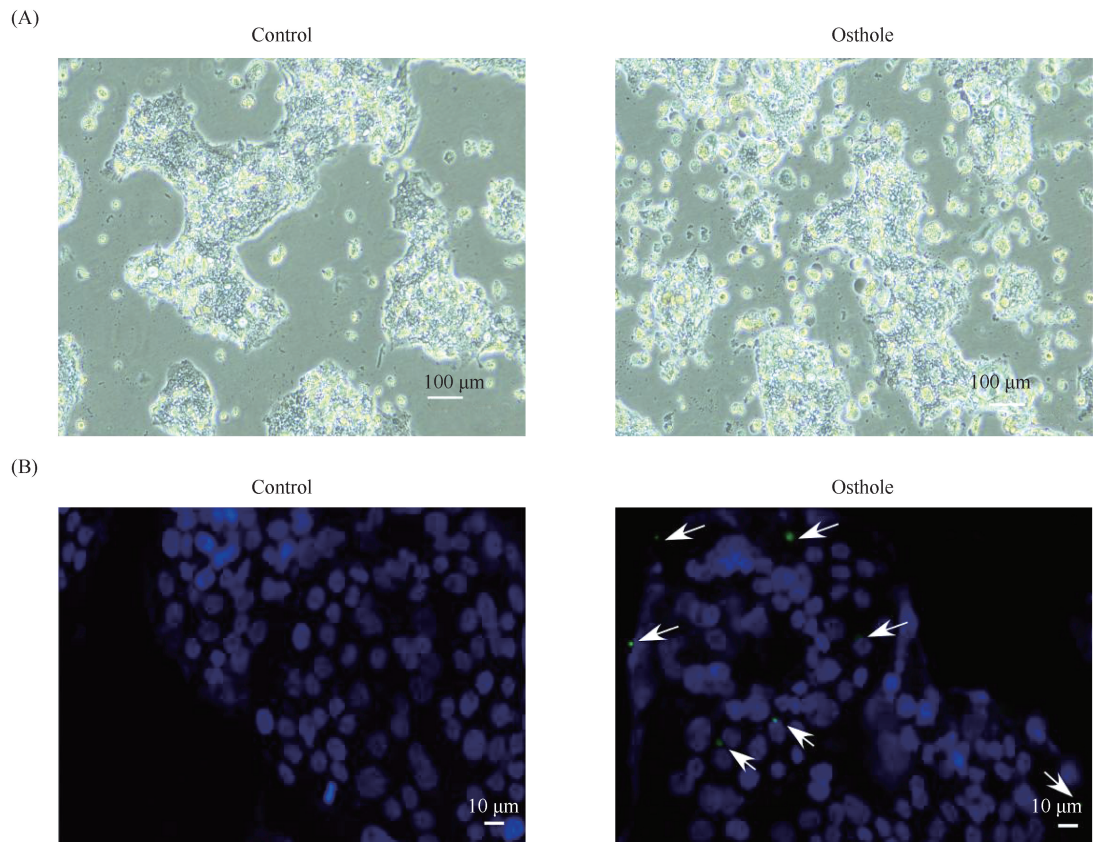


Fig.3 Apoptosis was induced in N87 cells when treated with osthole (A) The morphological changes of N87 cells when treated with osthole at the concentration of 0 (control) or 50 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours. Scale bar, 100 μm . (B) TUNEL assays showing the effect of osthole (50 $\mu\text{mol/L}$) treatment for 24 hours on apoptosis in N87 cells. Scale bar, 10 μm

3 讨论

中药在肿瘤的治疗,尤其是肿瘤的综合治疗中发挥着越来越重要的作用。其中,近年来对中药活性成分抑制肿瘤生长、增殖及调节肿瘤微环境的相关研究也越来越多。蛇床子素是一种传统的中药,之前主要用于治疗皮肤病及男性性功能障等。近年来发现,蛇床子素亦具有良好的抗肿瘤效果。已有研究表明,蛇床子素在肺癌、肝癌及乳腺癌等肿瘤中,均显示了一定的抑瘤效果^[16, 20, 24]。关于蛇床子素对胃癌细胞抑制作用的研究较少。因此,本文首先观察了其在体外及体内环境中对 N87 细胞的生长作用。结果显示,蛇床子素在体外和体内环境中都显示了显著的抑制肿瘤细胞生长的效果。因此,作为一种低毒且具有抗肿瘤效果的天然提取物,蛇床子素在胃癌的治疗中具有广阔的前景。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡的过程,可以被生理性或病理性刺激诱发,具有复杂的分子调控

机制。本文的研究表明,当蛇床子素处理较短时间的情况下,可将细胞阻滞在 G_2/M 期;当延长药物作用时间后,引起了显著的细胞凋亡发生。胱天蛋白酶-3 处于酶级联反应的底端,是细胞凋亡的主要效应分子,参与了包括细胞色素 C 及死亡受体配体途径等多个信号级联反应过程^[25]。本文的研究结果表明,在蛇床子素处理后,活化的胱天蛋白酶-3 剪切体 (17 kD 和 19 kD) 的表达量明显上调。同时,我们发现,胱天蛋白酶-3 上游的抗凋亡分子 Bcl-2 的表达量随着蛇床子素浓度的提高也显示了下调的趋势,而促凋亡分子 Bax 的表达则上调。这也证实,蛇床子素可能是通过靶向胱天蛋白酶-3 依赖的凋亡通路而发挥其作用效果。

N87 细胞是一种 HER2 过表达的胃癌细胞,同时也是对曲妥珠单抗作用敏感 的细胞。曲妥珠的作用机制包括抑制 HER2 下游的 PI3K/AKT 及 MAPK 信号通路、引起肿瘤细胞凋亡等^[26, 27]。但是,曲妥珠治疗胃癌一段时间后,往往会引起肿瘤患者的耐受而使治疗终止。我们设想,是否可以将曲妥珠单

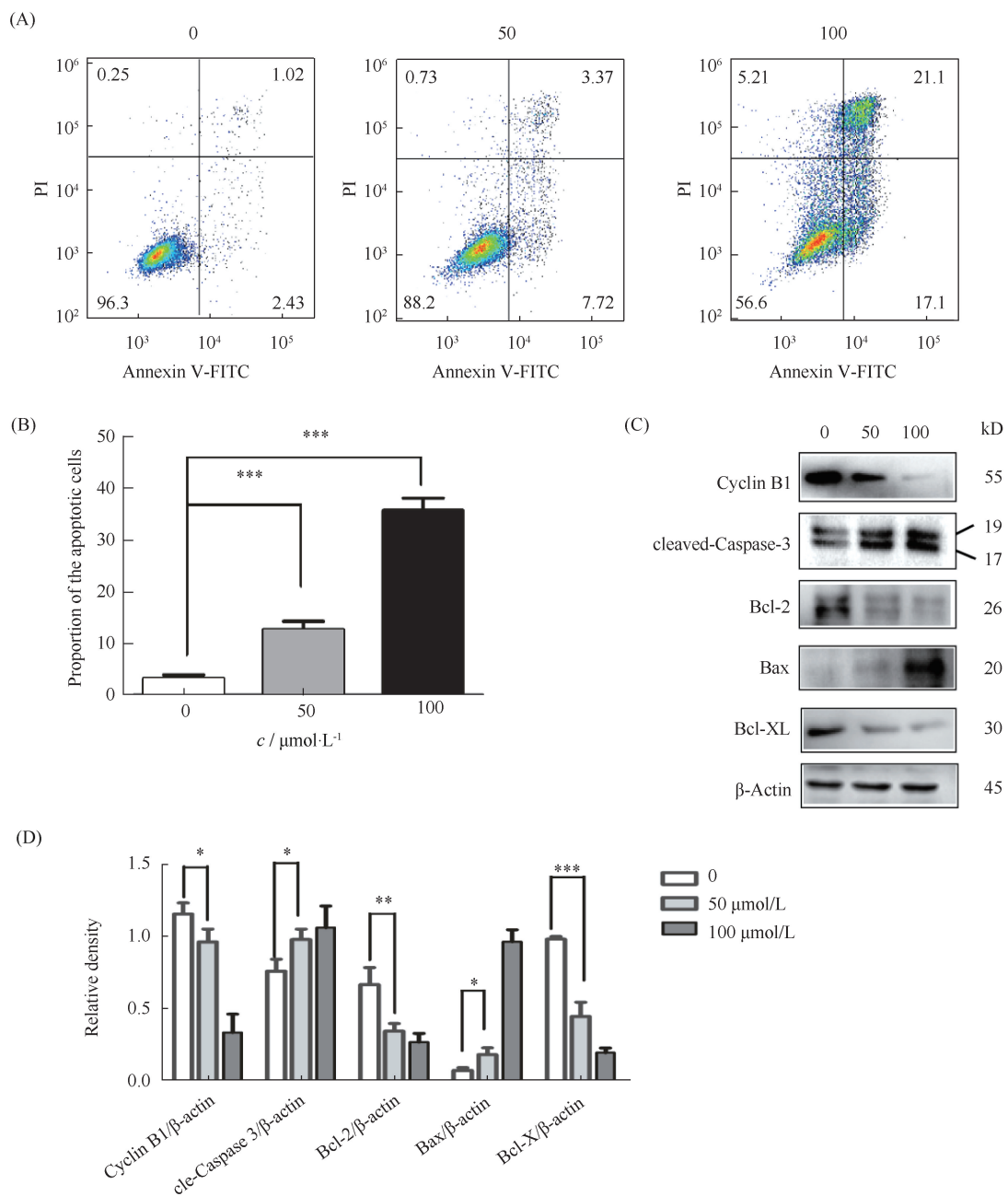


Fig.4 Osthole treatment induced caspase-3-dependent apoptosis in N87 cells (A) Induction of apoptosis of N87 cells after osthole treatment at the concentration of 0, 50 or 100 μmol/L for 30 hours. The percentage of the early apoptosis was calculated by Annexin V (+) and PI (-), while the percentage of the late apoptosis was calculated by Annexin V (+) and PI (+). (B) Quantification of the percentage of apoptotic cells in N87 cells. Data show the mean ± SD (three independent experiments). *** $P < 0.001$. (C) Apoptosis-related proteins (cleaved caspase-3, Bax or Bcl-2) were examined in N87 cells when treated with osthole (0, 50 or 100 μmol/L) for 24 hours. β-Actin was used as a loading control. (D) Quantification of Western blotting signal intensity relative to the β-actin loading control using the Image J software. Data show the mean ± SD (three independent experiments). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

抗和蛇床子素联合用药治疗 HER2 过表达的胃癌,尤其是对曲妥珠耐药的胃癌,以达到两药协同克服曲妥珠耐药问题。我们将在接下来的研究中对此问题进行深入研究。综上所述,本文的研究将为临床治疗胃癌提供有益的参考,并为将来将蛇床子素用于胃癌的治疗提供一定理论基础。

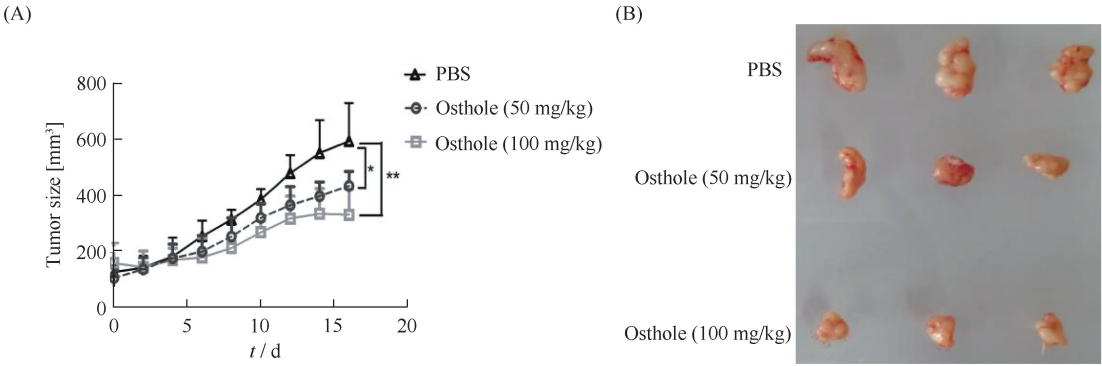


Fig.5 Osthole treatment inhibits the growth of N87 cancer cells *in vivo* (A) Tumor volumes of N87 xenografts after injection with Osthole (50 or 100 mg/kg) or PBS (control) for two weeks (one injection per day). (B) On day 16 post the first injection, xenograft tumors from each group were removed and photographed. Representative tumors in each group were shown

参考文献 (References)

[1] Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, *et al.* Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2009, **374**(9688): 477-490

[2] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. *中国肿瘤临床* (Zuo TT, Zheng RS, Zeng HM, *et al.* Epidemiology of stomach cancer in China [J]. *Chin J Clin Oncol*), 2017, **44**(1): 52-58

[3] 潘婷婷, 陈威佐, 关泉林. 胃癌靶向治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤临床* (Pan TT, Chen WZ, Guan QL. Advances in targeted therapy of gastric cancer[J]. *Chin J Clin Oncol*), 2018, **45**(4): 209-213

[4] Meng MB, Cui YL, Guan YS, *et al.* Traditional Chinese medicine plus transcatheter arterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *J Altern Complement Med*, 2008, **14**(8): 1027-1042

[5] 张秀云, 周凤琴. 中药抗肿瘤研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报* (Zhang XY, Zhou FQ. Anti-tumor traditional Chinese medicine research progress [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*), 2012, **14**(11): 142-144

[6] Niu H, Wang W, Li J, *et al.* A novel structural class of coumarin-chalcone fibrates as PPARalpha/gamma agonists with potent antioxidant activities: Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, **138**: 212-220

[7] Liu YT, Gong PH, Xiao FQ, *et al.* Chemical constituents and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities of *melilotus officinalis* (Linn.) Pall[J]. *Molecules*, 2018, **23**(2): pii: E271

[8] Lee JC, Shin EA, Kim B, *et al.* Auranpene induces apoptosis via myeloid cell leukemia 1-mediated activation of caspases in PC3 and DU145 prostate cancer cells[J]. *Phytother Res*, 2017, **31**(6): 891-898

[9] 李林虎, 陈莉, 夏玉凤. 抗肿瘤香豆素类化合物的研究进展[J]. *中国药科大学学报* (Li LH, Chen L, Xia YF. Progress in the study of coumarin derivatives as antitumor agents[J]. *J China Pharm Univ*), 2013, **44**(4): 374-379

[10] Zhang L, Jiang G, Yao F, *et al.* Growth inhibition and apoptosis induced by osthole, a natural coumarin, in hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(5): e37865

[11] You L, Feng S, An R, *et al.* Osthole: a promising lead compound for drug discovery from a traditional Chinese medicine (TCM)[J]. *Nat Prod Commun*, 2009, **4**(2): 297-302

[12] Liao PC, Chien SC, Ho CL, *et al.* Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF-kappaB, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, **58**(19): 10445-10451

[13] Chen T, Liu W, Chao X, *et al.* Neuroprotective effect of osthole against oxygen and glucose deprivation in rat cortical neurons; involvement of mitogen-activated protein kinase pathway [J].

Neuroscience, 2011, **183**: 203-211

[14] 周则卫, 沈秀. 蛇床子素药理活性的研究概况 [J]. *中国新药杂志* (Zhou ZW, Shen Xiu. Pharmacological activities of osthole [J]. *Chin J New Drugs*), 2006, **15**(20): 1726-1730

[15] Ye Y, Han X, Guo B, *et al.* Combination treatment with platycodin D and osthole inhibits cell proliferation and invasion in mammary carcinoma cell lines[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, **36**(1): 115-124

[16] Wang L, Peng Y, Shi K, *et al.* Osthole inhibits proliferation of human breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis[J]. *J Biomed Res*, 2015, **29**(2): 132-138

[17] Yang LL, Wang MC, Chen LG, *et al.* Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines[J]. *Planta Med*, 2003, **69**(12): 1091-1095

[18] Xu X, Zhang Y, Qu D, *et al.* Osthole induces G₂/M arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, **30**: 33

[19] Lin VC, Chou CH, Lin YC, *et al.* Osthole suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt/mTOR pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, **58**(8): 4786-4793

[20] Hung CM, Kuo DH, Chou CH, *et al.* Osthole suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition via repression of the c-Met/Akt/mTOR pathway in human breast cancer cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, **59**(17): 9683-9690

[21] Larsen BD, Rampalli S, Burns LE, *et al.* Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(9): 4230-4235

[22] Zhao F, Zhao J, Song L, *et al.* The induction of apoptosis and autophagy in human hepatoma SMMC-7721 cells by combined treatment with vitamin C and polysaccharides extracted from *Grifola frondosa*[J]. *Apoptosis*, 2017, **22**(11): 1461-1472

[23] Lagunas-Martinez A, Garcia-Villa E, Arellano-Gaytan M, *et al.* MG132 plus apoptosis antigen-1 (APO-1) antibody cooperate to restore p53 activity inducing autophagy and p53-dependent apoptosis in HPV16 E6-expressing keratinocytes[J]. *Apoptosis*, 2017, **22**(1): 27-40

[24] Kao SJ, Su JL, Chen CK, *et al.* Osthole inhibits the invasive ability of human lung adenocarcinoma cells via suppression of NF-kappaB-mediated matrix metalloproteinase-9 expression [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, **261**(1): 105-115

[25] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, *et al.* Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14128

[26] Yang Y, Guo R, Tian X, *et al.* Synergistic anti-tumor activity of Nimotuzumab in combination with Trastuzumab in HER2-positive breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **489**(4): 523-527

[27] Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice[J]. *N Engl J Med*, 2007, **357**(1): 39-51