

阿司匹林增加人肝癌细胞对三氧化二砷敏感性的实验研究及机制探讨*

胡亚男, 谷仕艳, 张遵真[△]

四川大学华西公共卫生学院 环境卫生与职业医学系(成都 610041)

【摘要】 目的 研究阿司匹林能否增加肝癌细胞对三氧化二砷(As_2O_3)的敏感性,并从氧化应激角度探索其增敏的机制。方法 采用 $10 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 和不同浓度的阿司匹林联合处理人肝癌细胞 HepG2 24 h 后,采用 MTT 比色法测定细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡和细胞内活性氧(ROS)水平,Western blot 检测总蛋白中血红素氧合酶 1(HO-1)和核蛋白中核转录因子 Nrf2 的表达水平。结果 与空白对照相比, $10 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 可引起肝癌细胞存活率降低,凋亡率、ROS 水平、HO-1 和 Nrf2 表达升高;不同浓度(0.1、1.0、2.5、5.0 mmol/L)的阿司匹林与 $10 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 联合处理时,HepG2 细胞存活率、总蛋白 HO-1 以及核内 Nrf2 的表达均随着阿司匹林浓度的增加呈现先升高后降低的趋势,而细胞凋亡率和细胞内 ROS 水平则表现为先降低后升高。结论 阿司匹林对 As_2O_3 的增敏作用有限,只有在较高浓度(5 mmol/L)时表现出一定的增敏作用,其增敏机制可能是通过抑制 Nrf2-HO-1 途径从而导致 ROS 蓄积,增强 As_2O_3 对 HepG2 的凋亡诱导能力,进而增加 HepG2 对 As_2O_3 的敏感性。

【关键词】 三氧化二砷 阿司匹林 凋亡 血红素氧合酶 1 核转录因子 Nrf2

The Experiment Study and Mechanism of Aspirin Enhances Cellular Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cell Line to Arsenic Trioxide HU Ya-nan, GU Shi-yan, ZHANG Zun-zhen[△]. Department of Environmental Health and Occupational Medicine, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: zhangzunzhen@163.com

【Abstract】 Objective To explore whether aspirin could sensitize arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma cell line and understanding the combination mechanisms underlying co-treatment. **Methods** Cell viability was detected by MTT assay, cell apoptosis rate and reactive oxygen species (ROS) level were measured by flow cytometry, and Western blot assay was used to estimated the protein expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in total protein and NF-E2-related factor 2 (Nrf2) in nuclear protein. **Results** $10 \mu\text{mol/L}$ arsenic trioxide can decreased the cell viability, while cell apoptosis rate, ROS level, HO-1 and Nrf2 protein expression was increased ($P < 0.05$). When compared with arsenic trioxide alone, co-treatment of arsenic trioxide with aspirin in different concentration (0, 0.1, 1.0, 2.5, 5.0 mmol/L) exhibited dual effects in intracellular ROS level, HO-1 and Nrf2 expression. Specifically, with the increasing of aspirin concentrations, the level of ROS induced by arsenic trioxide showed a rising trend after the first reduction, whereas, HO-1 and Nrf2 protein expression were decreased at first and then increased. **Conclusion** Low concentration, less than 2.5 mmol/L, of aspirin may reduce the ROS accumulation through activating of Nrf2-HO-1 pathway, therefore decreasing the apoptotic cell death induced by arsenic trioxide. On the contrary, 5 mmol/L aspirin could increase the sensitivity of HepG2 to arsenic trioxide through enhancing the arsenic trioxide-induced apoptosis by ROS accumulation resulting in inhibiting the Nrf2-HO-1 pathway.

【Key words】 Arsenic trioxide Aspirin Apoptosis HO-1 Nrf2

三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)在治疗急性早幼粒细胞性白血病中具有很好的疗效^[1],近年来 As_2O_3 逐渐被用于实体肿瘤的治疗,并于 2014 年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于肝癌的治

疗^[2]。然而,高剂量的 As_2O_3 会引起患者心肾毒性甚至猝死,因此,在肝癌治疗过程中 As_2O_3 使用剂量受到了严格的限制。为了提高疗效同时减少毒副作用,联合用药的策略被广泛研究和推崇。阿司匹林是目前临床上解热镇痛的一线用药,流行病学研究表明阿司匹林具有肿瘤预防作用^[3]。实验室研究显示阿司匹林对肠癌细胞系^[4]、胰岛瘤 NIT-1 细

* 国家自然科学基金(No. 81372945)资助

[△] 通讯作者, E-mail: zhangzunzhen@163.com

胞^[5]、宫颈癌 HeLa 细胞^[6]等均有抑制作用。此外,已有报道显示阿司匹林可增加肿瘤细胞对阿霉素^[7]、雷公藤甲素^[8]以及靶向药物 Navitoclax^[9]和索拉菲尼^[10]等的敏感性。迄今,国内外仅检索到 1 篇文献报导了阿司匹林增加人肝癌细胞对 As₂O₃ 的敏感性^[11],而增敏机制探讨甚少。因此,本实验进一步探讨阿司匹林增敏 As₂O₃ 的可能性,并从氧化应激角度对增敏机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

As₂O₃ 注射液(1 mg/mL,黑龙江哈尔滨医大药业有限公司);阿司匹林粉剂(Sigma);DMEM 细胞培养液和胰酶(Gibco);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,Amresco);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、浆蛋白和核蛋白提取试剂盒(南京凯基科技发展有限公司);考马斯亮兰蛋白浓度测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司);活性氧(ROS)检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);血红素氧合酶 1(HO-1)兔抗人抗体(武汉博士德生物工程有限公司);核转录因子 Nrf2 兔抗人抗体(Abgent);Lamin B 兔抗人抗体(ABclonal); β -actin 小鼠抗人抗体、山羊抗小鼠和山羊抗兔抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);增强型化学发光(ECL)显影试剂盒(Pierce)。

CO₂ 培养箱(Sanyo);全波长酶标仪(Thermo);FC-500 流式细胞仪(Beckman Coulter);Chemi Doc XRS 凝胶成像系统(Bio-Rad)。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2 购于中国典型培养物保藏中心(武汉),细胞于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 条件下采取开放式单层贴壁培养,每 3 d 传代 1 次。培养基含 10% 小牛血清、1% 双抗(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μ g/mL)。

1.3 方法

1.3.1 MTT 实验检测细胞存活率 取对数生长期 HepG2 细胞按 10⁴/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,分别予以不同浓度(0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、8.0 mmol/L)的阿司匹林单独及联合 10 μ mol/L As₂O₃ 处理,每个剂量组设 8 个复孔,同时设空白对照组(即 As₂O₃ 和阿司匹林的浓度均为 0)。作用 24 h 后弃液,每孔加入 100 μ L MTT 溶液(浓度 0.5 mg/mL),37 °C 避光孵育 4 h 后弃培养液,加入 100 μ L 二甲基亚砷后振荡 15 min,用

酶标仪测定 490 nm 波长下各孔的吸光度值(A₄₉₀),计算细胞存活率。细胞存活率(%)=染毒组 A₄₉₀/对照组 A₄₉₀×100%。

1.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡 根据 MTT 实验结果,以阿司匹林终浓度为 0.1、1.0、2.5 和 5.0 mmol/L,As₂O₃ 终浓度为 10 μ mol/L 作为后续实验药物浓度。取对数生长期的 HepG2 细胞按 10⁶ 细胞/孔接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,分别予以 As₂O₃ 单独及联合不同浓度的阿司匹林染毒,同时设空白对照组(即 As₂O₃ 和阿司匹林的浓度均为 0)。染毒 24 h 后,用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶收集细胞,4 °C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,弃上清液后向细胞沉淀中加入上样缓冲液 500 μ L 使细胞重悬,再向细胞悬液中加入 5 μ L Annexin V-FITC 染液和 5 μ L PI 染液,轻轻混匀后室温避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡。Winmd 软件分析凋亡率。

1.3.3 细胞内 ROS 的测定 取对数生长期的 HepG2 细胞按 1.3.2 分组接种、染毒。24 h 后弃去染毒液,加入终浓度为 2.5 μ mol/L 的荧光探针 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate,DCFH-DA),避光孵育 1 h。弃荧光探针后将孔板内细胞用 PBS 洗 3 次,胰酶消化收集细胞,并用 PBS 重复洗 2 次,再用 500 μ L PBS 重悬后转入流式管,采用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。Winmd 软件分析数据,以荧光强度的几何均值(*Gm*)表示细胞内 ROS 水平,*Gm* 值越大,ROS 的蓄积水平越高。

1.3.4 Western blot 检测 HO-1 和 Nrf2 蛋白的表达 取对数生长期的 HepG2 细胞按 1.3.2 接种、染毒。染毒结束,分别根据总蛋白和核蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白和核蛋白,用考马斯亮兰比色法测定蛋白浓度后置 -80 °C 储存备用。制 120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每条泳道上蛋白样品 50 μ g,按实验室常规方法电泳,转膜,封闭。分别孵育一抗 HO-1(1 : 400)、Nrf2(1 : 3 000)、 β -actin(1 : 1 000)、Lamin B(1 : 500)于 4 °C 过夜,二抗(1 : 5 000)室温孵育 2 h,ECL 显色,Chemi Doc XRS 凝胶成像系统曝光采集图像。采用图像分析软件 Quantity One 对各条带进行定量,总蛋白以 β -actin 为内参,核蛋白以 Lamin B 为内参,测定目的条带相对积分灰度值(相对积分灰度值=目的蛋白积分灰度值/内参蛋白积分灰度值)。

1.3.5 统计学方法 所有实验独立重复 3 次,数据

以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据分析前进行正态性检验和方差齐性检验;方差齐的多组数据用单因素方差分析进行组间比较,LSD法进行两两比较;方差不齐的数据则采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 阿司匹林对 As_2O_3 作用下肝癌细胞存活率的影响

由图1可见,与空白对照组比较,当阿司匹林浓度 ≤ 2.0 mmol/L,对细胞的存活没有明显的影响;当浓度 > 2.0 mmol/L时,随着阿司匹林浓度的升高,细胞存活率呈降低趋势,提示浓度 > 2.0 mmol/L的阿司匹林具有抑制肝癌细胞生长的作用。 $10 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 单独作用于肝癌细胞时,细胞存活率为 65.6%;与 As_2O_3 联合作用时,阿司匹林浓度 < 3.0 mmol/L时可拮抗 As_2O_3 引起的细胞存活率下降(vs. As_2O_3 单独处理组, $P < 0.05$),其中在 1.0 mmol/L时最明显;在 3.0 mmol/L时,细胞存活率为 66.7%,与 As_2O_3 单独作用时的细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.05$);当阿司匹林浓度 > 3.0 mmol/L时,可协同 As_2O_3 降低细胞存活率(vs. As_2O_3 单独处理组, $P < 0.05$),并随阿司匹林剂量的增加,细胞存活率降低,均低于相应的阿司匹林单独处理组($P < 0.05$)。

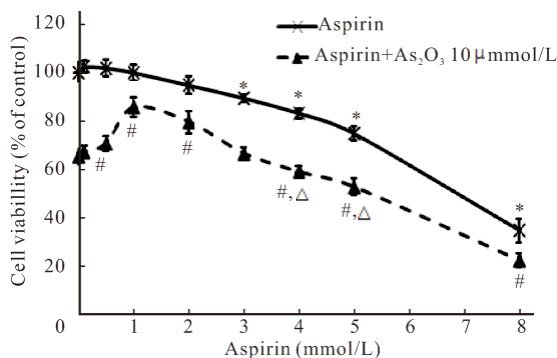


图1 阿司匹林联合三氧化二砷对肝癌细胞存活率的影响

Fig 1 The viability induced by aspirin or arsenic trioxide combined with aspirin

* $P < 0.05$, vs. 0 mmol/L As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin group (blank control); # $P < 0.05$, vs. $10 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin group; Δ $P < 0.05$, vs. aspirin group with the same dose of aspirin

2.2 阿司匹林对 As_2O_3 作用下细胞凋亡的影响

如表1所示, As_2O_3 单独处理时细胞凋亡率高于空白对照组($P < 0.05$)。与阿司匹林联合作用时,当阿司匹林浓度 < 5.0 mmol/L时,可拮抗

As_2O_3 引起的凋亡(vs. As_2O_3 单独处理组, $P < 0.05$),阿司匹林浓度为 1.0 mmol/L时,拮抗作用最强;但当阿司匹林浓度为 5.0 mmol/L时,可促进 As_2O_3 诱导的凋亡(vs. As_2O_3 单独处理组, $P < 0.05$)。

2.3 阿司匹林对 As_2O_3 作用下 ROS 水平的影响

由表2可见, As_2O_3 单独作用后产生的 ROS 水平高于空白对照组($P < 0.05$)。与阿司匹林联合处理后,随阿司匹林浓度的升高,ROS 水平表现出先降低后升高的趋势,阿司匹林浓度为 1.0 mmol/L时,ROS 水平降低最为明显(vs. As_2O_3 单独处理组, $P < 0.05$),当阿司匹林浓度为 5.0 mmol/L时,ROS 水平高于 As_2O_3 单独处理组($P < 0.05$)。

表1 阿司匹林联合 As_2O_3 对 HepG2 细胞凋亡水平的影响($n=8$)
Table 1 Effects of arsenic trioxide and aspirin on the apoptosis of HepG2 ($n=8$)

Treatment		Apoptotic cells (%)
As_2O_3 ($\mu\text{mol/L}$)	Aspirin (mmol/L)	
0	0	1.0 \pm 0.6
10	0	27.7 \pm 1.7*
10	0.1	21.1 \pm 4.2**#
10	1.0	12.4 \pm 3.1**#
10	2.5	15.5 \pm 2.1**#
10	5.0	29.6 \pm 1.3**#

* $P < 0.05$, vs. $0 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin group (blank control); # $P < 0.05$, vs. $10 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin group

表2 阿司匹林对 As_2O_3 作用下 ROS Gm 值的影响

Table 2 The Gm value for ROS level induced by As_2O_3 and aspirin combination

Treatment		ROS (Gm)
As_2O_3 ($\mu\text{mol/L}$)	Aspirin (mmol/L)	
0	0	6.21 \pm 1.13
10	0	44.09 \pm 2.44*
10	0.1	42.07 \pm 1.50*
10	1.0	24.23 \pm 2.90**#
10	2.5	27.87 \pm 1.94**#
10	5.0	48.96 \pm 2.36**#

* $P < 0.05$, vs. $0 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin group (blank control); # $P < 0.05$, vs. $10 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin group

2.4 阿司匹林与 As_2O_3 联用时 HO-1 在总蛋白和 Nrf2 在核蛋白中的表达情况

正常情况下,细胞内处于氧化还原平衡状态,细胞抗氧化相关因子表达极低,图2中可以看出,空白对照组 HO-1 和 Nrf2 所在位置均无明显条带, As_2O_3 处理后,HO-1 和 Nrf2 均出现明显的条带,相对积分灰度值均较空白对照组增加($P < 0.05$);

随着阿司匹林浓度的升高, As_2O_3 作用下的 HO-1 和 Nrf2 均表现出先升高后降低的趋势, 阿司匹林浓度为 1.0 mmol/L 时, 两种蛋白表达水平达最高 (vs. As_2O_3 单独处理组, $P < 0.05$)。

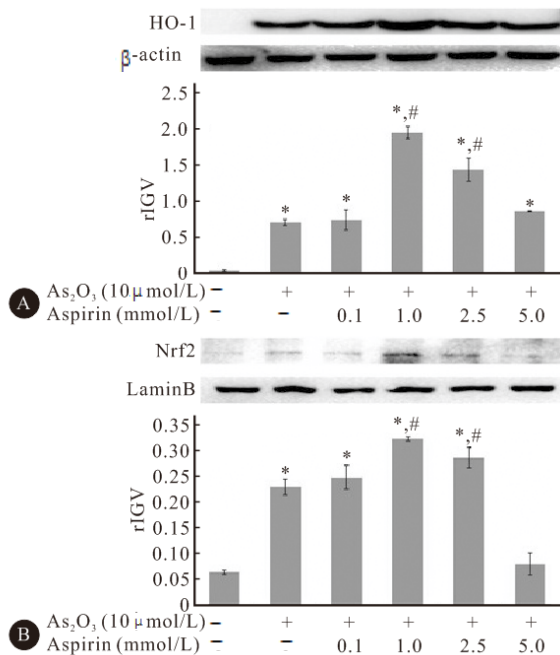


图 2 三氧化二砷联合阿司匹林对 HO-1(A) 和 Nrf2(B) 蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of As_2O_3 and aspirin on the expression of HO-1 protein (A) and Nrf2 protein (B)

* $P < 0.05$, vs. blank control (0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin); # $P < 0.05$, vs. 10 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0 mmol/L aspirin. rIGV: Relative integrated gray-scale value

3 讨论

我们实验室前期研究显示, As_2O_3 对 HepG2 细胞的半数抑制浓度为 17.14 $\mu\text{mol/L}$ ^[12], 且 10 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 与 PARP1 抑制剂 4-氨基 1,8-萘二胺联用, 可较好地观察 PARP1 抑制剂对 As_2O_3 的增敏效应^[13], 因此, 本研究选用 10 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 与不同浓度的阿司匹林联合处理 HepG2 细胞, 探讨阿司匹林增敏 As_2O_3 的可能性。研究结果显示, 阿司匹林对肝癌细胞的生长抑制率随药物浓度的增加而增加。而与 As_2O_3 联合处理肝癌细胞时, 不同浓度的阿司匹林对 As_2O_3 毒性的影响表现出截然相反的效应。为进一步明确阿司匹林对 As_2O_3 的增敏机制, 我们综合文献^[7,9-11] 以及 MTT 实验结果, 在低于半数抑制浓度下分别设置阿司匹林极低浓度(0.1 mmol/L)、低浓度(1.0 mmol/L)、

中浓度(2.5 mmol/L)和高浓度(5.0 mmol/L)4 个剂量与 As_2O_3 联合作用。

As_2O_3 抗肿瘤的基础是诱导肿瘤细胞产生大量 ROS, 从而导致细胞凋亡^[14]。本研究结果也表明 10 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 可诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡, 而阿司匹林对 As_2O_3 毒性的影响也是通过诱导细胞凋亡而实现, 这与郝立晓等^[11] 在人肝癌 Bel-7402 细胞中的研究相一致, 该研究认为阿司匹林是通过影响细胞周期进而增强 As_2O_3 的凋亡诱导能力。然而, 阿司匹林增强 As_2O_3 的凋亡诱导能力是否与 ROS 有关, 目前尚未见报导。众所周知, ROS 对细胞的生存至关重要, 但 ROS 对细胞的影响却错综复杂。有研究显示, 低浓度 H_2O_2 会导致多种肿瘤细胞株缓慢加速增殖, 而高浓度的 H_2O_2 则会引起细胞周期阻滞和凋亡^[15]。本研究结果表明, 随着阿司匹林浓度的升高, As_2O_3 诱导的 ROS 水平表现出先降低后升高的趋势, 在阿司匹林浓度为 1.0 mmol/L 时, ROS 水平降低最为明显, 当阿司匹林浓度为 5.0 mmol/L 时, 细胞内 ROS 水平高于 As_2O_3 单独处理, 这与凋亡的趋势相一致, 说明不同浓度的阿司匹林可能是通过改变 As_2O_3 诱导的 ROS 水平, 从而决定细胞存活或凋亡的命运。研究表明阿司匹林可诱导 HO-1 的表达^[16], HO-1 则可通过催化血红素底物生成 CO、亚铁离子、胆红素等清除细胞内过多的 ROS^[17]。本研究结果显示, 在 As_2O_3 刺激下, HO-1 表达明显增加。当 As_2O_3 联合不同浓度的阿司匹林共同作用于 HepG2 细胞, 随着阿司匹林浓度的升高, HO-1 的表达水平先升高后逐渐降低, 在 1.0 mmol/L 达峰值, 与阿司匹林对 ROS 水平的调控趋势正好相反, 提示阿司匹林对 ROS 水平的影响可能是通过 HO-1 调控。Nrf2 是机体抗氧化反应的调控枢纽, 氧化应激水平的升高可使位于胞浆的 Nrf2 迅速转位入细胞核, 与抗氧化基因如 HO-1、醌氧化还原酶(NQO1)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)等酶基因的启动子区域结合启动其转录^[18,19]。因此, 为了明确阿司匹林引起 HO-1 表达水平的改变是否由 Nrf2 调控, 我们检测了 Nrf2 在核蛋白中的表达。我们发现细胞在未做任何处理时, 核内 Nrf2 表达水平很低, 在 As_2O_3 刺激下, Nrf2 核转位增加, HO-1 也随之增加。当低、中浓度(1.0、2.5 mmol/L)的阿司匹林与 As_2O_3 共同处理时, 阿司匹林拮抗 As_2O_3 毒性的机制可能是阿司匹林促进 Nrf2 的核转位以及 HO-1 的表达, 以清除 As_2O_3 产生的大量自由基。而高浓度(5 mmol/L)的阿司匹林则增加

As₂O₃ 诱导的细胞死亡,同时 Nrf2 核转位以及 HO-1 的表达水平均下降,提示高浓度的阿司匹林增敏 As₂O₃ 可能是通过抑制 Nrf2-HO-1 信号通路,诱导 ROS 大量蓄积,进而增强 As₂O₃ 的氧化损伤实现的。阿司匹林的这种双面性——即在低浓度时发挥抗氧化作用,而在高浓度时则促进氧化损伤——提示阿司匹林对 As₂O₃ 有增敏作用,但作用有限,只有在高剂量时才能发挥抗癌作用。

综上所述,阿司匹林具有一定的增敏 As₂O₃ 的效应。低浓度的阿司匹林可能激活 Nrf2-HO-1 途径降低细胞内 ROS 的蓄积,减弱 As₂O₃ 的凋亡诱导能力;只有高浓度的阿司匹林可以抑制 Nrf2-HO-1 途径对 ROS 的清除作用,诱导大量的 ROS 蓄积进而增强 As₂O₃ 对肝癌细胞的杀伤能力。

参 考 文 献

- Song X, Hu X, Lü S, *et al.* Incorporation of arsenic trioxide in induction therapy improves survival of patient with newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia. *Eur J Haematol*, 2014;93(1):54-62.
- 屈凤莲,郝学志,秦叔逵等. 亚砷酸注射液治疗原发性肝癌的Ⅱ期多中心临床研究. *中华肿瘤杂志*, 2011;33(9):697-701.
- Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, *et al.* Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*, 2011;377(9759):31-41.
- Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, *et al.* A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2003;9(1):383-390.
- 孙情,冯乔,熊毅等. 阿司匹林对胰岛瘤细胞株 NIT-1 细胞增殖及 NF-κB 表达的影响. *中国糖尿病杂志*, 2012;20(11):862-865.
- 李盛,严浩,黄志琨. 阿司匹林诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及机制. *中国医院药学杂志*, 2012;32(9):675-678.
- Hossain MA, Kim DH, Jang JY, *et al.* Aspirin enhances doxorubicin-induced apoptosis and reduces tumor growth in human hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol*, 2012;40(5):1636-1642.
- Chen RH, Tian YJ. Enhanced anti-tumor efficacy of aspirin combined with triptolide in cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013;14(5):3041-3044.
- Li G, Zhang S, Fang H, *et al.* Aspirin overcomes Navitoclax-resistance in hepatocellular carcinoma cells through suppression of Mcl-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013;434(4):809-814.
- Pennarun B, Klleibeuker JH, Boersma-van Ek W, *et al.* Targeting FLIP and Mcl-1 using a combination of aspirin and sorafenib sensitizes colon cancer cells to TRAIL. *J Pathol*, 2013;229(3):410-421.
- 郝立晓,刘铁夫. As₂O₃ 联合 Aspirin 对诱导肝癌细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志*, 2012;20(17):1537-1541.
- 赵巍,胡亚男,蒋学君等. 三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡的机制研究. *四川大学学报(医学版)*, 2014;45(5):739-743.
- 李洋,罗擎英,邓建军等. 4-氨基-1,8-萘二胺对三氧化二砷在肝癌细胞中的增敏作用研究. *四川大学学报(医学版)*, 2015;46(2):163-168.
- Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, *et al.* Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Onco Targets Ther*, 2013;6:75-84. doi:10.2147/OTT.S38227.
- Burdon RH. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans*, 1996;24(4):1028-1032.
- Jacobs EJ, Thun MJ, Bain EB, *et al.* A large cohort study of long-term daily use of adult-strength aspirin and cancer incidence. *J Nat Cancer Inst*, 2007;99(8):608-615.
- Ansari N, Khodaghali F, Amini M. 2-Ethoxy-4,5-diphenyl-1,3-oxazine-6-one activity the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Eur J Pharmacol*, 2011;658(2-3):84-90.
- Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, *et al.* The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*, 2013;1(1):45-49.
- Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, *et al.* Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest*, 2006;116(4):984-995.

(2015-06-18 收稿, 2015-11-12 修回)

编辑 汤洁