

汉黄芩素通过激活活性氧簇介导的 p38MAPK 信号通路诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡

王慧莲^{1*} 孟庆良¹ 李松伟² 王济华²

1. 河南省中医院风湿病科, 河南 郑州 450000

2. 河南中医药大学第一附属医院风湿病科, 河南 郑州 450000

中图分类号: R593.22 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 07-0890-05

摘要: 目的 探讨汉黄芩素对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, RA-FLS)凋亡的影响以及作用机制。方法 类风湿关节炎患者关节滑液经原代培养,应用 3~5 代传代的成纤维样滑膜细胞。按照不同方法处理分为 6 组:空白对照组、低剂量汉黄芩素组(终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$)、中剂量汉黄芩素组(终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$)、高剂量汉黄芩素组(终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$)、100 $\mu\text{g/mL}$ 汉黄芩素 + NAC 组、100 $\mu\text{g/mL}$ 汉黄芩素 + SB203580 组。MTT 法检测细胞增殖情况,流式细胞仪检测细胞凋亡率,罗丹明 123 染色荧光显微镜照相法检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP),DCFH-DA 染色荧光显微镜照相法检测细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平,Western blot 法检测 p38MAPK 通路相关蛋白的表达。结果 与正常对照组相比,各剂量汉黄芩素均能够抑制 RA-FLS 细胞的增殖,增加其凋亡,降低 MMP 以及增加 ROS 水平,激活 p38MAPK 信号通路,并且呈现剂量依赖性关系。ROS 清除剂 NAC 和 p38 抑制剂 SB203580 可以明显降低汉黄芩素诱导的 RA-FLS 细胞的凋亡,并且 5 mmol/L NAC 下调汉黄芩素引起的 p38MAPK 磷酸化。结论 汉黄芩素能够诱导 RA-FLS 细胞凋亡,ROS/p38MAPK 信号通路参与了其凋亡的过程。

关键词: 汉黄芩素;类风湿关节炎;成纤维样滑膜细胞;细胞凋亡;中医中药

Wogonin induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes via reactive oxygen species-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis

WANG Huilian^{1*}, MENG Qingliang¹, LI Songwei², WANG Jihua²

1. Department of Rheumatism, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000

2. Department of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: WANG Huilian, Email: huilianwangzz@163.com

Abstract: Objective To explore the effect of wogonin on the apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS) and the associated molecular mechanisms. **Methods** FLSs were harvested from RA patients and cultured in joint synovial fluid and through 3-5 passages. With different treatments, cells were divided into six groups: control group, low-dose wogonin group (20 $\mu\text{g/mL}$ of wogonin), middle-dose of wogonin group (50 $\mu\text{g/mL}$ of wogonin), high-dose of wogonin group (100 $\mu\text{g/mL}$ of wogonin), 100 $\mu\text{g/mL}$ Wogonin + NAC group, and 100 $\mu\text{g/mL}$ Wogonin + SB203580 group. The proliferation of RA-FLS was measured with MTT assay. The apoptosis was measured with flow cytometric analysis. Mitochondrial membrane potential (MMP) was measured with rhodamine 123 staining. The intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were tested with DCFH-DA staining. The expression of proteins in p38 MAPK pathway was examined with Western blotting. **Results** Compared to the control group, different concentrations of wogonin inhibited RA-FLS growth, induced apoptosis, decreased mitochondrial membrane potential, and promoted p38MAPK phosphorylation and ROS production, and was in a concentration-dependent pattern. The apoptotic ratio of wogonin-treated group was markedly decreased by the ROS scavenger NAC or the p38MAPK inhibitor SB203580. and pretreatment of RA-FLS with 5 mmol/L NAC markedly reversed the wogonin-induced enhancement of p-p38 MAPK. **Conclusion** Wogonin effectively induces the apoptosis of FLS from rheumatoid arthritis patients through the induction of ROS formation and p38 MAPK activation.

* 通讯作者: 王慧莲, Email: huilianwangzz@163.com

Key words: Wogonin; Rheumatoid arthritis; Fibroblast like synoviocytes; Cell apoptosis; Traditional Chinese Medicine

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫疾病, 主要病理表现为炎症的反复发作、滑膜组织过度增殖和功能异常, 最终引起关节纤维化和关节功能障碍^[1]。已经证实成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 可表现出转化细胞的特征, 呈类肿瘤细胞样异常增殖, 侵入到软骨和软骨下的骨质, 并产生炎性介质、分泌基质金属蛋白酶等, 其过度增殖在 RA 的发病过程中起到了重要作用^[2-3]。因此, 诱导人成纤维样滑膜细胞的凋亡是治疗 RA 的主要靶点。目前临床上多采用甲氨蝶呤、环磷酰胺等抗肿瘤药物治疗 RA 患者, 虽然疗效明显, 但都有不良反应多或价格昂贵等缺点, 增加了患者的痛苦和经济负担^[4]。本研究从中医中药的角度研究汉黄芩素对人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, RA-FLS) 凋亡的影响, 探讨汉黄芩素对 RA 潜在的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 样本与试剂

采集 2015 年 6 至 12 月河南省中医院风湿科收治的 7 例 RA 患者关节积液标本, 其中男 4 例、女 3 例; 年龄 38 ~ 62 岁, 平均 55.7 岁。入选标准: 确诊诊断均符合 2010 年 ACR/EULAR 分类标准。排除标准: ①合并感染者; ②伴随慢性心、肝、肾功能不全者; ③合并其他自身免疫性疾病者; ④合并冠心病患者; ⑤合并血液系统疾病患者。所有患者均签署知情同意书。体外原代培养人成纤维样滑膜细胞。

DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO)、DCFH-DA 和罗丹明 123 荧光染料购自美国 Sigma 公司, Annexin V/FITC 细胞凋亡试剂盒和活性氧清除剂 (NAC) 购自上海碧云天生物技术有限公司, p38MAPK 抑制剂 (SB203580) 购于美国 Calbiochem 公司, 汉黄芩素购自南京郎泽医药科技有限公司 (纯度大于 98.0%), p-p38MAPK、p38MAPK 及 β -actin 的单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 成纤维样滑膜细胞的分离与培养

无菌采集患者关节腔积液 30 mL, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清后用磷酸盐缓冲液 (phosphate

buffer saline, PBS) 重悬沉淀, 经 100 目筛网过滤, 将滤液以 1000 r/min 离心 10 min, 再以 PBS 清洗沉淀 2 次后, 用含有 10% 的胎牛血清及青霉素和链霉素各 100U 的 DMEM 培养基重悬细胞, 用计数板计数细胞。将收集的细胞接种于 25 cm² 的培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。12 h 更换一次培养液, 去除非贴壁细胞, 重复 2 ~ 3 次。3 d 后倒置显微镜下观察, 细胞呈梭状成纤维样。用胰蛋白酶法收集滑膜细胞, 按细胞密度 5×10^5 个/L 复种于 25 cm² 塑料培养瓶中。后续用于实验的细胞为 3 ~ 5 代生长稳定的成纤维样滑膜细胞。

1.3 细胞处理与分组

将纯化培养的成纤维样滑膜细胞按照 1×10^3 个/L 接种于平底 48 孔板中, 待细胞生长至 80% 时进行处理并分组。(1) 正常对照组: 不加任何药物处理, 常规培养; (2) 低剂量汉黄芩素组: 加入汉黄芩素使其终浓度为 20 μ g/mL; (3) 中剂量汉黄芩素组: 加入汉黄芩素使其终浓度为 50 μ g/mL; (4) 高剂量汉黄芩素组: 加入汉黄芩素使其终浓度为 100 μ g/mL; (5) 100 μ g/mL 汉黄芩素 + N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC) 组: 细胞先加入终浓度为 5 mmol/L 活性氧的清除剂 NAC 处理 12 h, 然后再加入汉黄芩素, 使其终浓度为 100 μ g/mL; (6) 100 μ g/mL 汉黄芩素 + SB203580 组: 细胞先加入终浓度为 10 μ mol/L p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 抑制剂 SB203580 处理 12 h, 再加入汉黄芩素使其终浓度为 100 μ g/mL。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

取待测组对数生长期的细胞, 调整细胞浓度以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 同时设定阴性对照孔 (即不加细胞按照同步骤处理), 各自培养 24 h、48 h、72 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L, 继续培养 4 h, 弃掉上清液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜, 室温振荡 10 min, 在酶标仪上检测 490 nm 处吸光度 [光密度 (optical density, OD) 值]。每组同时设置 5 个重复孔。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

调整待测组细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 取 200 μ L 细胞悬液, FITC 标记的 Annexin-V 和 PI 各 5 μ L 混匀后避光孵育 20 min, 低速离心收集细胞, 150 μ L PBS 重悬细胞, 用流式细胞检测仪上样检测各组成纤维样滑膜细胞凋亡率。

1.6 细胞线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 含量的测定

Rh123 是一种可被线粒体吸收的绿色荧光染料,其吸收值随细胞 MMP 的改变而变化,因此本实验根据荧光强度来间接反映 MMP 的高低。将 100 μ L 待测组细胞接种于 6 孔培养板中,细胞生长融合至 80% 时,弃掉培养液, PBS 清洗 3 次,加入 10 μ g/L Rh123 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 45 min,再用 PBS 冲洗 3 次。在荧光显微镜下随机选择 3 个不同区观察其荧光,并用 ImageJ 1.41 软件分析各视野下平均荧光强度,对每组细胞的每个样本进行统计学分析。

1.7 细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 含量的检测

DCFH-DA 能够自由通过细胞膜,被细胞内的 ROS 氧化成有荧光的 DCF,本研究通过观察 DCF 的荧光强度分析细胞内 ROS 的水平。将 100 μ L 待测组细胞接种于 6 孔培养板中,细胞生长融合至 80% 时,弃掉培养液, PBS 清洗 3 次,加入 10 μ mol/L DCFH-DA 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,再用 PBS 冲洗 3 次。在荧光显微镜下随机选择 3 个不同区观察其荧光,并用 ImageJ 1.41 软件分析各视野下平均荧光强度,对每组细胞的每个样本进行统计学分析。

1.8 Western blot 分析 p38MAPK 相关蛋白的表达

收获待测组细胞,加裂解液提取蛋白,BCA 法

进行总蛋白定量。调整上样量为 25 μ g 总蛋白/样本,上样,电泳,转膜,封闭过夜。封闭完毕后 PBS 洗膜 5 次,分别加一抗 (所用的一抗稀释比例分别为 p-p38MAPK 抗体 11000、p38MAPK 抗体 11000), 37 $^{\circ}$ C 反应 1.5 h, PBS 洗膜 5 次,加辣根过氧化物酶标记二抗, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, PBS 洗膜 5 次。染色,曝光,采用 BIORAD GELDOC XR 凝胶成像系统依次显影、定影, Quantity One Basic 软件分析胶片蛋白条带。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间比较采用最小显著差法 (least significant difference, LSD), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养结果

7 例患者的关节滑液经处理后均成功获得大量成纤维样细胞,经鉴定该细胞为 CD68 阴性细胞,即人成纤维样滑膜细胞。经过反复贴壁与传代 3 代后,细胞纯度达到 90% 以上,体外生长稳定,显微镜下观察细胞形态基本为长梭形,胞质透亮、均匀,细胞轮廓清晰,适合后续实验 (见图 1)。

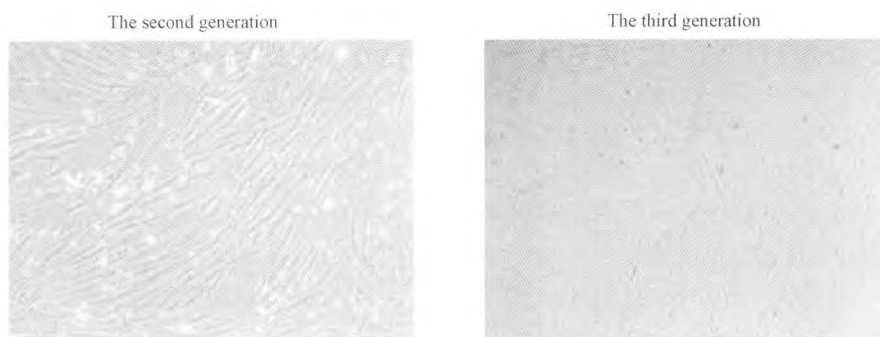


图 1 光镜下成纤维样滑膜细胞形态观察 ($\times 200$)

Fig. 1 Morphology of RA-FLS under light microscope ($\times 200$)

2.2 汉黄芩素抑制 RA-FLS 细胞增殖

与正常对照组相比,不同浓度汉黄芩素处理后 RA-FLS 细胞各个时间点在 490 nm 下 OD 值均明显减少,并且呈现剂量依赖性关系,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 1)。

2.3 汉黄芩素诱导 RA-FLS 细胞凋亡

与正常对照组细胞凋亡率 (7.69 ± 1.46)% 比较,从低剂量到高剂量汉黄芩素处理组细胞凋亡率依次为 (12.32 ± 1.65)%、(15.89 ± 2.17)% 和 (19.16 ± 2.13)%, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2)。

表 1 MTT 法检测各组细胞的增殖(OD 值, $\bar{x} \pm s$)Table 1 Proliferation of RA-FLS in each group detected with MTT assay (OD Value, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	OD 值		
	24 h	48 h	72 h
正常对照组 Control group	0.356 ± 0.023	0.578 ± 0.026	0.879 ± 0.056
低剂量汉黄芩素组 Low dose of wogonin group	0.286 ± 0.014 *	0.488 ± 0.031 *	0.787 ± 0.027 *
中剂量汉黄芩素组 Middle dose of wogonin group	0.231 ± 0.018 **	0.398 ± 0.029 **	0.588 ± 0.031 **
高剂量汉黄芩素组 High dose of wogonin group	0.176 ± 0.023 ***	0.299 ± 0.018 ***	0.490 ± 0.027 ***

注:与正常对照组相比, * $P < 0.05$;与低剂量汉黄芩素组相比, # $P < 0.05$;与中剂量汉黄芩素组相比, & $P < 0.05$ 。

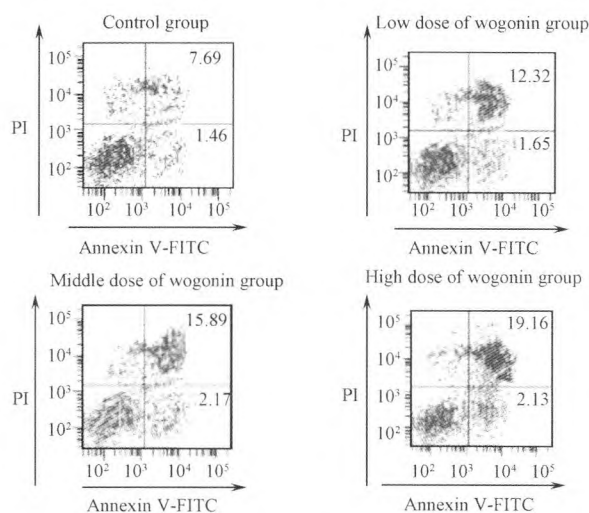


图 2 不同浓度汉黄芩素对 RA-FLS 细胞凋亡的影响

Fig. 2 The effect of wogonin with different concentrations on the RA-FLS apoptosis

表 2 不同剂量汉黄芩素对 RA-FLS 细胞 MMP 和 ROS 水平的影响

Table 2 The effect of wogonin with different concentrations on the levels of MMP and ROS in RA-FLS

组别 Group	Rh123 平均 荧光强度(%) Mean fluorescence intensity of Rh123(%)	DCF 平均荧光 强度(%) Mean fluorescence intensity of DCF(%)
正常对照组 Control group	43.56 ± 2.45	5.65 ± 0.91
低剂量汉黄芩素组 Low dose of wogonin group	38.37 ± 2.31 *	9.28 ± 1.02 *
中剂量汉黄芩素组 Middle dose of wogonin group	32.76 ± 2.89 **	12.47 ± 1.24 **
高剂量汉黄芩素组 High dose of wogonin group	27.98 ± 1.98 ***	15.89 ± 1.14 ***

注:与正常对照组相比, * $P < 0.05$;与低剂量汉黄芩素组相比, # $P < 0.05$;与中剂量汉黄芩素组相比, & $P < 0.05$ 。

够上调 p-p38MAPK 蛋白水平,并且呈现剂量依赖性关系,但并不影响 p38MAPK 总蛋白水平。与 100 $\mu\text{g/mL}$ 汉黄芩素组相比,100 $\mu\text{g/mL}$ 汉黄芩素 + SB203580 组中细胞 p-p38MAPK 蛋白水平明显降低,同时细胞凋亡也明显减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 3、4)。

2.7 汉黄芩素通过介导 ROS 生成而激活 p38MAPK 信号通路

与 100 $\mu\text{g/mL}$ 汉黄芩素组相比,100 $\mu\text{g/mL}$ 汉黄芩素 + NAC 组 p-p38MAPK 蛋白水平显著降低,同时细胞凋亡率也显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 3、图 4)。

3 讨论

RA 是目前临床上比较常见的一种自身免疫性疾病,病因复杂。研究表明人成纤维样滑膜细胞过度增生和分泌是 RA 发病的重要基础,参与关节的

2.4 汉黄芩素降低 RA-FLS 细胞 MMP 水平

与正常对照组细胞 Rh123 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) (反应 MMP 大小的指标) (43.56 ± 2.45) % 相比,从低剂量到高剂量汉黄芩素处理组细胞中 Rh123 的 MFI 数值依次为 (38.37 ± 2.31) %、(32.76 ± 2.89) % 和 (27.98 ± 1.98) %,组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 2)。

2.5 汉黄芩素增加 RA-FLS 细胞内 ROS 生成

与正常对照组细胞中 DCF 的 MFI (5.65 ± 0.91) % 相比,从低剂量到高剂量汉黄芩素处理组细胞中 DCF 的 MFI 数值依次为 (9.28 ± 1.02) %、(12.47 ± 1.24) % 和 (15.89 ± 1.14) %,组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 2)。

2.6 汉黄芩素通过激活 p38MAPK 信号通路诱导细胞凋亡

与正常对照组相比,不同剂量汉黄芩素均能

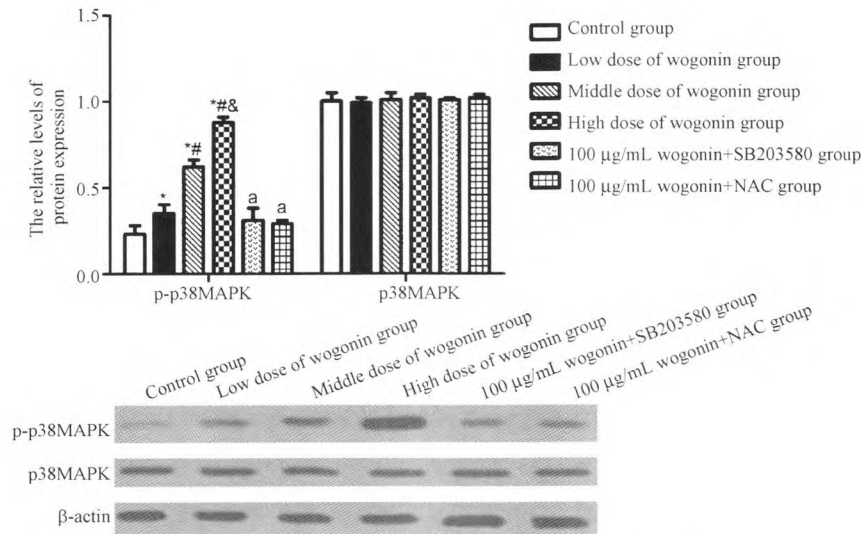


图 3 各组细胞中 p38MAPK 信号通路中相关蛋白检测

Fig. 3 The protein levels of p38 MAPK in each group detected with Western blotting

注:与正常对照组相比, * $P < 0.05$; 与低剂量汉黄芩素组相比, # $P < 0.05$; 与中剂量汉黄芩素组相比, & $P < 0.05$; 与 100 μg/mL 汉黄芩素组相比, ^a $P < 0.05$ 。

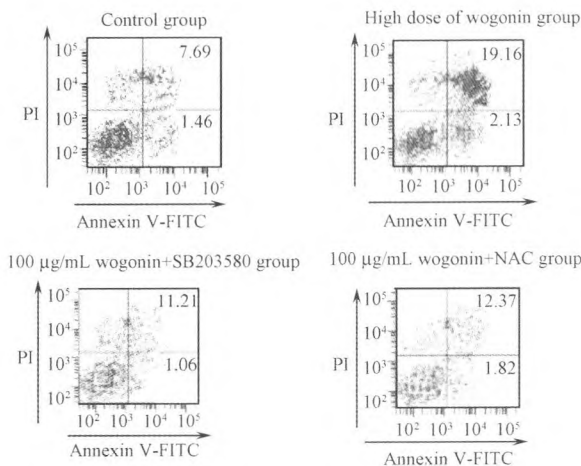


图 4 SB203580 和 NAC 对 RA-FLS 细胞凋亡的影响

Fig. 4 The effect of SB203580 and NAC on the apoptosis of RA-FLS

炎症反应和关节破坏^[5]。因此,有效抑制成纤维样滑膜细胞的增殖、诱导其凋亡能够为临床治疗 RA 提供新的靶点和思路。汉黄芩素是从常见中药黄芩中提取的黄酮类化合物,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤和神经保护等作用^[6]。已经证实汉黄芩素能够诱导多种细胞的凋亡,例如白血病多耐药细胞株 K562/A02 细胞和肝癌 HepG2 细胞^[7-8]。本研究探讨汉黄芩素对成纤维样滑膜细胞凋亡的影响以及可能的作用机制。

本研究中首先分离纯化培养 RA 患者的成纤维

样滑膜细胞,经过不同浓度汉黄芩素处理后,MTT 实验和流式细胞术均证实汉黄芩素能够明显抑制成纤维样滑膜细胞的增殖并诱导其凋亡,并且呈现剂量依赖性关系。已知细胞凋亡的途径有多种,其中线粒体损伤介导的凋亡是最常见的凋亡,主要表现为线粒体膜电位的缺失和细胞内 ROS 的生成。本研究在探索汉黄芩素对 RA-FLS 细胞凋亡机制中发现,不同剂量汉黄芩素均能够降低细胞线粒体膜电位,同时增加细胞内 ROS 的生成量,并且呈现剂量依赖性关系。这表明汉黄芩素通过诱导线粒体损伤来增加细胞的凋亡。

p38MAPK 蛋白是 MAPKs 蛋白激酶家族的主要成员之一,丝氨酸/酪氨酸残基可被磷酸化,细胞外多种应激原都可引起细胞内蛋白激酶的连锁反应,从而影响细胞的基因转录、蛋白合成和细胞表面受体表达等生物效应,在细胞凋亡中发挥着举足轻重的作用^[9-10]。已有研究表明细胞内 ROS 生成量的增加诱导的细胞凋亡与 p38MAPK 信号通路密切相关^[11-12]。本研究中发现不同剂量汉黄芩素能够上调 p38MAPK 磷酸化水平,但不影响 p38MAPK 总蛋白的表达。加入 p38MAPK 抑制剂 SB203580 降低细胞中 p38MAPK 磷酸化水平,同时能够明显逆转汉黄芩素诱导的 RA-FLS 细胞凋亡,这表明汉黄芩素通过激活 p38MAPK 信号通路诱导 RA-FLS 细胞的凋亡。另外,加入 ROS 清除剂 NAC 能够抑制

p38MAPK 的磷酸化, 阻断汉黄芩素诱导的细胞凋亡。因此笔者推断 ROS 生成的增加能够诱导 p38MAPK 信号通路的激活, 介导了汉黄芩素对 RA-FLS 细胞凋亡的诱导作用。

综上所述, 汉黄芩素能够通过诱导成纤维样滑膜细胞中 ROS 的产生, 继而激活 p38MAPK 信号通路而介导细胞线粒体损伤相关的凋亡。

【参 考 文 献】

- [1] Zhang T, Li H, Shi J, et al. p53 predominantly regulates IL-6 production and suppresses synovial inflammation in fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 271.
- [2] Xiong G, Huang Z, Jiang H, et al. Inhibition of microRNA-21 decreases the invasiveness of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via TGFbeta/Smads signaling pathway. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(7): 787-793.
- [3] Mainz ER, Serafin DS, Nguyen TT, et al. Single cell chemical cytometry of akt activity in rheumatoid arthritis and normal fibroblast-like synoviocytes in response to tumor necrosis factor alpha. *Anal Chem*, 2016, 88(15): 7786-7792.
- [4] 蒋红, 雷佳红, 何城, 等. 苦参碱对人成纤维样滑膜细胞生长的影响. *检验医学与临床*, 2014, 11(18): 2510-2512.
Jiang H, Lei JH, He C, et al. Effect of matrine on the growth of human fibroblast-like synovial cell. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2014, 11(18): 2510-2512. (in Chinese)
- [5] Zhu JQ, Jia E, Zhou Y, et al. Interleukin-22 secreted by NKp44 + natural killer cells promotes proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(52): e2137.
- [6] Liu X, Tian S, Liu M, et al. Wogonin inhibits the proliferation and invasion, and induces the apoptosis of HepG2 and Bel7402 HCC cells through NFkappaB/Bcl-2, EGFR and EGFR downstream ERK/AKT signaling. *Int J Mol Med*, 2016, 38(4): 1250-1256.
- [7] Huang B, Liu H, Huang D, et al. Apoptosis induction and imaging of cadmium-telluride quantum dots with wogonin in multidrug-resistant leukemia K562/A02 Cell. *J Nanosci Nanotechnol*, 2016, 16(3): 2499-2503.
- [8] Qian C, Wang Y, Zhong Y, et al. Wogonin-enhanced reactive oxygen species-induced apoptosis and potentiated cytotoxic effects of chemotherapeutic agents by suppression Nrf2-mediated signaling in HepG2 cells. *Free Radic Res*, 2014, 48(5): 607-621.
- [9] Chakraborty S, Ghosh S, Banerjee B, et al. Mephebrindole, a synthetic indole analog coordinates the crosstalk between p38MAPK and eIF2alpha/ATF4/CHOP signalling pathways for induction of apoptosis in human breast carcinoma cells. *Apoptosis*, 2016, 21(10): 1106-1124.
- [10] Pan Z, Niu Y, Liang Y, et al. Beta-ecdysterone protects SH-SY5Y cells against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis via mitochondria-dependent mechanism: involvement of p38 (MAPK)-p53 signaling pathway. *Neurotox Res*, 2016, 30(3): 453-466.
- [11] Lin X, Wu S, Wang Q, et al. Saikosaponin-D reduces H2O2-Induced PC12 cell apoptosis by removing ROS and blocking MAPK-dependent oxidative damage. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(8): 1365-1375.
- [12] Li QC, Liang Y, Tian Y, et al. Arctigenin induces apoptosis in colon cancer cells through ROS/p38MAPK pathway. *J BUON*, 2016, 21(1): 87-94.

(收稿日期: 2017-01-19; 修回日期: 2017-02-20)