

石上柏乙酸乙酯萃取物对喉癌 Hep-2 细胞增殖与迁移作用的研究

黄茹意¹, 朱素锶¹, 唐嘉徽¹, 龙娟¹, 张宇¹, 刘良红^{1,2*}, 吴卫华^{1,2*}

¹湖南医药学院药学院; ² 侗医药研究湖南省重点实验室, 怀化 418000

摘要: 本文利用三种不同极性溶剂从石上柏中分离出活性成分, 观察其对喉癌 Hep-2 细胞的增殖与迁移作用的影响。干燥的石上柏全草粉碎后经乙醇回流提取浓缩得浸膏, 依次采用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯三种溶剂进行萃取, 以获得各极性溶剂萃取部位; MTT 法检测石上柏提取物对 Hep-2 细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测石上柏提取物对 Hep-2 细胞周期的影响; 细胞划痕实验检测石上柏提取物对 Hep-2 细胞迁移能力的影响; 采用 p53 报告基因探讨石上柏提取物对喉癌 Hep-2 细胞的作用机制。结果显示 31.2 ~ 500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙酸乙酯萃取部位能明显抑制 Hep-2 细胞的生长及划痕区域的迁移; 15.0 ~ 60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙酸乙酯萃取部位能使喉癌 Hep-2 细胞阻滞于 G1 期, 并且能激活 p53 的表达。结果表明石上柏乙酸乙酯萃取部位可明显抑制喉癌 Hep-2 细胞的生长及迁移, 其作用与激活 p53 通路有关。

关键词: 石上柏; 喉癌; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.005

Effect of *Selaginella doederleinii* Ethyl Acetate Extract on Proliferation and Migration of Hep-2 Cells

HUANG Ru-yi¹, ZHU Su-si¹, TANG Jia-hui¹, LONG Juan¹, ZHANG Yu¹, LIU Liang-hong^{1,2*}, WU Wei-hua^{1,2*}

¹Hunan University of Medicine School of Pharmaceutical Sciences;

²Hunan Provincial Key Laboratory of Dong Medicine, Huaihua 418000, China

Abstract: In this study, *Selaginella doederleinii* was extracted by three reagents with different hydrophobicity. The effects of these extracts on proliferation, cell cycle and migration of Hep-2 cells *in vitro* were assessed. The petroleum ether, dichloromethane and ethyl acetate fractions were prepared from ethanol extract of *S. doederleinii*. The effect of these fractions on proliferation of Hep-2 cells was determined by MTT assay; cell cycle was measured by flow cytometry (FCM); the anti-migration ability was observed through cell scratch method; and the molecular mechanism was determined by p53 reporter gene. The results showed that the ethyl acetate extract (31.2-500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed the best anti-tumor activity *in vitro* and it can induce the inhibition of cell migration. Ethyl acetate extract (15.0-60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) also can induce cell cycle arrest and activate the expression of p53. It indicated that the ethyl acetate extract of *S. doederleinii* can significantly inhibit the growth and migration of Hep-2 cells through a p53 pathway.

Key words: *Selaginella doederleinii*; laryngocarcinoma; proliferation; migration; cell cycle

喉癌是来源于喉粘膜上皮组织的恶性肿瘤, 以鳞癌占多数。当前喉癌主要以手术治疗为主, 辅以放疗等综合治疗, 手术治疗虽能切除肿瘤, 但其死亡率和复发率仍然很高, 是严重威胁人民生命健康的疾病。近年来以中药为主的抗肿瘤作用研究已成

为当今研究的热点与焦点, 为肿瘤的治疗开辟了新领域。

石上柏为卷柏科卷柏属植物深绿卷柏 (*Selaginella doederleinii* Hieron, SDH) 的全草, 又名大叶菜。具有清热解暑、止血、抗癌等功效, 临床可用于治疗咽喉肿痛、风湿痹痛、鼻咽癌、绒毛膜上皮癌、肺癌、宫颈癌及外伤出血等疾病^[1]。石上柏的化学成分包括黄酮、生物碱、甾醇、皂苷等, 其中双黄酮类成分被认为是其主要的有效成分^[2]。现代药理研究证实石上柏对多种肿瘤细胞具有抑制作用, 并发现含

收稿日期: 2017-08-17 接受日期: 2017-09-20

基金项目: 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划 (2017-205); 湖南医药学院青年优秀科研人才支持计划 (2013-85)

* 通信作者 E-mail: 44592259@qq.com

双黄酮成分的乙酸乙酯部位是其抗肿瘤的主要有效部位^[3-7]。我课题组调查发现民间有使用石上柏治疗喉癌的应用,但是未见相关文献报道。本研究旨在通过一系列体外实验明确石上柏提取物对喉癌 Hep-2 细胞的抑制作用,为石上柏临床治疗喉癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物

石上柏购自市面药房。取干燥石上柏 500 g 碎成粗粉后等量分装于两个圆底烧瓶中,各加入 8 倍量的 70% 乙醇,85 °C 回流提取 3 次,每次回流 2 h,合并提取液,过滤,经旋转蒸发器浓缩得乙醇浸膏。醇浸膏用 200 mL 水复溶,依次用等体积石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯萃取,每种试剂各萃取 3 次,浓缩干燥 3 种萃取液得三种萃取部位浸膏各 1.37 g、1.33 g、1.43 g,提取率分别为 0.27%、0.27%、0.29%。用时分别称取石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯萃取部位各 100 mg,分别用 1 mL 二甲亚砜(DMSO)溶解,4 °C 保存备用。

1.2 细胞株

喉癌 Hep-2 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.3 试剂

石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯购自国药集团化学试剂有限公司;1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、青链霉素购自美国 GIBCO 公司;MTT、二甲亚砜(DMSO)、PI 染色试剂盒购自生工生物(上海)有限公司;p53 报告基因质粒、Dual-Glo® 双报告基因检测试剂购自美国 Promega 公司。

1.4 仪器

RE-5299 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SW-CJ-2D(2G)型超净工作台(苏州净化设备有限公司);3111 型 CO₂ 培养箱(Thermo);Cytotflex 流式细胞仪(Beckman);GloMax96 型化学发光检测仪(Promega);NIB-100F 倒置显微镜(宁波永新光学股份有限公司);RT-2100C 酶标仪(雷杜生命科学股份有限公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 喉癌 Hep-2 细胞的培养

喉癌 Hep-2 细胞在 1640 培养基(含 10% 胎牛血清,青霉素,链霉素各 100 U/mL)中,于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中常规培养。显微镜下观察细胞

生长状态,每天更换一次培养基,每两天传代一次。

1.5.2 MTT 法检测

取对数生长的喉癌 Hep-2 细胞以 5000 个/每孔的密度接种于 96 孔板内于培养箱中继续培养。将石上柏 3 种萃取部位经 0.22 μm 滤膜过滤后,用二甲亚砜(DMSO)梯度稀释,每孔细胞加入 2 μL 使其在每孔的终浓度为 7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0、500.0 μg/mL,每个浓度组各设 5 个复孔,于加药培养 48 h 后每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,取出后弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,低速振摇 10 min 使紫色结晶产物充分溶解,于 490 nm 检测吸光度。

1.5.3 形态学观察

将 Hep-2 细胞以 1 万个/每孔的细胞密度接种于 6 孔板中,然后给予不同浓度的乙酸乙酯萃取部位处理 6、12、24 h 后在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.5.4 细胞划痕实验

将 Hep-2 细胞接种于 12 孔板内培养,待细胞基本长满后,用 10 μL 枪头于细胞层中纵向划痕,造成培养细胞缺损区域带,用 PBS 清洗 2~3 次后,加入不同浓度的乙酸乙酯萃取部位(7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0、500.0 μg/mL)继续培养 48 h,然后于倒置显微镜下观察划痕处细胞的覆盖情况,采用 Image J 软件作图并处理数据。

1.5.5 细胞周期分析

取对数生长期细胞以 10 万个/每孔的密度接种于 6 孔板中,加入不同浓度乙酸乙酯萃取部位(15.0、30.0、60.0 μg/mL)继续培养 6 h 后,收集细胞用 70% 预冷乙醇固定,4 °C 避光过夜,用预冷 PBS 洗两遍,加入碘化丙啶避光染色 30 min,上流式细胞仪检测,分析各组样本 DNA 含量及周期变化。

1.5.6 p53 报告基因检测

将 p53 萤火虫萤光素酶质粒与海参萤光素酶对照质粒按 100:1 比例混合。转染组每孔加入 50 μL 上述转染复合物然后加入 150 μL 含 5000 个 Hep-2 细胞的完全培养基,在 96 孔板中培养 24 h 后,用 PBS 洗一遍,更换培养基,加入 15.0、30.0、60.0 μg/mL 的乙酸乙酯萃取部位,24 h 后吸去培养基,用 PBS 洗一遍,每孔加入 20 μL 细胞裂解液,低速振摇 15 min 后置于化学发光检测仪下检测分析。

1.5.7 数据处理

所有数据均为计量数据,表示为平均值 ± 标准差(Mean ± S. D.)。多组均数比较采用单因素方

差分析,组内两两比较采用 Newman-Student-Keuls 检验。统计分析采用 GraphPad Prism 软件, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 实验结果

2.1 石上柏提取物对 Hep-2 细胞增殖的影响

为了确定石上柏三种萃取物抗肿瘤活性的主要部位,本文采用了 MTT 法检测石上柏三种萃取物对

喉癌 Hep-2 细胞的抗肿瘤活性。与对照组相比,作用 48 h 后,石油醚萃取部位和乙酸乙酯萃取部位对喉癌 Hep-2 细胞均有明显的抑制作用且呈浓度依赖关系(见表 1)。但可以明显看出,乙酸乙酯萃取部位抗肿瘤活性最强,提示石上柏抗肿瘤活性部位可能集中在乙酸乙酯萃取部位。经拟合计算,乙酸乙酯的 IC_{50} 值为 $38.86 \mu\text{g/mL}$;石油醚部位的 IC_{50} 值为 $316.10 \mu\text{g/mL}$ 。

表 1 石上柏三种萃取物对 Hep-2 细胞增殖的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of three extracts of SDH on proliferation of Hep2 cells($n = 3, \bar{x} \pm s$)

剂量 Dose ($\mu\text{g/mL}$)	平均光密度数值 Average optical density		
	乙酸乙酯 Ethyl acetate	石油醚 Petroleum ether	二氯甲烷 Dichloromethane
0.0	0.929 ± 0.117	0.888 ± 0.069	0.885 ± 0.083
7.8	0.938 ± 0.127	0.830 ± 0.098	0.886 ± 0.043
15.6	1.104 ± 0.088	0.800 ± 0.143	0.911 ± 0.151
31.2	0.770 ± 0.255	0.821 ± 0.152	0.809 ± 0.071
62.5	$0.464 \pm 0.135^*$	$0.722 \pm 0.066^*$	0.769 ± 0.035
125.0	$0.365 \pm 0.060^*$	$0.660 \pm 0.126^*$	0.961 ± 0.102
250.0	$0.314 \pm 0.002^*$	$0.622 \pm 0.060^*$	0.821 ± 0.166
500.0	$0.344 \pm 0.076^*$	$0.306 \pm 0.090^*$	0.723 ± 0.042
1000.0	$0.302 \pm 0.122^*$	$0.275 \pm 0.094^*$	0.916 ± 0.010

注:与 0 剂量组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with 0 dose, * $P < 0.05$.

2.2 石上柏乙酸乙酯萃取部位对 Hep-2 细胞形态的影响

为了进一步明确乙酸乙酯萃取部位对喉癌 Hep-2 细胞的影响,我们通过倒置显微镜观察其对喉癌 Hep-2 细胞的形态学变化。如图 1 所示,观察

喉癌 Hep-2 细胞在不同浓度乙酸乙酯作用下的形态学变化($15.0, 30.0, 60.0 \mu\text{g/mL}$):对照组 Hep-2 细胞贴附紧密,呈对多边形或梭形,且相互接触成群。然而,随着不同浓度乙酸乙酯作用后,Hep-2 细胞间接触变少,细胞失去了它们的表面形貌且显著变小

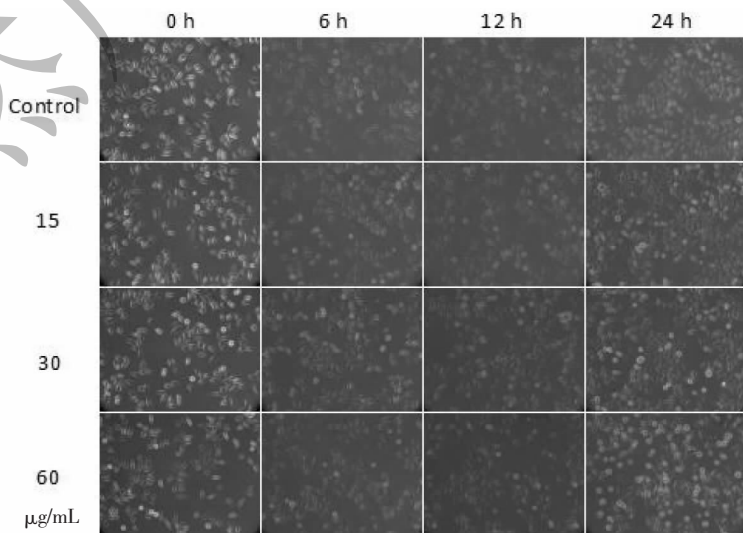


图 1 石上柏乙酸乙酯部位对 Hep-2 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of ethyl acetate extracts of SDH on cell morphology of Hep2 cell

而圆处于悬浮状态,这些细胞的形态变化呈剂量和时间依赖性。

2.3 石上柏乙酸乙酯萃取部位对 Hep-2 细胞迁移能力的影响

肿瘤细胞的迁移能力对肿瘤的发展和预后至关

重要。因此,我们通过细胞划痕实验观察了石上柏乙酸乙酯萃取部位对 Hep-2 细胞迁移能力的影响。结果显示:与对照组比较,乙酸乙酯萃取部位能剂量依赖性地抑制缺损区的缩窄,表明其具有显著的抑制迁移的作用(见图 2 及表 2)。

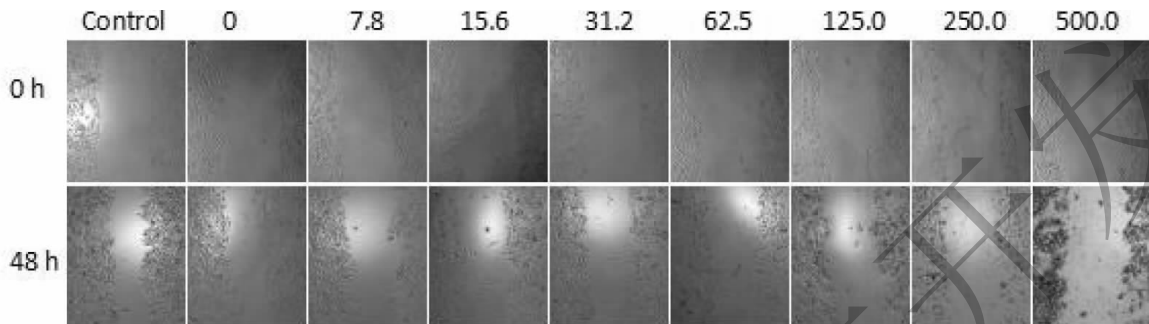


图 2 石上柏乙酸乙酯萃取部位对 Hep-2 细胞迁移的抑制作用
Fig. 2 Inhibition of ethyl acetate extracts of SDH on migration of Hep2

表 2 石上柏乙酸乙酯萃取部位对 Hep-2 细胞迁移的抑制作用 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Inhibition on migration of Hep2 of ethyl acetate extracts of SDH ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	伤口宽度 Wound width (mm) 0 h	伤口宽度 Wound width (mm) 48 h	迁移距离 Migration distance (mm)
对照组 Control		0.414 ± 0.072	0.228 ± 0.048	0.187 ± 0.035
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.0	0.411 ± 0.070	0.236 ± 0.041	0.176 ± 0.032
	7.8	0.417 ± 0.045	$0.262 \pm 0.051^*$	$0.154 \pm 0.030^*$
	15.6	0.423 ± 0.046	$0.298 \pm 0.058^*$	$0.126 \pm 0.024^*$
	31.2	0.416 ± 0.047	$0.357 \pm 0.054^*$	$0.059 \pm 0.024^*$
	62.5	0.417 ± 0.064	$0.366 \pm 0.057^*$	$0.051 \pm 0.021^*$
	125.0	0.408 ± 0.052	$0.386 \pm 0.053^*$	$0.022 \pm 0.010^*$
	250.0	0.384 ± 0.077	$0.376 \pm 0.082^*$	$0.009 \pm 0.005^*$
	500.0	0.399 ± 0.046	$0.393 \pm 0.042^*$	$0.006 \pm 0.004^*$

注:与对照组比较, $P < 0.05$ 。
Note: Compare with control, $* P < 0.05$ 。

2.4 石上柏乙酸乙酯萃取部位对 Hep-2 细胞周期的影响

为了进一步探讨石上柏乙酸乙酯萃取部位对喉癌 Hep-2 细胞的影响机制,我们采用流式细胞术分析了喉癌 Hep-2 细胞周期的变化。结果表明,石上柏乙酸乙酯萃取部位可增加 Hep-2 细胞 G1 期比例,降低 G2/M 期比例(见图 3)。

2.5 石上柏乙酸乙酯萃取物对 p53 信号通路的影响

为了初步探讨石上柏乙酸乙酯萃取物对喉癌 Hep-2 细胞的作用机制,我们采用报告基因的方法

检测了石上柏乙酸乙酯萃取物对 p53 信号通路的影响。如表 3 所示,随着石上柏乙酸乙酯萃取物浓度的增加,p53 报告基因活性逐渐增大,表明石上柏乙酸乙酯萃取能剂量依赖性的激活 p53 途径。

3 讨论

众所周知,恶性肿瘤是当今严重危害人类生命健康的一类疾病。而中药在抑制肿瘤生长及促进其凋亡等方面成为临床研究的重点,已得到国际社会的普遍认可,对抗肿瘤中草药进行研究与开发是当前的热点之一。目前对石上柏的药理活性研究也主

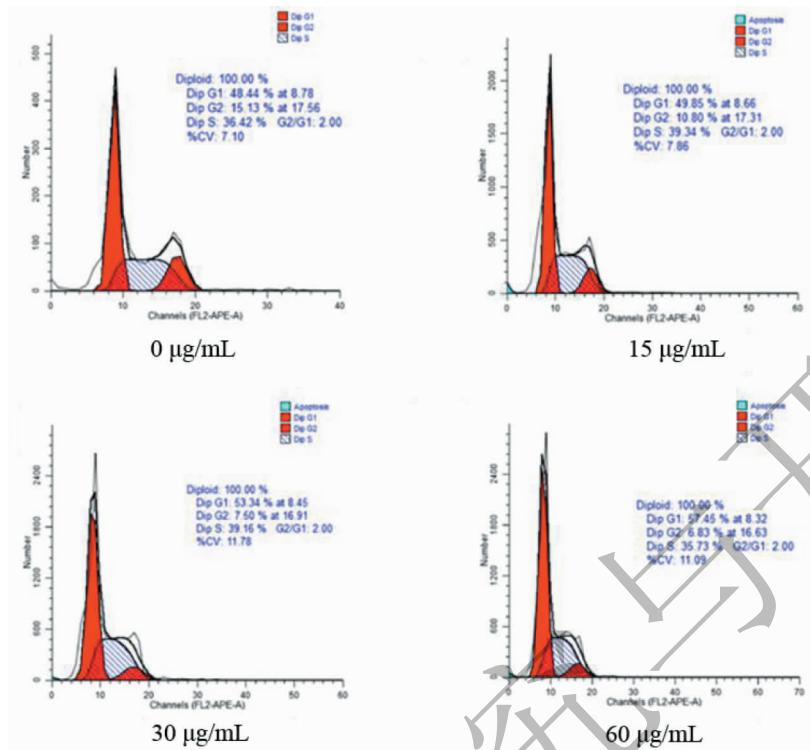


图3 石上柏乙酸乙酯萃取部位对 Hep-2 细胞周期的影响

Fig. 3 Effect of ethyl acetate extracts of SDH on cell cycle of Hep-2

表3 石上柏乙酸乙酯萃取物对 p53 报告基因活性的影响
($n = 4, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of ethyl acetate extracts of SDH on activity of p53 reporter gene ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g/mL}$)	相对活性 Relative activity
对照组 Control		0.494 \pm 0.14
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.0	0.450 \pm 0.07
	15.0	0.697 \pm 0.22
	30.0	0.740 \pm 0.18
	60.0	1.136 \pm 0.28 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$.

要集中在抗肿瘤方面。Lian R 等研究了石上柏乙醇提取物对鼻咽癌 CNE-1、C666-1 细胞增殖的影响,结果表明石上柏均能抑制这两种鼻咽癌细胞的生长^[3]。黄建勇等的研究显示石上柏提取物对人大细胞肺癌 H460、人食管癌细胞 Eca-109 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞的抑制作用呈浓度依赖关系^[4]。赵倩等对石上柏进行生物活性的研究表明其能显著抑制 HeLa 和 HepG2 细胞的生长,并有效抑制 S810 荷瘤小鼠体内瘤的生长^[5]。Wang JZ 等

研究表明石上柏乙酸乙酯提取物在体外和体内均具有相当大的抗肿瘤活性,对正常细胞无明显毒性,其诱导细胞凋亡可能与降低 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达水平有关^[6]。但是石上柏对喉癌的研究未见报道,本研究首次证实,石上柏提取物对喉癌 Hep-2 细胞具有抑制作用。

既往研究显示,石上柏抗肿瘤作用的有效活性部位主要为乙酸乙酯部位,且其主要成分为双黄酮类,如穗花杉双黄酮、银杏双黄酮等^[4,5,7]。本研究与之前的文献报道相似,MTT 结果表明石上柏乙酸乙酯萃取部位的抗肿瘤活性明显高于石油醚和二氯甲烷萃取部位。石上柏乙酸乙酯萃取部位的 IC_{50} 值为 38.86 $\mu\text{g/mL}$,这与 Sui Y^[7] 报道的 IC_{50} 值 87.17 $\mu\text{g/mL}$ 基本接近。新近 Yao H 等报道,从石上柏乙酸乙酯部位得到的总双黄酮具有良好的抗肿瘤活性,其 IC_{50} 值为 36.29 $\mu\text{g/mL}$ (LLC 小鼠肺癌细胞) 和 95.65 $\mu\text{g/mL}$ (B16 黑色素瘤细胞)^[8]。上述研究表明,石上柏乙酸乙酯部位或总双黄酮可用于开发抗肿瘤药物。

在确定石上柏具有抑制喉癌 Hep-2 细胞增殖作用以及明确其有效部位之后,我们进一步检测了石上柏乙酸乙酯萃取部位对细胞迁移和细胞周期的影

响。细胞周期异常是肿瘤细胞无限增殖的一个重要环节,肿瘤的生长率与在 S 期和 G2/M 期细胞比例相关,S 期和 G2/M 期是维持肿瘤细胞增殖非常重要的两个时期,许多抗肿瘤药物通过调节这两个阶段抑制肿瘤细胞的生长。我们的研究显示,随着乙酸乙酯萃取部位浓度的增加,Hep-2 细胞 G1 期所占比例与对照组相比明显升高,表明石上柏乙酸乙酯萃取部位能使 Hep-2 细胞阻滞于 G1 期,不能进入 S 期而抑制细胞增殖。这与 Sui Y^[7] 和景艳^[9] 的结果稍有不同,他们的结果显示石上柏主要是使肿瘤细胞阻滞在 S 期。这种差异可能是由于细胞类型的不同造成的。

肿瘤细胞的迁移是造成肿瘤扩散重要因素。通过细胞划痕实验,我们发现石上柏乙酸乙酯萃取部位能剂量依赖性的抑制喉癌 Hep-2 细胞迁移。结果显示,石上柏不仅能直接抑制喉癌细胞增殖也能抑制其迁移,这对于喉癌的治疗具有重要意义。

p53 作为重要的抑癌基因,通过诱导细胞凋亡、调控细胞周期、调节 DNA 修复及抑制血管生成等机制,在机体组织细胞的生长、发育和分化过程中起着重要作用^[10]。研究表明在多种肿瘤组织中 p53 发生突变,其抑癌作用减弱;而人为上调 p53 的表达则可以诱导肿瘤细胞凋亡以及抑制肿瘤转移^[11]。本研究显示石上柏乙酸乙酯萃取物可剂量依赖性的激活 p53,其抑制增殖、抑制细胞周期以及抑制迁移的作用可能是通过 p53 信号通路介导。提示石上柏乙酸乙酯部位可能含有激活 p53 的化合物,找到这些化合物未来可以此开发特异性 p53 激活剂。

综上所述,石上柏乙酸乙酯萃取部位具有抑制喉癌细胞生长及迁移的作用,为石上柏用于临床治疗喉癌提供了实验依据和理论基础。然而对其药效物质基础和分子作用机制还有待进一步研究。

参考文献

1 Dai EB (戴卫波), Mei QX (梅全喜), Zeng CY (曾聪彦), et al. Research advances on chemical compositions, pharmacological effects and clinical applications of *Selaginella*

la doederleinii. *China Pharm* (中国药业), 2011, 20:15-16.

2 Ding Q (丁奇), Wang DR (万定荣), Zhang F (张飞), et al. Study on comparative identification of mixed products including *Selaginellae doederleii* Herba and *Selaginellae moellendorffii* Herba. *China Pharm* (中国药房), 2015, 26: 1688-1690.

3 Lian R, Li J, Ma HM, et al. Effect of ethanol extract of *Selaginella doederleinii* Hieron on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 and C666-1 cells. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2013, 10:490-493.

4 Huang JY (黄建勇), Li SG (李少光), Li YX (李宇翔), et al. Study on anticancer extractions and components from *Selaginella doederleinii* Hieron. *J Fujian Med Univ* (福建医科大学学报), 2013, 47:1-5.

5 Zhao Q (赵倩), Wang CX (王彩霞), Li YL (李艳玲), et al. Chemical constituents from *Selaginella doederleinii* and their bioactivities. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 44:3270-3275.

6 Wang JZ, Li J, Zhao P, et al. Antitumor activities of ethyl acetate extracts from *Selaginella doederleinii* Hieron *in vitro* and *in vivo* and its possible mechanism. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015:865714.

7 Sui Y, Li S, Shi P, et al. Ethyl acetate extract from *Selaginella doederleinii* Hieron inhibits the growth of human lung cancer cells A549 via caspase-dependent apoptosis pathway. *J Ethnopharmacol*, 2016, 2016:261-271.

8 Yao H, Chen B, Zhang Y, et al. Analysis of the total biflavonoids extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and its *in vitro* and *in vivo* anticancer effects. *Molecules*, 2017, 22:1-17.

9 Jing Y (景艳), Tang AZ (唐安洲), Liu J (刘津), et al. Effects of *Selaginella doederleinii* on human nasopharyngeal carcinoma TW03 cells *in vitro* and its mechanism. *J Chin Med Mater* (中药材), 2009, 32:1864-1867.

10 Wang CH (王承红). Research progress of the p53 gene in the radiotherapy. *Med Recapitul* (医学综述), 2010, 16: 205-207.

11 Hu WL (胡汪来), Wu M (吴緬). Progress and prospects: roles of p53 in tumor development. *Scientia Sinica Vitae* (中国科学:生命科学), 2017, 47:52-58.