

· 论 著 ·

鹤草酚介导 caspase 3 相关凋亡抑制前列腺癌细胞在体内的增殖

周 亮,余 琴,刘伟华,苏耀武,陆建军*

(宁波市北仑区人民医院 泌尿外科,浙江 宁波 315800)

【摘要】目的 探讨鹤草酚对前列腺癌细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响。**方法** 通过细胞计数、菌落形成实验、细胞周期实验、细胞凋亡实验等检测细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的变化。通过蛋白印迹法(western blotting)检测细胞凋亡相关蛋白的表达。通过荷瘤裸鼠异种移植瘤模型研究鹤草酚在体内对肿瘤发生的影响。**结果** 鹤草酚抑制了DU145细胞和PC-3细胞的增殖,降低了细胞存活率。与对照组相比,经鹤草酚处理后,S期DU145细胞和PC-3细胞的比例增加,而G2/M期细胞的比例降低。鹤草酚通过激活caspase 3相关的线粒体依赖性凋亡通路,促进DU145细胞和PC-3细胞凋亡。体内实验证实,鹤草酚能减缓前列腺癌细胞的形成,延长移植瘤荷瘤裸鼠的生存时间。**结论** 鹤草酚是一种潜在抗癌药物,它通过激活凋亡通路,来抑制前列腺癌细胞的增殖和细胞周期进展。

【关键词】 前列腺癌;鹤草酚;细胞凋亡;增殖

中图分类号:R734.5

文献标识码:A

文章编号:2095-512X(2022)04-0337-05

AGRIMOPHOL MEDIATED CASPASE 3 ASSOCIATED APOPTOSIS INHIBITS THE PROLIFERATION OF PROSTATE CANCER CELLS IN VITRO AND IN VIVO

ZHOU Liang, YU Qin, LIU Weihua, SU Yaowu, LU Jianjun*

(Department of Urology, People's Hospital of Beilun District, Ningbo 315800, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of agrimophol on the proliferation, cell cycle and apoptosis of prostate cancer cells. **Methods** The changes of cell proliferation, cell cycle and apoptosis were detected by cell count, colony formation test, cell cycle test and apoptosis test. Western blotting was used to detect the expression of apoptosis related proteins. The effect of Crane Herb Phenol on tumorigenesis in vivo was studied by xenograft tumor model in mice. **Results** Crane grass phenol inhibited the proliferation of DU145 cells and PC-3 cells, and reduced the cell survival rate. Compared with the control group, DU145 cells and PC-3 cells in S phase after treatment with Crane Herb Phenol. The proportion of cells increased, while the proportion of cells in G2/M phase decreased. Crane grass phenol promotes apoptosis of DU145 cells and PC-3 cells by activating caspase 3 related mitochondrial dependent apoptosis pathway. The in vivo experiments have proved that Crane Herb Phenol can slow down the formation of prostate cancer cells and prolong the survival time of transplanted tumor mice. **Conclusions** Agrimophol is a potential anticancer drug that inhibits the proliferation of prostate cancer cells and the progression of cell cycle by activating the apoptotic pathway.

【Keywords】 Prostate cancer; Agrimophol; Cell apoptosis; Proliferation

前列腺癌是男性泌尿系肿瘤中常见的恶性肿瘤之一,发病率和病死率都很高。前列腺癌严重危害男性健康,而且治疗费用昂贵^[1]。目前,受人口老

龄化的影响,前列腺癌已经成为中国男性泌尿系统的第六大恶性肿瘤^[2]。然而,由于前列腺癌的早期症状不典型,且筛查相对滞后,约有5%的患者在就

收稿日期:2022-01-26; 修回日期:2022-07-15

基金项目:浙江省卫生计生委基金项目(2019KY65)

第一作者:周亮(1979-),女,硕士,副主任医师。研究方向:泌尿外科疾病。E-mail: 632562468@qq.com

*通信作者:陆建军,男,硕士,主任医师。研究方向:泌尿外科疾病。E-mail:454699984@qq.com

诊时已经发生远处转移^[3]。传统的治疗方法是雄激素剥夺疗法,包括药物去势和手术去势。它们通过阻断雄激素和其受体结合,抑制前列腺肿瘤的生长,并减少前列腺特异性抗原的产生,从而提高患者的生活质量和延长患者生存期^[4]。大多数患者能从去势治疗中获益,但在治疗20~30个月后,许多患者会转向去势抵抗性前列腺癌,导致目前的中位生存时间只有20个月左右,治疗效果较差^[5]。因此,探索前列腺癌的新疗法至关重要。

蔷薇科植物仙鹤草(*Agrimonia pilosa* Ledeb)^[6,7]的活性成分(*agrimonium citrate*, *Agrimonia pilosa* Ledeb)可以降低血糖、血压,增强免疫功能^[8-10]。并且,鹤草酚可以与结核分枝杆菌(*Mtb*)蛋白Rv3852相互作用,改变巨噬细胞中结核分枝杆菌的免疫稳态^[11]。此外,仙鹤草在体外对部分肿瘤细胞的生长有抑制作用^[12,13],但其活性成分鹤草酚在抗肿瘤中的作用及机制尚未被报道过。

本研究中发现,鹤草酚对前列腺癌细胞(DU145细胞和PC3细胞)有显著抑制作用,它可将前列腺癌细胞周期阻断在S期,并促进细胞凋亡。鹤草酚还通过诱导细胞凋亡,减缓了荷瘤小鼠前列腺癌的进展。这些结果证实了鹤草酚在治疗和抑制前列腺癌方面的潜力。

1 材料和方法

1.1 细胞系与材料

从中国科学院细胞库(american type culture collection, ATCC)中获得正常前列腺上皮细胞RWPE-1、前列腺癌细胞株(DU145和PC-3等多种肿瘤细胞株)。在37℃、5% CO₂条件下,将所有细胞在含有DMEM或RPMI-1640(Gibco)的10%胎牛血清(FBS)中培养。使用的抗体包括cyclin B1(Abcam, ab2949), cyclin A(Abcam, ab2097), CDC25C(Abcam, ab32444), GAPDH(CST, #5174), Bcl-xl(CST, #2764), Bad(CST, #9292), caspase 3(CST, #9662), cleaved-caspase 3(CST, #9664), PARP(CST, #9532), cleaved-PARP(CST, #5625), KI67(CST, #12202)。鹤草酚购自国家药品和生物制品控制研究所,HPLC测定纯度≥95%。将鹤草酚溶解在400 mM的二甲亚砜(DMSO)中,保存温度为-20℃。使用前,立即用新鲜的完全培养基稀释。对照组使用等体积DMSO(终浓度<0.1%)。

1.2 MTT实验

经胰蛋白酶处理后,以 5×10^3 细胞/孔的密度,将细胞加入到一个96孔板中(Corning,美国)。细胞

培养过夜后,加入含有不同浓度(0.5 μM、10 μM、20 μM、40 μM、80 μM、100 μM)鹤草酚的新鲜培养基,再继续培养24 h、48 h和72 h。将20 μL MTT(Sigma-Aldrich)溶解在5 mg/mL PBS后,直接加到所有的孔中,随后,将96孔板在37℃下继续培养4 h。去除上清液后,将形成的甲臍晶体溶解在100 μL DMSO溶液中。用全自动定量绘图酶标仪(Bio-Tek, 美国)记录在490 nm的光密度值(optical density, OD)。用0~500 μmol/L鹤草酚处理多种人癌细胞48 h。采用MTT法评估鹤草酚的细胞毒性,并计算其对多个细胞系的IC₅₀值。结果来自至少3个独立的实验。

1.3 细胞集落形成实验

每组中的经鹤草酚处理后处于对数生长期的前列腺癌细胞用0.25%胰蛋白酶消化,形成单细胞悬液,随后以200个细胞/皿的密度种在12孔板上。在37℃、5% CO₂条件的细胞培养箱中,培养2~3周。当菌落肉眼可见时结束培养,丢弃上清液,用PBS冲洗细胞2次。随后用1 mL 4%多聚甲醛固定细胞15 min,再用0.1%结晶紫染色液染色30 min。在拍照和进行菌落计数前用水冲洗孔板。

1.4 细胞周期实验

离心,收集经鹤草酚处理的前列腺癌细胞,用预冷的PBS洗涤2次。将预冷的70%乙醇加入细胞中,在4℃下固定过夜。用1 mL PBS和500 μL PBS(50 μg/mL碘化丙啶、100 μg/mL RNase A和0.2% Triton X-100)清洗细胞,4℃避光孵育30 min。BD流式细胞仪用于标准的细胞周期程序,计数2万个细胞。最后,利用ModFit软件对结果进行分析。

1.5 细胞凋亡实验

经鹤草酚处理的前列腺癌细胞用PBS缓冲液清洗一次。随后将FITC-Annexin V和PI加入缓冲液中,至最终浓度为1 μg/mL,在室温、黑暗条件下孵育10~15 min。使用流式细胞仪,在488 nm处测量荧光值,收集FITC荧光和PI-PE信号。最后,利用Flowjo软件对结果进行分析。

1.6 线粒体膜电位检测

采用线粒体膜电位检测试剂盒JC-1(Sigma)检测线粒体膜电位。在药物治疗后的贴壁前列腺癌细胞中,加入1 mL JC-1染色液,在37℃下孵化20 min,用缓冲液清洗2次,并用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。检测JC-1单体时,激发光设置为490 nm,发射光设置为540 nm;检测JC-1聚合物时,激发光设置为525 nm,发射光设置为590 nm。绿色荧光的出现时,表明线粒体膜电位下降,细胞可能处于凋亡的早期阶段。

1.7 异种移植瘤实验

在BALB/c荷瘤裸鼠的皮下注射DU145细胞,进行细胞体外克隆形成实验。7 d后,选取肿瘤大小相近的荷瘤裸鼠,静脉注射不同剂量的鹤草酚(0 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg),每2~3 d记录肿瘤大小。21 d后,安乐死裸鼠,称量每个肿瘤并拍照。同时进行一组平行实验,以检测经鹤草酚处理后的裸鼠的存活率的变化。所有动物实验均经北仑区人民医院伦理委员会批准。

1.8 统计学方法

采用SPSS 19.0和GraphPad软件进行统计分析。分类资料采用 t 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外实验证实了鹤草酚对前列腺癌细胞的抑制作用

经鹤草酚处理的PC-3和DU145细胞(48 h),其存活率随着鹤草酚浓度的增加而逐渐降低(见图1A),而经15 μ M鹤草酚处理72 h的正常前列腺上皮细胞株RWPE-1的存活率没有受到抑制(见图1B),表明鹤草酚只作用于前列腺癌细胞,而不影响正常细胞。此外,细胞集落形成实验的结果表明,在体外,15 μ M鹤草酚能显著抑制前列腺癌细胞PC-3和DU145的生长和聚集(见图1C-图1E)。

2.2 鹤草酚促进前列腺癌细胞的细胞凋亡

除细胞周期阻滞外,鹤草酚还影响前列腺癌细胞的细胞凋亡。用15 μ M鹤草酚处理DU145和PC-3细胞后,细胞密度显著降低(见图2A),凋亡率显著增加。DU145细胞凋亡率从1.9%增加至17.1%,PC-3细胞凋亡率从2.4%增加至15.0%(见图2B)。用15 μ M鹤草酚处理DU145和PC-3细胞后,凋亡细胞的比例也增加了(见图2C、图2D),DU145细胞凋亡比例由6.7%增加至17.4%,PC-3细胞凋亡比例由3.1%增加至12.3%(见图2E)。线粒体膜电位检测(JC-1)结果表明,540 nm处的绿色荧光信号聚合在经仙鹤草酚处理的DU145和PC-3细胞的线粒体中,表明细胞凋亡比例较高(见图2F)。由于凋亡通常与caspase级联反应的激活有关,在鹤草酚处理后,将caspase抑制剂Z-VAD-FMK加入DU145和PC-3细胞的线粒体中,抑制鹤草酚诱导的凋亡(见图2G)。此外,凋亡相关蛋白的表达也发生了变化,在经鹤草酚处理DU145和PC-3细胞中,促凋亡的Bad、cleaved caspase3和cleavedparp的表达增加,而抗凋亡的Bcl-xl的表达下降(见图2H)。综上所述,鹤草酚通过激活caspase通路,促进前列腺癌细胞凋亡。

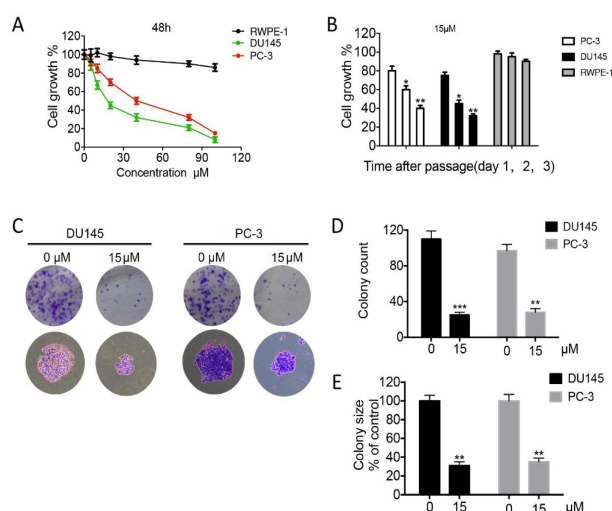


图1 鹤草酚能显著抑制体外培养的前列腺癌细胞的增殖

Fig.1 Eugenol can significantly inhibit the proliferation of prostate cancer cells cultured in vitro

A. 分别用不同浓度鹤草酚(0.5 μ M、10 μ M、20 μ M、40 μ M、80 μ M、100 μ M)处理48 h后,测定PC-3、DU145和RWPE-1细胞的细胞活力;B. 用15 μ M鹤草酚处理24 h、48 h、72 h后,每天测定PC-3、DU145和RWPE-1细胞的细胞活力;C. 用15 μ M鹤草酚处理48 h后,对PC-3和DU145细胞开展细胞菌落形成实验,图片显示了每一组的菌落形成情况;D. 统计每组的菌落数量;E. 统计各组的平均菌落大小。

A.The cell growth of PC-3, DU145 and RWPE-1 was measured after treating with different concentrations of Eugenol (0, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M) for 48 h. B.The cell growth of PC-3, DU145 and RWPE-1 was measured daily after treating with 15 μ M Eugenol for 24, 48 and 72 h. C. The cell cloning assay of PC-3 and DU145 was measured after treating with 15 μ M Eugenol for 48 h. The images show the formation of colonies in each group. D.The number of colonies in each group was counted. E.The average colony size of each group was calculated.

2.3 鹤草酚在体内诱导前列腺癌细胞凋亡,延缓肿瘤发生

接下来,我们研究了在体内鹤草酚对前列腺癌的影响。30只裸鼠皮下植入相同数量的DU145细胞。1周后,将10只裸鼠分为3组,经尾静脉注射不同浓度(0 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg)的鹤草酚。术后,每天记录肿瘤的体积。治疗3周后,安乐死裸鼠,取皮下肿瘤,并拍照称量。结果显示,注射鹤草酚后,荷瘤裸鼠前列腺癌的进展明显减缓(见图3A)。此外,鹤草酚还显著减缓了皮下肿瘤的生长(见图3B)。经鹤草酚处理后,小鼠的肿瘤重量也显著降低(见图3C),但小鼠的体质量没有任何变化(见图3D)。此外,鹤草酚显著延长了荷瘤小鼠的生存期(见图3E),

降低了细胞增殖抗原KI67的表达,增加了凋亡相关蛋白cleaved caspase 3的表达(见图3F)。因此,鹤草酚可以通过减少细胞增殖和促进caspase 3的凋亡,来抑制前列腺癌的发展。

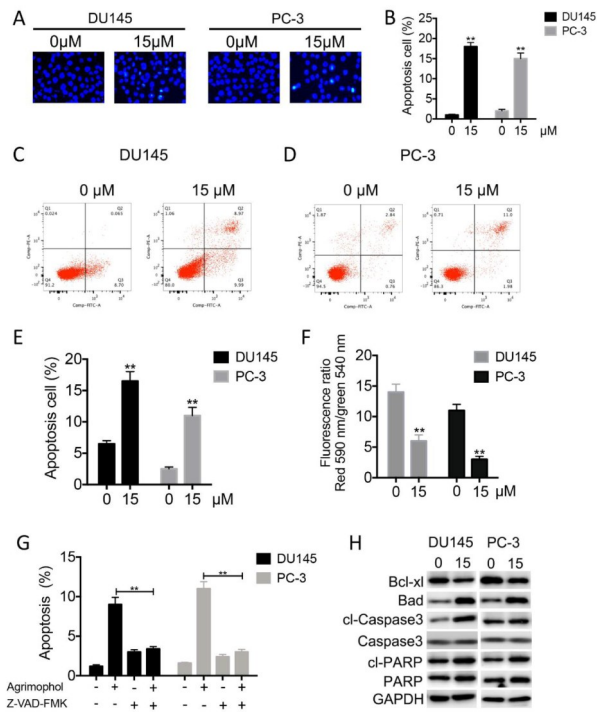


图2 鹤草酚通过激活caspase-3通路,诱导前列腺癌细胞凋亡通路

Fig. 2 Eugenol induces apoptosis of prostate cancer cells by activating caspase-3 pathway

A. 经15 μ M 鹤草酚处理48 h后,对DU145和PC-3细胞进行DAPI染色,用荧光显微镜观察细胞核形态和密度图;B. 统计各组细胞凋亡数量;C. 经鹤草酚处理48 h前后,用流式细胞仪检测DU145细胞凋亡情况;D. 经鹤草酚处理48 h前后,用流式细胞仪检测PC-3细胞凋亡情况;E. C图和D图中凋亡细胞比例;F. 线粒体膜电位分析,鹤草酚处理48 h前后的绿色凋亡信号的比例;G. 经鹤草酚和Z-VAD-FMK同时处理48 h后,DU145和PC-3细胞的活力;H. 鹤草酚治疗前后的凋亡相关蛋白的表达水平。

A. DU145 and PC-3 cells were treated with 15 μ M Eugenol and stained with DAPI, then nuclear morphology and density maps were visualized by fluorescence microscopy. B. Statistics on apoptotic cells in each group in A. C. Apoptotic flow cytometry of DU145 cells before and after Eugenol treatment. D. Apoptotic flow cytometry of PC-3 cells before and after Eugenol treatment. E. The proportion of apoptotic cells in the C and D plots. F. The results of mitochondrial membrane potential analysis showed the proportion of green apoptotic signals before and after Eugenol treatment. G. The cell viability of DU145 and PC-3 cells simultaneously treated with Eugenol and Z-VAD-FMK. H. Expression of apoptosis-related proteins before and after Eugenol treatment.

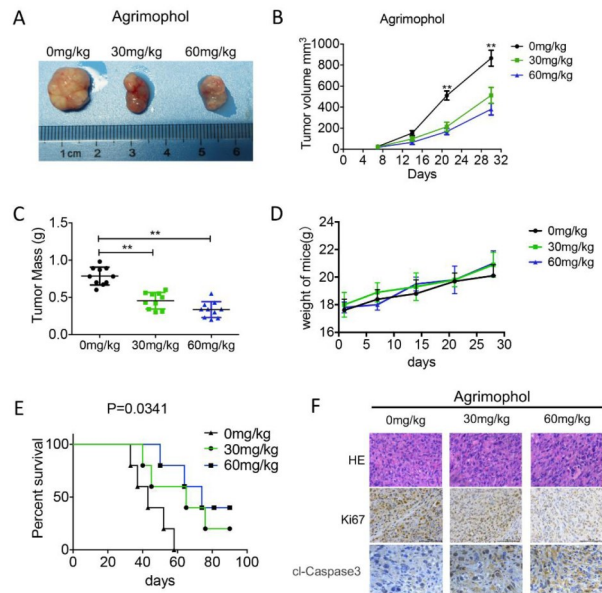


图3 鹤草酚在体内抑制前列腺癌的发生

Fig.3 Inhibition of genistein on prostate cancer in vivo

A. 比较经鹤草酚处理前后,裸鼠皮下异种移植瘤(DU145)的大小;B. 治疗期间肿瘤体积的测量;C. 小鼠安乐死后,取出皮下异种移植瘤并称重;D. 实验结束时,测量小鼠的体质量;E. 用不同浓度的鹤草酚治疗荷瘤小鼠,测定各组小鼠的存活率;F. 采用HE染色和免疫组化法,检测鹤草酚治疗前后,移植的肿瘤中KI67和cleaved-caspase 3的表达水平。

A. Size comparison of DU145 subcutaneous xenografts in nude mice before and after Eugenol. B. Measurement of tumor volume during Eugenol treatment. C. After the mice were sacrificed, the subcutaneous xenografts were removed and weighed. D. The body weight of the mice was measured at the end of the experiment. E. Tumor-bearing mice were treated with different concentrations of Eugenol and the survival of the mice in each group was determined. F. HE staining and immunohistochemistry were used to detect the expression of KI67 and cleaved-caspase 3 in transplanted tumors before and after Eugenol treatment.

3 讨论

前列腺癌是常见的恶性肿瘤,尤其是在美国,前列腺癌已成为危害男性健康的主要肿瘤。前列腺癌是由细胞过度增殖、细胞分化异常以及程序性细胞凋亡减少等多种因素引起的^[14-16]。因此,抑制和诱导癌细胞的凋亡和增殖,是前列腺癌的一种潜在治疗方法。传统化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡时,往往具有严重的不良反应。因此,在新药的研发中,低毒、抗肿瘤的天然药物具有重要意义^[17]。

已有研究发现^[18],鹤草酚是一种有效的抗肿瘤单宁酸,它通过作用于肿瘤细胞和某些免疫细胞,增强宿主动物的免疫反应。本研究表明,蔷薇科植物仙鹤草中的天然成分鹤草酚,能显著抑制DU145

和PC-3细胞的增殖,并呈剂量依赖性,提示其对前列腺癌具有潜在的抑制作用。

独立于线粒体的外源性细胞凋亡通路为 caspase 8-caspase 6-caspase 7-caspase 3/PARP通路,而线粒体依赖性的内源性细胞凋亡通路为 caspase 8-Bax/bak - cytochrome C/AIF-caspase 9-caspase 3通路^[19,20]。本研究表明,与对照组相比,经 15 μM 鹤草酚处理后,前列腺癌细胞凋亡的比例显著增加,提示鹤草酚通过独立于线粒体的通路,对前列腺癌细胞凋亡有显著影响。Caspase 3是一种蛋白酶,在细胞凋亡中起重要作用。它能促进DNA裂解、染色质凝聚和凋亡小体的形成,是细胞凋亡的关键酶^[21]。正常情况下,它以非活性形式存在于细胞质中,但在细胞凋亡阶段被激活,裂解相应的胞浆核底物,引起细胞凋亡^[22]。体内、体外实验结果都表明,用 15 μM 鹤草酚处理前列腺癌细胞后,caspase 3被激活。

综上所述,鹤草酚可能通过增加 caspase 3活性、阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡,对前列腺癌细胞的增殖发挥显著抑制作用。因此,鹤草酚具有治疗前列腺癌的潜力,但尚需进一步的临床研究。

参考文献

- [1] Evans AS, Timmermand OV, Bjartell A, et al. Radioimmunotherapy for prostate cancer-current status and future possibilities[J]. *Semin Nucl Med*, 2016, **46**(2): 165-179
- [2] Cai Z, Lv H, Cao W, et al. Targeting strategies of adenovirus-mediated gene therapy and virotherapy for prostate cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2017, **16**(5): 6443-6458
- [3] Falzarano SM, Ferro M, Bollito E, et al. Novel biomarkers and genomic tests in prostate cancer: a critical analysis[J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2015, **67**(3): 211-231
- [4] Polotti CF, Kim CJ, Chuchvara N, et al. Androgen deprivation therapy for the treatment of prostate cancer: a focus on pharmacokinetics[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017, **13**(12): 1265-1273
- [5] West TA, Kiely BE, Stockler MR. Estimating scenarios for survival time in men starting systemic therapies for castration-resistant prostate cancer: a systematic review of randomised trials[J]. *Eur J Cancer*, 2014, **50**(11): 1916-1924
- [6] Jang HH, Nam SY, Kim MJ, et al. Agrimonia pilosa ledeb, aqueous extract improves impaired glucose tolerance in high-fat diet-fed rats by decreasing the inflammatory response[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, **17**(1): 1-8
- [7] Pei YH, Li X, Zhu TR. Studies on the chemical constituents from the root-sprouts of agrimonia pilosa ledeb[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 1989, **24**(6): 431-437
- [8] Park S, Kang S, Kim DS, et al. Agrimonia pilosa ledeb, cinnamomum cassia blume, and lonicera japonica thunb, protect against cognitive dysfunction and energy and glucose dysregulation by reducing neuroinflammation and hippocampal insulin resistance in β -amyloid-infused rats[J]. *Nutr Neurosci*, 2017, **20**(2): 77-88
- [9] Jin X, Song S, Wang J, et al. Tiliroside, the major component of agrimonia pilosa ledeb ethanol extract, inhibits MAPK/JNK/p38-mediated inflammation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages[J]. *Exp Ther Med*, 2016, **12**(1): 499-505
- [10] Zhu H, Bie Y, Wang J, et al. Experimental study on the protection of agrimony extracts from different extracting methods against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Chin Med Sci J*, 2017, **32**(4): 239-247
- [11] Zhao N, Sun M, Burns HK, et al. Identification of Rv3852 as an agrimophol-binding protein in mycobacterium tuberculosis[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(5): e0126211
- [12] Wang X, Wang H, Zhang C, et al. Experimental study on inhibition of S180 tumor cells by agrimonia pilosa extract[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2013, **10**(3): 475-479
- [13] Lee YM, Kim JB, Bae JH, et al. Estrogen-like activity of aqueous extract from Agrimonia pilosa ledeb in MCF-7 cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, **12**(1): 1-8
- [14] Isaacs JT. Resolving the coffee paradox: what does the androgen receptor do in normal vs malignant prostate epithelial cells[J]. *Am J Clin Exp Urol*, 2018, **6**(2): 55
- [15] Prevarskaya N, Flourakis M, Bidaux G, et al. Differential role of TRP channels in prostate cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, **35**(1): 133-135
- [16] Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, et al. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells[J]. *Cell Death Differ*, 2007, **14**(7): 1295-1304
- [17] Kallifatidis G, Hoy JJ, Lokeshwar BL. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2016, **40**(6): 160-169
- [18] Miyamoto K, Kishi N, Koshiura R. Antitumor effect of agrimonin, a tannin of Agrimonia pilosa ledeb, on transplantable rodent tumors [J]. *Japanese Journal of Pharmacology*, 1987, **43**(2): 187-195
- [19] Iguchi T, Kuroda M, Naito R, et al. Cholestane glycosides from ornithogalum saundersiae bulbs and the induction of apoptosis in HL-60 cells by OSW-1 through a mitochondrial-independent signaling pathway[J]. *J Nat Med*, 2019, **73**(1): 131-145
- [20] Yang F, Chen WD, Deng R, et al. Hirsutanol a novel sesquiterpene compound from fungus Chondrostereum sp, induces apoptosis and inhibits tumor growth through mitochondrial-independent ROS production: hirsutanol a inhibits tumor growth through ROS production[J]. *J Transl Med*, 2013, **11**(1): 1-10
- [21] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, **41**(6): 13-21
- [22] Sergeeva TF, Shirmanova MV, Zlobovskaya OA, et al. Relationship between intracellular pH, metabolic co-factors and caspase-3 activation in cancer cells during apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, **1864**(3): 604-611