ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ПИСЬМА 16: 1943-1952,
2018

Влияние экстракта *Derris scandens* на клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы человека

DUANGHATHAI KULJITTICHANOK [1], PENCHATR DISKUL-NA-AYUDTHAYA [2], CHURAT WEERAPHAN [2], DARANEE CHOKCHAICHAMNANKIT [2], KHAJEELAK CHIABLAEM [2], KRIENGSAK LIRDPRAPAMONGKOL [2], JISNUSON SVASTI [1,2]и CHANTRAGAN SRISOMSAP [2]

[1]Программа прикладных биологических наук, Высший институт Чулабхорна;
[2]Лаборатория биохимии, Научно-исследовательский институт Чулабхорн, Бангкок 10210, Таиланд

Поступила 7 ноября 2016 г.; Принята 2 ноября 2017 г.

DOI: 10.3892/ol.2018.8824

Аннотация. Уровень заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) остается высоким во многих странах, включая Таиланд. Существует множество различных методов лечения ГЦК, однако различные побочные эффекты и резистентность раковых клеток во время лечения остаются проблемой. В настоящее время традиционно используемые травы широко применяются в качестве альтернативных методов лечения рака. *Derris scandens* - тайская традиционная трава, которая широко распространена в Таиланде и широко используется в качестве традиционной медицины для лечения множества различных заболеваний. Цитотоксичность этанольного экстракта *D. scandens* на клеточной линии HCC (HCC-S102) определяли с помощью MTT-теста. После обработки этанольным экстрактом *D. scandens* индукция апоптоза была определена с помощью анализа Annexin V и анализа мертвых клеток, а затем подтверждена повышением уровня расщепленной поли(ADP-рибоза) полимеразы. Кроме того, для изучения изменений белков при обработке этанольным экстрактом *D. scandens* был использован протеомный подход с применением жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии для идентификации белков. Результаты показали, что этанольный экстракт *D. scandens* обладает цитотоксичностью в отношении клеток HCC-S102: полумаксимальная ингибирующая концентрация составила 36,0±1,0, 29,6±0,6 и 22,6±1,5 мкг/мл через 24, 48 и 72 часа, соответственно. После обработки *D. scandens* индуцировались апоптотические клетки. Сравнительный протеомный профиль этанольного экстракта *D. scandens*, обработанных и необработанных клеток, выявил различные белки-мишени противораковой активности, включая гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин (hnRNP) K, hnRNP A2/B1, stomatin-like 2 и GAPDH. В настоящем исследовании продемонстрирована противораковая активность эта- нольного экстракта *D. scandens*, который влияет на пролиферацию клеток. HCC-S102 по апоптотическому пути. Изменения в этих белках позволяют лучше понять механизм действия *D. scandens*, который в будущем может стать перспективным противораковым средством для лечения пациентов с ГЦК.

Корреспонденция по адресу: Доктор Чантраган Срисомсап, лаборатория биохимии, Научно-исследовательский институт Чулабхорн, 54 Кампхенг Пхет 6, Талат Банг Кхен, Бангкок 10210, Таиланд.
E-mail: chantragan@cri.or.th

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, *Derris scandens*, клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы HCC-S102, апоптоз, протеомика

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), первичный рак печени, является одной из самых распространенных причин смертности от рака во всем мире и возникает из клеток гепатоцитов в печени (1). Развитию ГЦК способствуют различные факторы риска, включая хроническую вирусную инфекцию (в том числе вирусы гепатита B и C), воздействие афлатоксинов, употребление алкоголя и перегрузка железом (2). Уровень заболеваемости ГЦК растет во многих азиатских странах, в том числе в Таиланде (1). Большинство пациентов с ГЦК имеют плохой прогноз из-за первого выявления заболевания на поздней стадии. Было разработано множество различных методов лечения, направленных на улучшение прогноза и долгосрочной выживаемости пациентов, однако остаются ограничения, включая такие серьезные побочные эффекты, как усталость, боль, диарея, тошнота, рвота, выпадение волос, а также устойчивость раковых клеток к лечению (3). В настоящее время большой интерес вызывают традиционные растительные препараты, которые могут быть использованы для лечения рака или в сочетании с другими методами лечения рака. *Derris scandens*, известный в Таиланде под названием "Thao-wan-Priang", относится к семейству бобовых или Fabaceae. Он хорошо известен как азиатское лекарственное растение, которое растет в виде древесной лианы по всей Юго-Восточной Азии, в том числе и в Таиланде. Высушенные стебли *D. scandens* используются в качестве отхаркивающего, противокашлевого, мочегонного и антидизентерийного средства (4), а также для лечения ряда заболеваний, включая остеоартрит, воспаление и мышечные боли (4,5). Предыдущее исследование показало, что этаноловый экстракт *D. scandens* обладает потенциальной антиметастатической активностью в клеточных линиях холангиокарциномы и гепатомы, равной паклитакселу (Taxol; $10^{(-9)}$ M), который использовался в качестве положительного контроля (6). Кроме того, было обнаружено, что экстракты *D. scandens* оказывают антипролиферативное действие на рак толстой кишки путем повышения уровня B-клеточной лимфомы 2-ассоциированного X белка (Bax), который является проапоптотическим, и снижения уровня Антиапоптотические белки B-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2) (7).

Протеомный анализ широко используется в области исследования рака. Основной принцип этой методики заключается в выделении

белков в двух измерениях в соответствии с их изоэлектрической точкой и молекулярной массой. Масс-спектрометрия используется для идентификации белков после двумерного (2D) электрофореза (8). Эти процессы протеомного анализа используются в качестве важнейших инструментов для всестороннего мониторинга, идентификации и характеристики вариаций белков при многочисленных заболеваниях (9,10). Таким образом, протеомный анализ является полезным инструментом для изучения и идентификации изменений экспрессии белков в клеточной линии ГЦК в ответ на традиционное лечение растениями.

В настоящем исследовании была изучена цитотоксичность этанольного экстракта *D. scandens* в отношении клеточной линии HCC человека HCC-S102. Дополнительно изучалась индукция цитотоксичности через апоптоз. Поскольку механизмы, лежащие в основе антипролиферативных свойств *D. scandens* на этой клеточной линии, еще не раскрыты, был проведен 2D-электрофорез для выявления изменений белков, которые улучшат понимание способа действия.

Материалы и методы

Заготовка растения. D. scandens был приобретен в тайском магазине лекарственных растений в Бангкоке, Таиланд. Части стеблей были отобраны и подготовлены с помощью экстракции этанолом. Вкратце, части стеблей сухих растений измельчали и перетирали в мелкую крошку. Высушенные измельченные растительные материалы (50 г) процеживали в абсолютный этанол и затем встряхивали на орбитальном шейкере при 60 об/мин в течение 22 ч при комнатной температуре. Растительные материалы в растворе абсолютного этанола затем фильтровали с помощью фильтровальной бумаги Whatman no. 4 (Hyclone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA), затем высушивали при пониженном давлении с получением 62,93 мг. Этанольные растительные экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 200 мг/мл и хранили в виде исходного раствора при -20˚C.

Культура клеток. Клеточная линия HCC-S102, полученная от тайского пациента (11), была любезно предоставлена д-ром Сумали Тунгпрадабкул (отделение биохимии, факультет естественных наук, Университет Махидол, Бангкок, Таиланд). Клетки поддерживали в среде RPMI-1640 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Hyclone; GE Healthcare Life Sciences), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) и 125 нг/мл амфотерицина B (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Все культуры инкубировали в CO_2инку- баторе при 37˚C в увлажненной атмосфере 5% CO_2. Культуральная среда пополнялась три раза в неделю.

Цитотоксическая активность. Клетки HCC-S102 использовали для изучения цитотоксического эффекта *D. scandens* с помощью MTT-анализа (12). Клетки в культуральной среде высевали в 96-луночные планшеты при плотности $5x10^3$клеток/лунку и инкубировали при 37˚C в течение ночи. Затем клетки обрабатывали различными концентрациями этанольного экстракта *D. scandens* (0-50 мкг/мл) в течение 24, 48 и 72 ч в дополнение к ДМСО (отрицательный контроль) и доксорубицину (положительный контроль) в различных концентрациях (0-2,7 мкг/мл) в течение 24, 48 и 72 ч. Затем среду удаляли и заменяли 100 мкл свежей среды, содержащей раствор красителя тетразолия (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (0,5 мг/мл). Все планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37˚C. Затем среду удаляли, а продукт формазана растворяли добавлением 100 мкл ДМСО в каждую лунку. Абсорбцию измеряли при 550 нм с вычитанием фона при 650 нм с помощью микропланшетного ридера (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA).

Выделение белка. Клетки, обработанные 20 и 30 мкг/мл Клетки *D. scandens* с этанольным экстрактом в течение 72 ч и контрольные клетки (обработанные 0,5% ДМСО) были отдельно промыты 0,25 M сахарозой для удаления соли. Затем клетки соскабливали в 450 мкл 0,25 M сахарозы, содержащей cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (соотношение 1:10, Sigma-Aldrich; Merck KGaA) и центрифугировали при 778 x g в течение 15 мин при 4˚C. Гранулы ресуспендировали в буфере для лизиса, содержащем 9 M мочевину, 2% 3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]-1-пропансуль-фонат, 2% дитиотреитол (ДТТ), 2% амфолин [pH 3-10, тот же диапазон, что и на иммобилизованной pH-градиентной (IPG) полоске] и 1% коктейль ингибиторов протеаз, затем проводили соникацию на льду и центрифугирование при 13 800 x g в течение 10 мин при 4˚C. Концентрацию белка определяли с помощью анализа Брэдфорда (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), как описано ранее (13).

2D гель-электрофорез и анализ изображений. На полоски Immobiline™ Drystrips (7 см, нелинейные, градиент pH 3-10; Bio-Rad Laboratories) наносили по 200 мкг каждого образца. Полоски IPG инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Изоэлектрическое фокусирование первого измерения проводили при 6 500 В/ч, 55 мкА на гелевую полоску, используя Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Литтл Чалфонт, Великобритания). Для SDS-PAGE второго измерения IPG-полоски уравновешивали в эквилибрационном буфере при комнатной температуре в течение 15 мин для каждого шага. Электрофорез проводили в аппарате SE 600 Ruby (GE Healthcare Life Sciences) при 10 мА/гель с последующим окрашиванием Coomassie blue R-250, как описано ранее (14). Гели сканировали с помощью программного обеспечения Labscan (версия 5.0; GE Healthcare Life Sciences) и анализировали с помощью ImageMaster 2D Platinum (версия 7.0; GE Healthcare Life Sciences). Все эксперименты проводились независимо в трех экземплярах. Белковые пятна, обнаруживающие значительную разницу в объемном соотношении ($P<0,05$), были отобраны для идентификации белков с помощью масс-спектрометрического анализа.

Внутригелевое переваривание. Белковые пятна подвергали внутригелевому триптическому перевариванию, как описано ранее (14). Вкратце, гели разрезали на небольшие кусочки и обесцвечивали с помощью 0,1 M NH_4HCO_3в 50% ацетонитриле при 30˚C в течение 20 минут, затем восстанавливали 10 мМ ДТТ при 60˚C в течение 45 минут и алкилировали 100 мМ йодоацетамида при 25˚C в течение 30 минут, соответственно. После удаления реагентов гелевые кусочки полностью высушивали и переваривали с помощью 0,3 мкг трипсина (Promega Corporation, Madison, WI, USA) в 30 мкл буфера для переваривания при 37˚C в течение ночи. Буфер для переваривания собирали для идентификации белков.

Идентификация белков методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Идентификацию белковых пятен проводили методом нанопоточной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с ионной ловушкой amaZon speed (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Все трипсинизированные пептиды концентрировали и обессоливали на колонке EASY-nLC™ с внутренним диаметром 75 мкм x100 мм C_{18}(Thermo Fisher Scientific, Inc.). Затем пептиды элюировали с помощью

градиентное разделение с использованием элюентов A и B, которые представляли собой 0,1% муравьиной кислоты в воде и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле, соответственно. Всего в систему наноЖХ вводили 6 мкл образца и разделяли при скорости потока 0,5 мкл/мин в течение 30 мин, используя следующий градиент: 0 мин 95% A, 20 мин
60% A, 20,5 мин 5% A, 29 мин 5% A и 29,5 мин 95% A, затем MS/MS с использованием источника CaptiveSpray™ с автоматической скоростью сканирования 1,0 сек и задержкой между сканированиями 0,1 сек. Для МС/МС-анализа выбирались пики родительских масс с диапазоном от 50 до 3000 *m/z*. Энергия столкновения фиксировалась на уровне 1 300 В. Данные МС/МС обрабатывали и конвертировали в файлы mgf с помощью программного обеспечения Compass (версия 1.4; Bruker Corporation) и идентифицировали белки с помощью поисковой системы MASCOT (www.matrixscience.com). Параметры поиска были установлены следующим образом: База данных, Swiss-Prot и NCBInr; таксономия, *Homo sapiens*; фермент, трипсин; допускалось два пропущенных расщепления. Допуск на массу пептида и MS/MS фрагмента иона был установлен на 1,2 и 0,6 Da, соответственно. Положительно идентифицированными считались белки с согласованной молекулярной массой и изоэлектрической точкой гелевого пятна с MASCOT баллом >25 при P-значении ≤0,05.

Вестерн-блот анализ. Образцы белка выделяли с помощью буфера для анализа радиоиммунопреципитации, содержащего cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets. В качестве ингибиторов фосфатаз использовали 10 мкМ NaF (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA), 1 мМ $Na_3VO_{(4)}$ (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) и 20 мМ *β-глицерофосфата* (Merck KGaA). На каждую полосу загружали 15 мкг белка, который разделяли с помощью SDS-PAGE (12,5% гель) и электрофоретически переносили на поливинилидендифлюо- ридные мембраны (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Мембраны блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином в течение 1 ч при комнатной температуре и затем инкубировали при 4˚C в течение ночи с первичными антителами следующим образом: Кроличье поликлональное анти-поли(ADP-рибоза) полимераза (PARP; 1:1 000; кат. номер 9542; Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA), мышиный моноклональный анти-α-тубулин (1:3 000; кат. № 3873; Cell Signaling Technology, Inc.), кроличий поликлональный анти-гетероге- незный рибонуклеопротеин K (hnRNP K, 1:1 000; кат. №. 4675; Cell Signaling Technology), моноклональный кроличий анти-глицераль-дегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH; 1:1 000; кат. № ab75834; Abcam, Кембридж, Великобритания), моноклональный мышиный анти-гнРНП A2/B1 (1:1 500; кат. ab6102; Abcam), кроличий поликлональный анти-пероксиредоксин-4 (Prx4; 1:10 000; кат. № ab15574; Abcam), кроличий моноклональный анти-кислород-регулируемый белок 150 (ORP150, также известный как HYOU1 или гипоксия-апрег-мулируемый белок 1; 1:1 000; кат. ab134944; Abcam) и кроличьего моноклонального антистоматин-подобного белка 2 (STOML2; 1:2 000; кат. номер ab191884; Abcam). Затем мембраны промывали 3 раза Трис-буферным солевым раствором с 0,1% Tween 20 и инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) поликлональным кроличьим антимышиным иммуноглобулином (кат. № P0260; Dako; Agilent Technologies, Inc, Санта-Клара, Калифорния, США) или поликлональным свиным антирабическим иммуноглобулином (кат. № P0217; Dako; Agilent Technologies, Inc.) (разведение 1:2 000) при комнатной температуре в течение 1 ч. Полосы выявляли с помощью электрохе-милюминесцентного реагента (GE Healthcare Life Sciences), а изображения получали с помощью системы цифровой визуализации ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Аннексин V и анализ мертвых клеток (проточная цитометрия). Общее количество клеток $2x10^5$(2 мл/лунку) высевали в 6-луночные планшеты при 37˚C на ночь. Группа контрольных условий содержала 0,5% ДМСО в качестве транспортного средства. Для обработки клеток использовали
Этанольный экстракт *D. scandens* в различных концентрациях (20 и 30 мкг/мл) и далее инкубировали при 37˚C в увлажненной атмосфере 5% CO_2в течение 24, 48 и 72 ч. После инкубации клетки трипсинизировали и ресуспендировали в количестве $1x10^6$клеток/мл перед окрашиванием с использованием набора Muse® Annexin V and Dead Cell Assay kit (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) в соотношении 1:1 при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин. Апоптотический анализ проводили с помощью анализатора Muse™ Cell Analyzer (EMD Millipore), с программным обеспечением Muse™ Analysis Software версии 1.3.0.0.

Статистический анализ. Все данные представлены как среднее± стандартное отклонение. Статистический анализ проводили методом двустороннего дисперсионного анализа с пост-хок анализом Tukey's Honest Significant Difference), используя GraphPad Prism (версия 7; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Статистически значимым различием считалось P<0,05.

Результаты

Цитотоксическая активность этанольного экстракта D. scandens на клетках HCC-S102. Для оценки цитотоксического эффекта
Для определения влияния этанольного экстракта *D. scandens* на клетки HCC-S102 был проведен MTT-анализ. Были рассчитаны значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}), которые составили 36,0±1,0, 29,6±0,6 и 22,6±1,5 мкг/мл через 24, 48 и 72 часа,
соответственно (рис. 1A). Кроме того, в качестве положительного контроля использовали доксорубицин, и значения IC_{50}для клеток, обработанных доксорубицином, составили 1,1±0,03, 0,6±0,01 и 0,3±0,02 мкг/мл через 24, 48 и 72 ч, соответственно (рис. 1B).

Эти результаты показывают, что этаноловый экстракт *D. scandens* оказывает цитотоксическое действие на клетки HCC-S102 в дозо- и времязависимой манере по сравнению с контролем. Исходя из ингибирующей концентрации этанольного экстракта *D. scandens*, IC_{50}и IC_{80}составили 20 и 30 мкг/мл, соответственно, поэтому эти дозы были выбраны для дальнейших исследований.

Выявление апоптоза клеток HCC-S102, индуцированного Этанольный экстракт D. scandens. Апоптоз-индуцирующий эффект этанольного экстракта *D. scandens* на клетки HCC-S102 оценивали с помощью анализа на аннексин V и мертвые клетки. Клетки HCC-S102 подвергали воздействию этанольного экстракта *D. scandens* в концентрациях 20 и 30 мкг/мл в течение 24, 48 и 72 ч. После лечения в клетках, обработанных 20 и 30 мкг/мл этанольного экстракта *D. scan- dens*, было обнаружено постепенное увеличение положительного окрашивания Annexin V по сравнению с контролем (рис. 2A).

Пропорции общих апоптотических клеток показали, что обработка HCC-S102 этанольным экстрактом *D. scandens* индуцировала апоптоз в дозо- и времязависимой манере. Так, общее количество апоптотических клеток было значительно увеличено (P<0,01) в группах клеток, обработанных 20 и 30 мкг/мл этанольного экстракта *D. scandens* в течение 48 и 72 ч по сравнению с контролем, и значительно увеличено (P<0,01) в группе, обработанной 30 мкг/мл этанольного экстракта *D. scandens* в течение 24 ч по сравнению с контролем (рис. 2B).

Чтобы подтвердить, связан ли этаноловый экстракт *D. scandens* с индукцией апоптоза в клетках HCC-S102,

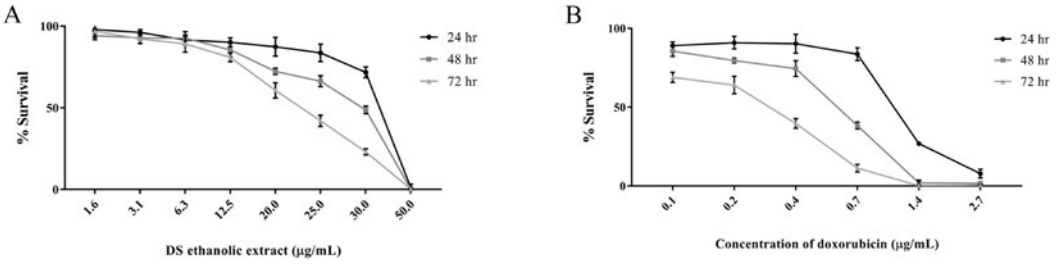

Рисунок 1. Цитотоксический эффект этанольного экстракта *D. scandens* и доксорубицина на клеточную линию HCC-S102. Клетки подвергали воздействию (A) этанольного экстракта *D. scandens* или (B) доксорубицина (положительный контроль) в указанных дозах в течение 24, 48 и 72 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью MTT-анализа. Результаты выражены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. DS - *Derris scandens*.

Уровень экспрессии расщепленного PARP определяли с помощью вестерн-блот анализа. Результаты показали, что обработка клеток HCC-S102 этанольным экстрактом *D. scandens* увеличивала интенсивность полосы расщепленного PARP, особенно при 30 мкг/мл (при 89 кДа; рис. 3A). Таким образом, 30 мкг/мл этанольного экстракта *D. scandens* приводили к значительному (P<0,01) повышению уровня экспрессии расщепленного PARP через 24, 48 и 72 ч лечения (рис. 3B). Повышение уровня экспрессии расщепленного PARP подтвердило гипотезу о том, что этаноловый экстракт *D. scandens* индуцирует гибель клеток HCC-S102 через апоптотический путь.

Эффекты обработки этанольным экстрактом D. scandens с помощью протеомного анализа. Для выявления различий в экспрессии белков из клеток HCC-S102, обработанных 20 и 30 мкг/мл этанолового экстракта *D. scandens* в течение 72 ч, были выделены белки. 2D-картины контрольных и обработанных этаноловым экстрактом *D. scandens* клеток (рис. 4A-C) были проанализированы с помощью программы ImageMaster 2D Platinum. В результате в клетках, обработанных этаноловым экстрактом *D. scandens* (20 или 30 мкг/мл), было обнаружено ~466 белковых пятен, причем для большинства белков были выявлены статистически значимые различия в уровнях экспрессии >1,5-кратного изменения (P<0,05; данные не показаны) по сравнению с аналогичными пятнами в контрольных клетках. Среди них 18 белковых пятен, уровень экспрессии которых значительно отличался, были отобраны для дальнейшего анализа методом ЖХ-МС/МС и впоследствии идентифицированы с помощью поисковой системы MASCOT и базы данных SwissProt.

Всего было идентифицировано 18 белков, как представлено в таблице I. Всего в клетках HCC-S102, обработанных этанольным экстрактом *D. scandens* (20 и 30 мкг/мл), было выявлено 6 повышенных и 12 пониженных белков по сравнению с контролем. К числу повышенных белков относятся эндоплазмин (Hsp90B1), когнатный белок теплового шока 71 кДа (Hsc70), промежуточная цепь цитоплазматического динеина 1 2 (DC1I2), UDP-N-ацетилгексозамин пирофосфорилазоподобный белок 1, ORP150 и цитоскелетный кератин 9 типа I.

Среди пониженных белков - гомолог хромобоксного белка 3 (CBX3), 60S кислый рибосомальный белок P0, субъединица α-1 филаментозного актин-укупорочного белка, ретиналь-дегидрогеназа 1 (RALDH1), альдо-кето-редуктаза семейства 1 член C1 (AKR1C1), GAPDH, нейрокальцин-δ, цитохром bc_1комплекс субъединица 1 (UQCRC1), глутаредоксин-3 (TXNL2), пероксидоксин-4 (Prx4), гнРНП K, гнРНП A2/B1 и STOML2.

Подтверждение различий в уровнях экспрессии белков 2D-электрофореза с помощью вестерн-блот анализа. Для подтверждения различий

Для подтверждения различий в уровнях экспрессии белков, которые, как сообщалось, участвуют в выживании раковых клеток (15-20), был использован вестерн-блот анализ, чтобы подтвердить различия в уровнях экспрессии белков между клетками, обработанными этанольным экстрактом *D. scandens*, и клетками, не подвергавшимися обработке. Было обнаружено, что ORP150 значительно повышена (P<0,0001) в *D. scandens*, обработанных этаноловым экстрактом, по сравнению с контролем, что согласуется с результатами 2D-электрофореза. Аналогично, STOML2 был значительно снижен в клетках, обработанных 20 мкг/мл этанольного экстракта *D. scandens* (P<0,05), а Prx4, STOML2, hnRNP K и hnRNP A2/B1 были значительно снижены в клетках, обработанных 30 мкг/мл (P<0,05), по сравнению с контролем (рис. 5A и B).

Обсуждение

Рак является одной из основных проблем здравоохранения, поэтому необходимы разработки новых методов лечения рака. Сообщалось, что некоторые растительные экстракты могут использоваться в качестве противораковых препаратов, усиливая иммунную систему, вызывая дифференциацию клеток, ингибируя активность теломеразы и вызывая апоптоз *in vitro* и *in vivo* (21). В Таиланде некоторые травы широко используются в течение длительного времени. Однако молекулярные механизмы действия тайских трав (например, *Bridelia ovata* Decne или *Dioscorea membranacea* Pierre) при лечении рака до сих пор не изучены. В настоящем исследовании было определено влияние этанольного экстракта стеблей *D. scandens* на клеточную линию HCC-S102.

Согласно критериям цитотоксической активности сырых экстрактов Американского национального института рака (NCI), концентрация растительного экстракта ≤30 мкг/мл при времени инкубации от 48 до 72 ч считается "активной" при расчете значения IC_{50}(22). Этанольный экстракт *D. scandens* был исследован на цитотоксическую активность в клетках HCC-S102. Значение IC_{50}после обработки в течение 72 ч составило 22,6±1,5 мкг/мл, что представляет потенциальный интерес с точки зрения критериев NCI. В одном из предыдущих исследований было показано, что этанольный сырой экстракт *D. scandens* проявлял мощную цитотоксическую активность против клеточной линии аденокарциномы легких (CORL-23) с показателем IC_{50}21,04±0,57 мкг/мл после обработки в течение 72 ч (23). Кроме того, цитотоксическая активность этанольного экстракта *D. scandens* была исследована на других клеточных линиях рака легких (а именно, A549 и NCI-H226) по сравнению с нормальными клетками легких, и результаты показали, что этанольный экстракт *D. scandens* проявляет повышенную цитотоксическую активность в клеточных линиях рака легких по сравнению с нормальными клетками легких (IC_{50}, 65,04 мкг/мл) (24).

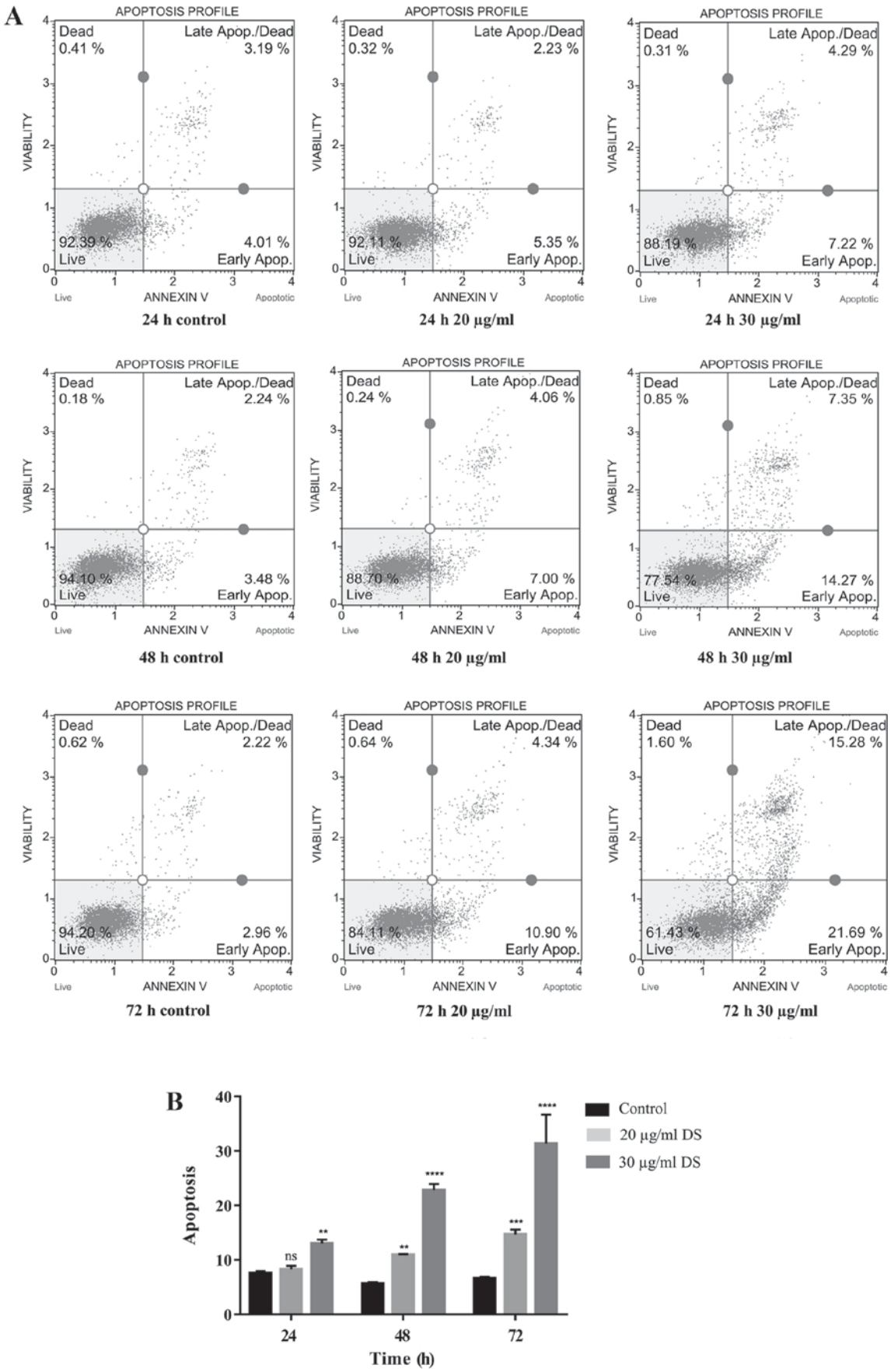

Рисунок 2. Влияние этанольного экстракта *D. scandens* на апоптоз клеточной линии HCC-S102. (A) Проточная цитометрия с анализом Muse показала, что доля апоптотических клеток увеличивалась в клеточной линии HCC-S102 при увеличении дозы и продолжительности лечения этанольным экстрактом *D. scandens*.

(B) Процент общего количества апоптотических клеток после обработки 20 и 30 мкг/мл этанольного экстракта *D. scandens* в течение 24, 48 и 72 ч по сравнению с контролем. Результаты выражены как среднее ± стандартное отклонение. **P<0,01 и ***P<0,001 по сравнению с контролем. NS - несущественный; DS - этаноловый экстракт *Derris scandens*.

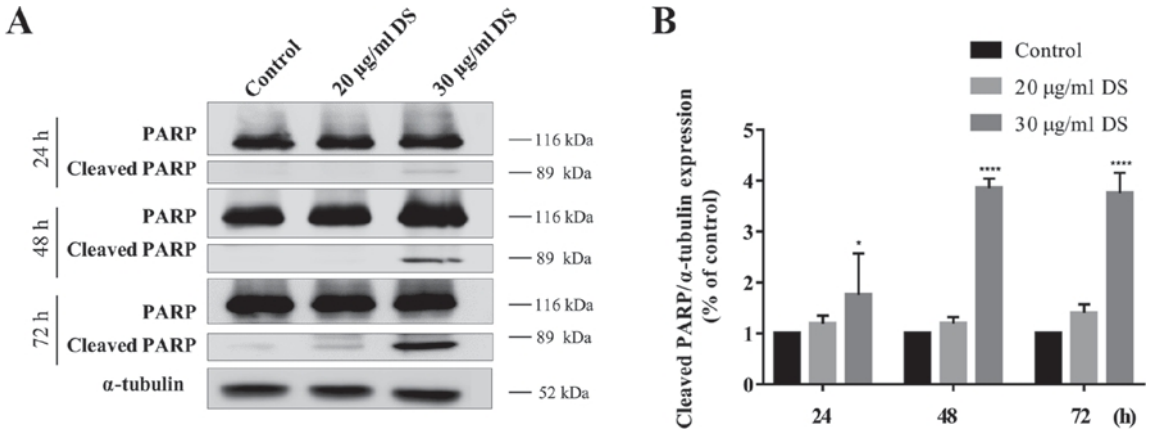

Рисунок 3. Влияние этанольного экстракта *D. scandens* на уровень экспрессии расщепленного PARP в клеточной линии HCC-S102. (A) Результаты Вестерн-блот анализа показали повышение экспрессии расщепленного PARP (89 кДа) после обработки этанольным экстрактом *D. scandens* в течение 24, 48 и 72 ч. (B) Изменение уровня экспрессии расщепленного PARP по сравнению с контролем при различных дозах обработки (20 и 30 мкг/мл) и времени (24, 48 и 72 ч). α-тубулин (52 кДа) использовался в качестве контроля нагрузки. Результаты выражены как среднее ± стандартное отклонение. $^{*}P<0,05$ и $^{***}P<0,001$ по сравнению с контролем. DS - этаноловый экстракт *Derris scandens*; PARP - поли(АДФ-рибоза) полимераза.

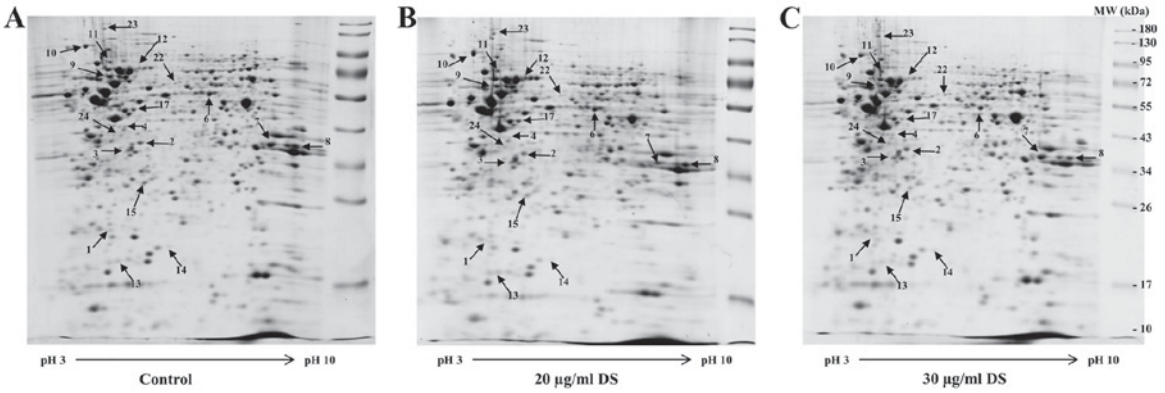

Рисунок 4. Карта 2D-электрофореза белков из клеточной линии HCC-S102, обработанной этанольным экстрактом *D. scandens*. 2D-электрофорез проводили на нелинейной иммобилизованной градиентной ленте pH 3-10 (7 см) с последующим SDS-PAGE (12,5% гель). Белки были выделены после воздействия на клетки (A) контрольного и (B) 20 и (C) 30 мкг/мл этанольного экстракта *D. scandens* в течение 72 ч. Гели окрашивали Coomassie blue R-250. 2D - двумерный; DS - этанольный экстракт *Derris scandens*; MW - молекулярная масса.

Было обнаружено, что этанольный экстракт *D. scandens* оказывает антипролиферативное действие на клеточные линии рака толстой кишки, вызывая гибель клеток путем некроза в клеточной линии рака толстой кишки SW480 (7). Гематулин *и другие* (5) сообщили, что клетки рака толстой кишки (HT-29), обработанные этаноловым экстрактом *D. scandens*, демонстрировали повышенную индукцию апоптоза по сравнению с клетками, обработанными комбинацией радиации и эта- нолового экстракта *D. scandens*. Однако гибель клеток под действием этанольного экстракта *D. scandens* в сочетании с радиацией была выше, чем при использовании только этанольного экстракта *D. scandens*, что позволяет предположить, что в клеточных линиях рака толстой кишки задействованы другие способы гибели клеток.

Для определения цитотоксичности этанольного экстракта *D. scandens* в отношении клеточной линии HCC-S102 был изучен механизм клеточной смерти - апоптоз - с помощью анализа Annexin V и мертвых клеток, который выявляет транслокацию фосфатидилсерина с внутренней на внешнюю клеточную мембрану, что происходит во время апоптоза. С помощью двойного окрашивания аннексина V-флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) и 7-аминоактиномицина D (7-AAD) клетки классифицировались как живые клетки или клетки на ранней или поздней стадии апоптоза. Клетки HCC-S102, обработанные *D. scandens* Этанольный экстракт окрашивали аннексином V-FITC и 7-AAD, а затем количественно оценивали с помощью проточного цитометрического анализа. Результаты показали, что апоптоз клеток при обработке этанольным экстрактом *D. scandens* был дозо- и времязависимым. При более высоких дозах обработанные клетки погибали по пути апоптоза после инкубации с экстрактом *D. scandens* в течение 48 и 72 ч.

PARP - это ядерный ДНК-связывающий белок, который обычно расщепляется каспазой-3 во время апоптоза, поэтому обнаружение расщепления PARP используется в качестве индикатора апоптоза (25). Результаты настоящего исследования показали, что интенсивность расщепленного белка PARP в клетках, обработанных различными дозами и временем, значительно увеличилась по сравнению с контролем. Это согласуется с результатами проточной цитометрии и подтверждает, что обработка этанольным экстрактом *D. scandens* индуцировала апоптоз в клетках HCC-S102.

Протеомный анализ был использован для исследования дифференциально экспрессированных белков между клетками HCC-S102, обработанными
D. scandens в течение 72 ч и необработанные контрольные клетки. В общей сложности 18 значительно отличающихся белковых пятен были проанализированы с помощью Image Master и идентифицированы с помощью ЖХ-МС/МС. Клетки, обработанные экстрактом *D. scandens*, обладали 6 белками

Таблица I. Дифференциально экспрессированные белки в клетках HCC-S102, обработанных этанольным экстрактом *D. scandens*, выявленные методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

Нет.	Название записи в SwissProt	Название белка	Молекулярная масса, кДа кДа/изоэлектрическая точка	Показатель белка	Подобранные пептиды	Покрытие последовательностей, %	Изменение объема белка в разах	
							Контроль и 20 мкг/мл *D. scandens* этаноловый экстракт	Контроль и 30 мкг/мл *D. scandens* этаноловый экстракт
Нерегулируемые белки								
10	ENPL_HUMAN	Эндоплазмин	92.4/4.8	609	13	15	(+) 1.68	(+) 1.17
11	DC1I2_HUMAN	Цитоплазматический динеин 1 промежуточная цепь 2	71.4/5.1	226	3	7	(+) 1.90	(+) 1.37
12	HSP7C_HUMAN	Белок 71 кДа, познающий тепловой шок	73.6/5.9	60	1	2	(+) 2.03	(+) 1.76
14	K1C9_HUMAN	Цитоскелетный кератин 9 типа I	62.0/5.1	90	1	3	(+) 0.77	(+) 1.54
22	UAP1L_HUMAN	UDP-N-ацетилгексозамин пирофосфорилаза-подобный белок 1	56.9/5.9	61	1	3	(+) 1.23	(+) 1.63
23	HYOU1_HUMAN	Гипоксия-регулируемый белок 1	111.3/5.2	435	7	9	(+) 1.34	(+) 1.81
Нерегулируемые белки								
1	CBX3_HUMAN	Гомолог хромобоксного белка 3	20.8/5.2	292	4	22	(-) 1.42	(-) 1.46
2	RLA0_HUMAN	60S кислый рибосомальный белок P0	34.3/5.7	66	2	9	(-) 1.53	(-) 1.20
3	CAZA1_HUMAN	Субъединица α-1 филаментозного актин-укупорочного белка	32.9/5.5	186	3	15	(-) 1.62	(-) 1.05
4	GLRX3_HUMAN	Глутаредоксин-3	37.4/5.3	119	2	8	(-) 1.50	(-) 1.07
6	AL1A1_HUMAN	Ретинальная дегидрогеназа 1	54.8/6.3	654	11	29	(-) 1.56	(-) 1.55
7	AK1C1_HUMAN	Член C1 семейства альдо-кето-редуктаз 1	36.8/8.0	133	3	9	(-) 1.80	(-) 1.15
7	ROA2_HUMAN	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2/B1	37.4/8.9	131	2	8	(-) 1.80	(-) 1.15
8	G3P_HUMAN	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	36.0/8.6	146	3	13	(-) 1.09	(-) 1.56
9	HNRPK_HUMAN	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин K	50.9/5.4	311	6	19	(-) 1.76	(-) 1.57
13	NCALD_HUMAN	Нейрокальцин-δ	22.2/5.2	58	1	6	(-) 1.05	(-) 1.98
15	PRDX4_HUMAN	Пероксиредоксин-4	30.5/5.8	104	2	12	(-) 1.28	(-) 1.93
17	QCR1_HUMAN	Субъединица 1 комплекса цитохрома bc_1	52.6/5.9	160	4	10	(-) 1.03	(-) 1.57
24	STML2_HUMAN	Стоматин-подобный белок 2	38.5/6.8	143	3	13	(-) 1.12	(-) 1.83

(+) и (-) означают увеличение или уменьшение, соответственно, изменения складчатости белка по сравнению с контролем. Номера пятен соответствуют рис. 4.

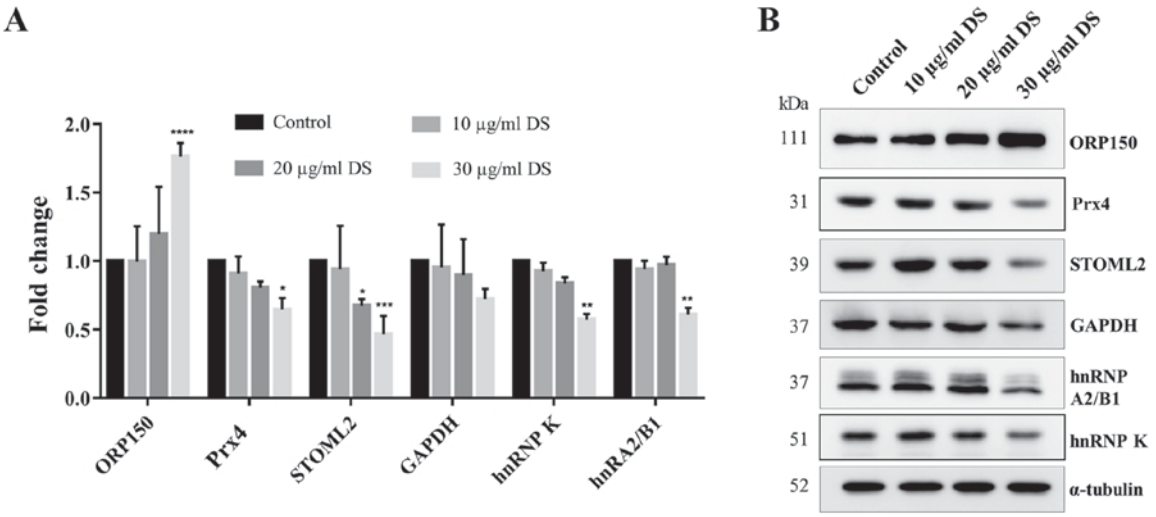

Рисунок 5. Проверка экспрессии репрезентативных белков с помощью двумерного электрофореза на клеточной линии HCC-S102, обработанной этанольным экстрактом *D. scandens*. Клетки обрабатывали различными концентрациями этанольного экстракта *D. scandens* (10, 20 и 30 мкг/мл) в течение 72 ч и подвергали SDS-PAGE (12,5% гель) с последующим вестерн-блот анализом. (A) Изменение фолда и (B) результаты вестерн-блот анализа для ORP150, Prx4, GAPDH, STOML2, hnRNP A2/B1 и hnRNP K. α-тубулин был использован в качестве контроля нагрузки. Результаты выражены как среднее ± стандартное отклонение. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 и ****P<0,0001 по сравнению с контролем. DS - этанольный экстракт *Derris scandens*; ORP150 - кислородно-регулируемый белок 150; Prx4 - пероксиредоксин-4; STOML2 - стоматиноподобный белок 2; hnRNP - гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин.

с более высокой экспрессией и 13 белков с более низкой экспрессией по сравнению с необработанным контролем. Большинство белков, участвующих в стрессовом ответе, включая Hsp90B1, Hsc70 и ORP150, были повышены. К числу пониженных белков, участвующих в клеточном метаболизме, относятся RALDH1, AKR1C, GAPDH, UQCRC1 и STOML2. Кроме того, были снижены уровни TXNL2 и Prx4, выполняющих функции антиоксидантов. Белки, участвующие в регуляции транскрипции, включая CBX3 и hnRNP K, были снижены, как и белки, участвующие в передаче сигналов, включая hnRNP A2/B1. Среди этих белков ORP150, Prx4, GAPDH, STOML2, hnRNP A2/B1
и гнРНП K были выбраны для подтверждения различий в экспрессии этих белков между обработанными и необработанными клетками с помощью вестерн-блот анализа. В соответствии с результатами протеомного анализа, вестерн-блот анализ показал, что ORP150 был повышен, в то время как Prx4, GAPDH, STOML2, hnRNP A2/B1 и hnRNP K белки были понижены.

Prx4 входит в группу тиол-специфических антиоксидантных белков и обычно экспрессируется в эндоплазматическом ретикулуме (ER) клеток (15). Его общая функция - служить антиоксидантом, снижая продукцию реактивных форм кислорода (ROS). Кроме того, предыдущее исследование показало, что Prx4 дополнительно участвует в окислительном сворачивании белков в качестве молекулярного шаперона, чтобы облегчить сворачивание белков в ЭР (26). Высокая экспрессия Prx4 отмечена в различных типах опухолей, включая рак легких, колоректальный рак и глиому высокой степени (первичная злокачественная опухоль головного мозга) (15,27,28). Например, Prx4 высоко экспрессируется и ассоциируется с развитием рака легких у человека, и было предложено использовать его в качестве прогностического маркера прогрессирования рака в плоскоклеточной карциноме легких на ранних стадиях (15). Кроме того, в одном из предыдущих исследований с помощью иммуногистохимии и количественной полимеразной цепной реакции было показано, что экспрессия гена и белка Prx4 была выше в тканях колоректального рака по сравнению с нормальными тканями (27). Примечательно, что ранее Kim *et al.* (28) выявили Пиперлонгумин, натуральный растительный продукт, подавлял экспрессию Prx4 и впоследствии увеличивал уровень ROS и ER-стресса в клетках глиомы. Избыток неправильных или развернутых белков в ЭР может вызывать реакцию стресса ЭР, которая может быть обнаружена по экспрессии ORP150.

ORP150 - заметный молекулярный шаперон в ЭР, принадлежащий к семейству белков теплового шока 70 (29). Система ORP150 является частью механизма ЭР, связанного со сворачиванием и сборкой секреторных и мембранных белков в ЭР (16). Экспрессия ORP150 индуцируется многочисленными стрессовыми условиями, включая накопление нескладывающихся белков и истощение запасов глюкозы или кислорода (16). В условиях стресса ORP150 может накапливаться в ЭР, выполняя цитопротекторную функцию для клеток. О повышении уровня ORP150 сообщалось при многих видах рака, включая рак молочной железы (28), рак мочевого пузыря (30) и назофа- рингеальную карциному (31). Снижение уровня Prx4 одновременно с повышением уровня ORP150 указывает на увеличение ER-стресса и уровня ROS в клеточной линии HCC-S102. Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное накопление развернутых белков и постоянный ER-стресс в раковых клетках могут инициировать проапоптотическую сигнализацию (32). Таким образом, можно предположить, что эти последствия будут иметь место в клетках HCC-S102 при обработке их этанольным экстрактом *D. scandens*.

GAPDH и STOML2 участвуют в клеточном метаболизме. GAPDH является ключевым регуляторным ферментом гликолиза и выполняет важнейшую функцию в ряде биологических процессов, включая контроль экспрессии генов, репликацию и репарацию ДНК и апоптоз (33). Имеются данные о том, что экспрессия GAPDH повышена при различных типах рака человека, включая рак яичников, легких и толстой кишки (17,34,35). Кроме того, предыдущие исследования показали, что нокдаун GAPDH с помощью малой интерферирующей РНК (siRNA) приводит к значительному снижению пролиферативной, миграционной и инвазивной способности клеток сквамозной карциномы легкого *in vitro* (36). STOML2 - это белок внутренней мембраны митохондрий, однако,

его функции остаются неизвестными (37). Было установлено, что STOML2 выполняет важную функцию поддержания мембранного потенциала митохондрий и производства АТФ, а также влияет на активность клеток, включая их подвижность и рост в опухолевых клетках (18). Кроме того, сообщалось, что снижение уровня STOML2 повышает чувствительность раковых клеток к химиотерапевтическому лечению, вызывая апоптоз раковых клеток и остановку клеточного цикла (18). Результаты настоящего исследования выявили снижение уровня GAPDH и STOML2, что может быть одним из механизмов цитотоксичности этанольного экстракта *D. scandens* в клетках HCC-S102.

Семейство гнРНК считается важным фактором процессинга и биогенеза мРНК (38). В настоящем исследовании выявлено снижение уровня экспрессии гнРНК K и гнРНК A2/B1 в клеточной линии HCC-S102, обработанной
Этанольный экстракт *D. scandens*. ГнРНК K является членом семейства гнРНК. Он осуществляет специфическое связывание с промотором c-myc и функционирует как транскрипционный фактор (39). Сообщалось о связи гнРНП K с развитием опухолей при различных видах рака. Предыдущее исследование показало, что hnRNP K может быть вовлечен в гепатоканцерогенез, усиливая репликацию и пролиферацию клеток гепатита B и гепатита C (19). При раке легких снижение уровня hnRNP K с помощью siRNA привело к ингибированию роста клеток и увеличению апоптоза в клеточной линии рака легких (A549) (40). Кроме того, есть данные о том, что hnRNP K подавляет апоптоз в ГЦК и карциноме носоглотки (41, 42).

hnRNP A2/B1 - еще один член семейства hnRNP, который был понижен в настоящем исследовании. hnRNP A2/B1 выполняет ряд клеточных функций, включая регуляцию экспрессии генов на транскрипционном и трансляционном уровне. hnRNP A2/B1, как сообщается, сверхэкспрессируется при опухолевом генезе и может быть потенциальным биомаркером для ранней диагностики, особенно при раке легкого (43). Для оценки риска развития рака печени человека повышенная экспрессия и цитоплазматическая локализация hnRNP A2/B1 могут использоваться в качестве диагностического биомаркера (20). Кроме того, было показано, что ингибирование экспрессии hnRNP A2/B1 повышает чувствительность раковых клеток к химиотерапии, стимулирует апоптоз и дополнительно модулирует развитие рака поджелудочной железы (44). Уровни экспрессии hnRNP K и hnRNP A2/B1 были снижены при лечении этанольным экстрактом *D. scandens* в настоящем исследовании. Таким образом, это может быть одним из механизмов, участвующих в цитотоксической активности против клеток HCC-S102.

В заключение следует отметить, что настоящее исследование показало, что воздействие этанольного экстракта *D. scandens* на клеточную линию HCC-S102 происходит через апоптотический путь. Протеомное профилирование клеток, обработанных этанольным экстрактом *D. scandens*, выявило множество белков-мишеней противораковой активности, включая hnRNP K, hnRNP A2/B1, STOML2 и GAPDH. Можно предположить, что снижение выживаемости клеток HCC-S102 за счет изменений в этих белках может усиливать летальный эффект *вызванного D. scandens* снижения уровня Prx4 и избыточного стресса ER, о чем свидетельствует повышение уровня ORP150. Таким образом, полученные результаты указывают на связь механизма апоптоза с клеточной цитотоксичностью при обработке этаноловым экстрактом *D. scandens*. Однако дальнейшие исследования функции каждого белка являются необходимо для выяснения способа действия этанольного экстракта *D. scan- dens.*

Благодарности

Настоящее исследование было проведено при поддержке Аспирантского института Чулабхорна (грант № 10/2556) и Научно-исследовательского института Чулабхорна (грант № BC2008-02).

Ссылки

1. Somboon K, Siramolpiwat S и Vilaichone RK: Эпидемиология и выживаемость гепатоцеллюлярной карциномы в центральном регионе Таиланда. Asian Pac J Cancer Prev 15: 3567-3570, 2014.
2. Миттал С и Эль-Сераг ХБ: Эпидемиология ГЦК: Рассмотрим популяцию. J Clin Gastroenterol 47: S2-S6, 2013.
3. Сафарзаде Е, Шоторбани СС и Барадаран Б: Травяные лекарства как индукторы апоптоза при лечении рака. Adv Pharm Bull 4 (Suppl 1): S421-S427, 2014.
4. Hussain H, Al-Harrasi A, Krohn K, Kouam SF, Abbas G, Shah A, Raees MA, Ullah R, Aziz S и Schulz B: Phytochemical investigation and antimicrobial activity of Derris scandens. J King Saud Univ Sci 27: 375-378, 2015.
5. Hematulin A, Ingkaninan K, Limpeanchob N и Sagan D: Ethanolic extract from Derris scandens Benth mediates radio- sensitzation through two distinct modes of cell death in human colon cancer HT-29 cells. Asian Pac J Cancer Prev 15: 1871-1877, 2014.
6. Laupattarakasem P, Sripa B и Laupattarakasem W: Антимиграция раковых клеток с помощью Derris scandens на клетках холангиокарциномы. Srinagarind Med J 22: 339-345, 2010.
7. Kaewkon K, Khamprasert N и Limpeanchob N: Экстракт бентоса Derris scandens вызывает некроз, а не апоптоз клеток рака толстой кишки SW480. Thai J Pharmacol 33: 118-121, 2011.
8. Li Y, Geng X и Zhang W: Применение протеомики для изучения гепатоцеллюлярной карциномы и некоторых сопутствующих заболеваний. Chin Jof Clin Oncol 2: 903-906, 2005.
9. Lee SY, Kim GT, Roh SH, Song JS, Kim HJ, Hong SS, Kwon SW и Park JH: Протеомный анализ противоракового эффекта 20 S-гинсенозида Rg3 в клеточных линиях рака толстой кишки человека. Biosci Biotechnol Biochem 73: 811-816, 2009.
10. Srisomsap C, Sawangareetrakul P, Subhasitanont P, Chokchaichamnankit D, Chiablaem K, Bhudhisawasdi V, Wongkham S and Svasti J: Proteomic studies of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma cell secretomes. J Biomed Biotechnol 2010: 437143, 2010.
11. Лаохатхай К и Бхамараправати Н: Культивирование гепатоцеллюлярной карциномы человека. Простой и воспроизводимый метод. Am J Pathol 118: 203-208, 1985.
12. Chiablaem K, Lirdprapamongkol K, Keeratichamroen S, Surarit R и Svasti J: Curcumin suppresses vasculogenic mimicry capacity of hepatocellular carcinoma cells through STAT3 and PI3K/AKT inhibition. Anticancer Res 34: 1857-1864, 2014.
13. Брэдфорд ММ: Быстрый и чувствительный метод количественного определения микрограммовых количеств белка, использующий принцип связывания белка с красителем. Anal Biochem 72: 248-254, 1976.
14. K hongmanee A, Lirdprapamongkol K, Tit- oon P, Chokchaichamnankit D, Svasti J and Srisomsap C: Протеомный анализ выявляет важную роль 14-3-3σ в устойчивости клеток холангиокарциномы к анойкису. Протеомика 13: 3157-3166, 2013.
15. Hwang JA, Song JS, Yu DY, Kim HR, Park HJ, Park YS, Kim WS and Choi CM: Peroxiredoxin 4 as an independent prognostic marker for survival in patients with early-stage lung squamous cell carcinoma. Int J Clin Exp Pathol 8: 6627-6635, 2015.
16. Krętowski R, Stypułkowska A и Cechowska-Pasko M: Низкоглюкозная среда индуцирует экспрессию ORP150 и оказывает ингибирующее действие на апоптоз и старение клеток MCF7 молочной железы человека. Acta Biochim Pol 60: 167-173, 2013.
17. Tang Z, Yuan S, Hu Y, Zhang H, Wu W, Zeng Z, Yang J, Yun J, Xu R и Huang P: сверхэкспрессия GAPDH в колоректальной карциноме человека как предпочтительная мишень для 3-бромпирувата пропилового эфира. J Bioenerg Biomembr 44: 117-125, 2012.
18. Wang Y, Cao W, Yu Z и Liu Z: Даунрегуляция ассоциированного с митохондриями белка SLP-2 подавляет подвижность и пролиферацию опухолевых клеток и повышает их чувствительность к химиотерапевтическим реагентам. Cancer Biol Ther 8: 1651-1658, 2009.

19. Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, Schneider R, Hwang SB, Lee AS и Lai MM: Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. J Biol Chem 273: 17651-17659, 1998.
20. Cui H, Wu F, Sun Y, Fan G и Wang Q: Up-регуляция и субклеточная локализация hnRNP A2/B1 в развитии гепатоцеллюлярной карциномы. BMC cancer 10: 356, 2010.
21. Tavakoli J, Miar S, Zadehzare MM и Akbari H: Оценка эффективности растительных препаратов в лечении рака: A review study. Iran J Cancer Prev 5: 144-156, 2012.
22. Malek SN, Phang CW, Ibrahim H, Norhanom AW и Sim KS: Phytochemical and cytotoxic investigations of Alpinia mutica rhizomes. Молекулы 16: 583-589, 2011.
23. Saetung A, Itharat A, Dechsukum C, Wattanapiromsakul C, Keawpradub N and Ratanasuwan P: Цитотоксическая активность тайских лекарственных растений для лечения рака. Songklanakarin J Sci Technol 27 (Suppl 2): S469-S478, 2005.
24. Prommee N, Prajuabjinda O и Itharat A: In vitro цитотоксическая, антиоксидантная и антимикробная активность Derris Scandens. In: Материалы Первой конференции сети аспирантов Таиланда, Патумтхани, Бангкок, 2012.
25. Li Y, Kong D, Bao B, Ahmad A и Sarkar FH: Индукция гибели раковых клеток изофлавоном: Роль многочисленных сигнальных путей. Nutrients 3: 877-896, 2011.
26. Zito E, Melo EP, Yang Y, Wahlander Å, Neubert TA и Ron D: Окислительное сворачивание белков с помощью пероксиредоксина, локализованного в эндоплазматическом ретикулуме. Mol Cell 40: 787-797, 2010.
27. Yi N, Xiao MB, Ni WK, Jiang F, Lu CH и Ni RZ: Высокая экспрессия пероксиредоксина 4 влияет на время выживания пациентов с колоректальным раком, но не является независимым неблагоприятным прогностическим фактором. Mol Clin Oncol 2: 767-772, 2014.
28. Kim TH, Song J, Kim SH, Parikh AK, Mo X, Palanichamy K, Kaur B, Yu J, Yoon SO, Nakano I и Kwon CH: Лечение пиперлонгумином инактивирует пероксиредоксин 4, усиливает стресс эндоплазматического ретикулума и преимущественно убивает клетки глиомы высокой степени зрелости. Neuro Oncol 16: 1354-1364, 2014.
29. Стояджинович А, Хук JA, Шрайвер CD, Ниссан А, Коватич AJ, Као TC, Понниа S, Peoples GE и Moroni M: HYOU1/Orp150 выражение в раке молочной железы. Med Sci Monit 13: BR231-BR239, 2007.
30. Asahi H, Koshida K, Hori O, Ogawa S and Namiki M: Immunohistochemical detection of the 150-kDa oxygen-regu- lated protein in bladder cancer. BJU Int 90: 462-466, 2002.
31. Zhou Y, Liao Q, Li X, Wang H, Wei F, Chen J, Yang J, Zeng Z, Guo X, Chen P, *et al*: HYOU1, регулируемый LPLUNC1, повышается в карциноме носоглотки и связан с плохим прогнозом. J Cancer 7: 367-376, 2016.
32. Schönthal AH: Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer. Biochem Pharmacol 85: 653-666, 2013.
33. Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, Zhang GJ и Cui YK: Критический белок GAPDH и механизмы его регуляции в раковых клетках. Cancer Biol Med 12: 10-22, 2015.
34. Hjerpe E, Egyhazi Brage S, Carlson J, Frostvik Stolt M, Schedvins K, Johansson H, Shoshan M and Avall-Lundqvist E: Met abolic ma rkers GA PDH, PK M 2 , AT P 5 B a and BEC-index in advanced serous ovarian cancer. BMC Clin Pathol 13: 30, 2013.
35. Puzone R, Savarino G, Salvi S, Dal Bello MG, Barletta G, Genova C, Rijavec E, Sini C, Esposito AI, Ratto GB, *et al*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene over expres- sion correlates with poor prognosis in non small cell lung cancer patients. Mol Cancer 12: 97, 2013.
36. Hao L, Zhou X, Liu S, Sun M, Song Y, Du S, Sun B, Guo C, Gong L, Hu J, *et al*: Elevated GAPDH expression is associated with the proliferation and invasion of lung and esophageal squa- mous cell carcinomas. Proteomics 15: 3087-3100, 2015.
37. Xiao B, Xie Z, Guo L, Wu J и Zhang H: Экспрессия стоматиноподобного белка 2 связана с клинической выживаемостью у пациентов с раком шейки матки. Int J Clin Exp Pathol 8: 1804-1809, 2015.
38. Geuens T, Bouhy D и Timmerman V: The hnRNP family: Insights into their role in health and disease. Hum Genet 135: 851-867, 2016.
39. Lu J и Gao FH: Роль и молекулярный механизм гетероге- незного ядерного рибонуклеопротеина K в развитии и прогрессии опухолей. Biomed Rep 4: 657-663, 2016.
40. Tang F, Li W, Chen Y, Wang D, Han J и Liu D: Снижение регуляции hnRNP K с помощью РНКи подавляет рост клеток карциномы легких человека. Oncol Lett 7: 1073-1077, 2014.
41. Xiao Z, Ko HL, Goh EH, Wang B и Ren EC: hnRNP K подавляет апоптоз независимо от статуса p53 путем поддержания высокого уровня эндогенных ингибиторов каспаз. Carcinogenesis 34: 1458-1467, 2013.
42. Chen LC, Chung I, Hsueh C, Tsang NM, Chi LM, Liang Y, Chen CC, Wang LJ и Chang YS: Антиапоптотический белок, FLIP, регулируется гетерогенным ядерным рибонуклеопротеином K и коррелирует с низкой общей выживаемостью пациентов с карциномой носоглотки. Cell Death Differ 17: 1463-1473, 2010.
43. Qu XH, Liu JL, Zhong XW, Li X и Zhang QG: Insights into the roles of hnRNP A2/B1 and AXL in non-small cell lung cancer. Oncol Lett 10: 1677-1685, 2015.
44. Gu WJ и Liu HL: Индукция апоптоза, инвазии, миграции и повышение чувствительности клеток рака поджелудочной железы к химиотерапии гемцитабином, 5-FU и оксалиплатином с помощью hnRNP A2/B1 siRNA. Anticancer Drugs 24: 566-576, 2013.