

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.24.001
文章编号: 1005-8982 (2019) 24-0001-07

基础研究·论著

JS-K 对人结肠癌细胞 HCT116 增殖及凋亡的影响*

范旋燕, 孙锦辉, 黄帅, 叶石才, 喻才元, 周宇, 全娟花
(广东医科大学附属第一医院 消化内科, 广东 湛江 524001)

摘要: 目的 研究JS-K对人结肠癌细胞HCT116增殖及凋亡的影响。**方法** 不同浓度JS-K处理HCT116细胞48 h后, 采用MTS法检测JS-K对HCT116细胞增殖活性的影响; PI单染流式细胞术检测JS-K对HCT116细胞周期的影响; Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测JS-K对HCT116细胞凋亡的影响; Texas Red-X 鬼笔环肽荧光染色观察细胞骨架形态; 实时荧光定量聚合酶链反应检测Bcl-2家族基因mRNA表达。**结果** JS-K对人结肠癌细胞HCT116增殖有抑制作用, 且呈浓度和时间依赖性 ($P < 0.05$)。JS-K诱导HCT116细胞被阻滞在G2/M期 ($P < 0.05$)。JS-K可致HCT116细胞发生晚期凋亡 ($P < 0.05$)。JS-K可改变HCT116细胞骨架形态、微丝结构与分布。随着JS-K浓度增加, 促凋亡基因Bax、Bik、Bim、Puma mRNA相对表达量上调, 抗凋亡基因Mcl-1 mRNA相对表达量下调 ($P < 0.05$)。**结论** JS-K对人结肠癌细胞HCT116细胞增殖有明显抑制作用, 通过调节Bcl-2家族基因表达, 阻滞细胞G2/M期, 促进细胞发生晚期凋亡。

关键词: 结肠肿瘤; HCT116细胞/细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R574.6

文献标识码: A

Effect of JS-K on proliferation and apoptosis of HCT116 human colon cancer cells*

Xuan-yan Fan, Jin-hui Sun, Shuai Huang, Shi-cai Ye, Cai-yuan Yu, Yu Zhou, Juan-hua Quan
(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University,
Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

Abstract: Objective To study the effects of JS-K on proliferation and apoptosis of HCT116 human colon cancer cells. **Methods** HCT116 cells were treated with different concentrations of JS-K for 48 hours, and cell proliferation was accessed by MTS assay; the effect of JS-K on HCT116 cell cycle was detected by PI single staining flow cytometry; and the effect of JS-K on HCT116 cell apoptosis was detected by annexin V-FITC / PI double staining flow cytometry; cell morphology was observed by staining with Texas Red-X phalloidin; the expression levels of Bcl-2 family genes were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** MTS results showed that JS-K significantly inhibited the proliferation of HCT116 cells in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Flow cytometry analysis of PI-stained cells showed that the G2/M phase arrest was induced by JS-K ($P < 0.05$). In addition, flow cytometry analysis of Annexin V-FITC/PI double stained cells indicated that JS-K induced late apoptosis of HCT116 cells ($P < 0.05$). Furthermore, JS-K treatment altered the cytoskeleton morphology, microfilament structure and distribution. qRT-PCR results showed

收稿日期: 2019-06-27

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81300368)

[通信作者] 全娟花, E-mail: quanjuanhua@gdmu.edu.cn; Tel: 0759-2386010

that with the increase of JS-K concentration, the expression levels of proapoptotic gene Bax, Bik, Bim and Puma mRNA were up-regulated, however, the anti-apoptotic gene Mcl-1 mRNA expression levels was down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** JS-K significantly inhibit the proliferation of HCT116 human colon cancer cells, regulate the expression levels of Bcl-2 family genes, induce G2/M arrest and further promote late apoptosis.

Keywords: colonic neoplasms; hct116 cells; apoptosis

结肠癌的发病率呈逐年升高趋势, 当前治疗手段以手术结合化疗为主, 辅以基因治疗、靶向治疗等, 但随治疗时间延长及耐药细胞的出现, 其疗效并不理想^[1]。JS-K 作为一氧化氮前体药物通过与细胞内谷胱甘肽-S-转移酶结合并释放一氧化氮, 进而调控机体多种生命活动, 包括舒张血管、抗病毒及抗肿瘤等^[2-4]。JS-K 对多种肿瘤细胞增殖有抑制作用, 但对人结肠癌细胞 HCT116 的影响尚未明确。本研究采用不同浓度 JS-K 处理 HCT116 细胞, 观察其对细胞增殖及凋亡的影响, 为临床治疗人结肠癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

JS-K (西格玛奥德里奇上海贸易有限公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (乌拉圭 Lonsera 公司), 100X 抗菌-抗真菌剂、0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司), RPMI 1640 培养基 (美国 Hyclone 公司), 细胞冻存液 CELLBANKER 2 (日本 ZENOAQ 公司), Trizol、Texas Red-X 鬼笔环肽 (美国 Life Technology 公司), 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 引物 (上海生工生物工程股份有限公司), M-MLV cDNA 合成试剂盒、酶标仪及细胞培养箱 (中国赛默飞世尔科技有限公司), CellTiter 96[®] AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (北京普洛麦格生物技术有限公司), 细胞周期检测试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司), Annexin V-FITC/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 凋亡检测试剂盒 (日本 Dojindo 公司), 抗荧光淬灭封片剂封片 (美国 Vector Laboratories 公司), 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), FACS Canto II 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养

将人结肠癌细胞株 HCT116 (北京北纳创联生物科技有限公司) 接种于 10 cm 培养皿, 培养体系为含 10% FBS、1% 抗菌-抗真菌剂 (青霉素、链霉素

II 两性霉素 B) 的 RPMI 1640 培养基, 使用饱和湿度细胞培养箱于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 环境下培养, 待细胞融合度达 70% ~ 80% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化、传代后冻存储备用。

1.3 JS-K 对 HCT116 细胞增殖的影响

将对数生长期的 HCT116 细胞, 按每孔 3 000 个细胞均匀接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁 12 h 后, 加入含有不同浓度 JS-K 的培养基 100 μl, 使培养体系 JS-K 药物浓度分别为 0.0、1.0、2.5、5.0、10.0 及 20.0 μmol/L, 并分别作为 0.0、1.0、2.5、5.0、10.0 及 20.0 μmol/L 组。各组设置 5 个复孔, 分别处理 12、24、48 及 72 h 后检测细胞增殖情况。参照 MTS 说明书, 于不同时间点加入 20 μl 孔 MTS, 在 37℃ 培养箱中孵育 2 h, 酶标仪测定 490 nm 处的吸光度, 计算细胞增殖抑制率。

1.4 细胞周期检测

取对数生长期的 HCT116 细胞接种于 6 孔板中 (3×10^5 个/孔), 培养 12 h 后, 用不同浓度 JS-K 处理细胞 48 h, 用 PI 单染色流式细胞术检测细胞周期收集各组上清液, 贴壁细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 1 500 r/min 离心 10 min, 预冷磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬细胞, 离心沉淀细胞, 弃上清液, 预留 50 μl PBS, 用预冷 75% 乙醇于 4℃ 固定过夜。用预冷 PBS 洗涤、重悬细胞后转移至流式管, 每管加入 20 μl RNase A Solution, 37℃ 水浴 30 min, 每管加入 400 μl PI Staining Solution, 轻轻混匀, 4℃ 避光孵育 30 min, 用流式细胞仪检测。

1.5 细胞凋亡检测

参照 1.4 的方法收集细胞, 加入 500 μl 预先配好的 $1 \times$ Annexin V Binding Buffer 重悬细胞, 使细胞浓度为 1×10^6 个/ml。取 100 μl 细胞悬液到流式管中, 每管加入 5 μl FITC Annexin V 和 PI 溶液, 室温避光孵育 15 min。补加 400 μl $1 \times$ Annexin V Binding Buffer, 用流式细胞仪检测。

1.6 细胞形态观察

将对数生长期的 HCT116 细胞接种于置有灭菌盖

玻片的 12 孔板 (8×10^4 个/孔), 培养 12 h 后, 不同浓度 JS-K 处理细胞 48 h, 弃培养基, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入免疫荧光固定液室温固定 30 min。用 0.1% Triton X-100 透化 10 min, 免疫荧光洗涤液洗 2 次, 滴加 $200 \mu\text{l}$ Texas Red-X 鬼笔环肽 (1 : 100 稀释), 暗盒室温放置 30 min, 染色细胞骨架。用 $10 \mu\text{l}$ DAPI 抗荧光淬灭封片剂封片, 在倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

1.7 凋亡基因 mRNA 表达检测

取对数生长期的 HCT116 细胞接种于 10 cm 培养

皿 (2.5×10^6 个/皿), 培养 12 h, 不同浓度 JS-K 处理细胞 48 h。用 Trizol 试剂提取样本总 RNA, 利用 M-MLV 试剂盒合成 cDNA。设计引物并用 $10 \mu\text{l}$ qRT-PCR 反应体系进行扩增 (见表 1)。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析基因转录水平。

1.8 统计学方法

数据分析采用 Graphpad Prism 7.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步的两两比较用 LSD-*t* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 Bcl-2 家族凋亡基因引物序列

基因	引物序列	长度 /bp	GenBank 序列号
<i>Bad</i>	正向引物: 5' -CGGAGGATGAGTGACGAGTT-3'	123	NM_004322.3
	反向引物: 5' -CCACCAGACTGGAAGACTC-3'		
<i>Bax</i>	正向引物: 5' -AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAG-3'	115	NM_001291428.1
	反向引物: 5' -CCACTCGGAAAAAGACCTCTC-3'		
<i>Bik</i>	正向引物: 5' -GGTCTGGCTTTCATCTACG-3'	111	NM_001197.5
	反向引物: 5' -GGGGATCTCCAGAACCTCAT-3'		
<i>Bim</i>	正向引物: 5' -GAGATATGGATCGCCCAAGA-3'	99	NM_138621.5
	反向引物: 5' -GTCTTCGGCTGCTTGTAAT-3'		
<i>Bid</i>	正向引物: 5' -CTTCCTCCAAAGCTGTCTGA-3'	111	NM_197966.2
	反向引物: 5' -TCAGTCTGCAGCTCATCGTAG-3'		
<i>Bak</i>	正向引物: 5' -ACATCAACCGACGCTATGACT-3'	98	NM_001188.4
	反向引物: 5' -GGTGGCAATCTTGGTGAAGTA-3'		
<i>Puma</i>	正向引物: 5' -GAGATGGAGCCCAATTAGGTG-3'	119	NM_001127240.2
	反向引物: 5' -CTACATGGTGCAGAGAAAGTCC-3'		
<i>Bcl-2</i>	正向引物: 5' -GGATTGTGGCCTTCTTTGACT-3'	113	NM_000633.2
	反向引物: 5' -CCGGTTCAGGTACTCAGTCAT-3'		
<i>Bcl-xL</i>	正向引物: 5' -GTAAACTGGGTGGCATTGT-3'	97	NM_138578.3
	反向引物: 5' -CGATCCGACTCACCAATACC-3'		
<i>Mcl-1</i>	正向引物: 5' -GCCTTTGTGGCTAAACACTTG-3'	108	NM_021960.5
	反向引物: 5' -AACTAGCCAGTCCCGTTTTGT-3'		
<i>GAPDH</i>	正向引物: 5' -GGACTCATGACCACAGTCCAT-3'	109	NM_002046.7
	反向引物: 5' -CAGGGATGATGTTCTGGAGAG-3'		

2 结果

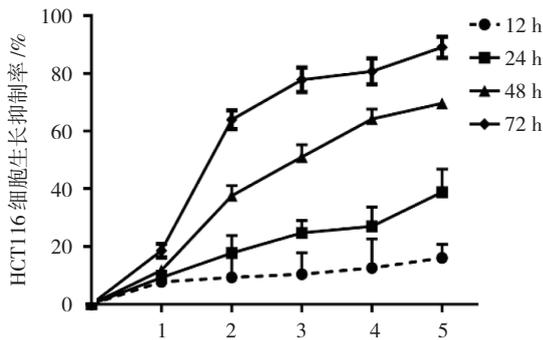
2.1 各组 HCT116 细胞的生长抑制率比较

不同浓度 JS-K 处理 HCT116 细胞 12、24、48 及 72 h 后, 检测细胞生长抑制率, 采用重复测量设计的方差分析, 结果如下: ①不同时间点细胞生长抑制率比较, 差异有统计学意义 ($F = 364.450$, $P = 0.000$); ②各组 HCT116 细胞生长抑制率比较, 差异有统计学

意义 ($F = 138.237$, $P = 0.000$); ③各组细胞生长抑制率的变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F = 29.835$, $P = 0.000$)。在同一时间点, HCT116 细胞的生长抑制率随 JS-K 浓度的增加而升高; 在 JS-K 浓度相同时, HCT116 细胞的生长抑制率随暴露时间的延长而升高, 提示 JS-K 对 HCT116 细胞增殖的抑制作用呈剂量-时间依赖性。见表 2 和图 1。

表 2 各组 HCT116 细胞生长抑制率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	7.19 \pm 2.20	7.86 \pm 3.96	16.49 \pm 6.87	17.17 \pm 7.03
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	10.47 \pm 1.95	15.21 \pm 6.05	33.71 \pm 7.31	57.53 \pm 4.48
5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	12.03 \pm 2.54	19.97 \pm 4.73	49.53 \pm 7.26	68.16 \pm 5.92
10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	13.78 \pm 2.59	23.09 \pm 5.61	58.93 \pm 5.43	76.04 \pm 3.74
20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	14.96 \pm 2.15	32.43 \pm 6.47	63.26 \pm 3.69	85.03 \pm 6.08



1: 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; 2: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5: 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6: 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组。

图 1 各组 HCT116 细胞生长抑制率的变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 不同浓度 JS-K 对 HCT116 细胞周期的影响

各组 G0/G1 期细胞比例比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 1.0、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 G0/G1 期细胞比例较 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组

下降。各组 G2/M 期细胞比例比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 1.0、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 G2/M 期细胞比例较 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组上升,提示 JS-K 可阻滞 HCT116 细胞 G2/M 期。见表 3 和图 2。

表 3 各组 G0/G1 期、G2/M 期 HCT116 细胞比例比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0/G1 期	G2/M 期
0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	74.66 \pm 5.99	4.89 \pm 1.16
1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	71.53 \pm 5.67	8.52 \pm 1.50
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	62.87 \pm 2.76	12.91 \pm 2.06
5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	51.13 \pm 4.85	26.47 \pm 2.35
10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	4.38 \pm 1.36	74.78 \pm 9.33
20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.51 \pm 0.60	84.05 \pm 7.38
F 值	194.386	143.089
P 值	0.000	0.000

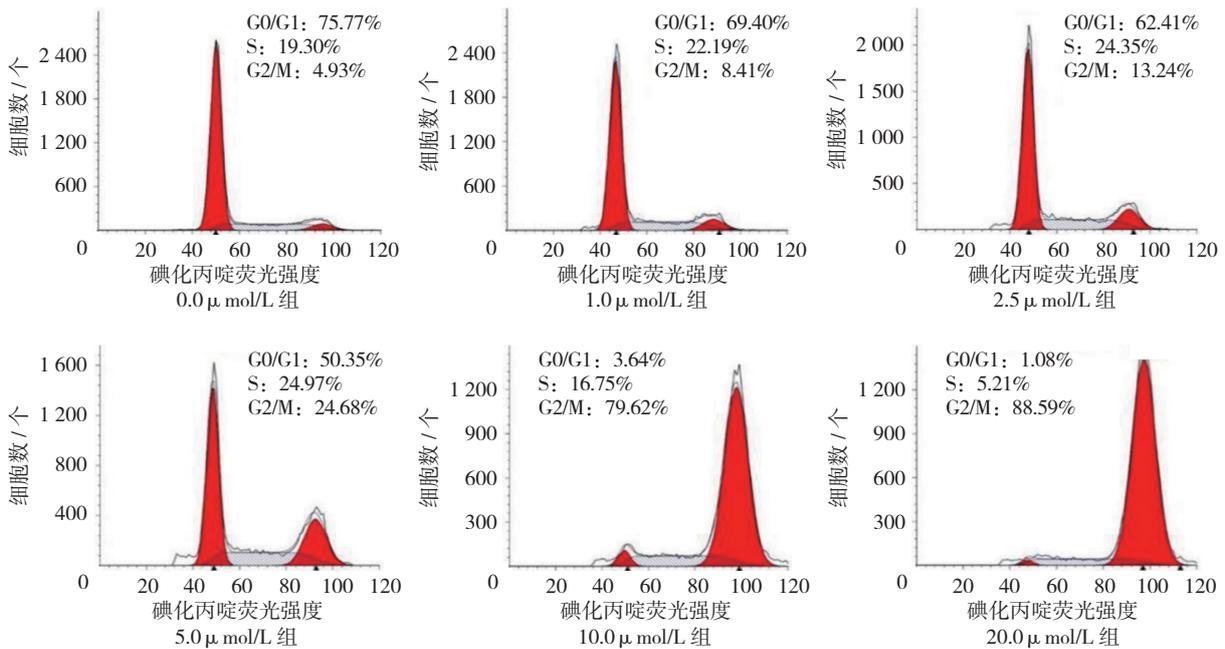


图 2 JS-K 处理 HCT116 细胞 48 h 后周期分布

2.3 各组细胞晚期凋亡率比较

0.0、1.0、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞晚期凋亡率分别为 $(5.4 \pm 0.8)\%$ 、 $(28.8 \pm 3.0)\%$ 、 $(31.1 \pm 2.3)\%$ 、 $(35.2 \pm 6.1)\%$ 、 $(36.9 \pm 4.5)\%$ 和 $(71.6 \pm 6.9)\%$ ，经单因素方差分析，差异有统计学

意义 ($F = 71.069$, $P = 0.000$)。进一步两两比较，1.0、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞晚期凋亡率逐渐递增，且均高于 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P < 0.05$)，提示 JS-K 呈浓度依赖性促进 HCT116 细胞的晚期凋亡。见图 3。

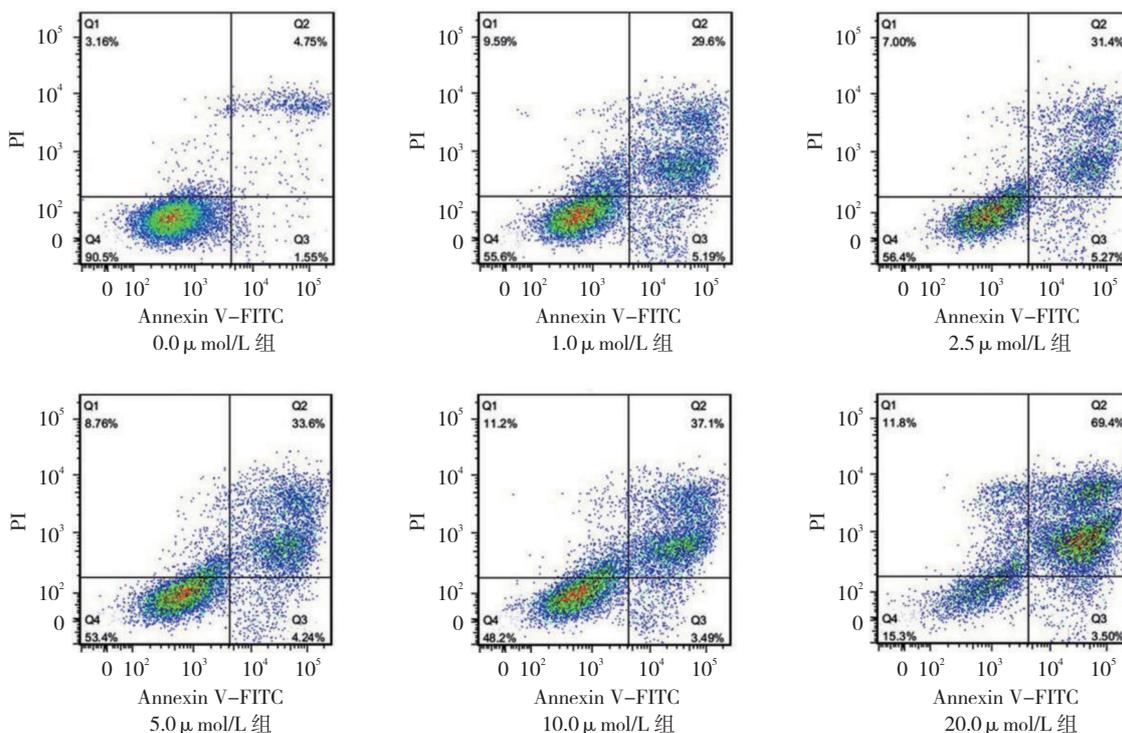
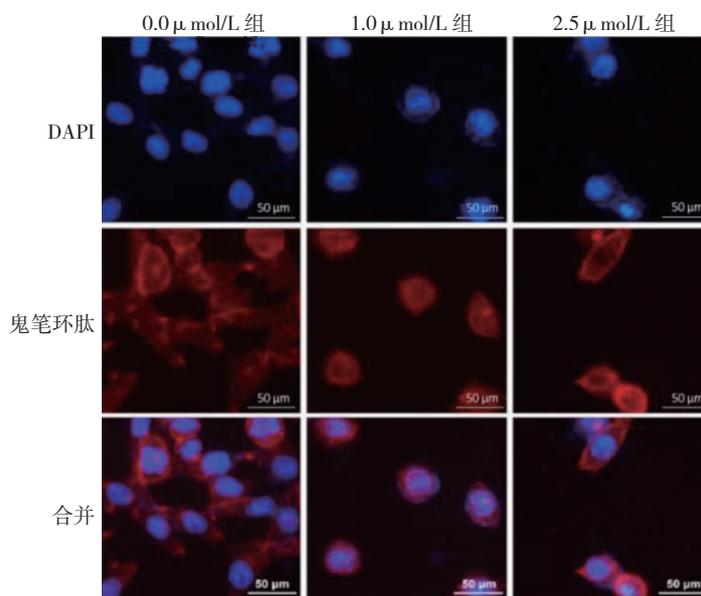


图 3 细胞凋亡流式细胞图

2.4 不同浓度 JS-K 对 HCT116 细胞核及细胞骨架微丝结构的影响

0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞微丝结构分布相对均匀，相互连成网状，周围边界清晰，有少量微丝触角。JS-K 处

理后，DAPI 染色呈核浓缩，核碎裂成大小不等的圆形小体；细胞骨架微丝网状结构不清晰，局部呈现溶解或者断裂现象。以上结果提示，JS-K 可诱导 HCT116 细胞核碎裂及改变骨架微丝结构的分布。见图 4。



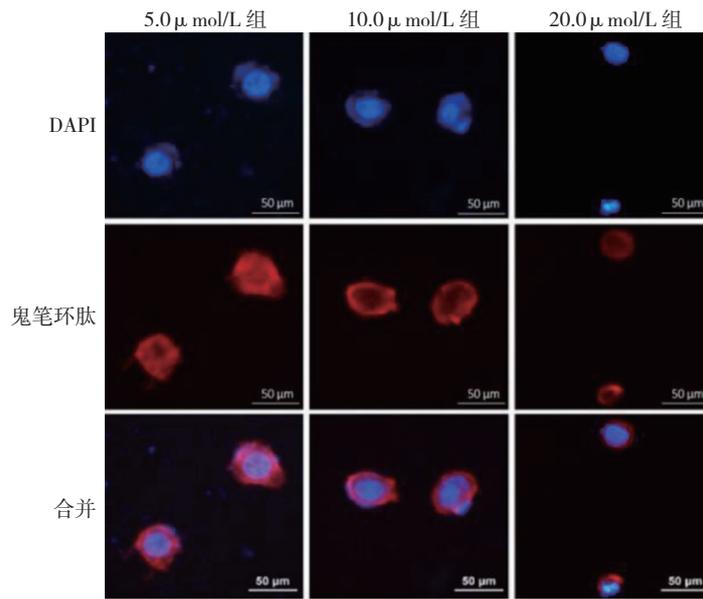


图 4 HCT116 细胞核及细胞骨架微丝结构变化

2.5 各组 Bcl-2 家族基因 mRNA 相对表达量比较

各组 Bax、Bik、Bim、Puma、Bcl-xL 和 Mcl-1 mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。0.0、1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 Bax、Bik 及 Bim

mRNA 相对表达量呈上升趋势;5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 Puma mRNA 相对表达量最高;0.0、1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 Bcl-2 和 Bcl-xL mRNA 相对表达量呈下降趋势;5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 Mcl-1 mRNA 相对表达量最低。见表 4 和图 5。

表 4 各组 Bcl-2 家族基因 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bik	Bim	Puma	Bcl-2	Bcl-xL	Mcl-1
0.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.01 \pm 0.22	1.01 \pm 0.15	1.02 \pm 0.23	1.01 \pm 0.17	1.01 \pm 0.20	1.01 \pm 0.17	1.00 \pm 0.10
1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.08 \pm 0.14	1.19 \pm 0.17	1.07 \pm 0.08	0.95 \pm 0.13	0.99 \pm 0.56	0.99 \pm 0.134	1.25 \pm 0.14
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.67 \pm 0.16	1.22 \pm 0.09	1.16 \pm 0.19	1.29 \pm 0.30	0.94 \pm 0.24	0.91 \pm 0.10	0.89 \pm 0.15
5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.36 \pm 0.32	1.82 \pm 0.11	1.75 \pm 0.18	2.14 \pm 0.64	0.83 \pm 0.16	0.58 \pm 0.09	0.46 \pm 0.05
F 值	23.761	21.934	10.937	6.541	0.6593	7.208	24.54
P 值	0.000	0.000	0.003	0.015	0.600	0.012	0.000

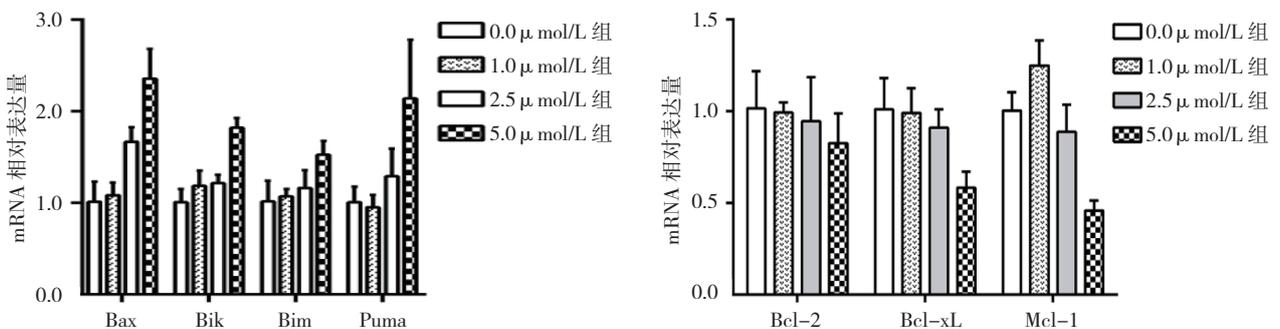


图 5 各组 Bcl-2 家族基因 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

结肠癌作为一种常见的消化道恶性肿瘤, 在世界范围内严重威胁着人类的身心健康。尽管随着各项研究的深入和技术的进步, 结直肠癌的诊断和治疗手段都有了显著提高, 但是肿瘤诊断和治疗仍然面临诸多挑战^[5]。临床治疗以根治手术联合化疗为主, 但患者的 5 年生存率仍不理想, 多药耐药性是影响结直肠癌患者化疗疗效的主要原因^[6]。因此, 开发高效、低毒的药物是治疗肿瘤的有效途径之一。有研究报道, 一氧化氮前体药 JS-K 对前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤及神经胶质母细胞瘤等生长有抑制作用^[3, 7-12]。本研究结果表明, JS-K 对人结肠癌 HCT116 细胞增殖和凋亡有明显影响, 且呈浓度依赖性。

有研究报道, JS-K 可抑制白血病细胞 G2/M 期, 诱导细胞早期凋亡^[13]。本研究显示, JS-K 主要阻滞 HCT116 细胞 G2/M 期, 并诱导晚期凋亡, 且呈浓度依赖性。细胞凋亡时细胞骨架发生相应变化, 表现为微丝结构降解凝集和分布不均匀^[14]。本研究荧光双标记结果提示, JS-K 处理 HCT116 细胞后, 诱导核浓缩和核碎裂; 细胞微丝结构和分布发生变化, 局部出现溶解或断裂现象, 表明 JS-K 促进 HCT116 细胞凋亡。

JS-K 主要通过诱导细胞凋亡对肿瘤细胞产生抑制作用, 在调控凋亡的众多基因中, Bcl-2 家族与凋亡发生、发展最为密切。Bcl-2 家族分为 2 大类: 一类是抗凋亡蛋白, 包括 Bcl-2、Bcl-xL 及 Bcl-w 等; 另一类是促凋亡蛋白, 包括 Bax、Bak、Bid、Bik 及 Bad 等^[15]。LIU 等^[16]发现, JS-K 通过 Bcl-2 家族蛋白调控诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡。本研究结果提示, JS-K 可通过上调促凋亡蛋白 Bax、Puma, 下调抗凋亡蛋白 Mcl-1 蛋白表达, 促进 HCT116 细胞凋亡。

综上所述, 本实验证实 JS-K 对人结肠癌细胞 HCT116 增殖有明显抑制作用, 同时 JS-K 通过上调 HCT116 细胞中 Bax 和下调 Bcl-2 表达, 阻滞细胞 G2/M 期, 促进细胞的晚期凋亡。目前证实 JS-K 通过以下 3 条途径抑制肿瘤细胞: ① MAPK/JNK 通路; ② Wnt/ β -catenin 信号通路; ③ 胱天蛋白酶信号通路。其中胱天蛋白酶信号通路是 JS-K 诱导凋亡最重要的信号通路, JS-K 诱导人结肠癌细胞 HCT116 凋亡的作用机制还有待研究。

参考文献:

[1] MUKKAI KRISHNAMURTY D, WISE P E. Importance of

surgical margins in rectal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2016, 113(3): 323-332.

[2] MACIAG A E, SAAVEDRA J E, CHAKRAPANI H. The nitric oxide prodrug JS-K and its structural analogues as cancer therapeutic agents[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009, 9(7): 798-803.

[3] FIODA C, ABRUZZESE M P, ZINGONI A, et al. Nitric oxide donors increase PVR/CD155 DNAM-1 ligand expression in multiple myeloma cells: role of DNA damage response activation[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 17.

[4] BONAVIDA B, GARBAN H. Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics[J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 486-494.

[5] 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)[J]. *中华外科杂志*, 2018, 56(4): 241-258.

[6] 苏建伟, 周喜汉. 结肠癌细胞耐药的研究现状[J]. *右江医学*, 2017, 45(01): 91-94.

[7] QIU M, CHEN L, TAN G, et al. JS-K promotes apoptosis by inducing ROS production in human prostate cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1137-1142.

[8] DONG R, WANG X, WANG H, et al. Effects of JS-K, a novel anti-cancer nitric oxide prodrug, on gene expression in human hepatoma Hep3B cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 367-373.

[9] KANG F, AI Y, ZHANG Y, et al. Design and synthesis of new hybrids from 2-cyano-3, 12-dioxooleana-9-dien-28-oic acid and O2-(2, 4-dinitrophenyl) diazeniumdiolate for intervention of drug-resistant lung cancer[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 149: 269-280.

[10] MCMURTRY V, SAAVEDRA J E, NIEVES-ALICEA R, et al. JS-K, a nitric oxide-releasing prodrug, induces breast cancer cell death while sparing normal mammary epithelial cells[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4): 963-971.

[11] KACZMAREK M Z, HOLLAND R J, LAVANIER S A, et al. Mechanism of action for the cytotoxic effects of the nitric oxide prodrug JS-K in murine erythroleukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2014, 38(3): 377-382.

[12] HECKLER M, OSTERBERG N, GUENZLE J, et al. The nitric oxide donor JS-K sensitizes U87 glioma cells to repetitive irradiation[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): DOI: 10.1177/1010428317703922.

[13] NATH N, CHATTOPADHYAY M, POSPISHIL L, et al. JS-K, a nitric oxide-releasing prodrug, modulates β -catenin/TCF signaling in leukemic Jurkat cells: evidence of an S-nitrosylated mechanism[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(11): 1641-1649.

[14] BOTTONE M G, SANTIN G, AREDIA F, et al. Morphological features of organelles during apoptosis: an overview[J]. *Cells*, 2013, 2(2): 294-305.

[15] DEY R, MORAES C T. Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(10): 7087-7094.

[16] LIU L, WANG D, WANG J, et al. The nitric oxide prodrug JS-K induces Ca²⁺-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2016, 30(4): 192-199.

(李科 编辑)