

豹蛙核酸酶与斑蝥酸钠对肺腺癌细胞增殖的协同抑制作用

翟昌宝¹ 沈如凌² 胡晓琚¹ 徐殿胜¹ 费 俭^{2,3} 王庆诚^{2*}

(¹华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; ²上海南方模式生物研究中心, 上海 201203;

³同济大学贵州神奇民族医药研究中心, 上海 200092)

摘要 豹蛙核酸酶(onconase, Onc)是从美洲北方豹蛙卵母细胞中提取的一种核糖核酸酶, 对许多肿瘤细胞都具有杀伤作用。斑蝥素(cantharidin)是存在于芫青科昆虫斑蝥体内的一种天然防御性毒素, 斑蝥酸钠(sodium cantharidate, SCA)是斑蝥素半合成衍生物。鉴于Onc与SCA对非小细胞肺癌都具有杀伤作用, 采用MTT法测定Onc与SCA单独与联合作用于两株肺腺癌细胞的IC₅₀值, 运用联合作用指数(combination index, CI)和等效线分析评价两者联合作用的效果。结果表明, Onc与SCA联合作用时, CI值均小于0.7, 等效线分析图显示, 代表Onc与SCA联合作用的点均位于加成线下方, Onc与SCA对肺腺癌SPC-A-1、A549细胞株增殖的抑制作用具有协同效应。用流式细胞仪进行的凋亡细胞检测结果也支持上述“Onc/SCA联合使用具有协同抗癌作用”的结论。

关键词 协同抑制作用; 豹蛙核酸酶; 斑蝥酸钠; 肺腺癌; SPC-A-1; A549

Synergistic Inhibition Effect of Onconase and Sodium Cantharidate on the Growth of Human Lung Adenocarcinoma Cells

Zhai Changbao¹, Shen Ruling², Hu Xiaojun¹, Xu Diansheng¹, Fei Jian^{2,3}, Wang Qingcheng^{2*}

(¹East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; ²Shanghai Research Center For Model Organisms, Shanghai 201203, China; ³Tongji University-Guizhou Shenqi Research Center of Ethnomedicine, Shanghai 200092, China)

Abstract Onconase (Onc) is a ribonuclease purified from oocytes of *Rana pipiens*, which possesses potent anti-tumor activity. Cantharidin is a natural defensive toxin, existing in *Mylabrisphalerata pallas* or *Mylabrischichorii linnaeus*. Sodium cantharidate is a semi-synthetic derivative of cantharidin. The cytotoxicity of Onconase and sodium cantharidate alone or combined on the growth of SPC-A-1 and A549 non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines was measured by MTT method. The anti-tumor joint effect of Onconase and sodium cantharidate *in vitro* was assessed by combination indices and isobologram analyses. The experimental results show that the combination indices were less than 0.7, and the points of joint effect were located below the line of additivity. The combination of Onconase and sodium cantharidate exhibited a synergistic growth-inhibitory effect on both SPC-A-1 and A549 cell lines. The data of apoptotic cells studied by flow cytometry were consistent with above conclusion. The Onc/SCA combination may have potential in NSCLC therapy.

Key words synergistic inhibitory effect; Onconase; sodium cantharidate; lung adenocarcinoma; SPC-A-1; A549

豹蛙核酸酶(Onconase, Onc)是美洲北方豹蛙(*Rana pipiens*)卵母细胞中的一种核糖核酸酶, 属于

RNase A超家族, 氨基酸序列与RNase A有30%相似。Onc具有结构特殊的N端和C端, 特别稳定, 且不易

收稿日期: 2012-06-14 接受日期: 2012-12-12

*通讯作者。Tel: 021-50793648-82014, E-mail: weiqunus@yahoo.com

Received: June 14, 2012 Accepted: December 12, 2012

*Corresponding author. Tel: +86-21-50793648-82014, E-mail: weiqunus@yahoo.com

网络出版时间: 2013-03-04 17:14 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130304.1714.012.html

被蛋白酶降解。与RNase A超家族大多数成员不同, Onc对RNase抑制剂蛋白亲和性很低, 其细胞毒性不受这类抑制剂影响, 比RNase A的强10 000倍以上, 对许多肿瘤细胞都具有杀伤作用^[1]。Onc免疫原性低、毒副作用小, 已在美国等地被批准作为孤儿药物用于临床治疗间皮瘤^[1]。斑蝥素(cantharidin)是存在于芫青科昆虫斑蝥体内的一种天然防御性毒素, 在我国已被用于临床治疗肝癌、食道癌、肺癌等。斑蝥酸钠(sodium cantharidate, SCA)是斑蝥素的半合成衍生物, 其毒性、刺激性比斑蝥素小, 抗肿瘤作用优于斑蝥素^[2]。鉴于Onc与SCA对非小细胞肺癌都具有杀伤作用, 本文选取SPC-A-1和A549两种非小细胞肺癌株作为研究对象, 研究两种药物的单独与联合作用, 评价两者联合作用的效果。

1 材料与方法

1.1 菌株与细胞株

pET-22b(+)-Onc(Onc原核表达质粒)、BL21(DE3)菌株为本实验室收藏, SPC-A-1(人肺腺癌细胞株)、A549(人肺腺癌细胞株)、B16(小鼠黑色素瘤细胞株)、K562(人慢性骨髓白血病细胞)均来源于中科院上海生命科学研究院细胞库。

1.2 试剂与药品

RPMI-1640培养基(Hyclone); F-12培养基(Gibco); 胎牛血清(Hyclone); MTT、DMSO(Sigma); 斑蝥酸钠注射液(贵州金桥药业有限公司, 批号: 101211, 规格: 2 mL×5、0.05 mg/mL); 蛋白胨、酵母膏(Oxoid); 凋亡检测试剂盒VYBRANT(R) APOPTOSIS ASSA(Invitrogen); 蛋白分子量标品 # SM0671(Fermatas); 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器与设备

JJ-CJ洁净工作台(金净); 二氧化碳细胞培养箱(Sanyo); Synergy 2多功能酶标仪(Bio-TEK); ÄKTA Purifier(GE Healthcare); Odyssey近红外双色激光成像系统(LI-COR); BD FACS Calibur流式细胞仪。

1.4 Onc的制备

将pET-22b(+)-Onc质粒转化到大肠杆菌BL21(DE3)中, IPTG诱导菌体表达, 菌体超声破碎收集包涵体; 包涵体经洗涤后溶于6 mol/L的盐酸胍溶液中, 将包涵体溶液逐滴加入到复性缓冲液中复性48 h, 蛋白浓度稀释至0.1 mg/mL; 通过阳离子交换柱(SP-Sepharose、Source15-S, GE Healthcare)纯化蛋白, 收集蛋白样品, MTT法检测其细胞毒性^[3-4]。

1.5 细胞培养

SPC-A-1、B16、K562细胞培养于RPMI 1640中, A549细胞培养于F-12中, 培养液均含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素。细胞株在含5%二氧化碳、37 °C的细胞培养箱中培养, 除K562(半悬浮)外其余细胞株都呈现贴壁状态, 每2-3天传一代。

1.6 MTT法检测药物的细胞毒性

培养肺腺癌SPC-A-1或A549细胞, 取对数生长期的细胞用含0.02% EDTA和0.25%胰蛋白酶的消化液消化计数后, 调整细胞密度为 5×10^4 /mL, 在96孔板中, 每孔加90 μL培养液。5% CO₂培养箱中培养12 h后, 按设定的浓度加10 μL药物, 对照品加PBS(含有0.1% BSA)。培养72 h后, 加入5 mg/mL的MTT 5 μL, 作用4 h, 吸去培液, 加入100 μL DMSO, 轻轻震荡5 min后, 用波长570 nm和630 nm酶标仪读数, 计算药物的IC₅₀值。肿瘤细胞存活率(%)=[(D₅₇₀-D₆₃₀)平均值/(D₅₇₀-D₆₃₀)对照组平均值]×100%。

1.7 Onc与SCA对肺腺癌细胞的单独作用

培养肺腺癌SPC-A-1或A549细胞, Onc与SCA药物分别用PBS(含有0.1% BSA)连续稀释, 每次稀释相同倍数, 设定六个梯度。用MTT法检测药物的细胞毒性, 96孔板中每孔加药10 μL, 每个样品三个复孔, 计算药物的IC₅₀值。

1.8 Onc与SCA对肺腺癌细胞的联合作用

两种药物以不同体积比混合即4:1、3:2、2:3、1:4, 配置4种溶液, 每种溶液用PBS(含有0.1% BSA)连续稀释, 每次稀释相同倍数, 设定六个梯度。培养肺腺癌细胞SPC-A-1或A549细胞株, MTT法检测药物的细胞毒性, 每种溶液可得到2个IC₅₀值(分别对应于Onc和SCA)。

1.9 联合指数和等效线分析

联合指数(combination index, CI)即两种药物抑制浓度的分数之和, 公式为 $CI = C_{A,50}/IC_{50,A} + C_{B,50}/IC_{50,B}$, C_{A,50}和C_{B,50}指A、B两种药物联用达到50%抑制时的药物浓度, IC_{50,A}和IC_{50,B}指单用某一药物达到50%抑制时的药物浓度。当CI<1时, 两药联用具有协同作用; 当CI>1时, 两药联用具有拮抗作用; 当CI=1时, 则认为是相加效应^[5-6]。

两种药物联用时, 药物的分数抑制浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)为某药联用的IC₅₀值/某药单独作用的IC₅₀值。以Onc的FIC值为横坐标, SCA的FIC值为纵坐标, 将两种药物单独作用的FIC值设定为1, 连接两种药物单独作用的坐标, 绘制等效

线分析图(加成线)。两种药物联合作用时, Onc的FIC值对应联合作用的横坐标值, SCA的FIC值对应联合作用的纵坐标值, 绘出联合作用的点。代表联合作用的点位于加成线的下方、线上或上方, 分别代表两种药物联用时具有协同、加成或拮抗效应^[6-7]。

1.10 Annexin-VFITC/PI法检测凋亡

取指数生长期的A549和SPC-A-1, 制成单细胞悬液, 按照每孔 5×10^5 /mL铺6孔板。对于SPC-A-1细胞, 贴壁过夜后将细胞分成4组: (1)对照组: 加PBS; (2)Onc单药组: 10 μ mol/L Onc; (3)SCA单药组: 4.5 μ mol/L SCA; (4)双药组: 10 μ mol/L Onc+4.5 μ mol/L SCA。对于A549细胞, 贴壁过夜后将细胞分成4组: (1)对照组: 加PBS; (2)Onc单药组: 20 μ mol/L Onc; (3)SCA单药组: 9 μ mol/L SCA; (4)双药组: 20 μ mol/L Onc+9 μ mol/L SCA。细胞处理24 h后, 收集各孔细胞, PBS洗涤两遍后, 用凋亡试剂盒检测细胞凋亡情况。

2 结果

2.1 Onc的制备

经菌体诱导表达蛋白、包涵体洗涤、蛋白复性和纯化, 蛋白纯度约95%, SDS-PAGE分析结果(图1A)。纯化获得的Onc对B16细胞 IC_{50} 值为0.218 μ mol/L, 对K562细胞的 IC_{50} 值为1.74 μ mol/L, 细胞毒性与文献值相似^[48](图1B)。

2.2 Onc和SCA对肺腺癌细胞株的单独作用

Onc和SCA分别作用于SPC-A-1细胞株, 对照组加入PBS溶液, 给药组做每次3.16倍的系列稀释, 依次加入各梯度的药物, 作用72 h, MTT法检测细胞存

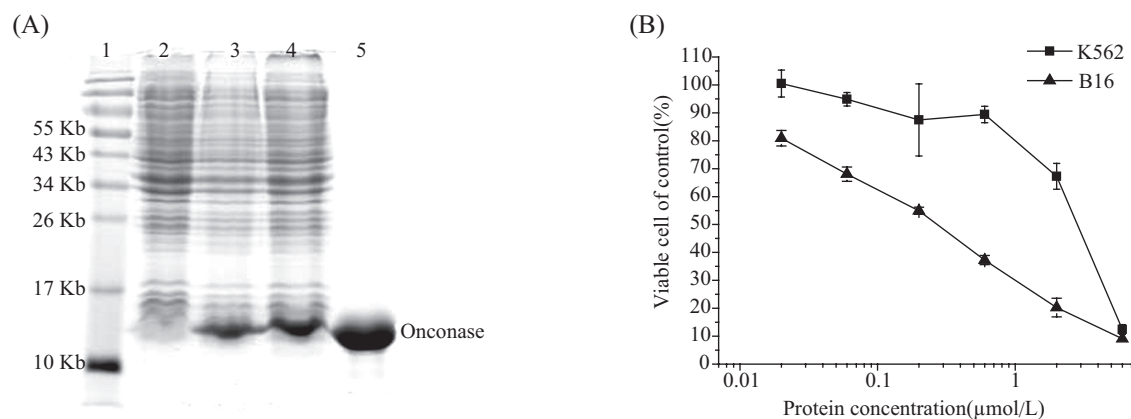
活率。随着药物浓度的增加细胞存活的数目逐渐降低, Onc和SCA作用于SPC-A-1细胞的 IC_{50} 值分别为0.145 μ mol/L和3.04 μ mol/L(图2)。

Onc和SCA分别作用于A549细胞, 对照组加入PBS溶液, 给药组作每次2倍的系列稀释, 依次加入各梯度的药物, 作用72 h。Onc和SCA作用于A549细胞的 IC_{50} 值分别为35.7 μ mol/L和32.7 μ mol/L(图3)。

2.3 Onc和SCA对肺腺癌细胞株的联合作用

Onc和SCA作用于肺腺癌细胞, 分为对照组、Onc单独作用组、SCA单独作用组、Onc与SCA联合作用组。对照组中, 两株细胞生长状态良好, 细胞核完整, 边缘整齐清晰, 细胞间结构紧密; 在给药组中, 细胞的增殖受到抑制并呈现不同程度的损伤。MTT法测定Onc和SCA对两株肺腺癌细胞(SPC-A-1、A549)的 IC_{50} 值(表1)。

依据方法1.9中的公式将表1中 IC_{50} 值计算出CI值, 同时绘出相应的等效线分析图。结果显示, 两种药物联合作用时, 随着药物浓度的增加, 两株细胞的增殖抑制率也增加。Onc与SCA联合作用于SPC-A-1时, 其CI值分别为0.58、0.44、0.30、0.14, 均小于0.6; Onc与SCA联合作用于A549时, 其CI值分别为0.39、0.65、0.41、0.39, 均小于0.7(表1)。CI值均小于1, 并且得到的等效线分析图上代表联合作用的点均位于加成线的下方(图4), 由此判定Onc与SCA能协同抑制肺腺癌细胞株(SPC-A-1、A549)的增殖。而且SPC-A-1细胞株CI值最小为0.14, Onc与SCA体积比例为1:4; A549细胞株CI值最小为0.39, Onc与



A: 聚丙烯酰胺凝胶电泳图。1: 蛋白分子量标准品, 2: IPTG诱导前的全菌蛋白, 3: IPTG诱导3.5 h后的全菌蛋白, 4: 包涵体, 5: 纯化的Onc(5 μ g); B: Onc对K562和B16的细胞毒性。

A: SDS-PAGE electrophoresis analysis. 1: protein marker; 2: total protein in bacteria before IPTG induction; 3: total protein in bacteria after 3.5 h IPTG induction; 4: inclusion bodies; 5: purified Onc(5 μ g); B: cytotoxicity of Onc on K562 and B16 cells.

图1 Onc的纯化和细胞毒性

Fig.1 Purification and cytotoxicity of Onc

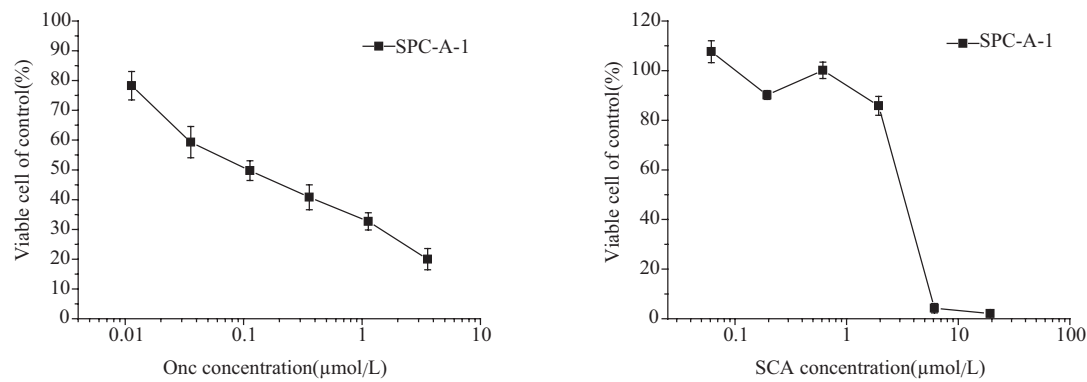


图2 Onc和SCA对SPC-A-1的细胞毒性
Fig.2 Cytotoxicity of Onc and SCA on SPC-A-1 cells

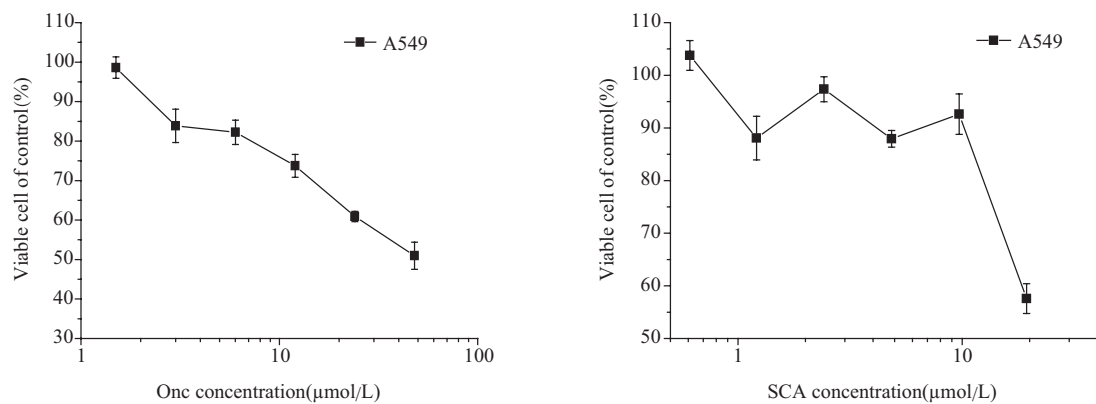


图3 Onc和SCA对A549的细胞毒性
Fig.3 Cytotoxicity of Onc and SCA on A549 cells

SCA体积比例为1:4或4:1, 结合等效线分析图表明, 加入少量的Onc就可以大大增强SCA的作用。Onc与SCA联合作用于SPC-A-1和A549的最适体积比为1:4, 摩尔比分别为1:21.7、1:1.62。

2.4 Onc和SCA对两种细胞株的凋亡检测

加药分别处理A549和SPC-A-1细胞(24 h)后检测其凋亡。

处理A549细胞株后, 对照组凋亡率Q2(凋亡晚期)为1.5%, Q4(凋亡早期)为0.6%; Onc单药组凋亡率Q2(凋亡晚期)为2.7%, Q4(凋亡早期)为0.8%; SCA单药组凋亡率Q2(凋亡晚期)为3.4%, Q4(凋亡早期)为0.9%; 双药组凋亡率Q2(凋亡晚期)为7.3%, Q4(凋亡早期)为2.8%(图5A); 统计各复孔平均值, 发现双药组Q2和Q4相对于对照均具有显著性差异(图5B)。

处理SPC-A-1细胞株后, 对照组凋亡率Q2(凋亡晚期)为2.1%, Q4(凋亡早期)为3.1%; Onc单药组凋亡率Q2(凋亡晚期)为4.7%, Q4(凋亡早期)为3.9%; SCA单药组凋亡率Q2(凋亡晚期)为5.5%, Q4(凋亡早期)为4.1%; 双药组凋亡率Q2(凋亡晚期)为11.7%, Q4(凋

表1 Onc与SCA联合作用SPC-A-1和A549细胞的IC₅₀值
Table 1 The IC₅₀ of combined treatment with Onc and SCA on SPC-A-1 and A549 cells

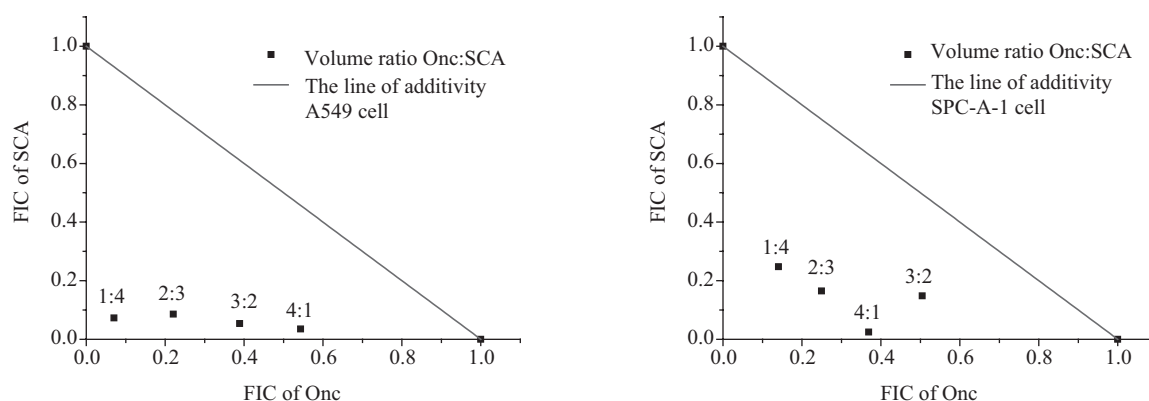
细胞株	体积比(Onc:SCA)	Onc IC ₅₀ 值	SCA IC ₅₀ 值(μmol/L)
Cell line	Volume ratio	(μmol/L)	SCA IC ₅₀ (μmol/L)
	(Onc:SCA)	Onc IC ₅₀ (μmol/L)	
SPC-A-1	4:1	0.0788	0.107
	3:2	0.0564	0.164
	2:3	0.0320	0.260
	1:4	0.0102	0.221
A549	4:1	13.2	0.798
	3:2	18.0	4.84
	2:3	8.91	5.39
	1:4	5.02	8.10

作用于SPC-A-1细胞株Onc和SCA的原始浓度分别为35.7 μmol/L、194 μmol/L, 作用于A549细胞株Onc和SCA的起始浓度为480 μmol/L、194 μmol/L。
The original concentrations of Onc and SCA on SPC-A-1 cells were 35.7 μmol/L and 194 μmol/L, the original concentrations of Onc and SCA on A549 cells were 480 μmol/L and 194 μmol/L, respectively.

表2 Onc和SCA联合作用于SPC-A-1 和A549的联合指数

Table 2 Combination indices of Onc combined with SCA on SPC-A-1 and A549 cells

细胞株 Cell line	体积比(Onc:SCA) Volume ratio(Onc:SCA)			
	4:1	3:2	2:3	1:4
SPC-A-1	0.58	0.44	0.30	0.14
A549	0.39	0.65	0.41	0.39



图中对角线为两药作用加成线, 图上的点位于加成线的下方、线上或上方, 分别代表两药协同、加成或拮抗作用。

The diagonal line is the line of additivity. The data were represented by dots located below, on, or above the line, indicating synergy, additivity or antagonism, respectively.

图4 Onc和SCA联合作用的等效线分析

Fig.4 The results of isobologram analysis of Onc and SCA combination treatment

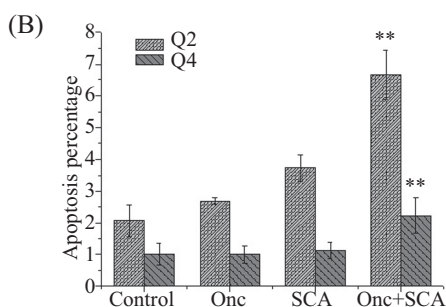
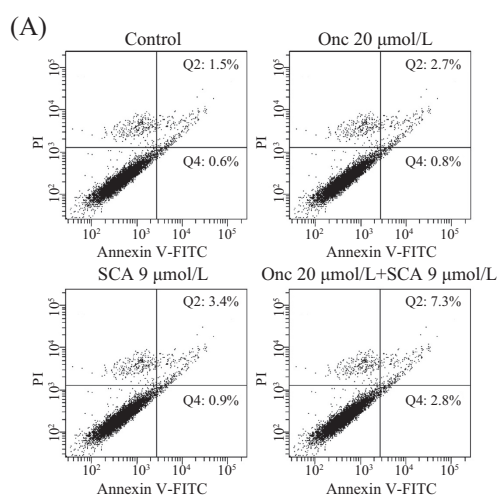


图5 药物处理后A549细胞凋亡比率

Fig.5 Apoptosis ratio of treated A549 cells

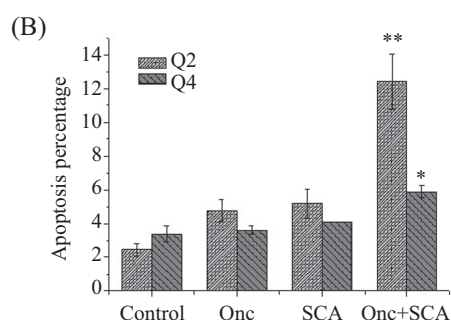
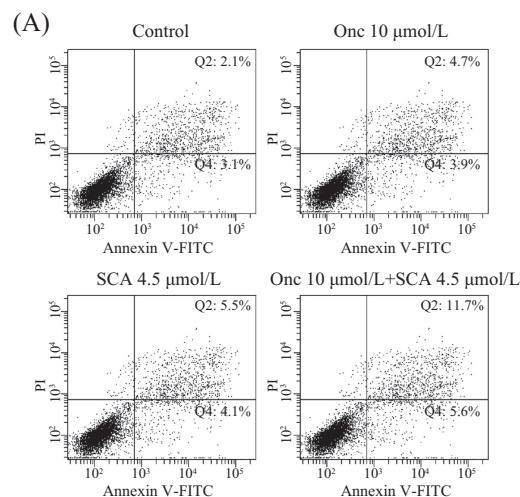


图6 药物处理后SPC-A-1细胞凋亡比率

Fig.6 Apoptosis ratio of treated SPC-A-1 cells

亡早期)为5.6%(图6A); 统计各复孔平均值, 发现双药组Q2和Q4相对于对照均具有显著性差异(图6B)。

3 讨论

癌症是威胁人类生命、健康的重大疾病之一。世界卫生组织报告指出, 2008年全世界有760万人死于癌症, 预计2030年癌症患者将达到7 500万人。我国每年新检出50万肺癌病例, 约80%属非小细胞肺癌。肺腺癌是非小细胞肺癌中的主要类型之一, 近年来, 其发病比例正在升高。治疗肺癌的药物不少, 但肺癌迄今仍是死亡率很高的癌种, 加上耐药性一直是肿瘤化疗的棘手问题。因此, 开发新的低毒有效的抗肺癌药物或者研发出新的联合化疗方案是一项重要而迫切的任务。将两种药物联合施用有可能避免过早出现耐药性, 提高作用效果、减少副作用, 并进一步提高患者的生存质量和延长病人的生存期。

本文选取肺腺癌细胞株(SPC-A-1、A549)作为研究对象, 采用MTT法测定Onc与SCA对两株肺腺癌细胞的单独及联合作用, 结果显示, Onc与SCA对肺腺癌细胞株的单独作用呈现明显的浓度依赖性, 并且两种药物联合作用优于单独作用, 能协同抑制肺腺癌细胞株(SPC-A-1、A549)的增殖。Onc依赖于静电介导的内吞作用进入细胞膜^[9], 催化降解RNA, 特别是t-RNA, 对micro-RNA也有影响。这些RNA的降解不但降低了蛋白质生物合成的水平, 抑制了细胞生长, 而且会进一步导致细胞凋亡。而SCA在我国早就在临床上用于治疗肝癌、肺癌等, SCA能够抑制蛋白磷酸酯酶1(protein phosphatase 1, PP1)和蛋白磷酸酯酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)的活性, 增强p53的功能, 并能影响肿瘤细胞蛋白质的合成过程, 进而引发细胞凋亡^[10]。另外, 通过CI值与等效线分析图得到, Onc与SCA联合作用于SPC-A-1和A549的最适体积比为1:4, 摩尔比分别为1:21.7、1:1.62, 原因在于两种肺腺癌细胞株对Onc与SCA的敏感性不同, 如Onc作用于SPC-A-1、A549细胞的IC₅₀值分别为0.145 μmol/L、35.7 μmol/L。这两种药物的作用机制与现有的其它肿瘤化疗药物非常不同, 而且都不损伤骨髓细胞(SCA还有促进白细胞增殖的功能), 两药联合使用又具协同作用, 因此这种新的肺癌治疗方案可能在临床应用上颇具潜力。凋亡检测结果提示, 通过两药联合作用, 可以大大提高诱导的细胞凋亡率, 证明两药联合使用具有协同作用。

Onc和SCA均为广谱抗癌药。除了间皮癌和非

小细胞肺癌之外, Onc能有效地抑制白血病、肝癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、乳癌、结肠癌等肿瘤细胞的生长。SCA已在临床上用于肝癌、膀胱癌、肺癌、胃癌、大肠癌、食道癌、鼻咽癌等的治疗。本文尝试了Onc和SCA联合抑制非小细胞肺癌细胞的生长, 这种组合很可能适用于其他肿瘤, 值得今后进一步研究。

综上所述, 通过将Onc与SCA联合作用发现, 两者在细胞水平对SPC-A-1和A549肺腺癌细胞株具有协同抑制肿瘤细胞增殖的作用, 需要进一步在体内研究两种药物的联合作用。

参考文献 (References)

- 1 田雪, 王庆诚, 沈如凌, 徐殿胜, 费俭. Onconase研究与开发的最新进展. 中国细胞生物学学报(Tian Xue, Wang Qingcheng, Shen Ruling, Xu Diansheng, Fei Jian. Latest advances in the research and development of onconase. Chinese Journal of Cell Biology) 2010; 29(6): 927-34.
- 2 江励华, 王明艳. 斑蝥的研究进展. 医药导报(Jiang Lihua, Wang Mingyan. Research advance of canthari. Herald of Medicine) 2004; 23(6): 389-91.
- 3 许国峰, 王庆诚, 龚兴国, 费俭. 抗肿瘤蛋白Onconase的原核细胞表达及细胞毒性检测. 实验生物学报(Xu Guofeng, Wang Qingcheng, Gong Xingguo, Fei Jian. Effective expression of ribonuclease-Onconase in *Escherichia Coli* and assaying its cytotoxicity potential. Acta Biologiae Experimentalis Sinica) 2004; 3(37): 227-31.
- 4 沈如凌, 孙瑞林, 王庆诚, 欧伶, 费俭. Onconase对B16黑色素瘤细胞的体内外生长抑制作用. 细胞生物学杂志(Shen Ruling, Sun Ruilin, Wang Qingcheng, Ou Ling, Fei Jian. Growth inhibition effect of Onconase on B16 melanoma cells *in vivo* and *in vitro*. Chinese Journal of Cell Biology) 2007; 29(6): 901-4.
- 5 Tallarida RJ. An overview of drug combination analysis with isobolograms. J Pharmacol Exp Ther 2008; 319(1): 1-7.
- 6 彭小伟, 李维, 谭国林. 顺铂逆转鼻咽癌紫杉醇耐药细胞的耐药性. 肿瘤(Peng Xiaowei, Li Wei, Tan Guolin. Reversal of taxol resistance by cisplatin in human nasopharyngeal carcinoma cell lines. Tumor) 2011; 31(4): 288-93.
- 7 Lu G, Xiao H, You H. Synergistic inhibition of lung tumorigenesis by a combination of green tea polyphenols and atorvastatin. Clin Cancer Res 2008; 14(15): 4981-8.
- 8 Marcia CH, Ronald TR. Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. J Cell Sci 2002; 116(Pt 2): 313-24.
- 9 Rodriguez M, Torrent G, Bosch M, Rayne F, Dubremetz JF, Rbio M, *et al*. Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol. J Cell Sci 2007; 120(8): 1405-11.
- 10 Li W, Xie L, Chen Z, Zhu Y, Sun Y, Miao Y, *et al*. Cantharidin, a potent and selective PP2A inhibitor, induces an oxidative stress-independent growth inhibition of pancreatic cancer cells through G₂/M cell cycle arrest and apoptosis. Cancer Sci 2010; 101(5): 1226-33.