

抗肿瘤化合物 CENPOANU 的体外抗肿瘤活性研究^Δ

吴晶^{1*}, 贾忠^{2,3#}, 刘渊², 贺殿⁴, 刘晓斌⁴, 郭庆欣⁴(1.兰州市中医医院, 兰州 730050; 2.兰州市肺科医院, 兰州 730046; 3.甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 4.兰州大学药学院, 兰州 730020)

中图分类号 R979.1; Q279 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)41-3864-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.41.09

摘要 目的: 研究抗肿瘤化合物 1-(2-氯乙基)-3-[2-(2-硝基苯氧)乙酰基]-1-亚硝基脲(CENPOANU)的体外抗肿瘤活性及其机制。方法: 考察对人乳腺癌细胞(MCF-7)、人宫颈癌细胞(HeLa)、小鼠红白血病细胞(MEL)、人恶性胶质瘤细胞(U251)、CENPOANU 和卡莫司汀(BCNU)的半数抑菌浓度(IC₅₀); 检测 0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 倍 IC₅₀ 的 CENPOANU 作用 24、36、48 h 后 MCF-7 的增殖抑制率, 0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 倍 IC₅₀ 的 CENPOANU、BCNU 作用 48 h 后 MCF-7 的增殖抑制率; 测定 0、10.5、14.0、28.0 μmol/L CENPOANU 对 MCF-7 的克隆形成率; 观察 14.0 μmol/L CENPOANU 作用 0、24、48 h 后 MCF-7 的细胞形态变化和凋亡形态, 以及作用 48 h 后空白对照组和 CENPOANU (14.0 μmol/L) 组 MCF-7 的细胞周期分布、增殖指数和凋亡指数(A)。结果: 在 MCF-7、HeLa、MEL、U251 上的 IC₅₀, CENPOANU 分别为 (6.9 ± 2.2)、(14.7 ± 3.5)、(7.8 ± 1.2)、(9.6 ± 2.1) μmol/L, BCNU 分别为 (14.5 ± 2.6)、(12.4 ± 1.5)、(8.8 ± 1.3)、(11.2 ± 1.4) μmol/L; CENPOANU 对 MCF-7 的生长具有抑制作用, 且与浓度和时间呈正相关。与 BCNU 比较, CENPOANU 对 MCF-7 的生长抑制作用明显增强 ($P < 0.01$)。CENPOANU 能明显降低 MCF-7 的克隆形成率, 且与浓度呈正相关 ($P < 0.05$)。与作用 0 h 比较, MCF-7 随作用时间延长, 可见体积缩小、空泡等凋亡细胞, 且细胞数量减少, 发生皱缩、脱落等, 其中 G₂/M、S 期细胞明显减少 ($P < 0.01$), 空白对照组和 CENPOANU 组 MCF-7 的增殖指数分别为 92.05%、42.70%, A 分别为 (1.5 ± 0.1)%、(13.1 ± 1.3)%。结论: CENPOANU 主要通过阻滞细胞周期 G₂/M、S 进程干预细胞增殖, 并诱导细胞凋亡, 且体外抗肿瘤活性优于 BCNU。

关键词 1-(2-氯乙基)-3-[2-(2-硝基苯氧)乙酰基]-1-亚硝基脲; 抗肿瘤活性; 卡莫司汀; 半数抑菌浓度

Research on Antineoplastic Activity of Anti Tumor Compound CENPOANU *in vitro*

WU Jing¹, JIA Zhong^{2,3}, LIU Yuan², HE Dian⁴, LIU Xiao-bin⁴, GUO Qing-xin⁴(1.Lanzhou Hospital of TCM, Lanzhou 730050, China; 2.Lanzhou Pulmonary Hospital, Lanzhou 730046, China; 3.College of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China; 4.Pharmacy College of Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the antineoplastic activity of anti tumor compound 1-(2-chloroethyl)-3-[2-(2-nitrophenoxy) acetyl]-1-nitrosourea (CENPOANU) *in vitro* and its mechanism. METHODS: The Half inhibitory concentration (IC₅₀) values of CENPOANU and carmustine (BCNU) were evaluated in MCF-7, HeLa, MEL and U251 cell lines. The growth inhibitory actions of CENPOANU (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 4.0 folds of IC₅₀) on MCF-7 were determined after 24 h, 36 h and 48 h. The growth inhibitory actions of CENPOANU and BCNU (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 4.0 folds of IC₅₀) on MCF-7 were observed after 48 h. The effects of 0, 10.5, 14.0 and 28.0 μmol/L CENPOANU on MCF-7 clone formation rate were tested. The morphological changes and apoptosis of MCF-7 were observed in normal control group and trial group (14.0 μmol/L CENPOANU) after 0, 24, 48 h. The distribution of cell cycle, proliferation index and apoptosis index (A) was observed in control group and trial group after 48 h. RESULTS: In MCF-7, HeLa, MEL and U251, IC₅₀ values of CENPOANU were (6.9 ± 2.2), (14.7 ± 3.5), (7.8 ± 1.2) and (9.6 ± 2.1) μmol/L; IC₅₀ values of BCNU were (14.5 ± 2.6), (12.4 ± 1.5), (8.8 ± 1.3) and (11.2 ± 1.4) μmol/L. CENPOANU showed inhibitory action on the growth of MCF-7, in concentration and time-dependant manner. Compared with BCNU, CENPOANU had strong inhibitory effect on the growth of MCF-7 ($P < 0.01$). CENPOANU could inhibit the MCF clone formation rate significantly, in concentration-dependant manner ($P < 0.05$). Compared with effects of 0 h, apoptotic MCF-7 cells as volume reduction and vacuole could be found in trial group as time went on; the reduction of cells, shrinkage and detachment were also found, and the cells of G₂/M, S phase decreased ($P < 0.01$). Proliferation index of MCF-7 in blank control group and CENPOANU group were 92.05% and 42.70%, and A were (1.5 ± 0.1)% and (13.1 ± 1.3)%, respectively. CONCLUSIONS: CENPOANU has better antineoplastic activity than BCNU *in vitro* though blocking the G₂/M, S phase of cell cycle, intervening in cell proliferation and inducing apoptosis. **KEY WORDS** 1-(2-chloroethyl)-3-[2-(2-nitrophenoxy) acetyl]-1-nitrosourea; Antineoplastic activity; Carmustine; Half inhibitory concentration

^Δ 基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(No.0710RJZA124)

* 药师, 硕士。研究方向: 药理学和药动学。E-mail: 754466351@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 新药设计与合成、中药新药开发。E-mail: lz-jiaz@163.com

恶性肿瘤严重威胁着人类的生命。现有抗肿瘤药物按照作用原理可分为破坏 DNA 结构和功能药(包括烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、天然抗肿瘤药和金属络合物等)、干扰 DNA 合成药、抗有丝分裂药和影响蛋白质合成药。近年来还有作用于肿瘤新生血管的药物(如抑制血管生成药物 Avastin) 在肿

瘤治疗中发挥着重要作用^[1-2]。亚硝基脒类属于烷化剂抗肿瘤药物,其通过烷化碱基导致异常碱基配对,使A-T/G-C的正常互补配对关系改变,在复制时引进错误的碱基,致使原来正常的遗传信息发生改变,阻碍DNA的正常复制过程,使有丝分裂不能正常进行。同时,也易导致DNA双链发生断裂^[3]。该类化合物的主要不良反应为骨髓抑制,其致毒机制与抗癌机制基本一致。这一问题严重影响了亚硝基脒的应用^[4]。目前,人们已经合成各种不同结构的亚硝基脒来改造其特性,更好地提高了其疗效。2-氯乙基-3-肌氨酸酰胺-1-亚硝脒(SarCNU)是一种N3位被甲基化的氯乙基亚硝基脒,已被国际癌症协会正式挑选,在治疗恶性神经胶质瘤方面具有广阔的前景。本课题组通过对前期合成先导化合物的结构优化,得到一种新型亚硝基脒氯乙烷类抗肿瘤药物1-(2-氯乙基)-3-[2-(2-硝基苯氧)乙酰基]-1-亚硝基脒{1-(2-chloroethyl)-3-[2-(2-nitrophenoxy) acetyl]-1-nitrosourea, CENPOANU};与经典亚硝基脒类药物不同的是其分子结构中引入了邻芳酰基,从而提高了药物对肿瘤细胞的选择性,降低了对正常细胞的毒性,同时保持经典亚硝基脒类药物分子质量小、脂溶性高、广谱抗癌活性等优势,最终达到高效、低毒的目的。CENPOANU的结构式见图1。

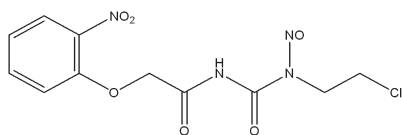


图1 CENPOANU的结构式

Fig 1 Chemical structure of CENPOANU

1 材料

1.1 仪器

流式细胞仪(美国BD公司);BX51荧光显微镜(日本Olympus公司);XD-101倒置显微镜(南京江南光电有限公司产品);BB15 CO₂培养箱(德国 Heraeus公司);BCN-1360超净工作台(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);550酶联免疫检测仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

阳性对照药:卡莫司汀原料药(BCNU,上海波以尔化工有限公司,批号:20110912,纯度:99%);实验药物:CENPOANU(兰州大学药学院实验室合成,批号:2011103,纯度:98%);胎牛血清、RPMI 1640培养基(美国Gibco公司);MTT、Hoechst染色液及碘化丙啶(PI)(美国Sigma公司);膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

1.3 细胞株

人乳腺癌细胞MCF-7、人宫颈癌细胞HeLa、小鼠红白血病细胞MEL均由中国典型培养物保藏中心提供;人恶性胶质瘤细胞U251由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

2 方法

2.1 CENPOANU对MCF-7、HeLa、MEL、U251的抗肿瘤活性

制备对数生长期的细胞悬液,0.4%台盼蓝染色并计数,调细胞数为 $2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 接种在96孔培养板中,每孔200 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 下5% CO₂培养箱预培养24 h。设空白对照组、BCNU组和

CENPOANU组,给药浓度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mmol/ml,各设3个平行孔。分别加入相应药物后继续培养48 h,弃上清液,每孔再加入200 μl 新配制的含0.2 mg/ml MTT的无血清培养基,培养4 h,弃上清液并加入200 μl 二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速振荡10 min混匀,在酶标仪上以选择波长为570 nm、参比波长为450 nm测定各孔的光密度(OD)^[5-6]。根据公式[抑制率=(空白对照组OD值-给药组OD值)/空白对照组OD值 \times 100%]计算抑制率,考察不同浓度CENPOANU对MCF-7、HeLa、MEL、U251的半数抑菌浓度(IC₅₀),其中给药组为BCNU组和CENPOANU组。

2.2 不同浓度CENPOANU作用不同时间对MCF-7的增殖抑制作用

取MCF-7按“2.1”项下方法处理至“预培养24 h”,分别加入CENPOANU并使终浓度分别为0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0倍IC₅₀(0、3.5、7.0、10.5、14.0、28.0 $\mu\text{mol/L}$),继续培养24、36、48 h,照“2.1”项下方法测定OD,计算抑制率。

2.3 不同浓度CENPOANU和BCNU对MCF-7的增殖抑制作用

取MCF-7按“2.1”项下方法处理至“预培养24 h”,分别加入0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0倍IC₅₀(0、3.5、7.0、10.5、14.0、28.0 $\mu\text{mol/L}$)的CENPOANU和BCNU,继续培养48 h,测定OD值,计算抑制率。

2.4 CENPOANU对MCF-7克隆形成的影响

将细胞数调节为 $1 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔板中,每孔200 μl ,设空白对照组和10.5、14.0、28.0 $\mu\text{mol/L}$ CENPOANU组,每组3个复孔,加入相应药物后,继续培养24 h,然后37 $^{\circ}\text{C}$ 下5% CO₂培养,当空白对照组出现肉眼可见的克隆时,终止培养并弃去培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次,4%的多聚甲醛溶液固定15 min(25 $^{\circ}\text{C}$),弃固定液,结晶紫染色20 min,流水冲洗,干燥,将培养皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,肉眼计数并重复3次。计算克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数 \times 100%^[7-9]。

2.5 CENPOANU对MCF-7细胞形态和凋亡形态的影响

将细胞数调节为 $7.5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于预先置入盖玻片的96孔板中,每孔200 μl ,加入14.0 $\mu\text{mol/L}$ CENPOANU,继续培养24 h,弃培养液,显微镜下观察细胞分别在作用0、24、48 h的细胞形态变化。取培养48 h的细胞,弃培养液,加0.5 ml固定液,固定10 min,弃固定液,PBS清洗2次,加入Hoechst染色液0.5 ml,避光染色5 min,滴加抗荧光淬灭封片液,封片,电镜下观察细胞凋亡形态。试验重复3次^[10-12]。

2.6 CENPOANU对MCF-7细胞周期分布的影响

取对数生长期MCF-7,设空白对照组和CENPOANU(14.0 $\mu\text{mol/L}$)组,加入相应药物后,继续培养48 h,收集细胞数约为 $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,800 \times g离心5 min,弃培养液,用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS洗涤,800 \times g离心5 min,弃上清液收集细胞。用100 μl 结合缓冲液和Annexin V-FITC(20 $\mu\text{g/ml}$)10 μl 的标记溶液重悬细胞,室温避光孵育10 min,加入50 $\mu\text{g/ml}$ PI 5 μl ,避光振动5 min,再加入400 μl 结合缓冲液,立即采用流式细胞术检测。流式细胞术的激发波长为488 nm,用波长515 nm的通带滤器检测FITC荧光,另一波长大于560 nm的滤器检测PI荧光^[13-16],

重复3次。采用Cell Quest 软件进行细胞周期分析,计算细胞增殖指数=(S期+G₂/M期)/(G₀期/G₁期+S期+G₂/M期)×100%表示细胞的增殖能力。细胞凋亡指数(Apoptosis index, A)表示细胞凋亡百分率。

2.7 数据处理

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用配对t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 抗肿瘤活性

结果显示,对于MCF-7、HeLa、MEL、U251的IC₅₀,CENPOANU分别为(6.9 ± 2.2)、(14.7 ± 3.5)、(7.8 ± 1.2)、(9.6 ± 2.1) μmol/L,BCNU分别为(14.5 ± 2.6)、(12.4 ± 1.5)、(8.8 ± 1.3)、(11.2 ± 1.4) μmol/L。除HeLa细胞外,CENPOANU对其他细胞的抗肿瘤活性均明显优于BCNU。

3.2 CENPOANU对MCF-7的增殖抑制作用

结果CENPOANU对MCF-7增殖具有抑制作用,且与浓度和时间呈正相关($P < 0.05$),其中28.0 μmol/L CENPOANU作用48 h对MCF-7细胞增殖的抑制作用最高,抑制率为(87.7 ± 3.2)%。不同浓度CENPOANU作用24、36、48 h后对MCF-7的增殖抑制率见图2。

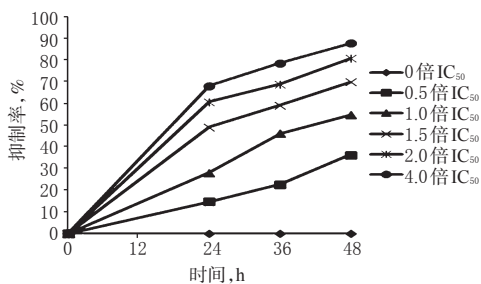


图2 不同浓度CENPOANU作用24、36、48 h后对MCF-7的增殖抑制率

Fig 2 Inhibitory ratio of different concentrations of CENPOANU on MCF-7 after 24, 36 and 48 h

3.3 CENPOANU和BCNU对MCF-7的增殖抑制作用

不同浓度的CENPOANU和BCNU处理MCF-7 48 h后,随着各作用药物浓度的增加,其抑制率逐渐升高。与BCNU比较,0.5、1.0、1.5、2.0、4.0倍IC₅₀的CENPOANU对MCF-7的增殖抑制作用均显著增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明CENPOANU对MCF-7增殖的抑制作用较BCNU显著。不同浓度CENPOANU和BCNU作用后MCF-7的增殖抑制率见表1。

表1 不同浓度CENPOANU和BCNU作用后MCF-7的增殖抑制率(% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Growth inhibitory rate of the growth of MCF-7 after treated with different concentrations of CENPOANU and BCNU (% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	0倍 IC ₅₀	0.5倍 IC ₅₀	1.0倍 IC ₅₀	1.5倍 IC ₅₀	2.0倍 IC ₅₀	4.0倍 IC ₅₀
BCNU	0	28.7 ± 3.1	46.0 ± 2.2	55.9 ± 4.0	72.4 ± 3.5	75.5 ± 3.8
CENPOANU	0	36.4 ± 2.2*	55.7 ± 4.4*	67.2 ± 2.7*	80.8 ± 2.5*	87.5 ± 2.2**

与BCNU比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

vs. BCNU: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 CENPOANU对MCF-7克隆形成的影响

空白对照组和10.5、14.0、28.0 μmol/L CENPOANU组MCF-7的克隆形成率分别为(65 ± 5)%、(21 ± 6)%、(9 ± 3)%、0。表明CENPOANU能明显降低MCF-7的克隆形成率,且与浓度呈正相关($P < 0.05$)。

3.5 MCF-7细胞形态与凋亡形态变化

显微镜下,随着CENPOANU作用时间延长,细胞数量逐渐减少,细胞发生如皱缩、变圆、脱落、出泡、膜呈不对称等形态学变化,这些现象表明CENPOANU对MCF-7增殖有抑制作用,且与时间呈正相关。CENPOANU作用不同时间后MCF-7的显微镜图见图3。

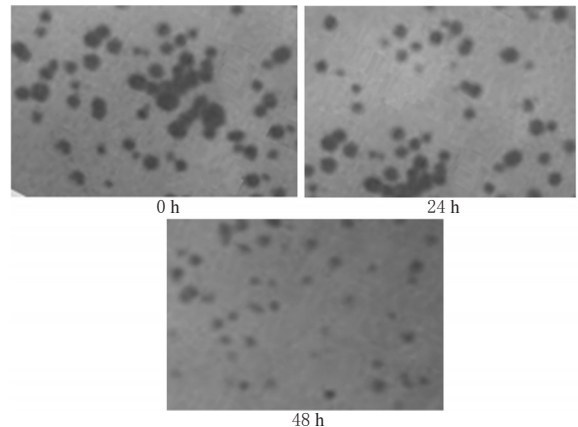


图3 CENPOANU作用不同时间后MCF-7的显微镜图(×400)

Fig 3 Electron micrograph of MCF-7 after treated with CENPOANU for different periods(×400)

电镜下,作用0 h时MCF-7细胞染色质均匀,核形态规则;14.0 μmol/L CENPOANU作用48 h MCF-7可见凋亡细胞,细胞体积缩小,细胞内出现空泡、染色质凝集、碎裂和核分离等凋亡形态学变化典型特征。CENPOANU作用0、48 h后MCF-7的电镜图见图4。

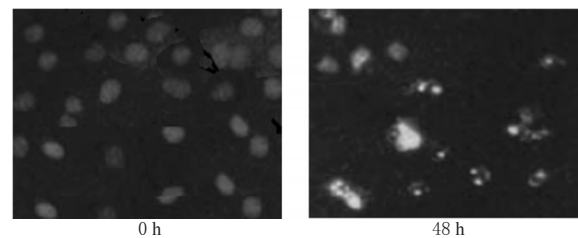


图4 CENPOANU作用0、48 h后MCF-7的电镜图(×400)
Fig 4 Micrograph of MCF-7 after treated with CENPOANU for 0, 48 h(×400)

3.6 MCF-7细胞周期分布

MCF-7的细胞周期分布、A、细胞增殖指数结果见表2。

表2结果表明,CENPOANU诱导MCF-7细胞凋亡并且将细胞周期阻滞在G₂/M、S期。

4 讨论

4.1 药效强度评价

在正常细胞中,由于CENPOANU中苯环的吸电子共扼效应,形成烷基化正离子困难;在肿瘤细胞中,磷酸酯酶活性显著高于正常细胞,使CENPOANU趋向于在体内肿瘤细胞中解

表2 MCF-7的细胞周期分布、A值、细胞增殖指数结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Distribution of cell cycle, A value and proliferation index of MCF-7($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	G ₀ /G ₁ , %	G ₂ /M, %	S, %	A值, %	细胞增殖指数, %
空白对照组	0	8.3±1.9	26.0±2.6	70.1±1.7	1.5±0.1	92.05
CENPOANU组	14.0	57.3±2.9*	6.2±2.9*	36.5±2.8*	13.1±1.3*	42.70*

与空白对照组比较: * $P < 0.01$

vs. blank control group: * $P < 0.01$

离,成稳定的五元、六元环,形成稳定的烷基化正离子,提高了CENPOANU的选择性。IC₅₀是衡量抗肿瘤药体内和体外药效的主要指标,CENPOANU比阳性对照药体外作用强,具有明显优势。该差别可以从本研究CENPOANU的结构设计分析得到解释。CENPOANU是基于其在人体的生化代谢途径,而体外细胞水平试验由于缺乏完整生物体系,比如肿瘤组织的低pH(肿瘤细胞外液pH=6.8)、缺氧条件下高活性还原酶和高活性酰胺酶等,同时缺乏机体大量正常细胞在机体正常生理生化本底条件竞争,使CENPOANU对肿瘤细胞产生毒性的选择性没有完全表现。而在完整生物体系体内,较之机体大量正常细胞,肿瘤细胞具有低pH(肿瘤细胞外液pH=6.8)、缺氧条件下高活性还原酶和高活性酰胺酶等,同时具备机体大量正常细胞在机体正常生理生化本底条件竞争,使CENPOANU在肿瘤细胞中选择性发生程序化的系列化学变化被激活,产生专属性的和有治疗效果的细胞毒作用。所以CENPOANU在体内比体外表现出更强的抗肿瘤作用,且比同类型阳性对照药BCNU具有优势。

4.2 抗肿瘤作用机制

细胞周期分析CENPOANU组G₂/M、S期细胞明显比空白对照组减少($P < 0.01$)。说明CENPOANU诱导MCF-7细胞凋亡并且将细胞周期阻滞在G₂/M、S期。细胞Hoechst染色形态学观察发现,CENPOANU能诱导MCF-7细胞凋亡。CENPOANU体外抗肿瘤试验表明,CENPOANU和BCNU具有相似的作用,通过阻滞肿瘤细胞周期G₂/M、S进程来干预细胞的增殖,同时诱导MCF-7凋亡。

参考文献

[1] Matsumoto G, Ohmi Y, Shindo J. Angiostatin gene therapy inhibits the growth of murine squamous cell carcinoma in vivo[J]. *Oral Oncol*, 2001, 37(4):369.

[2] Sledge GW Jr, Miller KD. Angiogenesis and antiangiogenic therapy[J]. *Curr Probl Cancer*, 2002, 26(1):1.

[3] Huynh GH, Deen DF, Szoka FC Jr. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors[J]. *J Control Release*, 2006, 110(2):236.

[4] 陆晓晶.化学类抗肿瘤药物的研究进展[J].浙江化工, 2010, 41(7):8.

[5] Higley NA, Taylor SL. The steatotic and cytotoxic effects of cholesterol oxides in cultured L cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 1984, 22(12):983.

[6] 张新华, 阎少羽, 李慧琴, 等.胆甾烷-3 β , 5 α , 6 β (6 α)-三醇和胆甾-4-烯-3 β , 6 β (6 α)-二醇的琥珀酸单酯钠合成与抗癌活性[J].中国药物化学杂志, 1995, 5(2):101.

[7] 梁璐, 汪森明, 胡喜钢, 等.醋酸棉酚对人鼻咽癌细胞凋亡的影响及其作用机制探讨[J].实用医学杂志, 2008, 24(7):1099.

[8] 代友彪, 杨四涛, 唐辉, 等.左旋棉酚抗肿瘤作用的研究进展[J].中国药业, 2009, 18(19):1.

[9] Rathinasamy K, Jindal B, Asthana J, et al. Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:213.

[10] Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(11):3443.

[11] Yazdanparast R, Ardestani A. Suppressive effect of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on cellular oxidative damages and apoptosis induced by 2-deoxy- D-ribose: Role of de novo synthesis of glutathione[J]. *Food Chem*, 2009, 114(4):1222.

[12] Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, et al. Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: Role of apoptosis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(4):855.

[13] Azuma H, Takahara S, Horie S, et al. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment[J]. *J Urol*, 2003, 169(60):2372.

[14] 王瑞, 何景华.FTY720抑制人胰腺癌Miopac2细胞株增殖的研究[J].天津医科大学学报, 2008, 14(4):445.

[15] Wang YK, Hong YJ, Wei M, et al. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1):233.

[16] Siu PM, Wang Y, Alway SE. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes[J]. *Life Sci*, 2009, 84(13/14):468.

(收稿日期:2013-06-28 修回日期:2013-08-09)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅