

伪土的宁对人结肠癌HT-29细胞凋亡的影响及其机制研究[△]

冯振宇^{1*},孟霜¹,常剑敏¹,周晓荣²,史敏²,赵建平^{1#}(1.山西省中西医结合医院/山西中医学院中西医结合医院中心实验室,太原 030013;2.山西中医药大学中药学院,太原 030024)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)02-0179-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.02.10

摘要 目的:探讨伪土的宁对人结肠癌HT-29细胞凋亡的影响及其机制。方法:取人结肠癌HT-29细胞,随机分为空白组和低、中、高剂量伪土的宁组(125、250、500 μmol/L),加入不含药培养基或含相应浓度伪土的宁的培养基培养48 h。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况和线粒体跨膜电位;采用Western blotting法检测细胞中P53、Caspase-3、Caspase-9、兔源DNA修复酶(c-PARP)、Bcl-2的蛋白表达水平。结果:与空白组比较,低、中、高剂量伪土的宁组细胞凋亡率显著升高,线粒体跨膜电位均显著降低($P < 0.01$),且均呈现浓度依赖趋势。中、高剂量伪土的宁组细胞中P53、Caspase-3、Caspase-9、c-PARP蛋白表达水平较空白组均显著升高,低、中、高剂量伪土的宁组细胞中Bcl-2蛋白表达水平则显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:伪土的宁可能通过上调P53蛋白、下调Bcl-2蛋白的表达,改变线粒体膜电位,然后激活Caspase-3、c-PARP、Caspase-9的表达,进而激活内源性线粒体通路,发挥促进HT-29细胞凋亡的作用。

关键词 伪土的宁;结肠癌;HT-29细胞;凋亡;线粒体跨膜电位;机制;P53;Caspase-3;Caspase-9;兔源DNA修复酶;Bcl-2

Study on the Effect and Its Mechanism of Pseudostrychnine on Human Colon Cancer HT-29 Cells

FENG Zhenyu¹, MENG Shuang¹, CHANG Jianmin¹, ZHOU Xiaorong², SHI Min², ZHAO Jianping¹(1. Central Laboratory, Shanxi Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Taiyuan 030013, China; 2. College of TCM, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030024, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects and its mechanism of pseudostrychnine on the apoptosis of human colon cancer HT-29 cells. **METHODS:** Human colon cancer HT-29 cells were randomly divided into blank group, pseudostrychnine low-dose, medium-dose and high-dose groups (125, 250, 500 μmol/L). They were cultured with culture medium without medicine or relevant concentration of pseudostrychnine for 48 h. The cell apoptosis and mitochondrial transmembrane potential were detected by flow cytometry. Western blotting assay was employed to detect the protein expression of P53, Caspase-3, Caspase-9, DNA repair enzyme from rabbit (c-PARP) and Bcl-2. **RESULTS:** Compared with blank group, apoptotic rate of cells was increased significantly in pseudostrychnine low-dose, medium-dose and high-dose groups, while mitochondrial transmembrane potential was decreased significantly ($P < 0.01$), in concentration-dependent manner. The protein expression levels of P53, Caspase-3, Caspase-9 and c-PARP were increased in pseudostrychnine medium-dose and high-dose groups, compared with blank group; while those of Bcl-2 were decreased significantly in pseudostrychnine low-dose, medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** Pseudostrychnine may change mitochondrial membrane potential by up-regulating the protein expression of P53 and down-regulating the protein expression of Bcl-2, and activate the expression of Caspase-3, c-PARP and Caspase-9, so as to activate endogenous mitochondrial pathway and promote the apoptosis of HT-29 cells.

KEYWORDS Pseudostrychnine; Colon cancer; HT-29 cells; Apoptosis; Mitochondrial transmembrane potential; Mechanism; P53; Caspase-3; Caspase-9; c-PARP; Bcl-2

结肠癌是一种常见的临床恶性肿瘤,目前我国结肠癌发病率和病死率越来越高,在全部恶性肿瘤中位居第5位,且确诊时大多数已发展至中晚期,严重威胁患者的身体健康和正常生活^[1]。中医药辅助治疗结肠癌有助于提高患者在治疗过程中的免疫力,减少化疗带来的不良反应,降低复发率,改善预后^[2]。马钱子具有抑菌、镇

痛、抗肿瘤和抗炎的功效^[3]。近年来,马钱子活性成分的抗肿瘤作用已成为研究的热点,相关研究表明,马钱子碱在肝癌、乳腺癌、血液系统肿瘤、基底样鳞状细胞癌、S180肉瘤等方面均表现出一定的抑制作用^[4]。本课题组前期对马钱子进行了系统的提取、分离、纯化研究,获得马钱子碱、土的宁、伪土的宁等单体生物碱成分;进一步就上述单体生物碱类成分对结肠癌细胞的抑制作用进行了研究,结果发现伪土的宁对HT-29细胞的抑制作用较强(拟另文发表)。伪土的宁分子式为 $C_{21}H_{22}N_2O_3$,分子量为350(结构式见图1),其在人类结肠癌治疗中的应

△ 基金项目:国家国际科技合作专项项目(No.2014DFA33150)

* 副主任医师,硕士生导师,硕士。研究方向:经方治疗疑难病。电话:0351-2150899。E-mail:sxfzy@163.com

通信作者:主任药师,博士生导师,硕士。研究方向:中药药理学。电话:0351-2150899。E-mail:mengzhaoshuang@126.com

用尚未见报道。因此,本研究考察了伪士的宁对 HT-29 细胞的线粒体跨膜电位、细胞凋亡、相关凋亡蛋白等的影响,并初步探讨其抗结肠癌的可能作用机制,旨在为该单体化合物临床用于结肠癌的治疗提供实验基础。

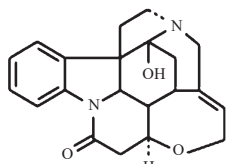


图1 伪士的宁结构式

Fig 1 Structure of pseudostrychnine

1 材料

1.1 仪器

Cyto FLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);MCO-15AC 型 CO₂ 恒温培养箱(台湾 Sanyo 公司);IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);DYCZ-24DN 型垂直电泳仪、DYCZ-40 型电转仪(北京六一仪器厂);5702R 型低速离心机(德国 Eppendorf 公司);微量移液器(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 药品与试剂

伪士的宁对照品(本课题组自制:参照前期研究工艺,取马钱子药材,经加热回流提取,硅胶柱色谱、薄层色谱、半制备高效液相色谱等分离纯化,即得;纯度:95.0%);0.25% 胰蛋白酶(批号:15050065)、胎牛血清(FBS,批号:10099-141)、Mc Coys 5A 培养基(简称“5A 培养基”,批号:16600-082)均购自美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素双抗(批号:PB180120)、pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS,批号:PB180327)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;细胞凋亡检测试剂盒(批号:KGA108)、线粒体膜电位检测试剂盒(批号:KGA602)均购自南京凯基生物科技发展有限公司;蛋白 Marker(加拿大 Fermentas 公司,批号:26619-1);兔源 DNA 修复酶(PARP)多克隆抗体(美国 Affinity 公司,批号:AF7023);兔源 P53 多克隆抗体(批号:10442-1-AP)、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(批号:BM0627)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗(批号:BA1051)、HRP 标记羊抗兔二抗(批号:BA1054)均购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体(批号:ab184787)、兔抗人 Caspase-9 单克隆抗体(批号:ab202068)、兔源 Bcl-2 多克隆抗体(批号:ab59348)均购自英国 Abcam 公司;ECL 化学发光底物试剂(美国 Thermo Scientific Pierce 公司,批号:NCI5079);X 光胶片(日本柯达公司,批号:XBT-1);显影定影试剂盒(天津市汉中摄影材料厂);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为去离子水。

1.3 细胞

人结肠癌 HT-29 细胞(批号:CL-0118)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将 HT-29 细胞置于含 10% FBS+1% 青霉素-链霉素双抗混合溶液^[4-5]的 5A 培养基(即完全培养基)中,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,待细胞处于对数生长期时用于后续试验。

2.2 伪士的宁对 HT-29 细胞凋亡的影响考察

取处于对数生长期、生长状态良好的 HT-29 细胞,以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。将细胞分为空白组和伪士的宁低、中、高剂量组(125、250、500 μ mol/L;剂量根据本课题组前期研究结果制定),分别加入不含药的 5A 培养基或含有相应浓度药物的 5A 培养基后,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 48 h。取出细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min;除去上清液,加入适量 PBS 重悬、润洗 2 次后,以 1 000 r/min 离心 5 min;除去上清液,将细胞重悬于 PBS 100 μ L 中,缓慢加入预冷的 80% 乙醇 700 μ L,再加入 Binding Buffer 500 μ L 重悬细胞;加入 Annexin V-FITC 试剂 5 μ L 混匀后再加入 PI 试剂 5 μ L,轻轻振摇混匀,室温避光反应 15 min 使染色;采用流式细胞仪检测分析细胞凋亡情况。

2.3 伪士的宁对 HT-29 细胞线粒体跨膜电位的影响考察

按“2.2”项下方法取 HT-29 细胞接种、培养、分组、加入相应药物并培养 48 h 后,收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,除去上清液,用 PBS 洗涤细胞 3 次;以 0.25% 胰蛋白酶消化并收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min;弃去上清液,加入适量 PBS 重悬、润洗 3 次,收集不多于 1×10^6 个/mL 的细胞,以 JC-1 工作液(取 $10 \times$ Incubation Buffer,以灭菌水稀释成 $1 \times$ Incubation Buffer,预热至 37 °C;吸取线粒体膜电位检测试剂盒中的 JC-1 试剂 1 μ L,加入 $1 \times$ Incubation Buffer 1 000 μ L 稀释,即得)1 000 μ L 混悬,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 20 min;室温下以 1 200 r/min 离心 5 min,收集细胞,用 $1 \times$ Incubation Buffer 润洗 2 次,再以 $10 \times$ Incubation Buffer 200 μ L 重悬细胞后,用流式细胞仪检测分析其跨膜电位变化。

2.4 伪士的宁对细胞中 Caspase-3、P53、Caspase-9、c-PARP、Bcl-2 蛋白表达的影响考察

采用 Western blotting 法测定细胞中各目标蛋白的表达水平。取“2.2”项下 HT-29 细胞接种、培养、分组、加入相应药物并培养 48 h 后,弃去培养液,以 PBS 洗涤 3 次;弃去 PBS 液,培养皿冰浴,每皿细胞加入含 PMSF 的裂解液进行裂解后,提取蛋白。取蛋白 40 μ g,在 60 V 电压下电泳,待 Marker 出现红色条带时,将电压升至 120 V 继续电泳;然后电转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液在室温条件下摇床封闭 2 h,加入

β -actin(1:1 000)、P53(1:2 000)、Caspase-3(1:2 000)、PARP(1:1 000)、Caspase-9(1:2 000)、Bcl-2(1:800)等相应一抗,于4℃下孵育过夜;以TBST缓冲液洗涤6次,加入HPR标记二抗(1:50 000),于37℃下摇床孵育2h;以TBST缓冲液洗涤6次,ECL显色曝光,晾干胶片,扫描。以 β -actin为参比,采用BandScan 5.0软件分析目标蛋白条带的相对灰度值,用以表示蛋白表达水平。

2.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件分析处理试验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 伪土的宁对HT-29细胞凋亡的影响

流式细胞凋亡检测结果显示,与空白组比较,伪土的宁低、中、高剂量组细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率均显著升高($P < 0.01$),且随着伪土的宁浓度的升高,细胞总凋亡率也随之升高,表明伪土的宁对HT-29细胞的促凋亡作用呈浓度依赖趋势。各组细胞流式细胞凋亡图见图1(图中,右下象限为早期凋亡细胞群,右上象限为晚期凋亡细胞群);凋亡率测定结果见表1。

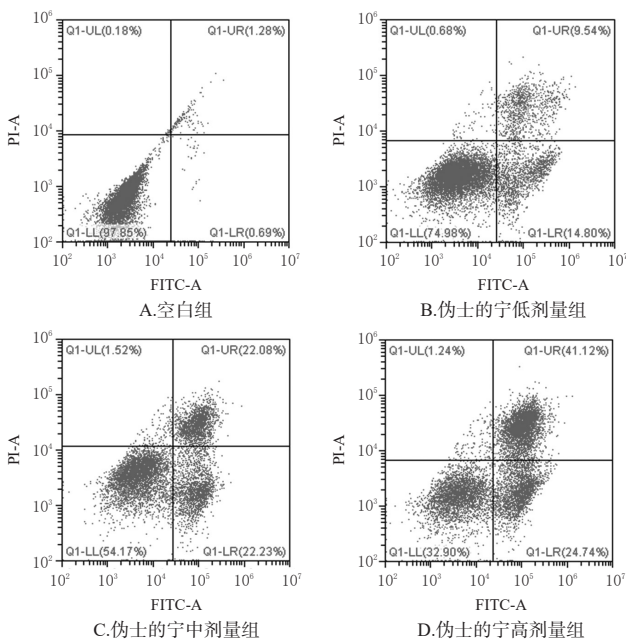


图2 各组细胞流式细胞凋亡图

Fig 2 Flow cytometry apoptosis of cells in each group

3.2 伪土的宁对HT-29细胞线粒体跨膜电位的影响

线粒体跨膜电位检测结果显示,与空白组比较,伪土的宁低、中、高剂量组细胞的线粒体跨膜电位显著降低($P < 0.01$),且随着伪土的宁浓度的升高,细胞线粒体跨膜电位随之降低,表明伪土的宁对HT-29细胞跨膜电位的降低作用呈浓度依赖趋势。各组细胞流式细胞跨

膜电位图见图3(图中,红色荧光表示线粒体跨膜电位较高,呈聚集状态;绿色荧光代表线粒体跨膜电位较低,呈离散状态);线粒体跨膜电位检测结果见表2。

表1 各组细胞凋亡率检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Results of apoptotic rate of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	早期凋亡细胞率	晚期凋亡细胞率	总凋亡率
空白组	1.22 ± 0.50	1.60 ± 0.30	2.81 ± 0.74
伪土的宁低剂量组	15.23 ± 0.60**	10.75 ± 1.17**	25.97 ± 1.73**
伪土的宁中剂量组	20.58 ± 3.09**	21.20 ± 1.02**	41.79 ± 3.01**
伪土的宁高剂量组	25.56 ± 5.03**	39.20 ± 5.76**	64.76 ± 1.10**

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$

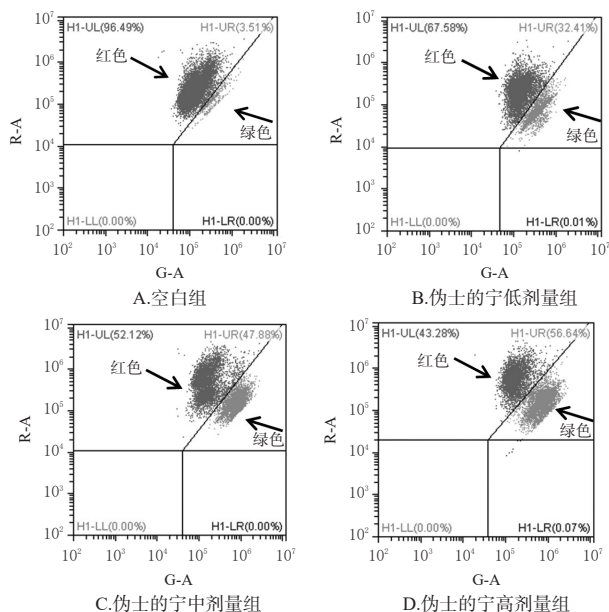


图3 各组细胞流式细胞跨膜电位图

Fig 3 Flow cytometry transmembrane potential of cells in each group

表2 各组细胞线粒体跨膜电位检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Results of mitochondrial transmembrane potential of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	红色荧光细胞数占比	绿色荧光细胞数占比
空白组	95.60 ± 0.83	4.40 ± 0.83
伪土的宁低剂量组	69.33 ± 1.53**	30.63 ± 1.56**
伪土的宁中剂量组	54.58 ± 2.55**	45.41 ± 2.56**
伪土的宁高剂量组	39.38 ± 3.88**	60.59 ± 3.91**

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$

3.3 伪土的宁对HT-29细胞相关蛋白表达的影响

Western blotting法检测结果显示,与空白组比较,伪土的宁中、高剂量组细胞中P53、Caspase-3、Caspase-9、c-PARP的蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);伪土的宁低、中、高剂量组细胞中Bcl-2蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见图4、表3。

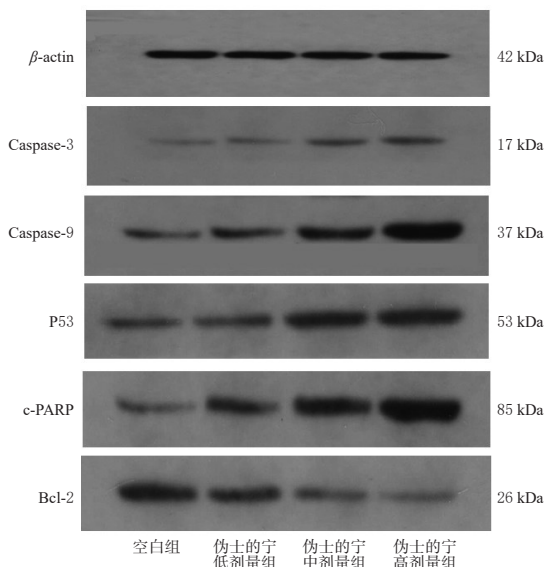


图4 各组细胞中相关蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoretogram of related protein expression in cells of each group

表3 各组细胞中相关凋亡蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Results of expression levels of apoptosis-related proteins in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	P53/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	Caspase-9/ β -actin	c-PARP/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
空白组	0.257 9 \pm 0.037 5	0.086 1 \pm 0.021 2	0.162 1 \pm 0.039 8	0.126 1 \pm 0.020 2	0.674 5 \pm 0.048 1
伪土的宁低剂量组	0.360 0 \pm 0.024 3	0.115 9 \pm 0.018 6	0.247 1 \pm 0.076 0	0.235 7 \pm 0.056 9	0.517 2 \pm 0.081 7*
伪土的宁中剂量组	0.524 1 \pm 0.055 9**	0.208 8 \pm 0.016 8**	0.428 7 \pm 0.068 0*	0.381 5 \pm 0.098 1**	0.319 0 \pm 0.076 9**
伪土的宁高剂量组	0.660 0 \pm 0.090 1**	0.286 5 \pm 0.034 6**	0.662 9 \pm 0.170 5**	0.545 1 \pm 0.117 3**	0.236 8 \pm 0.057 9**

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:vs. blank group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

各种促细胞凋亡信号作用下,线粒体通透性转变孔不可逆地过度开放,导致线粒体跨膜电位崩解、呼吸链解耦联,线粒体基质渗透压升高、内膜肿胀,并释放出膜间促凋亡蛋白,最终导致细胞凋亡^[9]。因此,线粒体跨膜电位的改变预示细胞可能出现凋亡,可为细胞凋亡的机制研究提供一定的理论基础。

本研究结果显示,与正常对照组比较,不同剂量伪土的宁作用于HT-29细胞48 h后,能显著升高细胞凋亡率($P<0.01$),表明伪土的宁具有明显的促HT-29细胞凋亡的作用,且这一作用呈浓度依赖趋势;同时,不同剂量的伪土的宁均能显著降低HT-29细胞的线粒体跨膜电位($P<0.01$),并使电位由聚集态向离散态变化的趋势增大,且这一作用呈浓度依赖趋势。

Bcl-2家族由抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-xL等)和促凋亡蛋白(Bax、Bak等)组成,共同构成一个相互作用的控制细胞凋亡的网络,是细胞凋亡内源性线粒体途径的重要调节因子^[10]。Bcl-2是细胞凋亡的负调节因子。Caspase家族蛋白分为启动子(包括Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9)和效应器(包括Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7),启动子的作用是在各种刺激下(如药物、生长因子等)发生自我激活并识别和活化下游的Caspase蛋白,

4 讨论

马钱子为马钱科植物马钱的干燥成熟种子,具有通络止痛、散结消肿的功效,常用于治疗跌打损伤、骨折肿痛、风湿顽痹、麻木瘫痪、痈疽疮毒、咽喉肿痛等^[6]。近年来,关于马钱子活性成分抗肿瘤作用的研究取得了一定成果^[7]。前期研究证实,伪土的宁作为马钱子中提取获得的生物碱单体化合物,对结肠癌具有一定的抑制作用,且毒副作用较小。因此,本研究通过考察伪土的宁作用于HT-29细胞后对其凋亡、线粒体跨膜电位及相关凋亡蛋白表达水平等的影响,对该化合物抗结肠癌的可能作用机制进行了初步的探讨。

正常情况下,细胞线粒体外膜为高通透性,而内膜通透性相对较低,线粒体内膜上存在的质子泵可将基质中的质子泵入膜外,从而使得线粒体膜内外形成跨膜电位^[8]。线粒体跨膜电位的降低是细胞凋亡早期的不可逆事件^[7]。当线粒体膜内外的电势差减少时,线粒体膜电位降低,可引起线粒体膜内外发生一系列生化改变。在

实施蛋白通过作用于特异性底物使细胞发生凋亡,Caspase活化可导致细胞凋亡进入不可逆阶段^[11]。Caspase-3是Bcl-2的下游调控蛋白;PARP是Caspase-3的切割底物,也是Caspase-3激活的标志。Caspase-3被激活后构象发生改变形成剪切体cleaved-Caspase-3,cleaved-Caspase-3进一步剪切PARP,使总PARP减少、cleaved-PARP增加,导致PARP失去正常功能,最终使得核小体间DNA降解、细胞发生凋亡^[10]。P53是Bcl-2的上游调控基因,P53通过调节Caspase-3蛋白酶上调Bcl-2的基因表达,从而影响相关凋亡功能^[12]。本研究结果显示,中、高剂量伪土的宁作用于HT-29细胞后,Caspase-3、Caspase-9、P53、c-PARP(PARP的活化形式)的蛋白表达水平均显著升高,低、中、高剂量伪土的宁作用后使细胞中Bcl-2蛋白表达均显著下调,表明其能够通过调控P53、Caspase-3、PARP、Caspase-9、Bcl-2蛋白的表达诱导HT-29细胞发生凋亡。

综上所述,伪土的宁可能通过上调P53蛋白、下调Bcl-2蛋白的表达,改变线粒体膜电位,然后激活Caspase-3、c-PARP、Caspase-9的表达,进而激活内源性线粒体通路,发挥促进结肠癌HT-29细胞凋亡的作用。但该化合物对结肠癌细胞的具体促凋亡途径还有待于进一步

广金钱草多糖指纹图谱的建立、含量测定及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究^Δ

程轩轩*, 陈亮元, 郑诗嘉, 唐晓敏, 杨全*(广东药科大学中药学院/国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室/国家中药材产业技术体系广州综合试验站/广东省南药规范化种植与综合开发工程技术研究中心, 广州 510006)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)02-0183-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.02.11

摘要 目的:建立广金钱草多糖的指纹图谱,分析其单糖组成及含量,并考察广金钱草多糖对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制作用。方法:采用水提醇沉法提取广金钱草多糖,经三氟乙酸水解、1-苄基-3-甲基-5-吡唑啉酮衍生化后,采用高效液相色谱法(HPLC)建立指纹图谱(以葡萄糖峰为参照),并进行单糖组成及含量分析。含量测定色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈,流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(用氢氧化钠调节pH至6.8),梯度洗脱,流速为0.8 mL/min,检测波长为250 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μ L。以阿卡波糖为对照,采用对硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃苷法考察广金钱草多糖对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制活性。结果:18批药材样品的HPLC指纹图谱有9个共有峰,其中15批药材样品的相似度大于0.90;共指认甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖等7个共有峰。其中,鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的含量分别为0.471~2.092、1.379~8.919、2.560~35.679、1.194~6.905、0.566~4.158 mg/g;以鼠李糖为基准,其余4种单糖的摩尔比分别为1.58~4.07、2.26~19.95、2.20~4.21、1.31~2.86。广金钱草多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性呈现随剂量升高而增强的趋势,其半数抑制浓度为0.70 mg/mL,低于阳性对照阿卡波糖(7.76 mg/mL)。结论:不同批次广金钱草的多糖组成均以葡萄糖为主,各单糖含量有所差异。广金钱草多糖对 α -葡萄糖苷酶具有明显的体外抑制作用,且活性强于阿卡波糖。

关键词 广金钱草多糖;单糖;含量;指纹图谱;高效液相色谱法; α -葡萄糖苷酶;抑制活性

步研究证实。

参考文献

- [1] 卢天宇.大肠癌最新研究进展及中医治疗演变[D].北京:北京中医药大学,2008.
 - [2] 林燕,马蕾,布力布·吉力斯汉,等.中医药辅助治疗结肠癌的应用研究进展[J].中国药师,2018,21(9):1637-1640.
 - [3] 王晓岚,龚千锋.马钱子的炮制沿革、药理作用及安全性的研究进展[J].江西中医药,2013,44(3):70-72.
 - [4] LAI KC, HUANG AC, HSU SC, et al. Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human colon cancer HT29 cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase plasminogen (uPA) through PKC and MAPK signaling pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(5):2935-2942.
 - [5] CHOI PM, TCHOU-WONG KM, WEINSTEIN IB. Over-expression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression[J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(9):4650-4657.
 - [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:50-51.
 - [7] 赵立民,刘玉国,牛作兴.马钱子碱抗肿瘤作用的研究进展[J].中华肿瘤防治杂志,2013,20(11):877-880.
 - [8] 刘晓婷,王延让,张明.线粒体介导细胞凋亡的研究进展[J].环境与健康杂志,2013,30(2):182-183.
 - [9] 陈慧莉,李建华,王树庆.线粒体跨膜电位和细胞凋亡相关性的研究[J].医学综述,2007,13(14):1041-1043.
 - [10] 马陈皋.大黄素对人胃癌细胞株SGC-7901凋亡的影响与初步机制[J].世界华人消化杂志,2016,24(16):2463-2469.
 - [11] CHIPUK JE, BOUCHIER-HAYES L, GREEN DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8):1396-1402.
 - [12] PRATHEESHKUMAR P, KUTTAN G. Oleanolic acid induces apoptosis by modulating P53, Bax, Bcl-2 and caspase-3 gene expression and regulates the activation of transcription factors and cytokine profile in B16F[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2011, 30(1):21-31.
- (收稿日期:2019-06-25 修回日期:2019-12-03)
(编辑:段思怡)

^Δ 基金项目:国家发展和改革委员会新兴产业重大工程包/国家中医药管理局中药标准化行动计划项目(No.ZYBZ-Y-GD-13/ZYY-2017-099)

* 副教授,博士。研究方向:中药化学成分与药理活性。电话:020-39352176。E-mail:gdxyxcx@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:道地药材质量及形成机制。电话:020-39352353。E-mail:yangquan7208@vip.163.com