

川楝素诱导人肺癌A549细胞凋亡

刘盛楠 邵淑丽* 王维熠 于秋芬 苗长久 李珊珊 冯元 焦凯贺

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 该研究旨在探讨川楝素诱导人肺癌A549细胞凋亡作用及其作用机制。通过不同浓度的川楝素作用于A549细胞48 h后, 采用MTT法检测细胞活性; 光学显微镜及荧光显微镜下观察细胞形态结构; 流式细胞术检测细胞凋亡率、线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)和细胞周期; 实时定量RT-PCR和Western blot分别检测*Bax*、*Bcl-2*、*Fas*、*Cytc*(细胞色素C)和*Caspase-3*基因mRNA和蛋白质水平。结果显示, 在一定浓度范围内, 川楝素能抑制A549细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 且呈剂量依赖性。川楝素作用48 h的最佳药物浓度是40 $\mu\text{mol/L}$, 增殖抑制率为46.73% \pm 1.47%, 细胞凋亡率为13.18% \pm 0.41%, 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)显著下降($P < 0.01$), 细胞阻滞于G₂期和S期; *Bcl-2*的表达显著降低, *Bax*、*Fas*、*Cytc*和*Caspase-3*的表达显著增加($P < 0.01$), 提示川楝素可能通过上调*Bax*、*Fas*、*Cytc*和*Caspase-3*基因和下调*Bcl-2*基因诱导人肺癌A549细胞凋亡。

关键词 川楝素; A549细胞; 凋亡; *Bcl-2*; *Bax*; *Fas*; *Cytc*; *Caspase-3*

Toosendanin Induces the Apoptosis of Human Lung Cancer A549 Cells

Liu Shengnan, Shao Shuli*, Wang Weiyi, Yu Qiufen, Miao Changjiu, Li Shanshan, Feng Yuan, Jiao Kaihe

(College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract To investigate the apoptosis-inducing effect of Toosendanin in human lung cancer A549 cells and its mechanisms, MTT assay was used to determine A549 cells activity. Light microscope, fluorescence microscope were used to observe the morphology change of apoptosis in A549 cells. The apoptosis, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cell cycle distribution of A549 cells were assayed by flow cytometry. The mRNA and protein levels of *Bax*, *Bcl-2*, *Fas*, *Cytc* (Cytochrome C) and *Caspase-3* were measured by Real-time RT-PCR and Western blot. The results showed that Toosendanin inhibited the growth and induced the apoptosis of A549 cells in a dose-dependent manner. The concentration for the treatment was optimized to 40 $\mu\text{mol/L}$ after 48 h in this study and the inhibition rate was up to 46.73% \pm 1.47% for the proliferation, the apoptotic rate could be up to 13.18% \pm 0.41%. The level of $\Delta\Psi_m$ decreased and caused a significant S arrest at the expense of G₂ phase cell numbers. The results suggested that Toosendanin induced the apoptosis of lung cancer cells through up-regulation of *Bax*, *Fas*, *Cytc* and *Caspase-3* and down-regulation of *Bcl-2*.

Keywords Toosendanin; A549 cells; apoptosis; *Bcl-2*; *Bax*; *Fas*; *Cytc*; *Caspase-3*

川楝素(Toosendanin)是从楝科植物川楝的根皮 有多种独特的生物效应和在临床医学及农业上的应用价值^[1]。近年来的研究表明, 川楝素能够抑制肿瘤

收稿日期: 2015-04-16 接受日期: 2015-07-13

黑龙江省自然科学基金(批准号: C201241)和黑龙江省教育厅科学技术项目(批准号: 12511611)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

Received: April 16, 2015 Accepted: July 13, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (Grant No.C201241) and the Project of Science and Technology of Heilongjiang Provincial Educational Department (Grant No.12511611)

*Corresponding author. Tel: +86-452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

网络出版时间: 2015-08-06 17:11:47

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150806.1711.001.html>

细胞增殖,但其作用机制尚不明确。为此,本研究以人肺癌A549细胞为研究对象,探讨川楝素对细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和抗体 人肺癌A549细胞购于北京肿瘤生物学检测中心。Bax、Bcl-2、Fas、Cycs、Caspase-3和 β -actin一抗购自生工生物工程(上海)有限责任公司;二抗购自上海宝曼生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 川楝素购自南通飞宇生物科技有限公司。罗丹明123(Rho123)购自Sigma公司。Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒、PI染液、线粒体膜电位检测试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司。RPMI-1640培养基购自Gibco公司。胎牛血清、二甲基亚砷、总RNA提取试剂盒、全蛋白提取试剂盒均购自生工生物工程(上海)有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 配制含10%的胎牛血清、100 mg/L链霉素和 1×10^5 U/L青霉素的完全培养液,于37℃、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中进行培养。

1.2.2 细胞增殖能力检测 取对数生长期的A549细胞,加入终浓度为0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μ mol/L的川楝素,分别培养24, 48, 72 h。用酶标仪在570 nm波长下测定吸光度(D)值,然后按公式:细胞增殖抑制率=(实验组平均D值-空白组平均D值)/(对照组平均D值-空白组平均D值) \times 100%,计算出细胞增殖抑制率并通过软件计算获得IC₅₀值。

1.2.3 细胞形态观察 取对数生长期的A549细胞,分别加入终浓度为0, 20, 40, 60 μ mol/L的川楝素,作用48 h后,光学显微镜下观察细胞形态结构并拍照。将原有培养基倒掉,加入1 mL预冷的PBS和200 μ L吖啶橙(0.5 μ g/ μ L)混匀后,室温孵育3~5 min,荧光显微镜下观察细胞形态结构并拍照。

1.2.4 细胞凋亡率的检测 用胰蛋白酶消化收集经0, 20, 40, 60 μ mol/L的川楝素作用48 h的A549细胞,加入预冷的PBS洗涤细胞2次,向悬液中加入500 μ L Binding Buffer充分混匀后,再加入5 μ L Annexin V-FITC染液和5 μ L Propidium Iodide(PI)染液,室温下避光孵育15 min后进行上机检测。

1.2.5 细胞线粒体跨膜电位的检测 用胰蛋白酶消化收集经0, 20, 40, 60 μ mol/L的川楝素作用48 h的

A549细胞,加入预冷的PBS洗涤细胞2次,向悬液中加入稀释好的罗丹明123 10 μ L,于37℃培养箱中避光孵育30 min,再用预冷的PBS洗涤细胞2次后悬浮细胞,最后用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的变化。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期的变化 用胰酶消化收集经0, 20, 40, 60 μ mol/L的川楝素作用48 h的A549细胞。用10 mmol/L PBS洗涤细胞2次,弃去上清,向其中按1:3的比例加入PBS和无水乙醇,充分混匀,于4℃固定18 h后,离心收集细胞,用预冷的PBS洗涤细胞2次,向悬液中加入500 μ L PI染液,再加入RNaseA(使其终浓度为0.25 mg/mL),于37℃、避光孵育30 min后,进行流式细胞仪的上机检测。

1.2.7 实时定量PCR检测 A549细胞经0, 20, 40, 60 μ mol/L的川楝素作用48 h后提取总RNA,并反转录成cDNA。反应体系为25 μ L Hotstart Fluor-PCR mix, 21 μ L ddH₂O, 2 μ L cDNA和上下游引物各1 μ L(用Primer 5.0进行引物设计)。Bax基因上游引物序列为:5'-AAG CTG AGC GAG TGT CTC AAG-3',下游引物序列为:5'-CAA AGT AGA AAA GGG CGA CAA C-3',扩增产物大小为178 bp。Bcl-2基因上游引物序列为:5'-ATG TGT GTG GAG AGC GTC AAC-3',下游引物序列为:5'-AGC AGC CAG GAG AAA TCA AAC-3',扩增产物大小为180 bp。Fas基因上游引物序列为:5'-TGA TGT GGA ACA CAG CAA GG-3',下游引物序列为:5'-GGC TGT GGT GAC TCT TAG TGA TAA-3',扩增产物大小为107 bp。Cycs基因上游引物序列为:5'-CTG GGT GAC GAG TGA AAC TG-3',下游引物序列为:5'-TGA GCA CAA CAG GAA CTG GA-3',扩增产物大小为104 bp。Caspase-3基因上游引物序列为:5'-GGA ACG AAC GGA CCT GTG-3',下游引物序列为:5'-GCC TCC ACT GGT ACT TCT G-3',扩增产物大小为135 bp。 β -actin基因上游引物序列为:5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3',下游引物序列为:5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3',扩增产物大小为205 bp(β -actin为内参)。实验设3次重复,应用实时荧光定量PCR仪自带的分析软件测得相应的Ct值,再采用power(2^{- Δ Ct})法计算出各实验组细胞的Bax、Bcl-2、Fas、Cycs和Caspase-3 mRNA的表达量。

1.2.8 Western blot检测 A549细胞经0, 20, 40, 60 μ mol/L的川楝素作用48 h后,提取全蛋白进行

SDS-PAGE凝胶电泳。然后将蛋白经恒电流转移到PVDF膜上, 封闭液封闭1 h后, 加入稀释好的Bax、Bcl-2、Fas、Cycs、Caspase-3和 β -actin一抗(1:500), 4 °C恒温摇床孵育过夜。PBST洗膜, 加入二抗IgG(1:15 000), 4 °C避光孵育1 h, PBST洗膜后, 进行上机扫描检测。

1.3 统计学分析

数据经SPSS 16.0软件分析处理后, 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间比较用LSD法检测其差异性, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 以 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 川楝素抑制A549细胞增殖能力

川楝素在浓度为10~70 $\mu\text{mol/L}$ 之间对A549细胞的增殖具有显著的抑制作用且呈剂量和时间依赖关系(图1)。川楝素作用A549细胞48 h的最佳药物浓度为40 $\mu\text{mol/L}$, IC_{50} 值为40.206 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 川楝素对A549细胞形态结构的影响

2.2.1 光学显微镜下观察细胞形态变化 对照组细胞呈梭形且大小均匀, 贴壁生长; 各加药组细胞随着药物浓度的增大, 细胞形态逐渐发生改变, 部分细胞变圆, 体积变小, 出现凋亡小体和小泡, 呈现凋亡

特征(图2)。

2.2.2 荧光显微镜下观察细胞形态结构变化 对照组细胞数量较多且结构清晰, 经吖啶橙染色后, 核呈圆形, 核仁显现橘黄色荧光且细胞质均匀; 随着药物浓度的增大, 细胞数量逐渐减少, 体积明显缩小, 箭头标注的部分细胞出现明显的凋亡小体(图3)。

2.3 川楝素诱导A549细胞凋亡

川楝素对A549细胞凋亡的影响结果见图4和表1。结果显示, 川楝素能够诱导肺癌A549细胞凋亡, 且随着药物浓度的不断增大早期凋亡细胞百分比呈现先增加后减少的趋势。其中, 20 $\mu\text{mol/L}$ 和40 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素作用48 h时变化最显著。早期凋亡细胞百分

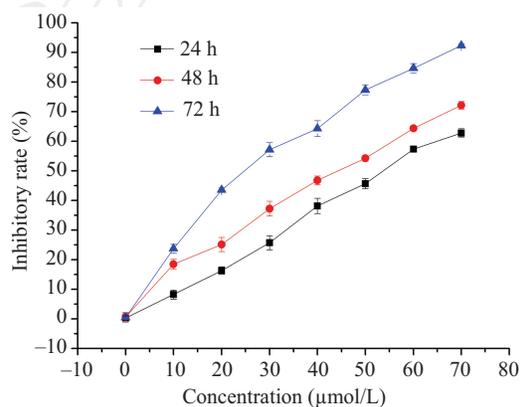
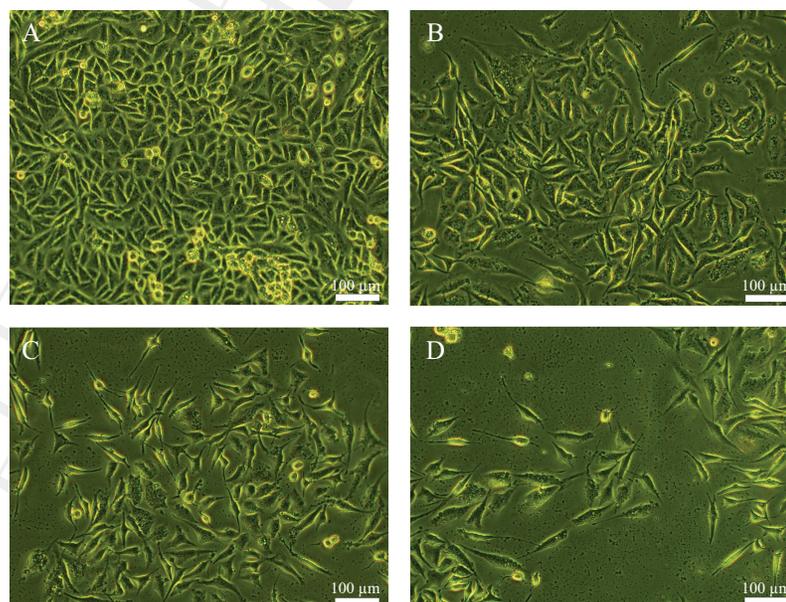


图1 川楝素对A549细胞增殖能力的影响

Fig.1 Effects of Toosendanin on the proliferation of A549 cells

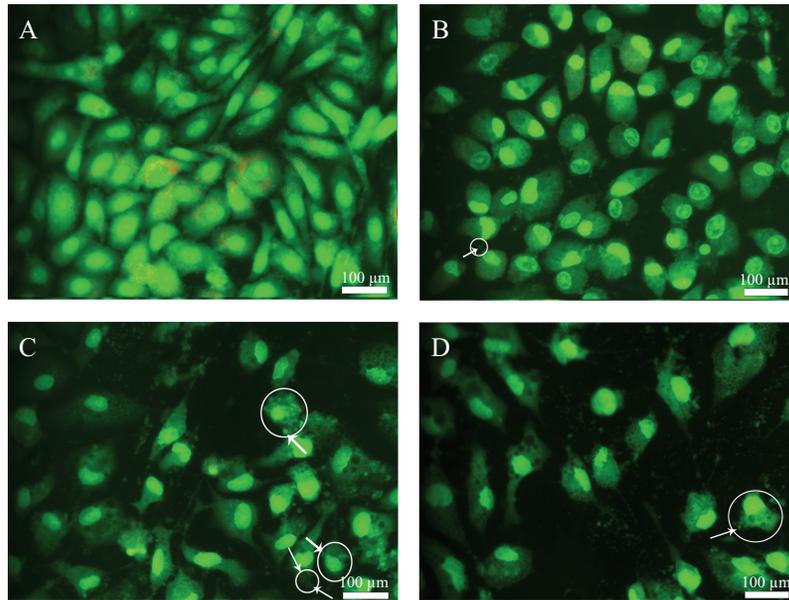


A: 对照; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组。

A: control check; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group.

图2 光学显微镜下观察川楝素对A549细胞形态的影响

Fig.2 The cell morphological changes in Toosendanin-treated A549 cells under light microscope

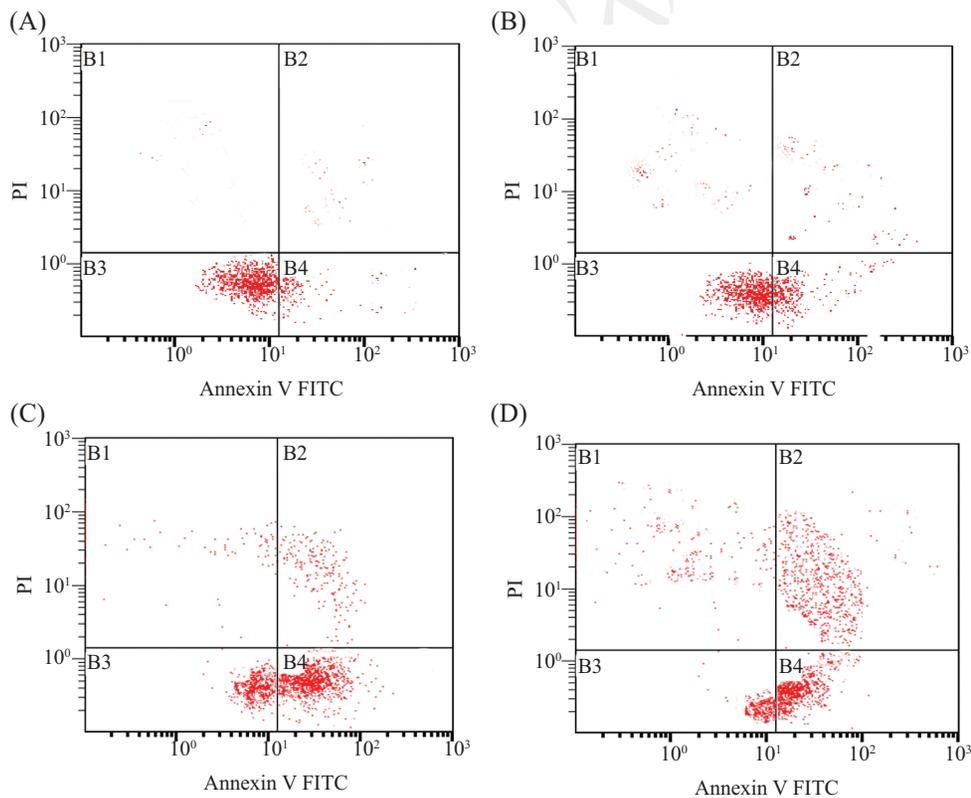


A: 对照; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组。箭头所示为凋亡小体。

A: control check; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group. The arrows showed apoptosis bodies.

图3 荧光显微镜下观察川楝素对A549细胞形态的影响

Fig.3 The nuclear morphological changes in Toosendanin-treated A549 cells under fluorescence microscope



A: 对照; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组。

A: control check; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin group.

图4 川楝素对A549细胞凋亡率的影响

Fig.4 The effect of Toosendanin on apoptosis rate in A549 cells

比分别为 $10.34\% \pm 0.35\%$ 和 $13.18\% \pm 0.41\%$ ($P < 0.05$), 且40 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值。

2.4 川楝素对A549细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响
川楝素对A549细胞的线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)

的影响结果见图5和表2。结果显示, 对照组细胞线粒体膜电位为 255.66 ± 13.17 , 各加药组细胞经川楝素作用48 h后线粒体膜电位显著降低, 分别为 186.32 ± 10.27 、 143.33 ± 12.54 和 112.87 ± 8.39 ($P < 0.01$)。

2.5 川楝素对A549细胞周期的影响

川楝素对A549细胞周期的影响结果见图6和图7。结果显示, 对照组的A549细胞大多分布于G₁期, 少数分布于S期, G₂期最少。用不同药物浓度处理细胞48 h后, G₁期细胞含量先降低后升高。而G₂期和S期细胞含量先升高后降低, 且在40 μmol/L处均达到

最大值。其中, 在20 μmol/L和40 μmol/L处, G₂期和S期细胞变化显著。

2.6 川楝素对A549细胞凋亡相关基因mRNA水平的影响

川楝素对A549细胞凋亡相关基因mRNA水平的影响结果见图8。结果显示, 与对照组相比, 川楝素作用A549细胞48 h后*Bax*、*Fas*、*Cycs*和*Caspase-3*基因表达显著上调, *Bcl-2*基因表达显著下调, 其中*Bax*和*Cycs*基因的变化最显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表1 流式细胞术检测川楝素诱导A549细胞48 h后的细胞凋亡率
Table 1 FCM analysis of A549 cells apoptosis rate after treatment with Toosendanin for 48 h

浓度(μmol/L) Concentration (μmol/L)	早期凋亡百分比(%) Early apoptosis rate (%)
0	8.62±0.23
20	10.34±0.35*
40	13.18±0.41*▲
60	11.25±0.26*

* $P < 0.05$, 与对照组比较; ▲ $P < 0.05$, 40 μmol/L川楝素组和20 μmol/L川楝素组相比较。

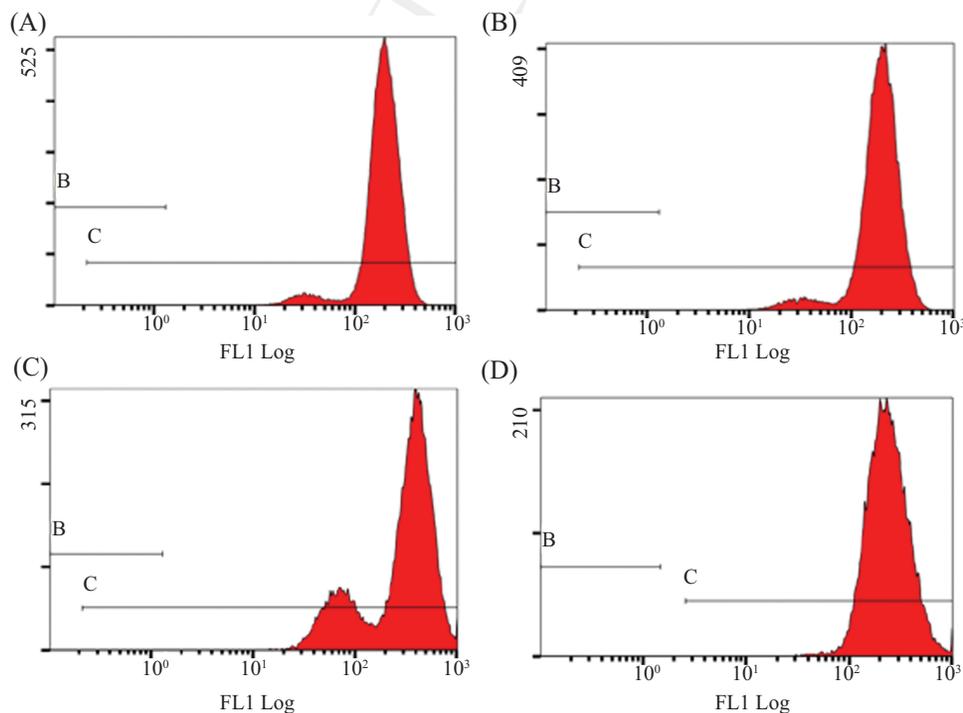
* $P < 0.05$ compared with control group; ▲ $P < 0.05$ compared between 40 μmol/L Toosendanin and 20 μmol/L Toosendanin groups.

表2 川楝素对A549细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 The mitochondrial membrane potential change of A549 cells treated with Toosendanin ($\Delta\Psi_m$) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度(μmol/L) Concentration (μmol/L)	线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$
0	255.66±13.17
20	186.32±10.27**
40	143.33±12.54***▲▲
60	112.87±8.39**

** $P < 0.01$, 与对照组比较; ▲▲ $P < 0.01$, 40 μmol/L川楝素组和20 μmol/L川楝素组相比较。

** $P < 0.01$ compared with control group; ▲▲ $P < 0.01$ compared between 40 μmol/L Toosendanin and 20 μmol/L Toosendanin groups.

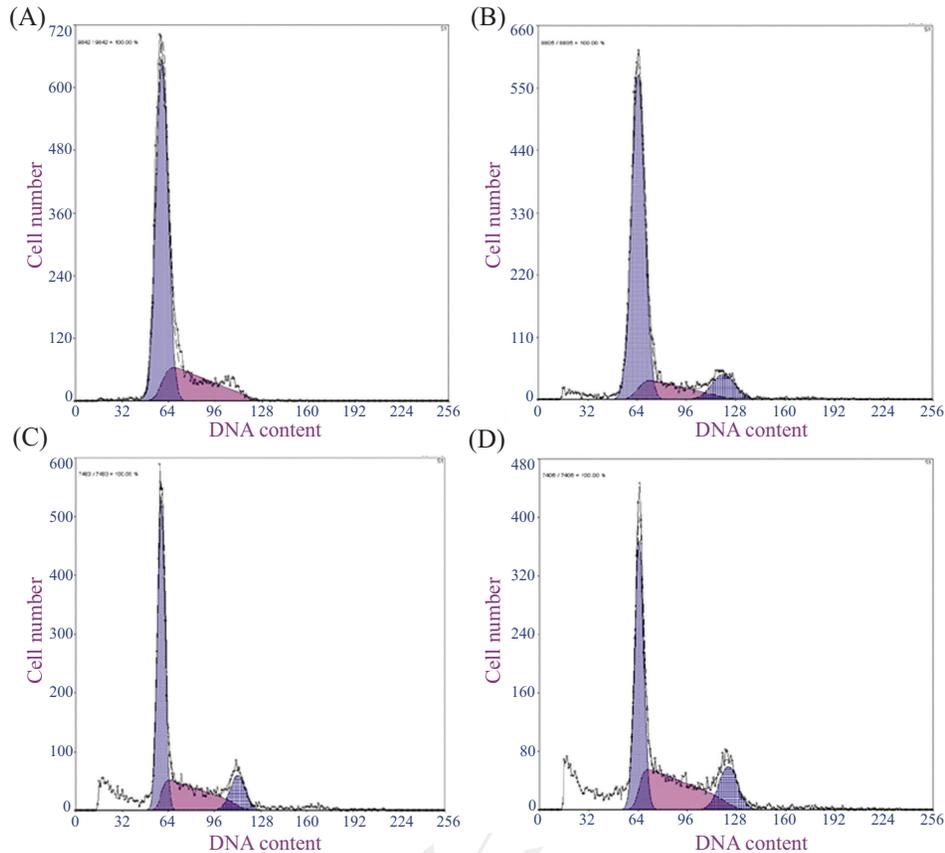


A: 对照; B: 20 μmol/L川楝素组; C: 40 μmol/L川楝素组; D: 60 μmol/L川楝素组。

A: control check; B: 20 μmol/L Toosendanin group; C: 40 μmol/L Toosendanin group; D: 60 μmol/L Toosendanin group.

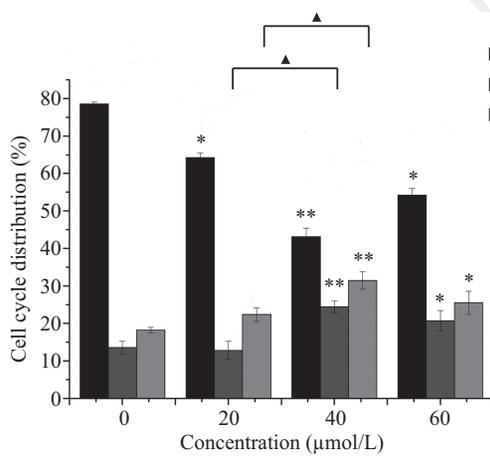
图5 川楝素对A549细胞线粒体膜电位的影响

Fig.5 The effect of Toosendanin on mitochondrial membrane potential in A549 cells



A: 对照; B: 20 μmol/L 川楝素组; C: 40 μmol/L 川楝素组; D: 60 μmol/L 川楝素组。
 A: control check; B: 20 μmol/L Toosendanin group; C: 40 μmol/L Toosendanin group; D: 60 μmol/L Toosendanin group.

图6 川楝素对A549细胞周期的影响
 Fig.6 The effect on A549 cell cycle treated with Toosendanin



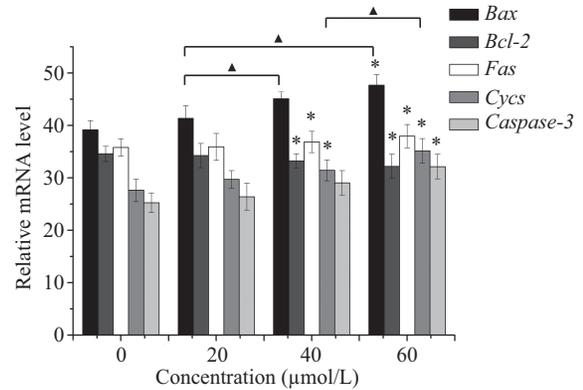
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; ▲ $P < 0.05$ 。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ 。

图7 各组A549细胞的细胞周期分布

Fig.7 The cell cycle distribution of A549 cells in each group

2.7 川楝素对A549细胞凋亡相关蛋白质水平的影响

川楝素对A549细胞凋亡相关蛋白质水平的影响结果见图9。结果显示, 不同药物浓度的川楝素



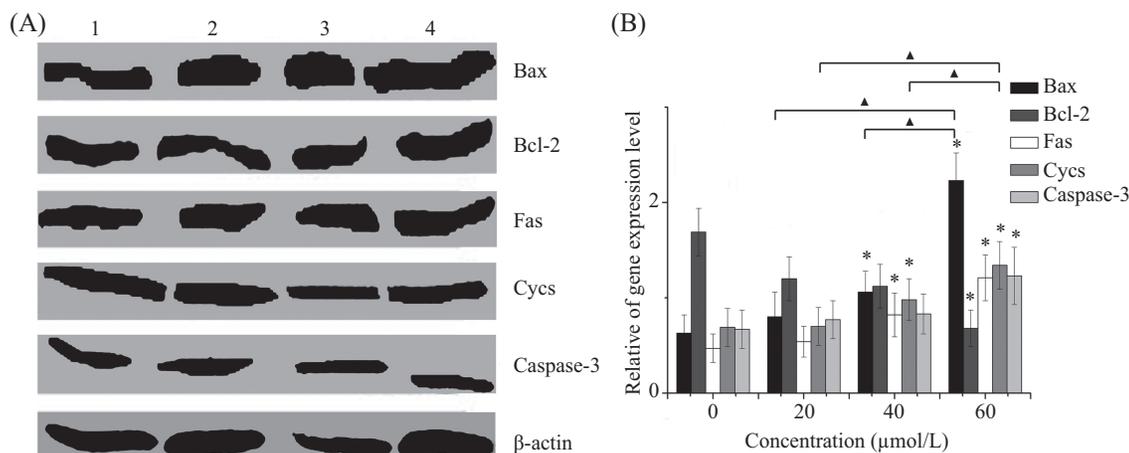
* $P < 0.05$, 与对照组比较; ▲ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ 。

图8 川楝素对Bax、Bcl-2、Fas、Cyts和Caspase-3 mRNA水平的影响

Fig.8 The effect of Toosendanin on mRNA level of Bax, Bcl-2, Fas, Cyts and Caspase-3

处理48 h后可使A549细胞中Bax、Fas、Cyts和Caspase-3蛋白质水平显著上调, Bcl-2蛋白质水平显著下调, 其中Bax和Cyts蛋白质水平变化最显著, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 1: 对照; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; 3: 40 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; 4: 60 $\mu\text{mol/L}$ 川楝素组; B: 各蛋白的相对表达量; * $P < 0.05$, 与对照组比较; $\blacktriangle P < 0.05$, 各组间比较。

A: 1: control check; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin; 3: 40 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin; 4: 60 $\mu\text{mol/L}$ Toosendanin; B: relative of gene expression level; * $P < 0.05$ vs control group; $\blacktriangle P < 0.05$ compared between groups.

图9 川楝素对Bax、Bcl-2、Fas、Cyts、Caspase-3和 β -actin蛋白质水平的影响

Fig.9 The effect of Toosendanin on Bax, Bcl-2, Fas, Cyts, Caspase-3 and β -actin protein levels

3 讨论

川楝素是一种三萜类化合物, 是从植物的根皮中分离得到的一种无色针状晶体^[2]。川楝素因来源广[川楝子(*Melia toosendan* Sieb)、川楝树(*Melia azedarach* L.)、苦楝树(*Melia azedarach* L.)等]且生物效应多样, 对于恶性肿瘤而言, 川楝素可作为新型抗肿瘤药物的候选者之一, 具有广阔的发展前景^[3]。恶性肿瘤是细胞无限增殖的结果, 抑制肿瘤细胞生长和促进肿瘤细胞凋亡是治疗癌症的有效手段^[4]。近年来的研究证实, 川楝素可诱导多种肿瘤细胞发生凋亡, 如乳腺癌^[4]、肝癌^[5]及白血病^[6]等。进一步的研究发现, 川楝素可能通过引起S期阻滞诱导乳腺癌细胞凋亡, 这与本研究得到的结果相类似。此外, 川楝素对人肝癌细胞和白血病细胞均具有明显的抑制作用。另有报道, 在淋巴瘤U937细胞中, 川楝素可能通过将细胞阻滞于G₀/G₁和S期的方式诱导细胞凋亡^[7]。以上研究表明, 川楝素为潜在的抗肿瘤药物且效果显著。但对肺癌细胞的作用机制尚不明确。为此, 本研究以人肺癌A549细胞为研究对象, 对其细胞凋亡机制进行了探索。

细胞凋亡机制对保持自身平衡十分重要, 肿瘤的生长速率很难控制, 这与凋亡能力的减弱和增殖能力的提升密切相关^[8]。细胞凋亡途径主要有三条: 线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径。其中, 线粒体途径和死亡受体途径为诱导哺乳动物细胞凋亡的主要途径^[9]。在细胞凋亡的早期, 线粒体结构

会发生一些显著的变化。一方面, 线粒体的外膜通透性会增加, 一些可溶性蛋白质从膜间隙释放到胞质; 另一方面, 线粒体跨膜电位会降低^[10]; *Caspase-8*主要参与的是死亡受体介导的细胞凋亡途径, 它通过与死亡受体Fas相互作用从而自我活化, 启动*Caspase*级联反应, 激活下游*Caspase-3*等, 诱导细胞发生凋亡^[11]。本研究结果显示, 川楝素可能通过线粒体途径和死亡受体途径双重机制介导诱导肺癌A549细胞凋亡。

细胞凋亡程序是一个复杂的、涉及多基因的过程。目前发现了很多参与细胞凋亡的因子, 如*Fas*和*FasL*、*Bcl-2*家族(*bax*、*bad*、*bak*等)、*Caspase*家族(*Caspase-3*、*Caspase-8*、*Caspase-10*等)、*Cyts*等, 它们中有些抑制细胞凋亡而有些促进细胞凋亡, 其功能和机制还有待进一步研究。本研究对其中五个凋亡相关基因进行了检测, 结果显示, 川楝素通过上调*Bax*、*Fas*、*Cyts*、*Caspase-3*基因及下调*Bcl-2*基因表达诱导肺癌A549细胞凋亡。其中, *Bcl-2*基因和*Cyts*在诱导细胞凋亡过程中起关键作用。*Bcl-2*家族蛋白在线粒体介导的细胞凋亡途径中起作用。在细胞凋亡过程中, 线粒体是调控细胞凋亡的中心, 而细胞色素C(*Cyts*)从线粒体的释放则起着关键性作用。细胞色素C释放到胞质后可激活*Caspase*, 从而引发级联反应, 导致细胞凋亡^[12]。张卫东等^[13]研究发现, 斑蝥素能够通过抑制*Bcl-2*等基因的表达诱导肺癌A549细胞凋亡; 杨玥等^[14]研究发现, 纳米雄黄可以

通过上调Caspase-3等基因表达诱导肺癌A549细胞发生凋亡。这与本研究得到的结果相类似。

综上所述,川楝素能够通过上调Bax、Fas、Cycs、Caspase-3基因和下调Bcl-2基因诱导肺癌A549细胞凋亡和抑制细胞增殖。此外,因川楝素具有低毒环保的特性,可以考虑用来作为化疗辅助药物,从而为改善肺癌等癌症的临床治疗方法提供新依据。

参考文献 (References)

- 1 施玉樑, 王文萍. 驱蛔中药的活性成分川楝素的生物效应. 生理学报(Shi Yuliang, Wang Wenping. Biological effects of toosendanin, an active ingredient of herbal Vermifuge in Chinese traditional medicine. *Acta Physiologica Sinica* 2006; 58(5): 397-406.
- 2 Ju JM, Qi ZC, Cai XT, Cao P, Huang Y, Wang SZ, *et al.* The apoptotic effects of toosendanin are partially mediated by activation of deoxycytidine kinase in HL-60 cells. *PLoS One* 2012; 7(12): 1-8.
- 3 王小娟, 刘妍如, 肖炳坤, 杨建云, 杨雁, 黄荣清. 川楝素抗肿瘤作用机制研究进展. 科学技术与工程(Wang Xiaojuan, Liu Yanru, Xiao Bingkun, Yang Jianyun, Yang Yan, Huang Rongqing. Review on antitumor effects and mechanisms of toosendanin. *Science Technology and Engineering* 2011; 11(2): 282-5.
- 4 蔡锦威, 汤海标, 邵喜英, 金洪传, 毛伟敏, 王晓稼. 川楝素对乳腺癌细胞的生长抑制作用. 中国肿瘤(Cai Jinwei, Tang Haibiao, Shao Xiying, Jin Hongchuan, Mao Weimin, Wang Xiaojia. Effects of toosendanin on growth inhibition in human breast cancer cells. *China Cancer* 2014; 23(4): 342-5.
- 5 He YJ, Wang J, Liu XL, Zhang L, Yi G, Li CW. Toosendanin inhibits hepatocellular carcinoma cells by inducing mitochondria dependent apoptosis. *Planta Med* 2010; 76(13): 1447-53.
- 6 Ju JM, Qi ZC, Cai XT, Cao P, Liu N, Wang SZ. Toosendanin induces apoptosis through suppression of JNK signaling pathway in HL-60 cells. *Toxicology In Vitro* 2013; 27(1): 232-8.
- 7 Zhang B, Wang ZF, Tang MZ, Shi YL. Growth inhibition and apoptosis-induced effect on human cancer cells of toosendanin, a triterpenoid derivative from Chinese traditional medicine. *National Business Media* 2005; 23(6): 547-53.
- 8 邵淑丽, 刘锐, 隋文静, 赵彬, 张伟伟, 杨希婷, 等. 大蒜素诱导结肠癌HT-29细胞凋亡. 基因组学与应用生物学(Shao Shuli, Liu Rui, Sui Wenjing, Zhao Bin, Zhang Weiwei, Yang Xiting, *et al.* Allicin induced apoptosis in conlon cancer cells HT-29. *Genomics and Applied Biology* 2015; 34(2): 227-33.
- 9 Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 2004; 9(6): 691-704.
- 10 邵淑丽, 李怀永, 孙宏岩, 张伟伟, 李爽. 莜术油对人肺腺癌A549细胞增殖和凋亡的影响. 中国细胞生物学学报(Shao Shuli, Li Huaiyong, Sun Hongyan, Zhang Weiwei, Li Shuang. ZTO inhibited proliferation and induced apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Chinese Journal of Cell Biology* 2013; 35(9): 1300-7.
- 11 Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6(5): 513-9.
- 12 王艳杰, 邓雯, 张鹏飞. 细胞色素C与细胞凋亡研究进展. 动物医学进展(Wang Yanjie, Deng Wen, Zhang Pengfei. Progress on cytochrome C and cell apoptosis. *Progress in Veterinary Medicine* 2012; 33(7): 89-92.
- 13 张卫东, 赵惠儒, 阎影, 王晓华, 宗志红, 刘莹. 斑蝥素诱导人肺癌A549细胞凋亡及其分子机制的研究. 中华肿瘤杂志(Zhang Weidong, Zhao Huiru, Yan Ying, Wang Xiaohua, Zong Zhihong, Liu Ying. Apoptosis induced by cantharidin in human pulmonary carcinoma cells A549 and its molecular mechanisms. *Chinese Journal of Oncology* 2005; 27(6): 330-4.
- 14 杨玥, 易娟, 陈静, 魏虎来, 李红玲. 纳米雄黄对肺癌A549细胞的凋亡诱导作用. 亚太传统医药(Yang Yue, Yi Juan, Chen Jing, Wei Hulai, Li Hongling. The apoptosis of lung cancer A549 cell induced by realgar and realgar nanoparticle. *Asia-Pacific Traditional Medicine* 2010; 6(6): 8-11.