

研究简报

柴胡总皂苷通过Akt/NF- κ B信号通路抑制胃癌细胞MGC80-3的增殖和迁移

李平 胡建燃* 铁军

(长治学院生物科学与技术系, 长治 046011)

摘要 该文以中药柴胡为材料, 研究其皂苷成分对胃癌细胞MGC80-3的抑制活性, 并探讨其潜在的分子机制。采用已报道的方法提取柴胡的总皂苷成分, 通过显微镜观察其对MGC80-3细胞形态的影响, 利用MTT法和细胞集落形成实验检测其对MGC80-3细胞增殖的影响, 利用细胞黏附实验和细胞划痕实验分析其对MGC80-3细胞迁移的影响, 进一步通过Western blot实验检测柴胡总皂苷对Akt/NF- κ B信号通路的影响。结果显示, 柴胡总皂苷显著抑制胃癌细胞MGC80-3的增殖和迁移能力, 并呈现明显的量效关系和时效关系。而且, 柴胡总皂苷降低了NF- κ B p65的蛋白表达水平, 虽然不影响Akt和IKK β 的表达, 却显著抑制了二者的磷酸化水平。因此, 柴胡总皂苷可能通过Akt/NF- κ B信号通路发挥对胃癌细胞MGC80-3的抑制作用, 具有开发为抗胃癌药物的潜在价值。

关键词 柴胡; 皂苷; 胃癌; 增殖; 迁移

Saikosaponin from *Bulperum Chinese* DC Represses Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cell MGC80-3 via Akt/NF- κ B Pathway

Li Ping, Hu Jianran*, Tie Jun

(Department of Biological Sciences and Technology, Changzhi University, Changzhi 046011, China)

Abstract The inhibitory effect of saikosaponin from *Bulperum Chinese* DC on gastric cancer line MGC80-3 was accessed in this study. And then, the potential molecular mechanism was investigated. Saikosaponin was extracted from *Bulperum Chinese* DC using the reported method. Effect of saikosaponin on MGC80-3 cell morphology was accessed with the light microscope. Effect of saikosaponin on cell proliferation was determined by MTT method and colony formation assay. Migration capability of MGC80-3 was detected by the cell adhesive assay and wound-healing assay. Western blot was used to access the potential molecular mechanism. Saikosaponin from *Bulperum Chinese* DC repressed the capability of MGC80-3 cell proliferation and migration in a dose- and time-dependent manner. Saikosaponin significantly reduced the expression level of NF- κ B p65, but not affect that of Akt and IKK β . Besides, phosphorylation of Akt and IKK β was decreased in cells treated by saikosaponin. It

收稿日期: 2018-05-23 接受日期: 2018-07-23

国家级高等学校大学生创新创业训练计划项目(批准号: 201710122004)、国家自然科学基金青年基金(批准号: 31701125)和山西省1331重点学科建设经费资助的课题

*通讯作者. Tel: 0355-2178013, E-mail: hjr_possible@163.com

Received: May 23, 2018 Accepted: July 23, 2018

This work was supported by the National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (Grant No.201710122004), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31701125) and the Fund for Shanxi "1331 Project" Key Subjects Construction

*Corresponding author. Tel: +86-355-2178013, E-mail: hjr_possible@163.com

网络出版时间: 2018-09-26 17:23:50

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180926.1723.010.html>

is probable that saikosaponin from *Bulperum Chinese* DC repressed MGC80-3 cell via Akt/NF- κ B pathway, and showed potential value in the development of anti-gastric cancer drugs.

Keywords *Bulperum Chinese* DC; saikosaponin; gastric cancer; cell proliferation; cell migration

癌症是全球关注的重大公共卫生问题之一, 严重威胁着人类的生命健康和社会发展。据统计, 在2003~2011年, 我国男性和女性居民中胃癌的发生率分别长期居于第三位和第四位, 死亡率则分别长期位于第三位和第二位^[1]。虽然在临床上目前已采用多种新型的化疗药物并改进了胃癌术式, 但胃癌患者的5年生存率仍然较低^[2]。近年来, 在癌症治疗及预防领域, 传统医药愈来愈受到人们的关注。因此, 积极寻找治疗胃癌的新药, 尤其是中药有效成分的深度开发及应用, 是改善胃癌预后的重要途径。

皂苷(saponin)是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷, 结构复杂, 广泛存在于陆生药用植物中, 例如人参、三七、远志、桔梗、柴胡等^[3]。目前, 关于药用植物皂苷类化合物在抗肿瘤方面的作用研究较多, 也较为深入。孙大鹏等^[4]发现, 人参皂苷Rg3可能通过下调钙调蛋白CaM的表达, 抑制NF- κ B信号通路, 促进胃癌细胞BGC-823的凋亡。徐明明等^[5]认为, 柴胡皂苷D可通过调控凋亡抑制蛋白survivin的表达, 抑制宫颈癌细胞HeLa的增殖。章英宏等^[6]证实, 桔梗皂苷D可抑制乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231中Bcl-2表达, 进而触发其caspase-3依赖的凋亡途径。陈美娟等^[7]的研究显示, 麦冬皂苷B可通过抑制Akt的磷酸化和MMP 2/9的表达, 抑制肺癌细胞A549的黏附和转移。总体而言, 皂苷类化合物种类繁多, 目前所报道的抗肿瘤作用机制复杂, 因此有待人们进一步予以揭示。

柴胡是多年生草本植物, 被2015版《中华人民共和国药典》收载, 主要指伞形科植物柴胡(*Bupleurum chinense*, DC.)或狭叶柴胡(*Bupleurum scorzonifolium* Willd.), 常以其干燥根入药。柴胡早在《神农本草经》中即有记载, 其性微寒, 味苦, 微辛, 功可轻清、升散、疏泄, 既能透表退热、疏肝解郁, 又可升举阳气, 可治妇女月经不调等。经调查, 柴胡属植物我国有40种, 17个变种, 主产于山西、河南、河北、陕西、辽宁、吉林等地。长治、晋城和运城一带是山西道地药材柴胡的主产区之一。近年来, 大量研究对柴胡的化学成分进行了报道, 发现其主要包括皂苷类、黄酮类、挥发油类、多糖类以及无机元素^[8]。根据化学

结构不同, 柴胡皂苷(saikosaponin)大致可分为A、B、C、D、M、N、P、T等。尽管现代研究对柴胡皂苷抗肿瘤的作用和机制有了较为深入的认识, 但是仍然缺乏系统性, 远未达到完全阐明的程度, 而且针对山西道地药材柴胡的抗胃癌研究仍少见报道。本研究以产自山西省长治市的道地药材柴胡为材料, 提取其总皂苷成分, 探讨其对胃癌细胞MGC80-3的抑制作用, 并初步分析潜在的分子机制, 为进一步完善人们对柴胡皂苷抗肿瘤作用的分子调控网络的理解以及为本地区柴胡资源的深度开发和胃癌的防治提供一定的理论依据。

本研究所用的柴胡购自山西省长治市当地药房。胃癌细胞MGC80-3购自博士德生物工程有限公司。RPMI-1640培养基、ECL显色试剂盒等购自北京索来宝生物科技有限公司。无支原体胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。胰蛋白酶、四氮甲唑蓝(MTT)、青链霉素、丝裂霉素C、二甲基亚砷(DMSO)等购自北京依托华茂生物科技有限公司。兔抗p-IKK β (Y466)抗体购自Abcam公司。鼠抗IKK β 抗体、鼠抗p-Akt(S473)抗体、鼠抗Akt抗体和鼠抗NF- κ B p65抗体购自Santa Cruz公司。兔抗GAPDH抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。实验所用的无水乙醇、无水甲醇、石油醚、正丁醇等均为分析纯。

旋转蒸发器RE-5ZAA购自上海压荣生化仪器厂; CO₂培养箱购自美国热电公司; 多功能酶标仪SpectraMax M2购自美谷分子仪器(上海)有限公司; 细胞计数仪Cellometer Auto1000购自美国Nexcelom公司; 倒置显微镜CKX41-C31BF购自日本Olympus公司; 蛋白电泳系统和ChemiDoc MP成像系统购自美国Bio-Rad公司; 高速冷冻离心机购自日本HITACHI公司。

本实验采用溶剂提取法^[9]获得柴胡总皂苷。将适量柴胡打碎, 过筛, 称取柴胡粉末5 g, 加入8倍体积的80%乙醇, 调节pH8.0。利用索氏提取器, 在80 °C下回流提取60 min, 重复3次, 收集提取液。利用旋转蒸发器对合并的提取液进行浓缩, 至1/10体积。用等体积的石油醚进行萃取3次, 弃去石油醚相, 收

集水相, 并进行适当浓缩, 再用等体积水饱和正丁醇萃取3次, 收集正丁醇相, 减压浓缩后, 吸出至小玻璃瓶中, 在45 °C下干燥, 即为柴胡总皂苷。用DMSO溶解, 并稀释成不同浓度的溶液备用。

本研究采用MTT实验检测柴胡总皂苷对胃癌细胞增殖的影响。将胃癌细胞MGC80-3接种在含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 于37 °C下含5% CO₂的培养箱中, 待其汇合率为80%时, 用胰酶-EDTA溶液消化细胞为单细胞悬液, 计数后, 按照 1×10^4 个/孔的数量接种到96孔板中。待细胞完全贴壁后, 分别用终浓度为3.125 μ g/mL、6.25 μ g/mL、12.5 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL以及100 μ g/mL的柴胡总皂苷处理细胞, 并设置只加入DMSO的对照组。培养一定时间后, 弃去培养基, 加入含有10% MTT(5 mg/mL)溶液的新鲜培养基, 继续孵育4 h后, 弃去培养基, 加入150 μ L DMSO, 振荡15 min, 待蓝色物质完全溶解后, 利用酶标仪测定 D_{570} 值, 并计算抑制率。

本研究采用平板集落形成实验检测柴胡总皂苷对胃癌细胞锚定依赖性生长能力的影响。按照 3×10^2 细胞/孔的数量, 将细胞接种于直径35 mm培养皿中, 在37 °C条件下含5% CO₂的培养箱中孵育过夜, 待细胞完全贴壁后, 加入不同浓度的柴胡总皂苷溶液, 继续培养, 每隔3~4天更换含有相同浓度柴胡总皂苷的新鲜培养基, 14天后, 弃去培养基, 用37 °C预热的PBS溶液漂洗1次, 弃去PBS, 加入无水甲醇固定5 min, 弃去甲醇, 然后用0.2%的结晶紫甲醇溶液对细胞进行染色, 蒸馏水洗涤后, 统计细胞集落数。

本研究采用细胞黏附实验检测柴胡总皂苷对胃癌细胞黏附能力的影响。参考文献[10-11]中的方法, 适当修改后进行如下步骤。用不同浓度的柴胡总皂苷处理MGC80-3细胞48 h后, 用胰酶-EDTA溶液消化指数生长期的细胞, 反复吹打, 制成单细胞悬液, 细胞计数后, 按照 1×10^5 个/孔的浓度均匀接种于96孔板中, 对照组和各实验组均设置5个复孔, 于37 °C下含5% CO₂的培养箱中孵育30 min后, 弃去培养基, 用37 °C预热的PBS溶液冲洗细胞, 去除未贴壁和贴壁不牢的细胞, 加入含10% MTT(储液浓度5 mg/mL)的新鲜培养基, 继续培养4 h后, 弃去培养基, 加入150 μ L DMSO, 振荡15 min, 待蓝色物质完全溶解后, 利用酶标仪测定 D_{570} 值。

本研究通过细胞划痕实验检测柴胡总皂苷对胃癌细胞迁移能力的影响。按照 5×10^4 个/孔的浓度,

将单细胞悬液均匀接种于12孔板中, 在37 °C、5% CO₂条件下培养过夜, 弃去培养基, 加入一定浓度的柴胡总皂苷溶液处理细胞, 并设置加入DMSO的对照组。继续培养72 h后, 细胞汇合率达到100%, 弃去培养基, 加入含有终浓度为25 μ g/mL丝裂霉素C的新鲜培养基, 孵育1 h。用无菌的移液器吸头划痕后, 用预热的PBS漂洗1次, 清除脱落的细胞后加入新鲜培养基继续孵育。立即进行显微拍照, 然后分别于12 h和24 h时在相同的位置再次进行拍照。利用Image-Pro Plus 6.0软件测量划痕宽度, 计算细胞迁移率。迁移率%=($W_{0h}-W_{12h/24h}$)/ W_{0h} , W_{0h} 为0 h划痕宽度(μ m); $W_{12h/24h}$ 为12 h或24 h划痕宽度(μ m)。

本研究通过Western blot实验检测柴胡总皂苷对胃癌细胞中相关蛋白表达的影响。收集汇合率为80%左右的细胞, 弃去培养液, 用冰预冷的PBS溶液漂洗1次, 加入适量RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂), 水平放于冰上30 min, 用细胞刮刀刮下细胞, 置于1.5 mL离心管中, 在4 °C下12 000 r/min离心20 min, 收集上清液, 利用Bradford法测蛋白质浓度。经SDS-PAGE电泳、转膜、脱脂奶粉封闭、一抗4 °C摇床孵育过夜、PBS-T溶液漂洗、二抗常温摇床孵育1 h、PBS-T溶液漂洗, 然后利用ECL试剂盒显色, 将PVDF膜置于成像系统拍照。

运用统计学原理分析实验数据, 统计结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。利用SPSS 10.0软件对所得数据进行处理, 并进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

柴胡总皂苷对MGC80-3细胞增殖的影响

用不同浓度的柴胡总皂苷处理胃癌细胞MGC80-3, 分别在24 h、48 h和72 h检测其对细胞的抑制率。结果如图1所示, 柴胡总皂苷的浓度越高, 细胞增殖越受抑制, 抑制率从约30%增高至约80%, 呈明显的量效关系; 此外, 处理时间越长, 细胞抑制率越高, 呈现明显的时间效应。

柴胡总皂苷对MGC80-3细胞形态的影响

结果如图2所示, 对照组细胞形态饱满, 生长紧密。用50 μ g/mL和25 μ g/mL柴胡总皂苷处理48 h后, 细胞形态不规则, 且细胞内出现大量空泡, 部分细胞死亡; 用12.5 μ g/mL、6.25 μ g/mL和3.125 μ g/mL的柴胡总皂苷处理48 h, 细胞形态未出现肉眼可见的变化。

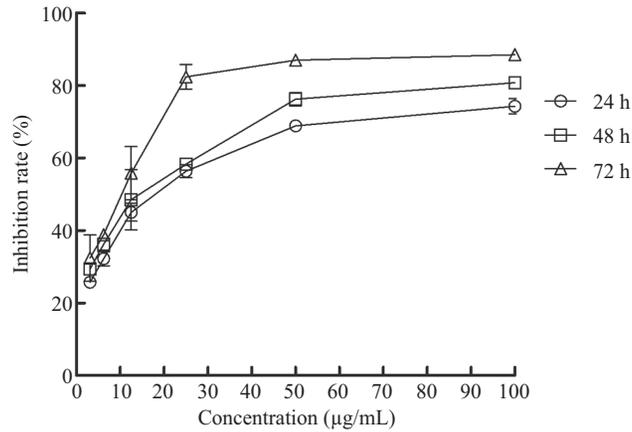
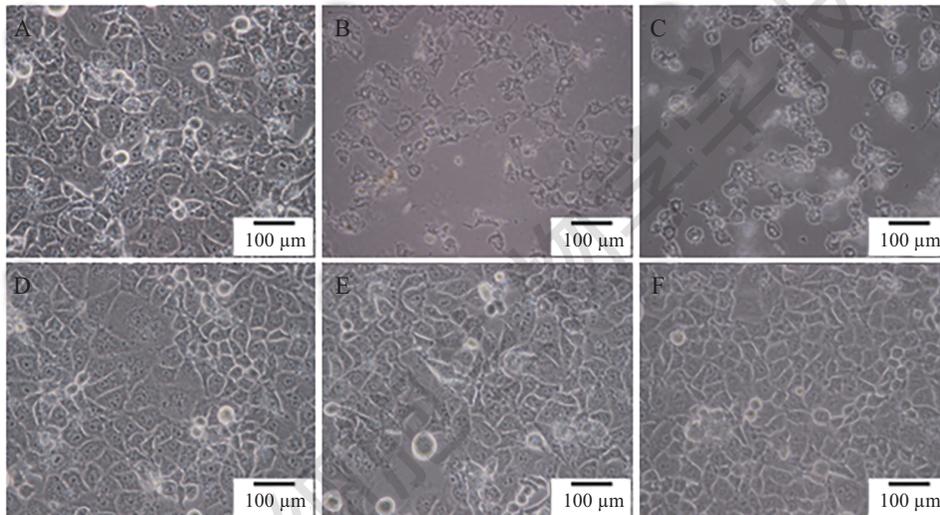


图1 柴胡总皂苷抑制胃癌细胞MGC80-3的增殖

Fig.1 Saikosaponin inhibited MGC80-3 cell proliferation



A: 对照组; B: 柴胡总皂苷浓度50 µg/mL; C: 柴胡总皂苷浓度25 µg/mL; D: 柴胡总皂苷浓度12.5 µg/mL; E: 柴胡总皂苷浓度6.25 µg/mL; F: 柴胡总皂苷浓度3.125 µg/mL。

A: control group; B: 50 µg/mL saikosaponin; C: 25 µg/mL saikosaponin; D: 12.5 µg/mL saikosaponin; E: 6.25 µg/mL saikosaponin; F: 3.125 µg/mL saikosaponin.

图2 柴胡总皂苷对胃癌细胞MGC80-3形态的影响

Fig.2 Effects of saikosaponin on cell morphology of MGC80-3

表1 柴胡总皂苷对胃癌细胞MGC80-3集落形成的影响

Table 1 Effect of saikosaponin on colony formation capability of MGC80-3 cells

Saikosaponin浓度(µg/mL)	细胞集落形成数目($\bar{x} \pm s$)
Saikosaponin concentration (µg/mL)	Number of cell colony ($\bar{x} \pm s$)
0 (control)	134±28
3.125	113±35
6.25	23±5**
12.5	0**

** $P < 0.01$, 与对照组比较。** $P < 0.01$ vs control group.

柴胡总皂苷对MGC80-3细胞集落形成能力的影响

平板集落形成实验的结果如表1所示, 终浓度为6.25 µg/mL的柴胡总皂苷能显著减少MGC80-3

细胞的集落数量, 差异极显著($P < 0.01$); 当终浓度为12.5 µg/mL时, MGC80-3细胞经14天培养后, 全部死亡, 不能形成集落。该结果表明, 柴胡总皂苷能够显著抑制胃癌细胞MGC80-3的集落形成能力。

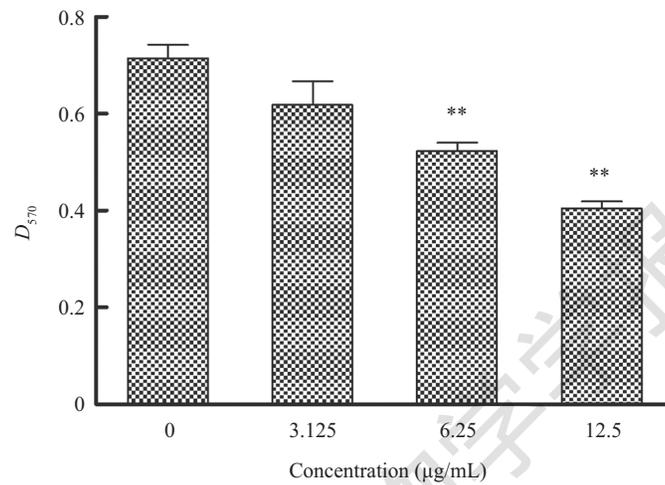
柴胡总皂苷对MGC80-3细胞黏附能力的影响

结果如图3所示, 分别用不同浓度的柴胡总皂苷处理48 h后, MGC80-3细胞的黏附能力与柴胡总皂苷的浓度呈明显的负相关, 呈量效关系。其中, 当柴胡总皂苷浓度为6.25 $\mu\text{g/mL}$ 和12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与对

照组相比, MGC80-3细胞的黏附能力明显降低, 差异极显著($P < 0.01$)。

柴胡总皂苷抑制MGC80-3细胞的迁移

利用划痕实验分析柴胡总皂苷对胃癌细胞MGC80-3迁移能力的影响, 结果如图4所示, 与对



** $P < 0.01$, 与对照组相比较。

** $P < 0.01$ vs control group.

图3 柴胡总皂苷对MGC80-3细胞黏附的抑制效应

Fig.3 Inhibitory effect of saikosaponin on MGC80-3 cells adhesion

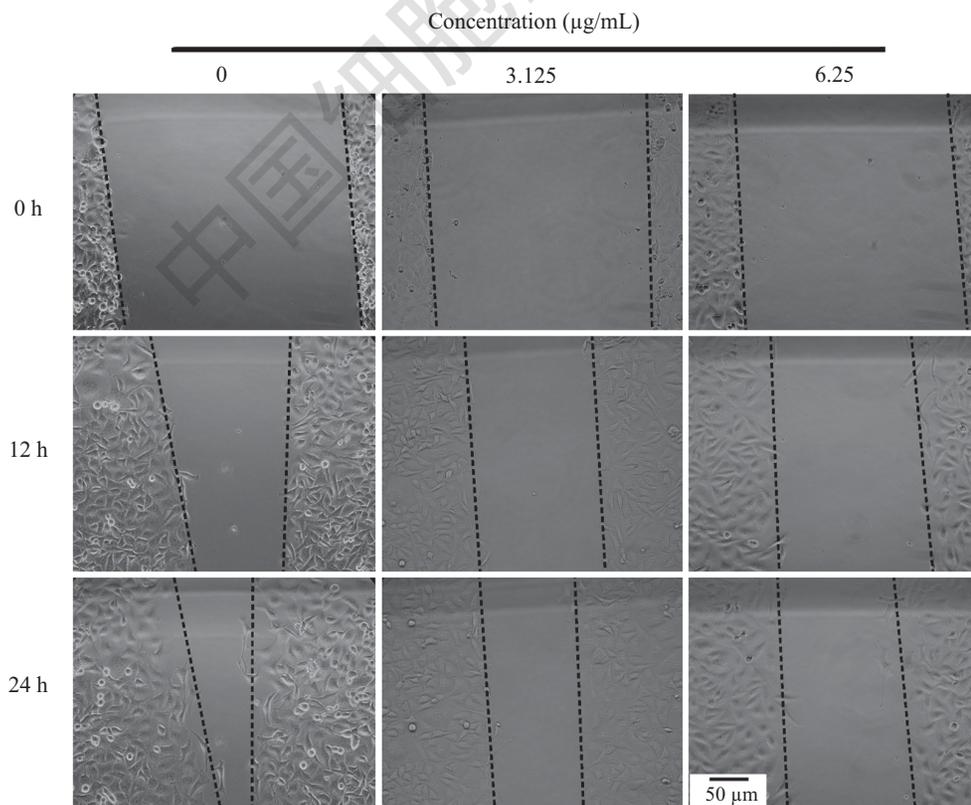
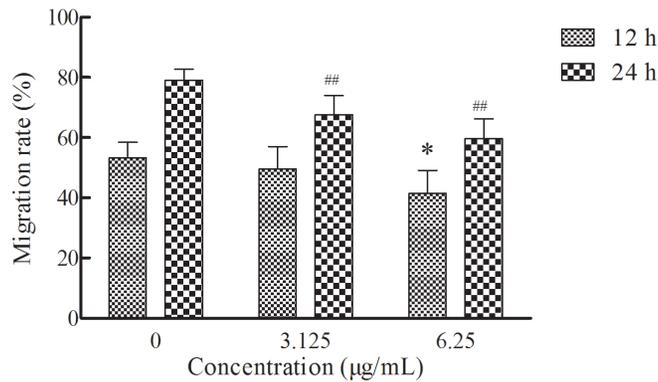


图4 细胞划痕实验

Fig.4 Wound-healing assay



* $P < 0.05$, 与12 h对照组相比较; # $P < 0.01$, 与24 h对照组相比较。

* $P < 0.05$ vs 12 h control group; # $P < 0.01$ vs 24 h control group.

图5 柴胡总皂苷抑制胃癌细胞MGC80-3的迁移运动

Fig.5 Saikosaponin inhibited MGC80-3 cell migration

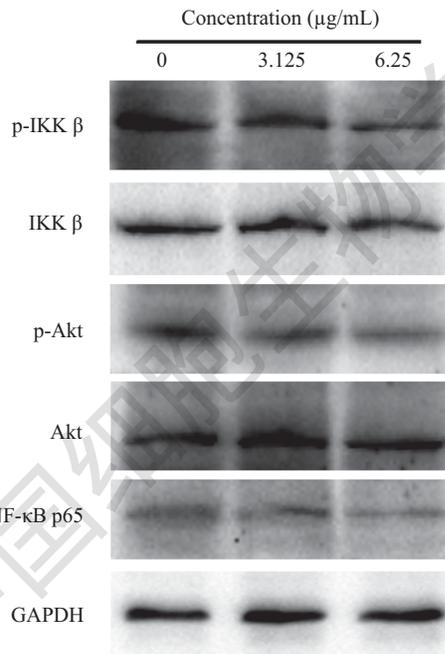


图6 Western blot实验

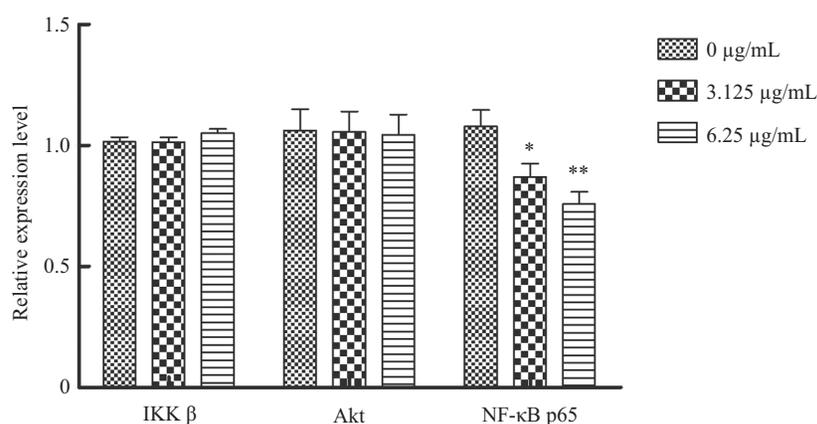
Fig.6 Western blot assay

照组相比, 柴胡总皂苷处理后, MGC80-3细胞的迁移能力明显降低。如图5所示, 培养12 h后, 对照组细胞迁移率为53.24%, 3.125 µg/mL柴胡总皂苷处理细胞的迁移率为49.56%; 6.25 µg/mL柴胡总皂苷处理细胞的迁移率则为41.48%, 显著低于对照组($P < 0.01$)。培养24 h后, 对照组细胞迁移率为79.04%, 3.125 µg/mL柴胡总皂苷处理细胞的迁移率为67.62%, 显著低于对照组($P < 0.01$); 6.25 µg/mL柴胡总皂苷处理细胞的迁移率则为59.66%, 显著低于对照组($P < 0.01$)。因此, 柴胡总皂苷显著抑制

MGC80-3细胞的迁移能力, 并呈现明显的量效关系。

柴胡总皂苷抑制MGC80-3细胞的分子机制

为进一步探讨柴胡总皂苷抑制MGC80-3细胞增殖和迁移的分子机制, 以GAPDH为内参, 通过Western blot检测相关蛋白的表达和磷酸化水平。如图6所示, IKK β和Akt的杂交条带未见明显差异, 但是NF-κB p65、p-IKK β和p-Akt表达水平随柴胡总

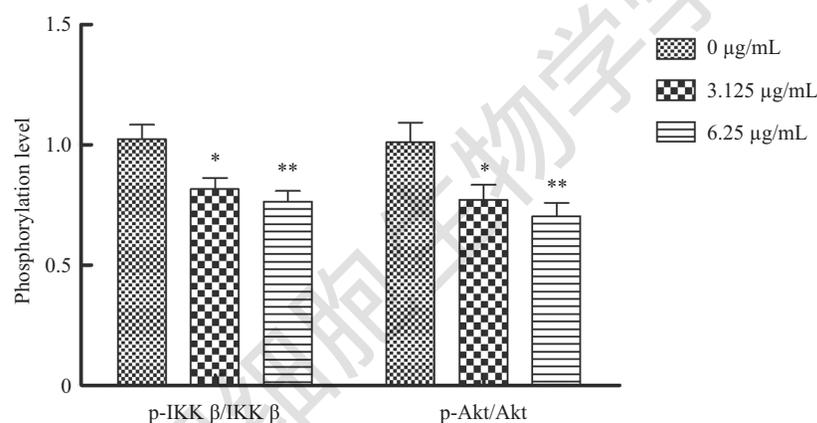


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图7 相关蛋白质相对表达水平分析

Fig.7 Analysis of relative expressive level of related proteins



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比较.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图8 相关蛋白质的磷酸化水平分析

Fig.8 Analysis of phosphorylation level of related proteins

皂苷浓度升高而降低。利用软件进行灰度分析,如图7和图8所示,柴胡总皂苷不影响IKK β 和Akt总蛋白的表达水平,但是明显抑制NF- κ B p65的表达,以及IKK β 和Akt的磷酸化水平。

柴胡皂苷具有多种药理特征^[12],目前已有大量文献报道了有关柴胡皂苷抗肿瘤作用的研究成果,其分子机制主要涉及细胞凋亡、细胞分化、肿瘤内部血管的生成、肿瘤细胞的侵袭转移、肿瘤细胞耐药性、机体免疫能力等方面^[13]。例如:柴胡皂苷D可提高人肝癌细胞和前列腺癌细胞内Fas和FasL的表达水平,促进其凋亡过程^[14-15];也有研究表明,柴胡皂苷D能够通过激活caspase-3和caspase-7,诱导

凋亡^[16],柴胡皂苷A则能够诱导脑胶质瘤细胞C6分化成星形胶质细胞,促进其恶性表型逆转^[17];柴胡皂苷D还可能通过调节细胞内Ca²⁺浓度,激活AMP信号通路,诱导肿瘤细胞自噬性死亡^[18]。但是,目前针对柴胡皂苷在抗肿瘤方面的研究主要集中于其中某些类别,例如柴胡皂苷A和D。对柴胡总皂苷综合活性的报道主要是关于其在诱导肝损伤的机制方面^[19-21],而对柴胡总皂苷的抗肿瘤作用机制的研究报道则很少。例如:盖晓东等^[22]用低浓度的柴胡总皂苷与阿奇霉素联用,可有效逆转白血病细胞K562对ADM的多药耐药性;张洪峰等^[23]利用循环超声法提取冀南柴胡的总皂苷,进一步发现其明显抑

制人肝癌细胞HepG2的增殖,并促进细胞凋亡。山西省是北柴胡的主产区,但是针对其总皂苷成分的活性,尤其是抗肿瘤方面的研究尚未见报道。本研究以山西长治所产的柴胡为材料,通过传统方法提取其总皂苷成分,并检测其抗肿瘤效果,证实柴胡总皂苷能够有效抑制胃癌细胞MGC80-3的增殖,非致死剂量的柴胡总皂苷则能显著抑制其黏附和迁移能力,并且呈现明显的量效关系和时效关系。本研究的结果初步揭示了山西长治所产的柴胡对消化道肿瘤细胞的抑制作用,为地道药材柴胡的深度开发和应用提供了理论参考。

Akt信号通路与多种恶性肿瘤密切相关。当致癌因子等细胞信号与细胞表面受体结合后,激活PI3K,活化的PI3K使Akt上473位丝氨酸、307位苏氨酸等重要位点磷酸化,Akt被活化,进而激活NF- κ B、mTOR等下游蛋白,介导细胞内多种生理过程。NF- κ B是广泛存在于哺乳动物细胞中一种细胞核转录因子,参与细胞的增殖、凋亡、分化、免疫应答等生理过程,在肿瘤的发生和发展中也发挥了重要作用^[24]。大量研究表明,NF- κ B是由两种不同蛋白亚基组成的异源二聚体,其中p65和p50是重要组成成分,一般情况下,该二聚体与抑制蛋白I κ B α 结合,以失活的三聚体形式存在于细胞质中^[25]。I κ B激酶 β (IKK β)是NF- κ B信号通路中IKK激酶复合物(由IKK α 和IKK β 激酶及调节元件NEMO组成的三聚体)的核心组分。当细胞受到相关信号分子刺激后,IKK β 发生磷酸化,被活化,进一步使抑制蛋白I κ B α 磷酸化而被降解,NF- κ B被释放,即进入细胞核,激活细胞因子、炎症因子等相关基因的表达^[26]。例如,NF- κ B可影响多种肿瘤细胞中Bcl-2、Bax、caspase等重要蛋白因子的表达^[27-28],增强肿瘤细胞的抗凋亡能力。进一步对分子机制的探讨表明,柴胡总皂苷不影响Akt和IKK β 的总蛋白水平,却显著抑制了二者的磷酸化水平,此外,还明显降低了细胞内NF- κ B p65的表达。因此,柴胡的总皂苷成分可能通过Akt/NF- κ B信号通路对胃癌细胞MGC80-3发挥抑制作用。

参考文献 (References)

- 1 Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, Zhang SW, Zeng HM, Bray F, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA-Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 2 涂铭, 李林. 胃癌防治知识对胃癌患者早期诊断的影响. *实用癌症杂志* (Tu Ming, Li Lin. Effect of knowledge about prevention of gastric cancer on early diagnosis of gastric cancer. *The Practical Journal of Cancer*) 2014; 29(8): 972-4.
- 3 石佳佳, 曹丽丽, 韩倩倩, 朱艳琴. 含皂苷类中药抗肿瘤作用的研究进展. *光明中医* (Shi Jijia, Cao Lili, Han Qianqian, Zhu Yanqin. Research progress on anti-tumor effects of traditional Chinese medicine containing saponins. *Guang Ming Zhong Yi*) 2016; 31(23): 3526-9.
- 4 孙大鹏, 鲁明明, 王硕, 富力. 人参皂苷Rg3通过Ca²⁺/CaM信号系统抑制胃癌BGC-823细胞增殖及其可能的机制. *中国肿瘤生物治疗杂志* (Sun Dapeng, Lu Mingming, Wang Shuo, Fu Li. Ginsenoside Rg3 inhibits gastric cancer cell proliferation through Ca²⁺/CaM kinase downregulation and NF- κ B inactivation. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*) 2015; 22(2): 225-9.
- 5 徐明明. 柴胡皂甙D诱导人宫颈癌Hela细胞系凋亡的研究. *医药论坛杂志* (Xu Ming ming. Study of human cervical cancer Hela apoptosis induced by saikosaponin D. *Journal of Medical Forum*) 2011; 32(8): 89-71.
- 6 章宏英. 桔梗皂苷D对人乳腺癌细胞体外杀伤效应及机制研究. *浙江中西医结合杂志* (Zhang Yinghong. Viability inhibition of human breast cancer cells treated with platycodon D *in vitro* and the underlying mechanism. *Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*) 2015; 25(6): 547-9.
- 7 陈美娟, 赵若琳, 郭园园, 宁利敏, 张旭. 麦冬皂苷B对A549细胞株体外黏附、侵袭及迁移的抑制作用及机制研究. *中国药理学通报* (Chen Meijuan, Zhao Ruolin, Guo Yuanyuan, Ning Limin, Zhang Xu. Inhibitory effect of ophiopogonin-B on adhesion, invasion and migration of A549 cells *in vitro*. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2015; 31(5): 660-4.
- 8 Law BY, Mo JF, Wong VK. Autophagic effects of Chaihu dried roots of *Bupleurum Chinense* DC or *Bupleurum scorzoneraefolium* WILD. *Chin Med* 2014; 9: 21.
- 9 肖功胜, 杨云, 刘富岗, 许小华. 柴胡皂苷提取和含量测定方法研究. *中成药* (Xiao Gongsheng, Yang Yun, Liu Fugang, Xu Xiaohua. *Chinese Traditional Patent Medicine*) 2009; 31(4): 595-8.
- 10 Weitz-schmidt G, Chreng S. Cell adhesion assays. *Methods Mol Biol* 2012; 757: 15-30.
- 11 Chigaev A, Sklar LA. Overview: assays for studying integrin dependent cell adhesion. *Methods Mol Biol* 2012; 757: 3-14.
- 12 于蓓蓓, 王亮, 尹利顺, 孙蓉. 基于HPLC-DAD-MSn的柴胡皂苷A的体外生物转化研究. *中草药* (Yu Beibei, Wang Liang, Yin Lishun, Sun Rong. Research on biotransformation of saikosaponin A *in vitro* based on HPLC-DAD-MSn. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*) 2017; 48(2): 333-8.
- 13 刘丹, 王佳贺. 柴胡皂苷抗肿瘤作用机制的研究进展. *现代药物与临床* (Liu Dan, Wang Jiahe. Research progress on antitumor mechanisms of saikosaponin. *Drugs & Clinic*) 2018; 33(1): 203-8.
- 14 Wang BF, Dai ZJ, Wang XJ, Bai MH, Lin S, Ma HB, et al. Saikosaponin-d increases the radiosensitivity of smmc-7721 hepatocellular carcinoma cells by adjusting the g0/g1 and g2/m checkpoints of the cell cycle. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 263.
- 15 Yao M, Yang J, Cao L, Zhang L, Qu S, Gao H. Saikosaponin-d inhibits proliferation of DU145 human prostate cancer cells by inducing apoptosis and arresting the cell cycle at G₀/G₁ phase.

- Mol Med Rep 2014; 10(1): 365-72.
- 16 Zhang Z, Zhang H, Chen S, Xu Y, Yao A, Liao Q, *et al.* Dihydromyricetin induces mitochondria-mediated apoptosis in HepG2 cells through down-regulation of the Akt/Bad pathway. *Nutr Res* 2017; 38: 27-33.
- 17 Tsai YJ, Chen IL, Horng LY, Wu RT. Induction of differentiation in rat C6 glioma cells with saikosaponins. *Phytother Res* 2002; 16(2): 117-21.
- 18 Wong VK, Li T, Law BY, Ma ED, Yip NC, Michelangeli F, *et al.* Saikosaponin-d, a novel SERCA inhibitor, induces autophagic cell death in apoptosis-defective cells. *Cell Death Dis* 2013; 4: e720.
- 19 黄幼异, 黄伟, 孙蓉. 基于肝药酶 P450动态变化的柴胡总皂苷小鼠肝毒性剂量-时间-毒性关系研究. *中国实验方剂学杂志* (Huang Youyi, Huang Wei, Sun Rong. Research on mechanism of hepatotoxicity caused by extracts of saikosaponins in mice. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*) 2012; 18(22): 299-303.
- 20 孙蓉, 黄伟. 柴胡总皂苷醇洗脱精制品对大鼠慢性肝毒“量-毒”关系研究. *中国中药杂志* (Sun Rong, Huang Wei. “Dose toxicity” relationship study on rats' chronic hepatotoxicity of refined products of saikosaponin by alcohol elution. *China Journal of Chinese Materia Medica*) 2010; 35(17): 2338-41.
- 21 吕天, 牟红元, 冯江江, 朱旭婷, 刘玲, 谢莲, 等. 中药柴胡总皂苷急性肝毒性的代谢组学研究. *化学研究与应用* (Lü Tian, Mou Hongyuan, Feng Jiangjiang, Zhun Xuting, Liu Ling, Xie Lian, *et al.* Metabolomics on acute liver toxicity of saikosaponin in Chinese medicine bupleuri radix. *Chemical Research and Application*) 2013; 25(6): 789-92.
- 22 盖晓东, 历春, 李倩, 刘艳波, 薛昊罡. 柴胡皂苷在体外对人白血病细胞株K562/ADM多药耐药性的逆转作用. *中国病理生理杂志* (Gai Xiaodong, Li Chun, Li Qian, Liu Yanbo, Xue Haogang. Reverse effects of saikoside on multidrug resistance of human leukemic cell line K562/ADM *in vitro*. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2012; 28(1): 76-80.
- 23 张洪峰, 王乐, 张凯, 刘燕娟. 柴胡总皂苷的循环超声提取及其对HepG2细胞凋亡的影响. *中南药学* (Zhang Hongfeng, Wang Le, Zhang Kai, Liu Yanjuan. Circulating ultrasonic extraction of total saikosaponins from *Bulperum Chinese DC* and its effect on the apoptosis activity of human HepG2 cells. *Central South Pharmacy*) 2016; 14(12): 1316-9.
- 24 Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(9): 823-30.
- 25 Yoong J, Michael M, Leong T. Targeted therapies for gastric cancer: current status. *Drugs* 2011; 71(11): 1367-84.
- 26 Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, *et al.* IKK beta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118(3): 285-96.
- 27 Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 2006; 13(5): 852-60.
- 28 Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(1): 49-63.