

重楼皂苷 I 对肝癌细胞的增殖及凋亡的影响

萧梅芳¹, 戴霞红¹, 贺新春², 周蓉蓉¹, 章保新¹, 胡关胜¹, 黄泽炳¹, 范学工^{1*}

(1. 中南大学 湘雅医院 传染科, 中国湖南 长沙 410008; 2. 湖南省人民医院 传染科, 中国湖南 长沙 410005)

摘要: 探讨重楼皂苷 I (paris saponin I, PS I) 在体外对人肝癌 SMMC-7721 细胞株增殖和凋亡的影响及相关机制. MTT 法检测 PS I 对肝癌 SMMC-7721 细胞株的增殖抑制作用, Hoechst 33528 染色法观察细胞核的形态学变化, 流式细胞术 Propidium iodide (PI) 染色检测细胞周期及凋亡的情况, 免疫印迹的方法检测 Fas、Bcl-2、Bax、细胞周期素 D1 (cell cycle regulatory factor D1, Cyclin D1) 和细胞周期素 E (cell cycle regulatory factor E, Cyclin E) 的表达情况. PS I 能时间和浓度依赖性的抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 干预后的 SMMC-7721 细胞染色质浓缩, 核碎裂, 凋亡小体形成, 呈典型的凋亡变化. 细胞周期阻滞于 G₁ 期, 并且有凋亡峰形成, 呈浓度依赖性. PS I 能浓度依赖性地上调 Fas 和 Bax 的表达, 下调 Bcl-2、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白的表达水平. PS I 可能是通过阻滞肿瘤细胞的生长及诱导细胞凋亡等机制, 从而抑制肝癌细胞的增殖.

关键词: 重楼皂苷 I; 人肝癌细胞; 细胞周期; 凋亡

中图分类号: R73-36*1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)06-0519-05

Growth and Apoptosis Effects of Paris Saponin I on Human Hepatocellular Carcinoma Cells

XIAO Mei-fang¹, DAI Xia-hong¹, HE Xin-chun², ZHOU Rong-rong¹,
ZHANG Bao-xin¹, HU Guan-sheng¹, HUANG Ze-bing¹, FAN Xue-gong^{1*}

(1. Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China;

2. Department of Infectious Diseases, The First People's Hospital, Changsha 410005, Hunan, China)

Abstract: To investigate the effect of Paris Saponin I (PS I) on the growth and apoptosis of hepatoma carcinoma cell strain (SMMC-7721) and its mechanism *in vitro*. The proliferation-inhibiting effect of PS I on SMMC-7721 cells was measured by MTT assay while the nuclear morphology of apoptotic cells was assessed by Hoechst 33528 staining. Cell cycle and apoptosis were examined by flow cytometry. Protein expressions of Fas, Bax, Bcl-2, cell cycle regulatory factor D1 (Cyclin D1) and cell cycle regulatory factor E (Cyclin E) were detected by Western blot analysis. The results showed that PS I inhibited the growth of SMMC-7721 cells in a dose and time-dependent manner *in vitro*. Marked morphological changes, including condensation of chromatin, nuclear fragmentation and apoptotic bodies were clearly shown on Hoechst 33528 staining. Flow cytometry analysis showed PS I arrested SMMC-7721 cells in G₀/G₁ phase and induced apoptosis. PS I treatment increased the Fas and Bax protein expressions while decreased the protein expressions of Bcl-2, Cyclin D1 and cyclin E. PS I can inhibit the proliferation of hepatoma cells by prolonging G₁ period of cell cycle, and inducing cell apoptosis.

Key words: paris saponin I; human hepatocellular carcinoma; cell cycle; apoptosis

(*Life Science Research*, 2011, 15(6): 519-523)

收稿日期: 2011-10-10; 修回日期: 2011-10-28

作者简介: 萧梅芳 (1982-), 女, 湖南郴州人, 博士研究生, 主要从事病毒性肝炎及肝癌方面的研究, E-mail: xmf427@126.com; * 通讯作者: 范学工 (1957-), 男, 湖南长沙人, 中南大学湘雅医院教授、主任医师, 博士生导师, 主要从事病毒性肝炎、幽门螺杆菌感染方面的研究, Tel: 0731-84327392, E-mail: xgfan@hotmail.com.

肝细胞癌是临床中一种常见的恶性肿瘤,其在全球的发病率居第 5 位,死亡率居第 3 位^[1]。顺铂等化疗药物的使用使药物对靶细胞的敏感性大大提高,对靶细胞的杀伤作用得到增强,但是目前的临床疗效仍不是很满意^[2]。国内外采用中药单药、复方或其中的有效成分对肿瘤细胞进行研究获得了可喜的成果。重楼为百合科重楼属植物的干燥根茎,研究表明其有抗炎、杀精子、止血、杀菌、镇静、止痛和抗癌的作用^[3]。甾体皂苷类是其活性成分。目前有 5 种甾体皂苷被分离出来,其中甾体皂苷 I,即 polyllin D^[4-8],一系列的体内体外实验表明其具有抗肿瘤和肿瘤预防作用^[4,5,8,9]。然而,其抗肿瘤的机制有待深入研究。本实验主要观察 PS I 在体外对肝癌细胞株 SMMC-7721 的抑制作用,并初步探讨其抗癌机制,为抗肿瘤新药物的研发奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

PS I 由云南昆明风山渐公司提供,纯度 97%。用 DMSO 配制成 5 g/L 的母液 20 mL, -20 ℃ 保存,工作液浓度按实验需要用细胞培养液稀释临用前配制, DMSO 的终浓度小于 1%。胎牛血清、低糖 DMEM 培养基等所有的细胞培养试剂均购自美国 GIBICO 公司;碘化丙啶和 RNA 酶 A、MTT、Hoechst 33528、DMSO、Fas、Bcl-2、Bax、Cyclin D1、Cyclin E 抗体均购自美国 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由本实验室保存,细胞培养采用完全培养基(含 10% 的胎牛血清, 1×10^5 IU/L 青霉素及 125 mg/L 链霉素, RPMI1640 培养基),在 37 ℃, 5% CO₂ 条件下培养, 2~3 d 换液传代一次,待细胞生长至对数生长期时用于实验。

1.2.2 噻唑氮蓝(MTT)比色法

PS I 对细胞活力的研究采用 MTT 法,方法参考文献^[10]。取对数生长期细胞(1×10^5),接种于 96 孔平底培养板,待 24 h 细胞贴壁后,加入不同浓度的 PS I,并设空白对照组,按照不同的时间要求培养,分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入浓度为 5 g/L 的 MTT/PBS 液 10 μmol/L,继续培养 4 h 后,小心吸弃孔内液体,加入 200 μL 二甲基亚砷溶解沉淀,充分振荡 10 min,溶解结晶物。选择 570 nm 波长,空白对照调零,在酶联免疫检测仪

上测定各孔光吸收值,记录结果,计算抑制率。抑制率按公式计算:生长抑制率(%)=(对照组 A-实验组 A)/(对照组 A-空白组 A)×100%。

1.2.3 Hoechst 33528

荧光细胞形态学检测方法参照文献^[11]。取对数生长期细胞调整细胞浓度为 1×10^5 种于 24 孔板中。细胞贴壁后,加入 2.5 μmol/L PS I 处理 24 h 后去掉培养基, PBS 洗涤细胞 2 次,并用 4% 的甲醇 4 ℃ 固定 10 min 后,加入 Hoechst 33528 染液 0.5 mL 室温下染色 15 min,选择波长 356 nm,荧光显微镜(日本奥林巴斯 FV1000)下观察并摄像。

1.2.4 细胞周期及凋亡测定

细胞周期的测定参照 Vinodhkumar 等^[12]方法。人肝癌 SMMC-7721 细胞调整细胞浓度为 1×10^6 ,种于 6 孔板中,分别用 0、1.25、2.5、5 μmol/L 的 PS I 处理 24 h,然后收集细胞,冷 PBS 洗 2 次,70%冷乙醇 4 ℃ 冰箱中固定过夜。固定后的细胞用 PBS 洗 1 次,离心 5 000 r/min, 5 min,重悬于 1 mL 的 PI 染色中,加入 (PI) 终浓度 50 g/L 和 RNaseA 终浓度 0.1 g/L, 4 ℃ 避光染色 30 min,进行流式细胞仪分析。观察凋亡峰来检测细胞的凋亡。采用 Becton dickinson FACS 分析系统和 Multicycle 软件进行细胞周期和凋亡的分析。

1.2.5 Western blot

人肝癌 SMMC-7721 细胞(1×10^6)种于 6 孔板中,培养 24 h 后,分别用 0、1.25、2.5、5 μmol/L 的 PS I 处理肝癌细胞 24 h。提取细胞总蛋白,方法简单描述如下,收集对照组及药物处理组细胞, PBS 洗细胞一次,用细胞裂解液裂解细胞,在冰上操作 30 min, 13 000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min,收集细胞上清。BCA 法测定蛋白浓度。Western blot 的操作方法参考文献^[13]。取总蛋白 20 μg,与上样缓冲液混合,95 ℃, 5 min 加热变性,10%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白质,电转移法将蛋白质转移到 PVDF 膜,1:1 000 稀释的兔抗人多克隆抗体 Fas、Bcl-2、Bax、Cyclin D1、Cyclin E, 4 ℃ 冰箱孵育过夜,加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔或羊抗鼠 IgG 室温孵育 2 h 后, TBST 摇洗 3 次,每次 10 min,用 DAB 显色系统进行目的条带显色,其中 β-actin 为内参。

1.2.6 统计学分析

所有实验至少重复 3 次,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 17.0 统计软件进行 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 PS I 对肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖影响

不同浓度的 PS I 分别作用于肝癌 SMMC-7721 细胞 24、48、72 h 后, 细胞增殖的抑制率均明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ 组(均 $P < 0.01$) (图 1), 并呈时间和浓度依赖性. 药物在 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别是 3.59、1.39、0.63 $\mu\text{mol/L}$, 结果见图 1.

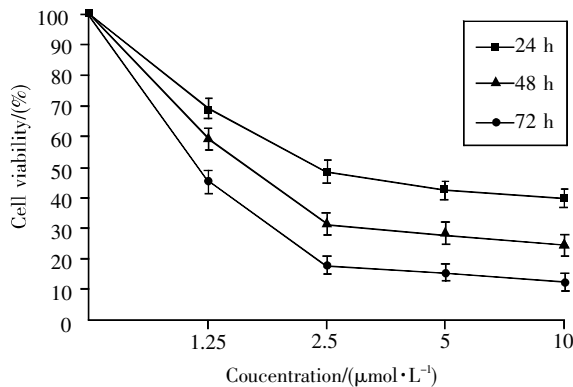


图 1 PS I 对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用
Fig.1 Effect of PS I on the proliferation and viability of SMMC-7721 carcinoma cells as determined by MTT assay

2.2 PS I 对人肝癌 SMMC-7721 细胞形态的影响

对照组和药物处理组细胞在进行 Hoechst 33528 染色后, 采用荧光显微镜观察细胞形态的变化. 对照组细胞的核呈圆形(图 A), 但是药物处理组(2.5 $\mu\text{mol/L}$)的细胞出现细胞皱缩, 核碎裂, 凋亡小体形成, 呈现典型的凋亡变化(图 B).

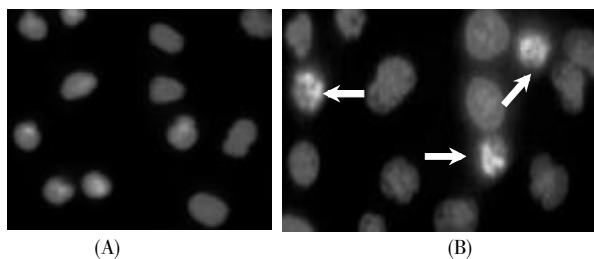


图 2 Hoechst 33528 染色观察 PS I 对人肝癌 SMMC-7721 细胞形态的影响

(A) 对照组; (B) PS I (2.5 $\mu\text{mol/L}$)处理组.

Fig.2 Fluorescent imaging of nuclei in PS I treated and untreated cells by Hoechst 33528 staining

(A) Control group; (B) PS I (2.5 $\mu\text{mol/L}$)-treated group.

2.3 PS I 对人肝癌 SMMC-7721 细胞周期及凋亡的影响

0、1.25、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 的 PS I 分别处理人肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h 后, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 药物处理组 G_0/G_1 期细胞比例明显增高 ($P < 0.01$);

S 期和 G_2/M 期细胞比例则明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P < 0.01$). 各药物处理组均可观察到凋亡峰, 与对照组相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 并呈浓度依赖性, 结果见表 1.

表 1 PS I 对 SMMC-7721 细胞周期及凋亡的影响
Table 1 Effect of PS I on cell cycle profile and apoptosis of SMMC-7721 cells by FACScan analysis

Groups ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	G_0/G_1	S	G_2/M	Apoptosis rate/(%)
0	55.05 \pm 3.7	29.75 \pm 2.5	15.20 \pm 2.7	0.96 \pm 0.43
1.25	63.55 \pm 4.5*	27.16 \pm 3.2	9.20 \pm 1.5*	29.4 \pm 3.1*
2.5	77.81 \pm 3.6*	13.85 \pm 2.4*	8.34 \pm 1.6*	50.4 \pm 3.6*
5	89.64 \pm 4.3*	7.68 \pm 1.2*	2.68 \pm 1.4*	56.46 \pm 3.8*

注: 与对照组比较: * $P < 0.01$.

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

2.4 PS I 对人肝癌 SMMC-7721 细胞株 Fas, Bcl-2, Bax, Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达的影响

随着 PS I 作用浓度的增加, 人肝癌 SMMC-7721 细胞的 Fas、Bax 蛋白的表达水平上调, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin E 蛋白的表达水平下降, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性, 结果见图 3.

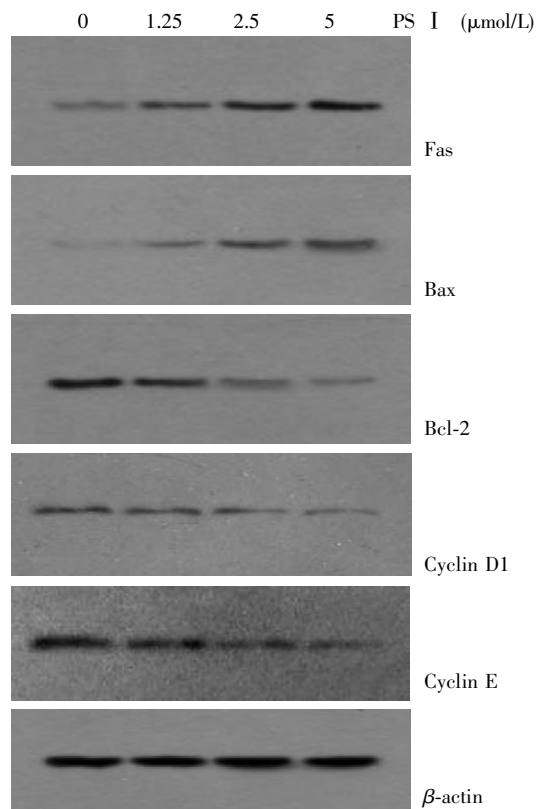


图 3 PS I 对肝癌 SMMC7721 细胞株的 Fas、Bax、Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin E 表达水平的影响

Fig.3 Effects of PS I on the levels of Fas, Bax, Bcl-2, Cyclin D1 and Cyclin E in SMMC7721 cells

3 讨论

原发性肝癌是一种发病率较高的消化道肿瘤,目前的治疗效果一直都不是很好^[4].在临床中肝癌的治疗手段一般是采取手术、化疗一级放疗,但是毒副作用比较明显.近年来,随着中药研究的不断深入,由于中药的毒副作用较小而使中药抗肿瘤的研究广受关注. PS I 是从重楼中分离出的一种甾体皂苷,目前研究表明其对乳腺癌、肝癌、非小细胞型肺癌及子宫癌具有细胞毒性作用^[4,5,8,9].本研究主要以人肝癌 SMMC-7721 细胞株为研究对象,探讨 PS I 在体外对肝癌细胞株 SMMC-7721 的生长和凋亡的影响及相关机制.

本研究结果显示 PS I 能显著性抑制肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖,并呈时间浓度依赖性.为进一步阐明 PS I 抑制 SMMC-7721 细胞增殖的机制,我们从细胞周期角度进行了深入的研究.细胞周期指的是细胞分裂所产生的新细胞的生长开始到下一次细胞分裂形成子细胞结束为止这一期间所经历的过程.一个完整的细胞周期是由 DNA 合成前期(G_1 期)、DNA 合成期(S期)、DNA 合成后期(G_2 期)、细胞分裂期(M期)、 G_0 期所组成^[15].流式细胞仪检测细胞周期结果显示 PS I 可明显增加 G_1 期细胞数,而 G_2/M 期和 S 期的细胞数显著减少,说明 PS I 使肿瘤细胞的增殖生长周期发生了改变,能使肿瘤细胞阻滞在 G_1 期,因而使肿瘤细胞的增殖受到抑制.研究认为,凋亡由基因调控的细胞的一个固有的主动消亡的过程,对维持组织的稳态具有非常重要的作用,细胞的凋亡受阻是引起肿瘤发生以及耐药的一个主要病理学基础^[16,17],可能是肿瘤发生以及发展的重要因素^[18],肿瘤细胞周期发生改变往往与肿瘤细胞的凋亡相关.流式细胞仪检测结果显示随着 PS I 浓度的增加,肿瘤细胞的凋亡峰增加,Hoechst 33528 染色亦显示 PS I (2.5 $\mu\text{mol/L}$)处理后的肝癌细胞呈现典型的凋亡形态特征,表明 PS I 对肝癌细胞具有良好的诱导凋亡作用.

Fas 是在凋亡中起非常重要作用的一类蛋白质^[19].Fas 基因定位于人染色体 10q24.1,属于 TNFR/NGFR 家族,其表达的蛋白质能和 T 效应细胞表面的 Fas-L 配体相结合,传递信号,诱导细胞的凋亡^[20].Western blot 的结果显示 PS I 可明显上调 Fas 蛋白的表达,呈浓度依赖性,表明 PS I 可能通过激活 Fas 基因诱导肝癌细胞的凋亡.细胞

的凋亡途径有两条:胞外途径(死亡受体途径),或者胞内途径(线粒体途径).Bcl-2 家族蛋白是公认的线粒体凋亡途径的重要凋亡因子,Bax 和 Bcl-2 是 Bcl-2 基因家族成员之一,Bax 和 Bcl-2 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞的凋亡^[21,22].研究发现细胞发生凋亡与 Bax 基因水平的过表达和 Bax/Bcl-2 比率的增加相关,Bcl-2 与 Bax 蛋白表达水平的比率决定了异二聚体(Bcl-2/Bax)与同二聚体(Bax/Bax)的比值,当 Bax 同源二聚体占优势时,细胞易于在诱导剂的作用下发生凋亡^[23].大量研究表明,在很多种肿瘤组织中都存在有 Bcl-2 和/ (或)Bax 蛋白表达的失常,而一些抗癌药物可以调节 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达水平^[24].本研究结果发现,PS I 可以浓度依赖性地诱导 Bax 蛋白表达上调,并下调 Bcl-2 的蛋白表达水平,提示 PS I 可能通过上调 Bax 和下调 Bcl-2 的蛋白表达水平来诱导肝癌细胞的凋亡.

Cyclin D1 和 Cyclin E 是一类细胞调控蛋白,它们在细胞周期的正常调控中起着非常重要的作用.Cyclin D1 与 Cyclin E 分别通过结合并激活细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase-4, CDK4) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase-2, CDK2) 来启动 DNA 的复制,促进细胞由 G_1 期进入到 S 期^[25].因此,如果 Cyclin D1 和 Cyclin E 发生过表达,将会引起细胞增殖的周期发生失调,细胞将会发生过度增殖从而导致肿瘤的发生.本实验结果发现,PS I 可以下调 Cyclin D1 及 Cyclin E 的表达,呈浓度依赖性,提示 PS I 下调 Cyclin D1 及 Cyclin E 的蛋白表达可能是其周期阻滞的机制之一.

综上所述,PS I 可通过下调 Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白的表达,阻滞肝癌细胞 SMMC-7721 的 DNA 的复制,同时通过促进 Fas, Bax 蛋白的表达,抑制 Bcl-2 蛋白的表达水平从而诱导肝癌细胞 SMMC-7721 的凋亡,本研究为 PS I 的临床应用提供了实验依据.

参考文献(References):

- [1] 陈磊,李德卫.肝细胞癌分子靶向治疗进展[J].胃肠病学和肝病杂志(CHEN Lei, LI De-wei. Advances in molecularly targeted therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Gastroenterology Hepatology, 2010, 19(8): 694.
- [2] 曹军,孙权,刘志苏.维生素 E 联合顺铂抑制肝癌细胞 BEL-7402 体外增殖作用及其机制 [J]. 中华实验外科杂志(CAO Jun, SUN Quan, LIU Zhi-su. Inhibitory effects of the combination of vitamin E and cisplatin on the *in vitro* proliferation of

- BEL-7402 cells and the mechanisms[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2009, 26 (11): 1456.
- [3] HO J W, LEUNG Y K, CHAN C F. Herbal medicine in the treatment of cancer[J]. Current Medical Chemistry, Anticancer Agents, 2002, 2(2): 209-214.
- [4] LEE M S, YUET-WA J C, KONG S K, *et al.* Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in paris polyphylla, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft[J]. Cancer Biology & Therapy, 2005, 4(11): 1248-1254.
- [5] CHEUNG J Y, ONG R C, SUEN Y K, *et al.* Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells [J]. Cancer Letters, 2005, 217(2): 203-211.
- [6] DENG S, YU B, HUI Y, *et al.* Synthesis of three diosgenyl saponins: dioscin, polyphyllin D, and balanitin 7[J]. Carbohydrate Research, 1999, 317(1-4): 53-62.
- [7] LI B, YU B, HUI Y, *et al.* An improved synthesis of the saponin, polyphyllin D [J]. Carbohydr Research, 2001, 331(1): 1-7.
- [8] SIU F M, MA D L, CHEUNG Y W, *et al.* Proteomic and transcriptomic study on the action of a cytotoxic saponin (Polyphyllin D): induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-mediated apoptotic pathways[J]. Proteomics, 2008, 8(15): 3105-3117.
- [9] XIAO X, BAI P, TRI M, *et al.* The antitumoral effect of Paris Saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2009, 8(5): 1179-1188.
- [10] HWANG J M, KUO H C, TSENG T H, *et al.* Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cells[J]. Archives of Toxicology, 2006, 80(2): 62-73.
- [11] RAMONEDE B M, PÉREZ-TOMÁS R. Activation of protein kinase C for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin[J]. Biochemical Pharmacology, 2002, 63(3): 463-469.
- [12] VINODHKUMAR R, SONG Y S, DEVAKI T. Romidepsin (depsipeptide) induced cell cycle arrest, apoptosis and histone hyperacetylation in lung carcinoma cells (A549) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression[J]. Biomedicine Pharmacotherapy, 2008, 62(2): 85-93.
- [13] GUO J, XIAO B, LIU Q, *et al.* Suppression of C-myc expression associates with anti-proliferation of aloe-emodin on gastric cancer cells[J]. Cancer Investigation, 2008, 26(4): 369-374.
- [14] 韩丹, 叶胜龙, 刘彬彬, 等. *Survivin* 在原发性肝细胞癌中的表达及其与侵袭、转移的关系[J]. 中华实验外科杂志(HAN Dan, YE Sheng-long, LIU Bin-bin, *et al.* Expression of *Survivin* in Hepatocellular carcinoma and its relationship with the invasion and metastasis[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery), 2007, 24(12): 1502.
- [15] PARK M Y, CHOI S C, LEE H S, *et al.* A quantitative analysis of N-myc downstream regulated gene 2(NDRG 2) in human tissues and cell lysates by reverse-phase protein microarray[J]. Clinica Chimica Acta, 2008, 387(1-2): 84-89.
- [16] 黄云燕, 夏焱, 郭海, 等. 干扰素 α 、5-AZA-CdR 对白血病细胞 HL-60 和 K562 的作用[J]. 中山大学学报(医学科学版)(HUANG Yun-yan, XIA Yan, GUO Hai, *et al.* Effect of α -interferon and 5-aza-2'-deoxycytidine on leukemia cells HL-60 and K562[J]. Journal of Sun Yat-Sen University (Medical Sciences)), 2007, 28(3): 274-278.
- [17] 洪迅, 张继红, 郭中敏, 等. Genistein 调节肝癌 HepG2 细胞 Caspase 3 蛋白表达诱导凋亡的作用研究 [J]. 热带医学杂志(HONG Xun, ZHANG Ji-hong, GUO Zhong-min, *et al.* Effects of genistein on the expression of caspase 3 and the induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 Cells[J]. Journal of Tropical Medicine), 2007, 7(4): 332-334, 338.
- [18] KERR J F R, HARMON B V, WINTERFORD C M. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013-2016.
- [19] 詹启敏, 曹亚, 陈英, 等. 分子肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社 (ZHAN Qi-min, CAO Ya, CHEN Ying, *et al.* Molecular Oncology[M]. Beijing People's Medical Publishing House), 2005. 407-410.
- [20] LOCKSHIN R A. Programmed cell death: history and future of a concept[J]. Journal de la Société de biologie, 2005, 199(3): 169-173.
- [21] YOULE R J, STRASSER A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(1): 47-59.
- [22] 胡强, 李琦, 殷佩浩, 等. 蟾毒灵诱导人胰腺癌细胞凋亡及其对 *Survivin* 基因表达的影响[J]. 上海中医药大学学报(HU Qiang, LI Qi, YIN Pei-hao, *et al.* Apoptosis of human pancreatic cancer cell induced by bufalin and its effects on *survivin* expression in nude mice[J]. Acta Universitatis Traditionis Medicinalis Sinensis Pharmacologiae Shanghai), 2008, 22(1): 55-58.
- [23] 王卫东, 陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志 (WANG Wei-dong, CHEN Zheng-tang. Bcl-2/Bax ratio and the “life or death fate” of cells[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy), 2007, 14(4): 393-396.
- [24] LALIER L, CARTRON P F, JUIN P, *et al.* Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 887-896.
- [25] JOHNSON D G, DEGREGORI J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context[J]. Current Molecular Medicine, 2006, 6(7): 731-738.