

· 药理 ·

构树叶总黄酮调控 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达 及 caspase-3 活性诱导 HepG-2 细胞凋亡的研究

朱开梅¹, 陈丹², 李美波¹, 许有瑞¹, 刘建楠¹, 顾生玖^{1*}

(1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西工人医院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**研究构树叶总黄酮(total flavonoids of *Broussonetia papyrifera*, TFBP)诱导 HepG-2 细胞凋亡的机制。**方法:**采用体外细胞培养方法,取对数生长期人肝癌 HepG-2 细胞,随机分为药物组和对照组,药物组用 3,6,9,12 g·L⁻¹不同质量浓度 TFBP 作用人肝癌 HepG-2 细胞 24,48,72 h 后,应用 MTT 法检测 TFBP 对人肝癌细胞 HepG-2 生长抑制作用;Hoechst 33342 荧光染色法荧光显微镜观察各浓度 TFBP 作用细胞 48 h 后的细胞的形态变化;通过免疫细胞化学 SP 法检测凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达;比色法检测半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活性。**结果:**TFBP 在体外对人肝癌细胞 HepG-2 有较强的浓度依赖性和时间依赖性抑制作用,9,12 g·L⁻¹的 TFBP 作用 HepG-2 细胞 72 h 后,细胞增殖抑制率可分别达 52.46%,64.72%,与对照组具有显著性差异($P < 0.01$),可诱导细胞凋亡,质量浓度 9,12 g·L⁻¹的 TFBP 作用 HepG-2 细胞 48 h 后就可出现典型的凋亡小体,TFBP 可升高 caspase-3 活性,并具有浓度效应,同时还可下调 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2/Bax。**结论:**TFBP 在体外对肝癌细胞 HepG-2 有明显的增殖抑制和诱导细胞凋亡的作用。其诱导凋亡的机制可能与其下调 Bcl-2 蛋白和上调 Bax 蛋白的表达,下调 Bcl-2/Bax 以及增强 caspase-3 的活性有关。

[关键词] 构树叶总黄酮; HepG-2 细胞株; 细胞凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病 2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 半胱氨酸蛋白酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0128-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190128

Effect of Total Flavonoids of *Broussonetia Papyrifera* on Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG-2

ZHU Kai-mei¹, CHEN Dan², LI Mei-bo¹, XU You-ruì, LIU Jian-nan¹, GU Sheng-jiu^{1*}

(1. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Guangxi Workers' Hospital, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** The total flavonoids of *Broussonetia papyrifera* (TFBP) was investigated for its antitumor activity and induction of apoptosis *in vitro*, using human HepG-2 hepatocellular carcinoma cell line. **Method:** The hepatocellular carcinoma HepG-2 cells in logarithmic phase of growth were randomly divided into drug group and control group, with the concentration of 3, 6, 9, 12 g·L⁻¹ TFBP in hepatocellular carcinoma HepG-2 cells intervention durations were 24, 48, 72 h accordingly. The viability of HepG-2 cells was measured by MTT. Morphology of cell apoptosis was observed by Hoechst 33342 fluorescence staining. The protein expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) was analyzed by immunocytochemical method (SP). **Result:** TFBP inhibited the growth of cells and caused apoptosis

[收稿日期] 20130921(007)

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科能 129825-21,桂科合 14123001-22);广西教育厅项目项目(201202ZD065);桂林市科技攻关项目(科技攻关 20130103-8,20140105-11,20130103-9,20130113-1,20120105-5,20120105-16,20120105-8)

[第一作者] 朱开梅, 硕士, 教授, 从事化学致病分子机制和药物防治研究, Tel:13977375180, E-mail: glzkm@163.com

[通讯作者] * 顾生玖, 博士, 教授, 从事药物化学研究, Tel:13607733816, E-mail: gushengjiu@163.com

significantly. The suppression was both in a time-and dose-dependent manner. When HepG-2 cells were treated with the concentration of 9, 12 g · L⁻¹ TFBP in 72 h, the inhibition rate can be achieved 52.46%, 64.72% respectively. Compared with control group, there has significant difference ($P < 0.01$). When HepG-2 cells were treated with the concentration of 9, 12 g · L⁻¹ TFBP in 48 h, the typical apoptotic body can be observed under the fluorescence microscope. The increase of caspase-3 activity induced by TFBP showed a concentration-efficiency. TFBP down-regulated the Bcl-2 expression and up-regulated the Bax expression. The ratio of Bcl-2/Bax was evident decrease. **Conclusion:** TFBP has apparent inhibition and apoptosis-inducing effect on HepG-2 cells. TFBP may induce apoptosis via down-regulating Bcl-2 expression, up-regulating of Bax expression, decreasing the ratio of Bcl-2/Bax and enhancing caspase-3 activities in HepG-2 cells.

[**Key words**] total flavonoids of *Broussonetia papyrifera*; HepG-2 cell line; apoptosis; Bcl-2; Bax; caspase-3

构树又名鹿仔树、奶树、造纸树、沙纸树、沙皮树等^[1]。构树的果实、树叶、枝条、根皮以及茎皮部的乳汁均可入药^[2-3],研究发现,构树属植物的提取物具有抗真菌、抗肝毒、抗过氧化、抗血小板形成以及治疗乳腺癌、前列腺癌等活性作用,其中起药效作用的主要是黄酮类和生物碱类两大类活性物质^[4-6]。本课题组前期研究发现构树叶总黄酮(TFBP)可有效的抑制人肝癌细胞 HepG-2 的生长,机制研究表明构树叶总黄酮通过诱导肿瘤细胞凋亡达到抗 HepG-2 人肝癌的作用^[7]。本研究在前期工作的基础上,通过构树叶总黄酮对半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活性和 B 细胞淋巴瘤/白血病 2(Bac-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达的影响,进一步研究 TFBP 诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG-2,由桂林医学院科学实验中心提供。

1.2 试剂 构树叶于 2009 年 9 月采集于桂林医学院药用植物园,由药学院天然药化教研室傅鹏博士鉴定其来源于桑科构属植物构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. 的叶子。构树叶总黄酮(TFBP,由本实验室提取,含量为 1.39 mg · g⁻¹)^[6]。四氮唑蓝(MTT,批号 1112B13)与二甲基亚砷(批号 1113B02,均为美国 Amresco 公司),胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技有限公司),鼠抗人 Bcl-2 蛋白单克隆抗体(批号 K112332D)、鼠抗人 Bax 单克隆抗体(批号 K112314D)、浓缩型 DAB 试剂盒(批号 K112329D)、两步法免疫组化检测试剂(批号 948866A,均为中衫金桥公司),caspase-3 活性检测试剂盒(碧云天生物技术研究所),Triton X-100(上海前生生物科技有限公司),33342 试剂盒(南京凯基生物科技有限公司),其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 CO₂ 培养箱(Thermo,美国),DG3002 型酶联免疫检测仪,倒置荧光显微镜(Olympus,日本),台式冷冻离心机(Beckman-Coulter,美国),SWCJ-2F 型超净工作台(苏净集团)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 HepG-2 人肝癌细胞以适量浓度接种于培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于 37 °C 恒温,5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中传代培养,细胞贴壁生长,每 1~2 d 传代 1 次。传代时首先倒出培养液,PBS 洗 3 次,胰酶消化后加入新鲜的培养液吹打均匀,调整细胞至适当密度移入新的培养瓶中,添加培养液至适量。取指数生长期的 HepG-2 人肝癌细胞进行试验。将 TFBP 用 pH 7.8 的 PBS 溶解后,过滤除菌,于 4 °C 冰箱保存备用,实验前稀释至所需质量浓度 3,6,9,12 g · L⁻¹。

2.2 测细胞增殖的抑制率 取对数生长期的 HepG-2 细胞,用 0.25% 胰酶消化并计数,调整细胞密度为 4 × 10⁴/mL 接种于 96 孔板中,24 h 后观察细胞贴壁情况,待细胞完全贴壁后,吸除培养液,分别以质量浓度 3,6,9,12 g · L⁻¹ 处理 HepG-2 细胞,分别培养 24,48,72 h,同时设不加药组为对照组。终止培养后每孔加入 20 μL MTT,孵育 4 h,弃上清液,加入 DMSO 150 μL,振荡,选择 490 nm 波长酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度(A),计算细胞增殖抑制率。实验重复 3 次,取平均值。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 } A_{490} - \text{实验组 } A_{490}) / \text{对照组 } A_{490} \times 100\%$$

2.3 荧光染色观察细胞凋亡 取肝癌对数生长期细胞,以每孔 2 × 10⁵ 个细胞/孔的密度接种于 6 孔培养板,待细胞完全贴壁后,吸除培养液,加入 3,6,9,12 g · L⁻¹ 不同质量浓度的 TFBP,再置于 37 °C,

5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中。待培养 48 h 后终止培养,去培养液,PBS 冲洗,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤后加入 Hoechst 33342 染液,避光,37 °C 孵育 30 min 后,显微镜下观察细胞形态。

2.4 免疫细胞化学染色法

2.4.1 细胞爬片 取对数生长期 HepG-2 细胞,调整细胞密度为 4 × 10⁵ 个/mL 加入 6 孔板中,调整细胞密度为 2 × 10⁵ 个/孔,放置于 37 °C 培养箱中培养,24 h 后观察细胞爬片情况,分别加入 3,6,9,12 g·L⁻¹ 不同浓度的 TFBP。继续培养 48 h 后终止培养,收集爬片进行免疫细胞化学检测。

2.4.2 免疫细胞化学检测 取出药物处理后的 HepG-2 细胞爬片,PBS 溶液清洗。加入一定量的 4% 多聚甲醛固定 15 min,弃净 4% 多聚甲醛溶液,空气干燥 5 min,PBS 清洗,0.5% Triton X-100 孵育 20 min,PBS 清洗,3% H₂O₂ 孵育 15 min,PBS 清洗。加入一抗,37 °C,孵育 2 h,PBS 清洗。加入二抗,37 °C,30 min,PBS 清洗后,滴加新鲜配制 DAB 显色液避光显色 10 min,在显微镜下观察,充分显色后蒸馏水冲洗 5 min。苏木素复染 10 min,蒸馏水冲洗,乙醇梯度脱水,透明,中性树胶封片,镜下观察。设 PBS 代替一抗为阴性对照。

2.4.3 结果判断 采用 ImagePro Plus 软件进行灰度值分析。光镜下连续观察 6 个视野,得出灰度值,取均值作为凋亡相关蛋白的阳性表达率。

2.5 检测细胞内 caspase-3 活性 收集经各浓度 TFBP 作用 24 h 后的 HepG-2 细胞,弃上清,PBS 清洗。按试剂盒说明操作,加入裂解液,冰浴裂解后 16 000 × g 离心,取上清加入 caspase-3 底物 (DEVP-PNA),37 °C 水浴 1 h 后用酶标仪测定 405 nm 波长下吸光度 (A₄₀₅)。用不同浓度的对照品 PNA 溶液在 405 nm 处测 A₄₀₅ 后,并绘制标准曲线,计算其斜率,caspase-3 活性单位 (U) 按下列公式计算。U = A_{405 实验组} / A_{405 对照组} × 100% (重复 4 次试验)。

2.6 统计学处理 所有实验数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行 One-way ANOVA 检验分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HepG-2 细胞增殖具有抑制作用 经 3,6,9,12 g·L⁻¹ 不同质量浓度的 TFBP 作用后的各实验组与阴性对照组细胞相比,HepG-2 细胞的增殖受到明显的抑制 (P < 0.05)。TFBP 对人肝癌 HepG-2 细胞生长具有抑制作用,且这种抑制作用具有剂量依赖性和时间依赖性关系。见表 1。

表 1 TFBP 对 HepG-2 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

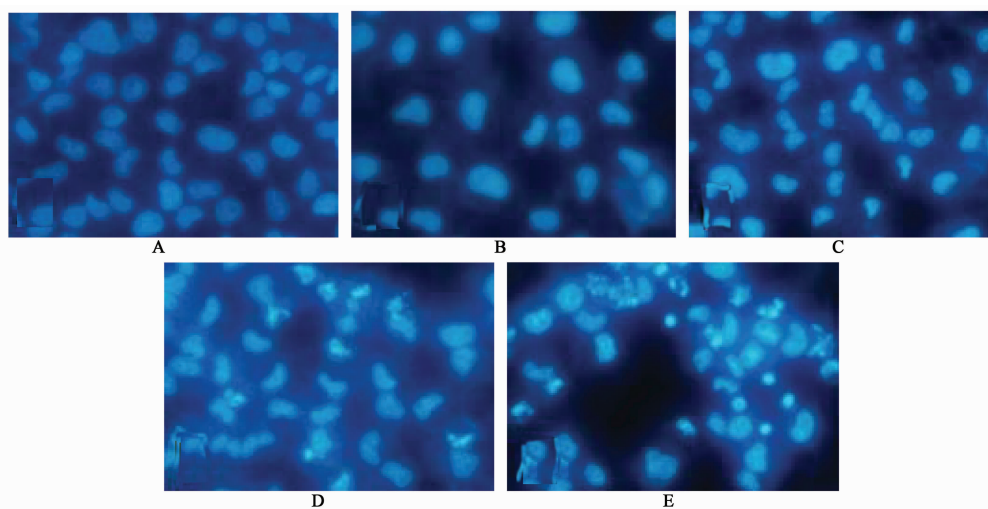
TFBP/g·L ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
	A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
0	0.487 ± 0.010	-	0.505 ± 0.017	-	0.514 ± 0.004	-
3	0.451 ± 0.051	7.63	0.403 ± 0.005 ¹⁾	20.2	0.374 ± 0.022 ¹⁾	27.24
6	0.436 ± 0.020 ¹⁾	11.86	0.356 ± 0.014 ¹⁾	29.44	0.336 ± 0.013 ¹⁾	34.70
9	0.408 ± 0.001 ¹⁾	19.02	0.307 ± 0.003 ¹⁾	39.21	0.244 ± 0.005 ²⁾	52.46
12	0.381 ± 0.001 ¹⁾	21.81	0.283 ± 0.007 ¹⁾	43.96	0.181 ± 0.005 ²⁾	64.72

注:与对照组比较¹⁾ P < 0.05,²⁾ P < 0.01(表 2 ~ 3 同)。

3.2 对 HepG-2 细胞核形态的影响 不同浓度的 TFBP 处理 HepG-2 细胞 48 h 后,倒置荧光显微镜下观察形态学改变。对照组细胞未见或很少见凋亡细胞,细胞染色质均匀,细胞核形态规则。实验组细胞,随着 TFBP 质量浓度的增加,逐渐出现细胞形态学的改变。当 TFBP 为 3 g·L⁻¹ 时,HepG-2 细胞凋亡现象不明显,但随药物浓度增加至 6 g·L⁻¹,贴壁细胞明显减少,皱缩、变圆和脱落细胞逐渐增加,凋亡细胞出现。当质量浓度为 9 g·L⁻¹ 时,凋亡细胞增多,看见典型的凋亡细胞形态改变,细胞核皱缩变形,部分细胞呈现致密浓染,呈现高度凝聚、边缘化,甚至裂解为碎块,产生凋亡小体,当质

量浓度为 12 g·L⁻¹ 时,细胞大部分呈凋亡形态改变。见图 1。

3.3 对 Bcl-2, Bax 蛋白的影响 Bcl-2 蛋白主要定位于细胞浆。对照组细胞胞浆染色细胞数量较多,且呈棕黄色,经不同浓度的 TFBP 处理 48 h 后的实验各组阳性细胞数量明显减少,细胞浆着色随着浓度的增加而逐渐变浅,阳性表达率与对照组比较具有统计学意义 (P < 0.05)。Bax 蛋白也主要定位于细胞浆,染色呈棕黄色。对照组胞浆染色细胞数量少,而实验各组阳性细胞数明显增多,染色加深,阳性表达率与对照组相比差异有显著性 (P < 0.05)。见表 2 和图 2,3。



A. 对照组;B. TFBP 3 g·L⁻¹;C. TFBP 6 g·L⁻¹;D. TFBP 9 g·L⁻¹;E. TFBP12 g·L⁻¹ (图 2~3 同)

图 1 TFBP 对人肝癌 HepG-2 细胞作用 48 h 后的形态学变化(×100)

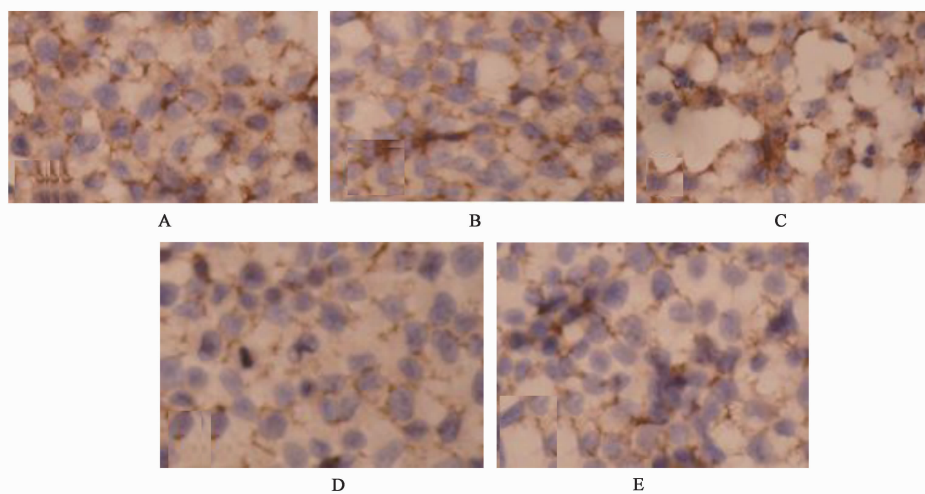


图 2 TFBP 作用 HepG-2 细胞 48 h 后细胞内 Bcl-2 蛋白的变化(×100)

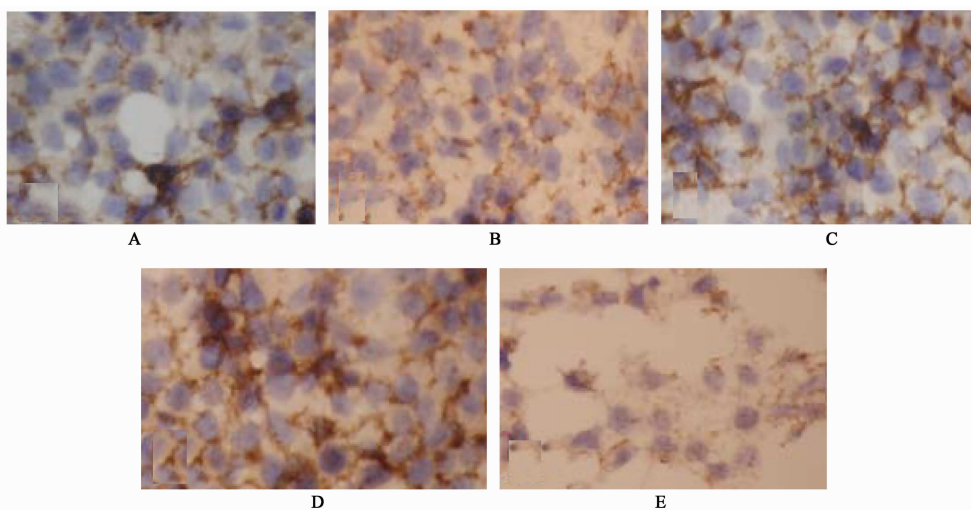


图 3 TFBP 作用 HepG-2 细胞 48 h 后细胞内 Bax 蛋白的变化(×100)

3.4 TFBP 对 HepG-2 细胞内 caspase-3 活性的影响

TFBP 对 HepG-2 细胞作用 24 h 后,随着 TFBP 浓度的增加,caspase-3 酶活性显著增高,各实验组结果与空白对照组比较有显著的统计学差异($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同质量浓度 TFBP 作用 HepG-2 细胞 Bcl-2, Bax 蛋白 caspase-3 酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	TFBP /g·L ⁻¹	Bcl-2	Bax	Caspase-3 /U·mg ⁻¹
空白	0	42.22 ± 2.13	22.77 ± 0.81	1.38 ± 2.13
TFBP	3	36.21 ± 2.05	27.27 ± 0.32 ¹⁾	3.58 ± 2.21
	6	29.34 ± 1.9 ¹⁾	30.5 ± 0.5 ¹⁾	4.95 ± 3.61 ¹⁾
	9	20.73 ± 1.41 ¹⁾	36.17 ± 0.05 ¹⁾	5.25 ± 1.41 ¹⁾
	12	27.95 ± 0.04 ¹⁾	39.39 ± 0.70 ¹⁾	5.75 ± 2.24 ¹⁾

4 讨论

庞素秋^[8]等首次从楮实子中分离得到 5 种生物碱并制成药液,发现楮实子总生物碱对多种肿瘤细胞生长有抑制作用。研究发现构树提取液中的查耳酮类,不仅有抗氧化作用,还可以抑制肿瘤因子 NF- κ B 的活性^[9]。而肿瘤的发生时由于细胞增殖和凋亡失调而导致的细胞无限增殖,肿瘤细胞凋亡即其增殖抑制成为评估抗癌药物作用能力的重要指标^[10]。本研究发现不同浓度 TFBP 作用于肝癌 HepG-2 细胞,抑制率与对照组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$),提示 TFBP 抗肿瘤机制之一是抑制肿瘤细胞的增殖,且随着药物浓度的增加,作用时间的延长抑制率增高。

细胞凋亡是一个细胞自我破坏的程序性生化过程,是多细胞生物体内的一个重要的生物学现象,即可出现在生理状态下也可出现的病理状态下,在这个过程中大量的基因被激活,蛋白质表达增加,其中 Bcl-2 家族蛋白及 caspase-3 家族蛋白酶在细胞凋亡中发挥着重要的作用。Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡过程中的一类调节因子,Bcl-2 家族中备受关注的两大“明星基因”分别是 Bcl-2, Bax。其中 Bcl-2 代表抑制凋亡蛋白,其作用是抑制细胞凋亡,而 Bax 是 Bcl-2 的同源基因,代表促凋亡蛋白,其过表达可拮抗 Bcl-2 的抗凋亡作用而使细胞趋于凋亡。研究发现 Bax/Bcl-2 两种蛋白表达水平的比例是决定细胞凋亡受抑强弱的关键因素。因此认为,下调肿瘤细胞中 Bcl-2 蛋白的表达,上调 Bax 蛋白的表达,是促

进肿瘤细胞凋亡的有力手段之一^[11]。而在凋亡信号途径中,另一重要角色就是 caspase 家族蛋白酶。半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统,在细胞凋亡机制网络中居中心地位^[12]。caspase-3 是介导细胞凋亡的关键执行分子,在凋亡信号传导途径中发挥重要作用。caspase-3 被称为“死亡蛋白酶”,是细胞凋亡的生物学标志,其活化及活性受到多种因素的调节^[13],它通常以酶原的形式存在于胞浆中,在细胞凋亡的早期阶段可被黄酮类化合物激活^[14]。活化的 caspase3 由两个大亚基和两个小亚基组成,可裂解相应的胞浆胞核底物,最终导致细胞凋亡^[15]。因此本实验旨在从 TFBP 促进肿瘤细胞凋亡方面,重点研究了 TFBP 对肝癌 HepG-2 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量和 caspase-3 活性的影响,从而来探讨 TFBP 诱导 HepG-2 细胞的凋亡可能存在的机制。

实验结果发现,在一定浓度和一定时间范围内,TFBP 对人肝癌 HepG-2 细胞有显著的增殖抑制作用,可以诱导肝癌 HepG-2 细胞凋亡,经高浓度的 TFBP 处理后的 HepG-2 细胞 Hoechst33342 荧光染色后看见明显的细胞凋亡形态。免疫细胞化学结果表明 HepG-2 细胞经不同浓度的 TFBP 作用后 48 h 后,HepG-2 细胞内的凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达随着药物作用浓度的增加而显著减弱,凋亡促进蛋白 Bax 的表达则随着药物浓度的增加而显著增强,Bcl-2/Bax 增大。故 TFBP 可能通过下调凋亡抑制蛋白与上调凋亡促进蛋白的双重作用,而促进肿瘤细胞凋亡。细胞内 caspase-3 活性的影响,随着 TFBP 浓度的增加,酶活性显著增高,各实验组结果与空白对照组比较有显著的统计学差异($P < 0.05$)。

综上所述,构树叶总黄酮 TFBP 有显著抑制 HepG-2 细胞的增殖和诱导细胞凋亡的作用,且具有呈剂量与时间依赖性关系,其作用机制可能与 TFBP 能通过上调促凋亡基因 Bax 的表达,下调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达及 Bcl-2/Bax 以及增强 caspase-3 的活性有关。由于细胞凋亡的调控是多个基因参与并受多因素调控的复杂过程,因此 TFBP 抑制 HepG-2 细胞生长与诱导 HepG-2 细胞凋亡的确切机制与具体信号途径,尚待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 郑汉臣,黄宝康,秦路平,等. 构树属植物的分布及其生物学特性[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(6):11.

生、熟延胡索饮片药理作用的对比研究

李荣, 蔡青青, 牛彦兵, 杨圣财, 窦志英*

(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] **目的:**基于张仲景“生熟异用”理论探讨延胡索及其炮制品的药效差异,阐明中药炮制理论的科学性,为临床合理使用延胡索提供参考。**方法:**采用热板法与醋酸扭体实验研究生、醋延胡索的镇痛作用;采用二甲苯致耳廓肿胀模型研究生、醋延胡索对昆明种小鼠耳廓肿胀度的影响;采用离体肠平滑肌运动实验研究生、醋延胡索对 Wistar 大鼠离体肠平滑肌运动的影响;采用比浊法研究生、醋延胡索对 ADP、胶原诱导的 Wistar 大鼠血小板聚集的影响。**结果:**生、醋延胡索对热传导、化学刺激引起的拟痛反应较对照组存在显著差异且生、醋延胡索之间存在显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);生、醋延胡索较对照组均能显著抑制二甲苯致耳廓肿胀度($P < 0.01$),但生、醋延胡索之间无差异;醋延胡索较生延胡索可明显抑制 Wistar 大鼠离体肠平滑肌舒缩活动($P < 0.05$, $P < 0.01$);生、醋延胡索在抗 ADP、胶原诱导的血小板聚集方面无差异。**结论:**延胡索醋制可增强镇痛和解痉作用,符合中药炮制生熟论的“生效熟增”的原则。在临床上以汤剂用药时,针对痛症,应用醋延胡索饮片入药,以增强镇痛和解痉作用。

[关键词] 延胡索; 药理作用; 炮制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0133-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190133

[收稿日期] 20140312(008)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(20110700709)

[第一作者] 李荣,从事中药制药专业, Tel:022-59596235, E-mail:2411989133@qq.com

[通讯作者] * 窦志英,教授,从事中药炮制及有效成分研究, Tel:022-59596235, E-mail:zhiyingdou@163.com

- [2] 马养民, 吉艳芬. 构树属植物活性成分的提取分离研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(1):161.
- [3] 熊山, 叶祖光. 楮实子化学成分及药理作用研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(5):102.
- [4] 朱开梅, 刘建楠, 顾生玖, 等. 构树药用活性化学成分及药理临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):198.
- [5] 李莹莹, 窦德强, 熊伟. 构树叶化学成分的研究[J]. 中国现代中药, 2012, 14(4):7.
- [6] Lee D, Bhat K P, Fong H H, et al. Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera* [J]. *Nat Prod*, 2001, 64(10):1286.
- [7] 朱开梅, 姚立新, 刘建楠, 等. 构树叶总黄酮对人肝癌细胞 HepG-2 增殖和凋亡的作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6):270.
- [8] 庞素秋, 王国权, 黄宝康, 等. 楮实子生物碱的细胞毒作用研究[J]. 中药材, 2007, 30(7):826.
- [9] Cheng Z, Lin C, H wang T, et al. Brousochalcone A, apotentantio xidantand effective suppressor of induciblenitri coxidesyn thaseinlipopoly saccharide-activated macrophages[J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(8):939.
- [10] 罗涛, 石孟琼, 刘雄, 等. 薤白总皂苷对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡作用的影响[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(10):762.
- [11] 王晓雪, 彭志刚. 黄酮类化合物诱导肿瘤细胞凋亡作用机制研究进展[J]. 内科, 2009, 4(4):595.
- [12] 弓娟琴, 陈志强, 李文忠, 等. Fas 介导的凋亡与 Caspase 家族[J]. 国外医学:肿瘤学分册, 2001, 27(5):279.
- [13] Ale M T, Maruyama H, Tamauchi H, et al. Fucose-containing sulfatedpoly saccharides from brownsea weeds in hibitpro life ration of melanomacell sand in duceapoptosis by activation of caspase-3 *in vitro*[J]. *Mar Drugs*, 2011, 9(12):2605.
- [14] 李茂, 刘明华, 肖顺汉. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(3):309.
- [15] 曾适, 杨勇, 郭青龙. 黄酮类化合物诱导肿瘤细胞凋亡的机制及其实验研究进展[J]. 药学进展, 2009, 33(9):402.

[责任编辑 聂淑琴]