

和厚朴酚联合青蒿素对 CNE-2 细胞增殖和凋亡的作用

王春玲*, 赖小平, 吴安国

(广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006)

[摘要] 目的: 研究和厚朴酚、青蒿素及二者联合应用在体外能否抑制人鼻咽癌 CNE-2 细胞的生长以及对其细胞凋亡的影响。方法: MTT 法检测和厚朴酚、青蒿素单独或联合对细胞生长的抑制作用, 以 IC_{50} 评判抗肿瘤的效果, 应用金氏公式进行联合用药的结果分析; DAPI 染色观察细胞的凋亡形态, 流式细胞仪检测和厚朴酚、青蒿素单独或联合作用对 CNE-2 凋亡率的影响。结果: 和厚朴酚能显著抑制 CNE-2 细胞的增殖, 并呈剂量依赖关系, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $8.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 青蒿素对 CNE-2 细胞生长没有明显的抑制作用, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $62.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 和厚朴酚与青蒿素联合应用对 CNE-2 细胞的增殖抑制作用优于各单药组, $q > 1.15$ 。DAPI 染色可观察到和厚朴酚与青蒿素联合组核碎裂、凋亡小体, 而单药组则不明显; 凋亡分析显示联合用药组作用 48 h 细胞凋亡率显著高于各单药组。结论: 和厚朴酚单独能够杀伤 CNE-2 细胞, 并呈量-效关系, 青蒿素单独作用不杀伤 CNE-2 细胞, 两者联合应用对 CNE-2 细胞具有协同杀伤作用。

[关键词] 和厚朴酚; 青蒿素; 协同作用; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0157-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1118.009 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:18

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1118.009.html>

Experimental of Honokiol and Artemisinin on Proliferation and Apoptosis of CNE-2 Cells

WANG Chun-ling*, LAI Xiao-ping, WU An-guo

(Research Center of New Drug Development, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate honokiol, artemisinin or combination of honokiol and artemisinin on proliferation and apoptosis of CNE-2 cells *in vitro*. **Method:** MTT assay was used to determine the effect of honokiol, artemisinin or their combination on the proliferation of CNE-2 cells. King formula was applied to analyze the combination effect of the two drugs. DAPI staining was used to observe the morphological changes of CNE-2 cells treated with honokiol, artemisinin or their combination for 48 hours. Flow cytometric analysis was used to detect the apoptosis rate of CNE-2 cells. **Result:** Honokiol could significantly inhibit the proliferation of CNE-2 cells, but artemisinin could inhibit the proliferation of CNE-2 cells slightly. The inhibitory effect of honokiol was in a dose-dependent manner. IC_{50} value of honokiol and artemisinin was 8.58, 62.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The inhibition rate in combination group was much higher than that of the single drug group. Much more chromatin condensation, nuclear fragmentation and formation of apoptotic bodies was observed in combination group than single drug groups under fluorescence microscope. Compared with single drug groups, combination group induced higher apoptotic rate of CNE-2 cells by FCM analysis. **Conclusion:** Honokiol could inhibit proliferation of CNE-2 cells, while artemisinin

[收稿日期] 20110213(004)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BA111B08-04)

[通讯作者] *王春玲, 在读博士研究生, 助理研究员, 从事抗肿瘤药物筛选及机制研究, Tel: 15915803651, E-mail: lingling9699china@yahoo.com.cn

had little effect on the proliferation of CNE-2 cells. However, honokiol combined with artemisinin yield a synergistic inhibitory effect on CNE-2 cells.

[Key words] honokiol; artemisinin; synergistic effect; apoptosis

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是主要分布在中国南方及东南亚国家恶性肿瘤之一,具有高转移和高复发性的特点,95%以上为低分化鳞癌和未分化癌^[1]。放射治疗是鼻咽癌最主要的的治疗手段,但放射结束时10%~18%有局部病灶残留,20%~30%有局部和颈部复发,20%~36%的患者发生远处转^[2]。使得放疗对晚期NPC仍存在着较高的治疗失败率^[3-4],导致患者5年生存率依然在50%左右。寻找对鼻咽癌治疗更有效、毒副作用更小的药物,提高疗效是临床治疗迫切需要解决的问题。药物的联合应用是近年来提出的克服肿瘤耐药的有效策略。多种药物以不同的作用机制作用在靶细胞上,产生大于每个药物效应总和的协同效果。既可以提高疗效,也可以避免因大剂量用药引起的毒性反应。由于和厚朴酚与青蒿素是不同植物来源的分子结构和作用机制均不同的2个单体,作者将两者组成联合用药组,期望2者联合应用能够增强抗肿瘤作用而减少毒副作用。以期为和厚朴酚与青蒿素联合应用抗肿瘤活性开发提供新的思路和实验基础。

1 材料

1.1 细胞株 人鼻咽癌CNE-2细胞(购自中国科学院上海细胞库,由本实验保存传代)。

1.2 药品与仪器 和厚朴酚对照品(honokiol,纯度>98%,批号110729-200311);青蒿素对照品(artemisinin,纯度>98%,批号110729-200310)均购自中国药品生物制品检定所,噻唑蓝四氮唑盐(MTT,美国Sigma公司),二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司),青霉素-链霉素双抗液、胰蛋白酶(杭州吉诺公司),RPMI-1640培养基(GIBCO公司),胎牛血清(GIBCO公司);培养板,75 cm²培养瓶(美国Corning公司),DAPI凋亡染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),细胞凋亡试剂盒(美国Biovision公司),CO₂培养箱(日本三洋公司),IX71型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),TGL-16C型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),6800型酶标仪(Bio-Rad公司),流式细胞仪(美国,BD公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将CNE-2细胞培养于含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉素的RPMI 1640培养液中,在37℃,饱和湿度5%CO₂培养箱中培养。隔天换液,取对数生长期细胞消化计数后进行实验。

2.2 药物制备 和厚朴酚、青蒿素用无水乙醇溶解配制成10 g·L⁻¹的储备液,0.22 μm滤膜过滤,置-20℃备用,临用前用含血清的培养基配制所需体积分数,乙醇在培养液的体积分数均≤0.2%。

2.3 MTT法检测和厚朴酚、青蒿素单用对CNE-2细胞的抑制作用^[5] 取生长状态良好,处于对数生长期的细胞,常规胰酶消化后培养液吹打成细胞悬液,将细胞密度调整为1×10⁵/mL的细胞悬液。96孔板每孔先加入培养液100 μL再加入细胞悬液100 μL,调零孔加入200 μL培养液。细胞贴壁后,和厚朴酚单独组加入不同浓度的和厚朴酚,使其终浓度为2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15 mg·L⁻¹,青蒿素单独组终浓度为30, 40, 50, 60, 80, 100 mg·L⁻¹,对照孔只加等量不含药物的新鲜培养液,每个剂量6个平行孔。药物作用48 h后吸弃培养液,板中每孔加入新鲜配制的浓度为5 g·L⁻¹的MTT 20 μL,继续培养4 h后取出培养板,小心吸弃培养基,每孔加DMSO 150 μL,平板振荡器温和振荡10 min使结晶物充分溶解,用酶联仪于570 nm处测出各孔吸光度(A),按下式计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \bar{A}_{\text{给药孔}} / \bar{A}_{\text{对照孔}}) \times 100\%$$

2.4 和厚朴酚与青蒿素合用对CNE-2细胞的抑制作用 按2.3方法计算出和厚朴酚、青蒿素的IC₅₀后,选择小于IC₅₀的浓度用于2药的相互作用的效应分析,和厚朴酚的终质量浓度为5.0, 7.5 mg·L⁻¹,青蒿素为7.5, 10, 12.5, 12.5, 15, 20, 30 mg·L⁻¹,每个浓度的和厚朴酚分别与不同浓度的青蒿素联合应用,同时设等浓度的和厚朴酚单独组、青蒿素单独组及细胞对照组。采用MTT法测定上述各组的抑制率,按金氏公式^[6]判断和厚朴酚与青蒿素2药合用在CNE-2细胞中药理效应。

$$Q = E_{A+B} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$$

E_{A+B} 为联合用药的抑制率, E_A, E_B 分别为 A 药和 B 药的抑制率。 Q 在 0.85 ~ 1.15 之间为单纯相加(+), Q 在 1.15 ~ 20 为增强(++), $Q > 20$ 为显著增强(+++), Q 在 0.85 ~ 0.55 为拮抗(-), < 0.55 为明显拮抗(---)。

2.5 和厚朴酚、青蒿素及二者联合应用对 CNE-2 细胞形态学的影响 取对数生长的 CNE-2 细胞, 按 7×10^4 /mL 接种于 24 孔板, 细胞贴壁后, 分别加入 $7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和厚朴酚, $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿素及和厚朴酚 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 青蒿素 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 CNE-2 细胞 48 h, 吸弃培养液, 每孔加入预冷的 75% 乙醇固定细胞 10 min, 用 DAPI 染色工作液漂洗 1 次, 加入甲醇再洗 1 遍, 然后加入 DAPI 染色工作液在 37 °C 培养箱中孵育 20 min, 吸弃 DAPI 染色液, 加入 Buffer A 液直接在荧光显微镜下观察、拍照。未加药细胞作为阴性对照。

2.6 FCM 检测和厚朴酚、青蒿素及二者联合应用对 CNE-2 细胞凋亡的影响 和厚朴酚 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别与 $7.5, 5.0, 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿素联合应用处理 CNE-2 细胞 48 h, 同时设立等浓度的和厚朴酚组、青蒿素组及对照组, 分别消化收集上述各组细胞, 调整细胞浓度至 1×10^6 /mL 各取 1 mL, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次后, 弃上清液, 加入结合缓冲液 500 μL 重悬细胞, 置冰上, 加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 10 μL 的 PI 于细胞悬液中, 轻轻混匀, 将试管置于 4 °C 避光染色 15 min, 流式细胞仪进行检测, 分析细胞凋亡率。

2.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, IC_{50} 采用 SPSS 13.0 统计软件进行计算, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 和厚朴酚、青蒿素单用对 CNE-2 细胞生长抑制作用 MTT 实验结果表明, 和厚朴酚单独对 CNE-2 细胞有较为明显的抑制作用, 并且这种抑制作用呈量-效关系, 作用 48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $8.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 1), 青蒿素对 CNE-2 细胞的生长没有明显的抑制作用, IC_{50} $62.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。

3.2 和厚朴酚与青蒿素联合应用对 CNE-2 细胞增殖效应分析 和厚朴酚分别为 $5.0, 7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其抑制率为 39.15%, 13.64%, 当与终浓度为 $30.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿素联合用药, 其抑制率均提高到 54% 以上。和厚朴酚与青蒿素联合应用对 CNE-2 细胞

的杀伤呈协同作用 (表 3)。通过计算和厚朴酚的终浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与青蒿素联合应用的 Q 值增大比和厚朴酚终浓度为 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 更为明显, 表现出和厚朴酚低浓度与青蒿素的协同作用增强。

表 1 和厚朴酚对 CNE-2 细胞生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率/%	$IC_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
0	0.649 ± 0.020	0	
2.5	0.566 ± 0.067	12.79	
5.0	0.511 ± 0.036	21.26	
7.5	0.418 ± 0.021	35.59	8.58
10.0	0.116 ± 0.011	82.12	
12.5	0.109 ± 0.008	83.20	
15.0	0.063 ± 0.012	90.29	

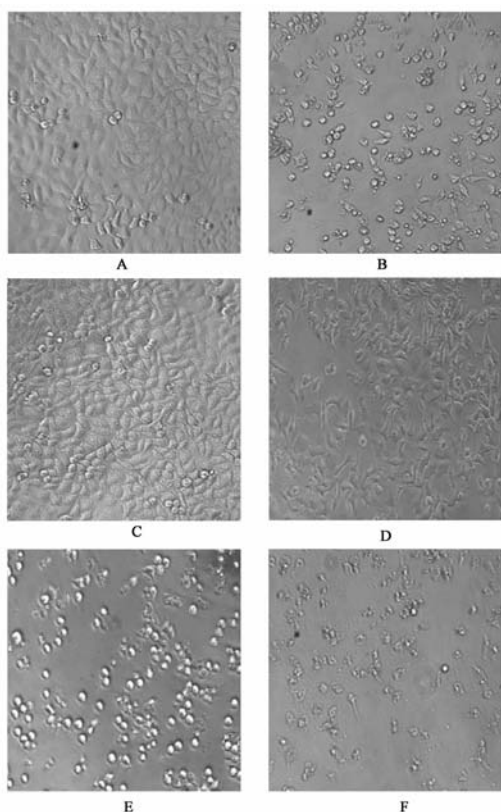
表 2 青蒿素对 CNE-2 细胞生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率/%	$IC_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
0	0.489 ± 0.047	0	
30.0	0.327 ± 0.020	33.12	
40.0	0.303 ± 0.026	38.04	
50.0	0.294 ± 0.012	39.88	62.24
60.0	0.258 ± 0.022	47.23	
80.0	0.215 ± 0.028	56.03	
100.0	0.170 ± 0.014	65.23	

表 3 和厚朴酚与青蒿素联合应用对 CNE-2 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

和厚朴酚 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	青蒿素 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率 /%	Q	联合作用
0	0	0.514 ± 0.029	0		
7.5	0	0.339 ± 0.026	39.15		
5.0	0	0.495 ± 0.021	13.64		
0	30.0	0.396 ± 0.021	26.40		
0	20.0	0.409 ± 0.025	23.49		
0	15.0	0.430 ± 0.030	18.19		
0	12.5	0.451 ± 0.024	14.09		
0	10.0	0.460 ± 0.015	12.08		
0	7.5	0.495 ± 0.021	4.25		
7.5	30.0	0.091 ± 0.009	94.13	1.705	++
7.5	20.0	0.089 ± 0.008	94.60	1.770	++
7.5	15.0	0.104 ± 0.013	91.08	1.801	++
7.5	12.5	0.114 ± 0.008	97.97	2.053	++
7.5	10.0	0.082 ± 0.012	95.10	2.045	++
7.5	7.5	0.254 ± 0.010	56.79	1.361	++
5.0	30.0	0.187 ± 0.030	72.78	2.018	++
5.0	20.0	0.196 ± 0.129	69.98	2.096	++
5.0	15.0	0.179 ± 0.016	73.65	2.509	++
5.0	12.5	0.212 ± 0.021	68.48	2.618	++
5.0	10.0	0.214 ± 0.011	68.07	2.788	++
5.0	7.5	0.331 ± 0.027	43.49	2.364	++

光学显微镜下观察正常对照组的细胞贴壁生长牢固, 细胞明亮清晰, 折光性好, 充分伸展, 细胞膜完整 (图 1-A), 和厚朴酚 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 CNE-2 细胞后可见部分细胞皱缩, 伪足断裂, 变圆 (图 1-B), 青蒿素 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞后, 形态学未见明显变化 (图 1-C), 与和厚朴酚联合应用后, 细胞折光率显著下降, 细胞变圆, 死亡数量显著增加 (图 1-D)。

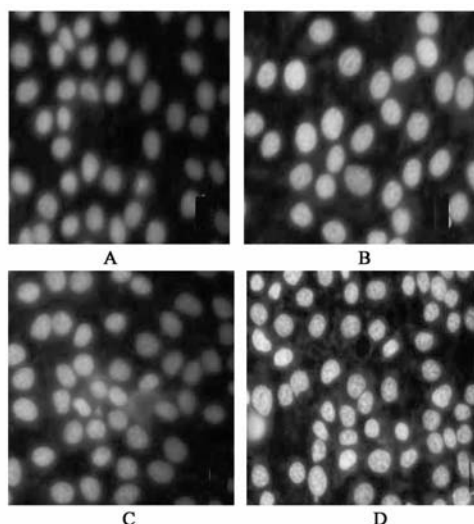


A. 对照组; B. 和厚朴酚 7.5 mg·L⁻¹; C. 和厚朴酚 5.0 mg·L⁻¹;
D. 青蒿素 30 mg·L⁻¹; E. 和厚朴酚 7.5 mg·L⁻¹ + 青蒿素
30 mg·L⁻¹; F. 和厚朴酚 5.0 mg·L⁻¹ + 青蒿素 30 mg·L⁻¹

图 1 和厚朴酚、青蒿素及二者联合应用对
CNE-2 细胞形态的影响 (×100)

3.3 和厚朴酚、青蒿素及二者联合应用对 CNE-2 细胞凋亡形态的观察 DAPI 染色后荧光显微镜下可见正常组边缘清晰, 染色均匀(图 2-A)。CNE-2 细胞经和厚朴酚作用后发出较正常组强的荧光, 胞质有浓缩、核染色体凝聚现象(图 2-B), 青蒿素单独作用 CNE-2 细胞, 细胞核完整, 未见明显的细胞凋亡(图 2-C), 但是, 与和厚朴酚联合应用之后, 能够显著增强和厚朴酚诱导 CNE-2 细胞凋亡的能力, 诱导凋亡细胞增加, 镜下可见大部分细胞胞体缩小, 发出强蓝色荧光, 胞质浓缩, 核染色体高度凝聚、边缘化, 细胞核碎裂呈碎片状, 数量显著增加, 出现典型的新月形的凋亡小体(图 2-D)。

3.4 凋亡分析 和厚朴酚、青蒿素及二者联合处理 HCNE-2 细胞 48 h 后经流式细胞仪应用 AnnexinV/PI 法检测凋亡率, 无论是单用还是合用均可引起细胞凋亡, 联合用药组细胞凋亡率高于等浓度的和厚朴酚或青蒿素组。经统计学检验, 实验组与对照组间有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示和厚朴酚与青蒿



A. 阴性对照组; B. 和厚朴酚(7.5 mg·L⁻¹); C. 青蒿素
(7.5 mg·L⁻¹); D. 和厚朴酚(7.5 mg·L⁻¹)
+ 青蒿素(7.5 mg·L⁻¹)

图 2 DAPI 染色观察和厚朴酚、青蒿素及二者联合应用对
CNE-2 细胞形态学的影响 (×400)

素联合应用时可能以协同模式诱导 CNE-2 细胞产生凋亡(表 4)。

表 4 和厚朴酚与青蒿素联合应用对 CNE-2 细胞的
凋亡作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和厚朴酚/mg·L ⁻¹	青蒿素/mg·L ⁻¹	凋亡率/%
0	0	8.11 ± 1.26
7.5	0	23.77 ± 1.23 ¹⁾
0	2.5	17.17 ± 5.32 ¹⁾
0	5.0	21.83 ± 3.21 ¹⁾
0	7.5	18.92 ± 0.95 ¹⁾
7.5	2.5	37.64 ± 2.06 ^{1, 2)}
7.5	5.0	47.54 ± 1.30 ^{1, 2)}
7.5	7.5	46.16 ± 1.51 ^{1, 2)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, 与单药组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

鼻咽癌是我国最常见的头颈部恶性肿瘤之一, 具有明显的民族聚集性和地域分布特征, 广东省的发病率明显高于欧美等其他地区 25 ~ 30 倍, 素有“广东瘤”之称。地域性和民族性特征使鼻咽癌的防、诊、治在中国癌症研究中具有特殊重要的位置。

和厚朴酚是中药厚朴的主要化学成分之一, 长期被用于抗氧化^[7]、抗炎^[8]、抗焦虑^[9]、抗菌^[10]和抗血栓形成^[11]。近年许多研究表明和厚朴酚对肿瘤细胞有直接杀伤作用^[12-14]。青蒿素不仅是有效抗疟药物, 而且具有明显的抗肿瘤作用。和厚朴酚、青蒿素是本实验室药效筛选的候选药物, 前期实验结果表明, 和厚朴酚对人鼻咽癌 CNE-2 细胞具有较强的

杀伤作用,而青蒿素对 CNE-2 细胞没有明显的杀伤作用,对正常肝细胞株 LO-2 的毒性很小。和厚朴酚与青蒿素是化学结构完全不同的化合物,这是二者可能产生协同作用的最基本的必要条件之一。目前,国内外尚未见和厚朴酚与青蒿素及二者在体外协同诱导 CNE-2 细胞凋亡的研究报道,值得进一步研究。

本实验通过 MTT 证实不同浓度的和厚朴酚作用 CNE-2 细胞 48 h,对 CNE-2 细胞的增殖有明显的抑制作用,并呈量-效关系,说明和厚朴酚体外能抑制 CNE-2 细胞的增殖。青蒿素对 CNE-2 没有明显的抑制作用,但是,通过与和厚朴酚联合作用于 CNE-2 细胞,两者的抑制作用却较二者分别单独作用明显增强,通过金氏公式算得和厚朴酚与青蒿素联合应用对 CNE-2 细胞的生长抑制具有协同作用。由表 3 中 Q 值及在光学显微镜下观察到的细胞形态学变化可知,低浓度的和厚朴酚与青蒿素合用协同增效的效果比高浓度的和厚朴酚与青蒿素联合的协同作用强。

细胞凋亡作为一种基本的生命现象,不仅存在于正常的细胞中,也存在肿瘤细胞中。细胞凋亡机制的减弱或障碍可导致肿瘤的发生、发展;同样,通过诱导肿瘤细胞凋亡也可对肿瘤的消除起到积极作用,因此诱导肿瘤细胞凋亡有着重要的肿瘤治疗学意义。因此,在肿瘤的研究和治疗中,细胞凋亡受到越来越多的重视。凋亡的细胞形态及生化改变主要特征有:染色质凝聚,胞膜水泡状改变,细胞核碎裂,形成膜包被的凋亡小体,DNA 断裂^[15]。在本实验中,和厚朴酚($7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、青蒿素($7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)及二者联合作用于 CNE-2 细胞 48 h,经 DAPI 染色后,荧光显微镜观察到和厚朴酚与青蒿素联合用药组出现典型的凋亡细胞形态改变,而和厚朴酚或青蒿素单独用药组则不明显;通过 AnnexinV/PI 双染法检测和厚朴酚、青蒿素及二者联合应用对凋亡率的影响,结果表明 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和厚朴酚分别与 $2.5, 5.0, 7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿素联合应用凋亡率较单独用药组显著增加。

综上所述,本实验通过从形态学改变及流式细胞仪检测凋亡率 2 个方面证明了和厚朴酚联合青蒿素在体外具有协同诱导 CNE-2 细胞死亡的作用,产生协同作用的机制值得进一步展开深入的探讨和研究。

[参考文献]

- [1] 郭颖,方妃燕.鼻咽癌遗传学研究进展[J].癌症,1998,17(4):316.
- [2] 汤钊猷,朱世能,曹世龙,等.现代肿瘤学[M].上海:上海医科大学出版社.1993:608.
- [3] Chan A T, Hsu M M, Goh B C, et al. Multicenter, phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in patients with recurrent of metastatic nasopharyngeal carcinoma[J]. Clin Oncol, 2005, 23(15):3568.
- [4] Bonner J A, Harari P M, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. New Engl J Med, 2006, 345(6):567.
- [5] 韩锐.抗癌药物研究与实验技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,2005.
- [6] 金正均.合并用药中的相加[J].中国药理学报,1980,1(2):70.
- [7] Lo. Y C, Teng C M, Chen C F. Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation [J]. Biochem Pharmacol, 1994, 5:549.
- [8] 林桂芸,谢生发,谢鸿.和厚朴酚抑菌作用的研究.成都大学学报:自然科学版,2003,22(2):18.
- [9] Huang D B, Yu Z F, Hu Z H. Effect of honokiol and magnolol on endorphin in relievable morphine withdrawal symptoms in rats [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2004, 35(2):182.
- [10] Clark A M, El-Ferali F S, Li W S. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L [J]. J Pharm Sci, 1981(70):951.
- [11] Teng C M, Chen C, Ko F N. Two anti-platelet agents from *Magnolia officinalis* [J]. Thromb Res, 1988(50):757.
- [12] Kenji Ishitsuka, Teru Hideshima, Makoto Hamasaki. Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase-dependent and-independent apoptosis [J]. Blood, 2005(106):1794.
- [13] Hibasami H, Achiwa Y, Katsuzaki H. Honokiol induces apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cell [J]. Int J Mol Med, 1998, 6(2):671.
- [14] Hirano T, Gtoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells [J]. Life Sci, 1994, 13(55):1061.
- [15] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407:770. [责任编辑 聂淑琴]