

华蟾素诱导人肝癌细胞株 HepG₂ 凋亡及其作用机制

齐芳华¹, 李安源^{1*}, 赵 林¹, 张 莉², 杜冠华², 唐 伟³

(1. 山东大学附属省立医院中医科, 山东 济南 250021; 2. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050;

3. 东京大学医学部肝胆胰外科, 日本 东京 113-8655)

摘要: 为了观察华蟾素体外抑制肝癌细胞株 HepG₂ 增殖、诱导细胞凋亡作用及其机制, 将不同浓度华蟾素作用于 HepG₂ 细胞。采用 MTT 法观察华蟾素对 HepG₂ 细胞的增殖抑制作用; 用 Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡的形态学改变; 以流式细胞术观察细胞的凋亡率和细胞周期的变化; 以实时荧光定量 PCR 技术 (real time-PCR) 和蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况。结果表明, 华蟾素对体外培养的肝癌 HepG₂ 细胞有抑制增殖作用, 且具有剂量、时间相关性; 华蟾素可致 HepG₂ 细胞阻滞于 G₂/M 期, 细胞凋亡率随药物浓度增加亦呈增长趋势; 细胞凋亡相关因子 Bax 及 p53 mRNA 和蛋白表达上调, Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达下调。因此, 华蟾素可抑制肝癌细胞株 HepG₂ 的增殖, 诱导肝癌 HepG₂ 细胞凋亡, 其机制可能与调节凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 的表达有关。

关键词: 华蟾素; 人肝癌细胞株 HepG₂; 增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0318-06

Apoptosis-inducing effect of cinobufacini on human hepatoma cell line HepG₂ and its mechanism of action

QI Fang-hua¹, LI An-yuan^{1*}, ZHAO Lin¹, ZHANG Li², DU Guan-hua², TANG Wei³

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 3. Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery Division, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan)

Abstract: To investigate the apoptosis-inducing effect of cinobufacini (Huachansu) on human hepatoma cell line HepG₂ and its possible mechanism of action, HepG₂ cells were treated with different concentrations of cinobufacini. Cell proliferation was measured by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The morphological changes of apoptosis were observed by Hoechst 33258 staining. Cell cycle distribution and apoptotic rate were evaluated by flow cytometry (FCM). Quantitative real-time RT-PCR and Western blotting analysis were used to detect the mRNA and protein expressions of apoptosis related factors Bcl-2, Bax and p53. The results indicated that cinobufacini could inhibit the proliferation of HepG₂ cells in a dose and time dependent manner. Remarkable morphological changes of apoptosis including cytoplasmic and nuclear condensation and partition of cytoplasm were observed by Hoechst 33258 staining. According to FCM analysis, HepG₂ cells were arrested in G₂/M phase and the apoptotic rate increased with the increase of the concentration of cinobufacini. Both the mRNA and protein expressions of Bax and p53 were up-regulated while Bcl-2 expression down-regulated. Thus, cinobufacini could inhibit the proliferation and induce apoptosis of human hepatoma cell line HepG₂.

收稿日期: 2009-09-18.

基金项目: Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan (20015009); JSPS and CAMS under the Japan-China Medical Exchange Program (09710000447).

*通讯作者 Tel: 86-531-86881726, Fax: 86-531-87061689, E-mail: sdslyy999@163.com

Furthermore, up regulation of Bax and p53 as well as down regulation of Bcl-2 expressions may be one of the important apoptotic inducing mechanisms.

Key words: cinobufacini; human hepatoma cell line HepG₂; proliferation; apoptosis

华蟾素是中华大蟾蜍皮经过水化萃取而成的中药制剂, 具有清热解毒、利水消肿、化瘀溃坚等作用, 目前已成为我国临床上应用较广的抗肿瘤中药制剂之一, 尤其对消化道肿瘤具有较好的疗效。近年来, 随着对华蟾素药理学研究的进一步深入, 已分离出其活性成分为蟾毒内酯类化合物, 属强心苷类物质, 包括蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾素毒基等^[1]。临床应用及基础实验研究证实, 华蟾素及其含有的活性成分对多种人肿瘤细胞有不同程度的抑制增殖、诱导分化、促进细胞凋亡及提高机体免疫水平等作用。细胞凋亡是一种细胞主动性死亡模式, 在肿瘤的形成和演变过程中起着重要的作用, 华蟾素对人胃癌细胞 MGC-80-3 的生长有明显的抑制作用并且可以镜下观察到细胞呈凋亡特征^[2]; 另外, 华蟾素能明显抑制白血病细胞株 Jurkat 细胞生长, 且通过调节凋亡相关分子 Bcl-2、Bax 的表达诱导细胞凋亡^[3]。但是, 目前对华蟾素具体的抗肿瘤作用机制还缺乏深入的认识, 并且其在肝癌中作用研究相对较少。因此, 本实验观察了华蟾素对人肝癌细胞株 HepG₂ 诱导凋亡的作用, 初步探讨可能的作用机制, 为其临床应用治疗肝癌提供理论和实验依据。

材料与方法

药品和试剂 华蟾素原液由安徽金蟾生化股份有限公司提供 (生产工艺专利号: CN200510005277.4)。实验时用 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培养液配成不同浓度药液。Hoechst 33258 染色液购自 Sigma 公司; DNA 细胞周期测定试剂盒购自 Beckman Coulter 公司; Annexin V-FITC 染色试剂盒购自晶美生物工程有限公司; 引物由上海 Sangon 生物制品公司合成; Trizol、Prime ScriptTM RT 试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒及 DEPC 水均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; BCA-100 蛋白浓度测定试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司; 兔抗 Bcl-2 抗体、Bax 抗体、p53 抗体及 β -actin 抗体均购自 Santa Cruz 公司。

细胞系及细胞培养 人肝癌细胞株 HepG₂ 引自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。用完全 DMEM 培养基 (含 10% 灭活小牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素及 100 μ g·mL⁻¹ 链霉素), 置于 37 °C、5% CO₂

培养箱中, 传代培养至对数生长期备用。

MTT 法检测华蟾素对 HepG₂ 细胞的增殖抑制作用 取对数生长期 HepG₂ 细胞制成 6×10^4 /mL 单细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 给予不同浓度的华蟾素 (0.005、0.01、0.05、0.1 和 0.5 mg·mL⁻¹) 处理, 另设空白对照组。细胞在加药处理 24、48 和 72 h 后, 加入 5% MTT 溶液 (5 mg·mL⁻¹) 20 μ L, 继续孵育 4 h, 然后加入 DMSO 100 μ L/孔, 振荡 20 min, 用酶标仪 490 nm 处测各孔的吸收度 (A) 值。根据公式计算细胞增殖率: 细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 加药孔平均 A 值/对照孔平均 A 值) $\times$ 100%。

Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡形态学变化 取对数生长期 HepG₂ 细胞制成 3×10^5 /mL 单细胞悬液, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 给予不同浓度的华蟾素 (0.01、0.05 和 0.1 mg·mL⁻¹) 处理, 另外设置空白对照组, 继续培养。48 h 后各组细胞中止培养, 给予 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用 PBS 冲洗, 然后 Hoechst 33258 常温染色 10 min, 再次 PBS 冲洗, 最后于免疫荧光显微镜下观察细胞形态。

流式细胞术检测细胞周期变化及细胞凋亡率 取对数生长期 HepG₂ 细胞制成 3×10^5 /mL 单细胞悬液, 接种于 35 mm 培养皿中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 给予不同浓度的华蟾素 (0.01、0.05 和 0.1 mg·mL⁻¹) 处理, 另外设置空白对照组, 继续孵育。培养 48 h 后收集各组细胞, 用冷的 PBS 洗涤两遍, 然后重悬于 200 μ L 冷的 PBS 中, 根据细胞周期测定说明书或 Annexin V-FITC 染色试剂盒说明书, 对细胞进行染色。利用流式细胞仪检测凋亡细胞 DNA 含量及分布情况和细胞周期。

实时荧光定量 PCR 技术检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 mRNA 表达 取对数生长期 HepG₂ 细胞制成 3×10^5 /mL 单细胞悬液, 接种于 35 mm 培养皿中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 给予不同浓度的华蟾素 (0.01、0.05 和 0.1 mg·mL⁻¹) 处理, 另外设置空白对照组, 继续孵育。培养 48 h 后收集各组细胞, 用 Trizol 提取总 RNA。利用 Prime ScriptTM RT 试剂盒把总 RNA 反转录成 cDNA, 根据试剂盒说

说明书, 反转录条件为: 10 μL 反应体系, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s。Bax (197 bp) 上游引物为 5'-CTGACGGC AACTTCAACTGG-3', 下游引物为 5'-GTGAGGAGGC TTGAGGAGTC-3'; Bcl-2 (174 bp) 上游引物为 5'-TGT GTGTGGAGAGCGTCAAC-3', 下游引物为 5'-GCCA GAGAAATCAAACAGAGG-3'; p53 (168 bp) 上游引物为 5'-GCGTGTGGAGTATTTGGATGAC-3', 下游引物为 5'-AGTGTGATGATGGTGAGGATGG-3'; 内参照 GAPDH (110 bp) 上游引物为 5'-ACCCACTCCTC CACCTTTGAC-3', 下游引物为 5'-TCCACCACCCTG TTGCTGTAG-3'。然后根据 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒说明书, 利用 ABI Prism 7500 检测系统对引物进行扩增, 20 μL 反应体系: SYBR (2 $\times$) 10 μL , ROX Dye II 0.2 μL , 上、下游引物共计 2.5 μL , cDNA 4 μL 及 ddH₂O 0.8 μL , PCR 循环参数设置: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 个循环。然后运用 comparative 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析各基因的相对表达^[4]。

蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 蛋白水平的表达 取对数生长期 HepG₂ 细胞制成 3 $\times 10^5/\text{mL}$ 单细胞悬液, 接种于 35 mm 培养皿中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 给予不同浓度的华蟾素 (0.01、0.05 和 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理, 另外设置空白对照组, 继续孵育。培养 48 h 后收集各组细胞, 以 12 000 $\times g$ 离心 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 上清液用 BCA-100 蛋白浓度测定试剂盒测定各组蛋白含量。每组样品各取蛋白 30 μg 上样, 用 10% SDS-PAGE 进行电泳。将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶在常温下封闭 1 h, 依次滴加一抗 (兔抗, 工作浓度均为 1:750, 4 $^{\circ}\text{C}$, 过夜) 及二抗 (1:10 000 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 室温, 1 h), 设 β -actin 为内参照, 用 TBST (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, 150 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6) 洗膜后, 采用 ECL 化学发光法进行观察。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计分析软件、单因素方差分析进行统计处理。

结果

1 华蟾素抑制 HepG₂ 细胞增殖

MTT 结果显示, 华蟾素 (0.01、0.05 及 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用于细胞 48 h 时, 细胞生长抑制率分别是 29.0%、40.4% 和 54.8%, 表现为抑制肝癌细胞 HepG₂ 增殖作用 (图 1), IC₅₀ 值为 0.08 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。且具有剂量依赖性和时间依赖性。

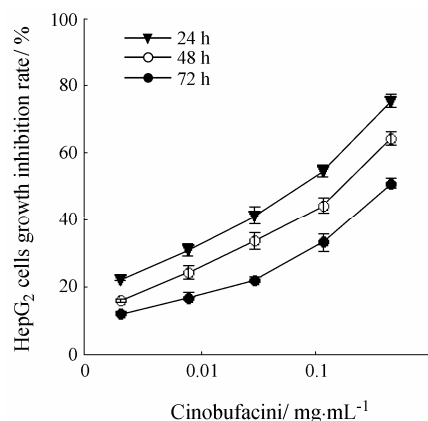


Figure 1 The growth inhibition effect of cinobufacini on HepG₂ cells. Cells were treated with cinobufacini (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, and 0.5 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24, 48, and 72 h, respectively ($n=3$)

2 华蟾素对凋亡 HepG₂ 细胞形态学改变的影响

经 Hoechst 33258 染色, 空白对照组细胞呈均匀的蓝色荧光, 华蟾素 (0.01、0.05 及 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理组均可见染色质的凝聚及边集化, 蓝色荧光加深, 细胞核皱缩断裂呈块状或点状蓝色荧光, 且随药物浓度增大, 细胞形态学变化越明显 (图 2)。

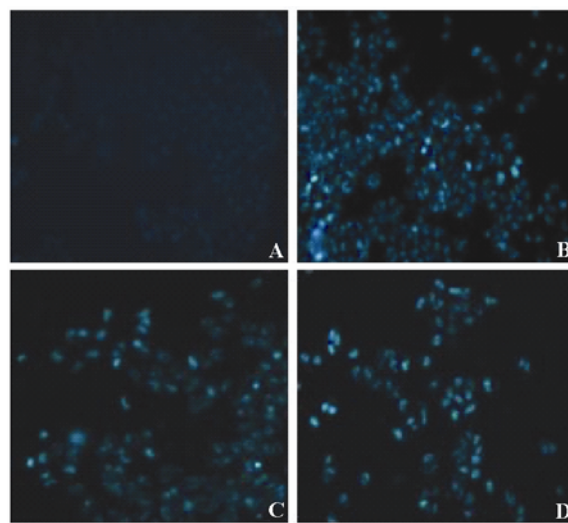


Figure 2 Effect of cinobufacini on HepG₂ cells by Hoechst 33258 staining. Cells were treated with cinobufacini (0, 0.01, 0.05, and 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$, A-D) for 48 h. Original magnification, 200 $\times$

3 华蟾素对 HepG₂ 细胞周期分布和凋亡率的影响

FCM 检测结果 (图 3) 显示细胞周期分布情况: 华蟾素 (0.01、0.05 及 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用于细胞 48 h 后, 与空白对照组相比, 呈现 G₀/G₁ 期细胞大量减少, G₂/M 期细胞大量堆积。华蟾素可使细胞阻滞于 G₂/M 期 ($P < 0.05$)。

FCM 检测结果 (图 4) 显示细胞凋亡率: 华蟾素 (0、0.01、0.05 及 0.1 mg·mL⁻¹) 作用于细胞 48 h 后, 细胞总凋亡率分别为 1.6%、4.3%、6.7% 和 21.7%。提示随着药物浓度的提高, 细胞凋亡率逐渐增加。

4 华蟾素对 HepG₂ 细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 mRNA 表达水平的影响

根据实时荧光定量 PCR 检测各组细胞的 C_T 值, 运用 $\text{comparative}2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析各细胞凋亡相关因子 mRNA 相对表达水平。与空白对照组相比, 随着华蟾

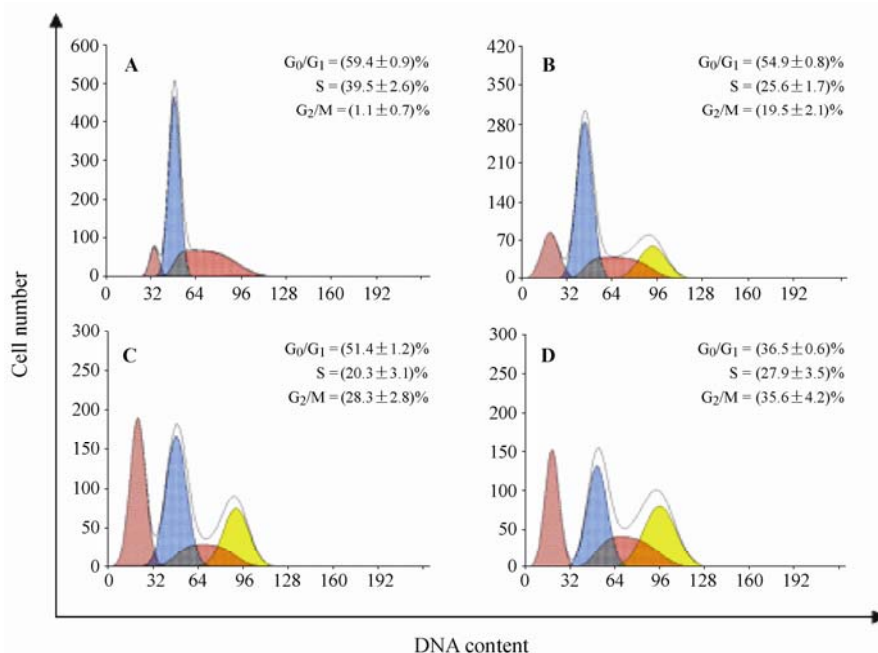


Figure 3 Effect of cinobufacini on cell cycle distributions of HepG₂ cells detected by flow cytometry. HepG₂ cells were treated with cinobufacini (0, 0.01, 0.05, and 0.1 mg·mL⁻¹, A-D) for 48 h ($n = 3$)

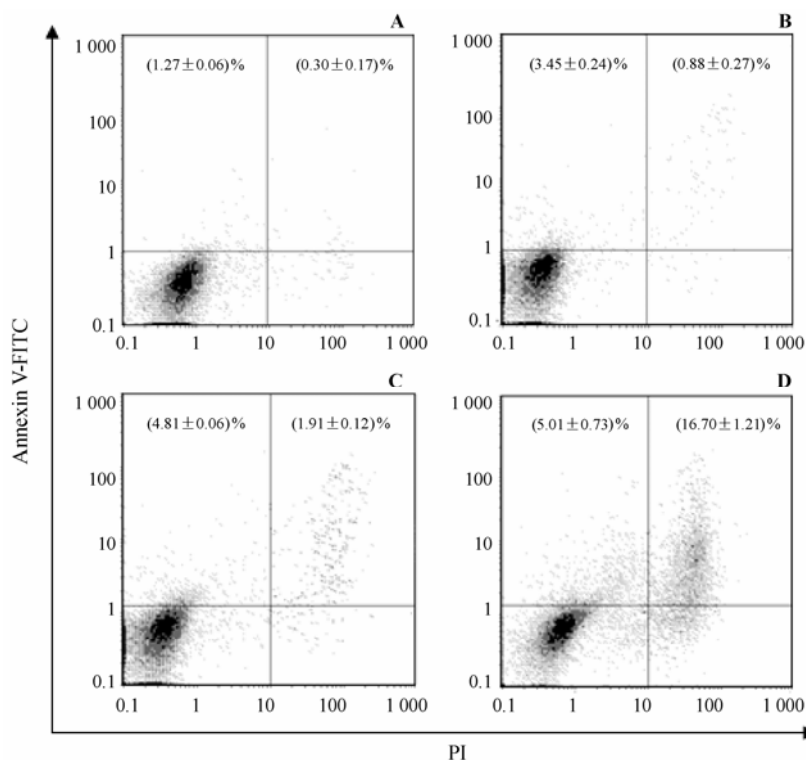


Figure 4 Effect of cinobufacini on apoptosis rates of HepG₂ cells detected by flow cytometry. HepG₂ cells were treated with cinobufacini (0, 0.01, 0.05, and 0.1 mg·mL⁻¹, A-D) for 48 h, separately ($n = 3$)

素处理浓度的增加 (0.01、0.05 及 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), Bax 及 p53 mRNA 的表达水平增加, 而 Bcl-2 mRNA 的表达水平却降低 (图 5)。

5 华蟾素对 HepG₂ 细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 蛋白表达水平的影响

Western blotting 结果显示, 华蟾素 (0.01、0.05 及 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用于 HepG₂ 细胞 48 h 后, 各细胞凋亡相关因子蛋白水平的表达 (图 6A): 与空白对照

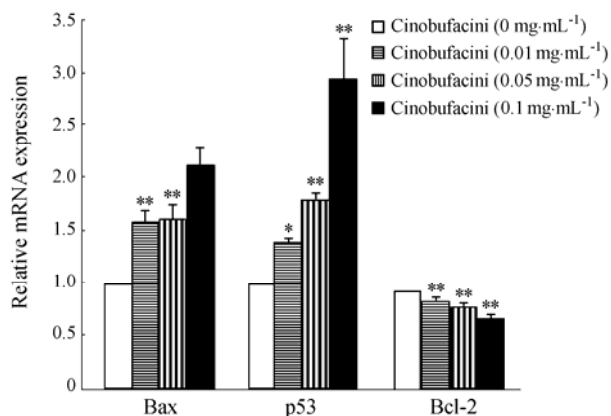


Figure 5 Effect of cinobufacini on relative mRNA expressions of apoptosis related genes of HepG₂ cells. HepG₂ cells were treated with cinobufacini (0, 0.01, 0.05, and 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 48 h. Apoptosis related genes (p53, Bax and Bcl-2) were detected by quantitative real-time RT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs untreated control group ($n = 3$)

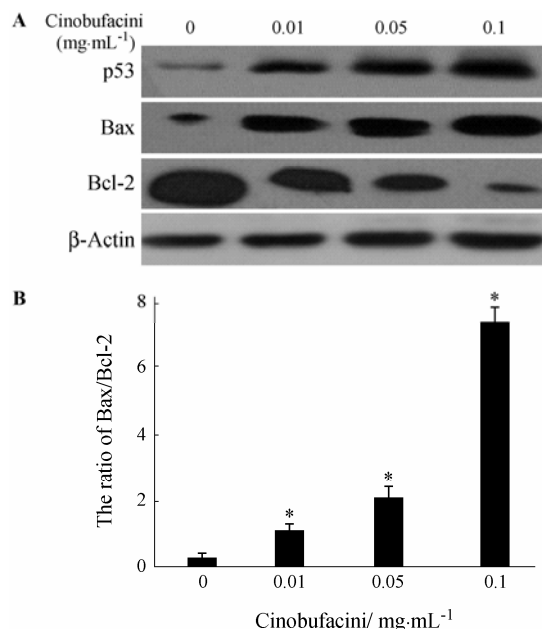


Figure 6 Effect of cinobufacini on apoptosis-related molecules (p53, Bax, and Bcl-2) of HepG₂ cells detected by Western blotting analysis. A: HepG₂ cells were treated with cinobufacini (0, 0.01, 0.05, and 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 48 h; B: The ratio of Bax/Bcl-2 of HepG₂ cells which were treated with cinobufacini (0, 0.01, 0.05, and 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 48 h. * $P < 0.05$ vs untreated control group

组相比, Bax 及 p53 蛋白的表达随药物浓度的增加亦增加; Bcl-2 蛋白的表达随药物处理浓度的增加而降低。另外, 不同处理组的 Bax/Bcl-2 与空白对照组相比均有不同程度的增加 (图 6B)。

讨论

肝癌是人类最常见的五大恶性肿瘤之一, 目前外科手术治疗仍是肝癌治疗的首选方案, 但是 95% 的肝癌患者在确诊时已失去手术机会, 只能依赖于化学药物的治疗, 但是由于肝癌属于化疗不敏感的恶性肿瘤, 大多数的化疗药物并不能提高肝癌患者的生存质量^[5]。因此, 现在国内外许多学者试图从天然药物中寻找能有效抑制恶性肿瘤细胞增殖、促进其分化和诱导凋亡的药物或其活性成分用于肝癌的治疗。

蟾酥是蟾蜍科动物中华大蟾蜍的耳后腺及皮肤腺所分泌的白色浆液收集加工而成, 性味甘辛、温, 有毒。其功效为解毒、消肿、强心、止痛^[6]。现代药理学研究表明其有一定的抗肿瘤作用, 但是由于其毒性较大, 用药后可引发心率失常、房室传导阻滞、抽搐、惊厥等副反应^[7], 限制了它的临床应用。华蟾素是以中华大蟾蜍皮为主要原料制成的一种水溶性制剂, 现已广泛应用于临床。体内、外实验研究表明华蟾素及其活性成分蟾毒灵、脂蟾毒配基等对白血病、膀胱癌、子宫内膜癌等恶性肿瘤均有一定的作用, 其发挥作用主要是通过调控细胞凋亡相关因子 (如 Bcl-2、Bcl-X_L、Bax, p53) 和阻滞细胞周期来诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖^[8-10], 但是关于其作用于肝癌细胞的基础研究报道尚少。虽然, 研究发现华蟾素的活性成分蟾毒灵、脂蟾毒配基对诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡有一定的作用, 但其作用机制未做深入探讨^[11]; 另外, 目前尚未发现用中药复合物华蟾素来诱导人肝癌细胞 HepG₂ 凋亡的机制研究。因此, 本实验通过观察细胞凋亡形态学变化, 检测细胞生长抑制率、细胞凋亡率、细胞周期变化及凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况, 发现华蟾素对 HepG₂ 细胞有增殖和诱导凋亡作用, 其可能是通过调控凋亡相关因子的表达来发挥诱导细胞凋亡作用的。

细胞凋亡是一种细胞主动性死亡模式, 在肿瘤的形成和演变过程中起着重要的作用。现已知多种基因与细胞凋亡的信号转导相关, 包括 Bcl-2 家族基因 (Bcl-2、Bcl-x_L、Bax、Bad 等)、p53、Fas、FasL 等都

参与了凋亡的调控^[12]。Bcl-2 家族蛋白是编码能抑制或激活凋亡的膜结合蛋白, 其中的一部分蛋白如 Bax 和 Bad 可促进凋亡, 而另外一些蛋白如 Bcl-2 和 Bcl-xl 可抑制细胞凋亡^[13], 许多研究证实 Bcl-2 的高度表达能够抑制诸多因素诱导的细胞凋亡, Bax 的表达增加可以诱导细胞的凋亡, 是通过抑制 Bcl-2 的活性来实现的^[14]。另外据报道, Bax 与 Bcl-2 的比值, 而不是单独的 Bcl-2, 尤其是对药物诱导的细胞凋亡的发生具有决定性作用^[15]。本实验结果证实, 华蟾素处理组 Bax 的 mRNA 和蛋白表达均上调, 而 Bcl-2 的表达下调, 且 Bax 与 Bcl-2 比率与对照组相比亦有不同程度的增加。P53 基因作为与肿瘤发生最密切相关的抑癌基因之一, 其主要生物学功能是通过调控 DNA 修复、细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡, 维持基因组和细胞稳定, 抑制肿瘤生长^[16]。另外, 据报道 p53 能够直接激活 Bax 而参与调控细胞凋亡^[17]。本实验证实华蟾素可使 HepG₂ 细胞阻滞于 G₂/M 期, 且 p53 的 mRNA 和蛋白表达均上调, 这可能跟 p53 参与细胞周期阻滞和凋亡调控相关。

总之, 本研究表明, 华蟾素可以在体外通过诱导细胞凋亡, 抑制肝癌细胞株 HepG₂ 的增殖, 调控凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 的表达是其诱导细胞凋亡的可能机制之一。但是究竟是华蟾素中的何种活性成分有诱导细胞凋亡的作用, 以及其通过哪些信号通路发挥作用, 均有待进一步探讨。

References

- [1] Yang LH, Jin XQ, Zhang W. Studies on the chemical constituents from the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2000, 17: 292–295.
- [2] Zuo XD, Cui YA, Wang JH, et al. Research on the effect of cinobufacini on human gastric neoplasm cell line MGC-80-3 [J]. Chin Clin Oncol (临床肿瘤学杂志), 2003, 8: 33–35.
- [3] Wang Y, Li JM, Zhang L, et al. Effect of cinobufacini on Jurkat cell line *in vitro* and in the animal experiment [J]. J Diagn Concept Pract (诊断学理论与实践), 2005, 4: 308–312.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [5] Thomas M. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol, 2009, 19: 136–141.
- [6] The state Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Chinese Pharmacopoeia 2005 (中华人民共和国药典: 2005 年版) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 265–266.
- [7] Qian WP. Toad's toxic and side effect on the circulatory system of experimental animals [J]. J Zhejiang Tradit Chin Med Coll (浙江中医学院学报), 2001, 25: 46–47.
- [8] Han KQ, Huang G, Gu W, et al. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 3374–3379.
- [9] Qi FH, Li AY, Gao B, et al. Apoptosis-inducing effect of Cinobufacini, *Bufo bufo gargarizans* Cantor skin extract, on human hepatoma cell line BEL-7402 [J]. Drug Discov Ther, 2008, 6: 339–343.
- [10] Takai N, Ueda T, Nishida M, et al. Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2008, 21: 637–643.
- [11] Su YH, Yin XC, Xie JM, et al. Inhibition effects of three kinds of bufotoxins on human SMMC-7721 and BEL-7402 hepatoma cell lines [J]. Acad J Sec Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2003, 24: 393–395.
- [12] Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer [J]. Oncogene, 2008, 27: 6398–6406.
- [13] Zhou YL, Hu WX, Lü YP, et al. Effect of ZGDHu-1 on proliferation and apoptosis of A549 cells *in vitro* and antitumor activity *in vivo* [J]. Acta Pharm Sin (药科学报), 2007, 42: 26–34.
- [14] Wang HY, Cai B, Cui CB, et al. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway [J]. Acta Pharm Sin (药科学报), 2005, 40: 27–31.
- [15] Van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis [J]. Cell Res, 2006, 16: 203–213.
- [16] Yu Q. Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer therapy [J]. Drug Resist Updat, 2006, 9: 19–25.
- [17] Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis [J]. Science, 2004, 303: 1010–1014.