

本文引用:曾玲芳,王亿君,吴依辰,章慧.黄连素联合顺铂诱导人肺癌耐药 A549/DDP 细胞凋亡的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(5):493-498.

黄连素联合顺铂诱导人肺癌耐药 A549/DDP 细胞凋亡的实验研究

曾玲芳¹,王亿君¹,吴依辰¹,章慧^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省肿瘤医院,湖南长沙 410006)

[摘要] 目的 观察黄连素联合顺铂对 A549/DDP 细胞凋亡的影响并探讨其相关机制。方法 以 A549/DDP 细胞为研究对象,分别加入 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂、浓度为 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的黄连素+12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂,设置空白对照孔(PBS 孔),分别用药物干预 24 h、48 h、72 h,采用 MTT 法检测细胞增殖活性;各组用药干预 48 h 后,流式细胞仪检测细胞凋亡,Western blot 法检测 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2 的蛋白表达情况,Real-time PCR 法检测 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2 的 mRNA 表达水平。结果 黄连素联合顺铂能够抑制 A549/DDP 细胞增殖($P<0.01$),并具有一定的时间-浓度依赖性。黄连素联合顺铂能够诱导耐药细胞 A549/DDP 凋亡($P<0.01$),且呈一定的浓度依赖性。不同浓度的黄连素联合顺铂使促凋亡相关基因 Caspase-3、Caspase-9、Bax 在蛋白和 mRNA 水平表达上调($P<0.05$),而抗凋亡基因 Bcl-2 在蛋白和 mRNA 水平表达下调($P<0.05$)。结论 黄连素联合顺铂抑制 A549/DDP 细胞增殖和促凋亡的分子机制可能是上调促凋亡相关基因 Caspase-3、Caspase-9、Bax 的表达,下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达。

[关键词] 黄连素;顺铂;肺癌耐药;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5;R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.05.002

An Experimental Study on Apoptosis of A549 / DDP Cells Induced by Berberine Combined with Cisplatin

ZENG Lingfang¹, WANG Yijun¹, WU Yichen¹, ZHANG Hui^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Hunan Cancer Hospital, Changsha, Hunan 410006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of berberine combined with cisplatin on cell apoptosis of A549 / DDP and investigate its related mechanism. **Methods** Human lung cancer resistance A549 / DDP cells, as the object of study, were added with 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin, and 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ berberine combined with 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin, respectively, blank control wells (PBS wells) were set up, they were all treated with drugs for 24 h, 48 h and 72 h. The cell proliferation was evaluated by MTT assay. After intervention with drugs for 48 h, cell apoptosis was determined by using the flow cytometry instrument. The protein and mRNA levels of Caspase-3, Caspase-9, Bax, Bcl-2 were measured by Real-time PCR and western blotting analysis, respectively. **Results** Berberine combined with cisplatin could inhibit the growth of A549 / DDP cells ($P<0.01$) and promote apoptosis of A549/DDP cells ($P<0.01$), with a certain time-concentration dependence. Different concentrations of berberine combined with cisplatin increased the levels of protein and mRNA levels of apoptosis genes Caspase-3, Caspase-9, Bax ($P<0.05$), and down-regulated the protein and mRNA levels of anti-apoptosis gene Bcl-2 ($P<0.05$).

[收稿日期] 2017-09-14

[基金项目] 湖南省科学技术厅资助项目(2014FJ3133)。

[作者简介] 曾玲芳,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治肿瘤。

[通讯作者] * 章慧,女,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:382793382@qq.com。

Conclusion The molecular mechanism of berberine combined with cisplatin in inhibiting proliferation and promoting apoptosis of A549 / DDP cells may be related to up-regulating the expression of apoptosis related proteins Caspase-3, Caspase-9 and Bax, downregulating the expression of anti-apoptosis protein Bcl-2.

[**Keywords**] berberine; cisplatin; lung cancer drug resistance; cell apoptosis

肺癌是常见的恶性肿瘤之一,近年来其发病率和死亡率均明显增高,据我国癌症中心2017年发布的数据显示:2013年肺癌在我国恶性肿瘤的发病率及死亡率均位居榜首^[1]。化疗是肺癌综合治疗的重要手段之一,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌的80%以上,以铂类为基础的二药联合方案是目前公认的晚期NSCLC的标准化疗方案,但肺癌的一线化疗有效率仅为20%~40%^[2],二线化疗有效率更低,其主要原因为肺癌对化疗药物极易产生耐药性^[3]。因此,肺癌耐药已成为化疗的“治疗性瓶颈”,是肺癌临床治疗中的棘手问题^[4]。黄连素,提取自中药黄连、黄柏。黄连、黄柏,以其大苦大寒之性,最善攻毒、排毒、解毒,是一类运用广泛的植物药^[5]。黄连素^[6-13]在诱导食管癌、乳腺癌等其他肿瘤细胞凋亡方面已有相关报道,但尚未有关于黄连素诱导人肺癌耐药A549/DDP细胞凋亡的相关研究。本实验通过观察黄连素联合顺铂对A549/DDP细胞凋亡的影响并探讨其相关机制,为黄连素能够进一步应用于临床,克服肺癌顺铂耐药提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验对象

人肺癌耐药细胞株A549/DDP购自中南大学肿瘤研究所;黄连素购于美国Sigma公司(批号:PHR1502);顺铂为山东齐鲁医药股份有限公司产品(批号:H20023460)。

1.2 主要试剂

MTT粉(德国Serva公司),BCA蛋白定量试剂盒(美国Sigma公司);一抗caspase-3(英国abcam, Rabbit)、一抗caspase-9(美国proteitech, Rabbit);一抗bcl-2(美国santa cruz, Mouse)、一抗bax抗体(美国santa cruz, Rabbit); β -actin抗体(美国proteitech, Mouse);goat anti-mouse IgG、goat anti-rabbit IgG(美国proteitech);显影液(中国WellBiology);逆转录试剂盒(Fermentas公司);PCR引物(南京金斯瑞公司)。

1.3 主要仪器

FACSCalibur流式细胞分析仪(BD公司)、DYCZ-40A转膜仪(中国北京六一)、PIKO REAL 96荧光定量PCR仪(Thermo)、SPL0960荧光PCR板(Thermo)。

1.4 方 法

1.4.1 实验分组 (1)对照组:PBS组;(2)顺铂组:以12 mg/L的DDP处理;(3)低、中、高浓度黄连素+DDP组:浓度分别为20、40、80 μ mol/L的黄连素+12 mg/L的DDP处理。

1.4.2 细胞培养及传代 人肺癌耐药细胞A549/DDP培养于含10%新生小牛血清的RPMI-1640培养基中,用2 μ g/mL顺铂维持其耐药性,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养,2~3 d换液1次,细胞密度达80%左右,胰酶消化细胞,一分为二进行传代。实验前1周换成不含顺铂的培养基以减少顺铂对实验的干扰。

1.4.3 MTT法检测细胞增殖活性 取对数生长期细胞,胰蛋白酶消化,加入到RPMI-1640培养基吹打成单细胞悬液,以密度为 1×10^4 个细胞/孔接种于96孔板内;采用12 mg/L的DDP、浓度为20、40、80 μ mol/L的黄连素+12 mg/L的DDP作用于A549/DDP细胞24、48、72 h,每组均设4复孔;每孔加入MTT 20 μ L继续孵育4 h,吸弃上清,加入二甲亚砜,充分震荡混匀;用Bio-Tek酶标仪检测各孔490 nm处吸光度值;计算细胞的生长抑制率:细胞生长抑制率=(1-实验组/对照组) $\times 100\%$ 。

1.4.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 取各组药物干预48 h的细胞,用不含EDTA的胰酶消化后,用含12%FBS的RPMI-1640培养基吹打成单细胞悬液,吸取单细胞悬液至离心管中;PBS洗涤2次后以2 000 r/min离心5 min,收集约 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞;加入500 μ L的Binding buffer悬浮细胞;加入5 μ L Annexin V-FITC混匀后,加入5 μ L Propidium Iodide,混匀;室温、避光,反应5~15 min;1 h内,在流式细胞仪观察检测。

1.4.5 Western blot 检测蛋白表达 各组药物干预 48 h 的细胞洗涤离心,加入 RIPA 裂解液提取样品蛋白。按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明操作,测定蛋白浓度。电泳后转膜,将膜放置于脱脂牛奶中室温 1 h。将一抗按一定比例稀释后 (Bax、Bcl-2、Caspase-3 均按 1:200 稀释,Caspase-9 按 1:500 稀释)与膜孵育,孵育结束后用 1×TBST 洗 3 次。用 HRP 标记的二抗(稀释比例 1:3 000)与膜孵育。最后以 ECL 显色曝光,将曝光后的底片扫描,并用 quantity one 专业灰度分析软件进行分析,并以 β -actin 作为内参条带。

1.4.6 RT-PCR 检测 Caspase-3 mRNA、Caspase-9 mRNA、Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 的表达水平 Trizol 提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品完整性。按 HiFiScript 试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,逆转录反应条件为 42 °C 孵育 30~50 min,逆转录酶失活反应 85 °C 孵育 5 min。按 SYBR 实时荧光定量 PCR 法反应体系进行 PCR 反应。由南京金斯瑞合成 PCR 引物,序列如下:Caspase-3-F:5'-GGTTCATCC AGTCGCTTTG-3';Caspase-3-R:5'-TTCTGTTGCCACCTTTTCG-3';product length:98 bp。Caspase-9-F:5'-AAAGTTGTCGAAGCCAACCCTAG-3';Caspase-9-R:5'-CAAATCCTCCAGAACCAATGTCC-3';product length:122 bp。Bcl-2-F:5'-ATTGTG-GCCTTCTTT GAGTTTCG-3';Bcl-2-R:5'-CCTACCAGCCTCCGTTATCC-3';product length:152 bp。bax-F:5'-CCAGGATGCGTCCACCAAGAA-3';bax-R:5'-CCGTGTCCACGTCAGCAATCA-3';product length:104 bp。actin-F:5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGG-3';actin-R:5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3'product length:107 bp。每个实验组设 3 个复孔,分别扩增 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2 基因,得到 3 组 Δ Ct,按照公式 Δ Ct=目的 Δ Ct-内参 Δ Ct, $-\Delta\Delta$ Ct=(对照组) Δ Ct 平均值-各样品 Δ Ct, $2^{-\Delta\Delta$ Ct} 计算各样品相对于对照组样品目的基因的表达水平(本实验以 PBS 样为对照样品)。

1.5 统计学方法

实验所得数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分

析。实验数据以均数“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),不满足方差分析条件的则用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增值

结果如表 1 所示:从中可以看出,作用 24 h、48 h、72 h,与 PBS 组对比,低、中、高浓度黄连素联合顺铂组、顺铂组对 A549/DDP 细胞增值抑制率差异有显著统计学意义($P<0.01$);随着黄连素浓度增加,抑制率逐渐增高。

黄连素联合顺铂能够抑制 A549/DDP 细胞增值,且有一定的时间和浓度依赖性。

表 1 黄连素联合顺铂对细胞 A549/DDP 增值的影响

组别	增值抑制率 ($n=4, \bar{x}\pm s, \%$)		
	24 h	48 h	72 h
PBS	0.00	0.00	0.00
DDP	4.91±0.21*	7.72±0.87*	12.57±1.86*
DDP+低	8.93±0.49*	22.15±1.22*	32.62±2.33*
DDP+中	11.76±0.81*	28.00±1.39*	40.87±1.42*
DDP+高	13.18±0.72*	33.49±1.48*	46.74±3.56*
<i>F</i>	5.53	46.80	91.25
<i>P</i>	0.006	0.000	0.000

注:与 PBS 组比较,* $P<0.01$ 。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

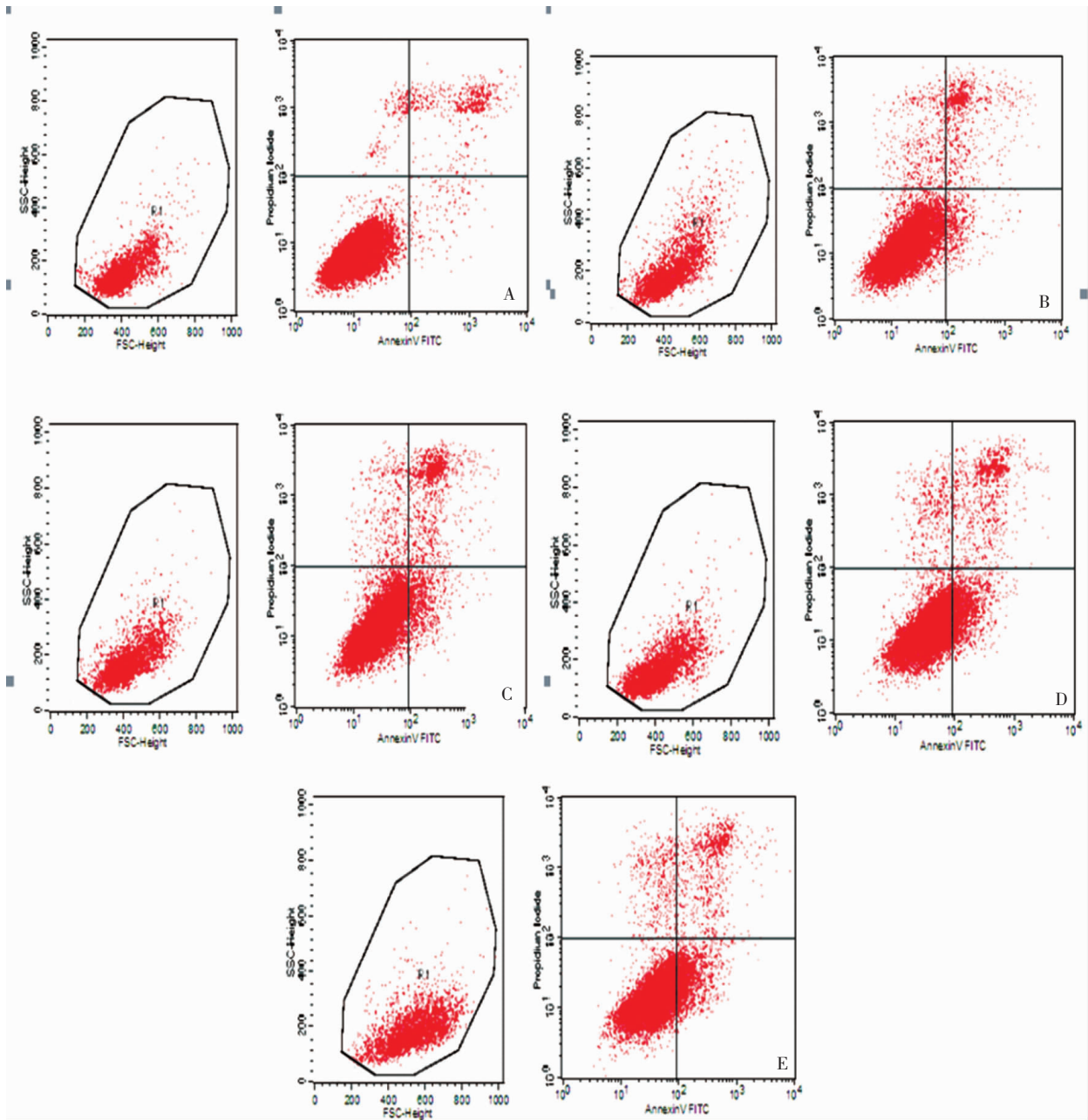
结果如表 2 及图 1 所示:顺铂组及低、中、高浓度黄连素联合顺铂组细胞凋亡率均高于 PBS 组,并且差异有显著统计学意义($P<0.01$),但中浓度黄连素联合顺铂组和高浓度黄连素联合顺铂组两组之间比较,细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。

黄连素联合顺铂能够诱导耐药细胞 A549/DDP 凋亡,且呈一定的浓度依赖性。

表 2 黄连素联合顺铂对 A549/DDP 细胞凋亡的影响

组别	凋亡率 ($n=3, \bar{x}\pm s, \%$)				
	PBS	DDP	DDP+低	DDP+中	DDP+高
凋亡率(%)	1.65±0.23	4.43±0.16*	5.39±0.34*	14.84±0.20*	14.33±0.20*
<i>F</i>			375.23		
<i>P</i>			0.000		

注:与 PBS 组比较,* $P<0.01$ 。



注:A.PBS 组;B.DDP 组;C.DDP+低组;D.DDP+中组;E.DDP+高组

图 1 细胞凋亡散点图

2.3 Western blot 检测蛋白表达

结果如图 2 及表 3 所示:与 PBS 组相比,顺铂组,低、中、高浓度黄连素联合顺铂组促凋亡相关蛋白 Caspase3、Caspase9、Bax 表达明显增强 ($P<0.05$),且低、中、高浓度黄连素联合顺铂组与顺铂组之间比较也有统计学差异 ($P<0.05$),随着浓度增加,促凋亡相关蛋白 Caspase3、Caspase9、Bax 的表达呈上升趋势;抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显减弱 ($P<0.05$),且低、中、高浓度黄连素联合顺铂组与顺铂组之间比较也有统计学差异 ($P<0.05$),随着浓度增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达呈下降趋势。

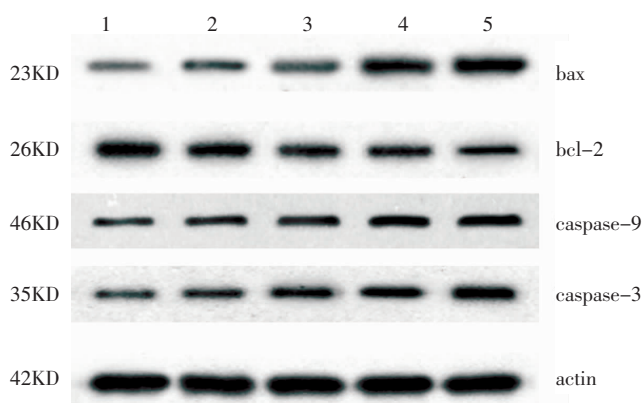
黄连素能够增强 A549/DDP 细胞促凋亡相关蛋

白 Caspase3、Caspase9、Bax 的表达,减弱抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,并具有浓度依赖性。

表 3 凋亡相关蛋白相对表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	caspase3/actin	caspase9/actin	bax/actin	bcl-2/actin
PBS	0.460±0.018	0.340±0.016	0.276±0.013	0.640±0.106
DDP	0.535±0.018*	0.396±0.151*	0.333±0.015*	0.591±0.058*
DDP+低	0.610±0.015*▲	0.4390±0.010*▲	0.388±0.026*▲	0.504±0.011*▲
DDP+中	0.650±0.020*▲	0.468±0.010*▲	0.586±0.103*▲	0.481±0.036*▲
DDP+高	0.722±0.019*▲	0.503±0.011*▲	0.660±0.117*▲	0.409±0.011*▲
F	153.0	120.7	53.14	534.2
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 PBS 组相比较,* $P<0.05$;与 DDP 组相比,▲ $P<0.05$ 。



注:从左至右分别为 PBS、DDP、DDP+低、DDP+中、DDP+高组。

图2 细胞凋亡相关蛋白表达电泳图

2.4 RT-PCR 法检测 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2 的 mRNA 水平

结果如表4所示:与 PBS 组相比,DDP 组、低中浓度黄连素联合顺铂组促凋亡相关 mRNA caspase-3、caspase-9、bax 表达明显上调,有统计学差异($P<0.05$),DDP 组、低中浓度黄连素联合顺铂组抗凋亡 mRNA bcl-2 表达明显下调,有统计学差异($P<0.05$)。

黄连素联合顺铂能够增强 caspase-3、caspase-9、bax 的 mRNA 表达,减弱 bcl-2 的 mRNA 表达,并具有一定的浓度依赖性。

表4 凋亡相关基因的 mRNA 表达水平 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	caspase-3	caspase-9	bax	bcl-2
PBS	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
DDP	1.500±0.367*	1.936±0.220*	1.542±0.144*	0.588±0.084*
DDP+低	1.708±0.238*	1.325±0.099*	2.033±0.092*	0.473±0.034*
DDP+中	1.882±0.121*	2.681±0.484*	2.283±0.283*	0.394±0.036*
DDP+高	1.856±0.411*	4.840±0.500*	3.127±0.606*	0.349±0.018*
F	5.271	64.52	20.14	70.04
P	0.015	0.000	0.000	0.000

注:与 PBS 组相比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

肿瘤是细胞分裂与细胞死亡失衡的一类疾病,细胞凋亡障碍在恶性肿瘤细胞发生发展中起关键作用。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)是一组与细胞凋亡有关的蛋白酶,是细胞凋亡的中央处理器。Caspase 家族分为三大类:凋亡启动因子、凋亡执行因子和炎症介导因子,在细胞凋亡中构成级联放大效应。凋亡启动因子位于级联反应的上游,以

caspase-9 为代表,能在其它蛋白辅助下发生自我活化并识别和激活下游的 caspase。凋亡执行因子在级联反应的下游,作用于其特异性底物并导致细胞凋亡。如 Caspase-3,是 caspase 家族中的最重要的凋亡执行者之一,是细胞凋亡过程中的主要效应因子,它的活化标志着凋亡进入了不可逆阶段。不管是死亡受体介导的外源性凋亡途径还是线粒体介导的内源性凋亡途径,Caspase-3 和 Caspase-9 都发挥了作用,其中 Caspase-3 是外源性凋亡途径和内源性凋亡途径的汇集点。

Bcl-2 家族蛋白对细胞凋亡具有双向调节作用,其作用部位主要是线粒体外膜,通过调节线粒体的膜孔隙形成蛋白^[14],从而调节线粒体释放促凋亡因子,参与线粒体介导的细胞凋亡过程。根据结构和功能不同分为两类,一类是以 Bcl-2 为代表的抗凋亡蛋白,另一类是以 Bax 为代表的促凋亡蛋白。Bax 蛋白能在较为广泛的 PH 范围内形成孔道,允许一些离子和小分子如细胞色素 c 等穿过线粒体膜,进入细胞质,从而引起细胞凋亡,而 Bcl-2 蛋白的作用正好相反,它能封闭 Bax 蛋白形成孔道的活性,使一些小分子不能自由通过,从而保护细胞凋亡。近年来的研究认为 Bcl-2 蛋白可能是通过清除线粒体活性氧,抑制多种线粒体凋亡蛋白的释放如细胞色素 c 释放到细胞质,阻止 Caspase 的进一步激活,从而抑制细胞凋亡^[15]。Bax 蛋白是 Bcl-2 家族的前凋亡蛋白,一般存在于胞浆中,并作为一种细胞损伤和刺激的传感器。当响应损伤和刺激时,Bax 蛋白将重新定位于线粒体表面并破坏在正常状态下抗凋亡的 Bcl-2 蛋白的功能。一般来说,在胞浆中的 Bax 以单体形式存在,然而在细胞发生凋亡时,与线粒体关联的 Bax 既可能以无活性的单体形式存在,也可能以与线粒体膜结合的大分子量的活性复合物形式存在。Bax 可以构成跨线粒体外膜的孔,并促使膜电位的降低和细胞色素 C(Cyt C)及凋亡诱导因子(AIF)的外流,细胞色素 C 与 Apaf-1 和 ATP 及 Pro-Caspase-9 形成复合物(凋亡体)并导致 Caspase-9 的激活。与细胞色素 C 的结合使 Apaf-1 与 pro-Caspase-9 的结合能力更强。

黄连素提取自黄连、黄柏,根据药物功效确定的中医归经理论中,均没有关于黄连、黄柏入肺经的记

载。黄连入药,除生用外,还有酒炙、姜汁炙、吴茱萸水炙等多种炮制方法,其功效各异。其中临床上多用姜黄连清胃热和胃止呕,然酒黄连善清上焦火热却少有人知,更无谓于临床使用。肺位居上焦,为五脏六腑之华盖,肺为娇脏,喜润恶燥,结合其生理病理特点,可以将肺癌的病机概括为气阴亏虚,瘀毒内结,黄连虽不入肺经,然酒黄连以其善清上焦火热之功效而能够治疗肺癌,且现代药理学研究已经显示黄连素具有诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡的作用^[16]。

实验中我们采用不同浓度的黄连素联合顺铂作用于 A549/DDP 细胞后,发现黄连素联合顺铂能够抑制人肺癌耐药 A549/DDP 细胞增值,诱导细胞凋亡。在分子水平上进一步研究发现,黄连素联合顺铂能够增强促凋亡因子 Caspase-3、Caspase-9、Bax 在 mRNA 和蛋白水平的表达,减弱抗凋亡因子 Bcl-2 在 mRNA 和蛋白水平的表达,由此我们可以推论黄连素联合顺铂抑制 A549/DDP 细胞增殖和促凋亡的分子机制可能是上调促凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9、Bax 的表达,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。

参考文献:

- [1] 中国癌症中心.2017年中国城市癌症最新数据报告[EB/OL], 2017-03-21.
- [2] 孙彬栩,杨佩颖.非小细胞肺癌多药耐药机制及其逆转的研究进展[J].疑难病杂志,2013,12(1):77-79.
- [3] SAIKA K, SOBUE T. Cancer statistics in the world [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2013, 40(13):2475-2480.
- [4] GALLUZZI L, SENOVILLA L, VITALE I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. *Oncogene*, 2012, 31(15):1869-1883.
- [5] 左茹,曹雪滨,张文生.黄连素药理作用研究进展[J].*环球中药*, 2014,7(7):568-572.
- [6] REFAAT A, ABDELHAMED S, YAGITA H, et al. Berberine enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(3):840-844.
- [7] YANG X, YANG B, CAI J, et al. Berberine enhances radiosensitivity of esophageal squamous cancer by targeting HIF-1 α in vitro and in vivo[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013,14(11):1068-1073.
- [8] 郎超,张立超,吉鹏宇,等.黄连素通过诱导肿瘤细胞内 GRP78 膜转位而促其凋亡[J].*山西大学学报*,2016,39(3):499-504.
- [9] WANG C, WANG H, ZANG Y, et al. Berberine inhibits the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells via an Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-dependent mechanism[J]. *Oncology reports*,2017,37(4):2109-2120.
- [10] 曾智豪,陈小伍,朱达坚,等.盐酸小檗碱对 MCF-7 乳腺癌小鼠体内抑制肿瘤生长的实验研究[J].*河北医学*,2016,22(6):988-991.
- [11] JIANG S X, QI B, YAO W J, et al. Berberine displays anti-tumor activity in esophageal cancer cells in vitro [J]. *World journal of gastroenterology*,2017,23(14):2511-2518.
- [12] JIN H, JIN X, CAO B, et al.Berberine affects osteosarcoma via downregulating the caspase-1/IL-1 β signaling axis [J]. *Oncology reports*, 2017,37(2):729-736.
- [13] 陈彬彬.黄连素对人结肠癌细胞凋亡和迁移作用的研究[D].厦门:厦门大学,2014.
- [14] KORYTOWSKI W, BASOVA L V, PILAT A, et al. Permeabilization of the mitochondrial outer membrane by Bax/truncated-Bid(tBid) proteins as sensitized by cardiolipin hydroperoxide translocation: mechanistic implications for the intrinsic pathway of oxidative apoptosis[J]. *The Journal of biological chemistry*,2011, 286(30):26334-26343.
- [15] LIU C, HUANG Y, ZHANG Y, et al. Intracellular methylglyoxal induces oxidative damage to pancreatic beta cell line INS-1 cell through Ire1 α -JNK and mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Free radical research*, 2017,51(4):337-350.
- [16] 柯昌康,刘毓英,倪云峰,等.腺苷酸活化蛋白激酶在黄连素诱导人肺腺癌细胞凋亡中的作用机制[J].*中华中医药杂志*,2017,32(9):3977-3980.

(本文编辑 杨 瑛)