

羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯通过调控线粒体凋亡途径诱导 HepG2 细胞凋亡

卜明^{1,2,3}, 王璐³, 罗然³, 徐天赐³, 林宇³, 葛鹏玲², 刘吉成^{1*}

1. 齐齐哈尔医药科学研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2. 黑龙江中医药大学 博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: **目的** 探究羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞凋亡的作用及机制。**方法** 采用 0、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯作用于 HepG2 细胞 24、48、72 h, 采用 CCK-8 法检测各组细胞的增殖活性。采用 0、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯作用于 HepG2 细胞 48 h 后, AO/EB 染色法和 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞的凋亡率; JC-1 染色法观察 HepG2 细胞的线粒体膜电位变化; DCFH-DA 染色法观察细胞的活性氧 (ROS) 水平。Western blotting 法检测各组细胞线粒体凋亡途径相关蛋白表达变化。**结果** 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯呈时间和浓度相关性抑制 HepG2 细胞增殖 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯组细胞的 ROS 水平、总凋亡率、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C、裂解半胱氨酸蛋白酶 9 (cleaved-Caspase-9)、cleaved Caspase-3 蛋白水平呈浓度相关性升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 线粒体的膜电位、Bcl-2 蛋白表达则显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯可能通过调控线粒体凋亡途径诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡, 进而发挥抗肝癌作用。

关键词: 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯; 肝癌; 细胞凋亡; 活性氧; 线粒体; Bcl-2 相关 X 蛋白; 细胞色素 C; 半胱氨酸蛋白酶 9

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2024)03 - 0549 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.03.002

Lupinol-3 β -succinate induce apoptosis of HepG2 cells by regulating the mitochondrial apoptosis pathway

BU Ming^{1,2,3}, WANG Lu³, LUO Ran³, XU Tianci³, LIN Yu³, GE Pengling², LIU Jicheng¹

1. Post-Doctoral Research Center, Qiqihar Institute of Medical Sciences, Qiqihar 161006, China

2. Mobile Postdoctoral Center, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

3. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

Abstract: Objective To investigate the effect of lupinol-3 β -succinate on apoptosis of HepG2 cells and mechanism. **Methods** HepG2 cells were treated with lupinol-3 β -succinate (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$) for 24, 48, and 72 h, and the proliferation activity of the cells was detected by CCK-8 method. HepG2 cells were treated with lupinol-3 β -succinate (0, 4, 8, and 16 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, and the apoptosis rate of each group was detected by AO/EB staining and Annexin V-FITC/PI double staining. Changes of mitochondrial membrane potential in HepG2 cells were observed by JC-1 staining. Levels of ROS were observed by DCFH-DA staining. Western blotting method was used to detect the changes of mitochondrial apoptosis-related protein expression in each group. **Results** Lupinol-3 β -succinate showed significant time and dose dependent inhibition of HepG2 cell proliferation ($P < 0.01$). Compared with control group, ROS level, total apoptosis rate, Bax, Cyt-C, cleaved Caspase-9, and cleaved Caspase-3 protein levels were increased in a dose-dependent manner after lupinol-3 β -succinate treatment ($P < 0.01$, 0.001). Mitochondrial membrane potential and Bcl-2 protein expression were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Lupinol-3 β -succinate may induce apoptosis of human hepatoma HepG2 cells by regulating mitochondrial apoptosis pathway, and finally play an anti-hepatocellular carcinoma role.

Key words: lupinol-3 β -succinate; liver cancer; apoptosis; ROS; mitochondrion; Bax; Cyt-C; Caspase-9

收稿日期: 2024-01-29

基金项目: 中央支持地方高校改革发展资金人才培养项目 (21B024); 齐齐哈尔医学科学院科研项目 (QMSI2022Z-01)

作者简介: 卜明, 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然药物化学。E-mail: buming@qmu.edu.cn

*通信作者: 刘吉成, 男, 博士, 教授, 研究方向为天然药物抗肿瘤作用。E-mail: jcliu@qmu.edu.cn

肝癌是临床常见恶性肿瘤之一，我国肝癌的发病率和死亡率一直呈现上升趋势，已成为严重危害居民健康的重要疾病^[1]。当前研究表明，化学疗法仍是癌症治疗的最有效方法之一，但不良反应严重限制了很多药物的临床应用^[2-3]。因此，开发高效低毒的抗肝癌药物已成为药物研发的重要方向之一。在新药研发的过程中，从中药资源中筛选具有抗肝癌作用的天然活性成分，对于肝癌药物的研发具有重要意义^[4-5]。

羽扇豆醇是课题组前期在毒性中药材狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 中提取得到的五环三萜类化合物，同时文献调研发现羽扇豆醇在水果、蔬菜、中草药中均有广泛的分布^[6]。羽扇豆醇用于抗炎、抗菌、抗风湿等的治疗^[7-10]。近年来，羽扇豆醇的抗肿瘤作用被广泛关注，已有研究发现羽扇豆醇可抑制头颈部肿瘤的生长和扩散，对肝癌、膀胱癌和乳腺癌有治疗作用^[11-17]。在以往研究的基础上，近年来关于羽扇豆醇的研究主要包括它的生物合成途径、衍生物合成和活性机理的探索^[18]。相关报道以羽扇豆醇作为先导化合物，合成出的某些衍生物也具有很好的抗肿瘤活性，如羽扇豆醇-3 β -硫酸盐可抑制前列腺肿瘤细胞的增殖和迁移能力^[19]；羽扇豆醇氯醋酸盐抑制肺癌 A549 较羽扇豆醇能力强^[20]；羽扇豆醇-3-吡啶季铵盐衍生物能够显著抑制结直肠癌增殖^[21]。琥珀酸可使药物具有良好的溶解性和穿透性。课题组前期成功制备羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯，如图 1 所示，并发现其对肝癌 HepG2 细胞的抗增殖活性 ($IC_{50}=8.60 \mu\text{mol/L}$) 较母体羽扇豆醇 ($IC_{50}=43.62 \mu\text{mol/L}$) 显著提升，具有深入研究价值。线粒体信号通路是治疗多种癌症的重要靶点，本研究通过观察羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对人肝癌细胞的抗增殖作用，并基于线粒体凋亡途径对其可能的作用机制进行探讨，以期羽扇豆醇类抗肿瘤药物的研制提供参考。

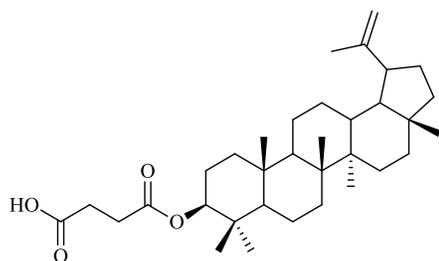


图 1 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯结构式

Fig. 1 Lupinol-3 β -succinate structural formula

1 材料与仪器

1.1 细胞株

HepG2 细胞株购买自中国科学院细胞库。将 HepG2 细胞接种于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中，37 °C、5% CO₂ 条件在细胞培养箱中进行培养。

1.2 药物及主要试剂

羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯(质量分数>98%)由齐齐哈尔医学院医药科学研究院合成(由羽扇豆醇与琥珀酸酐通过酯化反应制备，质量分数>98%；羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯溶于 DMSO 溶液中，加热至 50 °C 促溶，制成 40 mmol/L 储备液)；DMEM 培养液(批号 CM15019)购自北京中科迈晨科技有限公司；特级胎牛血清(批号 086-150)购自南京维森特生物技术有限公司；青霉素-链霉素溶液(批号 C0222)、胰酶消化液(批号 C0203)、CCK-8 试剂盒(批号 C0038)均购自上海碧云天生物科技有限公司；细胞色素 C (Cyt-C) 抗体(批号 4280T)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体(批号 2772)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 抗体(批号 4223T)、cleaved-半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) (批号 9664) 均购自美国 CST 公司；Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒(批号 KGA1102)、JC-1 细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒(批号 KGA1904)、活性氧 (ROS) 检测试剂盒(批号 KGT010-1)、BCA 蛋白测定试剂盒(批号 KGPBCA)均购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.3 主要仪器

EM208S 型电子显微镜(荷兰飞利浦公司)；二氧化碳恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；LSM710 型激光扫描共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)；FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)；Power/PAC3000 型电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞的存活率

将处于对数生长期的 HepG2 细胞用胰酶消化并重悬后稀释为 1.0×10^4 个/mL，按每孔 200 μL 接种于 96 孔细胞培养板中继续培养 24 h，使用不同浓度羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯(0、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24、48、72 h 后，加入 CCK8 工作液(每孔 20 μL)，在 37 °C 培养箱中继续孵育 2 h，然后使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (A) 值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 细胞凋亡情况检测

取对数生长期 HepG2 细胞以 5.0×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 培养 24 h, 使用不同浓度羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯 (0、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 48 h 后, PBS 洗涤, 加入 AO、EB 染色液各 5 μL , 室温避光孵育 5 min, 使用激光共聚焦显微镜观察各组细胞的凋亡形态并拍照。收集、洗涤细胞, 加入 Annexin V-FITC、PI 染液, 于室温下暗处孵育 30 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.3 DCFH-DA 法检测 ROS 变化

细胞按照 2.2 项下的方法进行分组给药和培养。HepG2 细胞洗涤后, 加入无血清稀释的 DCFH-DA 探针, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后, 使用无血清培养基洗涤细胞后, 流式细胞仪检测细胞 ROS 含量, 使用激光共聚焦显微镜拍照观察。

2.4 JC-1 法检测线粒体膜电位变化

细胞按照 2.2 项下的方法进行分组给药和培养。HepG2 细胞洗涤后, 加入稀释的 JC-1 染色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 用 1 \times Buffer 洗去多余的染色液, 流式细胞仪检测线粒体膜电位变化, 使用激光共聚焦显微镜拍照观察。

2.5 Western blotting 法检测相关蛋白的表达

按照 2.2 项下的方法对细胞进行分组给药和培养。收集各组细胞, 加入细胞裂解液后冰浴 30 min,

低温高速离心 20 min 提取总蛋白。蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 结束后转至 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 使用 TBST 缓冲液洗 PDVF 膜 3 次; 加入稀释后的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。使用 TBST 缓冲液洗膜后, 加入二抗在常温下孵育 2 h, 洗膜后 ECL 发光液显色, 利用 BIO-RAD 曝光; 运用 Image J V1.8.0 图像分析软件检测条带灰度值, 计算蛋白条带相对表达水平。

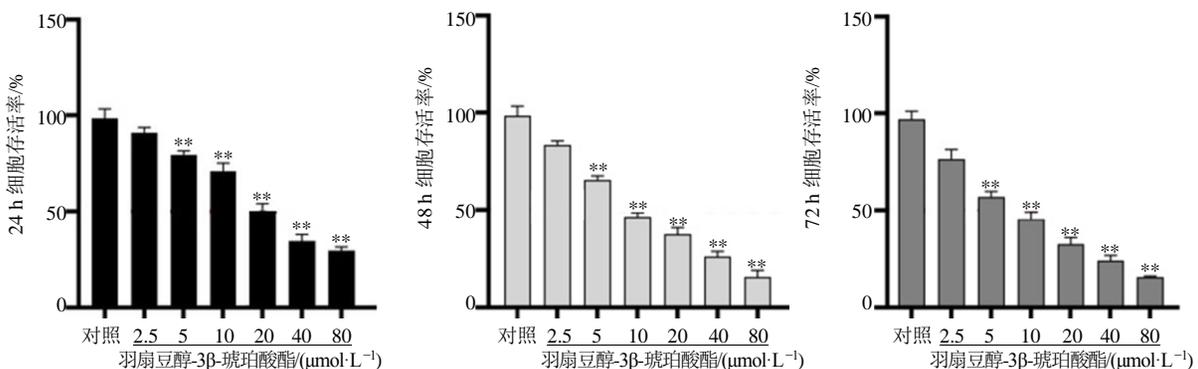
2.6 数据处理与分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞存活率的影响

与对照相比, 给药作用 24、48、72 h 后, HepG2 细胞的存活率均显著下降 ($P < 0.01$), 并呈现时间和浓度相关性。羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯作用 HepG2 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 (20.61 ± 0.32)、(8.60 ± 0.28)、(6.73 ± 0.16) $\mu\text{mol/L}$, 见图 2。通过比较, 药物作用 48 h 比作用 24 h 效果显著提升, 而药物作用 72 h 较 48 h 只有略微提升, 故后期实验选用羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯干预的梯度浓度及作用时间设置为 4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of lupinol-3 β -succinate on HepG2 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞凋亡率的影响

AO/EB 双染色法实验结果显示, 与对照组相比, 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯处理后 HepG2 细胞形态发生改变, 呈现出绿色荧光的非凋亡状态细胞数量

减少, 呈现出红色荧光的凋亡细胞数量增加, 并且具有浓度相关性, 见图 3。采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡率, 实验结果显示与对照组比较, 4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯作用 HepG2 细胞 48 h 后, 进入早期凋亡和

晚期凋亡的细胞比例显著增加，并呈现出显著的药物浓度相关性 ($P < 0.01$ 、 0.001)，见图 4。

3.3 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞 ROS 的影响

激光共聚焦显微镜观察结果显示，不同浓度的

羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯处理 HepG2 细胞后，细胞内 ROS 的荧光随着浓度的增加逐渐增强，见图 5。流式细胞术检测 HepG2 细胞内 ROS 水平结果显示，与对照组比较，4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯作用细胞 48 h 后，HepG2 细胞的 ROS 荧光

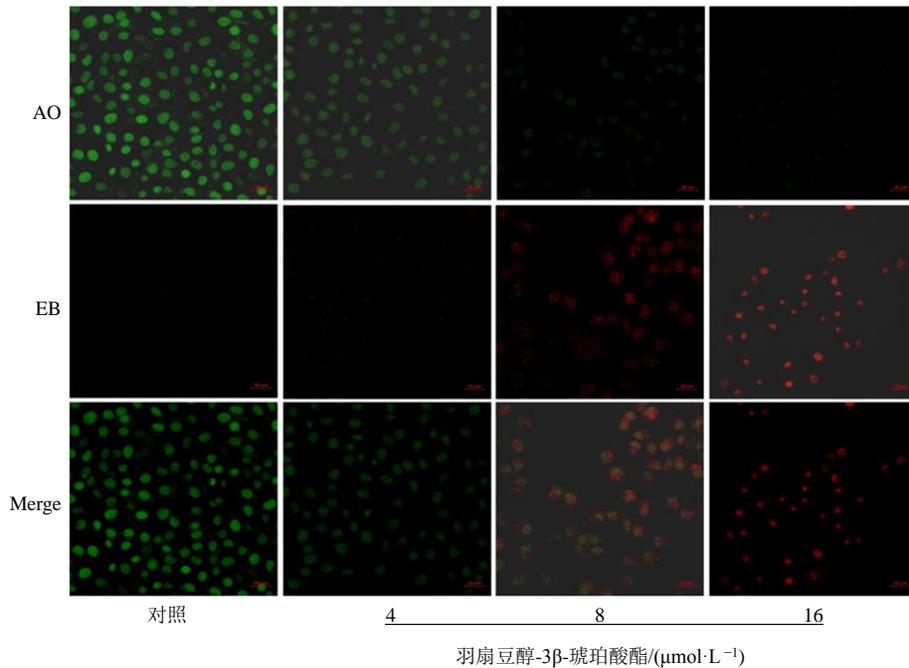
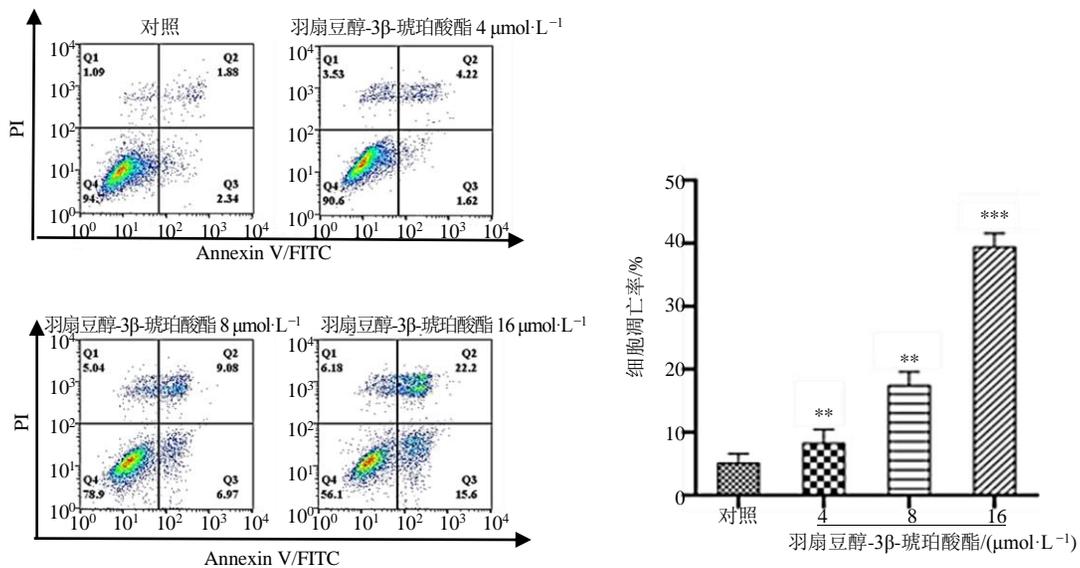


图 3 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞凋亡的 AO/EB 染色结果 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 3 AO/EB staining results of lupinol-3 β -succinate on apoptosis of HepG2 cells (immunofluorescence, $\times 400$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 4 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞凋亡的流式检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Flow detection results of lupinol-3 β -succinate on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

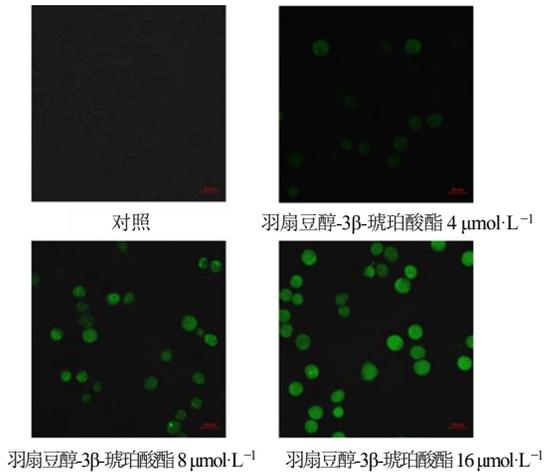
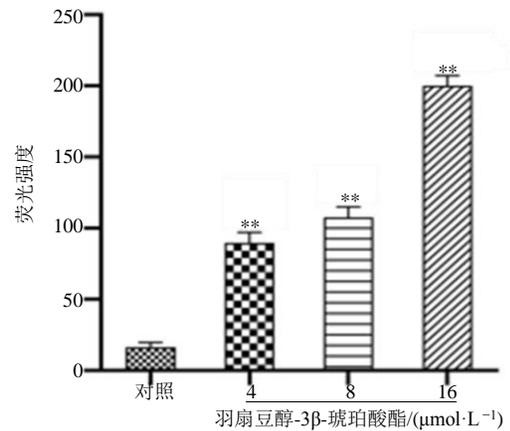


图 5 DCFH-DA 染色检测羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对 HepG2 细胞 ROS 的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 5 Effect of lupinol-3β-succinate on ROS of HepG2 cells detected by DCFH-DA staining (immunofluorescence, ×400) 强度值显著升高 ($P < 0.01$), 见图 6。

3.4 羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位结果如图 7 所示, 对照组呈现红色荧光, 说明此时线粒体膜电位处于正常状态。与对照组比较, 4、8、16 μmol/L 的羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯作用 HepG2 细胞 48 h 后, 红色荧光逐渐变弱至消失, 绿色荧光逐渐加强, 融合的 Merge 图亦呈



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group.

图 6 羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对 HepG2 细胞 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of lupinol-3β-succinate on ROS in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

现变绿色的趋势。流式细胞术检测 HepG2 细胞内膜电位水平显示, 受药物浓度影响 HepG2 细胞内的线粒体膜电位水平显著下降 ($P < 0.01$), 见图 8。

3.5 羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯组的凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的蛋白相对表达量显著下调, 而

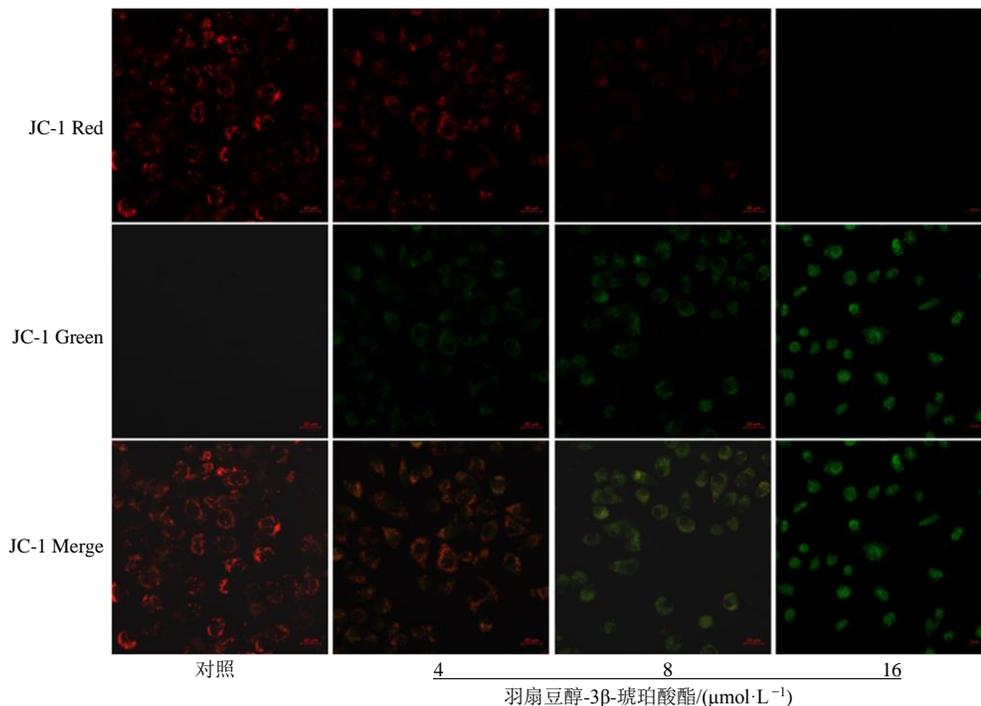


图 7 羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 7 Effect of lupinol-3β-succinate on mitochondrial membrane potential of HepG2 cells (immunofluorescence, ×400)

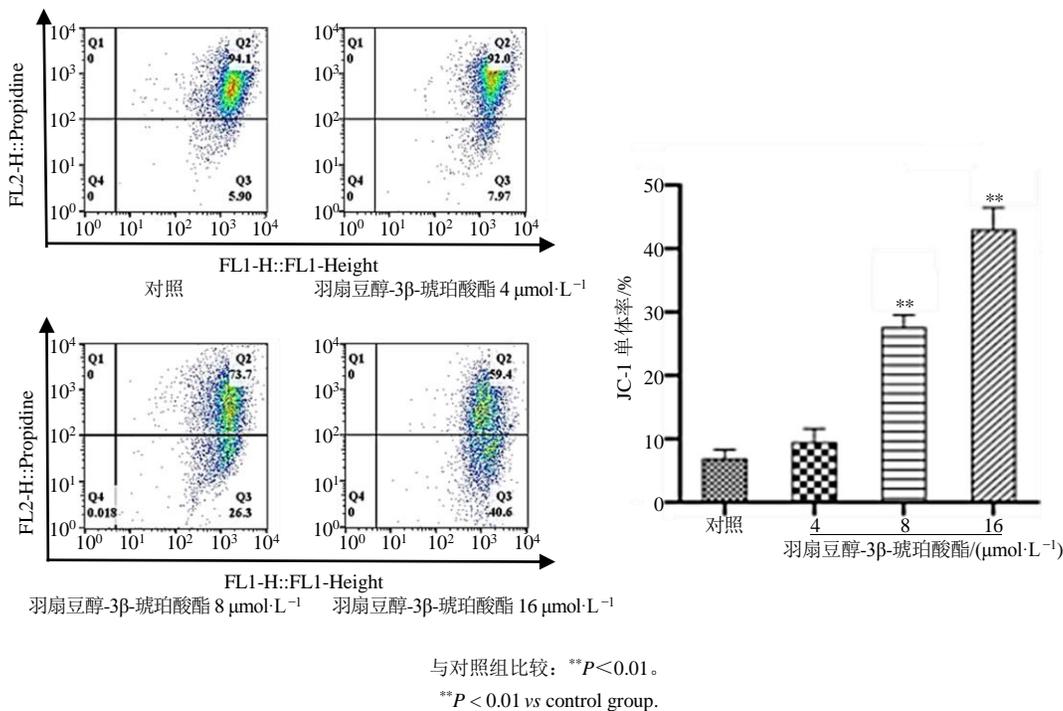


图 8 羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对 HepG2 细胞线粒体膜电位影响的流式细胞图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Flow cytometry of effects of lupinol-3β-succinate on mitochondrial membrane potential of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

促凋亡蛋白 Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 的表达水平显著上调 ($P < 0.01$), 见图 9。

4 讨论

狼毒大戟是大戟科多年生草本植物, 其根可入药, 中医记载其为毒性中药, 常以“以毒攻毒法”用于癌症、结核及腹水性疾病的治疗。对于狼毒大戟的毒性, 李时珍在《本草纲目》中提及:“狼毒, 观其名, 知其毒矣”^[22]。课题组前期研究中从狼毒大戟根部分离得到五环三萜类化合物羽扇豆醇, 经多项体外细胞及体内荷瘤实验证实, 对多种恶性肿瘤细胞均表现出显著的抑制活性^[23-24], 具有深入研究价值。但羽扇豆醇的水溶性很低, 限制了其进一步研究。琥珀酸是一种常见结构修饰基团, 可使药物具有良好的溶解性和穿透性, 课题组前期以琥珀酸对羽扇豆醇的 C-3 位羟基进行结构修饰, 成功制备羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯, 并发现其对肝癌 HepG2 细胞的抗增殖活性较母体羽扇豆醇显著提升。

肝癌是严重威胁人们生命健康的恶性肿瘤之一, 其发病机制复杂, 且生存时间短、预后不良^[25]。虽然分子靶向药物治疗取得了一定的疗效, 但是毒副作用及耐药性的问题仍然存在。因此从传统天然药用植物中挖掘具有潜在药用研究价值的新结构, 并通过结构改造进一步得到低毒、高效的抗肝癌药

物具有重要意义。基于线粒体介导的肿瘤细胞凋亡是肿瘤治疗的重要信号通路, 本研究通过观察羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对人肝癌 HepG2 细胞的抗增殖作用, 并基于线粒体凋亡途径对其可能的作用机制进行探讨, 以期羽扇豆醇类抗肿瘤药物的研制提供参考。

本研究结果表明羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯对 HepG2 细胞表现出呈浓度相关性地抑制作用。羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯作用 HepG2 细胞 48 h 的 IC₅₀ 值为 (8.60 ± 0.28) μmol/L, 是母体羽扇豆醇 [IC₅₀ = (43.60 ± 0.17) μmol/L] 的 5.03 倍, 实验结果证明引入琥珀酸酯结构对羽扇豆醇的抗增殖活性具有显著提升作用。

本研究中对羽扇豆醇-3β-琥珀酸酯的抗 HepG2 细胞增殖机制研究主要围绕线粒体相关信号通路开展。由于线粒体是细胞内氧化损伤的敏感靶点, 而肿瘤细胞中的氧化还原平衡又是异常的^[26], 所以线粒体功能受损对 ROS 触发的凋亡至关重要。研究表明, 药物对肿瘤细胞具有毒性作用的一个主要原因就是诱导肿瘤细胞产生大量 ROS 而引起肿瘤细胞发生氧化应激效应^[27]。同时, 过量的 ROS 能够增加线粒体的通透性, 从而降低线粒体的膜电位, 导致 Cyt-C 从线粒体释放到细胞质当中而导致凋亡的发

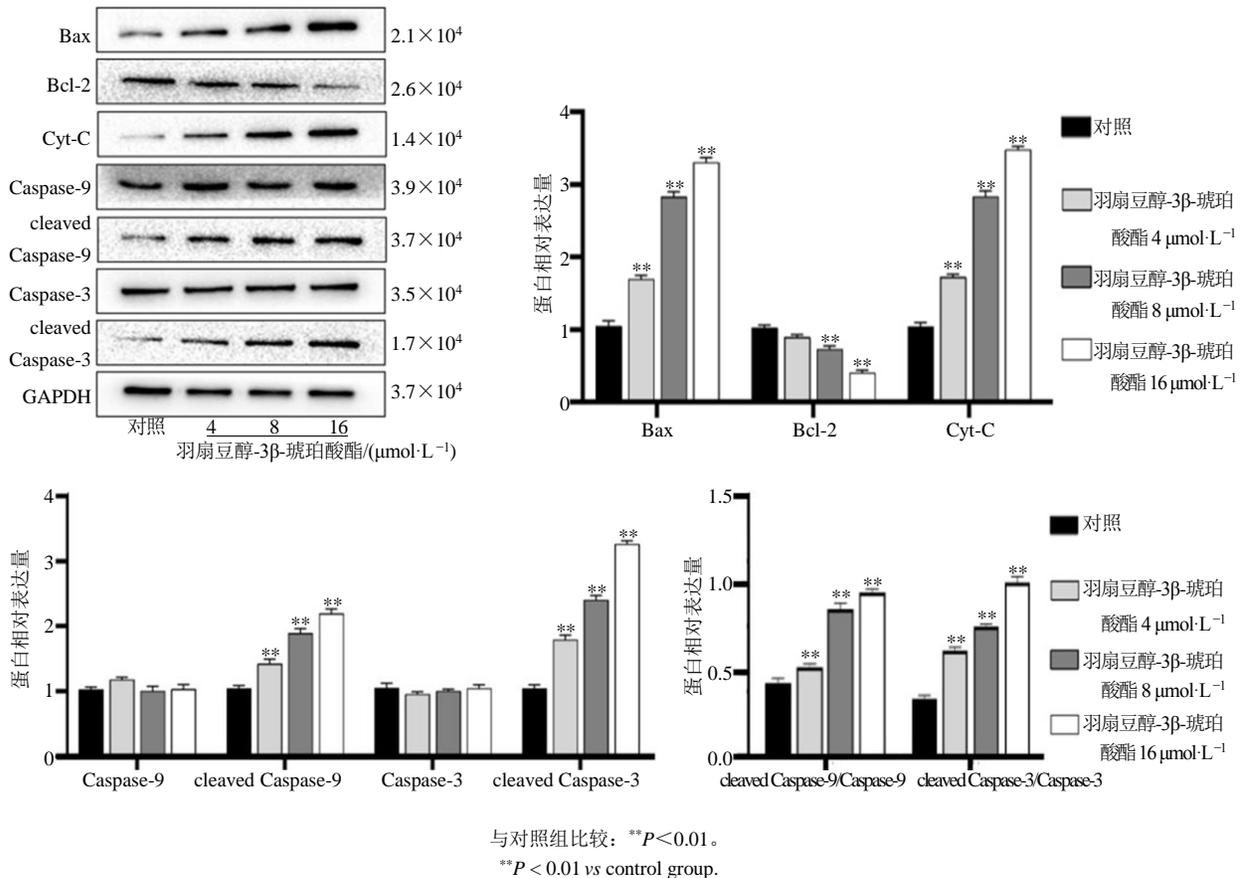


图 9 羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of lupinol-3 β -succinate on apoptosis-related protein expression in HepG2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

生。另外,在肿瘤细胞凋亡的过程中,蛋白水解酶 Caspase 家族同样发挥着重要作用,进入细胞质中的 Cyt-C 将在 ATP 和 dATP 的协助下形成凋亡复合体,继而激活蛋白水解酶 Caspase-9,使其发生自身裂解形成 cleaved Caspase-9,而裂解的 Caspase-9 进一步激活蛋白水解酶 Caspase-3,启动 Caspase 级联反应,触发线粒体信号通路相关的细胞凋亡^[28]。本实验采用 Annexin V-FITC/PI 双染、DCFH-DA 染色、JC-1 染色等流式细胞技术检测相关凋亡指标。研究结果显示,羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯作用于 HepG2 细胞后,可以使细胞内的 ROS 水平显著增加,线粒体膜电位下降,并呈现浓度相关性的诱导 HepG2 细胞凋亡。在此基础上,采用 Western Blotting 法检测羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯作用 HepG2 细胞后相关凋亡蛋白表达水平的变化,研究结果显示,羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯对 HepG2 细胞的凋亡作用可以呈现浓度相关性的下调 Bcl-2 的表达,上调 Bax、Cyt-C、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白的表达。

综上所述,羽扇豆醇-3 β -琥珀酸酯在体外可以显著抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,并诱导其凋亡。其

作用机制可能与线粒体介导的凋亡途径相关。本研究为天然源五环三萜类化合物的抗肝癌作用研究及成药性研究提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Nakauchi K, Ido S, Sumikawa S, *et al.* Assessment of chemotherapy-induced adverse events using a sharing system of patient-reported information via a touch panel [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2020, 47(5): 801-806.
- [3] Li Z Y, Hao E W, Cao R, *et al.* Analysis on internal mechanism of zedoary turmeric in treatment of liver cancer based on pharmacodynamic substances and pharmacodynamic groups [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 479-493.
- [4] 曹梦迪, 王红, 石菊芳, 等. 中国人群肝癌疾病负担: 多数据源证据更新整合分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41(11): 1848-1858.
- [5] 张道平, 刘起立, 姚昆鹏, 等. 基于生物信息学分析肝

- 癌差异基因及潜在的中药干预 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 788-798.
- [6] Siddique H R, Saleem M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies [J]. *Life Sci*, 2011, 88(7-8): 285-293.
- [7] Tsai F S, Lin L W, Wu C R. Lupeol and its role in chronic diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 929: 145-175.
- [8] 王强, 何超, 胡城, 等. 羽扇豆醇通过抑制 NF- κ B 活化改善克雷伯菌感染大鼠肺损伤 [J]. 中医学报, 2022, 37(10): 2177-2183.
- [9] 方红育, 周少怀, 黄涛, 等. 羽扇豆醇调节 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路对骨质疏松大鼠炎症反应的影响 [J]. 免疫学杂志, 2023, 39(7): 608-615.
- [10] Park J S, Rehman I U, Choe K, *et al.* A Triterpenoid lupeol as an antioxidant and anti-neuroinflammatory agent: Impacts on oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. *Nutrients*, 2023, 15(13): 3059.
- [11] 韦燕飞, 金丽杰, 刘莎莎, 等. 羽扇豆醇抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(7): 897-901.
- [12] 刘博佳, 宁青, 钟荣玲, 等. 羽扇豆醇对人肝癌细胞 HepG2 和 SK-HEP-1 侵袭、转移的影响及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(24): 6028-6035.
- [13] 赵芳, 宋玉霞, 周莎莎, 等. 羽扇豆醇通过上调 FOXO1 表达促进上皮性卵巢癌细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2023, 31(3): 565-570.
- [14] 韩泽平, 蔡贞. 羽扇豆醇对结直肠癌 HCT116 细胞的抑制作用及机制研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(20): 2433-2440.
- [15] 曹文富, 潘年松, 李颖. 羽扇豆醇抑制乳腺癌 MCF-7 增殖迁移和侵袭及机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 156-159.
- [16] 金丽杰, 刘欢, 刘莎莎, 等. 羽扇豆醇抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞自噬的实验研究 [J]. 中药材, 2022, 45(2): 422-426.
- [17] 史春雨, 陈红红, 景婷, 等. 羽扇豆醇对肝癌细胞的作用及其机制研究 [J]. 微循环学杂志, 2022, 32(1): 19-26.
- [18] Li W J, Xiao Y Y. Synthesis and *in vitro* antitumour activities of lupeol derivatives [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(1): 48-53.
- [19] 徐耿. 新型羽扇豆烷型三萜衍生物的设计合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2022.
- [20] Castro M J, Careaga V P, Sacca P A, *et al.* Lupane triterpenoids and new derivatives as antiproliferative agents against prostate cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(7): 3835-3845.
- [21] 韩泽平. 羽扇豆醇衍生物 LD-1 抗结直肠癌的作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- [22] Jian B Y, Zhang H, Liu J C. Structural diversity and biological activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 935.
- [23] 王明, 崔红霞, 刘吉成. 羽扇豆醇增强对沉默 ST3Gal III 基因的 MDA-MB-231 细胞侵袭转移的抑制作用 [J]. 解剖学报, 2020, 51(1): 26-31.
- [24] 王明, 崔红霞, 孙超, 等. 羽扇豆醇对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭转移作用及机制研究 [J]. 药学学报, 2016, 51(4): 558-562.
- [25] Xu Z X, Liu J, Cao J X, *et al.* 17 β -Estradiol inhibits testosterone-induced cell proliferation in HepG2 by modulating the relative ratios of 3 estrogen receptor isoforms to the androgen receptor [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8659-8671.
- [26] Xu D M, Li L R, Liu L C, *et al.* Polychlorinated biphenyl quinone induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cells [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30(9): 1063-1072.
- [27] Kaplan P, Tatarikova Z, Sivanova M K, *et al.* Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7698.
- [28] Dong X X, Fu J, Yin X B, *et al.* Induction of apoptosis in HepaRG cell line by aloe-emodin through generation of reactive oxygen species and the mitochondrial pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 685-696.

[责任编辑 高源]