

术界的高度重视。

References:

- [1] Fang S M, Zhang H D. Studies on the origin of the traditional Chinese drug Fuxiong and its relationships with *Ligusticum chuanxiong* and *L. sinense* [J]. *Acta Phytotaxono Sin* (植物分类学报), 1984, 22 (1): 38-42.
- [2] Zhang H D, Fang S M, Wu L K. Studies on the origin of the traditional Chinese drug "Jinxiong" [J]. *Acta Phytotaxono Sin* (植物分类学报), 1990, 28(6): 477-482.
- [3] Liu Y P, Cao H, Han G R, et al. Mat K and its nucleotide sequencing of crude drug *Chuanxiong* and phylogenetic relationship between their species from China and Japan [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2002, 37(1): 63-68.
- [4] Ding D R, Chen X F, Liu S R, et al. Investigation on ecological environment and soil properties of *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *Chin J Soil Sci* (土壤通报), 1997, 28(4): 184-186.
- [5] Wang H M. Cultivating techniques of Fuxiong in Jiangxi Province [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1990, 15(7): 15-16.
- [6] Zheng C J, Pu H S. Advances in studies on *Cnidium officinale* Makino [J]. *Res Chin Wild Plant* (中国野生植物资源), 2001, 20(2): 7-9.
- [7] Jin W Y, Cui J M, Liu Y Z. Studies on cultivating techniques of *Cnidium officinale* Makino [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(6): 386-387.
- [8] Wang F, Kuang W H. RP-HPLC determination of ferulic acid of *Ligusticum chuanxiong* Hort. from different areas [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中药现代应用药学), 2002, 19(4): 310-311.
- [9] Ni X L, He X Z, Shan R C. Contrast in contents of ferulic acid and levistolide A between Fuxiong and *Ligusticum chuanxiong* [J]. *J Jiangxi Coll Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 1998, 10(4): 170-171.
- [10] Wu Z G. The development of tetramethylpyzine in pharmacology [J]. *J Wuhan Chem Eng Coll* (武汉化工学院学报), 2003, 25(1): 28-32.
- [11] Li M, Handa S, Ikeda Y, et al. Specific inhibiting characteristics of tetramethylpyzine, one of the active ingredients of the Chinese herbal medicine '*Chuanxiong*' on the platelet thrombus formation under high shear rates [J]. *Thrombosis Res*, 2001, 104: 15-28.
- [12] Xu G J. *Category and Quality Control of Common Chinese Herbs* (常用中药材品种整理与质量研究) [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 1997.
- [13] Zhong F L, Yang L J, Ji L, et al. Studies on the constituents in volatile oil from *Ligusticum chuanxiong* Hort. of different species and from different place [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(3): 147-151.
- [14] Liu Y Z, Cui S Z, Cui J M, et al. Pharmacognostic comparative study on *Cnidium officinale* Rhizoma in different place of origin in Yanbian [J]. *J Yanbian Med Coll* (延边医学学报), 1994, 17(3): 210-215.
- [15] Wan F C, Huang D Z, Liu Z Z. Comparison in pharmacological efficacy among Chuanxiong, Fuxiong, Jinxiong and *Cnidium officinale* Makino [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1990, 6(5): 34-36.
- [16] Zhou D X, Lu H, Zhao Y F. Comparing different *Chuanxiong*'s effects on platelet aggregation and thrombosis formation [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2002, 18(3): 16-17.
- [17] Zhou D X, Lu H, Zhao Y F. Comparing different *Chuanxiong*'s effects on contraction of vascular smooth muscles [J]. *J Zhejiang Coll Tradit Chin Med* (浙江中医学院学报), 2002, 26(2): 46-47.
- [18] Wei J N. Analysis on trace elements in seven kinds of geo-authentic medicinal materials in Sichuan [J]. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 2001, 32(40): 634-635.
- [19] Feng J, Huang P, Zhou J M. Determination and its significance of Pb, Cd and As in 100 kinds of Chinese crude drugs [J]. *Study Trace Elements Health* (微量元素与健康研究), 2001, 18(2): 43-44.

蟾酥的研究进展

赵 强, 孟凡静, 刘安西

(南开大学生命科学院 生物系, 天津 300071)

摘 要: 综述了近几年国内外有关蟾酥主要药理作用及相关研究的进展。近 5 年来对蟾酥药理作用的研究主要集中在强心、镇痛和抗肿瘤作用的分子药理学方面, 且十分复杂, 涉及多种机制, 而蟾酥镇痛的细胞分子学机制尚待研究。对蟾酥有效成分的分子药理学研究将大大加快其临床应用的步伐。

关键词: 蟾酥; 蟾毒灵; 分子药理学

中图分类号: R282.74

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)10-附 4-04

Advances in study on *Venenum Bufonis*

ZHAO Qiang, MENG Fan-jing, LIU An-xi

(Department of Biology, Institute of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Key words: *Venenum Bufonis*; bufalin; molecular pharmacology

蟾酥 *Venenum Bufonis* 源于《本草衍义》, 为名贵中药, 又名蟾蜍眉脂(《药性论》)、蟾蜍眉酥(《日华子本草》)、癞蛤蟆浆

(《新疆药材》)、蛤蟆酥(《山东中药》)、蛤蟆浆(《中药材手册》)、《中华人民共和国药典》(2000 年版)和《中药大辞典》(2003 年

收稿日期: 2003-11-15

作者简介: 赵 强(1965—), 女, 副教授, 博士生, 研究方向为动物生理、生化与中草药药理及开发, 现发表论文 10 余篇。

E-mail: 310zhaoqiang@sohu.com.cn

版)中均明确记载了蟾酥的基原动物为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 两种。其性味甘辛、温,有毒,具有解毒、消肿、醒神、开窍、强心和止痛等作用。其在临床上被广泛应用于治疗多种癌症、结核病、心脏病、恶性血液病、顽固性呃逆、周期性面神经麻痹、急性咽炎和慢性乙肝等感染病,还可以用于局部麻醉、表面麻醉及慢性牙髓炎的无痛切髓术等。因其药理活性较强,作用广泛,早已引起国内外的广泛关注。现将其主要的药理作用和近年来国内外研究进展作一概述。

1 化学成分

蟾酥主要化学成分有:①蟾蜍毒素类(bufotoxins),包括蟾毒、蟾毒配基脂肪酸酯和蟾毒配基硫酸酯等;②蟾毒配基类(bufogenins)是蟾蜍毒素在加工炮制过程中的分解产物,如脂蟾毒配基(resibufogenin, RBG)、华蟾毒精(cinobufagin, CB)和蟾毒灵(bufalin, BL)等;③蟾毒色胺类(bufotenines)是有一定生物活性的水溶性吲哚类生物碱;④其他化合物,如吗啡和肾上腺素等。

杨立宏等^[1]对中华大蟾蜍皮的水溶性部分进行了研究,发现了蟾毒灵 3-丁二酰精氨酸酯、华蟾毒精 3-丁二酰精氨酸酯、脂蟾毒配基 3-丁二酰精氨酸酯、蟾蜍嘌呤和光色素等,其中后两者是最新发现的成分。

内源性 Na^+ , K^+ -ATP 酶(钠泵)抑制因子是一种由肾上腺或下丘脑分泌并储存的生物活性物质,它在高血压病的发病机制中可能占有重要地位。曾有人从牛的下丘脑和人类血液中纯化出能明显抑制钠泵活性的哇巴因样物质(ouabain-like compound, OLC),从牛肾上腺中纯化出前海葱苷原 A 样物质(proscillaridin A-like compound, PLC),它们均属内源性钠泵抑制因子。李素琴等^[2]从 1 kg 蟾酥中纯化得到几微克的一种内源性钠泵抑制因子,该活性物质与哇巴因抗体的交叉能力高于前海葱苷原 A 抗体的交叉能力,且明显抑制人红细胞⁸⁶Rb 摄取的生物活性。这将为治疗高血压病提供了又一思路,鉴定该因子的分子结构和制备其相应抗体工作正在进行中。

蟾酥的有效成分多为脂溶性化合物,因此对其剂型制备有一定难度。叶敏等^[3]利用生物转化技术,即用长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 和桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. 两种植物的细胞悬液,首次成功地对华蟾毒精进行转化,即通过在 C-16 位上去乙酰基、差向异构和糖基化等作用,生成 4 种全新的衍生物,并已明确这些衍生物的结构。初步的抑瘤实验^[4]已证实这些生物转化衍生物可抑制多种肿瘤细胞生长。该工作为利用生物转化技术寻找低毒、高效的多种蟾酥有效成分类似物提供了新途径。

2 药理作用

2.1 对心血管系统及细胞毒作用

2.1.1 强心作用:蟾毒及其配基均有洋地黄样作用,即强心作用。解景田等^[5]灌流离体犬心脏,发现 RBG 能降低蒲肯野氏纤维的动作电位振幅和静息电位,减慢动作电位最大上升速率,缩短动作电位间期和有效不应期,并呈明显的浓度依

赖关系。这一结果与其他强心苷类药物对动作电位的作用相一致。还证实 RBG 可降低犬和羊的蒲肯野氏纤维的膜反应性能,减慢兴奋的传导^[6],即证实 RBG 具有抗心律失常类药物的某些电生理特性。RBG 可以诱发犬蒲肯野氏纤维和人心房肌纤维的延时性后去极化和振荡后电位,提示在一定的条件下, RBG 可能引起心脏异位节律,即可诱发心律失常。还有人用豚鼠和兔子作类似实验,也得到了相同的结果。小剂量蟾蜍灵($<0.5 \mu\text{mol/L}$)能加强离体豚鼠心房肌收缩力,大剂量($>0.7 \mu\text{mol/L}$)则易出现心律失常^[6]。

RBG 对心脏的作用是通过植物神经末梢来实现的,并可直接作用于心肌。其机制可能与 RBG、华蟾毒精、蟾毒灵等蟾毒内酯是 Na^+ , K^+ -ATP 酶的反竞争性抑制剂有关。其作用于酶的磷酸化中间物,从而使心肌细胞内 Na^+ 和 K^+ 的浓度相对增高,影响到心肌动作电位和静息电位。同时,钙离子则通过 Na^+ - Ca^{2+} 交换而进入心肌细胞,使心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加,结果使心肌收缩力加大。

2.1.2 改变人非胃型 H^+ , K^+ -ATP 酶活性: Modyanov 等证实^[7], BL 可抑制非胃型 H^+ , K^+ -ATP 酶活性,人非胃型 H^+ , K^+ -ATP 酶也能进行 Na^+ - K^+ 交换。由此推测,过量 BL 可能通过抑制该酶,即影响胞内、外某些离子浓度,如 Na^+ , K^+ 浓度,而间接造成细胞毒作用。

2.1.3 改变上皮细胞的 NO 含量: Roger 等^[8]应用化学荧光技术证实低浓度的蟾酥乙醇提取物($5\sim 10 \mu\text{g/mL}$)可使绒癌 BeWo 细胞株的 NO 含量升到对照组的 110%,而高浓度组($40\sim 80 \mu\text{g/mL}$,属中毒剂量)则可降低 NO 含量,蟾毒灵也有类似作用。NO 是一种独特的第 2 信使,通过调节胞内 cGMP 等而调控多种生理过程,如平滑肌收缩性信号传递等。故蟾酥也可能是通过双向调节细胞内 NO 含量而发挥各种生物作用,当调节不当时则出现细胞毒反应。

2.1.4 其他途径: Roger 等^[9]用特异的荧光标记物 Fluo3 和实时荧光分光光度技术证实,加入中等量(400 ng/mL)蟾酥的乙醇提取液可引起心肌细胞内钙离子浓度升高,即使在应用饱和浓度的哇巴因(ouabain)和尼莫地平(nifedipine)完全阻断 Na^+ , K^+ -ATP 酶及钙通道后仍出现上述现象,并使心肌细胞在加药数秒后停跳。由此可知,蟾酥的强心作用不仅仅是因其具有抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶的作用,它还可以通过某些其他途径改变胞浆内钙离子浓度,当胞浆内钙离子浓度过度升高时则表现出细胞毒性作用。

2.2 镇痛作用:蟾酥镇痛早已被广泛应用于临床。张薇等^[10]通过醋酸扭体法和热板法试验证实,6 种蟾酥脂溶性活性成分均有镇痛作用,其中 RBG (1.30 mg/kg), CB (1.3 mg/kg)镇痛效果最明显, BL (0.8 mg/kg)镇痛作用平稳,而南美蟾毒精镇痛作用较弱。早期的豚鼠角膜实验验证蟾毒灵的局麻作用较可卡因大 30~60 倍,且无局部刺激的作用。

在治疗牙痛方面,蟾酥封药 1 h 即可造成牙髓神经超微结构的改变,由此推测蟾酥快速无痛切牙髓的作用机制可能是其具有神经毒性作用,而牙髓神经快速麻醉功能是其神经毒性作用的早期表现。在癌性镇痛方面,已有多种以蟾酥或

其主要成分为主药的复方制剂用于临床。虽已从中医理论角度对其作出解释,如具有清热解毒、软坚散结、行气止痛的功效,进入癌肿部位的微循环,溶解和破坏肿瘤周围及使瘤内纤维蛋白凝结,缓冲肿瘤对患者痛感部位的化学性刺激和物理性压迫,使疼痛得以缓解,但蟾酥镇痛的分子药理学机制研究目前仍属空白,其是否与神经细胞和神经纤维上的钠、钾通道等多种通道有关,尚待进一步研究。

2.3 对生殖系统和下丘脑-垂体-睾丸轴功能的影响:蟾酥具有地高辛样生物活性的物质,且有因长期(2年)服用地高辛而致血浆雄激素减少的报道。BL或蟾酥的无BL的甲醇提取液,均可直接抑制睾酮分泌,这可能与降低睾丸内cAMP有关;同时通过在体内外实验证实,BL可降低因人绒毛膜促性腺激素(hCG)引起的睾丸分泌睾酮量和垂体对促性腺激素释放激素(GnRH)引起的促黄体(生成)激素(LH)分泌,即对下丘脑-垂体-性腺轴的下行调控各环节均起抑制作用^[11]。

2.4 其他

另外,蟾酥还有镇咳、利尿、兴奋肠道平滑肌、收缩子宫及输精管、抗病原微生物、致幻、抑制血小板凝聚、促进糖原产生和抑制乳酸生成的胰岛素样作用等多种药理作用。

3 蟾酥治疗肿瘤的分子药理学机制

对该领域的研究已成为近年来国内外研究该药物药理作用的热点之一,且以BL的抗癌作用为研究焦点。国内外众多学者对在临床上已有确切抗癌效果的BL抗癌分子生物学机制从不同角度、不同方面进行了多层次研究,证实它可以抑制肿瘤血管内皮和血管增生,同时诱导肿瘤细胞的分化和凋亡。

3.1 抑制血管增生和内皮细胞增生:Lee等^[12]证明,BL(5nmol/L)可抑制牛主动脉内皮增生和毛细血管管状网络的形成,且呈一定浓度依赖性。BL可能是特异性阻止牛主动脉内皮细胞进入G₀/G₁期,即使细胞停止在细胞周期的G₂/M期,进而抑制肿瘤组织中的血管内皮增生和血管增生,达到抗肿瘤的作用。

3.2 多种途径促进肿瘤细胞发生分化和凋亡

3.2.1 通过MAPK、Ras、Raf-1、MAPKK信号传导通路促进肿瘤细胞发生凋亡:Masuda等^[13]通过对人白血病耐药细胞株HL-60的研究,发现用1μmol/L BL预处理HL-60细胞15min,可迅速触发诱导细胞凋亡的信号。研究发现此作用不受蛋白质合成抑制剂放线菌酮的抑制,而核酸内切酶的抑制剂ZnCl₂可抑制BL诱导的细胞凋亡,因而推测此作用与基因的表达有关。Watabe等^[14]通过对人白血病细胞系U937的进一步研究发现,BL对细胞凋亡的诱导作用是通过促进细胞丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)的异常活化来实现的,活化的MAPK将诱导癌基因Ras和Raf-1表达,而这些基因表达的结果是产生MAPK激酶-1(MAPKK-1),MAPKK-1对MAPK再进一步活化,即信号传递依次从Ras→Raf-1→MAPKK-1→MAPK。通过这一过程,MAPK会被持续地激活。研究表明,在U937细胞中,BL诱导的MAPK持

续激活会导致细胞的凋亡。在这一实验中,细胞凋亡结果可用DNA琼脂糖凝胶电泳出现凋亡细胞特有的DNA特征性梯带,或用原位缺口标记(TUNEL)法定量检测细胞凋亡率加以证实。

此外,Watabe等^[15]发现,原癌基因bc1-2的表达有抑制细胞凋亡的作用,它在U937细胞中的过量表达会对抗BL诱导的MAPK活性增加,但不影响MAPKK-1活性。因此bc1-2是BL的诱导肿瘤凋亡的主要环节之一,而对Na⁺,K⁺-ATP酶的抑制引起细胞内高钠,又是作用于bc1-2蛋白上游的又一主要抑癌机制。

3.2.2 通过蛋白激酶C(protein kinase C,PKC)途径调节细胞分化和凋亡:PKC有多种同工酶,如cPKC,nPKC等。Kurosawa等发现^[16],用R₀-31-8220(PKC的特异性抑制剂)和G₀-6976(cPKC的抑制剂)会使BL诱导人单核细胞白血病细胞株THP-1的IL-1β基因的表达式明显减弱,该基因产物是该类细胞成熟的标志。而cPKCβ和nPKCδ缺乏的THP-1/TPA细胞对BL诱导产生的标志细胞凋亡的DNA梯状带不表现。Rottlerin,一种nPKCδ特异性抑制剂,也部分地减弱BL引起的细胞凋亡前期特征。以上结果表明,BL可能通过PKC途径引起细胞分化和凋亡。

3.2.3 通过改变癌基因或抑癌基因的表达来抑制细胞分化:早期实验已证实,BL是一种高效的细胞分化诱导剂,对白血病K562细胞株、人单核细胞白血病THP-1细胞和HL-60细胞株都有诱导其分化的作用。这一作用是通过改变某些凋亡相关基因(如bc1-2,c-myc)的表达来实现的。BL可以特异性抑制某些酶(如拓扑异构酶Ⅱ),增加白细胞介素1(IL-1)的表达,并下调原癌基因c-myc和c-myc的表达,使细胞内的转录调节蛋白水平下降,同时诱导编码转录因子的原癌基因c-fos和Egr-1转录,最终导致细胞分化的产生。徐瑞成等^[17]通过用四唑盐(MTT)比色法观察BL对HL-60细胞的抑制作用,他们对细胞周期进行分析证实BL主要作用于HL-60的S期细胞,该结果支持BL是拓扑异构酶Ⅱ(TopoⅡ)抑制剂的结论。

Liu等^[18]的研究证实了BL诱导K562细胞分化和凋亡的另一种实现途径是通过下调WT1(Wilms tumor 1)基因来表达完成。实验应用了台盼兰染色技术检测细胞存活率,用Western Blot分析细胞WT1蛋白的含量,用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术测定细胞中WT1基因mRNA的含量,从而判定细胞中WT1基因的表达水平。实验结果显示:当BL在0.01~0.026μmol/L时,只有细胞分化现象;在0.026~0.05μmol/L时,分化与凋亡现象并存。在BL诱导的分化和凋亡过程中,WT1蛋白和mRNA的水平都会降低,即BL可以通过使WT1基因表达下调来促进K562细胞分化与凋亡。

p21^{WAF1}是细胞周期素依赖性蛋白激酶(CDK)的抑制因子。徐瑞成等发现^[19],BL可通过诱导其表达抑制CDK和增值细胞核相关抗原PCNA的活性,PCNA为DNA复制所必需。p21^{WAF1}与PCNA的结合可直接抑制DNA复制,使细胞

停滞于G₁晚期,从而抑制细胞的增殖,促进细胞的分化。

Tiaml 基因是通过 BL 处理过的细胞的 DNA 进行分化显示技术(differential display)得到的。Kawazoe 等^[20]克隆了这一基因,然后进行细胞转染。用 BL 处理过的野生型细胞作对比,发现在被 BL 处理过的正义链转染细胞中,Rac1 蛋白和 p21 激活蛋白激酶(p21-activated kinase,PAK)的活性会显著升高。这些实验证实,在 BL 处理过的细胞中 Tiaml 基因表达,使 Rac1 基因表达,PAK 活化,最后激活 c-Jun 基因 N-末端激酶(c-Jun NH₂-terminal kinase,JNK),也即通过 Rac1→PAK→JNK 途径来促进细胞的凋亡。

综上所述,蟾酥抗肿瘤的分子药理学机制是极其复杂的,它涉及到对多种信号传导系统及多种基因表达的调控。究其何种机制是占主导地位,它们彼此间又有怎样的相互关系,这些均有待进一步研究。

4 安全评价

Chan 等^[21]研究发现,鼠胚处于器官形成期的孕鼠在 ip 蟾酥后,当剂量高于 50 mg/kg 时,出现孕鼠肝脏、肾脏的结构异常和体重下降,并增加胚死率。上述研究结果提示,孕妇或需长期服用蟾酥的用药者,应注意用药期间的不良反应。

蟾酥提取物在美国亚裔人口中被用为麻醉剂和心血管系统用药。Barry 等^[22]报道因服用含有蟾酥成分的壮阳药“爱石”后表现出地高辛样中毒的病例,中毒者因心衰而死亡。纽约市毒品控制中心也曾报道有 4 位患者因服用了含有蟾蜍二烯酸内酯(bufadienolides)类药物导致心律紊乱而死亡。Brubacher^[23]报道使用洋地黄皂苷抗体的 Fab 片段(Digibind)治疗蟾酥中毒。蟾酥有效成分也可出现地高辛样免疫反应,这有碍于对已口服地高辛的患者血中地高辛含量的随时监测。目前,美国已研制出数种随时监测血中地高辛含量的检测方法^[24],其中,较新的免疫检测方法是化学荧光免疫检测技术(chemiluminescence method immunoassay, CLIA),即 Tina-quant 法(Roche diagnostics)和 Backman 方法(Synchron LX 系统)。它们与偏振光免疫荧光检测技术(fluorescence polarization immunoassay,FPIA)相比,出现因患者并用蟾酥等药物引起的地高辛样免疫反应假阳性的机率较低。

5 结语

目前有关蟾酥药理作用的研究热点主要集中于其抗肿瘤、镇痛和强心作用的分子药理学机制方面。预计,随着分子生物学和膜片钳等生物技术的进一步发展,有关该类药物的作用机制必将被进一步阐明。

References:

- [1] Yang L H, Jin X Q, 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 (4): 292-295.
- [2] Li S Q, Wilhelm S, Fu Y F. Purification of an endogenous inhibitor of the sodium pump from the toad venom chan'su [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2002, 18(2): 250-253.
- [3] Ye M, Dai J G, Gou H Z, et al. Glucosylation of cinobufagin by cultured suspension cells of *Catharanthus roseus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43: 8535-8538.
- [4] Ye M, Ning L L, Zhan J X, et al. Biotransformation of cinobufagin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* and *Platycodon grandiflorum* [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 22: 89-95.
- [5] Xie J T, Wang H, Attale A S, et al. Cardiac toxicity of resibufogenin; electrophysiological evidence [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(4): 289-297.
- [6] Xie J T, Wang H, Attale A S, et al. Effects of resibufogenin from toad venom on isolated Purkinje fibers [J]. *Am J Chin Med*, 2000, 28(2): 187-196.
- [7] Modyanov N, Pestov N, Adams G, et al. Nongastric H, K-ATPase; structure and functional properties [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 986: 183-187.
- [8] Baidul Alam Bhuiyan M, Michael E F, Amitava D. Study on mechanism of action of Chinese medicine Chan Su: dose-dependent biphasic production of nitric oxide in trophoblastic BeWo cells [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 330: 179-184.
- [9] Bick R J, Poindexter B J, Sweney R R, et al. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes; Cardiotoxicity due to more than Na⁺, K⁺-ATPase blocking [J]. *Life Sci*, 2002, 72: 699-709.
- [10] Zhang W, Liu Y L, Xu C Y, et al. Research on the active analgesic component of *Venenum Bufonis* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1998, 4(15): 268-271.
- [11] Wang S W, Chiao Y C, Tsai S C, et al. Inhibition of bufalin on pituitary and testicular function in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 283(2): 528-532.
- [12] Lee D Y, Yasuda M, Yamamoto T, et al. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis *in vitro* [J]. *Life Sci*, 1997, 60(2): 127-134.
- [13] Masuda Y, Kawazoe N, Nakajo S, et al. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 1995, 19(8): 549-556.
- [14] Watabe M, Masuda Y, Nakajo S, et al. The cooperative interaction of two different signaling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukemia U937 cells [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(24): 14067-14072.
- [15] Watabe M, Kawazoe N, Masuda Y, et al. Bcl-2 protein inhibits bufalin-induced apoptosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation in human leukemia U937 cells [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(15): 3097-3100.
- [16] Kurosawa M, Tani Y, Nishimura S, et al. Distinct PKC isozymes regulate bufalin-induced differentiation and apoptosis in human monocytic cells [J]. *Am J Physiol*, 2001, 280 (3): C459-C464.
- [17] Xu R C, Chen X Y, Chen L, et al. The mechanisms of inhibitory effect of bufalin of human leukemia cells [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 2000, 21(7): 359-361.
- [18] Liu Y, Qu X, Wang P. WT1 downregulation during K562 cell differentiation and apoptosis induced by bufalin [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 2002, 23(7): 356-359.
- [19] Xu R C, Chen X Y, Chen L, et al. HL-60 cell differentiation induced by bufalin and its relative gene expression [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(2): 151-153.
- [20] Kawazoe N, Watabe M, Masuda Y, et al. Tiaml is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells [J]. *Oncogene*, 1999, 18(15): 2413-2421.
- [21] Chan W Y, Ng T B, Yeung H W. Examination for toxicity of a Chinese drug, the load glandular secretory product Chan Su, in pregnant mice and embryos [J]. *Bilo Neonate*, 1995, 67(5): 376-380.
- [22] Yeh J Y, Huang W J, Kan S F, et al. Effect of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2003, 54 (2): 112-124.
- [23] Brubacher J R, Ravikumar P R, Bania T, et al. Treatment of toad venom poisoning with digoxin-specific Fab fragments [J]. *Chest*, 1996, 110(5): 1139-1141.
- [24] Chow L, Johnson M, Wells A, et al. Effect of the traditional Chinese medicines Chan Su, Liu-Shen-Wan, Dan Shen, and Asian ginseng on serum digoxin measurement by Tina-quant (Roche) and Synchron LX system (Beckman) digoxin immunoassays [J]. *J Clin Lab Anal*, 2003, 17(1): 22-27.