

• 药理与临床 •

阿诺宁各组分的抗肿瘤活性和急性毒性比较研究

谢冰芬¹, 吴萍², 刘宗潮¹, 冯公侃¹, 朱孝峰¹, 林立东², 魏孝义²

(1. 中山大学肿瘤防治中心华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060;

2. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

摘要:目的 阿诺宁(Anuoning)是具有高抗癌活性的番荔枝内酯有效部位药物。对阿诺宁(A)及其主要成分(B)、非主要成分(C)3个组分进行抗肿瘤活性和急性毒性对比试验。方法 用MTT法测定阿诺宁各组分对各种人癌细胞、正常细胞和耐药性(MDR)细胞的细胞毒作用,用小鼠肿瘤S₁₈₀模型进行体内抗肿瘤试验。应用Bliss方法计算小鼠的半数致死量(LD₅₀)。结果 A、B、C在 $1 \times 10^{-4} \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 质量浓度时,对人癌细胞CNE₂的IC₅₀分别为 3.1×10^{-4} 、 4.3×10^{-3} 、 $0.19 \mu\text{g/mL}$;对Bel-7402细胞的IC₅₀分别为0.078、0.043、 $0.39 \mu\text{g/mL}$;对KB细胞的IC₅₀依次为0.46、0.24和 $1.26 \mu\text{g/mL}$;对MCF-7细胞的IC₅₀分别为1.72、2.97、 $>10 \mu\text{g/mL}$;在上述质量浓度下对人体正常脐血管内皮细胞(ECV304)的IC₅₀分别为0.39、0.27、 $0.99 \mu\text{g/mL}$ 。在 $10 \mu\text{g/mL}$ 质量浓度时,A、B、C组分对人体正常肝细胞(CLC)的平均生长抑制率均小于20%。A、B、C组分对多药耐药(MDR)细胞MCF-7/Adr的IC₅₀分别为0.32、3.15、 $>10 \mu\text{g/mL}$,对KBV₂₀₀细胞的IC₅₀分别为0.027、0.72、 $0.83 \mu\text{g/mL}$ 。在体内试验中,A在 $30 \mu\text{g/kg}$,对小鼠肿瘤S₁₈₀的3批实验的平均抑瘤率为 $(52.8 \pm 9.5)\%$ ($P < 0.05 \sim 0.001$);B在15、30和 $60 \mu\text{g/kg}$ 剂量时的平均抑瘤率依次为 $(40.1 \pm 5.7)\%$ 、 $(50.7 \pm 10.3)\%$ 、 $(61.9 \pm 3.7)\%$ ($P < 0.05 \sim 0.001$);C在45、90和 $180 \mu\text{g/kg}$ 剂量下的平均抑瘤率分别为 $(32.7 \pm 3.4)\%$ 、 $(33.5 \pm 0.6)\%$ 、 $(30.6 \pm 7.3)\%$ ($P < 0.05 \sim 0.01$)。对小鼠ip一次A、B、C的LD₅₀及其95%可信限分别为 1.38 mg/kg 和 $0.97 \sim 1.95 \text{ mg/kg}$, 0.39 mg/kg 和 $0.36 \sim 0.43 \text{ mg/kg}$, 2.39 mg/kg 和 $2.12 \sim 2.69 \text{ mg/kg}$ 。结论 A、B、C组分在体内外试验均显示不同程度的抗癌活性,其中A的抗肿瘤活性强,毒性较小。MDR细胞对A、B、C组分均不产生抗药性。

关键词:阿诺宁;人癌细胞;小鼠移植瘤;急性毒性

中图分类号:R965, R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)08-1199-04

Comparative experiments on antitumor activities and acute toxicity of Anuoning and its fractions

XIE Bing-fen¹, WU Ping², LIU Zong-chao¹, FENG Gong-kan¹ZHU Xiao-feng¹, LIN Li-dong², WEI Xiao-yi²

(1. State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: **Objective** To compare the antitumor activities and acute toxicity exhibited by Anuoning (A) which is a multi-component drug with potent anti-tumor activity, as well as its two different parts (B) and (C). **Methods** The cytotoxicities of Anuoning and its two fractions in various human cancers, normal cell, and multidrug resistance (MDR) cell lines were assayed by MTT method. The models of mice sarcoma S₁₈₀ were used for *in vivo* antitumor test. Bliss method was used to calculate the lethal dose of 50% (LD₅₀) in mice. **Results** At the concentrations of $(1 \times 10^{-4} \sim 10.0) \mu\text{g/mL}$, the IC₅₀ of A, B, and C for human cancer cells (CNE₂) were 3.1×10^{-4} , 4.3×10^{-3} , and $0.19 \mu\text{g/mL}$, respectively; The IC₅₀ for Bel-7402 cells were 0.078, 0.043, and $0.39 \mu\text{g/mL}$, respectively; The IC₅₀ for KB cells were 0.46, 0.24, and $1.26 \mu\text{g/mL}$; The IC₅₀ for MCF-7 cells were 1.72, 2.97, and $>10 \mu\text{g/mL}$, respectively. At the concentrations of $(1 \times 10^{-4} \sim 10.0) \mu\text{g/mL}$, the IC₅₀ of A, B, and C for human normal endothelial cells in navel blood vessel (ECV304) were 0.39, 0.27, and $0.99 \mu\text{g/mL}$, respectively. At the concentration of $10.0 \mu\text{g/mL}$, the average growth inhibitory rates of A, B, and C for human normal liver cells (Chang Liver cell, CLC) were $<20\%$. The IC₅₀ of A, B, and C for multi-drug resistant (MDR) cell lines MCF-7/Adr were 0.32, 3.15, and $>10 \mu\text{g/mL}$ and KBV₂₀₀ cells were 0.027, 0.72, and $0.83 \mu\text{g/mL}$,

收稿日期:2007-01-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572253)

作者简介:谢冰芬(1940—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向为肿瘤药理与抗癌药物研究。

Tel: (020) 87343150 E-mail: fenggk@126.com

respectively. Under the doses of 30 $\mu\text{g/kg}$, *in vivo*, the average tumor inhibitory rate of A to mice tumor S_{180} was $(52.8 \pm 9.5)\%$ ($P < 0.05 - 0.001$); Under the doses of 15, 30, and 60 $\mu\text{g/kg}$, the average tumor inhibitory rates of B were $(40.1 \pm 5.7)\%$, $(50.7 \pm 10.3)\%$, and $(61.9 \pm 3.7)\%$ ($P < 0.05 - 0.001$), respectively; Under the doses of 45, 90, and 180 $\mu\text{g/kg}$, the average tumor inhibitory rates of C were $(32.7 \pm 3.4)\%$, $(33.5 \pm 0.6)\%$, and $(30.6 \pm 7.3)\%$ ($P < 0.05 - 0.01$), respectively. In single ip to mice, the LD_{50} and 95% confidence limit of A, B, and C were 1.38 mg/kg and 0.97—1.95 mg/kg, 0.39 mg/kg and 0.36—0.43 mg/kg, and 2.39 mg/kg and 2.12—2.69 mg/kg, respectively. **Conclusion** Anuoning and its two fractions have obvious antitumor activities *in vitro* and *in vivo*. The antitumor activity of A is the highest while the toxicity to mice is lower among them. MDR cell lines have no cross-resistance to A, B, and C.

Key words: Anuoning; human cancer cells; transplant tumor of mice; acute toxicity

阿诺宁 (Anuoning) 是中国科学院华南植物园从国产番荔枝科植物番荔枝 *Annona squamosa* L. 种子中发现的具有高抗癌活性的番荔枝内酯有效部位药物, 其由质量分数大于 90% 的 5~6 个番荔枝内酯化合物和质量分数小于 10% 的未知成分组成。其中单体化合物 squamocin 质量分数约占 50%~60%, bullatacin 质量分数约占 9.0%~15%。阿诺宁具有强的广谱的抗肿瘤作用, 且用量小^[1~3]。阿诺宁中的单体成分 squamocin 可诱导人白血病细胞 HL-60 细胞凋亡^[4]。由于阿诺宁中有效单体成分较多, 为了更好地了解各部分的作用, 本课题组将阿诺宁 (简称为 A) 分为两个部分, 即其主要成分组分 (由 squamocin 和 bullatacin 以质量比约 5:1 比例组成, 简称为 B) 和非主要成分组分 (除去 squamocin 和 bullatacin 后的剩余部分, 简称为 C)。本研究拟对 A、B、C 进行抗肿瘤活性和毒性 (LD_{50}) 的比较实验, 进一步了解阿诺宁发挥药效和产生毒性的成分所在, 为今后开发番荔枝内酯类的抗肿瘤新药的组方提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 受试样品和试剂: 番荔枝种子粉用 95% 乙醇提取 3 次, 乙醇提取物混悬于水中, 用石油醚萃取脱脂后用氯仿萃取, 氯仿萃取物用硅胶柱色谱分离、以氯仿-甲醇 (98:2~96:4) 梯度洗脱进行分离, 收集、合并含 squamocin 和 bullatacin 的流份, 浓缩后获阿诺宁粗品。将粗品上硅胶柱, 以石油醚-丙酮 (5:1~3:1) 梯度洗脱, 收集、合并含 squamocin 和 bullatacin 的流份, 浓缩、干燥后获 A。将 A 用 HPLC [色谱柱: ODS (300mm $\times$ 22 mm, 10 μm) 流动相: 甲醇-水 (85:15); 检测波长 210 nm] 反复分离, 分别收集 squamocin 和 bullatacin 流份, 合并二个流份, 浓缩、干燥获 B (squamocin 和 bullatacin 的质量比约为 5:1); 将其余流份合并、浓缩、干燥

获 C。A、B、C 不溶于水, 溶于有机溶剂二甲基亚砜 (DMSO), 临用前用注射用水稀释。注射用环磷酰胺 (CTX), 江苏恒瑞医药股份有限公司产品, 批号 04031121。DMSO, 分析纯, 天津福晨化学试剂厂产品。MTT 粉、RPMI-1640 培养基均为 Sigma 公司产品。新生牛血清为 Gibco 公司产品。550 型酶标仪是 Bio-Rad 产品。

1.2 细胞株: 人鼻咽癌细胞 (CNE₂)、人肝癌细胞 (Bel-7402)、人口腔癌细胞 (KB) 和人乳腺癌细胞 (MCF-7); 多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 细胞: 对阿霉素耐药 110.6 倍的人乳腺癌细胞 (MCF-7/Adr)、对长春新碱 (VCR) 耐药 100 倍的人口腔癌细胞 (KBV₂₀₀)、人体正常脐血管内皮细胞 (ECV 304); 人体正常肝细胞 (Chang Liver cell, CLC); 均由中山大学肿瘤防治中心肿瘤研究所提供。

1.3 实验动物及瘤株: 昆明小鼠 (清洁级), 雌雄兼有, 体重 (21 ± 2) g, 购于广东省医学实验动物中心, 合格证号: 粤监证字 2004A019。小鼠移植肿瘤 S_{180} 瘤株, 由中山大学肿瘤防治中心肿瘤研究所提供。

1.4 细胞生长抑制试验: 按噻唑蓝还原法 (MTT)^[5] 进行。用含 10% 新生牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 1×10^5 U/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液, 调整上述各细胞至 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液, 每孔 195 μL , 分装于 96 孔板上, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养, 待细胞贴壁后分别加入受试样品, 设无药 (H_2O) 对照、DMSO 溶剂对照以及 5~6 个不同质量浓度的 A、B、C 样品, 各设 4 个平行孔, 培养 72 h, 结束前 4 h 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 10 μL , 实验结束时, 倾去培养液, 加入 100 μL DMSO, 待结晶溶解后置酶标仪 570 nm 波长测定各孔的吸光度 (A) 值, 计算生长抑制率 [生长抑制率 = $(1 - \text{实验}$

组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%],实验重复 2~3 次,取平均抑制率以 SPSS 10.0 软件统计半数抑制浓度 (IC₅₀),进行比较。

1.5 体内抗肿瘤实验:在无菌条件下,取小鼠移植肿瘤 S₁₈₀腹水细胞 (1×10⁷/mL),于昆明小鼠腋窝皮下接种 0.2 mL/只,次日随机分为无药对照组、10% DMSO 溶剂对照组、CTX 阳性药对照组以及 A (30 μg/kg) 组、B (15、30、60 μg/kg) 和 C (45、90、180 μg/kg) 各不同剂量组,每组 10 只小鼠,接种 24 h 后开始给药,每天 ip 1 次,连用 10 d,停药次日处死小鼠,称体重和瘤质量,计算抑瘤率[抑瘤率=(1-实验组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%],并用 Microsoft Office Excel 2003 作 *t* 检验统计 *P* 值,实验重复 2 次。

1.6 小鼠急性毒性 (LD₅₀) 实验:各批实验选用清洁级昆明小鼠 70 只,体重 (18±2) g,雌雄兼有,设 H₂O 对照组、10% DMSO 溶剂对照组以及各样品的 5 个不同剂量组 (组间距 *r* 为 0.7),ip 给药 1 次,观察 14 d,记录各组小鼠的死亡数、死亡时间和毒性表现。按 Bliss 方法计算动物的半数致死剂量 (LD₅₀) 及其 95% 的可信限。

2 结果

2.1 体外细胞毒作用:A、B、C 在 1×10⁻⁴~10 μg/mL 质量浓度下对 CNE₂、Bel-7402、KB 和 MCF-7 4 种人癌细胞的 IC₅₀ 在 3.1×10⁻⁴~2.97 μg/mL,除 C 对 MCF-7 细胞的 IC₅₀>10.0 μg/mL 外,均显示强的细胞毒作用,其中对 CNE₂ 细胞的作用最强,IC₅₀<0.2 μg/mL。阿诺宁的 3 个组分在上述质量浓度下,对人体正常脐血管内皮细胞 ECV304 的 IC₅₀ 均<1.0 μg/mL。在 10 μg/mL 时,上述 3 个组分对 CLC 生长的平均抑制率分别为 (15.8±4.5)%、(14.5±1.6)% 和 (14.7±7.2)%,均无明显的抑制生长作用,见表 1。A 和 B 组分对 MDR 细胞株 (MCF-7/Adr、KBV₂₀₀) 及其敏感细胞株 (MCF-7、KB) 的细胞毒作用相似,以它们的 IC₅₀ 比较,差异均无显著性,A 组分对耐药的 MCF-7/Adr 细胞和 KBV₂₀₀ 细胞的细胞毒作用明显强于对敏感株 MCF-7 细胞和 KB 细胞的作用 (*P*<0.05),见表 2。

2.2 阿诺宁各组分对小鼠肿瘤 S₁₈₀ 的作用:30 μg/kg 的 A 组分对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤 3 批实验的平均抑瘤率为 (52.8±9.5)%;B 组分对小鼠 S₁₈₀ 的 2 批抑瘤实验中,剂量为 15、30、60 μg/kg 的平均抑瘤率依次为 (40.1±5.6)%、(50.7±10.3)%、(61.9±3.7)%;C 组分对小鼠 S₁₈₀ 的 2 批抑瘤实验中,剂量

在 45、90、180 μg/kg 时,平均抑瘤率依次为 (32.7±3.4)%、(33.5±0.6)%、(30.6±7.3)%,其抑瘤作用没有剂量依赖性。阳性对照药 CTX (50 mg/kg) 的平均抑瘤率为 65.9%,*P*<0.001,见表 3。

表 1 阿诺宁各组分 (A、B、C) 对人癌细胞和正常细胞的细胞毒作用

Table 1 Cytotoxicities of Anuoning A, B, and C on human cancer and normal cells

组分	人癌细胞 IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)				人正常细胞 IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	
	CNE ₂	KB	MCF-7	Bel-7402	ECV 304	CLC
A	3.1×10 ⁻⁴	0.46	1.72	0.078	0.39	>10
B	4.3×10 ⁻³	0.24	2.97	0.043	0.27	>10
C	0.19	1.26	>10	0.390	0.99	>10

表 2 阿诺宁各组分 A、B、C 对 MDR 细胞和敏感细胞的 IC₅₀

Table 2 IC₅₀ of Anuoning A, B, and C on MDR and sensitive cell lines

组分	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)			
	MCF-7	MCF-7/Adr	KB	KBV ₂₀₀
A	1.72±0.21	0.32±0.23**	0.59±0.34	0.027±0.023*
B	2.97±0.34	3.15±2.74**	0.24±0.22	0.720±0.670
C	>10	>10	1.26±0.34	0.830±0.630

与 MCF-7 比较: ***P*<0.01; 与 KB 比较: **P*<0.05

***P*<0.01 vs MCF-7; **P*<0.05 vs KB

表 3 阿诺宁各组分 A、B、C 对小鼠肿瘤 S₁₈₀ 的抗癌作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Antitumor effects of Anuoning A, B, and C on sarcoma S₁₈₀ in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (μg·kg ⁻¹)	动物数/只 前/后	体重变化/ g	瘤质量 /g	平均抑瘤率/ %
无药对照	—	10/10	+13.0	2.30±0.78	—
10% DMSO	—	10/10	+12.4	2.23±0.59	2.0±10.1
CTX	5.0×10 ⁴	10/10	+9.8	0.78±0.28	65.9±3.4***
A	30	10/10	+11.6	1.03±0.32	52.8±9.5***
	15	10/10	+11.5	1.43±0.43	40.1±5.7***
	30	10/10	+9.5	1.18±0.40	50.7±10.3***
B	60	10/10	+9.4	0.91±0.22	61.9±3.7***
	45	10/10	+12.1	1.60±0.56	32.7±3.4***
	90	10/10	+13.4	1.58±0.55	33.5±0.6***
C	180	10/10	+11.6	1.64±0.67	30.6±7.3***

与 10% DMSO 组比较: ***P*<0.01 ****P*<0.001

P*<0.01 *P*<0.001 vs 10% DMSO group

2.3 对小鼠的急性毒性 (LD₅₀) 实验:A 单次 ip 的 LD₅₀ 及其 95% 可信限为 1.38 mg/kg 和 0.97~1.95 mg/kg,B 组分的 LD₅₀ 及其 95% 可信限分别为 0.39 mg/kg 和 0.36~0.43 mg/kg,C 组分的 LD₅₀ 及其 95% 可信限分别为 2.39 mg/kg 和 2.12~2.64 mg/kg。它们的毒性是 B>A>C。阿诺宁各组的小鼠在给药后均表现为安静,少动,经 0.5~1 h 后反应迟钝,逐渐行走不稳,趴下,轻度发绀,继之呼吸困难,1~1.5 h 后开始死亡,绝大多数

小鼠均在 24 h 内死亡。尸解小鼠各脏器,肉眼未见明显的改变,观察 14 d,两个对照组小鼠体重增加,未见毒性表现和死亡。

3 讨论

阿诺宁的主要成分是番荔枝内酯化合物,具有很强的抗癌活性^[2,3]。番荔枝内酯的抗肿瘤作用机制与临床上现用的抗肿瘤药物不同,它的靶点是线粒体。主要是通过阻断细胞线粒体把葡萄糖的能量转为 ATP 的过程。它是一种细胞呼吸抑制剂,它阻断了癌细胞赖以生存、增殖的能量,使癌细胞“饿死”^[6]。其抗肿瘤作用机制独特。番荔枝内酯类化合物是目前研究发展最快的一类新的天然物质之一。

本研究结果表明,A、B、C 对 4 种人癌细胞均有明显的细胞毒作用(除 C 对 MCF-7 细胞没有明显的作用外)。其中 A 和 B 两个组分的细胞毒作用均很强,IC₅₀ 均小于 0.5 $\mu\text{g/mL}$,而 C 组分稍差。不同的细胞株对阿诺宁各部分的敏感性亦不一样,其敏感次序为 CNE₂>BEL-7402>KB>MCF-7。阿诺宁的 A、B、C 组分对人体正常脐血管内皮细胞(ECV304)均有不同程度的细胞毒作用,其作用相似于对人癌细胞(KB 和 MCF-7)的作用,表明阿诺宁对人体正常 ECV304 细胞和人癌细胞的细胞毒作用没有明显差异。但阿诺宁的 A、B、C 组分对人体正常肝细胞(CLC)均无明显的增殖抑制作用,若与人肝癌细胞 Bel-7402 相比较,对 Bel-7402 细胞的毒性较对 CLC 细胞的毒性要大 25.6~232.5 倍以上,若与最不敏感的 MCF-7 细胞比较,对 MCF-7 细胞的毒性较对 CLC 细胞的毒性要大 3.4~5.8 倍,表明阿诺宁各部分在杀伤癌细胞的同时对人体正常肝细胞损伤较少。提示阿诺宁各部分对人癌细胞有一定的选择性杀作作用。其原因可能是因为人癌细胞本身没有 ATP 库,ATP 的供给靠外源输入,加上癌细胞增殖速度快,ATP 耗量也较大,故使癌细胞的增殖严重受阻。而正常细胞有 ATP 库,生长缓慢,ATP 耗量较少,故对正常细胞的增殖抑制影响较少^[1]。此外推测正常肝细胞的线粒体特别丰富,也可能影响阿诺宁的抑制线粒体对能量传递的能力。故可能是阿诺宁的 A、B、C 组分均对人肝细胞无明显的杀伤作用的原因。多药耐药性(MDR)细胞(MCF-7/Adr 和 KBV₂₀₀)对阿诺宁的 A、B、C 组分均不产生抗药性,此结果是与 Raynaud^[7]报道的结果相一致的。本研究中的两种 MDR 细胞均是具有典型的 P-糖蛋白(P-gP)表达;肿瘤细胞中 mdrl 基因过度表达产生的 P-gP 是

MDR 产生的最重要和最常见的原因。番荔枝内酯化合物对 MDR 细胞的作用可能是其抑制了线粒体 MADH 氧化还原酶,抑制了线粒体呼吸链的传递,使细胞产生的能量迅速减少,而 P-gP 实际上是依赖于能量的药物排出泵使细胞内能量产生障碍,从而影响了 P-gP 的功能,最终导致 P-gP 功能丧失,故此克服肿瘤细胞的 MDR^[8]。MDR 细胞对阿诺宁的 A、B、C 组分均不产生抗药性的作用机制尚未清楚,有待进一步研究。

体内抗肿瘤实验结果表明,A 和 B 组分对小鼠肿瘤 S₁₈₀有显著的剂量依赖的抑瘤作用,A 的作用与先前报道^[2,3]是一致的。而 C 组分用高于 A 和 B 的 1.5~6 倍剂量,但其抑瘤率仅在 33% 左右,且没有剂量依赖性。表明 C 组分抗肿瘤作用明显比 A 和 B 弱。对小鼠的 LD₅₀实验已证明,它们的毒性大小次序为 B>A>C,表明 B 组分的毒性最强,是后两者的 3.5 和 6.1 倍。

综上所述,A 在体内外具有显著的抗肿瘤活性,与 B 组分相似,但其毒性比 B 组分要小(B 毒性为 A 毒性 3.5 倍)。同时两种耐药细胞株对 A 均不产生抗药性,故认为 A 是一个较理想的抗癌高效部位药物,无需作进一步成分的分离,值得进一步研究,很有希望开发为天然植物来源的抗肿瘤新药。

References:

- [1] Ahammadsahib K I, Holling W R M, McGorren J P, *et al.* Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin [J]. *Life Sci*, 1993, 53(14): 1113-1120.
- [2] Xie B F, Feng G K, Liu Z C, *et al.* Antitumor effect of Anuoning [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2002, 21(4): 379-382.
- [3] Xie B F, Feng G K, Liu Z C, *et al.* Studies on antitumor effects and acute toxicity of Anuoning emulsion [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, 38(8): 590-595.
- [4] Zhu X F, Liu Z C, Xie B F, *et al.* Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell lines HL-60 [J]. *Life Sci*, 2002(70): 1259-1269.
- [5] Hussain G F, Nouri A M, Oliver R T, *et al.* A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 160(1): 89-96.
- [6] Miyoshi H, Ohshima M, Shimada H, *et al.* Essential structural factors of *Annonaceous acetogeins* as potent inhibitors of mitochondrial complex [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1356(3): 443-452.
- [7] Raynaud S, Nemati F, Miccoli L, *et al.* Antitumoral effects of suamocin on parental and multidrug resistant MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cell lines [J]. *Life Sci*, 1999, 65(5): 525-533.
- [8] Li Y F, Fu L W. Antitumoral effects of acetogenins [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(3): 245-247.