

胶囊及两药合用均可改善 DN 大鼠蛋白尿和肾功能,减轻肾脏胶原沉积,且两药合用较单用洛汀新可以更好控制 DN 大鼠蛋白尿。DN 大鼠肾皮质组织胞液 PKC 活性较正常大鼠下降,胞膜的 PKC 活性明显增高,胞液 PKC 活性与胞膜 PKC 活性之比显著下降,提示 DN 大鼠肾皮质细胞有 PKC 由胞浆向胞膜转移的过程,与文献报道一致^[5]。洛汀新与六味地黄加味胶囊都能提高胞液 PKC 活性,降低胞膜 PKC 活性,使胞液 PKC 活性与胞膜 PKC 活性比显著提高,降低血清 TGF-1 水平和肾皮质 CTGF 表达,且两药合用可以更加显著降低 DN 大鼠肾皮质胞膜 PKC 活性,提高胞液 PKC 活性与胞膜 PKC 活性比,两药合用较单用洛汀新更显著降低血清 TGF-1 水平和肾皮质 CTGF 的表达,说明洛汀新与六味地黄加味胶囊合用可以更有效抑制肾脏 PKC 活化,降低 TGF-1 水平和 CTGF 的表达。综上所述,六味地黄加味胶囊对 DN 大鼠肾脏有明显的保护作用,其作用机制与抑制肾脏 PKC 激活、降低细胞因子 TGF-1 及抑制肾皮质 CTGF 的表达有关,并且与洛汀新合用有协同保护肾脏的作用,对临床应用六味地黄加味胶囊治疗 DN 有指导意义。

参考文献:

[1] 吕妍,王新,唐方. 六味地黄制剂对糖尿病肾病大鼠肾功能的影响[J]. 中草药, 2005, 36(9): 1379-1380.
 [2] 刘卿,周于禄,裴奇,等. 六味地黄丸对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 40-43.

[3] 章元沛. 药理学实验[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996.
 [4] Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications[J]. *Diabetes*, 1998, 47: 859-866.
 [5] Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: Isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes[J]. *Diabetologia*, 2001, 44(6): 659-673.
 [6] Craven P A, De Rubertis F R. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose[J]. *J Clin Invest*, 1989, 83(5): 1667-1675.
 [7] Kagami S, Border W A, Miller D E, et al. Angiotensin stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(6): 2421-2427.
 [8] Singh R, Song R H, Alavi N, et al. High glucose decrease matrix metalloproteinase-2 activity in rat mesangial cells rat via transforming growth factor-beta[J]. *Exp Nephrol*, 2001, 9(4): 249-257.
 [9] 沈雯,陆福明,林善钺,等. 蛋白激酶 C 在高糖诱导近端小管上皮细胞胞外基质及转化生长因子 1 高表达中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2001, 17(4): 246-249.
 [10] Darren J K, Yuan Z, Claire H, et al. Protein kinase C inhibition attenuates the progression of experimental diabetic nephropathy in the presence of continued hypertension[J]. *Diabetes*, 2003, 52(2): 512-518.
 [11] Wahab N A, Weston B S, Mason R M. Modulation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 307(2): 305-314.
 [12] Furlong F, Crean J, Thornton L, et al. Dysregulated intracellular signaling impairs CTGF-stimulated responses in human mesangial cells exposed to high extracellular glucose[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(6): 1691-1700.

双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及其机制研究

高小玲¹, 罗子国¹, 王丕龙², 李庆春¹

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院 消化内科, 重庆 400016)

摘要:目的 研究双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡诱导作用,并探讨其可能的机制。方法 MTT 法测定不同浓度双氢青蒿素对 PC-3 细胞增殖的影响,流式细胞仪 (FCM)、透射电镜 (TEM) 观察双氢青蒿素对 PC-3 细胞的凋亡诱导作用,免疫组化 (SP) 检测双氢青蒿素对 PC-3 细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白阳性表达的影响。结果 双氢青蒿素对 PC-3 细胞有明显增殖抑制效应,能诱导 PC-3 细胞凋亡且具有浓度-时间依赖性,导致 PC-3 细胞线粒体肿胀、核碎裂、凋亡小体形成;随着双氢青蒿素浓度的增加,Bcl-2 蛋白阳性表达降低,而 Bax 蛋白阳性表达增加。结论 双氢青蒿素可能通过上调 Bax,下调 Bcl-2 蛋白表达诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡。

关键词:双氢青蒿素; 前列腺癌; 细胞凋亡

中图分类号:R979.1; R737.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0081-05

收稿日期:2009-03-16

作者简介:高小玲(1970—),女,重庆人,主治医师,博士在读,主要从事抗肿瘤机制研究。

Tel: (023) 68485838 E-mail: ling-high@163.com

*通讯作者 罗子国 Tel: (023) 68485838 E-mail: luoliangwen@yahoo.com.cn

Induction of dihydroartemisinin on prostate cancer PC-3 apoptosis and its mechanism

GAO Xiao-ling¹, LUO Zi-guo¹, WANG Pi-long², LI Qing-chun¹

(1. Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract : Objective To study the induction of dihydroartemisinin (DHA) on prostate cancer PC-3 apoptosis and its possible mechanism. **Methods** MTT was employed for cellular viability measurement, flow cytometry (FCM) and transmission electron microscopy (TEM) for observation of apoptosis, and immunocytochemical staining (SP) for analyzing the expression of Bcl-2 and Bax proteins in PC-3 cells treated with DHA of different concentration. **Results** DHA significantly inhibited the proliferation of PC-3 cells, induced their apoptosis in a time-concentration dependent manner, and led to mitochondrial swelling, nuclear fragmentations and apoptosis body formation, down-expression of Bcl-2 protein, and over-expression of Bax protein correspondence with DHA concentration. **Conclusion** DHA could induce the apoptosis in PC-3 cells by up-regulating Bax protein and down-regulating Bcl-2 protein.

Key words: dihydroartemisinin (DHA); prostate cancer (PC); apoptosis

前列腺癌 (prostate cancer) 是男性泌尿生殖系统常见肿瘤之一,在美国占男性肿瘤发病率第 1 位、死亡率第 2 位^[1]。近年来,国内前列腺癌的发病率和死亡率上升趋势明显,且尚无有效的治疗措施,因此寻求高效低毒的治疗用药具有重要意义。青蒿素 (artemisinin) 是从菊科蒿属黄花蒿茎叶中提取的一种含过氧基团的倍半萜内酯,其衍生物有青蒿琥酯 (artesunate)、双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 及蒿甲醚 (artemether) 等^[2],由于其高效低毒,能杀灭多重耐药疟原虫,世界卫生组织推荐使用以青蒿素为基础的联合治疗对抗耐传统单一疗法的疟疾^[3]。近年来,青蒿素抗肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡以及对活体移植瘤的抑制作用日益受到关注^[4-7]。研究表明,青蒿素及其衍生物除对多种肿瘤细胞有抑制作用外,对前列腺癌细胞也呈中度抑制作用^[8],然而,对前列腺癌细胞的抑制作用机制尚未见相关报道。由于青蒿素类药物吸收后主要通过转化为双氢青蒿素活性成分而发挥药理作用^[9],故本实验采用酶联免疫法、流式细胞仪、透射电镜、免疫组化法检测双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞的增殖活性、凋亡及凋亡相关基因 bcl-2、bax 表达的影响,为寻求新型高效低毒抗前列腺癌药物提供参考。

1 材料

1.1 药物:双氢青蒿素由重庆医科大学附属第一医院薛斌博士馈赠,质量分数为 99.5%,以少量二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配成浓度为 200 mmol/L 的母液,超声波助溶。4 保存。实验前用 HamF12 培养基稀释至所需浓度 (DMSO 终体积分数 < 0.1%)。

1.2 细胞株:人前列腺癌 PC-3 细胞株购自中国科

学院上海细胞生物研究所细胞库。

1.3 主要试剂:HamF12 培养基, Gibco 公司;胎牛血清 (FBS),杭州四季青生物制品有限公司;MTT, Sigma 公司;Annexin-V-Fluorescein 试剂盒,晶美生物工程有限公司;SP 试剂盒、Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体、Bax 鼠抗人单克隆抗体、DAB 显色剂,北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 主要仪器: CW-CJ-2FO 超净工作台,苏净集团安泰空气技术有限公司; YCP-200 全自动 CO₂ 孵箱,上海易亮医疗器械有限公司; TDV5-WS 离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司; ST/TC 酶联免疫检测仪, Tecan Austria GmbH; FACS Calibur 流式细胞仪, BD 公司; TE2000-U 倒置显微镜,日本尼康; H7500 透射电子显微镜, HITACHI。

2 方法

2.1 细胞培养:人前列腺癌 PC-3 细胞接种于含 10% (体积分数) FBS、双抗溶液 (青霉素 G 100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL) 的 HamF12 培养基中,置于 37℃、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下的孵箱中常规培养,细胞贴壁生长,每 2~3 天换液 1 次,当细胞生长汇合时,按 1:3 传代,每周传代 1~2 次。用 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 混合消化液消化,收集对数生长期细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖活性:用 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 混合消化液消化处于对数生长期的 PC-3 细胞,离心收集后,台盼蓝计数,用含 5% FBS 的 HamF12 培养基调整细胞悬液浓度为 2.5 × 10⁴ / mL,均匀接种于 3 块 96 孔培养板中,每孔 200 μL,常规培养 24 h,细胞贴壁后,将每一块板上的细胞分为双氢青蒿素 12.5、25、50、100、200

μmol/L 5 个浓度组,以及对照 HamF12 组(用含 5% FBS 的 HamF12 培养基培养细胞)。每一浓度组设 4 个重复孔及一个空白调零孔。37℃、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下,分别培养 24、48、72 h 后,每孔加 MTT (5 mg/mL) 20 μL,继续培养 4 h 后,小心吸弃孔内上清,每孔加 DMSO 200 μL,均匀振荡 10 min 至结晶溶解,比色,在酶联免疫检测仪上测定 540 nm 波长处各孔吸光度值 (A₅₄₀),记录实验结果,计算细胞生长抑制率[抑制率 = (1 - 实验组 A₅₄₀/对照组 A₅₄₀) × 100%]。实验重复 3 次取平均值。

2.3 流式细胞仪分析细胞凋亡:用 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 混合消化液消化处于对数生长期的 PC-3 细胞,离心收集,在含 5% FBS 的 HamF12 培养液中培养。将细胞分为双氢青蒿素 12.5、50、200 μmol/L 3 个浓度组,细胞贴壁后,各浓度组分别作用 48、72 h,消化细胞,吹打成单细胞悬液,台盼蓝计数细胞,使收集细胞总数 1 × 10⁶ 以上,PBS 洗涤 2 次,单细胞悬液在室温下 1 400 r/min 离心 5 min 后弃上清,按照 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒提供的方法检测暴露在细胞表面的磷脂酰丝氨酸 (PS),进行细胞凋亡与死亡的检测。实验重复 3 次取平均值。

2.4 透射电镜观察细胞超微结构改变:取对数生长期 PC-3 细胞在含 5% FBS HamF12 培养液中培养。细胞贴壁后,分别以 0、12.5、50、200 μmol/L 双氢青蒿素作用 48 h,以 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 混合消化液消化细胞,吹打成单细胞悬液,台盼蓝记数细胞,使收集细胞总数为 1 × 10⁶ 以上,将单细胞悬液在室温下离心,1 500 r/min 离心 20 min,弃上清,经 4% 戊二醛及 1% 锇酸(磷酸盐配制)预固定和后固定(pH 7.2~7.4)各 2 h,酒精和丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 浸透、包埋,65℃ 聚合 24 h,超薄切片机制备 50 nm 超薄切片,经枸橼酸铅电子染色,透射电镜观察。

2.5 免疫组化检测细胞 Bcl-2、Bax 蛋白阳性表达:免疫组化采用 SP 法进行 Bcl-2、Bax 检测。取对数生长期细胞以 0.25% 的胰蛋白酶/0.02% EDTA 混合消化液消化,用含 5% FBS 的 HamF12 培养基制成浓度为 2.5 × 10⁴/mL 的细胞悬液,接种于放有无菌盖玻片的 24 孔培养板中,每孔 1 mL,常规培养 24 h 后,经过 0(对照组)、12.5、50、200 μmol/L 双氢青蒿素作用 48 h 后,终止培养,PBS 洗 3 次,用 95% 乙醇固定 20 min,取出细胞爬片,根据 SP 试

剂盒说明书操作,最后苏木素衬染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。阳性对照参照已知阳性标本,阴性对照用 PBS 代替一抗。SP 实验结果采用北航真彩色医学图像处理系统软件进行平均吸光度值的图像分析。

2.6 统计学分析:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SAS9.1 统计软件,数据采用析因设计方差分析及 SNK 法两两比较进行统计学处理。

3 结果

3.1 双氢青蒿素对 PC-3 细胞增殖活性的影响:以 HamF12 为对照组,比较不同浓度双氢青蒿素对 PC-3 细胞增殖的影响。各组、各时间点 PC-3 细胞增殖活性见表 1。经统计学分析,各浓度组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);12.5 与 25 μmol/L 组的差异没有统计学意义,各时间点组及 50、100、200 μmol/L 浓度组两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),PC-3 细胞的增殖活性与双氢青蒿素浓度和作用时间呈负相关。

表 1 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of DHA on proliferation of PC-3 cells
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	σ (μmol · L ⁻¹)	A ₅₄₀ 值(抑制率/%)		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	0.72 ± 0.11(-)	1.35 ± 0.21(-)	2.01 ± 0.18(-)
双氢青蒿素	12.5	0.64 ± 0.11(10.30)*	1.02 ± 0.18(24.54)*	1.08 ± 0.17(46.15)*
	25	0.60 ± 0.07(15.50)*	0.98 ± 0.18(27.43)*	0.97 ± 0.14(51.78)*
	50	0.54 ± 0.07(24.39)*	0.89 ± 0.16(34.72)*	0.71 ± 0.10(56.02)*
	100	0.48 ± 0.06(32.66)*	0.80 ± 0.14(40.81)*	0.88 ± 0.15(64.66)*
	200	0.40 ± 0.06(43.52)*	0.60 ± 0.01(55.92)*	0.71 ± 0.10(75.32)*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.2 双氢青蒿素对 PC-3 细胞凋亡的影响:流式细胞仪分析各组 PC-3 细胞凋亡率,见表 2。双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响具有浓度-时间相关性。经统计学分析,各浓度组与对照组比较及时间组两两比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),当双氢青蒿素 200 μmol/L 时,48、72 h 诱导凋亡率分别达 (22.06 ± 2.15)%、(28.91 ± 1.73)%。

3.3 双氢青蒿素对 PC-3 细胞超微结构的影响:对照组 PC-3 细胞,直径 8~14 μm 大小不一,形态呈圆形或椭圆形,较规则,细胞表面有微绒毛,细胞核较大,核仁明显(1~2 个),常染色质丰富,胞浆呈均匀中等的电子密度,散在分布有粗面内质网和线粒体,含有丰富的游离多聚核糖体,可见核分裂相,见图 1-a。双氢青蒿素各浓度组可见数量不等、程度

不同的凋亡和坏死细胞,浓度越高,凋亡和坏死细胞数量越多;早期凋亡细胞表现为细胞基质电子密度变深,细胞核异染色质边集,质膜表面呈泡状外突,见图 1-b;晚期凋亡细胞基质进一步浓缩,电子密度更深,少数凋亡细胞可见线粒体呈不同程度内室肿胀、核碎裂成许多小块,直至细胞凋亡成许多凋亡小体,凋亡小体大小不等,其内核碎片可有可无,其膜

完整,见图 1-c、d。早期坏死细胞表现为细胞核异染色质边集、核轻度溶解,细胞质呈灶性和成片的溶解,粗面内质网扩张,线粒体内室肿胀,核糖体减少,但核膜和质膜均完整;晚期坏死细胞可见胞浆电子密度明显降低,细胞核溶解破裂,线粒体进一步肿胀,伴有膜破裂,部分细胞可见质膜破裂,胞浆外溢。见图 1-e、f。

表 2 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

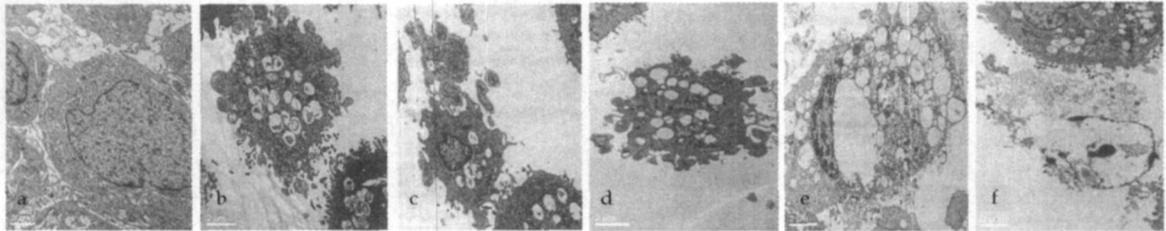
Table 2 Effect of DHA on apoptosis of PC-3 cells
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/ %	
		48 h	72 h
对照	-	1.32 \pm 0.38	3.20 \pm 0.31
双氢青蒿素	12.5	4.70 \pm 1.07 *	6.48 \pm 0.66 *
	50	5.63 \pm 0.63 *	8.95 \pm 1.16 *
	200	22.06 \pm 2.15 *	28.91 \pm 1.73 *

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.4 双氢青蒿素对 PC-3 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达的影响: Bcl-2 蛋白反应产物为棕色,位于细胞膜及细胞浆。对照组,细胞膜及细胞浆内呈深棕色,双氢青蒿素浓度越高,颜色越浅。Bax 蛋白反应产物为棕色,位于细胞浆。对照组,胞浆内呈浅棕色弱阳性,双氢青蒿素浓度越高,颜色越深,见图 2; 阴性对照组无特异性染色。图片经图像体视分析平均吸光度值见表 3,经统计学分析不同浓度双氢青蒿素之间 Bcl-2 与 Bax 表达平均吸光度值差异有统计学意义, Bcl-2 ($P < 0.001$), Bax ($P < 0.001$)。



a-正常形态的 PC-3 细胞 b-早期凋亡的 PC-3 细胞 c-中期凋亡的 PC-3 细胞 d-晚期凋亡的 PC-3 细胞 e、f-坏死的 PC-3 细胞
a-normal PC-3 cells b-apoptotic PC-3 cells in earlier stage c-apoptotic PC-3 cells in intermediate stage
d-apoptotic PC-3 cells in advanced stage e、f-necrotic PC-3 cells

图 1 透射电镜下双氢青蒿素对 PC-3 细胞超微结构的影响 (48 h)

Fig. 1 Effects of DHA on ultrastructure of PC-3 cells by TEM (48 h)

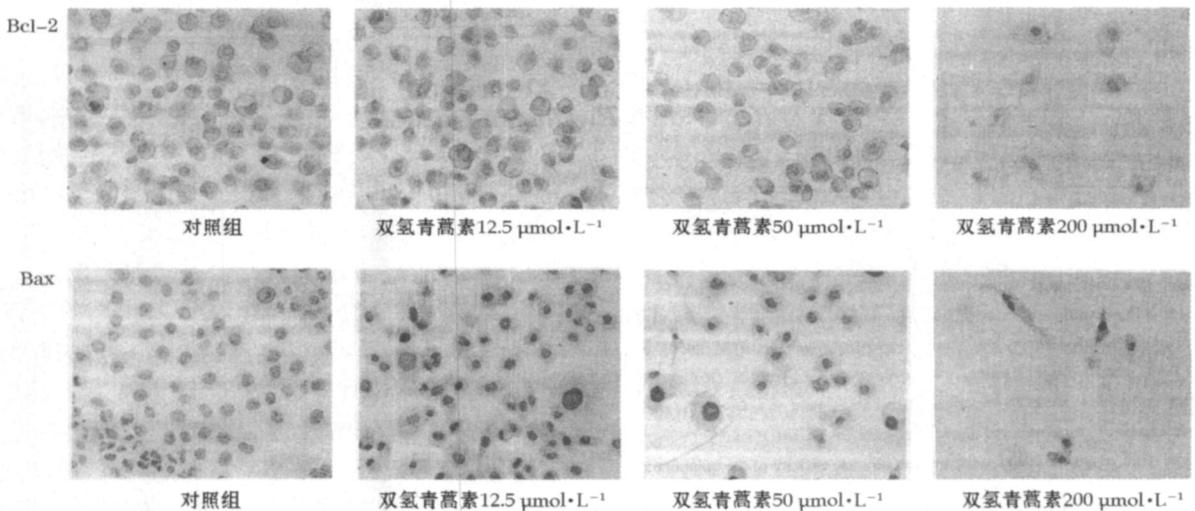


图 2 双氢青蒿素对 PC-3 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达的影响 (48 h)

Fig. 2 Effects of DHA on Bcl-2 and Bax protein positive expression in PC-3 cells (48 h)

表 3 双氢青蒿素对 PC-3 细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响
(平均吸光度值) ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 3 Effects of DHA on Bcl-2 and Bax protein positive expression in PC-3 cells (average optical value)
($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	C (μmol · L ⁻¹)	Bcl-2	Bax
双氢青蒿素	12.5	0.208 ± 0.015	0.063 ± 0.005
	50	0.075 ± 0.021	0.088 ± 0.010
	200	0.083 ± 0.010	0.243 ± 0.010

4 讨论

前列腺癌是男性生殖系统常见的恶性肿瘤,其发病率与死亡率很高^[10],目前尚无有效的治疗手段^[11,12],因此,寻求一种高效低毒的治疗用药具有深远意义。肿瘤的发生是一个复杂过程,其中细胞增殖与凋亡失衡是重要因素之一。抑制肿瘤细胞的增殖、诱导凋亡是探索抗肿瘤药物的重要思路之一。本实验表明双氢青蒿素对 PC-3 细胞有明显增殖抑制效应,能有效诱导 PC-3 细胞凋亡且具有浓度-时间依赖性,对 PC-3 细胞超微结构的观察也进一步证明双氢青蒿素的凋亡诱导作用;在对双氢青蒿素诱导凋亡机制的研究中,发现随着双氢青蒿素浓度的升高,凋亡相关基因 Bcl-2 在 PC-3 细胞胞浆与胞膜内的表达降低,而 Bax 在胞浆表达却显示增加。

bcl-2 是从滤泡性 B 淋巴细胞中分离出来的一种癌基因,bcl-2 基因家族是重要的细胞凋亡调节因子,分抑凋亡基因(如 bcl-2、bcl-xL、bcl-w 等)及促细胞凋亡(如 bax、bad、bik 等)^[13,14]。bcl-2 通过 C 末端疏水性氨基酸锚定于线粒体外膜,而 bax 则散布于基质中,激活后移位至线粒体表面与 bcl-2 作用通过调控线粒体膜电位及通透性转换通道,释放线粒体膜间隙的促凋亡蛋白,如:细胞色素 C、Smac/DIABLO、AIF 和 endonuclease G (endo G) 等,后者激活半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族引发 caspase 级联反应并最终引起膜泡形成,核碎裂和细胞凋亡^[15,16]。同时,Bcl-2 与 Bax 也存在于内质网膜,通过与 IP3R 作用调节并细胞内钙离子信号启动凋亡途径^[17]。Bax 与 Bcl-2 的比值调节细胞增殖和凋亡的平衡,当胞浆内 Bax 水平及 Bax/Bcl-2 比率增大时,促进细胞的凋亡^[18]。

结合本实验中免疫组化结果及电镜显示双氢青蒿素作用 PC-3 细胞后线粒体内室肿胀,凋亡小体形成,推测双氢青蒿素可能通过某种机制下调 Bcl-2,上调 Bax,使二者比例失衡,通过构像变化及蛋白质间相互作用调节内质网钙离子通道及线粒体膜通透性转换通道,最后通过线粒体释放凋亡物质,诱导

了 PC-3 细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Mu D, Zhang W, Chu D, et al. The role of calcium, P38 MAPK in dihydroartemisinin-induced apoptosis of lung cancer PC-14 cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61(4): 639-645.
- [3] Mercer A E, Maggs J L, Sun X M, et al. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(13): 9372-9382.
- [4] Efferth T. Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—from bench to bedside [J]. *Planta Med*, 2007, 73(4): 299-309.
- [5] Chen T, Li M, Zhang R, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(7): 1358-1370.
- [6] Nam W, Tak J, Ryu J K, et al. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells [J]. *Head Neck*, 2007, 29(4): 335-340.
- [7] Singh N P, Lai H C. Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4325-4331.
- [8] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A. The anti-malarial artemisinin is also active against cancer [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(4): 767-773.
- [9] Woodrow C J, Haynes R K, Krishna S. Artemisinins [J]. *Postgrad Med J*, 2005, 81(952): 71-78.
- [10] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(2): 71-96.
- [11] Altaner C. Prodrug cancer gene therapy [J]. *Cancer Lett*, 2008, 270(2): 191-201.
- [12] Aziz M H, Nihal M, Fu V X, et al. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(5): 1335-1341.
- [13] Del Gaizo Moore V, Brown J R, et al. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737 [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 112-121.
- [14] Chipuk J E, Green D R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(4): 157-164.
- [15] Antignani A, Youle R J. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(6): 685-689.
- [16] Morberg E, Gogvadze V, Ott M, et al. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(12): 1857-1864.
- [17] Pinton P, Rizzuto R. Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1409-1418.
- [18] Xu Y H, Zhao L J, Li Y. Alisol B acetate induces apoptosis of SGC7901 cells via mitochondrial and phosphatidylinositol 3-kinases/Akt signaling pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(23): 2870-2877.