

## 白头翁皂苷 D 体外抗肝癌作用及其机制研究

岳文华<sup>1,2</sup>, 徐坤<sup>3</sup>, 冯育林<sup>1</sup>, 张天<sup>2</sup>, 许琼明<sup>2</sup>, 杨世林<sup>1,2</sup>, 刘艳丽<sup>2\*</sup>

1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330000

2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123

3. 铜仁市人民医院 药学部, 贵州 铜仁 554300

**摘要:**目的 探讨白头翁皂苷 D 体外抗肝癌作用及其相关机制。方法 采用 MTT 法考察白头翁皂苷 D 对人肝癌细胞 BEL-7402 增殖的影响, 同时观察 BEL-7402 细胞形态的变化, 采用集落形成实验考察白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞集落形成的影响; Hoechst 33342 染色观察 BEL-7402 细胞凋亡的形态变化; 流式细胞术检测 BEL-7402 细胞凋亡率和线粒体膜电位的变化; 采用 Western blotting 法检测 BEL-7402 细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达。结果 MTT 结果显示白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞增殖有抑制作用; 集落形成实验结果显示白头翁皂苷 D 能明显抑制 BEL-7402 细胞集落的形成, 白头翁皂苷 D (25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) 能显著诱导 BEL-7402 细胞凋亡; 白头翁皂苷 D (18.75、25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) 能显著降低 BEL-7402 细胞线粒体膜电位; 白头翁皂苷 D (12.50、18.75、25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) 可显著上调 BEL-7402 细胞中 Caspase-3 的表达; 白头翁皂苷 D (25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) 可显著下调 Bcl-2 的表达。结论 白头翁皂苷 D 有良好的体外抗肝癌作用, 其机制与调节线粒体途径凋亡相关蛋白 Bcl-2、Caspase-3 的表达有关。

**关键词:** 白头翁皂苷 D; 抗肿瘤; 肝癌; 细胞凋亡; 线粒体途径

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3295-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.015

## Antihepatocarcinoma effect *in vitro* of pulchinenoside D and mechanisms

YUE Wen-hua<sup>1,2</sup>, XU Kun<sup>3</sup>, FENG Yu-lin<sup>1</sup>, ZHANG Tian<sup>2</sup>, XU Qiong-ming<sup>2</sup>, YANG Shi-lin<sup>1,2</sup>, LIU Yan-li<sup>2</sup>

1. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China

2. College of Pharmacy, Suzhou University, Suzhou 215123, China

3. Department of Pharmacy, Tongren City People's Hospital, Tongren 554300, China

**Abstract: Objective** To research the antihepatocarcinoma effect *in vitro* of pulchinenoside D and mechanisms. **Methods** MTT assay was used to evaluate the proliferative inhibition of pulchinenoside D on hepatoma carcinoma cells (BEL-7402), and the morphology of BEL-7402 cells was also observed; Colony formation method was used to examine colony-forming role by pulchinenoside D on BEL-7402 cells; The morphological changes of drug-induced apoptosis of BEL-7402 were observed by Hoechst 33342 staining; Flow cytometry assay was used to analyze the apoptosis rate and mitochondrial membrane potential changes of BEL-7402 cells; Western blotting was employed to determine the expression levels of Bcl-2/Caspase-3 protein in BEL-7402 cells. **Results** MTT assay showed that pulchinenoside D could inhibit the proliferation of BEL-7402 cells, and colony formation method showed that pulchinenoside D could significantly inhibit the colony formation of BEL-7402 cells; Pulchinenoside D (25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) could significantly induce the apoptosis of BEL-7402; Pulchinenoside D (18.75 and 25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) could significantly reduce the mitochondrial membrane potential of BEL-7402 cells; Pulchinenoside D (12.50, 18.75, and 25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) could significantly increase the expression of Caspase-3; Pulchinenoside D (25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) could significantly down-regulate the expression of Bcl-2. **Conclusion** Pulchinenoside D has antitumor effects *in vitro*; The mechanism is involved in regulation of the mitochondrial pathway apoptosis-related protein expression of Bcl-2 and caspase-3.

**Key words:** pulchinenoside D; antitumor; liver cancer; apoptosis; mitochondrial pathway

恶性肿瘤是目前危害人类生命健康的严重疾病之一, 严重威胁着人类的生存和健康。肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 我国每年死于肝癌的人数约为 11 万, 占全世界肝癌死亡人数的 45%<sup>[1]</sup>。手术切除

收稿日期: 2014-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273402); 重大新药创制国家科技重大专项资助 (2011ZX11102-001-19); 江苏省自然科学基金资助 (BK2012620); 2013 年苏州大学大学生创新创业训练计划 (2013xj060)

作者简介: 岳文华 (1988—), 女, 研究方向为天然药物活性成分及其作用机制研究。Tel: 13162021065 E-mail: 1403393217@qq.com

\*通信作者 刘艳丽, 女, 副教授, 主要从事中药药理学研究。Tel: (0512)69561421 E-mail: liuyanli@suda.edu.cn

一直是治疗肝癌的首选方法,但肝癌的总体手术切除率仅有20%左右,术后生存率也不高,容易复发和转移,难以实现根治。化疗在肿瘤的治疗中占有极其重要的地位,但其毒副作用和耐药现象限制了化疗药物的应用。故临床上急需开发高效、低毒或作用于新靶点的药物。中药因其毒副作用小,更易于被患者所接受等特点,在抗肿瘤药物中占有重要地位。

白头翁为毛茛科(Ranunculaceae)植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel. 的干燥根,别名野丈人、粉草、毛姑杂花、老公花、大将军草、大碗花、老冠花(山东)等,生于山野、荒坡及田野间,喜生向阳处<sup>[1]</sup>。白头翁皂苷D为白头翁中提取的活性成分,有研究表明白头翁皂苷D有抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>,能明显抑制人结肠癌细胞的增殖<sup>[3]</sup>,Son等<sup>[4]</sup>通过实验证明白头翁皂苷D通过下调Bcl-2、VEGF、HIF1 $\alpha$ 的表达,上调Caspase-3的表达引起胰腺癌系PANC-1、MIAPaCa-2、BXPC-3、AsPC-1和HPAC细胞的凋亡。Won等<sup>[5]</sup>发现白头翁皂苷D通过c-Met/Akt/mTOR通路诱导胃癌细胞MKN-45的凋亡,发挥其抗肿瘤作用。本实验对白头翁皂苷D的体外抗肝癌作用进行了初步研究,并进一步探讨其机制,为更好地开发利用白头翁提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 试药与试剂

白头翁皂苷D[常春藤皂苷元3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)[ $\beta$ -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷],由苏州大学天然药物化学教研室提供,质量分数>95%;5-氟尿嘧啶(5-FU),上海旭东海普药业有限公司生产,批号120603;RPMI 1640培养液、小牛血清(NBS,美国Gibco公司);注射用硫酸链霉素(大连美罗大药厂);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶(Amersco公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国Biosharp公司)。

### 1.2 细胞株

人肝癌细胞株BEL-7402购于中国科学院上海细胞库。

### 1.3 仪器

BB-15型二氧化碳培养箱(德国Thermo Scientific公司);KA-1000型飞鸽牌台式离心机;X85-2恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器有限公司);SW-CJ-2D型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);XDS-1A型倒置式生物显微镜

(重庆光电仪器总公司);Eclipse TE2000-U型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);Thermo MULTISKAN FC型酶标仪(德国Thermo Scientific公司);WD-9405B型水平摇床(沃德生物医学仪器公司);THS-10电热恒温水槽(宁波天恒仪器厂);低温高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司);BSA223S电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

从液氮罐中取出BEL-7402细胞冻存管,迅速置于37℃恒温水浴中解冻,离心去除冻存液,加入已配制的含10%NBS的RPMI 1640培养液,吹打均匀并移至细胞培养瓶中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的饱和湿度孵箱中静置培养。次日换液,3~4d传代,取对数生长期细胞用于实验。

### 2.2 MTT实验

收集对数生长期BEL-7402细胞,用含10%NBS的RPMI 1640培养基调整细胞悬液浓度至 $1 \times 10^5$ /mL,接种于96孔板中,每孔加入100  $\mu$ L细胞悬液,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养24h使细胞贴壁完全。次日分组,对照组正常培养,给药组给予白头翁皂苷D(终质量浓度分别为1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0、50.000 0  $\mu$ g/mL),每个质量浓度均设3个复孔,另设5-FU(25  $\mu$ g/mL)阳性对照组,药物分别与细胞作用24、48、72h,终止培养前4h加入MTT(5 mg/mL),10  $\mu$ L/孔,培养结束后弃去上层液体,每个复孔加入100  $\mu$ L DMSO溶液,于摇床上振摇10 min使结晶充分溶解,采用酶标仪检测490 nm处各孔吸光度(A)值。取其均值计算药物对细胞的增殖抑制率,并求其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值,重复3次实验。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

### 2.3 细胞形态观察

取对数生长期BEL-7402细胞,用含10%NBS的RPMI 1640培养基调整细胞浓度为 $5 \times 10^4$ /mL于6孔板中,37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养过夜,次日进行分组:给药组加入白头翁皂苷D(终质量浓度为6.25、12.50、25.00  $\mu$ g/mL),阳性组加入5-FU(25  $\mu$ g/mL),200  $\mu$ L/孔,对照组加入等体积培养基,每组均设3个复孔,药物作用24h后,去掉上清液,置于显微镜下观察形态变化。

### 2.4 集落形成实验

取对数生长期BEL-7402细胞,用含10%NBS

的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为 250/mL，混匀后吸取 2 mL 细胞悬液于 35 mm 无菌培养皿中，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养过夜，次日分组给药，给药组加入白头翁皂苷 D（终质量浓度为 0.781、1.562、3.125 μg/mL），阳性组加入 5-FU（25 μg/mL），200 μL/孔，对照组加入等体积培养基，每组均设 3 个复孔，在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置 10 d，弃去培养基，Gimesa 染色，镜下记录含 50 个细胞以上的细胞集落数，计算集落形成率和集落抑制率，并拍照。

集落形成率 = 集落数 / 接种细胞数

集落抑制率 = 1 - 给药组集落数 / 对照组集落数

### 2.5 细胞凋亡实验 (Annexin V-FITC/PI 双染)

取对数生长期的 BEL-7402 细胞，用含 10% NBS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为 5 × 10<sup>5</sup>/mL 于 6 孔板中，2 mL/孔，在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养过夜，次日进行分组：给药组加入白头翁皂苷 D（终质量浓度为 12.50、18.75、25.00 μg/mL）继续培养 48 h，对照组加入等体积培养基，每组均设 3 个复孔，在含 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养后，收集板孔里所有细胞并用 PBS 液洗涤细胞 2 遍，加入 500 μL 的结合缓冲液悬浮细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μL PI，混匀，室温避光反应 5~15 min，上流式细胞仪进行检测。

### 2.6 细胞凋亡的形态观察

取对数生长期的 BEL-7402 细胞，按“2.5”项方法分组给药，在含 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养后小心吸去上层液体，用 PBS 液轻洗 1 次，加入结合缓冲液 500 μL/孔，使浸满底层细胞，然后每孔加入 Hoechst 33342 染液 5 μL，避光反应 15 min，于荧光显微镜下观察并拍照（拍照前先将板内的液体吸出）。

### 2.7 线粒体膜电位检测

取对数生长期 BEL-7402 细胞，按“2.5”项方法分组给药。培养结束后收集孔内所有细胞，每个组的细胞中加入 0.5 mL 细胞培养液，并移至对应的 1 mL EP 管中，加入 0.5 mL JC-1 染色工作液，充分混匀，使细胞在 37 °C 避光孵育 20 min。在孵育期间，按照每毫升 JC-1 染色缓冲液（5×）加入 4 mL 蒸馏水的比例，配制适量的 JC-1 染色缓冲液（1×），并放置于冰浴中备用。37 °C 孵育结束后，4 °C 低温离心机中 600 r/min 离心 3~4 min，沉淀细胞，小心吸除上清，加入 1 mL JC-1 染色缓冲液（1×）重悬细胞，洗涤细胞 2 次。每个组加入 0.5 mL JC-1

染色缓冲液（1×）重悬后，于流式细胞仪上进行检测。

### 2.8 Western blotting 检测细胞 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达

取对数生长期 BEL-7402 细胞，经胰酶消化后，以 1 × 10<sup>6</sup>/mL 接种入细胞培养瓶内。待细胞长至 80%~90%，给药组加入白头翁皂苷 D（终质量浓度 12.50、18.75、25.00 μg/mL），对照组加入等体积培养基，作用 48 h 后，提取各给药组及对照组的蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样品加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶，经电泳、转膜、5% 脱脂奶粉封闭，封闭结束后，TBST 漂洗 3 次，每次 5 min；加一抗溶液，4 °C 孵育过夜，第 2 天 37 °C 恒温热孵 1 h，用 TBST 液洗 3 次，每次 15 min；加入对应的荧光二抗，37 °C 避光孵育 2 h，用 TBST 液避光洗 3 次，每次 15 min，于荧光扫描仪中扫描。由 SigmaScan Pro 5 软件分析图片中条带灰度值。实验重复 3 次。

### 2.9 统计分析

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 SPSS 11.5 统计学软件进行 One-way ANOVA 方差分析。

## 3 结果

### 3.1 对 BEL-7402 细胞的生长抑制作用

实验结果显示，白头翁皂苷 D 在 1.562 5~50.000 0 μg/mL 内对 BEL-7402 细胞的增殖有不同程度的抑制作用，作用 24、48、72 h 的增殖抑制率分别为 5.89%~66.19%、18.59%~81.04% 及 24.21%~84.20%，呈明显量效关系，其 IC<sub>50</sub> 值分别为（11.93 ± 2.42）、（7.74 ± 1.09）、（4.91 ± 1.42）μg/mL。结果见图 1。

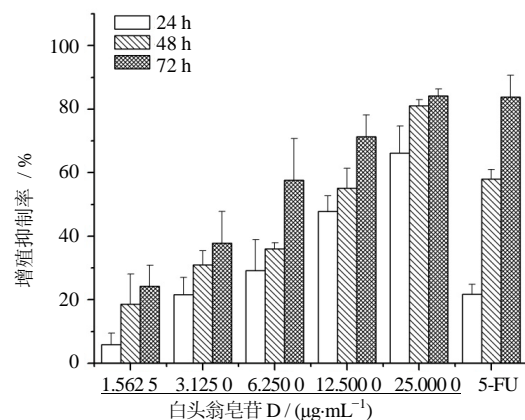


图1 白头翁皂苷D对BEL-7402细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of pulchinoside D on proliferation of BEL-7402 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.2 对 BEL-7402 细胞形态的影响

实验结果显示, 对照组细胞生长良好, 不同质量浓度白头翁皂苷 D 处理后贴壁细胞数减少, 皱缩变圆, 死亡细胞数增加, 呈明显剂量依赖性。结果见图 2。

### 3.3 对 BEL-7402 细胞集落形成的抑制作用

结果显示, 白头翁皂苷 D 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组及

5-FU (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组均无集落形成; 对照组及白头翁皂苷 D 0.781、1.562  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的集落形成率分别为 82.1%、79.7%、65.8%, 白头翁皂苷 D 0.781、1.562  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对 BEL-7402 细胞集落形成的抑制率分别为 3.0%和 19.8%, 其他剂量组抑制率均为 100%。结果见图 3。

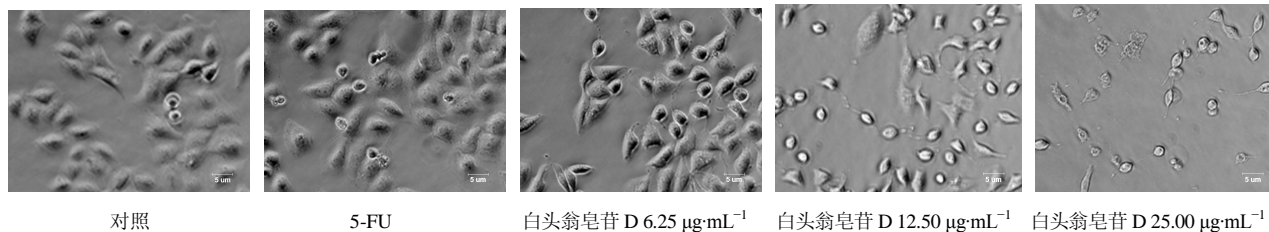
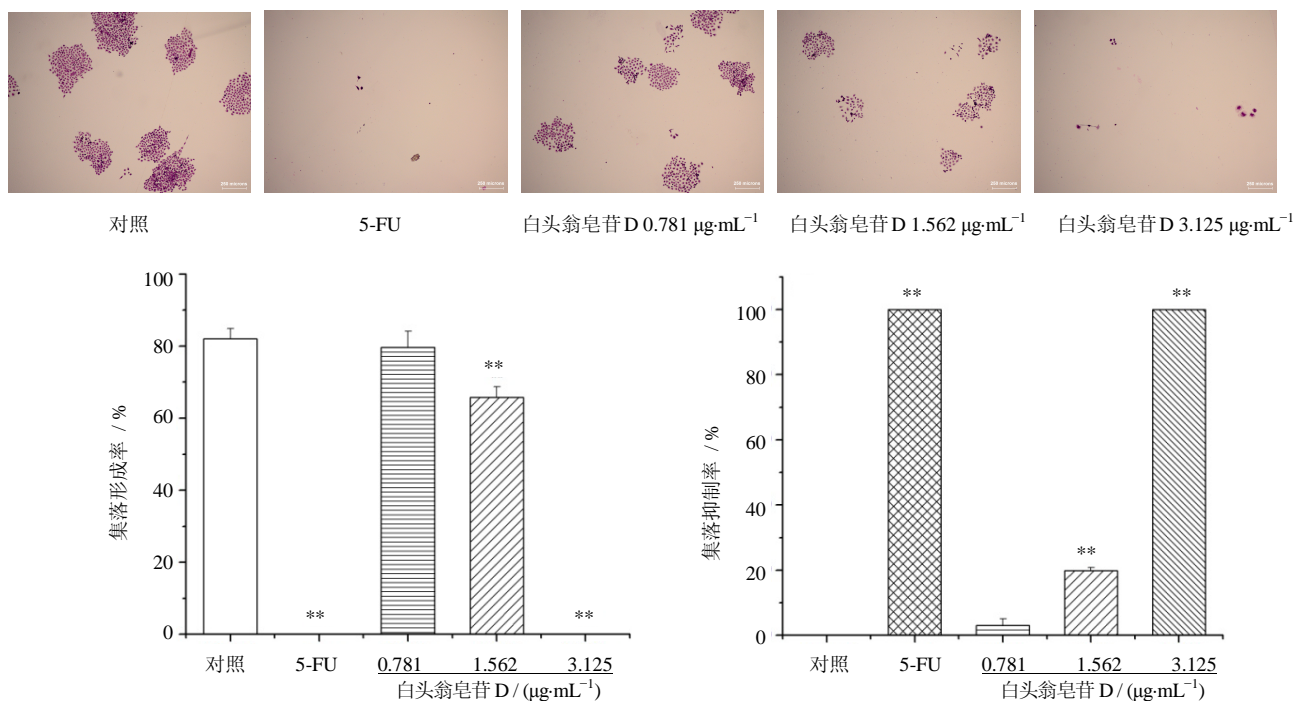


图 2 白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of pulchinoside D on morphological features of BEL-7402 cells



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ , 下同  
 \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below

图 3 白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞集落形成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of pulchinoside D on colony forming of BEL-7402 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 对 BEL-7402 细胞凋亡率的影响

结果显示, 白头翁皂苷 D 12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 BEL-7402 细胞凋亡率为 (11.08  $\pm$  0.56)%, 与对照组比较差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 白头翁皂苷 D 18.75、25.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组细胞凋亡率分别为 (24.84  $\pm$  4.29) %、(81.71  $\pm$  3.02) %, 与对照组比较差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。结果见图 4。

### 3.5 对 BEL-7402 细胞凋亡形态的影响

白头翁皂苷 D 作用 BEL-7402 细胞 48 h 后, 经 Hoechst 33342 染色观察, 结果显示白头翁皂苷 D 12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组对 BEL-7402 细胞凋亡形态的影响不大, 25.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞发出强烈的蓝色荧光, 表明被染色的细胞越来越多, 大量细胞凋亡。结果见图 5。



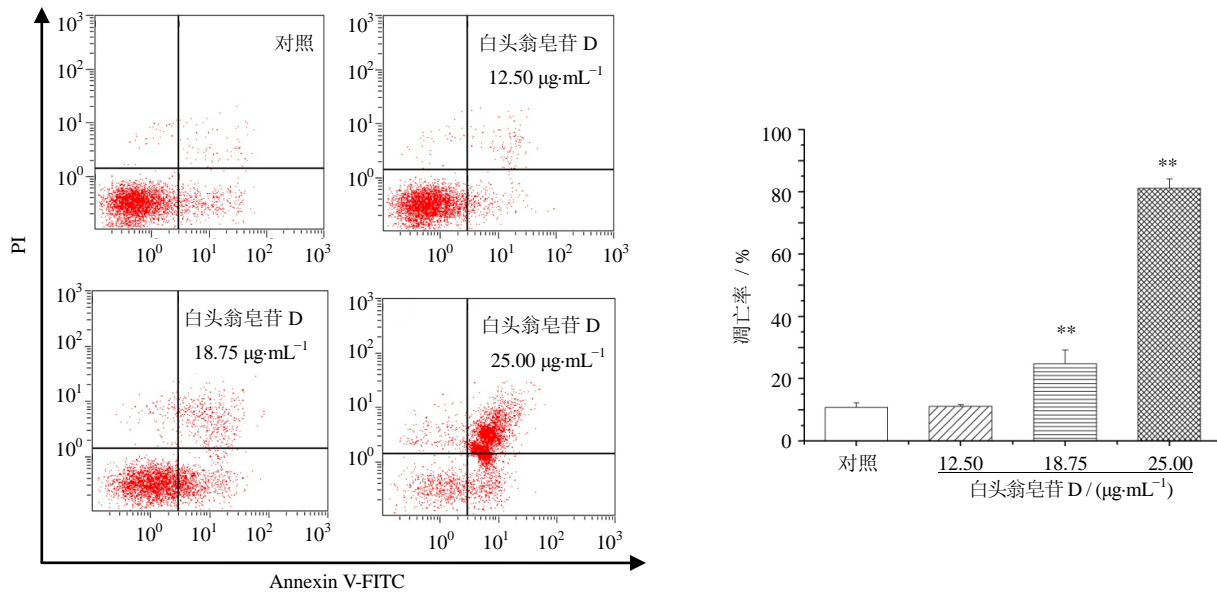


图 4 白头翁皂苷 D 作用 BEL-7402 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of pulchinenoside D on apoptosis rate of BEL-7402 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

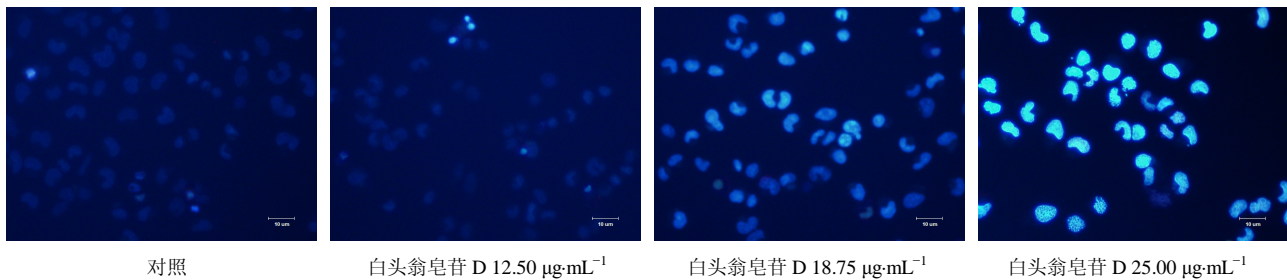


图 5 白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞凋亡形态的影响

Fig. 5 Effect of pulchinenoside D on morphological features of BEL-7402 cells

### 3.6 对 BEL-7402 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 是一种用于检测线粒体膜电位的理想探针, 在线粒体膜电位高时, JC-1 聚集在线粒体的基质中, 形成复合物 (aggregates JC-1), 可以产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, 以单体 (monomer JC-1) 存在, 产生绿色荧光, 以红、绿荧光强度的相对比值来衡量线粒体膜电位去极化程度。

实验结果显示, 白头翁皂苷 D (18.75、25.00 µg/mL) 组作用 BEL-7402 细胞 48 h 后, 红色荧光强度与绿色荧光强度的比值呈下降趋势, 与对照组比较差异非常显著 ( $P < 0.01$ ), 表明白头翁皂苷 D 可导致 BEL-7402 细胞线粒体膜电位下降。结果见图 6。

### 3.7 对 BEL-7402 细胞中 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白水平的影响

结果表明, 18.75 µg/mL 白头翁皂苷 D 组 BEL-7402 细胞中 Bcl-2 蛋白表达较对照组明显降低

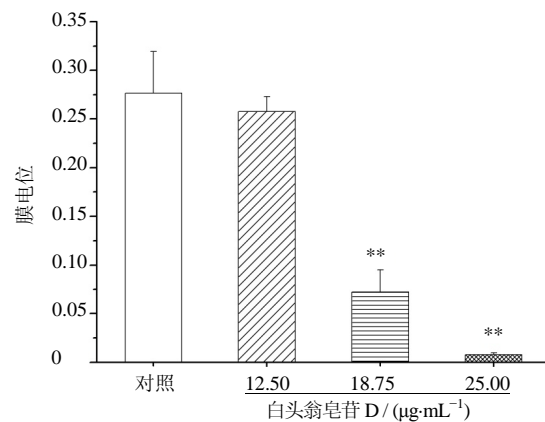


图 6 白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 线粒体膜电位影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of pulchinenoside D on mitochondrial membrane potential of BEL-7402 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

( $P < 0.05$ ), 25.00 µg/mL 白头翁皂苷 D 组 Bcl-2 蛋白表达较对照组显著降低 ( $P < 0.01$ )。结果见图 7。

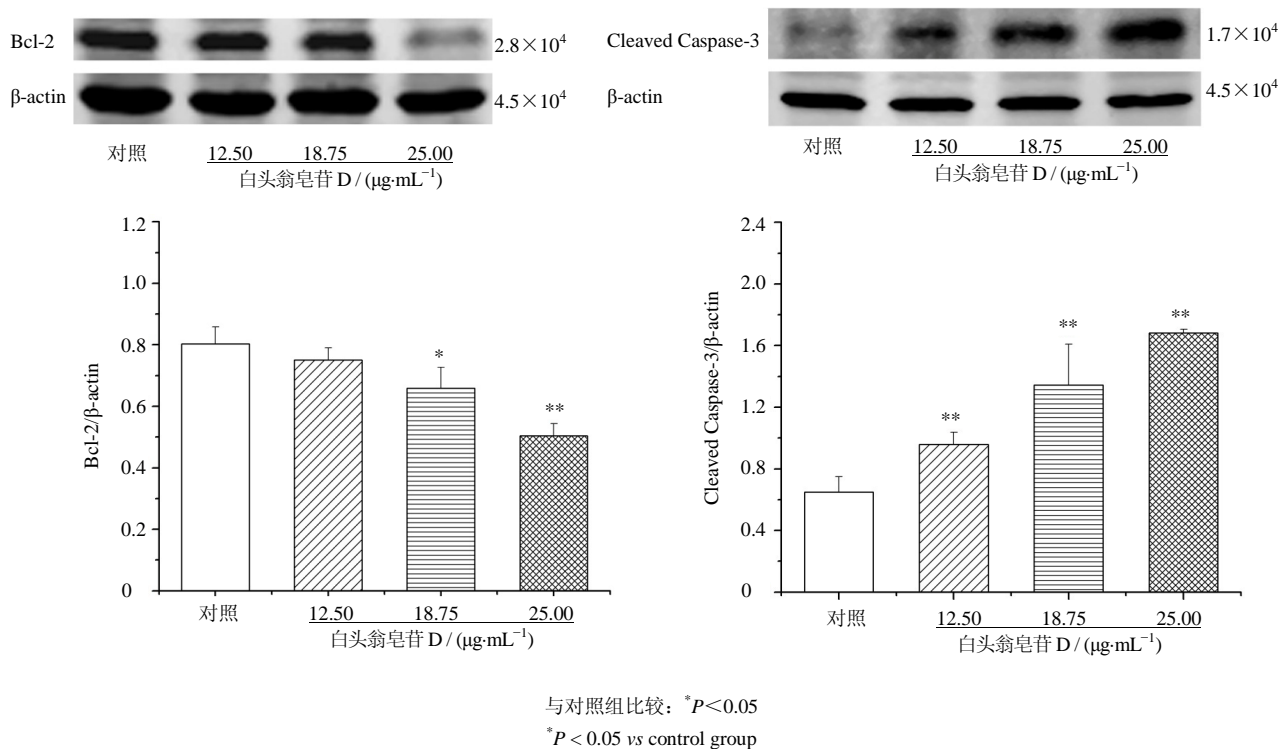


图 7 白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 中 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of pulchinenoside D on expression of Bcl-2 and Caspase-3 proteins in BEL-7402 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

12.50、18.75 和 25.00 μg/mL 白头翁皂苷 D 组 BEL-7402 细胞中剪切并活化的 Caspase-3 蛋白表达较对照组显著提高 ( $P < 0.01$ )。结果见图 7。

#### 4 讨论

细胞活性测定是体外筛选抗肿瘤药物和临床肿瘤药敏试验的重要方法之一, MTT 实验、集落形成实验结果均显示白头翁皂苷 D 对人肝癌细胞 BEL-7402 增殖有明显的抑制作用, 表明其有良好的抗肝癌活性。

细胞死亡分为两种方式, 即坏死与凋亡, 细胞凋亡又称程序性细胞死亡 (Programmed cell death, PCD) [6]。采用 Annexin V-PI 双染流式细胞术考察白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞凋亡的影响, 以探讨其对肝癌细胞的细胞毒作用的相关机制。研究发现, 白头翁皂苷 D 在剂量为 25.00 μg/mL 时作用 BEL-7402 细胞 48 h 的凋亡率为  $81.71\% \pm 3.02\%$ , 提示白头翁皂苷 D 能够显著诱导人肝癌细胞凋亡。通过 Hoechst 33342 染色观察, 发现白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞形态有影响, 随着给药浓度的增加, 发出强烈蓝色荧光的细胞越来越多, 表明大量细胞凋亡, 提示其对 BEL-7402 细胞的凋亡作用呈剂量依赖性, 这与凋亡率的结果相吻合。

在细胞凋亡的早期阶段, 细胞发生病理改变前, 线粒体膜电位就已经下降, 一旦线粒体跨膜电位崩溃, 则细胞凋亡不可逆转 [7]。线粒体膜电位下降是细胞凋亡的特征性标志, 维持正常的线粒体膜电位是抑制细胞凋亡的重要手段 [8]。采用流式细胞术考察白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞线粒体膜电位的影响, 研究结果显示, 白头翁皂苷 D 在 18.75 和 25.00 μg/mL 作用 BEL-7402 细胞 48 h 后, 红色荧光强度与绿色荧光强度的比值呈下降趋势, 与对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 提示白头翁皂苷 D 对 BEL-7402 细胞凋亡作用可能是通过线粒体途径诱导的, 白头翁皂苷 D 通过作用细胞的线粒体, 使膜电位下降, 进而诱导细胞凋亡。

凋亡是多基因严格控制的过程, 涉及一系列凋亡信号转导系统, 目前比较清楚的通路主要有外源性途径和内源性途径。Bcl-2 家族分子在内源性 (线粒体) 途径中起重要作用 [9]。Caspase-3 是 ICE (Interleukin-1β-converting enzyme) 家族中能够执行细胞凋亡的蛋白酶分子, 其底物是聚合多聚酶 (PARP)。PARP 是修复损伤 DNA 的酶, 被 Caspase-3 酶破坏后, 其修复损伤 DNA 的功能丧失, 从而导致细胞凋亡, 它是 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<sup>[10]</sup>。采用 Western blotting 实验,探讨白头翁皂苷 D 诱导细胞凋亡的相关机制。研究表明,18.75 μg/mL 白头翁皂苷 D 可以明显下调 BEL-7402 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达 ( $P<0.05$ ),25.00 μg/mL 白头翁皂苷 D 可以显著下调 Bcl-2 蛋白表达 ( $P<0.01$ ),白头翁皂苷 D 各组 (12.50、18.75、25.00 μg/mL) 均可显著上调 BEL-7402 细胞中磷酸化的 Caspase-3 蛋白表达 ( $P<0.01$ )。提示白头翁皂苷 D 可下调 Bcl-2 蛋白,使得线粒体发生一系列改变,导致 Caspase 家族蛋白被激活,启动细胞凋亡程序。综上所述,白头翁皂苷 D 体外有明显的抗肝癌活性,其抗肝癌活性可能是通过线粒体途径诱导细胞凋亡实现的。

参考文献

[1] 王 英,李文涛. 肝癌干细胞与肝癌的研究进展 [J]. 中国癌症杂志,2011,21(9): 735-738.  
 [2] Kim Y, Bang S C, Lee J H, et al. Pulsatilla saponin D: the antitumor principle from *Pulsatilla koreana* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(9): 915-918.  
 [3] Son M K, Jung K H, Hong S W, et al. SB365, *Pulsatilla* saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the

AKT/mTOR signalling pathway [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 26-33.  
 [4] Son Mi K, Jung K H, Lee H S, et al. SB365, *Pulsatilla* saponin D suppresses proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Reports*, 2013, 30(2): 801-808.  
 [5] Won S, Jung K H, Lee H S, et al. SB365, *Pulsatilla* saponin D, targets c-Met and exerts antiangiogenic and antitumor activities [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(9): 2156-2169.  
 [6] 陆立鹤,吴伟康. 细胞死亡方式研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志,2005,25(6): 507-510.  
 [7] Haeberlein S I. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death [J]. *Neurochem Res*, 2004, 29(3): 521-530.  
 [8] 蔡 循,陈国强,陈 竺,等. 线粒体跨膜电位与细胞凋亡 [J]. 生物化学与生物物理进展,2001,28(1): 3-5.  
 [9] 宋 宇,段 勇. 促凋亡基因 puma 的研究进展 [J]. 医学综述,2011,17(12): 1791-1794.  
 [10] Yim W, Deng X K, Yin F Z, et al. The cytotoxicity induced by brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* proceeds via apoptosis and is mediated by cyclooxygenase 2 and caspase 3 in SMMC 7221 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(9): 1700-1708.