

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.012

· 基础研究 ·

丹参多酚酸盐通过线粒体途径诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡

宋少华, 郭闻渊*, 傅志仁, 刘芳, 王正昕, 丁国善(第二军医大学长征医院器官移植科上海 200003)

[摘要] 目的: 研究丹参多酚酸盐(salvianolate)体外诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡作用及其可能机制。方法: 不同质量浓度丹参多酚酸盐(0.5、1、2 mg/ml)与肝癌细胞共培养 24 h 后, 流式细胞仪检测肝癌细胞凋亡, 线粒体膜电位试剂盒(JC-1)检测线粒体膜电位变化; 比色法测定 1.0 mg/ml 丹参多酚酸盐作用后肝癌细胞内 caspase-8、caspase-9 及 caspase-3 的活性, 流式细胞仪检测培养体系内加入 caspase-9 抑制剂(z-LEHD-fmk)或 caspase-3 抑制剂(z-DEVD-fmk)后细胞凋亡率的变化, Western blotting 检测肝癌细胞内线粒体凋亡途径相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平。结果: 丹参多酚酸盐显著诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡($P < 0.05$), 同时线粒体膜电位随着药物浓度的升高而加剧下降($P < 0.05$)。1.0 mg/ml 丹参多酚酸盐处理肝癌细胞 24 h 后 caspase-9 与 caspase-3 的活性明显升高($P < 0.05$), 而 caspase-8 的活性无明显变化($P > 0.05$); 当培养体系内加入 caspase-9 或 caspase-3 活性抑制剂后, 丹参多酚酸盐诱导肿瘤细胞凋亡的作用明显降低($P < 0.05$)。Western blotting 检测显示, 丹参多酚酸盐处理组前凋亡蛋白 Bax 表达明显升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低。结论: 丹参多酚酸盐(0.5~2.0 mg/ml)剂量具有促进肝癌细胞凋亡的作用, 且有剂量依赖的趋势, 其机制与线粒体凋亡途径有关。

[关键词] 丹参多酚酸盐; 肝癌细胞; 凋亡; 线粒体

[中图分类号] R735.7; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0062-05

Salvianolate induces apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells through mitochondrial pathway

SONG Shao-hua*, GUO Wen-yuan*, FU Zhi-ren, LIU Fang, WANG Zheng-xin, DING Guo-shan (Organ Transplantation Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the apoptosis-inducing effect of salvianolate on hepatoma SMMC-7721 cells and the underlying mechanism. **Methods:** SMMC-7721 cells were co-cultured *in vitro* with different concentrations (0.5, 1, 2 mg/ml) of salvianolate for 24 h. The apoptotic SMMC-7721 cells were examined by flow cytometry, and the changes of mitochondrial transmembrane potential were examined by mitochondrial transmembrane potential JC-1 kit. The activities of caspase-8, caspase-9, and caspase-3 were detected by spectrophotometry in the hepatoma SMMC-7721 cells after co-cultured with 1 mg/ml salvianolate. The changes of apoptotic SMMC-7721 cells induced by salvianolate in the presence or absence of caspase-9 inhibitor or caspase-3 inhibitor were measured by flow cytometry. The expressions of pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 were detected by Western blotting analysis. **Results:** Salvianolate significantly induced apoptosis of hepatoma SMMC-7721 cells ($P < 0.05$), and the decline of mitochondrial membrane potential increased with the increase of salvianolate concentration ($P < 0.05$). The activities of caspase-9 and caspase-3, but not caspase-8, were increased in hepatoma cells after treatment with 1 mg/ml salvianolate for 24 h ($P < 0.05$). The apoptosis-inducing effect of salvianolate was significantly decreased in the presence of caspase-9 or caspase-3 inhibitors ($P < 0.05$). Western blotting results showed that salvianolate increased pro-apoptotic protein Bax expression and decreased anti-apoptotic protein Bcl-2 expression. **Conclusion:** Salvianolate can induce the apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells in a dose-dependent manner, which is probably mediated by mitochondrial apoptosis pathway.

[Key words] salvianolate; hepatoma cells; apoptosis; mitochondria

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 62-66]

[基金项目] 上海市卫生局青年科研项目资助(No. 2008Y085); 卫生部国家科技支撑计划课题资助(No. 2008BAI60B03)。Project supported by the Youth Research Program of Shanghai Health Bureau (No. 2008Y085), and the National Science and Technology Supporting Program of the Ministry of Health (No. 2008BAI60B03)

[作者简介] 宋少华(1979-), 男, 辽宁省建平县人, 博士研究生, 主要从事肝脏疾病与肝脏移植研究, E-mail: 77472087@163.com; 郭闻渊(1975-), 男, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 硕士, 讲师, 主要从事肝脏疾病与肝脏移植研究。* 同为第一作者

[通信作者] 傅志仁(FU Zhi-ren, corresponding author), E-mail: zhirenfu@163.com

丹参是人药历史悠久、应用广泛的传统中药,具有活血化瘀、抗氧化、抗氧自由基和抗栓、抗血小板聚集、减轻组织缺血再灌注损伤等作用。其药效成分包括脂溶性及水溶性成分,脂溶性成分以丹参酮为主,水溶性成分主要为丹参多酚酸盐。大量的研究^[1-3]显示,丹参酮对多种肿瘤细胞具有杀伤作用,其机制包括诱导肿瘤细胞分化或促进肿瘤细胞凋亡等,目前已经在白血病、肝癌、胃癌等临床治疗得到应用。然而,丹参多酚酸盐是否具有抑制肿瘤细胞生长的作用,目前国内外鲜有相关文献报道。本课题主要研究丹参多酚酸盐对人肝癌 SMMC-7721 细胞的致凋亡作用,为临床更好地开发利用丹参提实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

丹参多酚酸盐购自上海绿谷制药有限公司,RPMI 1640 培养液、0.25% 胰酶、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司。ApoScreen™ Annexin V-RPE 凋亡检测试剂盒购自美国 Southern Biotech 公司,线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)购自美国 Alexis Biochemical 公司,caspase-8、caspase-9、caspase-3 活性检测试剂盒(分光光度法)购自南京凯基生物公司。caspase-9 抑制剂(z-LEHD-fmk)、caspase3 抑制剂(z-DEVD-fmk)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,Bax、Bcl-2、 β -actin 第一抗体及辣根过氧化物酶标记的第二抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中科院上海细胞生物学研究所,细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,37 °C、5% CO₂ 密闭传代培养,每 2~3 d 换液 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。细胞体外培养时丹参多酚酸盐终质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/ml,作用时间为 24 h。

1.3 流式细胞术检测丹参多酚酸盐对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

收集人肝癌 SMMC-7721 细胞,4 °C PBS 清洗 2 次,再将细胞沉淀充分混匀,调整细胞密度约为 1×10^6 /ml,细胞悬液经过滤后,吸取 100 μ l 悬液至试管内,同时加入 10 μ l Annexin V,冰上避光作用约 15 min 后每管各加入 $1 \times$ 缓冲液 380 μ l 和 10 μ l 7-AAD,流式细胞仪检测凋亡率,并应用 Cellquest 软件对数据进行初步分析。

1.4 荧光分光光度计检测 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位

SMMC-7721 细胞密度约为 1×10^6 /ml,吸取 0.5 ml 细胞悬液,入 0.5 ml JC-1 染色液,吹打混匀,37 °C 孵育 20 min。孵育结束后,600 \times g 4 °C 离心 3~4 min,沉淀细胞,弃上清。用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,用适量 JC-1 染色缓冲液重悬后,用荧光分光光度计检测。

1.5 分光光度法检测 SMMC-7721 细胞 caspase 活性

收集各组待测细胞,按着分光光度法检测试剂盒说明书操作,检测细胞内 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 活性。用 50 μ l 冷裂解液悬浮细胞冰上 20 min,4 °C、12 500 \times g 离心 10 min,取上清并测定蛋白浓度。吸取含有等量蛋白(100 μ g)的上述裂解液上清并用裂解液调整各样本体积均为 50 μ l,加入 50 μ l 的 $2 \times$ Reaction Buffer 并加入 5 μ l 相应的底物,37 °C 避光孵育 4 h 后,酶标仪在 $\lambda = 405$ nm 测定其光密度(D)值。用 $D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}$ 的比值表示 caspase 活化程度。

1.6 Western blotting 法检测 SMMC-7721 细胞中 Bax 以及 Bcl-2 的表达

收集对照组以及 50 μ g/ml 丹参多酚酸盐处理 24 h 的细胞(2×10^6 个以上),用冷 PBS 洗 2 次,加入裂解液于 4 °C 下裂解 30 min,4 °C、12 500 \times g 离心 5 min,收集上清并测定蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 分离蛋白,转至尼龙滤膜上。加入 1:1 000 稀释第一抗体反应 2 h 后,用 TBST 洗 2 次,再加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。最后显影并曝光。

1.7 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数间比较采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用最小显著性差异法(LSD 检验),应用 SPSS 13.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹参多酚酸盐诱导肝癌细胞的凋亡

丹参多酚酸盐浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/ml,与肝癌细胞共培养 24 h,收集细胞检测凋亡率。结果如图 1 所示,丹参多酚酸盐具有促进肝癌细胞凋亡的作用,且有剂量依赖的趋势。

2.2 丹参多酚酸盐对肝癌细胞线粒体膜电位的影响

不同浓度丹参多酚酸盐与肝癌细胞共培养 24 h 后,可见随着丹参多酚酸盐浓度的升高线粒体膜电位的下降率也随之升高($P < 0.05$,图 2)。表明丹参多酚酸盐诱导肝癌细胞凋亡可能与线粒体途径机制有关。

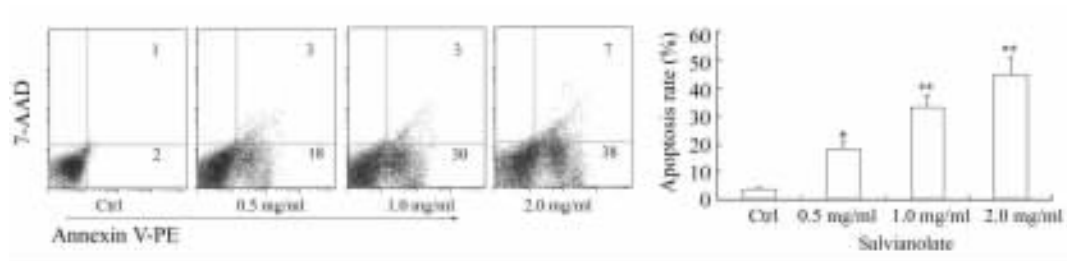


图1 丹参多酚酸盐诱导肝癌细胞凋亡

Fig.1 Salviaolate induced apoptosis of hepatoma cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl

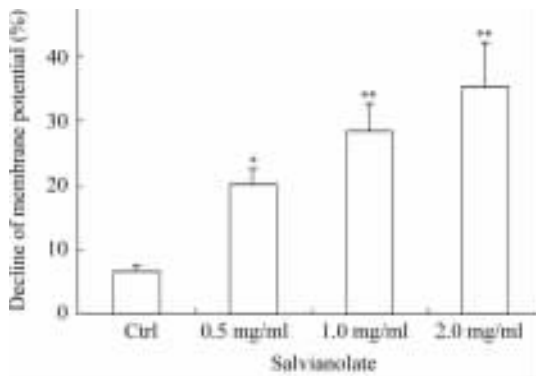


图2 丹参多酚酸盐对肝癌细胞线粒体膜电位的影响

Fig.2 Effects of salviaolate on mitochondrial membrane potential of hepatoma cells

* $P < 0.05$ vs, ** $P < 0.01$ Ctrl

2.3 丹参多酚酸盐对肝癌细胞 caspase 活性的影响

分光光度法检测显示,与对照组相比,1.0 mg/ml丹参多酚酸盐处理24 h后,肝癌细胞内 caspase-9 与 caspase-3 的活性明显升($P < 0.05$), caspase-8 的活性基本无变化。

表1 丹参多酚酸盐对肿瘤细胞内 caspase 活性影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of salviaolate on caspase activity of hepatoma cells($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	caspase-3	caspase-9	caspase-8
Ctrl	0.25 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Salviaolate	0.50 ± 0.01*	0.20 ± 0.19*	0.10 ± 0.01

* $P < 0.05$ vs Ctrl

2.4 抑制 caspase 活性对丹参多酚酸盐诱导肝癌细胞凋亡的影响

以 20 μmol/L z-LEHD-fmk 或 20 μmol/L z-DEVD-fmk 预处理肝癌细胞 1 h,然后与 1.0 mg/ml 丹参多酚酸盐共培养 24 h,检测肝癌细胞的凋亡率。结果显示, caspase-9 抑制剂或 caspase-3 抑制剂预处理能够明显降低丹参多酚酸盐致肿瘤细胞凋亡的作用(图3)。

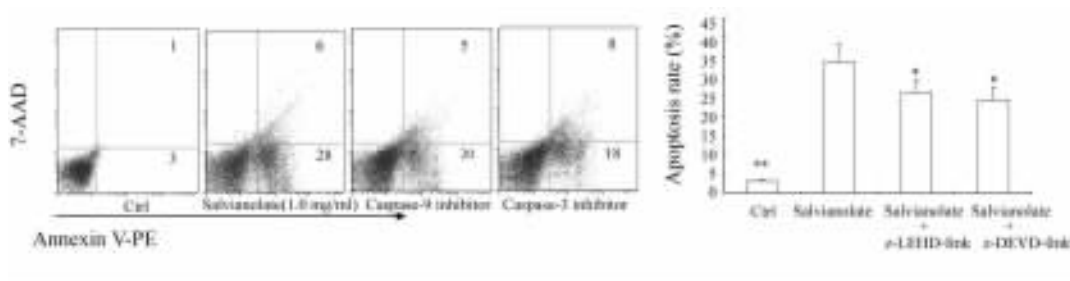


图3 抑制 caspase-3 或 caspase-9 活性对丹参多酚酸盐诱导肿瘤细胞凋亡的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.3 Effects of caspase-3 or caspase-9 inhibitors on salviaolate-induced apoptosis of hepatoma cells

* $P < 0.05$ vs salviaolate

2.5 丹参多酚酸盐对肝癌细胞线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

肝癌细胞与不同浓度丹参多酚酸盐共培养 24 h 后,检测肿瘤细胞内线粒体凋亡途径相关的前凋亡

蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达。结果如图 4 所示,丹参多酚酸盐促进前凋亡蛋白 Bax 表达、抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,且有剂量依赖趋势。

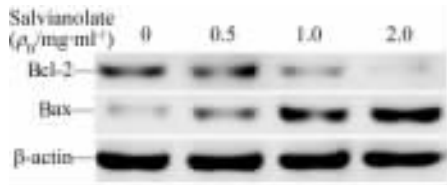


图4 丹参多酚酸盐对肝癌细胞内 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of salviaonolate on expressions of Bax and Bcl-2 protein in hepatoma cells

3 讨论

肝癌是严重危害国人健康和生命的恶性肿瘤之一,居所有肿瘤患者死亡原因的第二位。肿瘤的发生、发展与细胞凋亡密切相关。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程,在调节细胞分化发育、组织发生、器官形成及维持机体稳态中具有重要意义。机体凋亡活性下调是引起肿瘤发生的重要致病因素,目前许多抗肿瘤的化疗药物主要通过诱导其凋亡来杀伤肿瘤细胞的^[4-6]。

细胞凋亡是一个十分复杂的过程,这种由基因精确调控程序性死亡方式的主要特点是:尽管促进凋亡的具体信号途径尚未完全清楚,但是一些诱导分子最终都通过活化一系列被称为半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteases, caspase)的信号分子参与的共同通路来诱导凋亡过程,从而最终导致 DNA 断裂以及与凋亡相关的形态学改变^[7-8]。目前已知两种信号途径可以诱导细胞凋亡发生:第一途径即外部信号途径亦称死亡受体途径,主要由 Fas(CD95)死亡受体或其他 TNF- α 受体超家族成员活化并募集细胞膜旁 caspase (主要为 caspases-8),然后活化效应性 caspases-3,后者促进细胞凋亡^[9-11];第二种途径指内部途径或称线粒体途径,其特点是线粒体级联反应导致细胞色素 C 释放,活化 caspases-9,并形成凋亡小体及多蛋白复合物,进而活化下游 caspase-3,放大死亡信号,诱导细胞凋亡^[12-15]。可见两种途径分别特异性活化 caspases-8 或活化 caspase-9,两种途径最后都活化共同 caspase-3 导致细胞凋亡。

丹参是一种临床常用的中药,具有广泛而复杂的药理作用,能够改善缺血再灌注损伤、发挥免疫调节和抗感染等作用。丹参中的脂溶性成分丹参酮可对肿瘤细胞产生杀伤、诱导分化和凋亡、抑制侵袭和转移等抗肿瘤作用^[16-20]。丹参多酚酸盐是丹参中最重要的水溶性有效活性成分,其主要成分为丹参乙酸镁,具有明确的活血、化瘀、通脉作用和良好的临床耐受性。与传统中药丹参相比,丹参多酚酸盐

具有有效成分明确、质量容易监控、毒副作用小、疗效稳定等优点,在临床应用上具有重大的意义和价值^[21-24]。

目前对丹参多酚酸盐是否也具有抗肿瘤作用的研究和报道甚少,本课题通过明确丹参多酚酸盐对人肝癌细胞的作用来研究其抗肿瘤效果,采用 Annexin V/7-AAD 染色流式细胞术分析细胞凋亡率的结果表明,丹参多酚酸盐作用于人肝癌细胞后,肝癌细胞凋亡率明显的升高($P < 0.05$),细胞线粒体膜电位显著降低,且有剂量依赖趋势。上述结果提示丹参多酚酸盐诱导肿瘤细胞凋亡可能与线粒体途径有关。近年来的研究表明线粒体是细胞凋亡发生发展的关键场所,凋亡过程中的重要形态学变化与线粒体跨膜电位的改变密切相关。在致凋亡因子的刺激下,细胞线粒体跨膜电位降低或丧失^[25-27],线粒体基质中释放出致凋亡活性物质,如细胞色素 C^[28-30],凋亡诱导因子 AIF^[31-32]等,这些物质进入胞质或胞核,最终导致细胞不可逆凋亡。我们首先检测与线粒体途径凋亡密切相关的 caspases-9 以及与死亡受体途径凋亡密切相关的 caspases-8 酶活性。结果显示 1.0 mg/L 丹参多酚酸盐与肝癌细胞共培养 24 h 后,细胞内 caspase-9 活性明显升高,而 caspases-8 活性略有升高但无统计学意义。蛋白印迹结果表明丹参多酚酸盐剂量依赖性促进细胞线粒体内前凋亡蛋白 Bax 表达,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,进一步证实线粒体途径是丹参多酚酸盐诱导肿瘤细胞凋亡的重要机制。我们同时也注意到,采用特异性抑制剂抑制 caspase-9 或 caspase-3 活性,能够部分抑制丹参多酚酸盐对肿瘤细胞凋亡的诱导,但是作用有限,表明丹参多酚酸盐可能同时通过其他途径诱导肿瘤细胞凋亡,有待于进一步研究。

总之,本实验结果显示丹参多酚酸盐(0.5 ~ 2.0 mg/ml)能够诱导体外培养的人肝癌细胞凋亡且有剂量依赖趋势,其机制与线粒体凋亡途径有关。

[参 考 文 献]

- [1] Shan YF, Shen X, Xie YK, Chen JC, Shi HQ, Yu ZP, *et al.* Inhibitory effects of tanshinone II-A on invasion and metastasis of human colon carcinoma cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30 (11): 1537-1542.
- [2] Liu JJ, Zhang Y, Lin DJ, Xiao RZ. Tanshinone IIA inhibits leukemia THP-1 cell growth by induction of apoptosis [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(4): 1075-1081.
- [3] Su CC, Chen GW, Lin JG. Growth inhibition and apoptosis induction by tanshinone I in human colon cancer Colo 205 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 22(5): 613-618.
- [4] Alajez NM, Shi W, Hui AB, Yue S, Ng R, Lo KW, *et al.* Tar-

- geted depletion of BMI1 sensitizes tumor cells to P53-mediated apoptosis in response to radiation therapy [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(11): 1469-1479.
- [5] Kim JK, Jung KH, Noh JH, Eun JW, Bae HJ, Xie HJ, *et al.* Targeted disruption of S100P suppresses tumor cell growth by down-regulation of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(6): 1257-1264.
- [6] 原少斐, 杜红延, 陈筱婷, 汪森明, 李明. 抗人 stathmin 单克隆抗体与紫杉醇联用对人肝癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(2): 165-169.
- [7] Sun SY, Hail N Jr, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(9): 662-672.
- [8] Yan X, Feng C, Chen Q, Li W, Wang H, Lv L, *et al.* Effects of sodium fluoride treatment *in vitro* on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts [J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83(5): 451-458.
- [9] Naderi S, Blomhoff HK. Activation of cAMP signaling enhances Fas-mediated apoptosis and activation-induced cell death through potentiation of caspase 8 activation [J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(12): 833-836.
- [10] Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice [J]. *Immunity*, 1999, 10(6): 629-639.
- [11] Chen T, Wong YS, Zheng W, Liu J. Caspase- and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(1): 54-60.
- [12] Lee HJ, Lee HJ, Lee EO, Ko SG, Bae HS, Kim CH, *et al.* Mitochondria-cytochrome c-caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2008, 270(2): 342-353.
- [13] Barczyk K, Kreuter M, Pryjma J, Booy EP, Maddika S, Ghavami S, *et al.* Serum cytochrome c indicates *in vivo* apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(2): 167-173.
- [14] Hill MM, Adrain C, Martin SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows [J]. *Mol Interv*, 2003, 3(1): 19-26.
- [15] 张淑杰, 王新华, 成秉林. 苦参碱诱导胶质瘤 C6 细胞凋亡及其可能的基因机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(5): 451-457.
- [16] Lee WY, Liu KW, Yeung JH. Reactive oxygen species-mediated kinase activation by dihydrotanshinone in tanshinones-induced apoptosis in HepG2 cells [J]. *Cancer Lett*, 2009, 285(1): 46-57.
- [17] Wu WL, Change WL, Chen CF. Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines [J]. *Am J Chin Med*, 1991, 19(3): 207-216.
- [18] Ryu SY, Lee CO, Choi SU. *In vitro* cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant medica*, 1997, 63(4): 339-342.
- [19] Lee WY, Chiu LC, Yeung JH. Cytotoxicity of major tanshinones isolated from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on HepG2 cells in relation to glutathione perturbation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(1): 328-338.
- [20] Mosaddik MA. *In vitro* cytotoxicity of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* bunge against P388 lymphocytic leukemia cells [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(8): 682-685.
- [21] Xu M, Wang YP, Luo WB, Xuan LJ. Salvianolate inhibits proliferation and endothelin release in cultured rat mesangial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(7): 629-633.
- [22] 王洁, 张均田. 总丹酚酸抗脑缺血与抗血栓的关系 [J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(3): 204-206.
- [23] 高蕊, 张颖, 王书臣, 许羚, 郑青山. 丹参酚酸盐在健康志愿者的药代动力学和药效学研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(11): 1209-1212.
- [24] 王明伟, 张殿福, 唐建金, 陈波, 王连生, 杨志健, 等. 丹参多酚酸盐对猪急性心肌梗死后心肌细胞凋亡和心功能的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(2): 140-144.
- [25] Lee JC, Su CL, Chen LL, Won SJ. Formosanin C-induced apoptosis requires activation of caspase-2 and change of mitochondrial membrane potential [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(3): 503-513.
- [26] Hong J, Samudio I, Chintharlapalli S, Safe S. 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl) methanes decrease mitochondrial membrane potential and induce apoptosis in endometrial and other cancer cell lines [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(7): 492-507.
- [27] Chiu PY, Luk KF, Leung HY, Ng KM, Ko KM. Schisandrin B stereoisomers protect against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and inhibit associated changes in Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition and mitochondrial membrane potential in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Life Sci*, 2008, 82(21-22): 1092-1101.
- [28] Mohamad N, Gutierrez A, Nunez M, Cocca C, Martin G, Cricco G, *et al.* Mitochondrial apoptotic pathways [J]. *Biocell*, 2005, 29(2): 149-161.
- [29] Wu C, Yan L, Depre C, Dhar SK, Shen YT, Sadoshima J, *et al.* Cytochrome c oxidase III as a mechanism for apoptosis in heart failure following myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(4): C928-934.
- [30] Azuma H, Yoshida Y, Paul D, Shinoda S, Tsukube H, Nagasaki T. Cytochrome c-binding "proteo-dendrimers" as new types of apoptosis inhibitors working in HeLa cell systems [J]. *Org Biomol Chem*, 2009, 7(8): 1700-1704.
- [31] Seth R, Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(35): 31230-31239.
- [32] Takada E, Hata K, Mizuguchi J. C-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)-dependent nuclear translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) following engagement of membrane immunoglobulin on WEHI-231 B lymphoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(5): 1927-1934.

[收稿日期] 2009-11-20 [修回日期] 2009-12-25

[本文编辑] 王莹