

- [15] Liu G C, Fang F, Zhou J, *et al.* Deletion of p47phox attenuates the progression of diabetic nephropathy and reduces the severity of diabetes in the Akita mouse [J]. *Diabetologia*, 2012, 55 (9): 2522-2532.
- [16] Suh S W, Gum E T, Hamby A M, *et al.* Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117 (4): 910-918.

## 结合斑蝥素对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的作用

刘 流<sup>1</sup>, 郭 侃<sup>1</sup>, 刘 云<sup>2,3</sup>, 裴 显<sup>1</sup>, 张 沛<sup>4</sup>, 李晓飞<sup>1,2\*</sup>

(1. 遵义医学院基础医学院, 贵州 遵义 563003; 2. 贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治特色重点实验室, 贵州 遵义 563003; 3. 遵义医学院医学与生物学研究中心, 贵州 遵义 563003; 4. 贵州省柏强制药有限公司, 贵州 贵阳 550001)

**摘要:** 目的 研究贵州罗甸地区南方大斑蝥 (*Mylabris phalerata* Pallas) 和黄黑小斑蝥 (*Mylabris cichorii* Linnaeus) 体内的结合斑蝥素 (conjugated cantharidin) 对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响。方法 采用两种斑蝥三氯甲烷提取物的水浸液获取结合斑蝥素。运用磺酰罗丹明染色法 (SRB) 检测结合斑蝥素对 HepG2 细胞增殖的作用。利用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测结合斑蝥素对 HepG2 细胞凋亡的影响。应用倒置相差显微镜、透射电子显微镜观察凋亡细胞的形态学变化。结果 两种结合斑蝥素对 HepG2 细胞的增殖均有显著的抑制作用, 呈剂量依赖性, 其半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 0.90、0.85 mg/L。流式细胞术结果显示, 以 0.90 mg/L 的南方大斑蝥结合斑蝥素和 0.85 mg/L 黄黑小斑蝥结合斑蝥素作用 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞呈典型的凋亡形态特征, 凋亡率分别为 (10.5 ± 1.45)% 和 (12.8 ± 1.53)%; 结论 两种来源斑蝥体内结合斑蝥素均可抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖并促进其凋亡。

**关键词:** 结合斑蝥素; 南方大斑蝥; 黄黑小斑蝥; 肝癌 HepG2 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)08-1683-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.005

## Effects of conjugated cantharidin on the proliferation and apoptosis of hepatoma carcinoma HepG2 cells

LIU Liu<sup>1</sup>, GUO Kan<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>2,3</sup>, PEI Xian<sup>1</sup>, ZHANG Pei<sup>4</sup>, LI Xiao-Fei<sup>1,2\*</sup>

(1. Preclinical Medicine School, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Guizhou Provincial College-based Key Lab for Tumor Prevention and Treatment with Distinctive Medicines, Zunyi 563003, China; 3. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 4. Guizhou Baiqiang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550001, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the influence of conjugated cantharidin from *Mylabris phalerata* Pallas; *Mylabris cichorii* Linnaeus, collected from Luodian District, Guizhou Province, on the proliferation and apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. **METHODS** Conjugated cantharidin was obtained from water soluble matter of trichloromethane extracts of two sources of *Mylabris*. SRB assay was used to study the effects of conjugated cantharidin on the proliferation of HepG2 cells. Annexin V-FITC/PI staining was employed to detect the influence of conjugated cantharidin on the apoptosis of HepG2 cells. Morphological alteration of apoptotic cells was observed by phase con-

收稿日期: 2016-02-02

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81260488); 贵州省科技厅中药现代化项目 (黔科合 ZY 字 [2013] 3012); 贵州省教育厅特色重点实验室建设项目 (黔教合 KY 字 [2014] 212)

**作者简介:** 刘 流 (1976—), 女, 硕士, 副教授, 从事昆虫资源开发与利用研究。Tel: (0851) 28609647, E-mail: 403365478@qq.com

\* **通信作者:** 李晓飞 (1979—), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事药用昆虫及昆虫毒素方面的研究工作。Tel: (0851) 28609647, E-mail: lixiaofei35@gmail.com

trast microscopy and transmission electron microscopy. **RESULTS** Two kinds of conjugated cantharidin all exerted obvious inhibitory effects on the proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner; the  $IC_{50}$  value was 0.90 mg/L and 0.85 mg/L, respectively. The results of flow cytometry showed that represented  $(10.5 \pm 1.45)\%$  and  $(12.8 \pm 1.53)\%$  apoptosis rates, respectively, when 0.90 mg/L conjugated cantharidin originated from *M. phalerata* and 0.85 mg/L conjugated cantharidin originated from *M. cichorii* were incubated with HepG2 cells for 24 h. Morphological observation indicated that cells appeared typical characteristics of apoptotic morphology. **CONCLUSION** The conjugated cantharidin from two kinds of *Malybris* can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HepG2 cells.

**KEY WORDS:** conjugated cantharidin; *Malybris phalerata* Pallas; *Malybris cichorii* Linnaeus; human hepatoma HepG2 cells; proliferation; apoptosis

斑蝥 (Spanish fly) 是芫菁科南方大斑蝥 (*Malybris phalerata* Pallas) 或黄黑小斑蝥 (*Malybris cichorii* Linnaeus) 的干燥虫体<sup>[1]</sup>。斑蝥素 (cantharidin, CA) 已被证实对肝癌、胰腺癌、结直肠癌、膀胱癌以及白血病等恶性肿瘤具有抑制作用<sup>[2-6]</sup>, 但斑蝥素可引起较严重的胃肠道或泌尿道不良反应<sup>[7]</sup>, 临床应用受到限制。芫菁体内除了游离型斑蝥素外, 还有另一种形式—结合型斑蝥素, 是以斑蝥素酸镁、斑蝥素酸钾和斑蝥素酸钙等盐类衍生物的形式共存, 是芫菁体内斑蝥素的重要组成部分<sup>[8-9]</sup>。斑蝥作为一种用于抗癌的传统中药材, 其抗癌成分是否仅局限于游离斑蝥素? 为了考察斑蝥体中另一重要成分结合斑蝥素是否对肿瘤也有抑制作用, 课题组通过水提法提取了两种来源斑蝥 (即南方大斑蝥和黄黑小斑蝥) 的结合斑蝥素, 探讨结合斑蝥素对人肝癌细胞 HepG2 细胞的作用, 为斑蝥抗癌活性物质的筛选和研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料与仪器 两种来源斑蝥虫体收集自贵州省罗甸县境内, 经遵义医学院李晓飞教授分别鉴定为南方大斑蝥和黄黑小斑蝥。人肝癌细胞 HepG2 细胞由遵义医学院医学与生物研究中心提供; 斑蝥酸钠自制 (纯度  $\geq 98\%$ ), 其制备方法是: 将斑蝥素加入氢氧化钠水溶液, 加热溶解后, 再加活性炭回流脱色 0.5 ~ 1 h, 热滤, 水洗, 减压浓缩, 加入乙醇, 冷却至室温析出固体烘干即可<sup>[10]</sup>; RPMI-1640 培养基 (美国 Hyclone 公司, 批号 NYH0953); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司, 批号 ATK66678); 磺酰罗丹明 (SRB) (美国 Sigma 公司, 批号 341738-5G); Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (美国 eBioscience 公司, 批号 E09656-1652); 胰蛋白酶 (北京 Solarbio 公司, 批号 20130926); 其余试剂均为国产分析纯。

3131 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、Multiskan spectrum 全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); H-7650 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); 超净工作台 (苏州净化公司, 型号 JJ-CJ-IFD); Ti-S 倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司); 超纯水制备系统 (美国 Millipore 公司, 型号 Milli-Q)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 结合斑蝥素提取纯化<sup>[11]</sup> 南方大斑蝥和黄黑小斑蝥虫体烘干, 粉碎, 干燥, 加足量三氯甲烷, 摇匀, 静止 24 h, 过滤, 残渣用三氯甲烷冲洗 3 次, 干燥, 获去除游离斑蝥素的斑蝥粉末, 加蒸馏水, 按料液比 10 : 20 浸泡 24 h, 过滤, 分别得南方大斑蝥结合斑蝥素 (以下简称 BCMP) 和黄黑小斑蝥结合斑蝥素 (以下简称 BCML), 抽滤除菌, 备用。

1.2.2 人肝癌细胞 HepG2 细胞培养 采用 RPMI-1640 培养基 (含 10% 的胎牛血清), 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养。待细胞长至对数生长期, 弃培养液, PBS 冲洗, 0.25% 胰蛋白酶消化, 加培养液吹打均匀成单细胞悬液, 取 100  $\mu$ L 细胞悬液 (含 8 000 ~ 10 000 个细胞) 接种 96 孔培养板, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

1.2.3 磺酰罗丹明 (sulforhodamine B, SRB) 染色法<sup>[12]</sup> 于 96 孔板接种细胞 3 块, 一块为对照板 (T<sub>0</sub>), 另两块为实验板 (T)。CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20 h 后, 将对照板取出, 用预冷的 50% 三氯乙酸 (TCA) 固定, 待测。实验板中分别加入不同剂量的 BCMP 和 BCML, 同时设空白对照组 (加与实验组等量的培养基) 及阳性对照组 (斑蝥酸钠 2.71 mg/L), 每组设 5 个复孔, 继续培养 48 h 后取出培养板, 以预冷 50% TCA 固定 (终剂量为 10%), 1 h (4 °C) 后以去离子水冲洗, 自然晾

干,用 100  $\mu\text{L}$  0.4% 的 SRB 染色,10 min 后用 0.1% 醋酸冲洗、晾干,最后用 200  $\mu\text{L}$  10mmol/L 的缓冲 Tris 碱液 (pH 10.5) 溶解,在酶标仪上选择 530 nm 处测吸光度值 ( $D$  值),按照下列公式计算生长抑制率 (inhibition ratio, IR)。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率} = \left[ 1 - \frac{D(T) - D(T_0)}{D(C) - D(T_0)} \right] \times 100\%$$

1.2.4 两种来源斑蝥体内结合斑蝥素对人肝癌细胞 HepG2 形态的影响 将不同剂量的 BCMP 和 BCML 分别作用于 HepG2 肝癌细胞,设对照组,培养 48 h 后,置于倒置显微镜下观察细胞的生长情况及形态变化。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

细胞接种于 6 孔板,每孔加 2 mL 培养基,CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,弃上清,分别加入含 BCMP 和 BCML 的培养基,使其终质量浓度分别为各自的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>),并设空白对照组,每组设 3 个复孔,继续培养 24 h。分别消化收集各组细胞,PBS 洗涤 1 次,1  $\times$  binding buffer 洗涤 1 次,调整细胞密度为 1 ~ 5  $\times 10^6$ /mL,加入 5  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC 于细胞悬液中,室温孵育 10 min,1  $\times$  binding buffer 洗涤,离心,弃上清,于 200  $\mu\text{L}$  1  $\times$  binding buffer 中重悬,加入 5  $\mu\text{L}$  PI 于细胞悬液中,避光、混匀,进行流式细胞仪检测。

1.2.6 透射电子显微镜观察细胞超微结构的变化

将细胞 (按每孔 5  $\times 10^5$  个) 接种于 6 孔板上,每孔加 2 mL 10% 胎牛血清培养基,于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,弃培养液,分别加入含 BCMP 和 BCML 的培养基,使其终质量浓度分别为各自的 IC<sub>50</sub>,并设空白对照组,每组设 3 个复孔,继续培养 24 h。分别消化收集各组细胞,PBS 漂洗,2.5% 戊二醛固定液固定细胞 2 h,1% 四氧化锇后固定 30 min,梯度乙醇-丙酮脱水,半浸透、浸透,Epon812 树脂包埋,聚合,超薄切片,醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重染色,于透射电镜下观察并拍照。

1.2.7 统计方法 数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,并用 SPSS 16.0 软件包处理,单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果

2.1 两种来源斑蝥体内结合斑蝥素对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 经气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 检测,按“1.2.1”项方法制备的提

取的南方大斑蝥与黄黑小斑蝥体内所含结合斑蝥素含有量分别为 375 mg/L 和 290 mg/L<sup>[13]</sup>。由表 1 所示,BCMP 在 0.38 ~ 1.88 mg/L 范围内呈剂量依赖性,随着剂量的增加,对癌细胞的抑制效果愈显著;以 BCMP 质量浓度为横坐标抑制率为纵坐标,作对数曲线得回归方程为  $Y = 44.804 \ln(X) + 54.943$  ( $r^2 = 0.9810$ ),经计算 BCMP 的 IC<sub>50</sub> 为 0.90 mg/L;BCML 在 0.29 ~ 1.45 mg/L 质量浓度范围内也能抑制癌细胞的生长,并呈剂量依赖性,其回归方程为  $Y = 39.372 \ln(X) + 56.239$  ( $r^2 = 0.9919$ ),IC<sub>50</sub> 为 0.85 mg/L。同质量浓度下,BCML 对 HepG2 细胞抑制作用要强于 BCMP。

表 1 两种来源斑蝥体内结合斑蝥素对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab. 1 Effects of conjugated cantharidin from two sources of *Mylabris* on the proliferation of human hepatoma carcinoma HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/(mg·L <sup>-1</sup> )	吸光度值	生长抑制率/%
BCMP 组	1.88	0.51 $\pm$ 0.06 *	86.9
BCMP 组	1.50	0.65 $\pm$ 0.05 *	72.3
BCMP 组	1.13	0.89 $\pm$ 0.04 *	60.6
BCMP 组	0.75	1.14 $\pm$ 0.05 *	53.3
BCMP 组	0.38	1.45 $\pm$ 0.07 *	31.4
BCML 组	1.45	0.69 $\pm$ 0.03 *	72.4
BCML 组	1.16	0.81 $\pm$ 0.05 *	63.3
BCML 组	0.87	1.01 $\pm$ 0.05 *	48.8
BCML 组	0.58	1.24 $\pm$ 0.07 *	31.9
BCML 组	0.29	1.55 $\pm$ 0.08 *	9.6
阴性对照组	-	1.68 $\pm$ 0.04	-
对照板 T <sub>0</sub>	-	0.31 $\pm$ 0.03	-
阳性对照组	2.71	0.78 $\pm$ 0.05 *	65.7

注:与阴性对照组比较,\* $P < 0.05$

2.2 两种来源斑蝥体内结合斑蝥素对人肝癌 HepG2 细胞形态的影响 图 1 所示,当 BCMP 剂量为 0.38 mg/L 时,细胞数目略减少,形态少许变圆;剂量增加到 0.75 mg/L 和 1.13 mg/L 时,细胞数目明显减少,形态不规则、变圆,细胞有浮起或贴壁差;质量浓度达到 1.50 mg/L 和 1.88 mg/L 时,细胞存留很少,大部分细胞已坏死或凋亡,形态变化更加明显。如图 2 所示,BCML 以低 (0.29 mg/L)、中 (0.58 mg/L 和 0.87 mg/L)、高剂量 (1.16 mg/L 和 1.45 mg/L) 作用细胞后,其细胞形态变化和 BCMP 组相似。

2.3 Annexin V-FITC/PI 双染法对 HepG2 细胞凋亡率的检测 与空白对照组比较,0.90 mg/L 的 BCMP 和 0.85 mg/L 的 BCML 分别作用于 HepG2 细胞 24 h,其凋亡率分别是 (10.5  $\pm$  1.45)% 和

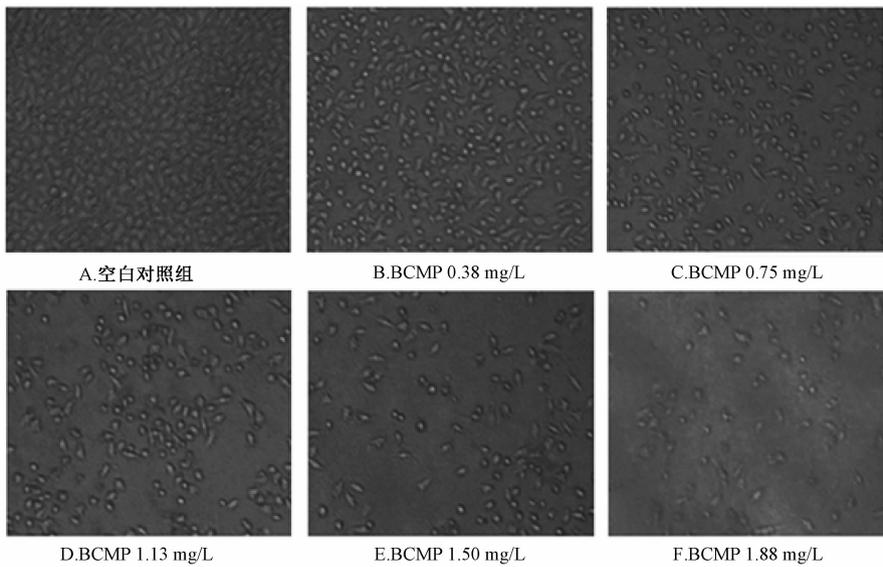


图1 南方大斑蝥结合斑蝥素对人肝癌细胞 HepG2 形态的影响 (×100)

Fig. 1 Effects of conjugated cantharidin from *Mylabris phalerata* Pallas on the cellular morphology of human hepatoma carcinoma HepG2 cells (×100)

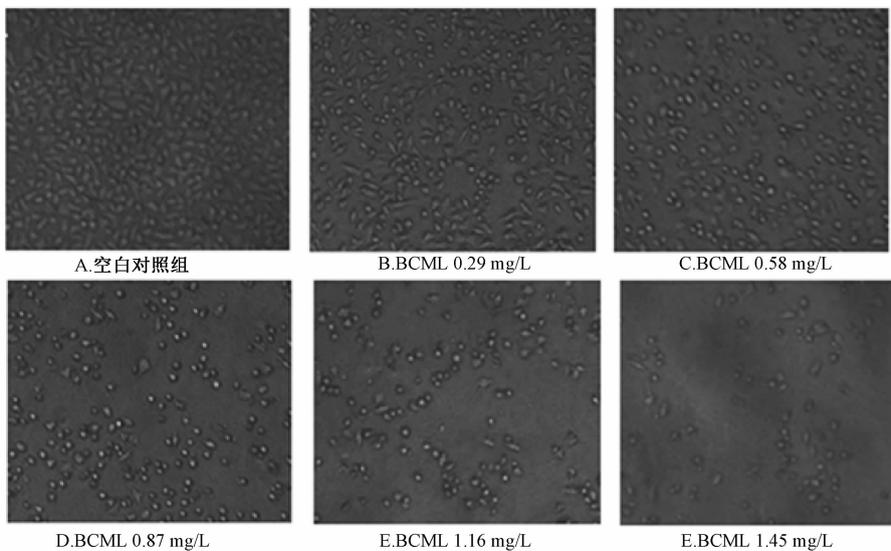


图2 黄黑小斑蝥结合斑蝥素对人肝癌细胞 HepG2 形态的影响 (×100)

Fig. 2 Effects of conjugated cantharidin from *Mylabris cichorii* Linnaeus on the cellular morphology of human hepatoma carcinoma HepG2 cells (×100)

( $12.8 \pm 1.53$ )% ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )。如图3所示,肝癌细胞皆出现不同程度的早期凋亡和晚期凋亡。

2.4 透射电镜观察两种来源斑蝥体内结合斑蝥素作用于肝癌细胞 HepG2 后超微结构的变化 空白对照组显示,细胞整体结构完好,胞膜表面可见绒毛状突起,胞质均匀;核大,不规则圆形,核膜核仁清晰可见,染色质均匀分布;胞质内线粒体、内质网等细胞器结构清晰可见(如图4空白对照

组)。0.90 mg/L 的 BCMP 作用 HepG2 细胞 24 h 后,癌细胞表面的绒毛状突起消失,内质网肿胀较明显、空泡样变;同时细胞核固缩,体积变小,核仁溶解(如图4 BCMP 0.90 mg/L 组);0.85 mg/L 的 BCML 作用 HepG2 细胞 24 h 后,细胞表面突起消失,线粒体肿胀;并可见内质网肿胀,核异性,皱缩明显,少量染色质聚集于核膜下(如图4 BCML 0.85 mg/L 组)。

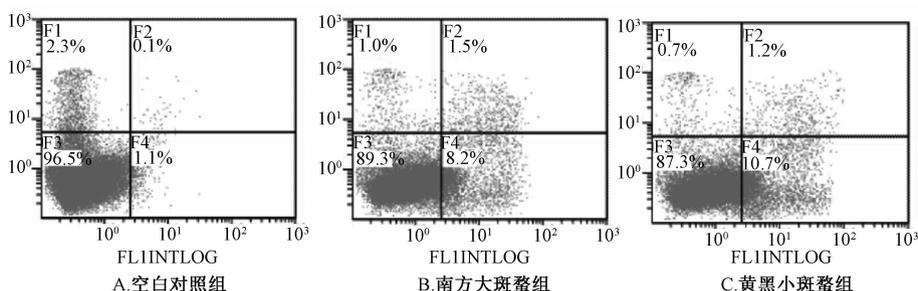
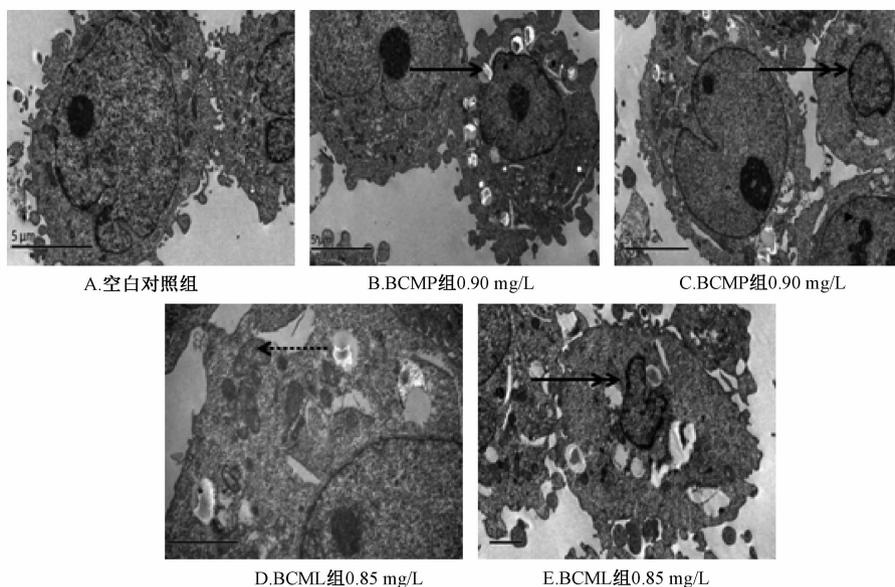


图3 流式细胞术检测南方大斑蝥和黄黑小斑蝥结合斑蝥素诱导 HepG2 细胞凋亡

Fig. 3 Apoptosis of the HepG2 cells induced by conjugated cantharidin from *Mylabris phalerata* Pallas and *Mylabris cichorii* Linnaeus detected by flow cytometry



注：实线箭头示肿胀内质网，虚线箭头示肿胀线粒体，实线双箭头示固缩细胞核

图4 南方大斑蝥和黄黑小斑蝥结合斑蝥素作用 HepG2 细胞后超微结构变化 ( ×20 000)

Fig. 4 Changes of ultra-structural bound on hepatoma carcinoma HepG2 cells after induced by conjugated cantharidin from *Mylabris phalerata* Pallas and *Mylabris cichorii* Linnaeus, respectively ( ×20 000)

### 3 讨论

本研究通过水提法从贵州罗甸的南方大斑蝥和黄黑小斑蝥体内提取出结合斑蝥素，体外考察了两种结合斑蝥素对人肝癌 HepG2 细胞的作用。SRB 实验结果表明，以斑蝥酸钠为阳性对照，两种来源斑蝥体内结合斑蝥素在一定质量浓度范围内对 HepG2 细胞增殖均有抑制作用，呈剂量依赖关系，且对 HepG2 细胞发挥抑制作用的有效剂量明显低于斑蝥酸钠。当作用质量浓度达到较高质量浓度时，细胞均出现大片坏死的现象，与研究报道相符<sup>[14]</sup>。流式实验结果显示，两种来源斑蝥体内结合斑蝥素均能诱导 HepG2 细胞的凋亡，提示其对癌细胞的抑制作用可能是通过促细胞凋亡实现的，

与斑蝥素可促进肿瘤细胞凋亡的文献报道一致<sup>[15-17]</sup>，但其凋亡机制还需深入探讨。本实验通过电镜观察了两种斑蝥体内结合斑蝥素对 HepG2 细胞的超微结构的影响，发现其均可导致细胞内质网和线粒体的肿胀，细胞核的异性、固缩等现象，从形态学上进一步证实了两种来源结合斑蝥素能引起 HepG2 细胞的凋亡。

斑蝥素作为一种抗癌中药，广泛存在于芜菁科昆虫体内，但毒性较大，且不溶于水。课题组前期研究发现芜菁体内的结合斑蝥素可能比斑蝥素有更好的抗肿瘤活性，且水溶性较好<sup>[18]</sup>。本实验初步证明了从两种来源斑蝥体内提取的水溶性结合斑蝥素能有效抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖并促进其凋

亡,但还需进一步明确结合斑蝥素的种类,为结合斑蝥素的进一步应用提供依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 331.

[2] Kok S H, Chui C H, Lam W S, et al. Apoptotic activity of a novel synthetic cantharidin analog on hepatoma cell lines[J]. *Int J Mol Med*, 2006, 17(5): 945-949.

[3] Li W, Xie L, Chen Z, et al. Cantharidin, a potent and selective PP2A inhibitor, induces an oxidative stress-independent growth inhibition of pancreatic cancer cells through G2/M cell-cycle arrest and apoptosis[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(5): 1226-1233.

[4] Chen Y J, Kuo C D, Tsai Y M, et al. Norcantharidin induces anoikis through Jun-N-terminal kinase activation in CT26 colorectal cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19(1): 55-64.

[5] Huan S K, Lee H H, Liu D Z, et al. Cantharidin-induced cytotoxicity and cyclooxygenase 2 expression in human bladder carcinoma cell line[J]. *Toxicology*, 2006, 223(1): 136-143.

[6] Kok S H, Chui C H, Lam W S, et al. Apoptogenic activity of a synthetic cantharimide in leukaemia: implication on its structural activity relationship[J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(6): 1217-1221.

[7] Yu C C, Ko F Y, Yu C S, et al. Norcantharidin triggers cell death and DNA damage through S-phase arrest and ROS-modulated apoptotic pathways in TSGH 8301 human urinary bladder carcinoma cells [J]. *Int J Oncology*, 2012, 41(3): 1050-1060.

[8] 李晓飞, 陈祥胜, 王雪梅, 等. 芫菁体内结合斑蝥素的含量及存在形式[J]. *昆虫学报*, 2007, 50(7): 750-754.

[9] 李晓飞. 芫菁体内结合斑蝥素与金属元素含量的比较[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(13): 2762-2764.

[10] 张芝庭, 张涛涛. 斑蝥酸钠的制备方法: 中国, ZL201110167963720130417[P]. 2014-10-08.

[11] 李晓飞, 曹嵩, 娄方明, 等. 芫菁体内结合斑蝥素对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(7): 963-966.

[12] Vanicha V, Kanyawin K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1112-1116.

[13] 郭侃, 李晓飞, 晏容, 等. 贵州及周边地区斑蝥资源抗人肝癌 HepG2 细胞的活性研究[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(5): 648-653

[14] Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(2): 167-172.

[15] Kuo J H, Shih T Y, Lin J P, et al. Cantharidin induces DNA damage and inhibits DNA repair-associated protein expressions in TSGH8301 human bladder cancer cell[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(2): 795-804.

[16] Tian X, Zeng G, Li X, et al. Cantharidin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in tongue squamous cell carcinoma through suppression of miR-214 and regulation of p53 and Bcl-2/Bax[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 3061-3068.

[17] Huang W W, Ko S W, Tsa H Y, et al. Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways [J]. *Int J Oncology*, 2011, 38(4): 1067-1073.

[18] 李晓飞, 娄方明, 晏容, 等. 芫菁体内斑蝥素和结合斑蝥素抗肿瘤活性的比较研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(3): 535-538.