

症动物模型初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 46-56.

[19] 郭 霞. 桑黄发酵过程优化及其多糖代谢调控研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.

[20] 何曦萌, 徐黎青, 朱春霖, 等. 次黄嘌呤联合氧嗪酸钾构建高尿酸血症小鼠模型探讨[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(4): 541-543.

[21] 王 恺, 丁志超, 裴娟娟, 等. 碱提桑黄菌丝体多糖的抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 289-294.

[22] 钟 臣. 桑黄发酵液多糖的抗运动疲劳作用[J]. 中国食用菌, 2020, 39(6): 46-48.

[23] 黄 倩, 林佩璜, 王梅爱, 等. 桑黄多糖通过 P311/TGF- β 1/Snail1 通路抗糖尿病小鼠肾间质纤维化的研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1): 28-33.

[24] Mandal A K, Mount D B. The molecular physiology of uric acid homeostasis[J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77(1): 323-345.

[25] 丁红霞, 李 进, 崔晓磊, 等. 苯溴马隆联合非布司他治疗高尿酸血症伴痛风的效果及对患者炎症因子水平、血管功能的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(17): 55-57.

[26] 朱超超, 张格艳. 血清尿酸、CRP、IL-6、TNF- α 联合检测诊断急性痛风的价值[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(14): 92-94.

[27] Zhang Q B, Zhu D, Wen Z, *et al.* High levels of serum uric acid, cystain C and lipids concentration and their clinical significance in primary gouty arthritis patients [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2019, 15(2): 141-145.

[28] He Z W, Qin Y H, Wang Z W, *et al.* HMGB1 acts in synergy with lipopolysaccharide in activating rheumatoid synovial fibroblasts *via* p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 596716.

[29] Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, *et al.* RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(1): 101-109.

从表型差异探讨大戟大枣汤含药血清抗乳腺癌的作用

马立威^{1,2}, 陈 哲³, 王文豹⁴, 张金玲⁵, 张洪涛⁶, 葛鹏玲², 刘吉成^{1*}

(1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究所博士后工作站, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江中医药大学博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 齐齐哈尔医学院公共卫生学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 4. 齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 5. 齐齐哈尔医学院医药科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 6. 齐齐哈尔医学院附属第三医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: **目的** 探讨大戟大枣汤含药血清抗雌激素受体 (ER) 阴性 (-) 和 ER 阳性 (+) 乳腺癌作用的差异性。**方法** 制备大戟大枣汤含药血清, 作用于体外培养乳腺癌 (ER-) MDA-MB-453 和 (ER+) MCF-7 细胞 48 h。乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒检测细胞毒性, 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位及细胞凋亡率变化, ELISA 法检测 caspase3、caspase9 酶活性, RT-qPCR 法检测 *caspase3*、*caspase9*、*Bax*、*Bcl-2* mRNA 表达, Western blot 法检测 c-caspase-3、c-caspase-9、*Bax*、*Bcl-2* 蛋白表达。**结果** 与阴性对照组比较, 大戟大枣汤含药血清均能使 2 种不同表型的乳腺癌细胞中 LDH 释放量增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞线粒体膜电位降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), caspase3 和 caspase9 的酶活性、mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), *Bax* mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), *Bcl-2* mRNA 及蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。大戟大枣汤含药血清对乳腺癌 (ER-) MDA-MB-453 细胞的作用效果优于乳腺癌 (ER+) MCF-7 细胞。**结论** 大戟大枣汤含药血清体外有抗乳腺癌的作用, 且作用效果因乳腺癌表型差异而不同, 细胞内线粒体通路可能参与调控。

关键词: 大戟大枣汤; 含药血清; (ER-) MDA-MB-453 细胞; (ER+) MCF-7 细胞; 线粒体通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)07-2373-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.07.046

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 黑龙江省中医药管理局科技计划项目 (ZHY2020-179); 齐齐哈尔市科技局联合引导项目 (LHYD-202028)

作者简介: 马立威 (1987—), 男, 博士, 副研究员, 从事天然药物抗肿瘤研究。Tel: 15845674204, E-mail: maliwei@qmu.edu.cn

* 通信作者: 刘吉成 (1958—), 男, 教授, 博士生导师, 从事天然药物抗肿瘤研究。Tel: 15845674204, E-mail: jcliu@qmu.edu.cn

乳腺癌作为女性好发的恶性疾病，高居世界女性新发癌症类型榜首及女性癌症相关死亡原因第 2 位^[1]，治疗主要采取手术、放化疗、内分泌药物、分子靶向药物等方法^[2]。目前，“精准治疗”日益得到重视，治疗方案的个体化制订，对乳腺癌患者的预后改善及提高患者生活质量有很大作用^[3]。对乳腺癌实现精准治疗的关键是依据不同的分子分型对患者给予更恰当、更高效的治疗，实现以最小代价换取最大获益的效果。但无论哪种治疗，有合适的治疗药物是关键。中药及其活性提取物在抗乳腺癌中发挥着重要作用，其具有多途径、多靶点和毒副作用低等优点。有研究表明，多种中药成分对乳腺癌的生长、转移、复发和耐药性具有很好的抑制作用^[4]。目前，中医药在乳腺癌治疗中的作用也受到广泛关注，复方中药也已经成为相关综合治疗中的一个重要组成部分^[5]。课题组前期研究也发现，大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞有显著的增殖抑制及诱导凋亡作用^[6]，而其抗乳腺癌作用是否因表型的不同而存在差异，是本研究继续探索的内容。

1 材料

1.1 细胞株及动物 (ER-) MDA-MB-453 细胞、(ER+) MCF-7 细胞，均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心，于本实验室保存。SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只，体质量 (300±30) g，购自哈尔滨医科大学实验动物医学部，实验动物生产许可证号 SCXK (黑) 2019-001，饲养于齐齐哈尔医学院实验动物中心，实验动物使用许可证号 SYXK (黑) 2021-001，适应性喂养 1 周后进行实验。研究经齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会批准 (伦理号 QMU-AECC-2021-138)。

1.2 试剂与药物 狼毒大戟采自黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县泰康镇绿色草原牧场林，由齐齐哈尔医学院天然药物化学实验中心郭丽娜教授鉴定为大戟科大戟属狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud.，取其根部入药；大枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 购自齐齐哈尔市东缘中药材批发有限公司 (陕西绿音狗头枣)。L15 培养基、MEM 培养基、胎牛血清 (美国 HyClone 公司，批号 AC10232463、AF29500573、NBH1286)；Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (美国 BD 公司，批号 0076884)；LDH 试剂盒 (南京建成生物工程研究所，批号 20180708)；JC-1 试剂盒、caspase3、caspase9 活性检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司，批号 082819191022、042821211029、042621211036)；PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Tap、Trizol (日本 TaKaRa 公司，批号 AK6002、AK8802、AI51028A)；兔抗人 cleaved-caspase3 (c-caspase3) 单克隆抗体、兔抗人 cleaved-caspase3 (c-caspase9) 单克隆抗体、小鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体 (美国 CST 公司)；小鼠抗人 Bax 单克隆抗体、羊抗小鼠 IgG 及羊抗兔 IgG 抗体 (英国 Abcam 公司)。

1.3 仪器 IX51 型显微镜 (日本 Olympus 公司)；Spark 型酶标仪 (奥地利 Tecan 公司)；FACS Calibu 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)；ChemiDoc MP 型荧光及化学发光成像系统

(美国 Bio-Rad 公司)；Q5 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 大戟大枣汤制备 参考文献 [6] 报道，取狼毒大戟 1 kg、大枣 1 kg，加 10 L 水煎煮，过滤浓缩，即得生药量为 1 g/mL 的原方。

2.2 含药血清制备 参考文献 [6] 报道，将 20 只大鼠随机分为阴性组和大戟大枣汤高、中、低剂量组 (10.0、5.0、2.5 g/kg)，每天早、晚各给药 1 次，连续 3 d；末次给药 1 h 后，无菌条件下腹主动脉取血，离心，即得，分装贮存备用。

2.3 分组与给药 MDA-MB-453 细胞、MCF-7 细胞复苏后，用 L15 或 MEM 的完全培养基 (10% FBS+90% 培养基) 常规培养，细胞分为阴性对照组 (10% 阴性组血清+90% MEM 或 L15 培养基) 和大戟大枣汤低、中、高剂量组 (10% 大戟大枣汤低、中、高剂量组含药血清+90% MEM 或 L15 培养基)。

2.4 LDH 试剂盒检测细胞毒性 取对数生长期的 MDA-MB-453 细胞、MCF-7 细胞，以每孔 2.0×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板，待细胞贴壁稳定后按“2.3”项下方法进行分组、给药，48 h 后收集各组细胞上清液 100 μL，备用，按照 LDH 试剂盒说明书检测各组细胞上清中 LDH 的释放量。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞按“2.4”项下方法处理，48 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化并收集各组细胞于流式管中，PBS 漂洗 2 次，每管加 300 μL 缓冲液，随后添加 Annexin V-FITC 染液 5 μL、PI 染液 5 μL，室温避光孵育 10 min 后上机检测，分析细胞凋亡率。

2.6 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位变化 细胞按“2.4”项下方法处理，48 h 后收集各组细胞，PBS 漂洗 1 次，各组细胞加入 JC-1 染色液，37 ℃ 避光染色 20 min，缓冲液梯度洗涤 3 次后上机检测，通过分析细胞线粒体膜电位去极化程度来反应细胞线粒体膜电位变化。

2.7 ELISA 法检测细胞 caspase3、caspase9 酶活性 细胞按“2.4”项下方法处理，48 h 后收集各组细胞于 1.5 mL EP 管中，加入蛋白裂解液冰上作用 30 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，进行蛋白定量。将 10 μL 蛋白上清液、80 μL 反应缓冲液、10 μL 比色底物液 (Ac-LEHD-pNA，Ac-DEVD-pNA) 混合加入 96 孔板中，同时按要求加入梯度稀释的 pNA 标准品，以测定 pNA 对吸光度的标准曲线。在酶标仪 405 nm 波长处测定各孔吸光度，依照标准曲线计算 caspase3、caspase9 酶相对活性。

2.8 RT-qPCR 法检测 caspase3、caspase9、Bcl-2、Bax mRNA 表达 细胞按“2.4”项下方法处理，48 h 后收集各组细胞，TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA，紫外光度计检测 RNA 浓度及纯度，按照逆转录试剂盒说明书，将 RNA 逆转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板结合待测基因及内参基因引物序列 (表 1) 进行荧光 PCR 反应，反应条件为 95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 31 s，40 个循环。测定各组 C_T 值，按照 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 相对表达。

表 1 引物序列

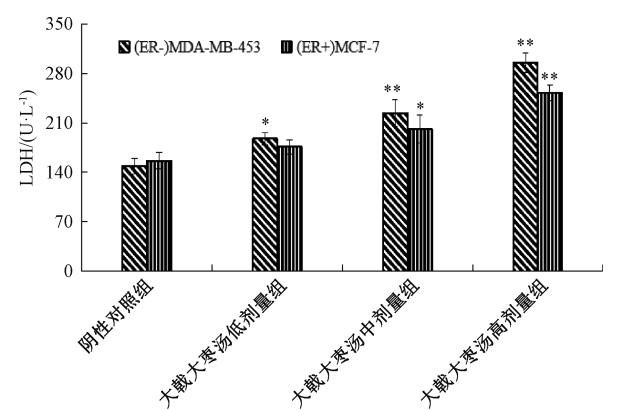
基因	序列	长度/bp
<i>β-actin</i>	正向 5'-GTTGTCGACGACGAGCG-3'	93
	反向 5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3'	
<i>Bcl-2</i>	正向 5'-GAGAAATCAAACAGAGGCCG-3'	106
	反向 5'-CTGAGTACCTGAACCGGCA-3'	
<i>Bax</i>	正向 5'-AGCTTCTTGTTGGACGCAT-3'	101
	反向 5'-CAGAGCGGGGTTTCATC-3'	
<i>caspase9</i>	正向 5'-CATGCTCAGGATGTAAGCCA-3'	93
	反向 5'-AGGTTCTCAGACCGAAACA-3'	
<i>caspase3</i>	正向 5'-TCGCTTCCATGTATGATCTTTG-3'	110
	反向 5'-CTGCCTCTTCCCCATTCT-3'	

2.9 Western blot 法检测 caspase3、caspase9、Bax、Bcl-2 蛋白表达 取对数生长期 MDA-MB-453 细胞、MCF-7 细胞，以 $2.0\times10^5/\text{mL}$ 密度接种于 100 mm 培养皿中，待细胞贴壁稳定后，按“2.3”项下方法进行分组、给药，48 h 后收集各组细胞于 4 mL 离心管中，每管加入 2.0 mL 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液，冰上裂解反应 30 min，离心提取细胞总蛋白，使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移蛋白至 PVDF 膜上，经 BSA 溶液封闭，一抗 4 ℃ 孵育过夜，二抗室温孵育 2 h，通过全自动荧光及化学发光成像系统进行 ECL 化学发光、获取图像，选用 GAPDH 作为内参蛋白，利用 Image J 软件计算目的蛋白相对表达量。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间比较采用 Dunnett-*t* 法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 LDH 释放量的影响 由图 1 可知，与阴性对照组比较，大戟大枣汤含药血清作用后 (ER-) MDA-MB-453 细胞、(ER+) MCF-7 细胞 LDH 的释放量均增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并且对 (ER-) MDA-MB-453 细胞 LDH 的释放水平增加程度更大。



注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 LDH 释放量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞凋亡的影响 与阴性对照组比较，大戟大枣汤含药血清作用后均能诱导 (ER

-) MDA-MB-453 细胞 (图 2A)、(ER+) MCF-7 细胞 (图 2B) 凋亡 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并且诱导 (ER-) MDA-MB-453 细胞凋亡的作用更强，见图 2C。

3.3 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞线粒体膜电位的影响 与阴性对照组比较，大戟大枣汤含药血清作用后能增加 (ER-) MDA-MB-453 细胞 (图 3A)、(ER+) MCF-7 细胞 (图 3B) 的线粒体膜电位的去极化程度 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并且对 (ER-) MDA-MB-453 细胞线粒体膜电位去极化程度影响更大，见图 3C。

3.4 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 caspase3、caspase9 酶活性的影响 与阴性对照组比较，大戟大枣汤含药血清作用后能增加 (ER-) MDA-MB-453 细胞及 (ER+) MCF-7 细胞中 caspase3 (图 4A)、caspase9 (图 4B) 酶活性 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并且对 (ER-) MDA-MB-453 细胞 caspase3、caspase9 酶活性增加更多。

3.5 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 caspase3、caspase9、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响 与阴性对照组比较，大戟大枣汤含药血清作用后能增加 (ER-) MDA-MB-453 细胞及 (ER-) MCF-7 细胞 caspase3 (图 5A)、caspase9 (图 5B)、Bax (图 5C) mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并降低 Bcl-2 (图 5D) mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)，同时对 (ER-) MDA-MB-453 细胞相关基因表达的影响更大。

3.6 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 c-caspase3、c-caspase9、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 如图 6 所示，与阴性对照组比较，大戟大枣汤含药血清作用后能增加 (ER-) MDA-MB-453 细胞及 (ER+) MCF-7 细胞 c-caspase3、caspase9、Bax 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)，降低 Bcl-2 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并且对 (ER-) MDA-MB-453 细胞相关蛋白表达的影响更大。

4 讨论

乳腺癌是女性中常见的恶性肿瘤之一，发病率和致死率高，具有起病隐匿、发展快、早期诊断率低等特征，严重危害女性健康^[7]。有文献报道，所有乳腺癌患者中雌激素受体阴性 (ER-) 乳腺癌约占三分之一，多见于年轻女性^[8]。ER-乳腺癌在临床上常表现为更高的侵袭性以及更差的预后。因此，对 ER-乳腺癌的有效治疗，成为对乳腺癌治疗研究的重点及难点。

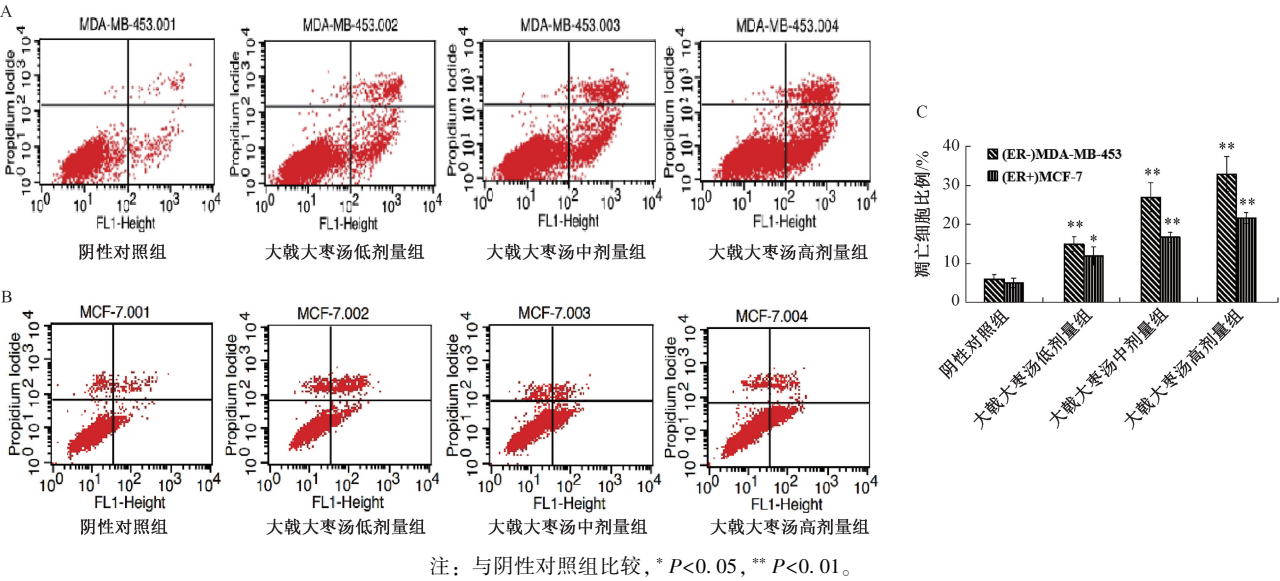


图2 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

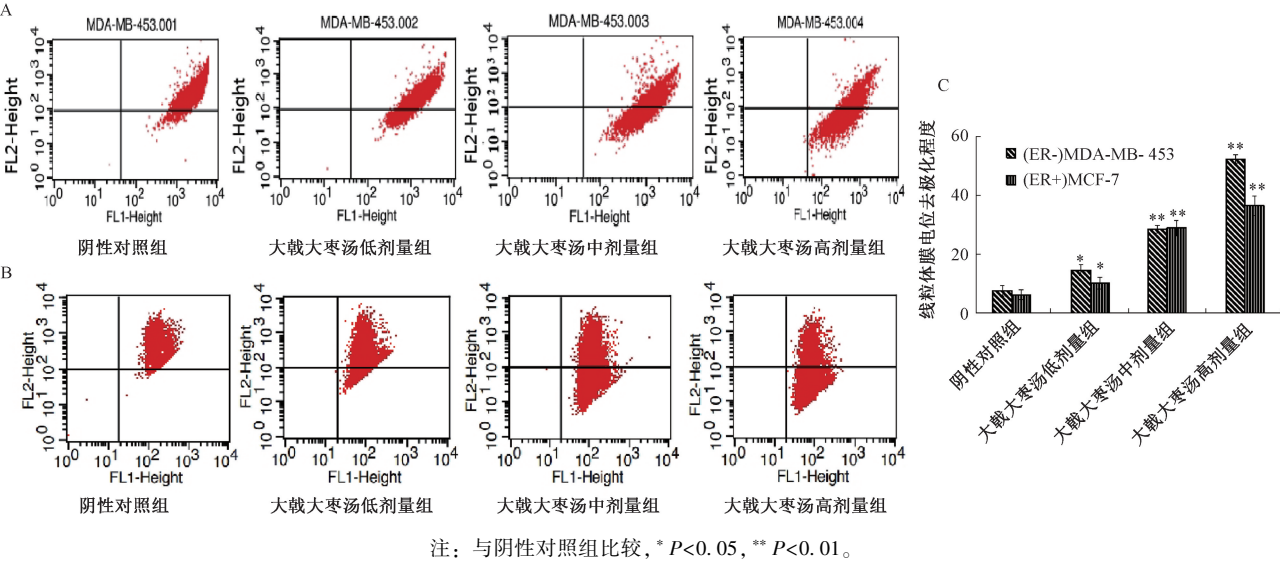


图3 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

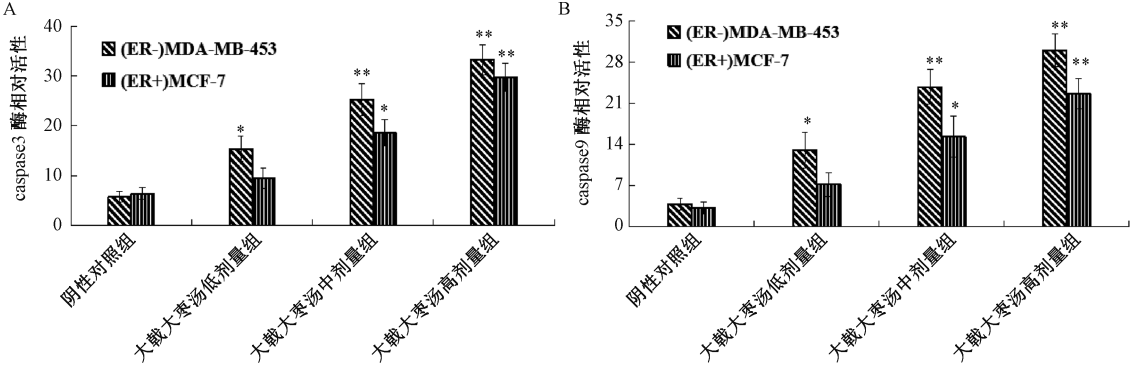
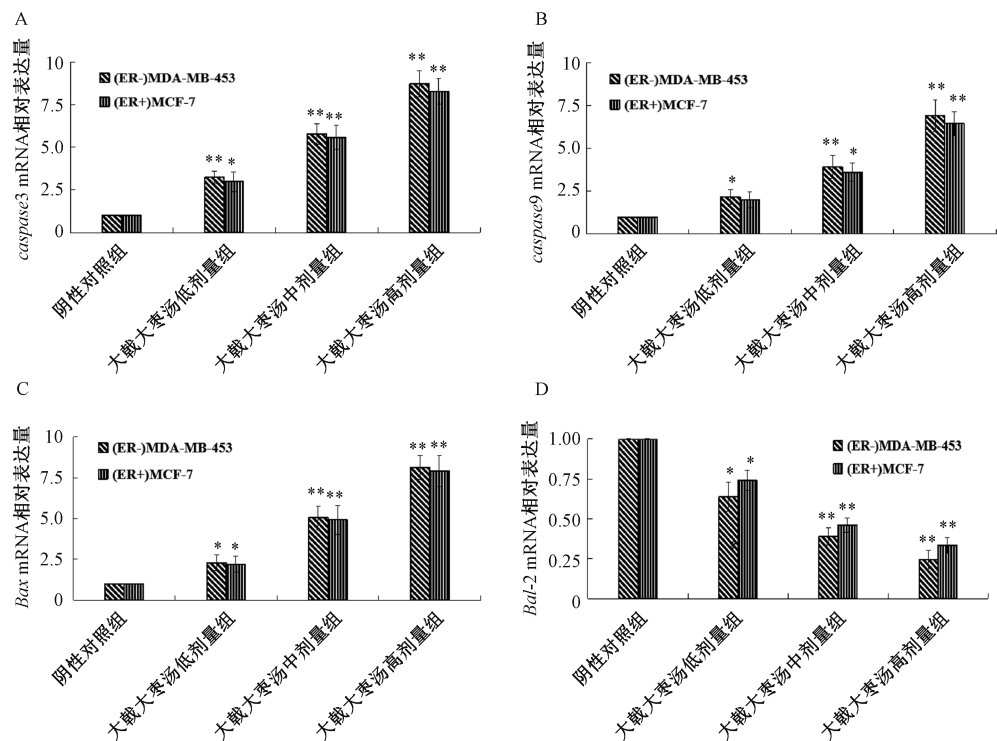


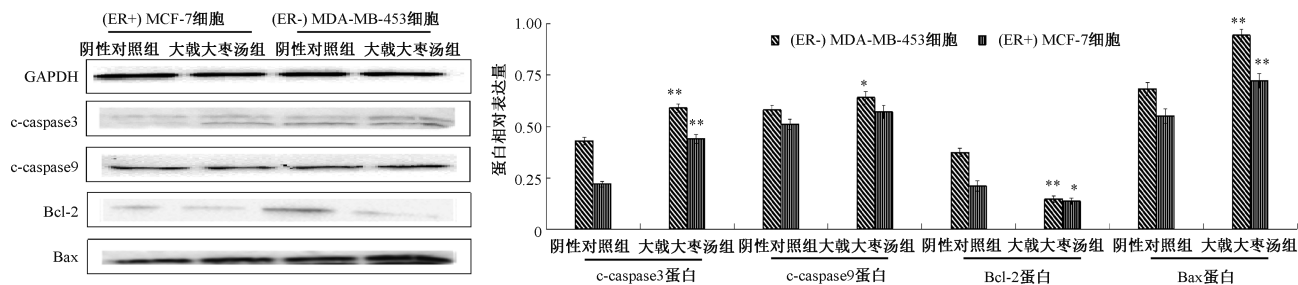
图4 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 caspase3、caspase9 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

不同的分子亚型可能指导临床医生选择合适的药物或方法治疗乳腺癌。本研究选取乳腺癌（ER-）MDA-MB-453 细胞和乳腺癌（ER+）MCF-7 细胞进行对比研究，发现大戟大枣汤含药血清能增加不同表型乳腺癌细胞 LDH 释放



注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图5 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 *caspase3*、*caspase9*、*Bax*、*Bcl-2* mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图6 大戟大枣汤含药血清对乳腺癌细胞 *c-caspase3*、*c-caspase9*、*Bax*、*Bcl-2* 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

量，且对 (ER-) MDA-MB-453 细胞作用效果更加显著。研究表明，LDH 的释放量是细胞膜完整性以及氧化负担引起的细胞坏死的一个重要指标，LDH 水平增加也间接反映细胞凋亡程度^[9]。本研究通过 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡率的结果也证实了这一点。

研究表明，传统的细胞毒性药物和化疗药物均可通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。诱导细胞凋亡也是评价抗肿瘤药物疗效的主要指标^[10]。细胞凋亡有两种不同的机制，即内源性和外源性途径^[11]。内源性途径由 Bcl-2 家族蛋白介导，包括促凋亡蛋白（如 Bax 等）和抗凋亡蛋白（如 Bcl-2 等），也被称为线粒体依赖途径^[12-13]。在线粒体依赖途径中，Bax 增加线粒体膜通透性，导致线粒体膜电位丢失，而线粒体膜电位丢失，被认为是凋亡进行的早期阶段^[14]，随后进一步激活 caspase 级联，引发细胞凋亡；Bcl-2 则起到相反的作用^[15]。正常情况下，Bcl-2 和 Bax 会产生同源或异源二聚体调控凋亡，但如果这种平衡被打破，就

会发生细胞凋亡^[16-18]。而 caspase 是细胞凋亡的重要介质，caspase-3 是一种常被激活的死亡蛋白酶^[19]。caspase-3 可被 caspase-9 切割，随后激活下游的 caspase，将靶细胞引导到凋亡、死亡的临界点^[20]。通常认为 caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必由之路，其被激活预示着凋亡步入不可逆阶段^[21]。本研究发现，大戟大枣汤含药血清能增加不同表型乳腺癌细胞线粒体膜电位的去极化程度，细胞 caspase3、caspase9、Bax 蛋白和 mRNA 表达，降低 Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达，且对 (ER-) MDA-MB-453 细胞中相关蛋白和 mRNA 表达的影响更大。

综上所述，大戟大枣汤含药血清可通过调控细胞内线粒体途径起到抗乳腺癌的作用，且作用效果因乳腺癌表型差异而不同，对 ER-乳腺癌作用效果更佳，研究为乳腺癌针对性的治疗提供科学的实验依据。

参考文献：

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics

2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 陈 建, 曾智锐, 雷 珊, 等. 木犀草苷对 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制 [J]. 中成药, 2022, 44 (2): 587-592.

[3] 吕 丹, 吴 云, 马 飞. 2021 年乳腺癌治疗新进展 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(1): 85-93.

[4] 李云祥, 梁引库, 高飞雄, 等. 中药治疗乳腺癌疾病研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 211-219.

[5] 梁 莉, 王法琴, 达 礼, 等. 乳病消片含药血清对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 [J]. 中成药, 2018, 40 (10): 2122-2125.

[6] 马立威, 陈 哲, 李 京, 等. 大戟大枣汤含药血清通过 PI3k/Akt 通路对乳腺癌细胞凋亡的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(10): 2584-2591.

[7] 张 敏, 华 桦, 曾安琪, 等. 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖、凋亡及转移的作用 [J]. 中成药, 2022, 44 (3): 942-947.

[8] Garcia-Closas M, Couch F J, Lindstrom S, *et al.* Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 392-398.

[9] 冀晓龙, 韩 林, 王晓琴, 等. 木枣多糖诱导胃癌细胞 MKN-45 凋亡的作用机制 [J]. 中国食品学报, 2019, 19 (5): 26-32.

[10] Ma L W, Chen Z, Li J, *et al.* DP from *Euphorbia fischeriana* S. mediated apoptosis in leukemia cells *via* the PI3k/Akt signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 113889.

[11] Kim H J, Seo B G, Kim K D, *et al.* C5, A cassaine diterpenoid amine, induces apoptosis *via* the extrinsic pathways in human lung cancer cells and human lymphoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1298.

[12] Shamas-Din A, Kale J, Leber B, *et al.* Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4): a008714.

[13] 陈 建, 曾智锐, 雷 珊, 等. 木犀草苷对 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制 [J]. 中成药, 2022, 44 (2): 587-592.

[14] Ma L W, Zhang J L, Wang X M, *et al.* Design and synthesis of diosgenin derivatives as apoptosis inducers through mitochondria-related pathways [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 217: 113361.

[15] Wang T A, Zhang X D, Guo X Y, *et al.* 3-Bromopyruvate and sodium citrate target glycolysis, suppress survivin, and induce mitochondrial mediated apoptosis in gastric cancer cells and inhibit gastric orthotopic transplantation tumor growth [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1289-1296.

[16] 严如根, 仇 华, 何 静, 等. 益肾调经方对卵巢储备功能减退大鼠颗粒细胞凋亡的影响 [J]. 中成药, 2022, 44(6): 1955-1960.

[17] 姜 丹, 宫丽鸿. 稳斑汤对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化不稳定斑块凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37 (5): 1215-1218; 1311.

[18] 冯嘉昆, 刘 伟, 李正发, 等. 半夏提取物调节 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达诱导白血病细胞凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(31): 5023-5029.

[19] Zhang J L, Wang X M, Yang J F, *et al.* Novel diosgenin derivatives containing 1, 3, 4-oxadiazole/thiadiazole moieties as potential antitumor agents; design, synthesis and cytotoxic evaluation [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 186: 111897.

[20] Yin F, Zhou H, Fang Y, *et al.* Astragaloside IV alleviates ischemia reperfusion-induced apoptosis by inhibiting the activation of key factors in death receptor pathway and mitochondrial pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 248: 112319.

[21] 何 泽, 成光宇, 吕美香, 等. 解毒通络保肾法对实验性 DM 大鼠肾足细胞凋亡相关因子 Bax、Bcl-2、caspase-3 的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(6): 1414-1417.