

华蟾素抗胶质瘤的作用及机制研究

孔冰, 左明荣, 刘艳辉[△]

四川大学华西医院 神经外科(成都 610041)

【摘要】 目的 研究华蟾素对 U87 胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响,并初步探讨其中的分子机制。方法 不同浓度的华蟾素(0.5~20 $\mu\text{mol/L}$)处理 U87 细胞 6 h、12 h、24 h、48 h 后,用 CCK-8 试剂盒进行做细胞活性检测,观察华蟾素对 U87 胶质瘤细胞活性的影响。不同浓度的华蟾素(1~20 $\mu\text{mol/L}$)分别处理 12 h、24 h 后,用 Hoechst33342 试剂检测 U87 胶质瘤细胞的凋亡情况。免疫荧光染色观察华蟾素处理 24 h 后与细胞增殖相关蛋白 p-AKT(T308)的表达情况。Western blot 检测不同浓度的华蟾素(1~20 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h 后与细胞增殖相关蛋白(磷酸化的磷脂酰肌醇激酶(p-PI3K)、苏氨酸 308 位点磷酸化的蛋白激酶 B[p-AKT(T308)]、丝氨酸 473 位点磷酸化的蛋白激酶 B[p-AKT(S473)]、磷酸化核糖体 S6 蛋白激酶(PS6)、磷酸化的真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1(p-4EBP1))和凋亡相关蛋白(BAX、cleaved-caspase 3、cleaved-caspase 9)的表达情况。结果 华蟾素可抑制 U87 胶质瘤细胞的活性、诱导 U87 胶质瘤细胞的凋亡,呈浓度和时间依赖性反应。华蟾素作用后可使凋亡相关蛋白 cleaved-caspase 3、BAX 的表达水平增高,PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 p-AKT(T308)的表达水平降低。结论 华蟾素可抑制 U87 胶质瘤细胞的增殖、诱导 U87 胶质瘤细胞的凋亡,这可能经由影响 PI3K-AKT-4EBP1 与 BAX-caspase 的信号通路实现。

【关键词】 华蟾素 胶质瘤 生长抑制 凋亡

The Research on the Anti-glioma Effect and Mechanism of Cinobufagin KONG Bing, ZUO Ming-rong, LIU Yan-hui[△]. Department of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: yhliu2001@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of cinobufagin (CB) on the proliferation inhibition and induction of apoptosis in glioblastoma cell lines U87 and its molecular mechanism. **Methods** A gradient concentration (0-20 $\mu\text{mol/L}$) of CB was used to treat the U87 glioma cells for 6 h, 12 h, 24 h and 48 h, respectively. Cell viabilities were determined by CCK-8 assay to discover the effects of different concentrations of CB on the proliferation of glioma cells. Different concentrations (1-20 $\mu\text{mol/L}$) of CB were used to treat the U87 glioma cells for 12 h and 24 h, hoechst33342 staining assay was used to assess the apoptosis levels. Immunofluorescence staining was used to determine the expression of growth related proteins phospho-protein kinase B(T308) [p-AKT(T308)] in U87 glioma cells after being treated with CB for 24 h. Western blot was used to determine the apoptotic related proteins (BAX, cleaved-caspase 3, cleaved-caspase 9) and growth related proteins [phospho-inositide 3-kinase (p-PI3K), p-AKT(T308), p-AKT(S473), phospho-ribosomal protein S6 kinase (PS6), phospho-4E-binding protein 1 (p-4EBP1)]. **Results** A significant effect of CB on the proliferation inhibition and induction of apoptosis in U87 glioma cells in a time- and dose-dependent manner was observed. Treatment with CB induced the expression levels of apoptosis-related protein, cleaved-caspase 3 and BAX, and the PI3K-AKT-4EBP1 signaling pathway related proteins p-AKT(T308) and p-4EBP1 were decreased. **Conclusion** CB can inhibit U87 glioma cells growth and induce apoptosis, which may involve the PI3K-AKT-4EBP1 and BAX-caspase signaling pathways.

【Key words】 Cinobufagin Glioma Growth inhibition Apoptosis

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见而且恶性程度极高的中枢神经系统肿瘤^[1]。据研究报道,GBM 在人群中发病率为 3.19/10 万^[2]。对 GBM 的治疗仍然充满挑战。即使是目前标准化的治疗方法,包括最大范围安全切除肿瘤组织,术后行

以替莫唑胺为基础的联合放疗手段,放疗结束后继续替莫唑胺辅助化疗 6~12 个疗程,初诊为 GBM 患者的中位生存期仅有 12~18 月^[1,3]。

华蟾素作为一种传统中药,经中国国家食品药品监督管理局(SFDA)(ISO9002)批准,已广泛用于多种癌症的治疗过程^[4]。已有研究证明,华蟾素对多种肿瘤(例如非小细胞肺癌^[5]、肝癌^[6]、前列腺

[△] 通信作者, E-mail: yhliu2001@163.com

癌^[7]、宫颈癌^[8]、胃癌^[9])具有明显的抗肿瘤作用。已有研究证明,华蟾素可调控 SHG44 胶质瘤细胞的周期进程,抑制胶质瘤细胞增殖、促进凋亡^[10],华蟾素还具有诱导人胶质瘤 U251 细胞凋亡的作用^[11],但对于华蟾素抗胶质瘤的机制并没有进一步探讨。本研究就华蟾素对胶质瘤细胞 PI3K/AKT 与 BAX-caspase 信号通路的影响进行了初步探讨,进而从信号通路层面证实了华蟾素确有一定的抗胶质瘤作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系、抗体和试剂

U87 胶质瘤细胞系从中国科学研究院细胞库购买。在本实验中,使用五代以内的 U87 胶质瘤细胞在含有体积分数 5% 二氧化碳(CO₂)的 37 ℃ 培养箱中用加入了 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基培养。华蟾素从 Sigma-Aldrich (USA) 购买,用二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)稀释为 20 mmol/L 的母液储存,DMSO 的浓度被限制在 0.1% 以下,避免过高浓度的 DMSO 对细胞的毒性作用。细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)购自 Dojindo (上海,中国)公司。细胞凋亡检测试剂盒(Hoechst33342)购自碧云天公司。蛋白质印迹法所用的一抗:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、磷酸化的磷脂酰肌醇激酶(p-PI3K)、苏氨酸 308 位点磷酸化的蛋白激酶 B[p-AKT (T308)]、丝氨酸 473 位点磷酸化的蛋白激酶 B[p-AKT(S473)]、磷酸化的核糖体 S6 蛋白激酶(PS6)、磷酸化的真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1(p-4EBP1)、凋亡相关蛋白(BAX、cleaved-caspase 3、cleaved-caspase 9)以及辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔或鼠)购自 Cell Signaling (上海,中国)。

1.2 CCK-8 法检测细胞活性

首先,将 U87 细胞以 5×10^3 细胞/孔在 96 孔板中培养,每组做 5 个复孔,培养 24 h 待细胞完全贴壁后,吸出原有培养基,再加入含有不同浓度华蟾素的新培养基 200 μ L。加入培养基的华蟾素的最终浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20 μ mol/L,并设立对照组,加入 DMSO。然后在培养基中分别培养 6 h、12 h、24 h、48 h 后,吸除原有培养基,加入含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基 200 μ L 后,分别在每个复孔中加入 CCK-8 试剂 20 μ L,再设立空白对照组,在不含胶质瘤细胞的孔中加入 200 μ L 培养基,并加入 CCK-8 试剂 20 μ L。最后在培养箱中反应约 2 h 后,在酶标仪

中测定每个复孔在 450 nm 的吸光度(A)值。该实验重复 3 次。细胞活性(%) = $100\% - \frac{A(\text{对照}) - A(\text{样本})}{A(\text{对照}) - A(\text{空白})}$ 。

1.3 免疫荧光观察细胞凋亡

将 U87 胶质瘤细胞以 1×10^5 细胞/孔的密度在 6 孔板中培养。培养 24 h 待细胞完全贴壁后,吸出原有培养基,再加入含有不同浓度华蟾素的新培养基 2 mL。加入培养基的华蟾素的最终浓度分别为 1、2、5、10、20 μ mol/L,并设立对照组,加入 DMSO。在培养箱中分别反应 12 h、24 h。反应时间到后,吸除含有华蟾素的培养基,并用磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗 3 次,避免将贴壁细胞洗掉。然后在每孔加入含有 Hoechst33342 试剂 5 μ L 的培养基 2 mL,并在 4 ℃ 柜中反应 30 min 后用 PBS 冲洗 1 次。最后,在荧光显微镜下观察胶质瘤细胞核的改变。正常细胞的细胞核呈弱蓝色荧光,凋亡细胞呈强蓝色荧光。在显微镜下计数每个视野的总细胞数和凋亡细胞数,该实验重复 3 次。凋亡率(%) = 凋亡细胞数/总细胞数。

1.4 免疫荧光染色检测 p-AKT(T308)的表达情况

玻片灭菌处理后铺于 6 孔板中,再将 U87 胶质瘤细胞以 1×10^5 细胞/孔的密度在 6 孔板中培养。培养 24 h 待细胞完全贴壁后,吸出原有培养基,再加入含有 20 μ mol/L 华蟾素的新培养基 2 mL,并设立对照组,加入 DMSO。在培养箱中反应 24 h。反应时间到后,吸除含有华蟾素的培养基,并用 PBS 清洗 3 次,避免将贴壁细胞洗掉。用体积分数 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗 3 次。0.5% Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20 min, PBS 清洗 3 次,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30 min;吸水纸吸掉封闭液,不洗,每张玻片滴加稀释好的一抗并放入湿盒,4 ℃ 孵育过夜。加荧光二抗:PBST 清洗 3 次,吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光二抗,湿盒中 20~37 ℃ 孵育 1 h, PBST 清洗 3 次。从加荧光二抗起,后面所有操作步骤都在较暗处进行。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行染核, PBST 5 min $\times$ 4 次洗去多余的 DAPI。用吸水纸吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。Imagepro-Plus 6.0 (IPP) 测量各组的平均荧光强度。

1.5 Western blot 检测 PI3K/AKT 与 BAX-caspase 信号通路蛋白的表达

收集 1、2、5、10、20 μ mol/L 华蟾素处理 24 h 后的 U87 胶质瘤细胞,用细胞裂解液裂解后,装入

1.5 mL离心管中并放入冰盒,防止蛋白质裂解,再用超声再次处理。最后以 13 000 r/min 的速度离心10 min。收集上清液,测定其中的蛋白质浓度后加入上样缓冲液,使每个样品的蛋白质浓度相同。用 125 g/L 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离不同相对分子质量的蛋白质,cleaved-caspase 3 用 150 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离。然后将 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质转移到硝酸纤维膜上,转膜完成后,用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h。封闭完成后,选取目标蛋白所在条带,加入一抗,并在 4 ℃柜中慢摇过夜。一抗结合后,取出条带,用 TBST 洗 3 次,每次 20 min。洗膜完成后,加入二抗,反应1 h,再次用 TBST 洗膜 3 次,每次 20 min。最后,在暗室中使用化学发光免疫印迹检测系统进行可视化抗体复合物检测。PI3K/AKT 信号通路蛋白包括:p-PI3K、p-AKT (T308)、p-AKT (S473)、PS6、p-4EBP1。BAX-caspase 信号通路蛋白包括:BAX、cleaved-caspase 3、cleaved-caspase 9。IPP 测量各条带的积分光密度(OD)值,以各条带与 GAPDH 的 OD 值的比值为该蛋白的相对表达量。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用进行 Student's *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,多重比较应用 Dunnett's 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 华蟾素对 U87 胶质瘤细胞活性的影响

见图 1。培养 6 h、12 h 时,华蟾素 0.5 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ 组 U87 细胞活性快速下降,华蟾素 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 U87 细胞活性趋于平缓;培养 24 h 的曲线在更低的浓度(2 $\mu\text{mol/L}$)便开始趋于平缓;培养 6 h、12 h、24 h 的细胞活性随着华蟾素浓度的升高而降低(P 均 < 0.01)。培养 48 h 的曲线基本持平,少许波动,基本不受浓度影响($P > 0.05$)。培养 6 h 的细胞活性在任一浓度均高于其他时点,48 h 的细胞活性在任一浓度均低于其他时点,培养 12 h 和 24 h 的细胞活性居中,在 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 趋于一致。相同浓度的华蟾素作用下,随着时间的推移,细胞活性下降得越明显($P < 0.01$)。

2.2 华蟾素对 U87 胶质瘤细胞凋亡活性的影响

培养 12 h、24 h 的曲线,U87 胶质瘤细胞的凋亡率均表现为 0 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ 快速上升,5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 趋于平缓(图 2)。在华蟾素作用于 U87 胶质瘤细

胞 12 h 后,细胞凋亡率随着华蟾素浓度增高而增高($P < 0.01$)(图 2,图 3)。相同浓度的华蟾素处理 24 h 后的细胞凋亡率较 12 h 增高($P < 0.01$)。见图 2,图 4。

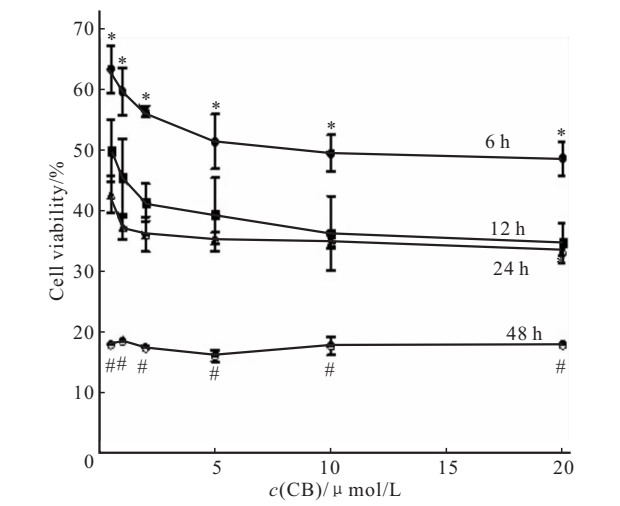


图 1 U87 胶质瘤细胞用不同浓度的华蟾素处理 6 h、12 h、24 h 和 48 h 后的细胞活性

Fig 1 The cell viability of U87 glioma cells treated with different concentrations of CB for 6 h, 12 h, 24 h and 48 h

* $P < 0.05$, vs. 12 h, 24 h, 48 h at the same concentration of CB; # $P < 0.05$, vs. 12 h, 24 h at the same concentration of CB

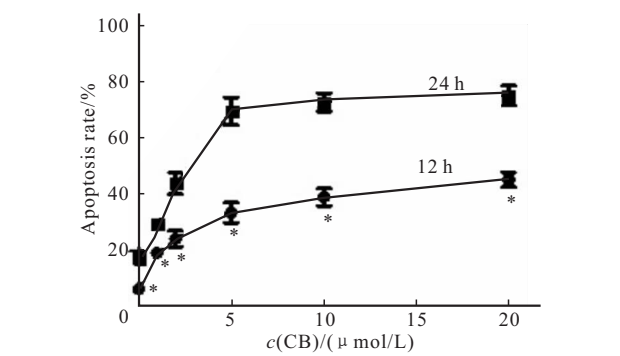


图 2 不同华蟾素浓度处理 12 h、24 h 的 U87 细胞的凋亡率

Fig 2 Apoptosis rates of U87 glioma cells treated with different concentrations of CB for 12 h and 24 h

* $P < 0.01$, vs. 24 h at the same concentration of CB

2.3 华蟾素对 PI3K/ AKT 与 BAX-caspase 信号通路的影响

免疫荧光染色结果中,DAPI 染色显示了细胞位置。p-AKT(T308)染色显示,与 DMSO 组相比,华蟾素作用于 U87 胶质瘤细胞后,PI3K/AKT 信号通路蛋白 p-AKT(T308)的表达降低(平均荧光强度 208.9 ± 18.1 vs. 93.6 ± 15.9 , $P < 0.05$)(图 5)。

随着加入培养基的华蟾素浓度的增加,PI3K/AKT 信号通路蛋白 p-AKT(T308), p-4EBP1 的表达随之降低,而 p-PI3K、p-AKT(S473)和 PS6 的表达水平无明显变化(附表,图 6)。表明华蟾素抑制 U87 胶质瘤细胞增殖是通过抑制 PI3K/AKT 信号通路蛋白 p-AKT(T308)与 p-4EBP1 的表达实现的。随

着加入培养基的华蟾素浓度的增加,BAX-caspase 信号通路蛋白 BAX、cleaved-caspase 3 表达随之增高,而 cleaved-caspase 9 的表达水平无明显变化。表明华蟾素促进 U87 胶质瘤细胞凋亡是通过增加 BAX-caspase 信号通路蛋白 BAX 与 cleaved-caspase 3 的表达实现的。

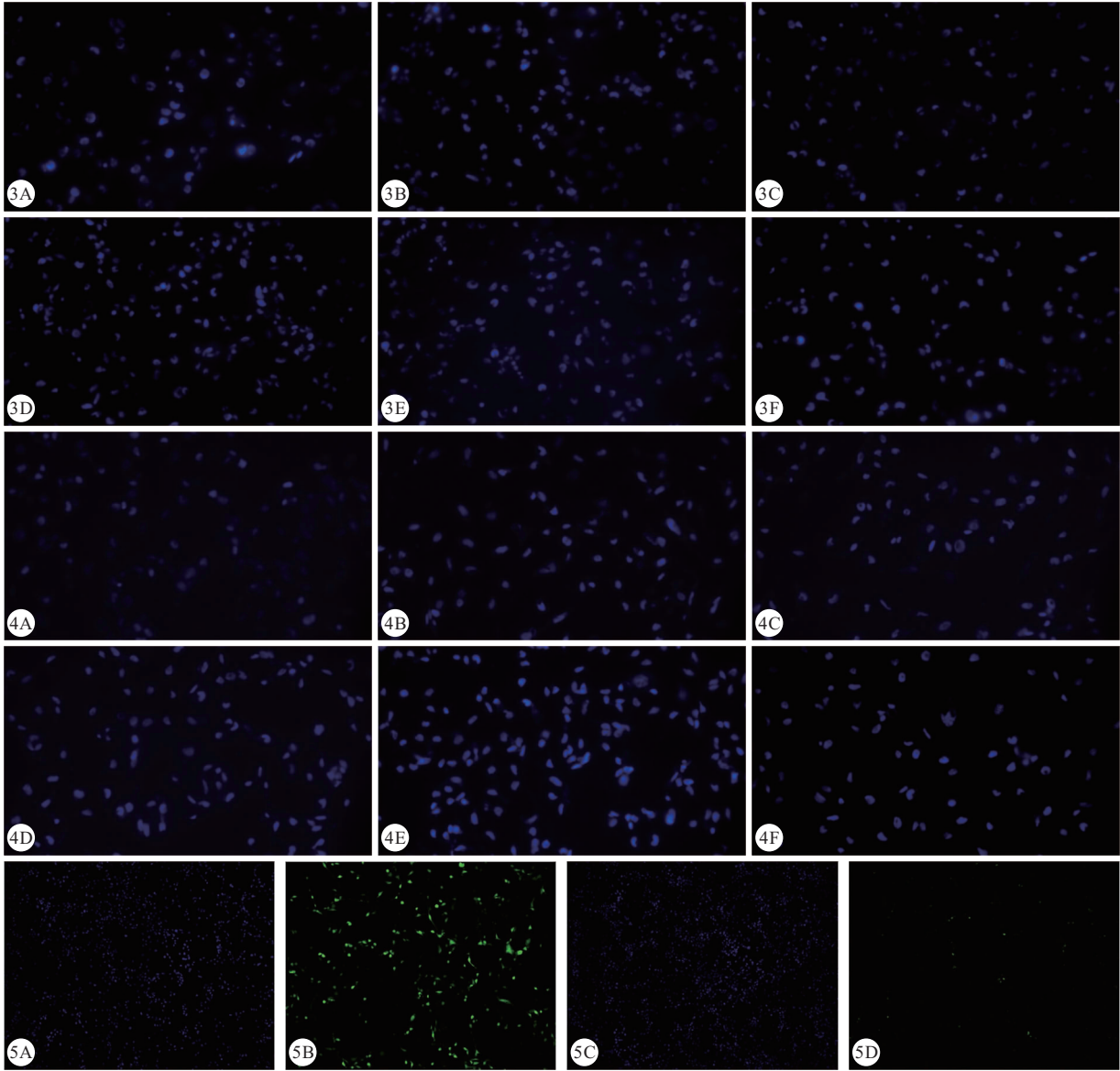


图 3 荧光显微镜下观察华蟾素处理 12 h 的 U87 胶质瘤细胞。Hochest 33342 染色 ×40 图 4 荧光显微镜下观察华蟾素处理 24 h 的 U87 胶质瘤细胞。Hochest 33342 染色 ×40 图 5 荧光显微镜下观察用 DMSO(A、B)及 20 μmol/L 华蟾素(C、D)处理 24 h 的 U87 胶质瘤细胞表达 p-AKT(308)的情况。DAPI 染色显示细胞位置。×40

Fig 3 Fluorescence microscopy represents the CB-treated U87 glioma cells at 12 h. Hochest 33342 staining ×40 Fig 4 Fluorescence microscopy represents the different concentration of CB-treated U87 glioma cells at 24 h. Hochest 33342 staining ×40 Fig 5 Fluorescence microscopy shows the expression of p-AKT(308) in U87 glioma cells after being treated with DMSO (A,B) or 20 μmol/L of CB (C,D) for 24 h. ×40

3A-3F: 0, 1, 2, 5, 10, 20 μmol/L CB, respectively; 4A-4F: 0, 1, 2, 5, 10, 20 μmol/L CB, respectively; 5A, 5C: DAPI staining allocates cells with blue fluorescence; 5B, 5D: p-AKT(308) is positive in green fluorescence

附表 不同浓度华蟾素作用于 U87 胶质瘤细胞 24 h 后 PI3K/AKT 和 BAX-caspase 信号通路蛋白表达水平(IOD 值)

Table Expressions of proteins in PI3K/AKT and BAX-caspase signal pathways after being treated with different concentrations of CB for 24 h (IOD value)

Protein	CB/(μmol/L)						P
	0	1	2	5	10	20	
p-AKT(S473)	194.8±7.6	186.3±9.7	170.5±5.5	170.9±13.1	197.2±12.6	177.7±16.5	>0.05
p-AKT(T308)	317.9±27.8	222.4±27.6	210.2±13.4	96.5±15.6	63.7±12.5	58.9±10.7	<0.05
p-PI3K	31.0±2.0	31.8±3.0	36.7±2.3	35.3±3.4	39.9±2.4	39.9±2.7	>0.05
PS6	61.1±4.1	57.6±4.3	56.3±6.2	55.4±6.5	56.4±6.1	53.5±6.8	>0.05
p-4EBP1	208.5±20.8	85.7±9.8	53.5±6.2	48.3±7.8	41.4±10.3	43.9±5.1	<0.05
BAX	56.7±4.7	75.6±6.5	114.7±9.3	148.6±5.2	181.7±5.7	279.1±12.1	<0.05
Cleaved-caspase 3	11.5±2.0	11.8±2.6	17.2±2.2	54.1±4.9	78.3±8.9	92.8±5.5	<0.05
Cleaved-caspase 9	246.5±18.3	208.5±12.6	201.8±16.3	230.8±20.9	214.6±14.6	211.7±17.6	>0.05
GAPDH	62.3±3.1	60.3±2.9	57.2±2.7	57.1±3.3	57.8±7.1	62.2±6.4	>0.05

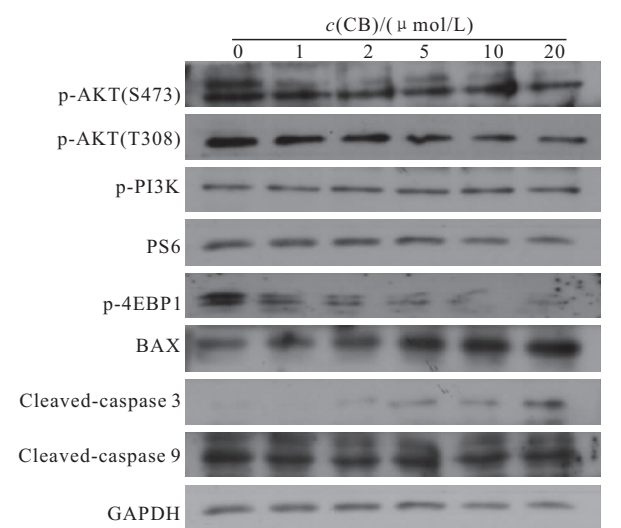


图 6 不同浓度华蟾素作用于 U87 胶质瘤细胞 24 h 后 PI3K/AKT 和 BAX-caspase 信号通路蛋白表达水平的变化

Fig 6 Expressions of signal pathway proteins of PI3K/AKT and BAX-caspase in different concentrations of CB treatment group at 24 h

3 讨论

实验结果表明,华蟾素可明显抑制 U87 胶质瘤细胞的增殖,6 h、12 h、24 h 的细胞活性随着华蟾素浓度的升高而降低,在相同浓度华蟾素作用下,细胞活性随着反应时间的增加而降低。48 h 时,细胞活性维持在 18% 左右,已不受剂量影响,推测此时华蟾素的抑制增殖的作用已达最大,不能继续增加。从细胞活性检测的结果可以得知,反应时间为 6 h,各组间细胞活性均还较高,反应时间为 48 h,各组间细胞活性维持在 18% 左右,所有我们选择观察华蟾素作用 12 h、24 h 后 U87 胶质瘤细胞的凋亡情况。U87 胶质瘤细胞凋亡率随华蟾素剂量增高而增高,并在 24 h 较 12 h 明显,因此我们选择检测华

蟾素处理 24 h 后 PI3K-AKT-4EBP1 与 BAX-caspase 相关蛋白的表达情况。

华蟾素诱导 U87 胶质瘤细胞的凋亡是通过影响凋亡相关蛋白的表达实现的,呈浓度依赖性反应。相关研究报道,华蟾素可引起肿瘤细胞的凋亡是通过影响某些凋亡分子实现的,包括增高凋亡蛋白 BAX、细胞色素 C、caspase-3 和 caspase-9 在前列腺癌细胞中的表达水平^[7,12],增高凋亡蛋白 BAX 在肝癌细胞和骨肉瘤细胞中的表达水平^[13-14],揭示华蟾素促使肝癌细胞和骨肉瘤细胞的凋亡是通过 BAX-caspase 信号通路实现的。本实验结果表明,随着作用于 U87 胶质瘤细胞的华蟾素浓度的增加,凋亡蛋白 BAX 和 cleaved caspase-3 的表达水平随之升高,说明华蟾素促 U87 胶质瘤细胞凋亡是通过影响凋亡蛋白 BAX 和 cleaved caspase-3 的表达水平而实现的。

华蟾素可使 U87 胶质瘤细胞中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 p-AKT(T308)、p-4EBP1 的表达水平降低。PI3K/Akt 信号通路的异常激活发生在多种肿瘤中,其中也包括胶质瘤^[15],该通路可调节肿瘤细胞的增殖和存活,PI3K/Akt 信号通路的异常激活,使肿瘤细胞获得更强的增殖能力。本研究发现华蟾素作用于 U87 胶质瘤细胞后,p-AKT(T308)的表达水平降低,并且其下游靶点 p-4EBP1 的表达水平也同样降低。p-4EBP1 是影响细胞增的关键蛋白,它不仅参与了蛋白质的合成,还参与了核糖体的合成以及细胞生长^[16-17]。已有研究证明,华蟾素对结肠癌模型的裸鼠具有较小的肿瘤生长抑制作用^[18]。在非小细胞肺癌动物模型上,5 mg/kg 剂量的华蟾素,可明显抑制肿瘤细胞的生长^[5]。因此,我们设想是否华蟾素也可以明显抑制胶质瘤动物模型的肿瘤细胞的生长,这需要我们进一步地研究,证

实这一假设。

本研究证明,华蟾素可抑制 U87 胶质瘤细胞的增殖、诱导 U87 胶质瘤细胞的凋亡,这可能是通过影响 PI3K/AKT 与 BAX-caspase 信号通路实现的。因此,我们相信华蟾素可能会是一种有前途的胶质瘤治疗剂。本研究的局限在于只使用一种胶质瘤细胞系,未证实华蟾素对其他胶质瘤细胞系是否具有相似的作用,且缺少颅内成瘤模型进一步验证药物作用效果。

参 考 文 献

[1] WEN PY, KESARI S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*,2008,359(5):492-507.

[2] DOLCEK TA, PROPP JM, STROUP NE, *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*,2012,14(Suppl 5):v1-v49.

[3] STUPP R, MASON WP, MJ VDB, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*,2005,352(10):987-996.

[4] MENG Z, YANG P, SHEN Y, *et al.* Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer. *Cancer*, 2009,115(22):5309-5318.

[5] ZHANG G, WANG C, SUN M, *et al.* Cinobufagin inhibits tumor growth by inducing intrinsic apoptosis through AKT signaling pathway in human nonsmall cell lung cancer cells. *Oncotarget*,2016,7(20):28935-28946.

[6] 董云巧, 马文丽, 顾金保, 等. 华蟾素注射液对 HepG2 细胞 NF- κ B 通路的影响. *南方医科大学学报*,2010,30(1):137-139.

[7] YU CH, KAN SF, PU HF, *et al.* Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. *Can Sci*,2008,99(12):2467-2476.

[8] 王 鹏, 吴 军, 李 敏, 等. 华蟾毒精抑制 HeLa 细胞增殖作用机制的探讨. *中华肿瘤杂志*,2005,27(12):717-720.

[9] YEH JY, HUANG WJ, KAN SF, *et al.* Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Prostate*,2003,54(2): 112-124.

[10] 岳 涛, 王海波, 张春泳, 等. 华蟾素对人脑胶质瘤细胞 SHG44 增殖及凋亡的影响. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2013,18(12):562-565.

[11] 赵志远. 华蟾素诱导人胶质瘤细胞 U251 凋亡的作用机制研究. *齐齐哈尔医学院学报*,2012,33(1):7-8.

[12] HE X, TANG J, QIAO A, *et al.* Cytotoxic biotransformed products from cinobufagin by *Mucor spinosus* and *Aspergillus Niger*. *Steroids*,2006,71(5):392-402.

[13] WANG DL, QI FH, XU HL, *et al.* Apoptosis-inducing activity of compounds screened and characterized from cinobufacini by bioassay-guided isolation. *Mol Med Rep*, 2010,3(4):717-722.

[14] YIN JQ, WEN L, WU LC, *et al.* The glycogen synthase kinase-3 β /nuclear factor-kappa B pathway is involved in cinobufagin-induced apoptosis in cultured osteosarcoma cells. *Toxicol Letters*,2013,218(2):129-136.

[15] JEFFREY A. Engelman. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews. Cancer*,2009,9(8):550-562.

[16] NISSIM H, NAHUM S. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*,2004,18(16):1926-1945.

[17] FAN QW, WEISS WA. Inhibition of PI3K-Akt-mTOR signaling in glioblastoma by mTORC1/2 inhibitors. *Methods Mol Biol*,2012,821:349-359[2017-12-13]. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-430-8_22.

[18] LI C, HASHIMI SM, CAO S, *et al.* Chansu inhibits the expression of cortactin in colon cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Bmc Complement Altern Med*,2015,15(1):1-8.

(2017 - 10 - 31 收稿,2018 - 03 - 01 修回)

编辑 吕 熙