

异叶败酱多糖的体内抗肿瘤活性研究

耿果霞^a, 陆文总^b, 李青旺^b, 李文烨^b

(西北农林科技大学 a 动物医学院, b 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**研究异叶败酱多糖抑制 U14 宫颈癌实体瘤小鼠肿瘤生长的作用机制。**【方法】**建立小鼠宫颈癌(U14)实体瘤模型,以灌胃生理盐水和皮下注射环磷酰胺(25 mg/kg)分别作为阴性和阳性对照,观察异叶败酱多糖不同剂量(30,60,90 mg/kg)灌胃给药 14 d 后,对小鼠肿瘤生长抑制作用的影响;检测异叶败酱多糖对荷瘤小鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)和碱性磷酸酶(AKP)活性的影响;用原位末端标记(TUNEL)法检测肿瘤细胞的凋亡情况;利用免疫组织化学法分析与细胞凋亡密切相关蛋白(突变型 p53、Bcl-2、Bax)的表达情况。**【结果】**与阴性对照组相比,异叶败酱多糖中、高剂量组瘤质量显著下降,荷瘤小鼠血清 LDH 活性显著降低,Bax 蛋白表达量显著升高,突变型 p53 和 Bcl-2 蛋白表达量显著下降($P<0.05$);异叶败酱多糖各组肿瘤组织的细胞凋亡数较阴性对照组均显著提高($P<0.05$),荷瘤小鼠血清 AKP 活性有所升高,但与阴性对照差异不显著($P>0.05$)。与阳性对照组相比,异叶败酱多糖中、高剂量组抗 U14 宫颈癌效果接近于临床化疗药环磷酰胺。**【结论】**异叶败酱多糖具有抑制实体瘤 U14 生长的作用,揭示该多糖可能通过调节细胞凋亡相关基因的表达,进而促进肿瘤细胞的凋亡而发挥其抗肿瘤作用。

[关键词] 抗肿瘤活性;异叶败酱多糖;细胞凋亡;宫颈癌小鼠

[中图分类号] R285.5;R730.52

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)11-0014-05

Anti-tumor activity of polysaccharides isolated from *Patrinia heterophylla* Bunge

GENG Guo-xia^a, LU Wen-zong^b, LI Qing-wang^b, LI Wen-ye^b

(a College of Animal Science and Technology, b College of Veterinary Medicine,

Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The aim of our research was to investigate the effect of *Patrinia heterophylla* Bunge polysaccharide (PHB-P) on U14-bearing mice. **【Method】**The tumor inhibition ratio was calculated by the model U14-bearing tumor mice. Subcutaneous injection of normal saline and given with cyclophosphamide 25 mg/kg were used as negative and positive controls, treated with PHB-P (30,60,90 mg/kg) for 14 days. Detection of apoptosis was performed by TUNEL staining assays. The activity of serum LDH and AKP was examined using the kits. Immunohistochemical analysis assay was applied on the protein expression productions of apoptosis-associated mutant p53, Bcl-2 and Bax genes in tumor tissues. **【Result】**The results showed that the groups of PHB-P (60,90 mg/kg), compared with the negative control group, significantly decreased tumor weight and the difference was significant ($P<0.05$); compared with the negative control group, the number of apoptotic cells of the PHB-P (60,90 mg/kg) groups significantly increased ($P<0.05$); compared with the negative control group, tumor bearing mice serum LDH activity of the groups of PHB-P (60,90 mg/kg) significantly decreased ($P<0.05$); In each group of PHB-P (30,60,90 mg/kg), ser-

* [收稿日期] 2010-07-08

[基金项目] 河北省秦皇岛科技局转基因动物生产基因工程药物研究项目(D08)

[作者简介] 耿果霞(1961—),女,陕西杨凌人,高级实验师,硕士,主要从事临床兽医学和抗癌药物研究。

[通信作者] 李青旺(1956—),男,陕西米脂人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物生殖生理调控与生物技术研究。

E-mail: liqingwangysu@yahoo.com.cn

um AKP activity increased compared with the negative control group, but the difference was not significant ($P > 0.05$); Bax protein expression was significantly higher than that of the negative control group ($P < 0.05$), mutant p53 and Bcl-2 protein expression in PHB-P (60,90 mg/kg) group compared with the negative control group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the positive control group, the effects of anti-tumor activity of the PHB-P (60,90 mg/kg) was close to the clinical chemotherapeutic agent cyclophosphamide. 【Conclusion】 Our data suggested that PHB-P might induce tumor cells apoptosis and inhibit tumor growth, including regulation of the apoptosis-associated genes.

Key words: anti-tumor activity; *Patrinia heterophylla* Bunge polysaccharides; cell apoptosis; uterine cervical cancer mice

肿瘤是危害人体健康的重要疾病。随着人口老龄化的加快,肿瘤的发病率也呈逐年上升趋势,因此,寻找有效、安全的药物仍然是肿瘤治疗工作的重要课题。目前,许多化学药物以诱导肿瘤细胞凋亡为靶点而发挥作用^[1],但同时也存在损伤机体等副作用,因此利用天然产物诱导肿瘤细胞凋亡的研究成为人们关注的焦点。在过去的几十年中,人们已经从蘑菇、海藻、苔藓等植物中分离出了多种多糖,这些多糖均显示出强大的抗肿瘤活性和免疫调节活性^[2]。由于天然性多糖来源广、细胞毒性较低、毒副作用小,因此对植物多糖抗肿瘤活性的研究是医药界的热门领域。

异叶败酱(*Patrinia heterophylla* Bunge)是我国传统的中草药,主要分布于陕西、河南、河北和山西等地。其根及全草均可入药,具有清热解毒、消肿排脓和祛瘀止痛的功效,临床上广泛用于急性阑尾炎初起、无名肿痛、宫颈糜烂、癌症等疾病的治疗。研究表明,异叶败酱主要含有黄酮醇、齐墩果酸、异香豆素糖苷、多糖和挥发性油^[3-6],其活性成分在体外能抗人宫颈癌 HeLa 细胞生长^[5],在体内能抑制大肠癌 HT-29 实体瘤生长^[7],具有较好的抗肿瘤活性^[8]。但是,有关异叶败酱多糖(polysaccharides of *P. heterophylla* Bunge, PHB-P)在体内抗肿瘤的研究,国内外目前尚未见报道。本试验通过建立小鼠 U14 宫颈癌实体瘤模型,研究异叶败酱多糖在体内对实体瘤细胞生长的抑制作用及其诱导肿瘤细胞凋亡的功能,同时分析了与肿瘤细胞凋亡密切相关基因的表达情况,试图阐明异叶败酱多糖抗肿瘤作用的机制,以期为异叶败酱多糖抗肿瘤药物的临床应用提供理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品和试剂 环磷酰胺(CTX)购于江苏恒

瑞医药股份有限公司,DEAE-纤维素、苏木精、伊红购于美国 Sigma 公司,兔抗鼠单克隆抗突变型 p53、Bcl-2、Bax 购于美国 Santa Cruz 公司,脱氧核苷酸末端转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒购于美国 Roche 公司,SP 免疫组化检测试剂盒购于北京中杉金桥试剂公司,乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)试剂盒购于南京建成生物工程研究所,其他试剂均为分析纯。

1.1.2 异叶败酱多糖的提取 将异叶败酱全草(500 g)经氯仿-甲醇(体积比 2:1)混合液脱脂、脱色后,蒸馏水回流(1 h/次)3 次,合并回流液过滤,滤液减压浓缩,用体积分数 95%乙醇沉淀,离心收集沉淀物,Savag 法去除蛋白,冷冻干燥即得异叶败酱粗多糖。将异叶败酱粗多糖溶于蒸馏水进行 DEAE-纤维素层析柱处理,收集洗脱液进行透析,冷冻干燥后得精制异叶败酱多糖(7.5 g)。

1.1.3 细胞株和试验动物 宫颈癌细胞株(U14)购于中国医学科学院。清洁级昆明种雌性小鼠(6~8 周龄,(20±2) g)购于协和医科大学实验动物中心,试验期间自由采食饮水。

1.2 方法

1.2.1 接种、分组和给药 小鼠腹腔注射 U14 细胞后 7~9 d,用 1 mL 一次性无菌注射器吸取处于最佳生长状态的 U14 腹水瘤(乳白色)传代细胞,调整细胞密度至 1×10^7 /mL,按 0.2 mL/只接种于试验小鼠左前肢腋下。接种后第 2 天将动物随机分为 5 组,每组 10 只,包括阴性对照组(灌胃生理盐水)、阳性对照组(皮下注射环磷酰胺 25 mg/kg)及异叶败酱多糖高剂量组(灌胃 90 mg/kg)、中剂量组(灌胃 60 mg/kg)、低剂量组(灌胃 30 mg/kg),每天给药 1 次,持续 14 d。

1.2.2 肿瘤抑制率的测定 停药次日脱颈处死小鼠,剖取瘤块称质量并保存留作其他试验,按下式计算肿瘤抑制率。

肿瘤抑制率=(1-给药组平均瘤质量/阴性对照组平均瘤质量)×100%。

1.2.3 肿瘤组织细胞凋亡的检测 根据 TUNEL 试剂盒的操作说明,进行肿瘤组织石蜡切片样品的细胞凋亡检测。主要步骤如下:57℃熔蜡 5 min→二甲苯和梯度乙醇脱蜡→蛋白酶 K 室温处理 15 min→H₂O₂ 室温封闭 5 min→加入标记反应混合物 37℃孵育 1 h→加入终止缓冲液终止反应→加入 Converter-POD 试剂 37℃孵育 1 h→加入 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)底物于 25℃作用 10 min→亚甲基绿衬染,样品切片后在光学显微镜下观察。细胞核呈棕褐色的视为阳性细胞,细胞核呈绿色的视为阴性细胞,随机选择 10 个视野,计数凋亡细胞数和总细胞数,计算凋亡细胞数占总细胞数的百分率。

1.2.4 血清 LDH 和 AKP 的测定 停药次日,各组小鼠自眼眶取血;血样于 4℃静置 2 h,3 000 r/min 离心 15 min,收集血清;根据 LDH、AKP 试剂盒说明书测定各组血清中 LDH 和 AKP 的活性。

1.2.5 肿瘤组织突变型 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 应用免疫组织化学法分析各组肿瘤组织中突变型 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况。操作流程为:肿瘤组织石蜡切片样品经二甲苯、梯度酒精脱蜡水化→抗原修复 15 min→体积分数 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,去除内源性过氧化物酶活性→山羊血清封闭 15 min→单克隆抗体突变型 p53(或 Bcl-2、Bax)37℃孵育 3 h→生物素标记的二抗室温下孵育 15 min→辣根酶标记链霉卵白素工作液室温下孵育 15 min→DAB 显色液显色 5 min→苏木精复染 15 min→分化液分化 5 s→梯度酒精脱水后加拿大树脂封片。试验采用 PBS 代替一抗作为阴性对照,显色结果在显微镜下观察。细胞核(或膜)呈褐色的视为阳性细胞,现蓝色的视为阴性细胞。计数每个视野中阳性细胞数和总细胞数,计算 10 个随机视野中的阳性细胞率。

1.2.6 统计分析 试验数据以“平均值±标准差”表示,利用 Origin7.5 统计软件进行分析,组间差异显著性采用 *t* 检验进行判定($P<0.05$,表示统计学差异显著)。

2 结果与分析

2.1 异叶败酱多糖对小鼠体内 U14 实体瘤的抑制作用

表 1 结果表明,异叶败酱多糖低剂量组瘤质量与阳性对照组差异极显著($P<0.01$),与阴性对照

组差异不显著($P>0.05$),说明低剂量异叶败酱多糖对荷瘤小鼠瘤质量影响不明显,而且作用效果远差于临床化疗药 CTX。异叶败酱多糖中、高剂量组瘤质量与阳性对照组差异不显著($P>0.05$),与阴性对照组差异显著($P<0.05$),说明中、高剂量异叶败酱多糖对瘤质量的影响接近于临床化疗药 CTX。异叶败酱多糖低、中、高剂量组的肿瘤抑制率分别为 4.07%,31.30%和 42.68%,说明中、高剂量异叶败酱多糖在小鼠体内具有显著的抗肿瘤效果,且存在剂量依赖关系。

表 1 异叶败酱多糖体内对小鼠肿瘤生长抑制的影响
Table 1 Effect of PHB-P on tumor growth inhibition *in vivo*

处理组 Group	瘤质量/g Tumor weight	肿瘤抑制率/% Inhibition ratio
阴性对照组 Negative control	2.46±0.17	—
阳性对照组 CTX	1.13±0.19**	54.06
异叶败酱多糖低剂量组 PHB-P-LD	2.36±0.27	4.07
异叶败酱多糖中剂量组 PHB-P-MD	1.69±0.25*	31.30
异叶败酱多糖高剂量组 PHB-P-HD	1.41±0.29*	42.68

注:与阴性对照组比较,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。
下表同。
Note:Compared with the control group,* stands for $P<0.05$,** stands for $P<0.01$. The same as below.

2.2 异叶败酱多糖对荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

由表 2 可见,与阴性对照组相比,异叶败酱多糖各处理组显著提高了肿瘤组织的细胞凋亡率($P<0.05$)。阴性对照组肿瘤细胞自发凋亡率仅有 4.15%,异叶败酱多糖低、中、高剂量组的肿瘤细胞凋亡率则分别提高到 8.23%,18.96%和 20.85%,阳性对照组细胞凋亡率为 27.03%。这说明异叶败酱多糖可以在体内诱导 U14 实体瘤细胞的凋亡。

表 2 TUNEL 染色检测异叶败酱多糖对荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响
Table 2 Effect of PHB-P on apoptotic cell number in tumor tissue by TUNEL assay

处理组 Group	细胞凋亡率/% Apoptotic cell
阴性对照组 Negative control	4.15±1.87
阳性对照组 CTX	27.03±2.31**
异叶败酱多糖低剂量组 PHB-P-LD	8.23±2.66*
异叶败酱多糖中剂量组 PHB-P-MD	18.96±2.26**
异叶败酱多糖高剂量组 PHB-P-HD	20.85±3.01**

2.3 异叶败酱多糖对荷瘤小鼠血清 LDH 和 AKP 活性的影响

由表 3 可见,与阴性对照组相比,异叶败酱多糖中、高剂量极显著降低了荷瘤小鼠血清 LDH 的活性($P<0.05$),但与低剂量组和阳性对照组差异不显著

($P>0.05$)。相较阴性对照组,异叶败酱多糖各组 and 阳性对照组荷瘤小鼠血清 AKP 活性差异均不显著 ($P>0.05$),各处理组血清 AKP 的活性稍有提高。

2.4 异叶败酱多糖对小鼠肿瘤组织突变型 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

由表 4 可见,与阴性对照组相比,异叶败酱多糖中、高剂量组和阳性对照组小鼠肿瘤组织的 Bax 蛋白表达均显著提高($P<0.05$),同时,突变型 p53 和 Bcl-2 蛋白表达均显著下降($P<0.05$)。其中,异叶败酱多糖中、高剂量组小鼠肿瘤组织的突变型 p53 蛋白表达量分别降低了 24.31% 和 35.44%,Bcl-2 蛋白表达量降低了 31.85% 和 36.18%,Bax 蛋白表达量提高了 61.12% 和 73.98%。但是,低剂量异叶

败酱多糖未能明显改变突变型 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达量。

表 3 异叶败酱多糖对荷瘤小鼠血清 LDH 和 AKP 活性的影响

Table 3 Effect of PHB-P on the level of serum LDH and AKP in tumor-bearing mice			U/L
处理组 Group	LDH	AKP	
阴性对照组 Negative control	4 307±101	67.82±10.23	
阳性对照组 CTX	4 271±113	69.23±13.87	
异叶败酱多糖低剂量组 PHB-P-LD	4 198±137	67.94±10.77	
异叶败酱多糖中剂量组 PHB-P-MD	3 581±129**	71.65±11.45	
异叶败酱多糖高剂量组 PHB-P-HD	3 296±142**	73.57±12.31	

表 4 异叶败酱多糖对小鼠肿瘤组织突变型 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Table 4 Effect of PHB-P on the protein expression of mutant p53,Bcl-2 and Bax in tumor tissue

处理组 Group	突变型 p53 阳性细胞率/% Mutant p53 positive cell	Bcl-2 阳性细胞率/% Bcl-2 positive cell	Bax 阳性细胞率/% Bax positive cell
阴性对照组 Negative control	69.56±5.03	76.32±8.25	19.52±4.31
阳性对照组 CTX	36.12±6.78**	50.19±7.46*	41.13±7.56**
异叶败酱多糖低剂量组 PHB-P-LD	61.98±7.44	70.32±6.88	22.37±4.96
异叶败酱多糖中剂量组 PHB-P-MD	52.65±5.56*	52.01±7.02*	31.45±5.02*
异叶败酱多糖高剂量组 PHB-P-HD	44.91±6.12*	46.71±6.34**	33.96±6.12*

3 讨 论

近年来,在植物中寻找有效而副作用小的抗肿瘤药物,特别是对中草药抗肿瘤机理的探讨,已成为国内外研究的重要课题。本研究结果显示,用不同剂量的异叶败酱多糖治疗 U14 宫颈癌荷瘤小鼠后,肿瘤生长均受到不同程度的抑制,且肿瘤抑制率随着异叶败酱多糖含量的升高而呈上升趋势,最高可达 42.68%,与阳性对照组抑瘤率差异不显著,表明异叶败酱多糖在体内具有显著的抗肿瘤效果,且与剂量存在一定的关系。

细胞凋亡是因内外环境的变化或死亡信号的触发,并在基因调控下引发的细胞自主性死亡过程,是正常胚胎发生过程和成人发育中细胞消除的正常途径,凋亡过程的紊乱将导致发育异常并加快肿瘤的发生^[9]。细胞增生和细胞凋亡间的平衡是多细胞生物体维持自身稳定的重要因素,如果肿瘤细胞的凋亡受抑制,肿瘤细胞数则增加,表现出生长优势,这是肿瘤发生的一个重要基础。细胞凋亡具有独特的生物化学和形态学特征,生物化学上的主要变化表现为内源性核酸内切酶被激活,细胞 DNA 被切割出现单链或双链缺口,产生与 DNA 断裂点数目相同的 3'-OH 末端。TUNEL(脱氧核苷酸末端转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法)是检测凋亡细胞的

灵敏方法之一。本试验通过 TUNEL 法检测到,异叶败酱多糖可诱导 U14 肿瘤细胞的凋亡,异叶败酱多糖高剂量组诱导细胞凋亡率达到 20.85%,表明异叶败酱多糖在体内可通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤生长。

细胞凋亡是级联式基因调控的结果,许多基因参与了此过程,其中包括 p53、Bcl-2、Bax 等^[10]。p53 基因是一种促进细胞凋亡的抑癌基因,可分为野生型和突变型 2 种,均参与细胞凋亡调控,但作用效果不同。野生型 p53 能修复细胞 DNA 的损伤,一旦 DNA 难以修复时即启动凋亡进程,使具有癌变倾向的细胞发生凋亡;而突变型 p53 丧失启动细胞凋亡的功能,与野生型 p53 亚单位形成寡聚体,干扰野生型 p53 的功能,从而使细胞增殖失控^[11]。研究表明,约 50% 的人类肿瘤发生 p53 的突变,一些天然产物的抗肿瘤机理即是清除肿瘤细胞中的 p53 突变细胞而保留 p53 正常细胞^[12]。Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡的调控中也起重要作用,其中 Bcl-2 抑制细胞的凋亡,而 Bax 促进细胞的凋亡,两者的比例决定细胞凋亡的发生^[13]。激活的 p53 通常诱导 Bax 蛋白上调,从而活化下游 caspase-3 等分子导致细胞凋亡^[14]。本试验通过免疫组化染色分析表明,异叶败酱多糖能够显著降低肿瘤组织中突变型 p53 蛋白和 Bcl-2 蛋白的表达,同时提高了 Bax 促凋亡

蛋白的表达。这提示异叶败酱多糖可能通过减弱或解除 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用而促进细胞凋亡,同时还可能下调突变型 *p53*、活化正常的 *p53* 来激活 Bax 蛋白,从而诱导肿瘤细胞的凋亡。

LDH 作为一种厌氧条件下催化丙酮酸到乳酸盐可逆性反应的酶,其上调能确保肿瘤细胞有效地进行厌氧生活、糖代谢,降低了肿瘤细胞对氧的依赖^[14]。有研究表明,原发性肿瘤去除手术后 1 周内,患者血清 LDH 快速降低,这表明血清 LDH 是癌症患者体内肿瘤细胞的产物^[15]。本研究表明,高剂量异叶败酱多糖可使 U14 荷瘤小鼠血清 LDH 活性水平显著下降,说明异叶败酱多糖可能降低了肿瘤细胞膜的通透性,干扰了肿瘤细胞的正常代谢,最终导致肿瘤组织细胞释放到血清中的 LDH 显著降低。AKP 常被作为一种肝毒性的生物标记酶^[16]。本研究结果表明,异叶败酱多糖未明显改变血清中的 AKP 水平,而且试验过程中也未发现试验小鼠有中毒症状,这说明所选的异叶败酱多糖剂量对 U14 荷瘤小鼠是安全的,无明显毒副作用。

综上所述,异叶败酱多糖在 U14 荷瘤小鼠体内具有显著的抗肿瘤作用,并且通过多种途径抑制肿瘤细胞的生长。其作用机理可能是通过调节 *p53*、*Bcl-2* 和 *Bax* 等与凋亡相关基因的表达,以及影响细胞膜通透性而发挥诱导肿瘤细胞凋亡的作用。深入研究异叶败酱多糖对 U14 肿瘤细胞凋亡相关基因表达的影响,有助于进一步认识异叶败酱多糖抗肿瘤的机制,从而为其临床应用提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Baell J B, Huang D C. Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5/6): 851-863.
- [2] Ooi V E, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes [J]. *Curr Med Chem*, 2000, 7(7): 715-729.
- [3] 曹艳萍, 李翠芹. RP-HPLC 法测定墓头回中的齐墩果酸 [J]. *中草药*, 2005, 36(5): 764-766.
Cao Y P, Li C Q. Determination the content of Oleandic acid in *Patrinia heterophylla* (scabra) Bunge by RP-HPLC [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2005, 36(5): 764-766. (in Chinese)
- [4] 田智勇, 曹继华. 黄花败酱和异叶败酱挥发油的研究 [J]. *河南大学学报: 医学科学版*, 2004, 23(1): 35-37.
Tian Z Y, Cao J H. Studies on chemical components of volatile oils of *Patrinia scabiosaeifolia* Fisch and *P. heterophylla* Bunge [J]. *Journal of Henan University: Medical Science Edition*, 2004, 23(1): 35-37. (in Chinese)
- [5] Lu X, Li D, Dalley N K, et al. Structure elucidation of compounds extracted from the Chinese medicinal plant *Patrinia heterophylla* [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(8): 677-685.
- [6] 丁 兰, 徐福春, 王 瀚, 等. 异叶败酱化学成分的研究及体外细胞毒性检测 [J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2007, 43(3): 62-65.
Ding L, Xu F C, Wang H, et al. Studies on chemical constituents from *Patrinia heterophylla* Bunge and their cytotoxicity *in vitro* [J]. *Journal of Northwest Normal University: Natural Science Edition*, 2007, 43(3): 62-65. (in Chinese)
- [7] 陈金秀, 王 迪, 王 军, 等. 异叶败酱总苷片对人大肠癌 HT-29 细胞凋亡的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(2): 159-161.
Chen J X, Wang D, Wang J, et al. Effects of Yiye Baijiang Zonggan tablets on apoptosis of human colon cancer HT-29 cells [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2007, 27(2): 159-161. (in Chinese)
- [8] 曹艳萍. 植物墓头回中总皂甙的提取与含量测定 [J]. *化学研究与应用*, 2005, 17(4): 529-530.
Cao Y P. Extraction and content determination of total saponins in *Patrinia heterophylla* (scabra) Bye [J]. *Chemical Research and Application*, 2005, 17(4): 529-530. (in Chinese)
- [9] Gercel-Taylor C. Diphenylamine assay of DNA fragmentation for chemosensitivity testing [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 111: 79-82.
- [10] Paquet C, Schmitt E, Beauchemin M, et al. Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic Bcl-2 family members in *p53*-defective cells [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 815-831.
- [11] John B. Natural compounds in cancer therapy [M]. Princeton: Oregon Medical Press, 2001.
- [12] Shin D M, Mao L, Papadimitrakopoulou V M, et al. Biochemopreventive therapy for patients with premalignant lesions of the head and neck and *p53* gene expression [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(1): 69-73.
- [13] Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: Functions and clinical implications in cancer [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2006, 43(1): 1-67.
- [14] Koukourakis M I, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: Strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway: A report of the tumour angiogenesis research group [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(26): 4301-4308.
- [15] Koukourakis M I, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(5): 877-885.
- [16] Tong D W, Wang J Y, Mu P H, et al. Analysis of several serum enzymes and blood urea nitrogen of swainsonine-HSA immunized goats [J]. *Anim Feed Sci Tech*, 2008, 142(1): 74-88.