

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.010

茛菪明碱对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及凋亡的影响*

姚建新¹,姚志峰^{2△},李占峰¹,刘永彪³

(1. 江苏联合职业技术学院南京卫生分院医学影像系,南京 210038;2. 南京医科大学第二附属医院放射肿瘤科 210011;3. 南京医科大学第一附属医院肿瘤放射治疗科 210029)

摘要:目的 探讨茛菪明碱(PL)对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡的影响及作用机制。方法 体外培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞;采用活细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测不同浓度的 PL 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响;流式细胞术检测 PL 对细胞凋亡的影响;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 PL 对 MDA-MB-231 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平的影响。结果 PL 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,并呈现出浓度、时间依赖性。PL 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡,而乙酰-L-半胱氨酸则抑制了 PL 诱导的细胞凋亡。Western blot 结果提示随着 PL 浓度的增加,Bax 的表达逐渐增加,而 Bcl-2 的表达逐渐减少。结论 PL 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有明显的生长抑制和诱导凋亡作用,其机制可能与 Bcl-2 蛋白表达的减少和 Bax 蛋白表达增加有关。

关键词:乳腺癌;细胞增殖;细胞凋亡;茛菪明碱

中图分类号:R73-3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)32-4304-03

Effect of piplartine on proliferation and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cell line*

Yao Jianxin¹, Yao Zhifeng^{2△}, Li Zhanfeng¹, Liu Yongbiao³

(1. Department of Medical Imaging, Nanjing Health School of Jiangsu Union Technical Institute, Nanjing, Jiangsu 210038, China; 2. Department of Radiation Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210011, China; 3. Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective The aim of the study was to investigate the effect of piplartine on the proliferation and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells line and the mechanism involved. **Methods** Human breast cancer MDA-MB-231 cells line was cultured in vitro. The inhibitory effect of piplartine on the proliferation of MDA-MB-231 cells was measured by CCK-8 assay after treatment with piplartine at different concentrations. The apoptosis rates were measured by flow cytometry. Western blot was used to explore the effect of piplartine on MDA-MB-231 cells Bcl-2 and Bax protein expression. **Results** The CCK-8 assay showed that piplartine had an inhibiting effect on the proliferation of MDA-MB-231 cells in a concentration and time dependent manner. Piplartine induced apoptosis of MDA-MB-231 cells obviously. The antioxidant N-acetyl-L-cystein inhibited the apoptosis of cells. By Western blot analysis, we found the expression of Bax was up-regulated whereas that of Bcl-2 was down-regulated in a concentration dependent manner. **Conclusion** Piplartine possesses a significant function for inhibiting proliferation and inducing apoptosis of MDA-MB-231 cells, and its mechanism would be associated with the down regulation of Bcl-2 and up regulation of Bax.

Key words: breast neoplasms; cell proliferation; apoptosis; piplartine

茛菪明碱(piplartine, PL)是从胡椒科植物茛菪根中分离得到的生物碱类化合物,具有诸如镇痛、镇静、抗血小板凝集、抗真菌、抗血吸虫、抗焦虑以及抗抑郁等多种生理及药理活性^[1-4]。近年来研究发现,PL对多种肿瘤细胞具有特异性的细胞毒作用,可显著抑制多种人类肿瘤细胞的生长增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常细胞没有明显毒性作用^[5-8]。然而,目前有关 PL 抗乳腺癌的具体作用机制仍不太清楚。本研究旨在研究 PL 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡的影响及可能机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购自中科院上海细胞库。采用含 10% 胎牛血清(FBS)的高糖 DMEM 完全培养液(内含青-链霉素 100 U/mL),置于含 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养,为单层贴壁生长。每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 试剂与仪器 PL:分子式 C₁₇H₁₉NO₅,相对分子质量 317.34,由华东师范大学化学化工学院合成(纯度大于 99%)。用二甲亚砜(DMSO)配成浓度为 5 mmol/L 的储备液,过滤除菌,置

于-20℃ 冰箱保存。使用时用无血清培养基逐级稀释至设定实验浓度(DMSO 浓度小于 0.1%)。高糖 DMEM 培养基、0.25% 胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、青-链霉素溶液为 GIBCO 公司产品;FBS 购于杭州四季青生物工程材料有限公司;活细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自日本株式会社同仁化学研究所;DMSO、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒为南京凯基公司产品;乙酰-L-半胱氨酸(N-Acetyl-L-cysteine, NAC)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒为碧云天生物工程公司产品。Bcl-2/Bax 鼠抗人单克隆抗体、β-actin 羊抗鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠单克隆抗体均购于 Santa Cruz 公司。其余为国产分析纯试剂。主要仪器有酶标仪(Thermo 公司),流式细胞仪(FACS Calibur, 美国库尔特公司)。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 法检测 PL 对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制率 将 MDA-MB-231 细胞用 0.25% 的胰酶消化,制备成单细胞悬液,以 5×10⁴ 个/mL 的密度接种到 96 孔培养板,每孔 100 μL,培养 24 h 后,更换培养液,加入 1.0、2.5、5.0 和 10.0 μmol/L 的 PL 细胞培养液 250 μL。每一浓度设 5 个复孔,

* 基金项目:江苏省医学创新团队与领军人才资助项目(LJ201123)。
△ 通讯作者, Tel:18951858722; E-mail: yzf058565@126.com。

作者简介:姚建新(1962—),副教授,本科,主要从事肿瘤影像新技术研究。

表 1 不同浓度的 PL 对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别		24 h		48 h		72 h	
		A 值	增殖抑制率(%)	A 值	增殖抑制率(%)	A 值	增殖抑制率(%)
空白对照组	—	0.063±0.010	—	0.076±0.015	—	0.092±0.021	—
溶剂对照组	0.1% DMSO	1.365±0.442	—	1.605±0.023	—	1.932±0.013	—
PL 组	1.0 μmol/L	1.254±0.017	8.52	1.366±0.094	15.62	1.425±0.037	27.56
	2.5 μmol/L	1.084±0.052	21.58	1.156±0.033	29.35	1.037±0.230	48.64
	5.0 μmol/L	0.920±0.023	34.18	0.992±0.056	40.12	0.803±0.091	61.34
	10.0 μmol/L	0.475±0.046	68.36	0.465±0.028	74.55	0.457±0.036	80.16

—:表示此项无数据。

加药后的细胞继续培养 24、48 或 72 h。于实验终止前 4 h,每个孔内加入 10 μL 的 CCK8 试剂,将 96 孔板置培养箱内培养 4 h,在 450 nm 波长处用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度(A)值。溶剂对照组:加入相同体积含终浓度为 0.1% DMSO 的完全培养基;空白对照组:不加细胞只加培养基。比色时以空白孔调零。各药物浓度重复 3 次,细胞相对增殖抑制率=[1-(PL 组 A 值-空白对照组 A 值)]/(溶剂对照组 A 值-空白对照组 A 值)×100%。

1.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期细胞,用 0.25% 的胰酶消化细胞,调整细胞密度,约 5×10⁵ 个/mL,接种于 6 孔培养板中,贴壁培养 24 h 后,每孔 1 mL,实验分为 3 组:(1)对照组(仅含 DMSO 和细胞的培养液);(2)PL 组,药物浓度为 5 μmol/L;(3)PL+NAC 组,用抗氧化剂 NAC 3 mmol/L 预孵育 1 h 后加入 5 μmol/L PL 孵育细胞 48 h。每组设 3 个复孔。0.25% 胰酶消化,离心,重悬,PBS 液洗涤 2 遍,收集各组细胞,经 AnnexinV-FITC 和 PI 双染色,流式细胞仪检测细胞凋亡率。以上实验重复 3 次。

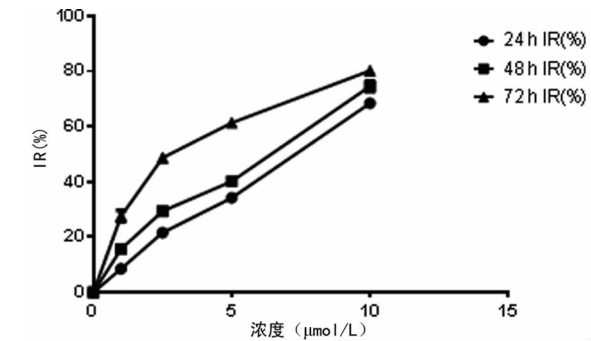
1.3.3 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 不同浓度 PL 分别作用细胞 48 h 后,收集细胞,预冷的 PBS 洗 2 遍,离心。加适量预冷的细胞裂解液,置于冰上裂解 30 min,12 000 r/min 于 4 ℃ 离心 20 min,取上清液备用。按照 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白,并调整各组蛋白质量浓度一致。蛋白提取物经定量后,各组取等量蛋白加入等量 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液,并置 95~100 ℃ 沸水中变性 5 min,行 SDS-PAGE 垂直电泳。电转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,丽春红染色观察转膜情况。加 5% 的脱脂奶粉于 4 ℃ 冷库封闭过夜,TBST 缓冲液洗膜 1.5 h 后加一抗 Bcl-2、Bax 鼠抗人单克隆抗体,内参照 β-actin 羊抗鼠单克隆抗体(均为 1:1 000 稀释),过夜孵育,TBST 洗膜 1.5 h 后加 HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗,37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗膜 40 min 后 ECL 试剂显色、曝光,并翻拍成照片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,检验水准 α=0.05,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

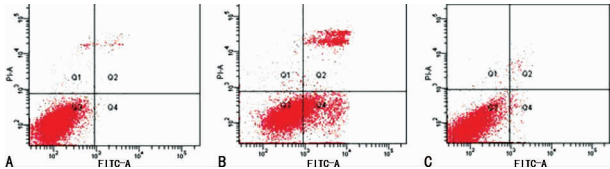
2 结 果

2.1 PL 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 不同浓度的 PL 处理 MDA-MB-231 细胞 24、48、72 h,各浓度组在不同时间点的增殖抑制率与溶剂对照组相比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 1、图 1。

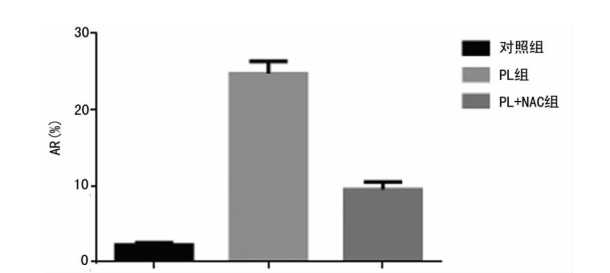
2.2 PL 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 PL 作用 48 h 后可检测到明显的细胞凋亡,凋亡率(24.70±1.62)%,与对照组凋亡率(2.20±0.35)%相比较,两者差异有统计学意义(*P*<0.05);PL+NAC 组的凋亡率为(9.50±0.98)%,明显低于 PL 组的凋亡率,两者差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 2、3。



IR:增殖抑制率。
图 1 增殖抑制率随浓度和时间的变化

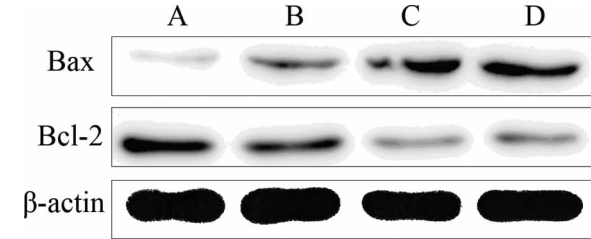


A:对照组;B:PL 组;C:PL+NAC 组。
图 2 各组细胞凋亡情况($\bar{x} \pm s, n=3$)



AR:细胞凋亡率。
图 3 各组细胞凋亡情况

2.3 Western bolt 检测 Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达水平 随着 PL 浓度的增加,Bcl-2 蛋白表达减弱,Bax 蛋白表达增强,各浓度组细胞的 Bcl-2 与 Bax 的灰度比值之间差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 4、表 2。



A:PL 0 μmol/L 组;B:PL 2.5 μmol/L 组;C:PL 5.0 μmol/L 组;D:PL 10.0 μmol/L 组。
图 4 PL 对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况的 Western bolt 检测结果

表 2 PL 对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)			
组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
PL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.98 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.03	5.50 $\pm$ 0.32
PL 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.22 $\pm$ 0.02 ^a	0.75 $\pm$ 0.01 ^a	1.63 $\pm$ 0.05 ^a
PL 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.82 $\pm$ 0.08 ^{ab}	1.06 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.77 $\pm$ 0.02 ^{ab}
PL 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.78 $\pm$ 0.01 ^{abc}	1.32 $\pm$ 0.15 ^{abc}	0.59 $\pm$ 0.03 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与 PL 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较;^b: $P<0.05$,与 PL 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较;^c: $P<0.05$,与 PL 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较。

3 讨 论

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer,TNBC)是指雌激素受体(estrogen receptor,ER)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)和人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2,HER-2)均为阴性的一种特殊类型乳腺癌,内分泌治疗和分子靶向药物注射用曲妥珠单抗均无效,而且 TNBC 更易局部复发和远处转移,是各种乳腺癌亚型中恶性程度最高、预后最差的一类^[9]。相当一部分抗肿瘤药物的开发基于天然化合物。PL 作为一种从胡椒科植物茱萸的根中分离得到的生物碱类化合物,对诸如白血病细胞、膀胱癌细胞、肺癌细胞以及结肠癌等多种人肿瘤细胞有增殖抑制作用,而不影响正常细胞的生长^[6-7,10-13]。

本研究对 PL 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡诱导作用及其潜在机制进行探讨。首先使用 CCK-8 法观察 PL 对肿瘤细胞增殖的抑制作用,结果显示,1.0、2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ PL 作用人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 24、48、72 h,均能抑制细胞的增殖,且呈浓度、时间依赖关系,PL 组与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。本结果与 Bezerra 等^[14]的研究类似,他们发现 PL 能显著抑制 HL-60、K562、Jukart、Molt-4 等白血病细胞的增殖,并且认为两个 α 、 β 不饱和羰基部分是其发挥细胞毒性的结构基础^[15-16]。本研究证实了 PL 对 MDA-MB-231 细胞同样产生细胞毒作用,然而其抗肿瘤作用却不十分清楚,为此笔者从诱导 TNBC 细胞凋亡的角度阐述其作用机制。本实验使用 Annexin-V/PI 双染法检测了 MDA-MB-231 细胞的凋亡情况,结果发现 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 PL 即引起了 MDA-MB-231 细胞的明显凋亡。Kong 等^[17]研究发现,用 PL 处理的前列腺癌 PC-3 细胞在光镜和荧光显微镜下出现空泡化、染色体浓集现象以及凋亡细胞的增加等典型表现,从形态学方面证实了 PL 能促进前列腺癌细胞的凋亡。Raj 等^[6]研究发现,PL 诱导肿瘤细胞凋亡的重要机制之一是通过活性氧(reactive oxygen species,ROS)应激反应途径靶向杀伤肿瘤细胞,他们发现 PL 能升高肿瘤细胞内 ROS 水平,对应的细胞凋亡率也会增加,而对正常细胞无明显影响。有研究指出,与正常细胞相比,肿瘤细胞对 ROS 更敏感,提出可以通过 PL 介导肿瘤细胞 ROS 的动态平衡达到靶向杀伤肿瘤细胞,而不对正常组织细胞造成损伤的抗癌新策略^[18]。NAC 作为一种抗氧化剂,理论上可有效抑制肿瘤细胞内 ROS 水平升高,故本研究使用 NAC 的目的就在于观察 PL 所诱导的 ROS 水平降低对肿瘤细胞凋亡有无影响。结果发现 PL+NAC 组的细胞凋亡率明显低于 PL 组,进一步证实了 ROS 在 PL 诱导细胞凋亡过程中所起的重要作用,为 ROS 应激反应途径的凋亡机制提供了直接佐证。

在细胞凋亡的调控基因中,Bcl-2 家族是目前发现的与凋亡关系密切的原癌基因之一^[19]。Bcl-2 与 Bax 作为 Bcl-2 家族中的代表,当细胞内 Bcl-2 较多时,Bcl-2 和 Bax 的异源二聚体增多,凋亡趋势减弱;当细胞内 Bax 较多时,则 Bax 本身形成的同源二聚体占主导,则易于发生凋亡。因此 Bcl-2/Bax 异源二聚体形成的调节是一个重要细胞凋亡调控方式,Bcl-2/Bax 蛋白比例的变化作为细胞凋亡的最下游机制,对决定细胞是否进

入凋亡状态有重要意义。PL 是否通过调节 Bcl-2 家族蛋白的表达诱导 MDA-MB-231 细胞的凋亡。因此,本研究观察了 PL 对凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 相对表达的影响,结果表明,随着 PL 浓度的增加,Bcl-2 的表达逐渐减少。这与 Kong 等^[17]的研究发现,PL 对前列腺癌 PC-3 细胞作用的结果类似,所不同的是他们发现 PL 作用于 PC-3 细胞后,Bax 蛋白的表达未见明显改变。本研究则发现,Bax 的表达随 PL 浓度的增加而逐渐增加,而 Bcl-2/Bax 均降低。这可能由于所选用细胞株或者实验方法的不同使得 PL 引起 Bax 表达出现不同情况。因此,笔者推测 PL 很可能通过改变 Bcl-2/Bax 异源二聚体的调控平衡来诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的。有研究指出,Bcl-2 家族促凋亡蛋白 Bax 表达上调以及凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达下调,从而使 caspase-3 的活化,并最终导致细胞凋亡很可能是通过 ROS 途径介导的^[20]。Bcl-2 抗凋亡机制之一是其作为抗氧化剂,调节细胞氧化还原状态,阻断氧化作用对细胞组成成分的破坏,这与本研究中的 NAC 抑制肿瘤细胞凋亡似乎有某种相似之处。

综上所述,本研究认为 PL 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞具有增殖抑制、诱导凋亡的作用,并且认为凋亡诱导效应可能与 Bcl-2 蛋白表达的减少和 Bax 蛋白表达增加有关。PL 在微摩尔浓度即表现出对肿瘤细胞明显的促进凋亡和增殖抑制作用,对于 PL 的其他可能抗肿瘤机制仍待深入研究,故开展 PL 动物模型的研究将有助于进一步明确其抗肿瘤的作用机制。

参考文献:

[1] Rodrigues RV,Lanznaster D,Longhi Balbinot DT,et al. Antinociceptive effect of crude extract,fractions and three alkaloids obtained from fruits of Piper tuberculatum[J]. Biol Pharm Bull,2009,32(10):1809-1812.

[2] de Moraes J,Nascimento C,Lopes PO,et al. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of piplartine [J]. Exp Parasitol,2011,127(2):357-364.

[3] Fontenele JB,Leal LK,Silveira ER,et al. Antiplatelet effects of piplartine, an alkaloid isolated from Piper tuberculatum: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity[J]. Pharm Pharmacol, 2009,61(4):511-515.

[4] Bezerra DP,Pessoa C,de Moraes MO,et al. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine) [J]. Eur J Pharm Sci,2012,48(3):453-463.

[5] Bezerra DP,Pessoa C,Moraes MO,et al. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species[J]. J Appl Toxicol,2008,28 (5):599-607.

[6] Raj L,Ide T,Gurkar AU,et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS[J]. Nature,2011,475(7355):231-234.

[7] Han SS,Son DJ,Yun H,et al. Piperlongumine inhibits proliferation and survival of Burkitt lymphoma(下转第 4310 页)

- normalities in thyroid dysfunction[J]. *Tunis Med*, 2010, 88(11):783-788.
- [2] 罗国春,潘长玉. 甲亢性贫血[J]. 中国人民解放军军医进修学院学报, 1984, 5(2):219-222.
 - [3] 赵笑燕,王淑芳,于正翠. 以贫血为主要表现的甲亢 1 例[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(3):376.
 - [4] 张彬,毕建玲,李金源,等. 即刻负载微种植体在甲亢大鼠模型中支抗稳定性的研究[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(3):183-186.
 - [5] Fukuyama K, Ichiki T, Takeda K, et al. Downregulation of vascular angiotensin II type 1 receptor by thyroid hormone[J]. *Hypertension*, 2003, 41(3):598-603.
 - [6] 李斌,陈晶,宋芳,等. 雌性甲亢大鼠模型的建立[J]. 包头医学院学报, 2010, 26(6):1-2.
 - [7] 张子泰,侯英萍,汪静,等. 用左旋 T4 建立大鼠甲状腺功能亢进模型的实验研究[J]. 西北国防医学杂志, 2006, 27(1):34-36.
 - [8] 闵晓俊,厉晶萍,陈如泉,等. 复方甲亢片对甲亢合并肝损害大鼠肝功能影响的实验研究[J]. 湖北中医杂志, 2008, 30(12):5-7.
 - [9] 谢益安,钟丽俊. 甲亢并贫血的外周血特点及相关因素分析[J]. 广西医学, 2007, 29(8):1178-1180.
 - [10] Das KC, Mukherjee M, Sarkar TK, et al. Erythropoiesis and erythropoietin in hypo- and hyperthyroidism[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1975, 40(2):211-220.
 - [11] 张坚力. 甲亢患者贫血有关指标检测分析[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(31):7587-7588.
 - [12] Hegazi MO, Ahmed S. Atypical clinical manifestations of graves' disease; an analysis in depth[J]. *J Thyroid Res*, 2012, 2012:768019.
 - [13] Lin KH, Lee HY, Shih CH, et al. Plasma protein regulation by thyroid hormone[J]. *J Endocrinol*, 2003, 179(3):367-377.
 - [14] 陈新宇,胡云良. 甲状腺功能亢进症患者血清锌、铁、铜、钙的测定及意义[J]. 江西医学检验, 2004, 12(6):489-490.
 - [15] Davis PJ, Yoshida K, Schoenl M. Interaction of thyroid hormone and hemoglobin I. Nature of the interaction and effect of hemoglobin on thyroid hormone radioimmunoassay[J]. *J Lab Clin Med*, 1980, 95(5):714-724.
 - [16] 王季猛,阮婉玉,袁杰,等. 甲亢贫血的铁代谢探讨[J]. 衡阳医学院学报, 1993, 21(2):176-179.
 - [17] Gianoukakis AG, Leigh MJ, Richards P, et al. Characterization of the anaemia associated with Graves' disease[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, 70(5):781-787.
 - [18] Smith TJ, Drummond GS. Thyroid hormone regulation of heme synthesis in rat liver[J]. *Endocrinology*, 1988, 122(5):1964-1967.
 - [19] 李艳伟,赵晋英,钱忠明. 铁调素药物研究现状和应用前景[J]. 广东医学, 2010, 31(2):257-260.
 - [20] 赵晋英,李艳伟,李琳,等. 铁调素在贫血诊断和治疗中的应用[J]. 检验医学, 2011, 26(9):635-639.
 - [21] Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias[J]. *Adv Hematol*, 2010, 2010:750643.
- (收稿日期:2014-08-10 修回日期:2014-09-22)
-
- (上接第 4306 页)
- in vitro[J]. *Leuk Res*, 2013, 37(2):146-154.
- [8] 姚志峰,姚建新,刘永彪. 草茛明碱抗肿瘤作用及其机制[J]. 国际肿瘤学杂志, 2013, 40(4):259-263.
 - [9] Qi Y, Fu X, Xiong Z, et al. Methylseleninic acid enhances paclitaxel efficacy for the treatment of triple-negative breast cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31539
 - [10] Golovine KV, Makhov PB, Teper E, et al. Piperlongumine induces rapid depletion of the androgen receptor in human prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2013, 73(1):23-30.
 - [11] Jarvius M, Fryknas M, D'Arcy P, et al. Piperlongumine induces inhibition of the ubiquitin-proteasome system in cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(2):117-123.
 - [12] Randhawa H, Kibble K, Zeng H, et al. Activation of ERK signaling and induction of colon cancer cell death by piperlongumine[J]. *Toxicol Vitro*, 2013, 27(6):1626-1633.
 - [13] Makhov P, Golovine K, Teper E, et al. Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signaling and mediates cancer cell death[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(4):899-907.
 - [14] Bezerra DP, Militão GC, de Castro FO, et al. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways [J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(1):1-8.
 - [15] Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, et al. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from Piper species[J]. *Z Naturforsch C*, 2005, 60(7/8):539-543.
 - [16] Gelmon K, Dent R, Mackey JR, et al. Targeting triple-negative breast cancer; optimising therapeutic outcomes [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(9):2223-2234.
 - [17] Kong EH, Kim YJ, Kim YJ, et al. Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(4):785-792.
 - [18] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(7):579-591.
 - [19] Tsukaharas S, Yamamoto S, Shew TT, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the bcl-2/bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(2):63-68.
 - [20] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2):41-58.
- (收稿日期:2013-08-25 修回日期:2014-09-20)