

银莲花素A对非小细胞肺癌H460的抑制作用*

高雅蓉^{1,2} 安君霞² 朱启或^{1,2} 李甫² 马超英¹ 王明奎² 唐亚雄^{2**}

(¹西南交通大学生命科学与工程学院 成都 610031)

(²中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要 通过溶剂萃取与重结晶等方法从银莲花属植物多被银莲花 *Anemone raddeana* Regel根茎中提取三萜皂苷银莲花素A, 研究银莲花素A对非小细胞肺癌H460癌细胞的增殖、凋亡与细胞周期的影响及分子机制. 结果表明: 银莲花素A能显著地抑制H460癌细胞的增殖, 且这种抑制效应呈明显的时间量效关系; 能诱导H460癌细胞凋亡, 并诱导其细胞周期阻滞于G2-M期; 能抑制Akt激酶活性、下调Bcl-2蛋白表达以及激活PARP活性, 从而导致其对H460癌细胞的增殖抑制作用. 结果显示银莲花素A对非小细胞肺癌的预防与治疗可能具有潜在价值. 图5 参21

关键词 银莲花素A; 肺癌细胞H460; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

CLC R965

Inhibitory Effect of Raddeanin A in Human Non-small Cell Lung Cancer H460 Cells*

GAO Yarong^{1,2}, AN Junxia², ZHU Qiyu^{1,2}, LI Fu², MA Chaoying¹, WANG Mingkui² & TANG Yaxiong^{2**}

(¹School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

(²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract Raddeanin A, a triterpenoid saponin, was isolated from *Anemone raddeana* Regel and identified by solvent extraction and recrystallization. The effect of Raddeanin A on cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human non-small cell lung cancer (NSCLC) H460 cancer cells and its mechanisms in this aspect were studied in this paper. The results demonstrated that Raddeanin A significantly suppressed proliferation of H460 cancer cells in a dose- and time-dependent manner which was associated with induced apoptosis and cell cycle G2-M arrest. Furthermore, Raddeanin A could inhibit Akt activation, down-regulate the expression of Bcl-2 protein, and activate the cleavage of PARP, leading to marked inhibitory effect of H460 cells. These findings suggest that Raddeanin A may be a potential usefulness for preventing and treating NSCLC. Fig 5, Ref 21

Keywords Raddeanin A; H460; proliferation; apoptosis; cell cycle

CLC R965

肺癌是常见的恶性肿瘤之一,分为小细胞肺癌 (Small cell lung cancer, SCLC) 与非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 两种类型, 后者为最常见的肺癌病理类型. 肺癌在发达国家已成为恶性肿瘤中最常见的死亡原因, 我国的肺癌发病率近年来也呈显著上升趋势. 尽管目前肺癌的诊断与治疗取得了一些进展, 但尚无特效治疗药物, 肺癌病人5年生存率仅为16.8%, 其中50%~60%的患者不能手术, 而绝大部分非小细胞肺癌患者对放疗和化疗不敏感, 因此急需基于肿瘤分子生物学研究基础上研发高效低毒副作用的抗癌药物^[1~2].

天然产物是抗肿瘤化学药物的重要来源. 统计表明, 到目前为止超过60%的临床抗肿瘤化学药物直接或间接源自天

然产物, 许多天然化合物经长期自然选择与进化后形成, 常常具有合理的结构、确切的活性与较高的稳定性, 因此天然产物的研究在抗癌药物的研发中占据十分重要的地位, 近年来一直方兴未艾, 临床上常用的抗癌药物如紫杉醇、高三尖杉酯碱、长春新碱及其衍生物等即是明证. 此外, 许多天然产物如姜黄素、苯基异硫氰酸盐、吡啶-3-甲醇、水飞蓟宾、番茄红素、染料木素、硒及维生素A/E/J等目前也正处于不同的临床试验阶段^[3~4].

银莲花属药用植物具有清热解毒、祛风除湿等功效, 多被银莲花 (*Anemone raddeanin* Regel) 根茎因用于风湿性关节炎、痹症、腰腿疼痛及肿瘤的辅助治疗等而备受关注, 早在上世纪80年代其活性化学成分分离、鉴定及药理学研究已开始起步^[5], 研究表明其中的三萜皂苷银莲花素A及类似物具有较好的抗癌作用^[6~11], 但其抗肿瘤分子机制还知之甚少. 因此, 本研究通过体外研究银莲花素A对肺癌细胞凋亡与细胞周期的影响, 从而探讨其抗癌的可能机制.

1 材料与方法

1.1 细胞株、药材与试剂

肺癌细胞株A549、H446、H460由中国科学院成都生物研究所肿瘤信号转导与分子药理实验室引进与保藏, 用含

收稿日期: 2010-09-09 接受日期: 2010-09-14

*国家自然科学基金项目 (No. 81072662)、四川省青年科技基金 (No. 2010JQ0028)、中国科学院“西部之光”人才培养计划重点项目和中国科学院成都生物研究所“人才引进启动项目”资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072662), the Youth Science and Technology Foundation of Sichuan, China (No. 2010JQ0028), the West Light Foundation of the Chinese Academy of Sciences (CAS) and the Talent-Recruiting Program of Chengdu Institute of Biology, CAS

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tangyx@cib.ac.cn)

10%胎牛血清的RPMI 1640培养基(100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素)于37℃、5% CO₂条件下进行常规细胞培养。两头尖(即多被银莲花的根茎)药材购自兰州市中药材批发站。细胞培养所用主要试剂购自Invitrogen公司, PARP、Bcl-2、Phospho-Akt及HRP偶联的羊抗兔/鼠IgG等抗体购自Cell Signaling Technology公司, MTT、PI、DAPI购自Sigma公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 银莲花素A的制备

取两头尖粉末1 kg, 用70%甲醇(6 L)溶液浸泡24 h后抽滤, 滤液经减压浓缩得浸膏300 g, 浸膏悬浮于2 L蒸馏水中, 用2 L乙酸乙酯萃取3次以除去其中的脂溶性成分, 再以2 L正丁醇依次萃取3次, 合并正丁醇萃取液并减压浓缩得正丁醇萃取物160 g, 随后将正丁醇萃取物进行硅胶柱层析, 以甲醇-氯仿(0:100→5:95→10:90→20:80; V/V)梯度洗脱, TLC跟踪银莲花素A馏分, 合并主要成分为银莲花素A的馏分成为银莲花素A粗品, 粗品经甲醇-乙醇(1:9; V/V)反复重结晶后即获得银莲花素A纯品5 g。具体步骤参见文献[11]。

1.3 细胞MTT测定

MTT测定参照文献[12]进行。首先, 在24孔细胞培养板上接种2×10⁴个肺癌A549、H460及H446对数生长期细胞, 3个复孔, 细胞贴壁后加入不同浓度银莲花素A, 共设8个药物浓度梯度, 分别为0.1% DMSO、0.35 μmol/L、0.70 μmol/L、1.40 μmol/L、2.80 μmol/L、5.60 μmol/L、14.0 μmol/L与28.0 μmol/L, 药物处理48 h后加入新鲜配制终浓度为1 mg/mL的MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]溶液并于37℃温育3 h, 全波长酶标仪检测570 nm波长吸光度, 0.1% DMSO作为阴性对照, 计算银莲花素A对细胞生长的抑制率与半数抑制浓度IC₅₀; 其次, 将不同浓度梯度的银莲花素A分别处理非小细胞肺癌H460细胞1 d、3 d、5 d, 从而确定其对H460细胞的生长曲线。每一样品重复试验3次。

1.4 细胞形态观察

常规培养H460细胞至饱和度70%, 分别用0.1% DMSO、1.40 μmol/L、2.80 μmol/L、5.60 μmol/L银莲花素A处理细胞24 h, 吸去培养基, 经1×PBS洗涤3次后于倒置显微镜下观察并照相。

1.5 DAPI染色

DAPI染色参照文献[13]进行。培养细胞至50%~80%饱和度, 分别用0.1% DMSO、1.40 μmol/L、2.80 μmol/L、5.60 μmol/L银莲花素A处理细胞24 h, 4%多聚甲醛固定细胞30 min后加入终浓度为1 μg/mL DAPI染色液染色5 min, 细胞涂片经PBS润洗、风干及固定后于正置荧光显微镜下检测, 荧光激发波长为350 nm, 发射波长在460 nm。

1.6 细胞周期分布分析

细胞周期流式细胞分析仪(FAScan)检测参见文献[14]。在H460细胞中加入0.1% DMSO及浓度分别为1.40 μmol/L、2.80 μmol/L、5.60 μmol/L的银莲花素A, 24 h后收集细胞, 70%的冰乙醇-20℃过夜固定细胞, 固定后的细胞经PBS洗涤后用50 μg/mL碘化丙啶(PI)避光染色30 min。10 000个细胞用于流式细胞仪分析, 以决定其细胞周期中G₁、S、G₂-M各期的分布状况。

1.7 蛋白提取与Western blot

细胞总蛋白提取与蛋白免疫印迹实验参见文献[15]。药物处理细胞后总蛋白的提取采用RIPA裂解法。50~80 μg总蛋白经变性SDS-PAGE电泳(8%~16%)并转移到硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉封闭后经抗PARP、Bcl-2、Phospho-Akt等抗体温育过夜, 辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗体免疫反应信号通过增强型化学发光方法而确定目标蛋白的位置与表达强弱, 免疫印迹经洗涤后用β-actin统一蛋白上样。

1.8 统计学分析

采用T检验与随机区间实验方差统计分析所有实验数据, P<0.05被认为具有显著差异性。

2 结果与分析

2.1 银莲花素A的制备

1 kg两头尖粉末经萃取、硅胶柱层析及重结晶等分离纯化手段获得纯度≥98%(HPLC)的银莲花素A纯品5 g, 收率为0.5%, 将银莲花素A纯品溶于DMSO溶液并经0.22 μmol/L滤膜过滤除菌后作为细胞测试药物。银莲花素A的化学结构如图1所示。

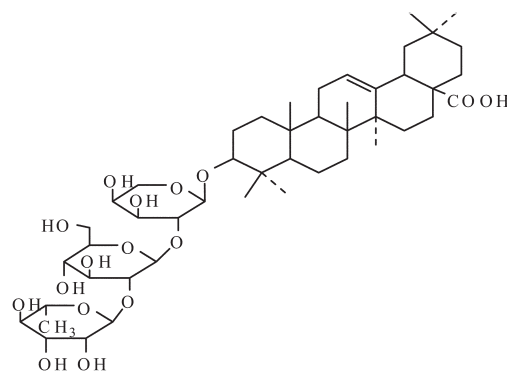


图1 银莲花素A的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Raddeanin A

2.2 银莲花素A对人非小细胞肺癌细胞的增殖影响

为了解银莲花素A对人非小细胞肺癌细胞的抗癌活性, 首先采用不同浓度的银莲花素A处理A549、H446和H460细胞48 h, 通过MTT法检测其活性。图2-A表明, 银莲花素A对这3个细胞株的细胞生长均具有显著的抑制作用, 在14.0 μmol/L浓度下具有大约85%的抑制率(P<0.05), 在48 h处理条件下其IC₅₀值分别为3.08 μmol/L(A549)、2.31 μmol/L(H446)与3.09 μmol/L(H460)(P<0.05)。随后重点开展银莲花素A对H460细胞的抗癌活性及相关机制研究, 并进一步证实了不同浓度银莲花素A在不同时间点如d 1、d 3、d 5时对H460细胞的增殖抑制作用, 图2-B表明银莲花素A对非小细胞肺癌细胞H460的生长抑制作用具有时间与浓度依赖效应。

2.3 银莲花素A对细胞凋亡的影响

为探究银莲花素A的抗肿瘤活性是否通过诱导细胞凋亡途径实现, 使用DAPI染色结合荧光显微镜观测银莲花素A对H460细胞凋亡的形态学特征。实验表明, 不同浓度银莲花素A处理H460细胞24 h后出现典型的细胞凋亡形态学变化, 特别是在5.6 μmol/L浓度条件下显著诱导细胞凋亡, 细胞发生皱缩、胞膜皱褶或出泡以及核碎裂、固缩等, 而对照组细胞未见(图3)。

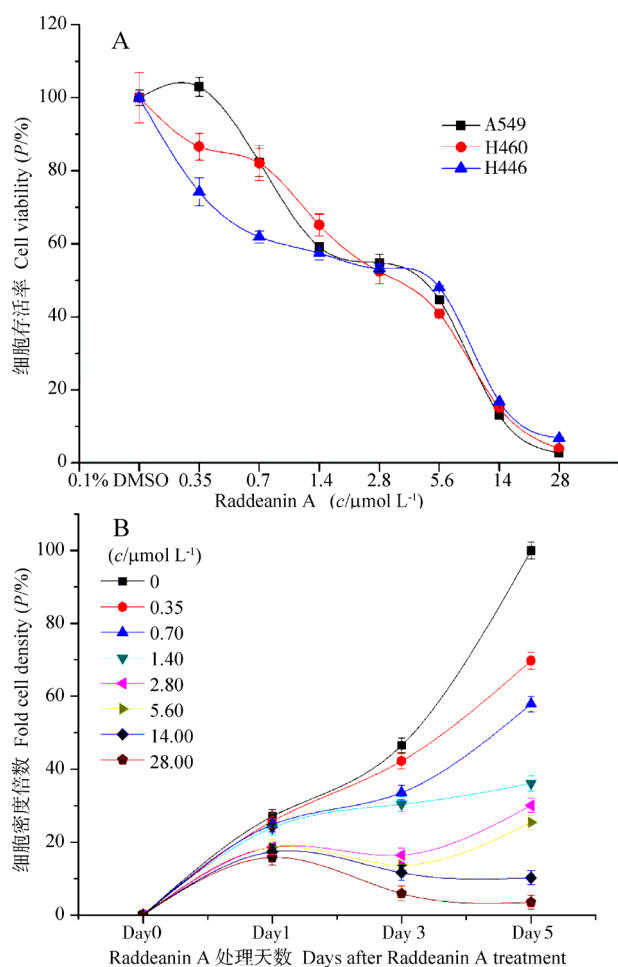


图2 银莲花素A对肺癌细胞的增殖抑制作用
Fig. 2 Inhibitory effect of Raddeanin A on human lung cancer cells

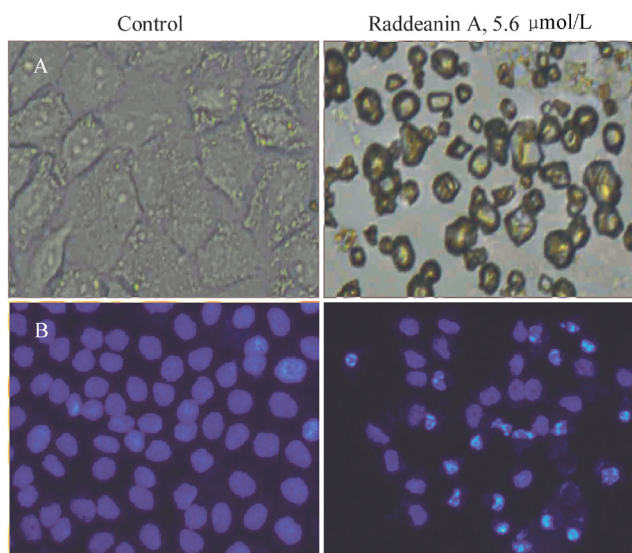


图3 银莲花素A诱导H460细胞凋亡($\times 400$)
Fig. 3 Raddeanin A induces apoptosis of H460 cells($\times 400$)

A: 活细胞形态学观察; B: DAPI染色
A: Live cell morphology under phase-contrast light microscope; B: DAPI staining of nuclear morphology under fluorescence microscope

2.4 银莲花素A对细胞周期的影响

为进一步探寻银莲花素A细胞生长抑制效应的诱导是否会干扰细胞周期的进程, 采用流式细胞仪分析H460细胞在0.1% DMSO对照与1.40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、2.80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、5.60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 银莲花素A处理后的细胞周期分布状况。图4表明不同浓度银莲花素A处理24 h后G2-M期细胞百分比随着银莲花素A剂量增加而增加, 提示银莲花素A能诱导G2-M期阻滞, 从而抑制肿瘤细胞生长。

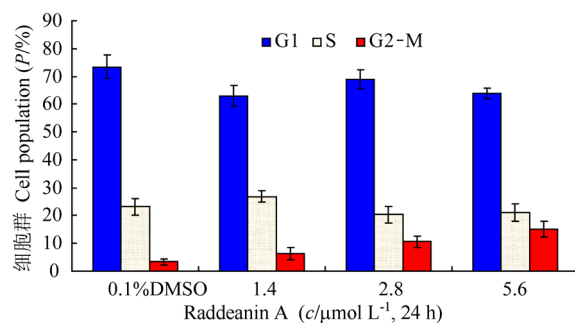


图4 银莲花素A诱导H460细胞周期进程
Fig. 4 Effect of Raddeanin A on cell cycle distribution in H460 cells

2.5 银莲花素A对PARP、Bcl-2及Phospho-Akt表达的影响

为进一步阐明银莲花素A诱导肺癌细胞凋亡的分子机制, 从银莲花素A处理24 h的H460细胞中提取总蛋白, 通过Western Blot检测其对PARP、Bcl-2及Phospho-Akt表达的影响。图5表明, 14.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 银莲花素A显著诱导H460细胞poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 经Caspase切割为相对分子质量为 89×10^3 的降解产物, 证明银莲花素A以剂量依赖方式激活PARP的切割活性从而促进细胞凋亡。与此同时, 14.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的银莲花素A还能下调抗凋亡蛋白Bcl-2的蛋白表达并抑制Akt激酶的活性。总之, 银莲花素A可以通过激活PARP活性、下调Bcl-2以及抑制Akt激酶活性来实现其抗癌活性。

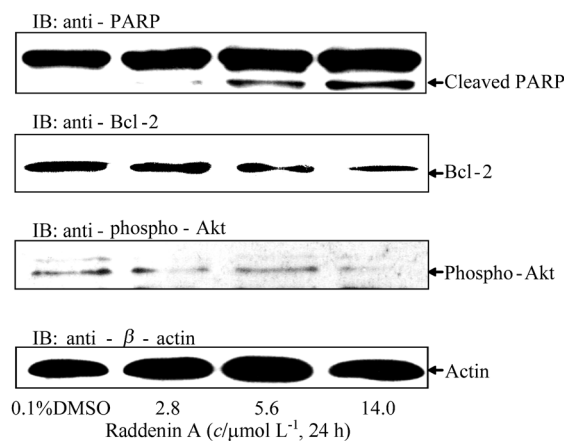


图5 银莲花素A激活PARP活性、下调Bcl-2以及抑制Akt活性
Fig. 5 Raddeanin A activating cleavage of PARP, down-regulating expression of Bcl-2 and inhibiting Akt activity on H460 cells

3 讨论

肺癌目前已成为世界范围内最常见的肿瘤死因, 特别是近年来晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者的预后改善处于平

台期, 进展较少, 因此迫切需要从抗肿瘤靶向治疗新角度去研发提高化疗有效率的抗癌新药. 我国传统中药作为新型抗肿瘤药物的重要来源应予以重要关注. 动物体内实验表明, 多被银莲花根茎中的五环三萜皂甙银莲花素A对小鼠肉瘤等几种小鼠实体瘤具有较高的抑瘤率以及较低的急性毒性^[11]. 本研究首次报道该化合物对人非小细胞肺癌细胞的增殖具有较强的抑制作用及其分子机制, 表明银莲花素A通过诱导激活细胞凋亡、诱导细胞周期G2-M期阻滞从而抑制肿瘤细胞生长. 但是, 我们对银莲花素A化学结构与抗癌活性之间的构效关系(SAR)还知之甚少, 从现有资料推测其化学结构上3位糖基的种类与顺次可能对抗癌活性影响较大, 因此尚需进一步对其不同水解产物进行活性评价.

以细胞周期、细胞凋亡信号通路调控分子为靶点可提供新的肿瘤预防与治疗方法. 研究已经表明, 在恶性肿瘤形成过程中大量的信号途径被活化, 导致肿瘤细胞的无限增殖、浸润与转移并最终致患者死亡, 阐明这些生物事件的分子机制显然可以为恶性肿瘤的预防与治疗提供更合适的方法, 而针对细胞周期检验点、恢复p53的活性、激活p53下游的细胞凋亡途径以及抑制PI3K-Akt信号通路的化学药物由于能选择性地杀死肿瘤细胞而日益成为肿瘤防治新策略^[16-18], 因此银莲花素A作为潜在抗肿瘤药物应予以关注. 首先, 作为多功能核酶的PARP在DNA损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用. 激活的PARP不仅参与环境胁迫下基因组修复、DNA复制与转录调节等修复过程, 而且作为细胞凋亡核心成员Caspase的切割底物在DNA大量受损时经切割后阻止其修复, 其过度活化使细胞能量储存耗竭以及促使线粒体释放凋亡诱导因子AIF与细胞色素C从而导致细胞凋亡. PARP的切割已成为细胞发生凋亡的明显标志事件^[19], 而银莲花素A可通过激活PARP的切割从而诱导细胞凋亡. 其次, Bcl家族在细胞凋亡的调控作用至关重要. Bcl家族成员Bcl-2及Bcl-xL主要抑制细胞凋亡, 而Bax等则促进凋亡, 它们通过彼此间的同源或异源复合物共同调节细胞凋亡过程, 其中Bcl-2/Bax复合物的形成与平衡决定细胞凋亡命运, Bax诱导细胞色素C的释放从而激活Caspase-3依赖的细胞凋亡途径, 而Bcl-2可与促凋亡蛋白Bax拮抗, 抑制线粒体细胞色素C的释放, 同时Bcl-2还能促进谷胱甘肽进入细胞核通过改变核内氧化还原反应从而阻止Caspase蛋白酶的激活抑制细胞凋亡. 此外, Bcl-2调节线粒体钙离子稳态与质子流, Bcl-2中Thr56、Ser70、Thr74与Ser87等磷酸化位点可能是ASK1/MKK7/JNK1信号通路的靶标, Bcl-2的磷酸化也可作为细胞有丝分裂的标志之一^[20]. 研究表明, 银莲花素A能下调Bcl-2蛋白表达, 但其下调Bcl-2的转录翻译机制以及银莲花素A对Bcl-2/Bax复合物形成的影响尚需进一步研究证实. 再次, PI3K-Akt信号通路与人类多种肿瘤的发生发展密切相关, 通过影响下游多种效应分子的活化状态从而控制细胞的凋亡、增殖及细胞骨架的变化. PI3K-Akt信号通路抗细胞凋亡的机制主要有以下几个方面: 第一, 作为Akt激酶底物之一的促凋亡蛋白Bad, 其Ser136位点经Akt磷酸化后与伴侣蛋白14-3-3蛋白结合阻断Bad与Bcl-2或Bcl-x1复合物形成, 从而有效阻断Bad的促凋亡效应. 此外, Akt还可通过Bax Ser184、caspase-9 Ser196等磷酸化过程负调

控细胞凋亡. 第二, Akt直接或间接影响FoxO、NF- κ B、p53等转录因子的生物学功能调控细胞生长. 第三, Akt通过其下游mTOR信号通路调节蛋白质的合成进而调控细胞增殖过程等等^[21]. 但是, 银莲花素A是如何通过抑制Akt活性从而促进细胞凋亡的, 仍需深入阐明.

总之, 本研究表明银莲花素A能显著抑制H460癌细胞的增殖, 且这种生长抑制效应呈明显的时间量效关系, 同时, 银莲花素A不仅能诱导H460癌细胞凋亡, 而且也能诱导H460细胞周期阻滞于G2-M期, 此外, 银莲花素A通过抑制Akt激酶活性、下调Bcl-2蛋白表达从而激活细胞凋亡途径可能是其抗癌活性的初步分子机制之一, 但其详细调控机制尚需深入研究, 从而为发展新型分子靶向抗肿瘤药物奠定坚实基础.

References

- Cohen V, Khuri FR. Chemoprevention of lung cancer. *Curr Opin Pulm Med*, 2004, **10** (4): 279~283
- Tsao AS, Kim ES, Hong WK. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin*, 2004, **54** (3): 150~180
- Naithani R, Huma LC, Moriarty RM, McCormick DL, Mehta RG. Comprehensive review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental carcinogenesis models and clinical trials. *Curr Med Chem*, 2008, **15** (11): 1044~1071
- Agarwal R, Deep G. Kava, a tonic for relieving the irrational development of natural preventive agents. *Cancer Prev Res*, 2008, **1** (6): 409~412
- Cao P (曹沛), Wu FE (吴凤镔), Ding LS (丁立生). Advances in the studies on the chemical constituents and biologic activities for *Anemone* species. *Nat Prod Res & Dev* (天然产物研究与开发), 2004, **16** (6): 581~584
- Liu LS (刘力生), Xiao XH (肖显华), Zhang LD (张龙弟), Zheng RL (郑荣梁), Wu FE (吴凤镔), Zhu ZQ (朱子清). Effects of anemodanin A on DNA, RNA and protein of tumor cells *in vitro* and plasma cAMP in mice. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1985, **6** (3): 192~194
- Liao X (廖循), Li BG (李伯刚), Gao XP (高小平), Guan JF (官家发), Ding LS (丁立生), Chen YZ (陈耀祖). Bioactive triterpenoidsaponins from *Anemone davidii*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, **32** (6): 493~496
- Peng SL (彭树林), Liao X (廖循), Wang FT (王昉彤), Ding LS (丁立生). Antitumor effect of the saponins from *Anemone davidii*. *Nat Prod Res & Dev* (天然产物研究与开发), 2001, **13**(5): 60~62
- Ren FZ (任凤芝), Zhang XX (张雪霞), Niu GY (牛桂云), Zhang L (张丽), Shan BE (单保恩), Liu GC (刘刚叁). Active antitumor constituents from *Anemone raddeana* Regel. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, **36**(12): 1975~1978
- Wang MK (王明奎), Ding LS (丁立生), Wu FE (吴凤镔). Anti-tumor activity of crude saponin from *Anemone raddeana* Regel. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (3): 378~382
- Wang MK (王明奎), Ding LS (丁立生), Wu FE (吴凤镔). Antitumor effects of raddeanin A on S1 80, H22 and U14 cell xenografts in mice. *Chin J Cancer* (癌症), 2008, **27** (9): 910~913

- 12 Tang Y, Simoneau AR, Xie J, Shahandeh B, Zi X. Effects of the kava chalcone flavokawain A differ in bladder cancer cells with wild-type versus mutant p53. *Cancer Prevention Res*, 2008, **1** (6): 439~451
- 13 Tang Y, Li X, Liu Z, Simoneau AR, Xie J, Zi X. Flavokawain B, a kava chalcone, exhibits robust apoptotic mechanisms on androgen receptor-negative, hormone-refractory prostate cancer cell lines and reduces tumor growth in a preclinical model. *Intern J Cancer*, 2010, **127** (8): 1758~1768
- 14 Tang Y, Simoneau AR, Liao W, Guo Y, Hoang BH, Hope C, Liu F, Li S, Xie J, Holcombe RF, Jornak FA, Mercola D, Zi X. WIF1, a Wnt pathway inhibitor, regulates SKP2 and c-myc expression leading to G1 arrest and growth inhibition of human invasive urinary bladder cancer cells. *Mol Cancer Therapeutics*, 2009, **8** (2): 458~468
- 15 Yee DS, Tang Y, Li X, Liu Z, Guo Y, Ghaffar S, McQueen P, Atreya D, Xie J, Simoneau AR, Hoang BH, Zi X. The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Mol Cancer*, 2010, **9**: 162. PMID: 20573255
- 16 Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M and Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 2004, **303** (5660): 1010~1014
- 17 Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem*, 2004, **92** (4): 656~663
- 18 Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, **8** (8): 627~644
- 19 Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem*, 1998, **273** (50): 33533~33539
- 20 Senderowicz AM. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16** (6): 670~678
- 21 Stiles BL. PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61** (14): 1276~1282