

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00634

氧化苦参碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的可能机制

侯颖^{1△}, 曹蔚^{1△}, 李涛², 刘水冰¹, 张晓楠¹, 李旭波¹, 田琼^{1*}

- 1. 第四军医大学药理学教研室, 西安 710032
- 2. 西安交通大学医学院法医系, 西安 710061

[摘要] 目的: 观察氧化苦参碱(OM)对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响, 探讨其可能的作用机制。方法: 用不同浓度的 OM 处理 HepG2 细胞, MTT 法检测 OM 对 HepG2 细胞生长增殖的抑制作用; 应用 Hoechst 荧光染色法观察 OM 处理后细胞形态的变化; 流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率; 免疫印迹法检测 OM 处理后细胞凋亡相关蛋白磷酸化 Akt, caspase-3、Bax、Bcl-2 和 Bcl-x_L 的表达。结果: OM 抑制 HepG2 细胞的增殖并呈一定的量效和时效关系; HepG2 细胞与 OM 作用后出现典型的凋亡细胞形态改变, 细胞凋亡率增高; OM 处理 HepG2 细胞后, 磷酸化 Akt 蛋白表达下降, caspase-3 可被蛋白酶水解形成相对分子质量 17 000 活性片段, Bax 蛋白表达增强, Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白表达下调。结论: OM 可诱导 HepG2 细胞凋亡, 可能与其调节 PI3K/Akt 信号通路, 抑制 Bcl-2 和 Bcl-x_L 的活性, 激活 caspase-3 有关。

[关键词] 氧化苦参碱; 实验性肝肿瘤; 细胞凋亡

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)06-0634-05

Oxymatrine-induced apoptosis of HepG2 cells: the possible mechanism

HOU Ying^{1△}, CAO Wei^{1△}, LI Tao², LIU Shui-bing¹, ZHANG Xiao-nan¹, LI Xu-bo¹, TIAN Qiong^{1*}

- 1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
- 2. Department of Forensic Medicine, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of oxymatrine(OM) on the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells and its possible mechanisms. **Methods:** HepG2 cells were treated with different concentrations of OM. The proliferation inhibition was measured by MTT assay and the apoptosis of HepG2 cells were examined by Hoechst staining method. Flow cytometry was used to analyze the cell cycle distribution and apoptosis rate. The expression of caspase-3, Bcl-2, Bcl-x_L and Bax proteins was assayed by Western blotting assay. **Results:** OM inhibited HepG2 cells growth in a time- and dose-dependent manner. After treatment with OM for 24 hours, some cells appeared typical apoptotic characteristics and the apoptosis rate was increased. Treatment with OM also increased caspase-3 activity and Bax expression in HepG2 cells, and decreased the expression levels of Bcl-2 and Bcl-x_L. **Conclusion:** OM can induce HepG2 cell apoptosis, which may be related to the down-regulation of PI3K/Akt signal pathway, suppression of Bcl-2 and Bcl-x_L activity, and activation of caspase-3.

[KEY WORDS] oxymatrine; experimental liver neoplasms; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(6): 634-638]

氧化苦参碱(oxymatrine, OM)又名苦参素, 是从中药苦豆子和苦参中提取的生物碱, 其具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤等多种作用^[1-2], 抗肿瘤作用逐渐成为近年来相关研究的热点。国内外研究^[2-6]发现 OM 对人胃癌、肺癌、卵巢癌及肝癌等多种肿瘤细胞具有一定的杀伤作用, 且能增强化疗药物的抑瘤作用^[7], 但其抗肿瘤作用的确切机制尚不明确。本研究观察 OM 对人肝癌细胞株 HepG2 细胞凋亡的影响,

并探讨其可能的作用机制, 为进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 DG3022 型酶标仪、PAC300 型电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品; Nu-3500E 型 CO₂ 培养箱为德国 Nuace 公司产品; YJ-875 医用超净台购自吴江市空气净化设备厂; 倒置荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品; 流式细胞仪

[收稿日期] 2008-03-01 **[接受日期]** 2008-04-20

[作者简介] 侯颖, 硕士生, 助理实验师. E-mail: litao-hy@163.com; 曹蔚, 博士, 讲师. E-mail: caowei@fmmu.edu.cn

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 029-84773701, E-mail: tqiong@fmmu.edu.cn

为美国 Becton Dickson 公司产品。

OM 购自中国药品与生物制品检定所,四甲基偶氮唑盐(MTT)、hochest 33342、二甲基亚砷(DMSO)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、亮抑酶肽(leupeptin)、牛血清白蛋白(BSA)、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵均为 Sigma 公司产品;RPMI 1640、胰蛋白酶及胎牛血清为 Gibco 产品。Annexin V-FITC/PI 双标记试剂盒(MedSystems Austria),Bax、Bcl-2、Bcl-x_L 多克隆抗体、HRP 标记 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程公司,caspase-3 单克隆抗体、Akt 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,β-actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司,磷酸化 Akt(pAkt,Ser473)单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司,DAB 浓缩型试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 细胞株 HepG2 细胞株为本室传代保存株,细胞培养使用 RPMI 1640 完全培养基(含 10% 灭活的小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素),置于 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 MTT 法观察细胞增殖抑制率 MTT 法^[8]测定肿瘤细胞增殖抑制率。取对数生长期的细胞,以 5×10⁷/L 的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μl。试验设对照组、不同浓度(0、0.1、0.3、1、3、10 mmol/L)的药物组,每组设 6 个复孔,37℃、5%CO₂ 饱和湿度孵箱内培养过夜,分别加入含药物或不含药物的培养液 100 μl,加入药物后分别培养 12、24、48 h,每孔加入 MTT 液(5 g/L) 10 μl,培养 4 h 后,吸弃培养液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砷,轻度振荡溶解结晶,置酶标仪 570 nm 波长处测 D 值,按下列公式计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率(%)=(对照组 D 值-给药组 D 值)/对照组 D 值×100%。实验重复 3 次。

1.4 细胞形态学观察 取对数生长期的细胞接种于 6 孔培养板中,细胞贴壁后弃上清,与含 0、1、3、10 mmol/L 的 OM 共孵育。24 h 后每孔加入 hochest 33342 溶液,使其终浓度为 10 mg/L,37℃ 孵育 30 min 后每孔加入 4% 预冷的多聚甲醛溶液,使其终浓度为 1%,4℃ 固定细胞 15 min,吸弃培养液后于荧光显微镜下观察凋亡细胞并照相。

1.5 细胞周期检测 取对数生长期的细胞以每瓶 2×10⁶(3×10⁵/ml)的密度接种于培养瓶中,细胞贴壁后,弃上清,各组分别加入 0、1、3、10 mmol/L 的 OM。孵育 24 h 后用 0.25% 胰酶收集所有细胞,用

预冷的 0.1 mol/L PBS 清洗 1 次。然后用 1 ml PBS 重悬后加入 2 ml 预冷的无水乙醇固定 30 min。上机前,收集所有固定标本,离心弃上清,用 PBS 清洗 1 次,加入 PI 染液(50 mg/L),室温下避光染色 30 min,流式细胞仪进行细胞周期 DNA 含量分析,确定细胞周期的分布。

1.6 流式细胞术测定细胞凋亡率 取对数生长期的细胞以每瓶 2×10⁶(3×10⁵/ml)的密度接种于培养瓶中,细胞贴壁后,弃上清,各组分别加入 0、1、3、10 mmol/L 的 OM。孵育 24 h 后用 0.25% 胰酶收集所有悬浮及贴壁细胞,每样本细胞数大于 1×10⁶ 个,用预冷的 PBS 洗 1 次后置 0℃ 冰浴中,加 490 μl 结合缓冲液,轻轻混匀细胞后加 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI(终浓度均为 1 mg/L),避光孵育 20 min 后立即进行流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

1.7 Western 印迹检测 pAkt、caspase-3、Bax、Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白的表达 取对数生长期的细胞以每瓶 1×10⁷的密度接种于培养瓶中,细胞贴壁后弃上清,各组分别加入 0、1、3、10 mmol/L 的 OM。孵育 24 h 后收集所有细胞,4℃ PBS 洗涤 2 次。加入预冷的细胞裂解缓冲液,冰上裂解 15 min,裂解产物 4℃ 10 000×g 离心 30 min。上清液用 Bradford 法测定蛋白浓度。等量样品以 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上,将膜用 PBST(0.02% Tween-PBS)配制的 5% 脱脂奶粉溶液 37℃ 封闭 2 h 后,分别与 pAkt、Akt、caspase-3、Bax、Bcl-x_L 和 Bcl-2 一抗 37℃ 反应 2 h, PBST 清洗 2 次,每次 15 min,再与辣根酶标记的第二抗体 37℃ 反应 1 h,用 PBST 充分洗涤后,以 DAB 显色,扫描记录,应用抗 actin 抗体确定上样量的一致性。

1.8 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示两组差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 OM 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 MTT 法测定结果显示(表 1):OM 处理 HepG2 细胞 12、24、48 h 后细胞的增殖抑制率随着药物浓度的增加及作用时间的延长显著增加($P < 0.05$),呈良好的量效和时效关系。

2.2 肿瘤细胞形态学的变化 荧光显微镜下见正常对照组的细胞核完整,无明显凋亡细胞(图 1A);低浓度 OM 组可见部分细胞胞体缩小,胞质浓缩,核染色体边集浓染,细胞核碎裂呈碎片状,可见典型的

新月形凋亡小体(图 1B);随着作用浓度的增加,细胞数明显减少,凋亡细胞相对增多,细胞出现坏死,

细胞轮廓不清,解体(图 1C、1D)。

表 1 OM 对 HepG2 细胞生长的抑制作用
Tab 1 Inhibitory effect of OM on HepG2 cells

(n=6)

Concentration $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	12 h		24 h		48 h	
	$D(\bar{x} \pm s)$	Inhibition rate (%)	$D(\bar{x} \pm s)$	Inhibition rate (%)	$D(\bar{x} \pm s)$	Inhibition rate (%)
0(Control)	1.586±0.14		1.660±0.13		1.467±0.15	
0.1	1.535±0.14	3.23	1.442±0.17*	13.13	1.235±0.12**	15.79
0.3	1.399±0.14**	11.78	1.192±0.16**	28.18	1.013±0.12**	30.97
1	1.214±0.13**	23.47	0.910±0.09**	45.17	0.853±0.06**	41.85
3	0.805±0.12**	49.23	0.593±0.13**	64.25	0.623±0.11**	57.56
10	0.232±0.05**	85.38	0.188±0.06**	88.69	0.199±0.06**	86.42

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group

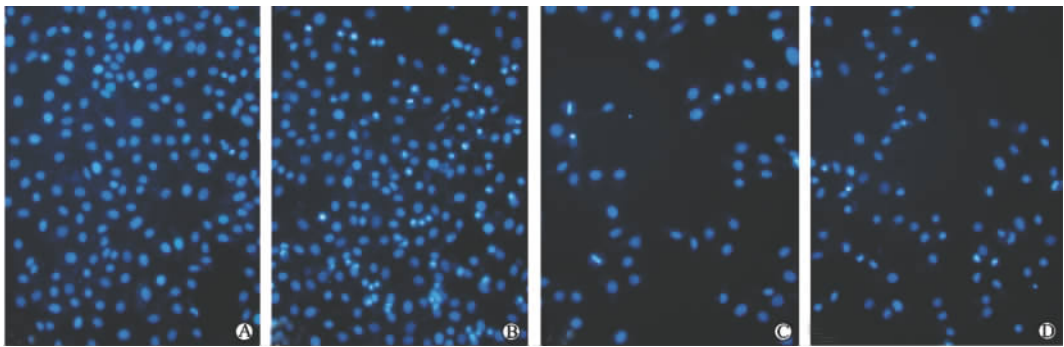


图 1 Hoechst 33342 荧光染色结果

Fig 1 Morphological observation under fluorescence microscope

A: Untreated cells; B: OM(1 mmol/L); C: OM(3 mmol/L); D: OM(10 mmol/L). Original magnification: ×400

2.3 OM 对细胞周期的影响 各浓度 OM 作用 24 h 后经流式细胞术对细胞周期分析发现, G_0/G_1 期的细胞比例有均明显增高, 相应的 S、 G_2/M 期的细胞比例降低, 提示细胞被阻滞于 G_0/G_1 期(表 2)。

表 2 OM 对 HepG2 细胞周期的影响

Tab 2 Change of cell cycle in HepG2 cells after exposure to OM

(%)

Concentration $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	G_0/G_1	G_2/M	S
0	53.87	12.87	33.26
1	63.42	13.40	23.18
3	72.25	5.89	21.86
10	77.16	1.28	21.56

2.4 OM 对 HepG2 细胞凋亡的影响 在双变量流

式细胞仪的散点图上, 右上象限显示凋亡晚期或坏死细胞, 左下象限显示活细胞, 右下象限显示凋亡细胞。结果(图 2)表明: 1、3、10 mmol/L 的 OM 作用 24 h 后细胞凋亡率分别为 2.7%、10.2% 和 25.1%, 均高于对照组(0.2%), 提示 OM 能诱导 HepG-2 细胞凋亡, 且具有剂量依赖性。

2.5 OM 对 HepG2 细胞 pAkt、caspase-3 表达的影响 结果表明: 随着 OM 浓度(1、3、10 mmol/L) 的增加, 细胞内 pAkt 蛋白的表达明显降低(图 3); 随着 OM 浓度的增加, 开始出现 caspase-3 的活性片段(相对分子质量 17 000, 图 4)。

2.6 OM 对 HepG2 细胞 Bax、Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白表达的影响 随着 OM 浓度的增加, 细胞内 Bax 蛋白的表达明显增加, 而 Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白的表达明显降低(图 5)。

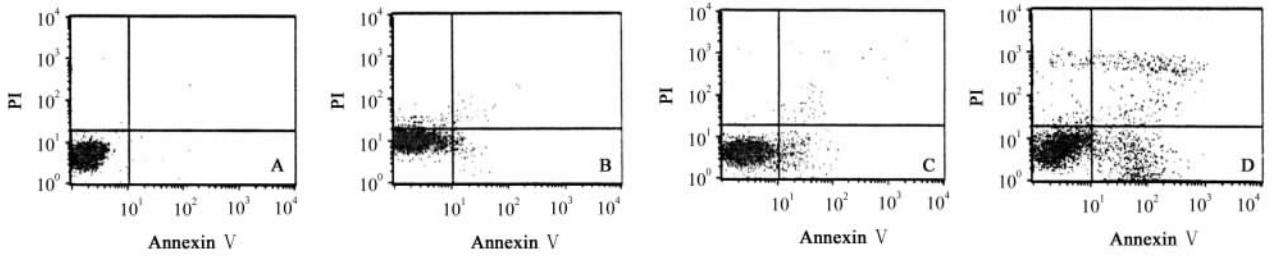


图 2 OM 对 HepG-2 细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of OM on apoptosis of HepG2 cells

A: Untreated cells; B: OM(1 mmol/L); C: OM(3 mmol/L); D: OM(10 mmol/L)

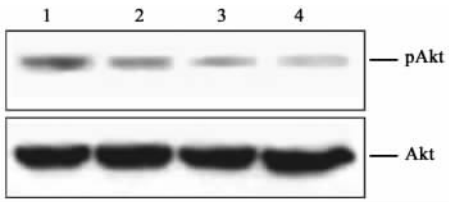


图 3 OM 浓度与 pAkt 蛋白表达的关系

Fig 3 pAkt expression induced by OM in HepG2 cells

1: Untreated cells; 2: OM(1 mmol/L); 3: OM(3 mmol/L); 4: OM(10 mmol/L)

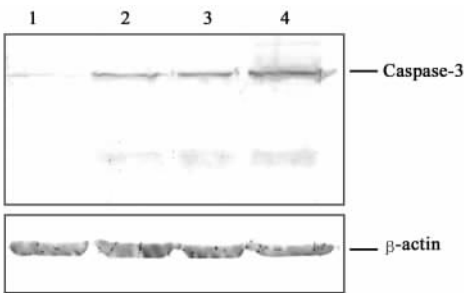


图 4 OM 浓度与 caspase-3 蛋白表达的关系

Fig 4 Caspase-3 expression induced by OM in HepG2 cells

1: Untreated cells; 2: OM(1 mmol/L); 3: OM(3 mmol/L); 4: OM(10 mmol/L)

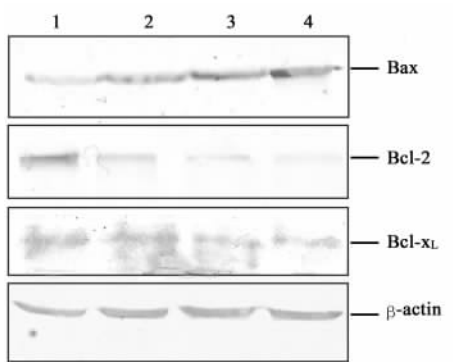


图 5 OM 浓度与 Bax、Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白表达的关系

Fig 5 Bax, Bcl-2 and Bcl-x_L expression induced by OM in HepG2 cells

1: Untreated cells; 2: OM(1 mmol/L); 3: OM(3 mmol/L); 4: OM(10 mmol/L)

3 讨论

肿瘤是一种常见病、多发病,其中恶性肿瘤是目前危害人类健康最严重的一类疾病。我国最为严重的肿瘤为鼻咽癌、肺癌、肝癌、大肠癌、食管癌等^[9]。因此寻找高效低毒的抗癌药物以及抗癌辅助药物是当前肿瘤研究的重要内容。OM 对多种肿瘤细胞具有直接的杀伤作用,是目前抗肿瘤研究的热点。其抗肿瘤的作用机制主要包括诱导肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化、抑制端粒酶活性和细胞毒作用等^[7,10],但其确切的抗肿瘤作用机制仍不清楚。

李鹏等^[6]研究发现,OM 可明显抑制 HepG2 细胞增殖,当浓度为 8.0 g/L 时可出现凋亡峰,从而提示 OM 具有诱导肿瘤细胞 HepG2 凋亡的作用。但 OM 诱导肿瘤细胞 HepG2 凋亡的分子机制尚不清楚,因此,本研究通过多种方法对 OM 诱导肿瘤细胞 HepG2 凋亡的作用进行了验证,并对其作用机制进行了进一步的探讨。用 hocheist 33342 染色后在荧光显微镜下观察到 OM 组出现大量的胞质浓缩、核染色体边集浓染的凋亡细胞;进一步的流式细胞术结果表明,10 mmol/L 的 OM 作用 24 h 后细胞凋亡率可达 25.1%。这些结果进一步证实了 OM 对 HepG2 细胞具有明显的凋亡诱导作用,并具有剂量依赖性。

3-磷酸肌醇激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 家族成员属于原癌基因,与 Akt(又名蛋白激酶 B,PKB)组成的 PI3K/Akt 信号通路在细胞的增殖和存活中起着重要的作用^[11]。PI3K/Akt 通路的激活,可诱发下游一系列底物改变:活化的 Akt 可以使 BAD 的 Ser136 位点磷酸化,有效阻断 BAD 诱导的细胞凋亡^[12];诱导细胞死亡信号通路酶 caspase-9 的前体第 196 位 Ser 磷酸化,阻止 caspase-9 对 Apaf-1 的结合与活化作用,使其失活,从而阻断内源性凋亡途径;Akt 也能磷酸化 Bcl-2 家族成员 Bax 的 Ser184 位点,负调控促凋亡功能^[13]。本研究中观察了 OM 对 Akt 蛋白

表达的影响,发现随着 OM 浓度的增加,Akt 磷酸化蛋白表达逐渐降低,提示 OM 可能通过抑制 PI3K/Akt 通路,从而诱导细胞凋亡。

凋亡是一个多分子参与的事件,细胞凋亡过程中 caspases 家族的激活起着关键的作用。Caspases 酶家族现已发现有 14 种以上家族成员,但并不是所有 caspases 都参与细胞凋亡反应,只有 caspase-3、caspase-6、caspase-7 是引起细胞凋亡的具体执行酶,其中的 caspase-3 处于枢纽地位,是细胞凋亡的主要效应因子^[14]。线粒体膜断裂释放细胞色素 C,可启动 caspases 酶家族的级联反应,caspase-3 被激活后裂解产生相对分子质量 17 000 大小的活性亚单位,可进一步激活核酸内切酶,造成 DNA 裂解破坏,形成 DNA 片段;同时也可消化破坏细胞内多种蛋白酶复合体,破坏细胞的钙泵功能,造成细胞内钙超载^[15],最终导致细胞的不可逆损伤,诱导凋亡。本研究观察了 OM 对 caspase-3 蛋白含量的影响,发现随着 OM 浓度的增加,caspase-3 的活性片段的蛋白表达逐渐升高,从而证实 OM 可通过激活 caspase-3 诱导细胞凋亡。

Bcl-2 家族是目前研究最深入的凋亡调控基因。Bcl-2 是细胞内抗凋亡因子,有稳定线粒体膜,阻止线粒体释放 caspase,阻遏氧自由基诱导凋亡信号通路的作用^[16]。Bcl-x_L 基因是 Bcl-2 家族中与 Bcl-2 具有相似功能的凋亡抑制基因,与 Bcl-2 有 44% 的相同结构,通常情况下,Bcl-2 与 Bcl-x_L 和促凋亡基因 Bax 结合,以二聚体的形式存在^[17]。Bcl-2 (Bcl-x_L) /Bax 比例是决定细胞对凋亡刺激信号敏感的重要因素。当 Bcl-2(Bcl-x_L) 过量时,细胞免遭凋亡,反之,细胞易于在诱导剂的作用下发生凋亡。本研究观察了 OM 对 Bcl-2 家族蛋白的影响,结果发现 OM 可以促进 HepG2 细胞 Bax 的表达,抑制 Bcl-x_L 和 Bcl-2 蛋白的表达,从而进一步说明 OM 可能通过抑制 HepG2 细胞内 Bcl-2/Bcl-x_L 的活性,减少细胞色素 C 的释放,激活 caspase-3 蛋白进而激活 caspases 蛋白酶家族,诱导细胞凋亡的发生。但 OM 诱导细胞凋亡是否还有其他的途径,尚待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Liu J, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: a Cochrane hepatobiliary systematic review of randomized trials[J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98: 538-544.
- [2] 于晓峰, 邹健, 冉志华. 氧化苦参碱对人胃癌细胞杀伤作用的机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15: 1719-1724.
- [3] 王源, 司维柯, 李鹏, 姚婕. 苦参碱及氧化苦参碱抑制 A549 细胞增殖及诱导细胞凋亡的比较研究[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26: 778-780.
- [4] 李龙江, 陈志琼, 郑元义, 汤为学, 余瑜. 氧化苦参碱对人卵巢癌细胞 SKOV-3 体外活性的影响[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2003, 17: 100-101.
- [5] Song G, Luo Q, Qin J, Wang L, Shi Y, Sun C. Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 48: 1-5.
- [6] 李鹏, 司维柯, 王源, 姚婕. 苦参碱与氧化苦参碱抑制 HepG2 细胞增殖的对比研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2004, 25: 261-264.
- [7] 王锐, 姜小军, 郑婕, 杨彩艳, 王小萍, 戴贵东. 氧化苦参碱增强环磷酰胺对小鼠 Lewis 肺癌生长的抑制作用[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 399-403.
- [8] Fotakis G, Timbrell J A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 160: 171-177.
- [9] 李丽星. 恶性肿瘤住院病人前 10 位疾病构成分析[J]. *中国病案*, 2004, 5: 42-43.
- [10] 何松, 左国庆, 张燕, 汤为学, 顺铂. 氧化苦参碱对肝癌 QGY 细胞生长及端粒酶活性的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2006, 31: 677-680.
- [11] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 667-676.
- [12] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9: 59-71.
- [13] Xin M, Deng X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 10781-10789.
- [14] Choi B H, Kim W, Wang Q C, Kim D C, Tan S N, Yong J W, et al. Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2008, 261: 37-45.
- [15] Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis[J]. *Science*, 2005, 310: 66-67.
- [16] Bagci E Z, Vodovotz Y, Billiar T R, Ermentrout G B, Bahar I. Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores[J]. *Biophys J*, 2006, 90: 1546-1559.
- [17] Oltersdorf T, Elmore S W, Shoemaker A R, Armstrong R C, Augeri D J, Belli B A, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours[J]. *Nature*, 2005, 435: 677-681.

[本文编辑] 贾泽军