

· 论 著 ·

球药隔重楼凝集素的抗肿瘤活性及机制研究*

袁志平¹, 张巍², 牟华平¹, 王立帅¹, 王秋¹

(1. 四川省宜宾市第二人民医院肿瘤科, 四川宜宾 644000; 2. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 四川成都 610041)

摘要:目的 探讨球药隔重楼中分离得到的球药隔重楼凝集素(PFL)的肿瘤细胞毒性及其可能的机制。方法 用交换层析法纯化 PFL 同源二聚体;通过噻唑蓝(MTT)法、形态学观察、乳酸脱氢酶(LDH)法、糖蛋白阻断分析等方法分析 PFL 对肿瘤细胞增殖的抑制情况及其机制。结果 PFL 对宫颈癌 HeLa、肝癌 HepG2 以及鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖都有抑制作用。PFL 的糖结合位点被甲状腺球蛋白阻断后对肿瘤细胞生长的抑制活性明显降低,表明 PFL 是通过识别 CNE-2 细胞表面的糖链作用于细胞,并诱导细胞凋亡。半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族抑制剂的研究表明 PFL 是通过经典的 caspase 途径诱导 CNE-2 细胞凋亡。结论 PFL 可通过 caspase 途径诱导肿瘤细胞凋亡。

关键词:球药隔重楼;凝集素;细胞凋亡;caspase 途径

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)13-1549-03

Analysis of antineoplastic activity of PFL and its possible mechanism*

Yuan Zhiping¹, Zhang Wei², Mu Huaping¹, Wang Lishuai¹, Wang Qiu¹

(1. Department of Oncology, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To explore the antineoplastic activity of paris fargesii franch lectin(PFL) and its mechanism. **Methods** PFL was purified by exchange chromatography; MTT method, cell morphological analysis, LDH activity-based cytotoxicity assays and caspase inhibitors analyses were adopted to analyze the objects mentioned above. **Results** PFL exhibited remarkable inhibitory effect on HeLa, HepG2 and CNE-2 cells and significantly decreased CNE-2 cell apoptosis in dose-dependent manner. The cytotoxicity was abruptly decreased when the carbohydrate binding-specific activity was inhibited, suggested a significant correlation between carbohydrate binding-specific activity and the antineoplastic mechanism. The research of caspase in bibitory shnoed that PEL induced apoptosis of CNE-2 cells through the dassic caspase pathway. **Conclusion** PFL induces the cancer cell apoptosis, and caspase may play an important role in this apoptotic mechanism.

Key words: paris fargesii franch; lectin; cell apoptosis; caspase pathway

凝集素在自然界中分布极为广泛,在生物体内发挥着重要作用,他们与细胞间黏附、细菌感染宿主、受体介导的胞饮、胚胎发育和机体代谢的调节控制、宿主清除入侵细菌、分子传递、植物防御病原体等生理过程密切相关^[1-2]。近来,多种凝集素还被证明具有血小板凝集、抗病毒、促进淋巴细胞分裂、抗菌和保护造血干细胞的功能^[3],同时还具有抗肿瘤、诱导肿瘤细胞凋亡和自噬的作用^[4]。在抗肿瘤方面,植物凝集素体现在抑制肿瘤细胞的增殖,抑制方式主要包括促肿瘤细胞凋亡和细胞毒性^[5-6]。这些作用为凝集素在医学上的研究和应用指明方向,开辟更广阔的领域。

重楼是多年生草本,具有清热解毒、消肿等功效。此外,还有祛痰抑菌、抗癌止血的作用。重楼属植物是宫血宁、云南白药和季德胜蛇药片等多种药物的主要原料。因为其突出的药用价值,近年来成为研究重点和热点。目前研究较多的是重楼的小分子物质:甾体皂苷,该物质具有止痛、止血、抗肿瘤、免疫调节和阻孕等多种生理活性^[7]。目前国内外对重楼活性成分的研究主要集中于皂苷分子,而对活性蛋白的报道却很少。因此,本研究分离得到球药隔重楼凝集素(paris fargesii franch iectin, PFL)的基础上,对其抗肿瘤活性进行详细分析,为其以后更

深入的研究和应用打下基础。本文所研究的球药隔重楼取自四川彭州,主要生长于常绿阔叶林、竹林、杂木林或者灌丛中。

1 材料与方法

1.1 材料 球药隔重楼块状根茎采于四川彭州;鲜兔血采于市场;宫颈癌细胞株 HeLa,肝癌细胞株 HepG2 和鼻咽细胞株 CNE-2 均购自美国 ATCC 公司;离心机购自美国 Bechman 公司;MALDI-TOF-MS 质谱购自 Waters 公司;电泳仪 Power-Pac300 购自 Bip-RAD 公司。主要试剂:DEAE-Sepharose, CM-Sepharose, Sephacryl S-100 均购自 Pharmacia 公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)低分子量蛋白购自 Takara 公司;蛋白抑制剂 z-IETD-fmk、z-DEVD-fmk 和 z-VAD-fmk 购自 Selleck 公司。

1.2 方法

1.2.1 PFL 的分离纯化 球药隔重楼根茎打成粉末,用生理盐水浸泡 24 h,过滤后离心(10 000 r/min, 10 min),收集上清液。上清液用 pH 8.5, 40 mmol/L Tris-HCl 充分透析并用此 pH 条件 DEAE-Sepharose 层析,用 0~0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱。兔血细胞检测并收集活性部分,再用 pH 4.8, 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液进行充分透析,以此 pH 条件

CM-Sepharose 离子交换层析,用 0~0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,洗脱过程同样以免血细胞检测活性,收集活性部分。活性蛋白溶液用 pH 7.0,20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS)透析,并以相同的缓冲液平衡 Sephacryl S-100 凝胶过滤柱。样品液以 0.5 mL/min 的流速上柱,以免血细胞检测活性,收集活性部分,透析,冷冻干燥。

1.2.2 分子量测定 用 MALDI-TOF-MS 质谱精确测定 PFL 的分子量;用 SDS-PAGE 进行不连续变性和非变性的 Tricine-SDS-PAGE,测定凝集素亚基的分子量。

1.2.3 蛋白基本性质 凝血活性的测定:用 20 μ L 样品与 20 μ L 生理盐水进行倍比稀释,再加入红细胞悬液,震荡 5 min,在室温放置 1 h 后,显微镜观察结果。凝血活性的最高稀释倍数的倒数为凝血活性单位^[8]。糖抑制实验:将糖或糖蛋白用生理盐水倍比稀释,加入 PFL,振荡混匀 30 min 后,每孔依次加入 2% 的兔红细胞悬液,振荡 30 min,检测凝血活性。PFL 初始量为 8 个凝集活性单位。

1.2.4 抗肿瘤活性 采用 MTT 方法,观察 PFL 对宫颈癌细胞株 HeLa,肝癌细胞株 HepG2 和鼻癌细胞株 CNE-2 的细胞毒性。取对数生长期的各种细胞,接种于培养板中,每孔 100 μ L (1 \times 10⁴ cell/mL),培养 24 h,加入不同浓度的 PFL (PFL 组),置培养箱中 48 h。后每孔加入 10 μ L (5 mg/mL) MTT,培养 4 h。弃培养基,后在 570 nm 处测吸光度 (A) 值。细胞存活率 (%) = PFL 组 A 值 / 对照组 A 值 \times 100%,其中,对照组为未经任何处理的细胞。

1.2.5 乳酸脱氢酶 (LDH) 活力测定 将 CNE-2 细胞接种于孔培养板,12 h 后加入不同浓度的 PFL,培养 24 h 收集细胞,加入 LDH 底物 (pH 8.2,0.2 mmol/L Tris-HCl 10 mL 中各组分浓度为: PMS 0.28 mmol/L, L (+)-乳酸 0.5 mmol/L, INT 0.66 mmol/L, NAD⁺ 1.3 mmol/L), 分别测定上清液中各指数。坏死指数: LDH 数量 (LDHn); 凋亡指数: 悬浮细胞中的 LDH 数量 (LDHa); 细胞内 LDH 指数: 培养板中贴壁细胞中的 LDH 数量 (LDHi)。计算公式为: 凋亡率 (%) = LDHa / (LDHa + LDHn + LDHi) \times 100%, 坏死率 (%) = LDHn / (LDHa + LDHn + LDHi) \times 100%。

1.2.6 PFL 作用于肿瘤细胞后的形态观察 取处于对数生长期的 CNE-2 细胞,接种于培养板中 (1.0 \times 10⁴ / mL), 培养 24 h 后,在倒置显微镜下观察。对照组加培养基,实验组加入 PFL (浓度 2 pmol/L), 培养 24 h,用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色,荧光显微镜下观察。

1.2.7 糖蛋白抑制后的抗肿瘤活性 取对数生长期的 CNE-2 细胞,接种于培养板 (每孔 100 μ L, 1 \times 10⁴ / mL), 培养 24 h,加入被糖蛋白抑制凝血活性后的 PFL (2 pmol/L), 继续培养 24 h,用 MTT 法测定 A 值,计算细胞抑制率。

1.2.8 蛋白抑制剂对抗肿瘤活性的影响 取对数生长期的 CNE-2 细胞,接种于培养板 (每孔 100 μ L, 1 \times 10⁴ / mL), 培养 24 h,加入蛋白抑制剂 (z-IETD-fmk、z-DEVD-fmk 和 z-VAD-fmk) 作用 1 h,加入 PFL,继续培养 24 h,用 MTT 法测定 A 值。

2 结果

2.1 基本性质 S-100 层析检测出天然状态 PFL 表观分子量约为 33 \times 10³, Tricine-SDS-PAGE 表明 PFL 的分子量为 13.2 \times 10³ 和 19.1 \times 10³ 的 2 个亚基组成,质谱分析 PFL 亚基的分子量分别为 12.75 \times 10³ 和 18.99 \times 10³, 结果综合表明该凝集素是由两个不同分子量的亚基组成的同源二聚体,亚基间以二硫键的形式连接。凝血活性研究 PFL 在浓度为 0.01

pmol/L 时仍能凝集兔红细胞,具有很强的凝血活性;糖抑制实验结果显示甲状腺球蛋白能抑制该凝集素的凝血活性,且完全抑制 4 个凝集活性单位的甲状腺球蛋白最低浓度为 0.58 pmol/L。

2.2 抗肿瘤活性 PFL 对鼻癌细胞 CNE-2 细胞抑制活性更强,在浓度为 2 pmol/L 时能达到 48.1% 的抑制率;同浓度下对宫颈癌 HeLa 细胞和肝癌 HepG2 细胞分别达到 28.3% 和 19.1% 的抑制率,见图 1。在所测定的细胞系中,PFL 对 CNE-2 细胞抑制活性最强,故选取其作进一步的研究对象。

2.3 PFL 作用于肿瘤细胞后的形态观察 在细胞形态上,对照组细胞连接紧密,大小均匀,发出均匀的荧光;而加 PFL 组的细胞变圆,细胞皱缩,荧光变得致密,细胞正处于形成凋亡小体的过程中。说明 PFL 可以诱导 CNE-2 细胞凋亡,见图 2。

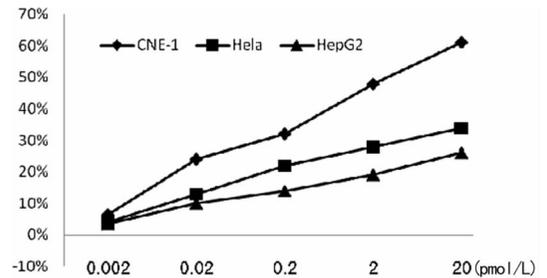
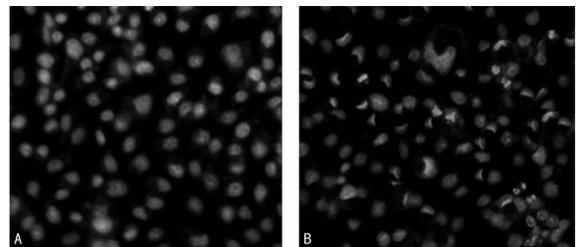


图 1 MTT 法测定 PFL 的细胞毒性



A: 对照组; B: PFL 组。

图 2 CNE-2 细胞的形态观察

2.4 LDH 活性测定 细胞死亡的方式有坏死 (necrosis) 和凋亡 (apoptosis) 两种。本研究通过测定不同时间后 LDH 的活力,来确定 PFL 诱导 CNE-2 细胞的死亡方式。测定的结果显示,当培养 24 h, PFL 的浓度为 2 pmol/L, 细胞凋亡率为 35.2%, 细胞坏死率为 13.5%; 48 h 后, 细胞的凋亡率为 53.2%, 而细胞的坏死率仅为 19.1%, 见图 3。可见, PFL 作用于肿瘤细胞以诱导凋亡为主。

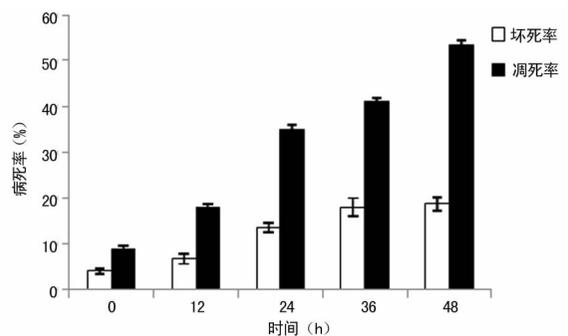


图 3 LDH 活性测定分析图

2.5 PFL 诱导细胞凋亡机理的初步研究

2.5.1 糖结合位点被阻断后对肿瘤细胞凋亡的影响 PFL 的糖结合位点被甲状腺球蛋白抑制后对肿瘤细胞生长的抑制活性如图 4 所示,当糖结合位点被糖蛋白半抑制后,PFL 对

CNE-2 细胞生长的抑制活性明显降低,抑制率降为 13.2%,全抑制后,抑制率仅为 4.1%。可见,PFL 是通过识别 CNE-2 细胞表面的糖链作用于细胞,并诱导细胞凋亡。

2.5.2 蛋白抑制剂对 PFL 诱导的 CNE-2 细胞凋亡的影响
caspase-8 和 caspase-3 以及整个 caspases 家族的抑制剂 (z-IETD-fmk、z-DEVD-fmk 和 z-VAD-fmk) 对 PFL 诱导的细胞凋亡的影响如图 5 所示。分别加入 caspase-8 和 caspase-3 的抑制剂 z-IETD-fmk、z-DEVD-fmk 和 z-VAD-fmk 后,PFL 对 CNE-2 细胞生长的抑制率明显降低,表明抑制剂的加入可抑制细胞凋亡,就说明 PFL 是通过激活 caspases 家族而诱导细胞凋亡的,caspase-8 和 caspase-3 参与了 PFL 诱导的 CNE-2 细胞的凋亡。

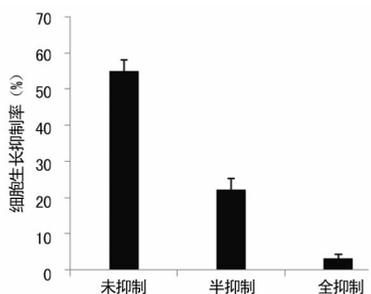


图 4 糖结合位点被阻断后的 PFL 对 CNE-2 细胞凋亡的影响

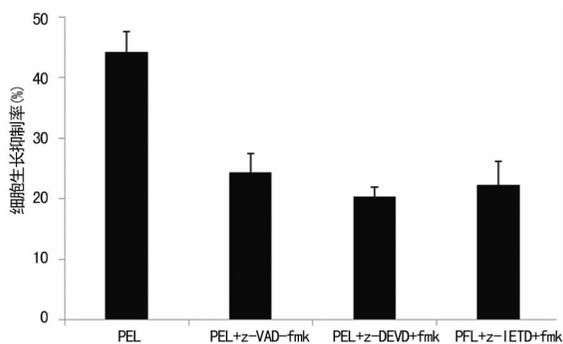


图 5 caspase 抑制剂对 PFL 诱导的 CNE-2 细胞凋亡的影响

3 讨论

重楼作为药用价值突出的中药材,成为近年来的研究重点和热点。目前,国内外对于重楼的活性成分,特别是对甾体皂苷做了充分的研究,证明其具有止痛、止血、抗肿瘤、免疫调节和抗怀孕等多种生理活性。然而,对重楼活性蛋白的报道却很少见。本研究从球药隔重楼中分离得到一种活性蛋白 PFL。该蛋白是由两个不同相对分子质量 12.75×10^3 和 18.99×10^3 的亚基组成的同源二聚体,此结构在凝集素中较为罕见。由于重楼属于百合科植物,曾有报道表明从百合科土茯苓根茎纯化出来的土茯苓凝集素也分别是由相对分子质量为 15×10^3 和 17×10^3 的 2 个亚基组成^[9],这两种凝集素的分子亚基构成上具有很大的相似性。凝血活性研究表明,PFL 在浓度为 $0.36 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时仍能凝集兔红细胞,与其他凝集素相比,显示很强的凝血活性;糖抑制实验结果显示甲状腺球蛋白能抑制该凝集素的凝血活性。

最近的一些研究显示,植物凝集素具有显著的抗肿瘤活性,这使得学术界对于凝集素抗癌的机制给予了更多的关注。鉴于 PFL 强凝血活性和特殊的分子结构,作者着重研究了其

抗肿瘤活性。MTT 法检测表明 PFL 对宫颈癌 HeLa 株、肝癌 HepG2 株以及鼻咽癌 CNE-2 细胞株的生长都有抑制作用;而对不同细胞系抑制作用的不同,可能与不同肿瘤细胞表面的糖蛋白结构和构象的不同有关。PFL 对 CNE-2 细胞呈现明显的细胞毒性,且能通过时间依赖性和剂量依赖性的方式引起 CNE-2 细胞凋亡。当 PFL 的糖结合位点被甲状腺球蛋白全抑制后对肿瘤细胞生长的抑制活性明显降低,提示 PFL 是通过识别 CNE-2 细胞表面的糖链而作用于细胞,并诱导细胞发生凋亡。

细胞凋亡在多细胞动物进化过程中扮演着极其重要的作用。因此,如果能研究清楚抑制肿瘤生长的细胞凋亡分子机制或信号通路,对于开发抗肿瘤药物至关重要^[10]。有研究显示,凝集素的糖结合位点以及其他一些位点具有诱导细胞凋亡活性^[11]。ConA 是第一个报道的具有抑制肿瘤细胞活性的豆类凝集素。它能通过 caspase 依赖途径和线粒体凋亡途径诱导 A375 细胞程序性死亡^[12]。黄精凝集素作为甘露糖结合凝集素,能通过线粒体介导途径诱发肿瘤细胞的凋亡和自噬^[13]。本研究揭示 PFL 能通过典型的 caspase 依赖型的细胞凋亡诱发肿瘤细胞,该过程有 3 个 caspase 抑制因子参与,特别是 caspase-3 和 caspase-8 的抑制因子。caspases 激活级联反应在凋亡调控中占核心作用,它有 2 条主要途径:线粒体依赖途径和死亡介导途径^[14]。不同刺激信号经各自途径启动不同的 caspases 级联反应,进而激活下游的效应 caspases,诱发细胞凋亡。不过,鉴于 PFL 本身结构和性质的特殊性,其诱发肿瘤细胞凋亡的机制目前还不如甘露糖结合凝集素或豆类凝集素清楚。因此,后续的研究应该关注于阐述该凝集素诱导凋亡的具体过程。

参考文献:

- [1] Sharon N, Lis H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition[J]. Chem Rev, 1998, 98(2): 637-674.
- [2] Panchak LV, Antoniuk VO. Purification of lectin from fruiting bodies of *Lactarius rufus* (Scop: Fr.) Fr. and its carbohydrate specificity[J]. Ukr Biokhim Zh, 2007, 79(2): 123-128.
- [3] Varki A. Biological roles of oligosaccharides; all of the theories are correct[J]. Glycobiology, 1993, 3(2): 97-130.
- [4] Liu B, Bian HJ, Bao JK. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic[J]. Cancer Lett, 2010, 287(1): 1-12.
- [5] Park R, Kim MS, So HS, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(11): 1685-1691.
- [6] Chang CP, Yang MC, Liu HS, et al. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model[J]. Hepatology, 2007, 45(2): 286-296.
- [7] 张曼, 李彦文, 李志勇, 等. 重楼属药用植物的研究进展[J]. 环球中医药, 2011, 4(2): 145-148.
- [8] Wang H, Gao J, Ng TB. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 275(3): 810-816. (下转第 1554 页)

房和(或)左房伞盘开始持续的压迫心房壁或主动脉壁。至于发生压迫原因可能是由于,伞盘开始失去可塑性,另外,封堵后心房容积减小,这些可能是导致影响接触型到间断压迫型改变的原因。但是新的内膜形成可以阻止患者主动脉磨损,认为间断压迫的危险性较低。仍然存在争议的是什么形状的封堵器带来磨损的危险性。在较大的主动脉边缘患者中,一些作者^[11-14]认为主动脉边缘张开,那么磨损的危险性降低,在选择主动脉边缘缺乏,由于封堵器较大,磨损的危险性就较大。

本组研究中,主动脉侧张开的形状随时间推移变为紧贴型。这些病例可能比刚置入时就紧贴的封堵器较日后的磨损危险性大,刚置入时封堵器在主动脉侧呈张开形状,可以减少对冠状静脉窦壁的磨损,但它可能增加上方心房壁的磨损。如果置入即刻封堵器会持续压迫心房壁和(或)主动脉壁,就要换小一点的封堵器。因此在封堵器置入后,对封堵器和主动脉壁和心房壁关系的观察是必要,这样才能预防封堵器对心房壁、主动脉壁的磨损。

参考文献:

- [1] Majunke N, Bialkowski J, Wilson N, et al. Closure of atrial septal defect with the amplatzer septal occluder in adults [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103(4): 550-554.
- [2] 舒茂琴, 宋治远, 冉肇力, 等. 经导管介入封堵术治疗继发性孔型房间隔缺损的临床效果[J]. *重庆医学*, 2006, 35(4): 289-290.
- [3] Kaya MG, Baykan A, Dogan A, et al. Intermediate-term effects of transcatheter secundum atrial septal defect closure on cardiac remodeling in children and adults[J]. *Pediatr Cardiol*, 2010, 31(4): 474-482.
- [4] 付勇, 邓明彬, 刘慧, 等. 经右胸小切口行房间隔缺损封堵术 16 例分析[J]. *重庆医学*, 2011, 40(20): 2037-2038.
- [5] López-Fernández T, Gómez de Diego JJ, Monedero MC, et al. Aortic wall erosion after percutaneous closure of atrial septal defect[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2011, 24(2): 227. e5-e8.
- [6] Misra M, Sadiq A, Namboodiri N, et al. The 'aortic rim' recount: embolization of interatrial septal occluder into the main pulmonary artery bifurcation after atrial septal defect closure[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2007, 6(3): 384-386.
- [7] Georgakis A, Radtke WA, Lopez C, et al. Complex atrial septal defect: percutaneous repair guided by three-dimensional echocardiography[J]. *Echocardiography*, 2010, 27(5): 590-593.
- [8] Kitano M, Yazaki S, Sugiyama H, et al. The influence of morphological changes in amplatzer device on the atrial and aortic walls following transcatheter closure of atrial septal defects[J]. *J Interv Cardiol*, 2009, 22(1): 83-91.
- [9] Ahn E, Luk A, Mezody M, et al. Early morphological changes of an Amplatzer Septal Occluder explanted at heart transplant[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2009, 18(1): 57-60.
- [10] 吕秀章, 刘延玲, 王浩, 等. 房间隔缺损封堵术后 Amplatzer 封堵器形态变化的研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 2004, 13(3): 10-12.
- [11] Thanopoulos BD, Dardas P, Ninios V, et al. Transcatheter closure of large atrial septal defects with deficient aortic or posterior rims using the "Greek maneuver". A multicenter study[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 3643-3646.
- [12] 柴青芬, 阮伟丽, 李玉玲, 等. 经胸超声心动图在边缘不足房间隔缺损封堵术中的应用[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2010, 31(9): 886-888.
- [13] Rastogi N, Smeeton NC, Qureshi SA. Factors related to successful transcatheter closure of atrial septal defects using the Amplatzer septal occluder[J]. *Pediatr Cardiol*, 2009, 30(7): 888-892.
- [14] Ko SF, Liang CD, Yip HK, et al. Amplatzer septal occluder closure of atrial septal defect: evaluation do transthoracic echocardiography cardiac CT, and transesophageal echocardiography[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2009, 19(6): 1522-1529.

(收稿日期: 2013-12-05 修回日期: 2014-01-18)

(上接第 1551 页)

- [9] Ng TB, Yu YL. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(3): 269-277.
- [10] Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes[J]. *Apoptosis*, 2008, 13(1): 1-9.
- [11] Wang H, Ng TB, Ooi VE, et al. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(3): 365-372.
- [12] Liu B, Li CY, Bian HJ, et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 482(1/2): 1-6.
- [13] Liu B, Zhang B, Min MW, et al. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(8): 840-844.
- [14] Enari M, Talianian RV, Wong WW, et al. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis [J]. *Nature*, 1996, 380(6576): 723-726.

(收稿日期: 2013-11-09 修回日期: 2014-02-01)