

## 原阿片碱通过线粒体凋亡途径抑制肝细胞癌生长

叶汉林, 乔 淦, 王琳琳, 程 丽, 林秀坤\*

(西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000)

**摘要:** 全球范围内超过一半的肝癌病例发生在我国, 亟待发现新的抗肝癌药物。已有报道表明, 原阿片碱具有较好的抗肿瘤活性, 但其作用机制尚不清楚。本研究采用CCK-8实验证实原阿片碱对肝癌细胞具有显著的抑制作用, 流式细胞术和JC-1染色实验表明原阿片碱能够降低肝癌细胞线粒体膜电位、诱导肝癌凋亡, Western blot分析表明原阿片碱能够激活线粒体凋亡通路, 上调Bax、细胞色素C (cytochrome C, Cyto-C)、剪切的半胱天冬氨酸蛋白酶-9 (cleaved-caspase-9)、剪切的半胱天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved-caspase-3)、剪切的DNA修复酶 (cleaved-poly ADP-ribose polymerase, cleaved-PARP) 和凋亡酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 的表达, 下调Bcl-2的表达。人肝癌裸鼠移植性肿瘤实验证实, 50 mg·kg<sup>-1</sup>原阿片碱腹腔注射给药, 抑瘤率可达到72.46%, 并对小鼠体重没有明显影响。动物实验严格按照西南医科大学动物伦理委员会的规定执行。本研究提示, 原阿片碱有潜力开发为治疗肝细胞癌的药物前体。

**关键词:** 肝细胞癌; 原阿片碱; 抗肿瘤活性; 线粒体凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)08-2223-07

## Protopine inhibits the growth of hepatocellular carcinoma through a mitochondrially mediated apoptosis pathway

YE Han-lin, QIAO Gan, WANG Lin-lin, CHENG Li, LIN Xiu-kun\*

(School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

**Abstract:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a serious threat for human health, the incidence of HCC in China accounts for more than 50% worldwide. There is an urgent need to develop novel anticancer agents for the treatment of HCC patients. Here we characterized the inhibitory effect and the molecular mechanism of protopine on HCC cancer cells. The results of a CCK-8 assay indicated that protopine displays anticancer activities on HCC cells. Flow cytometry and JC-1 staining confirmed that treatment with protopine decreased the mitochondrial membrane potential and induced apoptosis in HCC cells. Western blot analysis showed that protopine was able to increase protein expression in the mitochondrial apoptotic pathway; the level of cytochrome C, apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), Bax, cleaved-poly ADP-ribose polymerase (cleaved-PARP), cleaved-caspase-3, and cleaved-caspase-9 were increased while the expression of Bcl-2 was suppressed significantly. An *in vivo* study revealed that protopine significantly suppressed the growth of tumors in nude mice bearing HepG2 cells. Administration of protopine intraperitoneally at a concentration of 50 mg·kg<sup>-1</sup> inhibited tumor growth by 72.46%. Animal experiments were carried out according to the Regulation of the Animal Ethics Committee of Southwest Medical University. This study provides preliminary evidence that there is potential to develop protopine as a lead compound for the treatment of HCC.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; protopine; anticancer activity; mitochondrial apoptosis

收稿日期: 2021-03-07; 修回日期: 2021-03-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82773776).

\*通讯作者 Tel: 13522138991, E-mail: xiukunlin@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0319

肝癌是全球第三大恶性肿瘤致死因素,世界上有超过 50% 的肝癌病例发生在中国,而肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 约占总肝癌病例的 90%<sup>[1,2]</sup>。根据中国 2015 年的统计数据,每年我国大约有 422 100 人死于肝癌,约占所有癌症死亡案例的 15%<sup>[3]</sup>。早期诊断困难、缺乏靶向药物和疾病发展迅速是肝细胞癌存活率低的重要原因<sup>[4]</sup>。Sorafenib 是临床上用于肝细胞癌患者全身治疗的一线药物。然而,由于患者对 sorafenib 产生抗药性,导致疗效降低<sup>[5,6]</sup>。因此,亟待开发治疗肝细胞癌的新药。

原阿片碱 (C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>N) 是一种来自延胡索 (*Corydalis yanhusuo*) 的异喹啉类生物碱,分子量为 353.37 Da<sup>[7]</sup>。已有的报道表明,原阿片碱具有抗炎、抗真菌、保护肝脏、神经保护以及抗血栓形成等广泛的生物活性<sup>[8,9]</sup>。近来的研究表明,原阿片碱可以通过显著降低黏附因子的表达从而抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的异质性黏附<sup>[10]</sup>。原阿片碱还可以通过诱导微管蛋白聚合和有丝分裂阻滞抑制人前列腺癌细胞的增殖<sup>[11]</sup>。此外,原阿片碱还通过上调 p53 的表达可以抑制对人结肠癌 HCT116 细胞生长<sup>[12]</sup>。但其抗肿瘤作用的分子机制仍不明确,体内抗肿瘤活性尚未见报道,本文研究了原阿片碱对肝癌细胞的体内外抗肿瘤活性,证实其对肝细胞癌具有显著的抗肿瘤活性。

## 材料和方法

**药品和试剂** DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清来自美国 Gibco 公司;单克隆抗体剪切的半胱天冬氨酸蛋白酶 (cleaved-PARP)、半胱天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)、半胱天冬氨酸蛋白酶-9 (caspase-9) 和细胞色素 C (cytochrome C) 购自 Cell Signaling Technology 公司;cleaved-caspase-3 和 cleaved-caspase-9 购自 Abcam 公司;Bcl-2 和 Bax 购自 Proteintech 公司;CCK-8 试剂和 BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;Hoechst 33342/PI 双染试剂盒购自北京索莱宝科技公司;凋亡试剂盒购自美国 BD 公司;JC-1 试剂盒购自苏州凯基生物技术公司;SDS-PAGE 凝胶试剂盒购自上海雅酶生物医药科技公司;原阿片碱购自成都普菲德生物技术公司。其他化学试剂均为分析试剂级。

**细胞株与实验动物** 人肝癌细胞 BEL-7402、HepG2 和 SMMC-7721,人非小细胞肺癌细胞 NCI-H460,人胰腺癌细胞 Panc-28,人正常肝细胞 L02 和人脐静脉内皮细胞 HUVEC 均来自 ATCC (American Type Culture Collection)。雄性 Balb/c-nu 无胸腺裸鼠 [SCXK (京) 2019-0010] 购自重庆腾鑫生物技术有限公司。

**CCK-8 法检测原阿片碱对肿瘤细胞的抑制作用** 分别取处于指数生长期的人肝癌细胞 BEL-7402、HepG2 和 SMMC-7721,人非小细胞肺癌细胞 NCI-H460、人胰腺癌细胞 Panc-28、人正常肝细胞 L02 和人脐静脉内皮细胞 HUVEC,以 8 000 个/孔均匀接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100  $\mu$ L,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,待细胞贴壁后,用原阿片碱干预细胞,处理不同时间后加入 CCK-8 试剂染色,使用酶标仪在 450 nm 处检测其 OD 值。

### 肿瘤细胞凋亡检测

**Hoechst 33342/PI 双染法观察细胞凋亡形态** 分别取处于指数生长期的 BEL-7402 和 HepG2 细胞,均匀接种于 6 孔细胞培养板中,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,待细胞贴壁后,分别用 7.5、15 和 30  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 原阿片碱处理细胞 48 h,加入 Hoechst 33342/PI 双染试剂,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱内避光染色 20~30 min,荧光显微镜下观察、拍照。

**流式细胞术检测细胞凋亡** 将细胞接种于 6 孔板中,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,待细胞贴壁后,分别用 7.5、15 和 30  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 原阿片碱处理 48 h,胰酶消化、收集各组细胞,加入 Annexin V 和 PI 染色液 5  $\mu$ L,室温染色 15 min,加入染色缓冲液 400  $\mu$ L,流式细胞仪检测凋亡率。

**JC-1 染色法检测线粒体膜电位变化** 将细胞接种于 6 孔板中,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,待细胞贴壁后,分别用 7.5、15 和 30  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 原阿片碱干预细胞 48 h,胰酶消化、离心收集细胞,将细胞重悬于 500  $\mu$ L JC-1 工作液中,孵育 30 min,染色完成后加入适量反应缓冲液洗涤细胞 1 次,将细胞重悬于 500  $\mu$ L 培养缓冲液中,调节每毫升细胞数至  $1 \times 10^6$  个,流式细胞仪检测其线粒体膜电位变化情况。

**Western blot 研究原阿片碱对线粒体凋亡通路相关蛋白的影响** 按照上述方法将细胞接种于 6 孔板中,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,待细胞贴壁后,分别用 7.5、15 和 30  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 原阿片碱干预细胞 48 h,用 RIPA 裂解液裂解 30 min 后,4  $^{\circ}$ C 离心 20 min 提取蛋白。使用 BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度,每组样品上样量为 20  $\mu$ g,电泳分离蛋白,湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。使用快速封闭液封闭 30 min, TBST 漂洗 1 次,加入一抗,放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗常温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。配制 ECL 发光试液,检测蛋白表达。使用 Image J 软件分析蛋白的相对表达量。

**人肝癌裸鼠移植性肿瘤模型分析原阿片碱的体内抗肿瘤活性** 取指数生长期的 HepG2 细胞,胰酶消化收集细胞,调节细胞密度至每毫升  $3 \times 10^7$  个。将 HepG2

细胞接种于适应性喂养1周后的裸鼠右侧腋下, 每只鼠接种 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 每天记录裸鼠的体重和瘤体积, 待肿瘤长至 60  $\text{mm}^3$  左右时, 将裸鼠随机分为6组: 生理盐水对照组、溶剂对照组 (5% DMSO、10% PEG400 和 2% Tween 80)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 阳性对照组 (25  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  体重)、12.5、25 和 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  体重原阿片碱给药组。每组 5 只, 每次注射药物 100  $\mu\text{L}$ , 连续注射 14 天, 治疗完成后, 观察裸鼠生存状态 7 天。整个实验过程中, 隔日测量 1 次每只小鼠的体重和肿瘤体积, 并记录。待实验完成后, 取出肿瘤并拍照。动物实验严格按照西南医科大学动物伦理委员会的规定执行。

**统计学方法** 以上实验均重复进行 3 次, 统计数据结果, 用均数 $\pm$ 标准差表示, 用 GraphPad、Image J 等软件分析处理数据结果, 分析组间差异时选择的统计学分析方法为 *t* 检验或 one-way ANOVA,  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$  均代表组间有差异, 且差异明显具有统计学意义。

## 结果

### 1 原阿片碱能够显著抑制肝癌细胞的生长

通过 CCK-8 法分析原阿片碱 (图 1A) 对肿瘤细胞的抑制作用, 结果显示 (图 1B), 原阿片碱对肿瘤细胞的抑制作用具有选择性, 其中对人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 的抑制作用最强, 半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) 分别为  $26.32 \pm 9.13$  和

$32.91 \pm 8.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 并呈现时间依赖性 (图 1C、D), 对正常细胞的抑制作用相对较弱。

### 2 原阿片碱诱导肝癌细胞凋亡

采用 Hoechst 33342/PI 双染法在荧光显微镜下观察其凋亡形态, 结果表明经过原阿片碱干预后, 人肝癌细胞 BEL-7402 和 HepG2 出现细胞核皱缩碎裂和凋亡小体等现象 (图 2A、B)。

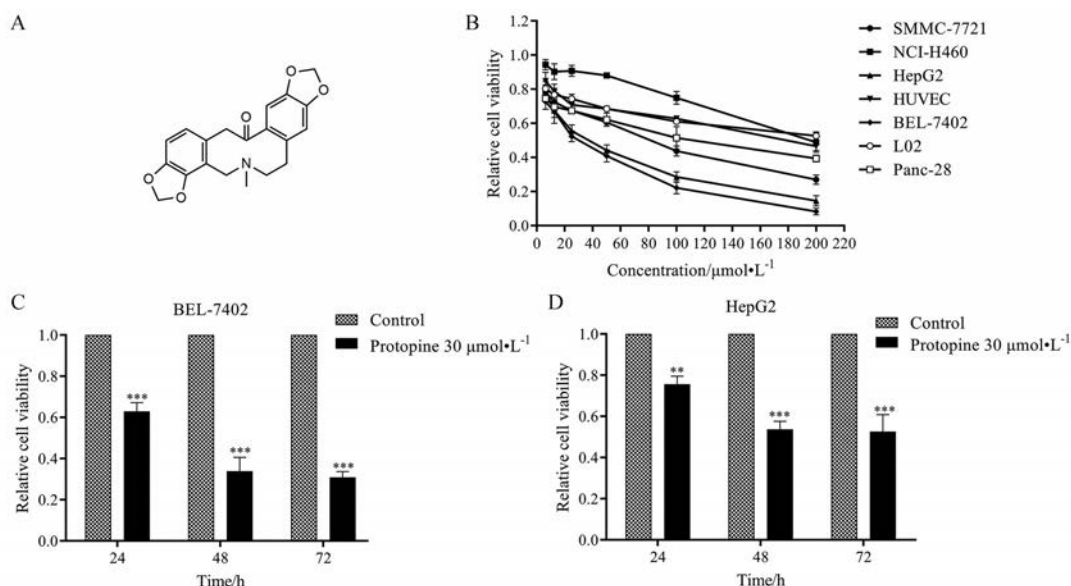
进一步采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测人肝癌细胞 BEL-7402 (图 3A) 和 HepG2 (图 3B) 的凋亡率, 定量分析结果表明, 原阿片碱能够以浓度依赖的方式显著诱导肝癌细胞凋亡, BEL-7402 细胞经过原阿片碱处理后, 凋亡率由 5.26% 升高至 55.16% (图 3C), 原阿片碱处理 HepG2 细胞也获得类似结果, 凋亡率由 5.13% 升高至 40.51% (图 3D)。

### 3 原阿片碱降低肝癌细胞线粒体膜电位

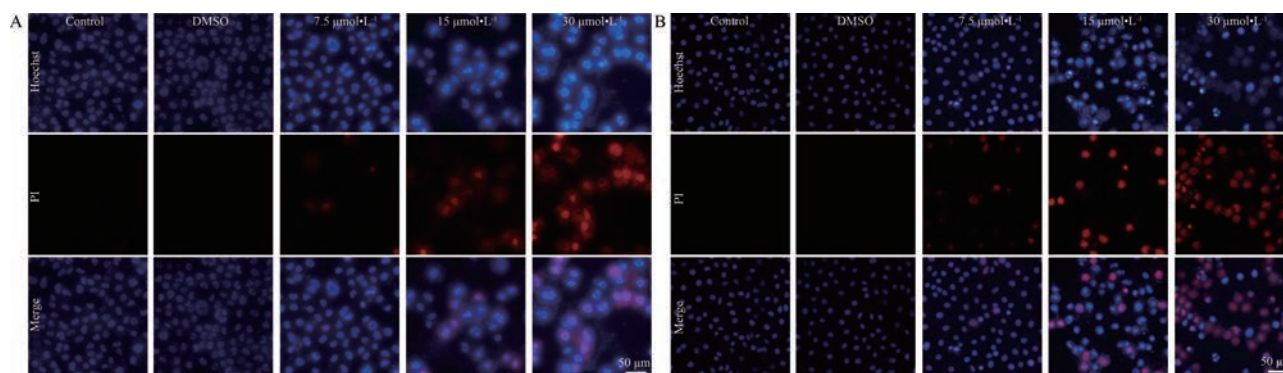
采用 JC-1 染色法检测了原阿片碱对肝癌细胞线粒体膜电位的影响, 结果表明, 原阿片碱能够显著降低人肝癌细胞 BEL-7402 (图 4A) 和 HepG2 (图 4B) 的线粒体膜电位, 定量结果分析表明, 经过原阿片碱的处理, 人肝癌细胞 BEL-7402 的绿色荧光比率由 11.36% 升高至 57.99% (图 4C), 而人肝癌细胞 HepG2 的绿色荧光比率由 14.92% 升高至 56.79% (图 4D)。以上结果显示, 原阿片碱能够以浓度依赖的方式诱导肝癌细胞线粒体膜去极化。

### 4 原阿片碱对线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

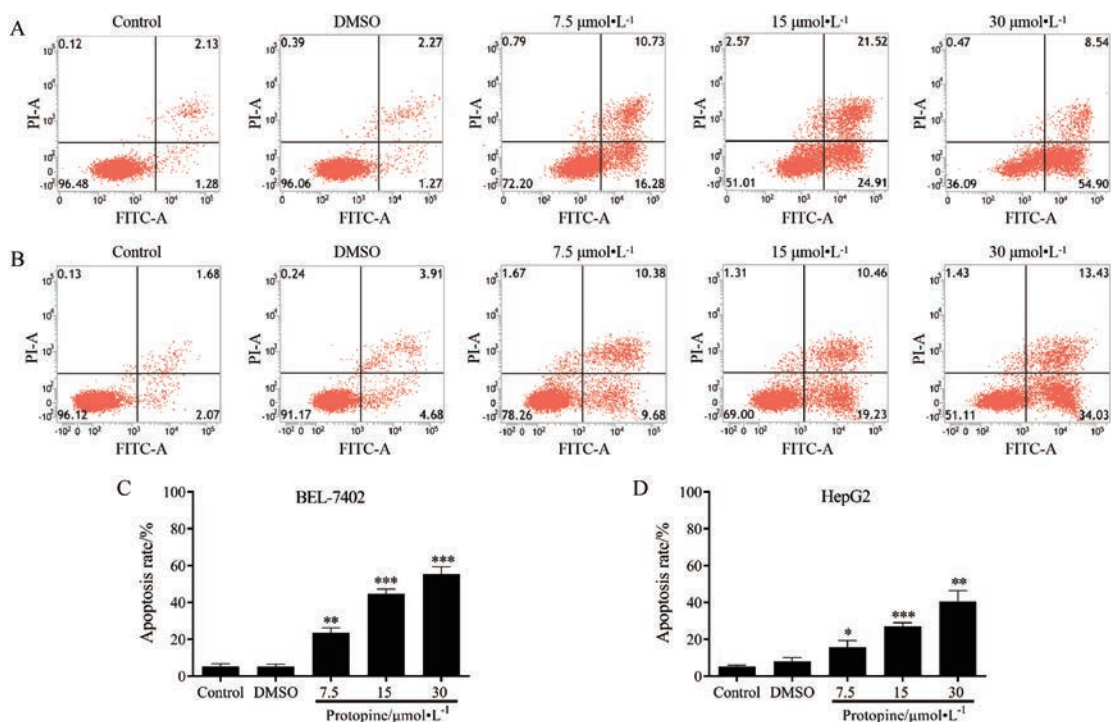
采用 Western blot 分析检测了原阿片碱对线粒体



**Figure 1** Protopine inhibited the growth of hepatocellular carcinoma. A: The chemical structure of protopine; B: Cells were treated with certain concentration of protopine for 48 h. The cell viability was measured by CCK-8 assay; C, D: Hepatocellular carcinoma cells were treated with protopine (30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24, 48, and 72 h respectively. The cell viability of BEL-7402 (C) and HepG2 (D) cells was measured by CCK-8 assay.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group



**Figure 2** Protopine induced apoptosis as analyzed by Hoechst 33342/PI double staining. BEL-7402 cells (A) and HepG2 cells (B) were treated with protopine (7.5, 15, and 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 48 h and the cells were stained with Hoechst 33342 (blue, staining apoptotic cells) and PI (red, staining dying cells). Cancer cells apoptosis was observed by fluorescence microscopy. The blue color indicated the apoptotic cells while the red color represented the dying cells. PI: Propidium iodide



**Figure 3** Protopine induced apoptosis on BEL-7402 cells and HepG2 cells. Cancer cells were treated with certain concentration of protopine, and the cells were stained with Annexin V/PI. Apoptotic effect of BEL-7402 cells (A) and HepG2 cells (B) were detected by flow cytometry approach. (C) and (D) were quantitative analysis results.  $n = 3, \bar{x} \pm s. P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001$  vs control group. FITC: Fluorescein isothiocyanate; DMSO: Dimethyl sulfoxide

凋亡途径相关蛋白表达的影响。结果显示,原阿片碱可以活化 caspase-3 与 caspase-9 (图 5A), 促进 Bax、细胞色素 C、cleaved-PARP 和 Apaf-1 表达,降低 Bcl-2 表达水平 (图 5B), 并呈现剂量依赖性,说明原阿片碱可以通过线粒体途径诱导肝癌细胞凋亡。

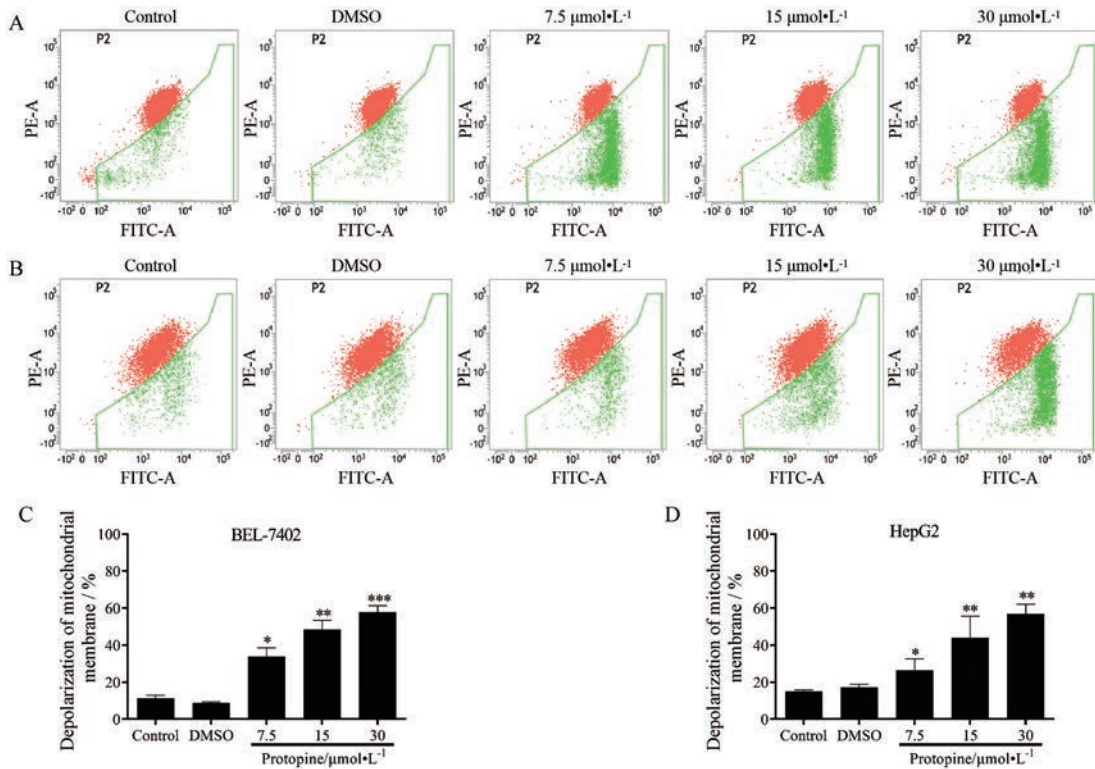
### 5 原阿片碱能够抑制人肝癌裸鼠移植性肿瘤的生长

采用人肝癌细胞 HepG2 裸鼠皮下移植瘤测定了原阿片碱的体内抗肿瘤活性。结果表明,原阿片碱能够显著抑制肿瘤生长 (图 6A、B), 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  原阿片碱 i.p.

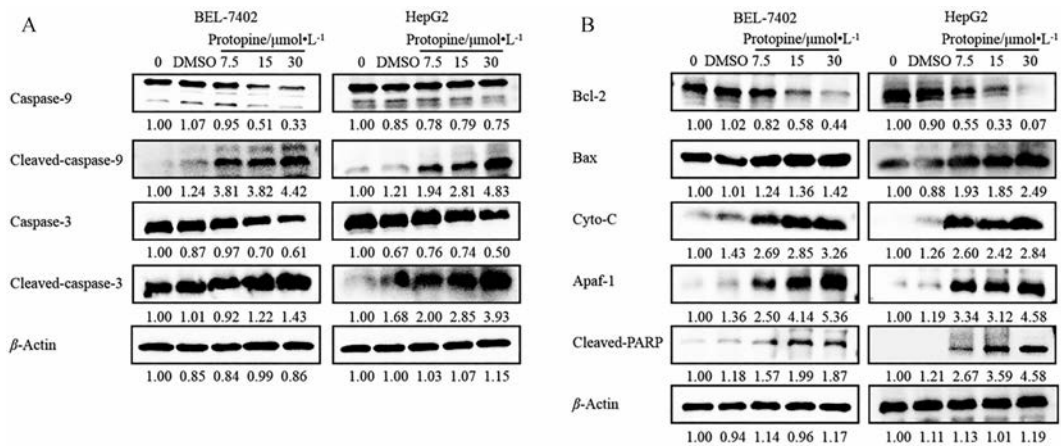
给药抑瘤率达到 72.46% (图 6C)。原阿片碱给药组的裸鼠体重没有明显改变 (图 6D), 说明原阿片碱的毒副作用较小。

### 讨论

天然产物是新型抗癌药物开发的重要发展方向, 并已成为癌症研究的新兴领域<sup>[13]</sup>。目前, 临床天然来源的生物碱包括喜树碱和紫杉醇在临床上广泛应用, 但这类药物多存在骨髓抑制等严重的不良反应, 另外



**Figure 4** Protopine decreased the mitochondrial membrane potential on BEL-7402 and HepG2 cells. Cells were treated with certain concentration of protopine. After incubated for 48 h, cells were stained with JC-1. Mitochondrial membrane potential of BEL-7402 cells (A) and HepG2 cells (B) were detected by flow cytometry approach. (C) and (D) were the quantitative analysis results.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

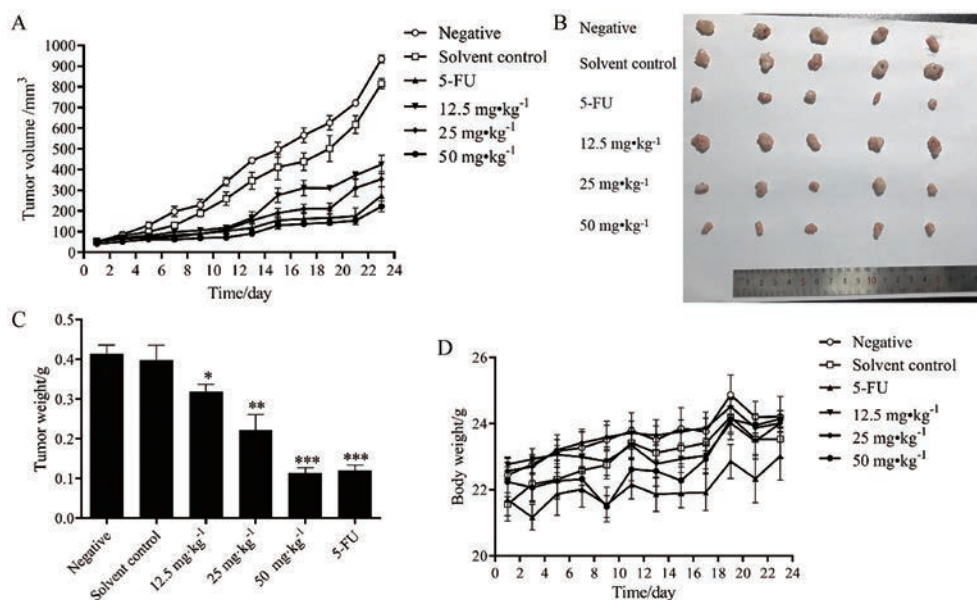


**Figure 5** Protopine affected the expression of proteins related to mitochondrial apoptosis pathway in hepatocellular carcinoma cells. Cells were treated with certain concentration of protopine. After incubated for 48 h, Western blot was performed to detect the expression level of apoptotic related proteins, including caspase-9, cleaved-caspase-9, caspase-3, and cleaved-caspase-3 (A), and Bcl-2, Bax, Cytochrome C (Cyto-C), Apaf-1, and cleaved-PARP (B)

由于耐药性的产生影响了这类药物的疗效<sup>[14-16]</sup>。本研究初步表明,原阿片碱对肿瘤细胞有较好的选择性,对裸鼠生长没有显著的抑制作用,提示原阿片碱可以作为抗肿瘤药物的研发前体。此外,本课题组发现原阿片碱水溶性差,这可能是其体内抗肿瘤活性不强的原因之一,因此,课题组正在应用化学修饰或纳米给药系

统等方法提高原阿片碱的生物利用度,以提高其体内抗肿瘤效果。

细胞凋亡又称程序性死亡,主要包括线粒体凋亡与死亡受体凋亡两种途径。死亡受体途径的凋亡主要由肿瘤坏死因子受体及其配体 (Fas/Fas L)、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-



**Figure 6** Protopine inhibited tumor growth in xenograft nude mice model. The xenograft nude mice model bearing HepG2 cells was established and the model mice were injected ip with protopine (12.5, 25, and 50 mg·kg<sup>-1</sup>) and 5-FU (25 mg·kg<sup>-1</sup>). Tumor volume (A) and mouse body weight (D) were measured every other day. After being treated with protopine for 14 days, the tumor tissues were removed and photographed (B). C: The quantitative analysis of tumor weight after treating the mice with protopine for 14 days.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

inducing ligand, TRAIL) 信号转导, 细胞表面的死亡受体与死亡配体的特异性结合导致 caspase-8 的激活, 引起细胞凋亡<sup>[17]</sup>。线粒体凋亡途径主要包括细胞色素 C 和非 caspase 依赖的细胞凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 介导的两种途径, 当细胞接收到凋亡信号时, 线粒体膜发生去极化、通透性增加导致线粒体膜内的促凋亡因子如细胞色素 C、Apaf-1 释放到胞质中, 激活 caspase 级联反应, 引起细胞凋亡; 另一种途径作用方式为线粒体膜内的 AIF 释放到胞质中, 并转移至细胞核内破坏 DNA, 导致细胞死亡<sup>[18]</sup>。细胞凋亡是抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞生长的主要方式, 临床上常用的抗肿瘤药物包括紫杉醇<sup>[19]</sup>、5-FU<sup>[20]</sup>和喜树碱<sup>[21]</sup>都可以通过凋亡途径抑制肿瘤生长。已有的报道表明, 原阿片碱可以通过诱导微管蛋白聚合和有丝分裂阻滞抑制人前列腺癌细胞的增殖<sup>[11]</sup>。本研究证实, 原阿片碱对人肝癌细胞具有良好的抑制作用。原阿片碱能够诱导肝癌细胞线粒体膜去极化, 上调 Bax、细胞色素 C、cleaved-caspase-9、cleaved-caspase-3、cleaved-PARP 和 Apaf-1 的表达, 下调癌基因 Bcl-2 的表达, 启动 caspase 级联反应, 导致细胞凋亡。原阿片碱是否可以抑制肝癌细胞微管聚合, 其与微管蛋白相互作用的位点还需要进一步研究证实。本研究的体内实验表明, 原阿片碱对人肝癌细胞裸鼠移植性肿瘤呈现良好的抗肿瘤作用, 对裸鼠体重没有明显影响, 提示原阿片

碱可以作为抗肿瘤药物的先导药物。

**作者贡献:** 林秀坤、叶汉林负责实验设计; 叶汉林、乔渝和王琳琳负责具体实验的实施; 程丽参与了实验数据分析; 叶汉林完成文章初稿; 林秀坤对文章进行修订。

**利益冲突:** 文章内容不涉及相关利益冲突, 该研究未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的资助, 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87-108.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. Int J Cancer, 2019, 144: 1941-1953.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.
- [4] Fu J, Wang H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China [J]. Cancer Lett, 2017, 412: 283-288.
- [5] Faivre S, Rimassa L, Finn RS. Molecular therapies for HCC: looking outside the box [J]. J Hepatol, 2020, 72: 342-352.
- [6] Villanueva A, Llovet JM. Second-line therapies in hepatocellular carcinoma: emergence of resistance to sorafenib [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18: 1824-1826.
- [7] Sung DK, Kim YH, Pan CH, et al. Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages [J]. BMB Rep, 2012, 45: 108-113.

- [8] Orhan I, Ozçelik B, Karaoğlu T, et al. Antiviral and antimicrobial profiles of selected isoquinoline alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* species [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2007, 62: 19-26.
- [9] Rathi A, Srivastava AK, Shirwaikar A, et al. Hepatoprotective potential of *Fumaria indica* Pugsley whole plant extracts, fractions and an isolated alkaloid protopine [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15: 470-477.
- [10] He K, Gao J. Protopine inhibits heterotypic cell adhesion in MDA-MB-231 cells through down-regulation of multi-adhesive factors [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11: 415-424.
- [11] Chen CH, Liao CH, Chang YL, et al. Protopine, a novel microtubule-stabilizing agent, causes mitotic arrest and apoptotic cell death in human hormone-refractory prostate cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315: 1-11.
- [12] Son YL, An YJ, Jung J, et al. Protopine isolated from *Nandina domestica* induces apoptosis and autophagy in colon cancer cells by stabilizing p53 [J]. *Phytother Res*, 2019, 33: 1689-1696.
- [13] Zhang X, Meng LH. Progress in molecularly targeted anti-tumor drugs derived from natural products or their derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2491-2500.
- [14] Yang CP, Horwitz S. Taxol: the first microtubule stabilizing agent [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1733.
- [15] Martino E, Della VS, Terribile E, et al. The long story of camptothecin: from traditional medicine to drugs [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 27: 701-707.
- [16] Shah NN, Merchant MS, Cole DE, et al. Vincristine sulfate liposomes injection (VSLI, Marqibo): results from a phase I study in children, adolescents, and young adults with refractory solid tumors or leukemias [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2016, 63: 997-1005.
- [17] Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17: 193-199.
- [18] Wiraswati HL, Hangen E, Sanz AB, et al. Apoptosis inducing factor (AIF) mediates lethal redox stress induced by menadione [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 76496-76507.
- [19] Weaver BA. How taxol/paclitaxel kills cancer cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25: 2677-2681.
- [20] Wyatt MD, Wilson DM. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 788-799.
- [21] Liew ST, Yang LX. Design, synthesis and development of novel camptothecin drugs [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14: 1078-1097.