

红树莓提取物抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的实验研究

张浩鹏,李国东,魏九峰,王云峰,党树伟,方 瑄,刘家仁,刘 明
(哈尔滨医科大学附属第四医院,黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: [目的] 探讨红树莓提取物抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的具体机制, 为红树莓提取物预防并治疗肝癌提供理论依据。[方法] 体外培养 SMMC-7721 细胞,应用 CCK8 方法及集落形成实验检测不同浓度的红树莓提取物对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖活性的影响;通过流式细胞术检测 SMMC-7721 细胞经不同浓度的红树莓提取物作用 72h 后细胞周期的变化;应用 Western blot 方法检测红树莓提取物处理 SMMC-7721 细胞 72h 后细胞周期相关蛋白的表达变化, 以及红树莓提取物对肝癌细胞 AKT 通路的影响。[结果] 红树莓提取物能够抑制 SMMC-7721 细胞的增殖活性;不同浓度红树莓提取物处理 SMMC-7721 细胞 72h 后,与对照组相比,随着浓度的增高, G_0/G_1 期细胞数比例降低 ($P<0.05$),S 期细胞数比例升高 ($P<0.05$);红树莓提取物能够降低周期相关蛋白 cyclinA 及 CDK2 的表达 ($P<0.01$);同时使 P-AKT(Ser473)表达下降 ($P<0.01$)。[结论] 红树莓提取物能够抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖,这种抑制作用可能与 AKT 通路调控的 cyclinA-CDK2 介导的 S 期阻滞相关。

关键词: 红树莓提取物;肝肿瘤;细胞周期阻滞

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2019)02-0155-06

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.02.A015

Effect of Red Raspberry Extract on Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells

ZHANG Hao-peng, LI Guo-dong, WEI Jiu-feng, WANG Yun-feng, DANG Shu-wei, FANG Xuan, LIU Jia-ren, LIU Ming

(The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of red raspberry extract on the proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. [Methods] Hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells were treated with different concentrations of red raspberry extract for 72h, the cell proliferation was detected by CCK8 and colony formation assay. The cell cycle of SMMC-7721 cells were detected by flow cytometry; the expression of proteins related to cell cycle and AKT pathway was detected by Western blot. [Results] Red raspberry extract inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells. Compared with control group, the proportion of cells of G_0/G_1 phase in red raspberry extract-treatment groups was significantly decreased ($P<0.05$) and that of S phase increased ($P<0.05$). The expression of cyclinA and CDK2 as well as the expression of P-AKT (Ser473) in raspberry extract-treatment groups were decreased ($P<0.01$). [Conclusion] Red raspberry extract can inhibit the proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells, and the inhibitory effect is associated with S-phase arrest mediated by the AKT pathway.

Key words: red raspberry extract; hepatocellular neoplasms; cell cycle arrest

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma)是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,其病因迄今尚未完全

阐明。目前认为肝癌的发生是多因素、多步骤的过程,与肝炎病毒、黄曲霉毒素、饮水污染关系较密切,长期过量饮酒和遗传性肝病、肝硬化可能与肝癌的发生有关^[1-4]。近年来肝癌的诊治水平有了明显提高,并形成了以手术切除为主,化学药物治疗、各种介入

收稿日期:2018-05-09;修回日期:2018-06-24

基金项目:哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(2017RAXXJ057);

哈尔滨医科大学研究生创新科研项目(YJSCX2017-49HYD)

通信作者:刘 明, E-mail:mingliu35@hrbmu.edu.cn

治疗、免疫治疗、生物治疗和中医中药治疗为辅的综合治疗方案^[5]。针对肝癌的总体疗效虽有了明显改善,但大多数患者就诊时已属中晚期,失去了手术机会。

红树莓(red raspberry)含有大量的活性物质,如酚酸类、黄酮类、原花青素、鞣花酸、苯乙烯、木脂素、三萜和甾醇等^[6,7]。其中原花青素和鞣花酸对于肿瘤有一定的预防及治疗作用^[8,9]。目前,国内针对红树莓的研究大部分集中于有效成分的鉴定及生物活性物质的分离等方面^[10,11],而对其抗癌的具体机制研究相对较少。因此,本研究旨在探讨红树莓提取物抑制肝癌细胞增殖的具体机制,在饮食方面做到一级预防或者通过饮食抑制肝癌生长,为肝癌的预防和治疗提供新的思路,同时为红树莓医用药品的应用开发研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

CCK8 购于日本同仁实验室;胎牛血清购自 Science Cell 公司;DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司;兔抗人 AKT、P-AKT(Ser473)、cyclinA、CDK2 及 β -actin 购买于美国 CST 公司;细胞周期检测试剂盒购买于北京四正柏公司。

1.2 红树莓的来源及提取方法

新鲜红树莓的成熟果实来自黑龙江省尚志市农场。取红树莓果实 100g 放在预冷的烧杯内,在烧杯中加入 300ml 80% 预冷乙醇(1:3w/v)并用搅拌机搅拌 3min,然后使用乳化匀浆器继续匀浆搅拌 5min。将红树莓匀浆液转移至放置有 2 号 Whatman 过滤纸的连接着真空泵的过滤瓶中。收集的滤过物置于旋转蒸发器中,在 45℃ 条件下旋转蒸发 45min,收集的红树莓提取物置于 -80℃ 保存。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

肝癌细胞株 SMMC-7721 由哈尔滨医科大学肝脾外科教育部重点实验室提供。细胞常规培养于 DMEM 培养液中(含 10% 胎牛血清),于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养,用含 0.25% EDTA 的胰酶消化细胞并传代。

1.3.2 细胞增殖活性测定

取对数生长期细胞,PBS 清洗 2 次,用含 0.25%

EDTA 的胰酶消化 3min,血球计数板计数后,每孔 4.0×10^3 个细胞接种在 96 孔板,设置 5 个复孔,细胞贴壁 24h 后,分别加入浓度为 1、5、10、25、50、75、100、200mg/ml 的红树莓提取物,培养 72h 后,弃培养液,每孔加入 10 μ l CCK8 溶液及 90 μ l DMEM 培养液,孵育箱孵育 2h 后于酶标仪 450nm 波长测定 OD 值,并计算细胞存活率。

1.3.3 集落形成实验

取 200 个对数生长期的 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板中,2d 后加入浓度分别为 10、25、50mg/ml 的红树莓提取物,培养 14d 后,终止培养。PBS 清洗 2 次后,用 4% 多聚甲醛室温固定 20min,PBS 清洗 2 次,应用结晶紫染色,照相计数。

1.3.4 检测细胞周期的变化

取对数生长期的 SMMC-7721 细胞(1.5×10^4 个)接种于细胞培养瓶中,细胞贴壁后,换无血清、无双抗的 DMEM 培养液培养 24h,对照组换正常培养液,实验组换成浓度分别为 10、25、50mg/ml 的红树莓提取物,作用 72h 后收集细胞,预冷的 PBS 洗涤,经 300 目的滤网过滤后,用 70% 乙醇固定过夜,1000rpm 离心 10min 去除乙醇,再用预冷 PBS 洗涤 1 次,PI 染色,37℃ 避光孵育染色 30min 后,用流式细胞仪检测细胞周期时相的分布,实验重复 3 次。

1.3.5 Western blot 方法检测蛋白的表达

常规培养 SMMC-7721 细胞,按 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中,不同浓度的红树莓提取物(终浓度分别为 10、25、50mg/ml)处理肝癌 SMMC-7721 细胞 72h 后,收集各组细胞,加入细胞裂解液裂解细胞进行蛋白提取,上样量为 30 μ g,应用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1h,分别加入 1:1000 稀释倍数的 AKT、P-AKT(Ser473)、cyclinA、CDK2 及 β -actin 一抗于 4℃ 条件下孵育过夜;第二天 TBST 洗涤 3 次后,加入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔二抗,室温孵育 1h;用 TBST 洗膜后应用化学发光法检测目的条带,并进行条带灰度分析,实验重复 3 次。

1.4 统计学处理

实验数据采用 GraphPad Prism 6.01 统计分析软件进行单因素方差分析,所有数值以均数 $\pm$ 标准差表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,各实验组均重复 3 次。

2 结 果

2.1 红树莓提取物对 SMMC-7721 细胞增殖活性及形态学的影响

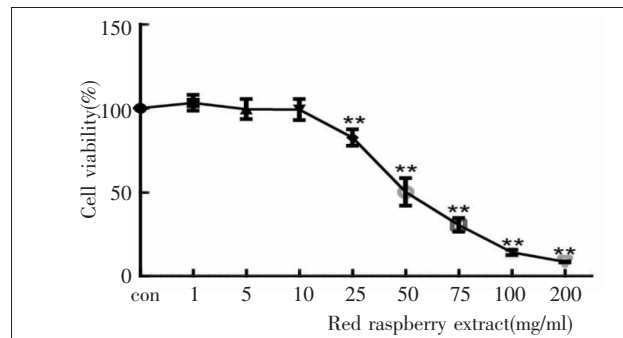
细胞过度增殖是恶性肿瘤的一个显著特征,因此,我们首先用 CCK8 方法检测不同浓度红树莓提取物对肝癌 SMMC-7721 细胞的影响。SMMC-7721 细胞经过不同浓度红树莓提取物作用 72h 后,从 25mg/ml 的浓度起,可剂量依赖性抑制 SMMC-7721 细胞的生长,IC₅₀ 为 49.45mg/ml。而 1、5、10mg/ml 低浓度的红树莓提取物对细胞增殖没有明显的抑制作用(Figure 1)。集落形成实验证实,10mg/ml 的低浓度红树莓提取物没有对集落的形成造成明显影响,在 25mg/ml 浓度红树莓提取物处理组中,集落数目减少,在 50mg/ml 浓度红树莓提取物处理组中,没有集落形成(Figure 2)。倒置显微镜下观察,对照组细胞生长旺盛,细胞大小基本均一;经红树莓提取物处理后的实验组随着提取物浓度增加,细胞数目明显减少,并且细胞出现不规则形态,部分细胞呈漂浮状,细胞碎片随浓度的增大而增多(Figure 3)。

2.2 红树莓提取物对 SMMC-7721 细胞周期的影响

与对照组相比,随着红树莓提取物浓度的增高,G₀/G₁ 期细胞数比例降低,从对照组到 50mg/ml 处理组 G₀/G₁ 期细胞比例(%)分别为 58.97±2.43、53.29±2.79、52.28±2.68、42.28±2.97。S 期细胞数比例升高,且具有一定的浓度依赖性,从对照组到 50mg/ml 处理组 S 期细胞比例(%)分别为 35.83±2.43、38.9±2.83、40.06±1.35、49.04±2.67,差异具有统计学意义(Figure 4)。为了进一步研究红树莓提取物促进肝癌 SMMC-7721 细胞发生 S 期阻滞的具体机制,我们应用 Western blot 方法检测了 cyclinA 及 CDK2 的表达,发现随着红树莓提取物浓度的增高,cyclinA 及 CDK2 的表达逐渐降低(Figure 5)。

2.3 红树莓提取物对 AKT 信号通路活性的影响

AKT 信号通路能够通过调节 cyclinA 及 CDK2 的表达与活性,调节肿瘤细胞周期,而 AKT 信号通路的活性是由其磷酸化水平所决定的。因此,我们应用了 Western blot 方法检测了 AKT 及 P-AKT (Ser473)的蛋白表达水平。红树莓提取物可以使肝癌 SMMC-7721 细胞的 P-AKT (Ser473) 表达下降,而 AKT 表达水平没有发生明显变化(Figure 6)。



Note: compared with control group, **: $P < 0.01$.

Figure 1 The survival rate of SMMC-7721 cells treated with different concentrations of red raspberry extract for 72h

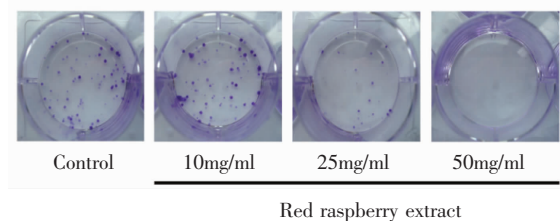


Figure 2 Colony formation assay

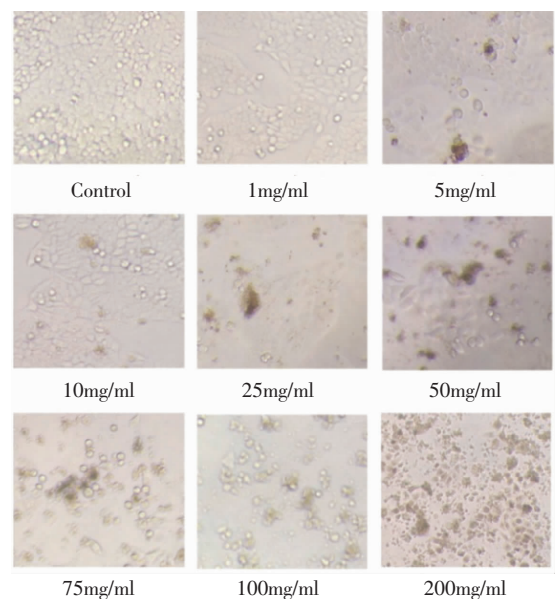


Figure 3 The morphology of SMMC-7721 cells treated with different concentrations of red raspberry extract

3 讨 论

红树莓在医用研究中有较多的用途,对肿瘤、糖尿病、心脑血管性疾病等具有一定的疗效。我国是红

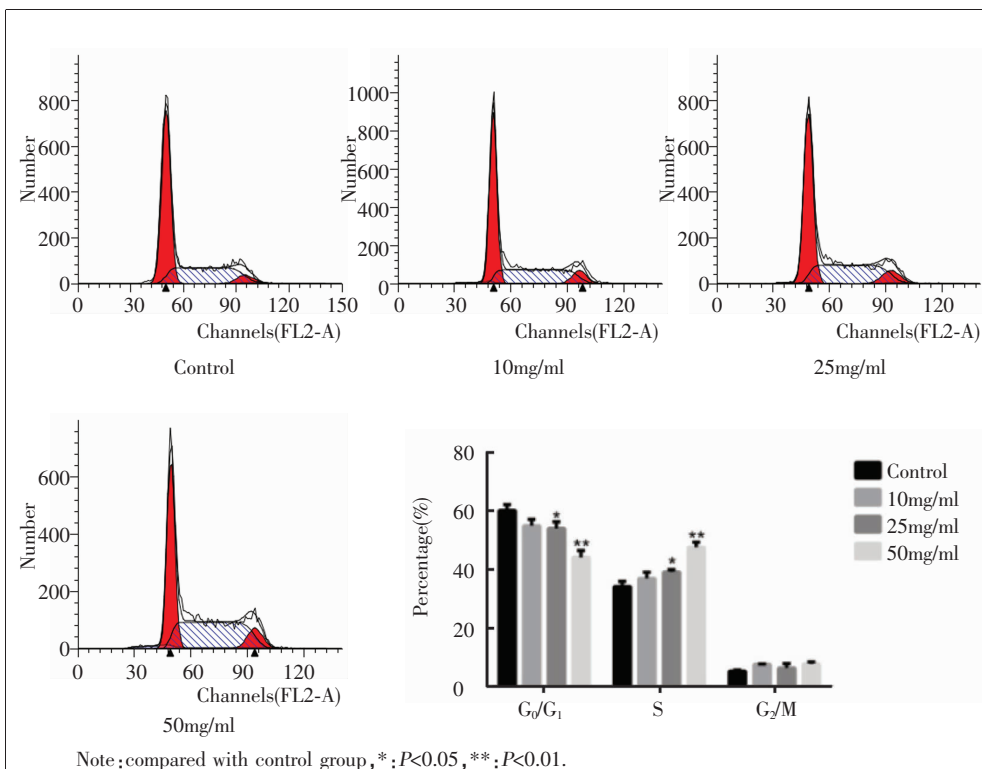


Figure 4 The effect of red raspberry extract on cell cycle of SMMC-7721 cells

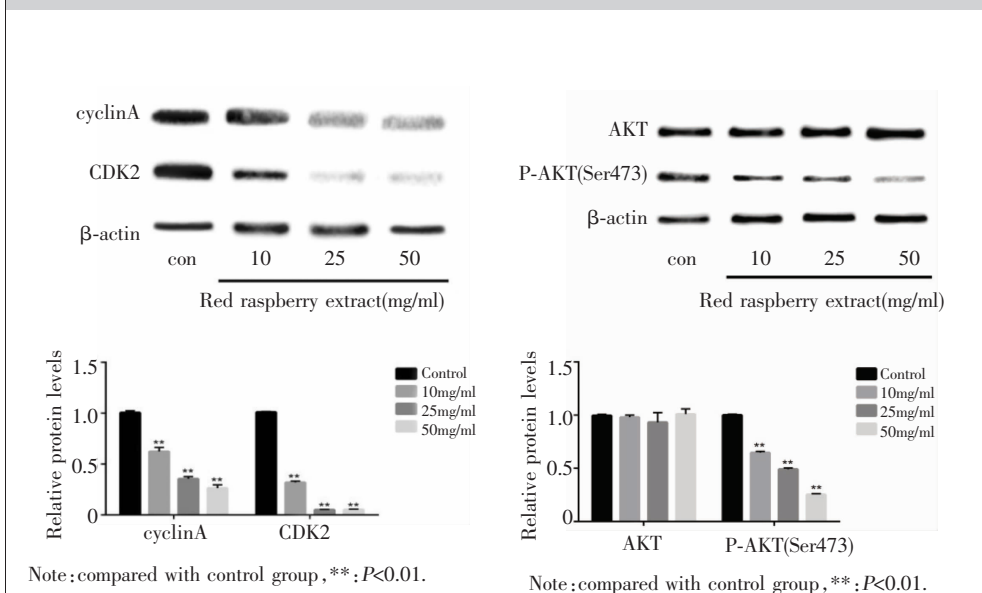


Figure 5 The effect of red raspberry extract on cell cycle relative protein of SMMC-7721 cells

Figure 6 The effect of red raspberry extract on AKT pathway of SMMC-7721 cells

树莓的多产国之一,且黑龙江地区拥有丰富的红树莓资源,但对红树莓的应用研究却不够系统和深入,因此应该更多地注重这方面的研究,尤其是医用药品的应用开发。

红树莓果汁或者提取物在体内、外抑制肿瘤生长已经得到证实^[12,13]。张善玉等^[14]给小鼠接种 S180 肉瘤细胞后,分别以不同剂量的红树莓成熟果实果汁和未成熟果实水提液灌胃,10 天后观察瘤重、体质量、脾脏和胸腺的变化。结果显示不同剂量红树莓成熟果实果汁及未成熟果实水提液对小鼠 S180 肉瘤均有抑制作用。并且各剂量组小鼠的胸腺和脾脏指数改变不明显。2010 年我们课题组的研究发现^[15],应用丙酮提取红树莓后,以低、中、高浓度 (0.75、1.50、3.00g/kg) 对二乙基亚硝胺 (DEN) 诱导的肝损伤大鼠灌胃 20 周,结果发现红树莓提取物可以呈剂量依赖性抑制 DEN 诱导的大鼠肝结节状再生性增生,阳性对照组、低剂量组、中剂量组及高剂量组对应的发生率分别为 45.0%、40.0%、25.0% 和 5.0% ($P < 0.05$);并且研究发现随着红树莓提取物剂量的增加,发生肝癌的比率呈下降的趋势。实验结果提示,红树莓提取物不但可以缓解二乙基亚硝胺 (DEN) 诱导的肝损伤,也可以降低肝癌的发生率。本次我们的实验结果表明,红树莓提取物在体外对肝癌 SMMC-7721 细胞的

增殖具有明显的抑制作用,并且随着提取物浓度的增加,抑制作用愈明显。

研究表明,红树莓中的多酚类化合物可以通过影响细胞信号通路,阻止或者延缓慢性炎症的相关疾病,如糖尿病、心血管疾病和癌症^[16]。近年来,关于红树莓抗癌的研究更倾向于化学成分抗癌的具体分子机制,包括信号通路、氧化应激、细胞周期阻滞、凋亡及血管生成等研究^[17-19]。Lee等^[20]研究结果表明红树莓成分 sanguin H-6(SH-6)能够抑制卵巢癌细胞 A2780 增殖。SH-6 诱导卵巢癌细胞出现明显凋亡的形态学变化,激活了 Caspases 及 MAPKs,同时分解了 PARP,而对细胞周期没有产生影响。实验结果提示,红树莓提取物 SH-6 能够通过 P38、MARK 及 caspase-8 依赖的 BID 分解途径来诱导卵巢癌细胞 A2780 凋亡。我们课题组前期工作中也探究红树莓抗癌的具体机制,以 0.75、1.50、3.00g/kg 三种浓度的红树莓提取物对 DEN 诱导的肝损伤大鼠灌胃 20 周,实验发现在肝损伤的组织中红树莓能够抑制细胞增殖和血管内生因子 VEGF 的表达,并且诱导凋亡。实验结果表明,在 DEN 诱导肝损伤的大鼠中,红树莓能够抑制细胞增殖、血管形成,并诱导凋亡^[21]。我们本次的实验结果表明,红树莓提取物能够降低 cyclinA 及 CDK2 的表达水平,促进肝癌 SMMC-7721 细胞发生 S 期阻滞,从而抑制肝癌细胞增殖。

PI3K/AKT 通路在肿瘤中起着重要的作用,控制了多种与肿瘤相关的生物进程,活化的 AKT 具有多种生物学活性,能够调节肿瘤细胞增殖、细胞周期、凋亡、侵袭和转移、血管生成等^[22-25]。磷酸化的 AKT 能够抑制 CDK 的活性,从而抑制细胞周期的进程^[26,27]。有研究表明,雌激素可能通过调节 AKT 信号通路活性抑制肝癌细胞侵袭转移^[28]。大黄素通过调控 AKT 信号途径诱导肝癌 Huh7 细胞的凋亡^[29]。我们的实验结果也证实,红树莓提取物可以降低 P-AKT(Ser473)的表达水平。因此,红树莓提取物可能通过调控 AKT 信号通路来调节 cyclin-CDK 的活性,使得肝癌细胞发生 S 期阻滞,从而抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖。

综上所述,本研究结果表明红树莓提取物可能以 AKT 信号通路为靶点诱导肝癌 SMMC-7721 细胞发生周期阻滞。为红树莓提取物治疗肝癌提供了理论依据,并且为红树莓的开发及应用提供了新的理

论基础。

参考文献:

- [1] Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2015, 24(1):1-17.
- [2] Ashtari S, Pourhoseingholi MA, Sharifian A, et al. Hepatocellular carcinoma in Asia: prevention strategy and planning[J]. World J Hepatol, 2015, 7(12):1708-1717.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30.
- [4] Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2018, 67(1):358-380.
- [5] Ikeda M, Morizane, Ueno M, et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives [J]. Jpn J Clin Oncol, 2018, 48(2):103-114.
- [6] Ludwig IA, Mena P, Calani L, et al. New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 89(1):758-769.
- [7] Rao AV, Snyder DM. Raspberries and human health: a review[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(7):3871-3883.
- [8] Si X, Chen QQ, Bi JF, et al. Research progress in main functional compounds in raspberry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(4):376-381. [司旭, 陈芹芹, 毕金峰, 等. 树莓主要功能性成分研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(4):376-381.]
- [9] Zhang H, Guo ZJ, Xu WM, et al. Antitumor effect and mechanism of an ellagic acid derivative on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line [J]. Oncol Lett, 2014, 7(2):525-530.
- [10] Kuang H, Feng JW, Fan Q, et al. Composition analysis and in vitro anti-lipid peroxidation activity of red raspberry polyphenols[J]. Food Science, 2018, 39(3):83-89. [旷慧, 冯建文, 范倩, 等. 红树莓多酚的组分分析及体外抗脂质过氧化活性[J]. 食品科学, 2018, 39(3):83-89.]
- [11] Zhang CT, Wan GS, Zhao YQ, et al. Determination of the content of ellagic acid and raspberry ketone in red raspberry (Rubus corchorifolius) fruit[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(19):140-143. [张成涛, 万国盛, 赵余庆, 等. 红树莓果实中鞣花酸和树莓酮的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19):140-143.]
- [12] Durgo K, Belščak-cvitanović A, Stančić A, et al. The bioactive potential of red raspberry (Rubus idaeus L.) leaves in

- exhibiting cytotoxic and cytoprotective activity on human laryngeal carcinoma and colon adenocarcinoma [J]. *J Med Food*, 2012, 15(3): 258–268.
- [13] God J, Tate PL, Larcom LL. Red raspberries have antioxidant effects that play a minor role in the killing of stomach and colon cancer cells[J]. *Nutr Res*, 2010, 30(11): 777–782.
- [14] Zhang SY, Piao HS, Jiang YL, et al. The primary studies on the anti-tumor effect of *Rubus idaeus* L [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2007, 18(2): 380–381. [张善玉, 朴惠顺, 姜艳玲, 等. 红树莓抗肿瘤作用的初步研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(2): 380–381.]
- [15] Liu Y, Liu M, Li B, et al. Fresh raspberry phytochemical extract inhibits hepatic lesion in a wistar rat model [J]. *Nutr Metab*, 2010, 7: 84.
- [16] Noratto GD, Chew BP, Atienza LM. Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice[J]. *Food Chem*, 2017, 227: 305–314.
- [17] Sousa M, Machado V, Costa R, et al. Red raspberry phenols inhibit angiogenesis: a morphological and subcellular analysis upon human endothelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(7): 1604–1612.
- [18] Burton-freeman BM, Sandhu AK, Edirisinghe I. Red raspberries and their bioactive polyphenols: cardiometabolic and neuronal health links[J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(1): 44–65.
- [19] Noratto G, Chew BP, Ivanov I. Red raspberry decreases heart biomarkers of cardiac remodeling associated with oxidative and inflammatory stress in obese diabetic db/db mice[J]. *Food Funct*, 2016, 7(12): 4944–4955.
- [20] Lee D, Ko H, Kim YJ, et al. Inhibition of A2780 human ovarian carcinoma cell proliferation by a rubus component, Sanguin H-6[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(4): 801–805.
- [21] Chen HS, Liu M, Shi LJ, et al. Effects of raspberry phytochemical extract on cell proliferation, apoptosis, and serum proteomics in a rat model[J]. *J Food Sci*, 2011, 76(8): T192–T198.
- [22] Kresty LA, Weh KM, Zyzus-johns B, et al. Cranberry proanthocyanidins inhibit esophageal adenocarcinoma in vitro and in vivo through pleiotropic cell death induction and PI3K/AKT/mTOR inactivation [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 33438–33455.
- [23] Lu XX, Cao LY, Chen X, et al. PTEN inhibits cell proliferation, promotes cell apoptosis, and induces cell cycle arrest via downregulating the PI3K/AKT/ hTERT pathway in lung adenocarcinoma A549 cells[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 2476842.
- [24] Roseweir AK, Powell AG, Bennett L, et al. Relationship between tumour PTEN/Akt/COX-2 expression, inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 70601–70612.
- [25] Li T, Zhou QM, Zhang WH. Advances in research of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for treatment of triple negative breast cancer[J]. *China Cancer*, 2018, 27(1): 40–45. [李甜, 周钱梅, 张卫红. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在三阴性乳腺癌治疗中的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(1): 40–45.]
- [26] Cho TM, Kim WJ, Moon SK. AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64(1): 344–352.
- [27] Gottschalk AR, Basila D, Wong M, et al. p27Kip1 is required for PTEN-induced G1 growth arrest[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 2105–2111.
- [28] Tian CY, Zhang X, Zhao WX, et al. Oestrogen inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by regulating the activity of AKT signaling pathway[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2016, 36(12): 1621–1625. [田长印, 张欣, 赵文学, 等. 雌激素通过调节 AKT 信号通路活性抑制肝癌细胞的侵袭和转移[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(12): 1621–1625.]
- [29] Liu C, Luo YH, Jiang XY, et al. Effect of emodin on inhibiting proliferation and inducing apoptosis in human hepatoma Huh7 cells and its mechanisms [J]. *Drug Evaluation Research*, 2016, 39(3): 367–371. [刘畅, 罗英花, 蒋雪园, 等. 大黄素对人肝癌 Huh7 细胞的凋亡作用及机制研究[J]. *药物评价研究*, 2016, 39(3): 367–371.]