

myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65 (14): 1454-1471.

[5] 唐丹丽, 刘寨华, 张华敏. 心肌缺血再灌注损伤中医病机及临床辨治的现代研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(09): 1051-1052.

[6] Han J Y, Li Q, Ma Z Z, *et al*. Effects and mechanisms of compound Chinese medicine and major ingredients on microcirculatory dysfunction and organ injury induced by ischemia/reperfusion[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 177: 146-173.

[7] 闫素云, 谢 平, 于东明, 等. 参芍片对犬急性心肌缺血的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23 (20): 1847-1849.

[8] 赵志芳. 阿托伐他汀预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.

[9] Yuan Y, Cao W, Hong Y, Guo X, *et al*. Tiliacin pretreatment prevents myocardial ischemia-reperfusion injury via preservation of mitochondrial function in rat heart[J]. *Phytomedicine*, 2017, 34: 106-114.

[10] Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89.

[11] Yuan L, Dai X, Fu H, *et al*. Vaspin protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) through the TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 835: 132-139.

[12] Ji C, Song F, Huang G, *et al*. The protective effects of acupoint gel embedding on rats with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2018, 211: 51-62.

[13] Schenk R L, Strasser A, Dewson G. BCL-2: long and winding path from discovery to therapeutic target [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(3): 459-469.

[14] Wang D, Wang J, Liu Y, *et al*. Roles of Chinese herbal medicines in ischemic heart diseases (IHD) by regulating oxidative stress[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 220: 314-319.

白头翁皂苷 PSA 对 SW480 人结直肠癌细胞糖酵解途径关键蛋白及调节因子 HIF-1α 的影响

崔亚茹, 王慧玲, 陈兰英*, 官紫祎, 罗颖颖
(江西中医药大学国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 探讨白头翁皂苷 PSA 对人结直肠癌 SW480 细胞糖酵解的影响。**方法** MTT 法检测细胞存活率; 分光光度试剂盒检测葡萄糖消耗及糖酵解产物; 荧光定量 PCR 法检测己糖激酶 II (HKII)、丙酮酸激酶 M2 (PKM2) 和乳酸脱氢酶 A (LDHA) 以及葡萄糖转运体 1 (GLUT1)、单羧酸转运体 4 (MCT4) mRNA 表达; 流式细胞术检测凋亡; Western blot 法检测低氧诱导因子 (HIF-1α) 蛋白表达。**结果** 在无血清条件下, 白头翁皂苷 PSA (1~9 μg/mL) 能够显著抑制细胞的增殖 ($P<0.01$), 降低葡萄糖的消耗、乳酸和 ATP 的生成 ($P<0.05$, $P<0.01$), 下调 *HK-II*、*PKM2* 以及 *GLUT1* mRNA 的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 诱导凋亡 ($P<0.01$), 降低 HIF-1α 蛋白表达水平 ($P<0.05$)。**结论** 白头翁皂苷 PSA 能够有效干扰 SW480 细胞糖酵解途径, 其机制可能与抑制 HIF-1α 蛋白表达, 下调 *HK-II*、*PKM2* 及 *GLUT1* mRNA 有关。

关键词: 白头翁皂苷 PSA; SW480 细胞; 糖酵解

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)12-2887-06

doi: 10. 3969/j.issn.1001-1528. 2019. 12. 012

收稿日期: 2018-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460618, 81860720, 81660683); 江西省自然科学基金项目 (2016BAB215190)

作者简介: 崔亚茹 (1987—), 女, 硕士, 从事药理学研究。Tel: 13870820285, E-mail: yarucui@163.com

* 通信作者: 陈兰英 (1966—), 女, 博士, 教授, 从事中药药效评价及机制研究。Tel: (0791) 87119611, E-mail: clyxy2513@163.com

网络出版日期: 2019-04-17

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20190416.1150.002.html>

Effects of Pulsatilla Saponin A on key proteins and regulatory factor HIF-1α of glycolytic pathway in SW480 human colorectal cancer cells

CUI Ya-ru, WANG Hui-ling, CHEN Lan-ying*, GUAN Zi-yi, LUO Ying-ying
(Jiangxi University of TCM NPEC, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Pulsatilla Saponin A (PSA) on the glycolysis of human colorectal cancer cells SW480. **METHODS** The following procedures were performed: detection of cell viability by MTT assay, the glucose consumption and glycolysis products by spectrophotometric kit, and the mRNA expressions of hexokinase II (HKII), pyruvate kinase M2 (PKM2), lactate dehydrogenase A (LDHA), glucose transporter 1 (GLUT1) and monocarboxylate transporter 4 (MCT4) by fluorescence quantitative PCR. The determinations of apoptosis by flow cytometry and the expression of hypoxia inducible factor (HIF-1α) by Western blot were practiced as well. **RESULTS** Under serum-free conditions, PSA (1μg/mL to 9μg/mL) significantly inhibited cellular proliferation, decreased glucose consumption and the production of lactic acid and ATP ($P<0.05$, $P<0.01$), down-regulated the expression of HK-II, PKM2 and GLUT1 ($P<0.05$, $P<0.01$), induced apoptosis ($P<0.01$), and decreased HIF-1α expression ($P<0.05$). **CONCLUSION** PSA can effectively interfere with the glycolysis pathway of SW480 cells, induce apoptosis and decrease cell viability. The mechanism may contribute to PSA's efficacy in the inhibition of HIF-1α protein expression and the down-regulation of HK-II, PKM2 and GLUT1.

KEY WORDS: Pulsatilla Saponin A (PSA); SW480; glycolysis

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤，近年来其发病率和死亡率均呈上升趋势，应用抗肿瘤药物治疗结直肠癌仍是当前临床重要的治疗方式。随着肿瘤第七大特征-有氧糖酵解提出^[1]，肿瘤细胞即使在有氧条件下，仍会选择通过糖酵解快速提供能量来维持肿瘤细胞的快速增殖。近年来，越来越多的证据表明，肿瘤细胞的糖酵解途径与肿瘤的发生发展有着密切关系，因此，筛选出能够抑制肿瘤细胞糖酵解的药物将成为抗肿瘤药物研发的重要方向。

白头翁属毛茛科多年生草本植物，味苦性寒，归胃、大肠经，可清热、凉血止痢^[2]。目前已经从白头翁中分离提取出 100 多种化学成分，其中三萜皂苷类成分最多有 81 种，现代药理研究发现三萜皂苷类为白头翁主要的抗肿瘤活性物质之一。白头翁皂苷 PSA 是白头翁中提取的三萜皂苷类单体成分之一，目前研究发现其具有较好的抗黑色素瘤^[3]、结肠癌^[4]、胃癌^[5]、肺癌^[6]等抗癌疗效，其抗肿瘤作用机制与诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖有关。但是，白头翁皂苷 (Pulsatilla Saponin A, PSA) 对肿瘤细胞能量代谢，尤其是糖酵解路径影响的研究尚未见报道。本实验旨在探讨白头翁皂苷 PSA 是否会干扰肿瘤细胞糖酵解及其可能的作用机制，为

2888

白头翁皂苷 PSA 抗肿瘤应用提供理论参考。

1 材料

1.1 细胞 人结直肠癌 SW480 细胞株，由中国医学科学院提供。

1.2 试药 白头翁皂苷 PSA，含量≥98%，(江西本草天工科技有限责任公司，批号 20131204)；IMDM 培养液 (江苏凯基生物技术股份有限公司，批号 KGM12200-500)、DMSO 试剂 (北京索莱宝科技有限公司，批号 1213C0214)；MTT 试剂 (北京梦怡美生物技术有限公司，批号 20160716M201)；FITC AnnexinV 凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司，批号 7347717)；葡萄糖检测试剂盒 (上海荣盛生物药业有限公司，批号 20171205147)；乳酸、ATP 测试试剂盒 (南京建成生物工程研究所，批号分别为 20180118、20180119)；Trizol 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司，批号 20160325)；逆转录试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司，批号 1705324)；SYBR Green 定量 PCR 试剂 (美国 Applied Biosystems 公司，批号 1509487)；RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司，批号分别为

100117171213、060816161223、010317170103)；Anti-HIF-1 α 抗 体 （ 英 国 Abcam 公 司 ， 批 号 GR10332456）；山羊抗兔 IgG/HRP（康为世纪生物科技有限公司，批号 01334/40243）；荧光定量 PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3 仪器 冷冻离心机（美国 Eppendorf 公司），多功能酶标仪（美国 MD 公司），超声波细胞破碎仪（美国 SONIC& MATERIALS 公司），流式细胞仪（美国 Beckman Gallios 公司），7500 荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司），垂直电泳系统、凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞存活率 取对数生长期的 SW480 细胞，胰酶消化后用无血清 IMDM 培养基制成浓度为 2×10^5 /mL 的细胞悬液，于 96 孔板内每孔加入 100 μ L，培养 48 h 后，分别加入终浓度为 1、3、9 μ g/mL 的白头翁皂苷 PSA 进行药物干预，每个浓度设 3 个复孔，空白对照组加入等体积的无血清培养基，继续培养 24 h。每孔加入 20 μ L 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT，37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。弃上清，每孔加入 150 μ L DMSO，振荡充分溶解 10 min，于 490 nm 波长测定 OD 值，计算存活率，公式为存活率= $[1-(\text{空白组平均 OD 值}-\text{给药组平均 OD 值})/(\text{空白组平均 OD 值}-\text{调零组平均 OD 值})]\times 100\%$

2.2 分光光度试剂盒检测能量代谢葡萄糖、乳酸和 ATP 水平 取对数生长期 SW480 细胞，胰酶消化，用无血清 IMDM 培养基调整细胞浓度为 2×10^5 /mL，接种于 12 孔板，每孔 1 mL。培养 48 h 后，分别加入终浓度为 1、3、9 μ g/mL 的白头翁皂苷 PSA 进行药物干预，每个浓度设 3 个复孔，空白对照组加入等体积的无血清培养基，继续培养 24 h。收集细胞培养液上清，根据葡萄糖和乳酸检测试剂盒测定上清中葡萄糖和乳酸水平，另收集 SW480 细胞，置于热水浴（90~100 $^{\circ}$ C）中用破碎仪匀浆破碎细胞，然后将细胞悬液置于沸水浴中加热 10 min，备用于蛋白浓度和 ATP 水平的测定。为避免各实验组间细胞数的差异性，将试剂盒计算得出的葡萄糖、乳酸、ATP 含有量再除以各待测样本蛋白浓度，进行样品标准化，最终计算得出每毫克蛋白中葡萄糖、乳酸、ATP 相对含有量，其中，葡萄糖消耗量=培养液葡萄糖含有量-细胞培养液葡萄糖含有量。

2.3 荧光定量 PCR 检测能量代谢关键酶及转运蛋白 mRNA 表达 取对数生长期 SW480 细胞，无血

清 IMDM 培养基调整细胞浓度为 4×10^5 /mL，接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，48 h 后加入相应药物干预 24 h。用 Trizol 裂解细胞后提取细胞总 RNA，使用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA 后应用 SYBR Green 试剂进行荧光定量 PCR 检测，采用经典 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因表达差异数据分析。引物序列如下：GAPDH 正向 TTCCACCCATGGCAAATTCC，反向 ATCTCGCTCCTGGAAGATGG；GLUT1 正向 CATGGGCTTCTCGAACTGG，反向 CCACATACATGGGCACGAAG；HKII 正向 TGGATCTTGGAGGGACCAAC，反向 TCGGCAATGTGGTCAAACAG；PFK1 正向 ATGACCCATGAAGAGCACCA，反向 GCACCGGTGAAGATACCAAC；PKM2 正向 GATTTCACACCCATCACAGC，反向 AGAAGTTCAGACGAGCACA；LDHA 正向 CGTCAGCATAGCTGTTCAC，反向 GCAATGAGATCCGGAATCGG；MCT4 正向 GGGCCTAACAGGAACAGACT，反向 TCTGGCTACCAGGTGAAAGG。

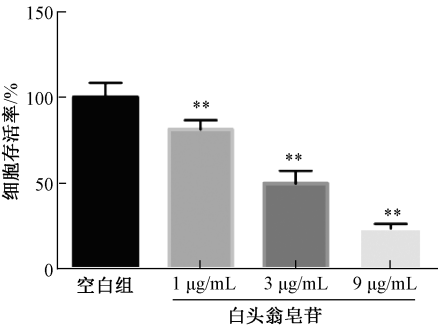
2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期的 SW480 细胞，胰酶消化，用无血清 IMDM 培养基调整细胞浓度为 2×10^5 /mL，接种于 12 孔板，每孔 1 mL。培养 48 h 后，分别加入不同浓度白头翁皂苷 PSA 进行药物干预，每个浓度设 3 个复孔，空白对照组加入等体积的无血清培养基，继续培养 24 h。收集细胞，PBS 冲洗两遍后按 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行染色，立即于 Gallios 流式细胞仪上测定细胞凋亡率。

2.5 蛋白免疫印迹法（Western blot）检测能量代谢调控蛋白 HIF-1 α 的表达 取对数生长期 SW480 细胞，无血清 IMDM 培养基调整细胞浓度为 4×10^5 /mL，接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，培养 48 h 后加入相应不同浓度白头翁皂苷 PSA 干预 24 h。PBS 清洗细胞后用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，BCA 法测定样品蛋白浓度；煮沸变性后，每个样品取 20 μ g 总蛋白上样，经 10% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜；用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h，用 TBST 稀释的一抗于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。TBST 充分洗膜 3 次，15 min/次。然后，于室温孵育二抗 1 h，TBST 充分洗膜 3 次，15 min/次，HRP 显色后使用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照并测定条带灰度值。

2.6 数据统计 实验数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，应用 SPSS 20.0 数据分析软件进行分析，组间差异独立样本 *t* 检验分析，多组间差异采用单因素方差分析，*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

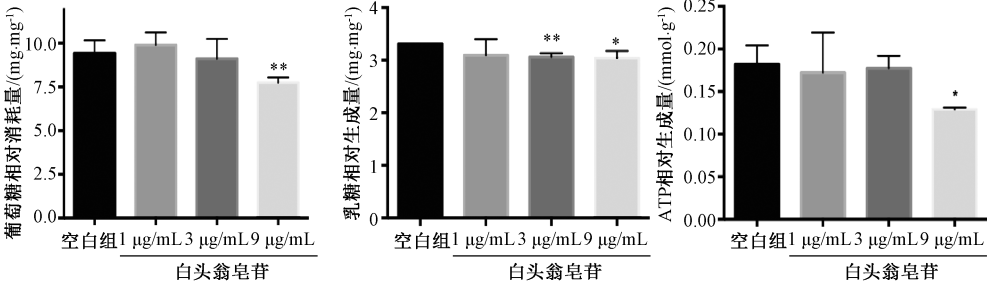
3 结果

3.1 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞增殖的抑制作用 用不同浓度的白头翁皂苷 PSA 在无血清条件下 SW480 细胞进行干预 24 h 后, MTT 法测定结果显示, 低剂量 1 $\mu\text{g/mL}$ 时即可显著降低细胞存活率 ($P<0.01$), 中剂量 3 $\mu\text{g/mL}$ 和高剂量 9 $\mu\text{g/mL}$ 对 SW480 细胞的抑制作用呈剂量依赖关系逐渐增强 ($P<0.01$), 细胞存活率分别为 50% 和 24%。由此表明, 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞具有一定的增殖抑制作用。见图 1。



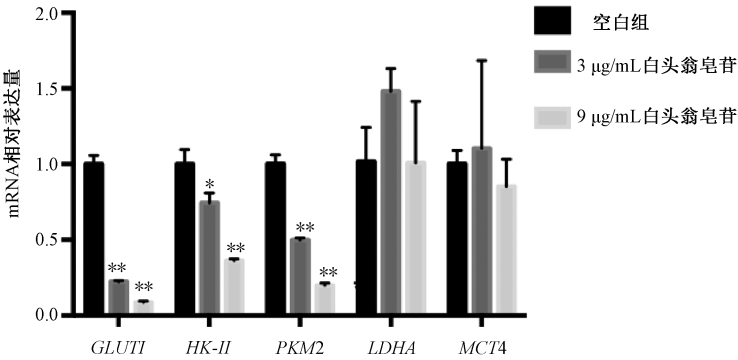
注: 与空白组比较, ** $P<0.01$

图 1 白头翁皂苷对 SW480 肿瘤细胞存活率的影响 ($n=3$)
Fig. 1 PSA on survival rate of SW480 tumor cells ($n=3$)



注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞葡萄糖消耗量与代谢产物量的影响 ($n=3$)
Fig. 2 PSA on glucose consumption and metabolites (Lactic acid + ATP) production in SW480 tumor cells ($n=3$)



注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

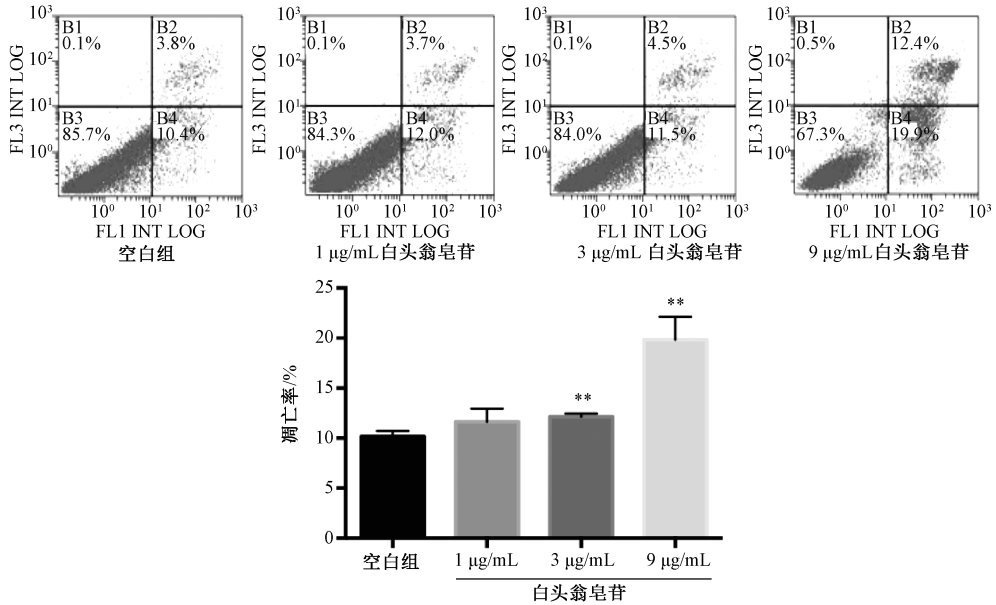
图 3 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞糖酵解关键酶及转运蛋白表达的影响 ($n=3$)
Fig. 3 PSA on expression of glycolysis related key proteins and transporters in SW480 tumor cells ($n=3$)

3.2 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞葡萄糖消耗量与代谢产物量的影响 在无血清条件下, 白头翁皂苷 PSA 在 9 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时对 SW480 细胞葡萄糖的消耗量有显著影响, 与空白组比较显著降低 ($P<0.01$)。乳酸作为糖酵解的主要代谢产物, 在白头翁皂苷 PSA 3 $\mu\text{g/mL}$ 剂量和 9 $\mu\text{g/mL}$ 剂量时, 细胞培养液上清中含有量均较空白组显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。此外, ATP 作为能量储存和利用中心, 与空白组相比, 白头翁皂苷 PSA 9 $\mu\text{g/mL}$ 剂量显著抑制了 SW480 细胞内 ATP 的生成。由此说明, 在无血清条件下, 白头翁皂苷 PSA 能够显著抑制 SW480 细胞葡萄糖的摄取, 明显减少乳酸和 ATP 的生成, 干扰了肿瘤细胞糖酵解途径的正常进行。见图 2。

3.3 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞能量代谢关键酶及转运蛋白 mRNA 表达影响 白头翁皂苷 PSA 显著降低了糖酵解关键酶 *HK-II*、*PKM2* 以及转运蛋白 *GLUT1* mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 对 *LDHA* 及 *MCT4* 表达无明显影响。说明白头翁皂苷 PSA 可能就是通过抑制这些关键蛋白干扰糖酵解的正常进行。见图 3。

3.4 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞凋亡的影响 随着白头翁皂苷 PSA 浓度的升高，SW480 细胞的凋亡率逐渐升高，与空白组相比，3、9 $\mu\text{g/mL}$

剂量组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$)。表明白头翁皂苷 PSA 在抑制了糖酵解途径，阻断了能量供给后，进一步诱导了肿瘤细胞的凋亡。见图 4。



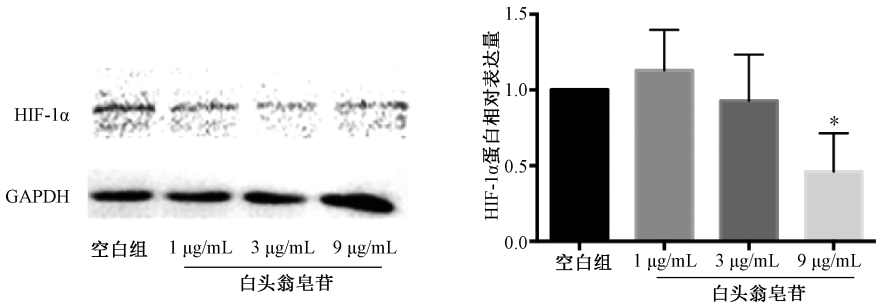
注：与空白组比较，** $P<0.01$

图 4 流式细胞仪检测白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞凋亡的影响 ($n=3$)

Fig. 4 Result for detection of PSA on apoptosis of SW480 tumor cells by flow cytometry ($n=3$)

3.5 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞糖酵解调控因子 HIF-1 α 的影响 与空白组比较，白头翁皂苷 PSA 干预后，糖酵解调控因子 HIF-1 α 蛋白表达显

著降低 ($P<0.05$)。说明，HIF-1 α 很有可能是其调控糖酵解途径的关键调节因子。见图 5。



注：与空白组比较，* $P<0.05$

图 5 白头翁皂苷 PSA 对 SW480 细胞 HIF-1 α 蛋白水平的影响 ($n=3$)

Fig. 5 PSA on HIF-1 α protein expression of SW480 tumor cells ($n=3$)

4 讨论

近年来，白头翁在治疗癌症方面的研究逐渐被报道^[7-9]，其单体成分三萜皂苷类在体内外均表现出显著的抗肿瘤作用，且作用机制多样。但是，目前对于白头翁皂苷 PSA 抗肿瘤的作用机制研究仍不全面，现有的研究发现，白头翁皂苷 PSA 抗肿瘤作用有抑制人结肠癌细胞的增殖、诱导细胞凋亡^[10]，诱导急性白血病细胞分化^[11]等，然而对于是否能够调控肿瘤细胞能量代谢尚不清楚。因此，

本研究从糖酵解代谢角度出发，探讨了在无血清即营养物料缺乏的情况下白头翁皂苷 PSA 可能的抗肿瘤作用机制。

无论是糖酵解还是氧化磷酸化，最终的目的都是为肿瘤细胞增殖、转移等活动提供能量 (ATP)。在糖酵解代谢中，HK、PK 是途径正常进行的主要限速酶，其中 HK 是使葡萄糖生成 6 磷酸葡萄糖的糖酵解的第 1 个关键酶；PK 是使磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸的最后 1 个限速酶，GLUT 也是将葡

葡萄糖转运入肿瘤细胞的第一步关卡^[12]。此外, 关键酶 PK 以及 LDH 的抑制可以促进 PARP 的清除和 caspase-9 的表达进而诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。本研究发现, 白头翁皂苷 PSA 可显著抑制 SW480 人结直肠癌细胞的增殖, 降低肿瘤细胞葡萄糖摄取量, 降低能量代谢产物乳酸和 ATP 的产量, 下调 HK-II、PKM2 这两种关键酶以及转运蛋白 GLUT1 的表达水平, 促进了细胞凋亡。由此推断, 白头翁皂苷 PSA 主要是通过下调 HKII、PKM2 两种限速酶以及转运蛋白 GLUT1 的表达来干扰糖酵解途径的正常进行, 从而减少对肿瘤细胞的能量供应, 抑制细胞增殖, 诱导凋亡的发生。

转录因子对糖代谢基因的调控是肿瘤能量代谢的重要机制之一, 与肿瘤能量代谢密切相关的转录因子有 HIF-1 α 、c-Myc、p53 等。其中, HIF-1 α 作为转录因子可上调肿瘤细胞 GLUT、HK、PFK 1、PFK 2、LDH 等糖酵解限速酶的表达, 从而调控糖酵解代谢^[14]。本研究发现, 在营养物料缺乏的情况下, 白头翁皂苷 PSA 干预后, SW480 细胞 HIF-1 α 蛋白的表达水平明显下降。揭示了其可能通过下调转录因子 HIF-1 α 蛋白表达来抑制肿瘤细胞糖酵解的进行, 但是对于 HIF-1 α 是如何调控糖酵解关键酶的将有待于继续研究。基于以上研究, 本课题主要揭示了白头翁皂苷 PSA 可以通过抑制肿瘤细胞糖酵解从而发挥抗肿瘤效应的作用机制, 为其成为抗肿瘤药物的研发提供了新思路。

参考文献:

[1] Cheng J K, Lee P, Wang Z X, *et al.* Regulation of cell proliferation and cell cycle progression by SUMO specific protease I is mediated through cyclin D1 induction[J]. *AACR Meeting Abstracts*, 2006, 66(8): 755-756.

[2] 张素军, 郝华明, 王丽芳, 等. 白头翁野生品栽培品质量研究[J]. 中国保健营养, 2017, 27(13): 131.

[3] 张步鑫, 赵献敏, 成 琼, 等. α 常春藤皂苷对黑色素瘤 B16 细胞增殖和凋亡的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 81-85.

[4] 王国娟, 余文燕, 郭红飞, 等. α 常春藤皂苷抗结肠癌增殖作用研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 41-45.

[5] 刘包欣子, 王瑞平, 邹 玺, 等. 常春藤皂苷元对胃癌细胞 MGC-803 增殖、黏附、侵袭和迁移能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 212-215.

[6] 李欣欣, 杨中林, 杨小林, 等. 常春藤皂苷元抑制人乳腺癌 M CF-7 和肺癌 A549 裸鼠移植瘤生长研究[J]. 海峡药 学, 2016, 28(5): 16-18.

[7] 罗颖颖, 陈兰英, 崔亚茹, 等. 白头翁皂苷抑制人 HT-29 结肠癌细胞增殖及诱导凋亡作用研究[J]. 中药药理与临 床, 2013, 29(5): 52-56.

[8] 罗颖颖, 陈兰英, 简 晖, 等. 白头翁皂苷调节 Bel-7402 人肝癌异体移植瘤裸鼠能量代谢的研究[J]. 中草药, 2014, 45(7): 973-977.

[9] Liu M, Zhao X, Xiao L, *et al.* Cytotoxicity of the compounds isolated from *Pulsatilla chinensis* saponins and apoptosis induced by 23-hydroxybetulinic acid[J]. *Pharm Biol*, 2014, 53(1): 1-9.

[10] Xu, Cheng G, Lu Y, *et al.* An active molecule from *Pulsatilla chinensis*, Pulsatilla saponin A, induces apoptosis and inhibits tumor growth of human colon cancer cells without or with 5-FU [J]. *Onco Lett*, 2017, 13(5): 3799-3802.

[11] Wang T, Gong F, Zhang R, *et al.* Pulsatilla saponin A induces differentiation in acute myeloid leukemia *in vitro* [J]. *Hematology*, 2016, 21(3): 182-186.

[12] Rafael M S, S Rodríguez-Enríquez, E Saavedra, *et al.* The bioenergetics of cancer; is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? [J]. *Biofactors*, 2009, 35(2): 209-225.

[13] Song T, Gan W, Chen J, *et al.* Antibodies against Clonorchis sinensis LDH could cross-react with LDHB localizing on the plasma membrane of human hepatocarcinoma cell SMMC-7721 and induce apoptosis [J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(4): 1595-1603.

[14] Azoitei N, Becher A, Steinestel K, *et al.* PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 3.