

## 铁棒锤中 3-乙酰乌头碱和宋果灵抗肿瘤活性

孙建瑞, 邱智军, 王大红, 张 彬, 原江锋\*

(河南科技大学 食品与生物工程学院, 洛阳市微生物发酵工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

**摘要:** 从铁棒锤总生物碱中提取分离得到了 3-乙酰乌头碱和宋果灵, 采用四唑盐 (MTT) 比色法考察了药物的细胞毒性, 电子显微镜及激光共聚焦显微镜观察了细胞形态, 流式细胞术分析了细胞凋亡和细胞周期。抗肿瘤活性研究表明: 随着 3-乙酰乌头碱和宋果灵浓度的增加, 抗肿瘤效果逐步增强, 当质量浓度均为 64 mg/L 时, 对 HepG2 细胞的抑制率分别最高达到 93.56% 和 98.48%。药物作用于人肝癌细胞后, 能明显抑制 HepG2 细胞的生长, 并且使细胞发生早期凋亡和晚期凋亡的比率增大, 质量浓度为 100 mg/L 3-乙酰乌头碱使早期细胞凋亡率上升至 58.32%, 晚期凋亡率增至 13.81%; 质量浓度为 120 mg/L 宋果灵使早期细胞凋亡率上升至 41.02%, 晚期凋亡率增至 28.78%。随处理时间的延长 G1 期细胞逐渐增多, G2 期和 S 期细胞逐渐减少。

**关键词:** 铁棒锤; 3-乙酰乌头碱; 宋果灵; HepG2; 抗肿瘤活性; 中药现代化技术

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)07-1163-07

## Anti-tumor Activity of 3-Acetylaconitine and Songorine from *Aconitum szechenyianum* Gay.

SUN Jian-rui, QIU Zhi-jun, WANG Da-hong, ZHANG Bin, YUAN Jiang-feng\*

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang Engineering and Technology Research Center of Microbial Fermentation, Luoyang 471023, Henan, China)

**Abstract:** 3-Acetylaconitine and songorine were extracted and separated from the total alkaloids of *Aconitum szechenyianum* Gay., and cytotoxicity of drugs were studied by MTT method using human liver cancer cells (HepG2). Morphological changes of carcinoma cells were also investigated by using inverted microscope and laser scanning confocal microscope (LSCM). Cell apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry. The antitumor experiments showed that the antitumor effects were gradually enhanced with the increase of the concentration of 3-acetylaconitine and songorine, and the highest level was 93.56% and 98.48%, respectively, when mass concentration were all 64 mg/L. The growth of HepG2 cells was inhibited significantly after the drugs acted on HepG2, and the ratio of cell early apoptosis and late apoptosis increased. 3-Acetylaconitine increased early cell apoptosis rate to 58.32% and late apoptosis rate to 13.81%, when mass concentration was 100 mg/L, while songorine made early cell apoptosis rate and late apoptosis rate increased to 41.02% and 28.78%, when mass concentration was 120 mg/L. With the prolonging of treatment time, the G1 phase cells gradually increased, but G2 and S phase cells gradually decreased.

**Key words:** *Aconitum szechenyianum* Gay.; 3-acetylaconitine; songorine; HepG2; antitumor activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31401672 and U1404307); Science and Technology Project of Henan Province (162102110056); Key Science Research Project of Henan Higher Education Institutions (17B180003)

收稿日期: 2017-07-29; 定用日期: 2017-11-13; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170615

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31401672, U1404307); 河南省科技项目 (162102110056); 河南省高等学校重点科研项目 (17B180003)

作者简介: 孙建瑞 (1987—), 男, 讲师, 博士。联系人: 原江锋 (1977—), 女, 副教授, 电话: 18638477899, E-mail: jiangfengyuan@163.com。

恶性肿瘤是全球致死率最高的一类疾病，是人类健康的第二大“杀手”<sup>[1]</sup>。在中国，每年新增癌症患者 160~170 万，同时约有 100 万人死于癌症<sup>[2]</sup>，随着人口的增长和老龄化，这个数字还在逐年增加，因此恶性肿瘤的防治工作刻不容缓。如今抗肿瘤药物的研究工作已取得很大进展，但这些药物在治疗肿瘤的同时会产生不同程度的副作用，例如骨髓抑制、免疫功能低下和白细胞减少等<sup>[3]</sup>。而天然药物在减轻临床症状、提高生存质量、防止复发转移、延长生存期和增效减毒等方面都具有很好的效果，因此制备特异性强、毒性低的新型天然抗肿瘤药物已成为当今抗肿瘤药物研究的重要方向<sup>[4]</sup>，大量研究表明生物碱具有显著的抗肿瘤活性<sup>[5-7]</sup>。

药理研究表明乌头属植物具有抗肿瘤作用，用中药乌头提取精制的乌头注射液有抑制癌瘤生长和癌细胞自发转移的作用，临床用于治疗晚期胃癌等消化系统恶性肿瘤<sup>[8-9]</sup>。乌头注射液对肝癌也有一定疗效，临床用于晚期原发性肝癌能抑制肝癌细胞的有丝分裂，并且能缓解消化道症状、增加食欲、镇痛<sup>[10-11]</sup>。在民间，鞘柄乌头、白喉乌头等乌头属植物被用于肿瘤的治疗，疗效显著<sup>[12]</sup>。

铁棒锤为毛茛科乌头属植物铁棒锤 (*Aconitum Pendulum* Busch.) 和伏毛铁棒锤 (*Aconitum flavum* Hand-Mazz.) 的干燥块根，主要分布在西藏、四川西部、青海、甘肃、陕西及河南<sup>[13-14]</sup>，其主要有效成分为各类生物碱，具有抗炎、镇痛、镇静、解热、免疫抑制、抗肿瘤和扩张血管等作用，具有较高的药用价值<sup>[15-16]</sup>。目前，国内外对铁棒锤的研究主要集中在抗炎、镇痛方面，而对其抗肿瘤作用的研究较少。郝文婧<sup>[17]</sup>从铁棒锤中分离得到单体化合物尼奥灵、14-*O*-乙酰新乌宁碱、宋果灵、12-表-欧乌碱、12-表-脱氢欧乌碱，采用 MTT 法研究发现其对人胃癌 SGC-7901、肝癌 HepG2、肺癌 A549 细胞的生长有抑制作用。

前人只是采用 MTT 方法简单地研究了宋果灵的抗肿瘤活性，而且没有对 3-乙酰乌头碱的抗肿瘤活性进行研究。本文从铁棒锤总生物碱中分离得到 3-乙酰乌头碱和宋果灵，应用 MTT 法研究了药物的细胞毒性、从细胞形态学观察细胞形态和分析细胞凋亡、流式细胞术分析细胞凋亡和细胞周期等，从多方面对 3-乙酰乌头碱和宋果灵抑制人肝癌 HepG2 的生理活性进行研究，以期为铁棒锤中 3-乙酰乌头碱和宋果灵在抗肿瘤方面的开发和利用提供参考，为寻找抗肿瘤药物的先导化合物奠定基础。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与仪器

铁棒锤采自陕西太白山，由陕西师范大学生命

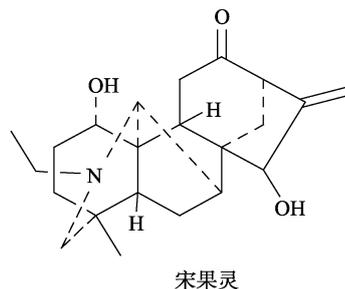
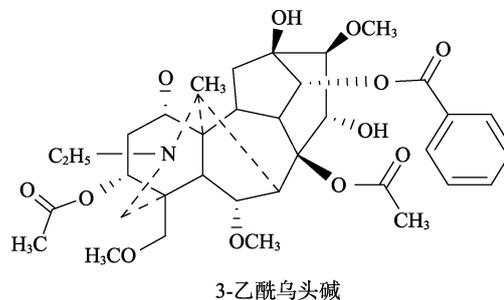
科学学院任毅教授鉴定为毛茛科铁棒锤的根茎；HepG2 (肝癌细胞株，来源于 ATCC)，武汉中国典藏物培养中心，采用含质量分数 10% 小牛血清 (CS) 的 RPMI 1640 培养基用贴壁细胞法培养，经质量分数 0.25% 胰酶消化可为实验使用或传代；胰酶，Difco；RPMI 1640 培养基、小牛血清，美国 Gibco 公司；DMSO、MTT，日本 Sigma 公司；PI、Annexin V-FITC 试剂盒，精美生物公司；台盼蓝，上海贝基生物科技有限公司。

超纯水仪，Millipore；TDL-5 台式离心机，上海安亭科学仪器厂；CO<sub>2</sub> 孵箱，德国 Heraeus 公司；37XB 倒置显微镜，上海豫光仪器有限公司；酶联免疫检测仪，美国 Bio-rad 公司；激光共聚焦扫描显微镜，德国 Leica 公司；流式细胞仪 (FACS)，美国 Becton-Dickinson 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 化合物的提取与分离

3-乙酰乌头碱和宋果灵的提取、分离方法按照文献<sup>[18-19]</sup>进行，其结构经 XRD、IR 和 <sup>13</sup>CNMR、DEPT 和 C-H COSY 分析鉴定为 3-乙酰乌头碱和宋果灵<sup>[18-19]</sup>，结构如下所示，经高效液相色谱检测纯度大于 95%。



#### 1.2.2 MTT 法观察 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞生长的毒性作用

参考文献<sup>[20]</sup>的方法，实验分为阴性对照组和给药组，给药组中 3-乙酰乌头碱和宋果灵的终质量浓度分别为 1、4、16、64 mg/L。

#### 1.2.3 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞形态的影响

参考文献<sup>[21]</sup>的方法，实验分为阴性对照组和给药组，铺板 36 h 后加药，给药组中 3-乙酰乌头碱

和宋果灵终质量浓度分别为 1、4、16 mg/L, 阴性对照组给等体积 PBS。

#### 1.2.4 流式细胞术观察 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞凋亡率的影响

参考文献[22]的方法, 实验分为阴性对照组、3-乙酰乌头碱组(终质量浓度分别为 0、25、50、100 mg/L)和宋果灵组(终质量浓度分别为 0、6、30、60、120 mg/L), 阴性对照组给等体积溶媒。

#### 1.2.5 流式细胞术观察 3-乙酰乌头碱对 HepG2 细胞周期的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞以  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  的密度接种于六孔板中, 于含体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  培养箱中培养。24 h 后给药, 阴性对照组加等体积溶媒(PBS), 给药组加不同浓度的 3-乙酰乌头碱, 使终质量浓度分别为 0、25、50、100 mg/L, 然后于体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  二氧化碳培养箱中培养 48 h。取不同浓度给药组细胞, 离心、收集细胞, PBS (pH=7.2) 洗涤 2 次, 加入  $4^\circ\text{C}$  预冷的体积分数 70% 冰乙醇(溶剂为 PBS), 制成单细胞悬液,  $4^\circ\text{C}$  过夜。24 h 后离心弃固定液, 用  $4^\circ\text{C}$  预冷的 PBS 漂洗 2 次, 调整悬液细胞浓度至  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。加入 1 g/L 的 RNase 80  $\mu\text{L}$ /管, 振荡混匀,  $37^\circ\text{C}$  水浴 30 min, 置冰上 2 min 终止 RNase 作用。加入 0.1 g/L 的 PI (碘化丙啶) 1 mL, 振荡混匀, 避光染色 30 min 以上。转入 FCM 测量管, 在流式细胞仪上检测细胞凋亡峰及细胞周期时相分布。

#### 1.2.6 激光共聚焦显微镜检测 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞的凋亡影响

参考文献[23]的方法, 培养 HepG2, 当细胞融合度达 80% 时, 加 3-乙酰乌头碱(质量浓度为 25、50、100 mg/L)和宋果灵(质量浓度为 6、30、60、120 mg/L)作用于 HepG2 细胞。激光共聚焦扫描显微镜下观察细胞形态, 测定采用双通道激发, PI 激发波长 488 nm, 发射波长 595 nm; Annexin V-FITC 激发波长 488 nm, 发射波长 650 nm<sup>[24]</sup>。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件包进行分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验,  $p < 0.05$  为统计学有显著差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞增殖的影响

3-乙酰乌头碱和宋果灵作用于 HepG2 后对 HepG2 细胞生长的影响见图 1 和图 2。

如图 1 和 2 所示, 3-乙酰乌头碱和宋果灵在 1~64 mg/L 质量浓度范围内对体外培养的 HepG2 细胞

增殖均有不同程度的抑制作用, 并且随着其干预浓度的增加及作用时间的延长, 具有明显的时间-效应和剂量-效应关系。当 3-乙酰乌头碱和宋果灵在相对已有报道较低的干预浓度情况下, 对 HepG2 细胞生长的抑制作用比较显著, 当其质量浓度达到 64 mg/L 时对 HepG2 细胞的抑制率分别为 93.56% 和 98.48%。因此, 3-乙酰乌头碱和宋果灵可能是抑制 HepG2 细胞生长的潜在药物, 并且作用效果明显, 说明 3-乙酰乌头碱和宋果灵是抑制 HepG2 细胞增殖的理想药物。

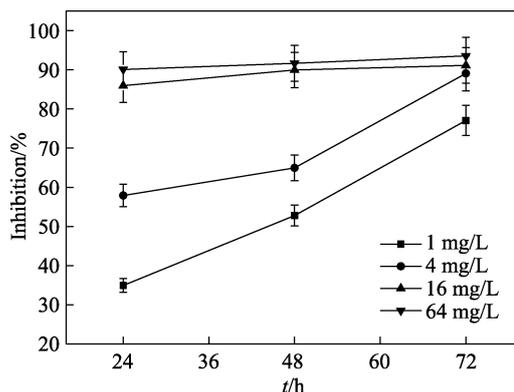


图 1 3-乙酰乌头碱质量浓度对 HepG2 细胞生长的影响  
Fig. 1 Effect of mass concentration of 3-acetylacetonine on the proliferation of HepG2

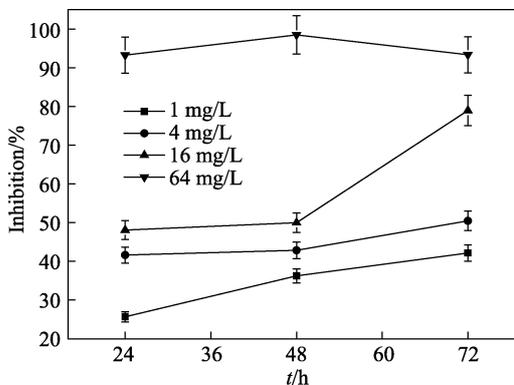


图 2 宋果灵质量浓度对 HepG2 细胞生长的影响  
Fig. 2 Effect of mass concentration of songorine on the proliferation of HepG2

### 2.2 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞形态的影响

3-乙酰乌头碱和宋果灵在质量浓度 0、1、4 和 16 mg/L 剂量下作用于 HepG2 细胞 48 h 后细胞形态的变化见图 3、4。

如图 3a 和 4a 所示, 正常情况下, HepG2 细胞生长良好, 呈卵圆形或多角型, 细胞贴壁好, 增殖旺盛, 球形及脱壁细胞极少见。如图 3b~d 所示, 经质量浓度 1、4 和 16 mg/L 的 3-乙酰乌头碱作用后, HepG2 细胞形态出现系列形态学改变: 折光性变弱, 轮廓增强, 胞质收缩, 细胞间隙增加, 突起变短,

呈椭圆形、球形，出现细胞聚集、脱壁。如图 4b~d 所示，质量浓度 1、4 和 16 mg/L 的宋果灵作用后，细胞数量明显减少，脱壁细胞多，可见较多细胞碎片，HepG2 细胞呈现长梭形，细胞变圆变小，贴壁能力下降。因此，3-乙酰乌头碱和宋果灵作用于 HepG2 细胞后影响细胞的形态和功能，在形态学上表现出死亡细胞和/或即将死亡的形态学特征，最终导致细胞的死亡。

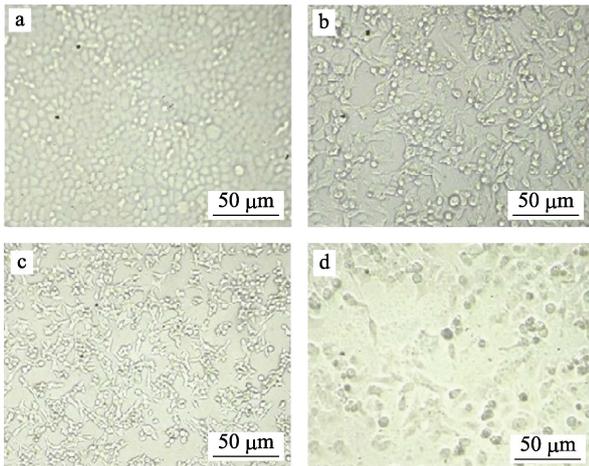


图 3 3-乙酰乌头碱质量浓度作用 HepG2 后细胞形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of HepG2 cells in the absence or presence of 3-acetylaconitine

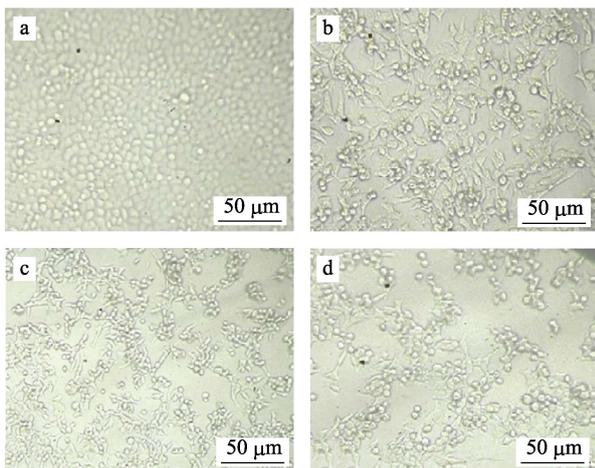


图 4 宋果灵质量浓度作用 HepG2 后细胞形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of HepG2 cells in the absence or presence of songorine

### 2.3 LSCM 观察 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞凋亡的影响

Annexin-V-FITC/PI 双染后激光共聚焦显微镜观察 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞凋亡的影响

见图 5 和 6。

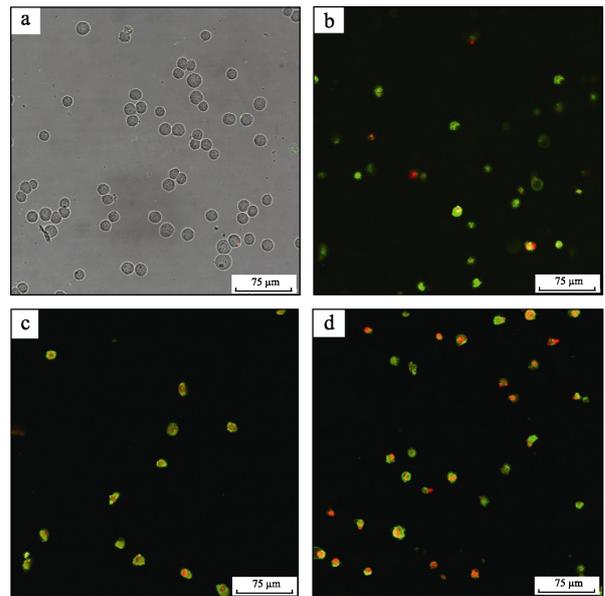


图 5 Annexin V/PI 染色激光共聚焦显微镜观察 3-乙酰乌头碱质量浓度对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of mass concentration of 3-acetylaconitine on HepG2 apoptosis under laser confocal microscopy stained by Annexin V/PI

如图 5b 所示，3-乙酰乌头碱在低质量浓度（25 mg/L）时可见大量细胞的膜呈绿色，随着干预浓度的增高，细胞核呈大小不等、形状不规则的碎片状或梅花状，处于凋亡晚期细胞逐渐增高。实验结果表明，质量浓度 100 mg/L 的 3-乙酰乌头碱具有明显促进 HepG2 细胞凋亡的作用（图 5d）。

由图 6 可见，质量浓度 6~120 mg/L 的宋果灵干预 HepG2 细胞，与对照组细胞相比，低剂量组细胞膜绿色荧光，细胞核体积变小，裂解为碎块，产生凋亡小体，说明以早期凋亡为主，出现典型的细胞凋亡形态；随着药物浓度的增加，核红色荧光较多，说明既有早期凋亡，又有晚期凋亡，凋亡特征表现越为显著。实验结果表明，质量浓度 120 mg/L 的宋果灵具有明显促进 HepG2 细胞凋亡的作用（图 6e）。

### 2.4 FCM 观察 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 染色后流式细胞仪观察 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞凋亡的影响见图 7 和图 8。

如图 7 和 8 散点图所示，对照组细胞主要分布在第 III 象限，机械性损伤细胞（第 II 象限）数量相对较少。3-乙酰乌头碱处理组（图 7），随着药物浓

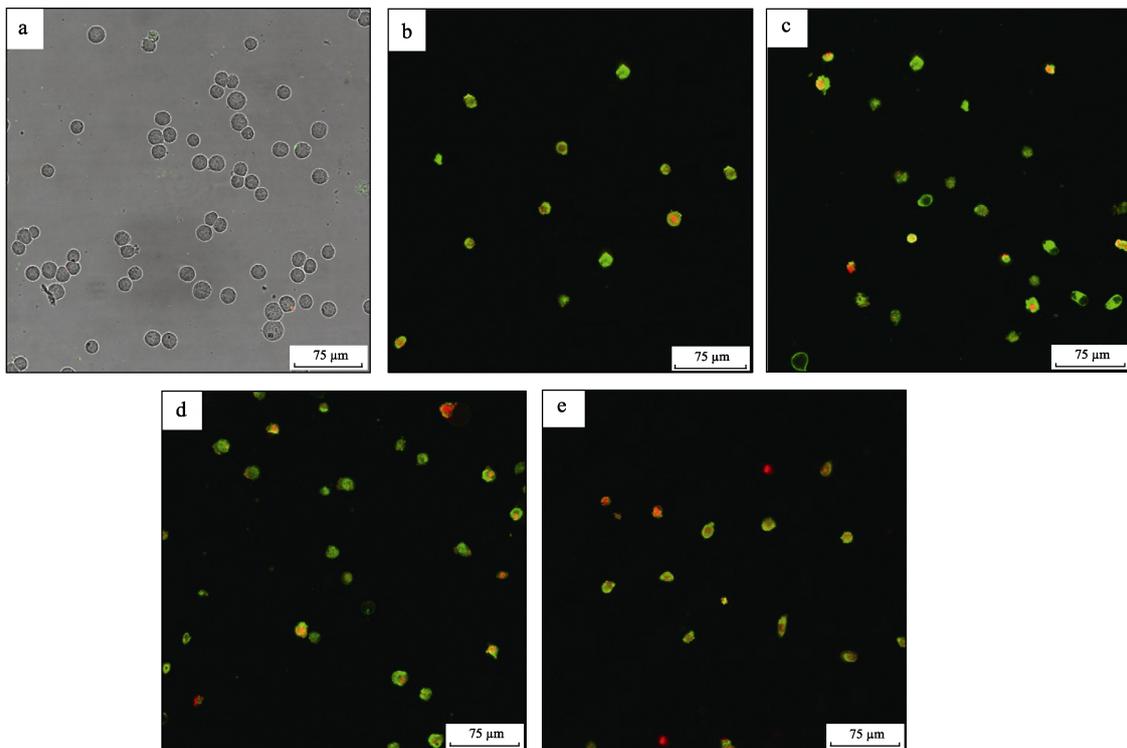
度的增加, 早期细胞凋亡率由 10.08% 上升至 58.32%, 晚期凋亡率由 4.96% 增至 13.81%; 当药物质量浓度为 50、100 mg/L 时与正常肿瘤细胞相比具有极显著差异 ( $p < 0.001$ )。宋果灵处理组, 随着药物浓度的增加, 早期细胞凋亡率由 10.61% 上升至 41.02%, 晚期凋亡率由 5.61% 增至 28.78% (图 8); 当药物质量浓度为 6、30 mg/L 时与正常肿瘤细胞

相比具有显著差异 ( $p < 0.05$ ), 当药物质量浓度为 60、120 mg/L 时与正常肿瘤细胞相比具有极显著差异 ( $p < 0.001$ )。

### 2.5 3-乙酰乌头碱对 HepG2 细胞周期的影响

3-乙酰乌头碱未处理组和处理组的 HepG2 肝癌细胞周期时相分布如图 9 所示。

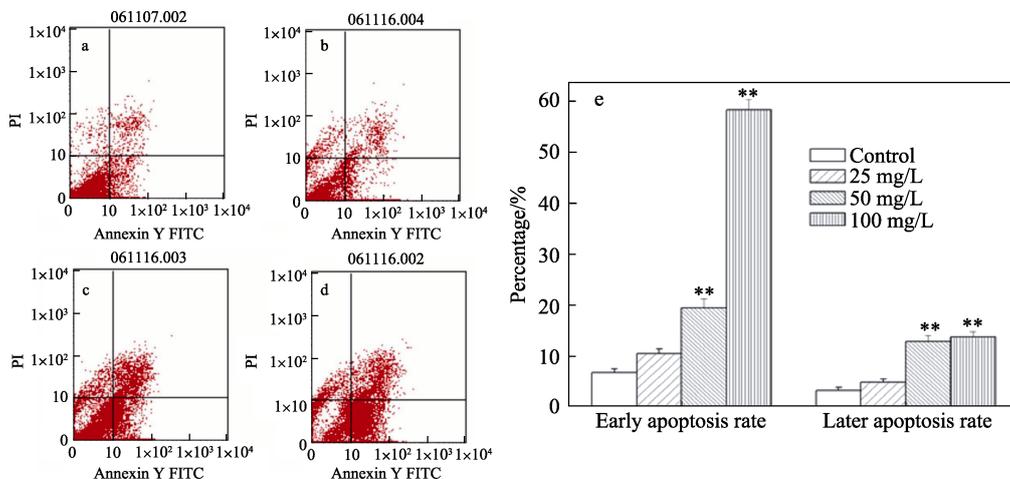
图 9 显示, 3-乙酰乌头碱未处理组的 G1 期细胞



a—阴性对照; b— $\rho$  (宋果灵) = 6 mg/L; c— $\rho$  (宋果灵) = 30 mg/L; d— $\rho$  (宋果灵) = 60 mg/L; e— $\rho$  (宋果灵) = 120 mg/L

图 6 Annexin V/PI 染色激光共聚焦显微镜观察宋果灵质量浓度对 HepG2 细胞凋亡的影响

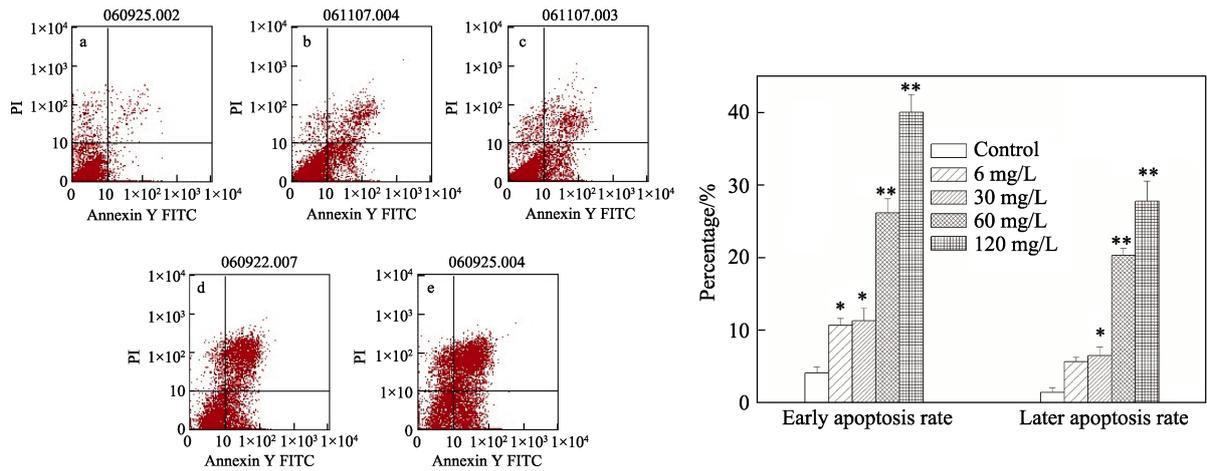
Fig. 6 Effect of mass concentration of songorine on HepG2 apoptosis under laser confocal microscopy stained by Annexin V/PI



a—阴性对照; b— $\rho$  (3-乙酰乌头碱) = 25 mg/L; c— $\rho$  (3-乙酰乌头碱) = 50 mg/L; d— $\rho$  (3-乙酰乌头碱) = 100 mg/L; e—柱状图注: 与对照组比较,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$

图 7 Annexin V/PI 染色流式细胞仪观察 3-乙酰乌头碱质量浓度对 HepG2 细胞凋亡的影响

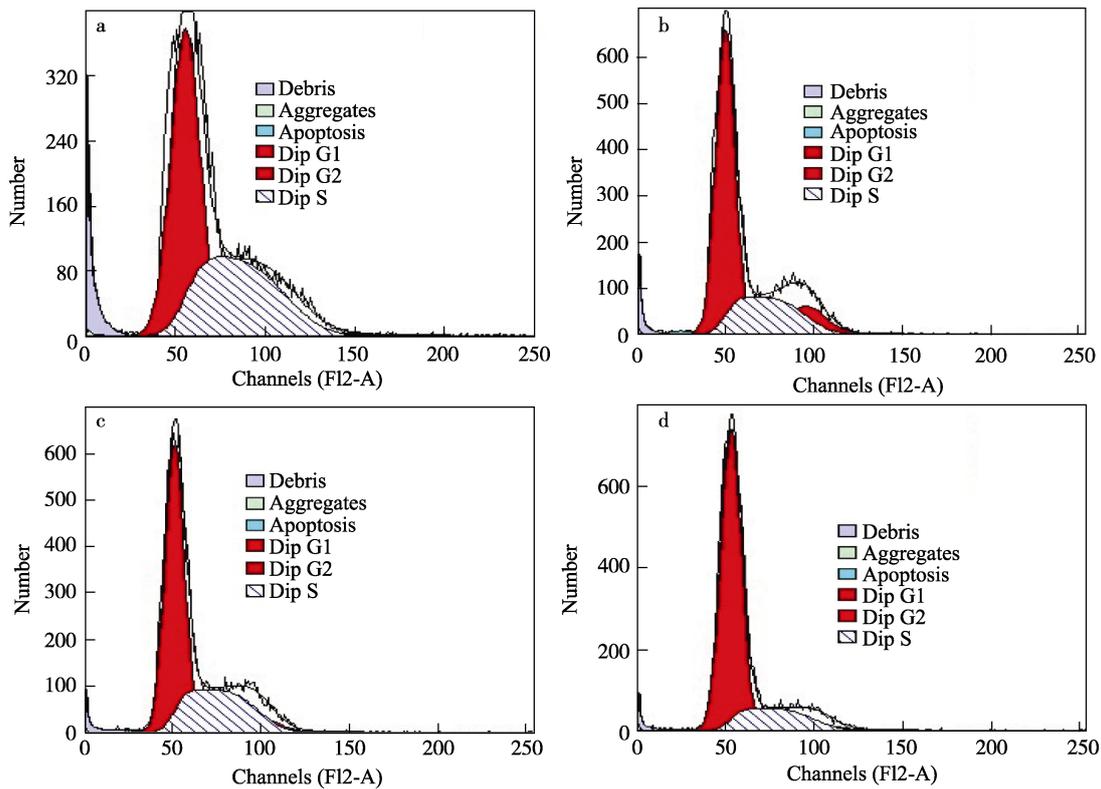
Fig. 7 Effect of mass concentration of 3-acetylacotinone on apoptosis in HepG2 cells assessed by Annexin V/PI staining under flow cytometry



a—阴性对照；b— $\rho$  (宋果灵) =6 mg/L；c— $\rho$  (宋果灵) =30 mg/L；d— $\rho$  (宋果灵) =60 mg/L；e— $\rho$  (宋果灵) =120 mg/L；f—柱状图注：与对照组比较，\* $p$ <0.05，\*\* $p$ <0.001

图 8 Annexin V/PI 染色流式细胞仪观察宋果灵质量浓度对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 8 Effect of mass concentration of songorine on apoptosis in HepG2 cells assessed by Annexin V/PI staining under flow cytometry



a— $\rho$  (3-乙酰乌头碱) =0 mg/L；b— $\rho$  (3-乙酰乌头碱) =25 mg/L；c— $\rho$  (3-乙酰乌头碱) =50 mg/L；d— $\rho$  (3-乙酰乌头碱) =100 mg/L

图 9 HepG2 细胞的 DNA 直方图  
Fig. 9 DNA histograms of HepG2 cells

为 56.6%，G2 期为 13.08%，S 期为 30.32%；质量浓度 25 mg/L 3-乙酰乌头碱处理组的 G1 期细胞为 63.19%，G2 期为 11.61%，S 期为 20.2%；质量浓度 50 mg/L 3-乙酰乌头碱处理组的 G1 期细胞为 68.02%，G2 期为 6.38%，S 期为 25.6%；质量浓度 100 mg/L 3-乙酰乌头碱处理组的 G1 期细胞为

78.17%，G2 期为 3.26%，S 期为 18.51%。

3-乙酰乌头碱处理 HepG2 细胞周期时相变化趋势如图 10 所示。

由图 10 可知，G1 期是一个细胞周期的第一阶段，随处理浓度的增加 G1 期细胞逐渐增多，G2 期和 S 期细胞逐渐减少。从分析的 DNA 结果说明 3-

乙酰乌头碱能阻滞 HepG2 细胞于细胞增殖周期的 G1 期, 而不能进入 S 期。G1 期是决定细胞增殖状态的关键阶段, 存在调节细胞增殖周期的检测点 (R 点), 它可以接受多种环境信号的调节, 控制着细胞增殖活动的进程, 是细胞增殖与否的转折点<sup>[25]</sup>。R 点可阻止受损伤的细胞进入 S 期, 从而导致细胞增殖的抑制, 可见 3-乙酰乌头碱以某种抑制机制抑制了 HepG2 细胞周期的进程, 从而使细胞周期阻滞, 抑制肿瘤细胞的增殖。

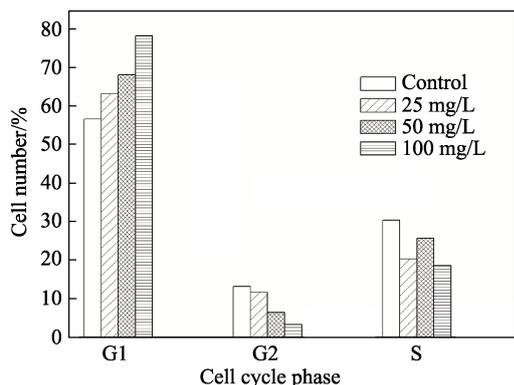


图 10 HepG2 在不同质量浓度的 3-乙酰乌头碱处理的细胞的周期时相分布

Fig. 10 Cell cycle phase of HepG2 cells treated by 3-acetylaconitine with different concentration

### 3 结论

本研究从铁棒锤中分离得到 3-乙酰乌头碱和宋果灵两个化合物, 用倒置显微镜和 LSCM 观察 3-乙酰乌头碱和宋果灵对 HepG2 细胞形态的影响, 用 MTT 法和流式细胞仪法对两种化合物的抗肝癌活性及促进癌细胞凋亡能力进行了考察。随着 3-乙酰乌头碱和宋果灵浓度的增加及作用时间的延长, 其抗肿瘤效果逐步增强, 最高分别达到 93.56% 和 98.48%, 具有明显的时间-效应和剂量-效应关系。3-乙酰乌头碱和宋果灵作用于人肝癌细胞后, 使细胞出现聚集、脱壁, 进而死亡, 细胞增殖能力减低, 使细胞发生早期凋亡和晚期凋亡的比率增大, 3-乙酰乌头碱使早期细胞凋亡率上升至 58.32%, 晚期凋亡率增至 13.81%; 宋果灵使早期细胞凋亡率上升至 41.02%, 晚期凋亡率增至 28.78%。随给药组处理时间的延长 G1 期细胞逐渐增多, G2 期和 S 期细胞逐渐减少, 可见 3-乙酰乌头碱以某种机制抑制了细胞的增殖活动。因此, 3-乙酰乌头碱和宋果灵是对抗肝癌的一个很好的候选治疗剂, 值得进一步探索其抗肿瘤机制, 并且为研发新型乌头属抗肿瘤药物的研究提供参考。

### 参考文献:

[1] Bauer K, Parise C, Caggiano V. Use of ER/PR/HER2 subtypes in

conjunction with the 2007 St Gallen Consensus Statement for early breastcancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 228-239.

[2] Liang Beibei (梁蓓蓓), Liu Huagang (刘华钢). Research progress of natural anti-tumor medicine[J]. China Cancer (中国肿瘤), 2007, 16(9): 705-708.

[3] Zhao Siwei (赵思伟), Yu Miao (于淼), Bai Yunjiao (柏云娇), et al. Study on anti-tumour activity of natural alkaloids[J]. J Harbin Univ Commer: Nat Sci Edit (哈尔滨商业大学学报: 自然科学版), 2012, 28(5): 516-519.

[4] Shao Yong (邵勇). Design, synthesis and SARs study of novel anti-tumor vinblastines[D]. Shanghai: Chinese Academy of Sciences Shanghai Institute of Materia Medica, 2007.

[5] Liu Weilu (刘玮璐), Xu Ruoting (徐若霆), Zhao Ming (赵明). Research progress in anti-tumor mechanism of natural medicine[J]. Med Recapitulate (医学综述), 2015, 10: 1778-1780.

[6] Ji Shuxian (季树仙). Research progress in anti-tumor active ingredient and mechanism of natural medicine [J]. Med Inf (医学信息), 2015, 43: 446.

[7] Zou Yuanmei (邹元梅). Research situation in anti-tumor mechanism of natural tumor suppressor [J]. J Cancer Control Treat (肿瘤预防与治疗), 2013, 26(1): 50-53.

[8] Yang Shu (杨姝), Jin Zhenhui (金振辉), Yang Xiao-dong (羊晓东), et al. Progress in studies on chemical constituents and pharmacological functions of *Aconitum L.* plants[J]. J Yunnan Agr Univ: Nat Sci Edit (云南农业大学学报(自然科学版)), 2007, 22(2): 293-295.

[9] Ai Chang (艾嫦), Zhu Yanyan (朱妍妍), Zhao Changqi (赵长琦), et al. Recent advances on chemical constituents, pharmacological study and the endophytes of the Genus *Aconitum*[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24(2): 248-259.

[10] Fu Wenwen (付雯雯), Xue Yan (薛岩), Liu Jun (刘军), et al. Analgesia of Wutou injection in mice [J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2015, 35(17): 4768-4770.

[11] Fu Wenwen (付雯雯), Jiang Yichuan (江一川), Zhang Hong (张虹), et al. Effects of Wutou injection on immune function in mice[J]. Ginseng Res (人参研究), 2015, 27(2): 25-27.

[12] Fu Ligu (傅立国). Higher plants of China: volume 3[M]. Qingdao: Qingdao Press, 2000: 112-115.

[13] Luo Dashang (罗达尚). Chinese herbal medicine[M]. Beijing: The ethnic publishing house, 1997: 215-218.

[14] Hu Junru (胡君茹), Jiang Hua (姜华). Progression on chemical constituent and pharmacological action about iron wooden club of Zang Drug[J]. Gansu J Traditi Chinese Med (甘肃中医), 2006, 19(11): 18-19.

[15] Yang Shiyong (杨世英), Ma Weilin (马伟林), Dong Kaizhong (董开忠). Progression on Iron wooden Club of Zang Drug [J]. J Northwest Univ Nationalities: Nat Sci Edit (西北民族大学学报: 自然科学版), 2014, 35(3): 46-50.

[16] Fu Xueyan (付雪艳), Kang Xiaolan (康小兰), Zhang Baitong (张百通), et al. Study on chemical components of aconitum flavum and their inflammatory and analgesic effects[J]. J Chinese Med Mater (中药材), 2013, 36(5): 747-751.

[17] Hao Wenjing (郝文婧). Study on the chemical constituents of the alkaloids from the root of *Aconitum flavum* Hand.-Mazz and its anti-tumor activities [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University(宁夏医科大学), 2014.

[18] Fan Z C, Zhang Z Q. Crystal and molecular structure of diterpenoid alkaloid 3-acetylaconitine[J]. J Chem Crystallogr, 2008, 38: 895-899.

[19] Fan Z C, Zhang Z Q. Molecular and crystal structure of 15-acetylsongorine and songoramine isolated from *Aconitum szechenyanum* Gay[J]. Struct Chem, 2008, 19: 413-419.

[20] Zhang Y, Hu Z, Ye M, et al. Effect of poly (ethyleneglycol)-block-poly lactide nanoparticles on hepatic cells of mouse: low cytotoxicity, but efflux of the nanoparticles by ATP-binding cassette transporters[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 66 (2): 268-280.

[21] Peng Liming (彭黎明), Wang Zengli (王曾礼). Basic and clinical cell apoptosis[M]. Beijing: People's medical publishing house, 2000: 511-514.

[22] Lai J C, Benimetskaya L, Santella R M, et al. G3139 (oblimersen) may inhibit prostate cancer cell growth in a partially bis-CpG-dependent non-antisense manner[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(10): 1031-1043.

[23] Liou J Y, Aleksic N, Chen S F, et al. Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance[J]. Exp Cell Res, 2005, 306(1): 75-84.

[24] Bernas T, Asem E K, Robinson J P. Confocal fluorescence imaging of photosensitized DNA denaturation in cell nuclei[J]. Photochem Photobiol, 2005, 81(4): 960-969.

[25] Nurse P. Along twentieth century of the cell cycle and beyond[J]. Cell, 2002, 100(1): 71-78.