

## 研究论文

## 毛钩藤碱通过线粒体途径诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡

黄器伟<sup>1</sup>, 翟娜娜<sup>1</sup>, 黄涛<sup>1,\*</sup>, 李道明<sup>2</sup><sup>1</sup>黄河科技学院, 郑州 450099; <sup>2</sup>郑州大学第一附属医院病理科, 郑州 450052

**摘要:** 本研究旨在观察毛钩藤碱对人乳腺癌细胞的抑制作用, 并探讨其分子机制。选取人正常乳腺上皮MCF-10A细胞、乳腺癌MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞作为研究对象, 采用CCK-8法检测细胞活性, 采用流式细胞术检测细胞凋亡和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP), 采用Western blot检测Bcl-2、Bax、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3以及胞浆中细胞色素C (cytochrome C, Cyt C)的蛋白水平。结果显示, 毛钩藤碱可显著降低MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞存活率, 且该作用呈时间和剂量依赖性( $P < 0.05$ ); 毛钩藤碱作用MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞48 h的 $IC_{50}$ 分别为447.79和179.06  $\mu\text{mol/L}$ ; 毛钩藤碱可诱导MDA-MB-231细胞发生凋亡和MMP去极化( $P < 0.05$ ), 促进线粒体释放Cyt C ( $P < 0.05$ ), 激活caspase 9和caspase 3 ( $P < 0.05$ ), 这些作用均可被线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)特异性阻断剂环孢素A (cyclosporin A, CsA)显著抑制( $P < 0.05$ ); 此外, 毛钩藤碱显著下调MDA-MB-231细胞Bcl-2蛋白水平并上调Bax蛋白水平( $P < 0.05$ )。以上结果提示, 毛钩藤碱可诱导MDA-MB-231细胞发生凋亡, 这可能与其调低Bcl-2/Bax蛋白比值, 从而引起MPTP持续开放和Cyt C释放, 最终导致caspase 9和caspase 3活化有关。

**关键词:** 毛钩藤碱; 乳腺癌; 凋亡; 环孢素A; 线粒体膜电位**中图分类号:** R737.9

## Hirsutine induces apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through mitochondrial pathway

HUANG Qi-Wei<sup>1</sup>, ZHAI Na-Na<sup>1</sup>, HUANG Tao<sup>1,\*</sup>, LI Dao-Ming<sup>2</sup><sup>1</sup>Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450099, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, Zhengzhou University First Affiliated Hospital, Zhengzhou 450052, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of hirsutine on apoptosis of breast cancer cells and its possible mechanism. The MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with hirsutine at different concentrations for 48 h or incubated with 160  $\mu\text{mol/L}$  hirsutine for 24, 48, and 72 h. The MCF-10A cell line is a non-tumorigenic epithelial cell line, and the MCF-7 and MDA-MB-231 are human breast adenocarcinoma cell lines. CCK-8 assay was employed to detect the cell viability. Flow cytometry was used to assay the apoptosis and mitochondrial membrane potential (MMP). The protein expressions of Bcl-2, Bax, cleaved-caspase 9, cleaved-caspase 3 and cytochrome C (Cyt C) in the MDA-MB-231 cells were detected by Western blotting. The results showed that hirsutine remarkably reduced the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells in a time- and dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ) with  $IC_{50}$  values of 447.79 and 179.06  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. In the MDA-MB-231 cells, hirsutine induced apoptosis and depolarization of MMP ( $P < 0.05$ ), released Cyt C from mitochondria ( $P < 0.05$ ), and activated caspase 9 and caspase 3 ( $P < 0.05$ ). However, these effects induced by hirsutine were all inhibited by cyclosporin A (CsA) ( $P < 0.05$ ), a specific inhibitor of mitochondrial permeability transition pore (MPTP). In addition, hirsutine down-regulated the protein level of Bcl-2 and up-regulated the protein level of Bax ( $P < 0.05$ ). These results suggest that hirsutine may induce apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through decreasing the ratio of Bcl-2 to Bax, opening MPTP, releasing Cyt C from mitochondria, and activating caspase 9 and caspase 3.

**Key words:** hirsutine; breast cancer; apoptosis; cyclosporin A; mitochondrial membrane potential

Received 2017-06-14 Accepted 2017-09-13

This work was supported by Science and Technology Development Project of the Science &amp; Technology Department, Henan Province, China (No. 162103210003).

\*Corresponding author. Tel: +86-371-68787667; E-mail: [hytzn@163.com](mailto:hytzn@163.com)

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。在欧盟和美国, 2017年女性乳腺癌预计死亡人数在所有女性癌症中分别位居第一位和第二位, 将分别达到92 600例和40 610例<sup>[1,2]</sup>。按照目前乳腺癌的发病趋势, 预计到2030年全世界每年乳腺癌的发病人数和死亡人数将分别达到264万和170万<sup>[3]</sup>。钩藤是茜草科植物, 为常用中药。吲哚类生物碱是钩藤植物中的主要化学成分, 包括钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱、毛钩藤碱和去氢毛钩藤碱等, 这些吲哚类生物碱具有广泛的药理学作用<sup>[4]</sup>。Lou等在对56种植物化学成分筛选后发现, 毛钩藤碱对小鼠乳腺癌4T1细胞核因子 $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)具有显著的抑制作用, 并在体内抑制小鼠乳腺癌4T1细胞向肺转移<sup>[5]</sup>。最近的一项研究显示, 这些吲哚类生物碱均能有效逆转MCF-7/ADR细胞对长春新碱、阿霉素和紫杉醇的耐药性<sup>[7]</sup>。目前, 毛钩藤碱对人乳腺癌细胞是否有抑制作用尚不明确。本研究选取乳腺癌MDA-MB-231细胞为研究对象, 用CCK-8法检测细胞活性, 采用流式细胞术检测细胞凋亡和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP), 并用Western blot检测细胞凋亡线粒体途径的相关蛋白表达水平, 以观察毛钩藤碱对人乳腺癌细胞的作用, 并揭示其可能机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人正常乳腺上皮细胞株MCF-10A购自中国科学院昆明细胞库; 人乳腺癌MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; DMEM/F12培养基、RPMI-1640培养基、马血清、胎牛血清、氢化可的松、表皮生长因子、胰岛素和霍乱毒素购自Hyclone公司; CCK-8试剂盒购自武汉博士德生物公司; 毛钩藤碱 (批号16122307、5 mg/支、纯度 $\geq$ 98%) 购自成都普菲德生物技术有限公司; 环孢素A (cyclosporin A, CsA) 购自Santa Cruz Biotechnology公司 (纯度 $\geq$ 99%); 罗丹明123购自Sigma公司; Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒、ECL化学发光试剂盒、RIPA裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 胞浆蛋白提取试剂盒购自Millipore公司; 兔抗人Bcl-2、Bax、细胞色素C (cytochrome C, Cyt C)、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3和 $\beta$ -actin抗体, 辣根过氧化物酶标记山

羊抗兔IgG均购自Cell Signaling Technology公司。

**1.2 细胞培养** 正常人乳腺上皮细胞MCF-10A采用含5%马血清、10  $\mu$ g/mL胰岛素、20 ng/mL表皮生长因子、500 ng/mL氢化可的松、100 ng/mL霍乱毒素的DMEM/F12培养基, 人乳腺癌MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞采用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下进行培养, 待细胞覆盖率达90%时进行传代。

**1.3 工作液配制** 将毛钩藤碱和CsA分别溶于DMSO制成储备液, 分装后于-20  $^{\circ}$ C储存。使用时用无血清培养基将储备液稀释成所需浓度的工作液, 其中DMSO终浓度为0.1%, 无药对照组使用含有0.1% DMSO的无血清培养基。

**1.4 CCK-8法检测细胞活性** 将细胞以每孔5 000个接种于96孔板, 于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养24 h。经不同浓度毛钩藤碱(10、20、40、80、160和320  $\mu$ mol/L)处理48 h或经160  $\mu$ mol/L毛钩藤碱处理24、48和72 h后, 每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液, 37  $^{\circ}$ C培养1 h, 用酶标仪检测各孔450 nm波长吸光度A值。每组设5个复孔, 同时设调零孔和对照孔。细胞存活率 = 加药孔A值 / 对照孔A值  $\times$  100%。

**1.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数生长期的MDA-MB-231细胞, 制成细胞密度为 $1 \times 10^6$  /mL的细胞悬液, 以每孔2 mL接种于6孔板, 置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。实验分成3组: 对照组(control组): 细胞在含0.1% DMSO的RPMI1640培养液中48 h; 毛钩藤碱处理组(hirsutine组): 经毛钩藤碱(180  $\mu$ mol/L)作用48 h; CsA+毛钩藤碱处理组(CsA+hirsutine组): 经CsA(5  $\mu$ mol/L)和毛钩藤碱(180  $\mu$ mol/L)共同作用48 h; 每组设3个复孔。收集各组细胞, 用预冷的PBS洗涤细胞1次, 用预冷的结合缓冲液重悬细胞, 加入Annexin V-FITC轻轻混匀后于室温避光孵育15 min。1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 重悬细胞于预冷的结合缓冲液中, 加入PI染色液轻轻混匀后于4  $^{\circ}$ C避光保存, 立即用流式细胞仪(美国BD公司)分析检测。

**1.6 流式细胞术检测MMP** 细胞分组同1.5节, 制备各组细胞悬液, 用PBS缓冲液漂洗两次, 将罗丹明123加入到细胞悬液(终浓度为5  $\mu$ g/mL), 37  $^{\circ}$ C孵育箱中放置30 min, 再用PBS缓冲液漂洗两次, 送流式细胞仪检测各组样本的荧光强度, 用平均荧光强度值(mean fluorescence intensity, MFI)

代表 MMP 水平。

**1.7 Western blot 检测蛋白水平** 细胞分组同 1.5 节, 裂解各组细胞分别提取细胞总蛋白和胞浆蛋白, 提取方法参照 RIPA 裂解液和胞浆蛋白提取试剂盒操作说明书进行。取 25  $\mu\text{g}$  蛋白样品, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜, 用封闭液 (5% BSA/TBST) 封闭 1 h, 加入一抗 (抗 Bcl-2、Bax、Cyt C、cleaved-caspase 9 和 cleaved-caspase 3 抗体均以 1:1 000 稀释, 抗  $\beta$ -actin 抗体以 1:2 000 稀释), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:2 000 稀释) 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 进行发光反应, 暗室 X 胶片显影, 拍照, 使用 ImageJ 1.45s 软件进行灰度分析, 用  $\beta$ -actin 蛋白条带作为内参。

**1.8 统计分析方法** 实验数据用 mean  $\pm$  SD 表示, 采用 SPSS 16.0 分析数据, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 Bonferroni 校正的  $t$  检验,  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 毛钩藤碱对细胞活力的影响

CCK-8 法检测结果显示, 与对照组相比, 160 和 320  $\mu\text{mol/L}$  毛钩藤碱作用 MCF-10A 细胞 48 h 后, 细胞活力明显降低 ( $P < 0.05$ ); 而 20 和 40  $\mu\text{mol/L}$  毛钩藤碱即可分别使 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞活力显著下降 ( $P < 0.05$ ), 且随着剂量加大, 细胞活力进一步明显下降 (图 1A); 毛钩藤碱作用 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 447.79 和 179.06  $\mu\text{mol/L}$ 。随着毛钩藤碱 (160  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用时间的增加, MCF-10A 细胞、MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞活力也逐渐下降 ( $P < 0.05$ ) (图 1B)。以上结果表明, 毛钩藤碱对人正常乳腺上皮细胞的毒性作用较弱, 而对乳腺癌 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞具有显著的毒性作用, 且作用呈剂量和时间依赖性 (图 1)。

### 2.2 毛钩藤碱对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示, 毛钩藤碱 (180  $\mu\text{mol/L}$ ) 可显著诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ), 但该效应可被线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 特异性阻断剂 CsA 显著抑制 ( $P < 0.05$ )。这表明毛钩藤碱可能通过开放 mPTP 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡 (图 2)。

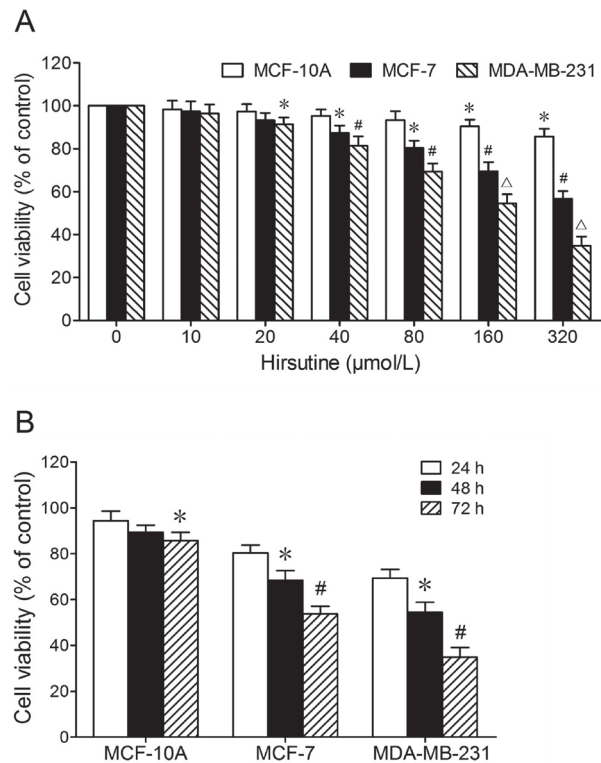


图 1. 毛钩藤碱对细胞活力的影响

Fig. 1. Effect of hirsutine on cell viability of breast cancer cells detected by MTT method. Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . A: The cells were treated with different concentrations of hirsutine for 48 h. \* $P < 0.05$  vs control (0  $\mu\text{mol/L}$ ) group; # $P < 0.05$  vs 20  $\mu\text{mol/L}$  group;  $\Delta P < 0.05$  vs 80  $\mu\text{mol/L}$  group. B: The cells were treated with 160  $\mu\text{mol/L}$  hirsutine for different time. \* $P < 0.05$  vs 24 h group; # $P < 0.05$  vs 48 h group.

### 2.3 毛钩藤碱对 MMP 的影响

流式细胞术检测结果显示, 与对照组相比, 毛钩藤碱处理组的 MFI 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 这表明毛钩藤碱可导致 MMP 下降, 即 MMP 去极化; 与毛钩藤碱处理组相比, CsA+毛钩藤碱处理组的 MFI 水平明显下降 ( $P < 0.05$ ), 这表明 CsA 抑制了毛钩藤碱诱导的 MMP 去极化, 发挥了稳定 MMP 的作用 (图 3)。

### 2.4 毛钩藤碱对胞浆中 Cyt C 蛋白水平的影响

Western blot 结果显示, 与对照组相比, 毛钩藤碱处理组 MDA-MB-231 细胞浆中的 Cyt C 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与毛钩藤碱处理组相比, CsA+毛钩藤碱处理组胞浆中的 Cyt C 蛋白水平明显下降 ( $P < 0.05$ )。这表明毛钩藤碱可促进线粒体中的 Cyt C 蛋白向胞浆释放, 但该作用可被 CsA 抑制 (图 4)。

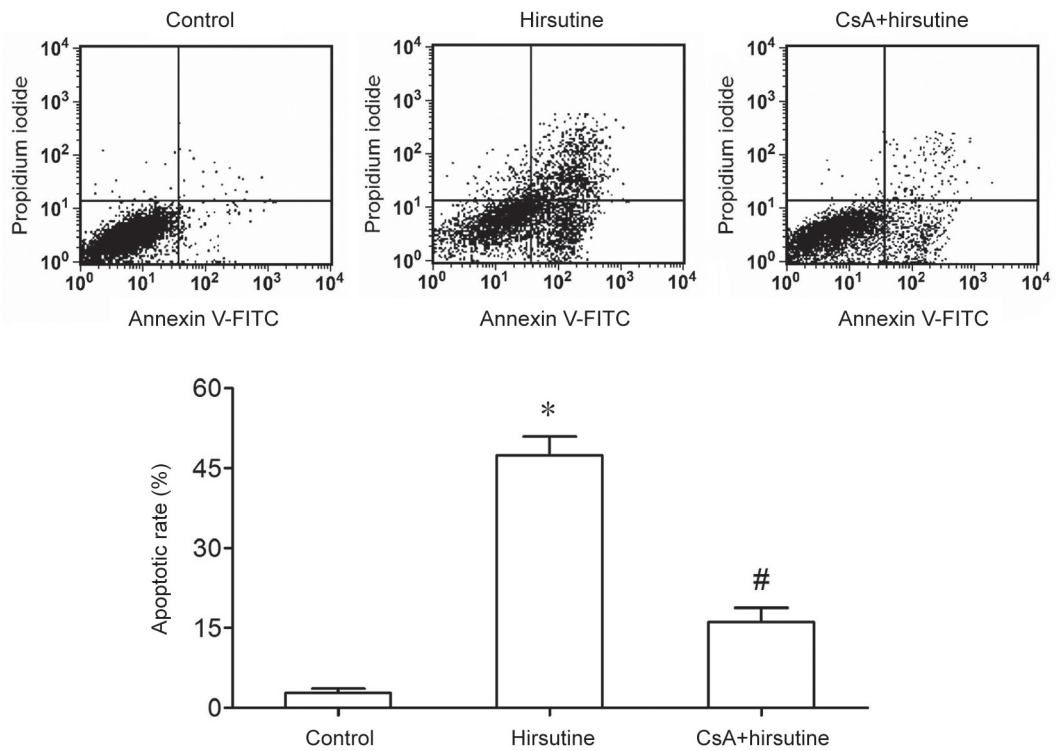


图 2. 毛钩藤碱诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡

Fig. 2. Hirsutine induced apoptosis of breast cancer MDA-MB-231 cells detected by Annexin V-FITC/PI double staining. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs hirsutine group.

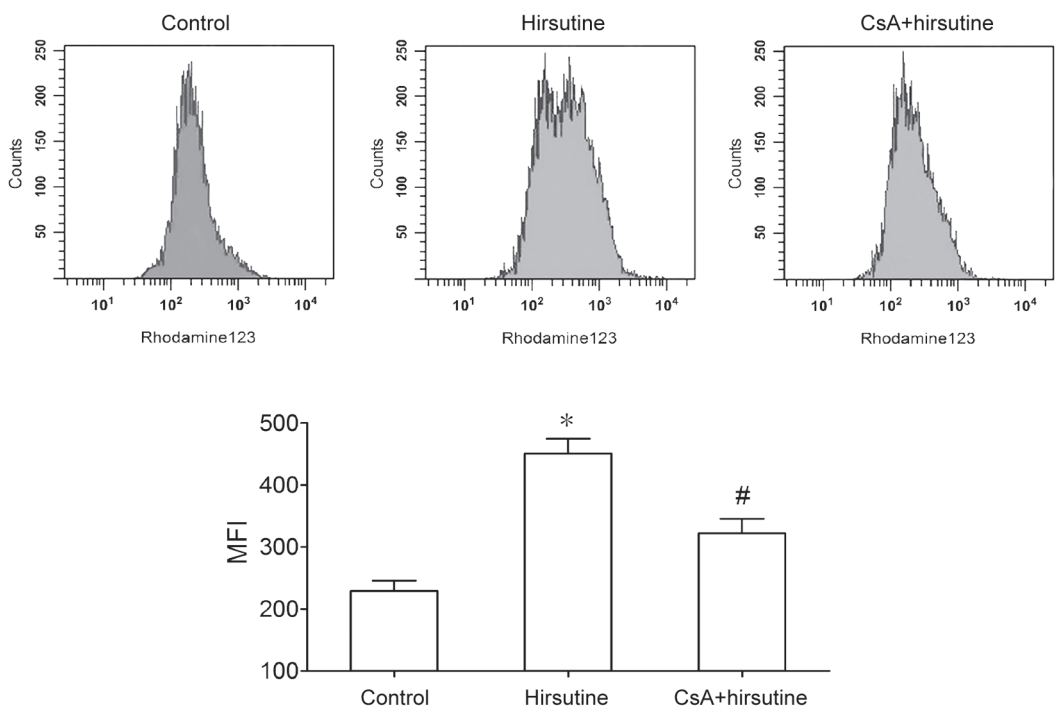


图 3. 毛钩藤碱对MDA-MB-231细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 3. Effects of hirsutine on mitochondrial membrane potential (MMP) in MDA-MB-231 cells detected by flow cytometry. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs hirsutine group. MFI, mean fluorescence intensity.

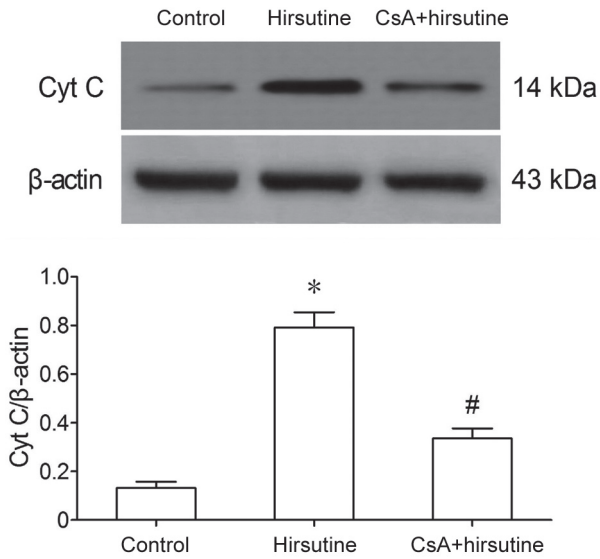


图 4. 毛钩藤碱对胞浆中Cyt C蛋白水平的影响  
Fig. 4. Effect of hirsutine on protein level of Cyt C in cytoplasm detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs hirsutine group.

## 2.5 毛钩藤碱对cleaved-caspase 9和cleaved-caspase 3蛋白水平的影响

Western blot 结果显示, 与对照组相比, 毛钩藤碱处理组 MDA-MB-231 细胞中的 cleaved-caspase 9 和 cleaved-caspase 3 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与毛钩藤碱处理组相比, CsA+毛钩藤碱处理组的 cleaved-caspase 9 和 cleaved-caspase 3 蛋白水平明显下降 ( $P < 0.05$ )。这表明毛钩藤碱可通过激活 caspase 9 和 caspase 3 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡, 该作用可被 CsA 抑制 (图 5)。

## 2.6 毛钩藤碱对Bcl-2和Bax蛋白水平的影响

Western blot 结果显示, 与对照组相比, 毛钩藤碱处理组 MDA-MB-231 细胞中的 Bcl-2 蛋白水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与毛钩藤碱处理组相比, CsA+毛钩藤碱处理组的 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。由此可见, 毛钩藤碱可下调 MDA-MB-231 细胞中 Bcl-2/Bax 比率, 该作用不受 CsA 影响 (图 6)。

## 3 讨论

本研究结果显示, 毛钩藤碱可显著抑制乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞活性, 且该作用具有时间和剂量依赖性。流式细胞术分析结果表明, 毛钩藤碱可诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡并引起 MMP

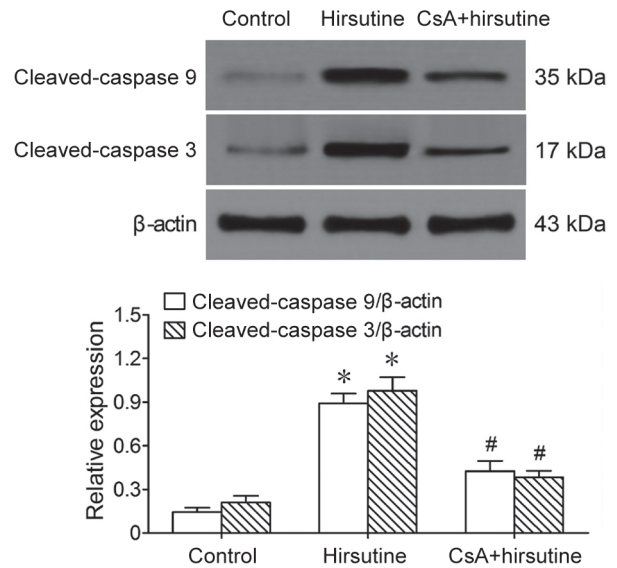


图 5. 毛钩藤碱对cleaved-caspase 9和cleaved-caspase 3蛋白水平的影响  
Fig. 5. Effect of hirsutine on protein levels of cleaved-caspase 9 and cleaved-caspase 3 detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs hirsutine group.

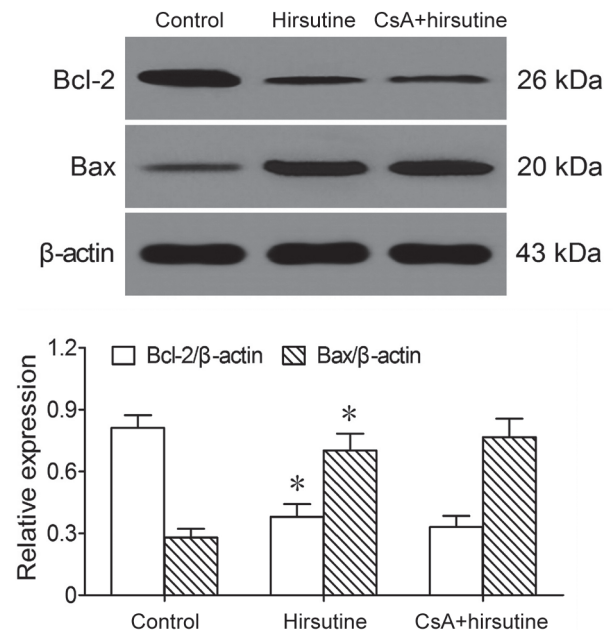


图 6. 毛钩藤碱对MDA-MB-231 细胞中Bcl-2和Bax蛋白水平的影响  
Fig. 6. Effect of hirsutine on protein levels of Bcl-2 and Bax in MDA-MB-231 cells detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs control group.

发生显著的去极化。在哺乳动物中, 线粒体是调控细胞凋亡的重要细胞器。线粒体是由双层膜围成的

囊状结构, 内外膜之间为膜间腔, 内膜以内是基质。线粒体内膜上的质子泵将线粒体基质中的质子泵入膜间腔, 从而形成跨线粒体内膜的 MMP。MMP 去极化是线粒体凋亡途径中的一个重要事件<sup>[7]</sup>。MMP 主要受 MPTP 的调控<sup>[8]</sup>。MPTP 是由基质的亲环蛋白 D (cyclophilin D, CyP-D)、内膜的腺嘌呤核苷酸转位酶 (adenine nucleotide translocase, ANT) 以及外膜的电压依赖性离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 等共同组成的一种非选择性的复合孔道<sup>[9]</sup>。正常生理条件下, MPTP 周期性开放可使质子或正离子回流至基质, 起到稳定 MMP 和基质渗透压的作用<sup>[10]</sup>。但持续开放的 MPTP 会引起 MMP 发生去极化和基质肿胀, 并使线粒体外膜透化 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), 释放出包括 Cyt C 在内的多种促凋亡蛋白, 最终导致细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

为探明线粒体途径是否在毛钩藤碱诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡过程中发挥着重要作用, 本研究使用了 MPTP 特异性阻断剂 CsA, 结果显示 CsA 可显著抑制毛钩藤碱诱导的细胞凋亡和 MMP 去极化。这表明毛钩藤碱可能是通过开放 MPTP 诱导 MDA-MB-231 细胞发生凋亡。

Cyt C 从线粒体释放至胞浆是线粒体凋亡途径的关键步骤<sup>[12]</sup>。Cyt C 是线粒体呼吸链的重要组成部分, 位于线粒体膜间腔<sup>[13]</sup>。当发生 MOMP 时, Cyt C 可释放至胞浆。胞浆中的 Cyt C 与凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptosis protease activating factor 1, Apaf-1) 结合形成凋亡小体, 募集并激活 caspase 9, 活化的 caspase 9 进一步激活 caspase 3, 引发 caspase 级联反应, 导致细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

为进一步验证线粒体途径是毛钩藤碱诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的重要机制, 我们观察了毛钩藤碱对胞浆 Cyt C 水平以及 caspase 9 和 caspase 3 活化的影响。结果显示, 在毛钩藤碱的作用下, 胞浆中 Cyt C 的水平以及 cleaved-caspase 9 和 cleaved-caspase 3 的蛋白水平均显著升高, 且上述作用均可被 CsA 显著抑制。这些结果表明, 毛钩藤碱可能通过触发 MOMP 释放出 Cyt C, 继而激活 caspase 9 和 caspase 3, 最终导致 MDA-MB-231 细胞凋亡。

Bcl-2 家族在 MOMP 过程中发挥着至关重要的作用<sup>[15]</sup>。Bcl-2 家族根据结构和功能可以分为两大类: 一类是抗凋亡的, 主要有 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w 和 Mcl-1 等, 另一类是促凋亡的, 主要包括

Bax、Bak、Bad 和 Bid 等。Bax 既可插入线粒体外膜并聚合成孔道, 也可与 VDAC 结合使 MPTP 持续开放, 触发 MOMP。定位在线粒体外膜上的 Bcl-2 可与 Bax 形成异源二聚体, 从而阻止 Bax 引起的 MOMP<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 毛钩藤碱可下调 MDA-MB-231 细胞中 Bcl-2 蛋白水平, 同时上调 Bax 蛋白水平, 这初步揭示了毛钩藤碱引发 MOMP 的机制。

综上所述, 毛钩藤碱可诱导 MDA-MB-231 细胞发生凋亡, 这可能与调低 Bcl-2/Bax 蛋白比值, 从而引起 MPTP 持续开放和 Cyt C 释放, 最终导致 caspase 9 和 caspase 3 活化有关。本研究为毛钩藤碱治疗乳腺癌提供了支持证据, 但还需临床实验来检验其有效性和安全性。

### 参考文献

- 1 Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Ann Oncol* 2017; 28(5): 1117-1123.
- 2 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67(1): 7-30.
- 3 Akarolo-Anthony SN, Ogundiran TO, Adebamowo CA. Emerging breast cancer epidemic: evidence from Africa. *Breast Cancer Res* 2010; 12(S4): 8.
- 4 Ndagijimana A, Wang X, Pan G, Zhang F, Feng H, Olaleye O. A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies. *Fitoterapia* 2013; 86: 35-47.
- 5 Lou C, Takahashi K, Irimura T, Saiki I, Hayakawa Y. Identification of Hirsutine as an anti-metastatic phytochemical by targeting NF- $\kappa$ B activation. *Int J Oncol* 2014; 45(5): 2085-2091.
- 6 Huang BY, Zeng Y, Li YJ, Huang XJ, Hu N, Yao N, Chen MF, Yang ZG, Chen ZS, Zhang DM, Zeng CQ. Uncaria alkaloids reverse ABCB1-mediated cancer multidrug resistance. *Int J Oncol* 2017; 51(1): 257-268.
- 7 Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003; 8(2): 115-128.
- 8 Pérez MJ, Quintanilla RA. Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore. *Dev Biol* 2017; 426(1): 1-7.
- 9 Elrod JW, Molkenin JD. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ J* 2013; 77(5): 1111-1122.
- 10 Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial mem-

- brane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 99–163.
- 11 Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem* 2014; 115(4): 632–640.
- 12 Chu WW (褚薇薇), Nie L, He XY, Yan AL, Zhou Y, Wu GL, Wang DH. Change of cytochrome c in postconditioning attenuating ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis in rat intestine. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2010; 62(2): 143–148 (in Chinese with English abstract).
- 13 Babbitt SE, Sutherland MC, San Francisco B, Mendez DL, Kranz RG. Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma. *Trends Biochem Sci* 2015; 40(8): 446–455.
- 14 Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie* 2017; 135: 111–125.
- 15 Birkinshaw RW, Czabotar PE. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin Cell Dev Biol* 2017; pii: S1084-9521(17)30189-1.