

·基础研究·

## 基于 AFM 对蝙蝠葛碱诱导 NB4 细胞凋亡的研究

陈伟<sup>1</sup>, 王穗湘<sup>2</sup>, 胡小毛<sup>3</sup>, 邢晓波<sup>1</sup>, 蔡继业<sup>1\*</sup>  
(暨南大学 1.化学系;2.医学院;3.第一临床医学院,广东广州 510632)

**摘要:**【目的】探讨蝙蝠葛碱对急性早幼粒细胞白血病(APL) NB4 细胞增殖的影响和可能的细胞凋亡机制。【方法】采用 CCK-8 法检测 NB4 细胞的存活率,原子力显微镜(AFM)探测蝙蝠葛碱作用 NB4 细胞前后细胞形态及超微结构的变化,流式细胞术检测细胞凋亡率、线粒体膜电位和活性氧的变化。【结果】蝙蝠葛碱能显著抑制 NB4 细胞生长增殖,20~80  $\mu\text{mol/L}$  蝙蝠葛碱处理细胞 24 h 后,细胞存活率从(86.5 $\pm$ 11.7)%下降到(4.1 $\pm$ 0.5)%;以 10~40  $\mu\text{mol/L}$  蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 24 h,流式细胞术分析显示,细胞凋亡率和细胞内活性氧含量上升、线粒体膜电位下降。AFM 探测表明,正常 NB4 细胞呈圆形,细胞饱满,表面较光滑。蝙蝠葛碱处理组细胞皱缩,细胞表面的平均粗糙度增大。【结论】蝙蝠葛碱能显著抑制 NB4 细胞增殖并诱导其凋亡。

**关键词:** 蝙蝠葛碱; NB4 细胞; 原子力显微镜; 超微结构; 细胞凋亡

**中图分类号:** R733.71; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)04-0421-08

### Atomic Force Microscope-related Study on Dauricine Induced Apoptosis of NB4 Cell

CHEN Wei<sup>1</sup>, WANG Sui-xiang<sup>2</sup>, HU Xiao-mao<sup>3</sup>, XING Xiao-bo<sup>1</sup>, CAI Ji-ye<sup>1\*</sup>

(1.Department of Chemistry; 2. Medical College; 3. The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the role of acute promyelocytic leukemia NB4 cells in cell growth and the possible mechanism of cell apoptosis by dauricine. 【Methods】 In this study, CCK-8 assay was used to detect the proliferation rate of NB4 cell. atomic force microscope (AFM) was used to detect the changes in morphological and ultrastructure of NB4 cells before and after dauricine treatment. Cell apoptosis rate, mitochondrial membrane potential (MMP), and reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. 【Results】 The result showed that dauricine directly inhibited growth and proliferation of NB4 cells. Cells were incubated with 20 to 80  $\mu\text{mol/L}$  dauricine after 24 h, the cell viability was decreased from (86.5  $\pm$  11.7)% to (4.1  $\pm$  0.5)%. In addition, cells were treated with 10 to 40  $\mu\text{mol/L}$  dauricine for 24 h. The flow cytometry analysis revealed that the cell apoptosis rate and ROS level was significantly increased and MMP was decreased. The AFM results indicated that normal cells were round and plump, the surface was smooth. Dauricine made the NB4 cell began to collapse, and the mean roughness of cells surface rised. 【Conclusion】 Dauricine directly inhibited proliferation and induced apoptosis of NB4 cells.

**Key words:** dauricine; NB4 cell; atmic force microscope (AFM); ultrastructure; cell apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4): 421-428]

在我国恶性肿瘤死亡率中,白血病在男女性中分别居第 6 和第 8 位。上世纪 80 年代,王振义用全反式维甲酸(all transretinoic acid, ATRA)治愈了急性早幼粒细胞白血病,其使初治患者完全缓解率达到 85%~90%<sup>[1]</sup>。1996 年陈竺等首次报道

三氧化二砷可引起急性早幼粒细胞白血病细胞凋亡,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL) 细胞表现为双重作用,低浓度(0.1~0.5  $\mu\text{mol/L}$ )诱导细胞部分分化,高浓度(>2.0  $\mu\text{mol/L}$ )则诱导细胞凋亡<sup>[2]</sup>。虽然

收稿日期:2012-02-23

基金项目:国家自然科学基金(30872404);“973 计划”项目(2010CB /833603);中国博士后基金(20090450099, 201003359)

作者简介:陈伟,硕士研究生, E-mail: happyew520@163.com; \* 通信作者: 蔡继业, E-mail: tjycj@jnu.edu.cn

ATRA 和  $As_2O_3$  治疗效果明显,但复发率较高,且  $As_2O_3$  毒性较大,副作用强,甚至会使人心脏猝死。原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)具有纳米量级的分辨率,能够在单细胞水平上对细胞的表面结构和超微结构进行三维化和定量分析,获得细胞表面结构和力学性质的定量数据,使得分析更加全面<sup>[3-6]</sup>。利用其可视化成像,可在形态学水平显示细胞经药物作用前后的变化。而对细胞膜超微结构的研究可让医学学者更直观的理解细胞表面结构的变化对癌症形成、发展、转移的影响。蝙蝠葛碱(dauricine,相对分子质量:624.8)是防己科植物蝙蝠葛根茎中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱,具有抗心肌缺血,抗心律失常作用。它也是种广谱抗心律失常药,对  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  跨膜离子流动均有抑制作用<sup>[7]</sup>。有研究表明蝙蝠葛碱能抑制肿瘤增殖并诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[8-12]</sup>。但蝙蝠葛碱对急性早幼粒细胞白血病(APL)的研究,国内外较少有文献报道。本文通过 CCK-8、细胞凋亡实验研究了蝙蝠葛碱对急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞增殖的影响,结合 AFM 分析蝙蝠葛碱作用前后细胞膜超微结构的变化,用流式细胞术分析细胞线粒体膜电位和活性氧水平探讨蝙蝠葛碱促 NB4 细胞凋亡的可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂和仪器

蝙蝠葛碱购自上海融禾医药公司(分析纯>99.2%);NB4 细胞由暨南大学医学院血液病研究所提供;RPMI 1640 培养液为 GIBCO 公司产品;新生胎牛血清购自杭州四季青公司;CCK-8 购自日本同仁化学研究所;罗丹明 123(Rh123)试剂、活性氧检测试剂盒、抗氧化剂 NAC 及台盼蓝试剂盒均购自碧云天生物公司;细胞凋亡与坏死检测试剂盒为南京凯基生物公司产品;实验用水为超纯水。

倒置荧光显微镜(TU-2000, Nikon);原子力显微镜(Autoprobe CP Research, Thermomicroscopes);酶标仪(SAFIRZ-Z, Tzcan);流式细胞仪(FACSAria, BD)。

### 1.2 细胞培养

急性早幼粒细胞性白血病 NB4 细胞株由广东暨南大学血液病研究所提供, NB4 细胞用含 10

mL/L 新生胎牛血清的 RPMI 1640 培养基置于体积分数 5%  $CO_2$ 、37 °C 培养箱中培养,所有实验用细胞均取指数增生期细胞,实验前以台盼蓝染色检测细胞活性,均大于 98%。

### 1.3 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率

将生长状态良好的 NB4 细胞接种于 6 孔板中,种板密度约为  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>,隔夜培养后加入 1 000  $\mu$ mol/L 的蝙蝠葛碱调成终浓度为 0、20、40、60 和 80  $\mu$ mol/L,并共培养 24 h,各浓度吸取 100  $\mu$ L 到 96 孔板中,设 5 个复孔,加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂孵育 5 h,以酶标仪检测 OD 值(测定波长 450 nm,参比波长 630 nm)。细胞存活率  $\gamma_V$  按下式计算:

$$\gamma_V = (n_E - n_B) / (n_C - n_B)$$
 其中  $n_E$ 、 $n_B$ 、 $n_C$  分别为实验组、空白组、对照组的细胞数。

### 1.4 流式细胞术检测 NB4 细胞凋亡率

NB4 细胞接种于 6 孔板中,密度约为  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>,其一加入蝙蝠葛碱设置终浓度为 0、10、20 和 40  $\mu$ mol/L;另一 6 孔板的 NB4 细胞以 2 mmol/L 的 NAC 抗氧化剂预处理 2 h,加入蝙蝠葛碱设置终浓度为 0、10、20 和 40  $\mu$ mol/L,共培养 24 h 后,收集细胞离心弃上清液,以 PBS 洗 2 次,弃上清。加入 200  $\mu$ L 的 binding buffer 重悬,并加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L 的 PI,37°C 避光孵育 15 min。轻轻吹匀细胞,1 h 内流式细胞仪检测,每个标本计数 10 000 个细胞。实验每组设 3 个复孔。

### 1.5 AFM 形貌分析

以多聚赖氨酸(0.1 g/L)浸泡消毒过的盖玻片过夜,室温晾干,将其置于 6 孔板中,接种 NB4 细胞,调节细胞密度为  $10^5 \sim 10^6$  mL<sup>-1</sup>,每孔 2 mL,加入蝙蝠葛碱,使终浓度为 10、20、30、40 和 60  $\mu$ mol/L,培养细胞 24 h,吸出培养基,每孔加入 1 mL 40 g/L 的多聚甲醛溶液固定细胞 1 h,再弃多聚甲醛溶液,用超纯水洗涤盖玻片 3 次。将制备好的样品置于原子力显微镜的 XY 扫描台上,用监视器定位所要扫描的样品区域,接触模式成像。实验采用 100  $\mu$ m 扫描器,UL20B 硅探针,微悬臂的弹性系数为 2.8 N/m。AFM 图像以自带软件(IP 2.1 版)平滑处理,消除扫描方向上的低频背景噪音。

### 1.6 细胞内活性氧自由基检测

用无血清培养基稀释 DCFH-DA 探针(ROS 检测试剂盒,碧云天公司),终浓度为 10  $\mu$ mol/L,

作为 ROS 检测浓度。将不同浓度蝙蝠葛碱作用 24 h 的 NB4 细胞(种板方式同 1.4)离心收集,弃上清液,以 PBS 洗涤两次,加入 500  $\mu\text{L}$  DCFH-DA 探针重悬,置于培养箱中孵育 20 min,离心以无血清培养基洗涤两次以洗净未进入细胞内的 DCFH-DA,1 h 内流式细胞仪检测。每组设 3 个复孔。

### 1.7 线粒体膜电位检测

收集经 0、20、40 和 60  $\mu\text{mol/L}$  蝙蝠葛碱处理 24 h 的 NB4 细胞(种板方式同 1.4),离心弃上清液,以 PBS 洗涤两次,加入 500  $\mu\text{L}$  Rh123 重悬避光孵育 20 min,离心再以 PBS 洗涤 1 次,最后以 PBS 重悬,1 h 内流式细胞仪检测。每组设 3 个复孔进行实验。

### 1.8 统计学处理

数据以结果平均数 $\pm$ 标准差表示,统计学处理采用 Origin 7.0 统计软件包,多组比较采用 ANOVA 单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蝙蝠葛碱抑制 NB4 细胞增殖

不同浓度的蝙蝠葛碱分别作用 NB4 细胞 24 h,其浓度从 20  $\mu\text{mol/L}$  依次增加到 80  $\mu\text{mol/L}$ ,

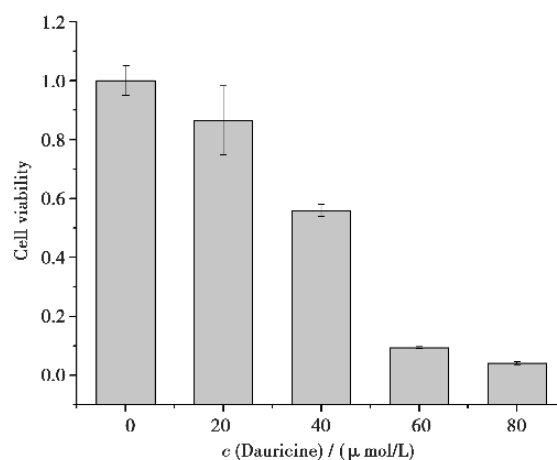


图1 不同浓度蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 24 h 后细胞存活率

Fig.1 Cell viability of NB4 cells after being treated with dauricine in different concentration for 24 h

NB4 细胞存活率从(86.5  $\pm$  11.7)%下降到(4.1  $\pm$  0.5)%。分析数据得出 NB4 细胞存活率随着蝙蝠葛碱作用浓度的加大,其存活率依次下降(图 1)。

### 2.2 细胞凋亡率分析

以 0、10、20 和 40  $\mu\text{mol/L}$  的蝙蝠葛碱作用 NB4 细胞 24 h,流式细胞仪检测其凋亡率。如图 2、3,细胞早期凋亡率分别为(6.2  $\pm$  2.2)%、(18.0  $\pm$  0.4)%、(22.5  $\pm$  1.3)%和(35.2  $\pm$  5.3)%,晚期凋亡

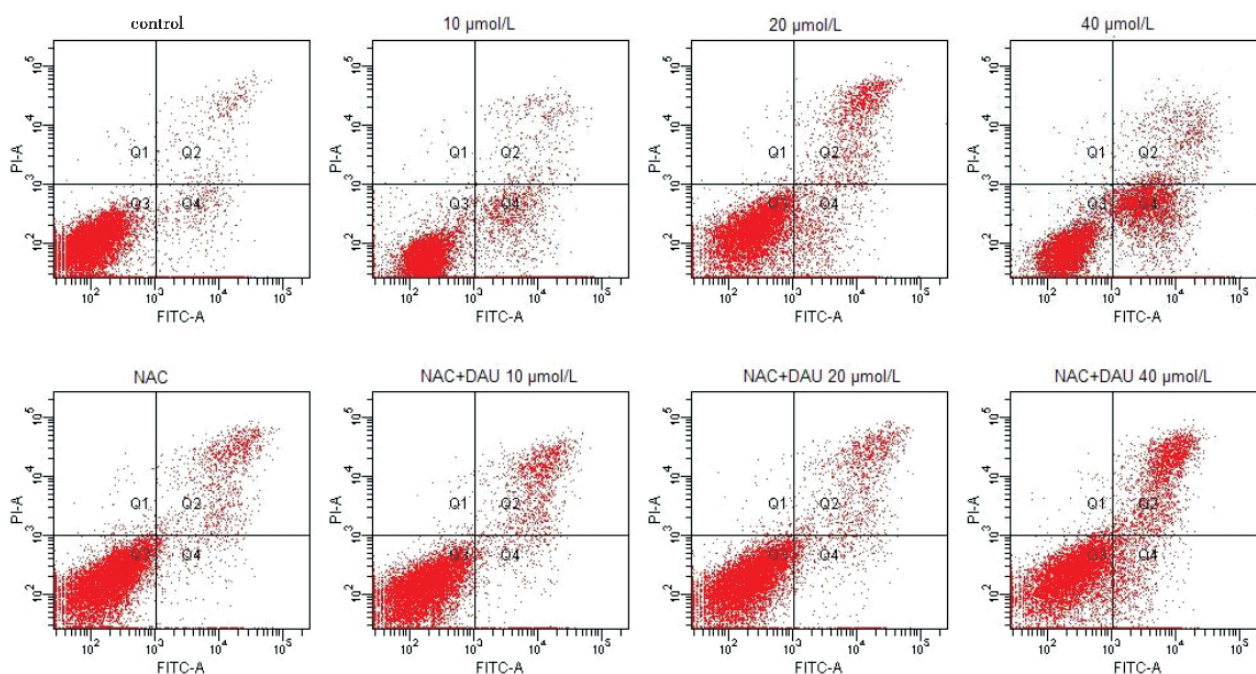


图2 流式细胞术分析蝙蝠葛碱作用 NB4 细胞 24 h 凋亡率

Fig.2 Flow cytometric analysis of apoptosis in NB4 cells exposed to dauricine for 24 h

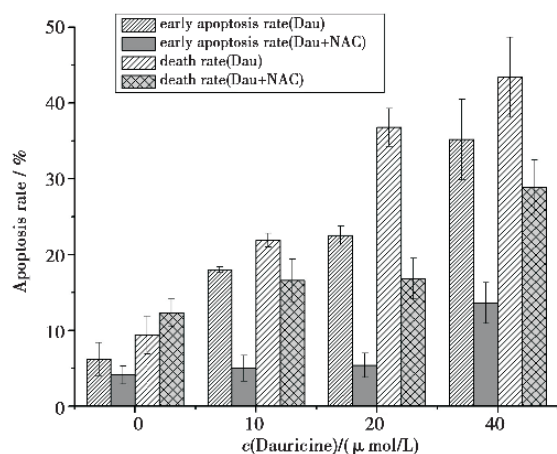


图 3 NB4 细胞凋亡率统计图

Fig.3 The histogram of NB4 cell apoptosis rate

率分别为  $(3.2 \pm 2.5)\%$ 、 $(3.9 \pm 0.5)\%$ 、 $(14.3 \pm 1.2)\%$ 和 $(8.2 \pm 0.2)\%$ ,随着药物浓度的加大,NB4 细胞的凋亡率总体增加。另一组以  $2 \text{ mmol/L}$  的抗氧化剂(NAC)预处理 NB4 细胞 2 h,以清除细胞产生的活性氧(ROS),其早期凋亡率分别为 $(4.1 \pm 1.2)\%$ 、 $(5.0 \pm 1.7)\%$ 、 $(5.4 \pm 1.6)\%$ 和  $(13.6 \pm 2.7)\%$ ,晚期凋亡率分别为  $(8.2 \pm 1.1)\%$ 、 $(11.6 \pm 2.1)\%$ 、 $(11.4 \pm 3.7)\%$ 和 $(15.3 \pm 4.6)\%$ 。NAC 可以抑制细胞生理过程中产生的 ROS,如图4,加入 NAC 处理的细胞,经蝙蝠葛碱处理 24 h 后,其细胞死亡率(早期凋亡率晚期凋亡率之和)比不加 NAC 显著降低。

### 2.3 NB4 细胞形态结构的 AFM 分析

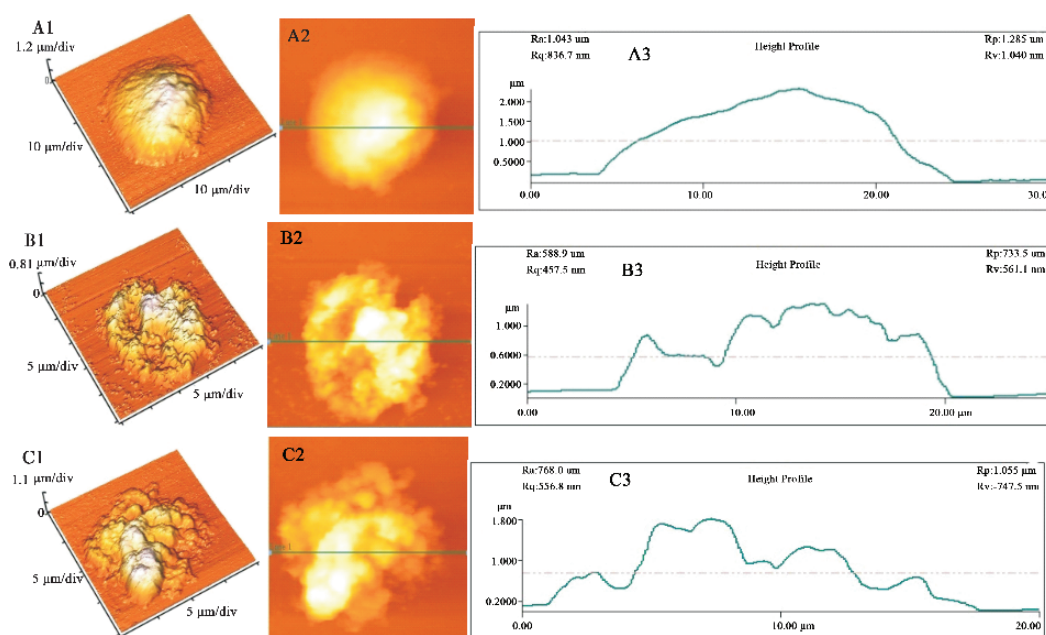


图 4 不同蝙蝠葛碱处理的 NB4 dauricine 细胞 AFM 成像图

Fig.4 AFM images of NB4 cell reaction with dauricine at different concentration

A1 ~ C1: AFM three-dimensional images; A2 ~ C2: morphology of NB4 cell. A3 ~ C3: cross-sectional height profile half-maximum amplitude (FWHM) of a single NB4 cell.

细胞膜是保证细胞内环境的相对稳定的关键结构,细胞膜对调节细胞功能和生理过程如物质运输、代谢调节、细胞表面识别、分子免疫、激素和药物的作用等具有不可替代的作用<sup>[13-14]</sup>。因此,细胞的功能是否正常与细胞膜结构的变化有着直接联系<sup>[15-17]</sup>。

取经 0、20、40  $\mu\text{mol/L}$  蝙蝠葛碱作用 24 h 的细胞组,每组至少用 AFM 扫描成像 10 个细胞,获得单个 NB4 细胞及表面超微结构图(图 4)。A 组

为对照组,B 组和 C 组分别为 20、40  $\mu\text{mol/L}$  药物处理 24 h 的细胞。A1 ~ C1 是细胞的 3D 图,A2 ~ C2 是细胞的形貌图,A3 ~ C3 是对应 A2 ~ C2 的细胞高度图。正常 NB4 细胞呈较规则的圆形,胞体饱满,细胞圆润,表面较平滑,其直径约为 15 ~ 20  $\mu\text{m}$ ,细胞高度约为 2  $\mu\text{m}$ ,经药物处理组的 NB4 细胞坍塌,细胞皱缩并且呈不规则形状,细胞表面明显的粗糙凹凸不平,其高度和体积均下降。

A4 ~ C4 是 NB4 细胞  $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$  超微结构

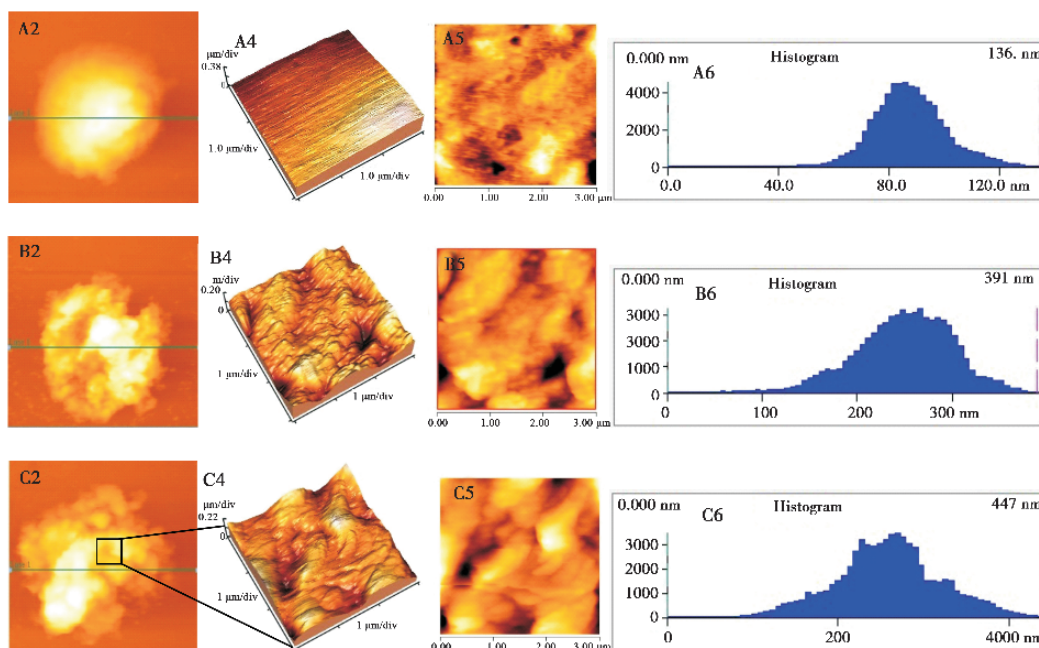


图 5 NB4 细胞超微结构 AFM 成像

Fig.5 AFM ultra-microstructure images of NB4 cell

A4–C4; three-dimensional images (3 μm × 3 μm); A5–C5; topographical mode; A6, B6, C6: histograms of the particles sizes of A5, B5, and C5.

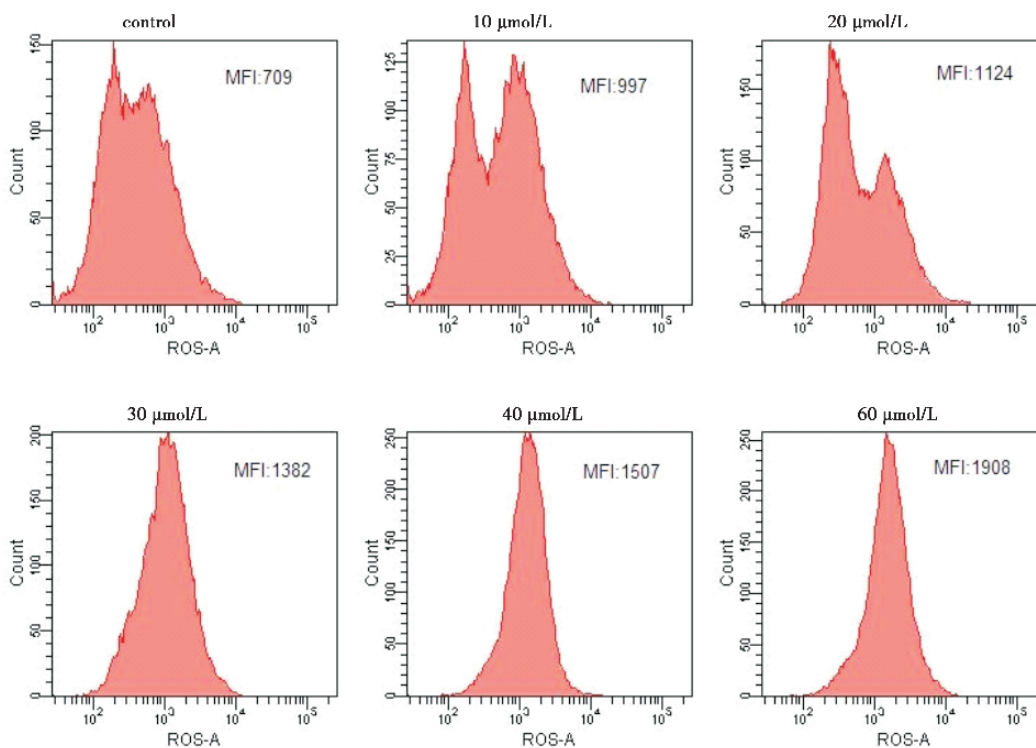


图 6 不同浓度蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 24 h 后活性氧含量分析

Fig.6 Flow cytometric analysis of the ROS of the NB4 cells were treated with different concentration of dauricine for 24 h

3D 图(图 5), A5 ~ C5 是其对应的形貌图, A6 ~ C6 是细胞 3 μm × 3 μm 超微结构粒径分布图。对照组 NB4 细胞膜结构基本光滑, 没有较大的凹凸起

伏和膜孔, 膜表面颗粒较小, 细胞膜结构完整, 膜表面分子粒径(A6)主要分布在 80 ~ 100 nm。药物处理组细胞 3 μm × 3 μm 超微结构(3D 图 B4, C4;

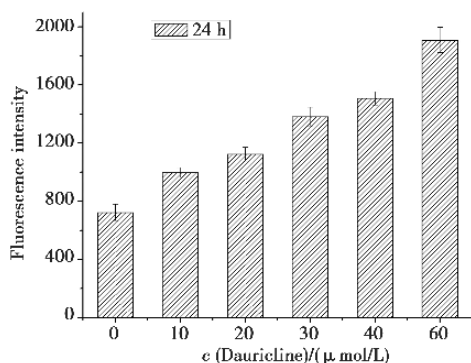


图 7 不同浓度蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 24 h 活性氧统计图

Fig.7 The histogram of NB4 cells were treated with different concentrations of dauricine for 24 h

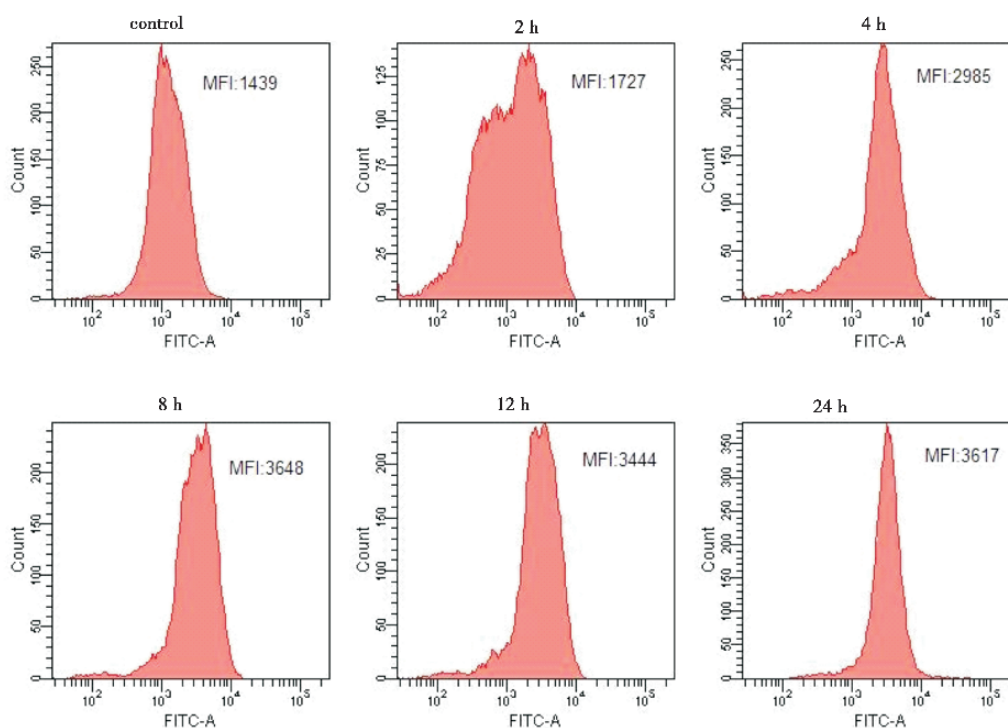


图 8 40 μmol/L 蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞不同时间后活性氧含量分析

Fig.8 Flow cytometric analysis of the ROS of the NB4 cells were treated with dauricine (40 μmol/L) at different time

表 1 NB4 细胞超微结构参数

Table 1 The ultrastructure parameters of NB4 cell

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

	Rp/nm	Rq/nm	Ra/nm	Mean H/nm
Control	55.6 ± 7.7	13.0 ± 1.9	10.8 ± 1.0	289.7 ± 30.7
20 μmol/L	173.6 ± 9.9	38.6 ± 5.3	31.6 ± 6.3	247.8 ± 15.7
40 μmol/L	259.1 ± 13.1	63.2 ± 7.8	50.9 ± 11.2	258.2 ± 20.1

Rp: peak-to-valley distance; Rq: root-mean<sup>2</sup>-squared roughness; Ra: average roughness; Mean H: mean height

形貌图 B5, C5) 细胞膜出现较明显的内凹外凸, 膜结构被破坏, 其粒径分布 (如图 B6, C6) 主要在 200 ~ 300 nm 范围, 用 AFM 自带软件 IP2.1 统计超微结构图数据, 药物组比正常组细胞超微结构的高低差 (Rp)、均方根粗糙度 (Rq)、和平均粗糙度 (Ra) 大, 细胞平均高度 (Mean H) 下降。NB4 细胞经药物处理之后, 其形貌和超微结构都发生了明显改变。

对 NB4 细胞的 3 μm 超微结构图, 利用 IP 2.1 分析软件对其进行测量, 得到超微结构参数值如表 1。

## 2.4 细胞活性氧分析

DCFH-DA 本身没有荧光, 进入细胞内后, 可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜, 从而使探针很容易被装载到细胞

内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。荧光强度和 ROS 含量水平呈正比, 检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。以 0 ~ 60 μmol/L 蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 24 h 后, 其荧光强度由 (723 ± 56) 增加到 (1 908 ± 87), 细胞内活性氧水平依次上升。以 40 μmol/L 的蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 0、2、4、8、12 和 24 h, 其荧光强度由 1406 ± 41 上升到 3529 ± 107。荧光

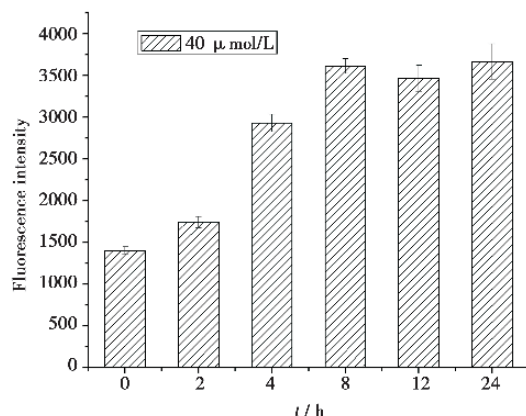


图 9 40 μmol/L 蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞不同时间后活性氧统计图

Fig.9 ROS statistical figure of the NB4 cells were treated with dauricine (40 μmol/L) at different time

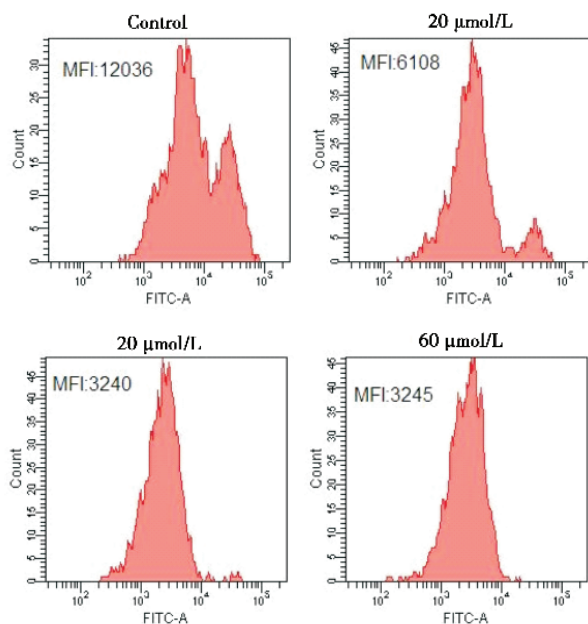


图 10 不同浓度蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 24 h 后线粒体膜电位

Fig.10 Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential of NB4 cells after being treated with different concentration of dauricine for 24 h

强度总体依次上升, NB4 细胞内 ROS 增加(图 6-9)。

### 2.5 细胞线粒体膜电位分析

Rhodamine 123 是一种可以通透细胞膜的选择性染色活细胞线粒体的荧光染料, 广泛用作检测线粒体膜电位。如图 10、11 所示, 以 0、20、40 和 60 μmol/L 蝙蝠葛碱处理 NB4 细胞 24 h,

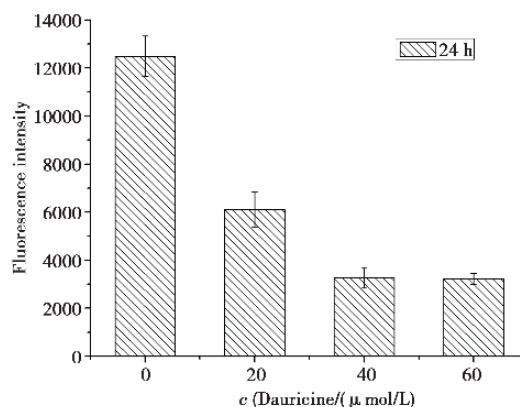


图 11 线粒体膜电位统计图

Fig.11 The histogram of mitochondrial membrane potential

用流式细胞仪检测其荧光强度随着蝙蝠葛碱浓度的增加而下降, 结果证明加药组的线粒体跨膜电位明显低于正常组, 线粒体膜电位依次下降。

## 3 讨论

蝙蝠葛碱药理作用广泛, 近年来越来越多的文献报道其能抑制肿瘤细胞增殖和诱导其凋亡<sup>[8-12]</sup>。本研究通过 CCK-8 细胞增殖实验进行定量检测发现蝙蝠葛碱能显著抑制 NB4 细胞的生长和增殖。流式细胞术检测药物处理组细胞随着药物浓度增加凋亡率显著上升, 并且发现细胞线粒体膜电位也依次下降, 细胞内的 ROS 含量上升。实验结果证明蝙蝠葛碱能诱导 ROS 产生, 过量的 ROS 破坏了细胞内氧化应激平衡, 线粒体功能发生紊乱。而 NAC 对细胞内的 ROS 具有清除作用<sup>[18-19]</sup>, 以 NAC 预处理细胞后, 蝙蝠葛碱作用 NB4 细胞, 细胞死亡率比不加 NAC 的组别明显要低。因此推测有可能是蝙蝠葛碱通过 ROS 介导的线粒体凋亡途径来抑制 NB4 细胞增殖, 诱导凋亡。

细胞的形貌、结构与细胞的生理状态和功能有着重要的联系, AFM 对细胞的形态学研究与临床研究的关系也将越紧密, 并有着广阔的应用前景<sup>[20-21]</sup>。因此, 研究 NB4 细胞的形貌及超微结构的变化有重要意义。本实验通过 AFM 对蝙蝠葛碱作用急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞前后形貌、超微结构的比较, 从单细胞水平和纳米尺度上直观的观察蝙蝠葛碱对 NB4 细胞的增殖抑制作用。结

果显示,经蝙蝠葛碱作用后的 NB4 细胞较对照组细胞皱缩,并且呈不规则形状,表面较粗糙。超微结构显示细胞膜表面出现不规则的内凹外凸,膜表面粒径分布增大,这可能 NB4 细胞经蝙蝠葛碱作用后,细胞膜上大分子颗粒聚集变化致细胞膜结构发生改变有关。AFM 可作为一种新的检测细胞凋亡的手段,从纳米尺度上探讨药物对肿瘤细胞的作用,可为检测细胞凋亡提供新的依据,在医学诊断上有广泛的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. *Blood*, 1988, 72: 567-572.
- [2] Shen ZX, Chen G Q, Ni J H, et al. Use of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients[J]. *Blood*, 1997, 89(9): 3354-3360.
- [3] Cai XF, Yang XX, Cai JY, et al. Atomic force microscope-related study membrane-associated cytotoxicity in human pterygium fibroblasts induced by mitomycin C[J]. *J Phys Chem*, 2010, 114(11): 3833-3839.
- [4] 李盛璞, 师如意, 王秋兰, 等. 应用原子力显微镜分析猪脂肪前体细胞的分化[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 124-130.
- [5] Hsieh CH, Lin YH, Lin S, et al. Surface ultrastructure and mechanical property of human chondrocyte revealed by atomic force microscopy[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(4): 480-488.
- [6] Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, et al. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Science*, 2004, 305(5687): 1147-1150.
- [7] Li YH, Gong PL. Neuroprotective effect of dauricine in cortical neuron culture exposed to hypoxia and hypoglycemia: involvement of correcting perturbed calcium homeostasis [J]. *Canadian J Physi Pharmac*, 2007, 85(6): 621-627.
- [8] Yang Z, Li C, Wang X, et al. Dauricine induces apoptosis, inhibits proliferation and invasion through inhibiting NF-kappaB signaling pathway in colon cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 225(1): 266-275.
- [9] Tang XD, Zhou X, Zhou KY. Dauricine inhibits insulin-like growth factor-I-induced hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human breast cancer cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(5): 605-616.
- [10] Jin H, Dai JY, Chen XY, et al. Pulmonary toxicity and metabolic activation of dauricine in CD-1 mice [J]. *J Pharmaco Experi Therap*, 2010, 332(3): 738-746.
- [11] 李铭, 梁文杰, 曾亚平, 等. 蝙蝠葛碱对人膀胱癌 T-24 细胞株生长增殖的抑制作用[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(18): 1860-1863.
- [12] 石玉生, 张艳, 王加志, 等. 蝙蝠葛碱抑制肺癌细胞 QG-56 增殖的实验研究[J]. *中医药信息*, 2010, 27(3): 115-116.
- [13] Puegh P, Poole K, Knebel D, et al. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM [J]. *Ultramicroscopy*, 2006, 106(8-9): 637-644.
- [14] Alarmo E, Jenita P, Arssinen J, et al. BMP7 influences proliferation, migration and invasion of breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 275(1): 35-43.
- [15] 柯长洪, 彭元, 陈伟, 等. 雷公藤红素抑制血管内皮细胞增殖的 AFM 研究[J]. *生物技术*, 2011, 21(4): 61-66.
- [16] Voitchovsky K, Contera SA, Kamihira M, et al. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes[J]. *Biophys J*, 2006, 90(6): 2075-2085.
- [17] Sato K, Adachi T, Ueda D, et al. Measurement of local strain on cell membrane at initiation point of calcium signaling response to applied mechanical stimulus in osteoblastic cells[J]. *J Biomechanics*, 2007, 40(6): 1246-1255.
- [18] Wang M, Ruan YX, Chen Q, et al. Curcumin induced HepG2 cell apoptosis-associated mitochondrial membrane potential and intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 41-47.
- [19] Xu KH, Lu DP. Plumbagin induces ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia cells in vivo [J]. *Leukemia Res*, 2010, 34(5): 658-665.
- [20] Brochu H, Vermette P. Young's moduli of surface-bound liposomes by atomic force microscopy force measurements [J]. *Langmuir*, 2008, 24(5): 2009-2014.
- [21] Iyer SR, Gaikwad M, Subba-Rao V, et al. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells[J]. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4(6): 389-393.

(编辑 孙慧兰)