Bax 通道在斑蝥素诱导草地贪夜蛾 Sf9 细胞凋亡中的作用*

崔高峰** 张鹏飞 郝少东 丁 凯 王进忠 张志勇***

（北京农学院植物科学技术学院 北京 102206）

摘 要 **【目的】**为明确 Bax 通道在斑蝥素诱导鳞翅目昆虫细胞凋亡过程中的作用。**【方法】** 本文利用 Bax 通道抑制法测定了斑蝥素诱导鳞翅目昆虫草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*(J. E. Smith)细胞系 Sf9 细胞凋亡过程中线粒体膜电位、线粒体琥珀酸脱氢酶活性及细胞形态等方面的影响。**【结果】** Bax 通道被抑制后，斑蝥素诱导造成的 Sf9 细胞线粒体膜电位的降低时间延迟，细胞形变率下降，但琥珀酸脱氢酶活性的下降未受影响。**【结论】** Bax 通道参与了斑蝥素引起的 Sf9 细胞线粒体膜电位改变和细胞形态变化，而与抑制线粒体有关能量代谢的酶无直接关系。

关键词 斑蝥素，草地贪夜蛾，Bax 通道，细胞形态，琥珀酸脱氢酶，线粒体膜电位

Effects of the Bax channel on cantharidin induced apoptosis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells

CUI Gao-Feng** ZHANG Peng-Fei HAO Shao-Dong DING Kai
WANG Jin-Zhong ZHANG Zhi-Yong***

(College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate the role of the Bax channel on cantharidin-induced cell apoptosis in lepidopteran insects **[Methods]** Bax channel blocker was used to determine the roles of mitochondrial membrane potential, succinate dehydrogenase activity in mitochondria, and cell morphology, on apoptosis of Sf9 cells derived from fall the armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) exposed to cantharidin stress. **[Results]** The results show that Bax channel blocker can delay the decrease of mitochondrial membrane potential and reduce changes in cell morphology, but fail to stop the decline of succinate dehydrogenase activity, in Sf9 cells after treatment with cantharidin. **[Conclusion]** Bax related channels play a role in cantharidin-induced changes in mitochondrial membrane potential and destruction of cell morphology. However, the Bax channel does not appear to play a role in the suppression of enzyme activity in mitochondria after cantharidin treatment.

Key words cantharidin, *Spodoptera frugiperda*, Bax channel, cell morphology, succinate dehydrogenase, mitochondrial membrane potential

斑蝥素（Cantharidin，CTD，$C_{10}H_{12}O_4$）是传统中药斑蝥的活性成分，广泛存在于鞘翅目芫菁科（Meloidae）昆虫体内（国家药典委员会，2005）。斑蝥素除用于研究抗肿瘤功能外（Deng *et al.*，2013），很早就被探索应用于其他领域，其中值得一提的是在植物保护领域的应用。研究发现斑蝥素在杀虫（Carrel and Ersuer，1974）、除草（Matsuzawa，1987）、杀菌（云月利和徐冠

* 资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目(30971938, 31272099)；北京市教委科技创新平台项目(PXM2008_014207_055164)；北京市高校人才强教计划项目(PHR-201107135)；国家科技支撑计划-果蔬重大病虫害防控技术研究与示范(2012BAD19B06)

**第一作者 First author，E-mail：410428427@139.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：zzy@bua.edu.cn

收稿日期 Received：2015-01-04，接受日期 Accepted：2015-03-12

军，2003；曹微丹等，2008）等方面存在着巨大潜力，生产上已经有登记的相关杀虫剂产品（陈琳和顾明洁，2002）。有证据表明，斑蝥素可以导致昆虫细胞凋亡，具有不同于现行杀虫剂的杀虫机理（张志勇等，1998，2000；张雅林等，2003；陈利平等，2011）。斑蝥素可以在细胞膜结构完整的情况下，使鳞翅目昆虫细胞系 Sf9 细胞[草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* （J. E. Smith）]卵巢组织 IPLB-Sf21 细胞系的克隆株）膜电位去极化，诱导细胞活性不可逆下降（汪丽等，2013），出现细胞凋亡特征，如凋亡小体（陈利平等，2008）和梯形 DNA 电泳图谱（DNA ladder）等（张来喜等，2011），表明诱导细胞凋亡是斑蝥素致死的重要机制。

哺乳动物细胞凋亡研究中，Korsmeyer 等（1993）提出 Bcl-2/Bax 比率是调控细胞死亡的“可变电阻器（Rheostat）”。在外界因素刺激下，细胞的凋亡与否最终取决于 Bcl-2 和 Bax 两种调控因子的平衡结果（Tayubi *et al.*，2014）。这一假说为后来的多个肿瘤临床研究所证实（王卫东和陈正堂，2007；姚鲲等，2014）。由此可见 Bax 等 Bcl-2 家族成员在细胞凋亡中发挥重要作用。

Bax（Bcl-2-associated X protein）是 Bcl-2 家族中的一员，主要位于细胞浆中。当受到凋亡刺激时，通常以单体形式存在的 Bax 会从胞浆转移到线粒体膜，蛋白构象改变并形成寡聚体（Korsmeyer *et al.*，2000；Nechushtan *et al.*，2001）。此变化可在线粒体膜上形成了 Bax 通道（Kuwana *et al.*，2005；Ganesan *et al.*，2012），也可能作用于线粒体膜上已存在的通道，如电压依赖性阴离子通道（VDAC）、腺嘌呤转运通道（ANT）等（Borner，2003；Reed，2006），使其孔径扩大，引起线粒体膜渗透性增加，线粒体膜电位下降，细胞色素 C（Cyt C）、凋亡诱导因子（AIF）、Smac/Diablo、核酸内切酶 G 等促凋亡因子从线粒体中释放出来（Liu *et al.*，1996；Gómez-Crisóstomo *et al.*，2013），凋亡信号传导并启动级联反应，引发细胞凋亡。

昆虫细胞凋亡的研究中，也提及 Bax 通道及其在凋亡中重要作用（Kumarswamy *et al.*，2009；Chandna *et al.*，2013）。本文主要通过观测 Bax 通道受到抑制剂作用后，斑蝥素诱导昆虫细胞凋亡时的变化，进而探索 Bax 通道在斑蝥素诱导 Sf9 细胞凋亡中的作用，以期能够进一步揭示斑蝥素的作用机理，为相关研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试细胞

草地贪夜蛾 *S. frugiperda*（J. E. Smith）Sf9 细胞由中国科学院动物研究所馈赠。培养方法同周晗颖等（2012），完全培养基由无血清基础培养基（Sf-900™ II SFM，Gibco，USA），10%胎牛血清（FBS，Gibco，USA）和 1%双抗（100×青霉素和链霉素，Gibco，USA）配制而成，于 27 ℃恒温细胞培养箱（Model371，Thermo electron corporation，USA）中培养。

1.2 Bax 通道抑制剂对斑蝥素诱导 Sf9 细胞膜电位变化的影响

1.2.1 斑蝥素对 Sf9 细胞的线粒体膜电位的检测 准备细胞爬片（细胞浓度约 10^5/mL），加入终浓度为 5 μmol/L 的罗丹明 123（Rhodamine 123，Sigma，USA），轻轻混匀后置于 37℃下避光孵育 10 min。斑蝥素（CTD，Sigma，USA）用二甲基亚砜（DMSO，Amresco，USA）溶解，无血清培养基稀释至终浓度为 32 μmol/L，分别处理 30、60 和 120 min，以正常细胞为对照组。用细胞培养基轻轻清洗细胞 3~5 次，将盖玻片放到干净的载玻片上，激光共聚焦显微镜（TCS SP5，Leica，德国）下拍摄荧光照片（激发波长 488 nm，发射波长 520 nm）。自带软件 LAS AF Lite（Leica，德国）检测各处理组相对荧光强度值（Relative fluorescence intensity，RFI），相对单位表示。每处理重复 3 次。

1.2.2 Bax 通道抑制剂对斑蝥素诱导 Sf9 细胞线粒体膜电位变化的影响 基本操作同 1.2.1，斑蝥素处理前用 20 μmol/L Bax 通道抑制剂（Bax

channel blocker，BCB，Tocris，英国） 预处理 3 h，斑蝥素处理时间分别为 120、150、180 和 210 min，以正常细胞为对照组。清洗后用激光共聚焦　显微镜拍摄荧光照片（激发波长 488 nm，发射波长 520 nm），检测相对荧光强度。每处理重复 3 次。

1.3　Bax 通道抑制剂对斑蝥素诱导 Sf9 细胞线粒体脱氢酶活性变化的影响

调整细胞浓度至 1×10^5~5×10^5/mL，100 μL/孔接种于 96 孔板中，恒温培养 1 h 使细胞贴壁。Bax 通道抑制剂（BCB 20 μmol/L） 预处理 3 h。加入斑蝥素，使其终浓度为 32 μmol/L，共设置 4 组：正常细胞组（CK 组）、二甲基亚砜对照组（DMSO 组）、斑蝥素处理组（CTD 组）和 Bax 通道抑制剂与处理后斑蝥素处理组（BCB-CTD 组）。加入斑蝥素后，分别处理 60、120 和 180 min 后，小心去除培养液，更换成含 0.5 mg/mL 噻唑蓝（MTT）的完全培养基，避光恒温孵育 4 h 后，小心吸弃孔内上清液，每孔加 150 μL DMSO，低速振荡，待结晶物充分融解后，酶标仪（Model 680，BIO-RAD，USA）490 nm 检测各孔吸光值，每处理 5 孔重复。

1.4　Bax 通道抑制剂对斑蝥素诱导 Sf9 细胞形态变化的影响

调整细胞浓度至 1×10^5 ~ 5×10^5 /mL，2 mL/孔接种于 6 孔板中，恒温培养 1 h 使细胞贴壁。分组及处理同上，显微成像系统（CRi Nuance，USA；荧光显微镜为 Zeiss AX10，德国）下监测细胞形态变化。分别于 60 和 120 min 时，随机选取 3 个视野拍照。依据陈利平等（2008）对斑蝥素处理后细胞形态变化的描述，计算正常细胞比率，公式如下。

$$\text{正常细胞比率} = \frac{\text{正常细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

1.5　数据统计与分析

利用 SPSS19.0 软件分析数据，采用单因素方差分析——最小显著差异法（LSD 法），检测同一时间点各组间差异的显著性。

2　结果与分析

2.1　Bax 在斑蝥素诱导 Sf9 细胞线粒体膜电位变化中的作用

2.1.1　斑蝥素对 Sf9 细胞线粒体膜电位的影响

罗丹明 123 可透过细胞膜在活细胞的线粒体内聚集，发出黄绿色荧光，荧光强度与 ATP 含量有关；线粒体跨膜电位（$\Delta\Psi_m$）崩溃后，罗丹明 123 释放出线粒体，荧光信号减弱，因而其常被用来检测线粒体膜电位。激光共聚焦显微镜检测斑蝥素处理 Sf9 细胞后线粒体膜电位指示探针罗丹明 123 的相对荧光强度，结果见图 1。

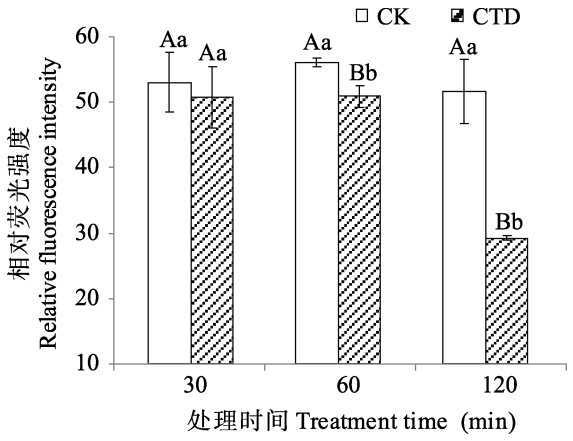

图 1　斑蝥素对 Sf9 细胞线粒体膜电位探针罗丹明 123 相对荧光强度的影响

Fig. 1　Effect of CTD on RFI of mitochondrial membrane potential probe, Rhodamine 123, of Sf9 cells

图中数据为平均值±标准差；柱上标有不同小写字母表示处理间达到显著差异水平（P<0.05）；不同大写字母表示达到极显著差异水平（P<0.01）。下图同。CK：正常细胞组；CTD：斑蝥素处理组。

Data are mean ± SD. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference (P<0.05) and different capital letters indicate extremely significant difference (P<0.01). The same below. CK: Normal Sf9 cell; CTD: Cantharidin treatment.

如图 1 所示，斑蝥素处理 Sf9 细胞 30 min 时，线粒体膜电位与对照组相比未发生明显变化；60 min 时，线粒体膜电位从（57.87±0.75）下降到（52.50±1.74），下降约 10%，到达显著差异水平；之后到第 120 min 时细胞膜电位持续

降低，CTD 组荧光强度仅为 CK 组一半左右，极显著降低。结果表明，斑蝥素可引起线粒体膜电位持续下降。

2.1.2 Bax 在斑蝥素诱导 Sf9 细胞线粒体膜电位变化中的作用 利用激光共聚焦显微镜检测 Bax 通道抑制剂（BCB）作用下斑蝥素对 Sf9 细胞线粒体膜电位的影响，探针的荧光强度即可反映线粒体膜电位的变化，结果见图 2。

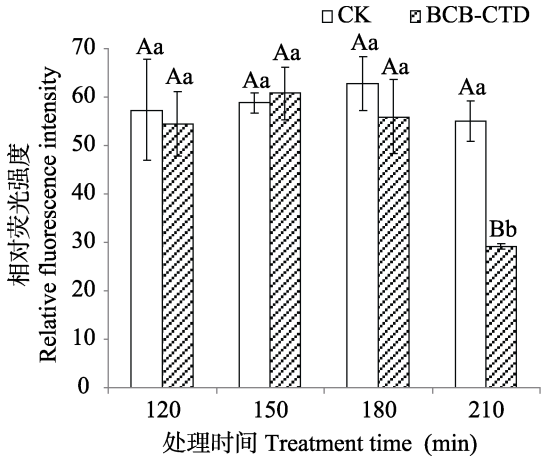

图 2 Bax 通道抑制剂预处理 Sf9 细胞后斑蝥素对线粒体膜电位探针相对荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of cantharidin on RFI of mitochondrial membrane potential probe of Sf9 cells under pretreatment with BCB

CK：正常细胞组；BCB-CTD：Bax 通道抑制剂 BCB 预处理后斑蝥素处理组。

CK: Normal Sf9 cell; BCB-CTD: Cantharidin treatment after BCB pre-treatment.

如图 2 所示，在 Bax 通道抑制剂的作用下，斑蝥素处理 Sf9 细胞 180 min 之前，线粒体膜电位与对照相比未发生明显变化。直到 210 min 时，BCB-CTD 组线粒体膜电位才下降到与 CK 组极显著差异。相比于斑蝥素直接处理 Sf9 细胞，Bax 通道受阻后，线粒体膜电位开始下降时间明显推迟。说明 Bax 相关通道参与了斑蝥素诱导的细胞线粒体膜电位的降低。

2.2 Bax 在斑蝥素诱导 Sf9 细胞线粒体琥珀酸脱氢酶活性变化中的作用

噻唑蓝（MTT）法是常用的检测活细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶活性的方法。其原理主要是琥珀酸脱氢酶等可将 MTT 还原为蓝紫色的甲瓒沉积在细胞中，生成物的深浅即可反应琥珀酸脱氢酶的活性。各处理的吸光值汇总如图 3 所示。

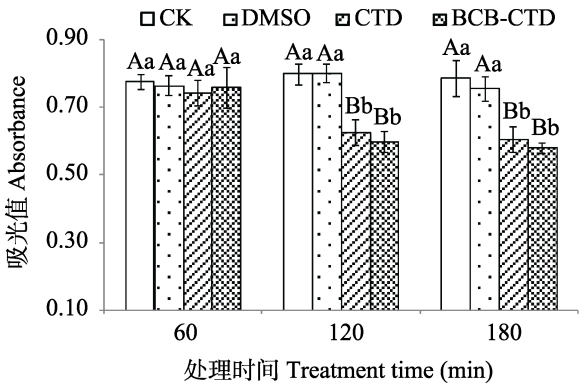

图 3 Bax 通道抑制剂对斑蝥素诱导 Sf9 细胞线粒体琥珀酸脱氢酶活性变化的影响

Fig. 3 Influence of Bax channel blocker on activity of succinate dehydrogenase in mitochondriaofSf9 cell induced by cantharidin

CK：正常细胞组；DMSO：DMSO 对照组；CTD：斑蝥素处理组；BCB-CTD：BCB 预处理后斑蝥素处理组。图 4，图 5 同。

CK: Normal Sf9 cell; DMSO: DMSO control group; CTD: CTD treatment; BCB-CTD: CTD treatment after BCB pre-treatment. The same with Fig.4, Fig.5.

不同时间点中，CK 组和 DMSO 组之间均不存在显著差异。斑蝥素处理 60 min 后，各处理间组间不存在显著差异。但随着斑蝥素处理的延长，在 120 和 180 min 时，CTD 组和 BCB-CTD 组细胞活性逐渐下降，与 CK 组和 DMSO 组相比，吸光值下降均超过 20%，达到极显著差异水平，但两组之间并未达到显著性差异。表明 Bax 通道受阻后，斑蝥素引起的线粒体脱氢酶活性下降并未受到抑制。推断斑蝥素抑制线粒体内能量合成相关酶类可能存在其他作用机制，而非通过 Bax 通道。

2.3 Bax 在斑蝥素诱导 Sf9 细胞形态变化中的作用

显微成像系统分别记录斑蝥素处理 60 和 120 min 时细胞形态变化。如图 4 所示，CK 组及 DMSO 组的细胞基本呈均匀圆形，细胞轮廓

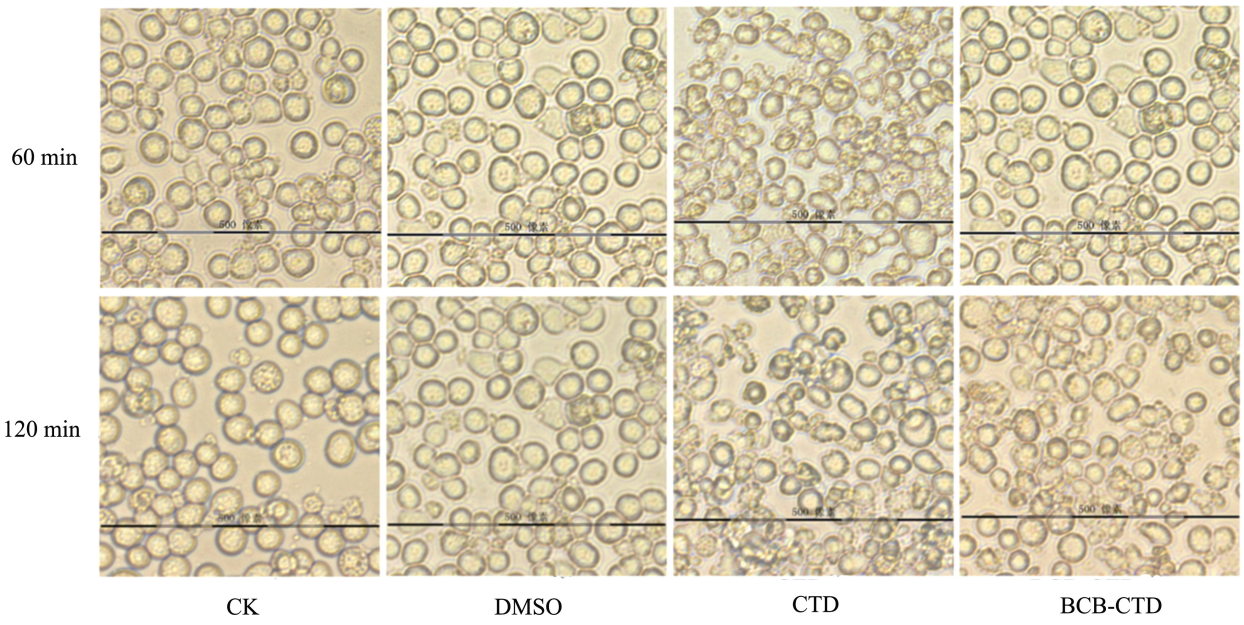

图 4　斑蝥素处理 60 min 和 120 min 后各处理细胞形态（40×）

Fig. 4　Cell morphology after cantharidin treatment for 60 min and 120 min (40×)

清晰；而 CTD 组细胞形态发生明显变化，部分细胞悬浮，细胞轮廓模糊，少数细胞内出现空泡，胞膜膨胀突起，有些细胞外产生芽状突起。而预先用 Bax 通道抑制剂处理过的细胞形变比率则明显减少，大多细胞轮廓清晰，正常细胞比例较高。

具体统计结果如图 5 所示，CK 组和 DMSO 组各时间点的正常细胞比率都维持在 90%以上，并且两组间各时间点不存在差异。而 CTD 组在 60 min 时正常细胞比率已极显著下降，仅有（60.76%±0.29%），并与 CK 组（93.13%±0.18%）和 DMSO 组（93.69%±0.80%）均达到极显著差异水平；BCB-CTD 组正常细胞比率为（75.98%±1.45%），虽显著低于 CK 组和 DMSO 组，但与 CTD 组相比，正常细胞比率极显著升高。60 min 和 120 min 时，Bax 通道抑制剂预处理均可抑制斑蝥素引起的细胞正常比率下降，抑制率可达 50%以上。说明 Bax 通道受阻能够减少斑蝥素对细胞形态造成的影响，进而推断 Bax 通道在斑蝥素诱导的细胞形态学改变中发挥着重要作用。

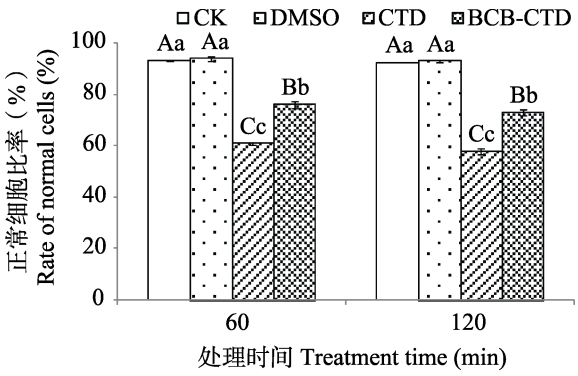

图 5　Bax 通道抑制剂对斑蝥素诱导 Sf9 细胞形态变化的影响

Fig. 5　Influence of Bax channel blocker on morphological changes of Sf9 cells after cantharidin treatment

3　讨论

Bax 是最早被发现的 Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白，其主要功能是调节线粒体膜的渗透性，促进促凋亡因子的释放，从而发挥促凋亡的作用。实验证实促凋亡蛋白 Bax 与 Bak 能够与线粒体外膜上的 VDAC 结合，使线粒体膜通透转换孔（MPTP）开放，从而诱导线粒体跨膜电位（$\Delta\Psi_m$）

下降，$\Delta\Psi_m$ 降低是细胞凋亡早期的不可逆事件，可启动细胞凋亡程序（陈慧莉等，2007；Westphal *et al.*，2011）。Mikhailov 等（2001）则发现，Bax 蛋白能以寡聚体的形式直接插入线粒体膜，形成通道介导 Cyt C 的释放。Kuwana 等（2005）也提出，Bax 在有 Bid 蛋白和心磷脂存在的条件下，能够在人工脂质体膜上形成通道，而 Bcl-X_L 可抑制此过程。本实验结果显示斑蝥素处理昆虫 Sf9 细胞后 $\Delta\Psi_m$ 很快降低，并且一直持续至细胞凋亡。而当加入能够抑制 Bax 相关通道形成的 Bax 通道抑制剂后，$\Delta\Psi_m$ 下降受阻，表明 Bax 相关通道参与了斑蝥素诱导的 Sf9 细胞线粒体膜电位下降。但是具体通过 Bax 直接形成通道还是间接促进 MPTP 开放，还需进一步证明。

琥珀酸脱氢酶是线粒体内重要的脱氢酶，参与三羧酸循环和呼吸链，连接氧化磷酸化与电子传递，为线粒体的标志酶。斑蝥素作用于 Sf9 细胞后，$\Delta\Psi_m$ 的崩溃，会导致呼吸链与氧化磷酸化解耦联，ATP 合成停止，电子传递链产生的自由能消耗，活性氧增加，加剧 MPTP 开放和 Ca^{2+} 内流，破坏细胞膜和细胞器，琥珀酸脱氢酶的活性也受到显著影响。虽然酶活性检测受实验方法灵敏度的制约，但 Bax 通道受阻未能抑制斑蝥素引起的琥珀酸脱氢酶活性的下降，提示斑蝥素可能存在其他方式影响线粒体内能量代谢相关酶系，而非 Bax 相关通道。

细胞形态改变中起关键作用的主要是细胞膜骨架和肌动蛋白骨架，其中很多蛋白都能被半胱天冬氨酸水解酶（Caspase）和钙结合蛋白酶水解，进而破坏细胞骨架，易导致细胞凋亡。其中，Caspase-3 对其底物多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶的裂解作用甚至晚于对肌丝的作用（高清和吴波，2008）。提示 Caspase 和 Ca^{2+} 在细胞形态学改变中具有重要作用，而 Bax 通道的形成位于胞内钙振荡传递下游和 Caspase 激活上游。实验结果证实，Bax 相关通道受到抑制后，斑蝥素引起的细胞形态改变受到显著抑制，提示 Bax 相关通道参与斑蝥素诱导昆虫细胞凋亡中形态改变。20 μmol/L 的 Bax 通道抑制剂可以抑制 99%±2% 的 Cyt C 的释放（Bombrun *et al.*，2003），但对于斑蝥素引起的细胞形态改变仅起到部分抑制作用，提示可能还存在其他影响细胞形态改变的机制。有研究表明，斑蝥素生物受体蛋白磷酸酶 2A（PP2A）（Li and Casida，1992；Chen *et al.*，2014），主要存在于胞浆中，能够影响细胞骨架微管蛋白的稳定（梁婧和徐立红，2011）。那么，PP2A 在凋亡早期细胞形态快速改变中的作用，及其与 Ca^{2+}、Bax 通道和线粒体凋亡途径之间是否存在联系等，还有待进一步探索。此外，凋亡过程中细胞形态改变与细胞内酶活性变化之间的关系也值得深入探讨。

参考文献 (References)

Bombrun A, Gerber P, Casi G, Terradillos O, Antonsson B, Halazy S, 2003. 3,6-dibromocarbazole piperazine derivatives of 2-propanol as first inhibitors of cytochrome c release via Bax channel modulation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(21): 4365–4368.

Borner C, 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, 39(11): 615–647.

Cao WD, Zhang ZY, Yang BD, Zhang MZ, Sun SL, 2008. Inhibition of cantharidin and demethylcantharidin to seven phytopathogenic fungi. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(1): 63–68. [曹微丹, 张志勇, 杨宝东, 张民照, 孙淑玲, 2008. 斑蝥素及去甲斑蝥素对七种植物病原真菌的抑制作用. 植物保护学报, 35(1): 63–68.]

Carrel JE, Eisner T, 1974. Cantharidin: potent feeding deterrent to insects. *Science*, 183(4126): 755–757.

Chandna S, Suman S, Chandna M, Pandey A, Singh V, Kumar A, Dwarakanath BS, Seth RK, 2013. Radioresistant Sf9 insect cells undergo an atypical form of Bax-dependent apoptosis at very high doses of γ-radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 89(12): 1017–1027.

Chen HL, Li JH, Wang SQ, 2007. Correlative study between mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. *Medical Recapitulate*, 13(14): 1041–1043. [陈慧莉, 李建华, 王树庆, 2007. 线粒体跨膜电位和细胞凋亡相关性的研究. 医学综述, 13(14) : 1041–1043.]

Chen L, Gu MJ, 2002. Application of a biological pesticide 0.1% cantharidin aqueous solution. *Pesticide Science and*

Administration, 23(4): 32–34. [陈琳, 顾明洁, 2002. 生物农药0.1%斑蝥素水剂的田间应用研究. 农药科学与管理, 23(4): 32–34.]

Chen LP, Yang BD, Zhang ZY, Wang JZ, Sun SL, 2008. Effects of cantharidin on insect cell Spex-Ⅶ and Sf9. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 23(4): 17–20. [陈利平, 杨宝东, 张志勇, 王进忠, 孙淑玲, 2008. 斑蝥素对昆虫细胞 Spex-Ⅶ和 Sf9 的作用效果. 北京农学院学报, 23(4): 17–20.]

Chen LP, Yang BD, Zhang ZY, Zhang AH, Zhang MZ, Zhang LX, Sun SL, 2011. Effect of cantharidin on the integument structure of *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1779–1785. [陈利平, 杨宝东, 张志勇, 张爱环, 张民照, 张来喜, 孙淑玲, 2011. 斑蝥素对小菜蛾体壁组织结构的影响. 应用昆虫学报, 48(6): 1779–1785.]

Chen XE, Liu JY, Zhang YL, 2014. Cantharidin impedes the activity of protein serine/threonine phosphatase in *Plutella xylostella*. *Molecular BioSystems*, 10(2): 240–250.

Deng LP, Dong J, Cai H, Wang W, 2013. Cantharidin as an antitumor agent: a retrospective review. *Current Medicinal Chemistry*, 20(2): 159–166.

Gao Q, Wu B, 2008. Changes of the cytoskeleton and cell apoptosis. *Journal of Medical Postgraduates*, 21(08): 877–880. [高清, 吴波, 2008. 细胞凋亡与细胞骨架的改变. 医学研究生学报, 21(08): 877–880.]

Ganesan V, Walsh T, Chang KT, Colombini M, 2012. The dynamics of Bax channel formation: influence of ionic strength. *Biophysical Journal*, 103(3): 483–491.

Gómez-Crisóstomo NP, López-Marure R, Zapata E, Zazueta C, Martínez-Abundis E, 2013. Bax induces cytochrome c release by multiple mechanisms in mitochondria from MCF7 cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45(5): 441–448.

Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN, 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Seminars in Cancer Biology*. 4(6): 327–332.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH, 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death and Differentiation*, 7(12): 1166–1173.

Kumarswamy R, Seth RK, Dwarakanath BS, Chandna S, 2009. Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(6): 1430–1440.

Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD, 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell*, 17(4): 525–535.

Li YM, Casida JE, 1992. Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24): 11867–11870.

Liang J, Xu LH, 2011. The progress on regulation of microtubule by PP2A. *Chinese Journal of Cell Biology*, 33(06): 705–710. [梁婧, 徐立红, 2011. 蛋白磷酸酶 2A 对微管的调控作用研究进展. 中国细胞生物学学报, 33(06): 705–710.]

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang XD, 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1): 147–157.

Matsuzawa M, Graziano MJ, Casida JE, 1987. Endothal and cantharidin analogs: relation of structure to herbicidal activity and mammalian toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(5): 823–829.

Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P, 2001. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21): 18361-18374.

Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoona SH, Youlea RJ, 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 153(6): 1265–1276.

Reed JC, 2006. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death & Differentiation*, 13(8): 1378–1386.

State Pharmacopoeia Committee, 2005. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press. 253. [国家药典委员会, 2005. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社. 253.]

Tayubi IA, Shome S, Hashmi S, 2014. Drug formulation studies on regulation of BCL-2 family for treatment of autism. *BMC Genomics*, 15(Suppl 2): 38.

Wang L, Zhang LX, Zhang ZY, Yang BD, Wang JZ, Zhang AH, Zhang MZ, 2013. Effect of cantharidin on cell membrane integrity and potential in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Acta Entomologica Sinica*, 56(05): 512–520. [汪丽, 张来喜, 张志勇, 杨宝东, 王进忠, 张爱环, 张民照, 2013. 斑蝥素对草地贪夜蛾 Sf9 细胞膜完整性和膜电位的影响. 昆虫学报, 56(05): 512–520.]

Wang WD, Chen ZT, 2007. Bcl-2/Bax ratio and the “life or death fate” of cells. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 14(04):

393–396. [王卫东, 陈正堂, 2007. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”. 中国肿瘤生物治疗杂志, 14(04): 393–396.]

Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM, 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4): 521–531.

Yao K, Zhu HX, Zhang R, Liao AJ, Yang W, Liu ZG, 2014. Effects of *TIEG1* on K562 cell apoptosis and expression of *BCL-2/BAX*，*PTEN*. *Journal of Experimental Hematology*, 22(5): 1278–1281. [姚鲲, 朱海霞, 李旸, 张嵘, 廖爱军, 杨威, 刘卓刚, 2014. *TIEG1* 对 K562 细胞凋亡及 *BCL-2/BAX*、*PTEN* 表达的影响. 中国实验血液学杂志, 22(5): 1278–1281.]

Yun YL, Xu GJ, 2003. The study on the inhibition of cantharidin to phytopathogen. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 25(4): 342–345. [云月利, 徐冠军, 2003. 斑蝥素对植物病原菌抑制作用的研究. 湖北大学学报(自然科学版), 25(4): 342–345.]

Zhang LX, Yang BD, Zhang MZ, Wang JZ, Zhang AH, Zhang ZY, 2011. Critical condition of apoptosis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells lead by cantharidin. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 26(2): 14–17. [张来喜, 杨宝东, 张民照, 王进忠, 张爱环, 张志勇, 2011. 斑蝥素诱导草地贪夜蛾(*Spdoptera frugiperda*)卵巢细胞系 Sf9 凋亡的临界条件. 北京农学院学报, 26(2): 14–17.]

Zhang YL, Zhou Y, Zhang ZY, 2003. Effect of cantharidin on the midgut of the orient armyworm (*Mythimna separata*) and diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Acta Entomologica Sinica*, 46(3): 272–276. [张雅林, 周越, 张志勇, 2003. 斑蝥素对黏虫和菜蛾幼虫中肠组织的影响. 昆虫学报, 46(3): 272–276.]

Zhang ZY, Yuan F, Zhang X, 2000. Effect of cantraridin on the digestive enzymes and esterase of diamondback moth larva. *Acta Phytophylacica Sinica*, 27(4): 355–358. [张志勇, 袁锋, 张兴, 2000. 斑蝥素对菜蛾消化酶及酯酶的影响. 植物保护学报, 27(4): 355–358.]

Zhang ZY, Yuan F, Zhang X, Li ZH, 1998. The insecticidal function of cantharidin to the larvae of diamondback moth. *Acta Phytophylacica Sinica*, 25(2): 166–170. [张志勇, 袁锋, 张兴, 李朝红, 1998. 斑蝥素对菜蛾幼虫的毒力作用研究. 植物保护学报, 25(2): 166–170.]

Zhou HY, Yang BD, Zhang MZ, Wang JZ, Zhang AH, Zhang ZY, 2012. Comparisons of inhibition between cantharidin and norcantharidin on Sf9cells. *Journal of Environmental Entomology*, 34(02): 154–160. [周晗颖, 杨宝东, 张民照, 王进忠, 张爱环, 张志勇, 2012. 斑蝥素与去甲斑蝥素对昆虫细胞 Sf9 抑制作用比较. 环境昆虫学报, 34(02): 154–160.]