

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.020

时贞颂,于大永,彭倩,等. 金花茶种子诱导人宫颈癌 HeLaS3 细胞凋亡及其作用机理的研究[J]. 广西植物,2013,33(1):112-117

Shi ZS, Yu DY, Peng Q, et al. Potential mechanism of *Camellia chrysantha* seeds-induced apoptosis in human cervical cancer HeLaS3 cells[J]. *Guihaia*, 2013,33(1):112-117

金花茶种子诱导人宫颈癌 HeLaS3 细胞凋亡及其作用机理的研究

时贞颂, 于大永, 彭倩, 史丽颖*, 冯宝民, 王永奇

(大连大学 药物研究所, 大连 116622)

摘要: 为探讨金花茶种子诱导人宫颈癌 HeLaS3 细胞凋亡的机制, 以不同浓度金花茶种子乙醇提取物的正丁醇萃取物处理人宫颈癌 HeLaS3 细胞后, 分别采用流式细胞仪、Western 印记法等检测对细胞凋亡及 Bax、Bcl-2、Bid 等表达的影响。结果表明: 金花茶种子乙醇提取物的正丁醇萃取物作用于人宫颈癌 HeLaS3 细胞后, 细胞凋亡增加, Bax 蛋白表达提高, Bcl-2 蛋白表达降低, Bid 蛋白活性减弱, 线粒体膜电位下降及 Caspase-8、Caspase-3 活性增强。金花茶种子乙醇提取物的正丁醇萃取物为其重要的抗肿瘤活性有效部位, 并可能通过激活 Bax 及 Caspase-3、Caspase-8, 抑制 Bcl-2 和 Bid 来诱导 HeLaS3 细胞凋亡。

关键词: 金花茶; 人宫颈癌; HeLaS3 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)01-0112-06

Potential mechanism of *Camellia chrysantha* seeds-induced apoptosis in human cervical cancer HeLaS3 cells

SHI Zhen-Song, YU Da-Yong, PENG Qian, SHI Li-Ying*,
FENG Bao-Min, WANG Yong-Qi

(Institute of Materia Medica, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: To investigate the effect of the seeds of *Camellia chrysantha* on apoptosis in human cervical cancer HeLaS3 cells. Human HeLaS3 cells were treated with the solution of BuOH fraction from the EtOH extract from the seeds of *C. chrysantha* at different concentrations. The apoptosis was detected by flow cytometry (FCM), apoptosis associated proteins were determined by western blot. After treatment with the solution of BuOH fraction from the EtOH extract of the seeds of *C. chrysantha* on human HeLaS3 cells, a significant enhancement of apoptosis was observed, the expression of Bax was enhanced, the expression of Bcl-2 and Bid decreased, and the decrease of mitochondrial membrane potential (MMP) and the activation of Caspase-8 and Caspase-3 were observed. The BuOH fraction from the EtOH extract of the seeds of *C. chrysantha* was the active anticancer fraction, which promoted human HeLaS3 cells apoptosis possibly by activating Bax, MMP, Caspase-8 and Caspase-3, and inhibiting Bcl-2 and Bid.

Key words: *Camellia chrysantha*; human cervical cancer; HeLaS3 cells; apoptosis

* 收稿日期: 2012-08-20 修回日期: 2012-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(81002621)

作者简介: 时贞颂(1986-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事天然产物的开发与研究工作, (E-mail)szs19860202@163.com。

* 通讯作者: 史丽颖, 博士, 副教授, 主要从事天然活性物质研究, (E-mail)shiliying99074@163.com。

金花茶 (*Camellia chrysantha*) 系山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*) 金花茶组植物 (section *chrysantha* Chang)。20 世纪 60 年代在广西“十万大山”首次发现黄花山茶, 而震惊世界。并以花瓣玉蕊、腊质金黄、高贵雅致而轰动世界花卉界。国内将金花茶誉为“茶族皇后”、“植物界的大熊猫”, 国外则称之为“幻想中的黄色山茶”。被列为国家一级重点保护植物 (梁盛业等, 2005; 韦霄等, 2006)。金花茶不仅有较高的观赏价值, 而且具有一定的药用价值和营养价值。其叶和花为壮族民间用药, 主要用于咽喉炎、痢疾、高血压、便血、月经不调 (黄燮才, 1994; 王永奇等, 2006)。我们在对山茶属植物抗肿瘤活性的研究中发现, 金花茶种子具有较强的抗肿瘤作用, 其中金花茶种子乙醇提取物的正丁醇萃取物 (CCEB) 显示了较强的抑制人宫颈癌 HeLaS3 细胞增殖的作用。因此本研究将进一步探讨金花茶种子乙醇提取物的正丁醇萃取物诱导人宫颈癌 HeLaS3 细胞凋亡及其相关机制。

1 材料和方法

1.1 金花茶种子的提取

金花茶种子采集于广西南宁, 由广西林业科学研究院高级工程师梁盛业鉴定。取金花茶种子 100 g, 粉碎后用 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液, 减压浓缩成浸膏, 加适量水分散, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 各萃取液分别浓缩至浸膏, 得乙酸乙酯部分、正丁醇部分和水溶部分, 减压浓缩并真空干燥后得到各部分的浸膏, 取正丁醇部分的浸膏用 DMSO 配成各浓度溶液备用。

1.2 细胞培养

人宫颈癌 HeLaS3 细胞株从 Human Sciences Research Resource Bank (日本人类科学基金会, 东京, 日本) 获得, 培养于含有 10% 热灭活小牛血清的 DMEM 培养液中, 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度条件下培养。选取对数生长期细胞进行实验。

1.3 体外细胞增殖抑制实验

噻唑蓝比色法 (MTT) 检测细胞生长情况, HeLaS3 细胞分别种于 96 孔培养板, 每个孔细胞数为 5×10^3 , 培养于 DMEM 培养液中, 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 24 h。培养 24 h 后, 以 PBS 冲洗细胞, 然后分别加入新的培养液和系列浓度的待测样品。实验组设 6 个药物浓度组, 每组药物的终浓

度分别为 5、10、20、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对照组加入同样浓度的二甲基亚砷 (DMSO), 培养 24 h。培养结束前 4 h 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 离心弃上清, 加入 200 μL DMSO 充分溶解结晶物, 测定酶标仪 570 nm 处吸光度值。因为吸光度值与培养液中活细胞数成正比, 所以通过吸光度值可以计算细胞存活百分率。

1.4 DNA 片断化检测

采用改良的 Sellins-Cohen 法进行 DNA 片段化分析 (Sellins *et al.*, 1987; Hopcia *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2007), 用细胞裂解液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 0.2% Triton X-100, pH7.5) 裂解细胞, 离心 (13 000 g, 10 min), 分离上清液和沉淀。将上清液和沉淀分别在 4 °C, 12.5% 三氯乙酸 (TCA) 中进行沉淀, 将上述沉淀分别用 5% 三氯乙酸在 90 °C 水解 20 min 后, 用二苯胺试剂进行定量分析。DNA 片段化率以每份样品上清液中 DNA 的含量占总 DNA 含量的百分比来计算。

1.5 细胞凋亡流式细胞仪分析

流式细胞分析中采用碘化丙啶 (PI) 和异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的膜联蛋白 V (Annexin V) (Immunotech, Marseille, France) 来检测早期凋亡终点指示剂磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine) 的表达 (van Heerde *et al.*, 1995)。不同浓度的样品处理细胞后, 取完整的细胞在 37 °C 培养 6 h, 以 4 °C PBS 冲洗后 1 200 r/min 离心 3 min。离心后细胞用 Annexin V-FITC 试剂盒自带的结合缓冲液稀释至 105 cells/mL, 加 5 μL FITC 标记的 Annexin V 和 5 μL PI 至上述细胞悬浮液中, 混匀。在 4 °C 避光培养 10 min 后, 用流式细胞仪 (Epics XL, Beckman-Coulter, Miami, FL) 进行分析。

1.6 线粒体膜电位检测

阳离子荧光染料四甲基罗丹明甲酯 (tetramethylrhodamine methyl ester, TMRM) (Molecular Probes, Eugene, OR) 对线粒体膜电位 (Mitochondria membrane potential, MMP) 产生响应而聚集在线粒体中, 当 MMP 下降而被释放。加入不同浓度样品处理细胞, 在 37 °C 培养 6 h, 收集细胞, PBS 冲洗后 1 200 r/min 离心 3 min。以 10 nmol/L 的 TMRM 在 1 mL 含 1% 小牛血清的 PBS 中染色细胞 15 min 后, 立即在流式细胞仪上以红色荧光 (激发波长 488 nm, 发射波长 575 nm) 进行测定 (Yu *et al.*, 2007, 2008)。MMP 降低 0.1~12 个对数分数窗格的

细胞被计数,以此计算 MMP 降低细胞的百分率。

1.7 细胞内 caspase-3 活性检测

Caspase 8 活性检测试剂盒是基于 Caspase 8 可以催化底物 Ac-IETD-pNA 产生黄色的 pNA (p-nitroaniline),从而可以通过测定吸光度来检测 Caspase 8 的活性。pNA 在 405 nm 附近有强吸收。收获细胞正常或凋亡细胞, PBS 洗涤,制备细胞裂解液,加 Ac-IETD-pNA, 37 °C 反应 1 h, 荧光分光光度计 (Polarstar) 分析荧光强度 (激发光波长 380 nm, 发射光波长为 430 ~ 460 nm) (Yu *et al.*, 2007)。

使用 CaspGLOW™ 活化 Caspase-3 原位染色试剂盒 (MBL, Nagoya, Japan) 检测细胞内 caspase-3 活性。以 FITC 标记的 caspase-3 抑制性底物多肽 DEVD (FITC-DEVD-FMK) 作为原位 (in situ) 的荧光标志 (Yu *et al.*, 2007, 2008)。因为 FITC-DEVD-FMK 的细胞膜通透性很好,在凋亡细胞中可与活化的 caspase-3 不可逆的结合,结合后 FITC 所发射的荧光信号可用流式细胞术检测,其荧光量反映活化 caspase-3 的量。加入不同浓度样品处理细胞,在 37 °C 培养 6 h,收集细胞,然后将细胞溶液 (1×10^6 cells/mL) 分装到样品管中,每 300 μ L 细胞溶液中加入 1 μ L FITC-DEVD-FMK, 37 °C 培养 0.5 h。在 3 000 r/min 离心细胞 5 min,移去上清液,将细胞重新分散在 0.5 mL 的洗涤缓冲液后离心。再重新将细胞分散在 500 μ L 洗涤缓冲液中,在流式细胞仪上用 FL-1 通道进行分析。

1.8 Western 印记分析

收集细胞后以冷的 PBS 冲洗,在每 50 μ L 裂解缓冲液 (1 mol/L Tris-HCl, 5 mol/L NaCl, 1% Nonidet P-40 (v/v), 1% 脱氧胆酸钠, 0.05% SDS, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟) 中 10^6 个细胞的细胞密度下将细胞裂解 20 min。超声后裂解液在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min,用 Bio-Rad 蛋白质双向电泳系统测定上清液中所含蛋白。每份样品中取 30 μ L 上述上清液,加入 5 μ L SDS 上样缓冲液 (62.5 mmol/L Tris-HCl, 20% SDS, 5% 2-巯基乙醇, 10% 甘氨酸, 0.001% 溴酚蓝) 混匀,煮沸变性 5 min,经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上。

分别使用特异性抗-Bcl-2 单克隆抗体、抗-Bax 多克隆抗体、抗-Bid 多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 和抗- β -actin 单克隆抗体 (Sigma) 进行 Western 印记分析来检测 Bcl-

2、Bax、Bid 和 β -actin 的表达。以 HRP (horseradish peroxidase) 标记兔抗小鼠 IgGs 作为二抗,在 ECL 系统 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) 中使 X 光胶片感光记录条带信号,采用 Vilber Lourmat Bio-Profile 系统的 BIO-ID 分析软件测定条带光密度 (Yu *et al.*, 2007, 2008)。

1.9 统计分析

实验结果以均值 \pm 标准差表示,采用统计学 t 检验进行组间比较分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。所有的实验都重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 CCEB 对 HeLaS3 细胞增殖的抑制作用

用浓度分别为 5、10、20、40、80、160 μ g/mL 的金花茶种子乙醇提取物的正丁醇萃取物 (CCEB) 处理 HeLaS3 细胞,采用 MTT 法检测不同浓度的样品对 HeLaS3 细胞增殖的影响。结果发现 CCEB 显示了较强地抑制 HeLaS3 细胞增殖的作用,其 IC_{50} 为 102.20 μ g/mL,结果见图 1。

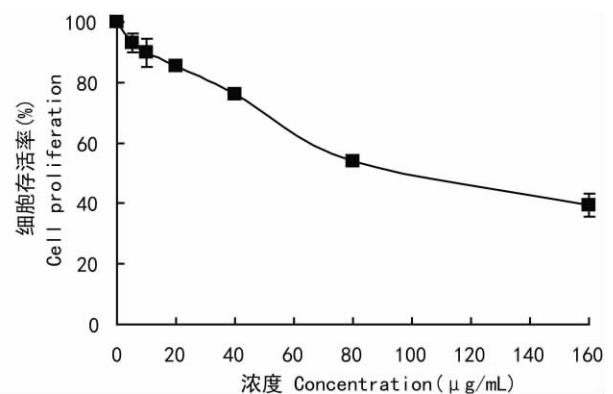


图 1 CCEB 对 HeLaS3 细胞增殖的影响
Fig. 1 Effects of CCEB on cell proliferation in HeLaS3 cells

2.2 CCEB 诱导 HeLaS3 细胞凋亡的作用

为了考察 CCEB 诱导 HeLaS3 细胞凋亡的作用,检测了 CCEB 对 HeLaS3 细胞 DNA 片段化的影响。分别用 90、120、150 μ g/mL 的 CCEB 处理 HeLaS3 细胞,测定 DNA 片段化率,结果如图 2 所示。和对照组相比各样品处理组 HeLaS3 细胞的 DNA 片段化率均显著升高,且与剂量相关。

采用 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测细胞早期凋亡率。CCEB 作用 HeLaS3 细胞,在浓度为 120 μ g/mL 时,HeLaS3 细胞早期凋亡率增

加到 20.6%, 在浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HeLaS3 细胞早期凋亡率增加到 36.3%, 结果见图 3: A。Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK (Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK) 是一种可以穿透细胞膜的泛 Caspase 抑制剂 (Cell permeable pan caspase inhibitor), 可以抑制由 Caspase 激活导致的细胞凋亡。从图 3: B 中我们可以看到 Caspase 抑制剂可以显著地抑制 CCEB 引起的细胞早期凋亡, 表明 CCEB 在 HeLaS3 细胞中引起的凋亡可能与 Caspase 的激活有关。

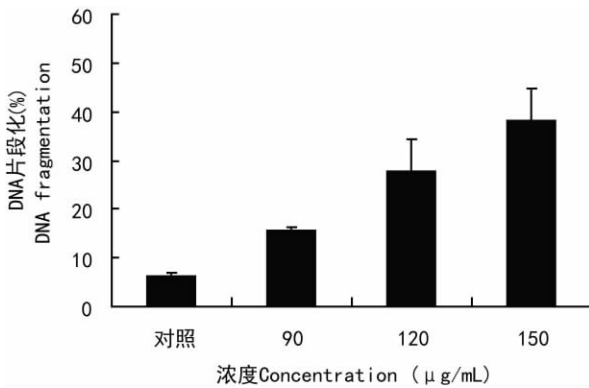


图 2 CCEB 对 HeLaS3 细胞 DNA 片段化的影响
Fig. 2 Effects of CCEB on DNA fragmentation in HeLaS3 cells

2.3 CCEB 对 caspase 依赖性线粒体途径的影响

为考察 CCEB 诱导 HeLaS3 细胞凋亡是否与 caspase 依赖性线粒体途径相关, 检测了 CCEB 对 HeLaS3 细胞 MMP 和细胞内 caspase-8 和 caspase-3 活性的影响。分别用 90、120、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CCEB 处理 HeLaS3 细胞, TMRM 染色, 在流式细胞仪上测定, 计算 MMP 降低细胞的百分率, 结果见图 4。CCEB 导致 HeLaS3 细胞 MMP 下降, 且下降程度与剂量相关。在 CCEB 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 有 42.4% 的细胞出现线粒体膜电位显著下降。然后分别检测 CCEB 对 HeLaS3 细胞 caspase-8 和 caspase-3 活性的影响。浓度为 90、120、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CCEB 作用于 HeLaS3 细胞, 分别导致 caspase-8 和 caspase-3 活性显著增加, 结果见图 5 和图 6。上述结果表明, CCEB 诱导 HeLaS3 细胞凋亡与 caspase 依赖性线粒体途径相关。

2.4 CCEB 对凋亡相关蛋白表达的影响

Bcl-2 家族蛋白包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白, 在细胞凋亡过程中调控细胞色素 c、凋亡诱导因子的释放。采用 Western 印记分析法检测 CCEB 对

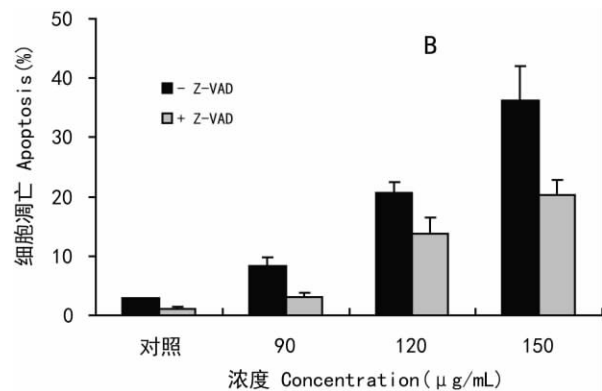
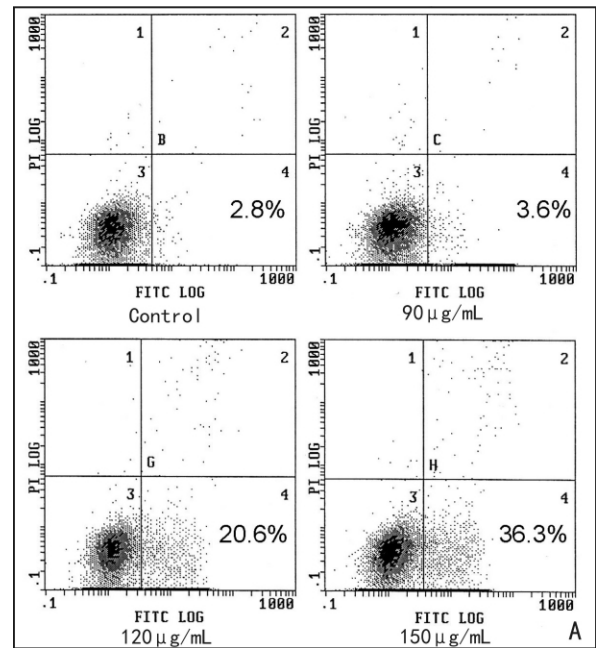


图 3 CCEB 对 HeLaS3 细胞凋亡的影响
Fig. 3 Effects of CCEB on apoptosis in HeLaS3 cells

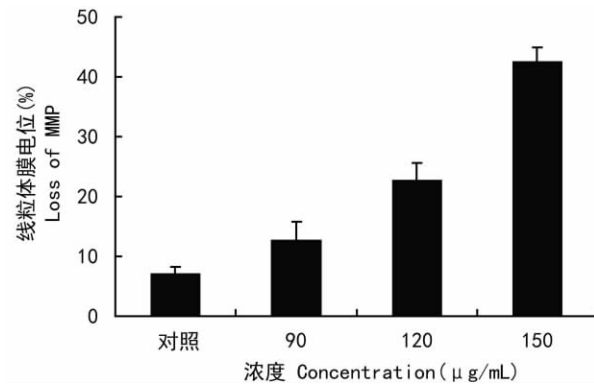


图 4 CCEB 对 HeLaS3 细胞 MMP 的影响
Fig. 4 Effects of CCEB on MMP in HeLaS3 cells

HeLaS3 细胞凋亡相关蛋白表达的影响。与对照组相比, 不同浓度 CCEB 处理 HeLaS3 细胞 24 h 后, Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 和 Bid 蛋白表达减少, 结果如图 7。

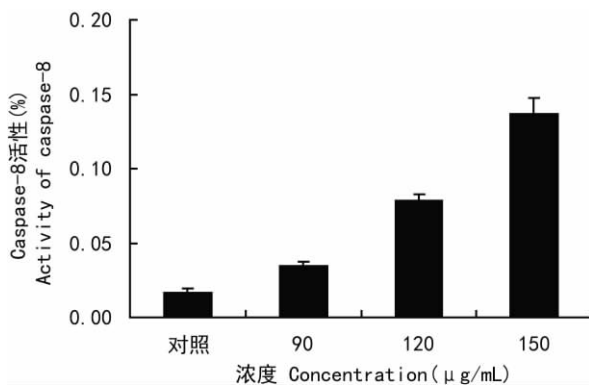


图5 CCEB对HeLaS3细胞内caspase-8活性的影响
Fig. 5 Effects of CCEB on caspase-8 activity in HeLaS3 cells

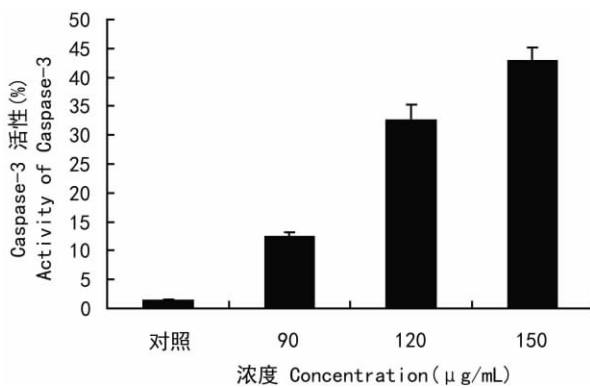


图6 CCEB对HeLaS3细胞内caspase-3活性的影响
Fig. 6 Effects of CCEB on caspase-3 activity in HeLaS3 cells

3 结论与讨论

凋亡是细胞的程序化死亡。凋亡异常(相对减弱)是肿瘤形成和发展的一个重要原因,通过各种途径和方式诱导、增强肿瘤细胞的凋亡是抑制、杀伤肿瘤细胞的重要方面。实验研究结果表明,CCEB具有较强的抑制细胞增殖的作用,并能引起HeLaS3细胞DNA片段化率增大和明显的细胞凋亡形态学的改变,引起HeLaS3细胞早期凋亡率显著增加,同时随CCEB浓度的逐渐增加,HeLaS3细胞凋亡率逐渐升高,呈现出一定的量效关系。

目前普遍认为哺乳动物细胞凋亡主要有两条途径(Green, 2000; Wang, 2001): ①死亡受体途径:即通过死亡配体与相应的位于细胞表面的死亡受体,主要是TNFR家族受体(包括TNFR1、TNFR2、Fas、DR4和DR5等)结合,配体受体结合后死亡受

体细胞内段的死亡域吸引衔接蛋白(如FADD、TRADD)并募集Caspase 8及10的前体,产生有活性的启动Caspase,再激活Caspase 3、6及7等效应Caspase,从而诱导细胞凋亡; ②线粒体途径:各种凋亡信号,如DNA损伤、外来刺激、生长因子去除及部分化疗药物可以诱导线粒体释放细胞色素C等促凋亡多肽进入细胞质,与凋亡蛋白酶激活因子(Apaf-1)结合,募集Caspase 9前体形成凋亡小体,产生具有活性的Caspase 9,再激活下游的Caspase 3效应Caspase诱导凋亡。研究结果显示,CCEB能引起HeLaS3细胞MMP下降、细胞内caspase-8和caspase-3活性增高,另外Caspase抑制剂可以显著地抑制CCEB引起的细胞早期凋亡,表明CCEB可能通过死亡受体途径和线粒体途径引起HeLaS3细胞凋亡。

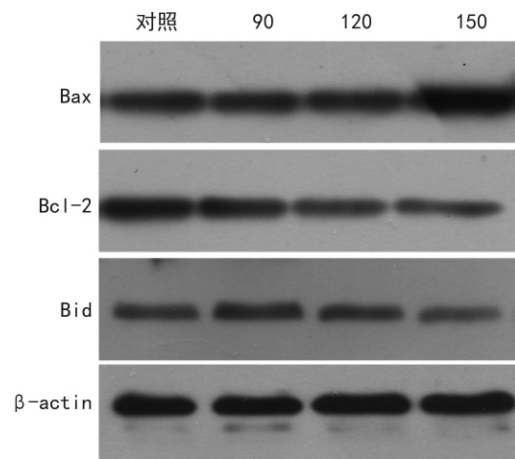


图7 CCEB对凋亡相关蛋白表达的影响
Fig. 7 Effects of CCEB on protein expression related to apoptosis

Bcl-2家族蛋白是以Bcl-2为代表的一组凋亡调节蛋白,能够通过不同的分子机制对线粒体介导的细胞凋亡发挥重要的调控作用。Bcl-2基因蛋白家族对于PT孔的开放和关闭起关键的调节作用,促凋亡蛋白Bax等可以通过与ANT或VDAC的结合介导PT孔的开放,而抗凋亡类蛋白如Bcl-2、Bcl-xL等则可通过与Bax竞争性地与ANT结合,或者直接阻止Bax与ANT、VDAC的结合来发挥其抗凋亡效应(Harris *et al.*, 2000)。有研究发现,发生膜转位Bax在线粒体膜上形成了由四聚体到十聚体组成的低聚复合物,从而在线粒体外膜上形成通道介导细胞色素C的释放,此复合物的形成可被Bcl-2抑制。由上可见,Bax对于细胞色素C的

释放起着关键的作用,在凋亡信号的刺激下 Bax 可从胞质转位到线粒体膜上,从而启动线粒体介导的细胞凋亡。抗凋亡类 Bcl-2 蛋白可以通过阻止促凋亡蛋白在线粒体膜上形成低聚体来发挥其抗凋亡作用(Mikhailov *et al.*, 2001)。Bid 属于促进凋亡的(pro-apoptotic)蛋白。在凋亡途径中,活化的 caspase-8 将胞质中的 Bid 剪切,形成活性分子 tBid (truncated Bid), tBid 进入线粒体,导致细胞色素 c 释放,使凋亡信号放大(Li *et al.*, 1998)。在本研究中, CCEB 能促进 HeLaS3 细胞中 Bax 蛋白表达增加和 Bcl-2 蛋白表达减少。同时 CCEB 能促进 HeLaS3 细胞中 Bid 蛋白活化和细胞内 caspase-8 活性增高。这些结果进一步表明了 CCEB 能通过线粒体途径引起 HeLaS3 细胞凋亡。

参考文献:

- 梁盛业,陆敏珠. 2005. 中国金花茶栽培与开发利用[M]. 北京:中国林业出版社:1
- Green DR. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors[J]. *Cell*, **102**:1-4
- Huang YC(黄燮才). 1994. 金花茶开发利用概况及前景预测[J]. *Chin J Inform TCM(中国中医药信息杂志)*, **1**(6):10-11
- Hopcia KL, McCarey YL, Sylvester FC, *et al.* 1996. Radiation-induced apoptosis in HL60 cells, oxygen effect, relationship between apoptosis and loss of clonogenicity, and dependence of time to apoptosis on radiation dose[J]. *Radiat Res*, **145**:315-323
- Harris MH, Thompson CB. 2000. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability[J]. *Cell Death Differ*, **7**(12):1 182-1 191
- Li H, Zhu H, Xu CJ, *et al.* 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis [J]. *Cell*, **94**:491-501
- Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ. 2001. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane[J]. *J Biol Chem*, **276** (21):18 361-18 374
- Sellins KS, Cohen JJ. 1987. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes[J]. *J Immunol*, **139**:3 199-3 206
- van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP. 1995. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V[J]. *Thromb Haemost*, **73**:172-179
- Wei X(韦霄), Jiang SY(蒋水元), Jiang YS(蒋运生), *et al.* 2006. Research Progress of *Camellia nitidissima*, a Rare and Endangered Plant (珍稀濒危植物金花茶研究进展) [J]. *J Fujian Fore Sci Technol(福建林业科技)*, **33** (3):169-173
- Wang YQ(王永奇), Wu XJ(吴小娟), Li HB(李红冰), *et al.* 2006. Research of *Camellia* on the used to drugs(药用山茶属植物的研究)[J]. *J Dalian Univ(大连大学学报)*, **27** (4):47-58
- Wang X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev*, **15**:2 922-2 933
- Yu DY, Matsuya Y, Zhao QL, *et al.* 2007. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a new synthesized class of furan-fused tetracyclic compounds[J]. *Apoptosis*, **12**(8):1 523-1 532
- Yu DY, Matsuya Y, Zhao QL, *et al.* 2008. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a new synthesized class of benzocycloalkene compounds[J]. *Apoptosis*, **13**(3):448-461
- Costanza R. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital[J]. *Nature*, **387**(15):253-260
- Daly GC. 1997. Nature's Services; Societal Dependence on Natural Ecosystems[M]. Washington DC: Island Press
- Li SN(李少宁), Wang B(王兵), Guo H(郭浩), *et al.* 2007. Assessment of forest ecosystem services value in Dagangshan(大岗山森林生态系统服务功能及其价值评估)[J]. *Sci Soil & Water Cons(中国水土保持科学)*, **5**(6):58-64
- Wang B(王兵), Li SN(李少宁), Guo H(郭浩). 2007. The assessment of forest ecosystem services evaluation in Jiangxi Province(江西省森林生态系统服务功能及其价值评估研究)[J]. *Jiangxi Sci(江西科学)*, **25**(5):553-559, 587
- Wang B(王兵), Wei JS(魏江生), Hu W(胡文). 2009. The assessment of forest ecosystem services evaluation in Qiandongnan of Guizhou Province(贵州省黔东南州森林生态系统服务功能评估)[J]. *J Guizhou Univ: Nat Sci Edit(贵州大学学报·自然科学版)*, **26**(5):42-47, 52
- Zhang LQ(张乐勤), Fang YY(方宇媛), Xu Y(许杨), *et al.* 2011. Service value evaluations of the forest ecosystem in Chizhou(池州森林生态系统服务价值评估与分析)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **31**(4):463-468
- 广西壮族自治区林业勘测设计院. 2005. 广西壮族自治区森林资源连续清查第七次复查报告[R]
- 广西壮族自治区林业勘测设计院. 2008. 广西壮族自治区重点公益林资源与生态状况监测报告[R]
- 王兵, 德永军, 杨锋伟, 等. 2007b. 暖温带森林生态系统定位观测指标体系(LY/T 1689-2007)[S]. 北京:中国标准出版社
- 王兵, 郭泉水, 杨锋伟, 等. 2004. 森林生态系统定位观测指标体系(LY/T 1606-2003)[S]. 北京:中国标准出版社
- 王兵, 李意德, 李少宁, 等. 2007a. 热带森林生态系统定位观测指标体系(LY/T 1687-2007)[S]. 北京:中国标准出版社
- 王兵, 杨锋伟, 郭浩, 等. 2008. 森林生态系统服务功能评估规范(LY/T 1721-2008)[S]. 北京:中国标准出版社
- 张永明. 2008. 云南轿子山自然保护区森林生态系统服务功能及其价值初步研究[J]. *林业建设*, (5):20-24
- Bolund P, Hunhammar S. 1999E. ecosystem services in urban areas [J]. *Ecol Econ*, **29**:293-301

(上接第 51 页 Continue from page 51)

济核算体系,但不能因此忽视森林生态系统服务功能及其价值。

参考文献:

- 广西壮族自治区林业勘测设计院. 2005. 广西壮族自治区森林资源连续清查第七次复查报告[R]
- 广西壮族自治区林业勘测设计院. 2008. 广西壮族自治区重点公益林资源与生态状况监测报告[R]
- 王兵, 德永军, 杨锋伟, 等. 2007b. 暖温带森林生态系统定位观测指标体系(LY/T 1689-2007)[S]. 北京:中国标准出版社
- 王兵, 郭泉水, 杨锋伟, 等. 2004. 森林生态系统定位观测指标体系(LY/T 1606-2003)[S]. 北京:中国标准出版社
- 王兵, 李意德, 李少宁, 等. 2007a. 热带森林生态系统定位观测指标体系(LY/T 1687-2007)[S]. 北京:中国标准出版社
- 王兵, 杨锋伟, 郭浩, 等. 2008. 森林生态系统服务功能评估规范(LY/T 1721-2008)[S]. 北京:中国标准出版社
- 张永明. 2008. 云南轿子山自然保护区森林生态系统服务功能及其价值初步研究[J]. *林业建设*, (5):20-24
- Bolund P, Hunhammar S. 1999E. ecosystem services in urban areas [J]. *Ecol Econ*, **29**:293-301