

· 基础研究 ·

仙鹤草水提液对 SMMC-7721 肝癌细胞的抗癌作用及其机制

邹夏慧, 张焜和[△], 陈江, 黄德强, 祝金泉, 朱莹, 吕农华

(南昌大学第一附属医院消化内科/江西省消化疾病研究所, 南昌 330006)

摘要:目的 体外观察中药仙鹤草的抗肝癌作用, 并初步探讨其机制。方法 制备仙鹤草水提液, 以含不同浓度仙鹤草水提液的细胞培养液培养 SMMC-7721 肝癌细胞, 于不同时间点采用 MTT 法测定细胞活力并计算抑制率(IR), 光镜下观察细胞形态学变化, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 免疫细胞化学染色检测 Bcl-2、P53 蛋白的表达。结果 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞 24、48、72 h 后, 5 mg/mL 组和 10 mg/mL 组无明显细胞生长抑制作用, 20 mg/mL 组的 IR 分别为 0.5%、23.9% 和 27.5%, 40 mg/mL 组的 IR 分别为 23.3%、51.7% 和 71.6%。仙鹤草水提液有效浓度作用 48、72 h 后, 细胞呈现明显的凋亡形态学改变; 20 mg/mL 组的细胞凋亡率分别为 19.5% 和 23.0%, 40 mg/mL 组分别为 33.4% 和 42.7%。20 mg/mL 组的 Bcl-2 蛋白阳性表达率分别为 71.9% 和 58.5%, 40 mg/mL 组分别为 47.9% 和 26.5%。20 mg/mL 组的 P53 蛋白阳性表达率分别为 22.9% 和 50.6%, 40 mg/mL 组分别为 48.7% 和 83.7%。结论 仙鹤草水提液能较明显地抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并呈剂量、时间依赖性, 凋亡发生可能与 Bcl-2 和 P53 蛋白表达改变有关。

关键词: 肝肿瘤; 细胞凋亡; 仙鹤草

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.031

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)32-3929-03

Anti-tumor effects of Agrimonia Pilosa Ledeb. on SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells and its mechanisms

Zou Xiahui, Zhang Kunhe[△], Chen Jiang, Huang Deqiang, Zhu Jinqian, Zhu Xuan, Lv Nonghua

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University/

Jiangxi Institute of Gastroenterology & Hepatology, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To observe the anti-tumor effects of Agrimonia Pilosa Ledeb (APL), a Chinese herbal medicine, on hepatocellular carcinoma cells in vitro and investigate the underlined mechanisms preliminarily. Methods APL water extracts were prepared. SMMC-7721 cells were cultured with the medium containing different concentrations of APL water extracts, and at different time points, cell viabilities were measured by the MTT assay and inhibitory rates (IR) were calculated; cell morphologic changes were observed under a light microscope; apoptotic ratios were measured by flow cytometry; and the expressions of Bcl-2 and P53 proteins were examined by immunocytochemistry. Results After the cells were cultured with the medium containing APL water extracts for 24 h, 48 h and 72 h, no obvious effects were found on the cell proliferation in 5 mg/mL group and 10 mg/mL group, but IR were 0.5%, 23.9% and 27.5% in 20 mg/mL group and 23.3%, 51.7% and 71.6% in the 40 mg/mL group, respectively. In the groups with effects on the cells proliferation, morphological characteristics of apoptosis were obvious, and the cell apoptotic ratios were 19.5% and 23.0% in 20 mg/mL group and 33.4% and 42.7% in 40 mg/mL group at 48 h and 72 h. The expressions of Bcl-2 protein were 71.9% and 58.5% in 20 mg/mL group and 47.9% and 26.5% in 40 mg/mL group at 48 h and 72 h, and the expressions of P53 protein were 22.9% and 50.6% in 20 mg/mL group and 48.7% and 83.7% in 40 mg/mL group at 48 h and 72 h. Conclusion The water extracts of APL are able to inhibit proliferation and induce apoptosis of SMMC-7721 cells dose-time dependently in vitro, which might be associated with the expression changes of Bcl-2 and P53 protein.

Key words: liver neoplasms; apoptosis; Agrimonia Pilosa Ledeb

目前恶性肿瘤的药物治疗以化学药品为主, 其开发费用昂贵, 不良反应大。中草药是我国医药的一大特色, 具有多靶点、多效应、毒副作用低、提高机体免疫力、调节内分泌功能、不易产生耐药性等独特优点, 在肿瘤治疗中正日益受到重视^[1]。仙鹤草是蔷薇科植物龙牙草 (*agrimonia pilosa leddeb.*, APL) 的地上部分, 含有酚、酯、黄酮、鞣质、糖苷、有机酸、挥发油、三萜皂苷等化学成分, 具有抗肿瘤、降血糖、镇痛抗炎、止血等多方面的药理作用^[2]。体外试验显示仙鹤草对胃癌、肠癌、食管癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌细胞株的生长都具有抑制作用^[3-4], 配伍用于中药方剂治疗肺癌也有一定的临床疗效^[5]。实验研究显示, 仙鹤草体内外都具有显著的抗肝癌作用^[6-8], 与介入治疗联合应用可提高肝癌的临床疗效^[9], 也是慢性肝病中医临症的要药

之一。因此, 仙鹤草的抗肝癌作用值得深入研究。体外研究常用的人肝癌细胞株有 SMMC-7721、HepG2 和 BEL-7402 等, 不同的肝癌细胞株具有不同的来源背景和生物学特性^[10], 其中 SMMC-7721 肝癌细胞是建株于国人的中分化肝细胞癌, 广泛应用于肝癌的实验研究。有关仙鹤草抗肝癌作用的实验研究主要限于 HepG2 和 BEL-7402 肝癌细胞系和一个研究组^[6-8]。本研究观察仙鹤草水提液对人 SMMC-7721 肝癌细胞生长和凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制, 旨在进一步为仙鹤草在肝癌治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方

1.1 仙鹤草水提液的制备 取中药仙鹤草 100 g, 加入约 10 倍体积的蒸馏水, 煮沸 1 h, 取药液, 再加等量的蒸馏水, 煮沸 1

h, 取药液。合并两次药液, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液浓缩为 80 mL, 过滤除菌, 4 ℃ 保存, 使用前用 RPMI 1640 培养液 (Hyclone 公司) 稀释为所需浓度。提取液按生药计为 1.25 g/mL。

1.2 SMMC-7721 肝癌细胞复苏与传代培养 复苏 SMMC-7721 肝癌细胞(本研究所冻存), 接种于含 10% 灭活胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司)的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度下培养, 24 h 后更换培养液。每天倒置显微镜下观察细胞, 视生长情况每 1~3 天换液 1 次, 并传代培养。

1.3 实验分组 按 RPMI 1640 培养液中的仙鹤草水提液浓度设 4 个实验组(5、10、20、40 mg/mL 组)进行实验, 同时设立对照组(不加药液), 于培养后 24、48 和 72 h 分别观察仙鹤草水提液对 SMMC-7721 细胞的作用。

1.4 仙鹤草水提液对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的影响 将对数生长期的 SMMC-7721 细胞用 0.25% 胰蛋白酶(上海生工生物工程有限公司)溶液消化, 收获细胞并用 RPMI 1640 培养液制成单细胞悬液, 计数细胞, 将细胞浓度调整为 5×10^4 /mL。以每孔 10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板(Biofil 公司), 每组设 4 个复孔。待细胞生长良好, 达孔底面积的 2/3 时, 吸去培养液, 加入不同浓度的仙鹤草水提液 RPMI 1640 培养液, 继续培养。于培养 24、48 和 72 h 时分别每孔加入噻唑蓝(MTT, 北京奇华盛生物技术有限公司)溶液(5 mg/mL) 20 μ L, 继续孵育 4 h, 吸弃孔内培养液, 加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO, 上海化学试剂厂), 震荡 10 min, 测定各孔光密度值(OD)。计算各组的平均 OD 值及细胞生长抑制率(IR): $IR = [(对照组平均 OD 值 - 实验组平均 OD 值) / 对照组平均 OD 值] \times 100\%$ 。实验重复 3 次, 计算平均抑制率。根据 MTT 结果, 选取有效浓度组及有效时间点进行后续试验。

1.5 仙鹤草水提液诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的观察

1.5.1 形态学观察 根据 MTT 结果, 制备有效浓度组及有效时间点的细胞爬片, 常规 HE 染色, 光镜下观察结果。凋亡细胞表现为核染色质致密浓缩, 核碎裂、边聚等, 或可见凋亡小体。

1.5.2 流式细胞仪检测 采用膜联蛋白 V(Annexin V)/碘化丙啶(PI)双染法检测细胞凋亡。消化收获仙鹤草水提液有效浓度组和时间点的细胞, 制备单细胞悬液, 按每管 1×10^6 个细胞分装于离心管中, 加入 5 μ L Annexin V、10 μ L PI、100 μ L 工作缓冲液, 混匀, 4 ℃ 冰箱中放置 30 min, 取出离心管, 再加入 400 L 工作缓冲液, 用流式细胞仪(FACSC alibur 型)测定细胞

凋亡率。同时设立对照。

1.6 仙鹤草水提液对 SMMC-7721 肝癌细胞 Bcl-2、P53 蛋白表达的影响 分别制备仙鹤草水提液有效浓度组和有效时间点的细胞爬片。免疫细胞化学染色法检测 Bcl-2 蛋白和 P53 蛋白(鼠抗人 Bcl-2 蛋白单克隆抗体, 鼠抗人 P53 蛋白单克隆抗体, 免疫组化染色试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品), 操作步骤按试剂说明书进行。光镜下观察染色结果: Bcl-2 蛋白阳性细胞表现为胞浆、胞膜着色呈棕黄色, P53 蛋白阳性细胞表现为胞核着色呈棕黄色; 每张爬片高倍镜下观察 5 个视野, 计算阳性细胞率及其均值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行统计分析。组间 OD 值、阳性细胞率的差异比较采用单因素方差检验, 两两比较采用 LSD 检测, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后 MTT 检测结果 不同浓度的仙鹤草水提液作用于 SMMC-7721 肝癌细胞后 MTT 法测定结果显示, 5 mg/mL 组对细胞生长无明显抑制作用; 10 mg/mL 组作用 72 h 才出现弱抑制作用; 20 mg/mL 组作用 48 h 后出现抑制作用; 40 mg/mL 组作用 24 h 后即出现抑制作用, 至 72 h 时作用明显。见表 1。

2.2 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后形态学观察结果 MTT 结果显示 20 mg/mL 组和 40 mg/mL 组作用 48 h 和 72 h 后细胞生长活性受到明显抑制, 故选择此两组的两个时间点制备相应的细胞爬片, HE 染色后光镜观察。对照组细胞呈多边形、三角形或梭形, 细胞均质而透明, 胞核轮廓明显。仙鹤草作用组可见细胞凋亡的形态学特征: 细胞核浓缩, 核染色致密, 可观察到新月体结构形成; 高浓度药物作用后, 细胞完全失去正常形态, 胞核固缩明显。见图 1。

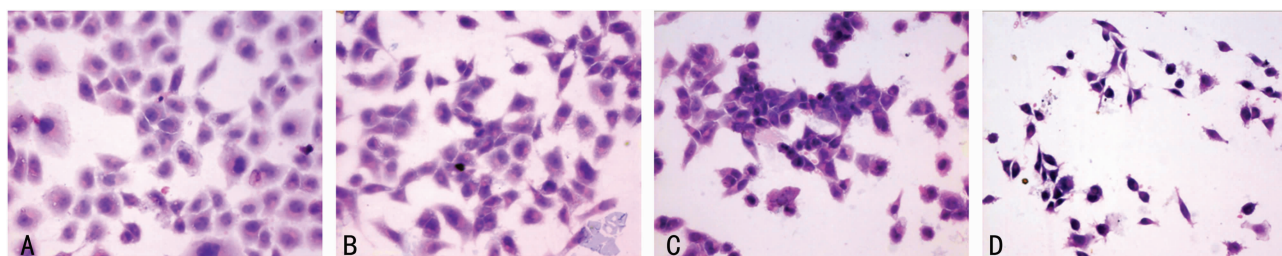
2.3 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后流式细胞仪分析结果 选择对细胞生长抑制作用明显的 20 mg/mL 组和 40 mg/mL 组进行实验, Annexin V 与 PI 双标记后进行流式细胞仪分析。结果显示, 仙鹤草水提液作用 48 h 和 72 h 后可见较明显的细胞凋亡, 20 mg/mL 组的细胞凋亡率分别为 19.5% 和 23.2%, 40 mg/mL 组的细胞凋亡率分别为 33.4% 和 42.7%, 对照组分别为 4.0% 和 8.8%。

2.4 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后 Bcl-2、P53 蛋白表达的结果 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后, 免疫细胞化学染色显示 Bcl-2 蛋白表达下调, 而 P53 蛋白表达上调。见表 2、图 2。

表 1 仙鹤草水提液对 SMMC-7721 肝癌细胞的生长抑制作用

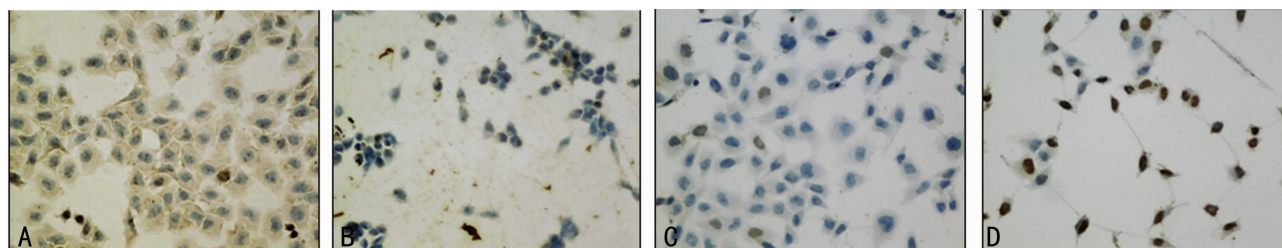
组别	时间点					
	24 h		48 h		72 h	
	OD($\bar{x} \pm s$)	IR(%)	OD($\bar{x} \pm s$)	IR(%)	OD($\bar{x} \pm s$)	IR(%)
5 mg/mL 组	0.92 \pm 0.09	-10.3	0.99 \pm 0.19	3.6	1.0 \pm 0.06	9.7
10 mg/mL 组	0.96 \pm 0.10	-14.9	0.99 \pm 0.16	2.9	0.95 \pm 0.09	13.5
20 mg/mL 组	0.83 \pm 0.08	0.5	0.78 \pm 0.15	23.9	0.82 \pm 0.10	27.5
40 mg/mL 组	0.70 \pm 0.18	23.3	0.50 \pm 0.13	51.7	0.32 \pm 0.24	71.6
对照组	0.84 \pm 0.06	-	1.02 \pm 0.20	-	1.03 \pm 0.30	-

—: 此项无数据。



A: 对照组; B: 20 mg/mL 组 (48 h); C: 40 mg/mL 组 (48 h); D: 40 mg/mL 组 (72 h)。

图 1 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后的形态学变化 (HE 染色 × 200)



A: 对照组 Bcl-2 蛋白免疫细胞化学染色 (72 h); B: 40 mg/mL 组 Bcl-2 蛋白免疫细胞化学染色 (72 h); C: 对照组 P53 蛋白免疫细胞化学染色 (72 h); D: 40 mg/mL 组 P53 蛋白免疫细胞化学染色 (72 h)。

图 2 仙鹤草水提液作用后 Bcl-2、P53 蛋白免疫细胞化学染色结果 (苏木精复染 × 200)

表 2 仙鹤草水提液作用后 Bcl-2、P53 蛋白的表达率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 蛋白阳性细胞率 (%)		P53 蛋白阳性细胞率 (%)	
	48 h	72 h	48 h	72 h
20 mg/mL 组	71.9 ± 4.1*	58.5 ± 5.3*	22.9 ± 2.3*	50.6 ± 4.0*
40 mg/mL 组	47.9 ± 4.7*	26.5 ± 5.7*	48.7 ± 4.4*	83.7 ± 3.2*
对照组	93.4 ± 4.5	85.8 ± 3.0	8.8 ± 0.5	9.2 ± 1.3

*: $P < 0.01$, 与同时点对照组比较。

3 讨 论

临床上中药最常用煎剂。本研究采用煮沸加热方法提取仙鹤草中的有效成分进行抗肿瘤实验, 贴近临床实用。有研究报道^[11], 仙鹤草水提液没有急性毒性和遗传毒性, 安全性好。

本研究采用仙鹤草水提液体外作用于 SMMC-7721 肝癌细胞, 发现其具有较明显的抗肝癌细胞增殖作用。形态学观察可见细胞变小变圆, 细胞数明显少于对照组。仙鹤草水提液对肝癌细胞的抑制呈现典型的时间和剂量依赖特点。

仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后 HE 染色, 光镜下可见细胞呈典型的凋亡形态学改变。进一步应用 Annexin V/PI 双染法流式细胞仪分析, 实验组的细胞凋亡率明显高于对照组, 并呈剂量和时间依赖性。表明诱导细胞凋亡, 可能是仙鹤草抗肝癌细胞的主要机制之一。凋亡受阻是肿瘤的发生机制之一。研究表明, 不少抗肿瘤中药都可通过干扰肿瘤细胞生长、代谢、增殖等过程, 最终触发肿瘤细胞凋亡来达到治疗目的^[1]。调控细胞凋亡的相关基因很多, 其中 Bcl-2 和 P53 为两个经典的凋亡相关基因, 前者抑制细胞凋亡, 后者促进细胞凋亡。Bcl-2 蛋白可能是通过防止线粒体通透性改变, 阻止细胞色素 C 释放等一系列凋亡级联反应, 从而抑制凋亡^[12]。野生型 P53 是重要的细胞周期与细胞凋亡调控基因之一, 参与维持细胞周期的正常运行, 保证 DNA 复制的精密性^[13]。

常态下的 SMMC-7721 肝癌细胞 Bcl-2 蛋白过表达^[14], P53 蛋白为恒量表达, 未发现该细胞株存在 P53 基因突变, 而凋亡增加时, Bcl-2 蛋白表达下调, P53 蛋白上调^[15]。本研究结

果显示, 仙鹤草水提液作用 SMMC-7721 肝癌细胞后, Bcl-2 蛋白表达明显下降, P53 蛋白的表达明显升高, 且呈剂量、时间依赖性, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示仙鹤草诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡可能是通过下调抗凋亡基因 Bcl-2 表达、上调抑癌基因 P53 表达来实现的。

综上所述, 仙鹤草水提液达到一定浓度时, 在体外能明显的抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡可能是其效用的基础, 凋亡机制可能与 Bcl-2 蛋白表达下调和 P53 蛋白表达上调有关。深入研究仙鹤草的抗肝癌作用及其分子机制, 对于促进其在肝癌治疗的应用和丰富肝癌的临床治疗方法具有重要意义。

参考文献:

- [1] 邹夏慧, 张焜和. 中药抗肿瘤分子机制的研究进展[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2005, 32(1): 17-19.
- [2] 洪阁, 戴永红, 刘培勋, 等. 仙鹤草化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学服务与研究, 2008, 8(2): 362-366.
- [3] 吴琳华, 郭劲柏, 刘红梅, 等. 仙鹤草注射液对人癌细胞生长抑制作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(5): 297-298.
- [4] 温雅, 毕雷, 张义彪, 等. 仙鹤草水提液对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用[J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 33-35.
- [5] 陆真权, 陈焕伟. 鹤蟾片合盖诺、顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(13): 1730-1731.
- [6] 武晓丹, 金哲雄, 宛春雷, 等. 仙鹤草诱导肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的研究[J]. 航空航天医药, 2010, 21(6): 844-846.
- [7] 武晓丹, 金哲雄, 宛春雷, 等. 仙鹤草醋酸乙酯有效部位体外诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及其机制研究[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 119-122.
- [8] 宛春雷, 金哲雄. 仙鹤草草质成分的抗肿瘤作用研究[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(1): 29-31. (下转第 3934 页)

的作用是通过与 HIF-1 α 的 bHLH-PAS 功能域相结合,发挥分子伴侣的作用,通过使 HIF-1 α 降解减少,使得 HIF-1 α 在胞核内短时间大量聚集,顺利地发挥 HIF-1 α 促红细胞再生,促进糖酵解关键酶的生成以使机体更有效地利用氧以及促进血管再生的生物功能。而本研究则在此基础上更进一步地深入了解了不同复苏液体对于心肌组织内 HSP90 α 表达的影响,以发掘出更为安全有效的复苏液体类型。从研究结果中可以看出,相同程度失血性休克后,不同类型液体进行复苏,能够明显地影响 HSP90 α 表达从而进一步产生对 HIF-1 α 产生过程的影响,本研究中,大鼠心肌组织中 HSP90 α 蛋白的表达明显不同,同时各组大鼠的存活率也不同。其中以 HSD 组 HSP90 α 表达最强且持续时间最久,HES 组其次,而 LR 组表达弱且持续时间较短,同时各组大鼠存活率比较 LR 组长于 HES 组长于 HSD 组。这说明了此 3 种复苏液体中 LR 能够最有效地复苏失血性休克机体,机制尽管可能是多方面的,但本研究说明其能有效地保护心肌组织,以更早、更有效地恢复机体的有效循环,HES 组次之,而 HSD 组效果则不如前二者。此前尽管有报道认为,7.5%高渗氯化钠能提高血清渗透压,将组织间隙的液体吸入血管床,有较好的血流动力学效果^[9],还可促进肿胀内皮的液体回流,改善微循环,提高组织灌注,同时抑制中性粒细胞释放炎症细胞因子^[10-14]。但至少本研究表明在重度失血性休克的机体中,其发挥的功效远不如 HES 和 LR,作者考虑由于高渗氯化钠含有大量的氯离子,大量输注后会引引起高氯性酸中毒,可能是其复苏效果不如另外两者的原因之一,另外其他方面的原因尚需要进一步的了解,因此在对机体复苏时应用应该适当地进行限制。此外在选择复苏液体时,每一种复苏液体的用量也是值得考虑的问题,有学者提倡在保证机体有效循环灌注的前提下,给予延迟(限制性)液体复苏^[15],这方面的具体机制仍需做进一步的研究以证实。另外不同的复苏液体到底是通过何种信号途径来对心肌组织内 HSP90 α 的表达产生变化并进而对整个机体产生影响的,这也是下一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 蒋荣成,吕志诚. 失血性休克液体复苏研究的新进展[J]. 中国急救医学,2004,24(6):432-433.
- [2] 刘智舜,王筑生. 高渗氯化钠在低血容量休克中的作用[J]. 中华医学写作杂志,2000,7(6):661-662.
- [3] 陈耀清,江宗贤,张彩文,等. 闭合性腹部多脏器 26 例分析[J]. 衡阳医学院学报,1999,20(12):1094-1096.
- [4] 陈星宇,杨晓鲲. 缺氧诱导乳鼠心肌细胞 hsp90 表达及变化[J]. 兰州大学学报:医学版,2007,33(2):17-20.
- [5] 党永明,黄跃生,陈丽峰. 烫伤诱导大鼠心肌细胞缺氧诱导因子-1 α 定位表达的研究[J]. 第三军医大学学报,2003,25(18):1602-1605.
- [6] 李涛,刘良明,刁有芳,等. 几种不同液体复苏失血性休克大鼠的适宜量研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(3):199-202.
- [7] 马计,张端莲,高凌,等. 糖尿病大鼠心肌组织中 Survivin 蛋白表达的影响[J]. 数理医药学杂志,2008,21(2):154-156.
- [8] Csermely P, Schnaider T, Soti C, et al. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review[J]. Pharmacol Ther, 1998,79(2):129-168.
- [9] Doyle JA, Davis DP, Hoyt DR. The use of hypertonic saline in the treatment of traumatic brain injury[J]. Trauma, 2001,50(2):367-383.
- [10] Emin KA, VijayVK. Effects of hypertonic dextran in hypovolemic shock: a prospective clinical trial[J]. Injury, 2004,35(5):500-506.
- [11] Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, et al. Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock[J]. J Trauma, 2003,54(6):1137.
- [12] 余伶俐,简道林,吕作均. 高渗高胶液对失血性休克大鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中华医学杂志,2006,30(4):309-310.
- [13] 周小洁,潘景业,金可可,等. 失血性休克再灌注大鼠血液 NO、NOS 的改变和丹参的作用[J]. 浙江临床医学,2005,7(7):676-677.
- [14] 李秀梅,王蕾,甘子明,等. 大鼠失血性休克及再灌注后小动脉的形态学改变[J]. 新疆医科大学学报,2006,29(11):1047-1049.
- [15] Kim SH, Safar P, Capone A, et al. Hypothermia is and minimal fluid resuscitation increase survival after uncontrolled hemorrhagic shock in rat[J]. J Trauma, 1997,42(2):213-222.
- [13] Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide[J]. Oncogene, 2004,23(16):2809-2818.
- [14] 袁丽华,郭武华,肖志华,等. SUMO-1 基因沉默对肝癌细胞株 SMMC-7721 bcl-2 及 c-myc 基因表达的影响[J]. 重庆医学,2010,39(19):2578-2580.
- [15] Song G, Luo Q, Qin J, et al. Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells[J]. Colloids Surf Biointerfaces, 2006,48(1):1-5.

(收稿日期:2013-07-08 修回日期:2013-08-13)

(上接第 3931 页)

- [9] 张亚密,彭轶霞,管宏钟. 山仙颗粒合并介入疗法治疗肝癌观察[J]. 陕西中医学院学报,2005,28(1):31-32.
- [10] 高英堂,张世光,宋文芹,等. 四株肝癌细胞系的抑癌基因甲基化谱分析[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5(11):3137-3140.
- [11] 陆英,张洁. 仙鹤草水提物急性毒性和遗传毒性实验研究[J]. 长春中医药大学学报,2011,27(5):709-711.
- [12] Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. IUBMB Life, 2008,60(6):390-397.

(收稿日期:2013-07-14 修回日期:2013-08-03)