

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.03.017

龙葵碱联合 VEGF 抗体对人结肠癌鸡胚移植模型血管生成的影响*

杨雪峰, 邓冬雪, 张桃, 宁伟伟, 郑兴斌, 谢铭[△]

(遵义医学院附属医院胃肠外科, 贵州遵义 563003)

[摘要] **目的** 建立人结肠癌鸡胚移植模型, 探讨龙葵碱、VEGF 抗体及两者联合对人结肠癌细胞诱导肿瘤血管生成及肿瘤增殖的影响。**方法** 将人结肠癌 HT-29 细胞鸡胚移植模型分为实验组和对照组, 实验组加入龙葵碱、VEGF 抗体和龙葵碱+VEGF 抗体混合液, 对照组加入磷酸盐缓冲液(PBS)液。通过立体显微镜照相、IPP 6.0 图像分析软件分析图片; 免疫组织化学方法检测 CD34 抗原和 ki-67 抗原, 观察龙葵碱、VEGF 抗体和龙葵碱联合 VEGF 抗体对肿瘤血管生成及肿瘤增殖的影响。**结果** 肿瘤血管面积、CD34 抗原和 ki-67 抗原表达: 龙葵碱+VEGF 抗体组明显优于单药 VEGF 抗体组和龙葵碱组, VEGF 抗体组优于龙葵碱组, 3 组均明显优于对照组($P < 0.01$)。**结论** 龙葵碱、VEGF 抗体及两者联合时均能抑制人结肠癌 HT-29 细胞系诱导的肿瘤血管生成及肿瘤增殖, 为抗肿瘤血管生成提供了一种新途径。

[关键词] 龙葵碱; 人结肠癌 HT-29 细胞; VEGF 抗体; 肿瘤血管生成; CAM

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)03-0342-03

Effect of angiogenesis on Solanine and VEGF antibody in chicken embryo transplantation model of human colon cancer cells*

Yang Xuefeng, Deng Dongxue, Zhang Tao, Ning Weirui, Zheng Xingbin, Xie Ming[△]

(Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[Abstract] **Objective** To establish model of the chicken embryo transplantation of human colon cancer cells, and investigate the effect of Solanine, VEGF antibody and Solanine combined with VEGF antibody on human colon cancer cells induce tumor angiogenesis and tumor proliferation. **Methods** The model of the chicken embryo transplantation of human colon cancer HT-29 cells were divided into three experimental group and control group. We added to the chick embryo chorioallantoic membrane with Solanine, VEGF antibody and Solanine + VEGF antibody mixture, PBS was added to the control group. Then we analysed picture through the stereomicroscope and IPP 6.0 image analysis software, using immunohistochemistry envision method to detect of CD34 antigen and ki-67 antigen, and observing effect of Solanine group, VEGF antibody group, Solanine + VEGF antibody group and the effect on the tumor angiogenesis and tumor proliferation. **Results** The tumor angiogenesis, CD34 antigen and ki-67 antigen of Solanine + VEGF antibody group were significantly better than those of VEGF antibody group and Solanine group ($P < 0.01$); VEGF antibody group had statistical significant difference with Solanine group ($P < 0.01$); the effect of other three groups were better than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Solanine, VEGF antibody and Solanine combined with VEGF antibody could inhibit tumor angiogenesis and tumor proliferation of human colon cancer cell line HT-29 to induce. It provides a new way for anti-angiogenesis.

[Key words] solanine; HT-29 human colon cancer cells; VEGF antibody; tumor angiogenesis; chick embryo chorioallantoic membrane

结直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤, 其发生、发展、侵袭及转移与肿瘤血管生成密切相关。寻找高效、低毒的血管生成抑制剂是抗肿瘤血管生成的热点之一。作为传统中草药龙葵, 其提取物龙葵碱, 在抗肿瘤作用方面已取得较好的研究成果^[1]; 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管形成最为关键的刺激因子, 其抗体已证实具有抑制血管生成的作用^[2]。为探究龙葵碱、VEGF 抗体及两者联合应用对人结肠癌肿瘤血管生成及肿瘤增殖影响效果, 本研究应用鸡胚绒毛尿囊膜(chick embryo chorioallantoic membrane, CAM)模型, 研究龙葵碱与 VEGF 抗体对人结肠癌 HT-29 细胞系诱导的肿瘤血管生成及移植瘤的影响。

1 材料与方

1.1 材料 人结肠癌细胞系 HT-29 细胞株遵义医学院中心实验室提供。实验试剂 RPMI 1640 培养基、南美胎牛血清、胰蛋白酶均为 Hyclone 公司产品。龙葵碱(纯度 95%)购自陕西慈缘生物技术有限公司; 兔抗人 VEGF 多克隆抗体购自北京

博奥森生物有限公司。受精鸡蛋购自广东南雄养鸡场, 每个平均 55~60 g, 孵化机购自德州德兴孵化设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HT-29 细胞生长于含 10% 灭活胎牛血清 RPMI 1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的恒温培养箱中培养, 3~5 d 传代 1 次, 实验时采用对数生长期的细胞。

1.2.2 鸡胚孵育 将受精鸡蛋在高锰酸钾液中消毒后, 气室向上置于温度为 38.2 °C、湿度 60% 的孵化器孵育, 每天翻蛋 1 次。选取 9 d 后孵育成功的鸡胚, 作为实验备用。

1.2.3 试剂配制 龙葵碱液的配制: 将纯度 95% 的龙葵碱 5 mg 溶于 1 mL 二甲亚砜(DMSO)液中, 用 pH7.4、0.01 M 磷酸盐缓冲液(PBS)999 mL 调整含龙葵碱的 DMSO, 使 DMSO 液在 0.1% 以下, 抽取 100 mL 含龙葵碱的 PBS 液溶于 2 mL 的 PBS 液, 配置成剂量为 250 μg/mL 的龙葵碱, 无菌保存备用。VEGF 抗体液的配制: 将 1 mg VEGF 抗体溶于 1 mL PBS 液中, 取 100 μL 溶于 900 μL PBS 液, 配制成 100 μg/mL

* 基金项目: 贵州省卫生厅科学技术基金(gzkwj2012-1-112); 遵义医学院中青年基金(院字[2009]号)。 作者简介: 杨雪峰(1973-), 副主任医师, 硕士, 主要从事消化道肿瘤的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: 2581303091@qq.com。

VEGF 抗体液, 无菌保存备用。

1.2.4 明胶海绵制备 将明胶海绵剪成大小约 0.5 mm×0.5 mm, 无菌保存备用。

1.2.5 人结肠癌鸡胚移植模型的建立 (1)CAM 制备, 参照 1993 年付生法的方法并加以改进, 在照蛋器下, 选取孵育至 9 d 生长较好的鸡胚, 距胎头下方 0.5~1.0 cm 处划定开窗位置, 其大小约 1.0 cm×1.0 cm, 予 75% 乙醇消毒后置于超净台中, 改进方面用无菌锯片在鸡胚上沿划定的开窗大小轻轻划开, 用无菌眼科镊沿开口打开蛋壳, 用 5 mL 的无菌注射器刺破卵壳膜, 并加无菌生理盐水 1 滴使卵壳膜与 CAM 分离, 制造人工气室去除卵壳膜暴露 CAM。(2)HT-29 细胞接种, 取生长对数期的细胞, 消化、离心(1 000 r/min, 5 min, 15~18 ℃), 用 PBS 调整细胞数为 4×10^6 , 以制作好的明胶海绵为载体, 取 20 μ L HT-29 细胞悬液接种于鸡胚 CAM 相对无血管区域。用无菌封口膜封口, 置于孵化机继续孵育。

1.2.6 给予不同类型试剂 将接种 HT-29 细胞的鸡胚于继续孵育后的第 2 天, 分为实验组 3 组(龙葵碱组、VEGF 抗体组、龙葵碱+VEGF 抗体组, $n=10$)和对照组($n=10$), 去除封口膜后分别加入剂量为 250 μ g/mL 的龙葵碱, 100 μ L/mL 的 VEGF 抗体各 20 μ L, 以及 250 μ g/mL 的龙葵碱+100 μ L/mL 的 VEGF 抗体各 10 μ L; 对照组给予等量的 PBS。封口膜封口后继续孵育 5 d, 每天观察鸡胚的生长情况及血管特性。

1.2.7 固定取膜 给药第 5 天后, 用 4% 的甲醛溶液原位固定移植瘤 15~20 min, 以接种区为中心用眼科镊剪下 CAM, 平铺于平皿中立体显微镜拍照, 收集 CAM 上移植瘤血管图片, 用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件处理图像, 收集数据; 取下的移植瘤常规石蜡包埋、切片, 采用 Envision 二步法, 检测移植瘤 CD34 抗原标记的肿瘤微血管密度(MVD)和 ki-67 抗原表达指数反应肿瘤增殖。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 版统计软件包, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

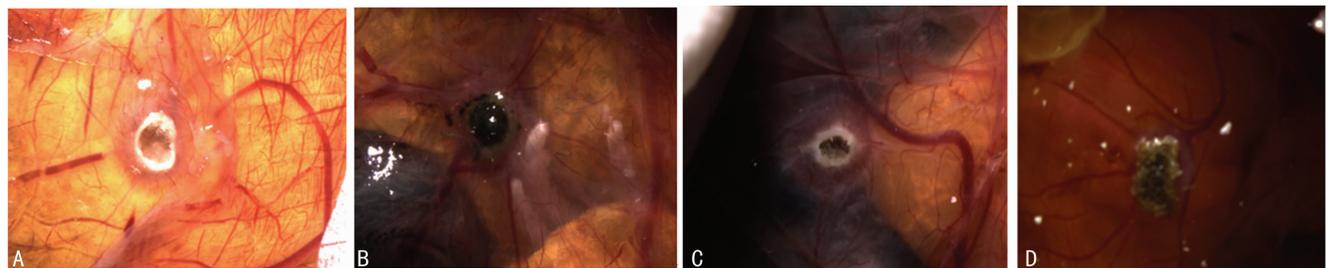
2 结 果

2.1 HT-29 细胞移植后肿瘤新生血管的生成 对照组中, 接种 HT-29 细胞 24 h 内, 细胞呈淡白色黏附于 CAM 接种区, 除 CAM 上原有的正常血管外, 未见明显的血管变化; 2 d 后接种区域的癌细胞开始聚集, 并可见少量微细的血管向瘤体集中。3~5 d 后大量的新生血管向肿瘤组织接近, 呈放射状, 排列紊乱, 部分血管长入或跨越瘤体表面, 移植瘤迅速生长, 直径可达 5 mm, 瘤体也由最初的苍白色变成深褐色, 部分瘤体表面有白色小点, 见图 1。



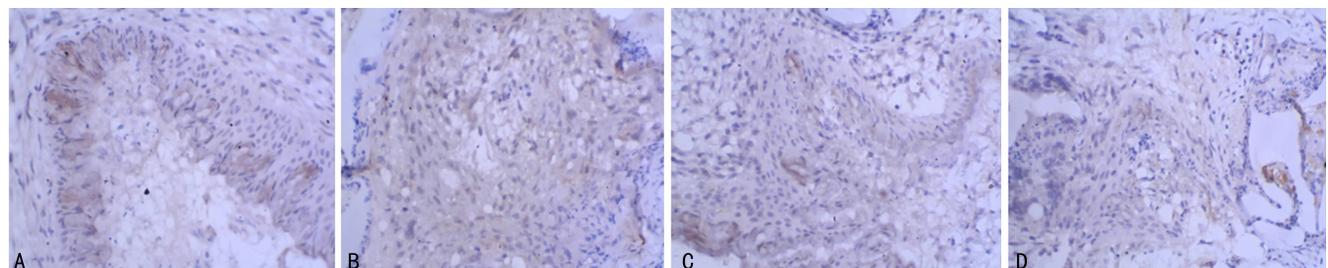
图 1 HT-29 细胞移植后肿瘤新生血管的生成 (5 d 甲醛固定)

2.2 龙葵碱、VEGF 抗体和龙葵碱联合 VEGF 抗体对肿瘤新生血管面积的影响 在实验组中, 应用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件定量处理图片和收集数据后, 得出龙葵碱组 (8.92 ± 0.79)、VEGF 抗体组 (5.07 ± 0.30) 及龙葵碱+VEGF 抗体组 (3.40 ± 0.20) 与对照组 (22.91 ± 1.45) 比较, 肿瘤血管新生面积均减少, VEGF 抗体组优于龙葵碱组, 龙葵碱+VEGF 抗体组明显优于龙葵碱组和 VEGF 抗体组, 上述差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2。



A: 对照组; B: 龙葵碱组; C: VEGF 抗体组; D: 龙葵碱+VEGF 抗体组。

图 2 不同类型试剂血管新生面积



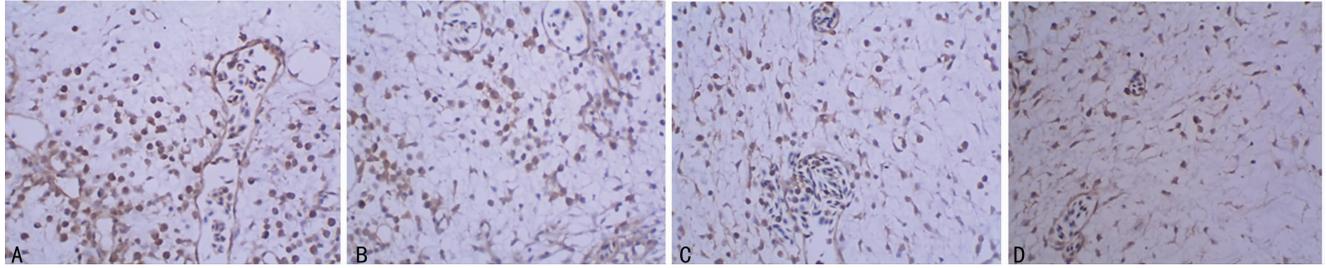
A: 对照组; B: 龙葵碱组; C: VEGF 抗体组; D: 龙葵碱+VEGF 抗体组。

图 3 不同类型试剂 CD34 的表达 (Envision $\times 100$)

2.3 龙葵碱、VEGF 抗体和龙葵碱联合 VEGF 抗体对 MVD 的影响 免疫组织化学显示 CD34 标记 MVD: 龙葵碱组

(16.4±3.51)、VEGF 抗体组(14.9±2.54)和龙葵碱+VEGF 抗体组(12.6±2.39)与对照组(37.83±4.03)比较,MVD 值均降低,VEGF 抗体组优于龙葵碱组,龙葵碱+VEGF 抗体组明显优于龙葵碱组和 VEGF 抗体组($P<0.01$),与血管新生面积的结果相一致,见图 3。

2.4 龙葵碱、VEGF 抗体和龙葵碱+VEGF 抗体对 ki-67 抗原



A: 对照组; B: 龙葵碱组; C: VEGF 抗体组; D: 龙葵碱+VEGF 抗体组。

图 4 不同类型试剂 ki-67 的表达 (Envision $\times 100$)

3 讨 论

CAM 已成为经典的研究血管及抗血管形成的理想体内模型。王捷等^[3]应用 CAM 作为载体,研究人乳腺癌细胞血管侵袭机制。本实验通过建立 CAM,动态观察人结肠癌细胞系 HT-29 诱导的肿瘤血管生成及移植瘤生长特点,与于文静等^[4]建立的人大肠癌鸡胚移植模型及诱导的血管生长特性相似。同时,运用建立的 CAM,研究龙葵碱、VEGF 抗体及两者联合应用时对肿瘤血管及移植瘤的影响。

现有的研究证明,龙葵碱可通过多种途径达到抗肿瘤作用。李志雄等^[5]研究发现龙葵碱可诱导 Du145 及 LNCaP 细胞发生凋亡,从而达到抗肿瘤增殖的作用;同样,龙葵碱还可通过升高人乳腺癌 MCF-7 细胞微观系统内管蛋白及微管相关蛋白(MAP-2)的表达,将 MCF-7 细胞阻滞于 S 期,抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖^[6-7]。张卫东等^[8]研究发现龙葵碱可通过减少胃癌 MGC-803 荷瘤小鼠癌细胞钙黏蛋白的表达,干扰 β -Catenin /TCF 复合物的形成,阻断 Wnt/ β -Catenin 信号通路而诱导期凋亡。许扬等^[9]研究显示龙葵给药组药物载体下 CAM 组织周围血管数与对照组比较明显减少,并可见部分大中血管结构受到严重破坏,提示龙葵中含有抗肿瘤血管成分。基于此,本实验研究发现龙葵碱组血管新生面积及 MVD 明显低于对照组,证实了龙葵碱能抑制人结肠癌细胞诱导的肿瘤血管生成;ki-67 抗原表达降低程度,龙葵碱组优于对照组,提示龙葵碱可抑制肿瘤细胞增殖。但这一现象是龙葵碱直接作用于瘤体组织,还是通过抑制肿瘤诱导的新生血管而抗肿瘤作用,或者同时作用于两者的结果,还待进一步研究。

肿瘤血管生成是指肿瘤细胞分泌因子的刺激下,肿瘤血管生成相关因子被激活或者诱导生成形成血管,它能加速实体肿瘤生长、侵袭与转移^[10]。VEGF 是公认的直接作用于血管内皮细胞的最强生长因子,与肿瘤的发生、发展存在密切关系。李贵新等^[11]研究发现乳腺癌组织中 p53 基因和 VEGF 之间存在正相关性,在 p53 和 VEGF 同时阳性的肿瘤中,其 MVD 明显增高,且易发生颈淋巴结转移。因此,通过下调 VEGF 的表达,抑制肿瘤新生血管生成,降低 MVD 值,可达到抗肿瘤增殖作用。VEGF 抗体,作为 VEGF 特异性抗体,已被证实能明显抑制肿瘤血管生成。郑青平等^[12]研究证实了 VEGF 抗体能使肝癌组织中 VEGF 表达下降,抑制肿瘤血管因子的生成。李明娥等^[13]研究表明抗 VEGF121 抗体能够有效降低肿瘤组织中 MVD,抑制裸鼠体内浆液性卵巢癌下移植肿瘤的血管形

的影响 ki-67 抗原表达反应肿瘤增殖程度:龙葵碱组(24.74±2.31)、VEGF 抗体组(22.07±1.77)、龙葵碱联合 VEGF 抗体组(17.15±1.06)与对照组(58.75±4.29)比较,ki-67 抗原表达指数均降低,VEGF 抗体组优于龙葵碱组,龙葵碱+VEGF 抗体组优于龙葵碱组和 VEGF 抗体组,上述组间存在差异有统计学意义($P<0.01$),见图 4。

成,从而抑制肿瘤生长。因此,本实验发现移植瘤周围血管数明显减少,肿瘤组织生长缓慢。MVD、血管新生面积及 ki-67 抗原表达明显低于对照组($P<0.01$)。表明 VEGF 抗体能抑制人结肠癌 HT-29 细胞系诱导的肿瘤血管生成,从而达到抗肿瘤目的。本实验还发现,对微血管面积与 MVD 的影响,VEGF 抗体组高于龙葵碱组;而 ki-67 核增殖抗原表达,VEGF 抗体组高于龙葵碱组($P<0.01$)。结果显示 VEGF 抗肿瘤作用强于龙葵碱,其原因有待进一步研究。

然而,由于肿瘤细胞的异质性,诱导相应肿瘤血管生长因子的生成多样性,以及血管内皮细胞的多样性,单一肿瘤血管抑制剂与联合用药治疗某一实体肿瘤相比较,有效性可能差^[14]。龙葵碱与 VEGF 抗体联合,利用两者不同的抗肿瘤机制,一方面龙葵碱既可直接杀死肿瘤细胞,也可通过抑制肿瘤血管生成而抗肿瘤增殖,弥补 VEGF 抗体单一通过抑制肿瘤血管形成而抗肿瘤作用;另一方面,VEGF 抗体弥补龙葵碱的抗肿瘤作用不及 VEGF 抗体,起到增强作用。因而,龙葵碱与 VEGF 抗体起到了协同抑瘤作用。本实验初步应用龙葵碱与 VEGF 抗体联合作用于人结肠癌细胞所诱导的肿瘤血管生成,实验显示,龙葵碱联合 VEGF 抗体作用于人结肠癌细胞诱导的肿瘤血管生成,其微血管面积、MVD 及 ki-67 核增殖抗原均明显低于龙葵碱与 VEGF 抗体单体应用($P<0.01$)。

综上所述,龙葵碱与 VEGF 抗体均能抑制人结肠癌诱导肿瘤血管生成,达到抗肿瘤增殖作用,而单药 VEGF 抗体强于龙葵碱;但龙葵碱与 VEGF 抗体联合应用,能明显抑制肿瘤血管生成,增加抗肿瘤效果作用,为临床指导抗肿瘤血管生成的治疗方面提供了一个新途径。

参考文献

- [1] 归小龙. 龙葵碱抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 5(S1): 80-82.
- [2] 白宇宏, 李金源, 刘刚. VEGF 单克隆抗体对人舌癌细胞 Tca-8113 增殖抑制作用观察[J]. 山东医药, 2011, 51(10): 19-20.
- [3] 王捷, 宋惠雪, 夏冰, 等. 骨涎蛋白单克隆抗体抑制亲骨转移人乳腺癌细胞血管侵袭机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(1): 30-32.
- [4] 于文静, 赵静, 连波, 等. 人大肠癌鸡胚尿囊膜移植模型的建立及血管生成特征的观察[J]. 中国比(下转第 347 页)

冰片是龙脑香科植物龙脑香树脂的加工品,主要成分为龙脑和龙脑的差向异构体异龙脑。冰片味辛苦,微寒,归心、脾和肺经,具有开窍醒神和通诸窍功效。临床常用于抗炎、抗菌和止痛^[5-6]。本课题结果显示,与对照组和冰片灌胃组比较,经滴鼻给予冰片,可改善全身麻醉大鼠后气血,缩短翻正反射恢复时间,缩短大鼠在水迷宫的逃避潜伏期和空间探索能力,提示冰片滴鼻可明显提高全身麻醉大鼠的苏醒时间,且明显提高大鼠全身麻醉后的认知。原因有以下几点^[7-12]:(1)药物经鼻黏膜吸入脑至少存在 3 条通路,嗅神经、嗅黏膜上皮和血液循环。经鼻腔给药后,药物滞留在嗅黏膜,经嗅神经和嗅黏膜上皮前进入嗅球与脑脊液,同时也可绕过血脑屏障进入中枢神经系统,避免胃肠道酶破坏及肝脏首过效应;(2)冰片具有促进血脑屏障开放,但与脑外伤或脑炎的病理性开放有本质不同,冰片开放血脑屏障不仅不会引起脑病理性损害反而具有保护作用,冰片可促使脑的微血管内皮细胞生成一氧化氮(NO),抗脑缺血损伤作用,加速脑缺血后脑血管内皮的修复;(3)冰片通过增加海马超氧化物歧化酶(SOD)活性,增强 SOD 对自由基的清除能力,降低慢性脑缺血所引起的氧化应激对脑神经的影响;(4)冰片可以调节下丘脑去甲肾上腺素(NA)、多巴胺(DA)、组胺(His)及 5-羟色胺(5-HT)含量,这些递质与机体觉醒状态的发生和维持密切相关;(5)冰片可增加脑中总 Ca^{2+} 含量,增加脑游离 Ca^{2+} 水平,游离 Ca^{2+} 可促进血脑屏障进一步开放,使更多冰片进入,使得冰片延长在脑内的时间,增加冰片在病灶的水平;(6)冰片的相对分子质量为 154,是小分子脂溶性单萜类化合物,虽然可经肠道迅速吸收,也有益于缩短全身麻醉后苏醒时间,但与滴鼻给药仍存在明显差异,全身麻醉昏迷患者经口服给药并不方便,因此,冰片适于鼻黏膜吸收而发挥作用。

本课题中冰片滴鼻低剂量和高剂量的滴鼻剂量分别为 0.9 mg/100 g 和 1.8 mg/100 g,有效剂量折合人用为 0.54~1.08 mg/人,远远低于 2010 版中国药典的使用低限 0.15 g/kg。因此,从安全性考虑滴鼻的高低剂量均是人体可接受的;从有效性方面,高剂量效果优于低剂量,可见给药时,首选高剂量,尤其适用于实热证患者。但冰片味辛、凉,微寒,存在肝肾虚或虚寒体质者若用本品需减量。

本课题显示,冰片独立滴鼻给药可显著改善全身麻醉大鼠的苏醒时间和全身麻醉后的认知功能,与冰片经鼻腔给药可迅速透过血脑屏障达到中枢神经有关,中医古籍记录冰片具有

“独行则势弱,佐使则有功”和“芳香走窜,引药上行”的特点,可见冰片通常与其他药物配伍,如麝香保心丸、复方丹参片、安宫牛黄丸和冰硼散,尤其麝香具有醒脑开窍功能,那么冰片与麝香配伍是否较冰片在术后苏醒方面更具效果值得下一步研究。

参考文献

- [1] 陈易. 全麻术后认知恢复特征及其与苏醒期躁动的相关性分析[D]. 宁夏:宁夏医科大学,2013.
 - [2] 许传通. 两种麻醉方法对患者术后认知功能障碍影响的评价[J]. 海军医学杂志,2013,30(5):330-332.
 - [3] 陈锋卫,李军,连庆泉. 不同麻醉方法对老年患者术后早期认知功能的影响[J]. 中国现代医生,2011,5(21):121-123.
 - [4] 文利东,代传兴,林丽,等. 不同全麻方式对腹部手术患者术后认知功能影响的比较[J]. 重庆医学,2013,42(29):3508-3509,3511.
 - [5] 田徽. 艾片与合成冰片脑保护及其对血脑屏障影响机制的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2013.
 - [6] 张博. 冰片等开窍药对实验动物的睡眠时间与睡眠时相的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2013.
 - [7] 林竹贞. 阿魏酸钠联合冰片灌胃对小鼠短暂性全脑缺血的神经保护作用[D]. 广州:中山大学,2007.
 - [8] 薛丽. 冰片对长时连续作业大鼠觉醒能力损害干预的神经机制[D]. 重庆:第三军医大学,2006.
 - [9] 刘煜德,郭珊珊,余玲,等. 冰片经鼻给药对鼻黏膜纤毛传输系统功能的影响[J]. 四川中医,2010,29(7):39-41.
 - [10] 黄勇华. 脑清喷鼻微乳治疗急性缺血性脑卒中的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学,2011.
 - [11] Zhao JY, Du SY, Lu Y, et al. Study on tissue distribution of borneol in mice by intravenous and intranasal administrations[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2013, 38(7):1071-1074.
 - [12] Zhao JY, Lu Y, Du SY, et al. Comparative pharmacokinetic studies of borneol in mouse plasma and brain by different administrations[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2012, 13(12):990-996.
- (收稿日期:2015-08-10 修回日期:2015-10-26)
-
- (上接第 344 页)
- 较医学杂志,2012,22(3):32-35,81.
 - [5] 李志雄,梁蔚波,唐晖,等. 龙葵碱对前列腺癌 LNCaP 及 Du145 细胞系的作用及机制[J]. 广东医学,2013,34(8):1153-1156.
 - [6] 高世勇,苏怡君,季宇彬. 龙葵碱对 HepG2 细胞 NAT1 酶活性及动力学影响的研究[J]. 中国药理学杂志,2011,46(8):589-594.
 - [7] 季宇彬,刘家源,高世勇. 龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微管系统的影响[J]. 中草药,2012,43(1):111-114.
 - [8] 张卫东,孙睿,李莉,等. 龙葵碱对人胃癌 MGC-803 荷瘤小鼠癌细胞钙粘蛋白表达的影响[J]. 安徽农业科学,2013,41(30):11965-11966.
 - [9] 许扬,潘瑞乐,常琪,等. 龙葵抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(5):549-552.
 - [10] 赵新汉,田方. 肿瘤血管生成抑制剂的研发现状与展望[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(11):2004-2006.
 - [11] 李贵新,郭璐,李鹏鑫,等. 乳腺癌组织 p53 和 nm23 及 VEGF 表达相关性的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,17(12):923-925.
 - [12] 郑青平,陈龙华,石玉生,等. 放疗联合抗 VEGF 抗体对肝癌移植瘤血管形成因子影响的实验观察[J]. 中华肿瘤防治杂志,2008,15(24):1852-1855.
 - [13] 李明娥,彭芝兰,王和,等. 抗血管内皮生长因子抗体对人浆液性卵巢癌裸鼠移植瘤生长的影响[J]. 山西医科大学学报,2006,37(10):1011-1013.
 - [14] 马波,张汉超,徐新戈,等. Vpr 对人结肠癌细胞抑制作用及其机制[J]. 中华消化外科杂志,2012,11(1):86-90.
- (收稿日期:2015-07-29 修回日期:2015-10-24)