

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.004

华蟾素对 TGF- β 1 诱导人结肠癌细胞上皮-间质化的实验研究*

沈国强¹,林炜栋¹,陈向芳²

(1. 武警上海市消防总队医院创伤外科,上海 200443;2. 第二军医大学附属长征医院内分泌科,上海 200443)

[摘要] **目的** 研究华蟾素在体外对肿瘤坏死因子- β 1(TGF- β 1)诱导的人结肠癌细胞上皮-间质化(EMT)的作用。**方法** 将体外培养的人结肠癌细胞株(SW480)分为:(1)正常对照组;(2)TGF- β 1(10 ng/mL)单独处理组;(3)TGF- β 1(10 ng/mL)+华蟾素(2.5、5、10、20、40、80 mg/mL)共同处理组,并在体外培养 48 h。CCK8 检测细胞增殖抑制情况,利用倒置相差显微镜观察各处理组细胞形态学变化,Transwell 小室检测细胞侵袭与迁移能力,实时荧光定量 PCR(QRT-PCR)和 Western blot 分别检测 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)在 mRNA 及蛋白水平表达的变化。**结果** (1)与 TGF- β 1(10 ng/mL)单独处理组比较,TGF- β 1(10 ng/mL)+华蟾素(10、20、40、80 mg/mL)共同处理组对 SW480 具有显著的增殖抑制作用($P < 0.05$)。(2)与正常对照组相比,TGF- β 1 单独处理组、TGF- β 1(10 ng/mL)+华蟾素(2.5 mg/mL)共同处理组呈现典型的间质化表型,TGF- β 1(10 ng/mL)+华蟾素(5 mg/mL)共同处理组则呈现经典的上皮表型。(3)TGF- β 1(10 ng/mL)+华蟾素(2.5、5 mg/mL)共同处理组与 TGF- β 1 单独处理组相比侵袭和迁移能力均明显减弱($P < 0.05$)。(4)QRT-PCR 和 Western blot 结果显示 TGF- β 1 单独处理组与正常对照组比较,Vimentin 表达水平明显增强,E-cadherin 表达显著减弱。TGF- β 1(10 ng/mL)+华蟾素(2.5、5 mg/mL)共同处理组与 TGF- β 1 单独处理组、对照组相比 Vimentin 表达水平显著降低,E-cadherin 表达显著增强。**结论** 华蟾素可抑制 TGF- β 1 诱导的人结肠癌细胞 SW480 的增殖,其机制可能与促进 E-钙黏蛋白表达增强,同时使波形蛋白表达减弱,从而与抑制 TGF- β 1 诱导的 EMT 过程有关。

[关键词] 华蟾素;上皮-间质化;肿瘤坏死因子- β 1;结直肠肿瘤**[中图分类号]** R3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2316-04

Experiment research of cinobufacini on TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal carcinoma cells*

Shen Guoqiang¹, Lin Weidong¹, Chen Xiangfang²

(1. Department of Traumatic Surgery, Shanghai Fire Corps Hospital of Chinese People's Armed Police, Shanghai 200443, China; 2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200443, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of cinobufacini on TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition of human colorectal carcinoma cells in vitro. **Methods** The cultured colorectal carcinoma cell line(SW480) was divided into the control group, TGF- β 1 (10 ng/mL) individual treatment group and co-treatment groups with TGF- β 1 (10 ng/mL) + cinobufacini (2.5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/mL), which were cultured in vitro for 48 h. The proliferation of the cells were measured by CCK8 assay. The morphological changes were observed by inverted phase contrast microscope. The ability of cell invasion and migration was detected by Transwell assay. The mRNA and protein expressions of E-cadherin and Vimentin were detected with QRT-PCR and Western Blot. **Results** (1) Compared with the TGF- β 1 (10 ng/mL) individual treatment group, TGF- β 1 (10 ng/mL) + cinobufacini (10, 20, 40, 80 mg/mL) co-treatment groups significantly had significantly proliferation inhibitory effect on SW480 ($P < 0.05$). (2) Compared with the normal control group, TGF- β 1 individual treatment group and TGF- β 1 (10 ng/mL) + cinobufacini(2.5 mg/mL) group exhibited classical mesenchymal phenotype, while the TGF- β 1 (10 ng/mL) + cinobufacini (5 mg/mL) co-treatment group showed classical epithelial phenotype. (3) The ability of invasion and migration in the TGF- β 1(10 ng/mL) + cinobufacini(2.5, 5 mg/mL) co-treatment group were significantly weakened compared with the TGF- β 1 individual treatment group ($P < 0.01$). (4) QRT-PCR and Western Blot results indicated that compared with the normal control group, the Vimentin expression in the in the TGF- β 1 individual treatment group was significantly increased and the E-cadherin expression was significantly decreased. Furthermore, compared with the TGF- β 1 individual treatment group and control group, the Vimentin expression level in the TGF- β 1 (10 ng/mL) + cinobufacini (2.5, 5 mg/mL) groups was significantly decreased and E-cadherin expression was significantly increased. **Conclusion** Cinobufacini can inhibit TGF- β 1-induced cell proliferation in human colorectal carcinoma SW480 cells, and its mechanism may be related with promoting E-cadherin expression increase, meanwhile decreasing the vimentin expression, thus inhibiting the EMT process induced by TGF- β 1.

[Key words] cinobufacini; epithelial to mesenchymal transition; transforming growth factor-beta1; colorectal neoplasms

结直肠癌是世界上最常见的消化道恶性肿瘤之一,“全球 癌症统计”表明欧美等发达国家结直肠癌的发病率和病死率均

跃居第 2 位,晚期患者的 5 年生存率不足 7%^[1]。近年来,随着我国工业化和城镇化进程,我国结直肠癌发病率和病死率总体呈上升趋势,分别居于第 3 位和第 5 位^[2]。转移是结直肠癌患者死亡的主要原因,有证据显示,上皮-间质化(EMT)在结直肠癌的侵袭和转移过程中扮演着十分重要的角色^[3]。转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 是一种具有广泛生物活性的细胞因子,通过下调上皮标志物如: E 钙黏蛋白(E-cadherin)和(或)上调间质标志物诸如波形蛋白(Vimentin)的表达,促使鹅卵石样的上皮细胞向纺锤体样的间充质细胞转换,从而更具有侵袭和转移能力。TGF- $\beta 1$ 能够诱导 EMT 转变,是一种强力的 EMT 诱导剂^[4]。

华蟾素是从中华大蟾蜍皮水化萃取而成的传统中药制剂,具有良好的抗肿瘤作用,特别是对消化道肿瘤,目前已经广泛的运用于临床。近年来在全球范围内对华蟾素的抗肿瘤作用及其潜在的机制进行了广泛的研究,目前研究发现华蟾素能够诱导肿瘤细胞凋亡,然而其与 EMT 的关系尚不清楚。因此,本研究通过 TGF- $\beta 1$ 联用不同浓度的华蟾素与人结肠癌细胞 SW480 共培养,研究华蟾素对 TGF- $\beta 1$ 诱导人结肠癌细胞 EMT 的作用。

1 材料与与方法

1.1 细胞来源 SW480 人结肠癌细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 细胞培养及共培养体系建立 SW480 人结肠癌细胞培养条件为 37 °C, 5% CO₂ 密闭恒温孵箱中,培养液为含 10% 胎牛血清(Gibco)+RPMI1640(Gibco)培养基。细胞 2~3 d 换液 1 次,当细胞密度为 70%~80% 时换无血清培养基饥饿 24 h,然后加入 TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL,美国 Peprotech 公司)及不同浓度的华蟾素,接种于 6 孔或 96 孔板,体外共培养 48 h。

1.3 CCK8 法检测细胞增殖能力 取对数期的 SW480 细胞制成 1×10^5 个/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,细胞培养 24 h 后,给予 TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL)及不同浓度的华蟾素(2.5、5、10、20、40、80 mg/mL),体外共培养 48 h 后加入 CCK8 浓液 10 μ L/孔,恒温箱孵育 1.5 h,用酶联免疫检测仪于 450 nm 处测算 OD 值。每孔平行设 4 复孔,重复实验 3 次。

1.4 Transwell 侵袭与迁移实验 Transwell 小室检测 SW480 细胞侵袭和迁移能力,实验分为(1)正常对照组:含细胞及无血清培养液;(2)TGF- $\beta 1$ 单独处理组;(3)TGF- $\beta 1$ +华蟾素(2.5 mg/mL)共同处理组;(4)TGF- $\beta 1$ +华蟾素(5 mg/mL)共同处理组;每组设复孔,实验需重复 3 次。Transwell 小室分为上下二室,侵袭实验上室底部有 8 μ m 的 Matrigel 基质胶包被,各处理组取 200 μ L 悬液细胞密度为 2.5×10^5 个/mL 接种于上室,下室内加入 600 μ L 5% 胎牛血清(FBS)的培养液;与侵袭实验不同,迁移实验上室底部无需 Matrigel 基质胶包被,上室内接种的细胞密度为 1×10^6 个/mL,下室加入 10% FBS 的培养液,37 °C 孵箱孵育 48 h 后,取出用磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻冲洗小室,干净棉签擦拭去小室内面的 Matrigel 和未穿膜细胞。95% 乙醇固定,0.1% 的结晶紫染色,室温下风干,并于倒置显微镜下观察穿膜细胞,随机选取 16 个视野进行观察、拍照($\times 200$ 倍)。

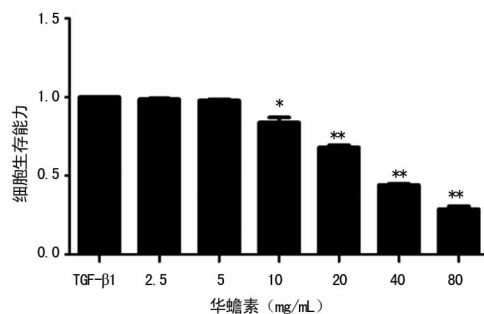
1.5 实时荧光定量 PCR(QRT-PCR)检测 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)mRNA 表达 QRT-PCR 实验分

组同侵袭和迁移实验,qRT-PCR 反应按照 TaKaRa 公司生产的 SYBR®Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)试剂盒说明加入 20 μ L PCR 反应体系。引物由上海生工生物科技有限公司设计合成:E-cadherin:F:5'-CCA CCA AAG TCA CGC TGA AT-3' R:5'-GGA GTT GGG AAA TGT GAG C-3',Vimentin:F:5'-GAG AAC TTT GCC GTT GAA GC-3',R:5'-CTC AAT GTC AAG GGC CAT CT-3',GAPDH:F:5'-CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA-3',R:5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3',PCR 反应条件为:95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环,用 ABI 7500 Real-time PCR 反应仪检测 E-cadherin、Vimentin、GAPDH mRNA 在不同稀释样品中的扩增情况,E-cadherin、Vimentin mRNA 相对表达量:RQ = $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$, $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t, Q - \Delta C_t, C) = (C_t, Q - C_t, GAPDH) - (C_t, C - C_t, GAPDH)$ 。其中 $\Delta C_t, Q$ 表示待测基因; $\Delta C_t, C$ 表示对照组基因。

1.6 统计学处理 所有实验结果均保证重复 3 次,数据统计采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,若方差不齐,则运用 Dunnett'-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 法检测不同干预后 SW480 增殖能力变化 处于对数期的 SW480 细胞加入 TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL)及不同浓度的华蟾素(2.5、5、10、20、40、80 mg/mL)培养 48 h 后,TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL)+华蟾素(10、20、40、80 mg/mL)共同处理组与 TGF- $\beta 1$ 单独处理组比较增殖能力明显抑制($P < 0.05$),TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL)+华蟾素(2.5、5 mg/mL)共同处理组与 TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL)比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。



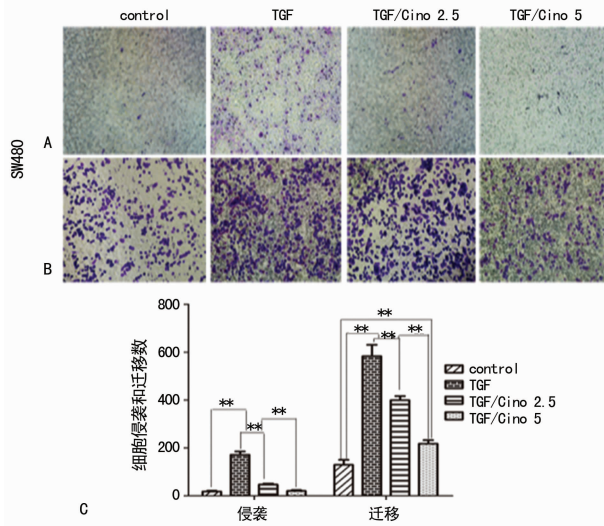
*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

图 1 CCK8 法检测不同干预后 SW480 增殖能力变化

2.2 Transwell 检测不同干预后人结肠癌细胞的侵袭和迁移能力的变化 通过“材料与与方法”所述收集、染色、观察穿膜细胞,侵袭和迁移细胞数及统计结果如图 2A~C 所示:无论是侵袭还是迁移 TGF- $\beta 1$ 单独处理组细胞穿膜数均最多,且 TGF- $\beta 1$ +华蟾素(2.5、5 mg/mL)组穿膜细胞较 TGF- $\beta 1$ 单独处理组均显著减少($P < 0.01$)。

2.3 不同干预后人结肠癌细胞的 Vimentin、E-cadherin mRNA 水平表达变化 收集各基因 QRT-PCR 所得的 Ct 值,按照上述“材料与与方法”中 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的计算方法,比较结果:E-cadherin 在正常对照组中最高,TGF- $\beta 1$ 单独处理组 E-cadherin 表达最低。其中 TGF- $\beta 1$ 单独处理组与正常对照组、TGF- $\beta 1$ +华蟾素(5 mg/mL)组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),TGF- $\beta 1$ 单独处理组与 TGF- $\beta 1$ +华蟾素(2.5 mg/mL)组相比($P <$

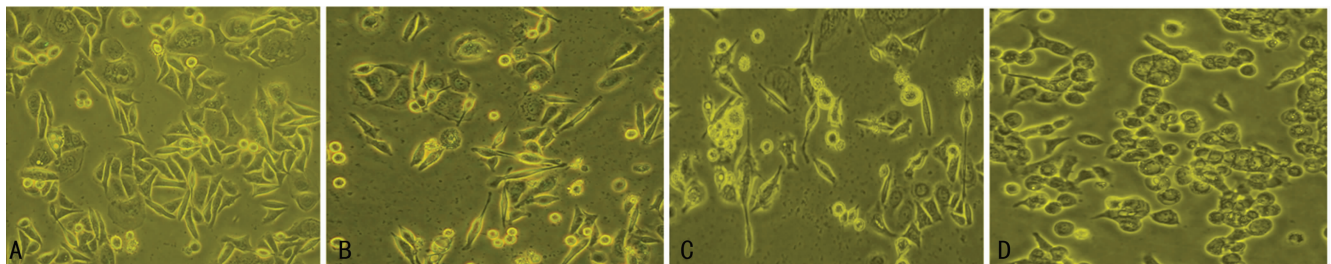
0.05); Vimentin 在 TGF- β 1 单独处理组中表达最高, 其中 TGF- β 1 单独处理组与正常对照组、TGF- β 1 + 华蟾素 (5 mg/mL) 组相比 ($P < 0.01$), TGF- β 1 单独处理组与 TGF- β 1 + 华蟾素 (2.5 mg/mL) 组相比 ($P < 0.05$), 见图 3。



A: 侵袭实验穿膜细胞; B: 迁移实验穿膜细胞; C: 侵袭和迁移结果统计; Control: 正常对照组; TGF: TGF- β 1 单独处理组; TGF/Cino 2.5: TGF- β 1 + 华蟾素 (2.5 mg/mL) 组; TGF/Cino 5: TGF- β 1 + 华蟾素 (5 mg/mL) 组。* * : $P < 0.01$ 。

图 2 不同干预组细胞的侵袭和迁移能力

2.4 人结肠癌细胞 SW480 干预后细胞形态学观察 为研究



A: 正常对照组; B: TGF- β 1 单独处理组; C: TGF- β 1 + 华蟾素 (5 mg/mL) 组; D: TGF- β 1 + 华蟾素 (5 mg/mL) 组; 均消化传代自同一母瓶 SW480 细胞。

图 4 人结肠癌细胞 SW480 经不同干预后 48 h 形态学观察

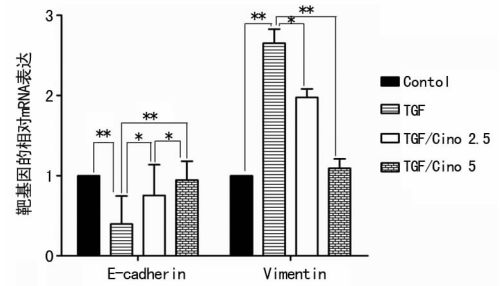
3 讨论

血行转移和局部复发是造成结肠癌患者死亡的主要原因, 尤其是进展期肿瘤的浸润和转移, 成为肿瘤治疗难以取得突破性进展的最大障碍, 肿瘤通过 EMT 而实现转移是目前肿瘤领域研究的热点, 将为肿瘤的预防和抗肿瘤药物治疗提供依据。

器官或组织发生 EMT 后, 细胞的形态由卵圆形样转变成纺锤体样, 类似于成纤维细胞。EMT 过程中, 上皮标志物 E-cadherin 表达降低及间质标志物 Vimentin 表达升高被认为是发生 EMT 最显著的改变^[5]。

TGF- β 1 是一种能够介导 EMT 发生的生物活性最为广泛的多肽类细胞因子之一^[6]。TGF- β 1 即能够识别并结合细胞膜表面的受体 TGF- β R, 使下游 Smad2 和 Smad3 发生磷酸化, 并使之与 Smad4 相结合形成 Smad 复合物, 随后结合到特定基因的启动子上, 调控基因的转录调控 EMT 的发生。大量研究发

华蟾素对 TGF- β 1 诱导 SW480 人结肠癌细胞株 EMT 影响, 本研究分为 TGF- β 1 单独处理组、TGF- β 1 联合华蟾素 (2.5、5 mg/mL) 共同处理组、对照组; 培养 48 h 后, 如图 4 所示: 图 4A 为对照组, 卵圆形, 细胞之间排列紧密, 为经典的上皮表型; 图 4B 为 TGF- β 1 单独处理组, 细胞拉长, 出现类成纤维样改变, 排列紊乱, 为典型间质化表型; 图 4C 为 TGF- β 1 联合华蟾素 (2.5 mg/mL) 共同处理组, 细胞拉长, 排列较紊乱, 大部分细胞类成纤维样; 图 4D 为 TGF- β 1 联合华蟾素 (5 mg/mL) 共同处理组, 较 TGF- β 1 单独诱导组细胞形态发生明显改变, 细胞固缩, 逐渐变的为卵圆形。见图 4。



Control: 正常对照组; TGF: TGF- β 1 单独处理组; TGF/Cino 2.5: TGF- β 1 + 华蟾素组; TGF/Cino 5: TGF- β 1 + 华蟾素 (5 mg/mL) 组。* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$ 。

图 3 不同干预组 E-cadherin 与 Vimentin mRNA 水平表达

现 TGF- β 1 和 TGF- β 1R 在多种恶性肿瘤组织中的表达比在正常组中要高出许多, 且和肿瘤的进展期呈现正相关, 研究表明恶性肿瘤患者血清中的 TGF- β 1 和 TGF- β 1R 的高表达与患者的生存率明显相关^[7]。Masuda 等^[8]用低浓度 TGF- β 1 使非小细胞肺癌 A549 细胞 3 周后, 细胞拉长, 排列疏松, 呈现经典的间质样形态, You 等^[9]发现利用 TGF- β 1 能够使肝癌细胞系 huh7 后, 细胞极性消失, 变成纤维母细胞样形态。江本元等^[10]报道 TGF- β 1 作用于人结肠癌细胞系 SW480 后细胞侵袭和迁移能力增强。

本研究首选高表达上皮指标的结肠癌细胞 SW480, 用 TGF- β 1 作用于 SW480 细胞后, 与对照组比较发现细胞拉长, 由卵圆形样变成纺锤体样, 呈现经典的 EMT 形态学变化 (图 4A、B)。QRT PCR 从 mRNA 水平证实 TGF- β 1 作用 SW480 细胞后较正常 SW480 细胞上皮标志物 E-cadherin 表达明显降低 ($P < 0.05$)、间质标志物 Vimentin 表达显著升高 ($P < 0.05$)

(图 3),本研究认为经证明 TGF- β 1 确实能诱导人结肠癌 SW480 发生 EMT。Transwell 侵袭和迁移实验进一步表明 TGF- β 1 作用 SW480 细胞后细胞侵袭($P < 0.01$)和迁移能力($P < 0.01$)均显著增强。

华蟾素主要由中华大蟾蜍阴干全皮制成,主要成分为干蟾皮提取物,是我国自行研制的二类新药,已经广泛用于肝癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤的治疗。华蟾素的抗肿瘤作用表现为:(1)抑制肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的生物合成:刘莉等^[11]对裸鼠人肝癌细胞经局部注射华蟾素,发现肝癌细胞核 DNA 含量下降,明显低于对照组,抑瘤生长率为 57.9%,另有学者对体外培养的 H22 腹水型小鼠肝癌细胞研究发现,华蟾素对其无直接杀伤作用,但能明显抑制其 DNA 和 RNA 合成;(2)抑制肿瘤细胞的增殖:王玲等^[12]对华蟾素对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长影响的实验研究发现,华蟾素也可明显抑制乳腺癌 MCF-7 生长;(3)诱导细胞凋亡:Masuda 等^[8]应用华蟾素 1 $\mu\text{mol/L}$ 处理肝癌 HL-60 细胞 15 h,发现华蟾素具有明显诱导凋亡作用;Jing 等^[13]认为华蟾素对细胞周期的影响类似拓扑异构酶抑制剂的作用;(4)抑制肿瘤血管形成:Lee 等^[14]用原代培养的牛主动脉内皮细胞生成的毛细血管样网络结构为模型,观察蟾毒灵对血管生成的影响,研究发现小剂量蟾毒灵即可显著抑制毛细血管生成;(5)增强机体的免疫功能:赵兴梅等^[15]报道华蟾素可增加小鼠血清白细胞介素-2 水平,并且能提高小鼠腹腔巨噬细胞指数,表明华蟾素对细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫均有促进作用。

近年来,越来越多的基础和临床研究表明华蟾素能够抑制肿瘤的侵袭和转移,肿瘤侵袭和转移相关基因,如 gene 1(*Tiam1*)、*c-myc* 均可被华蟾素有效的抑制。那么华蟾素的抗肿瘤作用是否与抑制 EMT 过程密切相关,目前尚未有相关的报道。本研究采用 TGF- β 1+不同浓度华蟾素(2.5、5、10、20、40、80 mg/mL)共同培养 SW480 细胞 48 h 的方法,并与 TGF- β 1 单独处理组相比较时,结果显示华蟾素浓度为 10、20、40、80 mg/mL 时,细胞生存能力显著降低($P < 0.05$)。

为进一步研究,作者选取 TGF- β 1+(2.5、5 mg/mL)共同培养 SW480 细胞 48 h,利用倒置显微镜观察细胞形态学变化,发现 TGF- β 1+华蟾素(5 mg/mL)共同处理组细胞极性消失,细胞逐渐变成卵圆形,呈现上皮样细胞形态。QRT-PCR 技术检测 E-cadherin、Vimentin 在 mRNA 水平的变化表明与 TGF- β 1 单独诱导组相比 E-cadherin 表达明显增强($P < 0.05$),Vimentin 表达显著降低($P < 0.05$)。华蟾素可抑制 TGF- β 1 诱导的人结肠癌细胞 SW480 的增殖,其机制可能与促进 E-Cadherin 表达增强,同时使 Vimentin 表达减弱,从而与抑制 TGF- β 1 诱导的 EMT 过程有关。

参考文献

[1] Shibayama M, Maak M, Nitsche U, et al. Prediction of metastasis and recurrence in colorectal cancer based on

gene expression analysis; ready for the clinic[J]. *Cancers*, 2011, 3(3):2858-2869.

- [2] Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, et al. Focus on colon cancer[J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(3):233-236.
- [3] Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(Suppl 7):vii89-92.
- [4] Zohn IE, Li Y, Skolnik EY, et al. p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of e-cadherin during mouse gastrulation[J]. *Cell*, 2006, 125(5):957-969.
- [5] Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it [J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(3):706-720.
- [6] Blick T, Widodo E, Hugo H, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(6):629-642.
- [7] Dariusz K, Bogdan M, Halina BM, Beata KK. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology[J]. *Endokrynol Polska*, 2013, 64(3):384-396.
- [8] Masuda Y, Kawazoe N, Nakajo S, et al. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 1995, 19(8):549-556.
- [9] You H, Ding W, Rountree CB. Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor-beta[J]. *Hepatology*, 2010, 51(5):1635-1644.
- [10] 江本元,袁宏银,熊斌.转化生长因子- β 1 对大肠癌细胞增殖侵袭能力的影[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2005, 26(2):147-151.
- [11] 刘莉,蒋亚生,张士华,等.抗癌中药制剂局部注射对裸鼠人肝癌细胞核 DNA 含量的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 1993, 20(2):140.
- [12] 王玲,刘世坤,周于禄.华蟾素对人乳腺癌细胞阿霉素耐药性的逆转作用[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(5):677-680.
- [13] Jing Y, Ohizumi H, Kawazoe N, et al. Selective inhibitory effect of bufalin on growth of human tumor cells in vitro: association with the induction of apoptosis in leukemia HL-60 cells[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1994, 85(6):645-651.
- [14] Lee DY, Yasuda M, Yamamoto T, et al. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro[J]. *Life Sci*, 1997, 60(2):127-134.
- [15] 赵兴梅,陈明,杨祖贻,等.华蟾素对人 IL-2 水平及 LAK 活性影响[J]. *中药药理与临床*, 1999, 15(6):33-35.

(收稿日期:2017-01-08 修回日期:2017-03-12)