

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.003

· 基础研究 ·

香加皮宝藿苷-I抑制结肠癌细胞株SW480和RKO的恶性表型及其作用机制

王晓华¹, 李晓亚², 白函瑜², 霍炳杰³(1. 河北省邯郸市河北工程大学医学院生物实验室, 河北 邯郸, 056038; 2. 河北医科大学检验医学系, 河北 石家庄 050011; 3. 河北医科大学第四医院中医科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨香加皮宝藿苷-I对人结肠癌细胞株SW480和RKO增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响, 并对其机制进行初步的探讨。**方法:** 用不同质量浓度(0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)的香加皮宝藿苷-I溶液分别处理结肠癌细胞株SW480和RKO, 采用MTT法检测细胞的增殖情况, 通过细胞克隆形成实验检测细胞克隆形成能力, 通过Transwell方法检测细胞的迁移和侵袭能力, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。通过Western blotting检测C-PARP、Bcl-2与caspase-3蛋白的表达水平, 通过RNA-seq检测分析香加皮宝藿苷-I对SW480细胞转录组的影响及其可能影响的信号通路。**结果:** 香加皮宝藿苷-I能抑制SW480和RKO细胞的增殖、侵袭和迁移, 并且能够诱导细胞凋亡和阻滞于细胞G0/G1期。香加皮宝藿苷-I处理可上调SW480和RKO细胞株中C-PARP与caspase-3蛋白的表达水平, 下调Bcl-2蛋白的表达水平; RNA-seq数据分析显示, SW480细胞DNA复制及ERBB信号通路等相关基因的转录都受到香加皮宝藿苷-I的影响。**结论:** 香加皮宝藿苷-I通过影响凋亡相关蛋白的表达、细胞DNA复制和ERBB信号通路来诱导细胞凋亡和细胞G0/G1期阻滞, 进而抑制人结肠癌细胞株SW480和RKO的恶性表型。

[关键词] 结肠癌; SW480细胞; RKO细胞; 宝藿苷-I; 恶性表型; DNA复制; ERBB通路

[中图分类号] R735.3; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0228-07

Baohuoside- I inhibits malignant phenotype of SW480 and RKO cells and its mechanism

WANG Xiaohua¹, LI Xiaoya², BAI Hanyu², HUO Bingjie³ (1. Biology Laboratory, Medical College, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei, China; 2. Clinical Laboratory Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Baohuoside-I on the proliferation, invasion, migration and apoptosis of colon cancer cell lines SW480 and RKO and the relative mechanism. **Methods:** Colon cancer cell lines SW480 and RKO were respectively treated with different concentrations of Baohuoside-I (0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$). Cell proliferation was detected by MTT assay; The ability of cell clone formation was tested by cell clone formation experiments; The migration and invasion of cells were detected by Transwell assay; The apoptosis and cell cycle was detected by Flow cytometry; and the protein expression levels of cleaved PARP, cleaved Caspase-3 and Bcl-2 were detected by Western blotting. The effects of Baohuoside-I on transcriptome and possible signaling pathways were detected by RNA-Seq technology. **Results:** Baohuoside-I could inhibit the proliferation, invasion and migration of SW480 and RKO cells, and induce cell apoptosis and G0/G1 phase block. Baohuoside-I could also up-regulate the protein expressions of cleaved PARP and cleaved Caspase-3 but down-regulate the protein expression of Bcl-2 in SW480 and RKO cell lines. In addition, RNA-Seq data analysis showed that DNA replication and transcription of ERBB signaling pathway related genes were both affected by Baohuoside-I. **Conclusion:** Baohuoside-I could induce apoptosis and G0/G1 phase block of colon cancer cell lines SW480 and RKO by affecting the expression of apoptosis related proteins, as well as cellular DNA replication and ERBB signaling pathways, thus inhibiting the malignant phenotypes of SW480 and RKO.

[Key words] colon cancer; SW480 cell; RKO cell; Baohuoside-I; malignant phenotype; DNA replication; ERBB signaling pathways

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 228-234. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.003]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81871894, No. 81202679); 河北省自然科学基金资助项目(No. H2018206318)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871894, No. 81202679), and the Natural Science Foundation of Hebei Province(No. H2018206318)

[作者简介] 王晓华, 女, 硕士, 实验师, 主要从事肿瘤的细胞生物学研究, E-mail: yxywxh@163.com

[通信作者] 霍炳杰(HUO Bingjie, corresponding author), 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤的中药治疗基础和临床研究工作, E-mail: hb331@163.com

结肠癌是一种发生在结肠组织的恶性肿瘤,发病率占全球癌症的第3位,是癌症相关死亡的主要原因之一^[1-2]。目前,手术和化疗是结肠癌的两种主要治疗选择,治疗方案取决于癌症的分期和诊断时的肿瘤位置,以及患者的个人特征。由于多种化疗方案的可用性,晚期结肠癌患者的总体生存在过去的几十年中得到了改善,然而,绝大多数结肠癌患者在化疗过程中都会产生耐药性,从而限制了抗癌药物的治疗效果,最终导致化疗失败^[3-4]。因此,积极探索新的治疗药物是改善结肠癌预后和提高治愈率的重要手段。

宝藜苣-I是一种多羟基黄酮类单体化合物,由传统中药香加皮和淫羊藿中分离得到,是香加皮和淫羊藿中主要药理活性成分之一^[5-6]。近些年来,的研究^[7-9]发现,宝藜苣对多种癌细胞都有较好的抑制作用,因此受到了越来越多的关注,例如宝藜苣-I能够抑制宫颈癌和乳腺癌细胞的侵袭能力,并且能够诱导人非小细胞肺癌细胞凋亡;此外宝藜苣-I在体内体外都具有较好的抗食管癌效果。但是宝藜苣-I对结肠癌恶性表型的影响还未有过报道,因此,本研究探讨了宝藜苣对结肠癌细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响,并对其机制进行了初步研究,为宝藜苣-I的开发应用和结肠癌的临床治疗提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂和仪器

人结肠癌细胞株SW480和RKO购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。细胞培养使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,于37℃、5%CO₂条件下培养。

宝藜苣-I标准品购自中国药品生物制品检定所,胎牛血清(FCS)购自Invitrogen公司,RPMI 1640购自美国Gibco公司,细胞凋亡和细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,MTT检测液购自Promega公司,ECL超敏发光液购自普利莱公司,BCA试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,结晶紫和抗体购自美国Sigma公司产品。

SANYO公司的CO₂培养箱,Gilson公司的微量移液器,Olympus公司的倒置显微镜,美国BD公司的流式细胞仪,Bio Rad公司的电泳仪和Western blotting转膜仪,Bio Tek公司的酶标仪,Beckman公司的低温高速离心机。

1.2 MTT法检测结肠癌细胞的增殖

取对数生长期的SW480和RKO细胞,以 $2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 的细胞密度接种于96孔板中,每孔接种100 μl 。设置(1)溶剂处理组;(2)5 $\mu\text{g/ml}$ 宝藜苣-I处理组;(3)10 $\mu\text{g/ml}$

宝藜苣-I处理组;(4)20 $\mu\text{g/ml}$ 宝藜苣-I处理组4个组别,每组实验设置3个平行孔。培养24 h后,分别加入不同质量浓度的宝藜苣-I(终质量浓度0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)继续培养,每隔24 h,添加10% MTT检测液,37℃孵育1 h后,酶标仪490 nm处检测光密度。

1.3 克隆形成实验检测结肠细胞的克隆形成能力

宝藜苣-I(终质量浓度0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理24 h的SW480和RKO细胞,制备为 $1 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ 的细胞悬液,分别接种0.5 ml于含有2.5 ml培养液的6孔培养板中培养,显微镜下观察,当视野中大多数集落的细胞数大于50时,弃上清,每孔加入1 ml 4%多聚甲醛固定,PBS清洗后,结晶紫染色10~30 min,清洗后,每孔添加2 ml甲醇,将结晶紫溶解,取200 μl 加入96孔板,酶标仪570 nm处测定光密度。

1.4 Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力

细胞侵袭实验中,提前将100 μl 含2%的Matrigel但不含血清和抗生素的RPMI 1640均匀铺在Transwell上室的聚碳酸酯膜上,37℃放置30 min。迁移实验中Transwell上室加400 μl RPMI 1640培养基以后侵袭和迁移实验操作相同,Transwell下室均加入600 μl 含10% FBS的RPMI 1640培养基,然后在上室分别接种宝藜苣-I(终质量浓度0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理24 h的SW480和RKO细胞,接种量为100 $\mu\text{l/室}$ (含 2×10^5 细胞的无血清RPMI 1640),培养24 h后,取出小室用PBS清洗,甲醇固定10 min,1%结晶紫染色10 min,用棉签拭去上层未迁移的细胞,清洗晾干后,置显微镜下拍照。

1.5 流式细胞检测细胞周期和细胞凋亡

根据细胞周期和细胞凋亡检测试剂盒说明书,收集宝藜苣-I(终质量浓度0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理24 h的SW480和RKO细胞,用PBS洗涤2次后,加入1 ml 4℃预冷的70%乙醇并充分混匀,于4℃冷藏过夜后,再用PBS洗涤2次,加入0.5 ml碘化吡啶(50 mg/L)染液并充分混匀,于37℃闭光染色30 min,采用流式细胞仪检测细胞周期分布和细胞凋亡情况。

1.6 Western blotting检测结肠癌细胞中凋亡相关蛋白的表达

使用不同浓度的宝藜苣-I(0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)分别处理SW480和RKO细胞24 h后,收集细胞,加入细胞裂解液裂解细胞,离心取上清并通过BCA法进行蛋白定量,根据蛋白定量结果,取等量的蛋白(40 μg)进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后将蛋白再电转至PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭1 h后,于4℃与一抗孵育过夜,将一抗洗去后,再与二抗于室温孵育1 h,将二抗洗去,最后将ECL的A液和B液的混合液滴加到PVDF膜上,于LAS4010仪器上显色曝光。

1.7 宝藜苣-I处理后细胞总RNA的测序

用10 μg/ml的宝藜苣-I处理SW480细胞24 h后,收集细胞,未经宝藜苣-I处理的SW480细胞作对照,加入1 ml TRIzol混匀,再加入200 μl氯仿并剧烈震荡15 s,于室温静置2 min后,12 000 rpm低温离心15 min,取上清,加入等体积的异丙醇并充分混匀,-20 °C放置10 min,12 000 rpm低温离心10 min,弃上清,再用1 ml 70%乙醇洗涤两次,晾干RNA后加入DEPC水溶解,送华大基因科技有限公司对总mRNAs进行测序分析。

1.8 统计学方法

使用SPSS 21.0软件进行统计分析。正态分布定量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验组与对照组间的比较采用t检验,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学

意义。

2 结果

2.1 宝藜苣-I以剂量依赖方式抑制SW480和RKO细胞的增殖

通过MTT法每隔24 h检测细胞的增殖情况,结果(图1)显示,与对照组相比,宝藜苣-I可以显著抑制SW480和RKO细胞的增殖,并且呈剂量依赖关系。细胞克隆形成实验结果(图2)显示,宝藜苣-I能显著抑制SW480和RKO细胞克隆的形成,药物浓度越高,细胞增殖能力越低。以上结果表明,宝藜苣-I以剂量依赖的方式抑制了SW480和RKO的细胞增殖能力。

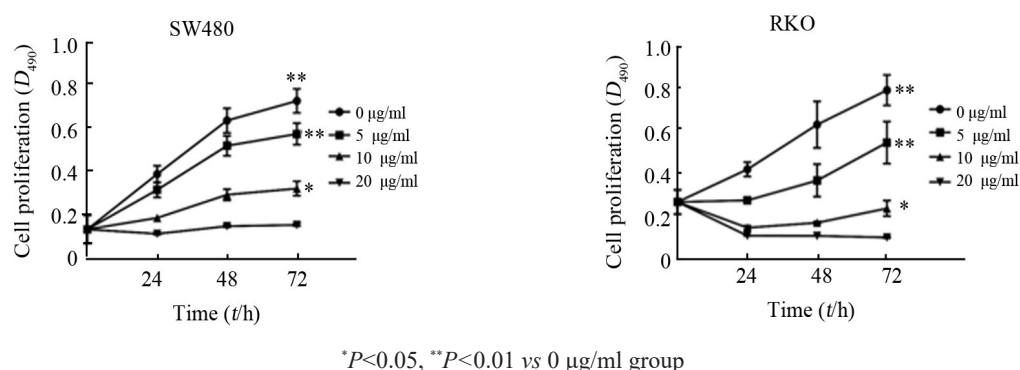


图1 MTT法检测宝藜苣-I对SW480和RKO细胞增殖能力的影响

Fig.1 MTT method was used to detect the effect of Baohuoside-I on proliferation of SW480 and RKO cells

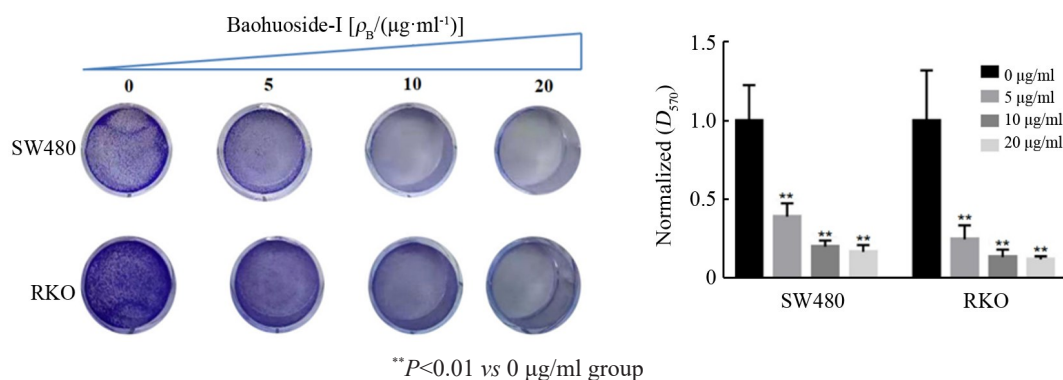


图2 细胞克隆形成实验检测宝藜苣-I对SW480和RKO细胞克隆形成能力的影响

Fig.2 Cell clone formation test was used to detect the effect of Baohuoside-I on the ability of SW480 and RKO cells to form clones

2.2 宝藜苣-I明显抑制SW480和RKO的细胞迁移和侵袭

Transwell实验结果(图3)显示,经过宝藜苣-I处理后,发生迁移和侵袭的SW480和RKO细胞数量与对照组相比显著降低($P<0.01$),并且降低水平与宝藜苣-I浓度成剂量依赖关系,说明宝藜苣-I以剂量依赖的方式抑制SW480和RKO细胞的迁移和侵袭能力。

2.3 宝藜苣-I能诱导SW480和RKO细胞凋亡并阻滞细胞于G0/G1期

流式细胞仪检测,结果(图4-5)显示,与对照组相比,随着宝藜苣-I浓度的增加,处于G0/G1的SW480和RKO细胞数量明显增加,而处于S和G2/M期的SW480和RKO细胞数量明显减少,说明宝藜苣-I能够影响SW480和RKO的细胞周期,使细胞阻滞在

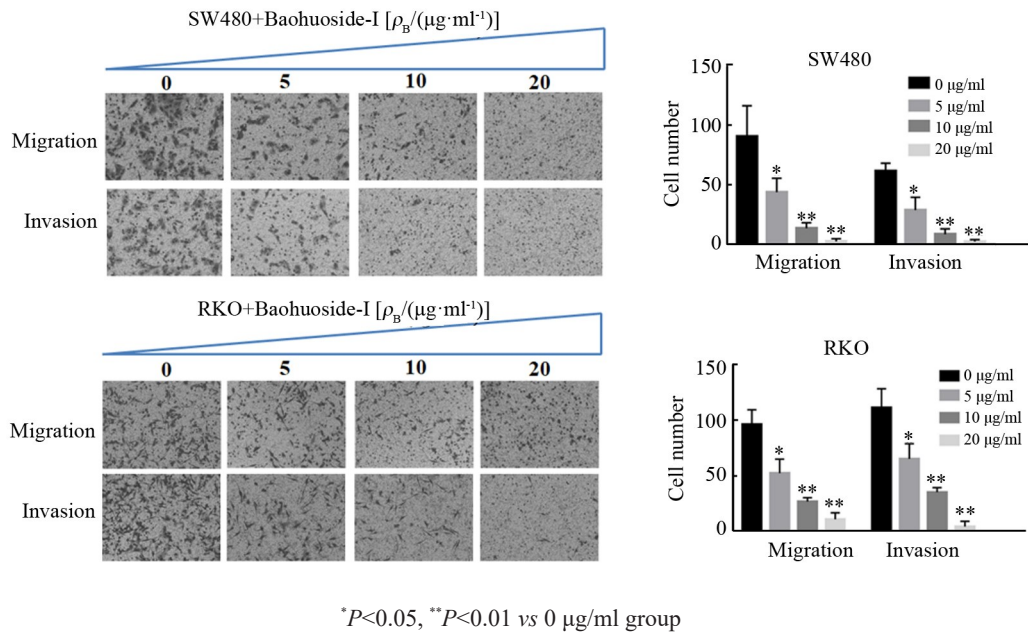


图3 Transwell实验检测宝藜苣-I对SW480和RKO细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.3 Transwell test was used to detect the effect of Baohuoside-I on the migration and invasion ability of SW480 and RKO cells

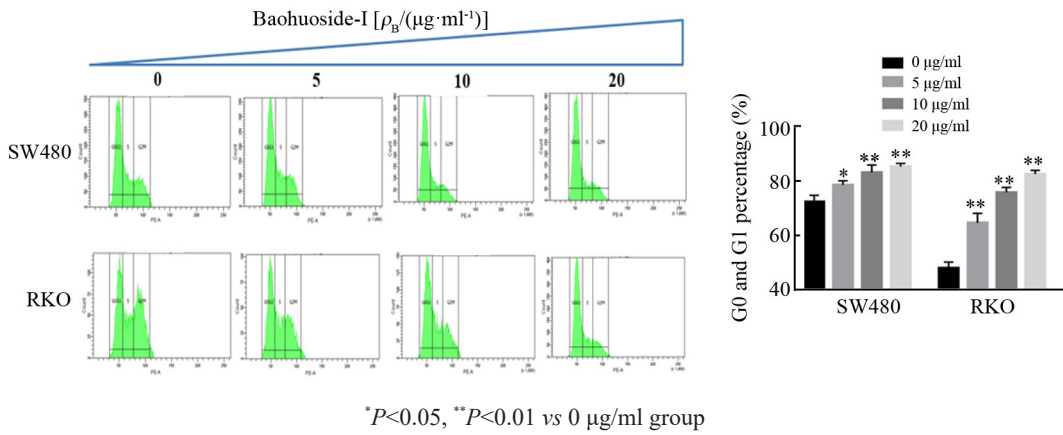


图4 流式细胞仪检测宝藜苣-I对SW480和RKO细胞周期的影响

Fig.4 Flow Cytometry was used to detect the effect of Baohuoside-I on the cell cycle of SW480 and RKO cells

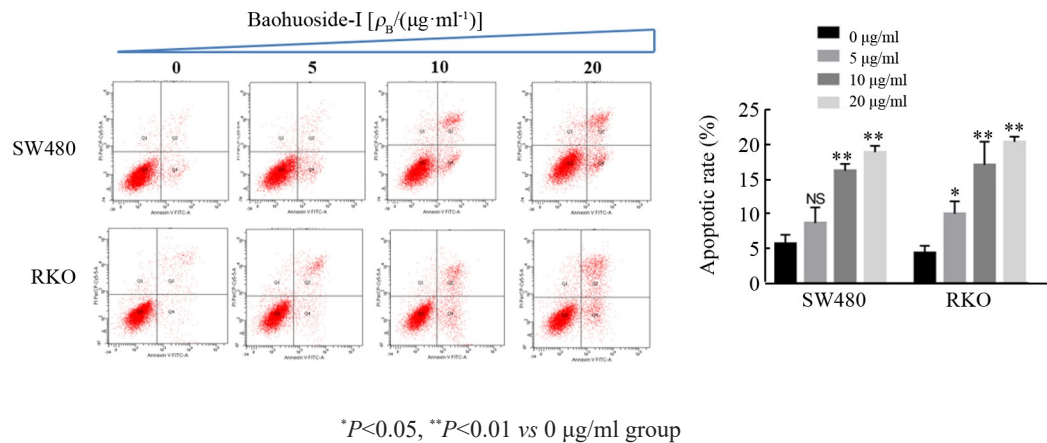


图5 流式细胞仪检测宝藜苣-I对SW480和RKO细胞凋亡的影响

Fig.5 Flow Cytometry was used to detect effect of Baohuoside-I on apoptosis of SW480 and RKO cells

G0/G1 期。此外,随宝藿苣-I浓度增加,SW480 和 RKO 凋亡细胞数量与对照组相比也明显增加,说明宝藿苣-I能够诱导 SW480 和 RKO 细胞凋亡。

2.4 宝藿苣-I对 SW480 和 RKO 细胞中 cleaved PARP、cleaved caspase-3 与 Bcl-2 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图6)显示,随宝藿苣-I

浓度增加,SW480 和 RKO 细胞株中凋亡标志物 cleaved PARP 与 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平与对照组相比明显升高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平明显降低。说明宝藿苣-I能够促进 SW480 和 RKO 细胞株中 cleaved PARP 与 cleaved Caspase-3 表达,抑制 Bcl-2 的表达。

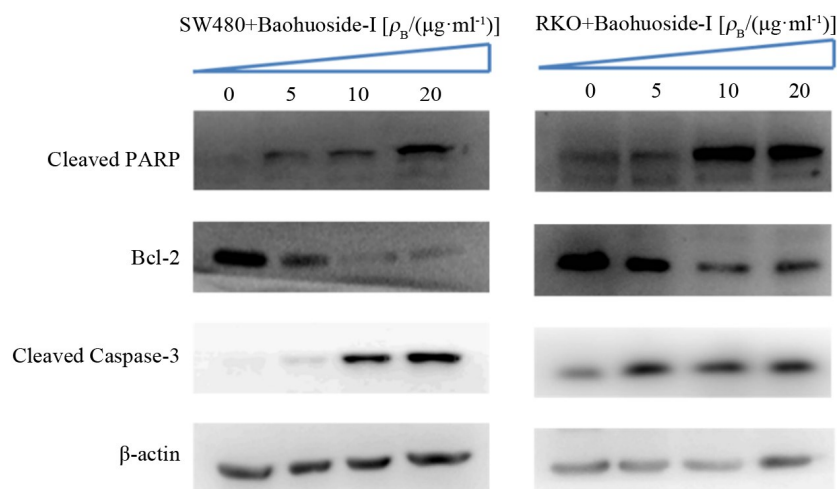


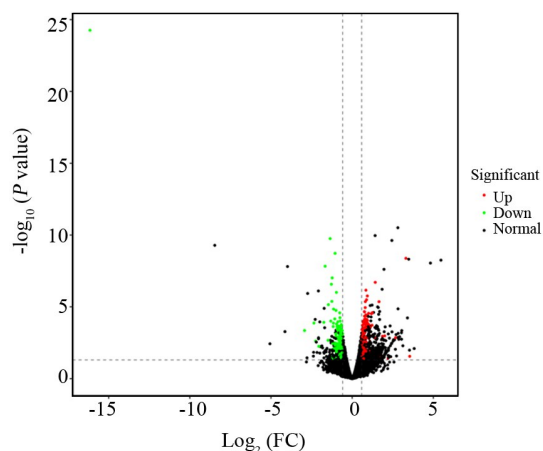
图6 Western blotting 方法检测宝藿苣-I对 SW480 和 RKO 细胞中 cleaved PARP、cleaved Caspase-3 与 Bcl-2 蛋白的影响
Fig.6 Western blotting was used to detect effect of Baohuoside-I on protein expressions of cleaved PARP, cleaved Caspase-3 and Bcl-2 in SW480 and RKO cells

2.5 宝藿苣-I对 SW480 细胞转录组的影响

提取宝藿苣-I (10 μg/ml)处理的 SW480 细胞和对照组 SW480 细胞的总 RNA,并对 mRNAs 进行测序。RNA-seq 数据分析结果显示,总共检测到 20 630 种 mRNAs(表 1),其中 376 个基因转录水平的差异在实验组与对照组间超过两倍 ($P \leq 0.05$),其中 232 个基因的转录水平下调、134 个基因的转录水平上调(图 7);将这些差异基因做聚类分析并做热图展示(图 8),进一步对这些差异基因进行富集分析,结果显示这些差异基因涉及到 48 种信号通路,其中细胞 DNA 复制和 ERBB 两个信号通路都受到显著影响(图 9)。由于这两个通路在肿瘤发生发展过程中发挥着极为重要的作用,所以宝藿苣-I对结肠癌细胞 SW480 的影响很有可能是通过影响 DNA 复制与 ERBB 通路发挥作用的。

3 讨论

近几年来,结肠癌的发病率逐渐上升,严重威胁着人们的身体健康,积极探索新的治疗药物是改善结肠癌预后和提高治愈率的重要手段,而近些年来传统中药成分在疾病预防与治疗中所展现的极高价值,提示了中药及其提取物在肿瘤治疗方面的应用潜力^[1,3]。宝藿苣-I是一种来源于传统中药香加皮和淫



The red dots indicate up-regulated differentially expressed genes as compared to the control group; the green dots indicate that the down-regulated differentially expressed genes as compared to the control group. The horizontal dashed line indicates $P = 0.05$, and the two vertical dashed lines indicate 2 fold change in transcription difference

图7 宝藿苣-I处理的 SW480 细胞和对照组间差异表达基因的火山图分析

Fig.7 Volcano gram analysis of differentially expressed genes between SW480 cells treated with Baohuoside-I and the control group

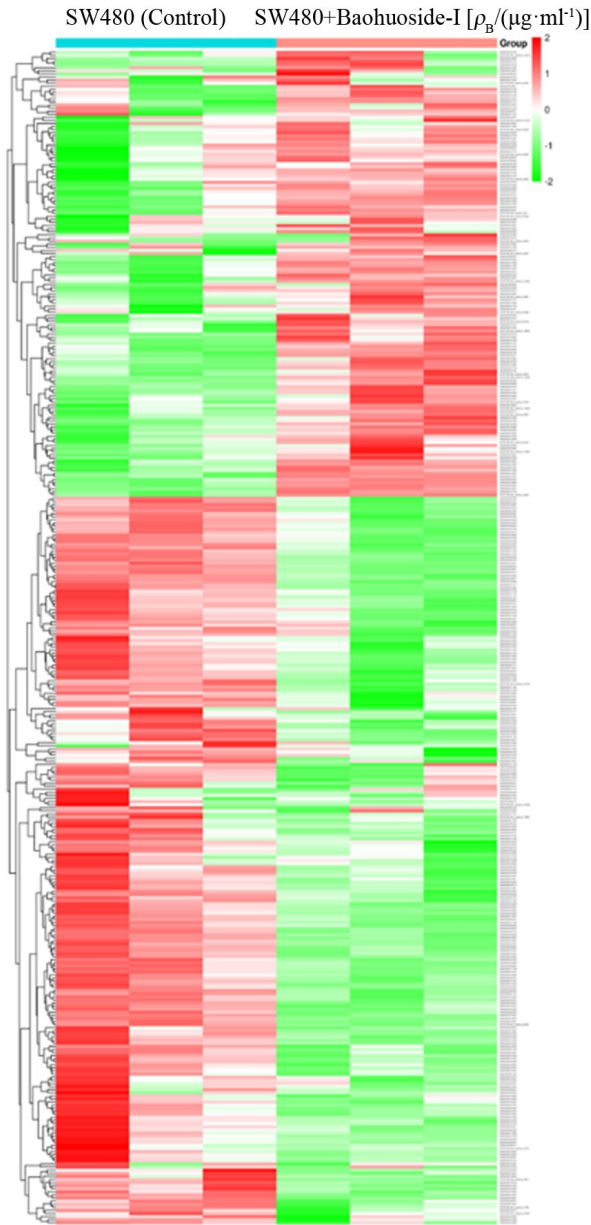


图8 宝藜苣-I处理的SW480细胞和对照组间差异表达基因的热图分析

Fig.8 Heat map analysis of differentially expressed genes between SW480 cells treated with Baohuoside-I and the control group

羊藜的多羟基黄酮类化合物,对多种癌细胞都有较好的抑制作用,包括宫颈癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、食管癌等^[7-9],但是宝藜苣-I对结肠癌恶性表型的影响还未有过报道。本研究首次通过实验,证明了宝藜苣-I对结肠癌细胞的恶性表型也具有显著的抑制作用,为宝藜苣-I进一步在临床上的应用提供了实验依据。

细胞凋亡是一种由多基因严格控制的细胞自主性、程序性死亡方式,多种药物都通过诱导细胞凋亡来发挥其抗肿瘤作用^[10]。本研究通过流式细胞仪检测到宝藜苣-I可诱导结肠癌细胞SW480和RKO凋亡,并且通过Western blotting检测到宝藜苣-I还能够

上调SW480和RKO细胞株中cleaved PARP [poly (ADP-ribose) polymerase]与cleaved Caspase-3蛋白的表达水平,下调Bcl-2蛋白的表达水平,而cleaved PARP与cleaved Caspase-3正是细胞凋亡的标志蛋白,Bcl-2属于抗凋亡蛋白,发挥抗凋亡作用^[10,11],由此说明宝藜苣-I很可能是通过上调cleaved PARP和Caspase-3、下调Bcl-2蛋白的表达来促进结肠癌细胞的凋亡。

对经宝藜苣-I处理和对照的SW480细胞的mRNAs进行测序分析,结果检测到376个差异基因,差异基因富集分析结果显示这些差异基因涉及到48种信号通路,其中细胞DNA复制信号通路受到显著影响。此外,流式细胞仪检测到宝藜苣-I能够使细胞阻滞在G0/G1期。考虑到细胞周期阻滞也是抗癌药物抑制肿瘤细胞恶性表型的一个重要机制^[12],因此研究认为,宝藜苣-I很可能通过影响DNA复制信号通路影响结肠癌细胞SW480的细胞周期,进而发挥抗肿瘤作用。差异基因富集分析的结果显示,宝藜苣-I处理结肠癌细胞SW480后,ERBB信号通路也受到显著的影响,所以宝藜苣-I还可能通过ERBB通路来发挥作用。

研究表明,宝藜苣-I通过下调趋化因子受体CXCR4的表达来抑制宫颈癌和乳腺癌细胞的侵袭^[7]、还可以通过ROS/MAPK途径诱导非小细胞肺癌细胞的凋亡^[9];还可能通过下调β-catenin、Cyclin D1、Survivin的表达和上调TFPI-2的表达而影响β-catenin信号通路,进而抑制人食管癌细胞的增殖和侵袭能力,并诱导细胞发生G0/G1期阻滞和细胞凋亡^[8,13-16]。本研究发现,宝藜苣-I很可能通过调控凋亡相关蛋白表达、细胞DNA复制及ERBB信号通路相关基因的转录来抑制结肠癌细胞SW480和RKO的恶性表型。研究结果提示,宝藜苣-I是一种很有潜力的抗癌药物,抗肿瘤作用机制具有多样性和复杂性。

[参考文献]

[1] YUICHIRO HATANO, SHINYA FUKUDA, KENJI HISAMATSU, et al. Multifaceted interpretation of colon cancer stem cells[J]. Inter J Mol Sci, 2017, 18, 1446. DOI: 10.3390/ijms18071446.
 [2] 李丽娟, 叶卓淼, 熊坚. 苦参碱对结肠癌的作用机制的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(69): 32-33. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.69.017
 [3] TAO H U, ZHEN L I, GAO C Y, et al. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(30): 6876-6889. DOI: 10.3748/wjg.v22.i30.6876.
 [4] 张子怡, 林泉任, 叶春雨, 等. 结肠癌干细胞标志物和信号通路的研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(8): 802-811. DOI: 10.13376/j.cbls/2019098

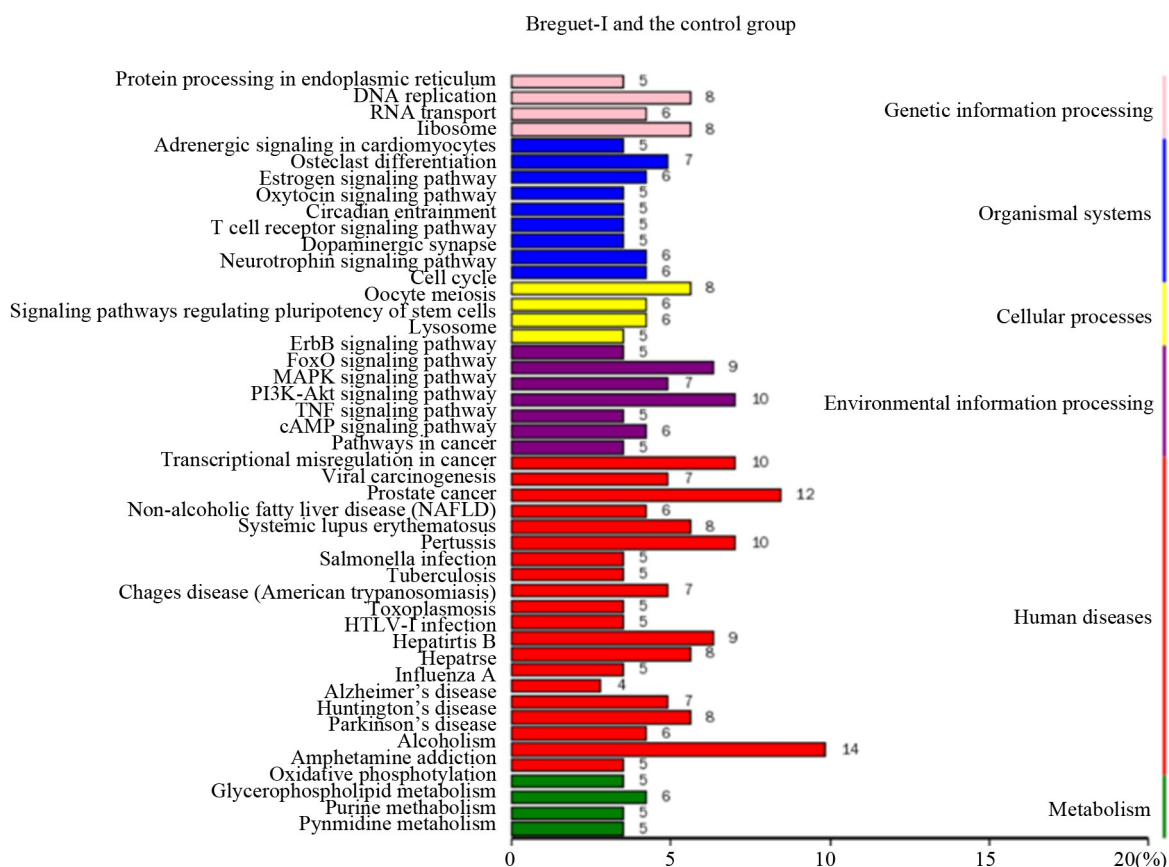


图9 宝藜苷处理的SW480细胞和对照组间差异表达基因KEGG富集分析

Fig.9 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between SW480 cells treated with Baohuoside-I and the control group

[5] PENG G Y, LI ZHANG. Baohuoside-I suppresses cell proliferation and migration by up-regulating miR-144 in melanoma[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2018, 56(1): 43-50. DOI: 10.1080/13880209.2017.1418391.

[6] 刘丽娟, 李健, 毕志明. 中药香加皮的抗肿瘤作用研究进展[J]. *中医学报*, 2013, 28(178): 317-319. DOI: 10.16368/j. issn. 1674-8999.2013.03.062.

[7] BUYUN KIM, BYOUNGDUCK PARK. Baohuoside I suppresses invasion of cervical and breast cancer cells through the downregulation of CXCR4 chemokine receptor expression[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(48):7562-7569. DOI: 10.1021/bi5011927.

[8] WANG L F, LU AN, LIU X X, et al. The flavonoid Baohuoside-I inhibits cell growth and downregulates survivin and cyclin D1 expression in esophageal carcinoma via β -catenin-dependent signaling[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5):1149-1156. DOI: 10.3892/or.2011.1400.

[9] SONG J, SHU L, ZHANG Z H, et al. Reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway is involved in Baohuoside I-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer[J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 199(1): 9-17. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.05.005.

[10] 纪昕, 李伟皓, 王崇, 等. 淫羊藿苷对食管癌细胞EC9706增殖与

凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3):143-147. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030143.

[11] 蒋绍艳, 常宏, 樊丹怡, 等. 淫羊藿苷对人卵巢癌细胞株的肿瘤恶性行为的抑制作用研究[J]. *四川大学学报*, 2018, 49(4): 530-534. DOI:10.13464/j.scuxbyxb.2018.04.005.

[12] 朱燕辉, 黄丽霞, 石崇军. 淫羊藿苷对肝癌细胞株SMMC-7721增殖与凋亡的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(8): 968-972.

[13] 刘晓霞, 刘红珍, 陈剑华, 等. 宝藜苷对人食管癌细胞Eca-109增殖及细胞周期的影响[J]. *中草药*, 2009, 40(10): 1590-1593.

[14] 王丽芳, 单保恩, 任凤芝, 等. 香加皮单体成分宝藜甙I对食管癌细胞及裸鼠移植瘤生长抑制作用研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(8): 635-638.

[15] 王丽芳, 单保恩, 刘丽华, 等. 香加皮单体成分宝藜甙I对食管癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. *肿瘤*, 2009, 29(2): 123-126.

[16] 刘晓霞, 李菊梅, 陈剑华, 等. 香加皮宝藜甙-I对人食管癌细胞Eca-109侵袭力的影响[J]. *当代医学*, 2011, 17(31): 3-5.

[收稿日期] 2019-12-15

[修回日期] 2020-02-18

[本文编辑] 韩丹