

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.20.007

三种去甲基斑蝥素衍生物体外对人肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用*

姜胜男¹ 朱欣婷^{1,2} 刘云^{2,3} 李三华^{2,3} 雷欣睿¹ 晏容^{1,2} 李晓飞^{1,Δ}

(1 遵义医学院基础医学院 贵州 遵义 563000; 2 贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治重点实验室 贵州 遵义 563000;

3 遵义医学院医学与生物学研究中心 贵州 遵义 563000)

摘要 目的:探讨去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙体外对人肝癌 HepG-2 细胞增殖的影响。**方法:**采用磺酰罗丹明 (SRB 法)、细胞集落形成实验、流式细胞技术检测三种去甲基斑蝥素衍生物对 HepG-2 细胞增殖和凋亡的影响。qRT-PCR 技术考察三种去甲基斑蝥素衍生物对 HepG-2 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响。**结果:**三种去甲基斑蝥素衍生物能明显抑制 HepG-2 细胞的增殖,其抑制率呈剂量时效依赖性;与空白对照组相比,三种去甲基斑蝥素衍生物能显著性减少 HepG-2 细胞集落形成数量,并且可诱导 HepG-2 细胞的凋亡,凋亡率分别为 $8\pm 0.56\%$ 、 $6.93\pm 0.91\%$ 、 $6.16\pm 0.37\%$;qRT-PCR 显示,三种去甲基斑蝥素衍生物能抑制 HepG-2 细胞 Bcl-2mRNA 的表达,增强 Bax mRNA 的表达。**结论:**三种去甲基斑蝥素衍生物可通过下调 Bcl-2 mRNA 表达,上调 Bax mRNA 表达,诱导 HepG-2 细胞的凋亡,从而抑制 HepG-2 细胞的增殖;三种衍生物中,去甲基斑蝥素酸钠对 HepG-2 细胞的增殖的抑制作用最强。

关键词:去甲基斑蝥素酸钠;去甲基斑蝥素酸钾;去甲基斑蝥素酸钙;人肝癌 HepG-2 细胞;抑制作用

中图分类号:R-33; R273; R730.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)20-3831-05

Inhibitory Effect of Three Norcantharidin Derivatives on HepG-2 Cells in Vitro*

JIANG Sheng-nan¹, ZHU Xin-ting^{1,2}, LIU Yun^{2,3}, LI San-hua^{2,3}, LEI Xin-rui¹, YAN Rong^{1,2}, LI Xiao-fei^{1,Δ}

(1 Basic Medical College, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, 563000, China;

2 Guizhou Provincial College-based Key Lab for Tumor Prevention and Treatment with Distinctive Medicines, Zunyi, Guizhou, 563000, China; 3 Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, 563000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the inhibitory effect of three norcantharidin derivatives which were named sodium norcantharidate, potassium norcantharidate and calcium norcantharidate on human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. **Methods:** The effect of three norcantharidate derivatives on HepG-2 cells proliferation was assessed with SRB assay. The cell colony forming experiment test was adopted to observe the impact of derivatives on colony formation ability of HepG-2 cells. The flow cytometry was used to examine the effect on HepG-2 cells apoptosis, and mRNA levels of Bcl-2 and Bax were measured with RT-qPCR. **Results:** Three norcantharidate derivatives inhibited the proliferation of HepG-2 cells with a time and dose dependent relation. Compared with the blank control group, derivatives were able to obviously inhibit cell colony formation and induce apoptosis of HepG-2 cells. The apoptosis rate were $8\pm 0.56\%$, $6.93\pm 0.91\%$, $6.16\pm 0.37\%$, respectively. Base on the results of RT-qPCR, three norcantharidate derivatives had the ability to reduce the mRNA levels of Bcl-2 and improve the mRNA levels of Bax. **Conclusion:** The three kinds of norcantharidate derivatives could inhibit the proliferation and induce apoptosis of HepG-2 cells which involve in down-regulating the mRNA levels of Bcl-2 and up-regulating the mRNA levels of Bax. Among three derivatives, sodium cantharidinate shows the strongest inhibitory activity on HepG-2 cells.

Key words: Sodium Norcantharidate; Potassium Norcantharidate; Calcium Norcantharidate; Human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells; Inhibitory effect

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R273; R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)20-3831-05

前言

癌症是威胁人类生命的恶性疾病之一,防癌治癌是医药工

作者的重要任务。化疗是治疗肿瘤的常规方法,但化疗药物常表现出毒副作用大的特点。寻找高效低毒的抗肿瘤化合物已成为研究热点。斑蝥是南方大斑蝥(大斑芫菁, *Mylabrisphalerata*

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81260488, 81660611);贵州省科技合作计划项目(黔科合 LH 字[2015]7516 号,黔科合 LH 字[2015]7509 号);贵州省卫计委科学基金项目(gzwjk2015-1-013);贵州省教育厅特色重点实验室建设项目(黔教教 KY 字[2014]212);贵州省遵义市汇川区科技计划项目(遵汇科合 201630)

作者简介:姜胜男(1989-),研究方向:药用昆虫资源开发与利用,E-mail: 964437330@qq.com

Δ 通讯作者:李晓飞,E-mail: lixiaofei35@sohu.com

(收稿日期:2016-12-29 接受日期:2017-01-25)

Pallas)或黄黑小斑蝥(眼斑芫菁, *Mylabris cichorii* Linnaeus)的干燥虫体^[1],从芫菁科昆虫斑蝥体内提取的斑蝥素(Cantharidin, CA)对喉癌、胃癌、肾癌、肺癌、皮肤癌等多种恶性肿瘤的生长均表现出抑制作用^[2-5]。去甲基斑蝥素(norcantharidin, NCTD)去除了斑蝥素结构上的两个甲基,是一种结构类似于斑蝥素的我国自主研发的抗癌化合物,但毒性较斑蝥素小,且对泌尿系统的刺激基本消失,目前已作为临床用药^[6]。目前临床使用的斑蝥素衍生物除了去甲基斑蝥素外,还有斑蝥素酸钠,大量报道了斑蝥素酸钠具有抗癌效果^[7-10]。鉴于此,本课题以毒性弱于斑蝥素的去甲基斑蝥素为主体,除了合成去甲基斑蝥素酸钠外,还自主合成了去甲基斑蝥素酸钾和去甲基斑蝥素酸钙,并初步探讨三种去甲基斑蝥素衍生物抑制人肝癌 HepG-2 细胞生长的作用。本文旨在以肝癌 HepG-2 细胞为实验对象,探讨去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾和去甲基斑蝥素酸钙对其抑制效果,为今后去甲基斑蝥素衍生物作用于临床癌症治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 肝癌细胞株 人肝癌细胞 HepG-2 细胞由遵义医学院医学与生物医学研究中心提供。

1.1.2 三种去甲基斑蝥素衍生物 去甲基斑蝥素酸钠,去甲基斑蝥素酸钾,去甲基斑蝥素酸钙由课题组合成,并申请了国家发明专利。

1.1.3 试剂 RPMI-1640 培养基 Gibco 公司(美国)、胎牛血清 Hyclone 公司(美国)、磺酰罗丹明 Sigma 公司(美国)、胰蛋白酶、SRB 染液、吉姆萨染液、细胞凋亡检测试剂盒碧云天公司、RNAiso plus TakaRa 公司(日本)、PCR 引物上海生工生物工程公司、反转录试剂盒 TakaRa 公司(日本)。

1.1.4 仪器 3131 型 CO₂ 培养箱、酶标仪、全波长酶标仪、台式离心机美国热电公司,超净工作台、苏州安泰空气技术有限公司,显微镜 OLYMPUS 公司(日本),DU800 分光光度计(德国),CFX96Real-Time System BIO-RAD 公司(美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌 HepG-2 细胞接种于培养瓶,加入 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清),37℃ 5% CO₂,静置培养。待长至瓶底面积 70-80%时,弃去培养液,PBS 冲洗 2 遍,0.25%胰酶消化后,加培养液于 CO₂ 培养箱中继续传代培养。

1.2.2 磺酰罗丹明(sulforhodamine B, SRB)染色法 参考文献方法^[11]略有改动;取对数生长期人肝癌 HepG-2 细胞,胰酶消化后平行接种于两块 96 孔板。分别为实验板(T)、对照板(T₀),培养 20 h,取对照板(T₀)加 TCA 固定液固定,4℃ 保存,待测;实验板(T)中分别加入 100 μL 含去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙的培养液(终浓度分别为 5、2.5、1.25、0.625、0.325 μg·mL⁻¹);阴性对照孔加入培养液 100 μL。每个组设 5 个重复。分别静置 24、48 h 后,加入预冷的 TCA 固定,于 4℃ 冰箱固定 1 h。去离子水洗板,室温晾干。加入 0.4% SRB 染料 100 μL,静置 10 min。0.1% 醋酸洗板,室温晾干。加入 10 mmol·L⁻¹ 缓冲 Tris 液(pH 10.5),每孔 200 μL,使其充分溶解。调整波长 530 nm,酶标仪测 OD 值,按照下列公式计算抑制

率:

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率} = [1 - \frac{\text{OD}(T) - \text{OD}(T_0)}{\text{OD}(C) - \text{OD}(T_0)}] \times 100\% \quad (T: \text{实验组}, T_0: \text{对照组}, C: \text{阴性对照组})$$

实验组, T₀: 对照组, C: 阴性对照组)

1.2.3 细胞集落形成实验 取对数生长期的人肝癌细胞 HepG-2,胰酶消化接种于 6 孔板,每孔接种 1 mL(约含 300 个/mL 细胞悬液)。37℃、5% CO₂ 培养 24 h。弃掉培养液,每孔加入含去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙(终浓度分别为 2.5、1.25 μg·mL⁻¹)。实验组与对照组均设 3 个平行,培养 10 天,定时观察集落形成情况。待集落形成取出培养板, PBS 小心冲洗,室温晾干。甲醇固定细胞 15 min。吸出甲醇,室温晾干。配制 Giemsa 染液,染色约 10 min。小心洗去染液,室温晾干^[12]。按公式计算克隆形成率(%)。

$$\text{克隆形成率}(\%) = (\text{克隆数} / \text{接种细胞数}) \times 100\%$$

1.2.4 流式细胞技术 将人肝癌 HepG-2 细胞接种于 6 孔板,24 h 后分别加入 2.5 μg·mL⁻¹ 的去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙,处理 24 h 后, PBS 冲洗,胰酶消化,收集细胞于离心管离心(1000 rpm, 5 min),弃上清,取 1×10⁵ 个细胞加入 PBS,再次离心,按说明书加入 PI 及 FITC 以及 FITC 结合液。

1.2.5 RT-qPCR 检测 Bcl-2、Bax mRNA 的表达 取对数生长期的人肝癌细胞 HepG-2,胰酶消化接种于 6 孔板。37℃、5% CO₂ 培养 24 h。弃掉培养液,每孔加入含去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙的培养基(终浓度为 2.5 μg·mL⁻¹)。放入培养箱分别培养 24 h。按照 RNAiso plus 说明书提取总 RNA,并反转成 cDNA。引物序列: Bcl-2 上游引物: 5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3', 下游引物: 5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCAA-3'。 Bax 上游引物: 5'-CCGATTCATCTACCCTGCTG-3', 下游引物: 5'-TGAGCAATTCCAGAGGCAGT-3'。 β-actin 上游引物: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 下游引物: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT。上下游引物共 1.6 μL,模板 DNA 2 μL,共 20 μL。PCR 反应条件: 预变性 95℃ 2 min,变性 95℃ 5 s,退火 60℃ 30 s,延伸 65℃ 30 s(40 个循环),终延伸 95℃ 5 min。根据各组样品的 Ct 值(公式 2^{-(Ct - Ct0)}),计算 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 相对表达量。

1.3 统计方法

分析采用 SPSS16.0 分析软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析做统计学检验, P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞增殖的影响

当 0.3125~5 μg·mL⁻¹ 的去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙作用于肝癌 HepG-2 细胞 24 h(图 1 所示),以浓度为横坐标,抑制率为纵坐标生成回归曲线;分别得到回归方程: $y = 14.759 \ln(x) + 47.579$ ($R^2 = 0.9412$); $y = 15.671 \ln(x) + 44.394$ ($R^2 = 0.9673$); $y = 15.671 \ln(x) + 44.394$ ($R^2 = 0.9673$)。经计算得去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 1.17 μg·mL⁻¹、1.43 μg·mL⁻¹、2.36

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同理,当作用细胞时间为 48 h 后,去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙的 IC_{50} 分别为 $0.39 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果显示,三种去甲基斑蝥素

衍生物均能抑制 HepG-2 细胞的增殖,且与浓度和时间呈正相关,其中去甲基斑蝥素酸钠对 HepG-2 细胞的抑制效果最好。

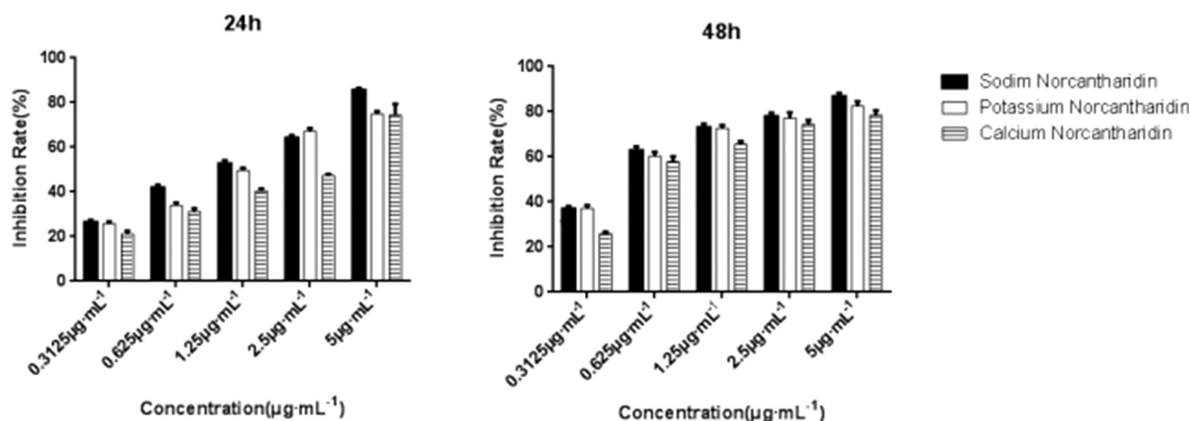


图 1 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of three norcantharidin derivatives on proliferation of HepG-2 cells

2.2 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞集落形成的影响

如图 2 所示,与空白对照组相比,三组处理组的细胞集落数量均有减少的现象。当浓度为 $1.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾和去甲基斑蝥素酸钙分别作用于肝癌

HepG-2 细胞 24 h 后,细胞集落形成率分别为 $14.69 \pm 0.27\%$ 、 $17.3 \pm 0.27\%$ 、 $22.28 \pm 0.75\%$ 。当作用浓度增加为 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,集落形成率分别减小至 $3.15 \pm 0.17\%$ 、 $6.85 \pm 0.12\%$ 、 $7.43 \pm 0.22\%$ 。去甲基斑蝥素酸钠对人肝癌 HepG-2 细胞集落形成抑制作用最强,与 "2.1" 表现的结果一致。

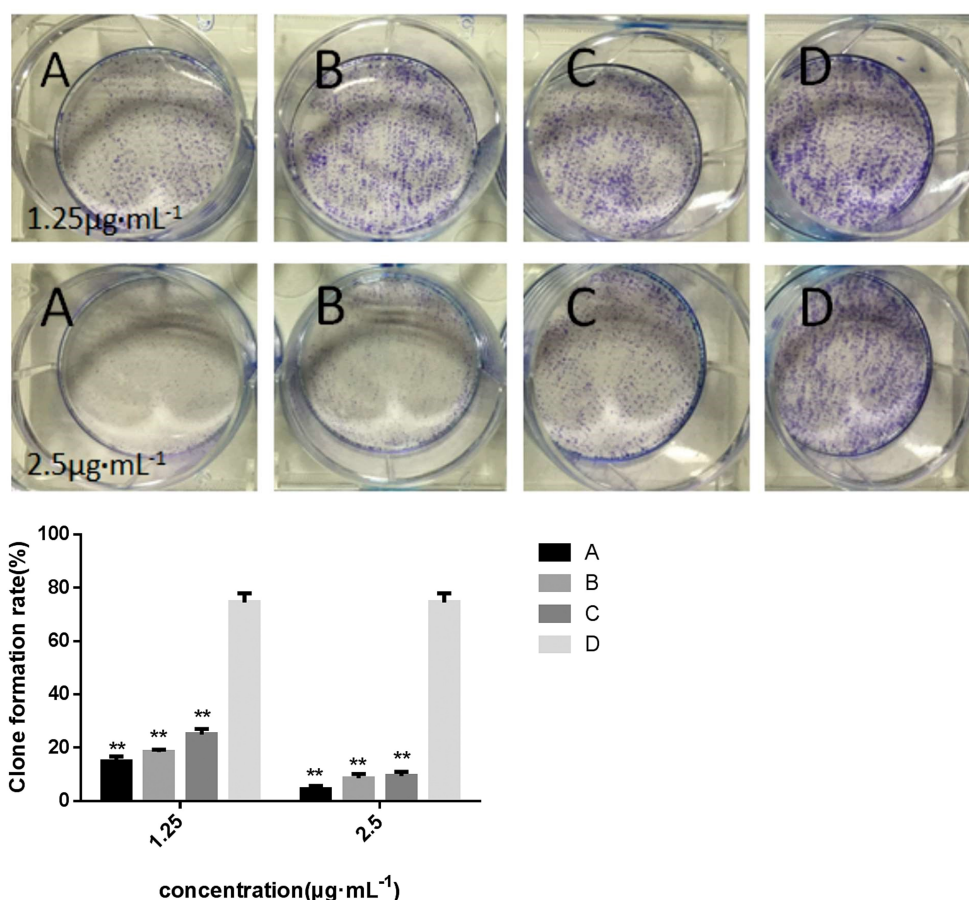


图 2 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞集落形成的影响

Fig.2 The influence of three norcantharidin derivatives on colony formation of HepG-2

Note: A: Sodium Norcantharidin B: Potassium Norcantharidin C: Calcium Norcantharidin D: Control

Compared with control group ** $P < 0.01$ $n=3$

2.3 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响

2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙作用于人肝癌细胞作用于肝癌 HepG-2 细胞 24

h 后(如图 3 示),均出现凋亡现象,凋亡率分别为 $8\pm 0.56\%$ 、 $6.93\pm 0.91\%$ 、 $6.16\pm 0.37\%$,与空白对照组相比,具有显著性差异($P<0.01$)。去甲基斑蝥素酸钠诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡作用强于去甲基斑蝥素酸钾和去甲基斑蝥素酸钙。

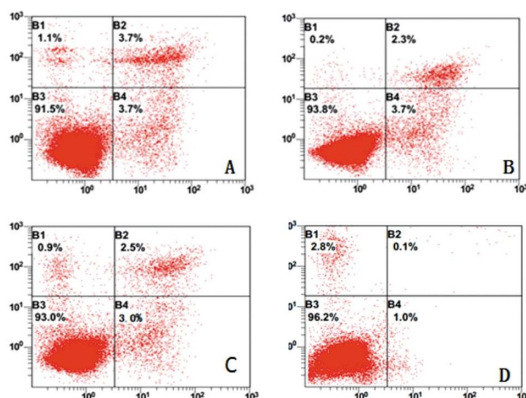


图 3 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响

Fig.3 Apoptotic effect of three norcantharidin derivatives on HepG-2 cells

Note: A: Sodium Norcantharidin B: Potassium Norcantharidin C: Calcium Norcantharidin D: Control

Compared with control group ** $P<0.01$ n=3

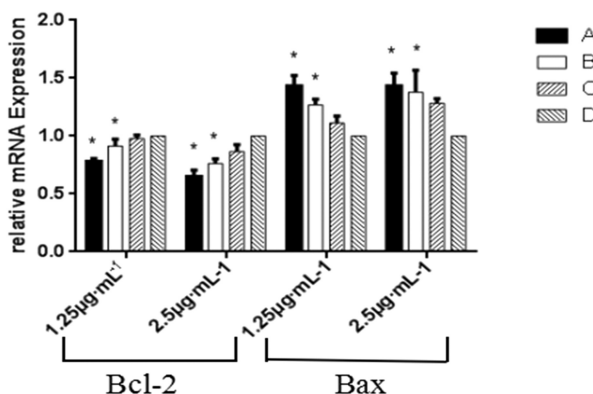
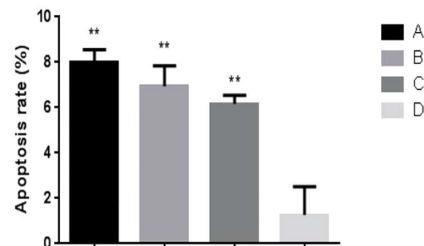


图 4 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

Fig.4 Changes of mRNA expressions of Bcl-2 and Bax in HepG-2 cells following three norcantharidin derivatives treatment

Note: Compared with control group * $P<0.05$ n=3

Note: A: Sodium Norcantharidin B: Potassium Norcantharidin

C: Calcium Norcantharidin D: Control

Compared with control group * $P<0.01$ n=3

2.4 三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HepG-2 细胞 Bcl2、Bax mRNA 表达的影响

如图 4 所示,去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙分别作用于人肝癌 HepG-2 细胞 24 h 后,当浓度为 $1.25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 Bcl-2 mRNA 的表达量分别为 0.78 ± 0.03 、 0.91 ± 0.06 、 0.97 ± 0.03 。Bax mRNA 的表达量分别为 1.4 ± 0.09 、 1.27 ± 0.05 、 1.11 ± 0.06 。当浓度为 $2.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 Bcl-2 mRNA 的表达量分别为 0.65 ± 0.06 、 0.73 ± 0.0 、 0.86 ± 0.06 。Bax mRNA 的表达量分别为 1.43 ± 0.11 、 1.38 ± 0.39 、 1.28 ± 0.04 。三组实验组的 Bcl-2 mRNA 均表达下调,Bax mRNA 表达上调。

3 讨论

斑蝥是我国民间用于抗癌的昆虫类传统中药,用药不当易使使用者中毒甚至死亡。其抗癌有效成分 -- 斑蝥素的化学全合成困难,难以大量投入生产。而斑蝥素类衍生物 -- 去甲基斑蝥素已通过化学全合成的方法大量制备,并且同样表现出抗肿瘤活性,而毒性较斑蝥素小,已经用于临床。因此,围绕斑蝥素和去甲基斑蝥素的结构改造及合成工作已成为抗肿瘤药物研究的一个重要方向。课题组在前期的工作中已合成了斑蝥素类衍生物,并报道了抗肿瘤活性^[13,14]。在此经验上,课题组对去甲基斑蝥素进行了结构修饰,合成了去甲基斑蝥素酸钠、去甲基斑蝥素酸钾和去甲基斑蝥素酸钙,并考察了三种去甲基斑蝥素衍生物对人肝癌 HpeG-2 细胞的抑制作用。

SRB 法检测结果显示,随着三种去甲基斑蝥素衍生物作用于 HepG-2 细胞的浓度增加和作用时间的延长,细胞抑制率出现增高趋势,表现出剂量时间依赖性。三种去甲基斑蝥素衍生物中,去甲基斑蝥素酸钠对 HepG-2 细胞的抑制作用最强。研究发现,肿瘤的恶性程度与软琼脂形成集落的多少呈正相关^[15]。癌细胞侵袭能力越强,会表现出集落数目越多且集落体积越大的现象^[16]。本研究通过集落形成实验同样证明,三种去甲基斑蝥素衍生物中去甲基斑蝥素酸钠对人肝癌 HepG-2 细胞的抑制作用最为显著。

目前,大多数的抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞的增殖是通过促进肿瘤细胞凋亡达到的,细胞凋亡是细胞在生理或病理状态下发生的一种自发性、程序性死亡的过程。细胞发生凋亡和众多基因调控有密切关系^[17,18]。调控机制中,线粒体通路扮演着重要角色,而 Bcl-2 基因家族对细胞凋亡的调控是线粒体通路中很重要的组成部分。Bcl-2 基因家族中 Bcl-2 基因是主要的抗凋亡基因,Bax 基因是促凋亡的代表成员。Bcl-2/Bax 比例是影响细胞凋亡的重要 " 分子开关 " ^[19]。本研究,利用 $2.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的三种去甲基斑蝥素衍生物分别作用于 HepG-2 细胞 24 h 后,细胞均出现凋亡现象。通过 RT-qPCR 检测发现,三组实验组细胞

的 Bcl-2 mRNA 均表达下调, 而 Bax mRNA 表达上调, Bcl-2/Bax 比例明显下降。实验结果提示,合成的三种去甲基斑蝥素可能是通过抑制 Bcl-2 mRNA 的表达,上调 Bax mRNA 表达诱导人肝癌 HepG-2 细胞的凋亡,从而抑制肿瘤细胞的增殖。史兆章等^[20]报道了去甲基斑蝥酸钠可阻滞人肝癌 HepG-2 细胞于 G0/G1 期,抑制 HepG-2 细胞增殖。此外,去甲基斑蝥素酸钠在体外可抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖^[21],还可用于治疗非小细胞肺癌^[22]。综合本实验结果可以初步说明去甲基斑蝥素酸钠在抑制肿瘤的增殖方面表现出良好的活性,是一种重要的斑蝥素类抗癌衍生物。而本次研究首次报道了自主合成的去甲基斑蝥素酸钾、去甲基斑蝥素酸钙对人肝癌 HepG-2 细胞的抑制作用,其抑制作用不及去甲基斑蝥素酸钠。但课题组前期工作发现斑蝥素酸钾对胃癌 SGC-7901 细胞的抑制作用好于斑蝥素酸钠^[23],该研究结果提示:去甲基斑蝥素酸钾或去甲基斑蝥素酸钙是否也会类似于斑蝥素酸钾,能抑制其他肿瘤细胞的增殖,并且抑制作用优于去甲基斑蝥素酸钠? 课题组将在后期工作中陆续筛查三种去甲基斑蝥素衍生物对不同肿瘤细胞的抑制作用,以期去甲基斑蝥素衍生物的开发和利用提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医学科学出版社, 2010, 311
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010, 311
- [2] 李晓飞, 侯晓晖, 陈祥盛. 芫菁斑蝥素对喉癌细胞和胃癌细胞的抑制作用[J]. 昆虫学报, 2009, 52(9): 946-951
Li Xiao-fei, Hou Xiao-hui, Chen Xiang-sheng. Inhibitory effect of cantharidin from Meloidson Hep-2 Cells and gastric cancer cells[J]. Acta Entomologica Sinica, 2009, 52(9): 946-951
- [3] Ren Y, Zhang SW, Xie ZH, et al. Cantharidin induces G2/M arrest and triggers apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Mol Med Rep, 2016, 14 (6): 5614-5618
- [4] Hsia TC, Yu CC, Hsiao YT, et al. Cantharidin Impairs Cell Migration and Invasion of Human Lung Cancer NCI-H460 Cells via UPA and MAPK Signaling Pathways [J]. Anticancer Res, 2016, 36 (11): 5989-5997
- [5] Li CC, Yu FS, Fan MJ, et al. Anticancer effects of cantharidin in A431 human skin cancer (Epidermoid carcinoma) cells in vitro and in vivo [J]. Environ Toxicol, 2016, 10(1): 399-401
- [6] 李先茜, 李晓丽. 去甲基斑蝥素诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(9): 1145-1146
Li Xian-xi, Li Xiao-li. Research progress of norcantharidin induced apoptosis of tumor cells [J]. Laboratory medicine and clinical, 2013, 10(9): 1145-1146
- [7] 周韬, 王明艳, 李文婷, 等. 斑蝥酸钠对肝癌细胞 SMMC-7721 周期、凋亡及端粒酶影响研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(5): 29-31
Zhou Tao, Wang Ming-yan, Li Wen-ting, et al. Sodium cantharidinate on hepatocellular carcinoma cell cycle, apoptosis and telomerase SMMC-7721 effect [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 16(5): 29-31
- [8] 张霞, 关洪全. 斑蝥酸钠诱导 RTP801 表达促进结肠癌细胞 HCT116 凋亡[J]. 中国医科大学学报, 2016, 3: 222-227
Zhang xia, Guan Hong-quan. Promote the expression of colon cancer HCT116 cells apoptosis induced by RTP801 [J]. Journal of China Medical University, 2016, 3: 222-227
- [9] 秦艳青, 沈卫. 斑蝥酸钠及康艾注射液联合 5-Fu 节拍化疗治疗晚期胃癌的临床观察[J]. 中西医结合研究, 2016, 3: 140-142
Qin Yan-qing, Shen Wei. Clinical observation of sodium cantharidinate and Kang'ai injection combined with 5-Fu chemotherapy in the treatment of advanced gastric cancer [J]. Integrated traditional Chinese and Western Medicine, 2016, 3: 140-142
- [10] 黄丹仪, 吴转斌, 黄勤, 等. 斑蝥酸钠与喜树碱联用抗肿瘤效果的实验研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 11: 1519-1525
Huang Dan-yi, Wu Zhuan-bin, Huang Qin, et al. Experimental study of sodium cantharidate and camptothecin combined with anti tumoreffect[J]. Chinese Journal of cell biology, 2014, 11: 1519-1525
- [11] Vanichavichai, Kanyawin Kirtikara. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening [J]. Nature Protocols, 2006, (3): 1112-1116
- [12] 卜雯雯, 朱欣婷, 刘云, 等. 斑蝥素酸镁与斑蝥酸钠对喉癌 Hep-2 细胞抑制活性比较的初步研究 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15 (12): 2234-2238
Bu Wen-wen, Zhu Xin-ting, Liu Yun, et al. A preliminary comparison of the activity of cantharidin magnesium and sodium cantharidinate on laryngeal carcinoma cells Hep-2 inhibition investigate[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(12): 2234-2238
- [13] 李晓飞, 姜方明, 晏容, 等. 三种斑蝥素盐类物质对肝癌 QGY-7703 细胞生长的抑制作用[J]. 中国老年学杂志, 2013, 9: 2049-2050
Li Xiao-fei, Lou Fang-ming, Yan Rong, et al. Three kinds of cantharidinsalts on the growth of hepatocellular carcinoma cells QGY-7703 inhibition of [J]. China Journal of Gerontology, 2013, 9: 2049-2050
- [14] 晏容, 刘云, 朱欣婷, 等. 不同斑蝥素类物质对人肝癌细胞 HepG2 增殖作用的研究[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(21): 3209-3211
Yan Rong, Liu Yun, Zhu Xin-ting, et al. Study on different cantharidin substances on the proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. Modern medical and health, 2015, 31(21): 3209-3211
- [15] Thapa N, Choi S, Hedman A, et al. Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase I γ i2 in association with Src controls anchorage-independent growth of tumor cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(48): 34707-34718
- [16] Huang WS, Wang TB, He Y, et al. Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide RNA interference inhibits growth of colon cancer cell SW948 [J]. World Journal of Gastroenterology, 2012, 18(26): 3458-3464
- [17] 吴艳玲, 夏丽洁, 张富春. 新疆家蚕抗菌肽诱导人胃癌细胞 AGS 凋亡的研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 2: 186-193
Wu Yan-ling, Xia Li-jie, Zhang Fu-chun. Apoptosis of human gastric cancer cell line AGS induced by antibacterial peptide from Xinjiang silkworm[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2015, 2: 186-193

- weighted sound level measurements for prediction of low-frequency noise annoyance[J]. Environment International, 1997, 23(4): 519-527
- [15] Holmberg K, Landström U, Kjellberg A. Low frequency noise level variations and annoyance in working environments[J]. Journal of Low Frequency Noise Vibration & Active Control, 1997, 16(2): 81-87
- [16] Muzet A. Environmental noise, sleep and health [J]. Sleep Medicine Reviews, 2007, 11(2): 135-142
- [17] Smith M G, Croy L, Ogren M, et al. On the Influence of Freight Trains on Humans: A Laboratory Investigation of the Impact of Nocturnal Low Frequency Vibration and Noise on Sleep and Heart Rate[J]. Plos One, 2013, 8(2): e55829
- [18] Alimohammadi L, Sandrock S, Gohari M R. The effects of low frequency noise on mental performance and annoyance [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2013, 185(8): 7043-7051
- [19] Bolin K, Bluhm G, Eriksson G, et al. Infrasound and low frequency noise from wind turbines: exposure and health effects [J]. Environmental Research Letters, 2011, 6(3): 329-346
- [20] Stansfeld S, Haines M, Brown B. Noise and health in the urban environment [J]. Reviews on Environmental Health, 2000, 15(1-2): 43-82
- [21] Moses A J. Measurement of magnetostriction and vibration with regard to transformer noise [J]. IEEE Transactions on Magnetics, 1974, MA10(2): 154-156
- [22] 俞鹏, 翟国庆, 黄逸凡, 等. 城市居住区设备噪声频率特性分析[J]. 中国环境科学, 2006, 26(4): 491-495
Yu Peng, Di Guo-qing, Huang Yi-fan, et al. The analysis of noise frequency characters of facilities in urban residential area [J]. China Environmental Science, 2006, 26(4): 491-495
- [23] Bao J, Hanson T, Mcmillan G P, et al. Assessment of DPOAE test-retest difference curves via hierarchical Gaussian processes [J]. Biometrics, 2016
- [24] 刘志勇, 卜行宽, 邢光前, 等. 新生儿听力普遍筛查模式的初步探讨[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2001, 36(4): 292-294
Liu Zhi-yong, Bu Xing-kuan, Xing Guang-qian, et al. A preliminary study of a hearing screening model for newborn[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2001, 36(4): 292-294
- [25] 赵晓雨, 刘淑红, 赵彤, 等. 强噪声对豚鼠认知功能和血清某些生化指标的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(5): 385-389
Zhao Xiao-yu, Liu Shu-hong, Zhao Tong, et al. Effects of strong noise on cognitive function and some biochemical indexes in serum of guinea pigs [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2016, 32(5): 385-389

(上接第 3835 页)

- [18] Guo CS, Xiao R, Bai YF. Effects of adiponectin on the cardiomyocyte apoptosis in rats induced by ischemia and reperfusion and the expression of the related protein[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2012, 28(7): 930-933
- [19] Qiu JX, He YQ, Wang Y, et al. Plumbagin induces the apoptosis of human tongue carcinoma cells through the mitochondria-mediated pathway[J]. Med SciMonit Basic Res, 2013, 19: 228-236
- [20] 史兆章, 阙晓, 曾兆清. 去甲斑蝥酸钠对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响[J]. 山东医药, 2011, 50: 40-41
Shi Zhao-zhang, Kan Xiao, Zeng Zhao-qing. Sodium norcantharidin effect on cell proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 [J]. Shandong medicine, 2011, 50: 40-41
- [21] 徐晓莉, 王钦, 罗佳. 去甲斑蝥酸钠对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(5): 2074-2075
Xu Xiao-li, Wang Qin, Luo Jia. Effects of norcantharidin on proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901 [J]. China Journal of Gerontology, 2016, 36(5): 2074-2075
- [22] 李玉光, 吴纪珍, 刘红梅, 等. 去甲斑蝥酸钠注射液对非小细胞肺癌患者免疫功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(3): 1538-1540
Li Yu-guang, Wu Ji-zhen, Liu Hong-mei, et al. The Sodium norcantharidin injection effect on the immune function of patients with non-small cell lung cancer [J]. China Journal of Gerontology, 2015, 35(3): 1538-1540
- [23] 张恒, 李晓飞, 陈祥盛. 斑蝥素、斑蝥素酸钾、及斑蝥素酸钠作用胃癌细胞的研究[J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(1): 52-55
Zhang Heng, Li Xiao-fei, Chen Xiang-sheng. Study of cantharidin and norcantharidin acid potassium, and cantharidin sodium gastric cancer cells [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2011, 30(1): 52-55