

• 实验研究 •

南蛇藤提取物对人肝癌细胞增殖、迁移及血管内皮生长因子-C 表达的影响

张 华^{1,2} 付 强³ 钱亚云¹ 刘延庆^{1*} 李国清¹ 崔平方¹朱耀东¹ 马 慧¹ 季 雪¹ 郭试瑜⁴ 久光 正⁴

(1. 扬州大学中西医结合研究所, 江苏省扬州市淮海路 11 号, 225001;

2. 扬州大学医学院; 3. 河南中医学院; 4. 日本昭和大学医学部)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173603, 81274741); 江苏省科技支撑计划(社会发展)

资助项目(BE2011738); 江苏省基础研究计划(自然科学基金)面上研究资助项目(BK2012686);

江苏省中医药科技项目(LZ11210); 扬州市产学研合作专项资助项目(YZ2010157)

* 通讯作者: liuyq@yzu.edu.cn, (0514)87971800

[摘要] 目的 探讨南蛇藤提取物抑制人肝癌转移的分子机制。方法 人肝癌 HCCLM6 细胞生长于培养液中进行传代, 取对数生长期细胞进行实验。南蛇藤提取物组共分为 10、20、40、80、160 mg/L 5 个浓度, 阳性对照组给予 5-氟尿嘧啶(5-Fu)注射液 180 mg/L, 阴性对照组不做处理。分别观察南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞增殖和迁移能力的影响, 并检测南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞及其培养上清中血管内皮生长因子-C(VEGF-C)蛋白表达的影响。结果 南蛇藤提取物组作用 24、48 h 时 160 μ g/ml 对细胞增殖的抑制率最高($P < 0.01$)。南蛇藤提取物组和阳性对照组穿膜细胞数较阴性对照组明显减少($P < 0.01$); 南蛇藤提取物组 10、20、40、80 μ g/ml 浓度穿膜细胞数多于阳性对照组, 并呈浓度依赖性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。南蛇藤提取物组各浓度和阳性对照组 VEGF-C 蛋白水平均低于阴性对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 南蛇藤提取物能抑制 HCCLM6 细胞的增殖、迁移及下调 VEGF-C 蛋白的表达水平, 这可能是其抑制肝癌转移的部分机制。

[关键词] 南蛇藤提取物; 肝癌; 增殖; 迁移; 血管内皮生长因子-C

Effects of Celastrus Orbiculatus Extract on the Proliferation, Migration and Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression of Human Hepatoma Cells

ZHANG Hua^{1,2}, FU Qiang³, QIAN Yayun¹, LIU Yanqing¹, LI Guoqing¹, CUI Pingfang¹, ZHU Yaodong¹, MA Hui¹, JI Xue¹, GUO Shiyu⁴, Hisamits Tadashi⁴

(1. Institute of Integrated Medicine, Yangzhou University, Jiangsu Province 225001; 2. Medical College, Yangzhou University; 3. Henan University of Chinese Medicine; 4. School of Medicine Showa University, Japan)

ABSTRACT Objective To study the molecular mechanism of Celastrus orbiculatus extract on liver cancer metastasis. **Methods** Human liver cancer HCLM6 cells were grown and passaged in the culture medium and the logarithmic growth phase cells were selected. The Celastrus orbiculatus extract group was divided into 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 80 mg/L and 160 mg/L concentrations. The positive control group was given 180 mg/L 5-fluorouracil (5-FU) injection and the negative control group was not treated. The effects of Celastrus orbiculatus extract on the proliferation and migration of HCCLM6 cells were observed. The expression of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) was observed as well. **Results** The inhibition rate of cell proliferation at 160 μ g/ml was the highest after 24 hours and 48 hours of administration in the Celastrus orbiculatus extract group ($P < 0.01$). Comparing with the negative control group, the penetrated cells in the Celastrus orbiculatus extract group and positive control group were significantly decreased ($P < 0.01$). Comparing with the positive control group, the penetrated cells at 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml and 80 μ g/ml in the Celastrus orbiculatus extract group were significantly increased with a dose-dependent manner ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the negative control group, the contents of VEGF-C protein were significantly decreased in the Celastrus orbiculatus extract group and positive control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Celastrus orbiculatus extract can inhibit the proliferation and migration of HCCLM6 cells and down-regulate the expression of VEGF-C, which might be part of the mechanism of celastrus orbiculatus extract on cancer metastasis.

Keywords Celastrus orbiculatus extract; liver cancer; proliferation; migration; vascular endothelial growth factor-C

原发性肝癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,全球每年有超过 50 万人患有肝癌,其中一半以上在中国^[1]。高转移、易复发是肝癌重要的临床特征,严重影响了患者的预后。已有研究表明血管内皮生长因子-C(VEGF-C)高表达与肝癌淋巴管生成、转移及预后密切相关^[2-3]。南蛇藤(*C. orbiculatus* Thunb.)系卫矛科南蛇藤属植物,在我国及世界有广泛分布。前期研究发现,南蛇藤乙酸乙酯提取物具有显著的抗肿瘤活性^[4]。本研究观察了南蛇藤乙酸乙酯提取物对人肝癌细胞 HCCLM6 体外增殖、迁移能力以及 VEGF-C 表达水平的影响,旨在探索南蛇藤抑制肝癌转移的分子机制。

1 材料

1.1 药物及细胞

南蛇藤购自广州致信药业有限公司,批号 070510,经中国药科大学中药资源研究室秦民坚教授鉴定为卫矛科南蛇藤 *C. Orbiculatus* Thunb. 的藤茎。人肝癌 HCCLM6 细胞购自上海复旦大学肝癌研究所。

1.2 试剂

高糖 DMEM 培养基(批号 681841)、胰蛋白酶(批号 25200)均购于 Gibco 公司;胎牛血清(批号 NWC0388),Hyclone 公司;二甲基亚砜(DMSO,批号 0231),Amresco 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT,批号 298-93-1),Sigma 公司;人 VEGF-C ELISA 试剂盒(批号 DVEC00),美国 R&D 公司;VEGF-C 多克隆抗体(批号 1203211),Santa cruz 公司;SABC 试剂盒(批号 SA1022)、DAB 显色试剂盒(批号 AR1022)均购于武汉博士德生物工程有限公司;5-氟尿嘧啶注射液(5-Fu,批号 101106),上海旭东海普药业有限公司。

1.3 仪器

8 μm 孔径 Transwell 小室,美国 Corning Costar 公司;8000 WJ CO₂ 培养箱、CL30R 高速台式冷冻离心机均为美国 Thermo Scientific Forma 公司产品;iMark 酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;ECLIPSE 80I 正置荧光相差显微镜,日本 Nikon 公司。

2 方法

2.1 药物制备

将南蛇藤藤茎切断、粉碎成粉,烘干(15 kg),95%乙醇(150 L)加热回流提取 3 次,每次 3 h,合并提取液,旋转蒸发仪回收乙醇,浸膏(900 g)加水分散后,石油醚萃取 3 次,再用乙酸乙酯萃取 3 次,收

集乙酸乙酯层,水洗涤 3 次,减压浓缩,真空冻干,得南蛇藤茎乙酸乙酯提取物(250 g),每克提取物含生药 60 g,4℃ 贮存。以 DMSO(终浓度<0.1%)助溶,培养液稀释,0.2 μm 孔径滤器过滤后,4℃ 避光保存,2 周内使用。用时调整至实验需要浓度。

2.2 细胞培养

人肝癌 HCCLM6 细胞生长于含 10% 胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM 培养液中,于 37℃ 含 5% CO₂ 及饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

2.3 实验分组

南蛇藤提取物组共分为 10、20、40、80、160 mg/L 5 个浓度,阳性对照组给予 5-Fu 注射液 180 mg/L,阴性对照组无特殊处理。

2.4 MTT 法检测南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞增殖能力的影响

取对数生长期细胞,消化后计数,按 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于 96 孔培养板中,细胞贴壁生长良好后弃上清,分别加入含不同浓度南蛇藤提取物或 5-Fu 的培养液,每组设 5 个复孔,37℃、5% CO₂ 继续培养,分别于 24 h、48 h 后,小心吸除上清液,每孔加入现配制的 MTT 溶液 20 μl (5 g/L),继续培养 4 h,去除 MTT 溶液,加入 DMSO(150 μl /孔),微孔板振荡器振荡 10 min,酶标仪 490 nm 检测各孔吸光度(A 值)。实验重复 3 次。分别于药物作用 24 h、48 h 检测,并按公式计算细胞生长抑制率(IR), $IR = [(空白组 A 值 - 处理组 A 值) / 空白组 A 值] \times 100\%$

2.5 Transwell 小室检测南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞迁移能力的影响

不同浓度南蛇藤提取物或 5-Fu 作用 HCCLM6 细胞 24 h,胰酶消化,以无血清培养液重悬,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,取 100 μl 细胞悬液至 Transwell 培养小室中(聚碳酸酯膜孔径 8 μm),下室加入含 10% 胎牛血清培养液 600 μl ,37℃ 培养 12 h 后取出小室,小心用棉签拭去滤膜上层细胞,风干,甲醇固定,结晶紫染色,100 倍光镜下随机选择 5 个视野进行细胞数计数,取其平均值作为穿过聚碳酸酯膜的细胞数量。每组平行设 3 个小室,实验重复 3 次。

2.6 细胞免疫化学法检测南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞 VEGF-C 蛋白表达强度的影响

取对数生长期细胞,胰酶消化,制备密度为 1×10^5 /ml 细胞悬液,接种至放有盖玻片的 6 孔培养板

表 1 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	样本数	24 h		48 h	
			吸光度(A 值)	抑制率(%)	吸光度(A 值)	抑制率(%)
阴性对照组	—	5	0.697 $\pm$ 0.022	—	0.652 $\pm$ 0.066	—
南蛇藤提取物组	10	5	0.661 $\pm$ 0.020 $\Delta\Delta$	5.1 $\blacktriangle$	0.595 $\pm$ 0.065 $^{*}\Delta\Delta$	12.1 $\blacktriangle$
	20	5	0.638 $\pm$ 0.013 Δ	8.4 $\blacktriangle$	0.473 $\pm$ 0.040 $^{*}\Delta\Delta$	27.5 $\blacktriangle\#$
	40	5	0.593 $\pm$ 0.034 *	14.9 $\blacktriangle$	0.454 $\pm$ 0.017 $^{*}\Delta\Delta$	30.3 $\blacktriangle\#$
	80	5	0.576 $\pm$ 0.067 *	17.3	0.405 $\pm$ 0.050 *	37.9 $\blacktriangle\#$
	160	5	0.477 $\pm$ 0.063 *	30.4	0.317 $\pm$ 0.033 $^{*}\Delta$	51.4
阳性对照组	180	5	0.524 $\pm$ 0.025 *	24.8	0.361 $\pm$ 0.012 *	37.2

注:与阴性对照组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与南蛇藤提取物组 160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\blacktriangle P<0.01$;与南蛇藤提取物组 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\#P<0.01$

中,2 ml/孔,细胞贴壁后弃去培养液,分别加入含不同浓度南蛇藤提取物或 5-Fu 的培养液。阴性对照组加入 DMEM 培养液,每孔 2 ml,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 ,孵箱中培养 24 h 后收取细胞爬片,PBS 洗 3 次,5 min/次,4%多聚甲醛室温固定 30 min,VEGF-C 蛋白的表达采用 SABC 法检测,抗体浓度为 1:100,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。阅片:100 倍视野下随机选取 5 个视野,观察细胞浆中 VEGF-C 蛋白的表达,按照 Fromowitz 综合计分法^[5]进行结果判定。

2.7 ELISA 法检测南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞培养上清液中 VEGF-C 蛋白水平的影响

将对数生长期 HCCLM6 细胞接种至 24 孔培养板,调整浓度至 4×10^4 /孔,细胞贴壁后弃去培养液,分别加入含不同浓度南蛇藤提取物或 5-Fu 的培养液,作用 24 h 后收集培养上清,严格按照 VEGF-C 检测试剂盒推荐方法进行操作,并按照标准品曲线计算 VEGF-C 蛋白水平(pg/ml)。

2.8 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件处理,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,率的比较采用卡方检验。

3 结果

3.1 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞增殖能力的影响

表 1 示,作用 24 h 时,南蛇藤提取物组 40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度和阳性对照组与阴性对照组相比,吸光度值明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);作用 48 h 时,南蛇藤提取物组各浓度和阳性对照组与阴性对照组相比,吸光度值亦明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。作用 24 h 时南蛇藤提取物组 10、20 $\mu\text{g/ml}$ 浓度吸光度值和 48 h 南蛇藤提取物组 10、20、40、160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度吸光度值与阳性对照组相比差

异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。南蛇藤提取物组各浓度间进行比较,作用 24 h 时 160 $\mu\text{g/ml}$ 对细胞增殖的抑制率最高,与 10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较差异有统计学意义($P<0.01$);作用 48 h 时 160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度对细胞增殖的抑制率最高,10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度抑制率最低,与其他各浓度比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

3.2 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞迁移能力的影响

表 2 示,南蛇藤提取物组和阳性对照组穿膜细胞数较阴性对照组明显减少($P<0.01$);南蛇藤提取物组 10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度穿膜细胞数多于阳性对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);南蛇藤提取物组随浓度的升高,穿膜细胞数逐渐减少,呈浓度依赖性($P<0.05$)。

表 2 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞迁移能力的影响(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	样本数	细胞数
阴性对照组	—	5	119 $\pm$ 6
南蛇藤提取物组	10	5	85 $\pm$ 3 $^{*}\Delta\Delta$
	20	5	74 $\pm$ 4 $^{*}\Delta\Delta\blacktriangle$
	40	5	61 $\pm$ 2 $^{*}\Delta\Delta\blacktriangle\#$
	80	5	43 $\pm$ 4 $^{*}\Delta\Delta\blacktriangle\# \nabla$
	160	5	31 $\pm$ 2 $^{*}\Delta\Delta\blacktriangle\# \nabla \blacktriangledown$
阳性对照组	180	5	35 $\pm$ 3 *

注:与阴性对照组比较, $^{*}P<0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与南蛇藤提取物组 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\blacktriangle P<0.05$;与南蛇藤提取物组 20 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\#P<0.05$;与南蛇藤提取物组 40 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\nabla P<0.05$;与南蛇藤提取物组 80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\blacktriangledown P<0.05$

3.3 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞 VEGF-C 蛋白 Fromowitz 计数的影响

VEGF-C 蛋白阳性染色表达主要定位于 HCCLM6 细胞胞浆,呈棕黄色染色。表 3 示,南蛇藤提

取物组 20、40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度和阳性对照组 Fromowitz 计分较阴性对照组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 南蛇藤提取物组 10、20 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 Fromowitz 计分高于阳性对照组, 160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 Fromowitz 计分低于阳性对照组 ($P < 0.05$)。南蛇藤提取物组各浓度之间比较, 40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 Fromowitz 计分低 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 ($P < 0.05$); 80、160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 Fromowitz 计分低于 20 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 ($P < 0.05$); 160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 Fromowitz 计分低于阳性对照组 ($P < 0.05$); 160 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 Fromowitz 计分低于 40、80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 ($P < 0.05$)。

表 3 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞 VEGF-C 蛋白 Fromowitz 计分的影响 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	样本数	Fromowitz 计分
阴性对照组	—	5	6.60 $\pm$ 0.55
南蛇藤提取物组	10	5	6.20 $\pm$ 0.84 Δ
	20	5	5.80 $\pm$ 0.45* Δ
	40	5	5.00 $\pm$ 0.71** Δ
	80	5	4.40 $\pm$ 0.89** Δ #
	160	5	2.80 $\pm$ 1.09** Δ # ∇
阳性对照组	180	5	4.60 $\pm$ 0.55**

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.05$; 与南蛇藤提取物组 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\Delta P < 0.05$; 与南蛇藤提取物组 20 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, # $P < 0.05$; 与南蛇藤提取物组 40 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\nabla P < 0.05$; 与南蛇藤提取物组 80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\nabla P < 0.05$

3.4 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞培养上清液中 VEGF-C 蛋白水平的影响

表 4 示, 南蛇藤提取物组各浓度和阳性对照组 VEGF-C 蛋白水平均低于阴性对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。南蛇藤提取物组 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 VEGF-C 蛋白水平高于其他各浓度组和阳性对照组 ($P < 0.05$), 其他各浓度间 VEGF-C 蛋白水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 南蛇藤提取物对 HCCLM6 细胞培养上清液中 VEGF-C 蛋白水平的影响 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	样本数	VEGF-C
阴性对照组	—	3	298.06 $\pm$ 23.352
南蛇藤提取物组	10	3	233.39 $\pm$ 29.431* Δ
	20	3	189.64 $\pm$ 16.610** Δ
	40	3	174.58 $\pm$ 21.489** Δ
	80	3	166.34 $\pm$ 26.450** Δ
阳性对照组	160	3	159.22 $\pm$ 21.835** Δ
	180	3	170.81 $\pm$ 21.326**

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.05$; 与南蛇藤提取物组 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

肝癌可归于中医学“肝积”、“癥瘕”、“臌胀”等范畴。肝癌的发生发展被认为是外邪侵袭、正气虚损等内外因素综合作用的结果。肿瘤转移属于中医传舍, 正气虚弱是肿瘤转移的根本因素, 而肝癌邪毒更易耗伤人体正气, 加重转移, 因此祛邪和扶正是治疗肝癌的两大基本原则。近年来, 针对中药的抗癌作用和机制开展了广泛和深入的研究, 发现多种中药有效成分和复方制剂, 如人参皂苷 Rg3、姜黄素、槲皮素、参麦注射液、复方苦参注射液等, 可通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡、抑制肿瘤血管生成、控制复发转移、增强机体免疫功能而发挥其抗癌效应^[6-7]。前期研究发现, 南蛇藤提取物也在多方面显示出较强的抗肿瘤作用^[4,8-9]。

转移复发是影响肝癌远期疗效的关键^[10]。大量临床资料表明, 近 1/3 的肝癌患者发生淋巴途径转移, 肝癌预后的多变量分析提示淋巴结转移是重要因素之一^[11-12]。淋巴管生成是肿瘤发生淋巴结转移的必然条件, 血管内皮生长因子家族成员 VEGF-C 是第 1 个被证实具有促进淋巴管生成作用的淋巴管内皮生长因子。VEGF-C 与其受体 3 (VEGFR-3) 是调控淋巴管生成的重要信号传导通路^[2]。淋巴管内皮细胞释放的旁分泌因子也可影响肿瘤细胞的侵袭以及与胞外基质的黏附性, 并增加淋巴管通透性, 促使肿瘤细胞进一步向淋巴管内渗透、转移^[13-16]。另有研究表明, 在 VEGF-C 促进肿瘤淋巴管新生及诱导肿瘤细胞发生淋巴转移过程中, 可与其他相关的细胞因子发挥着协同作用, 提示干预和靶向这种协同作用可能是肿瘤治疗和预防转移的新靶点^[17-20]。

本研究结果显示, 南蛇藤提取物可明显抑制人肝癌细胞 HCCLM6 的增殖、迁移, 并下调 VEGF-C 蛋白的表达水平, 且呈现量效关系, 提示 VEGF-C 可能是南蛇藤抑制肝癌生长和转移的作用靶点之一, 这为阐明南蛇藤的抗肝癌机制提供了新的思路, 但具体机制还有待深入研究。

参考文献

- [1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118-1127.
- [2] Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, et al. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites[J]. Blood, 2007,

- 109(3):1010-1017.
- [3] Yamaguchi R, Yano H, Nakashima O, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in human hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(1 Pt 1):152-160.
- [4] Qian YY, Zhang H, Hou Y, et al. Celastrus Orbiculatus extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathways and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas in Vitro and in Vivo[J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(10):752-760.
- [5] Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, et al. ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. Hum Pathol, 1987, 18(12):1268-1275.
- [6] 陈丽霞. 中药抗肿瘤血管生成研究概况[J]. 中医杂志, 2008, 49(12):1133-1135.
- [7] 赵峰, 刘培勋. 中药抗肿瘤及其转移机制研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(2):178-181.
- [8] 员林, 张华, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞的增殖能力和 VEGF-c 表达水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):157-160.
- [9] Zhang H, Qian Y, Liu Y, et al. Celastrus orbiculatus extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(4):621-626.
- [10] Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, et al. Analysis of prognostic factors affecting survival after initial recurrence and treatment efficacy for recurrence in patients undergoing potentially curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(8):2337-2347.
- [11] Watanabe J, Nakashima O, Kojiro M. Clinicopathologic study on lymph node metastasis of hepatocellular carcinoma; a retrospective study of 660 consecutive autopsy cases[J]. Jpn J Clin Oncol, 1994, 24(1):37-41.
- [12] Ohtani O, Ohtani Y. Lymph circulation in the liver[J]. Anat Rec(Hoboken), 2008, 291(6):643-652.
- [13] Su JL, Yang PC, Shih JY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells[J]. Cancer Cell, 2006, 9(3):209-223.
- [14] Lohela M, Bry M, Tammela T, et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(2):154-165.
- [15] Wang J, Zhang B, Guo Y. Artemisinin inhibits tumor lymphangiogenesis by suppression of vascular endothelial growth factor C[J]. Pharmacology, 2008, 82(2):148-155.
- [16] Zhang X, Wang JF, Chandran B, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activation of vascular endothelial growth factor receptor 3 alters endothelial function and enhances infection[J]. J Biol Chem, 2005, 280(28):26216-26224.
- [17] Chuangui C, Peng T, Zhentao Y. The expression of high mobility group box 1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(4):1021-1027.
- [18] Qiu Y, Chen Y, Fu X, et al. HMGB1 promotes lymphangiogenesis of human lymphatic endothelial cells in vitro[J]. Med Oncol, 2012, 29(1):358-363.
- [19] Jiang W, Wang Z, Li X, et al. Reduced high-mobility group box 1 expression induced by RNA interference inhibits the bioactivity of hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3[J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(1):92-98.
- [20] Cao R, Ji H, Feng N, et al. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(39):15894-15899.
- (收稿日期:2012-11-19;修回日期:2013-03-19)
- [编辑:邓媛]

欢迎邮购医学光盘

四大经典 VCD《黄帝内经》、《伤寒论》、《金匱要略》、《温病学》全套 2500 元,其中《金匱要略》单套 800 元,其余每套 600 元。四大基础 VCD《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套 2700 元,单套 700 元。

“全国名老中医专家临床经验高级讲习班”自 1999 年以来举办多期,得到了 60 多位全国名老中医和专家的积极响应和大力支持。授课内容为全国名老中医和专家个人几十年临床经验的宝贵结晶。现已制作成光盘,可作为中医医疗、教育和研究机构收藏以及开展继续教育的培训教材,也可供中医医务工作者临床自学。第一期 1500 元(22DVD),第二期 1500 元(20 DVD),第三期 1130 元(16 DVD),第四期 980 元(16 DVD),第五期 1330 元(23 DVD),第六期 1050 元(16 DVD),第七期 710 元(13 DVD),第八期 700 元(11 DVD),第九期 850 元(10 DVD),第十期 680 元(10 DVD),第十一期 540 元(10 DVD)。总价 10970 元。

汇款地址:北京东直门内南小街16号中医杂志社,收款人:北京医海林音像书店收,邮编:100700,联系人:张伟平,(010)64014411-3036;叶晨,(010)64013162。