DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409159

论著

三七总皂苷抑制 K562 细胞 mTOR 信号通路活性的实验研究

翟玮玮[1],李玉云[2],杨向荣[1],于北凯[1],王 露[1],李 见[1] (233030 安徽 蚌埠,蚌埠医学院:临床检验诊断学实验中心[1],临床检验基础教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)对体外培养 K562 细胞 mTOR 信号通路相关分子表达及活性的影响。**方法** 不同浓度的 PNS(50~800 μg/mL)干预体外培养 K562 细胞 24~72 h 后,MTT 比色法检测 PNS 对 K562 细胞增殖的抑制作用;AO/EB 双荧光染色法观察细胞死亡及凋亡状况;RT-PCR 检测 mTOR、p70S6K、4E-BP1 mRNA 表达变化;Western blot 检测 mTOR、p70S6K、4E-BP1 及 p-mTOR、p-p70S6K、p-4E-BP1 蛋白表达量的变化。**结果** 与对照组相比,浓度为 100~800 μg/mL 的 PNS 能够抑制 K562 细胞增殖($P<0.05$),促进 K562 细胞凋亡及死亡($P<0.05$),PNS 对 K562 细胞 72 h 的 IC_{50} 为(229.07±2.36)μg/mL;100、200、400 μg/mL PNS 作用于 K562 细胞 72 h 后 mTOR 蛋白表达量及 mRNA 表达量降低($P<0.05$),且磷酸化蛋白 p-mTOR (Ser2448)、p-p70S6K (Thr229/389)及 p-4E-BP1(Thr37/46)表达水平也随着药物浓度的增加而降低($P<0.05$)。**结论** PNS 能够抑制 K562 细胞 mTOR 信号通路的活性,这可能是 PNS 抑制 K562 细胞增殖的机制之一。

[关键词] 三七总皂苷;K562 细胞;mTOR 信号通路
[中图法分类号] R285.5;R73-354;R733.72 [文献标志码] A

Panax notoginseng saponins suppresses mTOR signaling pathway in K562 cells

Zhai Weiwei[1], Li Yuyun[2], Yang Xiangyong[1], Yu Beikai[1], Wang Lu[1], Li Jian[1] ([1]Department of Clinical Laboratory and Diagnostic Center, [2]Department of Basic Clinical Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233030, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Panax notoginseng saponins (PNS) on the expression and activity of mTOR signaling pathway related molecules in K562 cells *in vitro*. **Methods** K562 cells were treated with different concentrations (50–800 μg/mL) of PNS for different periods of time (24–72 h). The cell proliferation was measured by MTT assay, and the cell death and apoptosis were observed by AO/EB double fluorescence staining. The mRNA expression of mTOR, p70S6K and 4E-BP1 was examined by RT-PCR, and the protein expression of mTOR, p70S6K, 4E-BP1 and their phosphorylated proteins (p-mTOR, p-p70S6K and p-4E-BP1) was detected by Western blotting. **Results** PNS (100–800 μg/mL) inhibited the proliferation of K562 cells ($P<0.05$) and promoted cell apoptosis and death ($P<0.05$), and 72-h IC_{50} was (229.07±2.36) μg/mL. After PNS (100, 200 and 400 μg/mL) was applied to K562 cells for 72 h, the mRNA and protein expressions levls of mTOR were dose-dependently reduced ($P<0.05$). In addition, the expression of p-mTOR (Ser2448), p-p70S6K (Thr229/389) and p-4E-BP1 (Thr37/46) proteins was also decreased in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion** PNS can inhibit the activity of mTOR signaling pathway in K562 cells, and this may be one of PNS-mediated cell proliferation

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金(KJ2012A198)
[通信作者] 李玉云,E-mail:bbmcliyuyun@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1639.016.html(2014-12-04)

inhibition mechanisms.

[**Key words**] Panax notoginseng saponins; K562 cells; mTOR signaling pathway

Supported by the Natural Science Foundation of Anhui Provincial Department of Education (KJ2012A198). Corresponding author: Li Yuyun, E-mail: bbmcliyuyun@163.com

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是磷脂酰肌醇3-激酶相关激酶(phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase, PIKK)蛋白家族的成员之一,属于丝/苏氨酸蛋白激酶[1]。mTOR复合体能够通过磷酸化其下游的靶蛋白如40S核糖体S6蛋白激酶(p70 ribosomal protein S6 kinases, p70S6K)和真核启动因子4E结合蛋白1(eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1,4E-BP1)等来调节细胞的生长、增殖和凋亡等活动。近年来研究表明,mTOR信号通路的异常活化与多种癌症发生发展密切相关[2]。在粒细胞白血病细胞中,mTOR通路处于异常活化状态[3]。

三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)是从植物三七中提取的有效药用成分[4]。研究显示PNS及其单体具有抗肿瘤作用[5],然而,有关PNS对白血病细胞的作用研究较少,且其作用的机制尚不明确。本研究通过观察PNS抑制K562细胞增殖过程中mTOR信号通路部分信号分子的变化来探讨PNS抑制K562细胞增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

K562细胞株为本实验室冻存,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,RPMI1640培养基购自Gibco公司,MTT、DMSO购自Sigma公司,蛋白裂解液和蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所,三七总皂苷购自南京广润生物制品有限公司,一抗mTOR、p70S6K、4E-BP1、p-mTOR (Ser2448)、p-p70S6K (Thr229/389)、p-4E-BP1 (Thr37/46)购自Affinity Biosciences公司,二抗为HRP标记的羊抗兔IgG和HRP标记的羊抗鼠IgG,购自Santa Cruz公司。

1.2 主要溶液配制

三七总皂苷用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基溶解并稀释成5 mg/mL,分装后4 ℃保存。

1.3 细胞培养

使用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基,在37 ℃、5% CO_2的饱和湿度培养箱中培养。待细胞浓度达到10^6/mL时进行半量换液,半量换液3次后离心去除培养基进行传代。选择对数生长期的细胞进行各项实验。

1.4 MTT法测定三七总皂苷对K562细胞增殖活性的影响

取对数生长期的K562细胞,离心后弃去旧培养基,加入新鲜培养基,调整细胞浓度为10^5/mL,每孔50 μL接种于3个96孔板,再加入三七总皂苷稀释液,最后补齐培养基100 μL,使三七总皂苷的终浓度分别为0、50、100、200、400、800 μg/mL,每种浓度设置5个复孔,同时设置空白孔。3个96孔板分别孵育24、48、72 h,结束孵育前4 h向各孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),继续培养4 h后2 000 r/min离心15 min,吸去上清,最后每孔加入150 μL DMSO,震荡10 min,充分溶解后使用酶标仪检测各孔光密度值[$D(490)$],计算5个复孔的平均值。细胞存活率=$[D(490)_{给药}-D(490)_{空白}]/[D(490)_{对照}-D(490)_{空白}]$。实验重复3次。

1.5 AO/EB双荧光染色法观察三七总皂苷作用后K562细胞的凋亡及死亡率

取对数生长期的K562细胞离心去旧培养基,加入新鲜培养基重悬,接种于6孔板中,加入三七总皂苷稀释液,最后补齐培养基3 mL,使细胞浓度为2×10^5/mL,三七总皂苷终浓度分别为0、100、200、400 μg/mL。培养24 h后收集全部细胞于离心管中,1 000 r/min离心10 min,使用PBS重悬细胞,调整细胞浓度为10^6/mL,取细胞悬液100 μL,加入AO、EB工作液(100 μg/mL)各2 μL,混匀后取1滴涂于载破片上,在荧光显微镜下计数200个细胞并计算红色荧光细胞的比例。分类标准:A活细胞:核染色质呈均匀绿色荧光并结构正常;B早期凋亡细胞:核染色质呈绿色固缩状或串珠状;C晚期凋亡细胞和死亡细胞:核染色质为桔红色并呈固缩或圆珠状或核染色质着均匀桔红色。实验重复3次。

1.6 RT-PCR检测三七总皂苷作用后K562细胞的mTOR、p70S6K和4E-BP1mRNA表达量的变化

K562细胞分组及加药情况同1.5,72 h后收集细胞,提取总RNA,紫外分光光度计测量RNA浓度,每组取2 μg RNA进行逆转录,合成cDNA第1条链后,

按照剂盒要求对各组样本目的基因 mTOR、p70S6K、4E-BP1 及内参基因 GAPDH 进行扩增。引物序列、扩增长度及退火温度见表1。PCR 扩增条件:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性35 s,退火35 s,72 ℃延伸35 s,共30个循环;继而72 ℃10 min 终止延伸,4 ℃保存。反应完成后取5 μL PCR 产物在1.5%的琼脂糖凝胶中电泳。使用 Bio-Rad 凝胶成像仪检测条带并进行灰度分析。计算各组 mTOR、p70S6K 和4E-BP1mRNA 的相对表达量。

表1 待测基因引物序列、扩增长度及退火温度

引物名称	引物序列	扩增长度	退火温度
mTOR	上游:5′-CGCTGTCATCCCTTTATCG-3′	193 bp	53 ℃
	下游:5′-ATGCTCAAACACCTCCACC-3′		
p70S6K	上游:5′-TACTTCGGGTACTTGGTAA-3′	188 bp	49 ℃
	下游:5′-GATGAAGGGATGCTTTACT-3′		
4E-BP1	上游:5′-ACCGGAAATTCCTGATGGAG-3′	156 bp	55 ℃
	下游:5′-CCCGCTTATCTTCTGGGCTA-3′		
GAPDH	上游:5′-CAAGGTCATCCATGCAACTTTG-3′	496 bp	58 ℃
	下游:5′-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3′		

1.7 Western blot 检测三七总皂苷作用后 K562 细胞的 mTOR、p70S6K 和4E-BP1 及 p-mTOR(Ser2448)、p-p70S6K(Thr229/389)、p-4E-BP1(Thr37/46)蛋白表达的变化

实验分组、药物浓度及培养时间同1.6,收集各组细胞后用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量,蛋白变性后各取30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。其中 mTOR 使用6%分离胶,p70S6K 及 β-actin 使用10%分离胶,4E-BP1 使用12%分离胶。然后转膜至 PVDF 膜,室温封闭2 h。4 ℃孵育一抗过夜。TBST 洗膜后37 ℃孵育二抗2 h。TBST 洗膜,ECL 显色后在 Bio-Rad 凝胶成像仪上曝光检测条带并进行灰度分析。

取对数生长期的 K562 细胞接种于6孔板中,加入三七总皂苷稀释液,最后补齐培养基3 mL,使细胞浓度为 2×10^5/mL,对照组不加药培养3 h 后收集细胞提取总蛋白,实验组三七总皂苷终浓度为200 μg/mL,分别于培养1、2、3 h 后收集全部细胞提取总蛋白,使用 p-mTOR(Ser2448)、p-p70S6K(Thr229/389)、p-4E-BP1(Thr37/46)蛋白抗体检测磷酸化蛋白,方法同上。

1.8 统计学处理

使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 三七总皂苷抑制 K562 细胞增殖

采用1.4中的公式处理 MTT 实验中的光密度结果,计算得出细胞存活率(表2)。结果显示 PNS 浓度为50 μg/mL 时,作用时间达到72 h,药物才表现出抑制细胞增殖的作用($P<0.05$)。PNS 浓度为100~800 μg/mL,作用时间为24~72 h 时,其对细胞增殖的抑制作用具有时间依赖性和浓度依赖性,即随着时间的延长及药物浓度的增加,PNS 对细胞增殖的抑制作用逐渐增强,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。通过统计分析得出 PNS 对 K562 细胞 72 h 的 IC_{50} 为(229.07±2.36)μg/mL。

表2 不同浓度 PNS 作用不同时间后 K562 细胞的存活率
(%, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

PNS 浓度(μg/mL)	24 h	48 h	72 h
0	100	100	100
50	99.55±1.18	98.29±1.66	94.48±2.25[ab]
100	87.37±3.47[ab]	82.82±1.29[ab]	77.65±2.14[ab]
200	75.87±3.81[ab]	65.64±2.51[ab]	51.21±2.19[ab]
400	57.36±2.38[ab]	45.13±3.32[ab]	27.19±3.50[ab]
800	28.15±2.04[ab]	18.69±2.10[ab]	9.19±2.05[ab]

a:$P<0.05$,与相同药物浓度的其他作用时间比较;b:$P<0.05$,与相同作用时间的其他药物浓度比较

2.2 三七总皂苷促进 K562 细胞的死亡及凋亡

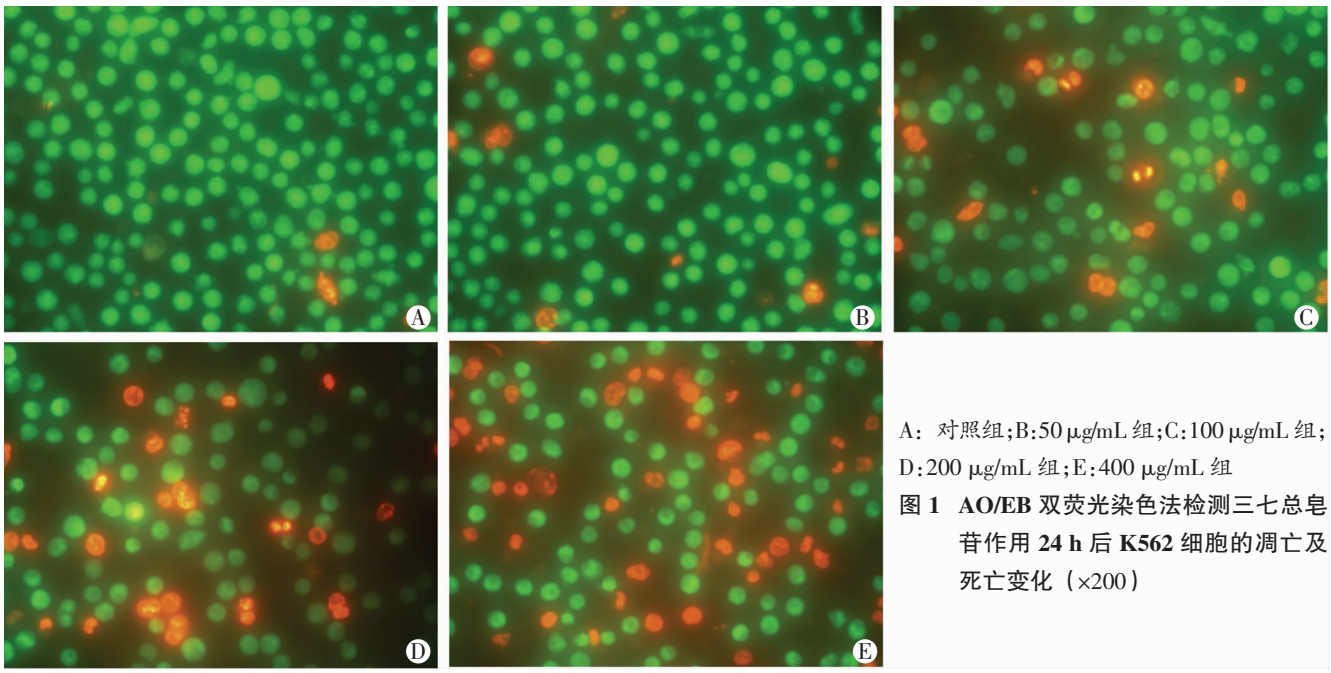
经 AO/EB 染色后放大200倍镜检(图1)显示,三七总皂苷作用于 K562 细胞24 h 后,红色荧光细胞数目较对照组增多,且红色荧光的细胞数目所占的比例随着药物浓度的增加而增加。在浓度为100、200、400 μg/mL 时,红色荧光细胞比例分别为(12.2±2.0)%、(24.8±1.9)%、(44.2±2.1)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果显示,三七总皂苷能够促进 K562 细胞的死亡及凋亡,且具有浓度依赖性。

2.3 三七总皂苷能够降低 mTOR mRNA 的转录量

RT-PCR 结果显示:经100、200、400 μg/mL PNS 作用72 h 后,mTOR mRNA 的表达量均有降低。上述3种药物浓度下,mTOR mRNA 的相对表达量较对照组均显著降低($P<0.05$,图2)。而 p70S6K 及 4E-BP1 的 mRNA 没有明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$)。

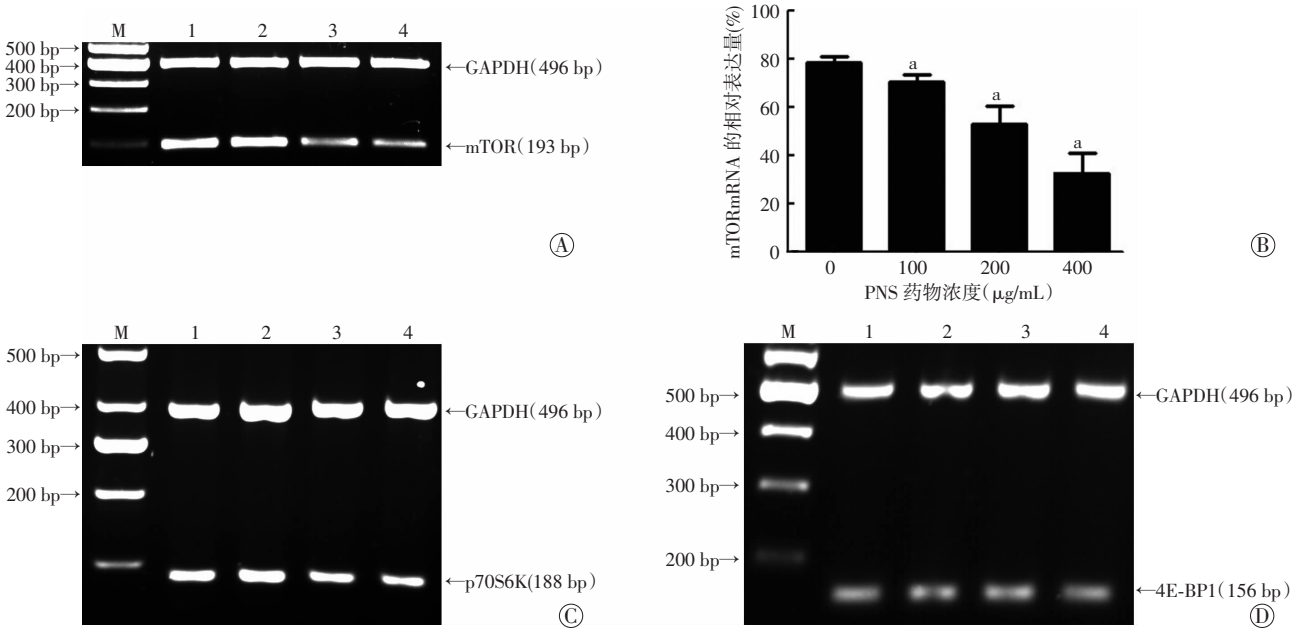
2.4 三七总皂苷能够抑制K562细胞mTOR的表达量且能够降低mTOR、p70S6K及4E-BP1的磷酸化水平

mTOR信号通路中各蛋白大部分以无活性状态存在，当上游信号刺激后发生磷酸化，转变为活化状态。癌细胞中的mTOR信号通路异常活化。Western blot结果显示三七总皂苷作用于K562细胞72 h后，100 μg/mL组、200 μg/mL组、400 μg/mL组mTOR总蛋白的相对表达量较对照组显著降低（$P<0.05$，图3）。而p70S6K及4E-BP1这两种总蛋白的变化无统计学意义（$P>0.05$）。图4显示对照组及200 μg/mL三七总皂苷作用于K562细胞1、2、3 h后，mTOR、p70S6K及4E-BP1的磷酸化水平逐渐减低，且差异具有统计学意义（$P<0.05$）。



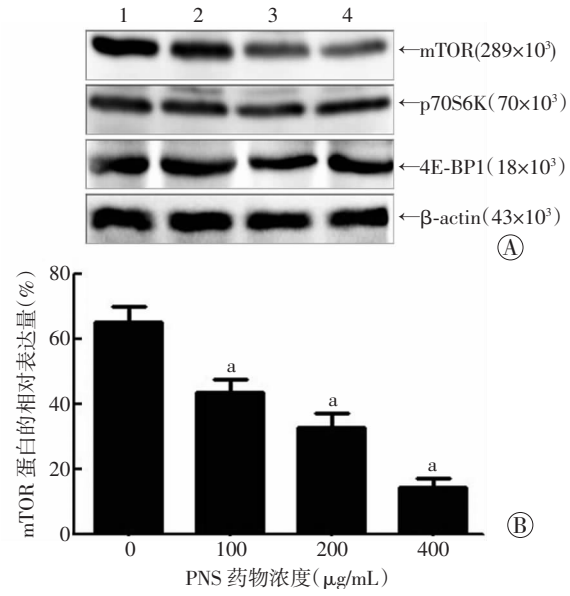
A：对照组；B：50 μg/mL组；C：100 μg/mL组；D：200 μg/mL组；E：400 μg/mL组

图1 AO/EB双荧光染色法检测三七总皂苷作用24 h后K562细胞的凋亡及死亡变化（×200）



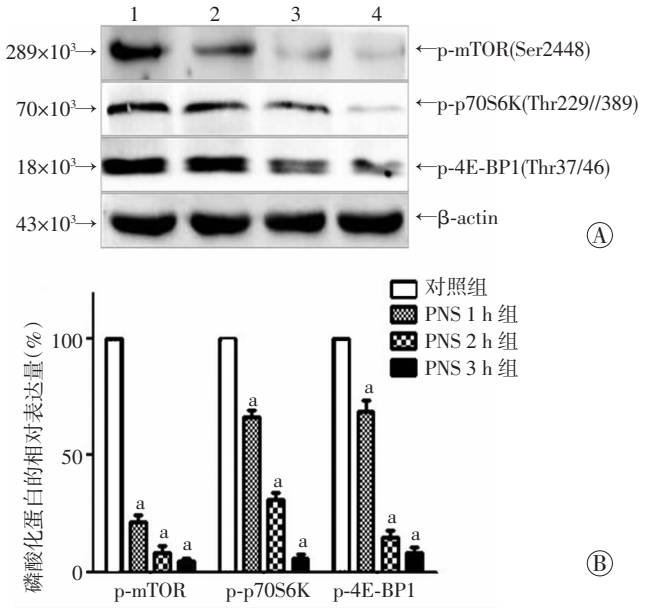
A：RT-PCR检测mTOR mRNA表达；B：mTOR mRNA相对表达；C：RT-PCR检测p70S6K mRNA表达；D：RT-PCR检测4E-BP1 mRNA表达　M：标准，1：对照组，2：100 μg/mL组，3：200 μg/mL组，4：400 μg/mL组；a：$P<0.05$，与对照组（0 μg/mL）比较

图2 PNS作用于K562细胞72 h后mTOR、p70S6K及4E-BP1 mRNA的变化



A:Western blot 检测结果　1:对照组,2:100 μg/mL 组,3:200 μg/mL 组,4:400 μg/mL 组;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组(0 μg/mL)比较

图 3　PNS 作用于 K562 细胞 72 h 后 mTOR、p70S6K 和 4E-BP1 的蛋白表达变化



A:Western blot 检测结果　1:对照组,2:PNS 作用 1 h 组,3:PNS 作用 2 h 组,4:PNS 作用 3 h 组;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组(0 h)比较

图 4　三七总皂苷作用于 K562 细胞不同时间后 mTOR、p70S6K 及 4E-BP1 蛋白磷酸化水平变化

3　讨论

三七是常用的传统中药,三七皂苷被认为是三七的主要生理活性成分。近年来研究发现 PNS 能够明显抑制肝癌、前列腺癌、宫颈癌等癌细胞增殖。研究结果显示,浓度为 200 μg/mL PNS 作用 72 h 对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制率为(54.57 ± 0.976)%[6];PNS 对前列腺癌 PC-3 细胞的 48 h IC_{50} 值为 931.3 μg/mL[7];200 μg/mL 的 PNS 作用 72 h 对 HepG2、BEL-7402 和 SMMC-7721 三株肝癌细胞的增殖抑制率分别为(33.18 ± 0.13)%、(29.40 ± 0.04)%、(33.38 ± 0.18)%,而 PNS 对正常肝细胞 L-02 的增殖抑制不明显[8]。本实验 MTT 结果显示,当浓度为 100 ~ 800 μg/mL,PNS 对 K562 细胞增殖有明显的抑制作用且具有时间依赖性和浓度依赖性,其 72 h 的 IC_{50} 为(229.07 ± 2.36) μg/mL。由上述研究结果可知 PNS 对多种癌细胞具有增殖抑制作用,且不同癌细胞对 PNS 的敏感度不同。

由于 PNS 并非单一化学物质,因此其作用的靶点可能有多个。目前研究发现 30 μmol/L PNS 中的单体三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1 和 Rg1 作用 SW480 细胞 48 h 后能够显著增加其凋亡,且能将细胞阻滞在 S 期及 G_2/M 期[9];PNS 能够抑制乳腺 4T1 细胞迁徙和侵袭[10];PNS 能够降低 PC-3 细胞 MMP-2 及 VCAM-1 的表达,抑制 PC-3 细胞迁移[7]。通过观察本实验 AO/EB 双荧光染色结果可发现,PNS 能够促进 K562 细胞死亡及凋亡,浓度为 100、200、400 μg/mL 的 PNS 作用于 K562 细胞 24 h 后,死亡及凋亡的细胞总比例分别为(12.2 ± 2.0)%、(24.8 ± 1.9)%、(44.2 ± 2.1)%。表明 PNS 主要是通过促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖和迁移来发挥抗肿瘤作用。

K562 细胞株是慢性粒细胞白血病急性变细胞株。Bcr/Abl 是慢粒细胞的特征性融合蛋白,具有强烈的酪氨酸激酶活性[11],可促进 Ras/MAPK、Jun/STAT5、PI3K/Akt/mTOR 等多种信号途径的激活,其中 PI3K/Akt/mTOR 途径是 Bcr/Abl 介导的细胞恶性转化的关键环节[12-13]。有学者研究发现,Bcr/Abl 阳性细胞株中 mTOR 途径激活,其下游底物 p70S6K 及 4E-BP1 以 Bcr/Abl 依赖性方式被磷酸化[14]。mTOR 信号通路可整合多种细胞外信号,参与基因转录、核糖体合成、蛋白质翻译等生物过程,在肿瘤细胞的生长和凋亡中发挥重要作用。那么 PNS 对 K562 细胞的抑制作用是否是与 mTOR 通路有关? 本实验使用 100 ~ 400 μg/mL PNS 作用 K562 细胞 72 h 后发现,PNS 能够通过降低 K562 细胞 mTOR 的转录水平来抑制 mTOR 蛋白的表达,并且能够降低 K562 细胞 mTOR、p70S6K 及 4E-BP1 蛋白的磷酸化水平。因为 mTOR 信号通路与细胞的生长、增殖及凋亡情况密切相关,且实验结果显示,

mTOR信号通路的活性在PNS抑制K562细胞增殖的过程中受到了抑制,所以,降低mTOR信号通路的活性可能是PNS抑制K562细胞增殖的机制之一。

目前白血病的临床治疗多采用大剂量的联合化疗法,此疗法副作用大,尤其对机体免疫系统有很大伤害。研究人员发现PNS联合化疗药物比单独化疗药物具有更强的抗肿瘤作用。崔玲玲等[15]发现PNS能明显增加K562细胞对Ara-C的敏感性;王远航等[16]使用PNS联合低剂量的环磷酰胺作用于黑色素瘤模型小鼠,发现此种方法有增强抗肿瘤效果,并且能够提高小鼠免疫力。总之,PNS不仅具有抗肿瘤的作用,而且能够降低化疗药物的毒副作用,这提示PNS可以作为临床化疗药物的辅助用药。本实验研究发现降低mTOR信号通路的活性可能是PNS抑制K562细胞增殖的机制之一,为PNS治疗白血病的临床应用提供了一定的理论基础。

参考文献:

[1] Gibbons J J, Abraham R T, Yu K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth[J]. Semin Oncol, 2009, 36(Suppl 3): S3-S17.

[2] Sato T, Nakashima A, Tamanoi F. Rheb-mTOR signaling pathway involved in tumor formation[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2010, 55(1): 11-17.

[3] Martelli A M, Evangelisti C, Chappell W, *et al*. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway[J]. Leukemia, 2011, 25(7): 1064-1079.

[4] 熊敏琪, 陈瑜, 张腾. 三七皂苷临床应用的基础研究进展[J]. 中医药信息, 2014, 31(3): 149-153.

[5] He F, Ding Y, Liang C, *et al*. Antitumor effects of dammarane-type saponins from steamed Notoginseng[J]. Pharmacogn Mag, 2014, 10(39): 314-317.

[6] 邹存华, 付婷婷, 鲁强, 等. 三七总皂苷抑制Hela细胞增殖的实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(12): 888-891.

[7] 倪晓辰, 赵志红, 仇炜, 等. 三七总皂苷对前列腺癌PC-3细胞增殖及迁移的抑制作用[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(11): 638-641.

[8] 文玲玲, 肖彬, 周辉. 三七总皂苷对三种不同人肝癌细胞株增殖的影响[J]. 肿瘤药学, 2013, 3(2): 100-103, 125.

[9] Wang C Z, Xie J T, Fishbein A, *et al*. Antiproliferative effects of different plant parts of Panax notoginseng on SW480 human colorectal cancer cells[J]. Phytother Res, 2009, 23(1): 6-13.

[10] Wang P, Cui J, Du X, *et al*. Panax notoginseng saponins (PNS) inhibits breast cancer metastasis[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 663-671.

[11] Rumjanek V M, Vidal R S, Maia R C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines[J]. Biosci Rep, 2013, 33(6): e00081.

[12] Vakana E, Sassano A, Platanias L C. Induction of autophagy by dual mTORC1-mTORC2 inhibition in BCR-ABL-expressing leukemic cells[J]. Autophagy, 2010, 6(7): 966-967.

[13] Cilloni D, Sagilo G. Molecular pathway: BCR-ABL[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(4): 930-937.

[14] Machado-Neto J A, Favaro P, Lazarini M, *et al*. Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cell[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(8): 1404-1411.

[15] 崔玲玲, 尹利明, 郑智茵. 三七总皂苷联合阿糖胞苷对K562细胞的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(9): 1025-1028.

[16] 王远航, 祝延, 张翠玲, 等. 三七总皂苷联合环磷酰胺节律化疗抗肿瘤效应观察[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(1): 36-40, 插3.

(**收稿**:2014-09-23;**修回**:2014-10-18)

(编辑 汪勤俭)