DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.045
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1346 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1346-04

苦参碱对 $HepG_2$ 细胞代谢水平和基因水平的影响

司维柯,李 鹏,姚 婕 (第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察苦参碱抑制 $HepG_2$ 细胞增殖时,代谢水平和基因水平的变化,以揭示苦参碱抑制 $HepG_2$ 细胞增殖的机制。方法 0~1.5 g/L 苦参碱作用 $HepG_2$ 细胞 3 d,免疫组化检测 AFP、PCNA、wp53、Rb、N-ras、c-myc 蛋白的表达,原位杂交法检测 wp53、c-myc mRNA 的表达,真彩色图像定量分析检测结果,Microsoft-Excel 软件统计学处理结果;放免法检测 cAMP、cGMP 量的改变;亲和层析法分离肝癌 GGT(HSGGT)并检测 HSGGT 和 GGT 酶活性。结果 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞后,与细胞代谢相关的指标发生变化:cAMP 升高,cAMP/cGMP 比值升高;AFP、PCNA、cGMP、GGT、HSGGT 量均降低。与基因相关的指标发生变化:抑癌基因 wp53、Rb 表达增强,癌基因 c-myc 表达减弱,N-ras 表达变化不明显。结论 一定浓度苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞后,在代谢水平和基因水平上均抑制了 $HepG_2$ 的恶性增殖,表明苦参碱通过调节抑癌基因和癌基因的表达,影响癌细胞的代谢从而抑制其增殖。

关键词:苦参碱;肝细胞癌;癌基因;抑癌基因;代谢
中图法分类号:R281.4;R730.21;R735.7 文献标识码:A

Effects of matrine on $HepG_2$ cells at metabolism level and gene level

SI Wei-ke, LI Peng, YAO Jie (Department of Clinical Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of metabolism level and gene level in matrine inhibiting proliferation of $HepG_2$ cells for revealing the functions of matrine to inhibit proliferation of $HepG_2$ cells. Methods After treatment of $HepG_2$ cells with 0~1.5 g/L matrine for 3 d, the protein expressions of AFP, PCNA, wp53, Rb, N-ras and c-myc were detected with immunocytochemical method; mRNA expressions of wp53, c-myc with in situ hybridization; cAMP and cGMP with radioimmunoassay; hepatocellular GGT (HSGGT) was isolated with affinity chromatography and the enzymic activities of HSGGT and GGT were detected. All results were quantitatively analyzed with high-fidelity colored picture and processed statistically with Microsoft-Excel program. Results After $HepG_2$ cells being treated by matrine, changes of indices related to cellular metabolism were found: cAMP as well as the ratio of cAMP to cGMP rose but AFP, PCNA, cGMP, GGT, HSGGT fell. Changes of the indices related to genes were also found: the expressions of anti-oncogenes wp53 and Rb enhanced whereas the expression of oncogene c-myc weakened; no obvious change of the expression of N-ras was found in treated cells. Conclusion After the cells being treated by certain dosage of matrine, $HepG_2$ cellular proliferation is inhibited at metabolism level and gene level, indicating that matrine can affect cellular metabolism to inhibit proliferation by the regulation of the expressions of anti-oncogenes and oncogenes.

Key words: matrine; hapetocellular carcinoma; anti-oncogene; oncogene; metabolism

苦参碱是中药苦参的化学成份之一,是抗肿瘤的活性成份,以往的研究表明:苦参提取液及苦参碱在体外可诱导 K562 细胞向红系和粒系分化[1~3],可抑制鼠移植性肿瘤生长,可诱导 SMMC-7721 细胞分化[4]。在临床也有苦参及苦参碱对白血病和肝癌治疗有效的报道[5]。此外它的毒副作用小并能提高免疫力,故可能发展成为较理想的抗癌新药。但目前它在体内外抗肿瘤的作用机制不明,特别是抗实体瘤的研究至今国内外罕见报道。作者近来的研究表明:苦参碱可有效的抑制人肝癌细胞 $HepG_2$ 的增殖并且诱导后在细胞水平上出现了分化的表型[6,7]。为进一步探讨苦参碱抑制肿瘤增殖的机制,本研究观察了苦参碱抑制 $HepG_2$ 增殖时在代谢水平和基因水平上的变化,为苦参碱治疗肿瘤打下基础。

作者简介:司维柯(1958-),女,山西省晋城市人,博士,副教授,主要从事抗肿瘤机制及肝胆疾病实验诊断方面的研究,发表论文 30 余篇。电话:(023)68752314

收稿日期:2001-12-20;修回日期:2002-04-01

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦参碱注射液(商品名:斯巴德康)10 g/L, 5 ml/支,购自广州明兴制药厂,批号 980304。RPMI1640 培养基和胰酶均为 Gibco 产品。AFP、PCNA、Rb、N-ras、c-myc 免疫组化试剂盒和 wp53、c-myc 原位杂交试剂盒均购自 Boster(博士德)生物工程有限公司。ConA, ConA-sepharose, α-methylglucoside, methyl-α-D-mannopynoside 均为 Sigma 公司产品。cAMP、cGMP 放免试剂盒分别由上海第二医科大学实验核医学教研室和上海中医学院同位素室提供。GGT(γ-glutamyltransferase, γ-谷胺酰转移酶)测定试剂盒为长征公司产品。

细胞株:$HepG_2$ 细胞株,由重庆医科大学附二院肝炎研究所提供,并在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,37℃, 5% CO_2 条件下培养。

HARRIS CO_2 孵箱,SW-CJ-IF 垂直净化工作台,COIC-XSZ-D2 光学显微镜和倒置显微镜,MD20 型真彩色图像分析仪。Beckman Synchron CX-7 型全自动生化分析仪,Edwards 冷冻真空抽干机。

1.2 方法

1.2.1 AFP、PCNA、p53、Rb、c-myc、N-ras 免疫组化试验 细

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞培养: 1×10^5 cells/ml 细胞悬液置于放有载片的培养皿中, 预培养 6~12 h, 细胞贴壁后更换新培养液并加苦参碱使终浓度为 0~1.5 g/L。培养 3 d 后用 PBS 洗 3 次, 4 ℃丙酮固定 20~30 min, 自然干燥后作免疫组化。

免疫组化染色: 按 Boster 生物工程有限公司的商品试剂盒操作说明书进行, 检测 AFP、PCNA、p53、Rb、c-myc、N-ras 等蛋白表达。光镜下观察, 细胞浆或核染为棕黄色为阳性, 阴性细胞不着色。真彩色图像分析仪上测定阳性细胞光密度值。

1.2.2　原位杂交试验　　细胞培养: 载片洗液浸泡 24 h, 自来水、蒸馏水充分洗涤 3 次以上, 沥干, 95% 酒精浸泡 24 h, 烘干, 15 磅高压灭菌 20 min。其它器械用品均高压消毒以灭活 RNA 酶。所用试剂均用含有 0.1% DEPC 的蒸馏水配制, 以防止 RNA 酶对 mRNA 的降解。用处理的载片培养细胞, 操作时注意防止 RNA 酶污染。3 d 后取出载片, 用含有 0.1% DEPC 的 0.1 mol/L PBS (pH7.4) 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定细胞, 室温 30 min, 蒸馏水洗涤。

原位杂交法检测 p53、c-myc 基因 mRNA 的表达变化: 按操作说明书进行, 分别用 p53 的寡核苷酸探针和 p53 cDNA 探针检测野生型的 p53 基因的表达。阳性细胞浆或核染为紫蓝色(采用蓝色 DAB 显色试剂盒), 阴性细胞不着色。真彩色图像分析仪上测定阳性细胞光密度值。

1.2.3　cAMP、cGMP 的测定　　1×10^5 cells/ml $HepG_2$ 细胞悬液 20 ml, 培养 24 h 后弃去培养液, 加新培养液和苦参碱并使终浓度为 0.8、1.5 g/L, 共培养 3 d, 每天取一瓶, 吸出上清液(勿弃去), 胰酶消化贴壁细胞后, 再用上清液吹打洗脱全部细胞, 充分打散细胞, 在 Neubauers 型计数板上计数细胞总数, 按 cAMP 放免试剂盒和"^{125}I-cGMP RIA Kit 使用说明书"上操作, 并按需要作相应稀释, 每测定管均作平行管, 最后所得结合率乘稀释倍数乘因素(即 Bu×F×N)得 cAMP 或 cGMP 量(pmol/10^5 cells)。

1.2.4　GGT 总活性测定和 HSGGT 的分离测定　　GGT 总活性测定: 收集培养 1~4 d 用药和未用药细胞, 计数后, 1 000 r/min, 5 min 离心沉淀细胞, 用 pH 7.2、0.01 mol/L PBS 液洗 2 次, 加 pH 8.0、0.01 mol/L Tris·HCl 缓冲液 1.00 ml(内含 0.1% 的 Triton X-100)混均, 4 ℃放置 10 min(镜检确定细胞已全部裂解), 全自动生化分析仪上检测酶活性, 每浓度平行测定 3 次, 结果取平均值。

建立亲合微柱法分离测定 HSGGT: 依据 ConA 可有效识别肝癌与非肝癌 GGT 的特性, 建立亲合层析法分离 GGT, 联合自动生化分析仪检测分离的 GGT, 以非肝癌与肝癌 GGT 的比值, 反应 $HepG_2$ 用药前后恶性程度。标本处理: 同 GGT 总活性, 细胞处理液用前 2 000 r/min, 离心 10 min。建立亲和微柱法分离检测肝癌 GGT: 方法参见文献[8,9]。

1.2.5　统计学方法　　数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　AFP、PCNA、p53、Rb、c-myc、N-ras 免疫组化试验

2.1.1　AFP、PCNA　　对照细胞 AFP 和 PCNA 均为不同程度阳性, AFP 主要分布在胞浆中, 呈棕黄色。PCNA 主要分布在核仁和核膜周围, 呈棕色。用药后, 细胞中的 AFP 和 PCNA 表达减弱呈黄色, 见图 1~4, 如药物浓度大于或等于 1.5 g/L 时, AFP 和 PCNA 均为阴性。配合真彩色图像分析, 每个浓度测量 20 个以上细胞阳性色的光密度值(IOD), 换算成每个细胞阳性色的光密度值(IOD/cell), 间接反应 AFP 和 PCNA 的量。则对照和加药细胞(苦参碱的终浓度为 0、0.8、1.5 g/L)培养 3 d, AFP 和 PCNA 的光密度值(IOD/cell)见表 1。

表 1　苦参碱对 $HepG_2$ 细胞 AFP 和 PCNA 的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of matrine on AFP, PCNA in $HepG_2$ cells($\bar{x}\pm s$)

MA(g/L)	PCNA(IOD/cell)	AFP(IOD/cell)
0.0	192.6±17.0	289.4±23.1
0.8	102±21.3**	114.0±16.1**
1.5	0	0

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* control group(MA 0 g/L)

2.1.2　p53、Rb、c-myc、N-ras 免疫组化试验　　未用药组细胞 p53、Rb 蛋白表达为阴性, c-myc 为阳性(细胞核和浆均着棕黄色)。用药细胞 p53、Rb 蛋白表达为阳性, 细胞核着棕黄色, c-myc 阳性程度减弱。N-ras 用药前后无显著差异, 均为弱阳性(细胞浆和核着黄色), 见表 2。

2.2　p53、c-myc 原位杂交试验

未用药组细胞 p53 mRNA 表达为弱阳性, c-myc mRNA 表达为阳性, 细胞核着紫蓝色。用药细胞, 无论是 p53 寡核苷酸作探针还是 p53 cDNA 作探针检测 p53 mRNA 表达, 阳性程度均增强, 细胞核和浆均着紫蓝色, c-myc 阳性程度减弱, 见图 5~8。

真彩色图像分析及统计处理: 图像分析仪上每个指标测定 50 个细胞阳性色的表面积 Area 和积分光密度值 IOD, 求出每个细胞阳性色单位面积的光密度值即 IOD/μm^2, 用 Excel 软件进行单因素方差分析, 用 Excel 得出的平均 IOD/μm^2, 可间接反应出蛋白或 mRNA 表达量, 见表 2。

2.3　cAMP 与 cGMP

cAMP 随用药浓度增加而增加, 其中以 1.5 g/L 作用 1 d 增加最明显, 是未用药的 7 倍; cGMP 随药物浓度增加而降低。cAMP 与 cGMP 比值随用药浓度增加而增大, 其中以 1.5 g/L 作用 1 d 的比值升高最明显, 是未用药细胞的 39 倍。随用药时间延长, cAMP、cGMP 总趋势是降低: 用药 1 d、2 d、3 d, cAMP (pmol/L) 分别为 118.8、100.3、52.2(MA 为 0g/L); 141、170.8、137.2 (MA 为 0.8 g/L); 830.4、261.1、217.5(MA 为 1.5 g/L); cGMP (pmol/L) 分别为 1.9、1.392、1.158 (MA 为 0 g/L); 0.594、0.631、0.313(MA 为 0.8 g/L); 0.34、0.436、0.357(MA 为 1.5 g/L)。

表 2　苦参碱诱导 $HepG_2$ 分化时抑癌基因和癌基因表达(IOD/μm^2, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expressions of oncogenes and anti-oncogenes of differentiating $HepG_2$ cells induced by matrine(IOD/μm^2, $\bar{x}\pm s$)

MA(g/L)	N-ras	c-myc		p53			Rb
	Protein	Protein	mRNA	Protein	mRNA	mRNA☆	Protein
0	0.20±0.03	0.37±0.01	0.827±0.09	0	0.418±0.11	0.222±0.02	0
0.8	0.176±0.02	0.31±0.06*	0.756±0.09*	0.157±0.02*	0.489±0.06*	0.289±0.08*	0.265±0.06*
1.5	0.178±0.02	0.265±0.04*	0.589±0.14*	0.254±0.04*	0.503±0.09*	0.511±0.12*	0.315±0.03*

*: $P<0.01$ *vs* control group(MA 0 g/L); ☆: cDNA serve as prob

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

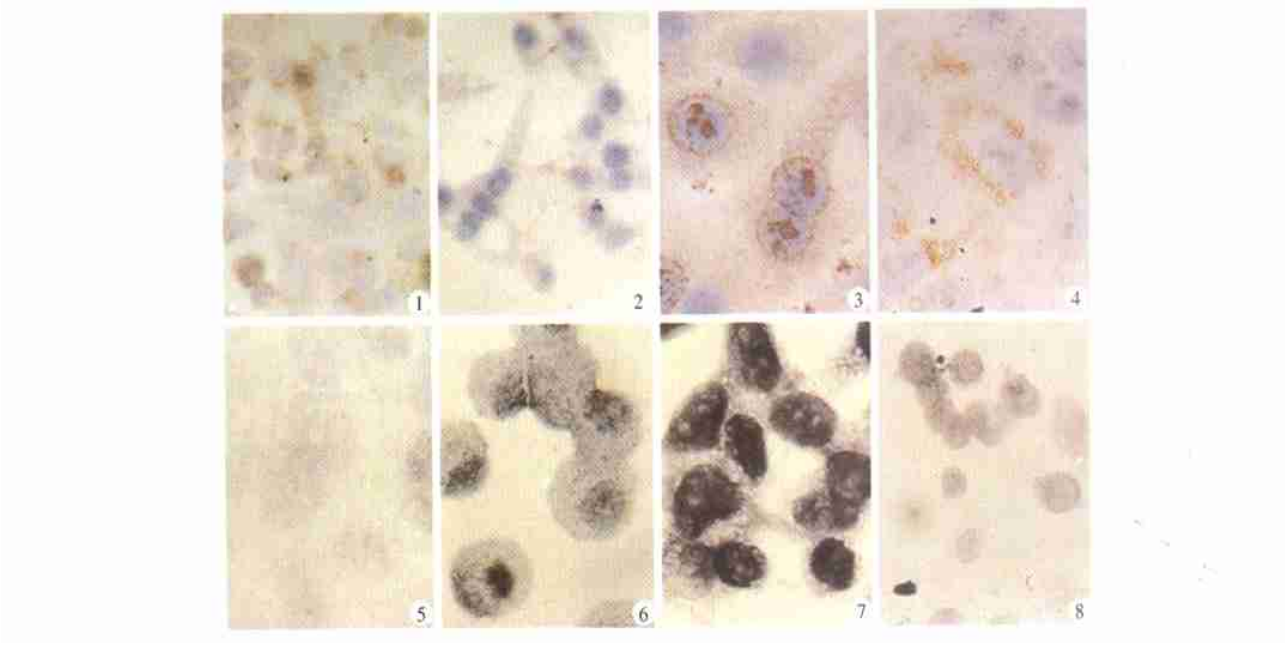


图 1 未处理的 $HepG_2$ 细胞的 AFP 免疫细胞化学染色 (S-P× 200)
Fig 1 Immunocytochemical staining of AFP in untreated $HepG_2$ cells (S-P× 200)
图 2 0.8 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞的 AFP 免疫细胞化学染色 S-P× 200)
Fig 2 Immunocytochemical staining of AFP in 0.8 g/L matrine-treated $HepG_2$ cells (S-P×200)
图 3 未处理的 $HepG_2$ 细胞的 PCNA 免疫细胞化学染色 (S-P× 400)
Fig 3 Immunocytochemical staining of PCNA in untreated $HepG_2$ cells (S-P× 400)
图 4 0.8 g/L 苦参碱处理 $HepG_2$ 细胞的 PCNA 免疫细胞化学染色 (S-P× 400)
Fig 4 Immunocytochemical staining of PCNA in 0.8 g/L matrine-treated $HepG_2$ cells (S-P× 400)
图 5 未处理的 $HepG_2$ 细胞 p53 原位杂交实验 (× 400)
Fig 5 *In situ* hybridization staining of p53 mRNA in untreated $HepG_2$ cells (×400)
图 6 0.8 g/L 苦参碱处理的 $HepG_2$ 细胞 p53 mRNA 的原位杂交实验 (× 400)
Fig 6 *In situ* hybridization staining of p53 mRNA in 0.8 g/L matrine-treated $HepG_2$ cells (× 400)
图 7 未处理的 $HepG_2$ 细胞 c-myc mRNA 原位杂交实验 (× 400)
Fig 7 *In situ* hybridization staining of c-myc mRNA in untreated $HepG_2$ cells (× 400)
图 8 1.5 g/L 苦参碱处理的 $HepG_2$ 细胞 c-myc mRNA 的原位杂交实验(× 400)
Fig 8 *In situ* hybridization staining of c-myc mRNA in 1.5 g/L matrine-treated $HepG_2$ cells (×400)

2.4 GGT 总活性测定

用药后细胞 GGT 总活性降低, 结果见图 9。

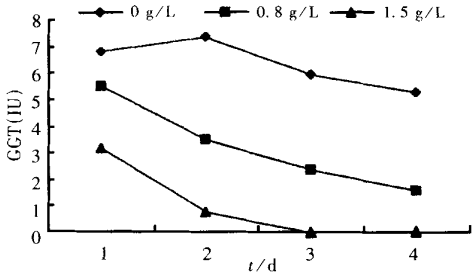


图 9 苦参碱作用 $HepG_2$ 细胞的 GGT 活性变化
Fig 9 Changes of GGT activities in matrine-treated $HepG_2$ cells

2.5 HSGGT

未用药组酶活性比值为 0.593±0.096, 用药组(0.8 g/L MA)为 0.207±0.033。统计学分析表明苦参碱处理肝癌细胞后肝癌特异 GGT 的酶活性降低($P<0.01$)。

3 讨论

我们以往的研究表明苦参碱大于 0.3 g/L 时可抑制 $HepG_2$ 增殖, 0.8 g/L 时, $HepG_2$ 的 DNA 合成率降至 32%, 细胞存活率为 50%, 该药物浓度为肿瘤细胞中等敏感的浓度, 在此浓度下 $HepG_2$ 在细胞水平出现了分化的表型, 光镜、电镜观察均表明用药的 $HepG_2$ 细胞恶性形态表型减弱甚至消失, 如: 核浆比减小, 核仁消失, 细胞表面微绒毛消失, 与外源凝集素 ConA 和 PHA 的凝集性减弱等[6,7,10]。本研究表明: 苦参碱抑制 $HepG_2$ 增殖时在代谢水平和基因水平上均发生了变化, 如代谢水平上, 一些代谢所需的酶和物质发生了改变: cAMP 升高, cAMP/cGMP 比值升高; AFP、PCNA、cGMP、GGT、HSGGT 量均降低。基因水平上: 抑癌基因 wp53、Rb 表达增强, 癌基因 c-myc 表达减弱。其可能的机制讨论如下。

PCNA 是反映肝癌细胞恶性增殖的指标, 主要在增殖旺盛的肿瘤细胞的 G_1 后期和 S 期表达, 对 S 期细胞胞核具有良好的标记作用。AFP 是肝癌细胞的肿瘤标志物, 在正常肝细胞中不表达, PCNA 和 AFP 均可反

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

应肿瘤细胞的恶性程度, PCNA 在临床上用于肿瘤组织分级。用药后细胞 AFP 和 PCNA 表达均减弱, 说明肝癌细胞恶性增殖受到抑制, 细胞恶性程度降低。

许多肿瘤细胞均有基因异常, 这种异常包括缺失、失活和突变。$HepG_2$ 细胞具有野生型的 p53 基因即 wp53, 其基因异常可能主要是失活。实验表明: 未用药时该基因的蛋白质和 mRNA 均不表达或表达很弱, 用药后蛋白质和 mRNA 表达均增强, 并随苦参碱浓度增加, wp53 mRNA 和蛋白表达均增强, 证实了苦参碱可诱导抑癌基因 wp53(即野生型) 的表达。而且蛋白表达的阳性显色分布在浆和核中, 不像其它肿瘤细胞蛋白常分布在核中, 文献[11] 报道恶性度高的肿瘤细胞, 蛋白多分布在核中。周小舟等[12] 也报道抗癌方诱导 $HepG_2$ 细胞 p53 蛋白的表达, 这也许是某些抗癌药物抑制肿瘤细胞生长的机制之一。Rb 基因也是抑癌基因, 许多肿瘤细胞中均发现有 Rb 基因的缺失突变等。Rb 基因表达的 Rb 蛋白与细胞周期进展有关, 它通过 Rb 蛋白磷酸化和去磷酸化实现其功能, 促进细胞增殖的生理信号使 Rb 磷酸化, Rb 磷酸化后释放出与之结合的转录因子 E2F, E2F 则激活一系列基因的转录, 如 TGFα, 促使细胞增殖。反之, 低磷酸化状态的 Rb 与 E2F 结合, 阻止细胞增殖。本实验结果表明, 随苦参碱浓度增加 Rb 蛋白表达增加, 可能大量 Rb 与 E2F 结合, 阻止了基因转录, 从而抑制了细胞的增殖。

N-ras 与 c-myc 均为原癌基因, 国内外研究证实 N-ras 是人原发性肝癌中的转化基因, 肝癌病人中发现有 N-ras 过量表达, 表达的蛋白 p21ras 具有 GTP 结合活性, 在细胞内起信号传导作用。本实验中发现, 用药前后 N-ras 基因表达变化不明显, 与 Saito 等报道一致, Saito 在丁酸钠诱导肝癌细胞分化中也发现, AFP、c-myc 表达降低, 而 N-ras、K-ras 基因表达无变化, 具体的原因有待进一步研究。c-myc 和 N-ras 可共同诱导 Cyclin E—CDKs 酶活性, 从而促进细胞异常增殖导致肿瘤发生。肝癌中持续表达 c-myc 和 TGF-α, 是因 Rb/E2F 通路破坏和凋亡抑制而诱发的癌基因事件[13]。在 Rat-1 细胞中破坏 c-myc 等位基因, 导致 G1 和 G2 细胞周期延长[14]。用反义寡核苷酸封闭 c-myc 可诱导 K562、HL60 等细胞分化[15]。本实验显示随苦参碱浓度增加, c-myc 的 mRNA 和蛋白表达降低, 说明苦参碱直接或间接下调了 c-myc 的表达, 可能苦参碱通过上调 wp53、Rb 表达来抑制 c-myc 的表达, 从而抑制了细胞增殖。

cAMP 和 cGMP 是细胞信号传导的第二信使。cAMP 是细胞增殖的抑制剂, 它可发动 CKIS(细胞周期蛋白激酶抑制剂 cyclin dependent kinases inhibitors)活性从而影响 Rb 磷酸化, 进而抑制细胞周期进程。cAMP 还可抑制 Cyclin A 的表达并抑制肝癌细胞的生长, 使细胞趋向分化。处于增殖状态的肿瘤细胞, cAMP 明显低于正常细胞, 加入抗癌药后, cAMP 浓度升高, 细胞增殖下降。cGMP 在细胞内含量很少, 通常只有 cAMP 的 1/101/50, 但它对增殖的调节起着重要作用, 当 cGMP 升高时, 促进细胞内核酸和组蛋白的合成, 提高细胞增殖水平, 促进细胞分裂增殖。可见 cAMP 与 cGMP 的作用恰好相反, 互相拮抗, cAMP/cGMP 的比值被认为可作为细胞生长代谢和增殖的指标(Goldberg 1974 年)。本实验结果表明: 用药后细胞 cAMP 升高, cGMP 下降, 两者比值明显升高, 说明苦参碱抑制 $HepG_2$ 的增殖。

GGT 和 HSGGT: GGT 总活性是临床诊断肝胆胰疾病灵敏指标, 一般良性肝病和肝肿瘤血清中 GGT 均升高。Joris(1987 年)和 Hideo(1981 年)的研究表明肝癌患者血清 GGT (HSGGT)与 ConA 亲和性弱, 正常人 GGT 与 ConA 亲和性强。我们的研究结果也支持该结论, HSGGT 因其分子上糖链的改变, 故与 ConA 亲合性弱于非肝癌 GGT, 利用该特性建立了亲合层析法分离测定 HSGGT 和非肝癌 GGT, 两者比值在用药组和未用药组间有差异, 可反映用药后, 肝癌细胞的恶性程度是否降低。实验表明用药后 GGT 总活性、HSGGT 活性均降低, 说明 $HepG_2$ 恶性度降低。

参考文献:

[1] 司维柯, 韩　风, 秦建平, 等. 苦参提取液诱导 K562 细胞分化的细胞化学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1997, 6(2): 200—205.

[2] 司维柯, 秦建平, 蒋纪恺等. 苦参诱导 K562 细胞分化的研究[J]. 中草药, 1997, 28(5): 309.

[3] Zhang Y, Jiang J K, Liu X S. Differentiation and apoptosis in K526 erytholeukemia induced by matrine[J]. Natured Medicine. 1998, 52(4): 295—299.

[4] 张燕军, 夏　天, 赵建斌. 苦参碱对 SMMC-7721 细胞系的诱导分化作用[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(3): 340—343.

[5] 陈庆强, 卢秋红, 黄应杰. 中药吗特灵经药盒治疗中晚期肝癌[J]. 影像诊断与介入放射学, 1997, 6(2): 114—115.

[6] 司维柯, 肖桃元, 康格非. 苦参碱对人肝癌细胞 $HepG_2$ 细胞形态的影响和相关增殖因素的变化[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 553—556.

[7] 司维柯, 张广运, 马立强. 苦参碱对 $HepG_2$ 细胞系增殖能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 451, 458.

[8] 司维柯, 李士敏, 罗朝学, 等. 伴刀豆球蛋白 A 识别正常与肝癌特异γ-谷氨酰转移酶的实验观察[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 294-295.

[9] 司维柯, 胡珍国, 何长生等, 外源凝集素亲和微柱法检测肝癌特异 GGT 方法研究[J]. 肿瘤, 2000, 20(3): 264—265.

[10] 司维柯, 潘　静, 陆　华, 等. 苦参碱抑制 $HepG_2$ 细胞增殖及其剂量与抑制方式关系的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(2): 185—189.

[11] Nagao T, kondo F, sato T, *et al*. Immunohistochemical detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with cell proliferative activity indices, including mitotic index and MIB—1 immunostaining[J]. Hum Patho, 1995, 26(3): 326—333.

[12] 周小舟, 郭振球. 抗癌方对 $HepG_2$ 人肝癌细胞株 p53 蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(3): 21—23.

[13] Ieone G, De G J, sears R, *et al*. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin El cdk2 and E2F[J]. Nature (London), 1997, 387, 422—226.

[14] Mateyak, M K, Obaya A J, Adachis, *et al*. Phenotypes of c-myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination[J]. Cell Growth Differ, 1997, 8: 1 039—1 048.

[15] Canelles M, Delgado M D, Hyland K M, *et al*. Max and inhibitory c-myc mutants induce erythoid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells[J]. Oncogene, 1997, 14: 1 315—1 327.

(编辑　郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net