

鳖甲煎丸对 HUVEC 增殖及 HepG2 中 VEGF 表达的影响

郑艳¹, 贺松其^{2*}, 文彬³, 陈旭狮¹, 贾文燕², 孙海涛², 樊尔艳²

(1. 南方医科大学第一临床医学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515;
3. 中国人民解放军四五六医院中医科, 广州 510602)

[摘要] **目的:**通过研究鳖甲煎丸对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)增殖及肝癌细胞系 HepG2 中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,探讨其抗肝细胞癌血管生成的机制。**方法:**将 24 只 6 周龄 Wistar 大鼠随机分为 3 组(8 只/组),分别以临床剂量 20,10 倍的鳖甲煎丸水溶液及生理盐水 *ig* 3 d,3 d 后采血,离心,获取血清。用含有不同浓度 HepG2 培养上清的条件培养基培养 HUVEC,48 h 后用 MTT 比色法检测 HUVEC 的增殖情况并确定条件培养基的最适浓度。用该浓度的条件培养基培养 HUVEC,分别于 48,72 h 后采用 MTT 比色法检测药物血清对 HUVEC 增殖的影响。用含药血清培养 HepG2,48 h 后采用 ELISA 方法检测培养液上清中 VEGF 的浓度,采用 qRT-PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达情况。**结果:**鳖甲煎丸高、中剂量组 10% 药物血清能够显著抑制 HUVEC 的增殖,这种抑制作用具有浓度和时间依赖性。鳖甲煎丸高、中剂量 10% 药物血清组中 VEGF 浓度与 VEGF mRNA 表达水平均明显下降,并且下降程度与药物浓度有关。**结论:**鳖甲煎丸能够抑制 HUVEC 的快速增殖并且显著地降低 HepG2 中 VEGF 的表达水平。研究表明鳖甲煎丸在抗肝细胞癌血管生成方面具有一定作用。

[关键词] 原发性肝癌; 鳖甲煎丸; 血管内皮生长因子; 人脐静脉血管内皮细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0132-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014200132

Effect of Biejiajian Pills on HUVEC Proliferation and VEGF Expression in HepG2

ZHENG Yan¹, HE Song-qi^{2*}, WEN Bin³, CHEN Xu-shi¹, JIA Wen-yan², SUN Hai-tao², FAN Er-yan²

(1. First Clinical College of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

3. TCM Department of No. 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Biejiajian pills (BP) on human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC) proliferation and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in HepG2 and to explore the mechanism of BP to suppress angiogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC, HepG2). **Method:** Twenty-four Wister rats were randomized equally into 3 groups for gavage of BP at 20-fold and 10-fold clinical doses and normal saline for 3 days. Blood samples were then collected from the rats, and the serum was separated and added in HepG2 cell cultures. HUVEC was cultured in conditioned medium (CM) supplemented with culture medium supernatant of HepG2 for 48 h. Then the proliferation of HUVEC was measured by MTT colorimetry. The effect of drug serum on HUVEC proliferation stimulated by CM was investigated by MTT colorimetry. After cultured in the medium containing drug serum for 48 h, the concentration of VEGF in HepG2 culture medium was assayed by ELISA and the expression of VEGF mRNA was investigated by qRT-PCR. **Result:** High and middle dose BP

[收稿日期] 20140401(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072934);广东省自然科学基金项目(9151051501000003);广东省大学生创新计划(1212111053)

[第一作者] 郑艳,硕士研究生在读,从事肝病的中西医结合临床与基础研究,Tel:020-61648247,E-mail:yanzheng@139.com

[通讯作者] *贺松其,博士,教授,主任医师,硕士生导师,从事肝病的临床与基础研究,Tel:020-61648247,E-mail:hesongqijz@126.com

inhibited the proliferation of HUVEC in a concentration-and-time depending manner. High and middle dose BP decreased the secretion of VEGF as well as the expression of VEGF mRNA significantly, which is also correlated with the concentration of BP. **Conclusion:** BP can effectively inhibit the proliferation of HUVEC and lower the expression of VEGF. It may serve as a potential anti-angiogenesis agent in HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; Biejiajian pills; vascular endothelial growth factor; human umbilical vascular endothelial cell

血管生成(angiogenesis)在肝细胞癌的生长、浸润和转移中起着重要作用。一方面新生血管可以为肿瘤细胞提供更多的氧和营养物质,另一方面新生血管内皮细胞分泌的多种生长因子可以刺激邻近的肿瘤细胞生长。肿瘤新生血管还为恶性肿瘤的血道转移提供了通路^[1-2]。血管内皮生长因子是血管生成中的一个关键的调控因子,已经成为目前研究恶性肿瘤浸润和转移的热点。人脐静脉内皮细胞来源于大静脉,当被肿瘤细胞培养液刺激后,其在一定程度上能够具备肿瘤血管内皮细胞的特性^[3],因此它常用于肿瘤血管生成方面的研究。

我国传统中药一直在肿瘤治疗领域发挥着独特的功效,随着抗肿瘤血管生成机制研究不断深入和肿瘤血管生成抑制剂相继研发,人们发现有不少中药或有效成分可以通过抑制肿瘤血管生成来发挥抗肿瘤的治疗作用^[4]。鳖甲煎丸出自东汉医家张仲景所著《金匮要略》,具有寒热并用、攻补兼施、益气活血、活血化瘀、解毒散结之功。该方目前广泛应用于临床,对肝癌、肝纤维化等病疗效显著。已有的临床和实验研究结果表明,鳖甲煎丸具有较好的防止肝癌转移的作用^[5]。鳖甲煎丸防止肝癌转移的作用机制涉及多个方面,动物实验研究表明鳖甲煎丸能够显著降低肿瘤组织的微血管密度及血管内皮生长因子(VEGF)的表达^[6],本课题组之前的研究表明鳖甲煎丸能够有效抑制肝细胞癌 HepG2 的增殖、黏附及侵袭,并且能够抑制 HepG2 中 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活^[7-8]。为了进一步探究鳖甲煎丸抗肿瘤血管生成方面的分子机制,本实验拟研究鳖甲煎丸对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)增殖及 HepG2 中 VEGF 表达的影响。

1 材料

1.1 动物 6 周龄 Wistar 大鼠 24 只,体重(250 ± 30)g,雌雄各半,清洁级,动物合格证号 SCXK(粤)2006-0015,由南方医科大学中医药学院实验动物中心普通饲料喂养,自由饮水。

1.2 细胞株 肝癌细胞系 HepG2 由南方医科大学药学院抗病毒中心提供;HUVEC 细胞株购自

ATCC。

1.3 药物 鳖甲煎丸处方:鳖甲胶 75 g,大黄 37.5 g,土鳖虫(炒)37.5 g,桃仁 15 g,鼠妇虫 22.5 g,蝼蛄 45 g,凌霄花 37.5 g,牡丹皮 37.5 g,银硝(精制)90 g,蜂房(炒)30 g,柴胡 45 g,厚朴(姜制)37.5 g,桂枝 37.5 g,干姜 37.5 g,瞿麦 30 g,石韦 37.5 g,葶苈子 7.5 g,射干 30 g,黄芩 22.5 g,人参 7.5 g,白芍(炒)37.5 g,阿胶 37.5 g,生半夏(漂洗)37.5 g,蜂蜜(炼)400 g,黄酒 600 g,制成 1 000 g。以上 23 味药材,人参粉碎成极细粉,除鳖甲胶、阿胶、银硝外,其余 19 味酌予碎断,加黄酒拌匀,加盖封闭,隔水炖至酒尽药熟,干燥,与鳖甲胶等 3 味混合粉碎成细粉,加入人参粉,过筛,混匀,加炼蜜与适量水泛丸,干燥,即得。运用薄层色谱法及高效液相色谱法对相应成分及其含量进行鉴定。鳖甲煎丸由杭州胡庆余堂药业有限公司提供,产品批号 100901。

1.4 试剂及仪器 DMEM(高糖)、胎牛血清、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),三氯甲烷、异丙醇、Tris 碱、硼酸(广州化学试剂总厂),DEPC、MTT 和 DMSO(美国 Sigma 公司),人 VEGF ELISA 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),Recombinant DNase I (RNase-free)试剂盒,Real-time PCR 试剂盒(日本 Toyobo 公司),反转录试剂盒(美国 Promega 公司)。ABI7500 型实时定量仪(美国 ABI 公司),多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司),显微镜(日本 Nikon 公司),低温冷冻离心机(珠江黑马医学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HepG2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基在 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱内常规培养,每 3 ~ 4 d 传代 1 次。HUVEC 用含 0.1 g·L⁻¹ 肝素,0.05 g·L⁻¹ 内皮细胞生长因子(EGCS),10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基在 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱内常规培养,每 6 ~ 7 d 传代 1 次。

2.2 HepG2 培养上清液的收集 当 HepG2 细胞融合达到 80% 时更换为无血清的 DMEM 培养液,48 h 后收集上清液,0.22 μm 滤膜过滤, - 80 °C 保存备

用。用 DMEM 培养液配成含 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% HepG2 上清的培养液用于实验。

2.3 动物分组及含药血清制备 将 24 只 6 周龄 Wistar 大鼠随机分为高剂量组(H 组)、中剂量组(M 组)、阴性对照(NC)组,每组 8 只。H, M 组分别将成人(60 kg)临床剂量的 20 倍($12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 10 倍($6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的鳖甲煎丸用生理盐水溶解,按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药,NC 组用等量生理盐水 ig, 2 次/d,连续给药 3 d,于第 4 天给药 2 h 后 3% 异戊巴比妥腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,静置 1 h 后, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min 分离血清,经 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭活 30 min, $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 过滤除菌后,置 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.4 不同浓度 HepG2 培养液上清刺激 HUVEC 异常增殖 将 HUVEC 按 2×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板, $100 \text{ }\mu\text{L}$ /孔,培养 24 h 待细胞贴壁后,弃去培养基,每组设 6 个复孔,分别加入上述配好的不同浓度的 HepG2 培养液上清, $100 \text{ }\mu\text{L}$ /孔,对照组加入等量 DMEM 培养液,继续培养 48 h 后,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT $20 \text{ }\mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,吸出上清后加入 $150 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO,震荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪于 570 nm 处测定每孔的吸光度(A),将受试孔的 A 减去本底 A,各平行孔的 A 取平均值。

2.5 药物血清在不同时间点对 HepG2 培养液上清刺激 HUVEC 异常增殖的抑制作用 将 HUVEC 按 2×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板, $100 \text{ }\mu\text{L}$ /孔,培养 24 h 待细胞贴壁后,弃去培养基,每组设 8 个复孔,每孔分别加入 60% HepG2 肿瘤上清 $90 \text{ }\mu\text{L}$ 和 60% 药物血清 $10 \text{ }\mu\text{L}$,空白对照组加入等量 DMEM 培养液,肿瘤模型(tumor model, TM)组加入 60% HepG2 肿瘤上清 $100 \text{ }\mu\text{L}$,继续培养 48 h 和 72 h 后,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT $20 \text{ }\mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,吸出上清后加入 $150 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO,震荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪于 570 nm 处测定每孔的 A,将受试孔的 A 减去本底 A,各平行孔的 A 取平均值。

2.6 HepG2 培养液上清中 VEGF 的浓度 将 HepG2 细胞以 2.5×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,3 孔重复,待细胞贴壁后弃培养基,随机分为 H 组、M 组、NC 组和空白对照(blank control, BC)组,分别更换为含 10% 药物血清(H, M, NC)的 DMEM, BC 组加入等量 DMEM,培养 48 h 后收集上清,按照试剂盒说明书检测 VEGF 浓度,并消化细胞计数。以 VEGF 浓度/细胞数作为结果。

2.7 HepG2 中 VEGF mRNA 表达水平 将 HepG2

细胞以 2.5×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,3 孔重复,待细胞贴壁后弃培养基,随机分为 H 组、M 组、NC 组和 BC 组,分别更换为含 10% 药物血清(H, M, NC)的 DMEM, BC 组加入等量 DMEM,共育 48 h 后分别收集各组细胞,按 TRIZOL Reagent 使用说明进行抽提总 RNA。按 RT-PCR 试剂盒说明书提供的方法将其反转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。VEGF 基因上游引物序列为 5'-CGCTTACTCTCACCTGCTTCTG-3',下游引物序列为 5'-GCTGTCATGGGCTGCTTCTTC-3',扩增片段长度为 99 bp。PCR 条件为:第 1 步, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min;第 2 步, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s(收集荧光信号), 40 cycles; $60 \sim 95 \text{ }^\circ\text{C}$ 融解曲线分析。引物由广东英骏生物技术公司合成。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件,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-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 HepG2 培养液上清刺激 HUVEC 异常增殖情况 随着 HepG2 培养液上清浓度不断增加, A 值也逐渐升高,各浓度组 A 值与 DMEM 组 A 值相比,差异均有统计学意义。除了 60%, 70%, 80% 与 90% 4 组 A 值之间差别无统计学意义以外,其余各浓度组之间 A 值比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),说明 HepG2 培养液上清对 HUVEC 增殖的促进作用随着浓度的增加而趋于平稳,因此选取 60% HepG2 培养液上清进行下一步的实验。

3.2 药物血清在不同时间点对 HepG2 培养液上清刺激后 HUVEC 异常增殖的抑制作用 HepG2 培养液上清无论在 48 h 还是在 72 h 均可显著促进 HUVEC 的增殖($P < 0.05$)。H 和 M 组药物血清均可显著抑制 HUVEC 的增殖,并且这种作用随着时间的延长而有所增强,见表 1。

3.3 HepG2 培养液上清中 VEGF 的浓度 HepG2 细胞用不同浓度鳖甲煎丸药物血清(H, M 组),阴性对照组药物血清(NC 组)及正常血清(BC 组)培养后 48 h 后, H, M 组 HepG2 培养上清液中 VEGF 的浓度显著降低,与 NC 组及 BC 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。表明鳖甲煎丸能够抑制 HepG2 分泌 VEGF,并且这种抑制作用具有浓度依赖性,见表 2。

3.4 HepG2 中 VEGF mRNA 表达水平 qRT-PCR 检测结果显示鳖甲煎丸血清 H, M 组 HepG2 中

表 1 10% 药物血清对 60% HepG2 肿瘤上清诱导 HUVEC 增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	细胞增殖/A	
		48 h	72 h
空白对照	-	0.257 ± 0.056	0.226 ± 0.034
肿瘤模型	-	0.638 ± 0.042 ²⁾	0.628 ± 0.036 ²⁾
鳖甲煎丸血清	12	0.274 ± 0.043 ¹⁾	0.237 ± 0.062 ¹⁾
	6	0.386 ± 0.044 ¹⁾	0.380 ± 0.047 ¹⁾
空白血清 NC	-	0.579 ± 0.053	0.559 ± 0.056

注:与肿瘤模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与空白血清组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

VEGF mRNA 表达水平显著降低,与 NC 组及 BC 组相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明鳖甲煎丸可以从基因水平抑制 VEGF 的表达,且抑制作用和药物浓度有关,见表 2。

表 2 10% 鳖甲煎丸药物血清对 HepG2 中 VEGF 表达及分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	VEGF 表达量	VEGF mRNA
		/μg/×10 ⁶ cells	相对表达量
鳖甲煎丸血清	12	8.874 ± 0.615 ^{1,2)}	0.542 ± 0.029 ^{1,2)}
	6	16.431 ± 0.454 ^{1,2)}	0.673 ± 0.036 ^{1,2)}
空白血清	-	29.596 ± 0.695	0.781 ± 0.040
空白对照	-	55.790 ± 0.559	1.028 ± 0.067

注:与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$;与空白对照组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

近年来抗肿瘤血管方面研究表明活血化瘀药中有多种单方、中药提取物及复方可抑制肿瘤血管生成因子的活性、表达或分泌。其对非肿瘤状态下的瘀阻血络可以起到“通”的作用,而对肿瘤的血络是发挥阻抑功能^[9]。鳖甲煎丸中含有大量的活血化瘀、软坚散结中药如大黄、紫葳、土鳖虫、蜣螂、鼠妇虫、牡丹皮、芍药、桃仁、鳖甲、半夏、乌扇、赤硝等,这些活血化瘀药物具有直接抑杀肿瘤细胞、改变血液流变性、抑制血小板活性、促纤溶、抗血栓、消除循环障碍的作用,可使癌细胞处于抗癌药物及机体免疫功能监控之下^[5]。为了进一步研究鳖甲煎丸抗肿瘤血管生成的作用机制,笔者从其对 HUVEC 增殖及 HepG2 中 VEGF 表达水平的影响两个方面进行了研究。

HUVEC 来源于大静脉,虽具有分化增殖的潜能和新生血管内皮的特性,但一般认为与肿瘤来源的微血管内皮细胞有明显区别,当 HUVEC 被肿瘤细

胞培养液刺激后,其在一定程度上能够具备肿瘤血管内皮细胞的特性,这可能与肿瘤细胞培养液中含有大量的 VEGF 有关^[10-11]。本实验中笔者使用 HepG2 培养液上清培养 HUVEC 以建立体内肿瘤血管内皮细胞模型,当鳖甲煎丸药物血清作用于经过刺激异常增殖的 HUVEC 后,发现 HUVEC 的增殖明显受到抑制。鳖甲煎丸对 HUVEC 增殖的抑制作用是一个综合作用的结果,可能包括抑制多种促血管生成因子的生成,阻断 VEGF 与 VEGF 受体的结合,抑制 VEGF 受体的表达等多种机制。VEGF 是血管生成中的关键因子,因此笔者又进一步探究了鳖甲煎丸对 VEGF 表达水平的作用。

VEGF 早期亦称作血管通透因子 (vascular permeability factor, VPF),是高度特异的血管内皮分裂素。VEGF 的受体 VEGFR-1 和 VEGFR-2 主要位于血管内皮细胞上,VEGF 与其受体结合后可以激活多种信号通路,包括 Ras, PKB/AKT, PI3K 等,从而促进血管生成^[12]。VEGF 可能通过多种方式诱导肿瘤的血管新生:①VEGF 是非常强大且具有高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂原,可以促进内皮细胞迁移和增殖。②VEGF 可以增加血管通透性,促进血浆蛋白外渗形成纤维素支架,从而为内皮细胞的迁移和血管的生长提供支持。③VEGF 还可以激活基质金属蛋白酶 (MMPs),促进细胞外基质降解,从而促进血管新生。④VEGF 还能增强肿瘤细胞对放疗的耐受性及影响免疫功能^[13]。

Wnt/ β -catenin 信号通路在调控胚胎正常发育、参与细胞增殖与分化等过程中起着重要作用,而其异常激活则可能导致肿瘤的发生^[14]。Zhang 等^[15]和 Easwaran 等^[16]先后在 VEGF 启动子上游发现 TCF-4 结合元件,表明 Wnt/ β -catenin 信号通路参与调控 VEGF 表达。笔者先前的研究表明,鳖甲煎丸可以促进 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制基因 DKK-1 的表达,从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活^[7]。在本实验中用 ELISA 方法检测了 HepG2 培养上清中 VEGF 的含量,发现鳖甲煎丸能够有效抑制 VEGF 的分泌。通过荧光定量 PCR 实验,笔者又从基因水平证明鳖甲煎丸可以降低 VEGF mRNA 的表达水平。综合以上实验结果,推测鳖甲煎丸可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活进而降低 VEGF 的表达水平。

总之,笔者的实验研究表明,鳖甲煎丸可以抑制 HUVEC 的异常增殖并降低 HepG2 中 VEGF 的表达水平,这可能与鳖甲煎丸具有活血化瘀的治疗功效

直接相关。VEGF还受到多种其他信号通路如HIF信号通路^[17]、COX-2/PGE₂信号通路^[18]等的调控,鳖甲煎丸是否对这些信号通路也存在抑制作用还需要进一步的研究。

[参考文献]

[1] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, et al. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications[J]. *Liver Int*, 2011, 31(2):146.

[2] Prager G W, Poettler M. Angiogenesis in cancer. Basic mechanisms and therapeutic advances [J]. *Hamostaseologie*, 2012, 32(2):105.

[3] 向邦德,吕明德,黄洁夫,等. 诱导正常血管内皮细胞具备肿瘤血管特性的研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3):354.

[4] 张前,赵言群,解华,等. 中药对肿瘤血管生成的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(4):242.

[5] 贺松其,姚飞龙,程旸,等. 鳖甲煎丸抗肝癌转移的理论依据及分子机制探讨[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(11):2579.

[6] 张绪慧,梁磊,蔡长青,等. 鳖甲煎丸对H22荷瘤小鼠肿瘤血管抑制作用的研究[J]. *山东中医杂志*, 2010(5):330.

[7] 贺松其,程旸,朱云,等. 鳖甲煎丸对肝细胞癌中Wnt/ β -catenin信号通路及抑制基因DKK-1、FrpHe表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(1):30.

[8] 程旸,贺松其,朱云,等. 鳖甲煎丸抑制肝癌细胞增殖、黏附及侵袭作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(5):664.

[9] 张春丽. 中药对肿瘤血管生成抑制作用的研究[J]. *北京中医药*, 2011, 30(2):156.

[10] 王济,张前,解华,等. 羟基红花黄色素A对肿瘤上清诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(5):572.

[11] Lu N, Gao Y, Ling Y, et al. Wogonin suppresses tumor growth *in vivo* and VEGF-induced angiogenesis through inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR2[J]. *Life Sci*, 2008, 82(17/18):956.

[12] Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2009, 20(4):158.

[13] 顾宇,陆枫林. VEGF促进肝癌SMMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(32):3292.

[14] Lee H C, Kim M, Wands J R. Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Biosci*, 2006, 11:1901.

[15] Zhang X, Gaspard J P, Chung D C. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16):605.

[16] Easwaran V, Lee S H, Inge L, et al. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12):3145.

[17] Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2010, 107(8):943.

[18] Cheng A S, Chan H L, To K F, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(4):853.

[责任编辑 聂淑琴]