

# 淫羊藿苷对食管癌细胞 EC9706 增殖与凋亡的影响

纪昕<sup>1</sup>, 李伟皓<sup>1</sup>, 王崇<sup>1</sup>, 岳晓乐<sup>1</sup>, 赵丹丹<sup>1</sup>, 张艳华<sup>2</sup>, 李永军<sup>1\*</sup>

(1. 河北医科大学第二医院, 石家庄 050000; 2. 河北省辛集市第一医院, 河北 辛集 052300)

**[摘要]** 目的:探讨淫羊藿苷(icariin, ICA)对食管癌细胞 EC9706 增殖的影响,明确其作用机制。方法:ICA(40, 160, 640 nmol·L<sup>-1</sup>)作用 EC9706 细胞 48 h 后,应用 CCK8 法检测 EC9706 细胞增殖;应用 Hoechst33342 染色和荧光显微镜检测细胞凋亡;应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) mRNA 表达;应用免疫印迹法检测 Bax, Bcl-2 的蛋白表达。结果:ICA 能显著抑制 EC9706 细胞增殖;ICA 作用 EC9706 细胞出现细胞凋亡形态学改变;免疫印迹结果显示 Bax 蛋白表达减少,而 Bcl-2 蛋白表达增多。结论:ICA 能显著抑制人食管癌 EC9706 细胞增殖,其凋亡作用机制可能与上调 Bax 蛋白,下调 Bcl-2 蛋白的表达相关。

**[关键词]** 淫羊藿苷; 食管癌; EC9706 细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0143-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030143

## Effect of Icariin on Proliferation and Apoptosis of Esophageal Cancer Cells EC9706

Ji Xin<sup>1</sup>, Li Wei-hao<sup>1</sup>, Wang Chong<sup>1</sup>, Yue Xiao-le<sup>1</sup>, Zhao Dan-dan<sup>1</sup>, Zhang Yan-hua<sup>2</sup>, Li Yong-jun<sup>1\*</sup>

(1. The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhang, 050000, China;

2. Xinji First Hospital, Xinji 052300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of icariin (ICA) on the proliferation of esophageal cancer cells EC9706 and identify its mechanism of action. **Method:** EC9706 cells were stimulated by different concentrations of ICA for 48 h, then CCK8 assay was performed to detect the proliferation of EC9706 cells; Hoechst33342 staining and fluorescence microscope were used to detect cells apoptosis; reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect B-cell lymphoma/leukemia2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated xprotein (Bax) mRNA expression, Western blot was used to detect Bax and Bcl-2 protein expression. **Result:** ICA could significantly inhibit proliferation of EC9706 cells. Cell apoptosis morphological changes were found in EC9706 cells after ICA treatment. Western blot results showed Bax protein expression was decreased, while Bcl-2 protein expression was increased. **Conclusion:** ICA could significantly inhibit the proliferation of human esophageal cancer EC9706 cells, and the mechanism of apoptosis may be associated with up-regulating the expression of Bax protein and down-regulating the expression of Bcl-2 protein.

**[Key words]** icariin; esophageal cancer; EC9706 cells

食管癌(ES)是发生在食管上皮组织较常见的消化道恶性肿瘤,是全球范围内临床常见恶性肿瘤之一,流行病学研究报告显示食管癌发病率在全球恶性肿瘤中居第 5 位,在消化道恶性肿瘤中居第 3

位,肿瘤死亡率居第 4 位,而且其发病率及死亡率均呈上升趋势,严重危害人类生命健康<sup>[1-2]</sup>。我国是食管癌大国,死亡人数超过全世界食管癌总死亡人数的 50%<sup>[3-4]</sup>。食管癌发病隐匿,发展迅速,而且一

**[收稿日期]** 20150824(006)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局科研计划项目(2015124)

**[第一作者]** 纪昕,硕士,主管检验师,从事临床生物化学和免疫学检验研究, Tel:13582127790, E-mail:lwlx426@163.com

**[通讯作者]** \*李永军,主任技师,硕士生导师,从事临床免疫学检验研究, Tel:15803210789, E-mail:lyjj221@sina.com

经发现往往处于中晚期。目前以手术切除,放化疗,靶向治疗为主的多学科治疗方式证实能相对延长食管癌长期存活率<sup>[5-6]</sup>。尽管肿瘤治疗模式明显转变,但仍然存在预后差等诸多问题。药物治疗仍是目前治疗晚期食管癌的重要手段之一,但因化疗药物有较大的毒副作用致使部分患者难以耐受,总的疗效并不令人满意<sup>[7]</sup>,因此积极寻找高效、低毒、诱导分化的抗癌药物仍是当前亟需解决的问题和肿瘤治疗的研究热点。近年来发现,中草药在抗肿瘤治疗中可发挥显著作用,被认为是开发抗肿瘤新药的宝藏<sup>[8-9]</sup>。

淫羊藿又名仙灵脾,三枝九叶草,始载于《神农本草经》,为补益类中药。近年来研究表明,淫羊藿的主要活性成分为淫羊藿苷(ICA),其有免疫调节活性,具有良好的抗肿瘤作用,并能显著改善化疗引起的免疫抑制作用<sup>[10-11]</sup>。淫羊藿苷被广泛应用到抗肿瘤治疗方面研究中,目前关于淫羊藿苷对食管癌作用鲜有报道,本研究旨在初步探讨淫羊藿苷对人食管鳞癌 EC9706 细胞株的生长增殖影响及其机制,探索将淫羊藿苷作为食管癌治疗药物的可能性。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人食管癌细胞株 EC9706,购自上海研域生物工程有限公司。

**1.2 试剂** 淫羊藿苷(美国 Sigma 公司,批号 2012ET01), RPMI1640(美国 Gibco 公司,批号 20131112), 四甲基偶氮唑啉蓝(CCK8,美国 Sigma 公司,批号 1502P229), B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关蛋白(Bax)抗体(北京奥博森生物有限公司,批号 XW101502), RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号 AXF39386), 顺铂(DDP,齐鲁制药有限公司,批号 1104015)。

**1.3 仪器** IX71 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司), MCO-20AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本三洋公司), TE2000 型置荧光显微镜(日本尼康公司), Light Cycler 480 II 型 PCR 仪(瑞士罗氏公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** EC9706 细胞置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,隔天用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液换液 1 次。

**2.2 CCK8 测定细胞抑制率** 将处于对数生长期的 EC9706 细胞,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后,更换无血清 RPMI1640 培养液;24 h 后向各孔中加入梯度稀释终浓度分别为 40,160,640 nmol·L<sup>-1</sup> 的 ICA;设置空白组(仅加

入 RPMI1640 培养液),顺铂(DDP,终质量浓度 10 mg·L<sup>-1</sup>)组。后每孔加入 20 μL CCK8,37 °C 孵育 1 h 后终止培养。490 nm 处测定各孔吸光度 A,计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} \% = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

**2.3 Hoechst33342 染色** 取对数生长期 EC9706 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 1 mL,不同浓度 ICA(40,160,640 nmol·L<sup>-1</sup>)组,空白组(仅加入 RPMI1640 培养液),顺铂(DDP,终质量浓度 10 mg·L<sup>-1</sup>)组作用 48 h 后,将 1/10 细胞培养基体积的 Hoechst33342 染料加入细胞培养物,37 °C 培养 10 ~ 20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞后荧光显微镜观察细胞。

**2.4 细胞线粒体膜电位变化测定** 取对数生长期 EC9706 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 1 mL,不同浓度 ICA(40,160,640 nmol·L<sup>-1</sup>)组,空白组(仅加入 RPMI1640 培养液),顺铂(DDP,终质量浓度 10 mg·L<sup>-1</sup>)组作用 48 h 后,收集细胞,加入 500 μL 阳离子脂质染料(JC-1)工作液,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 15 ~ 20 min 后收集细胞,加入 500 μL 孵化缓冲液重新悬浮细胞后荧光显微镜观察线粒体膜电位变化。

**2.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Bcl-2, Bax mRNA** 取对数生长期 EC9706 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 1 mL,不同浓度 ICA(40,160,640 nmol·L<sup>-1</sup>)组,空白组(仅加入 RPMI1640 培养液),顺铂(DDP,终质量浓度 10 mg·L<sup>-1</sup>)组作用 48 h 后收获细胞,提取细胞总 RNA,合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR。引物序列: Bcl-2 上游 5'-AACTCGAGTGACAAGCCCGATG-3', 下游为 5'-GTACCACCAGTTGTTGTCTTTGA-3'; Bax 上游 5'-GTGTGTGGAGAGCGTCAACC-3', 下游 5'-AAAAGCCACCCCACTTCTCT-3'; 内参 β-actin 上游 5'-CCTAGAAGCATTTCGCGTGG-3', 下游 5'-GAGCTACGAGCTGCTGCCTGACG-3'。反应体系:模板 cDNA 1 μL,上游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL,下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL,10 × Buffer 缓冲液 2.5 μL,2.5 mmol·L<sup>-1</sup> 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP) 2 μL,0.5 U·μL<sup>-1</sup> Ex-Taq 酶 0.5 μL,补水到 25 μL。反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,50 °C 40 s;72 °C 45 s,30 个循环;72 °C 10 min。产物经琼脂糖凝胶电泳,多功能凝胶系统成像分析结果。

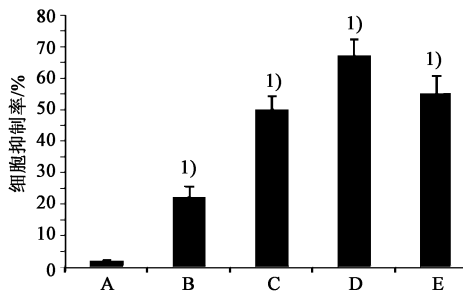
**2.6 免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2, Bax 相对蛋白表达** 取对数生长期 EC9706 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 1 mL,不同浓度 ICA(40,160,640 nmol·L<sup>-1</sup>)组,空白(仅加入 RPMI1640 培养液)组,

顺铂(DDP,终质量浓度  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )组作用 48 h 后收获细胞,细胞裂解液和蛋白酶抑制剂作用后收集总蛋白,电泳进行蛋白分离后将其转移至 PVDF 膜,加入一抗(Bax, Bcl-2,  $\beta$ -actin) (1:200) 过夜孵育后加入二抗室温孵育,曝光显影。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析。组间比较采用 *t* 检验,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 CCK8 法测定 ICA 对食管癌细胞 EC9706 生长的影响** 不同浓度 ICA 对食管癌细胞 EC9706 的增殖均有抑制作用,最大抑制率达 67.4%,与空白组相比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且随着给药浓度增加,其抑制作用也愈明显。见图 1。



A. RPMI1640 组; B. ICA  $40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; C. ICA  $160 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; D. ICA  $640 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; E. DDP 组(图 2 ~ 3 同)。与 A 组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 1 ICA 对食管癌 EC9706 细胞抑制率的影响

Fig.1 Effect of ICA on inhibitory rate of EC9706 cells

**3.2 ICA 对 EC9706 细胞的影响** 与空白组相比较,ICA 作用 EC9706 细胞后,各实验组染色质染色加深,颜色明亮,这表明 ICA 可以导致细胞染色质损伤,从而引起细胞凋亡,随着 ICA 剂量的增加,EC9706 细胞凋亡随之严重。见图 2。

**3.3 ICA 对 EC9706 细胞线粒体膜电位变化的影响** 与空白组相比,经 ICA 作用后部分细胞有绿色荧光(凋亡细胞)出现,证实细胞处于凋亡阶段。ICA 对 EC9706 细胞有明显促凋亡作用,且随着 ICA 剂量的加大,EC9706 细胞凋亡程度也随之加重。见图 3。

**3.4 ICA 对 EC9706 细胞凋亡相关因子 Bax, Bcl-2 mRNA 的影响** ICA 作用 EC9706 细胞后, Bcl-2 mRNA 含量降低, Bax mRNA 含量升高,不同浓度 ICA 用药组与空白组比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 4,表 1。

**3.5 ICA 对 EC9706 细胞凋亡相关因子 Bax, Bcl-2**

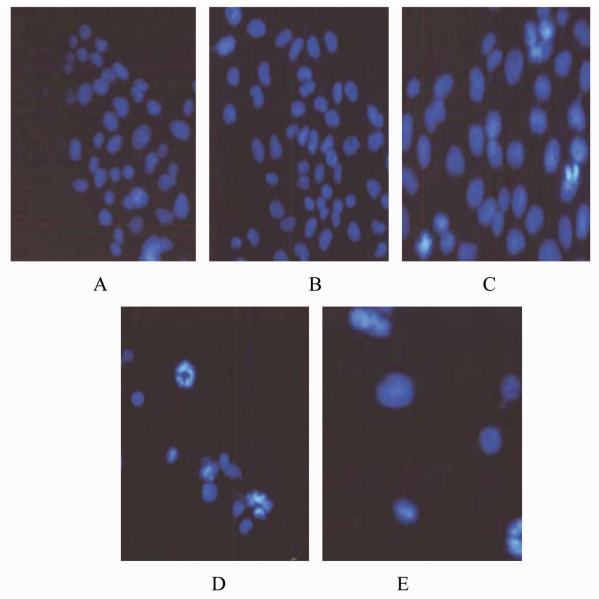


图 2 ICA 对 EC9706 细胞的影响 (Hoechst33342,  $\times 400$ )

Fig.2 Effect of ICA on EC9706 cells (Hoechst33342,  $\times 400$ )

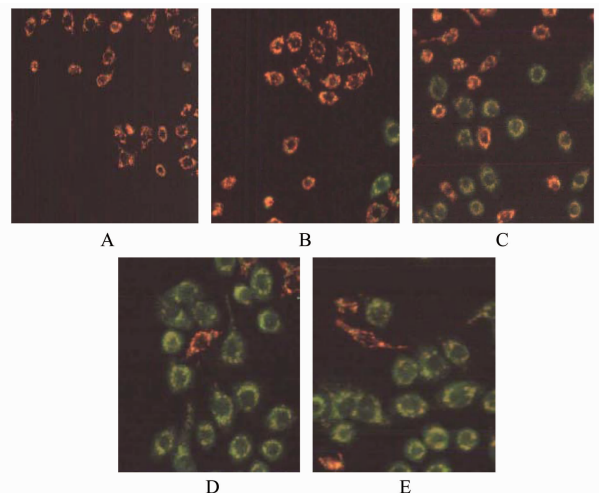
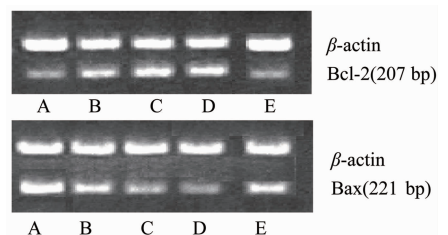


图 3 ICA 对 EC9706 细胞线粒体膜电位变化的影响(阳离子脂质染料,  $\times 400$ )

Fig.3 Effect of ICA on mitochondria membrane potential changes in EC9706 cells(JC-1,  $\times 400$ )



A. ICA  $640 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; B. ICA  $160 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; C. ICA  $40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; D. RPMI1640 组; E. DDP 组(图 3 ~ 5 同)

图 4 ICA 对 EC9706 细胞 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响

Fig.4 Effect of ICA on Bcl-2 and Bax mRNA of EC9706 cells

蛋白表达的影响 ICA 作用 EC9706 细胞, Bcl-2 蛋

表 1 ICA 对 EC9706 细胞 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Table 1 Effect of Bcl-2 and Bax mRNA expressions in EC9706 cells after treatment by ICA ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin
空白	-	0.332 $\pm$ 0.018	0.798 $\pm$ 0.032
ICA	40 nmol·L <sup>-1</sup>	0.421 $\pm$ 0.009 <sup>1)</sup>	0.570 $\pm$ 0.021 <sup>1)</sup>
	160 nmol·L <sup>-1</sup>	0.523 $\pm$ 0.012 <sup>1)</sup>	0.512 $\pm$ 0.017 <sup>1)</sup>
	640 nmol·L <sup>-1</sup>	0.660 $\pm$ 0.034 <sup>1)</sup>	0.493 $\pm$ 0.011 <sup>1)</sup>
DDP	10 mg·L <sup>-1</sup>	0.548 $\pm$ 0.024 <sup>1)</sup>	0.509 $\pm$ 0.009 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

白表达水平降低, Bax 蛋白表达水平升高, 不同浓度 ICA 用药组与空白组比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 5, 表 2。

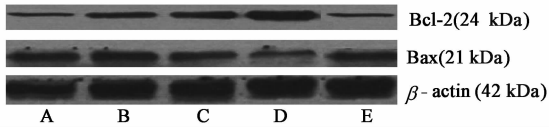


图 5 ICA 对 EC9706 细胞 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of ICA on Bcl-2 and Bax protein expression in EC9706 cells

表 2 ICA 对 EC9706 细胞 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of ICA on Bcl-2 and Bax protein expression in EC9706 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin
空白	-	0.21 $\pm$ 0.005	0.46 $\pm$ 0.007
ICA	40 nmol·L <sup>-1</sup>	0.37 $\pm$ 0.008 <sup>1)</sup>	0.27 $\pm$ 0.002 <sup>1)</sup>
	160 nmol·L <sup>-1</sup>	0.42 $\pm$ 0.002 <sup>1)</sup>	0.16 $\pm$ 0.004 <sup>1)</sup>
	640 nmol·L <sup>-1</sup>	0.46 $\pm$ 0.004 <sup>1)</sup>	0.09 $\pm$ 0.002 <sup>1)</sup>
DDP	10 mg·L <sup>-1</sup>	0.44 $\pm$ 0.005 <sup>1)</sup>	0.11 $\pm$ 0.003 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

我国是世界上食管癌发病率和病死率较高的国家, 其发病率仅次于胃癌。研究表明食管癌病变过程是一个多因素作用, 多基因参与, 多阶段发展的疾病, 除了与环境因素有关之外, 还涉及多种癌基因和抑癌基因的异常<sup>[12-14]</sup>。食管癌一直被认为是一种预后较差的肿瘤, 近年来, 随着肿瘤免疫基础研究的发展, 一些诱导肿瘤细胞凋亡的新药陆续问世并应用于治疗食管癌, 其中也包括了中草药的研发。中草药较西药的抗癌作用优势明显, 其本身多为植物提取物, 不良反应较小, ICA 是一种具有很大应用前景的抗癌药物。ICA 抗肿瘤的主要机制是抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞分化和凋亡, 降低肿瘤细胞转移侵袭能力, 增强抗癌效应细胞活性, 抑制端粒酶

活性等, 具有多靶点, 多环节的特点。段文飞等<sup>[15]</sup>实验结果表明, 低、中、高浓度组 ICA 均对胃癌细胞有抑制作用, 朱燕辉等<sup>[16]</sup>用不同浓度的 ICA 处理肝癌细胞株后, 各组细胞的增殖抑制率均受到不同程度的抑制。而 ICA 对于食管癌细胞的作用鲜有报道。

本实验结果表明, 不同浓度 ICA 对食管癌细胞 EC9706 的增殖均有抑制作用, 且随着给药浓度增加, 其抑制作用也愈明显。Hoechst 33342 染色常用于细胞凋亡检测, 受到损伤的染色质在染色过程中会有不同程度的染色加深, 明亮现象的出现, 进而导致细胞凋亡现象产生。另一方面, 作为参与细胞凋亡的重要细胞器—线粒体在细胞发生凋亡时, 线粒体跨膜电位降低导致 JC-1 从线粒体内释放, 其多聚体(红色荧光)以单体的形式存在于胞质内(绿色荧光), 反之, 当线粒体膜电位升高时则形成聚集体, 呈红橙色的荧光<sup>[17-18]</sup>。线粒体膜电位的改变是细胞凋亡发生的一个极早期表现<sup>[19-20]</sup>, 经 ICA 处理后的细胞, 从红色荧光到绿色荧光的变化说明膜电位下降, 证实该细胞处于凋亡早期。

近几年分子生物学研究发现, 食管癌的发生和一系列凋亡调节因子的异常表达密切相关, 如 P53, myc, Bcl-2 家族等<sup>[21]</sup>。为了进一步明确 ICA 作用食管癌细胞 EC9706 引起细胞凋亡的机制, 本研究检测与细胞凋亡相关的 Bax 和 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达。实验结果表明, ICA 作用 EC9706 细胞后, 不同浓度 ICA 用药组与空白组 Bax, Bcl-2 mRNA 表达有差别, 淫羊藿苷可降低食管癌肿瘤细胞内 Bcl-2 蛋白表达水平, 升高 Bax 蛋白表达水平。线粒体不仅参与细胞凋亡, 而且是细胞凋亡的调控中心。Bcl-2 家族蛋白在线粒体介导的细胞凋亡中发挥重要作用, 是细胞凋亡信号转导途径中关键的凋亡调节因子。Bcl-2, Bax 蛋白均属于 Bcl-2 家族蛋白成员。Bcl-2 属抗凋亡蛋白, 位于线粒体外膜, 在外膜上发挥抗凋亡作用, 维持膜的完整性。Bax 属促凋亡蛋白, 一般出现在胞浆中, 当细胞出现凋亡信号后, Bax 则重新定位于线粒体表面, 通过破坏线粒体膜的完整性启动凋亡程序。通常来说, Bcl-2 家族蛋白会通过自身独立改变膜的通透性或诱导线粒体通透性转变孔道开放等机制, 操控线粒体膜间隙蛋白的释放, 进而引起细胞凋亡。Bax/Bcl-2 是细胞凋亡的发生凋亡的关键因素。本实验结果表明, ICA 作用于 EC9706 细胞, Bax/Bcl-2 升高, 提示 Bax 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平下降, 可能是淫羊

藿苈促进食管癌细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用的重要机制之一。

虽然本实验证实 ICA 对人食管癌 EC9706 细胞具有明显的抑制增殖,促进细胞凋亡作用,但 ICA 作为单一抗肿瘤用药依然有其自身局限性,且 ICA 给药剂量偏大;另外体内的微环境与体外实验的效果并不能完全一致。随着研究的不断深入,并与其他治疗方法相结合联合用药,有可能进一步提高其抗肿瘤效果。

[参考文献]

[1] Bray F, Jemal A, Grey N, et al. Global cancer transition according to human development index (2008-2030): a population-based study [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(8):790-801.

[2] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.

[3] Enzinger P C, Mayer R J. Esophageal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(23):2241-2252.

[4] Thallinger C M, Kiesewetter B, Raderer M, et al. Pre- and postoperative treatment modalities for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(11):4607-4627.

[5] Lordick F, Hölscher A H, Haustermans K, et al. Multimodal treatment of esophageal cancer [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2013, 398(2):177-187.

[6] 邱子丹,李建成.食管癌靶向治疗研究进展[J].*实用肿瘤学杂志*, 2015, 29(1):57-60.

[7] 程欣,陈思禹,刘福国,等.食管癌化疗进展[J].*癌症进展*, 2013, 11(5):425-430.

[8] Liu G X, Wang T T, Hu W J, et al. Anticancer effect of ethanol extract of *Fructus Forsythiae* on primary cancer cells isolated from ascites and pleural fluids [J]. *Practical Geriatrics*, 2009, 29(23):359-363.

[9] 王彩莲,殷海涛,刘宝瑞.连翘三萜类化合物对前列腺癌 PC-3 细胞增殖抑制及放疗敏感性的实验研究 [J]. *山东医药*, 2011, 51(45):25-27.

[10] Wang Z, Ding L, Zhang S, et al. Effects of icariin on the

regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1 $\beta$ -stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6):1720-1726.

[11] 赵连梅,纪昕,潘晓明,等.淫羊藿苷(ICA)对化疗后免疫抑制小鼠的免疫促进作用[J].*中国免疫学杂志*, 2009, 25(12):1092-1095, 1099.

[12] Cooper S L, Russo J K, Chin S. Definitive chemoradiotherapy for esophageal carcinoma [J]. *Surg Clin North Am*, 2012, 92(5):1213-1248.

[13] D Journo X B, Thomas P A. Current management of esophageal cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2014, 2:S253-264.

[14] Denlinger C E, Thompson R K. Molecular basis of esophageal cancer development and progression [J]. *Surg Clin North Am*, 2012, 92(5):1089-1103.

[15] 段文飞,苏继荣,付小梅.淫羊藿苷对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的影响 [J]. *中国医药指南*, 2009, 7(24):17-19.

[16] 朱燕辉,黄丽霞,石崇军.淫羊藿苷对肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖与凋亡的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(8):968-972.

[17] Perelman A, Wachtel C, Cohen M, et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(21):e430.

[18] Robles V, Martinez-Pastor F. Flow cytometric methods for sperm assessment [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 927:175-186.

[19] Enomoto K, Sho M, Wakatsuki K, et al. Prognostic importance of tumour-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 168(2):186-191.

[20] Pennathur A, Gibson M K, Jobe B A, et al. Oesophageal carcinoma [J]. *Lancet*, 2013, 381(9864):400-4012.

[21] Sikkema M, Looman C W, Steyerberg E W, et al. Predictors for neoplastic progression in patients with Barrett's Esophagus: a prospective cohort study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(7):1231-1238.

[责任编辑 张丰丰]