

· 药理 ·

## 鳖甲煎丸对 HepG2 裸鼠移植瘤 Wnt 信号通路 相关分子及靶基因的影响

孙海涛<sup>1</sup>, 贺松其<sup>1\*</sup>, 文彬<sup>2</sup>, 樊尔艳<sup>1</sup>, 陈冠新<sup>1</sup>, 孙嘉玲<sup>1</sup>, 安海燕<sup>1</sup>, 庞杰<sup>1</sup>

(1. 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515; 2. 中国人民解放军第四五八医院, 广州 510602)

**[摘要]** 目的: 通过研究鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路相关信号分子及靶基因表达的影响, 探讨鳖甲煎丸抗肝细胞癌的分子机制。方法: 建立裸鼠移植瘤肝癌模型, 随机分为鳖甲煎丸高、中、低剂量(2.2, 1.1, 0.55 g·kg<sup>-1</sup>)组, 模型组, 正常组, 肉眼观察鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤生长的抑制作用, 免疫组化检测移植瘤组织中  $\beta$ -catenin 和 T-框蛋白 3(TBX3)的表达水平, 免疫印迹法(Western blot)检测其移植瘤组织中 p19<sup>ARF</sup>, 双微基因 2(MDM2), p53 的表达水平。结果: 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤生长具有明显的抑制作用, 鳖甲煎丸能够抑制其移植瘤组织中  $\beta$ -catenin 和 TBX3 的表达, 和模型组比较, 鳖甲煎丸高、中剂量组中  $\beta$ -catenin 和 TBX3 表达均明显降低( $P < 0.05$ )。同时, 鳖甲煎丸能够促进人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织 p19<sup>ARF</sup> 和 p53 表达, 并抑制 MDM2 表达, 鳖甲煎丸高、中剂量组 p19<sup>ARF</sup>, p53, MDM2 表达较模型组均有明显差异( $P < 0.05$ )。结论: 鳖甲煎丸能通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 调控  $\beta$ -catenin 和 TBX3 的表达, 继而通过调控 TBX3/p19<sup>ARF</sup>/MDM2 通路激活抑癌基因 p53, 最终抑制肝癌细胞的增殖并诱导其出现凋亡, 从而达到抗肝细胞癌的目的。

**[关键词]** 鳖甲煎丸; 裸鼠移植瘤;  $\beta$ -连环蛋白; T-框蛋白 3; p19<sup>ARF</sup>; 双微基因 2; p53

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0081-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130081

### Effects of Biejiajian Wan on Wnt Signal Pathway Molecules and Target Genes in HepG2 Cell Xenograft in Nude Mice

SUN Hai-tao<sup>1</sup>, HE Song-qi<sup>1\*</sup>, WEN Bin<sup>2</sup>, FAN Er-yan<sup>1</sup>, CHENG Guan-xin<sup>1</sup>,  
SUN Jia-ling<sup>1</sup>, AN Hai-yan<sup>1</sup>, PANG Jie<sup>1</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;  
2. 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the molecular mechanism of Biejiajian Wan in inhibiting hepatocellular carcinoma by studying its effect on the signaling molecules of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and the expression of target genes on HepG2 cell xenograft in nude mice. **Method:** The hepatocellular carcinoma mode was established by tumor formation experiment in nude mice, and the mice were randomly divided into the high dose group (2.2 g·kg<sup>-1</sup>), the middle dose group (1.1 g·kg<sup>-1</sup>), the low dose group (0.55 g·kg<sup>-1</sup>), the positive control group, and the normal control group. According to the visual observation, Biejiajian Wan had an inhibitory effect on the growth of implanted tumors of HepG2 cell xenograft in nude mice. Expressions of  $\beta$ -catenin and T-box 3 (TBX3) of HepG2 cell xenograft were measured by the immunohistochemical method. Expressions of

**[收稿日期]** 20151126(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072934)

**[第一作者]** 孙海涛, 在读博士, 从事肝病证的临床与实验研究, Tel: 15521107501, E-mail: haitao6230@163.com

**[通讯作者]** \*贺松其, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事肝病证的临床与实验研究, Tel: 020-61648247, E-mail: hesongqijz@126.com

p19<sup>ARF</sup>, murine double minute 2 (MDM2) and p53 in HepG2 cell xenograft were tested by Western blot. **Result:** Biejiajian Wan can significantly inhibit the growth of the implanted tumor of HepG2 cell xenograft in nude mice, and the expressions of  $\beta$ -catenin and TBX3 ( $P < 0.05$ ), as well as the expression of the p19<sup>ARF</sup>, p53 and MDM2 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Biejiajian Wan can regulate the expression of  $\beta$ -catenin and TBX3 by affecting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and then activate the cancer suppressor gene p53 by regulating the TBX3/p19<sup>ARF</sup>/MDM2 signaling pathway. Finally, Biejiajian Wan can repress the growth of liver cancer cells and induce cell apoptosis, so as to resist hepatocellular carcinoma.

[**Key words**] Biejiajian Wan; xenograft;  $\beta$ -catenin; T-box 3; p19<sup>ARF</sup>; murine double minute 2; p53

原发性肝癌是原发于肝细胞或者肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤,具有发病率高、病情隐匿、预后凶险等临床特征,我国发病率位居恶性肿瘤第 3 位,每年肝癌死亡人数达 20 万以上,死亡率居第 2 位<sup>[1]</sup>。研究发现,肝癌的发生发展与肝癌细胞无限制增殖与凋亡减少密切相关。其中,肝癌细胞中信号转导通路扮演着重要角色。近些年来,肝癌的临床研究取得了很大进展,但肝癌侵袭、转移的分子机制目前尚不完全清楚。因此,探索肝癌细胞生长、侵袭转移机制,并寻找经济有效的治疗方法及药物具有重要意义。鳖甲煎丸源于医圣张仲景的《金匮要略》,原用于治疗癥瘕、疟母等病证,是张仲景所创制方药最多用的方剂之一。鳖甲煎丸组方严谨,配伍得当,具有软坚散结、益气养血、行气化痰等多方面疗效。目前该方广泛应用于肝纤维化、肝硬化及肝癌等疾病的治疗<sup>[2]</sup>。前期研究表明鳖甲煎丸能通过调控 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)通路影响肝癌细胞的侵袭、黏附和转移<sup>[3-5]</sup>。为进一步探讨鳖甲煎丸体内抗肝细胞癌的作用机制,本课题通过研究鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关信号分子及靶基因表达的影响,探讨其抗肝细胞癌的分子机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料及试剂** 6 周龄雌性 BALBc-nu 裸小鼠,体重(16 ± 2)g,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2006-0015;人肝癌细胞系 HepG2 由南方医科大学药学院抗病毒中心提供。鳖甲煎丸(武汉中联药业集团股份有限公司,国药准字 Z42020772,3 g/丸),高糖型 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 681841); $\beta$ -catenin,T-框蛋白 3(TBX3),p19<sup>ARF</sup>,双微基因 2(MDM2)和 p53(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab16051, ab99302, ab26696, ab38618, ab31333);即用型免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 SA1029);BCA 法蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Scientific

公司,批号 23225),ECL 发光液(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-2048)。Eclipse Ni-U 型显微镜(日本 Nikon 公司),forma series 2 water jacketed CO<sub>2</sub> incubator 型恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养孵箱(美国 Thermo fisher Scientific 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 建立移植性裸鼠肝癌模型** BALBc-nu 裸鼠随机分为鳖甲煎丸高、中、低剂量(2.2, 1.1, 0.55 g·kg<sup>-1</sup>)组,模型组和正常组,每组 8 只。取对数生长期 HepG2 细胞,胰酶适度消化,800 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min 去上清,调整细胞密度为 5 × 10<sup>7</sup> 个/mL。鳖甲煎丸高、中、低剂量(2.2, 1.1, 0.55 g·kg<sup>-1</sup>)组和模型组裸鼠于腋窝处皮下注射细胞悬液,每只 0.2 mL,正常组不做处理。3 d 后鳖甲煎丸高、中、低剂量组分别按 2.2, 1.1, 0.55 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig 给药,ig 剂量参照文献[6];模型组 ig 等量生理盐水,连续给药 4 周,于第 4 周末给药后麻醉小鼠。切取皮下结节,取 0.5 cm × 0.5 cm 组织块,1 份置于 4% 中性甲醛固定 24 h,石蜡包埋,切片,备用。1 份 -80 °C 冻存备用。

**1.2.2 免疫组化检测移植瘤组织  $\beta$ -catenin 和 TBX3 蛋白表达** 石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,0.5% Triton X-100 孵育 20 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 15 min,封闭 20 min,一抗(1:200)4 °C 孵育过夜,二抗 37 °C 孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,中性树脂胶封片,光镜下分析结果,拍照。连续观察 5 个视野,以棕黄色颗粒为阳性表达。免疫反应阳性细胞数/总细胞数 < 25% 为 -, 25% ~ 50% 为 +, 51% ~ 75% 为 ++, > 75% 为 +++, 免疫反应阳性细胞数 ≥ 25% 作为组织阳性诊断标准。

**1.2.3 免疫印迹法(Western blot)检测移植瘤组织中 p19<sup>ARF</sup>,MDM2 和 p53 蛋白表达** 取冻存组织,裂解液裂解。测定蛋白浓度,上样,电泳,转膜,封闭,一抗( $\beta$ -actin,P19<sup>ARF</sup>,MDM2,p53 抗体浓度均为 1:800)4 °C 孵育过夜,洗膜,二抗(1:4 000)室温孵育 2 h,洗

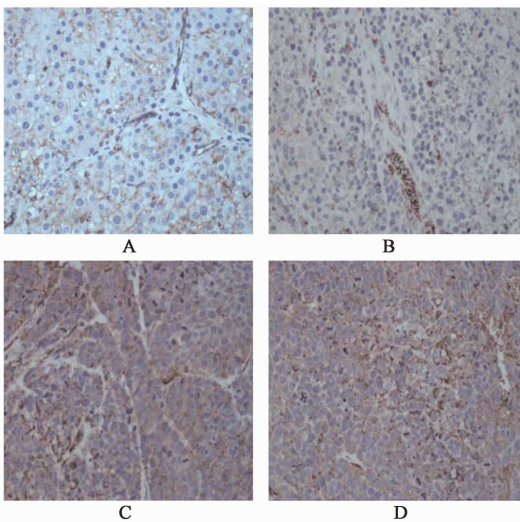
膜,发光,显影,定影。Bio-Rad 凝胶成像系统获取图像。以目的条带/ $\beta$ -actin 条带代表蛋白相对表达水平。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤成瘤情况** 皮下接种细胞 3 d 后,接种部位可见裸鼠接种点皮下出现单个白色小节,1 周后逐渐转为实性结节并增大,2 周左右瘤体直径约 7 mm,成瘤率达 100%,表明人肝癌 HepG2 裸鼠成瘤实验造模成功。和模型组比较,鳖甲煎丸组瘤体生长速度较慢。至 30 d 处死裸鼠时,鳖甲煎丸组瘤体体积小于模型组。实验过程中无裸鼠死亡,解剖得到皮下结节经病理检测证实为癌结节。

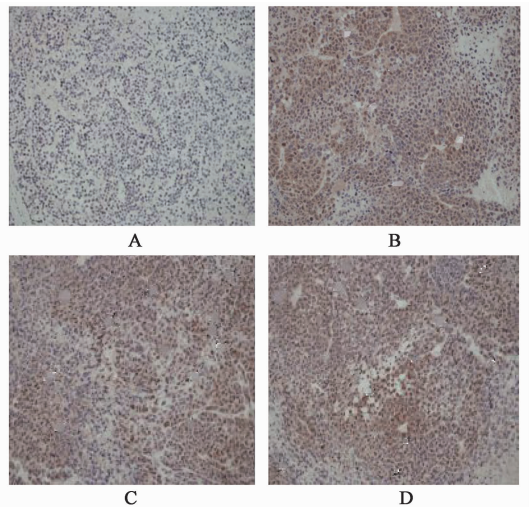
**2.2 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤中  $\beta$ -catenin, TBX3 蛋白表达的影响** 与模型组比较,鳖甲煎丸高、中、低剂量组  $\beta$ -catenin, TBX3 蛋白表达均有减少趋势。鳖甲煎丸高、中剂量组  $\beta$ -catenin, TBX3 蛋白表达较模型组明显减少 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 2, 表 1。



A~C. 鳖甲煎丸(2.2, 1.1, 0.55 g·kg<sup>-1</sup>)组; D. 模型组(图 2, 3 同)  
**图 1 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中  $\beta$ -catenin 蛋白表达的影响**(免疫组化,  $\times 400$ )

**Fig. 1 Effect of Biejiajian Wan on  $\beta$ -catenin expression in xenografts of nude mice(IHC,  $\times 400$ )**

**2.3 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤中相关蛋白表达的影响** 与模型组比较,鳖甲煎丸高、中剂量组 p19<sup>ARF</sup> 和 p53 蛋白表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), MDM2 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3, 表 2。



**图 2 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中 TBX3 蛋白表达的影响**(免疫组化,  $\times 400$ )

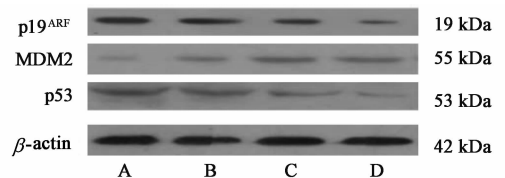
**Fig. 2 Effect of Biejiajian Wan on TBX3 expression in xenografts of nude mice(IHC,  $\times 400$ )**

**表 1 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中  $\beta$ -catenin, TBX3 蛋白表达的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**Table 1 Effect of Biejiajian Wan on expressions of  $\beta$ -catenin and TBX3 in xenografts of different groups**( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	$\beta$ -catenin	TBX3
鳖甲煎丸	2.2	21.32 $\pm$ 4.49 <sup>1)</sup>	3.62 $\pm$ 2.13 <sup>1)</sup>
	1.1	26.84 $\pm$ 7.92 <sup>1)</sup>	7.92 $\pm$ 1.89 <sup>1)</sup>
	0.55	43.31 $\pm$ 3.83	16.35 $\pm$ 5.82
模型	-	67.73 $\pm$ 5.82	18.49 $\pm$ 4.93

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ (表 2 同)。



**图 3 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中 p19<sup>ARF</sup>, MDM2, p53 蛋白表达的影响**

**Fig. 3 Effect of Biejiajian Wan on expressions of p19<sup>ARF</sup>, MDM2 and p53 in xenografts of different groups**

**表 2 鳖甲煎丸对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中 p19<sup>ARF</sup>, MDM2, p53 蛋白表达的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**Table 2 Effect of Biejiajian Wan on expressions of p19<sup>ARF</sup>, MDM2, and p53 in xenografts of different groups**( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p19 <sup>ARF</sup> / $\beta$ -actin	MDM2/ $\beta$ -actin	p53/ $\beta$ -actin
鳖甲煎丸	2.2	0.935 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	0.503 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.777 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>
	1.1	0.910 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.596 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.749 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
	0.55	0.821 $\pm$ 0.09	0.604 $\pm$ 0.02	0.636 $\pm$ 0.01
模型	-	0.677 $\pm$ 0.03	0.636 $\pm$ 0.02	0.561 $\pm$ 0.09

### 3 讨论

根据肝细胞癌症状和体征,中医多将其归为积聚、癥瘕等范畴。肝癌是多种致病因素协同作用的结果,中医认为与正气亏虚密切相关,目前针对肝癌有射频消融、肝动脉介入化疗栓塞、分子靶向药物治疗等多种治疗方法,但临床疗效均不十分理想。鳖甲煎丸共有 23 味药,药物组成复杂。鳖甲软坚散结,鳖甲提取物鳖甲多糖能显著抑制肿瘤的生长<sup>[7]</sup>。大黄、桃仁、厚朴、牡丹皮理气活血,化瘀而去干血。大黄提取物大黄素等有明显抗肿瘤作用,可诱导癌细胞凋亡,并对癌细胞代谢的多个环节有影响<sup>[8-9]</sup>。桃仁蛋白能够抑制肝癌细胞增殖,并具有抑制肿瘤浸润、侵袭和转移的作用<sup>[10]</sup>。柴胡、黄芩、白芍和少阳而使肝气条达,人参、阿胶补气养血而扶正气,能够抑制肿瘤细胞增殖,减少肿瘤细胞黏附,诱导其凋亡等<sup>[11-12]</sup>,并能够提高机体免疫力,从而达到抗肿瘤的目的<sup>[13-15]</sup>。纵观全方,鳖甲煎丸寒热并用,攻补兼施,具有活血化瘀、益气养血、解毒散结之功,在临床治疗肝癌中,具有疗效确切、副作用小等特点<sup>[16]</sup>,在治疗肝癌方面具有一定的优势。

近年来,随着对肝细胞癌发病机制研究的深入,细胞信号转导在肝细胞癌的发生、发展、侵袭转移中起到的重要作用,逐渐受到人们的重视。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在正常细胞中无激活。研究表明肝细胞癌的发生与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关基因突变及各信号分子蛋白表达水平改变有着密切关系<sup>[17]</sup>。 $\beta$ -catenin 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路重要的信号分子,在参与细胞间黏附,调控细胞生长、分化和凋亡等过程中,起到重要的作用<sup>[18-19]</sup>。当 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活后,其编码的 Wnt 蛋白作为细胞外的信号分子,可与细胞膜上特异性受体卷曲蛋白(FZ)结合,与低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)组成受体复合物(FZ/LRP),在 Wnt 共受体(LRP5/6)的协同作用下,与细胞表面的 FZ 受体结合激活细胞质内的 Dsh 蛋白,Dsh 蛋白能够使糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )发生磷酸化,从而使  $\beta$ -catenin 避免被 GSK-3 $\beta$  磷酸化而发生降解,使  $\beta$ -catenin 逐渐在细胞内堆积,当积累到一定程度,则向细胞核内转移<sup>[20]</sup>。在细胞核中  $\beta$ -catenin 与转录因子家族 Tcf/Lef5 结合,可激活 cyclinD1 和 c-myc 等原癌基因而促进细胞的增殖、分化、成熟。因此, $\beta$ -catenin 与肿瘤的发生,转移及侵袭密切相关<sup>[19,21]</sup>。本实验结果表明,鳖甲煎丸可以直接降低人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中  $\beta$ -catenin 的表达

水平,减少  $\beta$ -catenin 在其移植瘤细胞内的积聚。

TBX3 是近年来发现的 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路下游的新靶点,一方面 TBX3 可以通过 p19<sup>ARF</sup>/MDM2 途径影响 p53,从而阻断 p53 介导的细胞程序性死亡<sup>[22-23]</sup>;另一方面 TBX3 也可以直接作用于  $\beta$ -catenin,使 Wnt/ $\beta$ -catenin/TBX3 呈正反馈循环而持续激活<sup>[23]</sup>。另外,TBX3 还可负调节细胞膜表面的  $\beta$ -catenin 来抑制 E-钙黏蛋白的表达,引起肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[24]</sup>。因此,TBX3 被认为是 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中的一个关键因子。实验结果表明,鳖甲煎丸可抑制人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织中 TBX3 表达水平。表明鳖甲煎丸能通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来调控 TBX3 的表达,最终抑制肝癌细胞的侵袭转移,并促进其凋亡。

p19<sup>ARF</sup>/MDM2/p53 通路被过度增殖的细胞刺激时,其细胞凋亡的功能被激活,可引起癌基因的激活或者过度表达。如癌基因 myc 和 Ras 等可诱导 p19<sup>ARF</sup> 的表达,从而导致 p53 表达水平增加,进而促进细胞凋亡和(或)细胞增殖周期阻滞,可抑制肿瘤细胞的增殖及促进其凋亡<sup>[25]</sup>。研究表明,p19<sup>ARF</sup> 主要通过抑制 MDM2 的泛素化连接酶的活性,从而减弱 MDM2 介导的 p53 的降解<sup>[26]</sup>。另外,p19<sup>ARF</sup> 与 MDM2 结合使 MDM2 定位于细胞核,阻止了 MDM2 穿梭及其转运作用,使 p53 不受 MDM2 的抑制从而转录活化<sup>[27]</sup>。p19<sup>ARF</sup> 还可以与 MDM2 和 p53 形成 p19<sup>ARF</sup>-MDM2-p53 复合物,使 p53 不能被降解而发挥抑制肿瘤的作用。所以,p19<sup>ARF</sup> 可直接结合并抑制 MDM2 的活性,使其不能介导 p53 的降解,其表达升高是 p53 激活的原因之一。实验结果表明,鳖甲煎丸可促进人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤组织 P19<sup>ARF</sup> 和 p53 的表达,同时能够抑制 MDM2 的表达。结合 p53 的表达情况,表明鳖甲煎丸能通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路调控 TBX3 的表达,继而通过调控 TBX3/p19<sup>ARF</sup>/MDM2 通路激活抑癌基因 p53,最终抑制肝癌细胞的增殖并诱导其凋亡。

综上所述,鳖甲煎丸可以抑制肝癌细胞的生长,并促进肝癌细胞凋亡,从而达到抑制肝癌的作用。其机制可能与调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,影响 TBX3 的表达,继而通过 TBX3/p19<sup>ARF</sup>/MDM2 通路激活抑癌基因 p53 有关。本实验研究表明,鳖甲煎丸可通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来达到抗肝细胞癌的目的,但鳖甲煎丸抗肝细胞癌的作用机制尚未完全阐明,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 闫涛,苏俐.原发性肝癌的流行特征及其生存质量研究进展[J]. 内蒙古医学杂志,2013(6):702-705.
- [2] 罗庆东,姜德友.鳖甲煎丸的临床研究与进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2012(6):764-766.
- [3] 孙海涛,贺松其,文彬,等.鳖甲煎丸对肝癌细胞中Wnt信号分子 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及靶基因CD44v6、VEGF的影响[J]. 南方医科大学学报,2014,34(10):1454-1458.
- [4] 贺松其,程哓,朱云,等.鳖甲煎丸对肝细胞癌中Wnt/ $\beta$ -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):30-33.
- [5] 程哓,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):664-667.
- [6] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [7] 王慧铭,孙炜,黄素霞,等.鳖甲多糖抗肿瘤免疫调节作用及其机理的研究[J]. 浙江中医药大学学报,2006,30(4):347-349.
- [8] 范仁根,单湘湘,宋长志,等.大黄素在体外诱导人肝癌细胞smmc-7721凋亡的实验研究[J]. 河北医学,2008,14(11):1264-1270.
- [9] 林玩福,汪晨,凌昌全.大黄素抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(20):3937-3940.
- [10] 许惠玉,赵晨霞,王雅贤.桃仁总蛋白对荷瘤鼠T淋巴细胞亚群及细胞凋亡的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2004,25(5):485-487.
- [11] Chiang L C, Ng L T, Liu L T, et al. Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Bupleurum species* [J]. *Planta Med*, 2003, 69 (8): 705-709.
- [12] Ahn B Z, Yoon Y D, Lee Y H, et al. Inhibitory effect of bupleuri radix saponins on adhesion of some solid tumor cells and relation to hemolytic action; screening of 232 herbal drugs for anti-cell adhesion [J]. *Planta Med*, 1998, 64 (3): 220-224.
- [13] 侯华新,黎丹戎,秦箐,等. 黄芩黄酮A对人肝癌细胞7402的抑制能力及体外增效作用[J]. 中国临床药理学杂志,2000,9(3):166-168.
- [14] 姜浩,樊光华. 人参皂甙-Rh<sub>2</sub> 对人肝癌 Bel-7404 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2004,11(4):6-9.
- [15] 梁云,崔若兰. 柴胡皂甙及其同系物抗炎和免疫功能的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志,1998,18(7):446-448.
- [16] 曹阳. 鳖甲煎丸加减在原发性肝癌治疗中的应用[J]. 中国中医基础医学杂志,2000,6(7):30-31.
- [17] 沈艺南,卢军华. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路作为肝细胞癌的治疗靶点的新进展[J]. 肝胆胰外科杂志,2015,27(1):86-88.
- [18] Veeman M T, Axelrod J D, Moon R T. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling[J]. *Dev Cell*, 2003, 5 (3): 367-377.
- [19] Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48 (5/6): 477-487.
- [20] Heisenberg C P. Wnt signalling: refocusing on strabismus[J]. *Curr Biol*, 2002, 12 (19): R657-659.
- [21] Doucas H, Garcea G, Neal C P, et al. Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance[J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41 (3): 365-379.
- [22] Brummelkamp T R, Kortlever R M, Lingbeek M, et al. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19<sup>ARF</sup> and inhibits senescence [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (8): 6567-6572.
- [23] Lingbeek M E, Jacobs J J, van Lohuizen M. The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (29): 26120-26127.
- [24] Kowalski P J, Rubin M A, Kleer C G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases[J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5 (6): R217-R222.
- [25] Jacobs J J, Keblusek P, Robanus-Maandag E, et al. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a [p19 (ARF)] and is amplified in a subset of human breast cancers[J]. *Nat Genet*, 2000, 26 (3): 291-299.
- [26] den Besten W, Kuo M L, Tago K, et al. Ubiquitination of, and sumoylation by, the Arf tumor suppressor[J]. *Isr Med Assoc J*, 2006, 8 (4): 249-251.
- [27] Weber J D, Kuo M L, Bothner B, et al. Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (7): 2517-2528.

[责任编辑 张丰丰]