

# 灵巴菌质油对 A549 细胞成瘤能力及伪足形成的影响

燕珂, 杨光明, 孙钰, 潘扬\*

(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

**[摘要]** 目的:探讨灵巴菌质油对人肺癌细胞 A549 成瘤能力及伪足形成的效应。方法:灵巴菌质油 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 分别作用 A549 细胞 20 d 和 24 h, 通过软琼脂克隆形成法和 PI 单染法观察灵巴菌质油对 A549 细胞的成瘤能力和生长周期的影响;灵巴菌质油 100 mg·L<sup>-1</sup> 作用 A549 细胞 24 h, 通过免疫荧光染色法观察细胞骨架的影响。结果:灵巴菌质油能够抑制细胞克隆的形成, 低、中、高剂量组作用 A549 细胞 20 d 后的平均细胞克隆形成数与空白对照组比较均有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 抑制率与药物浓度呈正相关, 并将细胞的生长阻滞在 G<sub>2</sub> 期, 中、高剂量组 G<sub>2</sub> 期细胞比例分别为 21.92% 和 29.94%, 与空白对照组 12.44% 相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 但灵巴菌质油能改变 A549 细胞中微丝结构的分布, 使其产生伪足。结论:灵巴菌质油具有降低 A549 细胞克隆形成能力及损伤其细胞骨架的作用, 但它亦可能导致瘤细胞的迁移。

**[关键词]** 灵巴菌质油; A549 细胞; 成瘤能力; 伪足形成

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0185-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014080185

**[收稿日期]** 20131008 (008)

**[基金项目]** 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2010); 国家药典委员会资助项目 (2013)

**[第一作者]** 燕珂, 硕士, 助理研究员, 从事中药及质量标准研究, Tel: 025-85811958, E-mail: flyingke01@163.com

**[通讯作者]** \* 潘扬, 博士, 教授, 从事中药化学与生物技术研究, Tel: 025-86798185, E-mail: y.pan2006@163.com

- [3] Kubota T, Kubota N, Kumagai H, et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle [J]. *Cell Metabolism*, 2011, 13(3):294.
- [4] 潘丽丽. 游离脂肪酸对人脐静脉内皮细胞 eNOSmRNA 及 ET-1mRNA 表达水平的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2004.
- [5] 杨雪峰, 张瑞鹏, 李刚, 等. 苦荞麦总黄酮对软脂酸诱导 EA.hy926 细胞 NO 合成的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(10):1055.
- [6] 蒲翔, 冯泳, 王明强, 等. 理气活血法对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(1):126.
- [7] 蔡鹰, 魏群利, 陆晓和. 回心草对脐静脉内皮细胞的保护作用及对分泌一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(7):79.
- [8] 付颖, 王耀光, 李永春, 等. II 型糖尿病大鼠运动后骨骼肌 IRS-2、GLUT4 含量及 IRS-2 磷酸化变化的时间特征[J]. *首都体育学院学报*, 2011, 23(4):372.
- [9] 明志红, 肖伟, 黄雁玲. 二甲双胍联合用药治疗 2 型糖尿病的疗效观察[J]. *当代医学*, 2010, 16(9):51.
- [10] 田秀红, 刘鑫峰, 闫峰, 等. 苦荞麦的药理作用与食疗[J]. *农产品加工学刊*, 2008, 14(8):31.
- [11] 郑华, 戈延茹. 改善胰岛素抵抗的中药活性成分及其作用机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(4):531.
- [12] 崔鹏, 李继安. 中药有效成分改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗的研究进展[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2012, 15(5):736.
- [13] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells [J]. *Diabetes*, 2000, 49(11):1939.
- [14] Whiteside C I. Cellular mechanisms and treatment of diabetes vascular complications converge on reactive oxygen species [J]. *Current Hypertension Reports*, 2005, 7(2):148.

[责任编辑 邹晓翠]

## Effect of LBJZ Oils on Tumor Growth and Pseudopodium Formation of A549 Cells

YAN Ke, YANG Guang-Ming, SUN Yu, PAN Yang\*

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the effect of LBJZ oils on tumor growth and pseudopodium formation of human lung cancer cell line A549 cells. **Method:** Cell tumorigenicity was assayed by soft agar colony formation after treating A549 cells with LBJZ oils of 25, 50, 100 mg · L<sup>-1</sup> for 20 d. The cell cycle was analyzed by flow cytometry after treating A549 cells with LBJZ oils of 25, 50, 100 mg · L<sup>-1</sup> for 24 h. The changing of cytoskeletal was detected by immunofluorescence dyeing after treating A549 cells with LBJZ oils of 100 mg · L<sup>-1</sup> for 24 h. **Result:** LBJZ oils inhibited proliferation of A549 cells in a dose-dependent manner. There were significant differences between results of colony formation in control group and in all three dosage groups ( $P < 0.01$ ). LBJZ oils blocked cell cycle progression at G<sub>2</sub> phase. Ratios of cells in G<sub>2</sub> phase of medium and high dosage groups were 21.92% and 29.94% respectively, which showed significant differences compared with that of control group ( $P < 0.05$ ). LBJZ oils caused damage to the cytoskeleton of A549 cells, and promoted generation of pseudopodia. **Conclusion:** It suggested that LBJZ oils significantly inhibited proliferation of A549 cells, which may related to arrest of cell cycle and changes of cytoskeleton on A549 cells. However, it can also lead to cell migration and cancer.

**[ Key words ]** LBJZ oils; A549 cells; tumor growth; pseudopodium formation

中药巴豆为大戟科乔木巴豆 *Croton tiglium* L 的干燥成熟果实,性味辛,热,有大毒。入胃、大肠、肺经。具有泻下寒积,逐水退肿,祛痰,蚀疮之功效。因其药性峻烈,内服须炮制后入药。巴豆油是巴豆种子中的活性成分,亦为毒性成分,刺激皮肤,其主要成分是佛波醇二萜酯类化合物<sup>[1-3]</sup>,具有四环巴豆烷母核。佛波醇酯类化合物具有多种生物活性,如具有抗 HIV-1 引起的细胞病变、抗白血病等作用,同时也有促肿瘤形成、炎症、细胞增殖、血小板聚集等毒性<sup>[4]</sup>。因巴豆生品有大毒,需炮制加工后使用,传统炮制法操作较繁琐,含油量凭经验观察,各地结果差距很大,无法保证用药安全<sup>[5]</sup>,用之不当还可能引起中毒甚至有生命危险<sup>[6-7]</sup>。

“双向发酵”是一种使药用真菌与药材组合进行固体发酵的方法<sup>[8]</sup>,它为毒性中药减毒开辟了一条新途径<sup>[9]</sup>。巴豆经灵芝菌发酵后形成“灵巴菌质”,毒性明显下降,比巴豆炮制品毒性更低<sup>[10]</sup>;其毒性成分脂肪油和总蛋白的含量明显降低,均低于生巴豆及传统炮制品巴豆霜。与生巴豆相比,发酵品脂肪油的组成及相对含量产生了明显变化;发酵巴豆中出现了 5 种新成分<sup>[11]</sup>。

文献报道巴豆生物碱能抑制 SMMC-7721 细胞

的生长并促进其凋亡,其发生与 B 细胞淋巴瘤白血病 2 (Bcl-2) 蛋白减少和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达增多有关<sup>[12]</sup>,有人建立了巴豆生物碱部位的指纹图谱<sup>[13]</sup>。笔者已证实灵巴菌质碱性醇提物具有体外抑制 A549 细胞增殖的效应,其作用机制可能与降低细胞克隆形成能力及损伤细胞骨架有关<sup>[14]</sup>。有人通过 MTT 法证明了巴豆油具有抑制 A549 增殖的作用<sup>[15]</sup>。关于癌细胞迁移,研究发现小檗碱通过鼻咽癌细胞埃兹蛋白 (Ezrin) 和磷酸化埃兹蛋白 (phos-Ezrin) 抑制鼻咽癌细胞迁移和伪足形成<sup>[16]</sup>;白藜芦醇可以有效抑制胶质瘤 U87 细胞的迁移和侵袭能力,其机制可能与白藜芦醇降低细胞基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 活性相关<sup>[17]</sup>。但灵巴菌质油对 A549 细胞成瘤能力及伪足形成尚未见报道。本实验通过软琼脂克隆形成法、PI 单染法和免疫荧光染色法观察灵巴菌质油对 A549 细胞的成瘤能力、生长周期和细胞骨架的影响。

### 1 材料

**1.1 试剂** 二甲基亚砷 (DMSO, PCR 级), 低熔点琼脂糖 (生工生物工程股份有限公司), 噻唑蓝 / MTT (上海捷瑞生物工程有限公司), 细胞凋亡 PI 染色试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司), 胰

酶,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(Dapi)(美国 Sigma 公司), $\alpha$ -tubulin 抗体(美国 Bioworld Technology 公司),DMEM 培养基(Alexa Fluor®-488 conjugated Phalloidin),Alexa Fluor®-555 conjugated goat anti rabbit IgG(H+L)(美国 Life Technologies),其余试剂均为分析纯或色谱纯级,水为重蒸馏水。

**1.2 仪器** HF 90 二氧化碳培养箱, HF Safe 1200 生物安全柜(上海力康生物医疗科技控股有限公司),Leica DM IL LED/DFC450 倒置显微镜,Leica TCS SP5/TCS SP5 X 激光共聚焦显微镜(德国徕卡仪器有限公司),Hitachi Corona MTP-601F 全自动荧光酶标仪(日本日立公司),FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司),Sartorius BS 124S 电子天平(0.1 mg,德国赛多利斯公司),手动移液器(德国 Eppendorf 公司)。

**1.3 化学对照品、瘤株与药品** 灵巴菌质(LBJZ)由本实验室提供,由大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实经灵芝菌 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 固体发酵而成,制备方法参见文献<sup>[18]</sup>,人肺癌细胞 A549 瘤株,由南京大学模式动物研究所惠赠。

## 2 方法

**2.1 灵巴菌质油的获得** 取灵巴菌质 940 g,粉碎,过 40 目筛,以石油醚、二氯甲烷、水饱和正丁醇和甲醇极性递增梯度依次索氏抽提 12 h,提取液用旋转蒸发仪挥发干溶剂,60 °C 减压干燥成干浸膏,得石油醚、二氯甲烷、正丁醇和甲醇提取物分别为 150 g,17 g,7 g 和 50 g。其中石油醚提取物即灵巴菌质油,其得率占提取物总量的 67.0%。

**2.2 A549 细胞的培养** A549 细胞接种于细胞培养瓶中,DMEM 培养基含胎牛血清 100 mL·L<sup>-1</sup>,青霉素 100 kU·L<sup>-1</sup>和链霉素 100 mg·L<sup>-1</sup>,置 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞长满后,弃去培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加入 0.25% 胰酶-0.02% EDTA,37 °C 消化 3~5 min,每 2 d 按 1:3 比例传代 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。

**2.3 软琼脂克隆形成测定** 以 1.4% 的琼脂糖凝胶作为储备胶,冷却至 50 °C 与培养液按比例混合配制 0.7% 的底层胶铺于 6 孔板中,待底层胶凝固。取 A549 细胞制备成单细胞悬液,储备胶冷却至 42 °C,与含不同浓度灵巴菌质油的培养液配成终浓度为 0.35% 琼脂糖,每 1 mL 含 2500 个 A549 细胞培养液作为上层胶,药物浓度分别为 25,50,100 mg·L<sup>-1</sup>,并设空白对照组,每组 3 个复孔,将培养板在

37 °C 5% CO<sub>2</sub> 中培养 20 d,每周加 0.5 mL 培养液。培养结束后,每孔加 0.5 mL 0.005% 结晶紫染色。显微镜下拍照,随机选择 20 个视野进行克隆计数(含有 50 个细胞以上的集落计为 1 个克隆),取平均值作为克隆的形成数。

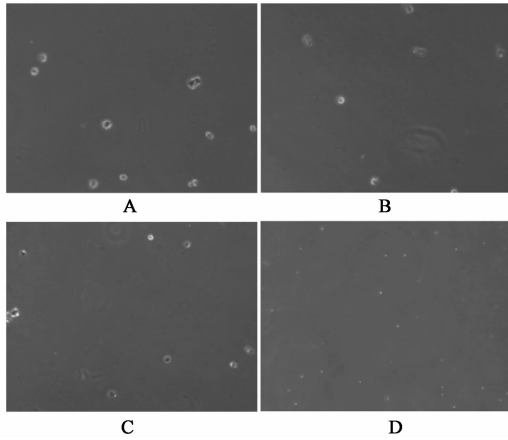
**2.4 PI 单染法测定** 取 A549 细胞用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化,制成 1 × 10<sup>8</sup>/L 细胞悬液接种于 6 孔板,每孔 3 mL 在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 中单层培养细胞至覆盖率 70%~80%,更换含不同质量浓度灵巴菌质油的培养液,空白对照为等体积全培,每组设 3 个复孔。细胞加药后在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 中孵育 24 h,0.25% 胰酶消化收集,参照细胞凋亡 PI 染色检验试剂盒说明,用 PBS 洗涤细胞 1 次(800 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min)收集并调整细胞密度为 1 × 10<sup>9</sup>/L,制备的单细胞悬液用体积分数 70% 乙醇 4 °C 固定 4 h,染色前用 PBS 洗去固定液,加入 5 μL RNAase(0.25 g·L<sup>-1</sup>)37 °C 水浴 30 min;再加入 5 μL PI 染色均匀,4 °C 避光 30 min;流式细胞仪检测,记录激发波长 488 nm 处荧光强度。

**2.5 免疫荧光染色法测定** 用 2% 多聚赖氨酸包被无菌盖玻片 30 min 后接种 A549 细胞,置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜,更换含灵巴菌质油质量浓度为 100 mg·L<sup>-1</sup>的培养液,空白对照为等体积全培。24 h 后取盖玻片做如下处理:PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,0.5% Triton X-100 透化处理 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,5% NGS-PBST 封闭 1 h,PBST 漂洗 3 次,每次 5 min,4 °C 湿盒内一抗兔来源单抗( $\alpha$ -tubulin)孵育过夜(1:100;5% NGS-PBST 稀释)。PBST 漂洗 3 次,每次 5 min,分别加 Alexa Fluor®-488 conjugated Phalloidin、Alexa Fluor®-555 conjugated goat anti rabbit IgG(H+L)、Dapi(分别 1:500,1:100,1:1000;1% NGA-PBST 稀释)37 °C 避光孵育 1 h。50% 甘油封片后,用激光共聚焦显微镜观察并成像。

## 3 结果

**3.1 软琼脂克隆形成测定** 结果显示,A549 细胞经灵巴菌质油作用 20 d 后,克隆形成能力低于空白对照组,随着浓度的增加,A549 细胞克隆生成率显著降低,克隆形成的团块数目明显减少,克隆直径、团块体积也明显减小。灵巴菌质油低、中、高剂量组作用 20 d 后的平均细胞克隆形成数分别为 123,73 和 38 个,与空白对照组 185 个克隆形成数比较均有极显著差异( $P < 0.01$ ),其中,中、高剂量组与空白组比较差异非常显著( $P < 0.001$ ),如图 1。说明灵

巴菌质油能抑制 A549 在软琼脂中的克隆形成,抑制率与剂量呈正相关。



A. 空白对照组; B. 灵巴菌质油 25 mg·L<sup>-1</sup>;  
C. 灵巴菌质油 50 mg·L<sup>-1</sup>; D. 灵巴菌质油 100 mg·L<sup>-1</sup>

图 1 灵巴菌质油作用于 A549 细胞 20 d 后的克隆形成细胞形态

**3.2 对细胞周期的影响** 与空白对照组相比,经处理 24 h 后,随着灵巴菌质油浓度增加,S 期细胞比例明显减少,G<sub>2</sub> 期细胞明显增加,灵巴菌质油中、高剂量组与空白对照组比较,G<sub>2</sub> 期细胞比例增加有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),G<sub>1</sub> 期比例虽略有变化,但与对照组比较无显著性差异。说明灵巴菌质油作用于 A549 细胞 24 h 后,能干扰 A549 细胞周期分布,使 S 期细胞比例减少,G<sub>1</sub> 期比例略有变化,G<sub>2</sub> 期比例明显增加,将细胞生长阻滞于 G<sub>2</sub> 期,从而抑制肿瘤细胞增殖。见表 1。

**3.3 对细胞骨架的影响** 染色后的空白对照组 A549 细胞胞质内见分布较为规则的绿色微丝结构

表 1 灵巴菌质油作用 A549 细胞 24 h 后细胞周期分布表 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	细胞周期分布/%		
		G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
空白	-	48.65 ± 0.30	32.80 ± 2.86	12.44 ± 2.77
灵巴菌质油	25	51.54 ± 1.73	17.35 ± 2.31 <sup>1)</sup>	18.57 ± 1.05
	50	57.06 ± 2.13	11.20 ± 1.21 <sup>1)</sup>	21.92 ± 1.03 <sup>1)</sup>
	100	45.87 ± 2.99	11.18 ± 1.42 <sup>1)</sup>	29.94 ± 2.98 <sup>1)</sup>

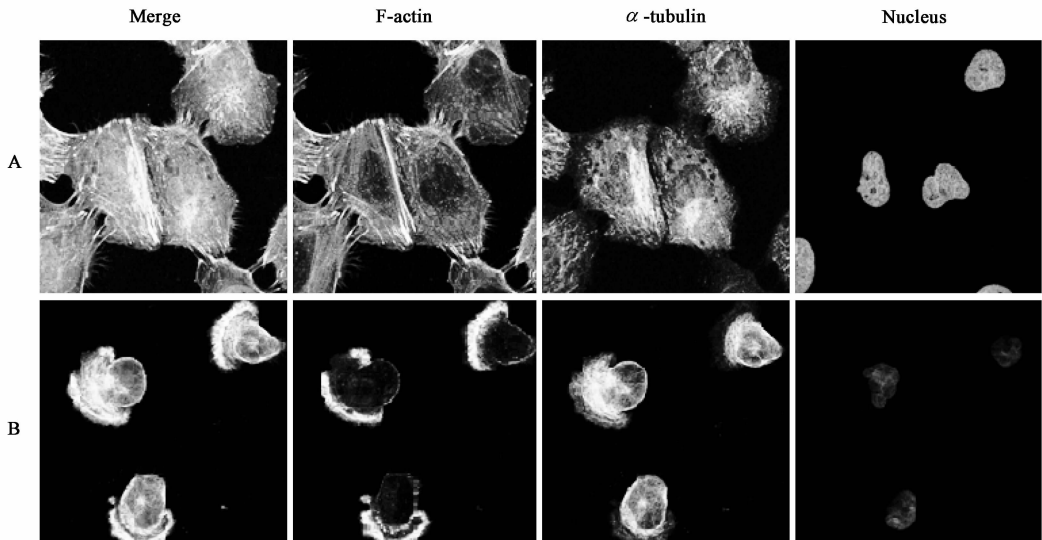
注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

以及红丝微管结构呈网络状分布,从细胞核向四周辐射状,连续而紧密,蓝色球状物是细胞核(图 2A)。100 mg·L<sup>-1</sup>灵巴菌质油作用 A549 细胞 24 h 后,细胞形态发生变形、细胞体积减小,胞质内丝状微丝结构在细胞内几乎消失,而聚集在细胞边缘,形成片状伪足,微管结构在伪足处聚集程度也有所增加(图 2B),说明药物处理后,A549 细胞内微丝分布发生较大变化,产生伪足。

### 3 讨论

对于巴豆已有的研究集中在生品巴豆的生物碱和石油醚部位,显示这两个部位具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,对发酵巴豆——灵巴菌质则研究了其碱性醇提物的抑瘤作用,证实其具有体外抑制 A549 细胞增殖的效应,提示其具有潜在的抗肿瘤活性;而对于灵巴菌质油的研究则未见报道。

细胞骨架在细胞内形成网络系统,以维持细胞形态。各种细胞运动如肌肉收缩、鞭毛摆动、纤毛煽动、有丝分裂期的染色体移动均依赖于细胞骨架。



A. 空白对照组; B. 灵巴菌质油 100 mg·L<sup>-1</sup> Merge. 重叠图; F-actin. 纤维状肌动蛋白;  $\alpha$ -tubulin.  $\alpha$ -微管蛋白; Nucleus. 细胞核

图 2 灵巴菌质油 100 mg·L<sup>-1</sup>作用 24 h 对 A549 细胞骨架中微丝和微管的影响

细胞骨架的最大特征是它的动力学可变性,这是适应于细胞内部的结构与功能而发生的,如有丝分裂期由微管组成的纺锤丝的延长与缩短。体外培养成纤维细胞移动时,由细胞核至前进方向的微丝结构形成伪足并不断延伸,相反方向则不断缩短。目前认为,伪足的形成是由于骨架再组装驱动,特别是肌动蛋白微丝骨架的重组。显微镜下发现,这个区域总是包含有密集的纤维状肌动蛋白微丝网络和少量的微管<sup>[19]</sup>。在活体细胞中,肌动蛋白的聚合主要发生在细胞延伸的边缘,通过膜和微丝末端之间新增肌动蛋白单体的方式。渗透压是驱动伪足形成的原动力。后来的肌动蛋白的重聚和跨连接加速稳定了新的伪足的形成<sup>[20]</sup>。细胞伪足包括丝状伪足、片状伪足、侵入性伪足、足体等。丝状伪足和片状伪足在肿瘤侵袭起始阶段起黏附作用<sup>[21]</sup>。灵巴菌质油在浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时作用 A549 细胞 24 h 后,改变培养液环境,产生渗透压,促使细胞骨架发生极化从而形成伪足,最终导致肿瘤细胞的迁移。

本实验通过软琼脂克隆形成法、PI 单染法和免疫荧光染色法检测灵巴菌质油对 A549 细胞成瘤能力,细胞周期分布和对细胞骨架的影响,探讨发酵减毒后灵巴菌质油对 A549 细胞体外增殖的影响,表明灵巴菌质油能抑制 A549 细胞的增殖和成瘤能力,并将细胞增殖阻滞在  $G_2$  期;但与碱性醇提物不同的是,灵巴菌质油能促使 A549 细胞产生片状伪足,这将刺激肿瘤细胞的迁移,间接促进癌细胞生长。此结论说明发酵过程并未能克服巴豆所含脂肪油(富含佛波醇酯类化合物)是促癌剂<sup>[22-23]</sup>的不良反应。

## [参考文献]

[1] Meyer-Bertenrath J G. 150 years of croton oil research [J]. *Experientia*, 1969, 25 (1): 1.

[2] 王媛,邹忠梅,丛浦珠. 巴豆属植物中二萜类成分研究概况[J]. *国际中医中药杂志*, 2006, 28 (1): 17.

[3] Salatino A, Salatino M L F, Negri G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae) [J]. *J Braz Chem Soc*, 2007, 18 (1): 11.

[4] 王磊,刘振,高文远,等. 巴豆中佛波醇酯类成分及其生物活性研究进展[J]. *中成药*, 2012, 34 (8): 1574.

[5] 姜林,黄文娟. 中维医巴豆霜脂肪油和总蛋白质的比较[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26 (9): 2094.

[6] 时霄霄. 巴豆致过敏性休克 1 例[J]. *中国中药杂*

志, 1994, 19 (9): 569.

[7] 赵立彦. 巴豆的合理加工及中毒后的解救[J]. *中国医药指南*, 2011, 9 (12): 139.

[8] 庄毅,潘扬,张李阳,等. 药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力[J]. *中国食用菌*, 2007, 26 (2): 3.

[9] 涂霞,潘扬. 双向发酵——毒性中药炮制减毒的新途径[J]. *菌物研究*, 2010, 8 (1): 52.

[10] 潘扬,吴晓峰,涂霞,等. 中药巴豆经炮制与发酵后毒性效应的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30 (5): 788.

[11] 刘春美,吴晓峰,潘扬,等. 巴豆发酵品与生巴豆、巴豆霜中毒性成分的含量比较[J]. *中国药房*, 2011, 22 (43): 4071.

[12] 陈武,陈鹏英,刘鹏,等. 巴豆生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (11): 199.

[13] 金锋,任玉珍,陈彦琳,等. 巴豆生物碱部位 HPLC 特征指纹图谱研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (2): 90.

[14] 孙钰,彭薇,潘扬,等. 灵巴菌质碱性醇提物体外抑制 A549 细胞增殖的作用及机制[J]. *南京中医药大学学报*, 2013, 29 (4): 362.

[15] 赵永春. 巴豆的化学成分研究及抗肿瘤活性初步评价[D]. 杭州:浙江工商大学, 2012.

[16] 陈宇,王巍巍,华建江,等. 小檗碱通过 Ezrin 蛋白抑制鼻咽癌细胞迁移和伪足形成[J]. *中国耳鼻喉咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14 (6): 401.

[17] 熊伟,林洪,章翔,等. 白藜芦醇对胶质瘤 U87 细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2011, 10 (6): 494.

[18] 吴晓峰,刘春美,潘扬,等. 发酵时间对灵巴菌质毒性成分含量的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39 (22): 13389.

[19] Condeelis J. Are all pseudopods created equal? [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1992, 22 (1): 1.

[20] 张秀真,吴泽志. 细胞伪足形成与微丝骨架研究进展[J]. *国外医学:临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26 (4): 213.

[21] 周方正,伍钢. 细胞伪足与肿瘤转移研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2007, 12 (1): 77.

[22] Armuth, V, Berenblum, I. Systemic promoting action of phorbol in liver and lung carcinogenesis in AKR mice [J]. *Cancer Res*, 1972, 32: 2259.

[23] 王磊,刘振,高文远,等. 巴豆中佛波醇酯类成分及其生物活性研究进展[J]. *中成药*, 2012, 34 (8): 1574.

[责任编辑 聂淑琴]