

异甘草素与光甘草定抗肿瘤转移作用比较

刘亮亮¹, 陈姬², 张波¹, 郑秋生^{1*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002;
2. 杭州默沙东制药有限公司, 杭州 310000)

[摘要] **目的:** 观察异甘草素和光甘草定对肿瘤细胞体外迁移能力以及血管内皮细胞管腔形成能力的影响, 比较 2 种药物的抗肿瘤转移能力。**方法:** 以 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异甘草素和光甘草定作用于小鼠黑色素瘤 B16F1 细胞和血管内皮细胞 (ECV304), 干预 48 h, 磺酰罗丹明 B (SRB) 法检测细胞增殖。划痕实验评价 B16F1 和 ECV304 细胞体外迁移能力, 明胶酶电泳和酶联免疫法 (ELISA) 测基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的活性和表达量, 吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 双荧光染色以及血管内皮细胞管腔样结构形成实验评价血管新生能力。**结果:** 异甘草素和光甘草定均能显著抑制 B16F1 细胞和 ECV304 细胞增殖, 且呈明显的剂量依赖性, 但光甘草定对 B16F1 细胞的抑制率低于异甘草素。80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 异甘草素与光甘草定的愈合面积分别为 19.1% 和 27.2%, 与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 药物组与对照组相比均能降低基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 分泌与表达, 药物组能显著降低血管内皮细胞迁移和管腔形成能力。光甘草定对 B16F1 细胞迁移, MMP-2 分泌与表达, 以及对 ECV304 细胞管腔形成的抑制能力低于异甘草素。**结论:** 异甘草素和光甘草定都具有抗肿瘤转移活性, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 光甘草定抗肿瘤转移作用弱于异甘草素。

[关键词] 异甘草素; 光甘草定; 抗肿瘤转移; B16F1 细胞; ECV304 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2013) 18-0245-06

[doi] 10.11653/syfj2013180245

Comparison of the Anti-metastasis Effect of Isoliquiritigenin and Glabridin

LIU Liang-liang¹, CHEN Ji², ZHANG Bo¹, ZHENG Qiu-sheng^{1*}

(1. Pharmacy School, Shihezi University, Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Shihezi 832002, China; 2. MSD Pharmaceutical Company Limited, Hangzhou 310000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the anti-metastasis effect and the inhibition of the tube-like structure formation of human umbilical vein endothelial cells of isoliquiritigenin and glabridin. **Method:** The sulforhodamine B (SRB) assay was used, and the mouse melanoma B16F1 and vascular endothelial ECV304 cells in logarithmic phase of growth were randomly divided into drug groups and control group, treated with the concentration of 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ isoliquiritigenin or glabridin, intervention durations were 48 h accordingly. And the scratch wound assay, gelatin zymography, enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay, acridine orange/othidium bromide (AO/EB) double staining and tube-like structure formation test were used to observe and compare the antitumor and anti-metastasis ability. **Result:** Inhibition rate of the B16F1 and ECV304 were enhanced along with increase of isoliquiritigenin and glabridin concentration; glabridin against melanoma cell migration, matrix metal proteinase-2 (MMP-2) expression and the ability of inhibiting tube-like structure formation were slightly lower than those of isoliquiritigenin. **Conclusion:** Isoliquiritigenin and glabridin have strong anti-metastasis activities, but anti-metastasis effect of glabridin was weaker than that of isoliquiritigenin within 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

[Key words] isoliquiritigenin; glabridin; anti-metastasis; B16F1 cells; ECV304 cells

[收稿日期] 20130311(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260338); 兵团杰出青年基金项目(2011CD006); 国际科技合作计划项目(2012BC001)

[第一作者] 刘亮亮, 硕士, 从事肿瘤及细胞药理研究, Tel: 15981703683, E-mail: LLL80231226@163.com

[通讯作者] * 郑秋生, 博士, 教授, 从事肿瘤及细胞药理研究, Tel: 13999328286, E-mail: zqsyt@sohu.com

异甘草素和光甘草定都是从甘草中提取分离出的黄酮类化合物。异甘草素具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、心血管保护等多种药理活性^[1],可抑制前列腺癌细胞的迁移和侵袭^[2]。光甘草定具有较多的药理活性,特别是在心脑血管疾病以及化妆品领域应用广泛^[3],近期有文献报道,光甘草定能抑制非小细胞肺癌 A549 细胞侵袭和转移^[4]。转移是恶性肿瘤细胞特有的生物学行为,也是导致患者死亡的主要原因^[5]。在我国,恶性黑色素瘤的发病率较低,但预后较差,而且极易发生转移^[6-7]。小鼠黑色素瘤 B16F1 细胞因其来源及基因背景清楚,已广泛地用于研究其肿瘤发生、转移过程及影响肿瘤发展、转移的相关参数^[8]。本试验拟用 B16F1 细胞探讨并比较以上 2 种甘草化合物的抗肿瘤转移能力及抗血管新生作用。

1 材料

1.1 细胞 小鼠黑色素瘤细胞 B16F1 细胞和血管内皮 ECV304 细胞株(上海生命科学院肿瘤细胞库)。

1.2 试药、试剂和仪器 异甘草素(isoliquiritigenin)与光甘草定(glabridin)(Sigma,纯度均为 98%),1640 培养基(RPMI 1640, Gibco),胎牛血清(FBS,北京四季青生物工程有限公司,批号 120112),Matrigel 胶(美国 BD 公司,批号 004753),金属蛋白酶-2(MMP-2)ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司,批号 0903055。Thermo3131 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),Thermo3001 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),MIC0026 型荧光倒置显微镜(德国 Zeiss 公司),GelX1620 型凝胶成像仪(上海欧翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 SRB 法测定细胞增殖抑制率 取对数生长期细胞(B16F1),胰蛋白酶消化,用完全培养基制成细胞悬液,细胞直接计数,以 5×10^4 个/mL 细胞接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,放置于培养箱过夜,待加药处理。次日加不同浓度(20, 40, 60, 80, 100, 120 μ mol·L⁻¹)的异甘草素和光甘草定。每组设 6 个平行孔,用添加完全培养液的 3 个无细胞孔作为本底对照组,混匀,置于 CO₂ 培养箱中继续培养 48 h 后,每孔轻轻地加入 10% (终浓度)的三氯醋酸固定,静置 5 min 后移到 4 $^{\circ}$ C 放置 1 h 后弃固定液,用去离子水洗 5 遍,室温干燥。每孔加入 0.4% 磺基罗丹明 B(SRB) 50 μ L 室温放置 20 min,用 1% 冰醋酸液洗 5 遍,室温干燥。加入 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 10.5) 150 μ L 溶解,酶标仪在 490 nm 波

长处测定每孔的吸光度(A)。计算增殖抑制率^[9]。

$$\text{增殖抑制率} = \frac{A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

2.2 台盼蓝拒染法测定药物对 B16F1 细胞的致死率 取对数生长期 B16F1 细胞,于超净工作台,胰蛋白酶消化,用完全培养基制成细胞悬液,计数并调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,按每孔 3 mL 加入 6 孔板中,加的浓度分别为 20, 40, 60, 80, 100, 120 μ mol·L⁻¹ 异甘草素和光甘草定,培养 48 h,取 90 μ L 细胞悬液加于 200 μ L 离心管中,再加入 90 μ L 0.4% 台盼蓝染液,用细胞计数器计数死细胞数,计算异甘草素和光甘草定对 B16F1 细胞的致死率。

$$\text{致死率} = \frac{\text{死细胞数}}{\text{死细胞数} + \text{活细胞数}} \times 100\%$$

2.3 细胞划痕实验测定细胞体外迁移能力 按照 Fishman 等^[10]方法,取对数生长期细胞于 48 孔板,细胞达 90% 融合度时,以 200 μ L Tip 头均匀划痕,用含 10% 小牛血清的培养液轻轻洗去脱落细胞,各组分别加入终浓度为 80 μ mol·L⁻¹ 异甘草素和光甘草定的无血清培养基,于培养箱孵育 48 h,至空白组划痕基本愈合。用倒置显微镜拍照并分析。用 Photoshop 6.0 软件分别测定划痕愈合前后的划痕区域像素值,计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = \frac{\text{各组 0 h 划痕区像素值} - \text{各组 48 h 划痕区像素值}}{\text{各组 0 h 划痕区像素值}} \times 100\%$$

2.4 明胶酶谱分析实验测定细胞 MMP-2 活力 明胶酶活性测定按照 Lalu 等^[11]的方法。制备聚丙烯酰胺凝胶。取对数生长期 B16F1 细胞接种于培养瓶中,培养箱培养 24 h 后,加入预先用无血清 RPMI 1640 培养基配制的异甘草素和光甘草定溶液。培养 48 h 后收集细胞上清液,细胞计数,取相同细胞数对应上清液电泳(浓缩胶:40 V,40 min;分离胶:60 V,150 min),结束后,室温复性 2 h。再于 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 36 h。孵育结束后,考马斯亮蓝染色 30 min,脱色液脱色至胶条呈蓝色均一背景,亮白色条带。拍照并用 Gel-PRO Analyzer 软件(Media Cybernetics, USA)进行分析。

2.5 用 ELISA 法测定 MMP-2 表达 取对数生长期 B16F1 细胞,计数后,以相同细胞数接种于培养瓶中,于培养箱培养 24 h,加入预先用无血清培养液配制的异甘草素和光甘草定溶液,终浓度为 80 μ mol·L⁻¹,培养 48 h 后,收集上清液,按 ELISA 试剂盒步骤操作,酶标仪在 450 nm 测定 A。所有 A 值都减去空白后再进行计算。

2.6 血管内皮细胞形态观察 取对数生长期的

ECV304 细胞,将细胞密度调整到 1×10^5 个/mL,按 1 mL/孔加入到六孔板中,加入异甘草素和光甘草定,培养箱中再培养 48 h,以 AO/EB 荧光染液暗处染色,荧光显微镜下观察拍照。

2.7 血管内皮细胞管腔结构形成实验 为更好、更完整的体外再现肿瘤转移的过程,除划痕试验外,笔者设计了血管内皮细胞 ECV304 在 Matrigel 胶上形成的血管管腔样结构实验,在体外模拟肿瘤内部的血管新生过程。参照 Mezentsev 等^[12]的方法,将 Matrigel 胶 4 °C 过夜溶解,加到 24 孔培养板,每孔 200 μL ,置 37 °C 培养箱 30 min 促凝,用含 0.5% FBS 的 RPMI 1640 培养液调整 ECV304 细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,每孔 1.0 mL 接种于 Matrigel 胶层,37 °C 孵育 1 h 后,用无血清的 RPMI 1640 培养液洗脱除去未贴壁的细胞,加入无血清培养液配制的异甘草素和光甘草定溶液,终浓度为 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,共同孵育 20 h。显微镜观察并拍照。正常的血管内皮细胞能够在 Matrigel 胶重建的基底膜上形成血管网状结构,观察药物处理以后能否抑制网状结构的形成。

2.8 数据分析 采用 Origin 6.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *Dunnnett-t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著统计学意义。

3 结果

3.1 对 B16F1 细胞活力的影响 异甘草素和光甘草定本实验浓度内 (20 ~ 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 B16F1 细胞的增殖均有一定抑制作用,异甘草素对 B16F1 细胞的抑制率高于光甘草定。异甘草素和光甘草定在 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的抑制率分别为 46.3% 和 31.0%。台盼蓝拒染法测定致死率分别为 22.5% 和 13.5%。此浓度在倒置显微镜下观察,细胞贴壁仍比较牢固,培养液中脱落细胞较少,因此选取 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行抗肿瘤转移作用的比较。见图 1。

3.2 对 B16F1 细胞迁移率的影响 划痕后培养基中不含血清,肿瘤细胞基本不会增殖,划痕愈合完全靠细胞的迁移运动,愈合面积代表肿瘤细胞的迁移运动能力^[11]。划痕后,正常组细胞基本愈合,异甘草素与光甘草定组的愈合面积明显低于正常组,且异甘草素组的愈合面积低于光甘草定组 (80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,异甘草素组和光甘草定组的愈合面积分别为 19.1% 和 27.2%),说明光甘草定对细胞迁移的抑制能力略弱于异甘草素。见图 2,3。

3.3 对 B16F1 细胞 MMP-2 活力的影响 采用明胶酶谱法,以 MMP-2 降解蛋白出现负染条带的面积和亮度来分析检测细胞分泌 MMP-2 活力的强弱。异

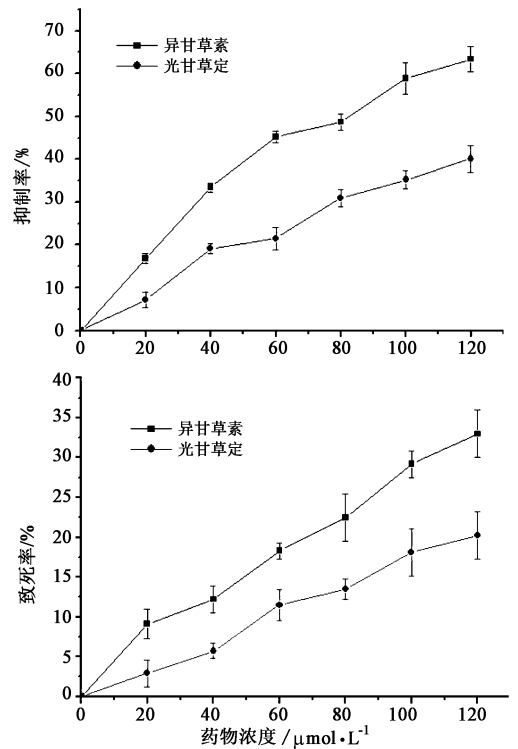


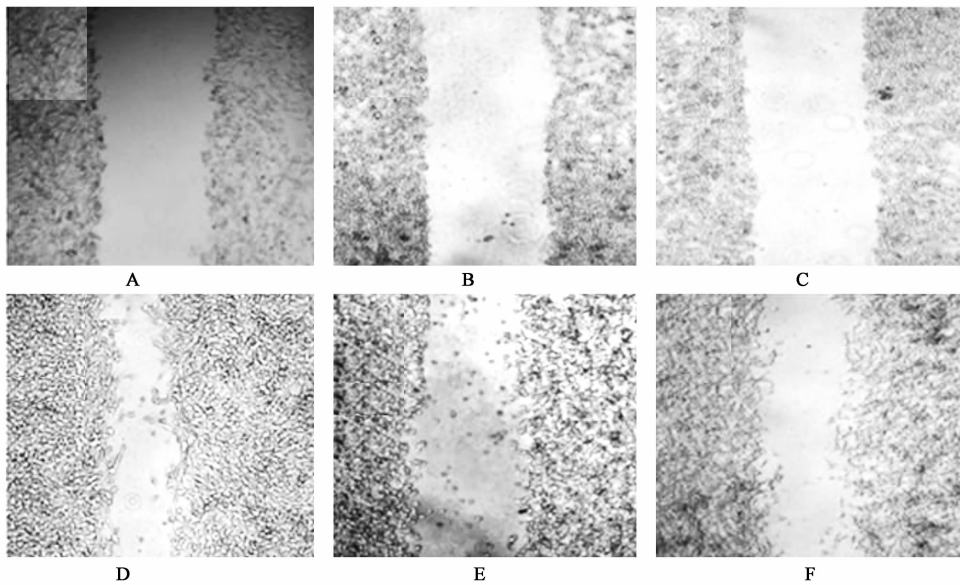
图 1 异甘草素和光甘草定对 B16F1 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

甘草素和光甘草定组条带的面积和亮度都低于正常组,说明二者都能降低 MMP-2 活性,同时,异甘草素的条带亮度与面积弱于光甘草定,用 Photoshop 6.0 软件分析,以正常组条带面积为 100%,异甘草素组和光甘草定组的条带面积分别为 42.5% 和 82.1%,二者比值为 0.5,说明光甘草定降低 MMP-2 的能力弱于异甘草素。见图 4。

3.4 对 B16F1 细胞 MMP-2 表达量的影响 用 ELISA 法。对照组、异甘草素组和光甘草定组蛋白量分别为 98 878.74, 46 051.52, 61 658.52 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$,三者比值为 1:0.46:0.62,说明与对照比较,80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异甘草素和光甘草定都能下调 B16F1 细胞中的 MMP-2 的表达,光甘草定下调能力略弱于异甘草素。见图 5。

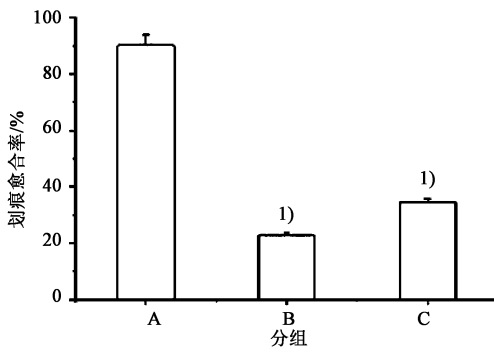
3.5 对血管内皮细胞增殖的影响 肿瘤的血管生成是肿瘤生长和转移的重要条件。因此,抑制血管内皮细胞的增殖可切断肿瘤细胞的营养来源,抑制其生长与转移。异甘草素和光甘草定细胞能抑制血管内皮 ECV304 细胞的增殖,在浓度为 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,它们对 ECV304 细胞的生长抑制率分别为 42.0% 和 26.1%,说明光甘草定对内皮细胞生长抑制作用弱于异甘草素。见图 6。

3.6 对血管内皮细胞形态的影响 异甘草素和光甘



A, B, C. 对照组; D. 48 h 对照组; E. 异甘草素 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. 光甘草定 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(图 8 同)

图 2 异甘草素和光甘草定对 B16F1 细胞迁移的影响 ($\times 100$)



A. 对照组; B. 异甘草素 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;
C. 光甘草定 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(图 4, 5, 7, 9, 10 同)
与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$ (图 4, 5, 9 同)

图 3 异甘草素和光甘草定对 B16F1 细胞迁移力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

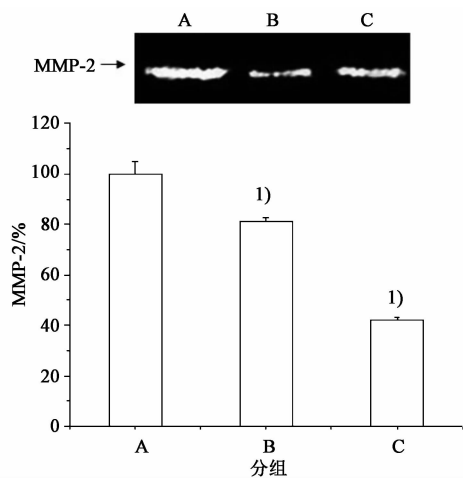


图 4 异甘草素和光甘草定对 B16F1 细胞 MMP-2 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

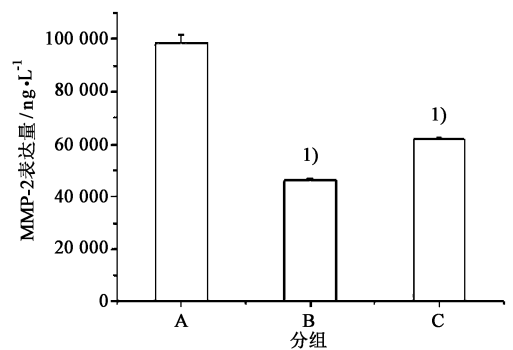


图 5 异甘草素和光甘草定对 B16F1 细胞 MMP-2 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

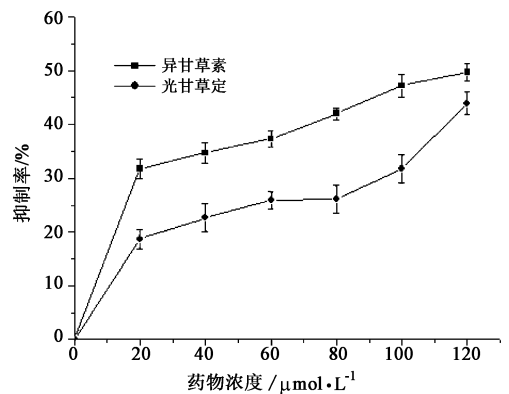


图 6 异甘草素和光甘草定对血管内皮细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

凋亡,光甘草定处理后细胞的膜结构完整,核染色质着绿色,但核已开始固缩或呈串珠状,细胞出现早期凋亡,异甘草素处理后,细胞明显涨大且部分核染色质固缩为圆珠状,部分细胞出现核染色质着橘红色,并呈晚期凋亡和死亡。结果显示异甘草素诱导血

草定处理 48 h 后即能引起 ECV304 细胞明显的晚期

管内皮细胞凋亡的能力明显强于光甘草定。见图7。

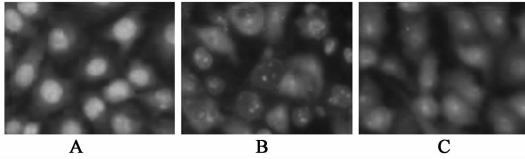


图7 异甘草素和光甘草定

对 ECV304 细胞形态的影响(AO/EB 染色, ×400)

3.7 对血管内皮细胞细胞迁移力的影响 血管内

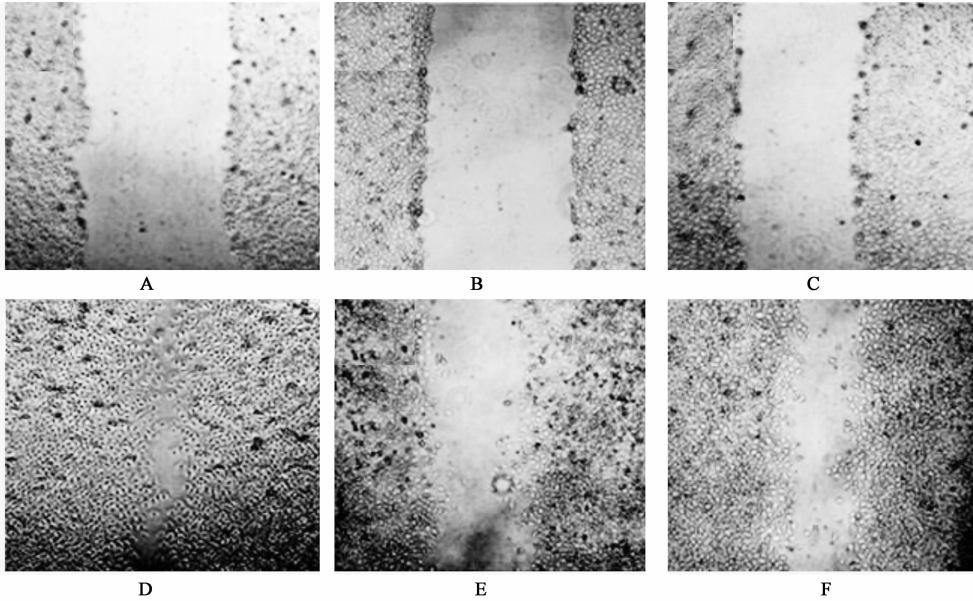


图8 异甘草素和光甘草定对 ECV304 细胞迁移的影响(×100)

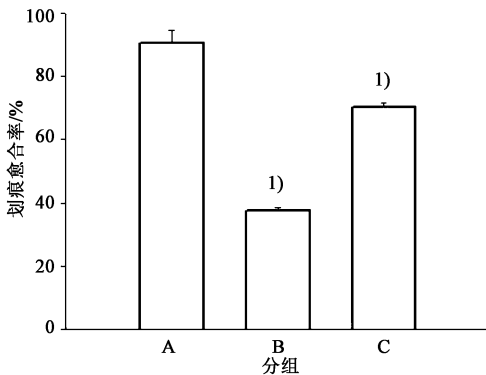


图9 异甘草素和光甘草定对 ECV304 细胞迁移力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 对血管内皮细胞管腔样结构形成的作用 正常组的血管内皮细胞能在 matrigel 胶重建的基底膜上形成完整的血管网状结构;80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异甘草素处理后的血管内皮细胞已经逐渐变圆,彼此之间已经完全游离,血管网状结构已经被破坏。80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的光甘草定处理后的血管内皮细胞拉伸程度降低,彼此间连接缝隙变大,部分血管网状结构的完整性发生破坏;2 种化合物都能有效抑制了内

皮细胞体外划痕实验结果显示,异甘草素和光甘草定能够显著减弱血管内皮细胞 ECV304 的迁移能力。划痕后约 48 h,正常组细胞基本愈合,异甘草素与光甘草定组的愈合面积明显低于正常组,异甘草素组和光甘草定组的愈合面积分别为 37.4% 和 70.2%,同浓度下,异甘草素组的愈合面积低于光甘草定组,说明光甘草定抑制血管内皮 ECV304 细胞迁移的能力弱于异甘草素。见图 8。

皮细胞血管管腔样结构的形成,从而对肿瘤内部血管新产生抑制作用,而且异甘草素的抑制作用明显强于光甘草定。见图 10。

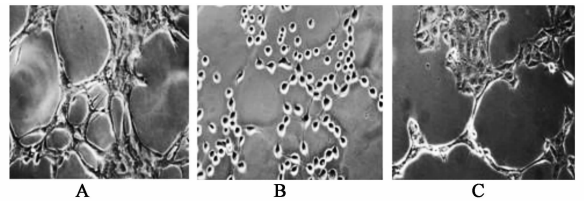


图10 异甘草素和光甘草定对 ECV304 细胞管腔形成能力的影响(×40)

4 讨论

本研究结果显示,异甘草素和光甘草定 20 ~ 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 48 h 均可抑制 B16F1 和 ECV304 细胞增殖。同浓度下,光甘草定对 B16F1 和 ECV304 细胞增殖的抑制率低于异甘草素。80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,异甘草素和光甘草定对 B16F1 细胞致死率分别为 22.5% 和 13.5%,基本保证接近或高于 80% 的细胞存活,因此选择在此较低毒性下继续研究。

游离细胞向远端转移灶游走迁移是肿瘤转移的重要环节。划痕后培养基中不含血清,肿瘤细胞基本不会增殖,划痕愈合完全靠细胞的迁移运动^[13],异甘草素和光甘草定均能降低划痕后愈合面积,这表明异甘草素和光甘草定均能抑制 B16F1 细胞的迁移能力,但光甘草定作用略弱于异甘草素。细胞外基质(ECM)的降解是肿瘤侵袭转移的关键步骤之一,MMP-2 是肿瘤细胞降解基底膜的重要成分^[14],其表达增加能促进细胞株的侵袭能力。异甘草素和光甘草定处理后,小鼠黑色素瘤 B16F1 细胞的 MMP-2 分泌量下降,而且运动能力也明显受到限制,提示异甘草素和光甘草定均具有抗肿瘤细胞浸润作用。血管新生在肿瘤生长、转移中起着重要的作用^[15],实验发现,异甘草素和光甘草定都能抑制血管内皮细胞增殖,诱导血管内皮细胞至晚期凋亡,同时抑制血管内皮细胞的迁移。为更好、更完整的体外再现肿瘤转移的过程,除划痕实验外,笔者设计了血管内皮细胞 ECV304 在 Matrigel 胶上形成的血管管腔样结构实验,在体外模拟肿瘤内部的血管新生过程和管腔结构的形成,结果发现异甘草素和光甘草定均能有效抑制内皮细胞血管管腔样结构的形成,表明异甘草素和光甘草定都具有抗血管新生作用,但光甘草定作用略弱于异甘草素。

综上,异甘草素和光甘草定都具有抗肿瘤转移能力。光甘草定的作用虽然略弱于异甘草素,但其低细胞毒作用仍有望成为一种新的抗肿瘤转移药物,但其具体机制有待进一步阐明。

[参考文献]

[1] Kwon H M, Choi Y J, Choi J S, et al. Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF-kappaB signal disruption[J]. *Exp Biol Med*, 2007, 232(2):235.

[2] Kwon G T, Cho H J, Chung W Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling [J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(9):663.

[3] Kang J S, Yoon Y D, Han M H, et al. Glabridin suppresses intercellular-adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells by blocking sphingosine kinase pathway: implications of Akt, extracellular signal-regulated kinase, and nuclear factor-kappaB/Rel signaling pathways [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2006, 69(3):941.

[4] Tsai Y M, Yang C J, Hsu Y L, et al. Glabridin inhibits migration, invasion, and angiogenesis of human non-small cell lung cancer A549 cells by inhibiting the FAK/rho signaling pathway [J]. *Integr Cancer Ther*, 2011, 10(4):341.

[5] 陈华圣, 许爱华, 沈婷婷, 等. 六君祛痰解毒汤及其拆方对 C57BL/6J 小鼠 Lewis 小鼠肺转移的抑制作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6):249.

[6] Sporn M B. The war on cancer [J]. *Lancet*, 1996, 347(9012):1377.

[7] O' Day S J, Kim C J, Reintgen D S. Metastatic melanoma: chemot herapy to biochemot herapy [J]. *Cancer Control*, 2002, 9(1):31238.

[8] Zhao J, Qi Q, Yang Y, et al. Inhibition of alpha (4) integrin mediated adhesion was involved in the reduction of B16F10 melanoma cells lung colonization in C57BL/6 mice treated with gambogic acid [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 589(1/3):127.

[9] 丁岩, 何丽容, 曹卡加, 等. 叠氮甲基苊醌衍生物诱导 KB 细胞及其耐药株细胞的凋亡 [J]. *药学学报*, 2005, 40(1):22.

[10] Fishman D A, Kearns A, Chilukuri K, et al. Metastatic dissemination of human ovarian epithelial carcinoma is promoted by alpha2beta1-integrin-mediated interaction with type I collagen [J]. *Invasion Metastasis*, 1998, 18(1):15.

[11] Lalu M M, Csonka C, Giricz Z, et al. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(4):937.

[12] Mezentsev A, Seta F, Dunn M W, et al. Eicosanoid regulation of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in micro vessel endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(21):18670.

[13] Li Z R, Zhan W H, Wang Z, et al. Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(1):229.

[14] 陈萌, 娄丽霞, 吴爱民, 等. 活血益气方及其拆方药物血清对 VEGF₁₆₅ 转染奇静脉内皮细胞分泌 MMP-9, MMP-2 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2):156.

[15] Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis [J]. *Oncogene*, 2000, 19(53):6122.

[责任编辑 李玉洁]