

# 美洲大蠊多肽对血管生成的影响

张鸿翰<sup>1</sup>, 张蕊<sup>1</sup>, 袁发璐<sup>2</sup>, 李婷<sup>3</sup>, 彭芳<sup>1\*</sup>

(1. 大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671000;

2. 云南新兴职业学院, 昆明 650200; 3. 云南省药物研究所, 昆明 650111)

**[摘要]** 目的:探讨美洲大蠊多肽对血管生成的作用,探讨其机制。方法:以人脐静脉内皮细胞 HUVECs 和人肝癌 HepG2 细胞为研究对象,采用噻唑蓝(MTT)比色法和细胞划痕实验,观察不同质量浓度(6.25,12.5,25,50,100 mg·L<sup>-1</sup>)的美洲大蠊多肽(PAP-1~3),脱脂膏和美洲大蠊多肽前体物 C II-3 对 HUVECs 增殖、迁移的影响,另设正常组和沙利度胺组;采用小管形成实验检测各组 HUVECs 小管形成能力;通过细胞间黏附实验,观察不同质量浓度(25,50,100 mg·L<sup>-1</sup>)的美洲大蠊提取物处理后人肝癌 HepG2 细胞同 HUVECs 之间黏附能力;利用免疫细胞化学染色和酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组 HUVECs 中血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达。结果:MTT 比色法结果显示,多肽均能抑制 HUVECs 的增殖( $P < 0.05$ ),呈剂量依赖关系。不同质量浓度多肽分别作用 24,48,72 h,PAP-2 的抑制作用优于 PAP-1,PAP-3( $P < 0.05$ )。不同质量浓度的 C II-3 和脱脂膏作用,HUVECs 的存活率明显升高。细胞划痕实验结果显示多肽均能抑制 HUVECs 迁移( $P < 0.05$ ),且随药物浓度的增加,抑制迁移的作用也越强。其中 PAP-2 的作用优于 PAP-1 和 PAP-3( $P < 0.05$ );C II-3 在一定程度上能抑制 HUVECs 迁移,但是剂量越大,抑制作用越弱;脱脂膏作用后,HUVECs 迁移能力增强。小管生成实验结果显示,多肽均能抑制 HUVECs 小管形成( $P < 0.05$ ),且随着给药浓度的增大,抑制作用越强。其中,PAP-2 对小管形成的抑制作用优于 PAP-1 和 PAP-3( $P < 0.05$ )。C II-3 和脱脂膏一定程度上促进 HUVECs 小管的形成。细胞间黏附实验结果显示,多肽均能阻断 HepG2 同 HUVECs 之间的黏附( $P < 0.05$ ),其中 PAP-2 对 HepG2 同 HUVECs 间黏附的阻断作用强于 PAP-1 和 PAP-3( $P < 0.05$ )。相反,C II-3 和脱脂膏在一定程度上却能促进 HepG2 同 HUVECs 间黏附。免疫细胞化学染色和 ELISA 实验结果显示,多肽均能够下调 HUVECs 细胞中 VEGF 含量( $P < 0.05$ ),且呈浓度依赖性。其中,PAP-2 对 VEGF 的下调作用优于 PAP-1 和 PAP-3( $P < 0.05$ )。而 C II-3 和脱脂膏能上调 HUVECs 中 VEGF 的表达。结论:美洲大蠊多肽对 HUVECs 的侵袭和转移,分化形成小管的能力有一定抑制作用,并能下调细胞中 VEGF 蛋白的表达。其中,美洲大蠊多肽的作用优于 C II-3 和脱脂膏,多肽中 PAP-2 的作用较优。

**[关键词]** 美洲大蠊多肽;人脐静脉内皮细胞(HUVECs);HepG2 细胞;增殖;迁移;血管内皮生长因子(VEGF)

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5;R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0060-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190725

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181218.1705.008.html>

**[网络出版时间]** 2018-12-20 13:57

## Effect of Periplaneta Aamericana Polypeptide on Angiogenesis

ZHANG Hong-han<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, YUAN Fa-lu<sup>2</sup>, LI Ting<sup>3</sup>, PENG Fang<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China;

2. Yunnan Xinxing Occupations Institute, Kunming 650200, China;

3. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of the Periplaneta Americana polypeptide on the angiogenesis. **Method:** Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and cell scratch assay were used to observe effect of different concentration (6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>) of the Periplaneta Americana

**[收稿日期]** 20181216(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81560600)

**[第一作者]** 张鸿翰,在读硕士,从事抗肿瘤药理学研究,E-mail:344792450@qq.com

**[通信作者]** \*彭芳,硕士,教授,从事抗肿瘤药理学研究,E-mail:pengfang6556@aliyun.com

polypeptide, C II -3 and skimmed cream on the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and a normal group and a thalidomide group were also established in this study. The tubule formation assay was used to detect the effect of different concentration (25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>) of the *Periplaneta Americana* extracts on the formation of tubules in HUVECs cells. The adhesion between HepG2 cells and HUVECs cells was observed by cell adhesion assay. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) proteins in HUVECs was detected by immunocytochemical staining and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** MTT results showed that the *Periplaneta Americana* polypeptide could inhibit the proliferation of HUVECs in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). The effect of different concentrations of PAP-2 was better than that of PAP-1 and PAP-3 at 24, 48 72 h ( $P < 0.05$ ). However, the survival rate of HUVECs was significantly increased after treatment with different concentrations of C II -3 and skimmed cream in a time-dose dependent manner. Cell wound scratch assay indicated that migration of HUVECs could be inhibited by *Periplaneta Americana* polypeptide in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ), and the effect of PAP-2 was better than that of PAP-1 and PAP-3 ( $P < 0.05$ ). C II -3 could inhibit migration HUVECs to some extent, but the higher the dose was, the weaker the inhibition effect was. Skimmed cream promoted migration of HUVECs in a dose-dependent manner. Tube formation assay revealed that *Periplaneta Americana* polypeptide could inhibit tube formation of HUVECs, and the inhibitory effect of PAP-2 was better than that of PAP-1 and PAP-3 ( $P < 0.05$ ). C II -3 and skimmed cream promoted the tube formation of HUVECs to a certain extent. Intercellular adhesion assay stated clearly that *Periplaneta Americana* polypeptide could block the adhesion between HepG2 and HUVECs ( $P < 0.05$ ), and the effect of PAP-2 was better than that of PAP-1 and PAP-3 ( $P < 0.05$ ). However, C II -3 and skimmed cream could promote the adhesion between HepG2 and HUVECs. Results of ELISA assay and immunocytochemical staining indicated that *Periplaneta Americana* polypeptide could down-regulate the expression of VEGF of HUVECs in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ), in which effect of PAP-2 was better than that of PAP-1 and PAP-3 ( $P < 0.05$ ). However, C II -3 and skimmed cream could up-regulate the expression of VEGF in HUVECs. **Conclusion:** The *Periplaneta Americana* polypeptide can inhibit the invasion, metastasis and tube formation of HUVECs, and down-regulate the expression of VEGF in HUVECs. The effect of *Periplaneta Americana* polypeptide is better than C II -3 and skimmed cream, and the among the polypeptide, the effect of PAP-2 is superior to the other two.

[**Key words**] *Periplaneta Americana* polypeptide; human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); HepG2 cells; proliferation; migration; vascular endothelial growth factor (VEGF)

肝癌(HCC)是世界上第五大常见的恶性肿瘤,全球癌症病死率居世界第2位<sup>[1-2]</sup>,恶性程度高,复发率高、易转移。近年来,不少研究聚焦于肿瘤血管生成<sup>[3]</sup>。肿瘤血管生成是一种与肿瘤微环境有关的重要生物学过程之一<sup>[4-5]</sup>。HCC是血管极其丰富的肿瘤,对血供需求高,肝脏独特的血液供求模式是HCC血管生成区别其他肿瘤的特点,在肝癌生长中血管生成所起作用十分典型<sup>[5]</sup>。因此,以抗血管生成成为靶点<sup>[6-8]</sup>的HCC治疗研究近年来备受广大研究者的关注。与小分子化学药物和蛋白质药物比较,多肽类药物有其独特的优势。相对小分子化学药物而言,多肽类药物的适应症广泛且疗效显著,具有良好的分子认知性,代谢毒性低,不会蓄积于体内而引起中毒,因而毒副作用低。相对蛋白质药物而言,多肽类药物的稳定性较好、纯度高、几乎没有免疫原性

且合成成本较低。同时多肽类药物针对性强,研发目标明确,开发成功率高,产业化开发优势明显。总之,多肽类药物在新药研发、生产、使用过程中独具特色,已成为当前国际新药研发的重要方向之一。但目前临床上真正用于治疗肿瘤的多肽类药物却寥寥可数,原因就在于长期以来对多肽类药物抗肿瘤机制的研究多数仅局限于免疫调节方面,体现不出作用靶点的新颖性和高效性,主要原因就是忽略了肿瘤微环境的动态变化过程。

国内外昆虫药抗肿瘤血管生成的研究报道很少。昆虫是自然界中最大的生物类群,并且具有独特的免疫体系,为开发天然药物提供了一种新的资源。美洲大蠊 *Periplaneta americana* 为昆虫纲有翅亚纲蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫,俗称“蟑螂”,其入药始载于《神农本草经》。蜚蠊科 *Blattidae* 是一个

庞大的昆虫家族,在地球上已生存了 3.2 亿年,与恐龙属同一时代出现的生物。自 20 世纪 70 年代以来,本校课题组对美洲大蠊进行了系列研究<sup>[9-22]</sup>,先后开发了美洲大蠊系列昆虫药品,如康复新、心脉隆、肝龙等,分别用于烧伤、烫伤,急慢性心衰和乙型肝炎。美洲大蠊抗肿瘤研究,除本课题组外未见对美洲大蠊抗肿瘤活性物质进行系统深入研究;国内外其他学者的实验仅仅是停留在利用蟑螂的粗提物(如蟑螂油),或利用蟑螂的全虫体,或将蟑螂的全虫体与其他药物配伍来进行初步的抗肿瘤活性实验。

本课题组前期发现美洲大蠊多肽前体物 C II-3 及脱脂膏的抗 HCC 效果已经明确<sup>[23-24]</sup>,但存在提取率低、成本高、成药性差等缺陷。为了克服这些缺陷,在前期课题组采用了多种分离手段进行多肽/糖肽物质药效组分的分离纯化,通过高效液相、质谱等技术手段现已从 C II-3 分离和鉴定了 13 个多肽分子,命名为美洲大蠊 PAP 系列多肽分子(PAP-1 ~ 13)。本研究以多肽 PAP-1, PAP-2, PAP-3 为实验用药,观察其对入脐静脉内皮细胞 HUVECs 和肝癌细胞 HepG2 的作用,并与脱脂膏, C II-3 进行对比,来探索多肽在抗肝癌血管生成的作用。近年研究证实,沙利度胺有明显的抗血管生成作用,可减少血管生成相关因子(VEGF),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等的分泌<sup>[25]</sup>,故沙利度胺作为本研究的阳性对照药物。

## 1 材料

**1.1 细胞与待测样品** 美洲大蠊多肽 PAP1 ~ 3, 美洲大蠊提取物 C II-3 及美洲大蠊脱脂膏(大理大学昆虫生物医药研究院提供;美洲大蠊脱脂膏的制备,将美洲大蠊全虫干燥后进行粉碎,用 70% 乙醇冷浸提取 3 次,将所得乙醇液进行合并、浓缩、提取获得浸膏,浸膏到脱脂膏的平均收得率为 75.18%<sup>[26]</sup>。美洲大蠊提取物 C II-3 的制备,将美洲大蠊脱脂膏上聚酰胺柱,依次应用水及不同比例的含水甲醇洗脱,定量收集,分别浓缩,冷冻干燥后即为所用样品,所提取物占生药的率为 0.2%<sup>[27]</sup>);人脐静脉内皮细胞 HUVECs 及人肝癌 HepG2 细胞(复苏后传至第 3 代,海博全尔生物科技有限公司)。

**1.2 试剂** 改良伊格尔培养基(DMEM),胎牛血清,胰蛋白酶(澳大利亚 Gibco 公司,批号分别为 1696695, 1205332, 1681700);青霉素链霉素混合液(美国 Millipore 公司,批号 31015-1);二甲亚砜(DMSO,北京索莱宝公司,批号 821D0310);噻唑蓝(MTT),沙利度胺(美国 Sigma 公司,批号分别为

298-93-1, 113M4746V);一抗 VEGF, 兔免疫球蛋白(Ig)G 免疫组织化学法试剂盒(武汉博士德生物有限公司,批号分别为 13CII4098, 11J27C02);人 VEGF 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号 H161129-108a)。

**1.3 仪器** SW-CI-IFD 型医用洁净工作台和 BSC-10000 II A2 二级生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司), NU-5510E 型二氧化碳培养箱(美国 Nuair 公司), CKX41SF 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 225939 型酶标仪(Bio-Teck 公司)。

## 2 方法

**2.1 美洲大蠊多肽的配置** 美洲大蠊多肽(纯度  $\geq 98\%$ ) PAP-1, PAP-2, PAP-3 均用注射用水配置成质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存,保存浓度由本课题组前期实验确定<sup>[23]</sup>,实验时用培养基将药物按倍数稀释到所需浓度即可。

**2.2 细胞培养** 常规培养复苏后传至第 3 代的 HUVECs 及肝癌细胞 HepG2,取对数生长期的细胞进行实验。

**2.3 MTT 比色法检测细胞增殖** 用质量浓度分别为 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的美洲大蠊多肽, C II-3, 脱脂膏进行干预,同时设置 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  沙利度胺组和正常组。按 MTT 比色法实验流程操作。按下式计算细胞抑制率。细胞抑制率  $\text{IR} = (1 - A_{\text{加药组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移** 细胞分为空白组、沙利度胺组、美洲大蠊提取物 PAP-1, PAP-2, PAP-3, C II-3 和脱脂膏组(25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。分组后按细胞划痕实验流程操作。实验重复 3 次,取平均值计算划痕愈合率。划痕愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度  $\times 100\%$ 。

**2.5 小管形成实验检测小管形成能力** 实验分组同 2.4 项。按小管形成实验操作,每组随机选取 5 个视野进行统计。小管形成率 = (1 - 管腔数量加药孔 / 管腔数量对照孔)  $\times 100\%$ 。

**2.6 细胞间黏附实验检测细胞黏附** 按细胞间黏附实验流程进行种板,加入不同浓度 TNF- $\alpha$  刺激 4 h;药物黏附阻断实验时,则再以不同浓度的美洲大蠊提取物继续作用 2 h。在光镜下观察中性红染色后的 HepG2 细胞(棕色细胞)与 HUVECs 细胞黏附情况,并用 MTT 比色法计算黏附率。黏附抑制率 =  $1 - (A_{\text{加药组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**2.7 免疫组化检测蛋白表达** 实验分组同 2.4 项。取对数生长期的 HUVECs 细胞,按照免疫组化步骤

和试剂盒说明进行实验,在倒置显微镜下观察细胞内棕黄色颗粒的数量。

**2.8 ELISA 检测 VEGF 蛋白表达** 实验分组同 2.4 项。取对数生长期的 HUVECs 细胞,按照 ELISA 试剂盒说明书进行试验,并计算样品 VEGF 的浓度。

**2.9 统计学分析** 所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理,数据多组间数据比较采用单因素方差分析;结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为检验水准。数据图表采用 Origin Pro8.6 进行绘制。

### 3 结果

#### 3.1 美洲大蠊提取物对 HUVECs 增殖的影响 与

正常组比较,多肽均能抑制 HUVECs 细胞的增殖,呈时间依赖性,其中以 72 h 存活率最低,抑制率最高(表 1);C II-3 和脱脂膏在一定程度上反而促进 HUVECs 细胞的增殖,也呈时间依赖性。200 mg·L<sup>-1</sup>沙利度胺对细胞的增殖抑制率也呈时间依赖关系。不同浓度的不同提取物分别作用 24,48,72 h 后,PAP1 组,PAP-3 组,C II-3 和脱脂膏组分别与 PAP-2 组比较,细胞的存活率均高于 PAP-2 组,美洲大蠊多肽的作用优于 C II-3 和脱脂膏,多肽中 PAP-2 的作用优于 PAP-1, PAP-3 ( $P < 0.05$ )。

表 1 美洲大蠊多肽对 HUVEC 细胞增殖存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Periplaneta Aamericana polypeptide on HUVEC cell proliferation rate( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

%

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
正常	-	100	100	100
沙利度胺	200	65.14 ± 1.03 <sup>1)</sup>	50.78 ± 0.70 <sup>1)</sup>	40.94 ± 1.53 <sup>1)</sup>
PAP-1	6.25	94.85 ± 0.73 <sup>1,2,4)</sup>	92.86 ± 0.32 <sup>1,2,4)</sup>	89.45 ± 0.73 <sup>1,2,4)</sup>
	12.5	92.22 ± 1.31 <sup>1,4)</sup>	84.58 ± 1.07 <sup>1,2,4)</sup>	81.69 ± 1.03 <sup>1,2,4)</sup>
	25	85.91 ± 0.60 <sup>1,2,4)</sup>	74.99 ± 1.33 <sup>1,2,4)</sup>	66.62 ± 0.53 <sup>1,2,4)</sup>
	50	79.21 ± 0.65 <sup>1,2,4)</sup>	68.41 ± 0.84 <sup>1,2,4)</sup>	54.91 ± 0.32 <sup>1,2)</sup>
	100	70.47 ± 0.31 <sup>1,2,4)</sup>	59.16 ± 0.72 <sup>1,2,4)</sup>	47.32 ± 1.34 <sup>1,2,4)</sup>
PAP-2	6.25	92.32 ± 0.48 <sup>1,2)</sup>	89.96 ± 1.39 <sup>1,2)</sup>	84.69 ± 1.32 <sup>1,2)</sup>
	12.5	89.07 ± 0.79 <sup>1,2)</sup>	81.47 ± 0.76 <sup>1,2)</sup>	74.70 ± 1.39 <sup>1,2)</sup>
	25	83.37 ± 0.45 <sup>1,2)</sup>	72.97 ± 0.27 <sup>1,2)</sup>	64.53 ± 1.36 <sup>1,2)</sup>
	50	75.43 ± 1.01 <sup>1,2)</sup>	66.09 ± 0.67 <sup>1,2)</sup>	53.24 ± 0.64 <sup>1,2)</sup>
	100	67.54 ± 0.37 <sup>1,2)</sup>	54.24 ± 1.39 <sup>1,2)</sup>	42.02 ± 0.63 <sup>1)</sup>
PAP-3	6.25	95.58 ± 0.32 <sup>1,2,4)</sup>	93.29 ± 0.13 <sup>1,2,4)</sup>	86.24 ± 0.39 <sup>1,2,3)</sup>
	12.5	90.85 ± 1.09 <sup>1,2,4)</sup>	83.38 ± 0.37 <sup>1,2,4)</sup>	75.58 ± 0.15 <sup>1,2,3)</sup>
	25	85.06 ± 0.48 <sup>1,2,4)</sup>	78.90 ± 1.65 <sup>1,2,3,4)</sup>	68.43 ± 0.99 <sup>1,2,3)</sup>
	50	78.11 ± 0.82 <sup>1,2,4)</sup>	68.64 ± 0.18 <sup>1,2,4)</sup>	59.72 ± 0.43 <sup>1,2,3,4)</sup>
	100	68.74 ± 0.56 <sup>1,2,4)</sup>	58.03 ± 0.74 <sup>1,2,4)</sup>	47.88 ± 1.45 <sup>1,2,4)</sup>
C II-3	6.25	96.08 ± 0.69 <sup>1,2,3,4)</sup>	103.69 ± 1.00 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	100.35 ± 0.93 <sup>2,3,4,5)</sup>
	12.5	96.34 ± 0.78 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	103.45 ± 1.11 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	102.91 ± 0.67 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	25	99.30 ± 0.30 <sup>1,3,4,5)</sup>	102.72 ± 1.17 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	111.84 ± 1.86 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	50	99.48 ± 0.69 <sup>1,3,4,5)</sup>	104.11 ± 1.31 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	114.66 ± 1.31 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	100	109.66 ± 1.71 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	109.55 ± 1.27 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	136.31 ± 1.07 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
脱脂膏	6.25	97.82 ± 0.66 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	103.63 ± 0.64 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	102.56 ± 0.96 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	12.5	98.52 ± 0.54 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	103.32 ± 1.47 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	114.49 ± 1.61 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	25	98.78 ± 0.40 <sup>2,3,4,5)</sup>	111.55 ± 0.91 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	122.17 ± 0.53 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	50	100.52 ± 0.94 <sup>2,3,4,5)</sup>	111.68 ± 0.48 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	125.88 ± 2.56 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	100	113.14 ± 1.18 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	112.88 ± 1.06 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	139.84 ± 1.10 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>

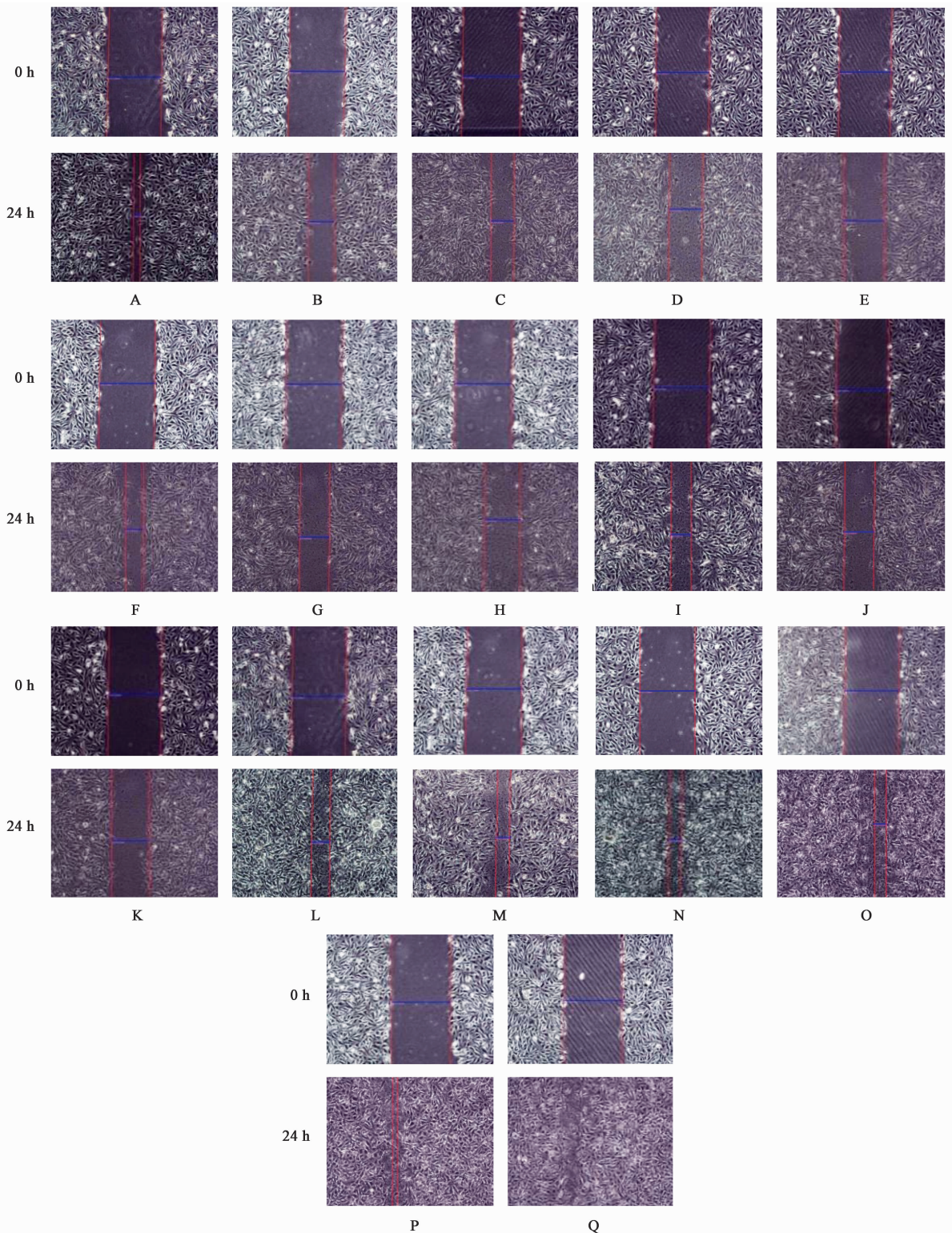
注:与正常组同时间比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,与沙利度胺组同时间比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 PAP-1 组同时间比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与 PAP-2 组同时间比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ;与 PAP-3 组同时间比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ ;与 CII-3 组同时间比较<sup>6)</sup>  $P < 0.05$ (表 2,3,5 ~ 7 同)。

**3.2 美洲大蠊提取物对 HUVECs 细胞迁移抑制的影响** 划痕 24 h 后,HUVECs 发生了明显迁移,与 0 h

比较明显变窄,说明细胞在划痕后愈合能力强。经过美洲大蠊提取物和沙利度胺干预 24 h 后,HUVECs 的

迁移距离均明显减小,划痕愈合率逐渐减小。与正常组、沙利度胺组比较,各多肽组 HUVECs 的划痕愈合率明显减小,抑制率具有浓度依赖性,CII-3 和脱脂膏随着浓度的增加,划痕愈合率逐渐增大。与 PAPI

组,PAP-3 组,CII-3 和脱脂膏组比较,PAP-2 组划痕后愈合率最低 ( $P < 0.05$ ),美洲大蠊多肽的作用优于 CII-3 和脱脂膏,多肽中 PAP-2 的作用优于 PAP-1, PAP-3。见图 1,表 2。



A. 空白组;B. 沙利度胺组;C ~ E. PAP-1 (25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组;F ~ H. PAP-2 (25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组;I ~ K. PAP-3 (25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组;L ~ N. C II-3 (25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组;O ~ Q. 脱脂膏 (25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组 (图 2, 4, 5 同)

图 1 美洲大蠊提取物对 HUVECs 划痕愈合的影响 (倒置显微镜,  $\times 40$ )

Fig. 1 Effect of extracts from *Periplaneta Americana* on HUVECs scratch healing (inverted microscope,  $\times 40$ )

表 2 美洲大蠊提取物对 HUVECs 细胞迁移的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of extracts from *Periplaneta Americana* on HUVECs migration( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	愈合率/%
正常	-	91.47 ± 1.37
沙利度胺	200	55.68 ± 3.64 <sup>1)</sup>
PAP-1	25	68.56 ± 1.43 <sup>1,2,4)</sup>
	50	43.84 ± 3.41 <sup>1,2,4)</sup>
	100	32.82 ± 3.44 <sup>1,2,4)</sup>
PAP-2	25	56.40 ± 1.72 <sup>1)</sup>
	50	38.87 ± 1.08 <sup>1,2)</sup>
	100	27.77 ± 2.48 <sup>1,2)</sup>
PAP-3	25	64.35 ± 3.03 <sup>1,2,3,4)</sup>
	50	51.18 ± 0.27 <sup>1,3,4)</sup>
	100	34.97 ± 3.07 <sup>1,2,4)</sup>
CII-3	25	72.37 ± 0.63 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	50	75.13 ± 0.37 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	100	81.98 ± 0.70 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
脱脂膏	25	79.28 ± 1.29 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	50	93.19 ± 0.23 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	100	99.78 ± 0.25 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>

### 3.3 美洲大蠊对 HUVECs 分化形成小管能力的影响

观察 HUVECs 的小管形成情况,正常组管腔清晰可见,管腔结构完整,形成管腔数目多。而经过沙利度胺和多肽处理后,管腔的结构明显减少,而 CII-3 和脱脂膏处理后效果并不显著。与正常组比较,经过多肽作用后,小管生成率明显降低,抑制率呈浓度依赖性。CII-3 和脱脂膏作用后发生相反作用。PAP1 组, PAP-3 组, CII-3 和脱脂膏组分别与 PAP-2 组比较, PAP-2 组管腔结构较不完整,形成管腔数目较少,美洲大蠊多肽的作用优于 CII-3 和脱脂膏,多肽中 PAP-2 的作用优于 PAP-1, PAP-3 ( $P < 0.05$ )。见图 2, 表 3。

### 3.4 美洲大蠊对 HepG2 同 HUVECs 细胞间黏附的影响

#### 3.4.1 TNF- $\alpha$ 刺激后 HepG2 同 HUVECs 间的黏附

实验发现,与正常组比较,随着 TNF- $\alpha$  浓度的不断增加,肝癌细胞 HepG2 与 HUVECs 黏附强度逐渐增大,即棕色的细胞数量增加,但是当浓度达到  $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,黏附强度已达饱和 ( $P < 0.05$ ),再增加 TNF- $\alpha$  的浓度,棕色细胞数量减少,黏附强度反而下降,故选取  $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  刺激 HepG2

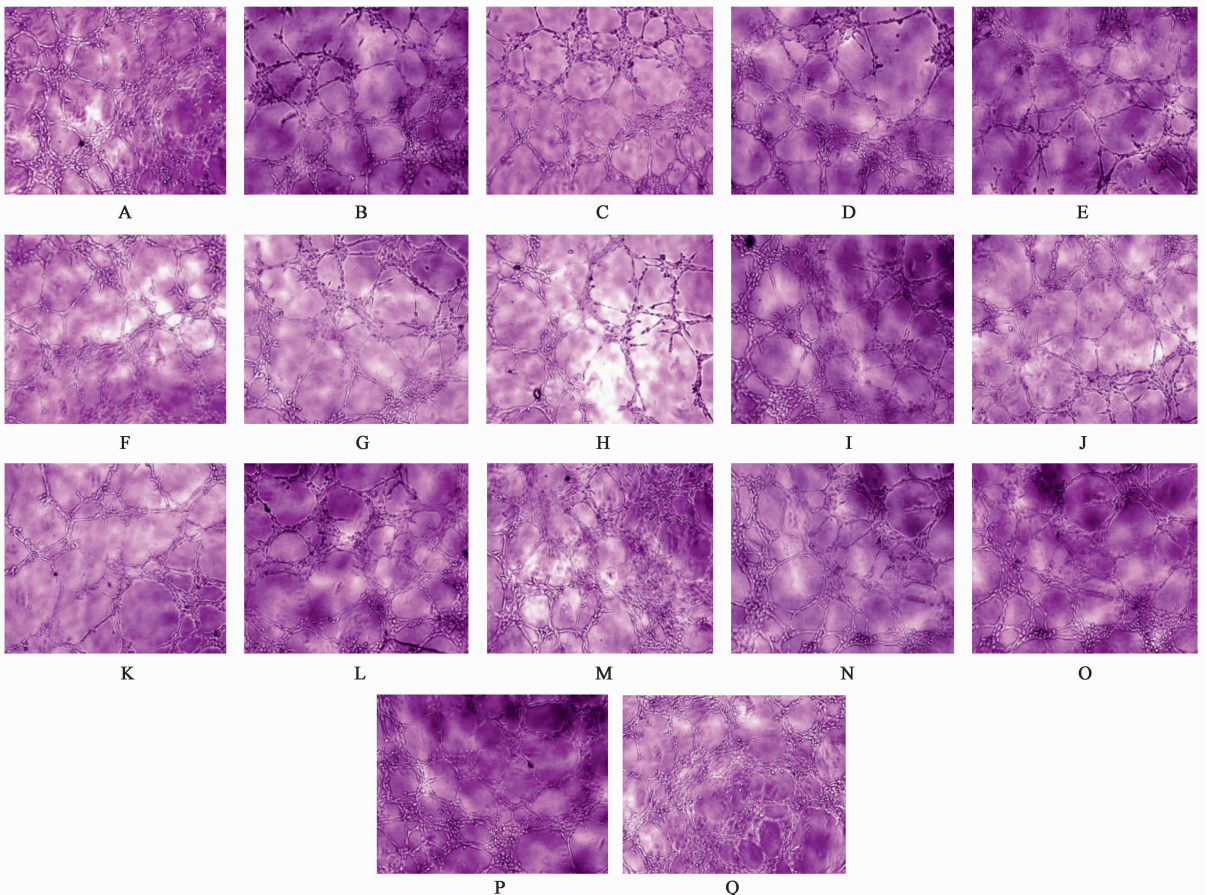


图 2 美洲大蠊提取物对小管形成的影响(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Fig. 2 Effect of extracts from *Periplaneta Americana* on tube formation of HUVECs (inverted microscope,  $\times 40$ )

表 3 美洲大蠊提取物对 HUVECs 小管形成能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 3 Effect of extracts from *Periplaneta Americana* on tube formation ability of HUVECs( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	管腔数目	小管生成率/%
正常	-	33.67 ± 1.53	100.00 ± 4.54
沙利度胺	200	23.67 ± 1.57 <sup>1)</sup>	70.30 ± 4.54
PAP-1	25	26.32 ± 2.50 <sup>1,4)</sup>	78.22 ± 4.50
	50	21.68 ± 2.08 <sup>1,4)</sup>	64.36 ± 6.18
	100	15.90 ± 1.73 <sup>1,2,4)</sup>	45.53 ± 5.38
PAP-2	25	22.00 ± 2.01 <sup>1)</sup>	65.34 ± 5.94
	50	17.21 ± 1.98 <sup>1,2)</sup>	50.49 ± 5.05
	100	11.67 ± 1.54 <sup>1,2)</sup>	34.65 ± 4.54
PAP-3	25	25.33 ± 2.53 <sup>1,4)</sup>	75.25 ± 6.27
	50	21.34 ± 1.16 <sup>1,4)</sup>	63.37 ± 3.43
	100	15.76 ± 0.58 <sup>1,2,4)</sup>	46.54 ± 1.71
CII-3	25	26.70 ± 1.49 <sup>1,4,5)</sup>	79.21 ± 4.53
	50	32.00 ± 2.24 <sup>2,3,4,5)</sup>	95.05 ± 5.94
	100	37.34 ± 2.52 <sup>2,3,4,5)</sup>	110.89 ± 7.10
脱脂膏	25	30.33 ± 1.27 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	90.10 ± 4.54
	50	38.00 ± 2.13 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	112.87 ± 5.16
	100	41.67 ± 2.27 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	123.76 ± 4.59

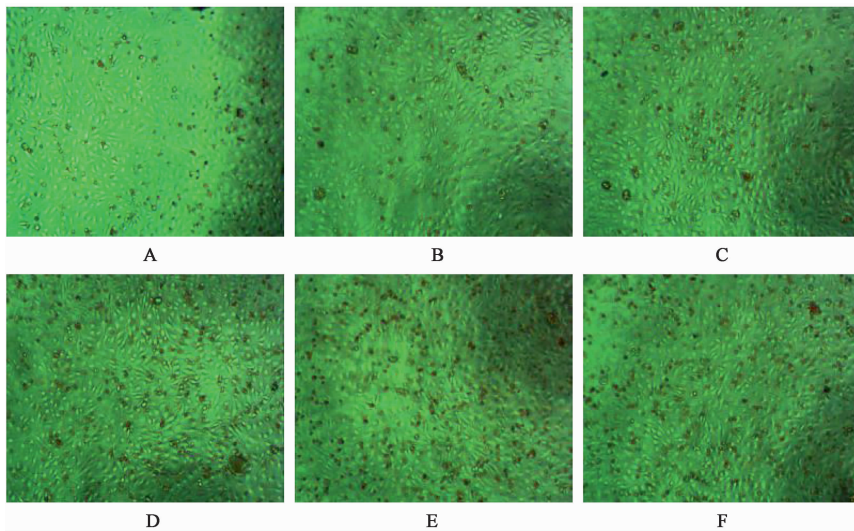
同 HUVECs 细胞间的黏附,见表 4,图 3。

表 4 TNF- $\alpha$  对 HUVECs 与 HepG2 黏附作用的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 4 Effect of TNF- $\alpha$  on adhesion between HUVECs and HepG2( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	黏附率/%
正常	-	100.00 ± 1.51
TNF- $\alpha$	2.5	123.00 ± 0.60 <sup>1)</sup>
	5	130.40 ± 0.92 <sup>1)</sup>
	10	136.20 ± 1.59 <sup>1)</sup>
	20	172.40 ± 3.02 <sup>1)</sup>
	40	148.60 ± 0.93 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.4.2 美洲大蠊多肽对 HepG2 与 HUVECs 间黏附的影响** 与正常组比较,沙利度胺处理可降低细胞间黏附率,中性红染色后呈棕色的 HepG2 细胞减少。不同浓度多肽处理后,黏附率明显降低,且随着多肽浓度的增加,黏附率越小,呈浓度依赖性(图 4)。结果显示,多肽均能减弱两细胞之间的黏附,视野下棕色细胞均减少。C II-3 和脱脂膏对细胞间黏附作用不明显,且随浓度增大,黏附率反而增大,见表 5。多肽减弱两细胞之间的黏附作用强于 C II-3



A. 正常组;B~F. TNF- $\alpha$  (2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组

图 3 TNF- $\alpha$  对 HepG2 与 HUVECs 间的黏附的影响(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Fig. 3 Effect of different concentrations of TNF- $\alpha$  on adhesion between HUVECs and HepG2(inverted microscope,  $\times 40$ )

和脱脂膏。与 PAP1 组, PAP-3 组, C II-3 和脱脂膏组比较, PAP-2 组视野下棕色细胞较少,细胞间黏附率最低,美洲大蠊多肽的作用优于 C II-3 和脱脂膏,多肽中 PAP-2 的作用优于 PAP-1, PAP-3 ( $P < 0.05$ )。

**3.5 美洲大蠊提取物对 HUVECs 上清中 VEGF 的影响** 与正常组比较,经不同药物处理 24 h 后, HUVECs 细胞培养上清液中 VEGF 的浓度显著降低。且多肽浓度越大, VEGF 浓度越小,多肽抑制 HUVECs 分泌 VEGF 作用具有浓度依赖性,见表 6。

表 5 美洲大蠊提取物对 HepG2 与 HUVECs 间黏附率的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of extracts from *Periplaneta Americana* on adhesion between HUVECs and HepG2 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	黏附率/%
正常	-	100.00 $\pm$ 0.69
沙利度胺	200	65.29 $\pm$ 0.77 <sup>1)</sup>
PAP-1	25	72.97 $\pm$ 0.89 <sup>1,2,4)</sup>
	50	54.84 $\pm$ 0.51 <sup>1,2,4)</sup>
	100	41.82 $\pm$ 1.02 <sup>1,2,4)</sup>
PAP-2	25	68.52 $\pm$ 1.09 <sup>1,2)</sup>
	50	52.28 $\pm$ 0.84 <sup>1,2)</sup>
	100	34.49 $\pm$ 1.39 <sup>1,2)</sup>
PAP-3	25	70.74 $\pm$ 0.33 <sup>1,2,3,4)</sup>
	50	58.73 $\pm$ 0.68 <sup>1,2,3,4)</sup>
	100	44.38 $\pm$ 0.67 <sup>1,2,3,4)</sup>
C II -3	25	76.42 $\pm$ 0.67 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	50	85.09 $\pm$ 1.53 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	100	102.56 $\pm$ 1.90 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
脱脂膏	25	81.09 $\pm$ 1.73 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	50	98.07 $\pm$ 0.84 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	100	109.68 $\pm$ 1.17 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>

但随着 CII-3 和脱脂膏浓度的增大,VEGF 表达反而增加。与 24 h 比较,不同药物处理 48 h 后,上清液中 VEGF 的浓度明显升高,说明随着时间延长,HUVECs 分泌的 VEGF 增多。实验结果表明多肽对抑制 HUVECs 分泌 VEGF 的作用优于 CII-3 和脱脂膏( $P < 0.05$ ),其中,25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PAP-2 和 PAP-3 下调 VEGF 优于 PAP-1( $P < 0.05$ ),50,100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3 个多肽对 VEGF 的作用无显著性差异。综合 24,48 h 的结果可得,美洲大蠊多肽的作用优于 CII-3 和脱脂膏,多肽中 PAP-2 的作用优于 PAP-1 和 PAP-3。

**3.6 美洲大蠊提取物对细胞中 VEGF 蛋白表达的影响** VEGF 蛋白表达于 HUVECs 细胞浆,未加药的正常组的 VEGF 染色阳性细胞多,染色呈棕黄色颗粒。不同剂量多肽和沙利度胺作用后,细胞浆中棕黄色颗粒减少,阳性细胞数减少,VEGF 蛋白表达降低。且随着多肽浓度的增加,VEGF 的表达也逐渐减少(图 5)。而经过 C II -3 和脱脂膏作用后,出现相反作用,说明美洲大蠊 C II -3 和脱脂膏能促进 HUVEC 细胞中 VEGF 蛋白的表达。PAP1 组,PAP-3 组,C II -3 和脱脂膏组分别与 PAP-2 组比较,PAP-2 组视野下棕黄色颗粒减少程度最大,美洲大蠊多肽

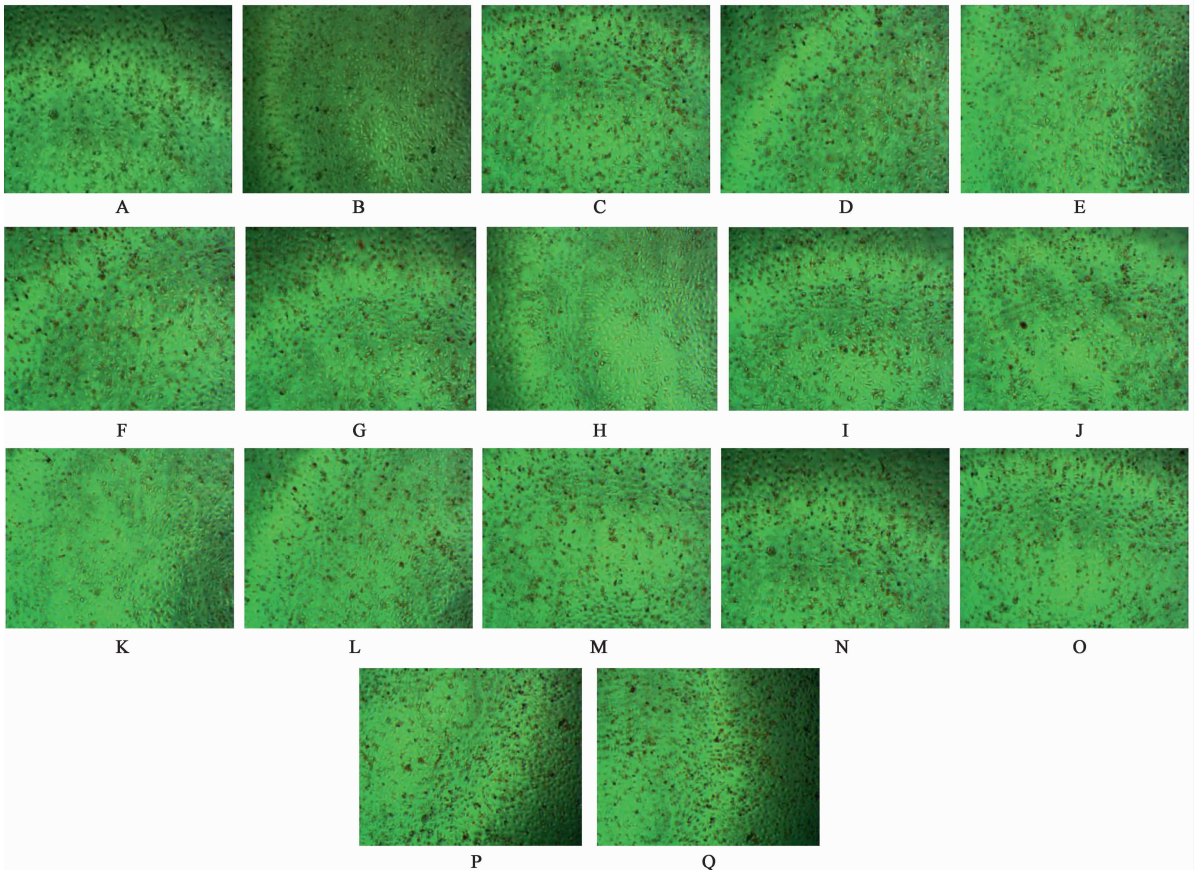


图 4 美洲大蠊提取物对 HepG2 与 HUVECs 间黏附的影响(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Fig. 4 Effect of extracts from *Periplaneta Americana* on adhesion between HUVECs and HepG2 (inverted microscope,  $\times 40$ )

表 6 美洲大蠊提取物对 HUVECs 细胞上清液中 VEGF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of extracts from *Periplaneta Americana* on VEGF expression in supernatant of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
正常	-	466.00 $\pm$ 20.14	530.79 $\pm$ 20.00
沙利度胺	200	311.09 $\pm$ 16.12 <sup>1)</sup>	425.05 $\pm$ 14.17 <sup>1)</sup>
PAP-1	25	410.71 $\pm$ 17.31 <sup>1,2,4)</sup>	521.51 $\pm$ 5.67 <sup>2,4)</sup>
	50	354.15 $\pm$ 18.50 <sup>1,4)</sup>	488.79 $\pm$ 13.73 <sup>2)</sup>
	100	337.47 $\pm$ 3.28 <sup>1,4)</sup>	466.21 $\pm$ 12.24 <sup>1)</sup>
PAP-2	25	341.48 $\pm$ 20.89 <sup>1)</sup>	471.28 $\pm$ 7.46 <sup>1,2)</sup>
	50	326.71 $\pm$ 6.57 <sup>1)</sup>	468.32 $\pm$ 17.60 <sup>1)</sup>
	100	312.99 $\pm$ 2.69 <sup>1)</sup>	455.45 $\pm$ 8.36 <sup>1)</sup>
PAP-3	25	342.75 $\pm$ 11.94 <sup>1,3)</sup>	492.38 $\pm$ 3.88 <sup>2)</sup>
	50	328.61 $\pm$ 7.46 <sup>1)</sup>	486.68 $\pm$ 14.32 <sup>1,2)</sup>
	100	326.92 $\pm$ 16.42 <sup>1)</sup>	474.65 $\pm$ 8.05 <sup>1,2)</sup>
C II -3	25	371.66 $\pm$ 6.11 <sup>1,2)</sup>	513.07 $\pm$ 0.89 <sup>2,3,4,5)</sup>
	50	408.60 $\pm$ 18.50 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	561.18 $\pm$ 18.21 <sup>2,3,4,5)</sup>
	100	432.23 $\pm$ 7.76 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>	601.28 $\pm$ 11.04 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
脱脂膏	25	388.55 $\pm$ 9.25 <sup>1) 2,4,5)</sup>	586.51 $\pm$ 11.94 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	50	427.38 $\pm$ 6.86 <sup>2,3,4,5)</sup>	617.96 $\pm$ 17.619 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	100	464.10 $\pm$ 14.03 <sup>2,3,4,5,6)</sup>	683.80 $\pm$ 9.85 <sup>1,2,3,4,5)</sup>

的作用优于 C II -3 和脱脂膏,多肽中 PAP-2 的作用优于 PAP-1, PAP-3 ( $P < 0.05$ )。见表 7。

#### 4 讨论

肿瘤血管生成是一个多因素参与的复杂病理过程,受血管生成促进因子和血管生成抑制因子的双重调控。正常情况下,血管生成促进因子和抑制因子之间处于一个平衡状态,血管生成不被启动。一旦它们之间的平衡信号被破坏,就会引起肿瘤血管生成“开关”趋向开启,使得肿瘤组织内不断形成新的血管,从而促进肿瘤生长和转移<sup>[28-29]</sup>。

HCC 是一种典型的富血管性肿瘤,新生血管的形成与肝癌生长、侵袭、转移有着密切的关系。VEGF 作为一种重要的血管生成促进因子,通过与 VEGF 受体 [VEGFR, 主要包括受体-1 (Fit-1) 和受体 2 (KDR)] 结合,激活 HCC 细胞内信号传导通路,释放各种生长因子和细胞因子,促进内皮细胞的增殖与迁移,最终促进血管形成。VEGF 信号传导通路作用机制十分复杂,包括激活内皮细胞、促进内皮细胞增殖分化、抑制内皮细胞凋亡、改变血管通透性、诱导基底膜降解及促进肿瘤血管侵袭和转移等<sup>[30]</sup>。因此,通过阻断新生血管的形成可以控制

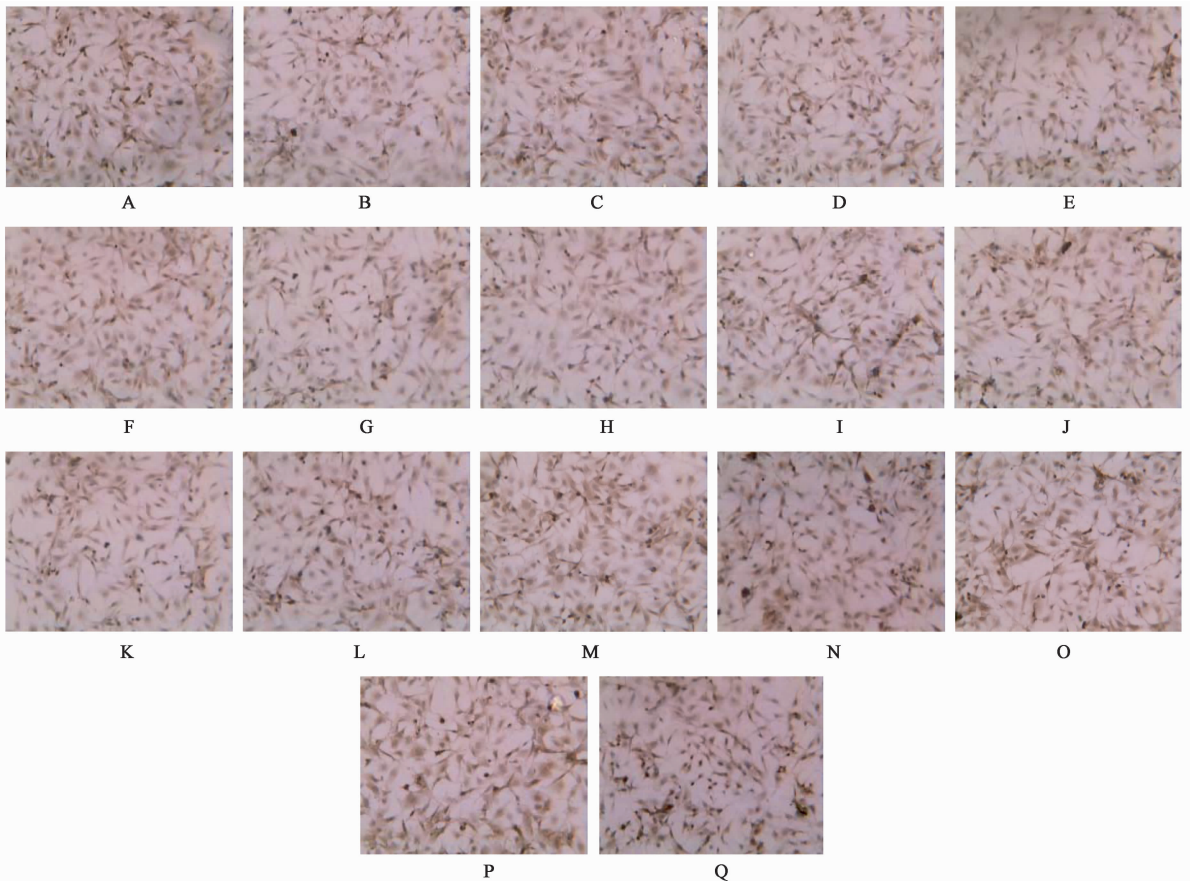


图 5 美洲大蠊多肽提取物对 HUVECs 细胞内 VEGF 蛋白表达的影响 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 5 Effect of extract from *Periplaneta Americana* on expression of VEGF protein in HUVECs (IHC,  $\times 200$ )

表 7 美洲大蠊多肽提取物对 HUVECs 细胞内 VEGF 蛋白表达 IA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of extract from *Periplaneta Americana* on VEGF protein expression IA in HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	VEGF
正常	-	0.48 ± 0.02
沙利度胺	200	0.34 ± 0.02 <sup>1)</sup>
PAP-1	25	0.42 ± 0.02 <sup>1,2,4)</sup>
	50	0.35 ± 0.03 <sup>1,4)</sup>
	100	0.26 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>
PAP-2	25	0.38 ± 0.02 <sup>1,2)</sup>
	50	0.31 ± 0.02 <sup>1,2)</sup>
	100	0.23 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>
PAP-3	25	0.41 ± 0.02 <sup>1,2,4)</sup>
	50	0.35 ± 0.02 <sup>1,4)</sup>
	100	0.27 ± 0.02 <sup>1,2,4)</sup>
C II -3	25	0.41 ± 0.02 <sup>2,4)</sup>
	50	0.50 ± 0.02 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
	100	0.57 ± 0.03 <sup>1,2,3,4,5)</sup>
脱脂膏	25	0.52 ± 0.02 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	50	0.61 ± 0.02 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>
	100	0.69 ± 0.01 <sup>1,2,3,4,5,6)</sup>

肿瘤生长,其中最有效的途径是阻断 VEGF 信号通路,而目前阻断 VEGF 通路从而抑制肿瘤生长已在临床前模型上得到证实<sup>[31]</sup>。于是,越来越多靶向于肿瘤血管生成的药物逐渐成为抗肿瘤研究的热点,同时也是目前治疗肿瘤具有前景的新策略<sup>[32]</sup>。本课题组在体内实验<sup>[24]</sup>已初步发现,美洲大蠊提取物 C II -3 对 H22 肝癌移植瘤有一定的抑制作用,其抑制机制可能与下调 VEGF 在荷瘤鼠体内的表达有关,表明 C II -3 在某种程度上具有一定的抗肿瘤血管新生作用。此外也有研究表明美洲大蠊提取物脱脂膏和 C II -3 对多株人肿瘤细胞都存在较好的抑制作用<sup>[33-36]</sup>。美洲大蠊多肽 PAP 是美洲大蠊抗肿瘤部位 C II -3 的基本组分。

本研究显示,美洲大蠊多肽体外能降低 HUVECs 的存活率,抑制 HUVECs 细胞迁移,但是 C II -3 和脱脂膏一定程度上却是促进 HUVECs 细胞的增殖和迁移。小管形成实验和细胞间黏附实验结果表明,美洲大蠊多肽 PAP-1, PAP-2, PAP-3 能抑制 HUVECs 小管形成,同时也能抑制 HepG2 同 HUVECs 细胞之间黏附,且随着剂量的增大,抑制作用越强。相反,美洲大蠊 C II -3 和脱脂膏一定程度

上促进 HUVECs 细胞小管的形成和促进 HepG2 同 HUVECs 间黏附。美洲大蠊多肽 PAP-1, PAP-2, PAP-3 能下调 HUVECs 细胞中 VEGF 的表达,呈浓度依赖性。而美洲大蠊 C II -3 和脱脂膏能上调 HUVECs 细胞中 VEGF 的表达,且脱脂膏的上调作用强于 C II -3。

美洲大蠊多肽不仅具有体外抗肿瘤增殖的活性,也能降低血管内皮细胞功能活性,阻断体内外血管生成的过程。而美洲大蠊 C II -3 和脱脂膏不仅对于血管内皮细胞的功能无抑制作用,反而会上调 VEGF 表达促进体内外血管形成。出现这种情况的原因可能是因为,美洲大蠊 C II -3 和脱脂膏本身并不是单体,仅仅是从美洲大蠊中得到的活性部位,或许其中还含有一些物质能促进血管生成。于是,美洲大蠊多肽是分离出来的小分子肽类,结构中含有抗血管生成相关的结构,因此进行美洲大蠊多肽抗肝癌血管生成的研究是非常必要的。

综上所述,美洲大蠊多肽 PAP-1, PAP-2, PAP-3 体外不仅可以抑制 HUVECs 增殖、迁移和小管形成,抑制 HepG2 与 HUVECs 的黏附,还能下调 VEGF 的表达。这一结论为美洲大蠊多肽抗血管生成临床应用提供了理论基础,开辟了新的应用领域。

[参考文献]

[1] Salgia R, Singal A G. Hepatocellular carcinoma and other liver lesions[J]. Med Clin North Am, 2014, 98 (1):103-118.

[2] WU C H, LAN C H, WU K L, et al. Hepatocellular carcinoma-targeted nanoparticles for cancer therapy[J]. Int J Oncol, 2018, 52(2):389-401.

[3] XIONG Y X, REN L, WANG Z Q, et al. The role of angiogenesis inhibitors re-challenge in colorectal cancer previously treated with bevacizumab: a Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(7):1489-1494.

[4] 杨传玉,曾荣耀,刘荣亮,等. 姜黄素对化学诱导大鼠肝癌缺氧模型血管生成的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(2):137-141.

[5] 赵川,李俊莹,刘雪梅,等. 肿瘤血管生成机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2017,35(1):130-132.

[6] 章凡,张献全,钱程. Foxg1 抑制肝癌细胞血管形成及其机制[J]. 第三军医大学学报,2018, 40(6):494-499.

[7] 张艳,刘威,李军红,等. 鱼藤素对胆管癌 TFK-1 细胞诱导肿瘤新生血管生成的抑制作用[J]. 中国实用医刊,2016,43(11):31-34.

- [ 8 ] 唐国建,沈璇,李长福. 肿瘤血管生成与肝癌的研究进展[J]. 中国社区医师,2017,33(10):9-10.
- [ 9 ] 杜光明,赵元贵,金荣敏,等. 康复新对虚证老人的超氧化物歧化酶细胞免疫临床及实验研究[J]. 云南中医杂志,1989,10(3):32-33.
- [10] 胡艳芬,吕小满,王玉梅,等. 美洲大蠊药用价值研究进展[J]. 医学综述,2008,14(18):2822-2824.
- [11] 焦春香,刘光明,周萍. 天然药物康复新的研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(11):2623-2624.
- [12] 甘平,张旭强,何旭,等. 美洲大蠊醇提物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 现代药物与临床,2011,26(2):123-128.
- [13] 杜一民,陈鸿珊,李树楠,等. 治疗乙型肝炎新药肝龙胶囊的药效学初步研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(8):1369-1371.
- [14] 李武,段丽芳,何贵清,等. 美洲大蠊提取物对实验性肝纤维化的影响[J]. 时珍国医国药,2010,21(5):1137-1138.
- [15] 谢荣慧,刘云华,赵玉蓉. 肝龙胶囊治疗慢性乙型肝炎疗效分析[J]. 中西医结合肝病杂志,2003,13(16):366-366.
- [16] 杨永荣,缪新权,梅光涛,等. 肝龙胶囊治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎的疗效观察[J]. 云南医药,2008,29(2):182-183.
- [17] 马家骅,蒋巧梅,徐华,等. 美洲大蠊抗 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤作用的研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(3):79-80.
- [18] 高永翔,扈晓宇,钟森,等. 蟑螂提取物抗肝损伤及抗病毒作用探讨[J]. 国际中医中药杂志,2006,28(3):155-158.
- [19] 何正春,彭芳,宋丽艳,等. 美洲大蠊化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2326-2331.
- [20] 吴少辉,彭芳,高鹏飞,等. 膜超滤分离美洲大蠊抗肿瘤活性部位小分子肽的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(4):2041-2042,2089.
- [21] 胡艳芬,吕小满,刘光明,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人肺癌细胞的体外抑制作用[J]. 大理学院学报,2009,8(12):1-3.
- [22] 何旭,普小菲,李娇,等. 美洲大蠊提取物对 S180 荷瘤小鼠肿瘤抑制作用及免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):179-182.
- [23] 张蕊,袁发璐,李婷,等. 美洲大蠊提取物对人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞的作用机制研究[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(12):1-8.
- [24] 陈俊雅,耿玲,张旭强,等. 美洲大蠊提取物 C II-3 对 H22 肝癌小鼠血管生成作用的研究[J]. 肿瘤学杂志,2012,18(4):274-276.
- [25] 孙珺,白倩,周红梅. 沙利度胺抗肿瘤血管生成的作用[J]. 临床口腔医学杂志,2009,25(6):379-380.
- [26] 普小菲,罗亦佳,彭丽,等. 美洲大蠊提取物 C II-3 体内抗 HSV-2 实验研究[J]. 大理学院学报,2014,13(10):5-9.
- [27] 李洪文,耿玲,刘光明,等. 美洲大蠊脱脂膏及其活性炭脱色物体外抗菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):159-161.
- [28] 王绍钧,王锐,朱冬波. 实体瘤靶向药物的研究进展[J]. 中国药房,2017,28(8):1149-1152.
- [29] 杨传玉,刘荣亮,柯恩明,等. 小管形成实验在肿瘤微血管形成中的应用研究[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(4):634-637.
- [30] 张东梅,卿晨. 血管内皮生长因子家族及其受体与肿瘤血管新生[J]. 医学综述,2017,23(3):417-420,427.
- [31] 袁扬,赵凯,卢娜. VEGF/VEGFR 信号通路及其相关抑制剂研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(26):74-75,77.
- [32] Scartozzi M, Vincent L, Chiron M, et al. Aflibercept, a new way to target angiogenesis in the second line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) [J]. Targeted Oncol, 2016, 11(4):489-500.
- [33] 何正春,王晓雨,胡明辉,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人体呼吸系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 中国现代药物应用,2009,3(7):1-2.
- [34] 何正春,胡明辉,王晓雨,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人及小鼠白血病细胞的细胞毒性研究[J]. 云南中医中药杂志,2009,30(5):56-57.
- [35] 何正春,王晓雨,杨雷香,等. 美洲大蠊提取物对 3 株消化系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 中国药业,2009,18(9):11-12.
- [36] 何正春,王晓雨,杨雷香,等. 美洲大蠊提取物对 3 株人体生殖系统肿瘤细胞的细胞毒性研究[J]. 西北药理学杂志,2009,24(4):271-272.

[责任编辑 张丰丰]