

苦参碱对人肺癌 A549 细胞增殖、侵袭和血管生成的抑制作用及其机制研究

卓新风¹, 姬颖华²

1. 新乡市中医院 药剂科, 河南 新乡 453000

2. 新乡医学院第一附属医院 肿瘤科, 河南 新乡 453000

摘要: **目的** 探讨苦参碱对肺癌 A549 细胞增殖、侵袭和血管生成抑制作用以及其作用机制。**方法** 不同浓度苦参碱组加入到 A549 人肺癌细胞株中, 利用 ELISA 法研究了苦参碱对 EGFR-TPK 的抑制作用, 利用 MTT 法测定苦参碱对 A549 细胞的抑制作用, Transwell 法检测苦参碱对肺癌 A549 细胞侵袭的抑制作用, 酶标仪法检测苦参碱对细胞凋亡蛋白 caspase 3 活性的影响, Western blotting 法检测苦参碱存在下 A549 中 VEGF、HIF-1 α 的表达。**结果** 苦参碱对 EGFR-TPK 半数抑制率为 $11.26 \pm 1.02 \mu\text{mol/L}$, 对肺癌 A549 细胞生长 IC_{50} 为 $30.45 \pm 3.02 \mu\text{mol/L}$, 都具有良好的抑制能力, 但对于 MRC-5 细胞表现了较低的毒性; 苦参碱与对照组相比能够诱导肿瘤细胞穿过人工基底膜的数量减少, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 苦参碱能显著提高 A549 中凋亡蛋白 caspase 3 活性 ($P < 0.05$); 苦参碱能够下调 HIF-1 α 和 VEGF 的表达。**结论** 苦参碱可降低 EGFR-TPK 活性和 HIF-1 α 、VEGF 的表达, 激活 caspase 3 活性, 对肺癌肿瘤 A549 细胞的侵袭、增殖和血管生成产生抑制作用。

关键词: 苦参碱; A549 细胞; 抑制作用; 血管生成; caspase 3 活性; HIF-1 α 表达; VEGF 表达

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2017)05 - 0767 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.05.003

Inhibition of matrine against proliferation, invasion and angiogenesis of lung cancer tumor A549 cell and its mechanism

ZHUO Xin-feng¹, JI Ying-hua²

1. Department of Pharmacy, Xinxiang Hospital of Traditional Chinese Hospital, Xinxiang 453000, China

2. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

Abstract: Objective To study the inhibition of matrine on proliferation, invasion, and angiogenesis of A549 lung cancer tumor cells, and explore its mechanisms. **Methods** Matrine with various concentration was added to human lung cancer A549 cell line. The inhibitory effect of matrine against EGFR-TPK was investigated by ELISA method, the inhibitory rate of matrine against A549 was determined by MTT method, and inhibitory effect of matrine on invasion of lung cancer A549 cells was studied by Transwell assay. The effect of matrine on the activity of apoptotic protein caspase 3 was detected by enzyme labeling method, and finally the effect of matrine on expression of angiogenesis related protein VEGF and HIF-1 α of A549 tumor cells were discussed. **Results** Matrine has good restrain ability on EGFR-TPK and A549 cells with IC_{50} of (11.26 ± 1.02) and $(30.45 \pm 3.02) \mu\text{mol/L}$, but showed low toxicity for MRC-5 cells. Compared with the control group, matrine could induce the number of tumor cells to pass through the artificial basement membrane, with significant difference between two groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, matrine could significantly increase caspase 3 activity of A549 ($P < 0.05$), and the expression of angiogenesis related protein VEGF and HIF-1 α of A549 tumor cells were down-regulated. **Conclusion** Matrine can reduce the activity of EGFR-TPK and the expression of HIF-1 and VEGF, activate the activity of caspase 3, and inhibit the invasion, proliferation and angiogenesis of lung cancer A549 cells.

Key words: matrine; A549 tumor cells; inhibitory effect; angiogenesis; caspase 3 activity; HIF-1 α expression; VEGF expression

肺癌是全球癌症患病率、死亡率最高的肿瘤^[1]。长抑制的研究不断涌出, 但预后仍然很差, 化疗的虽然在攻克肺癌研究的几十年间, 对于癌细胞的生 耐药性依然严重, 因此寻求特异性的靶点治疗越来越

收稿日期: 2016-12-26

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (201203068)

作者简介: 卓新风 (1966—), 女, 河南省新乡市人, 副主任药师, 本科, 研究方向: 中药药理。Tel: 15690799151 E-mail: syyliudoc@sina.com

越受到关注；这其中就包括分子靶向药物的表皮生长因子受体酪氨酸蛋白激酶（EGFR-TPK）上，这是因为其在多种恶性肿瘤中均存在过量表达^[2]。厄洛替尼作为靶向的竞争性 EGFR-TPK 抑制剂，在多肿瘤细胞研究中均具有良好的生长抑制作用^[3-5]，但厄洛替尼具有一定的副作用，限制了它的使用。因此寻找一种有效的低毒性的 EGFR-TPK 抑制剂对肺癌的治疗至关重要。从苦参的根中提取的苦参碱具有多种药理活性，这其中就包括它在抗肿瘤作用中的应用^[6-7]。研究表明，苦参碱可抑制多种瘤细胞的增殖，但其具体作用机制尚不完全清楚。因此本实验拟以 A549 人肺癌细胞株为研究对象，通过体外和细胞实验探讨苦参碱对肺癌细胞的作用及其机制。

1 材料

苦参碱购自阿拉丁试剂（上海）有限公司，质量分数 >98%，批号 M109802；盐酸厄洛替尼片购自上海罗氏制药有限公司，规格 150 mg/片，产品批号 KZJ65359。人肺癌细胞 A549 和人正常肺细胞 MRC-5 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。RP-MI 1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司；VEGF 定量 ELISA 试剂盒、四甲基偶氮唑盐（MTT）均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；Caspase-GlooR3 检测试剂盒购自 Sigma-aldrich（上海）贸易有限公司；TIMP-2、HIF-1 α ELISA 试剂盒购自上海科兴商贸有限公司；L-亮氨酸-P-硝基苯胺（分析纯）、转移缓冲液（25 mmol/L Trisbase, 0.2 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇）、Modified RIPA buffer 1 \times SDS 样品缓冲液、封闭缓冲液（TBS/T）、TBS 缓冲液均购自阿拉丁试剂（上海）有限公司。

酶标仪（Thermo Scientific Microplate Reader）；微量加样器（法国 Gilson 公司）；NUAIR-NU-5510E 细胞培养箱（美国 Nuair 公司）；RealPlex2 Thermal Cycler 仪器（美国 Eppendorf 公司）。

2 方法

2.1 苦参碱对 MRC-5、A549 细胞生长抑制试验

将细胞增殖处于对数生长期的 MRC-5、A549 细胞使用胰蛋白酶消化后，培养基清洗获得细胞悬浮液，接种于 96 孔培养板中。每孔 1 600 细胞于 160 μ L 培养液中。设对照组，厄洛替尼（10、20、30、40、50、60 μ mol/L）组以及苦参碱（10、20、30、40、50、60 μ mol/L）组。进行 3 次重复实验，进行 24 h 细胞培养，根据 MTT 试剂盒说明书和酶标仪

检测每孔吸光度（A）值，计算细胞的生长抑制率^[8]。

$$\text{细胞生长抑制率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 细胞生长曲线测定

将对数生长期 A549 细胞 1.0×10^5 个置于 25 mL 培养瓶中，对照组只加培养液，苦参碱组加入 5、25、50 μ mol/L 苦参碱的培养液，连续进行培养 6 d，之后加入 0.25% 胰蛋白酶液 0.5 mL，在 37 $^{\circ}$ C 温箱中消化至细胞接近脱落瓶壁的状态，之后把消化液弃去，并加入少量培养液，形成细胞悬液。以拒染台盼蓝者为活细胞计数，取活细胞数的均值绘制生长曲线。

2.3 苦参碱对 EGFR-TPK 的抑制作用

A549 细胞用低渗酶提取缓冲液 4 $^{\circ}$ C 提取，超声破碎细胞，离心，收集上清液，进行分装，在 -80 $^{\circ}$ C 保存后。参照文献方法^[9]进行 EGFR-TPK 活性检测：每孔加入 0~100 μ mol/L 苦参碱 10 μ L 后，每孔再加入邻苯二胺，催化反应完成后终止反应，在 490 nm 波长处测定 A 值，计算酶的相对活性。

$$\text{相对活性} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 苦参碱对 A549 细胞转移的抑制作用^[10]

准备 transwell 小室的滤膜内表面涂细胞外基质胶（50 μ g/室），之后在 transwell 小室的下室中加入新鲜 10% 胎牛血清培养基，而在上室中加入在 0.1% 胎牛血清的细胞培养基培养 24 h 的重悬浮细胞浓度为 5.0×10^5 /mL，将 5、25、50 μ mol/L 苦参碱和 25 μ mol/L 厄洛替尼加入到完全贴壁生长细胞悬液中继续培养 24 h，取出小室后，使用 PBS 溶液冲洗滤膜，使用 PBS 棉棒吸除和擦除上室的细胞，再根据 transwell 小室使用说明进行染色观察，计算穿膜的细胞数，从而反映各组细胞的转移能力。实验为 3 次重复实验。

2.5 A549 细胞凋亡蛋白 Caspase 3 活性的检测

按照文献报道^[11]方法，将 A549 细胞以 2×10^5 每孔接种于 96 孔板，用 5、25、50 μ mol/L 苦参碱处理 24 h 后，向细胞培养物中加等体积的 Caspase-GlooR3 试剂，置于震荡仪，以 400 r/min 轻轻震荡混合 30 s，室温孵育 60 min，在 405 nm 测定 A 值，检测 caspase3 的活性。

2.6 苦参碱对 A549 细胞中 VEGF、HIF-1 α 表达的影响^[12]

收集对数生长期的细胞作为对照组，苦参碱（5、25、50 μ mol/L）组处理 24 h，根据 Bio-Rad 电泳实验指导来进行各组细胞总蛋白的提取，通过

Bradford 的方法调整相同的蛋白浓度后, 进行电泳获得根据相对分子质量分离的蛋白条带, 根据 Pierce 公司 Western blotting 显像试剂盒的指导说明来进行, 蛋白的 NC 膜电转, 进行蛋白封闭和一抗结合。一抗包括: 大鼠抗人 HIF-1 α (1:1 000)、VEGF (1:1 000) 多克隆抗体。一抗结合后洗脱, 再进行二抗孵育标记兔抗大鼠的多克隆抗体 (1:10 000)。ECL 试剂盒显色后, 暗室发光拍照, 进行系统软件分析。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件对实验数据进行分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 组间比较用 t 检验或单因素方差分析。

3 结果

3.1 苦参碱对 MRC-5、A549 细胞生长的抑制作用

解析苦参碱和厄洛替尼对 A549 细胞生长的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 (34.25 \pm 2.54)、(30.45 \pm 3.02) $\mu\text{mol/L}$; 进一步观察到, 随着苦参碱浓度的增加, MRC-5 细胞的生长并未受到抑制, 而随着厄洛替尼浓度的增加, MRC-5 细胞的生长抑制率在不断地增加, 苦参碱与相同浓度的厄洛替尼比较, 二者对 MRC-5 细胞生长的抑制率具有统计学差异 ($P < 0.01$); 在相同 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 厄洛替尼存在下的 MRC-5 细胞生长抑制率是苦参碱的 7 倍左右; 此外鉴于在低浓度苦参碱 (5 $\mu\text{mol/L}$) 的作用下, A549 细胞生长的抑制作用较弱, 当苦参碱的浓度达到 50 $\mu\text{mol/L}$, A549 细胞生长的抑制作用趋于平缓, 因此选择 5、50 $\mu\text{mol/L}$ 以及中间浓度 25 $\mu\text{mol/L}$ 用于以下研究实验中。见表 1。

3.2 苦参碱对 A549 细胞生长的影响

随着苦参碱浓度的升高和作用时间的延长, 细胞生长抑制现象越明显。在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的苦参碱作用 3 d 后, 细胞个数出现了明显的减少, 活细胞数目比对照组减少了 70% 左右, 见图 1。

3.3 苦参碱对 EGFR-TPK 活性的抑制作用

随着苦参碱、厄洛替尼浓度 (0~100 $\mu\text{mol/L}$) 的增加, EGFR-TPK 的相对活性在不断的下降, 解析苦参碱和厄洛替尼 IC₅₀ 分别为 (8.59 \pm 0.42)、(11.26 \pm 1.02) $\mu\text{mol/L}$ 。苦参碱对 EGFR-TPK 显示出了较好的抑制效果, 见图 2。

3.4 苦参碱对 A549 细胞侵袭转移能力的抑制作用

随着苦参碱浓度 (5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 的增大, 穿过的 A549 细胞数目不断地减少。见表 2。

表 1 苦参碱和厄洛替尼对 MRC-5 和 A549 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibitory effects of matrine and erlotinib against growth of MRC-5 and A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞生长抑制率/%	
		A549	MRC-5
对照	0	0.12 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02
	5	1.19 \pm 0.03*	0.15 \pm 0.02
	10	17.32 \pm 1.78**	2.21 \pm 0.42 $\Delta\Delta$ *
	20	27.43 \pm 3.11**	3.43 \pm 0.22 $\Delta\Delta$ *
	25	33.45 \pm 3.45**	3.47 \pm 0.27 $\Delta\Delta$ *
	30	40.34 \pm 4.17**	4.76 \pm 0.47 $\Delta\Delta$ *
	40	54.32 \pm 5.65**	5.54 \pm 0.32 $\Delta\Delta$ **
	50	66.43 \pm 6.21**	6.67 \pm 0.72 $\Delta\Delta$ **
	60	72.48 \pm 6.89**	7.11 \pm 0.85 $\Delta\Delta$ **
	75	72.53 \pm 6.56**	7.31 \pm 0.67 $\Delta\Delta$ **
苦参碱	100	70.56 \pm 6.46**	7.35 \pm 0.87 $\Delta\Delta$ **
	5	9.87 \pm 0.98**	6.87 \pm 0.56**
	10	20.11 \pm 1.71**	17.11 \pm 1.23**
	20	33.32 \pm 3.21**	22.46 \pm 2.21**
	25	40.67 \pm 3.78**	26.78 \pm 2.71**
	30	48.87 \pm 4.95**	30.35 \pm 3.21**
	40	61.21 \pm 5.78**	40.21 \pm 4.11**
	50	72.48 \pm 6.76**	50.45 \pm 5.33**
	60	78.41 \pm 7.32**	55.46 \pm 5.65**
	75	81.78 \pm 7.32**	61.78 \pm 6.21**
厄洛替尼	100	85.77 \pm 7.34**	63.74 \pm 6.32**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与厄洛替尼组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs erlotinib group

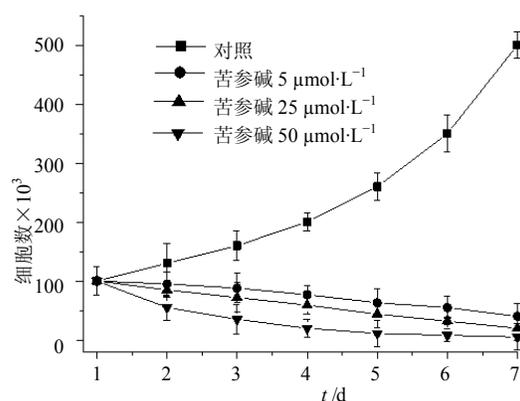


图 1 苦参碱作用后 A549 细胞的生长曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Growth curve of A549 cells by matrine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

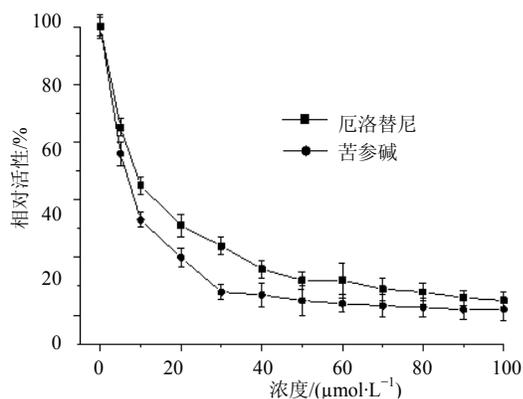


图 2 苦参碱对 EGFR-TPK 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Inhibitory effect of matrine against EGFR-TPK ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 苦参碱对细胞侵袭转移能力、caspase 3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of matrine on cell invasion and caspase 3 activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞转移数 ($\times 10^3$)	caspase 3 活性			
			0 h	24 h	48 h	72 h
对照		50.11 \pm 2.43	11.43 \pm 0.89	12.54 \pm 0.78	13.13 \pm 1.32	12.94 \pm 1.12
厄洛替尼	25	22.54 \pm 3.01**	12.11 \pm 0.66	30.43 \pm 3.21**	41.22 \pm 4.32**	52.43 \pm 4.54**
苦参碱	5	39.33 \pm 3.12*	10.98 \pm 1.05	18.43 \pm 0.98*	25.32 \pm 2.76**	31.43 \pm 2.54**
	25	25.21 \pm 2.54**	11.46 \pm 0.87	26.19 \pm 1.76**	34.54 \pm 2.87**	46.76 \pm 4.32**
	50	10.54 \pm 1.54**	10.45 \pm 0.42	42.11 \pm 3.54**	53.11 \pm 4.32**	66.32 \pm 4.76**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

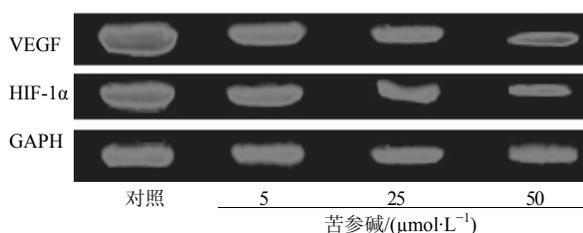


图 3 苦参碱对 A549 细胞中 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响
Fig. 3 Effect of matrine on expression of VEGF and HIF-1 in A549 cell

表 3 VEGF 和 HIF-1 α 的相对表达率

Table 3 Relative expression rates of VEGF and HIF-1

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	相对蛋白表达率/%	
		VEGF	HIF-1 α
对照		150.56 \pm 9.23	136.54 \pm 8.65
苦参碱	5	110.94 \pm 6.78**	112.34 \pm 7.56*
	25	79.44 \pm 5.45**	66.16 \pm 4.56**
	50	54.15 \pm 4.34**	39.34 \pm 3.41**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.5 A549 细胞凋亡蛋白 caspase 3 活性检测

随着苦参碱 (5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 浓度的增加和作用时间的延长, A549 细胞中凋亡蛋白 caspase 3 活性明显增加 ($P < 0.05$), 在相同浓度 (25 $\mu\text{mol/L}$) 下, 相同作用时间下的苦参碱与厄洛替尼凋亡蛋白 caspase 3 活性比较, 差异无统计学意义, 都表现出来良好的 caspase 3 活性增敏效应。见表 2。

3.6 苦参碱对 A549 细胞中 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响

与对照组比较, 随着苦参碱浓度 (5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 的增加, VEGF 和 HIF-1 α 的表达呈不断降低的趋势, 分别从 110.94%、112.34% 降到了 54.15%、39.34%, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 见图 3、表 3。

4 讨论

实验发现苦参碱对 EGFR-TPK 和 A549 细胞生长都具有良好的抑制能力; 其他实验结果显示, 经过不同浓度苦参碱处理后, 凋亡调控因子 caspase-3 的活性呈现不断增加的趋势, 这种活性的增加呈现时间和剂量相关性的。究其原因认为这很有可能是由于在肿瘤细胞凋亡过程中, caspase-3、caspase-9 共同组成的酶联反应的终末因子开启^[13-15], 尤其凋亡因子 caspase-3 活性的增加是导致细胞凋亡的最重要原因, 因此苦参碱通过对 caspase-9 凋亡通路的调控, 降低了肺癌肿瘤细胞的穿透能力, 很好地阻碍了肺癌细胞 A549 的转移。

信号通路的下放与肿瘤的发生、转移具有息息相关的联系。报道显示众多癌症预后不良反应均与肿瘤喜好通路有关^[16], 同时肿瘤组织也会通过内源性因子的调控促进肿瘤细胞的生长^[17]。因此, 阻截信号通路下放已成为肿瘤靶向治疗的重要手段之一。由实验结果发现, 苦参碱能够下调 HIF-1 α 和

VEGF 的表达, 这会影响血管生成因子的释放, 进而抑制内皮细胞的增殖, 这是由于内皮细胞表面受体可直接与 VEGF 结合, 进而对下游的 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 通路激活, 使血管通透性增加, 蛋白溶解酶在内皮细胞中分泌增加, 使毛细血管基底膜发生降解, 更多促血管生成因子 (如 MMP-2 和 MMP-9 等) 从周围基质中释放, 内皮细胞的增殖和运动增加^[20]。此外细胞毒性发现, 苦参碱毒性低, 是一种潜在的抗新生血管药物。

综上所述, 苦参碱可能通过抑制 EGFR-TPK 活性, 增敏 caspase-3 的活性, 并通过下调血管生成信号通路因子 HIF-1 α 和 VEGF 的表达, 导致细胞凋亡和转移能力的降低。

参考文献

- [1] Pan Q, Wang Y, Chen J, *et al.* Investigation of the epidermal growth factor receptor mutation rate in non-small cell lung cancer patients and the analysis of associated risk factors using logistic regression [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 813-818.
- [2] Rivoire W A, Corleta H V E, Brum I S *et al.* Molecular biology of cervical cancer [J]. *Revista Brasileira De Saúde Materno Infantil*, 2005, 6(4): 447-451.
- [3] Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR-TKI: a literature review of clinical reports [J]. *J Thorac Dis*, 2011, 3(1): 10-18.
- [4] 刘显红, 马丽霞, 张 爽, 等. 厄洛替尼治疗吉非替尼失败后晚期非小细胞肺癌的疗效 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(24): 4790-4791.
- [5] 隆艳艳, 王 飞, 石 燕, 等. 厄洛替尼在晚期胰腺癌综合治疗中的作用 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 16(12): 1108-1111.
- [6] 鲍娇琳, 陆金健, 陈修平, 等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(3): 369-373.
- [7] 毛 燕, 王海琳, 陈晓红, 等. 苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞 JAK-STAT 通路负调控机制研究 [J]. *中药材*, 2015, 38(1): 136-138.
- [8] 周红祖, 徐丽霞, 余惠旻, 等. 左金方、黄连、吴茱萸诱导人胃癌细胞SGC-7901 凋亡的作用比较 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(7): 1160-1165.
- [9] 蒋 超, 蒙凌华, 齐 清, 等. 螺旋藻提取物对表皮生长因子受体酪氨酸激酶的抑制作用及诱导 HL-60 细胞凋亡 [J]. *癌症*, 2000, 19(12): 1101-1104.
- [10] 李明潺, 王玉丽, 董林易, 等. 槐定碱对肺癌 A549 细胞体外增殖和侵袭抑制作用及机制的研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(13): 1111-1116.
- [11] 杨 辉, 谢 辉, 洪 明, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂联合芬维 A 胺诱导人肝癌细胞凋亡的研究 [J]. *临床医学工程*, 2012, 19(11): 1881-1883.
- [12] 刘敬弢, 袁 霞, 徐 波, 等. 新型蛋白酶体抑制剂 YSY-01A 对肿瘤细胞促血管生成作用的抑制及其机制初探 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(8): 748-756.
- [13] Kim S J, Rabbani Z N, Dong F, *et al.* Phosphorylated epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 expression in localized non small cell lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(1): 91-97.
- [14] 倪晓辰, 赵志红, 马永良, 等. 桉木醇诱导人肾透明细胞癌 786-O 细胞凋亡及其机制研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(1): 43-46.
- [15] 王 晶. 秦皮甲素对人肺癌细胞 A549 凋亡影响 [J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(4): 464-466.
- [16] Al-Najar A, Al-Sanabani S, Korda J B, *et al.* Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma [J]. *Urol Oncol*, 2012, 30(3): 325-329.
- [17] Senger D R, Galli S J, Dvorak A M, *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid [J]. *Science*, 1983, 219(4587): 983-985.
- [18] Tan W F, Zhang X W, Li M H, *et al.* Pseudolarix acid B inhibits angiogenesis by antagonizing the vascular endothelial growth factor-mediated anti-apoptotic effect [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 499(3): 219-228.