

5.0%)，而一般用于在体肠循环的 KR 液的 pH 为 7.4。人体正常生理状况下小肠液的 pH 为 5~7，为保证试验过程中药物的稳定性并尽量贴近人体小肠的环境，笔者采用 pH 值为 6.0 的 KR 液作为灌流液进行试验，汉防己甲素在 pH 值为 6.0 的空白循环液中稳定性较好，可以说明在体肠循环中药物质量浓度的降低是汉防己甲素被肠道吸收的结果。

4.3 药物不同质量浓度对汉防己甲素在大鼠小肠全肠段的吸收无显著影响，且以肠内剩余药量的对数 $\ln X$ 对取样时间 t 作图，所得直线的相关系数均大于 0.9，可以初步确定汉防己甲素在小肠的吸收呈一级动力学过程，吸收机制为被动扩散。药物的 K_a 和平均每小时吸收量回肠段大于十二指肠、空肠和结肠；这是由于回肠的环境 pH 值大于十二指肠和空肠，汉防己甲素在回肠的解离度小于十二指肠和空肠，且回肠的面积最大，故吸收较其他肠段好。本实验中 P_{app} 定义为单位时间单位面积的表观吸收速率，各肠段 P_{app} 差异无显著性，且均大于 1×10^{-6} ，说明汉防己甲素在小肠各段和结肠段均有较好的吸收^[8]，适合制备成缓释制剂。

4.4 由于本实验中空白循环液的 pH 略小于肠道环境的 pH，而汉防己甲素为一种生物碱，所以测得的 K_a 偏小，吸收半衰期较人体实际值略大，尽管测定的结果为表观吸收速率常数，但对制剂的开发仍

有一定的指导意义。

4.5 研究中药有效成分口服时的吸收特性，是中药制剂现代化和提高中药口服给药生物利用度的基础，可以减少剂型设计的盲目性，为剂型的开发提供科学依据。本实验证明汉防己甲素在小肠各肠段均有较好的吸收，适合制备成缓释给药系统。

References:

[1] Wang H, Luo S D, Cai H S. Advances in research on pharmacology of tetrandrine [J]. *Chin Pharm J* (中国药学期刊), 2000, 35(12): 800-802.
 [2] Zeng F D, Shaw D H, Ogilvie R I. Kinetic disposition and hemodynamic effects of tetrandrine in anesthetized dogs [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1985, 7(6): 1034-1039.
 [3] Lou J S, Zhang C L. Studies on pharmacokinetic of tetrandrine in rabbit [J]. *Clin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(1): 24-26.
 [4] Lu B. *Pharmaceutical Experiment* (药剂学实验) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
 [5] Yu W J, Cai Y B, Jiang L N. Determination of tetrandrine in Jinake by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 1999, 16(4): 50-52.
 [6] You B G, Yang M S, Fan S L, et al. Intestinal absorption kinetics of nitrendipine in rats [J]. *Chin Pharm J* (中国药学期刊), 2004, 39(3): 214-217.
 [7] Feng L, Jiang X H, Zhou J, et al. Studies on absorption kinetics on sanchinoside R_1 and ginsenoside R_{g1} in rat intestine [J]. *Chin Pharm J* (中国药学期刊), 2006, 41(14): 1097-1102.
 [8] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in human and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (CaCo-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880-885.

西兰花中葡萄糖异硫氰酸盐诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡的初步研究

邹翔¹, 郎朗¹, 武晓丹², 季宇彬¹

(1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学 药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨对西兰花中葡萄糖异硫氰酸盐 (glucosinolates, GS) 诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡的作用及其可能机制。方法 不同质量浓度 GS 处理人胃腺癌 SGC-7901 细胞, 通过 SRB 法、细胞形态学观察、流式细胞仪和激光共聚焦显微镜实验, 观察 GS 对 SGC-7901 细胞的抑制率, 对细胞凋亡和细胞周期的影响。结果 1、10、100、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的 GS 作用于 SGC-7901 细胞 72 h 后, 抑制了 SGC-7901 细胞的增殖, 其 IC_{50} 为 187.723 $\mu\text{g/mL}$; 300 $\mu\text{g/mL}$ 的 GS 作用 SGC-7901 细胞 24 h 后, 细胞出现早期凋亡的形态; 300、600、1 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 GS 作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后, 可见细胞凋亡率分别为 (14.54 \pm 6.69)%、(10.11 \pm 6.25)%、(34.12 \pm 13.29)% , 并且 G_2 期细胞数目减少至 0, 对细胞周期有影响; 100、200、300 $\mu\text{g/mL}$ 的 GS 作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后, 细胞内的 Ca^{2+} 浓度升高, 且随着 GS 给药剂量的增加而升高。结论 GS 能够促进人胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡, 影响细胞周期, 此作用可能是 GS 升高细胞内 Ca^{2+} 的浓度而达到的。

收稿日期: 2006-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300284, 30400592); 黑龙江省自然科学基金重点项目 (ZJY03-04); 哈尔滨市科技攻关项目 (2004AA9CN164)

作者简介: 邹翔 (1978-), 男, 医学硕士, 助理研究员, 研究方向为抗肿瘤药物研究。
Tel/Fax: (0451) 84866922/84866001 E-mail: zou8663202@163.com

关键词: 西兰花; 葡萄糖异硫氰酸盐; 细胞凋亡; Ca^{2+}

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0228-04

Apoptosis of human gastric adenoma cells SGC-7901 induced by glucosinolates in broccoli

ZOU Xiang¹, LANG Lang¹, WU Xiao-dan², JI Yu-bin¹

(1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Postdoctoral Program, Institute of Materia Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract; Objective To investigate the effect of glucosinolates (GS) in broccoli on apoptosis of human gastric adenoma cells SGC-7901 and its possible mechanism. **Methods** SGC-7901 cells were treated with different concentrations of GS. SRB Assay, fluorescence microscope, flow cytometry, and laser confocal microscopy were used to observe the inhibitory rate, apoptosis rate, and cell cycle of SGC-7901 cells by GS. **Results** 1, 10, 100, and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GS affected on SGC-7901 cells for 72 h, GS inhibited proliferation of SGC-7901 cells, and its IC_{50} was 187.723 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GS affected on SGC-7901 cells for 24 h, cells appeared the modality of early apoptosis; 300, 600, and 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GS affected on SGC-7901 cells for 24 h, the apoptosis rates were $(14.54 \pm 6.69)\%$, $(10.11 \pm 6.25)\%$, and $(34.12 \pm 13.29)\%$, and the number of G_2 cycle cells decreased to zero; 100, 200, and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GS affected on SGC-7901 cell for 24 h, the variation of Ca^{2+} in cells was increased, and it can be raised with the increase of dose. **Conclusion** GS could promote the apoptosis of SGC-7901 cells and affect cell cycle, its mechanism may be to increase the Ca^{2+} in cells.

Key words: broccoli; glucosinolates (GS); apoptosis; Ca^{2+}

葡萄糖异硫氰酸盐 (glucosinolates, GS) 也称硫代葡萄糖苷, 是广泛存在于十字花科植物中的含硫次级代谢产物, 是一类抗癌特性成分^[1]。英国科学家 1997 年初的一次抗癌蔬菜研究结果表明, 西兰花 *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. 中含有十分丰富的 GS, 可阻碍早期癌细胞的生长, 并有助加强人体对癌细胞的抵抗能力, 降低患癌症的危险^[2], 但关于 GS 抗癌机制的研究较少, 本实验主要通过体外研究探讨西兰花中 GS 对人胃腺癌 SGC-7901 细胞的影响。

1 材料

1.1 癌细胞株: SGC-7901 人胃腺癌细胞株, 由哈尔滨商业大学药物研究所提供。

1.2 主要试剂: GS (质量分数 52.6%), 由哈尔滨商业大学药物研究所提供。阿霉素, 浙江海正药业股份有限公司, 批号 200506。Fluo-3/AM 荧光探针, 美国 Molecular probe 公司。RPMI-1640 培养基干粉, 美国 Gibco 公司。胰蛋白酶、磺酰罗丹明 B (Sulforhodamine B, SRB)、二甲基亚砷 (DMSO)、溴化丙啶 (PI) 和 RNA 酶, Sigma 公司。Hoechst 33258 ($-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存), 上海华舜生物工程有限公司。小牛血清, 美国 Gibco 公司。

1.3 主要仪器: 流式细胞仪, 美国 Beckman-Coulter

公司。激光共聚焦扫描显微镜, 德国 Leica 公司。 CO_2 恒温培养箱, 日本三洋公司。奥林巴斯 CKX-41-32 荧光倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。酶标仪, 美国 Bio-rad 公司。超净工作台, 苏净集团。

2 方法

2.1 细胞培养: 人胃腺癌 SGC-7901 细胞常规复苏后, 培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置于 CO_2 培养箱 ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 相对湿度 95%) 培养。2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

2.2 将对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$, 每孔加 100 μL 培养液, 置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。24 h 后加入不同质量浓度的 GS, 使其终质量浓度分别为 1、10、100、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 阳性对照组阿霉素的终质量浓度为 0.01、0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 阴性对照组加相同体积的培养液, 每个剂量设 6 个平行孔。置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。72 h 后, 加 50% 冷三氯乙酸 (TCA) 液, 置 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中固定 1 h, 倒掉固定液, 用去离子水洗 5 遍, 干燥后, 加 4 mg/mL SRB 染液, 室温放置 30 min; 倒掉染液, 用 1% 醋酸洗 5 遍, 过夜干燥, 加 10 mmol/L Tris 缓冲液 150 μL , 10 min 后测定吸光度 (A) 值, 波长为 490 nm。计算药物对肿瘤细胞的抑

制率,并按中效方程计算 IC_{50} 。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均 } A \text{ 值} - \text{给药组平均 } A \text{ 值}}{\text{对照组平均 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

2.3 荧光倒置显微镜观察 GS 对 SGC-7901 细胞形态的影响:先将 6 孔培养板内放上盖玻片,取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中,细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$,每孔加 1 mL 细胞培养液,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中。24 h 后加入不同质量浓度的 GS,使其终质量浓度分别 100、200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阳性对照组加阿霉素,药物质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阴性对照组加相同体积的培养液。24 h 后细胞用胰酶消化,加 PBS 洗 1 遍,置 4°C 冰箱中 12 h 以上,固定[甲醇-冰醋酸 (3:1)]10 min 后,加入质量浓度为 5 mg/L 的荧光探针 Hoechst 33258,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 15 min,将孔中的盖玻片取出,盖在已滴好甘油的载玻片上,置于荧光倒置显微镜上观察细胞形态并照相。

2.4 流式细胞仪检测 GS 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响:将对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中,细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,每孔加 1 mL 细胞培养液,置于 37°C 、5% CO_2 条件培养箱中,24 h 后加入不同质量浓度的 GS,使其终质量浓度分别为 300、600 和 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阳性对照组的阿霉素,药物终质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阴性对照组加相同体积的培养液。24 h 后细胞用胰蛋白酶消化,PBS 洗 2 次,70% 冷乙醇固定,置入 4°C 冰箱中 12 h 以上,离心,用 PBS 液除尽乙醇,离心后的细胞重悬于质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 染液, 37°C 避光温育 30 min,300 目尼龙网滤过后上机检测,检测细胞数为 1×10^4 个。激发波长 488 nm,发射波长 630 nm。

2.5 激光共聚焦显微镜检测 GS 对 SGC-7901 细胞内钙离子浓度的影响:先将 6 孔培养板内放上盖玻片,取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中,细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,每孔加 1 mL 细胞培养液,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中。24 h 后加入不同质量浓度的 GS,使其终质量浓度分别 100、200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阳性对照组加阿霉素,药物质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阴性对照组加相同体积的培养液。24 h 后吸出培养皿中的培养液,加胰酶消化,用无钙台氏液洗 1 遍,加入质量浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fluo-3/AM 荧光探针 200 μL , 37°C 避光温育 30 min,将孔中的盖玻片取出,盖在载玻片上,避光,激光共聚焦显微镜扫描观察。激发波长 488 nm,发射波长 540~570 nm。观察细胞内 Ca^{2+} 的变化,并记录细胞的荧光强度,以

细胞的荧光强度反映 Ca^{2+} 的浓度。

2.6 统计学处理:组间数据采用 t 检验,由 SPSS 11.5 软件处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 GS 对 SGC-7901 细胞增殖的影响:1、10、100、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GS 作用于 SGC-7901 细胞 72 h 后,GS 各剂量组 SGC-7901 细胞生长受到抑制,该抑制作用随着 GS 质量浓度的增大而增强,见表 1,其 IC_{50} 为 187.723 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 GS 对 SGC-7901 细胞增殖的影响 ($n=6$)

Table 1 Effect of GS on proliferation of SGC-7901 cells ($n=6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%
对照	—	0.365 \pm 0.015	—
阿霉素	0.01	0.350 \pm 0.007	4.1
	0.1	0.231 \pm 0.013**	36.7
	1	0.089 \pm 0.011**	75.6
	10	0.098 \pm 0.003**	73.2
GS	1	0.362 \pm 0.011	0.8
	10	0.368 \pm 0.014	0.9
	100	0.342 \pm 0.019**	6.2
	1 000	0.076 \pm 0.005**	79.2

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.2 GS 对 SGC-7901 细胞形态的影响:结果显示,正常细胞发蓝色荧光,且较弱,较均匀,染色质均匀分布,且细胞呈贴壁状;而经 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GS 作用 24 h 后,SGC-7901 细胞变圆,细胞核固缩,并可见致密强荧光,呈早期细胞凋亡的细胞形态。

3.3 GS 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响:300、600、1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GS 作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后,GS 具有在一定程度上诱发细胞凋亡的作用,与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$),见表 2,可见 GS 能促进 SGC-7901 细胞凋亡;GS 可使 G_2 期细胞数目减少至 0,对细胞周期有较明显影响。

3.4 GS 对 SGC-7901 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响:100、200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GS 作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后,SGC-7901 细胞内 Ca^{2+} 的浓度显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。SGC-7901 细胞内 Ca^{2+} 浓度随着 GS 质量浓度的升高而升高,见表 3。

4 讨论

胃癌是世界上第二常见的癌症^[3]。有报道显示,工业化国家约 35% 的癌症与膳食有关。最近世界癌症研究基金会证实膳食是全球许多类型癌症的一种主要决定因素,并强调食用蔬菜水果可降低许多类型癌症的危险^[4]。近几年,西兰花越来越受到人们的重视,不仅是因为西兰花味道鲜美、口感脆嫩,而

表 2 GS 对 SGC-7901 细胞凋亡和细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of GS on apoptosis and cell cycles of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	凋亡率/%	G ₁ /%	G ₂ /%	S/%
对照	—	3.34 ± 1.23	71.80 ± 2.80	8.09 ± 2.80	21.86 ± 2.50
阿霉素	5	26.43 ± 19.78**	51.32 ± 4.71**	14.46 ± 4.71**	34.23 ± 4.14**
GS	300	14.54 ± 6.69	59.88 ± 3.17**	12.04 ± 3.21**	29.16 ± 3.19**
	600	10.11 ± 6.25	47.33 ± 2.29**	13.48 ± 2.29**	38.17 ± 2.48**
	1 200	34.12 ± 13.29**	32.83 ± 4.54**	—	66.95 ± 4.33**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表 3 GS 对 SGC-7901 细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Effect of GS on Ca²⁺ concentration in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组 别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Ca ²⁺ 浓度 (荧光强度)
对照	0	24.45 ± 6.56
阿霉素	5	118.37 ± 16.31**
GS	100	21.67 ± 2.84
	200	40.66 ± 8.54*
	300	50.29 ± 12.30**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

且是因为它对人体有很好的保健作用。

本实验通过 SRB 法检测 GS 对 SGC-7901 细胞的生长具有抑制作用,其抑制作用随着 GS 质量浓度的增大而增强,作用较明显,其 IC₅₀ 为 187.723 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用荧光倒置显微镜观察,GS 作用 SGC-7901 细胞 24 h 后,该细胞呈早期细胞凋亡的形态,提示 GS 作用后 SGC-7901 细胞发生了凋亡的形态学改变。为了进一步观察 GS 对 SGC-7901 细胞的作用,本研究采用流式细胞仪检测 GS 作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后,细胞出现凋亡,且作用较明显,与剂量有关,但不一定是随着 GS 的剂量增大而增强的。在细胞周期方面,正常细胞多数处于静止期,即 G₀ 期,一旦进入生长期 (G₁),细胞 RNA 和蛋白质不断增加,再进入 DNA 合成期 (S) 和一个短的合成后期 (G₂),最后进入细胞有丝分裂期 (M),此后,细胞离开循环进入静止期或继续经循环再分裂^[5]。本研究发现 GS 作用后 G₁ 期细胞减少,S 期细胞增加,表明其细胞生长受到抑制,DNA 合成增加,但 G₂ 期细胞先稍增加后减少至 0,表明细胞分裂受到抑制。给药组细胞大部分停留在 S 期,阻碍了细胞的增殖,说明 GS 对细胞周期也有较明显影响。

细胞内 Ca²⁺ 是一种重要的第二信使,参与调节细胞膜的通透性,影响环核苷酸及磷酸肌醇代谢、调控酶活性以及 DNA 合成等。有资料表明,Ca²⁺ 的变化对细胞凋亡起重要作用^[6]。因此为了观察 GS

诱导细胞凋亡而抗肿瘤的作用机制,本实验采用激光共聚焦显微镜观察了 GS 对 SGC-7901 细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响,同时使用新一代荧光探针 Fluo-3/AM。Fluo-3/AM 为一种脂溶性钙荧光指示剂,可穿越细胞膜进入细胞内,与细胞内游离 Ca²⁺ 结合,根据荧光强度变化表示细胞内 Ca²⁺ 浓度^[7]。研究表明,与对照组相比,给药组细胞内的 Ca²⁺ 浓度升高 ($P < 0.05, 0.01$),且随 GS 的剂量的增加而升高。Ca²⁺ 浓度的变化可能激活了细胞凋亡机制,从而诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡。细胞内 Ca²⁺ 具有两个来源,一是细胞外钙内流;二是细胞内钙库释放。由于 SGC-7901 细胞处理过程中已用无钙台氏液处理,细胞外无 Ca²⁺,因此细胞内 Ca²⁺ 的升高只能来源于细胞内钙的释放^[8]。

综上所述,西兰花中 GS 对人胃腺癌 SGC-7901 细胞有一定的抑制作用,能促进 SGC-7901 细胞凋亡并对细胞周期有一定的影响,其作用机制可能是升高 SGC-7901 细胞内 Ca²⁺ 浓度。关于 GS 诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡的作用机制还有待于进一步研究。

References:

- [1] Plumb G W, Price K R, Rhodes M J, et al. Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli [J]. *Free Rad Res*, 1997, 27(4): 429.
- [2] Johns T. The anu and the maca [J]. *J Ethnobiol*, 1981, 1: 208.
- [3] Zhang Y, Huang J Z, Yu D F. Research on stomach cancer [J]. *Mod Hosp* (现代医院), 2005, 5(3): 39-42.
- [4] Huang J, Sun J. Biology utilization rate and meaning of flesh health of glucosinolates [J]. *Foreign Med Sci: Sec Hyg* (国外医学:卫生学分册), 2003, 30(2): 94-97.
- [5] Liang F, Wang M Y, Xu D Q. Study on apoptosis of human gastric adenoma cells SGC823 induced by Banmao acid natrium [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2006, 22(3): 171-172.
- [6] Zhang L, Wang L, Song W H, et al. Apoptosis of human pulmonary adenocarcinoma cells mediated by arsenic trioxide (AS₂O₃) via increasing intracellular calcium concentration [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(8): 867-870.
- [7] Wang L, Chang Y Z, Duan X L. The influence of Fe³⁺ on Ca²⁺ and the relationship between Ca³⁺ and the cell apoptosis in Caco-2 cells [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 2005, 36(2): 177-181.
- [8] Ji Y B, Gao S Y. Studies on antitumor activities of Sargassum fusiforme polysaccharide *in vitro* and its mechanism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(12): 1111-1114.