

· 药理与临床 ·

云南重楼中血管内皮生长因子结合因子的活性研究

李彤彤^{1,2#}, 高飞^{2#}, 段承俐², 王向军², 钱永常^{2,3*}

1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201
2. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300
3. 美国德克萨斯农工大学 综合生物学系, 美国德克萨斯州大学城 77843-4458

摘要: 目的 筛选并分离云南重楼水提取物中能与血管内皮生长因子(VEGF)蛋白结合的物质,并探究其对VEGF的刺激作用。方法 采用固相化VEGF亲和柱色谱的方法筛选云南重楼水提取物中的VEGF结合因子,HPLC法进一步分离纯化该因子成分,并采用MTT法以VEGF敏感型细胞株HepG2为模型验证该因子活性,采用UV、RRLC-QTOF检测,推测该因子可能的成分组成。结果 从云南重楼水提取物中筛选到能与VEGF蛋白结合的因子(命名为因子B³),HPLC分离纯化后因子B³可以促进VEGF敏感型细胞HepG2的增殖,而对VEGF不敏感型细胞HEK293的增殖没有影响。因子B³和VEGF蛋白对HepG2细胞的增殖促进作用存在叠加效应;而这种效应可以被VEGF抗体阻断;因子B³本身对HepG2细胞的增殖作用也可以被VEGF抗体阻断。通过UV和RRLC-QTOF检测,推测因子B³可能为皂苷类成分。结论 云南重楼中分离得到的因子B³具有促进VEGF功能的活性。

关键词: 云南重楼; 血管内皮生长因子; 因子B³; 亲和柱色谱; 皂苷类成分

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)15-2251-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.15.013

Study on activity of VEGF-binding factors in *Paris polyphylla*LI Tong-tong^{1,2}, GAO Fei², DUAN Cheng-li², WANG Xiang-jun², QIAN Yong-chang^{2,3}

1. College of Agriculture and Bio-technology, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China
2. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China
3. Department of Integrative Biosciences, College Station, Texas A&M University, Texas 77843-4458, USA

Abstract: Objective To screen and isolate vascular endothelial growth factor (VEGF)-binding factors from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, and explore their property for stimulating VEGF activity. **Methods** The VEGF-binding factors from water extract of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were screened by VEGF-affinity chromatography and further purified by HPLC method. Their activity on proliferation of VEGF-dependent cells was determined by MTT analysis with sensitive cell line HepG2 as model. We also predicted the possible components according to RRLC-QTOF and UV results. **Results** The VEGF-binding factors screened from the water extract of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were named as factor B³ which included three compounds and could induce the proliferation of VEGF-dependent cell line HepG2 but not the VEGF-independent cell line HEK293. Further studies indicated that factor B³ had an additive effect with VEGF to induce the proliferation of HepG2, and the additive effect could be attenuated by VEGF antibody. In addition, the proliferation of HepG2 cells induced by factor B³ alone could also be attenuated by VEGF antibody. Furthermore, based on the results of RRLC-QTOF and UV analysis, we predicted that factor B³ are probably members of saponin family. **Conclusion** The factor B³ isolated from *P. polyphylla* var. *yunnanensis* has the property to stimulate VEGF activity.

Key words: *Paris polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; vascular endothelial growth factor; factor B³; affinity column chromatography; saponins

收稿日期: 2015-01-07

基金项目: 浙江农林大学科研发展基金(2012FR017); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ14H280007)

作者简介: 李彤彤(1991—),女,在读硕士研究生,主要从事天然产物活性因子的开发和利用。E-mail: litongchina90@163.com

高飞(1981—),男,主要从事天然产物中抗肿瘤活性因子的筛选。E-mail: gfei1981@live.com

*通信作者 钱永常(1962—),男,主要从事神经细胞生物学、肿瘤细胞生物学及天然药物的研究。Fax: (0571)63740809 E-mail: qian3906@zafu.edu.cn
#共同第一作者

重楼 *Rhizoma Paridis* 是百合科重楼属植物的总称, 又名蚤休, 入药部位为其根茎, 具有清热解毒、抗菌消炎、通络活血、凉肝定惊等功效^[1-2], 从古至今被应用于蛇药和治疗妇科的各种血症。《中国药典》2010年版收载云南重楼 *Paris polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith. var. *chinensis* (Franch.) Hara 作为药材重楼的基原植物^[3]。云南重楼在我国传统医学领域被认为是具有舒筋活血功能的重要传统中药^[2], 常作为君药用于治疗下肢静脉血栓、血管闭塞性冠脉炎等血管类疾病。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种高度保守的同源二聚体糖蛋白, 其与血管内皮细胞膜上的特异性受体结合后, 能够促进内皮细胞的生长和增殖, 增加血管的渗透性, 形成血管生成的临时基质, VEGF 也是新生血管的关键调控者。VEGF 含有多种亚型, 其中 VEGF165 蛋白活性最强, 是 VEGF 家族中最重要的血管生成调节因子。VEGF165 蛋白在心血管领域中已被应用于冠心病防治的研究, 发现其可促进小冠状血管侧枝循环的建立, 恢复心肌血流供应, 减少梗死面积, 促进缺血心肌的功能恢复^[4-6]。与此同时, VEGF165 蛋白也具有美容的功效, 与其他细胞因子的协同作用可以有效促进新生毛细血管的生成, 提高真皮微血管的数目, 改善皮肤的新陈代谢, 起到延缓衰老的作用。

VEGF 是血管生成的关键调控因子, 筛选与之作用从而促进血管生成的功能因子, 尤其是来自天然产物中的功能因子, 对于血管类疾病的治疗具有极为重要的意义。云南重楼具有舒筋活血的功效, 因此, 本研究采用固相化 VEGF 亲和柱色谱的方法, 从云南重楼的水提取物中筛选出能与 VEGF 蛋白 (具体亚型为 VEGF165 蛋白) 结合的物质。进而分离纯化该物质, 用筛选出的 VEGF 敏感型细胞株作为模型^[7], 对其活性进行评价研究。

1 材料

1.1 药材

5 年生的新鲜云南重楼采自云南省大理市弥渡县, 经浙江农林大学林生院中药学科段承俐副教授鉴定为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的新鲜根茎。

1.2 细胞株

人肝癌细胞 HepG2、人肾癌细胞 HEK293 由浙

江大学药学院曾苏教授实验室馈赠。

1.3 试剂

VEGF 亲和色谱柱 (产品目录号 NRPB03S-5mL) 和人血清白蛋白 (HSA) 亲和色谱柱 (产品目录号 NRPB99S-5mL) 均购自杭州纽龙生物科技有限公司。DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (美国 HyClone 公司); 胰蛋白酶、双抗 (美国 Sigma 公司); MTT 试剂盒 [生工生物工程 (上海) 有限公司]; VEGF165 蛋白、VEGF 抗体 (杭州纽龙生物科技有限公司); 色谱纯乙腈、甲醇 (西班牙 Scharlau 公司); 甘氨酸、Tris、HCl (上海凌峰化学试剂有限公司)。

1.4 仪器

Agilent RRLC 液相色谱系统 (包括 G1312B 型二元输液泵, G1322A 型脱气机, G1367D 型自动进样器和 G1316A 型柱温箱); Agilent 6530 型四极杆-飞行时间串联质谱仪, 配备电喷雾电离源 (ESI 源) 及 Agilent Mass Hunter 数据采集软件 (version B.02.01); HPLC-DAD Agilent 1100 (美国安捷伦公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); CF16RX II 高速冷冻离心机 (日本 HITACHI 公司); Class II BSC 生物安全柜 (新加坡 ESCO 公司); MCO-18AIC 细胞培养箱 (日本三洋公司); PMI-3000B 荧光倒置相差显微镜 (德国徕卡公司); MULTISKAN-FC 酶标仪 (美国 Thermo 公司); R-210 旋转蒸发仪 (瑞士 BUCHI 公司)。

2 方法

2.1 云南重楼水提物的制备

新鲜云南重楼用清水洗净后切片晒干, 打磨成粉。取 10 g 粉末置 500 mL 烧杯中, 加入蒸馏水 200 mL, 在保持微沸状态下煎煮 1 h, 取煎煮液, 再重复煎煮 2 次, 合并 3 次煎煮液约 500 mL, 室温下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用旋转蒸发器浓缩至体积 100 mL, 调 pH 值至 7.2, 得云南重楼水提取物 (相当于生药量 0.1 g/mL)。

2.2 云南重楼水提物的亲和柱色谱分离

VEGF 亲和柱色谱分离过程: 先用 50 mL 的 A 液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2) 进行 VEGF 亲和柱色谱活化平衡, 取 50 mL 云南重楼水提取物上样于 VEGF 亲和色谱柱, 用 50 mL 的 A 液再次平衡柱体, 除去未结合的物质; 接着用 50 mL 的 B 液 (PBS, pH 6.0) 洗脱柱子, 除去结合能力弱的物质; 最后用 50 mL 的 C 液 (100 mmol/L 甘氨酸溶液, pH 3.0) 洗脱目的物质^[8]; 收集洗脱液 C 洗脱的组分进行 HPLC

分析。HSA 亲和色谱柱作为特异性结合化合物测定的阴性对照,方法同 VEGF 亲和色谱柱分离过程。

2.3 HPLC 检测

Waters XBridge-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~40 min, 5%~90% B; 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C, 体积流量 1 mL/min, 进样量 30 μL。

2.4 功能因子的 HPLC 收集

根据“2.2”项的结果,把与 VEGF 蛋白特异结合(不与 HSA 结合)的洗脱液冷冻干燥,用 1 mL 5%乙腈溶解,进行 HPLC 分析。根据特异性结合化合物的出峰时间,收集与 VEGF 蛋白特异结合的因子,旋蒸去除有机溶剂后用无菌超纯水溶解,再次进行冷冻干燥并定容至 1 mL,然后用 0.22 μm 滤膜滤过,按“2.3”项下方法再次对制备好的因子样品进行 HPLC 检测,确认特异因子的存在,并根据峰面积归一化法估算纯度,因子在-80 °C 冰箱保存备用。

2.5 VEGF 敏感型细胞株的筛选

将消化后重悬的 HepG2 和 HEK293 细胞浓度调整为 2×10^4 个/mL,按每孔 100 μL (2 000 个细胞/孔)接种于 96 孔板中,实验组加入不同质量浓度的 VEGF 蛋白 10 μL,使培养基中 VEGF 终质量浓度分别为 4、20、100、200、500 ng/mL,阴性对照组加无菌超纯水 10 μL,每组 5 个复孔,处理 24 h 后用 MTT 法测定细胞增殖效果[以 490 nm 处吸光度值 (A_{490}) 表示],绘制细胞生长曲线,重复 3 次。

2.6 功能因子对细胞增殖的影响

HepG2、HEK293 细胞接种方法同“2.5”项,把分离得到的因子溶液用无菌超纯水以 5 倍的梯度依次稀释,得到 5 个质量浓度样品(每个质量浓度之间相差 5 倍),每孔加入对应质量浓度的因子各 10 μL,因子终质量浓度分别相当于生药量为 500.0、100.0、20.0、4.0、0.8 mg/mL。阴性对照组加无菌超纯水 10 μL,处理 24 h 后用 MTT 法测定细胞增殖效果,绘制细胞生长曲线,重复 3 次。

2.7 功能因子、VEGF 蛋白和 VEGF 抗体对细胞增殖的影响

HepG2 细胞接种方法同“2.5”项,设置 4 批实验。第 1 批样品组加入不同质量浓度功能因子(终质量浓度分别相当于生药量为 500.0、100.0、20.0、4.0、0.8 mg/mL),阴性对照组加无菌超纯水,阳性对照组加 VEGF 蛋白(终质量浓度为 20 ng/mL)。

第 2 批样品组加入不同质量浓度功能因子(质量浓度同第 1 批实验)和 VEGF 蛋白(终质量浓度为 20 ng/mL),阴性对照组加无菌超纯水,阳性对照组加 VEGF 蛋白(终质量浓度为 20 ng/mL)。第 3 批样品组加入不同质量浓度功能因子(质量浓度同第 1 批实验)、VEGF 蛋白(终质量浓度为 20 ng/mL)和 VEGF 抗体(终质量浓度为 200 ng/mL),阴性对照组加无菌超纯水,阳性对照组加 VEGF 蛋白(终质量浓度为 20 ng/mL)和 VEGF 抗体(终质量浓度为 200 ng/mL)。第 4 批样品组加入不同质量浓度功能因子(质量浓度同第 1 批实验)和 VEGF 抗体(终质量浓度为 200 ng/mL),阴性对照组加无菌超纯水,阳性对照组加 VEGF 抗体(终质量浓度为 200 ng/mL)。4 批实验加入不同处理因素的体积均为 10 μL,处理 24 h 后用 MTT 法测定细胞增殖效果,绘制细胞生长曲线,重复 3 次。

2.8 RRLC-QTOF 测定精确相对分子质量

采用高分辨质谱测定功能因子的精确质量数,推断可能的结构类型。将“2.4”项下收集到的因子组分按照下述液质条件测定精确相对分子质量。

RRLC-QTOF 测定条件: Waters XBridge-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~40 min, 5%~90% B; 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C, 体积流量 1 mL/min, 采用柱后分流,分流进质谱仪的体积流量为 0.3 mL/min,紫外检测器体积流量为 0.7 mL/min。进样体积 3 μL。离子源为电喷雾离子源 (ESI 源),正离子模式检测;干燥气温度为 300 °C;干燥气体积流量为 8 L/min;鞘气温度为 300 °C;鞘气体积流量为 10 L/min,毛细管电压为 3 500 V;喷雾针气压为 310.275 kPa (45 psi),skimmer 电压为 45 V,MS2 碰撞能量 (CE) 为 16 V。

3 结果

3.1 VEGF 亲和柱结合物的 HPLC 分析

HPLC 分析(图 1)显示,云南重楼水提取物中观察到 3 个能与 VEGF 亲和的信号峰(命名为因子 B³),保留时间在 15.6 min 左右;而因子 B³ 不能与 HSA 亲和,表明因子 B³ 与 VEGF 结合是特异性的。

3.2 VEGF 结合因子 B³ 的 HPLC 分离和收集

进一步对因子 B³ 进行分离、纯化和收集。根据纯化因子 B³ 的 HPLC 检测结果,使用峰面积归一化法估算出因子 B³ 的质量分数大于 90%,见图 2。经计算,因子 B³ 的质量浓度相当于生药量 5 g/mL。

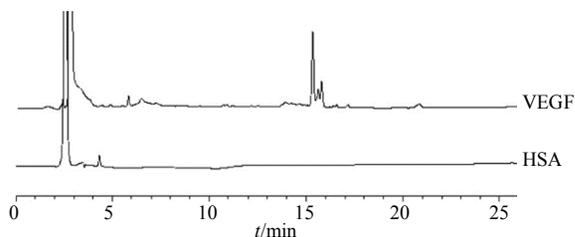


图 1 云南重楼水提取物 VEGF 和 HSA 亲和色谱柱结合成分的 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* water extracts binding to VEGF and HSA affinity columns

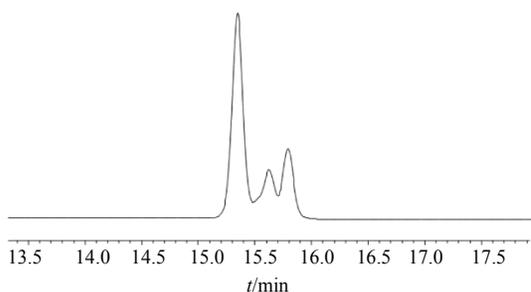


图 2 云南重楼水提取物中因子 B³ 纯化后的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of purified factors B³ from *P. polyphylla* var. *yunnanensis* water extract

3.3 VEGF 敏感型细胞株的筛选

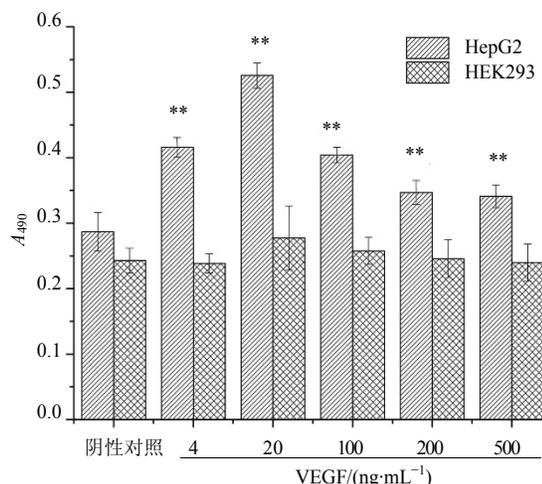
通过 MTT 方法筛选出对 VEGF 敏感的细胞株作为细胞模型,对 VEGF 不敏感的细胞株作为对照。结果显示,不同质量浓度的 VEGF 蛋白对 HepG2 细胞的增殖均有促进作用 ($P < 0.01$),并在 VEGF 蛋白质量浓度为 20 ng/mL 时,促进作用最为显著,当 VEGF 蛋白质量浓度 > 100 ng/mL 时,促进作用逐渐减弱。而 VEGF 蛋白对 HEK293 细胞的增殖没有促进作用 ($P > 0.05$),见图 3。

3.4 因子 B³ 对细胞增殖的影响

在没有外加 VEGF 蛋白的条件下,当因子 B³ 的质量浓度 > 4.0 mg/mL 时,能够显著诱导 VEGF 敏感型细胞 HepG2 的增殖,并呈剂量依赖关系 ($P < 0.01$),但不能诱导 VEGF 不敏感型细胞 HEK293 的增殖,见图 4。

3.5 VEGF 抗体对因子 B³ 和 VEGF 诱导细胞增殖的抑制作用

图 5 显示,仅加入因子 B³ (第 1 批实验)及同时加入因子 B³ 和 20 ng/mL VEGF 蛋白 (第 2 批实验)均能够显著诱导 VEGF 敏感型细胞 HepG2 增殖 ($P < 0.05$);在 VEGF (20 ng/mL) 被 VEGF 抗体 (200 ng/mL) 阻断条件下 (第 3 批实验),因子

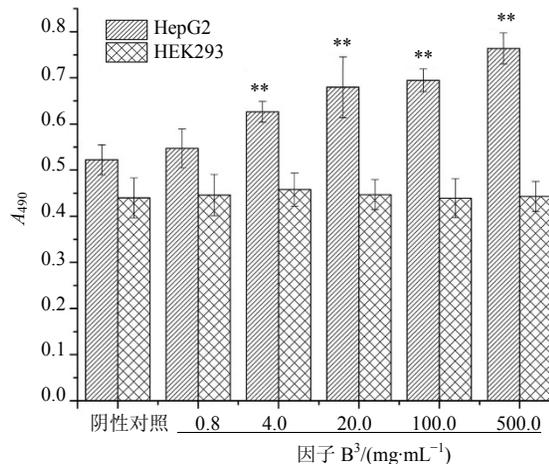


与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$, 图 4 同

** $P < 0.01$ vs negative control group, Fig.4 is same

图 3 不同质量浓度的 VEGF 蛋白对 HepG2 和 HEK293 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of VEGF protein at different concentration on proliferation of HepG2 and HEK293 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs negative control group

图 4 因子 B³ 对 HepG2 和 HEK293 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of factor B³ on proliferation of HepG2 and HEK293 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

B³ 和 VEGF 对 VEGF 敏感型细胞 HepG2 增殖没有影响;而在培养基中只加 VEGF 抗体 (200 ng/mL),不加 VEGF 蛋白条件下 (第 4 批实验),因子 B³ 对 VEGF 敏感型细胞 HepG2 增殖无影响,甚至在 VEGF 抗体的作用下呈现抑制细胞增殖的趋势。结果说明因子 B³ 通过增加或激活 VEGF 活性的途径促进 HepG2 细胞增殖,而不是直接作用于 HepG2 细胞。

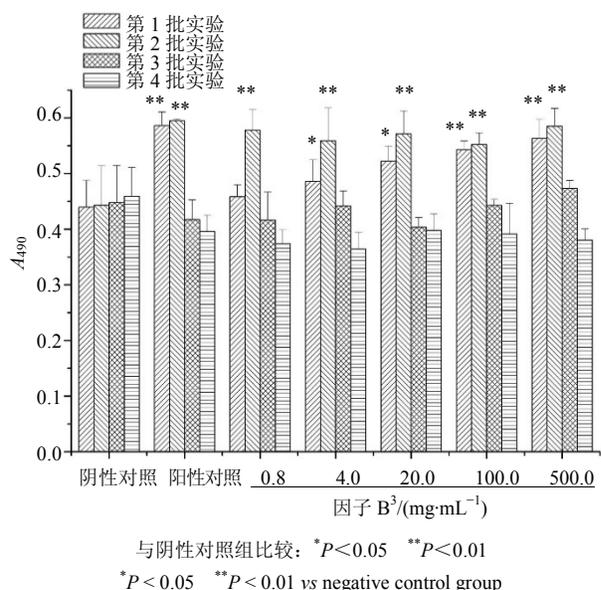


图 5 VEGF 抗体对因子 B³ 和 VEGF 诱导细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of VEGF antibody on proliferation of HepG2 cells induced by factor B³ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 因子 B³ 精确相对分子质量测定

采用 RRLC-QTOF 对因子 B³ 可能存在的化合物进行精确相对分子质量的测定, 得到 3 个精确相对分子质量的检测结果 (图 6)。根据保留时间, 3 个化合物 (编号为 A、B、C) 的质荷比 (m/z) 分别为 504.320 2、679.514 1 和 570.358 9, 根据同位素及其丰度, 通过安捷伦质谱软件 (Agilent Mass Hunter 数据采集软件, version B.02.01), 推导得到 A 和 C 的质谱信号均带双电荷, 为 $[M+2H]^{2+}$ 峰; B 化合物的质谱信号中 m/z 679.514 1 为 $[M+H]^+$ 峰, m/z 701.496 1 为 $[M+Na]^+$ 峰。因此, 3 个化合物的相对分子质量依次为 1 006.624 8、678.506 3 和 1 138.702 2。通过 Agilent Mass Hunter 数据采集软件, 得到这 3 个化合物可能的分子式 (表 1)。此外, 通过 DAD 的光谱扫描, 得到 3 个化合物的 UV 图谱 (图 6 中的小图)。

4 讨论

本研究首次报道云南重楼中存在水溶性的功能

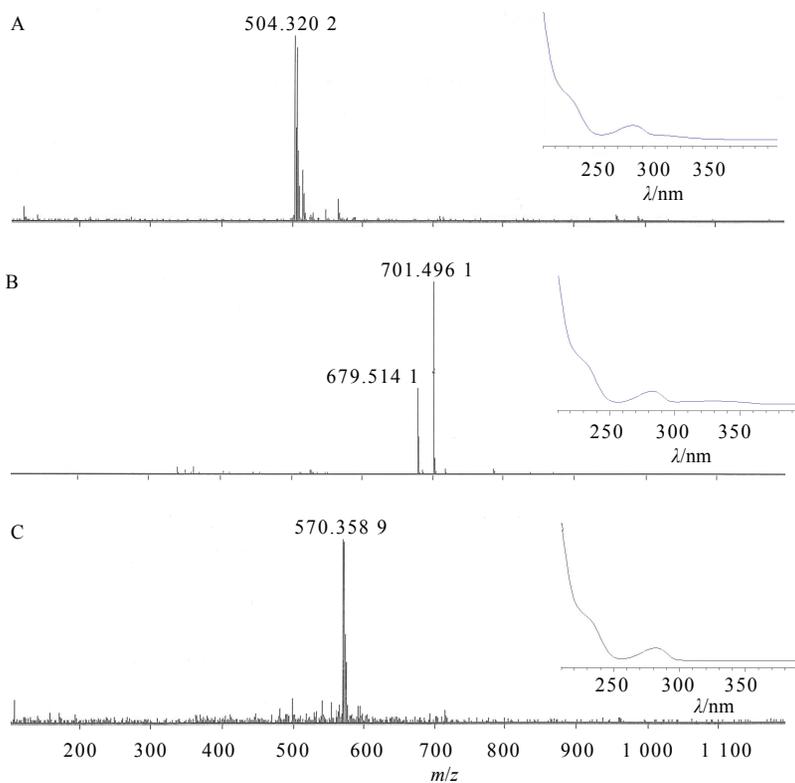


图 6 因子 B³ 的 RRLC-QTOF 和 UV 检测结果

Fig. 6 Results of factor B³ using RRLC-QTOF and UV method

因子 B³, 它不能与 HSA 结合, 而能与 VEGF 蛋白亲和和结合, 这说明因子 B³ 具有高度的 VEGF 结合特异性, 具有潜在调节 VEGF 蛋白的功能。

模型细胞增殖实验结果表明, 因子 B³ 具有促进依赖 VEGF 生长的细胞增殖的作用, 而对不依赖 VEGF 的细胞增殖没有促进作用。进一步的研究表

表1 因子B³中3个化合物的可能分子式、相对分子质量及匹配度Table 1 Possible molecular formula, molecular mass, and matching degree of three compounds in factor B³

化合物	可能分子式	相对分子质量	质量匹配度	综合匹配度
A	C ₄₄ H ₉₀ N ₆ O ₁₉	1 006.624 7	99.98	97.75
	C ₄₁ H ₈₂ N ₁₆ O ₁₃	1 006.623 3	98.32	95.87
	C ₄₀ H ₈₆ N ₁₀ O ₁₅	1 006.622 1	93.12	95.15
B	C ₄₀ H ₇₀ O ₈	678.506 4	99.70	93.70
	C ₃₇ H ₆₂ N ₁₀ O ₂	678.505 1	96.73	93.48
	C ₃₀ H ₆₂ N ₁₆ S	678.505 8	99.53	93.43
C	C ₄₇ H ₉₄ N ₁₆ O ₁₆	1 138.702 1	100.00	98.63
	C ₄₆ H ₉₈ N ₁₂ O ₂₀	1 138.700 7	98.43	97.94
	C ₄₈ H ₉₀ N ₂₀ O ₁₂	1 138.703 3	98.40	97.36

明,当VEGF被其抗体失活后,因子B³对依赖VEGF的细胞增殖没有促进作用。这些结果揭示,在云南重楼中发现的水溶物因子B³是直接通过和VEGF的相互作用来调节细胞的增殖。因为VEGF蛋白参与心脑血管疾病、缺血缺氧性疾病及新生血管的形成、生长^[5],故推测其可能是重楼活血化瘀方面的分子基础。同时,云南重楼在我国传统医学领域被认为是舒筋活血功能的重要传统中药^[2],常作为君药用于治疗下肢静脉血栓、血管闭塞性冠脉炎等疾病。因此,本研究发现的因子B³可能是云南重楼舒筋活血功效的有效成分之一,是一类增强血管功能的活性因子,对传统中药资源的开发利用具有重要的研究价值和现实意义。

根据因子B³的RRLC-QTOF测定结果,结合3个化合物的紫外光谱图以及在电喷雾正离子化模式下出现双电荷的现象,推断因子B³中至少可能存在的3个化合物为皂苷类成分。根据表1中这3个化合物可能的分子式和相对分子质量,查阅文献和资料,并没有发现类似的化合物,因此推测这3个极有可能是新的化合物,但最终结构的完全确证需要在接下来的工作中进一步展开。

本研究虽然报道因子B³通过和VEGF相互作用后调节细胞的增殖,但是在依赖VEGF的HepG2细胞中,没有外加VEGF的条件下,因子B³还是诱导细胞的增殖,这可能与HepG2细胞可以合成并且分泌VEGF蛋白到细胞外有关^[9],微量VEGF存在于培养基中以介导因子B³的作用,因为VEGF抗体可以拮抗因子B³的诱导作用。这种推测可能和培养基外加20 ng/mL VEGF蛋白条件下,因子B³没有显示其剂量效应的原因,因为当培养基中VEGF蛋白浓度足够高时,细胞增殖的促进作用已

经达到饱和。此外,本研究虽然发现因子B³是通过VEGF调节细胞的增殖,但是因子B³并非单一结构,根据液相色谱和液质的检测结果来看至少含有3种物质,目前正在进一步将其分离,确定每个单一结构,进一步研究单一结构的功能,有利于更好地开发云南重楼这一传统中药资源。

志谢:浙江农林大学研究生周瑜和张宇在实验过程中给予帮助。

参考文献

- [1] 武姗姗,高文远,段宏泉,等.重楼化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2004,35(3):344-347.
- [2] 尹鸿翔,张浩,薛丹,等.滇川地区重楼属药用植物资源质量初评[J].中国中药杂志,2007,32(13):1344-1346.
- [3] 中国药典[S].一部.2010.
- [4] 孙旭东,欧希龙,关云艳,等.HIF-1 α 与VEGF165在胃癌的表达及其意义[J].江苏医药,2011,37(11):1288-1290.
- [5] 蒋国顺,朱郎标,高长青,等.VEGF165 cDNA治疗缺血心肌的实验研究[J].中国现代医学杂志,2003,13(4):7-9.
- [6] Ehrbar M, Metters A, Zammaretti P, et al. Endothelial cell proliferation and progenitor maturation by fibrin-bound VEGF variants with differential susceptibilities to local cellular activity[J]. *J Controlled Release*, 2005, 101(1/3): 93-109.
- [7] Chen Z X, Liu B R, Ding Y T, et al. Proteomic analysis of anti-tumor effects by *Rhizoma Paridis* total saponin treatment in HepG2 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120(2): 129-137.
- [8] 马骊,王小宁,张智清,等.VEGF165 cDNA在酵母中的表达、纯化及其生物学活性研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2001,17(1):24-28.
- [9] 李兴睿,廖晓峰,易继林.缺氧对肝癌细胞系HepG2表达VEGF的影响[J].中国普外基础与临床杂志,2005,12(5):477-479.