

冬虫夏草繁育品对恶性黑色素瘤 B16 细胞增殖及迁移能力的影响

季宇彬¹, 白雪莲^{1,2}, 霍小位², 李文佳³, 李 静³, 肖 瑛³, 胡雪峰³, 曹 丽^{2*}

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. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 广东东阳光药业有限公司 国家中医药管理局重点研究室, 广东 东莞 523850

摘要: 目的 探讨冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 繁育品对恶性黑色素瘤 B16 细胞增殖及迁移能力的影响。方法 通过 MTT 法、平板克隆实验检测冬虫夏草繁育品对 B16 细胞增殖能力的影响; 采用划痕实验、transwell 小室实验检测其对 B16 细胞迁移能力的影响; 通过黏附实验检测其对 B16 细胞黏附能力的影响; 采用流式细胞仪检测其对 B16 细胞周期分布的影响; 采用 Western blotting 法检测其对 B16 细胞中 MMP-2、MMP-9、Bax、Bcl-2、CyclinD1、CDK2、CDK4、P21 及 p-Akt 蛋白表达的影响。结果 冬虫夏草繁育品能够将 B16 细胞阻滞在 G₁/S 期, 从而显著抑制 B16 细胞的增殖, 并显著降低 B16 细胞的迁移能力。同时可导致 B16 细胞 MMP-9、MMP-2、Bcl-2、CyclinD1、CDK2、CDK4、p-Akt 蛋白表达减少和 Bax、P21 蛋白表达增加。结论 冬虫夏草繁育品能显著抑制 B16 细胞的增殖及迁移能力, 其作用机制可能与调控细胞周期相关蛋白、MMPs 家族蛋白及 p-Akt 蛋白的表达有关。

关键词: 冬虫夏草; 恶性黑色素瘤 B16 细胞; 迁移; 细胞周期; 增殖; 基质金属蛋白酶; 蛋白激酶 B (Akt)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0368-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.016

Effects of cultivated *Cordyceps sinensis* on proliferation and migration of B16 melanoma cells

Ji Yu-bin¹, Bai Xue-lian^{1,2}, Huo Xiao-wei², Li Wen-jia³, Li Jing³, Xiao Ying³, Hu Xue-feng³, Cao Li²

1. Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., Dongguan 523850, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cultivated *Cordyceps sinensis* on inhibiting the proliferation and migration of B16 melanoma cells. **Methods** MTT assay and clone formation assay were used to examine the inhibitory effect of cultivated *C. sinensis* on the proliferation of B16 cells; Scratching test and transwell assay were used to detect its effect on migration; Cell adhesion assay was used to detect its effect on adhesion. Flow cytometry was used to detect its effect on cell cycle arrest; Western blotting was used to detect its effect on the expression of the proteins of MMP-2, MMP-9, Bax, Bcl-2, CyclinD1, CDK2, CDK4, P21, and p-Akt. **Results** The results showed that cultivated *C. sinensis* can significantly inhibit the proliferation and clone formation of B16 cells via arresting cells at G₁/S phase in a dose-dependent manner. Moreover, cell migration was also substantially inhibited in a dose-dependent manner. Western blotting analysis showed that cultivated *C. sinensis* obviously increased the levels of Bax and P21, and meanwhile, decreased the expression of Bcl-2, MMP-2, MMP-9, CDK2, CDK4, CyclinD1, and p-Akt. **Conclusion** The inhibitory effects of cultivated *C. Sinensis* on the proliferation and migration of B16 cells probably associated with the expression of related regulating proteins, MMPs family proteins and p-Akt protein in cell cycle.

Key words: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; B16; migration; cell cycle; proliferation; MMP; Akt

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 为麦角菌科真菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体, 具有补肾益肺、止血化痰的功效^[1], 是名贵的濒危中药材。由于来源紧缺和

收稿日期: 2017-07-20

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 研究方向为抗肿瘤药物研究。E-mail: jyb@hrbcu.edu.cn

*通信作者 曹 丽 (1966—), 女, 博士, 研究员, 研究方向为天然药物抗肿瘤药理学。Tel: (010)57833223 E-mail: lcao@implad.ac.cn

市场需求增加,冬虫夏草繁育技术成为研究重点,广东东阳光药业有限公司率先实现了冬虫夏草的产业化繁育技术。按照《中国药典》2015 年版标准,对冬虫夏草繁育品和野生品的腺苷含量和 5 种重金属及有害元素的含量进行检测,结果表明冬虫夏草繁育品腺苷和 5 种重金属及有害元素含量均不超过标准,并且砷的含量显著低于野生品^[1-3],而基于特征图谱及多指标成分含量的冬虫夏草野生品与繁育品的比较研究也显示冬虫夏草繁育品的品质不低于野生冬虫夏草^[4]。

体外研究表明野生冬虫夏草可以通过诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期来抑制肿瘤细胞增殖^[5-7];体内实验研究也证明其可抑制黑色素瘤 B16F10 的转移^[8],表明野生冬虫夏草具有明确的抗肿瘤作用。但冬虫夏草繁育品是否和野生品一样具有抗肿瘤作用尚未见文献报道,本课题组前期研究显示冬虫夏草繁育品体内与顺铂合用,具有明显的减毒增效作用^[9]。为了进一步明确其是否具有对肿瘤的直接抑制作用,本研究选择小鼠黑色素瘤 B16 细胞为研究对象,探究冬虫夏草繁育品对肿瘤细胞增殖和迁移的影响,为其临床应用及作为野生品的替代品提供参考。

1 材料

1.1 药物

冬虫夏草繁育品由广东东阳光研究院提供,并经中国食品药品检定研究院中药民族药检定所郑健研究员鉴定为 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., 为麦角菌科真菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体。

1.2 细胞株

黑色素瘤 B16 细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.3 主要试剂

RPMI 1640 培养基(批号 20161115)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 20170105)、高效裂解液(RIPA)(批号 20160805)、0.25% EDTA 胰蛋白酶(批号 20160726)、CCK-8(批号 20161003)购自北京索莱宝公司;胎牛血清(批号 150918)购自北京元亨圣马公司; β -actin 抗体、基质金属蛋白酶-2(MMP-2,批号 2C1)、MMP-9(批号 7-11C)、CDK2(批号 D-12)、CDK4(批号 C-22)、Cyclin D1(批号 1-295)、P21(批号 C-19)抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;p-Akt(批号 4060S)、Bax(批号 2772S)、Bcl-2(批号 3478S)抗体购自 CST 公司;辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔抗体(批号 2112F)、辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠

抗体(批号 1915H)购自北京康为试剂有限公司。

1.4 主要仪器

BCN-1360 型生物洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);5410 型二氧化碳培养箱(NAPCO,美国);MQZ200 型酶标仪(Bio-Tek,美国);CKX41 倒置荧光显微镜(Olympus,日本);Labofuge 400R 离心机(Heraeush,德国);流式细胞分析仪(Becton-Dickinson,美国)。

2 方法

2.1 受试药物的制备

将新鲜冬虫夏草繁育品剪碎,置于烧杯中,按 1:10 料液比加入超纯水,冰浴下匀浆至无明显颗粒为止,将匀浆后所得的混悬液超声提取,超声过程加入冰袋控制水温(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,超声完毕将样品冷冻,重复匀浆超声实验步骤,将第 2 次超声完毕的混悬液离心,收集合并的上清液进行冻干处理,得冻干样品(含腺苷 0.029%),将所得固体用超纯水复溶。按生药计算,药物原液质量浓度为 110.48 mg/mL,分装后于 -20°C 保存。使用之前用 0.22 μm 滤膜滤过除菌,并用培养基稀释到使用质量浓度。

2.2 细胞培养

B16 细胞用添加 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度下培养,每 2~3 天传代或换液,从细胞复苏培养至 4 代以后开始用于实验。

2.3 MTT 实验

将处于对数生长期的 B16 细胞以每孔 5 000 个的浓度接种于 96 孔板中,24 h 后加入含有不同质量浓度药物的培养基 100 μL ,使得药物终质量浓度分别为 0、0.345、0.690、1.381、2.762、5.524、11.048 mg/mL。当药物作用时间达到 72 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL),继续作用 4 h,弃掉上清液,并加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶解反应产物,用酶标仪在 570 nm 波长下检测吸光度(A)值,计算细胞存活率(存活率= $A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$)和药物半数抑制浓度(IC_{50})值。

2.4 平板克隆实验

将对数生长期的细胞用 0.25% EDTA 的胰酶消化吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度至 100 个/mL,按 2 mL/孔接种于 6 孔板中,24 h 后加入含有 10% FBS 的稀释后的药物,并且使得药物终质量浓度分别为 0、1.381、2.762、5.524 mg/mL,药物持续作用 10~14 d(出现肉眼可见的克隆时终止培养),吸去上清液,用 PBS 清洗 3 次,加入甲醇固定 15

min, 用 PBS 洗 1 次, 静置干燥。0.1% 结晶紫染色 20 min 后, 用蒸馏水慢慢洗去染料, 室温下干燥并且观察拍照。

2.5 划痕实验

将对数生长期的 B16 细胞用 0.25% EDTA 的胰酶消化吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 按 0.5 mL/孔接种于 24 孔板中, 当细胞单层长满时, 用 200 μL 枪头在每孔中央划痕。用 PBS 洗掉多余的细胞, 并且加入含有不同质量浓度药物的无血清培养基, 使药物终质量浓度分别为 0、0.345、0.690、1.381 mg/mL。分别于 0 h 和 24 h 拍照记录。计算迁移率 (迁移率 = 给药组迁移细胞量/对照组迁移细胞数量)。

2.6 Transwell 迁移实验

将对数生长期的 B16 细胞用 0.25% EDTA 的胰酶消化吹打成单细胞悬液, 接种于 6 孔板中, 分别用 0、1.381 mg/mL 的药物作用于细胞 24 h 后, 消化吹打细胞并用无血清培养基调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 取 100 μL 细胞悬液加入到 Transwell 上室, 下室加入含有 10% FBS 的培养基 600 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中培养 24 h 后, 取出小室, 吸出上室液体, 1 mL 甲醇固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 用湿棉棒小心擦掉上室的细胞, 在倒置显微镜下随机选取 5 个视野观察并拍照。计算细胞迁移率。

细胞迁移率 = 给药组迁移数量/对照组迁移数量

2.7 黏附实验

将对数生长期的细胞用 0.25% EDTA 的胰酶消化吹打成单细胞悬液, 接种于 6 孔板中, 分别用 0、0.345、0.690、1.381 mg/mL 的药物作用于细胞 24 h 后, 调整细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$, 备用。将 Matrigel 基质胶与培养基 1:3 稀释, 以 35 μL /孔加入到 96 孔板中, 共铺 12 个孔, 置超净台内室温风干后, 用 2% BSA 20 μL 进行封阻, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中放置 1 h。每组选择 3 个铺胶孔, 加入 100 μL 相应的细胞悬液, 将铺好的 96 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养。1 h 后用 PBS 洗掉未黏附的细胞, 每孔加入 90 μL 无血清培养基和 10 μL CCK-8, 继续在培养箱中孵育 4 h, 上酶标仪检测 A 值。计算细胞黏附率。

细胞黏附率 = $A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$

2.8 细胞周期检测

将对数生长期的细胞用 0.25% EDTA 的胰酶消化吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度并接种于 6 孔

板, 分别用 0、1.381、2.762 mg/mL 的药物作用细胞 24 h, 收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗 3 次, 加入 1 mL 预冷的体积分数为 70% 的乙醇, 混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗 3 次, 加入配好的 PI 染色缓冲液避光染色 10 min 后, 用流式细胞仪检测细胞周期。

2.9 Western blotting 法检测相关蛋白表达

取对数生长期的 B16 细胞接种于 T25 培养瓶中, 24 h 后将培养基替换成含有不同质量浓度药物的培养基, 药物质量浓度分别为 0、1.381、2.762、5.524 mg/mL, 药物作用 24 h 后, 收集细胞, 提取蛋白。取 40 μg 左右的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后 300 mA 恒流电转 55 min, 将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 室温下封闭二抗 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 用 ECL 显色后使用凝胶成像系统 (BIO-RAD) 进行成像, 使用 Photoshop 图像处理软件对蛋白条带的灰度值进行分析, 并与内参 β -actin 条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

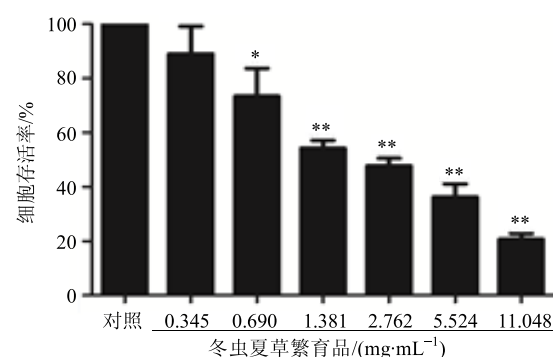
2.10 统计学处理

所有数据用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对细胞增殖的抑制作用

如图 1 所示, 与对照组比较, 随着冬虫夏草繁育品质量浓度的增加, 药物对 B16 细胞的增殖抑制作用增强 ($P < 0.05$ 、0.01), 具有浓度依赖性, 药物作用 72 h 的 IC_{50} 为 2.55 mg/mL。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 冬虫夏草繁育品对 B16 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 1 Effect of cultivated *C. sinensis* on proliferation of B16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 对 B16 细胞克隆形成的影响

如图 2 所示,与对照组比较,1.381、2.762、5.524 mg/mL 冬虫夏草繁育品组 B16 细胞克隆形成率均显著下降 ($P < 0.01$),说明药物抑制 B16 细胞克隆形成的能力随药物质量浓度增加而逐渐增强。

3.3 对 B16 细胞迁移的影响

3.3.1 划痕实验 如图 3 所示,通过划痕实验观察细胞伤口愈合情况,判断冬虫夏草繁育品对细胞迁移能力的影响。对照组 24 h 时伤口基本愈合,与对照组相比,用不同质量浓度冬虫夏草繁育品作用于

细胞,其迁移率明显降低且呈浓度依赖性。

3.3.2 Transwell 小室实验 如图 4 所示,用 1.381 mg/mL 冬虫夏草繁育品处理细胞 24 h 后,与对照组相比,转至 Transwell 膜下面的细胞数量显著减少 ($P < 0.01$),迁移率为 $(31.61 \pm 1.62)\%$ ($n = 3$),说明 B16 细胞迁移能力受到药物的抑制。

3.4 对 B16 细胞黏附能力的影响

如图 5 所示,与对照组相比,随着冬虫夏草繁育品质量浓度的增加,细胞黏附率降低 ($P < 0.01$),并且呈浓度依赖性。

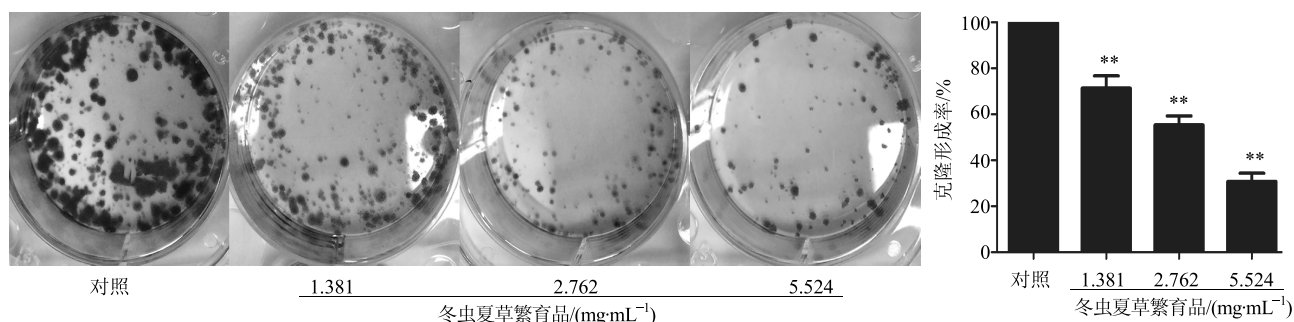


图 2 冬虫夏草繁育品对 B16 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of cultivated *C. sinensis* on clone formation of B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

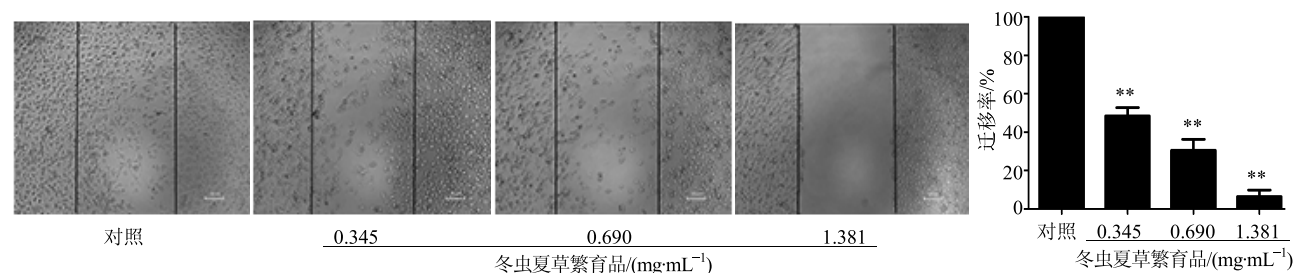


图 3 冬虫夏草繁育品作用 B16 细胞 24 h 后对细胞迁移的影响 (标尺=100 μ m, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of cultivated *C. sinensis* on migration of B16 cells (bar = 100 μ m, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

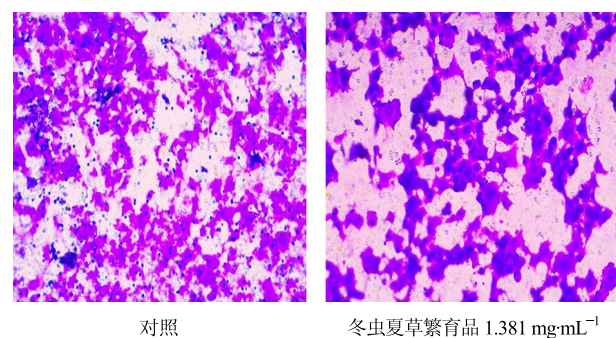


图 4 冬虫夏草繁育品对 B16 细胞迁移能力的影响 ($\times 400$, Transwell 小室)

Fig. 4 Effect of cultivated *C. sinensis* on migration of B16 cells ($\times 400$, Transwell assay)

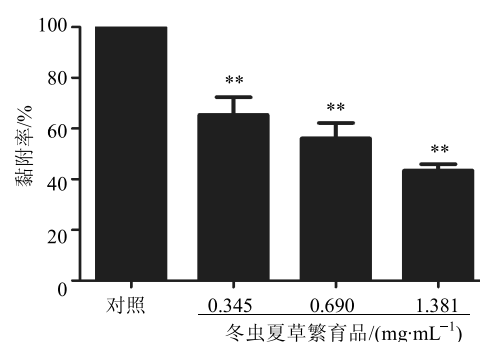


图 5 冬虫夏草繁育品对 B16 细胞黏附能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of cultivated *C. sinensis* on adhesion of B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 对 B16 细胞周期的影响

如图 6 和表 1 所示,随着冬虫夏草繁育品质量浓度的增加,B16 细胞 G₁ 期分布比例增加,S 期分布比例减少,且呈浓度依赖性,表明 B16 细胞被阻滞在 G₁/S 期。

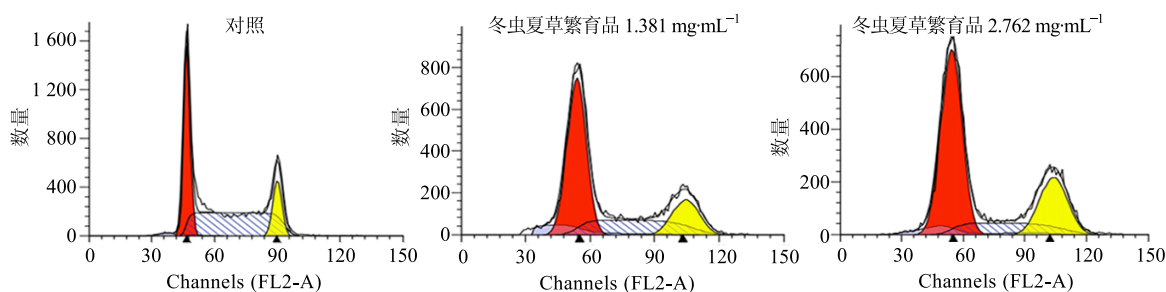


图 6 冬虫夏草繁育品对 B16 细胞周期分布的影响

Fig. 6 Effect of cultivated *C. sinensis* on cell cycle arrest of B16 cells

表 1 冬虫夏草繁育品对 B16 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of cultivated *C. sinensis* on cell cycle arrest of B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	(G ₀ /G ₁)/%	S/%
对照	—	37.38 ± 1.81	53.71 ± 2.15
冬虫夏草繁育品	1.381	62.18 ± 1.87**	28.90 ± 12.51**
	2.762	71.21 ± 1.79**	20.52 ± 2.96**

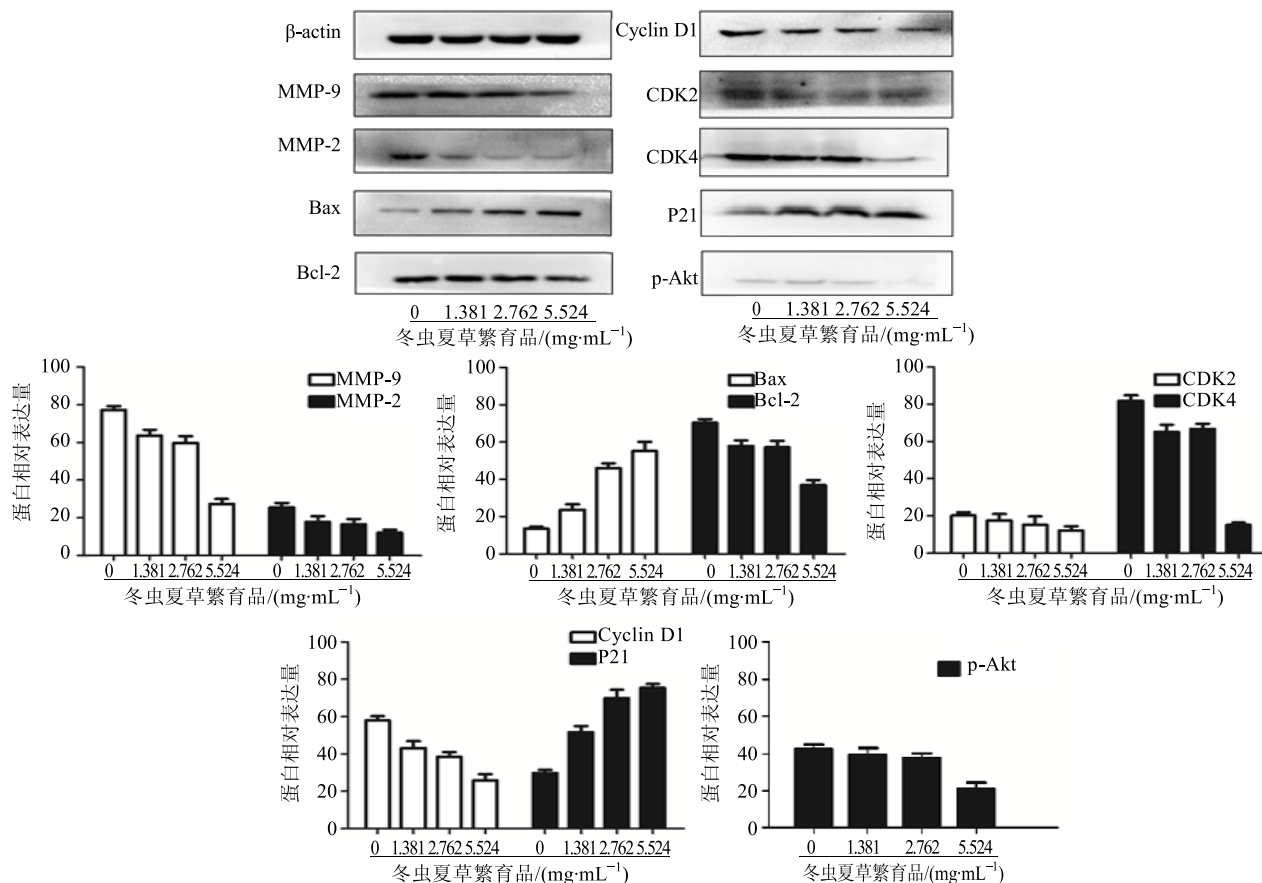


图 7 冬虫夏草繁育品对 B16 细胞相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of cultivated *C. sinensis* on relative protein expression of B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

冬虫夏草作为一种名贵的传统藏药,已被多项实验及临床研究证实具有较好的抗肿瘤作用^[10-11]。冬虫夏草繁育品可能是取代野生虫草的最佳选择,因此有必要对其药效进行系统研究。前期研究结果观察到冬虫夏草繁育品体内对顺铂治疗小鼠肺癌转移具有显著的增效减毒作用^[9],提示其可能也具有直接抑制肿瘤生长和转移的作用。经过筛选发现黑色素瘤细胞 B16 对冬虫夏草繁育品比较敏感,在此基础上,本研究采用黑色素瘤 B16 细胞进一步观察冬虫夏草繁育品的抑制细胞增殖、转移作用以及可能的分子机制。

MTT 和克隆形成实验结果表明冬虫夏草繁育品可以显著抑制 B16 细胞增殖 ($P<0.05$)。流式细胞术结果显示 B16 细胞被阻滞在 G₁/S 期。细胞周期的激活与细胞的增殖有关^[12], Cyclin E-CDK2 和 Cyclin D1-CDK4/CDK6 为细胞从 G₁ 进入 S 期的关键激酶复合物。Western blotting 结果显示 Cyclin D1 和 CDK2、CDK4 蛋白表达均降低;同时 Bcl-2/Bax 的值也降低,而 Bcl-2 家族与细胞凋亡有关^[13],说明冬虫夏草繁育品可通过诱导 B16 细胞凋亡、细胞周期阻滞来抑制细胞增殖。

划痕实验和 Transwell 小室实验结果显示冬虫夏草繁育品可以抑制 B16 细胞迁移。进一步采用 Western blotting 检测 MMP-9、MMP-2 蛋白表达, MMP-9、MMP-2 蛋白表达均降低。MMPs 家族成员 MMP-2 和 MMP-9,由于其能够特异性降解基底膜的主要成分 IV 型胶原和细胞外基质 (ECM),在多种恶性肿瘤的侵袭转移过程中发挥至关重要的作用^[14],说明冬虫夏草繁育品可通过下调 MMP-9、MMP-2 蛋白表达抑制 B16 细胞迁移。

Western blotting 检测结果同时发现冬虫夏草繁育品下调 p-Akt 蛋白表达, Akt 蛋白在肿瘤发生、发展、侵袭、转移以及耐药方面具有非常核心的调控作用, Akt 与细胞内众多蛋白分子组成多个非常复杂的信号通路网络,之前的体内实验也证实其具有抑制 Akt/MMP-2/MMP-9 通路的作用^[10],提示 Akt 信号通路可能是冬虫夏草抑制肿瘤细胞生长、侵袭、转移的关键调控点,但其具体是如何调控 Akt 信号通路网络的,还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 咎珂, 苏蕊, 刘杰, 等. 冬虫夏草人工繁育品与野生冬虫夏草中腺苷含量的比较研究 [J]. 中国药事, 2016, 30(6): 598-603.
- [3] 刘杰, 李耀磊, 咎珂, 等. 冬虫夏草人工繁育品和野生冬虫夏草中 5 种重金属及有害元素含量的比较 [J]. 中国药事, 2016, 30(9): 912-918.
- [4] 咎珂, 黄莉莉, 过立农, 等. 基于特征图谱及多指标成分含量的冬虫夏草野生与人工繁育品比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(20): 3957-3962.
- [5] Niwa Y, Matsuura H, Murakami M, *et al.* Evidence that naturopathic therapy including cordyceps sinensis prolongs survival of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Integr Cancer Ther*, 2013, 12(1): 50-68.
- [6] 陈家念, 张璇, 蔡豪斌, 等. 冬虫夏草菌丝体水提醇沉物体外抗肿瘤活性研究 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(2): 108-112.
- [7] 卢群, 罗少洪, 何伟彬, 等. 虫草素对人肝癌 Bel-7402 细胞抑制及作用机制的研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 7(10): 1477.
- [8] Winkler D. Yartsa gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy [J]. *Econ Bot*, 2008, 62(3): 291-305.
- [9] Huo X W, Liu C Q, Bai X L, *et al.* Aqueous extract of *Cordyceps sinensis* potentiates the antitumor effect of DDP and attenuates therapy-associated toxicity in non-small cell lung cancer via I κ B α /NF κ B and AKT/MMP2/MMP9 pathways [J]. *Rsc Adv*, 2017, doi: 10.1039/C7RA04716A.
- [10] Gogas H J, Kirkwood J M, Sondak V K. Chemotherapy for metastatic melanoma: Time for a change [J]. *Cancer*, 2007, 109(3): 455-464.
- [11] 胡贤达, 黄雪, 王彪, 等. 冬虫夏草抗肿瘤及免疫调节作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 448-452.
- [12] Kwon H, Lee J J, Lee J H, *et al.* Cinnamon and its components suppress vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitors Am [J]. *J Chin Med*, 2015, 43(4): 621.
- [13] 孟岩, 李艳, 叶尚尚, 等. rhEPO 对高糖状态下大鼠 Miller 细胞凋亡及对 Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1132-1135.
- [14] Roy R, Yang J, Moses M A. Matrix metalloproteases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(31): 5287-5297.