崔玮,丁玲强,曾巧英. 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 463-469.
Cui W, Ding LQ, Zeng QY. Inhibitory effect of EtOAc extract from *Saxifraga taugutica* on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic-transplanted tumors in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 463-469.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.005

甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用

崔玮[1,2],丁玲强[1,2],曾巧英[3*]

(1. 河西学院生命科学与工程学院,甘肃 张掖 734000; 2. 河西学院实验动物中心,甘肃 张掖 734000;
3. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

【摘要】 目的 探讨甘青虎耳草乙酸乙酯提取物(EtOAc extract from *Saxifraga taugutica*,EST)对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用。**方法** 体外实验用不同浓度 EST 处理 H22 细胞 48 h 后,AO/EB 双荧光染色,激光共聚焦显微镜观察细胞形态变化;用核酸电泳和流式细胞术检测 H22 细胞的凋亡情况。建立小鼠肝癌原位移植瘤模型进行体内实验,对比 EST 低、中、高剂量组对荷瘤小鼠抑瘤率、T 淋巴细胞增殖能力以及肝病理变化的影响。**结果** EST 处理后 H22 细胞出现凋亡形态学变化,且与浓度正相关;核酸电泳呈凋亡特征性梯状带;流式细胞分析,500 μg/mL 处理组凋亡率达 31%;体内试验显示, EST 低、中、高剂量的抑瘤率分别为 33.0%、46.7%、64.3%;显著提高小鼠的胸腺指数、T 淋巴细胞增殖能力($P < 0.05$);组织学观察证明 EST 各剂量组癌细胞有不同程度的生长抑制,形态固缩、向周围组织浸润减少。**结论** EST 可增强小鼠免疫功能和诱导肿瘤细胞凋亡,具明显的抗肿瘤作用,与剂量正相关。

【关键词】 甘青虎耳草;乙酸乙酯提取物;肝癌细胞;原位移植瘤;小鼠
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0463-07

Inhibitory effect of EtOAc extract from *Saxifraga taugutica* on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic-transplanted tumors in mice

CUI Wei[1,2], DING Lingqiang[1,2], ZENG Qiaoying[3*]

(1. College of Life Sciences and Engineering Hexi University, Zhangye 734000, China. 2. Laboratory Animal Center, Hexi University, Zhangye 734000. 3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)
Corresponding author: ZENG Qiaoying.E-mail:zengqy@gsau.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of EtOAc extract from *Saxifraga taugutica* (EST) on carcinoma cells and orthotopic-transplanted tumors. **Methods** Murine cancer cells (H22 cells) were incubated with different concentrations of EST for 48 h *in vitro*. Morphological changes were examined by laser confocal microscopy after AO/EB double staining. Apoptosis of carcinoma cells was determined by DNA electrophoresis. and flow cytometry. Orthotopic-transplanted tumors in mice were established *in vivo*. The tumor inhibition rate, thymus index, spleen index, and liver pathology were compared between low-dose, medium-dose, and high-dose groups. Results Apoptotic morphological changes of H22 cells were observed, with the level of apoptosis gradually increasing with increased EST concentration. DNA

[**基金项目**]国家自然科学基金项目(31860709),甘肃省自然科学基金项目(18JR3RG207)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (31860709), and National Natural Science Foundation of Gansu (18JR3RG207).
[**作者简介**]崔玮(1969—),男,博士研究生,研究方向:动物生理。Email:zhangyecw@163.com
[**通信作者**]曾巧英,女,博士,教授,博士生导师。Email:zengqy@gsau.edu.cn

electrophoresis demonstrated a typical ladder pattern. Flow cytometry revealed that the apoptosis rate of H22 cells was 31% in the EST group with 500 μg/mL. *In vivo* experiments showed that the tumor inhibition rate was dose-dependent to some extent; the best tumor inhibition rate was 64.3% in the high dose group, followed by tumor inhibition rates of 46.7% in the medium dose group and 33% in the low dose group. Spleen and thymus indexes in the EST group was significantly higher than those in the model group ($P< 0.05$). Histological observation showed that the proliferation and invasion of cancer cells was inhibited to different degrees, and karyopyknosis of cancer cells was identified in the EST group. Conclusion EST could enhance the immune function of mice, induce apoptosis of tumor cells, and significantly inhibit the proliferation of carcinoma cells in a dose-dependent manner.

【Keywords】 *Saxifraga taugutica*; EtOAc extract; hepatoma cells; orthotopic transplantation tumor; mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

甘青虎耳草(*Saxifraga taugutica*)是虎耳草科虎耳草属植物。为常用藏药,藏药名松滴,其味苦、性凉,清热。常用于治疗急性中耳炎、风热咳嗽、大泡性鼓膜炎、风疹瘙痒等[1]。研究证实,甘青虎耳草中含有黄酮、多糖等生物活性物质,其中,乙酸乙酯提取物中槲皮素比较丰富[2],诸多研究表明,槲皮素通过调节抑癌基因表达、阻断细胞周期、诱导细胞凋亡、干扰细胞信号传导、抑制血管生成、阻滞肿瘤细胞侵袭及转移等多种机制来发挥抗肿瘤作用,对人前列腺癌、乳腺癌、肺癌、淋巴癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤细胞均有抑制作用[3-6]。肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,死亡率高[7],目前有关甘青虎耳草对肝癌是否有影响的研究报道较少,甘青虎耳草乙酸乙酯提取物(EtOAc extract from *Saxifraga taugutica*,EST)对肝癌 H22 细胞和其肝原位移植瘤的抑制鲜有研究。为此,本试验研究了 EST 对肝癌 H22 细胞和其肝原位移植瘤生长的影响,旨在探讨甘青虎耳草在肝细胞癌治疗中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

小鼠 H22 肝癌细胞,购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 实验动物

6 周龄 SPF 级 KM 小鼠,体重 18 ~ 22 g,来源于甘肃中医药大学科研实验动物中心【SCXK(甘)2015-0002】,在甘肃中医药大学科研实验动物中心进行实验【SYXK(甘)2015-0005】,所有操作均符合甘肃中医药大学动物实验伦理学要求(审批号:2018-310)。

1.1.3 试剂

细胞 DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:B511375);环磷酰胺(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:H58849);丫啶橙(AO)(上海生工生物工程有限公司,批号:140810);噻唑蓝(MTT)(上海源叶生物科技有限公司,批号:YY11351);多聚甲醛(Sigma 公司,批号:19J171120);苏木精(天津光复化学试剂有限公司,批号:090408);伊红(天津光复化学试剂有限公司,批号:75130319); RPMI-1640 培养基(Gibio 公司,批号:AE2446298);小牛血清(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,批号:NYB0814)。

1.2 方法

1.2.1 EST 的制备

虎耳草→60℃ 烘干→粉碎→过筛(80 目)→石油醚浸泡(脱脂)→挥干→超声辅助乙醇回流提取(100 W)→合并粗提液→室温减压抽滤→滤液减压旋蒸→蒸馏水溶解→乙酸乙酯萃取→萃取液减压浓缩→冻干→蒸馏水溶解→AB-8 大孔树脂吸附→去离子水洗脱除杂→90% 乙醇洗脱→减压浓缩→异丙醇洗涤(2 次)→过滤→浓缩→甲醇除杂→冻干(棕黄色粉末)→甘青虎耳草提取物。

以芦丁作对照,硝酸铝法测得甘青虎耳草提取物中黄酮的纯度为 82.07%。

1.2.2 EST 对 H22 瘤细胞的体外抑制试验

(1)H22 细胞的形态学观察

将生长旺盛的 H22 细胞以 5×10^4细胞/孔接种于 24 孔板,置 37℃、5% CO_2 细胞培养箱培养 24 h,PBS 清洗一次,加入含 EST 的培养液,使其终浓度分别为 0 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、500 μg/mL,培养 48 h 后 1000 r/min,离心 10 min,弃上清,PBS 洗两次,收集细胞,加入 100 μL PBS 重新悬浮细胞,与 4 μL AO/EB 荧光染液混合(AO、EB 各含 100 μg/mL),进行吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染色。30 s 后在激光共聚焦显

微镜下观察药物作用于细胞后细胞的形态变化及细胞的凋亡情况[8]。

(2)H22 细胞的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

收集经 EST 0、20、40、100、200、500 μg/mL 处理的 H22 细胞,用细胞 DNA 提取试剂盒提取 H22 细胞基因组 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪拍照。设 PBS 对照。

(3)细胞凋亡率的检测

收集经 EST 0 μg/mL 和 500 μg/mL 处理的两组 H22 细胞,根据凋亡试剂盒的说明书用流式细胞仪检测分析。每个处理 3 个重复,设 PBS 阴性对照。

1.2.3　EST 对 H22 瘤细胞的体内抑制试验

(1)小鼠 H22 肝癌细胞原位移植瘤模型的建立

依据参照文献[9]的方法略作改进,取对数生长期的 H22 细胞,用生理盐水调整细胞密度(每毫升 2×10^6 个),腹腔注射到雄性 KM 小鼠体内,作为瘤源小鼠,取培养 1 周的瘤源小鼠腹水,离心(1000 r/min、10 min)收集 H22 细胞,生理盐水调整细胞密度(2×10^7/mL) 制成细胞悬液;选取健康昆明种小鼠(雌雄各半)、麻醉、腹部手术、暴露肝,向肝内注入 10 μL H22 细胞悬液,棉签压迫止血、乙醇棉球擦拭,肝回纳腹腔,缝合伤口,小鼠肝癌细胞原位移植瘤模型建立完毕。另外,肝接种生理盐水代替 H22 细胞实施假移植。

(2)动物的分组与处理

将肝癌原位移植瘤模型建立成功的小鼠随机分为:低剂量组、中剂量组、高剂量组、模型组和环磷酰胺组,每组 10 只,雌雄各半,假移植小鼠作为对照组(10 只,雌雄各半)。手术 24 h 后开始给药,低、中、高剂量组分别灌胃 50、100、200 mg/kg 的 EST 溶液,对照组、模型组灌胃生理盐水,环磷酰胺组按 20 mg/kg 腹腔注射环磷酰胺,各组均连续处理 14 d。

(3)抑瘤率及脏器指数的测定

末次给药 12 h 后,脱颈处死小鼠,剖取肝、脾、胸腺,剥离肝肿瘤,计算抑瘤率和器官指数[10]。

抑瘤率(%)=[模型组平均瘤重(g)-给药组平均瘤重(g)]/模型组平均瘤重(g)×100%

器官指数=器官重(mg)/体重(g)

(4)T 淋巴细胞增殖功能的测定

试验动物的分组与处理同上,末次给药 12 h 后,脱颈处死小鼠,无菌取脾,制备脾细胞悬液,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为每毫升 2×10^6。每份脾细胞悬液在 24 孔培养板中加 2 孔,每孔 1 mL,其中一孔加 50 μL ConA 液,另一孔不加 ConA 液作对照,细胞培养箱(37℃、5% CO_2)培养 44 h 时每孔弃去培养液 0.7 mL,重新加入不含小牛血清的 RPMI1640 培养液 0.7 mL,同时加入 MTT(5 mg/mL),每孔 50 μL,细胞培养箱中继续培养 4 h 后每孔加入 1 mL 酸性异丙醇,吹打多次,5 min 后用全波长酶标仪测定 570 nm 下的 OD 值,以加 ConA 的吸光度值减去不加 ConA 的吸光度值表示 T 淋巴细胞增殖情况[11]。

(5)肝组织学检测

用 10%福尔马林固定肝组织 24 h,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜 400 倍视野下观察肝组织形态学变化。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 Excel 2016 进行统计学处理,用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均值比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性,$P < 0.01$ 为差异极具有显著性。

2　结果

2.1　EST 处理后 H22 细胞的形态学观察

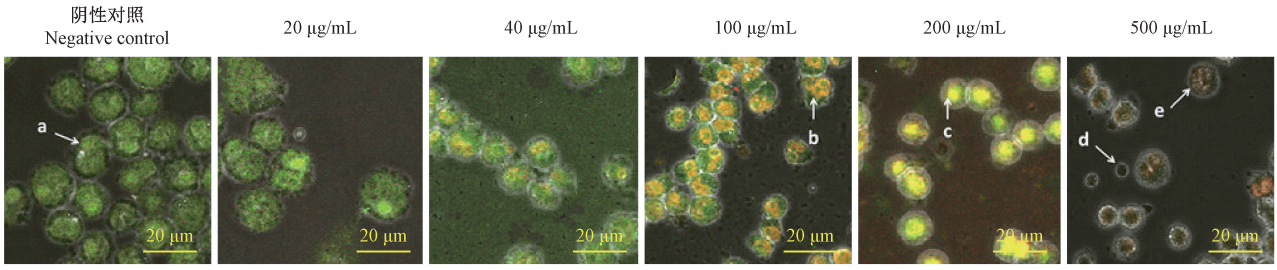
如图 1 所示,经 AO/EB 细胞染色,阴性对照细胞形态规则均一,着色均匀,外形较圆,仅被 AO 染色呈绿色;EST 处理细胞被 EB 染色,随浓度增加呈黄绿色直至橙红色,细胞膜皱缩、出芽、染色体固缩、边聚、碎裂等细胞凋亡特征,数量和程度与浓度正相关。

2.2　H22 细胞的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

如图 2 所示,H22 细胞在不同浓度的 EST 处理 48 h 后,其 DNA 图谱在阴性对照(0 μg/mL)仅一条高分子质量条带;而其它浓度处理后均呈现典型的凋亡细胞特征性梯状条带,并随着 EST 浓度增加细胞凋亡特征性梯状条带越明显,200 μg/mL 和 500 μg/mL 处理组梯状条带最明显。

2.3　细胞凋亡率的检测

流式细胞仪分析表明,500 μg/mL EST 对 H22 细胞作用 48 h,出现特征性的凋亡峰,即 AP 峰,凋亡率为 31%,而阴性对照(0 μg/mL)为 0.3%(图 3),两组间差异极显著($P < 0.01$)。



注:a:正常细胞;b:细胞核碎裂;c:细胞核固缩;d:凋亡小体;e:坏死细胞。

图 1 EST 作用 48 h 对 H22 肝癌细胞形态的影响

Note. a, Normal cell. b, Nuclear fragmentation. c, Nuclear shrinkage. d, Apoptotic body. e, Necrotic cells.

Figure 1 Effect of EST on the morphology of H22 hepatoma cells after 48 h treatment

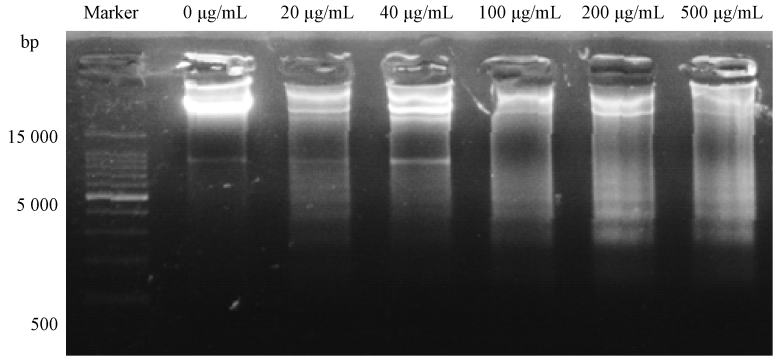


图 2 EST 对 H22 细胞作用的基因组 DNA 片段电泳分析

Figure 2 Electrophoretic analysis of genomic DNA fragments in H22 Cells by EST

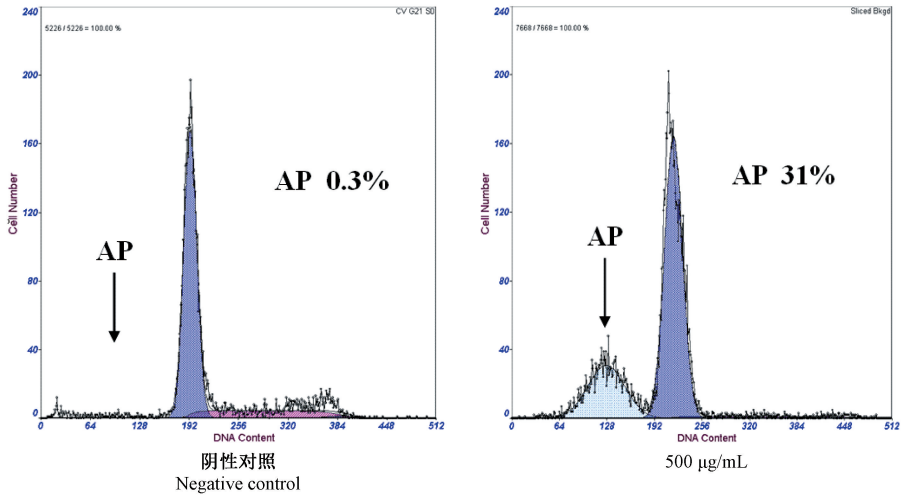


图 3 EST 对 H22 细胞作用的流式细胞分析图

Figure 3 Flow cytometric analysis of the effect of EST on H22 cells

2.4 EST 对小鼠 H22 肝瘤的抑瘤效果

由图 4 可以看到,除对照组外,EST 各剂量组、模型组和环磷酰胺组小鼠的肝均有大小不同肿瘤,说明原位移植瘤模型的建立是成功的。

由表 1 可知,给药组平均瘤重显著低于模型组($P< 0.05$),且呈现出了一定的量效关系。高剂量组的抑瘤率为 64.3%,接近环磷酰胺组的 78.7%。而根据国家药监局新药特药评审规定,抑瘤率达 30%以上,就算作有效,即可作为新药开发。表明甘青虎耳草乙酸乙酯提取物在一定程度上能够明显抑制肝癌的生长。

2.5 EST 对小鼠免疫器官指数和 T 淋巴细胞增殖能力影响

由表 2 所示,与模型组比较,环磷酰胺组小鼠脾

指数和胸腺指数显著下降($P<0.05$),其与环磷酰胺强大的免疫抑制作用有关;与环磷酰胺组比较,EST 高剂量组小鼠的脾指数和胸腺指数均显著升高($P<0.05$),提示该剂量甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠免疫系统毒副作用较低。

由表 2 也可看到,与空白对照组比较,模型组和环磷酰胺组小鼠 T 细胞增殖能力显著下降($P<0.05$);与模型组比较,EST 各剂量组小鼠 T 细胞增殖能力显著升高($P<0.05$),且具有剂量依赖趋势,提示甘青虎耳草乙酸乙酯提取物能提升肝癌小鼠细胞免疫能力。

2.6　EST 对 H22 肝癌小鼠肝组织形态的影响

如图 5 所示,对照组小鼠肝小叶结构清晰,细胞排列整齐;模型组小鼠表现为组织结构紊乱、肝小

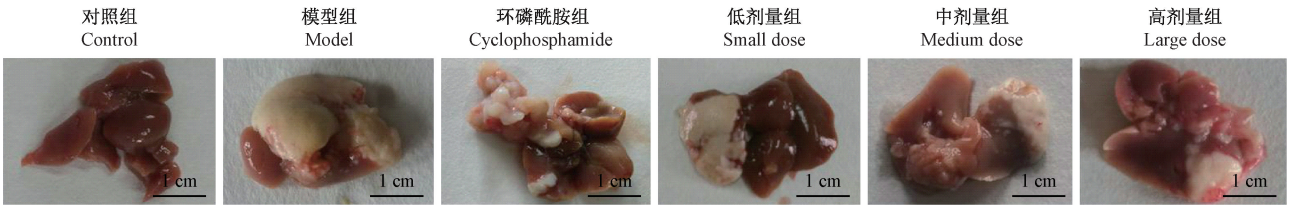


图 4　小鼠肝癌细胞原位移植瘤生长情况

Figure 4　Growth of orthotopic xenograft of mouse hepatoma cells

表 1　EST 对小鼠 H22 肝移植瘤的抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1　Inhibition of EST on H22 liver xenograft in mice($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别 Groups	平均瘤重(g) Everage weight(g)	抑瘤率(%) Anti-tumor rate(%)
模型组 Model	1.280 ± 0.283^{a}	0
环磷酰胺组 Cyclophosphamide	0.273 ± 0.057^{b}	78.7
低剂量组 Small dose	0.857 ± 0.108^{c}	33.0
中剂量组 Medium dose	0.683 ± 0.110^{c}	46.7
高剂量组 Large dose	0.456 ± 0.099^{bc}	64.3

注:同列不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note. Significant difference ($P<0.05$) were shown by the different superscript letters in the same line.

表 2　EST 对小鼠器官指数和 T 淋巴细胞增殖能力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2　Effects of EST on organ index and T lymphocyte proliferation in mice($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别 Groups	脾指数 Spleen index	胸腺指数 Thymus index	△OD
对照组 Control	4.112 ± 0.790^{ab}	2.816 ± 0.537^{a}	0.266 ± 0.032^{a}
模型组 Model	7.315 ± 0.387^{d}	1.039 ± 0.190^{c}	0.090 ± 0.004^{b}
环磷酰胺组 Cyclophosphamide	2.705 ± 0.640^{c}	0.682 ± 0.188^{b}	0.070 ± 0.004^{b}
低剂量组 Small dose	3.388 ± 0.992^{ac}	0.945 ± 0.206^{c}	0.114 ± 0.017^{c}
中剂量组 Medium dose	3.492 ± 0.711^{ac}	1.261 ± 0.281^{cd}	0.147 ± 0.023^{d}
高剂量组 Large dose	5.221 ± 1.461^{b}	1.564 ± 0.459^{d}	0.216 ± 0.010^{e}

注:同列不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note. Significant difference($P<0.05$) were shown by the different superscript letters in the same line.

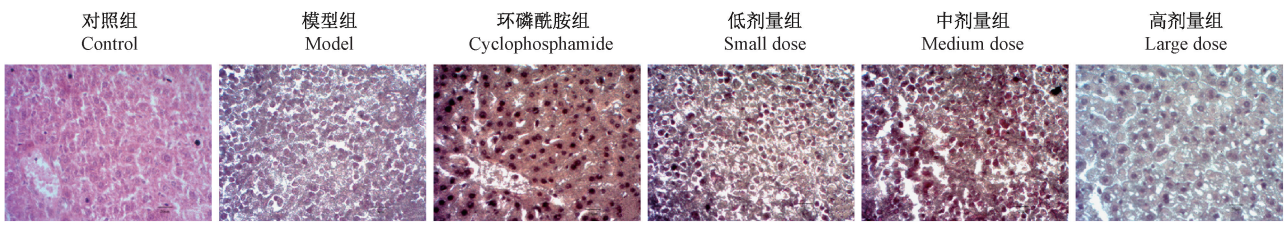


图 5　肝癌小鼠肝组织 HE 染色结果(× 400,标尺=20 μm)

Figure 5　HE staining results of liver tissues of mice with liver cancer(× 400, Bar=20 μm)

叶消失、汇管区消失、细胞密度增加、细胞增生、细胞异型性明显,表现出炎性反应、癌变等特性;EST 各治疗组癌细胞有不同程度的生长抑制,主要表现为癌细胞固缩,癌细胞向周围肝组织浸润减少。

3 讨论

肝癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,具有治愈率低、致死率高等特点,对人类的生命健康构成严重威胁。当前在对肿瘤患者实施临床治疗时,主要应用顺铂、环磷酰胺等化疗药物,虽然有很明显的抑制肿瘤作用,但是其毒副作用很大,表现为破坏机体免疫力、抗氧化能力和肝损伤等[12]。近年来,研究发现很多传统中药在治疗恶性肿瘤方面具有毒副作用小,可以提高肿瘤患者的生存质量,在恶性肿瘤治疗方面有广阔的应用前景[13]。甘青虎耳草是有抗炎、抗氧化作用的常用藏药。近年研究发现,同属植物虎耳草具有抑制前列腺增生、提升 Lewis 肺癌移植瘤小鼠抗氧化能力以及促进肿瘤细胞的凋亡,且显示出有效、低毒的优点[14]。但甘青虎耳草及其活性成分在肿瘤治疗方面的研究未见报道,因此,我们课题组设计试验,用乙酸乙酯提取甘青虎耳草黄酮,研究其体外对小鼠 H22 肝癌细胞的抑制作用以及体内对小鼠肝癌原位移植瘤的抑制作用。

结果显示, EST 在体外能够诱导 H22 细胞的凋亡,且凋亡程度与 EST 浓度相关,浓度越大,H22 细胞凋亡程度越大。

体内实验表明,EST 各剂量组在小鼠体内都能达到抑瘤的效果,其中高剂量(200 mg/kg)对小鼠 H22 肝癌移植瘤的抑瘤率达到 64.3%,具有显著的生长抑制作用;肿瘤组织病理学观察结果也显示,EST 使肝癌细胞生长受到抑制,癌细胞向肝组织浸润程度减轻,进一步表明 EST 可以抑制肝癌生长。

肿瘤的发生、发展与机体的免疫功能有关,研究发现,肿瘤患者免疫功能明显低下,表现为胸腺严重萎缩,T、B 细胞增殖力下降,T 淋巴细胞总数、T 淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 比值均明显低低下,提示癌症患者机体免疫抑制是导致肿瘤无限制增长和免疫逃避的一个重要因素[15-16]。本试验体内实验结果显示,EST 能提升肝癌小鼠 T 细胞增殖能力和胸腺指数,对荷瘤小鼠免疫力低下有一定的改善作用,表明甘青虎耳草乙酸乙酯提取物可以有效增强肝癌小鼠的免疫功能,提高机体免疫力,从而发挥抗肿瘤的作用。

综上所述,甘青虎耳草乙酸乙酯提取物中主要的活性物质—黄酮类物质,具有明显的体内外抗肝肿瘤活性,其作用机制可能与其增强机体免疫力促进肝癌细胞凋亡有关。但甘青虎耳草乙酸乙酯提取物是如何激活机体免疫调节还有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] 西北高原生物所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社; 1991: 107.
The Northwest Plateau Institute of Biology edita. Tibetan Medicine Records[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991: 107.

[2] 杨爱梅, 李玉兰. 藏药甘青虎耳草化学成分研究[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报)[J]. 2011, 26(9):1975-1977.
Yang AM, Li YL. Study on chemical composition from Tibetan herbal medicine *Saxifraga tangutica*[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 26(9): 1975-1977.

[3] Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(5): 647-659.

[4] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素磺酸化衍生物合成及其体内外抗肿瘤研究[J]. 药物评价研究, 2018, 41 (11): 1945-1950.
Xu H, Gao YX, Wang XT. Antitumor efficacy of quercetin sulfonic acid[J]. Drug Eval Res, 2018, 41 (11): 1945-1950.

[5] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.
Sun J, Yu SC. Research progress of Quercetin[J]. Res Pract Chin Med, 2011, 25(3): 85-88.

[6] 杨扬,郭举. 具有抗肿瘤活性的槲皮素衍生物研究进展[J]. 中草药, 2018, 49 (6): 1468-1475.
Yang Y, Guo J. Research progress on active quercetin derivatives with antitumor effect[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49 (6): 1468-1475.

[7] Mise Y, Sakamoto Y, Ishizawa T, et al. A worldwide survey of the current daily practice in liver surgery[J]. Liver Cancer, 2013, 2(1): 55-66.

[8] Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS, et al. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60[J]. Anal Cell Pathol, 1999, 19 (3-4): 139-151.

[9] 赵方, 胡明道, 陈鹏. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及其研究意义[J]. 现代肿瘤医, 2017, 25(18): 2883-2885.
Zhao F, Hu MD, Chen P. Establishment of orthotopic transplantation model of mice liver cancer and its significance[J]. Mod Oncol, 2017, 25(18): 2883-2885.

[10] 李晓娟, 白云峰, 王睿林, 等. 扶正化积方剂对 H22 肝癌小鼠抑瘤的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(11): 42-45.

Li XJ, Bai YF, Wang RL, et al. Experimental study of Fuzheng Huaji decoction inhibition effect on H22 tumor bearing mice[J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(11): 42-45.

[11] 李秀娟, 刘福英, 毛宇湘, 等. 复肝春 6 号对荷 H22 小鼠抑瘤作用的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(2): 107-110.
Li XJ, Liu FY, Mao YX, et al. Anti-tumor effect of Fuganchun 6 on H22 tumor-bearing mice[J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(2): 107-110.

[12] 苏海刚. 肿瘤化疗药物应用中的不良反应及影响因素[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(9): 108-109.
Su HG. Adverse reactions and influencing factors in application of tumor chemotherapy drugs[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2017, 11(9): 108-109.

[13] 杨绍梅, 张娜. 肝癌治疗药物的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(2): 93-98.
Yang SM, Zhang N. Research progress of hepatocellular carcinoma chemotherapy[J]. Chin J New Drugs Clin Remed, 2015, 34(2): 93-98.

[14] 刘东. 虎耳草及其主要活性成分以及对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的抗肿瘤作用[D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
Liu D. *Saxifraga stolonifera* and its main bioactives and their anti-tumor effects on Lewis lung carcinoma-bearing mice [D]. Suzhou: Soochow University, 2017.

[15] 余琪, 毛培江, 姜建民, 等. 4 种药用石斛对增强小鼠免疫功能效果的比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(2): 191-195.
Yu Q, Mao PJ, Jiang JM, et al. Comparison of the effects of four medicinal species of dendrobium on improving immunological functions on mice[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2017, 34(2): 191-195.

[16] 张景豪, 郑超, 周振华, 等. 免疫细胞与肝细胞癌关系的研究进展[J]. 中国医药导报, 2018, 15(36): 24-27.
Zhagn JH, Zheng C, Zhou ZH, et al. Research progress of relationship the between immune cells and hepato-cellular carcinoma[J]. Chin Med Herald, 2018, 15(36): 24-27.

[收稿日期] 2020-02-20