

钩吻总碱抑制人结肠癌细胞增殖及血管新生的作用研究[△]

王文义*, 檀兴慧, 张萍萍, 杨宇珂, 黄梓泓, 李德森^{#a}, 吴水生^{#b} (福建中医药大学药学院, 福州 350122)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)08-0957-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.11

摘要 目的:探讨钩吻总碱(TAG)抑制人结肠癌细胞增殖及血管新生的作用。方法:体外培养人结肠癌细胞HT-29和人脐静脉内皮细胞(HUVEC),经低、中、高剂量TAG(40、80、120 μg/mL)干预后,使用倒置荧光显微镜观察两种细胞的形态,采用CCK-8法检测两种细胞的存活率,采用流式细胞术检测HT-29细胞的周期变化情况,采用划痕试验、Transwell侵袭试验和管腔形成试验检测HUVEC的迁移率、侵袭率和管腔数量。结果:与空白组比较,TAG各剂量组HT-29细胞和HUVEC均有不同程度的减少,并可见死亡细胞,两者存活率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);TAG各剂量组G₂/M期HT-29细胞比例以及中剂量组G₀/G₁期细胞比例均显著升高,而TAG各剂量组S期细胞比例以及高剂量组G₀/G₁期细胞比例均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);TAG各剂量组HUVEC的存活率、迁移率、侵袭率均显著降低,4~24 h各时间点管腔数量均显著减少($P<0.01$)。结论:TAG可抑制人结肠癌HT-29细胞和HUVEC的增殖,可改变HT-29细胞的周期,并抑制HUVEC的迁移、侵袭及管腔形成。

关键词 钩吻总碱;结肠癌;HT-29细胞;人脐静脉内皮细胞;增殖;迁移;侵袭;血管新生

Study on Inhibitory Effects of Total Alkaloids of *Gelsemium elegans* on the Proliferation and Angiogenesis of Human Colon Cancer Cells

WANG Wenyi, TAN Xinghui, ZHANG Pingping, YANG Yuke, HUANG Zihong, LI Desen, WU Shuisheng (School of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effects of total alkaloids of *Gelsemium elegans* (TAG) on the proliferation and angiogenesis of human colon cancer cells. METHODS: Human colon cancer cell line HT-29 and HUVEC were cultured *in vitro*. After the intervention of low-, medium-, high-dose TAG (40, 80, 120 μg/mL), the morphology of the two cells was observed by fluorescence inversion microscope. The survival rate of HT-29 cells and HUVEC was detected by CCK-8 assay. Flow cytometry was used to detect HT-29 cell cycle. The migration rate, invasion rate and tube number of HUVEC were observed by scratching test, Transwell invasion experiment and tube formation experiment. RESULTS: Compared with blank group, HT-29 cells and HUVEC were decreased to different extents in TAG groups; dead cells were observed, and the survival rate of both decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The proportion of HT-29 cells at G₂/M phase in TAG groups as well as those at G₀/G₁ phase in medium-dose group were increased significantly; the proportion of HT-29 cells at S phase in TAG groups as well as those at G₀/G₁ phase in high-dose group were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Survival rate, migration rate and invasion rate of HUVEC were decreased significantly in TAG groups, and tube number was also decreased significantly at each time point during 4-24 h ($P<0.01$). CONCLUSIONS: TAG have inhibitory effect on the proliferation of human colon cancer HT-29 cells and HUVEC, can change HT-29 cell cycle, inhibit the migration, invasion and tube formation of HUVEC.

KEYWORDS Total alkaloid of *Gelsemium elegans*; Colon cancer; HT-29 cells; HUVEC; Proliferation; Migration; Invasion; Angiogenesis

结肠癌(Colon cancer, CRC)是常见的胃肠道恶性肿瘤,2018年全球CRC患者病死率和发病率分别位列恶性肿瘤的第2、3位^[1],且目前仍无有效防治CRC的措施。中药防治CRC具有低毒、有效的特点,有一定的开发价值^[2-4]。钩吻[*Gelsemium elegans*(Gardn. et Champ.)

Benth.]为马钱科胡蔓藤属植物,又名断肠草、大茶药、野葛以及胡蔓藤等,其具有良好的抗肿瘤、镇静、镇痛、调节免疫功能等多种药理活性,在肿瘤患者镇痛和肝癌患者生存期延长等方面具有独特的优势^[5-7]。钩吻总碱(TAG)是钩吻的主要成分之一,其既为活性成分,也是毒性成分。本课题组前期研究表明,TAG能抑制CRC细胞的增殖,并可抑制人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖与迁移,但具体作用及其机制尚不明确^[8-10]。有研究指出,肿瘤细胞的存活与增殖依赖于血管生成^[11],而钩吻及其活性成分能否影响CRC细胞的血管生成、且通过何种形式调控这一个过程,尚未见相关研究报道。鉴

△ 基金项目:福建省自然科学基金项目(No.2019J01342)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及其作用机制。

E-mail: 1158900410@qq.com

通信作者a:副教授,硕士。研究方向:中药药效物质基础及其作用机制。E-mail: 32134753@qq.com

通信作者b:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药药效物质基础及其作用机制。E-mail: wushuishengwss@163.com

于钩吻对CRC细胞的抑制活性,本研究初步探讨了TAG在CRC血管生成中的作用及可能机制,旨在为钩吻及其活性成分在CRC临床治疗中的应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

HF212 UV型CO₂培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);Multiskan FC型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司);IX70型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);TDZ4A-WS型低速水平离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 药品与试剂

钩吻药材购自福建省龙岩市胡蔓藤种植基地,经福建中医药大学药学院黄泽豪副教授鉴定为钩吻真品。TAG冻干粉由福建中医药大学药学院中药药效物质基础实验室制备(得率为0.6%)。

0.25%胰蛋白酶(批号:2048080)、胎牛血清(FBS,批号:1982158C)、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4,批号:8119049)、RPMI 1640培养基(批号:8119022)、青链霉素(批号:2019313)均购自美国Gibco公司;McCoy's 5A培养基(江苏凯基生物技术有限公司,批号:20190212);CCK-8试剂盒(美国MCE公司,批号:30116);碘化丙啶/核糖核酸酶(PI/RNase)染料(美国BD公司,批号:9039585);Triton X-100试剂[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号:J02N];结晶紫试剂(批号:1130P041)、Matrigel基质胶(批号:20190218)均购自北京索莱宝科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、乙二胺四乙酸(EDTA)等试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

人CRC HT-29细胞、HUVEC均购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 方法

2.1 药液配制

取TAG冻干粉100 mg,溶于DMSO 4 mL中,配成质量浓度为25 mg/mL的TAG母液,于4℃保存,备用。临用前用McCoy's 5A完全培养基或RPMI 1640完全培养基(即含有10%FBS、1%青链霉素的McCoy's 5A培养基或RPMI 1640培养基)稀释至相应质量浓度。

2.2 细胞培养

将HT-29细胞和HUVEC分别接种至含McCoy's 5A完全培养基和RPMI 1640完全培养基中,置于37℃、5%CO₂条件下培养(培养条件下同)。

2.3 细胞形态观察

使用倒置荧光显微镜观察。取对数生长期的HT-29细胞、HUVEC各适量,经含EDTA的胰蛋白酶消化、计数后,以1.0×10⁵个/mL按每孔2 mL接种至6孔板中,培养,待细胞融合至50%~60%后,将其随机分为空白组

和TAG低、中、高剂量组[40、80、120 μg/mL,剂量参考已有文献和TAG半数抑制浓度(IC₅₀)^[8,10]设置,下同],每组设3个复孔。弃去培养基,空白组加入相应完全培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的完全培养基2 mL。培养24 h后,于倒置荧光显微镜下观察并拍摄细胞形态。

2.4 细胞活力检测

采用CCK-8法检测。取对数生长期的HT-29细胞、HUVEC各适量,经含EDTA的胰蛋白酶消化、计数后,以1.0×10⁵个/mL按每孔100 μL接种至96孔板中,培养,待细胞融合至50%~60%后,将其随机分为空白组、DMSO组和TAG低、中、高剂量组(40、80、120 μg/mL),每组设6个复孔。弃去培养基,空白组加入相应完全培养基100 μL,DMSO组加入含DMSO 0.5 μL的完全培养基100 μL,各给药组加入含相应药物的完全培养基100 μL。培养24 h后,加入CCK-8试剂10 μL,避光培养4 h,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,并计算细胞存活率:存活率=(空白组平均OD值-试验组平均OD值)/空白组平均OD值×100%。上述试验重复3次。

2.5 HT-29细胞周期变化检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的HT-29细胞适量,经不含EDTA的胰蛋白酶消化、计数后,以1.0×10⁵个/mL按每孔2 mL接种至6孔板中,培养,待细胞融合至50%~60%后,将其随机分为空白组和TAG低、中、高剂量组(40、80、120 μg/mL),每组设3个复孔。弃去培养基,空白组加入McCoy's 5A完全培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的McCoy's 5A完全培养基2 mL。培养24 h后,吸弃上清液,收集细胞,用4℃PBS清洗后,置于70%乙醇中,于-20℃固定过夜,以1 000 r/min离心5 min,收集细胞,用PBS清洗后,加入含0.2% Triton X-100试剂的PI/RNase染料0.5 mL,避光孵育30 min,使用流式细胞仪检测细胞周期分布情况并使用Modfit 5.0周期拟合软件进行分析。上述试验重复3次。

2.6 HUVEC迁移能力检测

采用划痕试验检测。取对数生长期的HUVEC适量,经含EDTA的胰蛋白酶消化、计数后,以1×10⁵个/mL按每孔2 mL接种至6孔板中,培养,待细胞铺满后,用200 μL枪头在每孔底部中央作一划痕,用PBS清洗后,将细胞随机分为空白组和TAG低、中、高剂量组(40、80、120 μg/mL),每组设3个复孔。弃去培养基,空白组加入RPMI 1640完全培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的RPMI 1640完全培养基2 mL。分别于培养的0、24 h时拍照,并使用Image Pro-Plus 6.0软件分析结果,计算迁移率:迁移率=(0 h时迁移距离-24 h时迁移距离)/0 h时迁移距离×100%。上述试验重复3次。

2.7 HUVEC侵袭能力检测

采用Transwell侵袭试验检测。取对数生长期的HUVEC适量,经含EDTA的胰蛋白酶消化、计数后,以 1×10^5 个/mL按每孔2 mL接种至6孔板中,将其随机分为空白组和TAG低、中、高剂量组(40、80、120 $\mu\text{g/mL}$),每组设3个复孔。弃去培养基,空白组于小室上层加入RPMI 1640完全培养基200 μL ,各给药组于小室上层加入含相应药物的RPMI 1640完全培养基200 μL ,各组均于小室下层加入RPMI 1640完全培养基700 μL 。培养24 h,弃去上清液,用棉签擦拭上层底部未穿膜的细胞,用PBS清洗,以多聚甲醛溶液固定20 min后,加结晶紫试剂染色15 min,用PBS清洗,使用倒置荧光显微镜观察,每孔随机选择5个视野,拍照并记录染色细胞(染色后呈紫红色的细胞即为发生迁移的细胞)数,同时计算侵袭率:侵袭率=试验组迁移细胞数/空白组迁移细胞数 $\times 100\%$ 。上述试验重复3次。

2.8 HUVEC管腔形成情况检测

采用管腔形成试验检测。用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的移液枪吸取Matrigel基质胶置于24孔板中,平铺,于37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡40 min。取对数生长期的HUVEC适量,经含EDTA的胰蛋白酶消化、计数后,以 1×10^5 个/mL按2 mL/孔接种至6孔板中,将细胞随机分为空白组和TAG低、中、高剂量组(40、80、120 $\mu\text{g/mL}$),空白组加入RPMI 1640完全培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的RPMI 1640完全培养基2 mL,培养24 h后,以含EDTA化的胰蛋白酶消化、计数,用RPMI 1640完全培养基调整各组细胞浓度至 5.0×10^5 个/mL。吸取上述单细胞悬液以 1.0×10^5 个/孔接种至铺好基质胶的24孔板中,每组设3个复孔,分别于培养的4、12、24 h时使用倒置荧光显微镜观察管腔形成的情况,随机选择5个视野,使用Image Pro-Plus 6.0分析,取平均值作为检测结果。上述试验重复3次。

2.9 统计学方法

使用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多重比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TAG对细胞形态的影响

空白组HT-29细胞成片生长,细胞间连接紧密;随着TAG剂量的增加,细胞数量有逐渐变少的趋势,且细胞间连接松散,成群细胞变小,形态未见明显变化,但可见呈明亮小颗粒状的死亡细胞,详见图1。

空白组HUVEC呈单层成簇生长,大多为梭形,小部分为椭圆形,并具有旋涡状排列的特征,细胞边缘光滑、清晰,形态饱满;经TAG干预后,细胞生长发生紊乱,胞质皱缩,边缘模糊,且TAG高剂量组细胞皱缩明显,并可观察到呈明亮小点状的死亡细胞,详见图2。

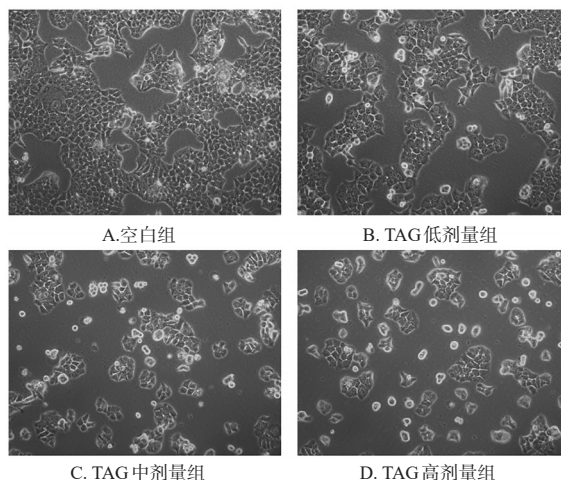


图1 TAG对HT-29细胞形态影响的显微图($\times 200$)

Fig 1 Micrographs of the effects of TAG on morphology of HT-29 cells ($\times 200$)

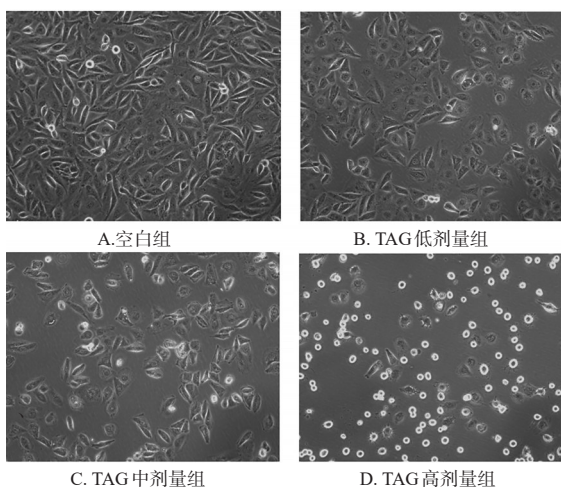


图2 TAG对HUVEC形态影响的显微图($\times 200$)

Fig 2 Micrographs of the effects of TAG on morphology of HUVEC ($\times 200$)

3.2 TAG对细胞活力的影响

与空白组比较,TAG各剂量组细胞存活率均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而DMSO组细胞存活率与空白组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表1。

表1 TAG对HT-29、HUVEC存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

Tab 1 Effects of TAG on the survival rate of HT-29 cells and HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

组别	HT-29细胞	HUVEC
空白组	100.00 \pm 1.80	100.00 \pm 1.24
DMSO组	100.06 \pm 1.80	98.97 \pm 0.60
TAG低剂量组	83.30 \pm 1.54*	86.06 \pm 1.86*
TAG中剂量组	53.25 \pm 1.47**	56.13 \pm 1.81**
TAG高剂量组	31.43 \pm 0.80**	24.08 \pm 1.45**

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 TAG对HT-29细胞周期的影响

与空白组比较,TAG各剂量组 G_0/M 期细胞比例以

及中剂量组 G₀/G₁期细胞比例均显著升高,而TAG各剂量组 S期细胞比例以及高剂量组 G₀/G₁期细胞比例均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图3、表2。

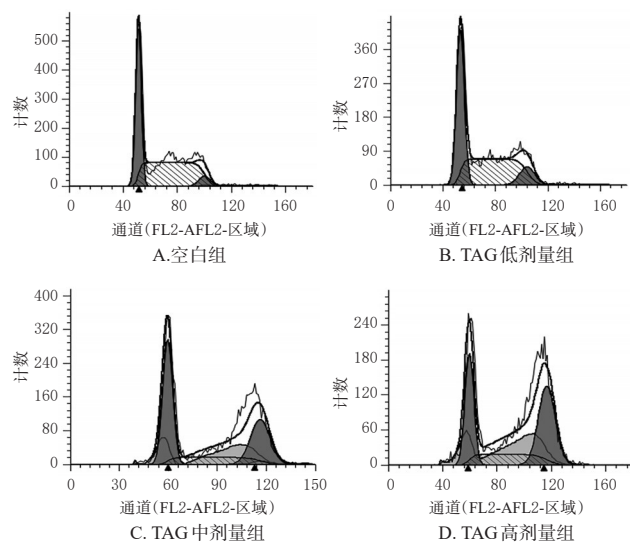


图3 TAG对HT-29细胞周期影响的流式图

Fig 3 Flow plots of the effects of TAG on HT-29 cell cycle

表2 TAG对HT-29细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Effects of TAG on HT-29 cell cycle ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白组	40.80 ± 1.65	53.91 ± 1.35	5.29 ± 2.84
TAG低剂量组	43.22 ± 1.20	48.50 ± 1.12**	8.29 ± 1.08*
TAG中剂量组	46.92 ± 1.52**	21.03 ± 1.25**	32.06 ± 2.04**
TAG高剂量组	34.40 ± 1.34**	22.62 ± 0.83**	42.98 ± 2.17**

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 TAG对HUVEC迁移、侵袭能力的影响

与空白组比较, TAG各剂量HUVEC的迁移率和侵袭率均显著降低($P < 0.01$), 详见图4、图5、表3。

3.5 TAG对HUVEC管腔形成的影响

与空白组比较, TAG各剂量组各时间点HUVEC的管腔数量均显著减少($P < 0.01$), 详见图6、表4。

4 讨论

CRC是全球性的医学难题之一, 诸多学者均致力于抗CRC药物的研发。有研究指出, 细胞血管新生是肿瘤发生、发展的重要因素, 中药抑制肿瘤细胞血管新生是临床防治肿瘤的有效策略之一^[11-12]。钩吻是一味剧毒中

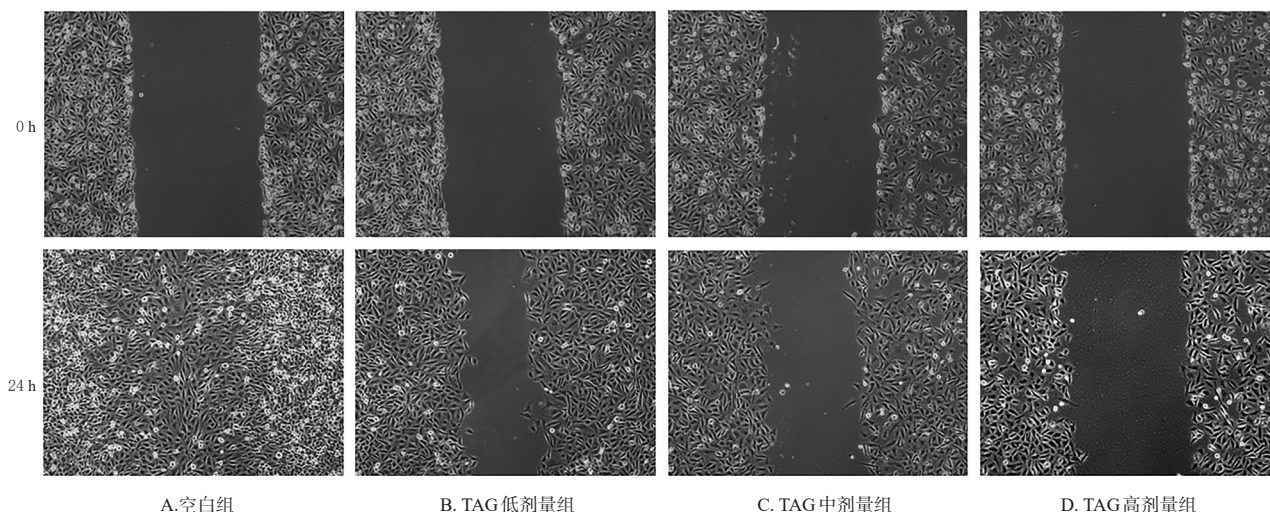


图4 TAG对HUVEC迁移能力影响的显微图(迁移试验, ×100)

Fig 4 Micrographs of the effects of TAG on migration ability of HUVEC (migration test, ×100)

药, 临床应用较少, 相关体外研究证实其具有一定的镇痛、抗类风湿、抗肿瘤等活性^[13-14]。现代药理研究多涉及该药抗炎及镇痛等领域。本课题组前期研究表明, 钩吻具有良好的抗肿瘤效果, 其中TAG及部分单体成分均可抑制肿瘤的发生与发展^[8-10, 15]。基于前期研究成果, 本研究以HT-29细胞和HUVEC为对象, 从细胞周期出发, 初步探讨TAG对CRC细胞增殖的抑制作用, 并通过血管新生试验来验证TAG对血管新生的抑制作用。其中, HT-29细胞主要用以观察TAG对CRC细胞的抑制效果, 以及评价TAG对其细胞周期的影响; HUVEC因具有干细胞潜能, 是血管内皮细胞试验时较为常用的细胞^[16], 故本研究通过考察TAG对HUVEC迁移、侵袭、管腔形

成能力的影响, 初步评价TAG在肿瘤细胞血管新生中的作用。

在HT-29细胞形态学观察及增殖试验中发现, TAG各剂量组HT-29细胞数量均有所减少, 细胞连接松散, 并可见死亡细胞, 细胞存活率均较空白组显著降低。这提示TAG可诱导HT-29细胞凋亡, 并抑制其增殖。周期检测结果显示, TAG各剂量组G₂/M期细胞比例以及中剂量组G₀/G₁期细胞比例均较空白组显著升高, 而TAG各剂量组S期细胞比例以及高剂量组G₀/G₁期细胞比例均较空白组显著降低。这提示TAG能通过影响HT-29细胞的周期分布, 使其S期(TAG各剂量组)、G₀/G₁期(TAG高剂量组)细胞比例下降, G₂/M期(TAG各剂

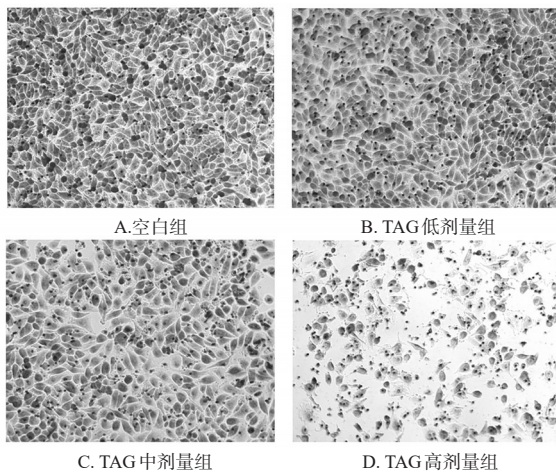


图5 TAG对HUVEC侵袭能力影响的显微图(Transwell侵袭试验, ×200)

Fig 5 Micrographs of the effects of TAG on invasion ability of HUVEC (Transwell invasion test, ×200)

表3 TAG对HUVEC迁移、侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 3 Effects of TAG on migration ability and invasion ability of HUVEC($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	迁移率	侵袭率
空白组	100	100
TAG低剂量组	44.78 ± 5.19**	84.86 ± 2.43**
TAG中剂量组	17.68 ± 3.89**	59.72 ± 1.58**
TAG高剂量组	6.54 ± 0.90**	22.78 ± 0.90**

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$

组)细胞比例升高,从而抑制HT-29细胞的增殖;同时,由于各剂量TAG对G₀/G₁期细胞比例影响的不同,发现TAG可能先作用于S期,当剂量增加时再影响G₀/G₁期,但具体机制有待进一步挖掘。

在恶性肿瘤发生发展的过程中,细胞存活与增殖需要大量的血管予以支撑,故新生血管形成是肿瘤细胞转移、侵袭的必要条件^[11]。有研究指出,血管新生是一个

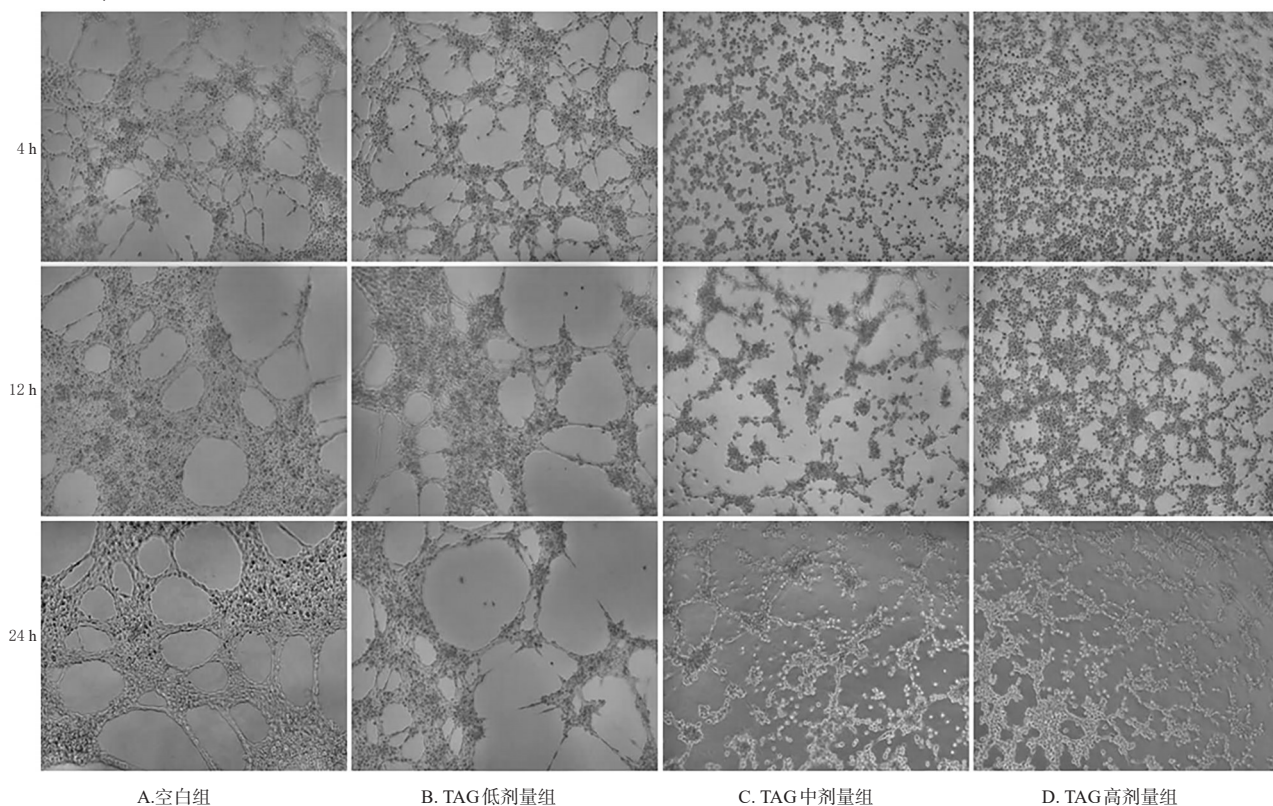


图6 TAG对HUVEC管腔形成影响的显微图(×100)

Fig 6 Micrographs of the effects of TAG on tube formation of HUVEC(×100)

渐进的过程,首先会发生血管内皮细胞的迁移、聚集,再经成熟、分化后形成管腔^[17]。由此可见,细胞迁移、侵袭和管腔形成是血管新生过程中的必经阶段,也是研究抗肿瘤作用机制的重要方向。血管新生相关试验包括内皮细胞增殖、新生血管动脉环试验、鸡胚绒毛尿囊膜血管模型及体外管腔形成试验等,其中管腔形成试验以其简单、便捷的特点备受国内外学者关注^[18]。鉴于此,本研究在细胞增殖、划痕、Transwell侵袭试验的基础上,选

择了管腔形成试验,初步评价了TAG对HUVEC增殖、迁移、侵袭以及管腔形成能力的影响。结果显示,经TAG干预后,HUVEC胞质皱缩、边缘模糊,且可见死亡细胞,TAG各剂量组细胞存活率、迁移率、侵袭率均较空白组显著降低,各时间点管腔数量均较空白组显著减少。这提示TAG对HUVEC的增殖、迁移、侵袭和管腔形成均具有明显的抑制作用,可能是TAG抗肿瘤的作用机制之一。

表4 TAG对HUVEC管腔形成的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 4 Effects of TAG on tube formation of HUVEC
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	管腔数量,个		
	4 h	12 h	24 h
空白组	44.00 ± 2.00	16.67 ± 1.15	15.33 ± 0.58
TAG低剂量组	32.67 ± 1.53**	12.00 ± 1.00**	11.33 ± 1.53**
TAG中剂量组	3.00 ± 1.00**	6.00 ± 1.00**	4.67 ± 0.58**
TAG高剂量组	2.67 ± 0.58**	3.33 ± 0.58**	3.00 ± 1.00**

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$

值得注意的是,钩吻在发挥药理作用的同时,其巨大的毒性是影响其临床应用的原因之一^[19]。本课题组长期从事钩吻减毒方法的研究,在一定程度上阐明了钩吻减毒后毒性成分的变化^[16,20]。前期“减毒存效”相关研究发现,经过炮制后的钩吻可明显降低小鼠死亡率,并维持其抗炎、镇痛活性^[20]。本研究结果提示,TAG有望成为一种抗肿瘤血管新生的候选药物。但本文所用TAG是从未经减毒炮制的钩吻生药中提取、纯化所得,而对于减毒后钩吻药材炮制品及其总碱部位是否同样具有类似的抗肿瘤血管新生活性尚有待后续研究予以确认。此外,本研究内容较为基础,且暂未设置阳性对照,同时亦未阐明其具体作用机制,故有待后续研究予以完善。

综上所述,TAG能抑制人CRC HT-29细胞和HUVEC的增殖,并能将HT-29细胞阻滞于G₀/M期;同时,TAG对HUVEC迁移、侵袭及管腔形成均有明显的抑制作用,提示其可能通过抑制血管新生来影响肿瘤的发生与发展。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 李奕璇. 中药单体白花丹醌通过调控VEGF/VEGFR2信号通路抑制结肠癌血管生成的实验研究[J]. *实用药物与临床*, 2018, 21(7): 745-749.

[3] 周利红, 李雁, 隋华, 等. 丹参酮Ⅱ_A调节缺氧诱导因子1 α 对人结肠癌细胞血管新生的抑制作用[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(3): 947-951.

[4] 刘松江, 孙姮, 闫珺. 地龙提取液对小鼠结肠癌移植瘤血管新生的抑制作用[J]. *上海中医药大学学报*, 2018, 32(1): 70-73.

[5] XU YK, LIAO SG, NA Z, et al. Gelsemium alkaloids, immunosuppressive agents from *Gelsemium elegans*[J]. *Fittoterapia*, 2012, 83(6): 1120-1124.

[6] 断肠草提取物可遏制癌痛[J]. *河北中医*, 2013, 35(10): 1575.

[7] ZHANG JY, GONG N, HUANG JL, et al. Gelsemine, a principal alkaloid from *Gelsemium sempervirens* Ait., exhibits potent and specific antinociception in chronic pain by acting at spinal $\alpha 3$ glycine receptors[J]. *Pain*, 2013, 154(11): 2452-2462.

[8] 陈亮, 杨樱, 卢伊, 等. 钩吻总碱对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移的影响[J]. *福建中医药大学学报*, 2013, 23(4): 41-43.

[9] 李德森, 廖华军, 苏志敏, 等. 钩吻总碱对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响[J]. *福建中医药*, 2017, 48(6): 30-31.

[10] 林满遍, 陈亮, 吴水生. 钩吻总碱对人结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4): 149-153.

[11] 吴义春, 蔡逗逗, 汪晓庆, 等. 肿瘤血管生成方式的研究进展: 综述[J]. *安徽卫生职业技术学院学报*, 2017, 16(2): 107-109.

[12] 阎锡蕴. 肿瘤新生血管及分子靶向治疗新策略[J]. *生物物理学报*, 2010, 26(3): 180-193.

[13] 周治忠. 断肠草煎剂治疗糖尿病足溃疡32例[C]// 济南: 中华中医药学会周围血管病分会25年会暨第4届学术大会论文集, 2011: 162-163.

[14] 周治忠. 断肠草煎剂外用治疗毒蛇咬伤溃疡32例[J]. *中国民间疗法*, 2004, 12(5): 25.

[15] 张国鹏, 李彤. 断肠草抗肿瘤机制及其临床研究进展[J]. *黔南民族医学学报*, 2018, 31(4): 273-276.

[16] 白雪晶, 冯磊, 徐文波, 等. 人脐静脉内皮细胞培养技术的研究进展[J]. *吉林医学*, 2018, 39(5): 960-962.

[17] NOWAK-SLIWINSKA P, ALITALO K, ALLEN E, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays[J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 425-532.

[18] 任丽, 李高攀, 湛赛男, 等. 钩吻炮制减毒存效的物质基础研究[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 26(3): 117-124.

[19] 姬圣洁, 刘伟. 钩吻毒理学与检测方法的研究进展[J]. *中国司法鉴定*, 2017(3): 24-30.

[20] 吴水生, 李德森, 许豪然, 等. 基于谱效关系的钩吻炮制减毒存效的实验研究[J]. *中医药学报*, 2017, 45(5): 80-84.

(收稿日期: 2019-07-27 修回日期: 2020-01-14)

(编辑: 张元媛)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅