

紫龙金对鼻咽癌裸鼠移植瘤放射增敏作用的研究

唐 秋¹, 郭 勇², 胡巧英¹

(1.浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 2.浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

摘 要: [目的] 探讨紫龙金对鼻咽癌细胞系裸小鼠移植瘤放射增敏作用及机制。[方法] 建立 CNE-I 裸小鼠移植瘤模型, 观察空白对照组、紫龙金组、单纯照射组和紫龙金加照射组肿瘤体积变化, 并计算抑瘤率和放射增敏比(SER); 免疫组化检测肿瘤组织中 p16 和 cyclinD1 蛋白的表达; 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 p16 和 cyclinD1 mRNA 的表达。[结果] 紫龙金加照射组抑瘤率明显高于其他组, SER(E/O)为 2.45, 提示紫龙金有放疗增敏效果。免疫组化分析和 RT-PCR 显示, 紫龙金组和紫龙金加照射组与空白对照组及单纯照射组相比, p16 蛋白和 p16 mRNA 表达显著上调 ($P<0.05$); cyclinD1 蛋白和 cyclinD1 mRNA 表达显著下调 ($P<0.05$)。[结论] 紫龙金对鼻咽癌细胞系 CNE-I 裸小鼠移植瘤有放射增敏作用, 其增敏作用机制可能与 p16 表达上调、cyclinD1 表达下调有关。

关键词: 紫龙金; 鼻咽癌; 放射增敏; p16; cyclinD1

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)09-0737-06

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2013.09.A014

Radiosensitizing Effect of Zilongjin on Human Nasopharyngeal Carcinoma CNE-1 Transplantation Tumor in Nude Mice

TANG Qiu¹, GUO Yong², HU Qiao-ying¹

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China;

2. The First Hospital Affiliated Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310006, China)

Abstract: [Purpose] To investigate radiosensitization of Chinese herbal medicine Zilongjin on the transplantation tumor of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 and its mechanism. [Methods] The transplantation tumor models of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 were established, and divided into control group, alone radiation group, Zilongjin group and Zilongjin plus radiation group. The changes of tumor size in various groups were observed and the sensitizing enhancement ratio(E/O) was calculated. The expressions of p16 protein and cyclinD1 protein in tumor tissue were examined by immunohistochemistry staining. RT-PCR was applied to detect p16 mRNA and cyclinD1 mRNA. [Results] The tumor inhibition rate in Zilongjin plus radiation group was higher than that in other groups. E/O was 2.45, that means Zilongjin had the effects on radiosensitization. Immunohistochemistry staining and RT-PCR results showed that compared with control group and alone radiation group, the expression of p16 protein and p16 mRNA was up-regulation and expressions of cyclinD1 protein and cyclinD1 mRNA was down-regulation in Zilongjin group and Zilongjin plus radiation group ($P<0.05$). [Conclusion] Zilongjin has radiosensitization on CNE-I transplantation tumor. Its mechanisms of radiosensitization might relate to p16 up-regulation and cyclinD1 down-regulation.

Key words: Zilongjin; nasopharyngeal carcinoma; radiosensitizing; p16; cyclinD1

如何提高放射线对肿瘤细胞的杀伤, 从而提高放疗疗效一直是放射生物学家和放射肿瘤学家致力研究的课题。中药紫龙金由黄芪、当归、白英、郁金、

龙葵、丹参、半枝莲、蛇莓等组成, 具有益气养血、清热解毒、理气化瘀、扶正祛邪的功效, 是国家级抗肿瘤新药。我们已通过集落形成分析法研究了紫龙金对鼻咽癌细胞系 CNE-I 的放射增敏作用, 结果提示紫龙金能够增加鼻咽癌细胞系 CNE-I 对放射线敏

收稿日期: 2013-05-06; 修回日期: 2013-07-05

基金项目: 浙江省中医药科技计划资助项目 (2010B591127)

通讯作者: 郭勇, E-mail: gyk@mail.hz.zj.cn

感性,提示紫龙金是一种潜在放射增敏剂^[1]。本研究拟通过人鼻咽癌细胞系裸鼠移植瘤的在体研究进一步探讨紫龙金对鼻咽癌放疗增敏作用及作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

40只SPF级BALB/c 6周龄、体重17~20g、雌性、裸小鼠,购自中国科学院上海实验动物中心,由浙江中医药大学实验动物中心SPF级动物房内饲养,荷人鼻咽癌细胞系CNE-I瘤株购自北京医科院肿瘤医院肿瘤研究所放射生物实验室。

1.2 药物

紫龙金原药由天津隆顺荣药业馈赠,1克干膏相当于5.92克生药量。药物密封后置于干燥器内防止受潮。药物配置:按每次灌胃0.4ml,每天灌胃2次,共0.8ml,再按20g/kg紫龙金生药量计算小鼠每天需口服紫龙金的剂量,计算出所需配置的紫龙金药物浓度。

1.3 紫龙金对鼻咽癌裸小鼠移植瘤增敏作用研究

1.3.1 荷瘤小鼠模型及放疗模型建立和实验分组

将直径达0.8cm的人鼻咽癌细胞系CNE-I瘤株取下后剪碎,瘤块大小约1mm,将瘤块埋于裸小鼠右大腿外侧下方皮下位置。共接种36只(准备4只防止分组前意外情况),埋块24h后随机分为两组。其中18只每天灌注20g/kg紫龙金生药量,分2次给药;另外18只灌注等体积纯净水。待肿瘤生长至直径6~8mm时再次随机分组,其中给药组分为紫龙金组和紫龙金加照射组;纯净水组分为空白对照组和单纯照射组。每组8只小鼠。空白对照组:每天继续灌注等体积纯净水,共25d;紫龙金组:继续每天灌注紫龙金药液,共25d。单纯照射组:单次照射18Gy后继续每天灌注等体积纯净水,共25d。紫龙金加照射组:单次照射18Gy后继续每天灌注紫龙金,共25d。第25d处理结束后处死裸鼠。

1.3.2 观察裸鼠生长情况及抑瘤效果

干预期间每天观察裸鼠反应、活动、摄食、饮水、排泄等一般情况;每周两次游标卡尺测量肿瘤最大径(L)和垂直方向最大横径(W);每周两次称量裸鼠体重。肿瘤体积 $V(\text{cm}^3)=0.50 \times L \times W^2$,求出各组肿瘤体积的平均值,绘制肿瘤生长曲线,并计算抑瘤率。

抑瘤率 $=[(\text{对照组肿瘤平均体积}-\text{实验组肿瘤平均体积})/\text{对照组肿瘤平均体积}] \times 100\%$, $E/O(\text{预期值}/\text{观察值})=(\text{紫龙金组平均增长瘤体积} \times \text{放疗组平均增长瘤体积})/(\text{对照组平均增长瘤体积} \times \text{联合组平均增长瘤体积})$, $E/O > 1.4$ 提示放射增敏作用。

1.3.3 标本处理

第25d处理结束后脱颈处死裸鼠,剥离肿瘤组织,切除一部分经4%多聚甲醛固定后石蜡包埋用于免疫组化检测p16和cyclinD1蛋白的表达;另一部分液氮-80℃保存用于RT-PCR检测p16和cyclinD1mRNA的表达。

1.4 紫龙金对鼻咽癌细胞系裸小鼠移植瘤增敏作用机制研究

1.4.1 免疫组化法p16和cyclinD1蛋白检测

将各组裸鼠移植瘤切片进行免疫组织化学染色,按照SP试剂盒说明书进行,所用一抗抗体的工作浓度均为1:100。免疫组化图像分析采用Nikon eclipse 80i显微镜(500万像素)拍摄图片;采用Carl Zeiss Imaging Systems图像分析软件测量阳性表达肿瘤细胞的累积光密度(integrated optical density, IOD)。并计算阳性指数:即 $IOD/1228800$ (IOD面积以像素单位计算)。

1.4.2 RT-PCR法检测p16和cyclinD1 mRNA水平表达

用液氮将各组组织研磨成粉末,按Trizol裂解法提取总mRNA。应用Reverse Transcription System(Promega公司)试剂盒进行逆转录反应成cDNA。Omiga 2.0软件设计引物(Table 1)。按PCR Master Mix(Promega公司)说明进行荧光定量PCR反应,反应结束后,利用荧光定量PCR仪所带软件分析各基因的Ct值。以 β -actin作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算p16和cyclinD1基因相对表达量。

1.5 统计学处理

应用Excel2003进行数据录入,应用SPSS16.0统计软件进行数据分析,描述性分析中数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠生长情况及抑瘤效应

至第3周末,单纯照射组中1只裸小鼠因荷瘤

Table 1 Taqman genotyping primers and primer sequences

Gene	Primer sequence		Size of products(bp)
β-actin	Upstream primer	5' AGCGAGCATCCCCAAAGTT 3'	285
	Downstream primers	5' GGGCACGAAGGCTCATCATT 3'	
p16	Upstream primer	5' CGCAAGAAATGCCCACAT 3'	306
	Downstream primers	5' TCTGAGAAACCTCGGGAAAC 3'	
cyclinD1	Upstream primer	5' AACACGGCTCAGCTTAC 3'	335
	Downstream primers	5' TGGGGTTTTACCAGTTTTAT 3'	

衰竭死亡,其余裸鼠反应良好,摄食、饮水无明显异常,未观察到血尿、便血及体重明显减轻等药物毒副反应。单纯照射组肿瘤体积照射后开始缩小,至12d肿瘤体积逐渐增大;紫龙金组肿瘤体积逐渐增大,但与空白对照组相比,肿瘤生长缓慢;紫龙金加照射组肿瘤体积在照射后明显缩小,至第15d开始逐渐增大;空白对照组肿瘤体积逐渐增大,实验过程中有2只小鼠肿瘤因坏死物破溃导致肿瘤缩小引起肿瘤体

积明显下降。

空白对照组、单纯照射组、紫龙金组和紫龙金加照射组的肿瘤平均增长体积分别为 $991.10 \pm 58.12 \text{mm}^3$ 、 $307.13 \pm 39.73 \text{mm}^3$ 、 $463.62 \pm 23.25 \text{mm}^3$ 和 $58.56 \pm 16.46 \text{mm}^3$ 。肿瘤生长曲线见 Figure 1。至第12d,与对照组相比,紫龙金组、单纯照射组、紫龙金加照射组的抑瘤率分别为50%、61%和92%(Figure 2)。通过 E/O 公式计算:SER(E/O)=2.45, E/O>1.4,提示紫龙金有放射增敏作用。

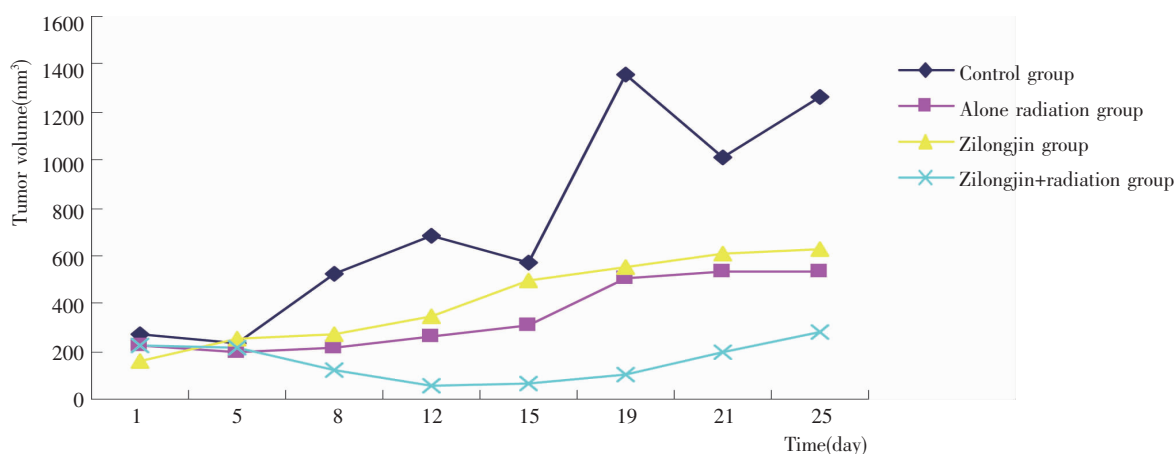


Figure 1 The trend of tumor volume in various groups

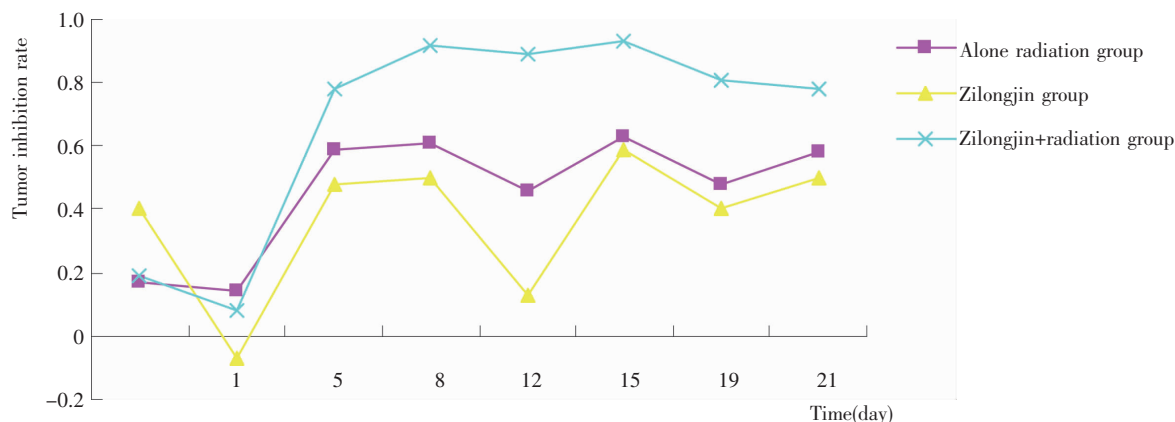


Figure 2 The change of tumor inhibition rate in various groups

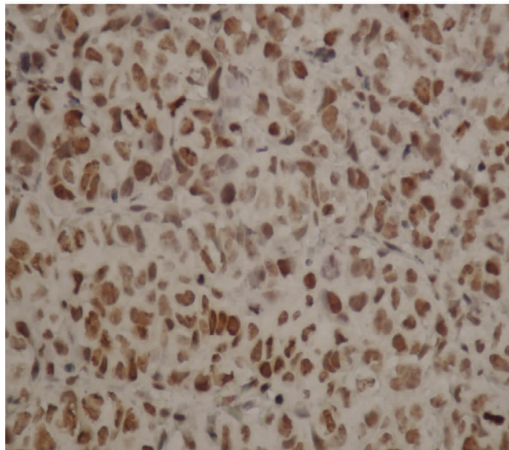


Figure 3 p16 protein positive expression(×400)

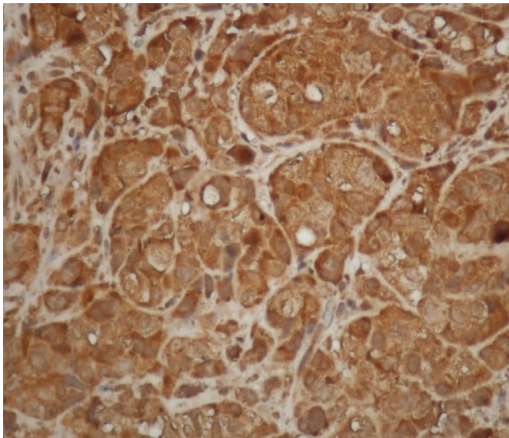


Figure 4 Cyclin D1 protein positive expression(×400)

Table 2 The expression of p16 and cyclinD1 protein in tumor

Group	p16 positive index	cyclinD1 positive index
Control group	0.000971±0.000239	0.163858±0.017765
Alone radiation group	0.000954±0.000257	0.101769±0.025408
Zilongjin group	0.004014±0.000327 ^{*△}	0.067735±0.007603 ^{*△}
Zilongjin+radiation group	0.003067±0.000182 ^{*△}	0.073677±0.011511 ^{*△}

^{*} Compare to control group, $P<0.05$; [△] Compare to alone radiation group, $P<0.05$

Table 3 The expression of p16 mRNA and cyclinD1 mRNA in tumor

Group	p16 relative copy amount	cyclinD1 relative copy amount
Control group	0.000063±0.000037	0.020714±0.008978
Alone radiation group	0.000103±0.000147	0.016256±0.002313
Zilongjin group	0.007583±0.002681 ^{*△}	0.000041±0.000043 ^{*△}
Zilongjin+radiation group	0.007615±0.003786 ^{*△}	0.000036±0.000032 ^{*△}

^{*} Compare to control group, $P<0.05$; [△] Compare to alone radiation group, $P<0.05$

2.2 肿瘤组织中 p16 和 cyclinD1 蛋白表达

免疫组化分析法结果(Figure3,4)显示,紫龙金组和紫龙金加照射组与空白对照组及单纯照射组相比,p16 蛋白表达显著性上调($P<0.05$)。紫龙金组和紫龙金加照射组与空白对照组及单纯照射组相比,cyclinD1 蛋白表达显著性下调($P<0.05$)(Table 2)。

2.3 肿瘤组织中 p16 和 cyclinD1 mRNA 表达

与空白对照组和单纯照射组相比,紫龙金加照射组及紫龙金组与空白对照组相比,p16 基因表达明显上调,cyclinD1 基因表达明显下调(Table 3)。

3 讨 论

本研究在离体研究基础上进一步通过裸小鼠移植瘤的在体研究紫龙金与放疗联用是否增加放疗疗效,并探讨其作用机制。初步研究结果显示紫龙金有明显抗肿瘤作用,紫龙金组肿瘤体积逐渐增大,但与空白对照组相比,肿瘤生长缓慢;联合治疗组肿瘤体积在照射后明显缩小,至第 15d 开始逐渐增大,从肿瘤体积随时间变化趋势图上看,紫龙金加照射组与其他 3 条曲线分离明显。紫龙金放射增敏作用明显,SER 值(E/O)为 2.45。一般认为,动物实验中如能使放射敏感性提高 40%,即 $SER>1.4$ 的药物应用于临床有意义。本实验结果说明,每日口服紫龙金 20g/kg,分 2 次口服,持续给药 4 周,能使肿瘤的放射敏感性提高,紫龙金具有放射增敏作用。

放疗敏感性降低的主要原因是肿瘤组织中大量

乏氧细胞的存在,中药改善放射敏感性主要增敏作用机制包括:①改善血液循环、改善组织供氧。活血化瘀药大多通过这条途径实现增敏作用。②调节细胞周期,提高放射敏感性。③增强机体免疫功能,辅助增敏和防护。④诱导细胞凋亡^[2]。紫龙金放射增敏作用的机制又如何呢?

p16 是 CKI 家族中的重要成员,也是目前已知的惟一直接参与细胞周期调控的抑癌基因^[3]。p16 基因位于染色体 9P21,其编码蛋白质是周期素依赖激酶 4 (cyclin dependent

kinase 4,CDK4)的抑制剂,周期素与 CDK 结合,能使 Rb1 蛋白磷酸化,解除其对 DNA 合成必需的酶表达的抑制作用^[3]。这一过程是启动细胞由 G₁ 期进入 S 期的核心步骤。因此,p16 能控制细胞由 G₁ 期进入 S 期,对细胞生长周期起负调控作用^[1]。p16 高表达可增加辐射敏感性已在对多种肿瘤放射耐受的研究中被报道:罗京伟等^[4]用外源性 p16 基因转染人鼻咽癌细胞系 CNE-2 (已知其有 p16 基因突变而造成其表达产物的缺失,同时该细胞系有 p53 蛋白的表达缺失),其放射敏感性明显增加。Lin 等^[5]研究了复发鼻咽癌患者 p16 和 cyclinD1 表达特点,96%复发鼻咽癌患者 p16 缺失,远远高于初治鼻咽癌患者。p16 缺失鼻咽癌细胞与 p16 表达阳性相比,对放疗相对抗拒,局部复发率高。也有学者报道 p16 可能参与细胞周期阻滞和增加 G₁ 期细胞的比例,对 DNA 合成前期 G₁ 期放射敏感性增加^[6]。

细胞周期素 1(cyclin D1)作为细胞周期重要的正调控因子在肿瘤发生发展过程中起着重要的作用^[7,8],在生理状态下,细胞进入 S 期后 cyclinD1 迅速分解。如 cyclinD1 持续高表达,将导致 G₁ 期缩短,提前进入 S 期,使细胞增殖失控,最终形成肿瘤^[9]。研究表明,cyclinD1 可能是鼻咽癌细胞周期中必不可少的细胞周期调节因子^[10,11]。王晖等^[12]发现放疗疗效与 cyclinD1 表达呈负相关。许茂轩等^[13]研究 cyclinD1 和 survivin 蛋白表达与鼻咽癌放疗敏感性的关系。72 例鼻咽癌患者标本中,30 例 cyclinD1 蛋白高表达,阳性表达率为 41.7%。cyclinD1 在放疗敏感组和放疗不敏感组的表达率分别为 28.6%(14/49)和 69.6%(16/23)($P<0.05$)。CyclinD1 表达与鼻咽癌放射敏感性呈负相关。cyclinD1 可以作为预测鼻咽癌患者放射敏感性的分子标志物。

p16-cyclinD1-CDK4/6→Rb 途径是调控细胞周期的一种重要机制,p16 是 CDK4 的抑制因子,p16 蛋白能够和 cyclinD1 竞争性结合 CDK4,抑制 cyclinD1/CDK4 复合物的活性,从而抑制细胞增殖。当 p16 蛋白低表达、不表达或 cyclinD1 高表达,将促使细胞提前进入 S 期,细胞生长失控,甚至发生癌变。王代树等前期研究发现很多培养肿瘤细胞中 p16 虽有较强表达,但在应该发挥作用的 G₁ 期时表达较弱,而正调分子 cyclinD 恰恰在 G₁ 期表达最强。紫龙金正是提高 G₁ 期 p16 表达,从而抑制细胞增殖,促

进细胞分化^[14-17]。

紫龙金放射增敏作用是否与 p16 表达上调、cyclinD1 下调有关呢? 本研究免疫组化半定量分析法显示,紫龙金组和紫龙金加照射组与空白对照组及单纯照射组相比,p16 蛋白表达显著性上调($P<0.05$),而 cyclinD1 蛋白表达则显著性下调($P<0.05$)。进一步 RT-PCR 检测肿瘤组织中 p16 和 cyclinD1 mRNA 结果显示:与空白对照组和单纯照射组相比,紫龙金加照射组 p16 基因表达明显上调,而 cyclinD1 基因表达明显下调($P<0.05$)。上述结果验证紫龙金对鼻咽癌放射增敏作用机制可能是通过使 p16 表达上调、cyclinD1 表达下调,使处于对放疗相对敏感的细胞周期 G₁ 细胞比例增加,处于对放疗不敏感的 S 期细胞比例减少来提高鼻咽癌放射敏感性。

总之,本实验通过在体研究证明,紫龙金联合放疗能明显抑制人鼻咽癌细胞系 CNE-I 裸鼠移植瘤的生长,并且使与放射敏感性相关的 p16 表达上调、cyclinD1 表达下调。这为进一步临床研究提供更为可靠的理论基础,为紫龙金用于鼻咽癌放疗增敏临床综合治疗方法提供了一条新思路,但肿瘤形成是一个复杂的过程,有多种生长因子参与其中,放疗又涉及时间剂量分割方式的不同,我们的实验结果只是其中组合之一,还期待更多的临床研究以证实其确切疗效。

参考文献:

- [1] Tang Q,Guo Y,Hu QY,et al. Clinical observation on the radiosensitizing effect of Zilongjin on human nasopharyngeal carcinoma[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2012,30(6):1256-1258.[唐秋,郭勇,胡巧英,陈建祥,等.紫龙金对鼻咽癌增敏作用临床研究[J]. 中华中医药学刊,2012,30(6):1256-1258.]
- [2] Wu XF,Zhang GH,Li JJ,et al. Tetrandrine enhances radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma cell lines[J]. Chinese Journal of Pathophysiology,2012,28(12):2187-2191.[吴喜福,张革化,黎景佳,等. 汉防己甲素对人鼻咽癌细胞株的放射增敏作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(12):2187-2191.]
- [3] Zhong J,Min L,Huang H,et al. EZH2 regulates the expression of p16 in the nasopharyngeal cancer cells [J]. Technol Cancer Res Treat,2013,12(3):269-274.
- [4] Luo JW,Liang K. The study of p16 gene transfection on

- radiosensitivity in CNE-2 cell[J]. Chinese Journal of Radiation Oncology, 1999, 8(4): 229-232. [罗京伟, 梁克. p16 基因转染对 CNE-2 细胞放射敏感性的研究 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 1999, 8(4): 229-232.]
- [5] Lin HS, Berry GJ, Sun Z, et al. Cyclin D1 and p16 expression in recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. World J Surg Oncol, 2006, 4: 62.
- [6] Wang SQ, Zhou XJ, Wang Y. Expression of vascular endothelial growth factor tumor suppressor and p16 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2008, 21(3): 99-100. [书芹, 周小军, 汪芸. 鼻咽癌组织中血管内皮因子 VEGF 和肿瘤抑制基因 p16 的表达及意义[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(3): 99-100.]
- [7] Tsang CM, Yip YL, Lo KW, et al. Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(50): 3473-3482.
- [8] Yang Y, Liao Q, Wei F, et al. LPLUNC1 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth via down-regulation of the MAP kinase and cyclin D1/E2F pathways[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62869.
- [9] Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al. A novel cyclin encoded by a BCL-1 linked candidate oncogene[J]. Nature, 1991, 350 (6318): 462-463.
- [10] Ji H, He X, Chen SQ, et al. The expression of p16 and cyclinD1 in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance[J]. Journal of Oncology, 2010, 16(5): 370-373. [纪红, 何侠, 陈森清, 等. 鼻咽癌 p16 和 CyclinD1 表达及其临床意义[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(5): 370-373.]
- [11] Zhang X, Liu H, Li B, et al. Tumor suppressor BLU inhibits proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells by regulation of cell cycle, c-Jun N-terminal kinase and the cyclin D1 promoter[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 267.
- [12] Wang H, Hu BQ. Expression of Cyclin D1 and the radiotherapy effect of nasopharyngeal carcinoma[J]. Journal of Clinical Research, 2002, 19(1): 7-8. [王晖, 胡炳强. Cyclin D1 蛋白的表达与鼻咽癌放射治疗的疗效[J]. 医学临床研究, 2002, 19(1): 7-8.]
- [13] Xu MX, Lin SM, Liang S, et al. Correlation between expression of CyclinD1 protein and survivin protein and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma[J]. Chinese Journal of Laboratory Pathologist, 2012, 4(1): 11-14. [许茂轩, 林少民, 梁荣, 等. CyclinD1 及 Survivin 蛋白表达与鼻咽癌放疗敏感性的关系[J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(1): 11-14.]
- [14] Shi DS, Zhou JM, Ma SP. Effects of traditional Chinese medicine Zilongjin extracts on human non-small cell lung cancer cells A549 and endogenous VEGF expression[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2011, 38(20): 1267-1270. [史东升, 周静敏, 马淑萍. 紫龙金对人非小细胞肺癌 A549 细胞生长及 VEGF 表达的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(20): 1267-1270.]
- [15] Tian ZH, Liang YY, Li ZF, et al. Effects of Zilongjin on proliferation and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2010, 30(1): 48-52. [田志华, 梁云燕, 李振甫, 等. 紫龙金对人乳腺癌细胞系 MCF-7 增殖及凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 48-52.]
- [16] Fan FX, Wei W, Liu HT. Effects of anticancer medicine Zilongjin on cell proliferation and activity of p16~(ink4A) gene promoter in BGC-823 cells [J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2010, 46 (1): 68-71. [樊粉霞, 卫玮, 柳惠图. 紫龙金对 BGC-823 细胞增殖的抑制作用及对 p16~(INK4a) 启动子活性的影响[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2010, 46(1): 68-71.]
- [17] Peng A, Shen DL, Xu SZ. Reverse effects of Zilongjin on the malignant phenotype of BEL-7402 human hepatocarcinoma cells[J]. The Practical Journal of Cancer, 2012, 27 (2): 111-113. [彭安, 申东兰, 徐颂周. 紫龙金诱导 BEL-7402 人肝癌细胞分化的实验研究[J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(2): 111-113.]