

本文引用:刘洁,胡晶,戴娜,徐冰雁,罗晶婧,胡梅,何迎春.益气解毒方主要三萜类化合物抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖效应的比较[J].湖南中医药大学学报,2019,39(11):1315-1320.

益气解毒方主要三萜类化合物抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖效应的比较

刘洁¹,胡晶¹,戴娜¹,徐冰雁¹,罗晶婧^{1,2,3},胡梅^{1,2,3},何迎春^{1,2,3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;
3.湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南长沙 410208)

【摘要】目的 研究比较益气解毒方4种主要三萜类化合物齐墩果酸、熊果酸、茯苓酸、黄芪甲苷抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的效应。**方法** 实时无标记细胞功能分析技术(real-time unlabeled cell function analysis technique,RTCA)动态监测不同浓度的4种益气解毒方三萜类化合物对体外培养的人鼻咽癌 CNE2 细胞生长的影响,高通量细胞成像多功能检测系统 Cytation5(C5)监测不同化合物对鼻咽癌 CNE2 细胞形态的影响,Western Blot 法检测不同化合物对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖相关蛋白表达的影响。**结果** RTCA 结果显示齐墩果酸、熊果酸、茯苓酸、黄芪甲苷均能够不同程度地抑制鼻咽癌细胞增殖,呈剂量依赖性,不同单体发挥最佳药效的时间不同。茯苓酸和黄芪甲苷起效较快,茯苓酸在处理 24 h 达到最佳药效,IC₅₀ 值为 7.51 μmol/L,黄芪甲苷持续作用 36 h,抑制效果达到最佳,熊果酸在刺激 28 h 后 IC₅₀ 值最低,为 0.70 μmol/L,齐墩果酸后期作用效果较好,且所需浓度低。C5 结果显示,与对照组相比,4种三萜类化合物在作用 36 h 后,CNE2 细胞数量及形态均发生明显变化。Western Blot 结果显示,与对照组相比,齐墩果酸、熊果酸、茯苓酸、黄芪甲苷能明显抑制 CNE2 细胞中增殖相关蛋白 Survivin, XIAP, PCNA 的表达。**结论** 益气解毒方主要三萜类化合物均能抑制鼻咽癌细胞增殖,降低增殖相关蛋白 Survivin, XIAP, PCNA 的表达水平,但药物的作用时间和浓度均有差异。

【关键词】 益气解毒方;三萜类化合物;鼻咽癌;细胞增殖

【中图分类号】R285.5;R739.6

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.11.005

Comparison of Inhibitory Effects of Main Triterpenoids of Yiqi Jiedu Formula on Proliferation of Nasopharyngeal Carcinoma CNE2 Cells

LIU Jie¹, HU Jing¹, DAI Na¹, XU Bingyan¹, LUO Jingjing^{1,2,3}, HU Mei^{1,2,3}, HE Yingchun^{1,2,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Ophthalmology and Otolaryngology Diseases Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine and Visual Function Protection Engineering and Technological Research Center, Changsha, Hunan 410208, China)

【Abstract】 Objective To study and compare the inhibitory effects of the main triterpenoids of Yiqi Jiedu Formula including oleanolic acid, ursolic acid, pachymic acid and astragaloside iv on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. **Methods** Real-time unlabeled cell function analysis technique (RTCA) was used to dynamically monitor the effects of 4 triterpenoids of Yiqi Jiedu Formula at different concentrations on the growth of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells *in vitro*. Cytation 5 (C5) was used

【收稿日期】2019-01-31

【基金项目】国家自然科学基金课题(81573721,81874408);湖南省自然科学基金项目(2016JJ6117,2019JJ4026);湖南省研究生创新项目(CX2018B482);湖南中医药大学研究生创新项目(2017CX33)。

【作者简介】刘洁,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治肿瘤研究。

【通讯作者】*何迎春,女,博士,教授,博士研究生导师;E-mail:yingchunhe@aliyun.com。

to monitor the effects of different compounds on the morphology of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. The effects of different compounds on the expression of proliferation-related protein of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells were detected by Western Blot.

Results RTCA results showed that oleanolic acid, ursolic acid, pachymic acid and astragaloside iv could inhibit the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells in a dose-dependent manner, and the optimal time for different monomers was different. Pachymic acid and astragaloside iv arose faster, pachymic acid reached the best efficacy after 24 hours with treatment. IC_{50} was $7.51 \mu\text{mol/L}$, and the inhibitory effect of astragaloside iv was the best when it continued to function for 36 h. The IC_{50} of ursolic acid was the lowest after 28 hours of stimulation, which was $0.70 \mu\text{mol/L}$. Oleanolic acid had a better effect in the later stage and the action concentration was low. C5 results showed that compared with the control group, the number and morphology of CNE2 cells were significantly changed after 36 hours of treatment with 4 triterpenoids. Western Blot results showed that oleanolic acid, ursolic acid, pachymic acid and astragaloside iv could significantly inhibit the expression of proliferation-related proteins Survivin, XIAP and PCNA in CNE2 cells compared with the control group.

Conclusion The main triterpenoids of Yiqi Jiedu Formula can inhibit the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells and reduce the expression of proliferation-related proteins Survivin, XIAP and PCNA, but the action time and concentration of the drugs are different.

[**Keywords**] Yiqi Jiedu Formula; triterpenoids; nasopharyngeal carcinoma; cell proliferation

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种易发生于鼻咽黏膜上皮细胞的恶性肿瘤,其恶性程度高,易复发且具有早期转移的特点,中国鼻咽癌发病率和死亡率均高于世界平均水平(1.2/10万,0.7/10万),且男性高于女性^[1],其具体发病机制尚未明确,可能与EB病毒感染和11q、14q、3p和9p的杂合性缺失的遗传易感性以及现代环境中化学致癌因素、促癌因素等多种因素有关^[1-3]。益气解毒方是本课题组研究和应用20多年的一个经验方药,该方主要由黄芪、党参、天花粉、黄连、茯苓、射干、白花蛇舌草、甘草组成,多年研究证明益气解毒方对NPC细胞有很强的抑制和杀灭作用^[4-6]。益气解毒方中三萜类化合物主要有齐墩果酸(oleanolic acid, OA)、熊果酸(ursolic acid, UA)、茯苓酸(pachymic acid, PA)、黄芪甲苷(astragaloside iv, ASI)等,其在多种肿瘤的防治过程中均具有一定作用,茯苓酸通过线粒体途径能够抑制胃癌细胞的致癌性,在鼻咽癌治疗方面也有报道^[4],另外,黄芪甲苷能通过多种途径抑制胃癌和肝癌细胞的生长,熊果酸是一种用于乳腺癌治疗的潜在抗癌化合物,齐墩果酸在癌症预防和治疗中的应用中能改变多种细胞信号传导途径,但在抑制鼻咽癌细胞增殖效应方面尚未明确,本课题主要研究比较益气解毒方主要三萜类化合物茯苓酸、齐墩果酸、熊果酸、黄芪甲苷对鼻咽癌CNE2细胞增殖效应的影响,明确益气解毒方有效单体成分,为益气解毒方的现代临床应用提供更为科学的理论依据。

实时无标记细胞功能分析技术(real time cellular analysis, RTCA)是一种基于电阻抗检测的现代仪

器,相似的小分子化合物会产生相似的细胞效应特征曲线,因此,RTCA能够实时、不需标记、持续动态地检测小分子化合物引起的细胞效应。目前,RTCA广泛应用于国内外的各项研究中^[1-2],本实验通过RTCA比较益气解毒方主要三萜类化合物抑制鼻咽癌细胞增殖的效应,然后运用高通量细胞成像多功能检测系统Cytation5(C5)监测不同化合物对鼻咽癌CNE2细胞形态的影响,再通过Western Blot技术检测不同化合物对鼻咽癌CNE2细胞相关增殖蛋白表达的影响,从微观和分子方面为阐明益气解毒方药效物质基础提供更丰富的实验数据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人鼻咽癌细胞株CNE2,购自北京协和细胞库,由本实验室传代培养。

1.2 实验药物

RPMI-1640培养基和PBS缓冲液购自Hyclone公司,胎牛血清购自Gibco公司,0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液和青霉素-链霉素混合液购自北京Solarbio公司,二甲基亚砜(DMSO)购自Amresco公司,茯苓酸、齐墩果酸、熊果酸、黄芪甲苷购自上海金穗生物科技有限公司。

1.3 试剂及仪器

双人单面净化工作台(SW-CJ-2FD,苏州净化设备有限公司)、CO₂培养箱(赛默飞世尔公司)、实时无标记细胞功能分析仪RTCA(艾森生物科技有限公司)、高通量细胞成像多功能检测系统Cytation5(美

国伯腾仪器有限公司)、倒置显微镜(Olympus 公司)、Odyssey CLX 荧光扫描成像系统(Gene 有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养及药物溶解 将 CNE2 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 37 °C、5%CO₂、湿度饱和的恒温细胞培养箱内培育,适时换液,细胞生长至 70%~80%传代,取对数生长期细胞用于实验。

益气解毒方 4 种三萜类化合物均用 DMSO 溶解后分装,于 -20 °C 保存,使用时全培稀释,终浓度 DMSO 均为 0.1%;对照组为含 0.1%DMSO 的全培。

1.4.2 RTCA 监测细胞增殖情况 先将 RTCA 专用细胞增殖检测培养板中加入 50 μL/孔的培养基平衡仪器,约 15 min 后,选取对数生长期鼻咽癌 CNE2 细胞,胰酶消化后,制成单细胞悬液,5 000 个/孔接种于 RTCA 专用细胞增殖检测培养板,每孔加入 150 μL 细胞悬液,24 h 内当细胞贴壁进入对数生长期,即细胞指数(CI)达到 1 时,加入 200 μL 不同浓度的化合物,同时设置溶剂对照组(DMSO 组),每个组设 3 个复孔,于 37 °C,5%CO₂ 培养,RTCA 实时监测 72 h 以上。以细胞指数(cell index, CI)反映细胞增殖情况,

$$CI=(R_n-R_b)/15$$

其中 R_n 表示孔接种有细胞时的电极阻抗值, R_b 表示孔中只有培养基时的背景阻抗值。根据曲线分析益气解毒方 4 种三萜类化合物的药效随浓度及时间变化的特征,并计算出合适时间点的半数抑制率(50% inhibiting concentration, IC₅₀)的浓度^[7]。

1.4.3 高通量细胞成像多功能检测系统 Cytation5 (C5)监测细胞形态变化 待鼻咽癌 CNE2 细胞生长至 70%~80%,胰酶消化后制成单细胞悬液,5 000

个/孔接种于 96 孔板,待细胞完全贴壁后,加不同三萜类化合物刺激,通过 C5 监测细胞生长形态,设定 6 h 拍摄 1 次细胞形态图像。

1.4.4 Western Blot 技术检测细胞增殖相关蛋白的表达 根据 RTCA 和 C5 结果确定药物处理浓度和时间,待 CNE2 细胞生长至 70%~80%,加不同三萜类化合物,同时设置溶剂对照组(DMSO 组),处理一定时间后提取细胞蛋白,测定蛋白浓度后,通过 Western Blot 检测细胞增殖相关蛋白 Survivin、XI-AP、PCNA 的表达。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,计量资料实验数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,多重比较,方差齐性用 LSD 检验,方差不齐用 Dunnet's T3 检验。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RTCA 动态监测益气解毒方主要三萜类化合物对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响

2.1.1 不同三萜类化合物对 CNE2 细胞增殖的影响 为比较益气解毒方 4 种三萜类化合物齐墩果酸、熊果酸、茯苓酸、黄芪甲苷对鼻咽癌细胞增殖的抑制作用,分别将其设为不同浓度,采用 RTCA 动态监测细胞活性,结果显示 4 种化合物对于鼻咽癌细胞的增殖具有不同程度的抑制作用,且呈一定的剂量依赖性。见图 1-4。

2.1.2 不同化合物的 IC₅₀ 根据 RTCA 生长曲线,计算出益气解毒方不同单体在不同时间点的 IC₅₀,结果显示,益气解毒方中不同三萜类单体在不同时间的 IC₅₀ 有明显差别,不同单体的起效时间、浓度和最

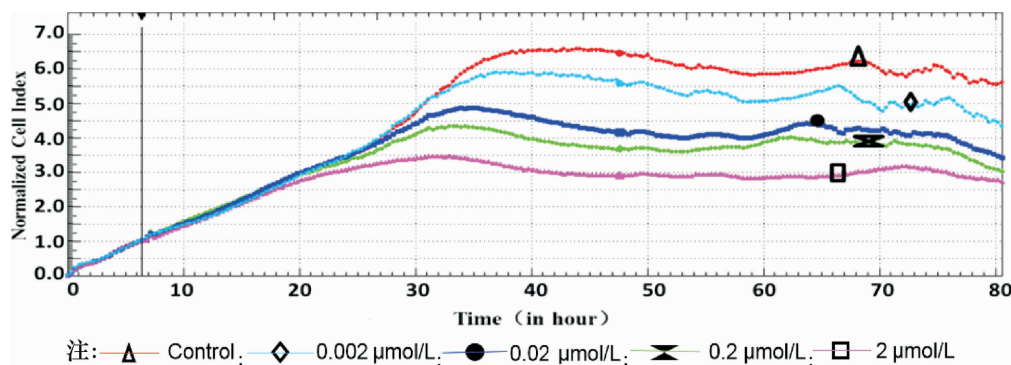


图 1 不同浓度齐墩果酸处理下鼻咽癌细胞增殖曲线

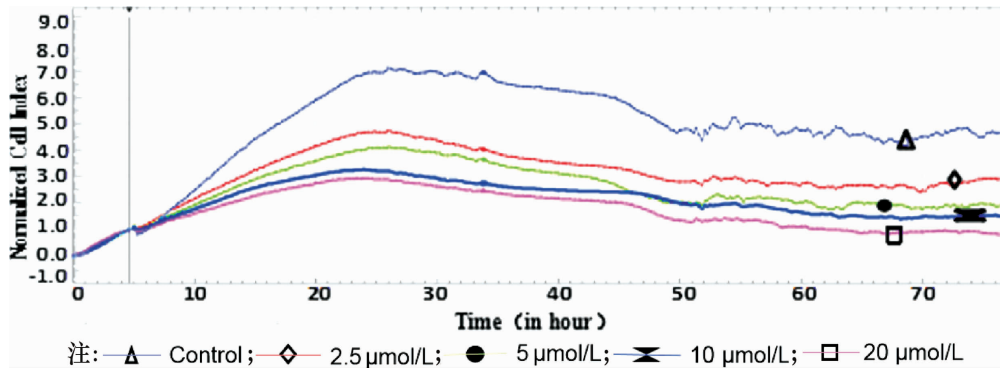


图2 不同浓度熊果酸处理下鼻咽癌细胞增殖曲线

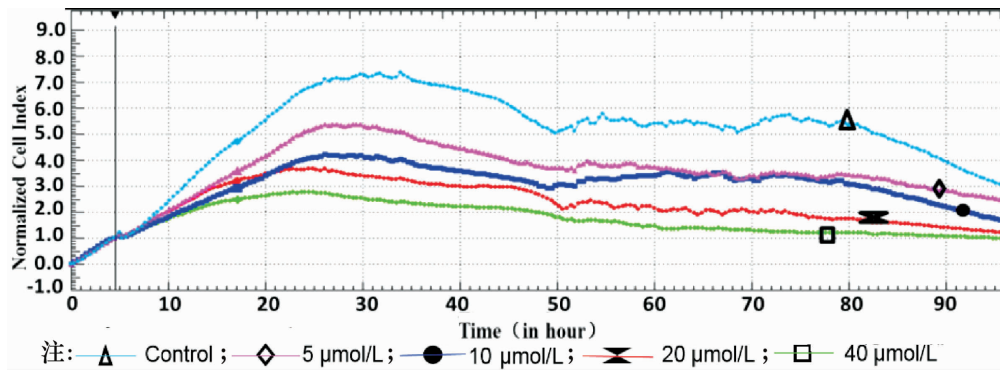


图3 不同浓度茯苓酸处理下鼻咽癌细胞增殖曲线

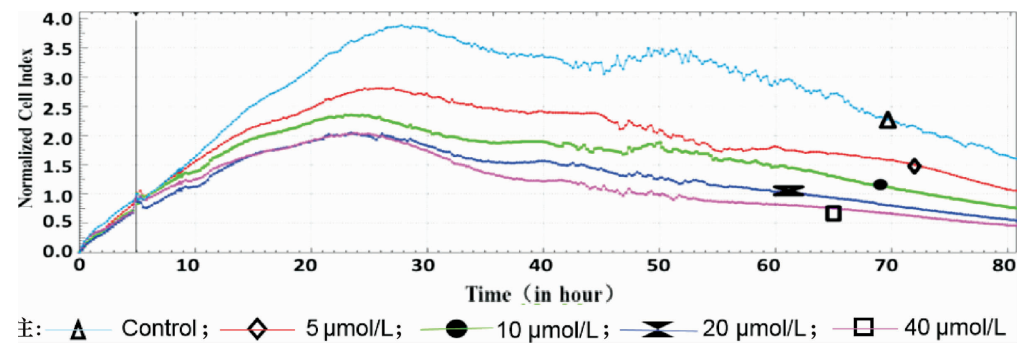


图4 不同浓度黄芪甲苷处理下鼻咽癌细胞增殖曲线

佳药效时间也不同。茯苓酸和黄芪甲苷见效快,加药刺激 12 h 后开始显效,茯苓酸在处理 24 h 达到最佳药效,IC₅₀ 为 7.51 μmol/L,之后,茯苓酸抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的作用逐渐降低,而黄芪甲苷依然发挥着较好的抑制作用,持续作用 36 h,抑制效果达到最佳,此时 IC₅₀ 为 5.44 μmol/L。熊果酸作用 20 h 之前,对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖具有一定的抑制作用,但多次实验结果差异较大,可能与细胞状态及熊果酸起效时间有关,而熊果酸在刺激 28 h 后达到最佳抑制效果,此时 IC₅₀ 值最低,为 0.70 μmol/L。齐墩果酸起效较慢,抑制 CNE2 细胞增殖的最佳作用时间为 36 h,IC₅₀ 值为 15.25 nmol/L,之后一段时间依然维持着较平稳的作用趋势。见

表1-2。

表1 不同化合物不同时间的 IC₅₀($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	24 h	36 h	48 h	72 h
齐墩果酸	0.24 μmol/L	15.25 nmol/L	13.75 nmol/L	11.18 nmol/L
熊果酸	6.75 μmol/L	3.50 μmol/L	13.14 μmol/L	>300 μmol/L
茯苓酸	7.51 μmol/L	11.3 μmol/L	14.72 μmol/L	25.01 μmol/L
黄芪甲苷	4.24 μmol/L	5.44 μmol/L	4.07 μmol/L	1.67 μmol/L

表2 不同化合物最佳药效时间及 IC₅₀($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	最佳药效时间/h	IC ₅₀
齐墩果酸	36	15.25 nmol/L
熊果酸	28	0.70 μmol/L
茯苓酸	24	7.51 μmol/L
黄芪甲苷	36	5.44 μmol/L

2.2 C5 动态监测益气解毒方主要三萜类化合物对鼻咽癌 CNE2 细胞形态的影响

根据 RTCA 结果,4 种化合物均选择接近最佳药效时间点的 IC_{50} 浓度作用于鼻咽癌 CNE2 细胞,通过 C5 动态监测不同组的细胞形态图像,结合 RT-CA 结果,我们选择加药处理 0、24、36、48 h 4 个时间点的细胞形态图像,结果显示,对照组细胞正常生长,形态饱满均匀,于 48 h 左右基本长满,齐墩果酸和熊果酸作用于药物 24 h 后,细胞大量死亡,漂浮,形成细胞碎片;茯苓酸和黄芪甲苷明显抑制细胞增殖,部分细胞脱壁漂浮,细胞膜溶解,轮廓不清。见图 5。

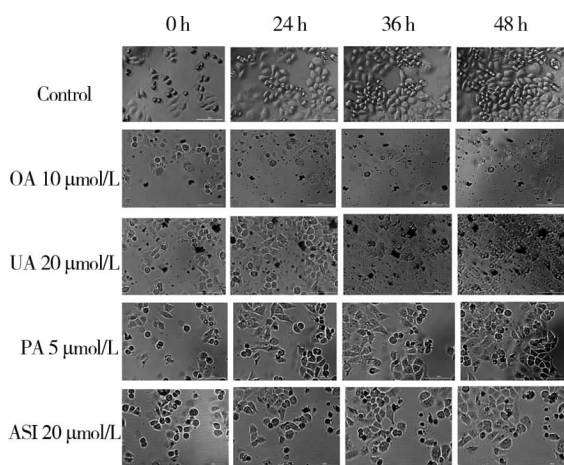


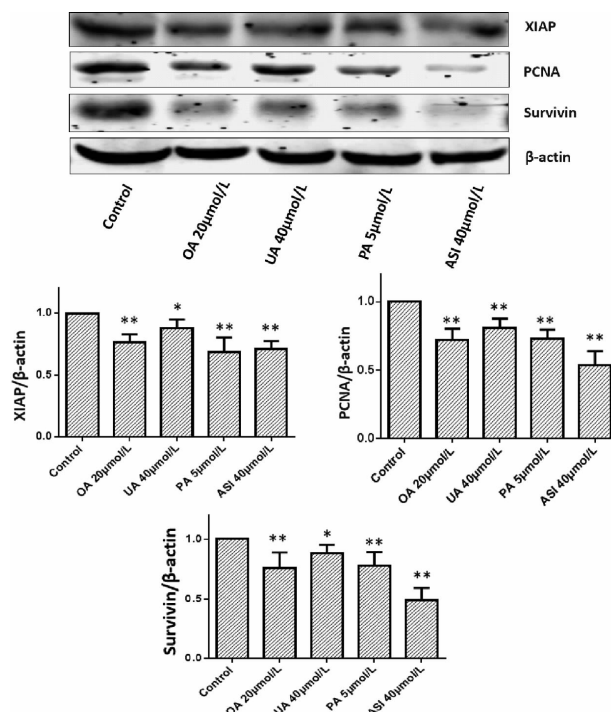
图 5 益气解毒方主要三萜类化合物对鼻咽癌 CNE2 细胞形态的影响 (Bar=100 μ m, $\times 200$)

2.3 Western Blot 检测益气解毒方主要三萜类化合物对 CNE2 细胞增殖相关蛋白的影响

根据 RTCA 和 C5 结果,4 种化合物在作用 36 h 后均有明显的效应,因此,在 4 种化合物处理细胞 36 h 后提取总蛋白,结果显示,与对照组相比,增殖相关蛋白 XIAP、PCNA、Survivin 的表达水平均下降,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 6。

3 讨论

目前,临床上对于癌症的治疗主要以化疗和放疗为主,但其毒副作用严重,疗效不稳定,随着中药研究与开发的深入,其抗肿瘤作用及优势愈发明显,中药成分复杂,不同成分能够多途径、多靶点、多效应的作用于肿瘤细胞,研究认为,中药的抗肿瘤作用可能通过以下几个途径:预防致癌,诱导肿瘤细胞衰老、自噬、凋亡和分化,抑制肿瘤细胞生长及上皮间充质转移和血管生成,逆转肿瘤细胞多药耐药,调节



注:与对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 6 益气解毒方主要三萜类化合物对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖相关蛋白的影响

机体免疫功能,联合放化疗减毒增效。但是,肿瘤的生长复杂,是一个多阶段的过程,因此,中药防治肿瘤的具体机制有待进一步研究。

鼻咽癌是耳鼻咽喉恶性肿瘤的主要癌种之一,益气解毒方是本课题组长期研究和应用的经验方,由黄芪、黄连、党参、天花粉、白花蛇舌草、茯苓、甘草等中药组成,具有益气解毒、生津润燥之效,全方补泻并用,气阴双补,扶正祛邪,帮助改善患者气虚体质,同时解毒养阴,起到平和抗癌的作用。有研究证明益气解毒方能够诱导大鼠鼻咽上皮细胞凋亡、抑制其增殖,从而有效逆转细胞癌变进程^[8-11]。益气解毒方 20 多年以来抗鼻咽癌疗效显著,但是,其具体中药成分在抗鼻咽癌过程中发挥的作用并不十分明确,从微观角度分析其具体成分的作用,对益气解毒方的进一步优化和临床广泛应用具有重大意义。益气解毒方中化合物成分较多,茯苓酸、槲皮素、黄芪甲苷、异欧前胡素、绿原酸、熊果酸、阿魏酸、齐墩果酸、汉黄芩素、芒柄花黄素、小檗碱等均是益气解毒方中含有的化合物,其中多数化合物的抗肿瘤作用在国内外文献中已有报道^[12-17]。根据其分类,以三萜类化合物和苯丙素类化合物为主。本研究主要比较益气解毒方君药黄芪中齐墩果酸、熊果酸、黄芪甲苷以及臣药茯苓中三萜类化合物茯苓酸对鼻咽癌

CNE2 细胞数量和形态的影响,黄芪与茯苓相须为用,扶助正气,而本实验发现这 4 种活性成分单独作用于体外培养的人鼻咽癌 CNE2 细胞都具有一定的抑制作用,且能够影响细胞形态,呈一定的剂量依赖性,其中不同化合物起效时间、浓度和最佳药效时间不同。本研究发现茯苓酸和黄芪甲苷能够快速作用于鼻咽癌细胞,发挥抗增殖作用;齐墩果酸和熊果酸较低浓度即能发挥较好的抑制鼻咽癌细胞增殖的效应,但相对来说,作用时间较晚,这可能与其作用机制有关。另外,本研究采用的 RTCA 技术通过动态监测药物处理后的细胞生长,能够预测药物所带来的靶向药效和毒性,还能根据曲线图判定药物的最佳药效时间^[18-19],弥补了 MTT 和 CCK8 需不同时间点多次测定的不足,缩短了抗肿瘤药物筛选和开发的时间,同时也能为新药开发提供新的思路。

抗凋亡蛋白 XIAP 和 Survivin 与肿瘤凋亡密切相关,亦可介导细胞增殖,增殖细胞核抗原(PCNA)是判断细胞增殖状态的重要指标,研究发现其在鼻咽癌细胞中异常高表达^[7],造成鼻咽癌细胞异常增殖,本实验中 4 种三萜类化合物均能下调 XIAP、Survivin、PCNA 的表达水平。综上所述,益气解毒方主要三萜类化合物均能抑制鼻咽癌细胞增殖,且与药物的作用时间和浓度相关,其作用机制可能均与降低增殖相关蛋白 Survivin、XIAP、PCNA 的表达水平有关。

参考文献

- [1] 丁静华,苏法仁,薄琳.鼻咽癌研究进展[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志,2017,41(1):43-46.
- [2] RAFFEE S, ELAMIN Y Y, CRONIN K, et al. A rare case of nasopharyngeal carcinoma with widespread CNS Metastases [J]. Irish medical journal,2014,107(6):180-181.
- [3] WEI W, SHAM J. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2005,365(9476):2041-2054.
- [4] SHANG X L, XIE Z Q, HUANG Z B. Risk factors for nasopharyngeal carcinoma[J]. Modern Preventive Medicine, 2008,35(2):206-207.
- [5] 江志超,田道法,范靖莹.益气解毒方对对中老年鼻咽癌患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞和 Th17 细胞的影响[J].中国中医药信息杂志,2014,21(2):23-26.
- [6] 刘丹丹,何迎春,尚云峰.益气解毒方抑制鼻咽癌 CNE2 细胞转移潜能的细胞迁徙干预机制[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2010,18(1):18-21.
- [7] 胡晶,戴娜,徐冰雁,等.益气解毒方通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J].中国中药杂志,2018,43(6):1221-1227.
- [8] 唐发清,田道法,梁日初,等.益气解毒方对二亚硝基咪唑诱导人鼻咽上皮细胞转化的阻抑作用[J].湖南中医学院学报,2001,21(3):18-20.
- [9] 王大海,田道法.益气解毒方配合放射治疗鼻咽癌的临床研究[J].湖南中医学院学报,2006,26(1):36-37.
- [10] 周小军,杜国有,孙一帆,等.鼻咽解毒颗粒对 EB 病毒感染 TNF- α 及 IL-2 水平的影响[J].世界中西医结合杂志,2009,4(10):721-723.
- [11] 廖雪,蔺婷,罗晶婧,等.益气解毒方水提物对 RAW264.7 细胞免疫功能的影响[J].肿瘤基础与临床,2015,28(6):473-476.
- [12] LU C, MA J, CAI D. Pachymic acid inhibits the tumorigenicity of gastric cancer cells by the mitochondrial pathway[J]. Anticancer Drugs, 2017,28(2):170-179.
- [13] ZHANG Y H, ZHANG Y, LI X Y, et al. Antitumor activity of the pachymic acid in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Ultrastruct Pathol, 2017,41(3):245-251.
- [14] ZHU J, WEN K. Astragaloside IV inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through inhibition of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway in gastric cancer cells[J]. Phytotherapy Research, 2018,32(7):1289-1296.
- [15] QIN C D, MA D N, REN Z G, et al. Astragaloside IV inhibits metastasis in hepatoma cells through the suppression of epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3 β / β -catenin pathway[J]. Oncology Reports, 2017,37(3):1725-1735.
- [16] YIM R, LI T, TIAN J, et al. Ursolic acid,a potential anti-cancer compound for breast cancer therapy[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018,58(4):568-574.
- [17] ŽIBERNA L, ŠAMEC D, MOCAN A, et al. Oleonic Acid Alters Multiple Cell Signaling Pathways: Implication in Cancer Prevention and Therapy[J]. Int J Mol Sci, 2017,18(3): 643-658.
- [18] MONIRI M R, YOUNG A, REINHEIMER K, et al. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA)[J]. Cytotechnology, 2015, 67(2):379-386.
- [19] 严国俊,裴燕芳,朱贞宏,等.实时细胞电子分析技术的应用研究进展[J].中国药理学杂志,2014,49(3):169-173.

(本文编辑 杨 瑛)