

# 健脾化痰中药逆转人肝癌细胞恶性表型作用研究<sup>※</sup>

□ 蓝惠玲<sup>1\*</sup> 王昌俊<sup>2\*</sup> 刘友章<sup>2</sup> 李建军<sup>3</sup>

(1. 广州大学 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第一附属医院 广东 广州 510405

3. 中山大学第二医院 广东 广州 510120)

**摘要** 目的：研究健脾化痰中药 960 复方（960）对人肝癌细胞恶性表型的逆转作用及机理。方法：用 960 大鼠灌胃后采集的含药血清体外处理人肝癌 SMMC7721 细胞，MTT 法检测细胞活力，ELISA 法检测 AFP 和白蛋白（Alb），放免法检测环核苷酸水平，PCR-ELISA 法检测端粒酶活性。结果：中药血清处理组，细胞活力显著减弱，Alb 生成明显增多，以作用 6 天组作用最为明显，AFP 显著降低，端粒酶活性显著低于对照组，与 DDP 组相近。细胞内 cAMP 明显高于对照组，DDP 组无明显变化。结论：中药 960 复方具有逆转人肝癌 SMMC7721 细胞恶性表型作用，作用机理与升高细胞内环核苷酸水平和降低端粒酶活性有关。

**关键词** 中药 960 复方 环核苷酸 白蛋白 甲胎蛋白 肝细胞癌 端粒酶

癌症的发生是由于原癌基因激活和抑癌基因的失活等多种基因改变所致<sup>[1]</sup>。研究发现正常细胞恶性转化需要经过获得恶性表型和永生等几个步骤<sup>[2,3]</sup>。诱导分化，即诱导癌细胞再分化，逆转癌细胞恶性表型，促使其向正常细胞转化已成为肿瘤治疗研究的热

点。维甲酸类具有诱导分化作用，但其作用不稳定，且有严重的毒副作用限制了临床应用<sup>[4,5]</sup>。中医药对原发性肝癌确有疗效<sup>[6,7]</sup>，但少有中药复方诱导分化的报道。我们既往的研究<sup>[8-12]</sup>发现，健脾化痰中药 960 复方（960）具有较好的治疗原发性肝癌的作用。其对小鼠移植瘤 H<sub>22</sub> 和 S<sub>180</sub>，以及人肝癌 SMMC7721 细胞具有显著抑制作用，本文用血清药理学方法从细胞活力、白蛋白（Alb）和 AFP 分泌，观察 960 对 SMMC7721 细胞恶性表型的逆转作用，并从细胞内 cAMP 水平和端粒酶活性研究其诱导细胞分化作用。

**※基金项目** 中国博士后基金资助课题（No. 2004035185），广州市卫生局课题（No. 200221）

**\*作者简介** 蓝惠玲，女，副主任医师。王昌俊，男，主任医师，博士后。

## 1 材料与方法

**1.1 健脾化痰中药 960 复方药物血清制备** 960 复方由莪术、白术、苦参、白花蛇舌草等 6 味中药组成, 提取挥发油及水溶性成分, 混合制成口服液。1ml 相当于生药 1.0g。根据既往研究<sup>[10]</sup> 方法, 1.6ml/kg. wt 中药复方 960 给 SD 大鼠 (广州中医药大学动物中心提供) 灌胃, 2 小时后以相同剂量再给药一次, 对照组给生理盐水, 再过 1 小时, 从下腔静脉采血, 静置 4 小时后 3000rpm 离心 30 分钟, 分离血清, 56℃ 灭活 30 分钟, 0.22μm 滤膜过滤, 临用时加入 PRMI 1640 培养液 (GIBCO) 中制成终浓度 10% 的药物血清温育液 (DSM)。以正常大鼠血清为空白对照。西药对照组: 顺氯氨铂 (DDP) 用含 10% 正常大鼠血清的 RPMI 640 培养液配制 (浓度 10μg/ml)。

**1.2 细胞** 人肝癌细胞系 SMMC7721 引自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。在含 10% 小牛血清 (FCS), 100U/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素的 PRMI 1640 培养液, 37℃, 含 5% CO<sub>2</sub> 湿度条件下培养。

**1.3 试剂** MTT 和 Triton X-100 为 Serva 产品, 羊抗兔 IgG-HRP, 兔抗人 Alb、AFP 单克隆抗体购于华美生物公司, <sup>125</sup>I-cAMP 和 <sup>125</sup>I-cGMP 试剂盒由上海中医药大学同位素室提供。端粒酶 PCR-ELISA 试剂盒为德国宝灵曼公司产品。

**1.4 细胞活力检测** 用 MTT 法。1 × 10<sup>6</sup> 细胞接种于 96 孔板, 每孔 100μl, 培养 8 小时后, 去培养液, 加入 DSM 作用一定时间 (12h, 24h, 48h, 72h) 后, 去 DSM, 加入 2mg/ml 的 MTT, 每孔 100μl, 4 小时后, 加入 100μl/孔的 DMSO, 于酶标仪 492nm 处比色测吸光度 A。

**1.5 细胞分泌 Alb 和 AFP 能力检测** 用酶联免疫吸附法。(1~2) × 10<sup>6</sup> 细胞接种于 24 孔培养板, 0.5ml/孔, 培养 4 小时后去 FCS-1640 培养液, 加入 DSM 培养 2~6 天后, 去 DSM, 加无血清培养液 (NSM) 培养 24 小时, 然后, 收集培养液样品。90μl 样品加 10μl 包被液加入 96 孔酶标板 (EIA 板), 4℃, 24 小时后取出, 以 0.1 mol/L 的 PBS (PH 7.4) 洗 3 次, 2 分/次, 加入兔抗人 Alb 或 AFP, 37℃ 温育 2 小时, 按前法洗后, 加入羊抗兔 IgG-HRP 温育 2

小时后, 按前法洗 3 次, 加入邻苯二胺底物显色液, 100μl/孔, 37℃ 避光 10 分钟, 加入 1mol/L 硫酸, 100μl/孔, 终止反应, 于酶标仪 492nm 处测 A 值。Alb 增加率 = (处理组 A 值 - 对照组 A 值) / 对照组 A 值 × 100%, AFP 降低率 = (对照组 A 值 - 处理组 A 值) / 对照组 A 值 × 100%。

**1.6 细胞内 cAMP 和 cGMP 测定** 2 × 10<sup>5</sup> 细胞接种于 12 孔培养板, DSM 培养 5 天, 去 DSM, 换 NSM 培养 24 小时, 去 NSM, 加入 -10℃ 的 1% Triton X-10, 100μl/孔, 然后转入 -20℃ 2 小时, 4℃ 18 小时, 3000 转/分离心 10 分钟, 取上清, 按 <sup>125</sup>I-cAMP 和 <sup>125</sup>I-cGMP 试剂盒说明书测 cAMP 和 cGMP<sup>[13]</sup>。

**1.7 端粒酶活性测定** 离心收集细胞, 洗涤缓冲液 [10mM HEPES-KOH (PH 7.5) - 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> - 10mM KCl - 1mM DTT] 冰上重悬, 再次离心, 10<sup>6</sup> 细胞用 15μl 冰冻的裂解液, 去上清, 液氮快速冻熔, -80℃ 保存, 按 PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒说明书检测端粒酶活性。(取细胞提取物 2ul 加入 PCR 反应混合液进行 cDNA 合成扩增; 扩增产物与地高辛标记的探针杂交; 杂交混合液移入预包被的反应板 (MTP) 中, 使之与 MTP 板上的链霉菌素蛋白结合; 将过氧化物酶标记的抗地高辛抗体加入 MTP 板, 反应后再加入酶反应底物, 显色后置 E960 酶标仪于 450 nm、690 nm 处测吸光度值 (A) 端粒酶阳性对照: 试剂盒提供的人肾 293 细胞裂解物端粒酶阴性对照: RNA 酶处理的细胞提取液。端粒酶活性 (A) = 样本吸收值 - 阴性吸收值, > 0.2 时为阳性)

**1.8 统计学处理** 采用 EXCEL 所附带的统计方法。各组数据比较用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 细胞活力** 经 960 血清作用后, SMMC7721 细胞活力明显减弱, 与对照组比 *P* < 0.05。如图 1 所示, 随着作用时间的增加, 960 合剂组细胞活力逐渐减弱, 而对照组, 逐渐增强。作用 12h, 960 组较对照组低 30.7%, 作用 24h 低 40.3%, 48h 低 56.9% 和 72h 低 67.7%。

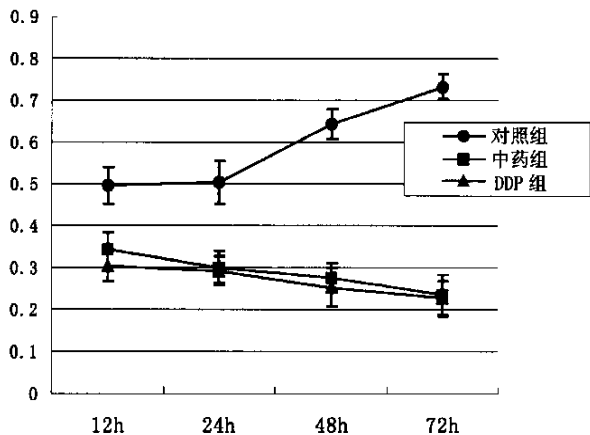


图1 健脾化痰中药血清对 SMMC7721 细胞活力的影响  
注: X 轴为含药血清作用时间, Y 轴为酶标仪 492nm 吸光度 (MIT 法)。

2.2 白蛋白分泌能力 经药物血清温育细胞 3 天后, Alb 生成明显增多, 与对照组比较具有显著差异, 以作用 6 天组作用最为明显。(表 1)

表1 健脾化痰中药血清对 SMMC7721 细胞分泌白蛋白的影响 (A 492 nm )

	n	Day2	Day3	Day4	Day6
对照组	12	3.38 ± 0.28	2.98 ± 0.13	2.16 ± 0.18	2.16 ± 0.25
DDP 组	12	3.41 ± 0.25	3.29 ± 0.19 *	3.04 ± 0.21 **	2.62 ± 0.22 **
中药组	12	3.47 ± 0.24	3.37 ± 0.29 *	2.94 ± 0.20 **	2.69 ± 0.23 **

注:与对照组比较: \*  $p < 0.05$  \* \*  $p < 0.01$

2.3 药物血清对人肝癌细胞生成 AFP 的影响 药物血清温育 3 天, AFP 变化不明显, 药物血清温育 5 天, 药物组 AFP 显著降低, 比对照组低 62.5%, 与 DDP 组接近 (73.4%)。(表 2)

2.4 药物血清对人肝癌细胞内环核苷酸水平的影响 药物血清温育 6 天, 药物组细胞内 cAMP 明显高于对照组, 较对照组升高 72.7%, DDP 组无明显变化; cGMP 和 cAMP/cGMP 变化不明显。(表 3)

表2 药物血清对人肝癌细胞生成 AFP 的影响

组别	D4		D6	
	n	A <sub>492</sub>	n	A <sub>492</sub>
对照组	11	1.83 ± 0.71	12	0.64 ± 0.33
DDP 组	12	1.55 ± 0.36	11	0.17 ± 0.04 **
中药组	12	1.43 ± 0.35	12	0.24 ± 0.09 **

注:与对照组比较, \* \*  $p < 0.01$

表3 药物血清对人肝癌细胞内环核苷酸水平的影响

组别	n	cAMP (fM/2 × 10 <sup>5</sup> 细胞)	cGMP (fM/2 × 10 <sup>5</sup> 细胞)	cAMP/cAMP
对照组	6	16.33 ± 3.28	1.28 ± 0.08	66.11 ± 16.04
DDP 组	6	18.57 ± 2.40	0.22 ± 0.06	84.40 ± 27.37
药物血清组	6	28.20 ± 12.28 *	0.34 ± 0.12	80.97 ± 40.08

注:与对照组比较 \*  $p < 0.05$

2.5 药物血清对人肝癌端粒酶活性的影响

经 960 药物血清处理组 SMMC7721 细胞端粒酶活性较弱, 而未处理的对照组细胞显示出很强的端粒酶活性, 处理 24h、48hH 和 72h, 差异非常显著。960 作用 12h、24h、48h、72h, 对端粒酶活性的抑制率分别为 12.58%、34.80%、50.04% 和 61.43%。时间越长, 作用越强。(见图 2)

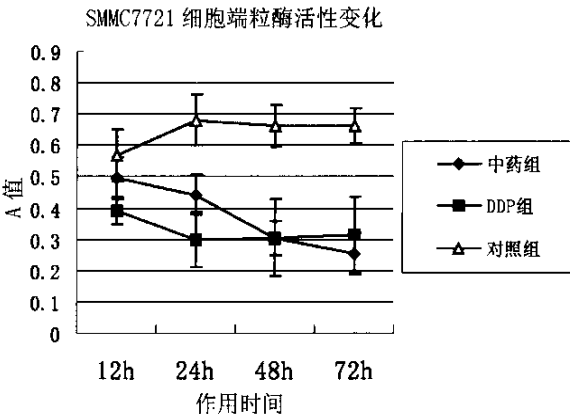


图2 SMMC7721 细胞端粒酶活性

注: X 轴为检测端粒酶活性的于不同作用时间, Y 轴为按 (Boehringer Mannheim Telomerase PCR ELISA kit) 检测说明书于 450nm 检测的吸光度。

3 讨论

3.1 细胞分化与细胞恶性表型的逆转 肿瘤细胞是由于内在基因结构和表达异常, 由正常细胞恶变而来, 失控的增殖和去分化是恶性肿瘤的重要特征, 癌细胞种种恶性表型就是分化异常的结果, 癌细胞由于去分化从而表现出许多胚胎细胞的特征<sup>[13-15]</sup>。随着肿瘤研究的深入, 业已发现肿瘤细胞是可以逆转的, 如维甲酸类对白血病细胞的诱导分化研究取得了可喜的成就<sup>[16]</sup>。但由于化合物类药物作用周期短, 且效果不稳

定,临床运用可出现严重的副作用,已有学者进行从中草药中筛选肿瘤细胞诱导分化剂的研究,如淫羊藿甙对 HL-60 细胞<sup>[17]</sup>、苦参碱对 K562 细胞<sup>[18]</sup>、香茶菜黄酮对人肝癌细胞 GHC<sup>[19]</sup>等的诱导分化研究。

Alb 和 AFP 分别反应了肝癌细胞的分化程度和恶性程度。肝细胞 DNA 及蛋白质合成是反映正常肝细胞功能的重要指标<sup>[20]</sup>,Alb 是肝细胞特异性分泌的功能性蛋白,肝细胞分化程度高,肝细胞功能正常,Alb 分泌量多,肝细胞受损,或分化异常时 Alb 分泌减少<sup>[20]</sup>。诱导分化剂 Acyclic retinoid 促使人肝癌 HuH-7 细胞 Alb 基因转录作用增强,培养液中 Alb 分泌量增多<sup>[21]</sup>。AFP 为胎儿期肝细胞特有蛋白,出生以后,肝细胞失去分泌 AFP 的功能,当肝细胞癌变时,又回到胎儿期状态,而分泌 AFP。AFP 是肝癌的一个重要标志物,AFP 表达减弱或消失是肝癌细胞发生逆转的特征性改变指征<sup>[15]</sup>,AFP 作为一癌症标志物,具有免疫抑制作用,抑制脾脏淋巴细胞增殖,激活 T 抑制细胞 (Ts),此外,AFP 还有直接促瘤作用,人 AFP 与小鼠肝癌 (H22) 细胞一起培养可刺激 H22 细胞的生长,然而,当培养液中加入人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA),则对 H22 细胞无生长促进作用,抗 AFP 抗体可抑制 H22 增殖,说明 AFP 与肝癌的发生、发展密切相关,AFP 是肝癌治疗的重要靶点。Oxa 降低 AFP mRNA 及蛋白表达,诱导分化剂维甲酸 (RA) 抑制人肝癌 SMMC-7721 中 AFP mRNA 的表达<sup>[22,23]</sup>。羟基喜树碱诱导肝癌细胞 G2 分化的机理与降低 AFP 和升高 Alb 有关<sup>[25]</sup>。维甲酸和异视黄酸 (IRA) 均可使人肝癌细胞分泌到培养液中的 AFP 减少,免疫组化显示细胞内 AFP 亦减少<sup>[25]</sup>。

本文结果,经 960 药物血清温育细胞后,培养液中 Alb 浓度增高,说明细胞生成白蛋白的能力增强,ELISA 检测培养液中 AFP,药物血清作用 5 天组, A 值显著低于对照组,表明药物血清作用后,AFP 分泌减少,说明细胞恶性程度降低,向正常肝细胞转化,960 有诱导人肝癌 SMMC-7721 分化作用。

关于肿瘤细胞诱导分化的机理至今尚未完全明了,反全式维甲酸对急性早幼粒白血病的诱导分化作用是通过其受体所调控的基因加以实现的,环磷酸腺苷的受体蛋白有两种异构体 RI 和 RII,生理条件下,二者处

于平衡状态,发生肿瘤时,这一平衡被破坏,若使平衡得以恢复,则肿瘤细胞停止生长,趋向分化<sup>[17]</sup>。众多研究表明,环磷酸腺苷 (cAMP) 是一种有效的诱导分化剂,是 ATP 经腺苷酸环化酶催化的产物,是体内很多激素的第二信使,其主要功能是激活蛋白激酶 A (PKA),通过某些蛋白质的磷酸化来体现激素的生理效应,研究证明 cAMP 能在体外引起某些癌基因转化细胞分化,使细胞生长延缓,形态趋向正常,体内实验也证明瘤内注射双丁酰-AMP 可使脑恶性胶质瘤细胞明显缩小<sup>[15,26]</sup>;cAMP 及其类似物对人肝癌细胞的促分化作用同样是通过细胞内 cAMP 依赖性蛋白激酶 A 发挥生理效应的<sup>[27]</sup>。用 H-ras 基因转染 NIH3T3 细胞,使细胞转化成恶性后,细胞加速生长,接触抑制丧失,细胞内 cAMP 浓度降低,再用双丁酰-cAMP,8-溴-cAMP 等处理细胞,可使细胞形态恢复成典型的正常纤维母细胞<sup>[8]</sup>,HL-60 细胞的研究发现,一个化合物若能升高细胞内 cAMP 含量,多可诱导 HL-60 细胞分化,且分化程度与升高 cAMP 呈正相关<sup>[28]</sup>。本文结果,扶正抗癌方药物血清温育人肝癌细胞 SMMC-7721 后,细胞内 cAMP 含量显著高于对照组,说明其诱导分化机理可能与升高细胞内 cAMP 含量有关。

**3.2 端粒酶与肝癌** 端粒酶是合成染色末端端粒 DNA 重复序列必须的一种核膜蛋白。端粒酶由染色体末端 6 个重复核酸序列组成,他们使染色体彼此保持距离形成结构变化。当正常细胞增殖,端粒变短,因为 DNA 多聚不能终止 DNA 远端复制过程。因此认为,端粒长度变短,预示着细胞老化或程序性死亡,那么,阻止染色体进一步发生变化,可导致细胞恶性转化。与正常细胞相反,“永生”细胞呈现出短而稳定的端粒长度,端粒的长度由端粒酶 (一种由 RNA 组成的逆转录酶) 维持。近来的研究表明,在多种人类恶性肿瘤中有明显的端粒酶活性,如乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌和甲状腺癌。因而,目前端粒酶被认为可能是不同器官肿瘤恶性行为的有用的标志物。超过 85% 的人癌表达端粒酶活性,绝大部分人肝癌端粒酶阳性。在大鼠肝癌的发生过程中,端粒酶活性与动物衰老具有组织特异性和稳定性。肝脏和睾丸组织中端粒酶阳性。端粒酶活性在 2/3 部分肝切除后肝再生过程中轻度增加 (2 成)。端粒酶活性在 WB-

F344 细胞增殖过程中明显不同。体外建立的非肿瘤起源的 WB - F344 细胞在低级水平表达端粒酶活性。在进一步的老化过程中这些细胞失去了端粒酶活性的表达。在肿瘤来源的 WB - F344 细胞中有端粒酶表达,但在选择的细胞周期,这些细胞亲本细胞中无表达,由此说明在肝癌的发生过程中端粒酶起着一定作用。端粒的不断缩短和端粒酶的激活,可能是肝脏疾病恶性进展的一个早期检测的有用的标志物。所有 HCC 都有端粒酶表达<sup>[29]</sup>。端粒酶活性与细胞的分化程度密切相关。在高分化肝癌组织中端粒酶阳性率 73% (11/15),中分化肝癌中 94% (16/17),低分化中 100% (5/5)。分化好的 HCC 用其他方法检诊断率较低,如 AFP21%, PIVKA - II 0% H 和血管造影 13%<sup>[30]</sup>。经 960 药物血清处理过的 SMMC7721 细胞端粒酶活性较弱,而未经处理的对照组细胞表现出较强的端粒酶活性。说明 960 中药复方影响 SMMC7721 细胞端粒酶活性表达。960 复方逆转 SMMC7721 细胞恶性表型的机理可与降低端粒酶活性表达有关。

## 参考文献

- [1] Vogelstein B, Kinzler KW. The mutistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993, 9: 138 - 141.
- [2] Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embirc fibroblasts requires at least two cooperation oncogenes. *Nature (Lond)*, 1983, 304: 596 - 602.
- [3] Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991, 1072: 1 - 7.
- [4] Naik HR, Grogery K, Pienta KJ, 4 - Hydroxyphenylretinamide in the chemoprevention of cancer. in: August TJ, Anders MW, Murad Ferid, Coyle JT ed. *advances in pharmacology.* California. Academic Press. 1995: 315 - 348.
- [5] 赵勇, 崔正言, 张玲, 等. 淫羊藿甙对人急性早幼粒白血病细胞分化的影响 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1997; 19 (1): 53 - 55.
- [6] 吴孟超. 中医药在肝癌防治中的作用、地位和存在的问题 [J]. *中西医结合学报*, 2003, 1 (3): 163 - 164.
- [7] 王昌俊, 廖子君, 陈庆强, 等. 中药 960 合剂配合肝动脉栓塞化疗治疗晚期肝癌 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2002, (4): 211 - 214.
- [8] 陈伟, 钱力兰, 王昌俊, 等. 钱氏肝癌方加减治疗 53 例原发性肝癌临床观察 [J]. *上海中医药杂志*, 1998; (4): 14 - 16.
- [9] Wang CJ, Li JJ, Chen QQ, Chen W, Qian BW. Herbal medicine 960 recipe regulates the proliferation and apoptosis of human hepatoma cell line SMMC - 7721 cells. *China Medical Abstracts (Internal Medicine)*, 2001, 18 (3): 176 - 179.
- [10] 王昌俊, 陈伟, 钱伯文. 扶正抗癌方药物血清对人肝癌细胞增殖的影响 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 1997, 7 (4): 214 - 216.

- [11] 胡月红, 胡月娟, 徐军, 等. 钱氏抗肝癌方的抗癌实验研究 [J]. *中成药*, 1997; 17 (4): 34 - 35.
- [12] 王昌俊, 钱伯文, 陈伟. 中药复方 960 诱导人肝癌细胞凋亡的研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2000, 10 (1): 19 - 21.
- [13] Sachs L. Regulators of growth, differentiation and reversion of malignancy; Normal hematopoiesis leukemia. In: Wahren B, et al ed. *Progress on cancer research and therapy.* Vol 32: *Molecular biology of tumor cells.* New York. Reven Press. 1985: 257.
- [14] Sparks RI, Estevig DN, Scott RE. Differatiation and its role in carcinogenesis. In: Colburn NH, Moses HM, Stanbridg EG eds. *UCLA symposium on molecular and cellular biology.* New series Vol 58: *Growth factors, tumor promoters and cancer genes.* New York. Alan R Liss Inc. 1988: 171.
- [15] 陈惠黎, 肿瘤逆转. 见: 汤钊猷主编, *现代肿瘤学* [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 157.
- [16] 王振义. 人急性早幼粒细胞性白血病的分化治疗. 见韩锐主编, *抗癌药物研究与实验技术* [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 48 - 65.
- [17] Zhao Y, Cui Z Y, Zhang L, et al. Effects of Icarin on differentiation of HL - 60 cells. *Biotherapy* 1996; 10: 915 - 918.
- [18] 毛慧生, 刘洪隐, 李川, 等. 苦参碱对肿瘤细胞恶性表型及免疫功能的调控作用 [J]. *中国肿瘤临床*, 1996, 23 (11): 799 - 801.
- [19] 葛曰萍, 陈维洁, 王晨光, 等. 香茶菜黄酮诱导人肝癌细胞系 GHC - 3 恶性表型的逆转 [J]. *细胞生物学杂志*, 1995, 17 (2): 33 - 35.
- [20] 小山典男, 十孝夫. 肝スアフェロイドの構造と機能 [J]. *细胞*, 1991, 23 (6): 18 - 20.
- [21] Noriaki N, Yoshihiro S, Yasuhiro Y, et al. Induction of apoptosis by acyclic retinoid in the human hepatoma - derived cell line HuH - 7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 207 (1): 382 - 386.
- [22] Wang X W, Xu B. Several new targets of antitumor agents. *Acta Pharmacologica Scinica* 1997; 18 (4): 289 - 292.
- [23] Cheng HL. Reversal of human hepatoma cells. in: Tang ZY, Yang MH ed. *Advance of Primary liver cancer research*, Shanghai, Shanghai University Press, 1990: 328.
- [24] 夏明明, 陈惠黎, 蒋秉坤. 异视黄酸对人肝癌细胞的诱导分化作用 [J]. *细胞生物学杂志*, 1991, 13 (3): 127 - 130.
- [25] Zhang X, Zhou Y, Xu B, et al. Differentiation of human hepatoma Hep G2 cells induced by 10 - hydroxycamptothecin. *Chin Med J English edition* 2000; 113 (8): 712 - 713.
- [26] Loodwood A H, Murphy SK, Borslow S, et al. Cellular signal transduction and reveral of malignancy. *J Cell Biochem* 1987; 33: 237.
- [27] 陈惠黎. 人肝癌细胞的逆转, 见汤钊猷, 杨秉辉 主编, *原发性肝癌的研究与进展* [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1990: 328.
- [28] 韩锐. *肿瘤化学预防及药物治疗* [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1991: 215.
- [29] Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, et al. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997 Jan, 93 (1): 56 - 62.
- [30] Kazuhiro N, Yoshiaki U, Toshihiro H, et al. Telomerase as a tool for the differential diagnosis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1996; 78: 232 - 236.