

文章编号:1673-1689(2005)06-0060-06

松口蘑糖蛋白联合 5-Fu 体外对人肝癌细胞 Bel-7402 的影响及作用机理初探

魏元青, 陶文沂, 许泓瑜

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用 MTT 法研究了松口蘑抗肿瘤糖蛋白 MTS03 与化疗药物 5-Fu 单独及联合使用对人肝癌细胞 Bel-7402 的影响及对人正常肝细胞 L-02 的毒性作用, 观察不同浓度配比及不同作用时间对细胞是否具有增效减毒的作用; 采用扫描电镜观察 MTS03 作用后的 Bel-7402 细胞形态. 结果表明, MTS03 与 5-Fu 在较低浓度单独使用对肿瘤细胞无显著差异, 但两者联合使用增强了对肿瘤细胞的杀伤作用, 而对正常细胞的作用较小, 联合使用的 q 值均大于 0.85, 说明不存在拮抗作用. 扫描电镜观察到凋亡小体的形成, 随着剂量升高, 凋亡小体增多. 这一结果说明两者合用后 MTS03 增加了 5-Fu 对肝癌细胞的敏感性, 同时降低了两者单一高剂量使用时引起的毒副作用, 同时 MTS03 能诱导 Bel-7402 细胞膜皱缩和凋亡小体的形成.

关键词: 松口蘑; 糖蛋白; 抗肿瘤; 协同增效; 细胞毒性; 凋亡

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

Combinational Effects of a Glycoprotein from *Tricholoma matsutake* with 5-Fu on Human Liver Cancer Cells Bel-7402 in Vitro and the Relevant Mechanisms

WEI Yuan-qing, TAO Wen-yi, XU Hong-yu

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: MTT assay was used to study the effects of a glycoprotein MTS03 from *Tricholoma matsutake* combined with 5-Fu on human liver cancer Bel-7402 cells and the cytotoxicity of the drugs against human liver L-02 cells. The preliminary mechanism of MTS03 on cancer cells was also investigated. The results showed that MTS03 significantly decreased the survival level of Bel-7402 cells combined with 5-Fu at low dose, as compared with that using the drugs individually, and it had no or little side effects against human liver L-02 cells. The values of q were larger than 0.85, they had no antagonistic effect with each other. The cells treated with MTS03 at dosage of 40, 20, 5 g/mL were abnormal, and apoptotic bodies were visualized by microscope and scanning electromicroscope. The result suggested that MTS03 could increase the sensitivity of human liver cancer cells to 5-Fu, and reduce the side effects when using high dosage of either MTS03 or 5-Fu, MTS03 could also cause cell shrinkage with the formation of apoptotic bodies.

Key words: *Tricholoma matsutake*; glycoprotein; antitumor; synergistic effect; cytotoxicity;

收稿日期: 2005-01-10; 修回日期: 2005-03-25.

基金项目: 无锡市自然科学基金项目(CK030002)资助课题.

作者简介: 魏元青(1975-), 女, 湖北麻城人, 发酵工程博士研究生.

apoptotic bodies

临床上化疗是治疗癌症的一种重要的手段,通常为了增强疗效,都是联合使用几种药物。合用具有不同作用的几种药物,可以杀死更多的癌细胞,并可降低人体对某种特定药物产生耐药性的可能,同时以几种方式攻击癌细胞,比单用一种药物更有疗效。

松口蘑(*Tricholoma matsutake*, S. Ito et imai Sing.)是与松树共生的一种外生菌根真菌,日本学者对其进行了一些研究,从子实体和菌丝体提取的活性物质具有良好的抗肿瘤作用,而对正常细胞的毒性较小,是一种高效低毒的活性物质^[1~3]。万彩霞等人^[4]从松口蘑中提取到一种糖蛋白,对 S180 肉瘤具有良好的抑制作用。作者拟从联合用药的角度,研究此糖蛋白与化疗药 5-Fu 的药物配比,观察两者的相互作用,并初步探讨了 MTS03 抗肿瘤的机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 材料

1) 松口蘑:作者所在实验室保藏菌种,松口蘑菌丝体根据文献^[5]的方法发酵获得。松口蘑糖蛋白(MTS03)从松口蘑发酵菌丝提取、分离纯化获得,用 RPMI 1640 完全培养基溶解后经 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,临用前用完全 RPMI 1640 培养液稀释到所需浓度。

2) 细胞株:人肝癌细胞 Bel-7402、人正常肝细胞 L-02,购自中国科学院上海细胞研究所,常规体外细胞传代,培养基为 RPMI 1640 完全培养基。

3) 主要试剂:小牛血清,上海华美生化试剂公司产品;谷氨酰胺、台盼蓝、MTT, Sigma 公司产品;RPMI 1640 细胞培养基, GIBCO 公司产品;胰蛋白酶, Amresco 公司分装;二甲亚砜(DMSO), 国产分析纯。

1.1.2 仪 器 96 孔细胞培养板,美国 Costar 公司产品;超净工作台,苏净集团安泰公司产品;圆筒式不锈钢过滤器,绍兴卫星医疗设备制造有限公司产品;自动双重纯水蒸馏器 SZ-93,上海亚荣生化仪器厂制造;酶联免疫检测仪 Multiskan MK3, Thermo Labsystems 公司制造;CO₂ 培养箱, Thermo Forma 公司制造;倒置相差显微镜 Bi-4463, Union Optical Tokyo 制造;SX-40 扫描电子显微镜,日本日立公司制造。

立公司制造。

1.2 方法

1.2.1 MTS03 与 5-Fu 单独及联合使用对人肝癌细胞 Bel-7402 的影响 取对数生长期的 Bel-7402 细胞,经体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化后用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL,加样于 96 孔细胞培养板中,每孔 150 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱培养 24 h 后加样,采用不同加样方案:1)单独加入不同浓度的 MTS03;2)单独加入不同浓度的 5-Fu;3)不同浓度的 MTS03 与 5-Fu 联合使用。用完全培养基将 MTS03、5-Fu 稀释成不同浓度的样品,合用时将两者以不同浓度进行配比,每孔加入 150 μL ,空白对照组加入等体积的 RPMI 1640 完全培养基,每组设复孔 4 孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% 的 CO₂ 条件下培养 24, 48, 72 h。小心弃去上清液,每孔加入 MTT 液(0.5 mg/mL)100 μL 继续培养 4 h。弃去上清液,每孔加入 150 μL DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 后测定 OD₅₇₀, 计算抑制率^[6]。

1.2.2 MTS03 与 5-Fu 单独及联合使用对人正常肝细胞 L-02 的细胞毒性作用 方法同 1.2.1。

1.3 统计学处理与 q 值的计算

结果用 $\overline{\text{OD}}_{570} \pm S$ 表示,组间处理用双侧 t 检验。根据下面的公式计算 q 值^[7]:

$$q = \frac{E_{AB}}{E_A + (1 - E_A)E_B}$$

式中, E_A 为 A 药抑制率, E_B 为 B 药抑制率, E_{AB} 为两药合用抑制率, $q < 0.85$ 为两药拮抗; q 在 0.85 ~ 1.15 范围为两药作用相加; $q > 1.25$ 为两药作用增强(或协同)。

1.4 扫描电镜观察样品对细胞形态的影响

培养的 BEL-7402 细胞经体积分数 0.25% 的胰酶消化收集, PBS 洗 2 次(1 000 r/min, 5 min), 立刻用体积分数 2.5% 的戊二醛溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 1 h, PBS 液洗 3 次,再用体积分数 1% 的钨酸溶液固定 1 h, PBS 洗 3 次,酒精上行脱水,进行扫描电镜观察细胞形态^[8]。

2 结果与讨论

2.1 5-Fu 及 MTS03 单独使用对 Bel-7402、L-02 细胞增殖的影响

采用 MTT 法分别考察了不同质量浓度的 MTS03 和 5-Fu 单独使用对 Bel-7402 和 L-02 作用

不同时间的增殖抑制作用,结果见表 1,2.

从表 1 可以看出,MTS03 与 5-Fu 单独使用时,随剂量的加大和时间的加长,对 Bel-7402 细胞的抑制率增大,在 MTS03 质量浓度小于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时无显著影响,5-Fu 的质量浓度小于 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 、

作用 48 h 内对 Bel-7402 细胞的抑制率无显著影响 ($P>0.05$).从表 2 可以看出,当作用时间小于 48 h,MTS03 质量浓度小于 20 $\mu\text{g/mL}$ 、5-Fu 质量浓度小于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,对正常细胞无毒性或毒性极小.

表 1 5-Fu 及 MTS03 单独使用对 Bel-7402 细胞增殖抑制率的影响
Tab.1 Inhibitory effect of 5-Fu and MTS03 on the proliferation in Bel-7402 cells, individually

质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)		时间/h					
		24		48		72	
		OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%	OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%	OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%
对照		1.125±0.038		0.579±0.024		0.496±0.015	
MTS03	1.25	1.246±0.019	-10.76	0.603±0.015	-4.06	0.492±0.017	0
	2.5	1.299±0.019	-15.49	0.599±0.036	-3.37	0.483±0.029	2.71
	5	1.085±0.015	3.53	0.583±0.021	0	0.419±0.006	15.52
	10	0.897±0.095*	20.24	0.493±0.014	14.94	0.212±0.013**	57.26
	20	0.688±0.035*	38.87	0.313±0.012**	45.95	0.157±0.056**	68.28
5-Fu	0.25	1.058±0.048	5.99	0.481±0.015	16.88	0.334±0.033*	32.71
	0.50	1.039±0.005	7.64	0.469±0.003	18.96	0.288±0.006**	41.88
	0.75	0.979±0.011	12.98	0.467±0.017*	19.43	0.247±0.032**	50.15

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与对照相比,以下同

表 2 5-Fu 及 MTS03 单独使用对 L-02 细胞杀伤率的影响
Tab.2 Inhibitory effect of 5-Fu and MTS03 on the proliferation in L-02 cells, individually

质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)		时间/h					
		24		48		72	
		OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%	OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%	OD 570 ± s	抑制率/%
对照		0.537±0.036		1.050±0.036		1.175±0.081	
MTS03	1.25	/	/	1.132±0.062	-7.83	1.459±0.012	-24.28
	2.5	/	/	1.106±0.054	-5.29	1.456±0.048	-23.98
	5	0.624±0.074	-16.16	1.069±0.063	-1.76	1.176±0.017	0
	10	0.574±0.006	-6.95	0.995±0.020	5.25	1.133±0.069	3.59
	20	0.520±0.005	3.10	0.969±0.055	7.74	1.017±0.078	13.48
5-Fu	0.25	0.690±0.011	-28.49	1.102±0.064	-4.95	1.259±0.072	-7.23
	0.5	0.556±0.011	-3.44	1.017±0.095	3.17	1.145±0.045	2.47
	0.75	0.514±0.013	4.38	0.893±0.064	14.92	0.950±0.092*	19.06

2.2 MTS03 与 5-Fu 联用后对 Bel-7402 细胞增殖的影响

根据单独使用两者对两细胞作用的结果,采用了 MTS03 对 L-02 的无毒或低毒的剂量,即小于 10 $\mu\text{g/mL}$ 与 5-Fu 合用或 20 $\mu\text{g/mL}$ 合用作用 24 h, MTS03 与 5-Fu 以不同质量浓度配比后联合使用对 Bel-7402 细胞的抑制率见表 3.

从表 3 的结果可以看出,在两者单独使用无效的剂量下合用后对 Bel-7402 有非常好的抑制作用,

与表 1 的比较看,在 MTS03 单独使用的剂量为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时才具有显著意义,而以较低的剂量范围 1.25~5 $\mu\text{g/mL}$ 与 5-Fu 合用后,对肿瘤细胞的杀伤力非常明显,与单独使用时比较,具有非常显著意义.

2.3 MTS03 与 5-Fu 联合使用对人正常肝细胞 L-02 的细胞毒性的影响

MTS03 与 5-Fu 以不同质量浓度联合使用对人正常肝细胞 L-02 生长的影响见表 4.

由表 4 可以看出,两者合用后,在低剂量范围

内,即 MTS03 质量浓度小于 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5-Fu 的质量浓度小于 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,无论两者单独使用还是合用作用 72 h 均无细胞毒性,而较高的剂量作用长时间对正常肝细胞有一定的毒性.从表 2~4 的结果可以看出,在 MTS03 质量浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5-Fu 的质量浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,分别作用 48,72 h 对 L-02 无细胞毒性,对 Bel-7402 的抑制率高达

18.74%和 40.42%,在低于此浓度下,两者的合用对 L-02 均无毒性,而与空白对照比较均有显著差异.

2.4 MTS03 与 5-Fu 联用后对 Bel-7402 细胞作用的 q 值

根据 MTS03 与 5-Fu 联用对 Bel-7402 细胞的生长抑制率,计算 q 值结果见表 5.

表 3 MTS03 与 5-Fu 联用对 Bel-7402 细胞增殖的影响

Tab. 3 Inhibitory effect of 5-Fu combined with MTS03 on the proliferation in Bel-7402 cells

质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)			时间/h					
			24		48		72	
			OD ₅₇₀ $\pm s$	抑制率/%	OD ₅₇₀ $\pm s$	抑制率/%	OD ₅₇₀ $\pm s$	抑制率/%
对照			1.125 $\pm$ 0.038		0.579 $\pm$ 0.024		0.496 $\pm$ 0.015	
MTS03	1.25	0.25	1.054 $\pm$ 0.051	6.32	0.508 $\pm$ 0.016	12.26	0.346 $\pm$ 0.041 *	30.29
		0.5	1.035 $\pm$ 0.058	7.98	0.502 $\pm$ 0.026	13.26	0.293 $\pm$ 0.022 *	34.58
		0.75	0.969 $\pm$ 0.068	13.86	0.468 $\pm$ 0.019	19.13	0.278 $\pm$ 0.022 **	43.90
	2.5	0.25	1.037 $\pm$ 0.044	7.86	0.502 $\pm$ 0.026	13.30	0.347 $\pm$ 0.019 *	29.99
		0.5	1.018 $\pm$ 0.056	9.53	0.471 $\pm$ 0.022	18.74	0.296 $\pm$ 0.047 **	40.42
		0.75	0.950 $\pm$ 0.036	15.55	0.444 $\pm$ 0.039 *	23.40	0.269 $\pm$ 0.025 **	45.77
	5	0.25	0.767 $\pm$ 0.028 *	31.82	0.372 $\pm$ 0.009 *	35.75	0.195 $\pm$ 0.016 **	60.69
		0.5	0.777 $\pm$ 0.072 *	30.89	0.357 $\pm$ 0.012 *	38.34	0.171 $\pm$ 0.018 **	65.63
	+5-Fu	0.75	0.763 $\pm$ 0.065 *	32.16	0.344 $\pm$ 0.008 **	40.62	0.138 $\pm$ 0.009 **	72.18
10		0.25	0.725 $\pm$ 0.036 *	35.53	0.298 $\pm$ 0.010 **	48.50	0.048 $\pm$ 0.014 **	90.32
		0.5	0.686 $\pm$ 0.009 *	39.02	0.291 $\pm$ 0.009 **	49.83	0.047 $\pm$ 0.011 **	90.42
		0.75	0.671 $\pm$ 0.001 **	40.36	0.288 $\pm$ 0.007 **	50.22	0.041 $\pm$ 0.007 **	91.73
20		0.25	0.540 $\pm$ 0.034 **	51.97	/	/	/	/
		0.5	0.541 $\pm$ 0.066 **	51.88	/	/	/	/
		0.75	0.508 $\pm$ 0.075 **	54.84	/	/	/	/

表 4 MTS03 与 5-Fu 联合使用对 L-02 细胞增殖的影响

Tab. 4 Inhibitory effect of 5-Fu combined with MTS03 on the proliferation in L-02 cells

质量浓度/ (μg/mL)				时间/h					
				24		48		72	
				OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%	OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%	OD ₅₇₀ ± s	抑制率/%
对照				0.537±0.036		1.050±0.036		1.175±0.081	
MTS03	1.25	0.25	/	/	1.068±0.028	-1.71	1.258±0.015	-7.18	
		0.50	/	/	1.015±0.011	3.33	1.134±0.016	3.45	
		0.75	/	/	0.889±0.048	15.37	1.012±0.016	13.84	
	2.5	0.25	/	/	1.052±0.038	0	1.401±0.015	-19.34	
		0.50	/	/	0.994±0.035	5.37	1.154±0.028	1.70	
		0.75	/	/	0.848±0.033	19.27	0.838±0.018*	28.67	
	5	0.25	0.601±0.048	-11.92	1.020±0.010	2.86	0.906±0.010*	22.86	
		0.50	0.584±0.042	-8.64	0.926±0.027	11.81	0.717±0.010*	38.93	
	+5-Fu	0.75	0.572±0.061	-6.43	0.808±0.002*	23.10	0.643±0.012**	45.27	
20	0.25	0.550±0.044	-2.42	0.945±0.036	10.03	0.795±0.040*	32.28		
		0.50	0.541±0.041	-0.68	0.904±0.042	13.95	0.646±0.032**	44.95	
		0.75	0.544±0.041	-1.30	0.866±0.059	17.57	0.524±0.020**	55.35	
	0.50	0.509±0.048	5.21	/	/	/	/		
		0.478±0.035	11.03	/	/	/	/		
		0.456±0.064	15.04	/	/	/	/		

由表 5 的 q 值可以看到,在 MTS03 质量浓度小于 $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时合用的 q 值大于 0.85 而小于 1.25,而随着浓度加大, q 值均大于 1.25,具有良好的增效作用.两者合用后的 q 值均大于 0.85,说明两者合用不存在拮抗作用,当 MTS03 质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$,与 5-Fu 合用的 q 值均大于 1.25,具有良好的增效作用.但是从安全的角度考虑,两者的剂量不可太大,但由此可以看出,两者合用具有良好的协同作用,在较低剂量合用时,并不增加对正常细胞的毒副作用,而增加了对肿瘤细胞的杀伤率,达到了单一使用 5-Fu 或 MTS03 在高剂量下才能达到的效果,从而避免了使用高剂量单一

药物所带来的毒副作用,从而有一定的增效减毒作用.

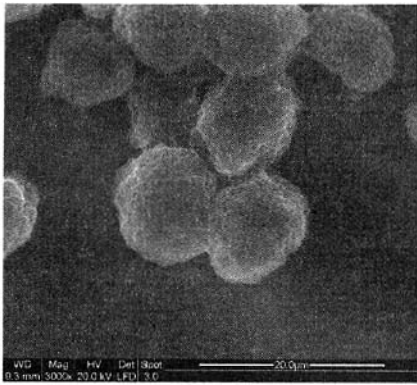
2.5 扫描电镜观察糖蛋白 MTS03 对 Bel-7402 细胞形态的影响

Bel-7402 细胞在扫描电镜下的细胞形态见图 1.从图 1 可以看出,经 MTS03 作用后的 Bel-7402 细胞与空白对照细胞比较,细胞粘度增加,不易分离成单个细胞,细胞膜皱缩外突形成小泡,有的小泡破裂,或脱落形成凋亡小体,凋亡小体的形成与剂量有关,随剂量增高,细胞出现的凋亡小体明显增多.

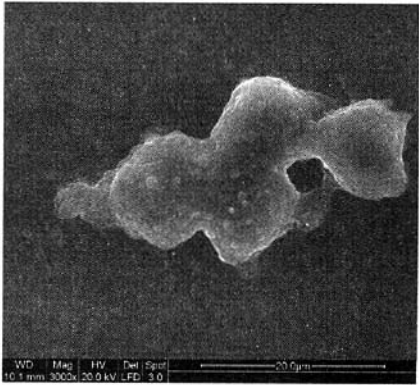
表 5 MTS03 与 5-Fu 联用后对 Bel-7402 细胞作用的 q 值

Tab. 5 The q values of 5-Fu combined with MTS03 on the proliferation in Bel-7402 cells

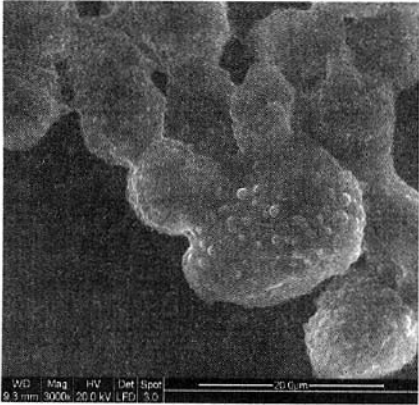
质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	q 值								
	24 h			48 h			72 h		
	5-Fu (0.25)	5-Fu (0.50)	5-Fu (0.75)	5-Fu (0.25)	5-Fu (0.50)	5-Fu (0.75)	5-Fu (0.25)	5-Fu (0.50)	5-Fu (0.75)
	q_1	q_2	q_3	q_1	q_2	q_3	q_1	q_2	q_3
1.25	1.055	1.045	1.068	0.956	0.890	1.238	0.926	0.826	0.875
2.5	1.312	1.247	1.198	0.945	1.155	1.400	0.868	0.930	0.889
5	3.418	2.834	2.004	2.118	2.022	2.091	1.406	1.289	1.247
10	1.361	1.872	1.319	1.655	1.604	1.596	1.260	1.203	1.166



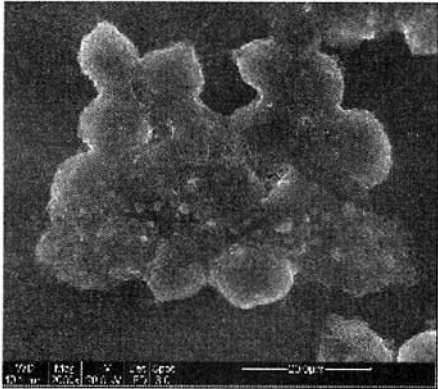
Bel-7402细胞空白对照(3 000倍)



5 $\mu\text{g/mL}$ 作用48 h(3 000倍)



20 $\mu\text{g/mL}$ 作用48 h(3 000倍)



40 $\mu\text{g/mL}$ 作用48 h(3 000倍)

图 1 扫描电镜观察 MTS03 对 Bel-7402 细胞形态的影响

3 结 论

松口蘑是一种珍贵的野生食用菌,采用深层发酵技术获得的菌丝体提取出一种抗肿瘤糖蛋白,经体外的抗肿瘤实验表明,对肝癌细胞有一定的抑制作用,而对正常细胞毒副性较小. 5-Fu 是临床上广泛使用于肿瘤治疗的药物,在细胞内转变为 5-氟尿嘧啶脱氧核苷酸(5F-dUMP)而抑制脱氧胸苷酸合成酶,阻止脱氧尿苷酸(dUMP)甲基化为脱氧胸苷酸(dTMP),从而影响 DNA 的合成,然而其毒副反应也限制了它的大剂量使用,常时间使用也存在抗药和耐药性,因此多采用几种药物联合使用的方案对患者进行治疗. 基于两者的特点,作者研究了 MTS03 与 5-Fu,观察两者单独使用及联用对 Bel-7402 细胞的抑制作用及对正常细胞 L-02 的毒性反应.

实验结果表明,在两者低剂量范围内即 MTS03 小于 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5-Fu 小于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,单独使用或联合使用 72 h 均无细胞毒性,增大剂量会出现一定的毒副作用. MTS03 低剂量单独使用对 Bel-7402 细胞的作用不显著,而与 5-Fu 合用时,对肿瘤细胞的抑制率与空白对照比较具有显著差异,两者合用的 q 值均大于 0.85,说明两者不存在拮抗作用,MTS03 明显增加了 5-Fu 对肝癌细胞的敏感性. 因此可以采用低剂量的两者合用来增加对肿瘤细胞的杀伤率,同时又降低了单独使用高剂量 5-Fu 引起的对正常细胞的毒性,有一定的增效减毒作用.

通过扫描电镜观察 MTS03 作用后的 Bel - 7402 细胞形态,发现有凋亡小体的形成,随剂量加大凋亡小体也增多,初步说明 MTS03 可能引起 Bel - 7402 肿瘤细胞的凋亡.

参考文献:

[1] Akakida Koji, Ikekawa Tetsuro. Process for Producing Emitanin[P]. USP;4177108,1979-03-05.

[2] Kawamura Yukio, Morita Akihiro,Tomatsu Makoto, *et al.* Antitumorigenic protein, method of preparing it and antitumorigenic composition containing the protein as active component[P]. USP; 5302699, 1994-05-08.

[3] Kawamura Yukio, Morita Akihiro, Izumo Koji, *et al.* Antitumor protein and corresponding gene sequence isolated from matsutake mushrooms[P]. USP; 6291648, 2001-06-20.

[4] 万彩霞,许泓瑜,薛峰,等. 松口蘑菌丝体糖蛋白对荷 S180 肉瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19 (12): 1439—1440.

[5] 刘萍,陶文沂,许正宏,等. 松口蘑深层发酵工艺的研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 5—9.

[6] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2003.

[7] 王勇,王宗伟,黄兆胜,等. 芦荟多糖对肿瘤化疗的增效和减毒作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2): 89—91.

[8] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.

(责任编辑:李春丽,朱 明)