

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0137-06

· 论 著 ·

淫羊藿苷体内抑瘤作用及其机制

李翠玲¹, 张 玲¹, 顾洪涛¹, 王 军¹, 毛海婷¹, 杨尚军², 温培娥¹ (1. 山东省医学科学院 基础医学研究所; 2. 山东省医学科学院 药物研究所, 济南 250062)

[摘 要] **目的:** 探讨淫羊藿苷(icariin, ICA)对肝癌细胞 H22 荷瘤小鼠体内抑瘤作用及其机制。**方法:** 肝癌细胞株 H22 右腋皮下接种 C57BL/6 小鼠, 建立小鼠体内荷移植瘤模型。接种 H22 细胞后 24 h, 用高、中、低不同剂量(9.4.5.2.25 mg/ml)的 ICA 和环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy) (30 mg/kg) 进行局部注射治疗, 待荷瘤对照组肿瘤长至 1 g 左右, 各组小鼠称重, 处死。留自凝血, 取血清检测 TNF- α ; 依次取脾脏及肿瘤组织称重; 取 1/2 脾脏和肿瘤组织制成单细胞悬液, 剩余的用 10% 中性甲醛溶液固定, 做病理切片和 H-E 染色以及 TUNEL 实验; 脾单细胞悬液用流式细胞术(FACS)检测 CD3、CD4、CD8、DX5 等抗原分子的表达; 肿瘤单细胞悬液用 AnnexinV/PI 双染检测肿瘤细胞的早期与晚期凋亡情况, 同时取适量的瘤细胞用 70% 乙醇固定以 FACS 检测肿瘤细胞周期各时相的分布情况。**结果:** Cy 治疗组抑瘤率为 67.16%, ICA 高、中、低剂量治疗组抑瘤率分别为 24.63%、32.84%、5.22%。AnnexinV/PI 双染结果表明, Cy 治疗组与 ICA 治疗组早期凋亡细胞率均高于荷瘤对照组[Cy 组为 (9.11 $\pm$ 1.584)%, ICA 组为 (7.14 $\pm$ 1.376)%, 荷瘤对照组为 (3.6 $\pm$ 2.38)%]。TUNEL 结果显示, ICA 治疗组凋亡指数为 (5.35 $\pm$ 0.73)%, 显著高于荷瘤对照组中的凋亡指数[(1.03 $\pm$ 1.17)%] ($P < 0.01$)。正常小鼠血清中未检测到 TNF- α 的存在, 而 ICA 治疗组及 Cy 治疗组中检测到微量 TNF- α 。病理检测表明, ICA 中、高剂量组肿瘤组织中出现较多的灶状及小片状坏死, 包膜处及肿瘤边缘可见瘤细胞坏死, 包膜及肿瘤组织中可见少量的炎细胞(淋巴细胞与单核细胞) 浸润。**结论:** ICA 有显著的抑瘤作用, 可能通过促进实体瘤细胞早期凋亡引起肿瘤组织坏死而起作用。

[关键词] 淫羊藿苷; 抑瘤作用; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R730.5

[文献标志码] A

The *in vivo* anti-tumor effects of Icariin and its mechanisms

LI Cui-ling¹, ZHANG Ling¹, GU Hong-tao¹, WANG Jun¹, MAO Hai-ting¹, YANG Shang-jun², WEN Pei-er¹ (1. Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China; 2. Institute of Pharmaceutics, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vivo* anti-tumor effects of Icariin (ICA) on H22-bearing mice and the related anti-tumor mechanisms. **Methods:** C57BL/6 mice were subcutaneously inoculated with H22 hepatocarcinoma cell line to establish H22-bearing mice model. 24 h after the inoculation, H22-bearing mice were treated with different doses of ICA (9.0 mg/ml, 4.5 mg/ml, and 2.25 mg/ml) and cyclophosphamide (30 mg/kg). When the tumors in H22-bearing mice grew to 1 g, the mice were weighed, sacrificed and their spleens and tumors were harvested. The mice sera were also collected for determination of TNF- α . Half of the spleens and tumors were made into single-cell suspensions and the other half was fixed by 10% formaldehyde solution for pathology analysis and TUNEL detection. Flow cytometry technique was used to detect the expression of surface antigens CD3, CD4, CD8, and DX-5 in the spleen. Annexin- V/PI double staining method was used to analyze the early and late apoptosis of tumor single-cell suspension. 1.0×10^6 cells were used to analyze the cell cycle of the solid tumor cells by flow cytometry. **Results:** The tumor inhibition rate of cyclophosphamide was 67.16% ($P < 0.001$), and those of high-, medium- and low-dose ICA groups were 24.63% ($P < 0.05$), 32.84% ($P < 0.01$) and 5.22%, respectively. Annexin V/PI double staining results indicated that the early apoptosis rate of tumor cells in cyclophosphamide group and medium-dose ICA group were higher than those in H22-bearing group [Cy (9.11 $\pm$ 1.584)%, ICA (7.14 $\pm$ 1.376)%, H22-bearing group (3.6 $\pm$ 2.38)%]. TUNEL result showed that apoptosis index in ICA-medium group was significantly higher than that in H22-bearing group [(5.35 $\pm$ 0.73)% vs (1.03 $\pm$

[基金项目] 国家自然科学基金主任基金资助项目(No. 30540041)

[作者简介] 李翠玲(1969-), 女, 山东烟台人, 硕士, 助理研究员, 主要从事肿瘤免疫与免疫调控研究, E-mail: cuilingli@yahoo.com

[通讯作者] 张 玲, E-mail: zhlhln@tom.com

1.17)% , $P < 0.01$]。No TNF- α was detected in normal control mice and only very low level of TNF- α was found in ICA treatment group and Cy group. Pathology study showed that there were severe necrosis in tumors of medium- and high-dose ICA groups, with the necrosis found in the capsule and the margin of tumors. A small number of inflammatory cells (lymphocytes and monocytes) were observed in the capsule of tumor and tumor tissues. **Conclusion:** ICA can effectively inhibit tumor growth, which is probably through inducing early apoptosis of solid tumor cells and the subsequent tumor tissues necrosis.

[**Key words**] icariin; anti-tumor effect; cell apoptosis; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 137-142]

淫羊藿苷(icariin, ICA)是来源于小檗科淫羊藿属植物的活性成分,其化学结构属黄酮类化合物。以 ICA 为主要成分的制剂在心脑血管系统^[1-2]、骨代谢^[3-7]、免疫系统^[8-10]、神经系统^[11]、性机能及肿瘤治疗^[12-16]等方面具有广泛的药理作用。体外研究^[12-14]表明, ICA 可抑制肿瘤细胞生长与增殖,诱导白血病细胞分化、凋亡;其抑瘤机制包括抑制肿瘤细胞分泌免疫抑制因子 TGF- β 2,并可影响其细胞周期各时相的分布,使 S 期细胞减少, G_0/G_1 期细胞增多等。但 ICA 对实体性肿瘤细胞的抑制作用及其体内抑瘤机制尚待探讨。本课题用肝癌细胞株 H22 接种 C57BL/6 小鼠建立小鼠体内荷移植瘤模型,研究 ICA 的体内抑瘤作用及其机制,为 ICA 的开发应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

C57BL/6 小鼠购自上海斯莱克公司[SCXK (沪)2003-003]。ICA 为淡黄色结晶,本课题组纯化,纯度 96% 以上。CD3-PECY5、CD4-FITC、CD8-PE、DX5-PE 及同型对照 hamster IgG-PECY5、RatIgG2b-FITC、RatIgG2a-PE 购自 e-Biosciences。Annexin V/PI 和 TNF- α 试剂盒均购自晶美生物工程公司。TUNEL 试剂盒购自北京中山试剂公司。Beckman Coulter XL 流式细胞仪、QWIN-V3 图像分析系统、Bio-Rad 550 型酶标仪分别购自美国 Beckman Coulter 和 Bio-rad 公司。

1.2 H22 移植瘤模型的制备及治疗实验

用 10 ml 带生理盐水的注射器抽取腹水 1 ~ 2 ml,混匀,注射 0.2 ~ 0.3 ml 腹水于昆明鼠腹腔内,待腹水长出。抽取荷 H22 腹水鼠腹水数毫升,混匀,计数,调细胞数为 4.0×10^7 /ml,每只 C57BL/6 小鼠右腋皮下接种 0.2 ml。设正常对照组、荷瘤组、环磷酰胺阳性对照组和 ICA 高剂量组(9 mg/ml)、中剂量组(4.5 mg/ml)、低剂量组(2.25 mg/ml),每组 10 ~ 11 只小鼠。接种 H22 腹水瘤 24 h 后,分别

用环磷酰胺(Cy, 30 mg/kg)和不同剂量的 ICA 0.2 ml 瘤内与瘤周注射治疗,每日 1 次,共 12 次。抑瘤率的计算按下列公式进行:抑瘤率(%) = (荷瘤组瘤重 - 治疗组瘤重) / 荷瘤组瘤重 $\times 100\%$

1.3 流式细胞术检测 CD3、CD4、CD8、DX5 表面抗原的表达^[17]

C57BL/6 小鼠处死,解剖脾脏,取 1/2 加 1 ~ 2 ml 红细胞裂解液,在 100 目钢网上研磨成单个核细胞,加含 2% 小牛血清的 PBS, 1 500 r/min 离心 10 min,洗 2 次后计数。每管取 1.0×10^6 细胞,分别加入 CD3-PECY5/CD4-FITC/CD8-PE、DX5-PE、hamster IgG-PECY5/RatIgG2b-FITC/RatIgG2a-PE 抗体,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min,洗 2 次,用不含血清 PBS 重悬细胞流式细胞术检测,结果用 Winmdi2.9 软件分析。

1.4 AnnexinV/PI 检测鼠实体瘤 H22 细胞的早期与晚期凋亡^[18]

处死 C57BL/6 小鼠,解剖出肿瘤组织,制成单细胞悬液后用 PBS 洗 2 次,按试剂盒说明先加 5 μl AnnexinV 和 10 μl PI,再立即加 100 μl Buffer 工作液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 30 min 后再加 buffer 工作液 400 μl ,流式细胞术分析结果。

1.5 鼠肝癌 H22 细胞的细胞周期分析^[17]

鼠肝癌单细胞悬液用 PBS 洗 2 次,70% 乙醇固定,PBS 洗 2 遍,碘化丙啶溶液(含 0.005% PI, 0.1% TritonX-100, 0.1 mmol/L EDTA 和 0.01% RNaseA) 1 ml 重悬,室温避光 30 min,流式细胞术分析。

1.6 DNA 末端原位标记染色法(TUNEL)检测细胞凋亡^[19]

按试剂盒说明书操作。石蜡切片的标本经常规脱蜡脱水处理,冲洗,冰浴 2 min 后进行样品通透,冲洗样品,滴加 TUNEL 反应混和物,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,冲洗样品,滴加转化剂-POD,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,冲洗样品,滴加 DAB 底物溶液,室温孵育 5 ~ 20 min,QWIN-V3 图像分析系统分析,计算凋亡指数:数 6 个高倍镜 $> 1\,000$ 个细胞,计算凋亡细胞和总细

胞数。凋亡指数 = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%

1.7 小鼠血清中 TNF-α 的检测

小鼠自凝血室温放置 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清按试剂盒说明操作, 采用 Microplate Manager 4.0 软件计算各组 TNF-α 含量。

1.8 肿瘤组织的病理学观察

移植瘤组织用 10% 中性甲醛溶液固定, 组织切片, H-E 染色后光镜观察。

1.9 统计学处理

应用统计学软件 SPSS12 对数据进行分析, 检测

结果采用 *t* 和 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 ICA 显著抑制小鼠 H22 移植肿瘤的生长

各组平均瘤重及抑瘤率以及各组小鼠实验前及实验后平均体重见表 1。表中可以看出环磷酰胺治疗组抑瘤率最高, 为 67.16%; ICA 高、中、低剂量组的抑瘤率分别为 24.63%、32.84%、5.22% ($P < 0.05$)。中高剂量的 ICA 有显著的抑瘤作用。ICA 治疗过程对实验组小鼠体重影响不大。

表 1 ICA 的体内抑瘤作用
Tab. 1 The *in vivo* anti-tumor effects of icariin

Groups	n	Body mass(m/g)		Tumor	
		Before therapy	After therapy	Mass(m/g)	Inhibitory rate(%)
Normal control	10	15.1 ± 0.77	16.9 ± 0.57		
H22-bearing tumor	10	15.2 ± 0.54	18.0 ± 1.17	1.3 ± 0.37	
Cy control	10	15.0 ± 0.67	16.7 ± 0.96	0.4 ± 0.10**	67.16
ICA 9.0 mg/ml	9	14.8 ± 0.46	18.0 ± 1.39	1.0 ± 0.40*	24.63
ICA 4.5 mg/ml	10	15.0 ± 0.93	17.4 ± 0.86	0.9 ± 0.21**	32.84
ICA 2.25 mg/ml	10	15.1 ± 0.94	17.1 ± 1.24	1.3 ± 0.58	5.22

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs H22-bearing tumor group

2.2 ICA 诱导 H22 肿瘤细胞的早期凋亡

Annexin V/PI 双染检测肿瘤组织的凋亡情况见图 1, 从中可以看出, ICA 中剂量治疗组及环磷酰胺治疗组的早期凋亡细胞率均高于荷瘤对照组[Cy 组为 (9.11 ± 1.58)%, ICA 组为 (7.14 ± 1.38)%, 荷瘤对照组为 (3.6 ± 2.38)%], 说明 ICA 可通过诱导肿瘤细胞早期凋亡而发挥其抑瘤作用。

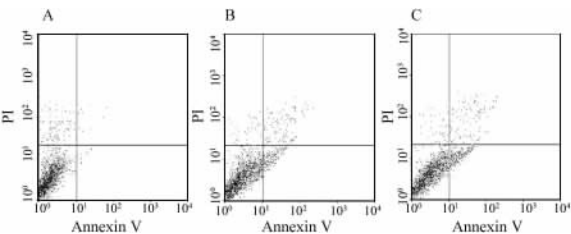


图 1 ICA 对 H22 肿瘤细胞凋亡的影响
Fig1 Effects of ICA on apoptosis of H22 tumor cells
A: H22-bearing control group;
B: ICA medium-dose group;
C: Cyclophosphamide control group

TUNEL 检测结果如图 2 所示, 荷瘤对照组中未发现明显的凋亡细胞, 凋亡指数为 (1.03 ±

1.17)%, 而 ICA 治疗组中则检测到凋亡细胞的存在, 凋亡指数为 (5.35 ± 0.73)%($P < 0.01$)。

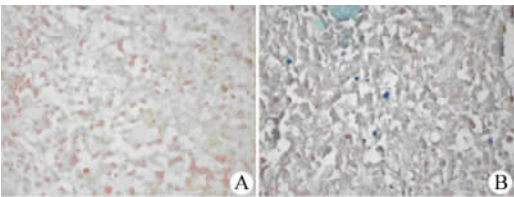


图 2 TUNEL 法检测 ICA 对肿瘤细胞凋亡的影响
Fig.2 Effects of ICA on apoptosis of H22 tumor cells by TUNEL
A: H22-bearing control group (×400);
B: ICA medium-dose group (×400)

2.3 ICA 对实体瘤细胞周期时相分布的影响

流式细胞术检测结果如表 2 所示, ICA 可使实体瘤细胞的 G₁/G₀ 期细胞增多, S 期和 G₂ 期细胞减少, 说明 ICA 可将瘤细胞阻滞于 G₁/G₀ 期。

2.4 ICA 对荷瘤鼠脾细胞抗原分子表达的影响

荷瘤对照组、环磷酰胺对照组、高中低不同剂量 ICA 治疗组脾单细胞悬液, 分别用 CD3-PECY5、CD4-FITC、CD8-PE、DX5-PE 染色后, 流式细胞术检测结果如表 3 所示, 环磷酰胺组 DX5 表达升高, ICA

治疗组中 CD3、CD4、CD8、DX5 的表达与荷瘤对照组的表达无明显差异。另外,ICA 脾组织病理观察表明,脾小体未见增大或缩小。可以认为 ICA 治疗不影响脾细胞中 T 细胞和 NK 细胞的组成及功能。

2.5 ICA 治疗致移植瘤组织的病理改变

病理检测结果如图 4 所示,荷瘤对照瘤细胞生长旺盛;ICA 各剂量组肿瘤组织中均出现灶状及小片状坏死,但低剂量组坏死范围较小,中剂量组肿瘤组织的坏死范围较高剂量组大,坏死灶较高剂量组多;而环磷酰胺对照组组织则出现大片状坏死。另外 ICA 治疗组的包膜及肿瘤组织中还出现少量的炎细胞(淋巴细胞与单核细胞)浸润。

2.6 ICA 对荷瘤小鼠血清 TNF- α 水平的影响

取正常对照组、H22 荷瘤组、环磷酰胺对照组、

ICA 治疗组小鼠血清,用 ELISA 方法检测 TNF- α 的表达水平。结果显示,正常对照组未检测到 TNF- α ,而 ICA 治疗组可检测到微量的 TNF- α [(17.27 $\pm$ 14.12)pg/ml],该水平显著高于荷瘤对照组[(5.57 $\pm$ 7.70)pg/ml]($P < 0.05$)。

表 2 ICA 对实体瘤细胞细胞周期时相分布的影响

Tab.2 Effects of ICA on cell cycle of solid tumor cells

Groups	Cell cycle (%)		
	G ₁ /G ₀	S	G ₂ /M
H22-bearing	56.53 $\pm$ 6.62	38.18 $\pm$ 4.54	5.24 $\pm$ 2.74
Cy control	54.76 $\pm$ 6.41	32.05 $\pm$ 4.43	13.93 $\pm$ 3.48
ICA therapy	63.04 $\pm$ 6.93	31.73 $\pm$ 2.77	2.58 $\pm$ 0.87

表 3 ICA 对荷瘤小鼠脾细胞表面抗原分子表达的影响

Tab.3 Effects of ICA on expression of surface antigens in mice spleen

Groups	CD3	CD4	CD8	DX5	CD4/CD8 ratio
Normal control	33.71 $\pm$ 3.06	15.29 $\pm$ 1.62	17.8 $\pm$ 2.31	4.34 $\pm$ 0.98	0.88 $\pm$ 0.16
H22-bearing	34.23 $\pm$ 3.10	20.25 $\pm$ 2.05	13.41 $\pm$ 1.81	1.62 $\pm$ 0.97	1.53 $\pm$ 0.15
Cy control	24.26 $\pm$ 5.19	13.69 $\pm$ 2.95	9.91 $\pm$ 2.5	9.27 $\pm$ 1.08	1.46 $\pm$ 0.25
ICA therapy	32.52 $\pm$ 5.26	18.66 $\pm$ 2.31	12.27 $\pm$ 2.69	2.55 $\pm$ 0.49	1.58 $\pm$ 0.25

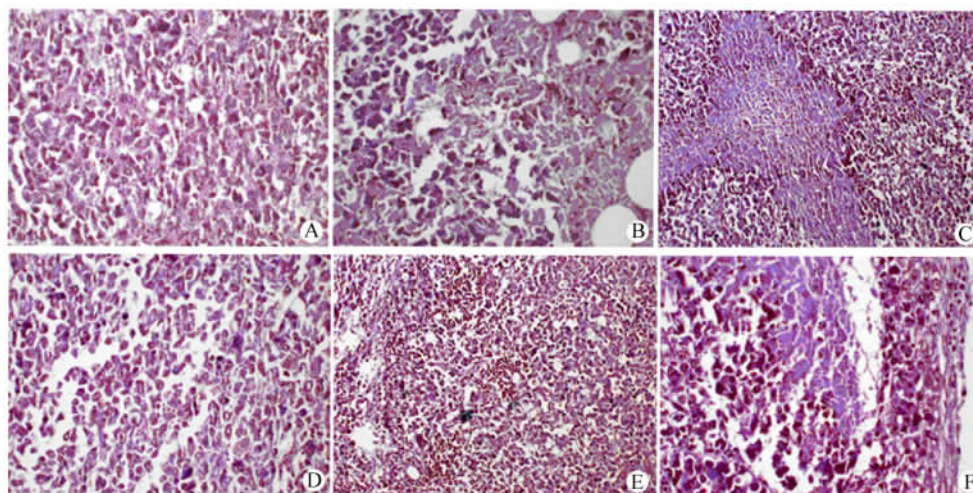


图 3 ICA 作用后肿瘤组织的病理改变

Fig. 4 Pathological changes of tumor tissue after ICA treatment

A: Tumor grew lively in H22-bearing group ($\times 400$); B: Tumor necrosis in cyclophosphamide group($\times 400$); C: Tumor necrosis in medium-dose ICA group ($\times 200$); D: Tumor cell apoptosis in high-dose ICA group ($\times 400$); E: lymphocytes infiltration in medium-dose ICA group($\times 200$); F: Marginal lymphocytes infiltration in medium-dose ICA group($\times 400$)

3 讨 论

体外实验研究表明 ICA 是一种免疫增强剂和肿瘤抑制剂,具有调节免疫功能、诱导白血病细胞分化和凋亡的作用^[8-13]。但是,在肿瘤局部微环境中积累聚集了多种免疫抑制因子,使肿瘤局部成为深度免疫抑制的“黑洞”。因此,体外有抑瘤作用的药物在进入体内后能否克服肿瘤局部的深度免疫抑制、发挥其抑瘤作用尚待探讨。本研究用 H22 肝癌细胞株右腋皮下接种 C57BL/6 小鼠,建立了小鼠荷 H22 移植瘤模型,研究 ICA 对荷瘤小鼠的体内抑瘤作用。结果表明,ICA 在体内可显著地抑制肿瘤生长,抑瘤率达 32.84%;其抑瘤效果还与 ICA 剂量有关,过低的剂量(2.25 mg/ml)基本没有抑瘤效果,中剂量组(4.5 mg/ml)抑瘤效果最好,高剂量组(9.0 mg/ml)也有显著的抑瘤作用。病理检测结果表明,ICA 中剂量组肿瘤组织的坏死灶最多,坏死范围最大,与抑瘤结果相吻合,说明 ICA 在应用时要选择最适的剂量,过高与过低都不利于其抑瘤作用的发挥。ICA 治疗前后小鼠体重无明显变化,说明 ICA 无毒副作用,是一种安全有效的肿瘤抑制剂。

AnnexinV/PI 双染法检测细胞凋亡的原理^[20]是:在凋亡的早期阶段细胞膜发生变化,磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内层转移到细胞膜外层,这样 PS 就暴露在细胞膜外表面。Annexin V 是一种依赖于 Ca^{2+} 的磷脂蛋白,对 PS 有高度的亲和力。这种蛋白可用来作为探测暴露在细胞表面的 PS 的一种敏感的探针,并用来检测凋亡细胞。由于坏死细胞失去了膜的完整性,PS 暴露在细胞表面,AnnexinV 染色出现阳性。结合 PI 染色就可以区分坏死和凋亡,因为凋亡细胞膜完整,PI 染色阴性,而坏死细胞 PI 染色阳性。所以,AnnexinV 和 PI 染色均为阴性的为正常活细胞;AnnexinV 阳性而 PI 阴性的为凋亡细胞(早期凋亡细胞);Annexin V 和 PI 染色均为阳性的为坏死细胞(晚期凋亡细胞)。本研究结果表明,ICA 中剂量治疗组及环磷酰胺治疗组的早期凋亡细胞比例均高于荷瘤对照组。原位细胞死亡检测(TUNEL)方法也在 ICA 治疗组中检测到(5.35 ± 0.73)%的凋亡细胞,这与 AnnexinV/PI 双染结果相吻合。

前期研究表明^[14],ICA 在诱导白血病细胞凋亡的同时,能影响细胞周期各时相的改变,凋亡率增高与 S 期减少和 G_0/G_1 期增多相关。本研究也发现 ICA 治疗组 G_0/G_1 期细胞增多,S 期和 G_2 期细胞减少,说明 ICA 可将瘤细胞阻滞在 G_0/G_1 期。

He 等^[8]发现 ICA 可影响人外周血淋巴细胞的表型,与 ICA 培养 7 d 后,PBMC 中 $\text{CD8}^+ \text{CD4}^+$ T 细胞的比例明显升高,而 $\text{CD4}^+ \text{CD8}^-$ T 细胞的比例明显下降。本研究除了发现环磷酰胺可使荷瘤小鼠 NK 细胞的比例上升外,并未发现 ICA 对荷瘤小鼠脾细胞表面 CD3、CD4、CD8、DX5 的表达有什么影响。产生这一差异的原因可能与本研究所用的体系不同有关。值得一提的是,病理结果提示 ICA 治疗组脾小体未见明显增大或缩小,说明其免疫功能正常,这也与上述 ICA 不影响脾细胞表型相吻合。

He 等^[8]还发现 ICA 可刺激健康人的单核细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 。与此相一致,本研究结果显示,ICA 治疗组小鼠血清中检测到微量 $\text{TNF-}\alpha$ [(17.27 ± 14.12) pg/ml],说明 ICA 可刺激小鼠单核巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$,从而促进肿瘤组织坏死,与 ICA 治疗组肿瘤组织出现坏死相吻合。

总之,ICA 可通过促使肿瘤细胞凋亡导致肿瘤组织坏死,从而有效地抑制肿瘤生长。

[参 考 文 献]

- [1] Zhu DY, Qu LH, Zhang XN, *et al.* Icariin-mediated modulation of cell cycle and P53 during cardiomyocyte differentiation in embryonic stem cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 514(2-3): 99-110.
- [2] Zhu DY, Lou YJ. Icariin-mediated expression of cardiac genes and modulation of nitric oxide signaling pathway during differentiation of mouse embryonic stem cell into cardiomyocytes *in vitro*[J]. *Acta Pharmacologie Sinica*, 2006, 27(3): 311-320.
- [3] Meng FH, Li YB, Xiong ZL, *et al.* Osteoblastic proliferative activity of epimedium brevicornum[J]. *Phy tomedicine*, 2005, 12(3):189-193.
- [4] 雪 原,王 沛,齐青会,等. 淫羊藿苷对成骨细胞 Smad4 mRNA 作用的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2005, 25(2): 119-123.
- [5] 陈 虹,张秀珍. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞分泌细胞因子的影响[J]. *同济医科大学学报:医学版*, 2005, 26(2): 5-7,16.
- [6] 李淑梅,宋利格,张秀珍. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞功能及 Osterix 表达的影响[J]. *同济医科大学学报:医学版*, 2005, 26(6):8-11.
- [7] Chen KM, Ge BF, Ma HP, *et al.* Icariin, a flavonoid from the herb epimedium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells[J]. *Pharmazie*, 2005, 60(12): 939-942.
- [8] He W, Sun H, Yang B, *et al.* Immunoregulatory effects of the herba epimedium glycoside Icariin[J]. *Drug Res*, 1995, 45(8): 910-913.
- [9] Zhao Y, Zhang L, Cui ZY, *et al.* Studies on the immuno modulatory action of Icariin[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 1996, 27(3): 669-672.
- [10] 李晓冰,金东庆,郭良军,等. 淫羊藿苷在辐射小鼠免疫学功能恢复中作用的研究[J]. *中国辐射卫生*, 2002, 11(3):171.

- [11] Pan Y, Kong L, Xia X, *et al.* Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, 82(4): 686-694.
- [12] 李晓燕, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿苷逆转转化生长因子 $\beta 2$ 对 LAK/CD3AK 细胞的免疫抑制作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(5): 266-268.
- [13] 李晓燕, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿苷逆转转化生长因子 $\beta 2$ 免疫抑制作用的抗肿瘤研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(2): 127.
- [14] 李贵新, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿苷诱导白血病细胞凋亡及其对癌基因表达的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2002, 23(6): 322-323.
- [15] 葛林阜, 董政军, 姜国胜, 等. 淫羊藿苷对急性早幼粒白血病细胞端粒酶活性的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002, 9(1): 36-38.
- [16] 张玲, 王芸, 毛海婷, 等. 淫羊藿苷抑制肿瘤细胞端粒酶活性及其调节机制的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(3): 191-194, 196.
- [17] 左连富. 流式细胞术样品制备技术[M]. 北京: 华夏出版社, 1991: 81-98.
- [18] 尹琰, 寿伟璋. 流式细胞术 AnnexinV 细胞凋亡检测方法探讨[J]. *东南大学学报*, 2003, 22(3): 169-170.
- [19] Portera-Cailliau C, Sung C, Nathans J, *et al.* Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 974-978.
- [20] 胡庆抑, 朴英杰, 周美娟. 一种检测早期凋亡细胞的方法[J]. *细胞生物学杂志*, 2000, 22(3): 155-157.
- [收稿日期] 2006-12-11 [修回日期] 2007-01-30
[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

参考文献题名后需标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求, 每条文献的题名后都需标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献, 如为期刊中析出文献, 题名后应标上[J]; 如为专著中析出文献, 题名后应标上[M]。对电子文献, 如为网络期刊析出文献, 题名后需标上[J/OL]; 如为网络专著中析出文献, 题名后需标上[M/OL]。

现把常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学位论文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符, 它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法, 切不可混淆使用。现根据有关标准和规则, 把生物医学文稿中需要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体, 例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体), 例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体, 例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。(4) 各种统计学符号应斜体, 例如样本数 *n*、均数 $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(pH 用正体除外), 例如长度 *L*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体, 例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体, 例如 *et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)