

· 论著 ·

夏枯草消瘤合剂对 Lewis 肺癌小鼠的药效作用

马明华¹, 汪晓河², 戴媛媛², 顾小燕², 吴铁军², 年 华²(1. 上海市杨浦区中心医院药剂科, 上海 200090; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科, 上海 200437)

[摘要] 目的 探讨夏枯草消瘤合剂对 Lewis 肺癌小鼠的治疗作用。方法 采用 C₅₇BL/6 小鼠 Lewis 肺癌移植瘤模型, 将 30 只小鼠随机分为 3 组: 模型对照组、夏枯草消瘤合剂组 (M 组)、顺铂组 (DDP 组), 连续用药 14 d。通过对 Lewis 肺癌小鼠的大体观察, 测定肿瘤大小, HE 染色方法测定肿瘤病理组织学变化, 免疫组化方法测定肿瘤组织的细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 和 P16 的表达情况。结果 模型对照组瘤体质量最重, 与其他组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); M 组可在一定程度上改善小鼠的生存状态及生活质量; 各组小鼠的肿瘤生长曲线及 HE 染色结果显示: M 组可抑制肿瘤细胞的生长, 且对正常细胞有保护作用; M 组、DDP 组均可显著降低 CyclinD1 阳性表达 ($P < 0.01$), 但是 M 组对于提高 P16 阳性表达的效果不显著。结论 夏枯草消瘤合剂具有较好的抑制肺癌生长的作用。

[关键词] 中医药; 夏枯草消瘤合剂; Lewis 肺癌; CyclinD1; P16

[中图分类号] R285.5; R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)01-0057-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201812070

Therapeutic effect of Xiakucao Xiaoliu mixture on Lewis lung cancer mice

MA Minghua¹, WANG Xiaohu², DAI Yuanyuan², GU Xiaoyan², WU Tiejun², NIAN Hua²(1. Pharmaceutical Center of Yangpu District Central Hospital, Shanghai 200090, China; 2. Pharmaceutical Center of Yueyang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect of Xiakucao Xiaoliu mixture on Lewis lung cancer mice. **Methods** 30 mice with C₅₇BL/6 mouse Lewis lung cancer xenograft model were randomly divided into three groups: model control group, Xiakucao Xiaoliu mixture group (M group), cisplatin group (DDP group). M group and DDP group were administered continuously for 14 days. Through the general observation of Lewis lung cancer mice, tumor size was determined, HE staining method was used to determine the histopathological changes of tumors, and the expression of CyclinD1 and P16 in tumor tissues was determined by immunohistochemistry. **Results** The tumor weight of the model control group was the heaviest, and the difference was statistically significant compared with other groups. ($P < 0.05$). Survival state and quality of life of mice had been improved to some extent in M group. The results of tumor growth curve and HE staining in each group of mice showed that the growth of tumor cells had been inhibited and normal cells had been protected. The positive expression of CyclinD1 was significantly decreased in M group and DDP group ($P < 0.01$), but the effect of M group on the improvement of P16 positive expression was not significant. **Conclusion** Xiakucao Xiaoliu mixture had a good effect on inhibiting lung tumor growth.

[Key words] Chinese Medicine; Xiakucao Xiaoliu mixture; Lewis lung cancer; CyclinD1; P16

肺癌的发病率居于我国恶性肿瘤之首且正处于不断上升的趋势, 其中 70%~80% 为非小细胞肺癌 (NSCLC), 严重威胁人类的生命健康。由于肺癌的临床症状不明显, 半数以上的患者就诊时已属于

中、晚期, 局限于各种环境、身体等因素, 治疗手段以化疗为主, 但 5 年存活率和生活质量均达不到期望的效果^[1]。大量实验及临床研究证实, 中医药在治疗和改善 NSCLC 患者的临床症状、机体免疫功能、患者生存质量及减少西药和化疗所产生的毒副作用等方面有一定程度的优势^[2-4]。夏枯草消瘤合剂由中药夏枯草、牡蛎、生地黄等中药组成, 是中医肿瘤学专家钱伯文教授的经验方。体外细胞实验结果表明, 方中所含的主要成分迷迭香酸可显著抑制肺腺癌 A549 细胞的生长, 并且通过诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡来抑制其增殖, 以及抑制肺癌

[基金项目] 上海中医药大学高峰高原学科 2018 年项目 (30304114334); 中药炮制传承基地项目 (30304118220); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (16401902100); 上海中医药大学预算内项目 (18LK047)

[作者简介] 马明华, 硕士研究生, Email: njmmh@126.com

[通讯作者] 年 华, 博士, 副主任药师, 研究方向: 中药临床药学及医院药学, Email: jackynian@126.com

A549 细胞侵袭^[5]。其临床试验研究已证实,该药配合一线化疗方案治疗中、晚期 NSCLC 患者,有助于提高患者的生存质量和减少化疗所产生的毒副作用^[6]。本研究采用 Lewis 肺癌移植瘤模型^[7],从整体动物模型的角度,对中药复方进一步研究。通过小鼠的大体观察、HE 染色、免疫组化等数据综合分析,观察夏枯草消瘤合剂肺癌移植瘤的疗效,以期进一步证实其抑制肺癌的作用机制,为临床用药提供科学的理论依据。

1 材料

1.1 试剂与药物

夏枯草消瘤合剂(生药浓度 3.3 g/ml)委托上海宝龙药业有限公司制备(生产批号:1711001);顺铂[齐鲁制药(海南)有限公司,国字准号:H20023461;批号:EA4A7046A;规格:每支 20 mg,加生理盐水溶解至 0.2 mg/ml,现配现用];兔抗鼠 P16 单克隆抗体(批号:ab51243)和兔抗鼠 CyclinD1 单克隆抗体(批号:ab134175),均购自上海逊希生物科技有限公司。

1.2 实验动物及饲料

SPF 级 4~6 周雄性 C₅₇BL/6 小鼠 30 只(上海斯莱克实验动物有限公司),以动物普通饲料喂食,实验动物许可证号:SCXK(沪)2017-005。实验动物环境及设施符合《中华人民共和国实验动物规范》。

2 方法

2.1 细胞培养

将 Lewis 肺癌细胞在 DMEM (含 10% 胎牛血清)完全培养液中培养,培养箱条件为:37℃、5% CO₂。细胞培养液 2 d 更换一次,胰蛋白酶(0.25%)消化传代。

2.2 Lewis 肺癌移植瘤模型的建立

将对数生长期的 Lewis 肺癌瘤株用生理盐水调成细胞悬液浓度为 1×10⁷ 个/ml,接种于 C₅₇BL/6 小鼠右上肢腋窝皮下,每只 0.2 ml,接种后常规喂食。

2.3 给药方案

接种 3 d 后,按照随机数字法将小鼠随机分为 3 组:模型对照组(control 组)、夏枯草消瘤合剂组(M 组)、顺铂组(DDP 组),每组 10 只。造模 7 d 左右,以小鼠皮下肿瘤最长直径 7 mm 为造模成功。其中模型对照组饮用水灌胃 0.2 ml,每日一次,连续 14 d,同时给予 0.2 ml 生理盐水腹腔注射,每 2 日一次;DDP 组给予顺铂 2 mg/kg,腹腔注射,每 2 日一次^[8],同时饮用水灌胃 0.2 ml,每日一次,连

续 14 d;M 组夏枯草消瘤合剂灌胃 7.8 ml/kg,每日一次,连续 14 d,同时给予 0.2 ml 生理盐水腹腔注射,每 2 日一次。

2.4 标本采集

末次给药后 24 h,麻醉后脱颈处死各鼠,摘取肿瘤组织并称重,置于 10% 中性甲醛液中固定,48 h 内进行常规石蜡包埋。

2.5 HE 染色

①取材、固定、脱水;②包埋、切片;③60℃ 恒温箱中烘烤 1 h;④二甲苯脱蜡 3 次,每次 10 min;⑤水洗 2 次,每次 5 min;⑥Harris 苏木素染色处理 5 min;⑦水洗 5 min;⑧1% 盐酸酒精溶液分化 5 s,自来水洗返蓝 15 min;⑨0.5% 伊红(水溶性)染色 1 min;80% 乙醇 2 min;95% 乙醇 2 次,每次 5 min;100% 乙醇 2 次,每次 5 min;⑩二甲苯透明处理 2 次,每次 5 min,滴加 1~2 滴树胶,加盖玻片封固。

2.6 免疫组化

免疫组化染色使用 Leica Bond Max 全自动免疫组化仪进行染色:将福尔马林固定、石蜡包埋的病理组织块经 3 μm 厚度连续切片;二甲苯脱蜡;梯度酒精水化;将玻片放入全自动免疫组化仪中进行染色,机器设置程序;加热抗原修复 15 min,冷却至室温(每步操作后均需用 PBS 漂洗);3% H₂O₂ 溶液封闭内源性过氧化物酶活性;加一抗兔抗鼠 p16 单克隆抗体(1:150 稀释)、兔抗鼠 CyclinD1 单克隆抗体(1:100 稀释)20 min;Post Primary 10 min;Polymer 10 min;DAB 显色 10 min;苏木素复染;水洗后将玻片取出机器,梯度酒精脱水;二甲苯透明;中性树胶封片。对照组设阳性、阴性和空白对照,用已知阳性表达组织作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为空白对照。阳性表达为细胞核深黄色或棕黄色染色。

2.7 观察指标

2.7.1 大体观察

分组给药时测量小鼠体重和肿瘤大小,给药开始后每 3 d 称一次体重。同时观察并记录给药过程中及给药后小鼠精神、外观、活动、体重的变化及肿瘤生长情况。

2.7.2 Lewis 肺癌移植瘤的重量和抑瘤率

连续给药 14 d 后,于末次给药 24 h 后测量体重,脱颈处死小鼠,手术剥去各组小鼠的肿瘤组织,于电子天平上称重,如果荷瘤模型对照组的平均瘤体重量不足 1 g,则表示肿瘤组织生长不良,数据不可用,需重新试验。

抑瘤率计算公式:抑瘤率(%)=(模型组平均瘤

重—给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

2.7.3 HE染色结果观察

在200倍镜下,观察HE染色后各组肿瘤组织切片的病理情况。

2.7.4 免疫组化法检查肿瘤组织中P16蛋白、CyclinD1蛋白表达情况

显微镜下400倍观察切片,随机选取3个界面,计数阳性细胞数。P16、CyclinD1蛋白检测阳性率=阳性反应癌细胞数/癌细胞总数 $\times 100\%$ 。阳性率 $<10\%$ 为阴性(-),阳性率 $10\% \sim 25\%$ 为弱阳性(+),阳性率 $25\% \sim 75\%$ 为中度阳性(++),阳性率 $>75\%$ 为强阳性(+++)。

2.7.5 统计学方法

采用SPSS21.0对结果进行统计分析,数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。多组间计量资料采用单因素方差分析LSD检验,单向有序资料用Ridit检验。以 $P < 0.05$ 为显著性差异标准。

3 结果

3.1 大体观察

实验期间,各组小鼠的肿瘤呈现不同程度的生长趋势,其中,模型对照组小鼠肿瘤生长最快,M组肿瘤生长稍缓,DDP组小鼠肿瘤生长最慢(图1)。模型对照组小鼠体重呈现上升的趋势,在第13天后,体重开始下降;M组小鼠的体重先下降后呈现上升趋势;DDP组小鼠体重在首次给药后呈现下降趋势(图2)。给药14d后,模型对照组小鼠活动

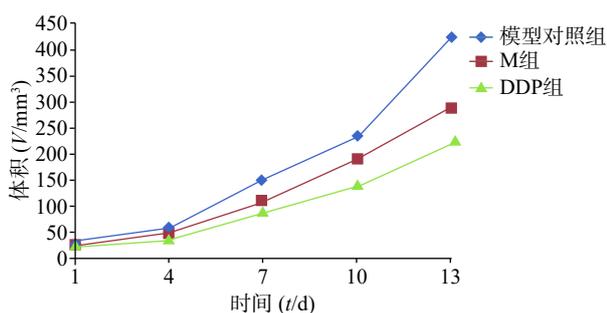


图1 3组荷瘤小鼠肿瘤生长曲线

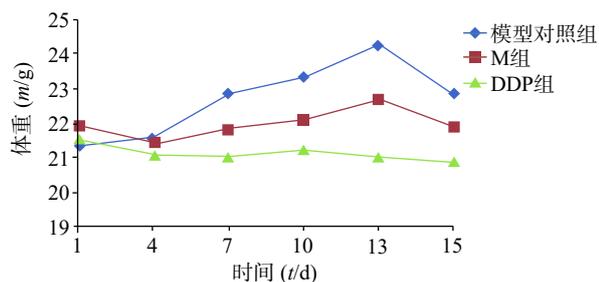


图2 3组荷瘤小鼠体重变化

减少,摄食、饮水大幅减少,精神萎靡,无力,且毛色暗淡无光泽。M组小鼠行动正常,反应敏捷,摄食、饮水正常,毛色光泽浓密。DDP组小鼠给药顺铂期间摄食、饮水极度减少,疲乏无力,精神萎靡,行动极少,毛色无光泽且稀疏,给药期间死亡1只。

3.2 Lewie肺癌移植瘤的重量和抑瘤率

M组和DDP组的瘤重均显著低于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),抑瘤率分别为24.85%、25.69%,与模型对照组比较无统计学差异。结果见表1、图3。

表1 夏枯草消瘤合剂对小鼠体内肿瘤抑制作用($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	平均瘤重(m/g)	抑瘤率(%)
模型对照组	1.09 \pm 0.37	—
M组	0.83 \pm 0.20*	24.85
DDP组	0.81 \pm 0.20**	25.69

注:“—”表示未获得;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与模型对照组比较

3.3 HE染色

3组肿瘤组织HE染色结果显示,模型对照组肿瘤组织细胞轮廓清晰,呈现片状或巢状分布,细胞生长旺盛,无坏死出现,且核大深染;而给药组肿瘤组织细胞均出现不同程度的退变、坏死,M组可见基质和间质减少,肿瘤组织细胞核固缩、出现小片状坏死;DDP组肿瘤组织内有细胞核固缩,大片细胞崩解的碎片及坏死。同时,M组和DDP组间质中血管成分均明显减少,结果见图4。

3.4 免疫组化

M组阳性表达有8只,阳性率为80%(8/10);DDP组阳性表达有8只,阳性率为88.89%(8/9)。经Ridit检验,各给药组阳性表达情况和模型对照组相比差异不显著,结果见表2、图5。

模型对照组肿瘤组织的CyclinD1阳性表达有9只,阳性率达到90%(9/10);M组阳性表达有6只,阳性率为60%(6/10);DDP组阳性表达有3只,阳性率为33.33%(3/9)。经Ridit检验,M组、DDP组的CyclinD1阳性表达情况和模型对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),结果见表3、图6。

4 讨论

在临床上,早期的手术治疗和晚期的化疗始终是肺癌最主要的治疗手段。但化疗在杀伤癌细胞的同时也杀伤大量的正常细胞,损伤人体正气,引

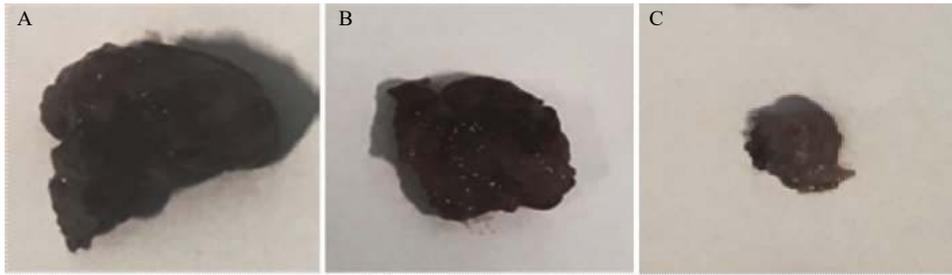


图3 3组荷瘤小鼠的肿瘤组织比较

A.模型对照组; B.M组; C.DDP组

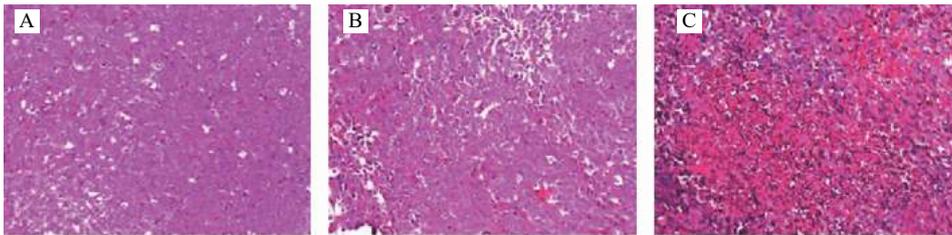


图4 3组荷瘤小鼠肿瘤组织 HE 染色(×200)

A.模型对照组; B.M组; C.DDP组

表2 3组 P16 蛋白的表达情况 (n=10)

组别	阴性	弱阳性	中度阳性	强阳性	合计(只)	阳性率(%)
模型对照组	4	2	3	1	10	60
M组	2	2	5	1	10	80
DDP组	1	0	6	2	9	88.89
合计	7	4	14	4	29	—

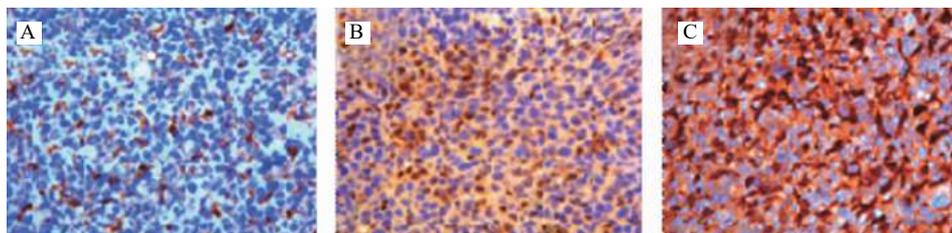


图5 3组荷瘤小鼠肿瘤组织 P16 蛋白的表达(×400)

A.模型对照组; B.M组; C.DDP组

表3 各组 CyclinD1 蛋白的表达情况 (n=10)

组别	阴性	弱阳性	中度阳性	强阳性	合计(只)	阳性率(%)
模型对照组	1	1	3	5	10	90
M组	4	4	2	0	10	60*
DDP组	6	1	2	0	9	33.33*
合计	11	6	7	5	29	—

注：“—”表示未获得；*P<0.05，与模型对照组比较

起内环境失衡，且其不良反应明显。传统中医理论十分重视气血的疏通，所谓“气血畅通，百病不侵”。气助血行，气滞则血瘀，血瘀则导致气滞，形成正气亏损和阴阳失调。肺癌的病因主要有外感

六邪、七情内伤、饮食劳倦等，其发病根本在于正气虚弱、脏腑功能失调。肺癌患者在正气虚损的基础上，外感六淫邪毒，趁虚入肺，导致脏腑功能失调，肺气雍滞，宣降失司，气机不利，血行受阻，精液

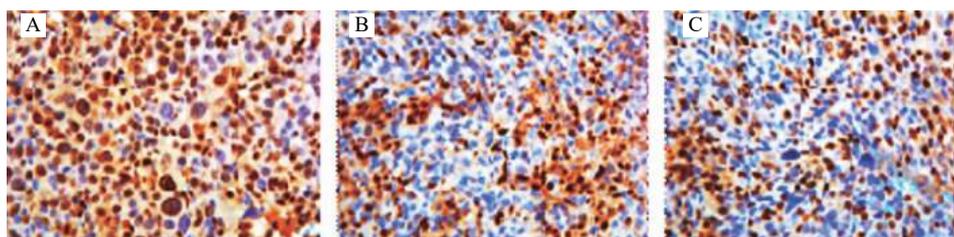


图6 3组荷瘤小鼠肿瘤组织 CyclinD1 蛋白的表达($\times 400$)

A.模型对照组;B.M组;C.DDP组

不布,聚而成痰,痰凝气滞,痰阻脉络,毒、痰、痰胶结。治疗上则以“扶正培本,解毒散结,化痰祛湿,活血化瘀”为主。夏枯草消瘤合剂是中医肿瘤学专家钱伯文教授的经验方,具有化痰软坚,活血化瘀,补养气血的功效。该方由中药夏枯草、牡蛎、生地黄、莪术、苍术、白术等组成。方中夏枯草味苦、辛,性寒,破癥散结,可明显抑制肿瘤细胞增生并可诱导肿瘤细胞凋亡;莪术味苦、辛,性温,消瘀消肿;白术味甘,性温,理胃益脾;牡蛎味咸、平,性微寒,化痰软坚、清热除湿;生地黄味甘,性寒,除寒热积聚;苍术味苦,性温,善治冷气癥瘕^[9-10]。

肿瘤是一种细胞周期性疾病,细胞周期的调控失控是恶性肿瘤的本质,导致细胞呈无限制的自主增殖、分裂。在细胞周期调控中,GS期之间调控点是细胞内外信号传递,整合汇集到细胞核对细胞的增殖进行调控的关键点。该点调控的异常与肿瘤的发生发展关系密切,其长短主要取决于G1期的时间长短,故而在整个细胞周期网络中G1/S期该限制点尤为重要^[11-12]。研究表明,肿瘤被认为是一种细胞周期性疾病,多种肿瘤的发生发展与细胞周期的失调均有着密切的关系^[13]。细胞周期蛋白(Cyclin)在细胞周期中起着关键的调控作用,其中,CyclinD已证实与卵巢癌、食管癌、结肠癌等多种肿瘤的发生发展及预后有一定的关系,是启动细胞周期网络中G1/S期转换的重要调控因子^[14-17]。目前研究最多的是CyclinD1,是重要的细胞周期调节蛋白,与其依赖性激酶CDK特异性结合能促进细胞从G期到S期的转换,从而使细胞增值失控而导致肿瘤的发生,具有原始的致癌特性。相关研究表明,CyclinD1在NSCLC中的阳性表达率高达54.3%~76.0%,与肿瘤的分化程度、淋巴结转移、临床分期均有关,提示CyclinD1作为一个原癌基因产物,在NSCLC的发生发展中发挥了重要作用^[18-19]。P16蛋白是周期素依赖性激酶(CDK4)的抑制因子之一,直接参与细胞周期的调控,可以通过抑制细胞周期来抑制细胞增殖与分裂。P16与CyclinD1

竞争与CDK4结合,从而阻止细胞由G1期进入S期,抑制细胞的增殖从而阻止细胞生长。一旦P16的基因发生突变、缺失以及P16基因启动子甲基化等异常改变,关键酶CDK4的功能丧失,使P16蛋白不能得到正常表达。导致细胞不受控制的恶性增殖,加快了肿瘤的发生发展^[20-21]。综上所述,夏枯草消瘤合剂抗NSCLC药效及对肿瘤组织中CyclinD1、P16蛋白表达的影响,是值得研究的重要课题。

本研究结果表明:与DDP组相比,夏枯草消瘤合剂可有效改善小鼠的生活及精神状态。根据3组肿瘤生长及体重变化情况折线图可以看出,M组在给药期间小鼠体重比模型对照组小鼠的体重轻,但比DDP组小鼠的体重重,且肿瘤质量显著低于模型对照组($P<0.05$);M组小鼠肿瘤体积比模型对照组小,但比DDP组大,显示夏枯草消瘤合剂在有效抑制肿瘤生长的情况下可以改善小鼠生活状态。肿瘤组织形态显示:模型对照组肿瘤组织细胞生长旺盛,无坏死出现;夏枯草消瘤合剂组肿瘤组织细胞核固缩、有小片状坏死情况;DDP组肿瘤组织内有细胞核固缩,大片细胞崩解的碎片及坏死;免疫组化结果显示,夏枯草消瘤合剂明显降低CyclinD1蛋白表达,但提高P16蛋白表达的效果不显著,说明夏枯草消瘤合剂可能通过阻止肿瘤细胞进入S期来抑制肺癌细胞的生长。本实验只是阶段性总结,对于夏枯草消瘤合剂抑制肿瘤生长的作用机制有待进一步研究。

综上所述,P16蛋白和CyclinD1蛋白在NSCLC中的研究有着广阔的前景,其不仅是在肺癌发生发展中起到重要作用,对于预后也有一定的评估意义。随着科学知识及分子生物学研究水平的不断发展,相信P16、CyclinD1基因会成为NSCLC进行基因治疗的靶基因。

【参考文献】

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

- [2] 赵东杰. 中西医结合疗法对老年晚期非小细胞肺癌临床疗效的影响[J]. 中外医疗, 2017, 36(9): 167-169.
- [3] 王丽丽, 石磊, 钱祥, 等. 化疗联合清肺合剂改善非小细胞肺癌患者免疫功能的临床研究[J]. 中华全科医学, 2017, 15(7): 1166-1168.
- [4] 尚兴平, 齐敏. 益气养阴法联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的疗效观察[J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(21): 203-205.
- [5] 柯军. 迷迭香酸抑制肺癌A549细胞的增殖及侵袭的实验研究[J]. 甘肃医药, 2015, 34(4): 255-258.
- [6] 贺天临, 谢国群, 陈洁, 等. 夏枯草消瘤合剂联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌30例[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(5): 29-32.
- [7] 马雪曼, 于明薇, 张甘霖, 等. 小鼠Lewis肺癌不同部位皮下移植瘤模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 386-390.
- [8] 靳福鹏, 张梅, 李平, 等. 益气养阴解毒方对小鼠Lewis肺癌生长抑制作用的实验研究[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(1): 72-74.
- [9] 钱超尘, 温长路, 赵怀舟, 等(校). 金陵本《本草纲目》新校正[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.
- [10] 严东, 谢文剑, 李春, 等. 夏枯草化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 49-54.
- [11] 张朝晖, 徐正顺, 焦龙华, 等. CyclinD1, P16, Rb蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(14): 1271-1274.
- [12] 王前, 邓晶, 蒋永新. CyclinD1的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(2): 350-353.
- [13] CHOI Y J, LI X Y, HYDBRING P, et al. The requirement for Cyclin D function in tumor maintenance[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(4): 438-451.
- [14] MASAMHA C P, BENBROOK D M. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of Cyclin E2 in ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(16): 6565-6572.
- [15] OGINO S, NOSHO K, IRAHARA N, et al. A cohort study of Cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(13): 4431-4438.
- [16] ISHIKAWA T, FURIHATA M, OHTSUKI Y, et al. Cyclin D1 overexpression related to retinoblastoma protein expression as a prognostic marker in human oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(1): 92-97.
- [17] LI H Y, XIAO W W, MA J W, et al. Dual high expression of STAT3 and CyclinD1 is associated with poor prognosis after curative resection of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7989-7998.
- [18] 夏靖华, 李维妙, 王雪娇, 等. CyclinD1与CyclinD3在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(8): 615-621.
- [19] 梁瑞韵, 廖增顺, 江山平, 等. CyclinD1和VEGF在非小细胞肺癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 癌症, 2003, 22(1): 86-90.
- [20] 付冉, 王艳林, 黄利鸣. p16表达异常与肿瘤关系的研究进展[J]. 生命的化学, 2017, 37(4): 585-589.
- [21] 冯蓓, 冯艳, 杨小平, 等. P16在肺癌方面的研究进展[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2015, 13(1): 70-73.
- [收稿日期] 2018-12-24 [修回日期] 2019-09-22
[本文编辑] 李睿旻

(上接第46页)

- [11] 任凤鸣, 胡开治, 刘燕琴, 等. 传统中药金钱草ISSR-PCR反应体系的正交优化研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2233-2238.
- [12] 唐辉, 陈宗游, 史艳财, 等. 正交设计优化地枫皮ISSR-PCR反应体系[J]. 中草药, 2013, 44(5): 610-615.
- [13] 张福生, 郭顺星. 金线莲ISSR反应体系的建立与优化[J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
- [14] 穆立蕾, 刘赢男, 冯富娟, 等. 紫椴ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2006, 42(6): 26-31.
- [15] CUI C J, LI Y, LIU Y L, et al. Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers[J]. *C R Biol*, 2017, 340(2): 76-86.
- [16] WU W F, CHEN F X, YEH K, et al. ISSR analysis of genetic diversity and structure of plum varieties cultivated in southern China[J]. *Biology (Basel)*, 2018, 8(1): E2.
- [17] 刘蕤, 杨际双. 菊属11个野生种和12个栽培品种遗传关系的ISSR分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(5): 874-882.
- [收稿日期] 2019-09-12 [修回日期] 2019-10-21
[本文编辑] 李睿旻