

苦参碱、氧化苦参碱联合应用对 ECV304 活性及能量代谢影响

王淑静*, 孙微微, 张家宁, 赵健凯, 任爽, 张文君

哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076

摘要:为探讨苦参碱和氧化苦参碱联合应用对人脐静脉内皮 ECV304 细胞活性及能量代谢影响, 采用排列组合法确定苦参碱和氧化苦参碱联合用药的浓度配比, 生长曲线法检测细胞增殖抑制作用, HE 染色、透射电镜观察细胞形态变化, 试剂盒测定糖代谢中相关酶活力和代谢产物含量。结果显示, 氧化苦参碱 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和苦参碱 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 联合作用效果较好, 联合应用对 ECV304 增殖抑制和形态改变较氧化苦参碱、苦参碱明显增强, 可明显降低有氧化中的琥珀酸脱氢酶活力及 ATP 含量, 对糖酵解的己糖激酶、丙酮酸激酶及乳酸影响较小。研究表明氧化苦参碱、苦参碱联合应用明显干扰 ECV304 细胞氧化磷酸化有关酶活性, 减少 ATP 生成, 抑制 ECV304 细胞增殖, 实现抗肿瘤血管生成的间接抗肿瘤作用。

关键词:苦参碱; 氧化苦参碱; 人脐静脉内皮 ECV304 细胞; 能量代谢; 细胞增殖

中图分类号: R73-35+4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.004

Effect of Matrine and Oxymatrine on Proliferation and Energy Metabolism of ECV304

WANG Shu-jing*, SUN Wei-wei, ZHANG Jia-ning, ZHAO Jian-kai, REN Shuang, ZHANG Wen-jun

College of pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of matrine and oxymatrine combination on the activity and energy metabolism of human umbilical vein endothelial cells (ECV304). The method of permutation and combination was used to determine the best ratio of matrine and oxymatrine concentration. The cell growth curves were used to describe the effect of matrine and oxymatrine combination on cell proliferation. The morphological changes of ECV304 cells were determined by HE staining and transmission electron microscopy. The enzymatic activity and metabolite quantity of the metabolite related enzymes in ECV304 cells was also measured. Results showed that matrine at 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and oxymatrine at 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ combination had a better effect. The proliferation of ECV304 cells was significantly inhibited by the combined usage of matrine and oxymatrine and the cells morphology were also changed significantly as compared with control group and matrine/oxymatrine group. The combination usage of these two drugs did not affect HK activity, PK activity and lactate metabolism in glycolysis, but can significantly reduce SDH activity and ATP level in oxidation process. Combined usage of matrine and oxymatrine had an indirectly antitumor effect in ECV304 cells by inhibiting cell proliferation and tumor angiogenesis.

Key words: matrine; oxymatrine; human umbilical vein endothelium cells; energy metabolism; cell proliferation

苦参碱、氧化苦参碱主要来源于豆科植物苦参或广豆根干燥根、植株、果实, 苦参碱是经乙醇提取的白色粉末, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$, 氧化苦参碱经水提取的透明颗粒结晶, 又名苦参素, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ ^[1]。苦参碱、氧化苦参碱药理作用广泛, 苦参碱可诱导肺癌, 肝癌, 胃癌等多种癌细胞凋亡^[2], 阻滞

肿瘤细胞周期, 抑制肿瘤新生血管形成, 促进宿主抗肿瘤免疫应答反应^[3]。氧化苦参碱具有抗血管生成, 治疗心血管系统疾病, 抑制肿瘤细胞增殖等多种药理作用^[4]。两者都具有抑制肿瘤细胞增殖、促进其凋亡、抗肿瘤血管生成的活性。生物体细胞增殖所需能量大多来源于糖, 葡萄糖在氧供应充足时彻底氧化成 CO_2 和 H_2O , 提供大量能量。在氧供应不足或缺氧情况下无氧分解生成乳酸, 快速提供少量能量。肿瘤细胞快速增殖需要大量血管来提供营养物质, 新生血管的生成需要血管内皮细胞增殖, 降低

收稿日期: 2016-10-17 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金 (2016RQQXJ095); 2016 年哈尔滨商业大学研究团队支持项目 (2016TD009)

* 通信作者 Tel: 86-451-84869572; E-mail: misswsj@163.com

能量供给,将会抑制血管内皮细胞增殖,阻碍血管生成。本实验从细胞活性、能量代谢角度研究苦参碱、氧化苦参碱及联合应用对人脐静脉内皮细胞(ECV304)增殖抑制及能量代谢的影响,探究苦参碱、氧化苦参碱是否通过抑制能量生成而达到抑制肿瘤血管生成的间接的抗肿瘤作用,两者联合具有一定的协同抗肿瘤血管生成作用^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮 ECV304 细胞株由哈尔滨商业大学药学院保存;苦参碱、氧化苦参碱(成都曼斯特生物科技有限公司,纯度 $\geq 99\%$);RPMI 1640 培养液(Invitrogen 公司);己糖激酶(HK)检测试剂盒、丙酮酸激酶(PK)检测试剂盒、琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒、乳酸(LD)检测试剂盒、ATP 含量测试盒(均购自南京建成生物工程研究所);Mco-15AC CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);Model 680 酶标仪(美国 BIO RAD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 排列组合法确定联合用药浓度

将苦参碱和氧化苦参碱用药剂量以 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 1 倍浓度,对两种药的 0、1/2、1、2 倍浓度排列组合进行实验。铺设 96 孔板,每孔加药液 100 μL (联合各药按每种药液 50 μL 加入)。具体操作见 MTT 方法。

1.2.2 生长曲线

将对数生长期的 ECV304 细胞用 0.25% 胰酶消化,制成悬液,调整浓度为 5×10^4 个/mL,24 孔板中分别加 400 μL 细胞悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。弃上清液,对照组各孔加 400 μL 无血清培养基,实验组各孔分别加终浓度 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱药液、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化苦参碱药液 400 μL 、终浓度 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱和终浓度 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化苦参碱联合药液,培养箱培养 24 h。对照组、实验组每天各取三个孔,PBS 漂洗,0.25% 胰酶消化制成细胞悬液,每孔多次计数求平均值,持续计数 6 d。

1.2.3 HE 染色

将对数生长期的 ECV304 细胞用 0.25% 胰酶消化,制成悬液,调整浓度为 5×10^4 个/mL,接种 900 μL 细胞悬液于 6 孔板中消毒的盖玻片上,培养 24

h。对照组每孔加 1000 μL 培养液,实验组各孔分别加终浓度 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化苦参碱、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱和 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化苦参碱联合药液,继续培养 48 h。取出盖玻片进行 HE 染色,显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 电镜观察细胞形态

将对数生长期 ECV304 细胞用 0.25% 胰酶消化,制成悬液,调整浓度为 5×10^4 个/mL,6 孔板中每孔加入 1 mL,静止 10 min,培养 24 h,实验组加终浓度 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化苦参碱、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱和 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化苦参碱联合药液,对照组加 1000 μL 培养基,培养 48 h。PBS 漂洗,胰酶消化,制成细胞悬液,1000 rpm,离心 15 min。弃上清,加戊二醛,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h,包埋、固定、制成薄切片,电镜下观察细胞形态。

1.2.5 BCA 法测定 ECV304 细胞蛋白浓度

将 BCA 蛋白标准溶液按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 分别加到比色皿,稀释液补足到 20 μL ,取 ECV304 细胞匀浆液 20 μL 于比色皿中,分别加 200 μL BCA 工作液 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,562 nm 处测吸光度值,绘制标准曲线,通过标准曲线计算 ECV304 细胞蛋白含量。

1.2.6 能量代谢酶活力测定

采用酶活力检测试剂盒分别对糖酵解的己糖激酶、丙酮酸激酶和糖氧化磷酸化的琥珀酸脱氢酶活力进行测定。用 340 nm 波长,测定吸光度 A_1 与 A_2 值,计算己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)活力,选用 600 nm 波长,测定吸光度 A_1 与 A_2 值,计算琥珀酸脱氢酶(SDH)活力,具体操作方法见说明书。

1.2.7 能量代谢产物含量测定

采用分光光度试剂盒分别对糖酵解的代谢产物-乳酸和糖代谢的终产物-ATP 的含量进行测定。将培养细胞分为空白管、标准管、测定管和对照管,给药后继续培养 48 h,离心,取上清液,530 nm 处测吸光度值,计算乳酸含量;选用 636 nm 波长测定各管吸光度,计算细胞内 ATP 含量,具体方法见说明书。

1.2.8 统计处理

采用 SPSS 20.0 统计分析软件,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用完全随机分组设计的多样本均数比较进行统计学处理,以检验水准 $P <$

0.05 为差异显著标准,具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 氧化苦参碱与苦参碱联合用药浓度测定

根据所选择的苦参碱和氧化苦参碱药物浓度

(如表 1 所示),其中 A 代表氧化苦参碱,1 倍浓度为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$,B 代表苦参碱,1 倍浓度,同为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当联合用药浓度为 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氧化苦参碱和 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱时,ECV304 的存活率较低,为 56.87%,细胞的增殖抑制活性较好。

表 1 苦参碱、氧化苦参碱排列组合联合处理对 ECV304 细胞存活率影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects of matrine and oxymatrine on survival rate of ECV304 cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

药物浓度配比 Drug concentration ratio	存活率(%) = 1-抑制率(%) Survival(%) = 1-inhibition rate(%)
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B (control)	100 \pm 0.00
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	85.24 \pm 0.47
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	76.67 \pm 0.99
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	56.24 \pm 0.54
300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	84.27 \pm 0.18
300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	81.92 \pm 0.22
300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	78.09 \pm 0.63
300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	74.17 \pm 0.92
600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	72.69 \pm 1.43
600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	69.15 \pm 1.27
600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	67.48 \pm 1.42
600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	63.50 \pm 0.86 *
1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	57.96 \pm 1.05 *
1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	60.70 \pm 1.82 *
1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	56.87 \pm 0.96 *
1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A + 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B	53.78 \pm 0.86 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 具有显著性差异; ** $P < 0.01$,具有非常显著性差异。

Note:Compared with control,* $P < 0.05$ indicated significant difference; ** $P < 0.01$,indicated extremely significant difference.

2.2 氧化苦参碱与苦参碱联合用药对 ECV304 细胞增殖抑制作用

生长曲线测定结果显示(如图 1 所示),苦参碱、氧化苦参碱、联合用药对 ECV304 均有增殖抑制作用,在第五天之前,氧化苦参碱较苦参碱的抑制作用强,第 5 d 之后,两者抑制情况几乎相同,而联合

用药组对细胞的增殖抑制作用最强,从第二天起,增殖抑制作用一直强于两者单独应用组。

2.3 HE 染色观察联合用药后 ECV304 细胞形态改变

HE 染色结果显示(如图 2 所示),苦参碱、氧化苦参碱对 ECV304 形态具有影响,细胞核深染,细胞体积变小,氧化苦参碱对 ECV304 作用较强,而联合应用组的作用较前两者更加明显,细胞数量明显减少,大量细胞出现细胞变圆、细胞核深染等形态学变化。

2.4 电镜观察联合用药后 ECV304 细胞凋亡形态变化

电镜观察结果显示(如图 3 所示) ECV304 对照组细胞核中细胞器发达,细胞核明显,细胞形态多呈比较规则的圆形,细胞膜表面的细胞微绒毛比较丰富;苦参碱组和氧化苦参碱可见少量细胞形态变化,不规则,细胞外绒毛减少,多数细胞处早期凋亡状

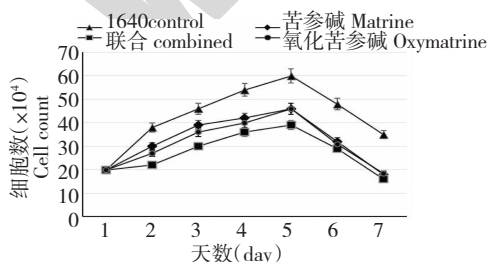


图 1 苦参碱、氧化苦参碱及联合应用对内皮细胞 ECV304 生长曲线折线图

Fig. 1 Growth curve of endothelial cells (ECV304) by matrine, oxymatrine and combined application

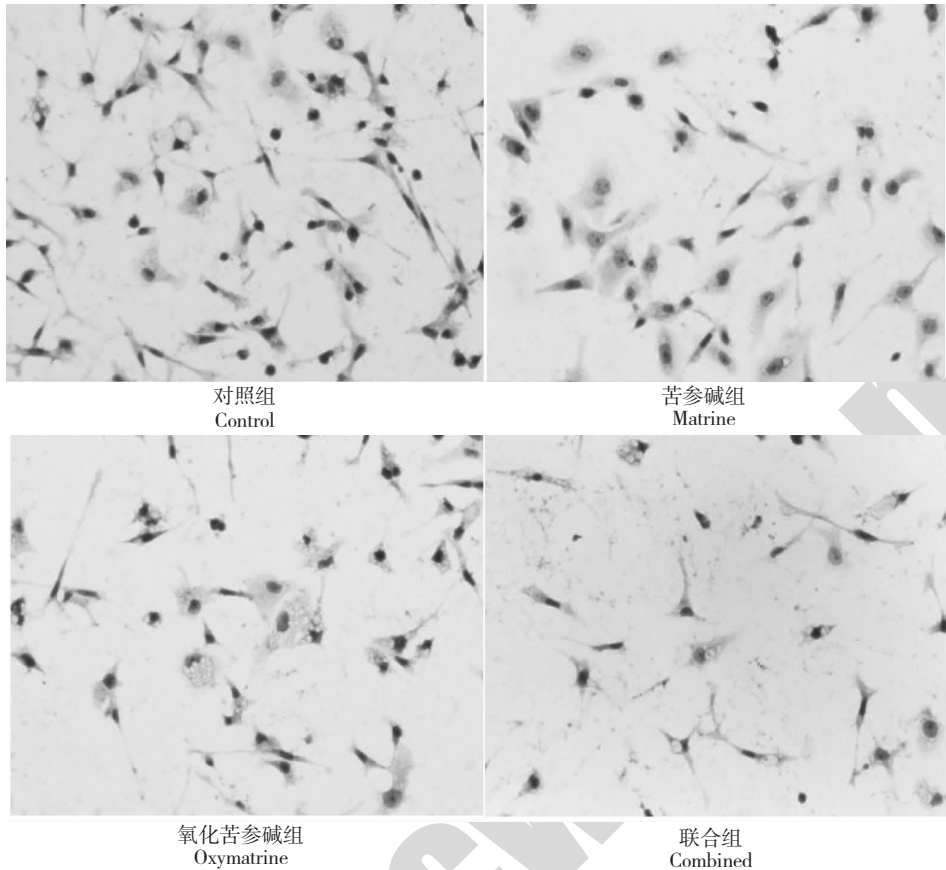


图2 苦参碱、氧化苦参碱及联合应用对内皮细胞 ECV304 细胞形态影响(40 × 10)

Fig. 2 Effects of matrine, oxymatrine and combined application on the cellular morphology of ECV304 cells(40 × 10)

态;联合组观察到的细胞则多数处于中期凋亡状态,个别处于晚期凋亡状态,细胞形态不规则,细胞核轮廓不明显,有凋亡小体生成。

2.5 ECV304 细胞蛋白浓度的测定

通过 BCA 法绘制标准曲线,对照组、苦参碱组、氧化苦参碱组、联合用药组的蛋白浓度分别为 0.052、0.015、0.067、0.067 mg/mL,标准方程 $y = 3.8125x + 0.1569$, $R^2 = 0.9990$ 。

2.6 ECV304 细胞糖代谢酶活力测定结果

己糖激酶(HK)是糖酵解第一个关键酶,使葡萄糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸。丙酮酸激酶(PK)是糖酵解中最后一个关键酶,催化磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸,两者活力下降会降低糖酵解供能,实验结果显示,与对照组相比,苦参碱、氧化苦参碱、联合应用在一定程度上可降低 ECV304 内 HK、PK 活力,但三者之间并无显著性差异。琥珀酸脱氢酶(SDH)是三羧酸循环中唯一存在于线粒体内膜上的酶,催化琥珀酸脱下的氢传递给电子受体 FAD 生

成 $FADH_2$,进入氧化磷酸化产生大量能量 ATP,供细胞生理活动所需。实验结果显示,与对照组比较,氧化苦参碱可引起 ECV304 内 SDH 活力显著降低($P < 0.05$),联合组作用更强($P < 0.01$),而苦参碱组对 SDH 活力有一定的抑制作用。说明氧化苦参碱、联合用药主要干扰糖代谢的氧化磷酸化过程,对糖酵解影响较小。

2.7 ECV304 细胞糖代谢产物含量测定结果

乳酸(LD)作为 ECV304 糖酵解过程最终代谢产物,其含量是检测糖酵解水平的重要依据,实验结果显示,与对照组相比,苦参碱、氧化苦参碱、联合应用对 ECV304 内 LD 含量虽有所下降,但无显著性差异。ATP 可通过糖酵解和糖氧化磷酸化产生,以氧化磷酸化产能为主,其含量高低可反映细胞内能量代谢情况。实验结果显示,与对照组相比,苦参碱组、氧化苦参碱、联合用药组都可引起细胞内 ATP 含量降低。苦参碱和联合用药作用明显,具有显著性差异($P < 0.05$)。

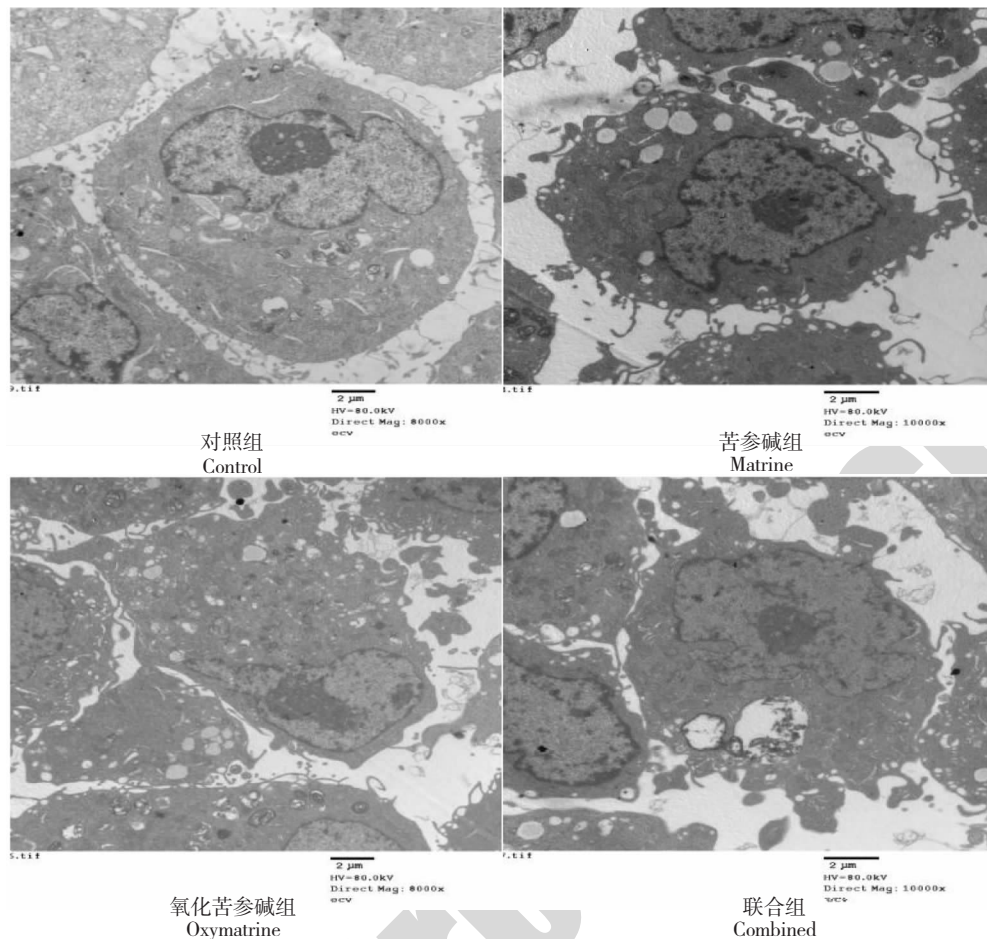


图 3 苦参碱、氧化苦参碱及联合应用对内皮细胞 ECV304 透射电镜

Fig. 3 Transmission electron microscopy of endothelial cells (ECV304) by matrine, oxymatrine and combined application

表 2 苦参碱、氧化苦参碱及联合应用对内皮细胞 ECV304 酶活力影响

Table 2 Effects of matrine, oxymatrine and combined application on enzyme activity of ECV304 cells

	对照组 Control	苦参碱组 Matrine	氧化苦参碱组 Oxymatrine	联合组 Combination
己糖激酶活力 HK activity (U/mgprot)	5.659 ± 0.021	4.955 ± 0.019	5.326 ± 0.100	5.214 ± 0.018
丙酮酸激酶活力 PK activity (U/mgprot)	0.418 ± 0.015	0.382 ± 0.018	0.365 ± 0.012	0.355 ± 0.015
琥珀酸脱氢酶活力 SDH activity (U/gprot)	0.218 ± 0.017	0.205 ± 0.011	0.169 ± 0.010 *	0.134 ± 0.013 * *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 具有显著性差异; * * $P < 0.01$, 具有非常显著性差异。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$ indicated significant difference; * * $P < 0.01$, indicated extremely significant difference.

表 3 苦参碱、氧化苦参碱及联合应用对 ECV304 细胞乳酸和 ATP 含量测定

Table 3 Determination of the content of lactic acid and ATP in ECV304 cells by matrine, oxymatrine and combined application

	对照组 Control	苦参碱组 Matrine	氧化苦参碱组 Oxymatrine	联合组 Combination
培养液中 LD 含量 Lactic acid in culture solution (mmol/L)	6.918 ± 0.426	6.030 ± 0.140	5.957 ± 0.196	6.942 ± 0.275
ATP 含量 ATP content (μmol/mgprot)	45.330 ± 0.793	35.694 ± 0.711 *	41.083 ± 0.934	33.049 ± 0.615 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 具有显著性差异; * * $P < 0.01$, 具有非常显著性差异。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$ indicated significant difference; * * $P < 0.01$, indicated extremely significant difference.

3 讨论

苦参碱、氧化苦参碱具有多方面药理活性,两者都具有一定的抗肿瘤和抗肿瘤血管生成活性^[6-7]。在目前很多抗肿瘤中药复方中都同时存在氧化苦参碱和苦参碱两种成分,两者在进行抗肿瘤活性研究中可能存在一定的协同作用^[8]。肿瘤的生长需要生成血管来提供氧和营养物质,肿瘤血管生成需内皮细胞大量增殖,抑制内皮细胞能量生成将会抑制肿瘤血管生成达到间接抗肿瘤作用^[9-10]。细胞增殖、转移、凋亡等生理活动与能量生成密切相关,肿瘤细胞具有特殊的能量供给方式“有氧糖酵解”,即使在有氧的情况下也要靠糖酵解快速提供能量,而肿瘤血管的生成需要血管内皮细胞的快速增殖、迁移,也需要大量能量,苦参碱和氧化苦参碱可能减少血管内皮细胞能量来抑制肿瘤血管生成。本文从细胞活性、能量代谢角度,通过苦参碱、氧化苦参碱及联合应用对 ECV304 细胞增殖抑制和细胞形态变化,糖酵解和氧化磷酸化酶活力影响以及乳酸、ATP 的生成来找到血管内皮细胞与肿瘤细胞能量代谢的不同,揭示苦参碱、氧化苦参碱、联合应用抗肿瘤血管生成的作用机制,为苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用研究提供新的思路。

生长曲线法可以得出苦参碱、氧化苦参碱、联合应用对人脐静脉内皮细胞 ECV304 均具有增殖抑制作用,前两者对 ECV304 细胞的增殖抑制作用无明显差别,而联合应用组的增殖抑制作用较单独用药增强。HE 染色、透射电镜观察结果显示,与对照组相比,三种给药组细胞出现形态变小、细胞数量减少、出现凋亡小体等形态学变化,氧化苦参碱的作用略强于苦参碱组,联合用药组的作用最强。

本实验采用 BCA 法绘制标准曲线求蛋白浓度,根据蛋白浓度、试剂盒公式对 ECV304 内糖酵解、氧化磷酸化相关酶活性和代谢产物含量进行测定,来阐明苦参碱、氧化苦参碱、联合应用对 ECV304 能量代谢的影响。细胞快速增殖需要通过糖酵解、氧化磷酸化产生能量,ATP 是细胞能量贮存和利用中心,可直接提供细胞各种生命活动所需要的能量,反映能量代谢的水平。己糖激酶、丙酮酸激酶是糖酵解的关键酶,乳酸是糖酵解的最终代谢产物,糖酵解是细胞在无氧或缺氧条件下供能的重要方式。琥珀酸脱氢酶活力反映细胞内氧化磷酸化产能情况。实验结果表明苦参碱、氧化苦参碱、联合应用对 ECV304 内己糖激酶活力、丙酮酸激酶活力、细胞内乳酸含量无明显影响。联合用药可引起琥珀酸脱氢酶的活力

明显下降,细胞内 ATP 含量明显降低,说明联合应用组对 ECV304 较强的增殖抑制作用主要通过抑制氧化磷酸化产能过程而实现的,对糖酵解的影响较小。

综上所述,苦参碱、氧化苦参碱及联合应用可引起 ECV304 增殖抑制及形态学改变,但联合应用较单独应用明显增强,两者联合具有协同作用,其作用主要是通过抑制氧化磷酸化酶的活性,降低细胞内 ATP 含量,抑制内皮细胞增殖,阻碍肿瘤血管生成而达到抗肿瘤作用。

参考文献

- Mu JJ(穆甲骏), Wang WG(王卫国), Hou QC(侯启昌). Research status and prospect of physiological active substances in Radix. *J Henan Normal Univ, Nat Sci* (河南师范大学学报, 自科版), 2014, 42: 785-792.
- Yang SW(杨少武), Li LX(李玲霞). Advances in research on the preparation of matrine in China. *Practical Pharm Clin Remedies* (实用药物与临床), 2012, 15: 52-53.
- Chen XX(陈晓峡), Xiang XQ(向小庆), Ye H(叶红). Progress of research and application in tumors of matrine and oxymatrine. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 361-364.
- Yao ZH(姚志华), Yuan YD(苑亚东), Gou HQ(郭宏强), et al. Study on the antiangiogenic effect of oxymatrine *in vivo* and *in vitro*. *J Med Postgra* (医学研究生学报), 2014, 27: 469-472.
- Wang YN(王怡楠). The anti-tumor activity of the combination of matrine and oxymatrine to human hepatoma HepG2 cells and the impact to energy metabolism. Harbin: Harbin University of Commerce. (哈尔滨商业大学), MSc. 2015.
- Shi L(石磊), Shi LJ(史丽娟). Traditional Chinese medicine monomer-New progress in research on the pharmacological effects of oxymatrine. *Shanxi Med J* (山西医药杂志), 2015, 44: 123-126.
- Xue SM(薛士梅). Research progress in pharmacological research, clinical application and detection methods of matrine. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2014, 26: 70-73.
- Bao JL(鲍娇琳), Lu JJ(陆金键), Chen XP(陈修平), et al. Research progress in the anti-tumor effects and mechanisms of matrine and oxymatrine. *Tradit Chin Med Clin Pharm* (中药新药与临床药理), 2012, 23: 369-373.
- Hu MM(胡明明), Hu Y(胡瑛), Li BL(李宝兰). Research progress of clinical translation on signal pathway and relevant drugs in tumor angiogenesis. *Chin J Cancer Biother* (中国肿瘤生物治疗杂志), 2014, 21: 86-94.
- Liu YJ(刘益均), Zheng J(郑军), Xiao WB(肖文波), et al. Influence of oxymatrine on cell proliferation and VEGF expression in human gastric cancer cell line SGC-7901. *China Oncol* (中国肺癌杂志), 2010, 20: 22.