



杨佳琪, 檀军, 曹米兰, 等. CCK-8 法检测九香虫血淋巴对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 193 – 197.

CCK-8 法检测九香虫血淋巴对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

杨佳琪¹, 檀 军², 曹米兰¹, 金道超¹, 郭建军^{1*}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025; 2. 遵义医学院, 贵州遵义 563099)

摘要: 为了明确九香虫血淋巴对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用, 本文利用 Bradford 法检测九香虫血淋巴浓度, 用不同浓度的九香虫血淋巴处理体外培养的 MCF-7 细胞, 采用 CCK-8 法检测九香虫血淋巴对 MCF-7 细胞的抑制作用。结果表明: 九香虫血淋巴能显著抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的生长, 且对 MCF-7 的抑制率呈时间、剂量依赖关系。

关键词: 九香虫; 血淋巴; 乳腺癌; CCK-8 法

中图分类号: Q965.9; R273

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 01-0193-06

The inhibitory effect of haemolymph from *Aspongopus chinensis* Dallas on growth of human breast cancer MCF-7 by CCK-8

YANG Jia-Qi¹, TAN Jun², CAO Mi-Lan¹, JIN Dao-Chao¹, GUO Jian-Jun^{1*} (1. Institute of Entomology, Guizhou University, The Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Region, Guiyang 550025, China; 2. Zunyi Medical College, Zunyi 563099, Guizhou Province, China)

Abstract: To clear the inhibitory effect on human breast cancer cell line MCF-7 by the haemolymph from *Aspongopus chinensis* Dallas, 1851, Bradford method was used to test the concentrations of the haemolymph from *A. chinensis*, the MCF-7 cells cultured in vitro were treated by different concentrations of the haemolymph, and at last the inhibition rates to MCF-7 cells were detected by CCK-8 method. The results showed that the haemolymph from *A. chinensis* could inhibit proliferation of human breast cancer MCF-7 cells in vitro with dosage- and time-dependent effects.

Key words: *Aspongopus chinensis* Dallas; haemolymph; breast cancer; CCK-8

乳腺癌严重威胁着女性健康。全世界每年约有 120 万妇女患乳腺癌, 50 万人死于乳腺癌, 其长期居于女性肿瘤患者致死率的第 2 位; 近年来我国乳腺癌的发病率也呈逐年上升趋势, 且发病年龄逐渐降低, 并且随着社会发展, 女性生

活方式显著改变, 乳腺癌相关危险因素普遍存在, 预计未来较长一段时间我国乳腺癌的发病率和死亡率还将持续上升 (郑莹等, 2013)。目前, 抗乳腺癌药物对肿瘤有一定疗效, 但仍存在着严重的毒副作用。因此, 寻找高效、低毒、安全的抗乳

基金项目: 国家自然科学基金 (81360612); 贵州省科学基金省校联合项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7650); 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目 (黔科合人字 [2015] 25 号); 贵州省科技厅创新人才团队建设项目 (黔科合人才团队 [2014] 4001 号)

作者简介: 杨佳琪, 女, 1992 年生, 硕士研究生, 研究方向为资源昆虫学

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: jjguo@gzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-05-28; 接受日期 Accepted: 2016-10-08

腺癌药物仍是当前治疗的当务之急。

药用历史悠久的中药材九香虫 *Aspongopus chinensis* Dallas, 1851 是昆虫纲 Insecta 半翅目 Hemiptera 兜蝽科 Dinidoridae 昆虫 (彩万志等, 2001), 因其理气止痛、温中助阳的功能以及含有抗癌的药用成分而倍受人们的重视 (张笠等, 2011)。现代医学也认为九香虫对某些种类的肿瘤和癌症亦有良好的治疗效果 (林普莲, 2005; 徐波等, 2007)。近年来, 国外研发了一种综合指标较好的细胞活性检测方法 CCK-8 法 (Cell Counting Kit-8), 其原理为活细胞线粒体脱氢酶转化的黄色结晶为高度水溶性, 不需要裂解细胞, 可直接进行比色; 该法步骤简便, 且准确性高 (Tominaga *et al.*, 1999; 熊建文等, 2007; 刘爱旗和夏璐, 2013), 目前在国际上被广泛应用于免疫学、肿瘤学、及医用材料生物相容性等方面的研究 (邹颖等, 2011; 辛培成等, 2011; 赵惠君等, 2012)。因此, 本实验利用 Bradford 法 (李海玲等, 2008; 喻辉辉等, 2010; 张志涛等, 2011) 测得九香虫血淋巴蛋白含量后, 拟采取该技术检测九香虫血淋巴对乳腺癌 MCF-7 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

人乳腺癌细胞 MCF-7, 购自中科院上海细胞库; 九香虫活虫采自贵州习水县, 经贵州大学郭建军教授鉴定。

1.1.1 主要试剂

Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究所); DMEM (Hyclone 公司); 胎牛血清 (杭州四季青); 胰蛋白酶 (美国赛默飞世尔科技有限公司); 青链霉素 (双抗) (索莱宝公司); PBS 缓冲液 (北京鼎国昌盛生物公司); CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术研究所)。

1.1.2 主要仪器设备

酶标仪 (帝肯瑞士公司); CO₂ 培养箱 (美国赛默飞世尔科技有限公司); 生物安全柜 (西班牙 Telstar 公司); 离心机 (德国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 九香虫血淋巴制备

野外采集九香虫活虫, -20℃ 冰箱内致死; 将其头部及翅膀掰下, 剩余部分置于无针头的 10 mL 注射器内, 挤压将九香虫体内物质与虫体分

离, 并向存放九香虫血淋巴的离心管中加入柠檬酸钠 (0.5 mmol/L), 3500 rpm/min, 4℃ 离心 10 min, 取中部的可溶性组分置于新的离心管中, 制得九香虫血淋巴组分。

1.2.2 Bradford 法检测九香虫蛋白浓度

完成溶解蛋白标准品, 取 10 μL 加缓冲液 PBS 稀释至 100 μL, 使终浓度为 0.5 mg/mL。将稀释后的标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板中, 加缓冲液 PBS 补足到 20 μL。取过滤除菌后的九香虫血淋巴 10 μL 加缓冲液 PBS 至 100 μL, 将稀释后的九香虫血淋巴 1 μL 加到 96 孔板中, 加缓冲液 PBS 补足到 20 μL。各孔加入 200 μL G250 染色液, 室温放置 3–5 min。用酶联免疫检测仪测定 A595, 根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

1.2.3 癌细胞培养

将人乳腺癌 MCF-7 细胞体外培养于 DMEM (高糖) 培养基 (10% 胎牛血清, 1% 双抗), 置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养。

1.2.4 九香虫血淋巴对人乳腺癌 MCF-7 生长的影响

取指数生长期细胞, 使用血细胞计数板对细胞悬液计数; 将细胞悬液接种到 96 孔培养板中, 采用倍比稀释法, 调节细胞的浓度, 使得浓度达到 5×10^4 个/mL, 每组 4 孔, 每孔加入细胞悬液 100 μL, 待细胞贴壁后, 分别加入九香虫血淋巴 1、5、10、15 μL (血淋巴处理组含 0.5 mmol/L 的柠檬酸钠), 并加入缓冲液 PBS, 每孔总体积补至 115 μL, 使得反应体系中血淋巴浓度比为 1:5:10:15, 设置无药对照组 (培养液中有细胞), 并对应设置空白对照组 (培养液中无细胞), 在二氧化碳培养箱中 37℃、5% 二氧化碳浓度下分别培养 12、24、36 h 后取出培养板, 并在 96 孔培养板的相应孔中加入 CCK-8 试剂 10 μL, 再将培养板重新放回二氧化碳培养箱孵育 4 h 后, 利用酶联免疫检测仪在波长 490 nm 处测量 OD 值 (辛培成等, 2011)。抑制率的计算公式为: 抑制率 (%) = $1 - [(药物组 OD 值 - 空白对照 OD 值) / (无药对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值)] \times 100$

1.3 数据处理

使用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析 (One way ANOVA), 试验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Bradford 法分析测定九香虫血淋巴蛋白质含量

配置牛血清蛋白 (BSA) 标准品溶液 0.5 mg/mL, 按浓度 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、

0.5 mg/mL 分别加到 96 孔板中, 在 595 nm 下用酶联免疫检测仪测定各标准品的吸光度, 重复 3 次, 计算平均值 (见表 1)。

以平均吸光度 (Y) 对牛血清蛋白标准品含量 (X) 进行线性回归, 得标准曲线 (见图 1): $Y = 1.2348X + 0.6240$, $r = 0.9827$ ($n = 7$)

表 1 不同浓度 BSA 标准品吸光度
Table 1 Comparison of standard absorbance to different concentrations of BSA

BSA 浓度 (mg/mL)	Concentration of BSA	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
平均吸光度	Average absorbance	0.576	0.623	0.695	0.783	0.897	1.049	1.139	1.175

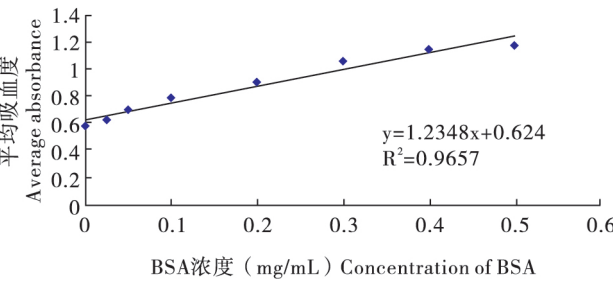


图 1 牛血清蛋白标准曲线谱图
Fig. 1 Standard curve of BSA

在同一块酶标板上测定标准品及九香虫样品的吸光度 (测定时间在 1 h 内完成)。九香虫血淋巴平行 3 份, 每次试验结果测定 3 次, 计算 9 次吸光度的平均值为样品最终测量值。参照标准曲线, 由平均吸光度计算样品含蛋白质浓度 (见表 2)。

表 2 九香虫血淋巴吸光度及蛋白质含量
Table 2 Absorbance of haemolymph from *Aspongopus chinensis* and its protein content

样品名	吸光度 (A595)	蛋白质含量 (mg/L)
Specimen	Absorbance	Content of protein
九香虫血淋巴		
Haemolymph from <i>Aspongopus chinensis</i>	0.6997	12.2611

Bradford 法检测蛋白质灵敏度高, 检测下限可达 25 $\mu\text{g/mL}$ (李海玲等, 2008), 蛋白质与 Bradford 试剂反应颜色变化明显, 颜色深浅与蛋白质含量在一定范围内呈正相关, 结合酶联免疫检测仪测定可以快速检测样品中含有的蛋白质, 可为后续实验中蛋白含量提供可靠依据。

2.2 CCK-8 法检测九香虫血淋巴对 MCF-7 的抑制作用

2.2.1 作用于人乳腺癌 MCF-7 的九香虫血淋巴浓度

由 Bradford 法测出九香虫血淋巴蛋白含量, 计算作用于人乳腺癌 MCF-7 的九香虫血淋巴浓度分别为: 0.82 mg/L, 4.09 mg/L, 8.17 mg/L, 12.26 mg/L。

2.2.2 CCK-8 法检测结果

结果表明, 0.82、4.09、8.17、12.26 mg/L 的九香虫血淋巴与阴性对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明其对 MCF-7 细胞生长具有显著的抑制作用。相同时间不同浓度的血淋巴对 MCF-7 细胞的抑制率与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。不同时间相同浓度的血淋巴对 MCF-7 细胞的抑制率与对照组比较, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$), 且各浓度组对 MCF-7 细胞的抑制率大体随浓度的增大、时间的延长而增高, 呈时间、剂量依赖关系 (见表 3)。

2.2.3 九香虫血淋巴对 MCF-7 细胞的影响

由图 2 可知: 九香虫血淋巴对乳腺癌 MCF-7 细胞具有明显的抑制作用。处理时间在 12 - 24 h 时, 九香虫血淋巴浓度的改变对 MCF-7 细胞的抑制率具有很大的影响; 处理时间为 24 - 48 h 时, 九香虫血淋巴浓度分别为 8.17 mg/mL 与 12.26 mg/mL, 抑制率增加的幅度明显减弱; 在处理时间增至 48 h 后, 九香虫血淋巴浓度为 8.17 mg/mL 与浓度 12.26 mg/mL 对 MCF-7 细胞的影响相对持平, 此时九香虫血淋巴浓度的增加对 MCF-7 细胞的抑制率并不明显, 表示这样的处理条件下, MCF-7 细胞的抑制作用并不会再因血淋巴浓度的增加而增加。因此仅在一定的处理时间及九香虫血淋巴浓度范围内, 对 MCF-7 细胞的抑

表3 不同浓度九香虫血淋巴作用 12 h、24 h、48 h 对人乳腺癌 MCF-7 增殖的影响

Table 3 Inhibitory effects of haemolymph from *Aspongopus chinensis* on proliferation of human breast cancer MCF-7 for 12 h, 24 h, 48 h

蛋白浓度 (mg/L) Concentration of protein	12 h 抑制率 (%) Inhibitory at 12 h	24 h 抑制率 (%) Inhibitory at 24 h	48 h 抑制率 (%) Inhibitory at 48 h
对照 CK	0	0	0
0.82	14.96 ± 3.64 [*]	39.43 ± 3.48 [*]	55.69 ± 0.33 [*]
4.09	36.86 ± 1.89 [*]	65.23 ± 2.37 [*]	77.75 ± 2.55 [*]
8.17	62.36 ± 3.56 [*]	88.95 ± 1.49 [*]	89.17 ± 0.86 [*]
12.26	84.12 ± 1.65 [*]	92.68 ± 0.99 [*]	92.48 ± 1.19 [*]

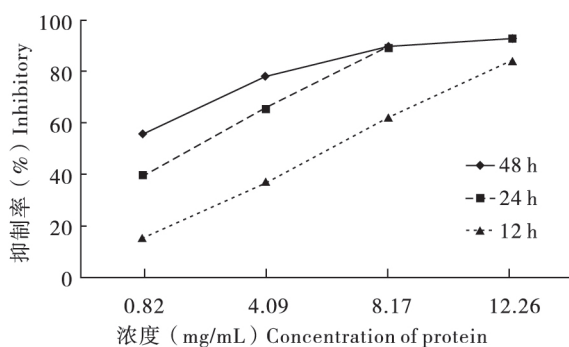


图2 九香虫血淋巴作用 12 h、24 h、48 h 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of haemolymph from *Aspongopus chinensis* on proliferation of human breast cancer MCF-7 for 12, 24, 48 h

制作用随着血淋巴的浓度及处理时间的增加而增强。

3 结论与讨论

据统计,中国城市人口中乳腺癌占女性恶性肿瘤之首 (Zheng *et al.*, 2010; Ferlay *et al.*, 2010)。因此,寻找高效、低毒、安全的抗乳腺癌药物成为紧迫而现实的问题。研究表明九香虫对某些种类的肿瘤和癌症亦有良好的治疗效果,但多以干虫或冷冻干燥后的血淋巴为原料 (范钦, 2011; 檀军等, 2013)。本实验以保证九香虫血淋巴最高活性为前提,通过 Bradford 法检测九香虫蛋白含量,以蛋白质含量为指标,计算出各处理组九香虫血淋巴的浓度。但目前常用于检测细胞活性的 MTT 法,需要使用 DMSO 等裂解液溶解甲斐晶体,因此可能遇到颗粒不完全溶解以及吸取上清的操作中也可能带走部分细胞等问题,导致所

测结果稳定性不佳等情况。所以本实验将处于对数生长期的 MCF-7 细胞以不同浓度的九香虫血淋巴处理后,应用 CCK-8 比色法检测 OD 值,计算抑制率;检测出九香虫血淋巴对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外增殖具有抑制作用,且在浓度为 0.82、4.09、8.17、12.26 mg/L 时呈时间和浓度依赖。

九香虫作为一种传统中药,对其抗菌作用的研究较多 (吴玛莉和金道超, 2005; 赵柏松等, 2011; 李尚伟等, 2015),但其抗癌活性的研究较少。目前主要有两种研究方法,第一种是利用九香虫的提取溶剂进行抗癌活性检测,主要材料为九香虫干虫,提取方法包括有侯晓晖等 (2012, 2013) 使用的冷浸法得到的九香虫三氯甲烷浸提物和乙醇粗提物;于声等 (2015) 使用传统的水煎服药方式收集九香虫水提液,分别采用 MTT 法检测胃癌 SGC-7901、肝癌 HepG2 细胞活性。第二种是檀军等 (2013) 直接利用九香虫活虫体内血淋巴,采用冷冻干燥等方法后加入癌细胞中,利用形态观察法及台盼蓝法检测九香虫血淋巴对胃癌 SGC-7901 细胞增殖影响。而以上实验表明,多种方法处理九香虫后,所得溶剂都具有一定抗癌活性,因此本实验结合两种研究方法,直接将 Bradford 法测得血淋巴蛋白含量后的血淋巴作用于目前高发的乳腺癌细胞内,采用比 MTT 法更精确的 CCK-8 法检测九香虫血淋巴抗癌活性,最后证明九香虫血淋巴对乳腺癌 MCF-7 具有明显的抑制作用。

本研究检测出九香虫血淋巴对人乳腺癌细胞具有明显的抑制作用后,可从两方面进行后续研究。一是检测九香虫血淋巴是否会诱导肿瘤细胞凋亡,进而可研究九香虫血淋巴作为抗肿瘤药物诱导细胞凋亡过程中的信号转导机制,为开发中

药治疗肿瘤提供参考依据。二是针对其抗癌活性进行九香虫血淋巴的分离纯化,进一步得出九香虫血淋巴抗癌的具体活性成分,为后续药品产业化生产提供可靠支撑。

参考文献 (References)

- Cai WZ, Pang XF, Hua BZ, *et al.* General Entomology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 318 – 327. [彩万志, 庞雄飞, 花保祯, 等. 普通昆虫学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001: 318 – 327]
- Fan Q. Effects of the serum containing *Aspongopus chinensis* Dallas on the expression of SW480 apoptosis associated factor FADD and P53 [J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 2011, 39 (13): 7828 – 7831. [范钦. 九香虫含药血清对人结肠癌细胞 SW480 凋亡相关因子 FADD • P53 表达作用的研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (13): 7828 – 7831]
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, *et al.* Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IACR Cancer Base [M]. Lyon: IARC Press, 2010.
- Hou XH, Sun T, Li XF. Effects of *Aspongopus Chinensis* Dallas extracts on cell proliferation and cell cycle of SGC – 7901 and HepG2 cell lines [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2012, 34 (12): 2278 – 2281. [侯晓晖, 孙廷, 李晓飞. 九香虫三氯甲烷浸提物对两种癌细胞增殖和周期的影响 [J]. 中成药, 2012, 34 (12): 2278 – 2281]
- Hou XH, Sun T, Li XF. Effects of rectum extracts from *Aspongopus chinensis* Dallas on cell proliferation and cell cycle of SGC – 7901 and HepG2 cell lines [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2013, 24 (1): 108 – 109. [侯晓晖, 孙廷, 李晓飞. 九香虫粗提物对 SGC – 7901 和 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24 (1): 108 – 109]
- Li HL, Peng SM, Zhang XM. Studies on four conventional methods for protein determination [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2008, 29 (4): 277 – 280. [李海玲, 彭书明, 张雪梅. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29 (4): 277 – 280]
- Li SW, Zhao BS, Du J. Isolation, purification, and detection of the antimicrobial activity of the antimicrobial peptide CcAMP1 from *Codius chinensis* (Hemiptera: Dinidoridae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 58 (6): 610 – 616. [李尚伟, 赵柏松, 杜娟. 九香虫抗菌肽 CcAMP1 的分离纯化和抗菌活性检测 [J]. 昆虫学报, 2015, 58 (6): 610 – 616]
- Lin PL. 23 Cases on anti – pain of Jiuxiangkangaidingtongsan [J]. *Journal of Fujian College of TCM*, 2005, 15 (Suppl.): 123 – 124. [林普莲. 九香抗癌定痛散治癌痛 23 例观察 [J]. 福建中医学院学报, 2005, 15 (增刊): 123 – 124.]
- Liu AQ, Xia L. Comparative study on the optimal experiment conditions between CCK – 8 and MTT in rabbit fibroblasts [J]. *Jichuanyanjiu*, 2013, 10 (2): 12 – 15. [刘爱旗, 夏璐. CCK – 8 法与 MTT 法检测兔成纤维细胞活性的比较研究 [J]. 基础研究, 2013, 10 (2): 12 – 15]
- Tan J, Guo JJ, Wei C, *et al.* The inhibitory effects of haemolymph from *Aspongopus chinensis* Dallas on in vitro proliferation of gastric carcinoma cell SGC – 7901 [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2013, 32 (2): 119 – 122. [檀军, 郭建军, 魏超, 等. 九香虫血淋巴对胃癌 SGC – 7901 细胞体外增殖的抑制作用 [J]. 山地农业生物学报, 2013, 32 (2): 119 – 122]
- Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, *et al.* A water – soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay [J]. *Anal. Commun.*, 1999, 36 (1): 47 – 50.
- Wu ML, Jin DC. The antibacterial activity of the haemolymph and the purified haemo – protein from *Aspongopus chinensis* [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2005, 42 (3): 315 – 318. [吴玛莉, 金道超. 九香虫血淋巴及其纯化蛋白抑菌活性的研究 [J]. 昆虫知识, 2005, 42 (3): 315 – 318]
- Xin PC, Yang S, Lu JM, *et al.* An experimental research on the best test conditions of CCK – 8 method detecting rabbit fascia fibroblasts proliferation activity [J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2011, 9 (12): 6 – 8. [辛培成, 杨圣, 芦健民, 等. CCK – 8 法检测兔筋膜成纤维细胞增殖活性之最佳测试条件研究 [J]. 中外医学研究, 2011, 9 (12): 6 – 8]
- Xiong JW, Xiao H, Zhang ZX. An experimental research on different detection conditions between MTT and CCK – 8 [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, 16 (5): 559 – 562. [熊建文, 肖化, 张镇西. MTT 法和 CCK – 8 法检测细胞活性之测试条件比较 [J]. 激光生物学报, 2007, 16 (5): 559 – 562]
- Xu B, Zhu GH, Xia JT, *et al.* Influence of chinese herb aitoncke on the proliferation, apoptosis and Rb gene expression of hepatoma cells HepG2 [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering*, 2007, 11 (12): 2253 – 2256. [徐波, 朱光辉, 夏金堂, 等. 中药抗癌克对人肝癌细胞 HepG2 增殖、凋亡及 Rb 基因表达的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (12): 2253 – 2256]
- Yu HH, Tan HY. Sheng mai injection with residual protein detection [J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2010, 16 (6): 106 – 110. [喻辉辉, 谭衡亚. 生脉注射液含残留蛋白质的检测 [J]. 中医药导报, 2010, 16 (6): 106 – 110]
- Yu S, Duan SL, Li HY, *et al.* Effects of aqueous extracts from *Aspongopus chinensis* Dallas on cell proliferation and cell cycle of two type of cells [J]. *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 33 (1): 104 – 108. [于声, 段斯亮, 李海叶, 等. 九香虫水提液对两种癌细胞的作用研究 [J]. 广西师范大学学报 (自然科学版), 2015, 33 (1): 104 – 108]
- Zhang L, Guo JJ. The current research situation of *Aspongopus chinensis* Dallas resources and its utilization [J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 36 (5): 151 – 155. [张笠, 郭建军. 九香虫资源及其利用研究 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2011, 36 (5): 151 – 155]
- Zhang ZT, Liu JS, Xu Q, *et al.* Protein determination of milk by bradford method [J]. *Food and Machinery*, 2011, 27 (5): 128 – 132.

(下转第 220 页)

- (上接第 197 页)

- [张志涛, 刘金生, 许强, 等. Bradford 法测定牛奶中蛋白质含量 [J]. 食品与机械, 2011, 27 (5): 128-132]
- Zhao BS, Du J, Wang JG, et al. Preliminary study on antimicrobial activity of haemolymph from *Aspongopus chinensis* [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2011, 39 (6): 85-89. [赵柏松, 杜娟, 王金固, 等. 九香虫血淋巴的抗菌活性初步研究 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39 (6): 85-89]
- Zhao HJ, Zhou NN, Xie XT. Inhibition of cytarabine in proliferation of human leukemia cloned strains determined by CCK-8 [J]. *J. Clin. Pediatr.*, 2012, 30 (5): 460-465. [赵惠君, 周妮娜, 谢晓恬. CCK-8 法检测阿糖胞苷对白血病细胞株增殖抑制作用 [J]. 临床儿科杂志, 2012, 30 (5): 460-465]
- Zheng GP, Peng F, Ding RK, et al. Identification of proteins responsible for the multiple drug resistance in 5-fluorouracil-induced breast cancer cell using proteomics analysis [J]. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2010, 136 (10): 1477-1488.
- Zheng Y, Wu CX, Zhang ML. The epidemic and characteristics of female breast cancer in China [J]. *China Oncology*, 2013, 23 (8): 561-569. [郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23 (8): 561-569]
- Zou Y, Wang WM, Zhu YN. In vitro evaluation the cytotoxicity of dental bonding agents through CCK-8 assay [J]. *Journal of Oral Science Research*, 2011, 8 (27): 673-678. [邹颖, 王文梅, 朱雅男. CCK-8 法评价口腔粘结材料的体外细胞毒性研究 [J]. 口腔医学研究, 2011, 8 (27): 673-678]