

溶菌酶与顺铂联合应用对肝癌 SMMC-7721 细胞的协同抑制效应

王利娟, 李琳娜, 何金花, 李海城, 刘 誉

(暨南大学医学院生物化学教研室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨溶菌酶(lysozyme, Ly)和顺铂(cisplatin, Cis)对肝癌细胞 SMMC-7721 生长的协同抑制效应及其抑制机制, 并分析 Ly 对正常肝细胞 LO₂ 的毒性作用。方法: 分别用 MTT 比色法和 RT-PCR 观察 Ly 与 Cis 联合应用对 SMMC-7721 细胞生长的抑制作用以及对 PCNA、bcl-2 的 mRNA 表达水平的影响, 同时测定 Ly 对 LO₂ 细胞生长的毒性作用。流式细胞仪观察 Ly 与 Cis 联合应用对 SMMC-7721 细胞诱导凋亡的作用。结果: Ly 能有效地协同 Cis 抑制 SMMC-7721 细胞生长, 抑制率最低 36%, 最高 82%, 呈时间、剂量依赖性关系, 但在同样浓度下对 LO₂ 细胞几乎没有抑制作用。联合用药组的 PCNA、bcl-2 的 mRNA 的表达水平均比对照组明显降低。流式细胞仪分析显示, Ly 协同 Cis 作用可诱导 SMMC-7721 细胞凋亡, 最高凋亡率为 32.5%。结论: 溶菌酶(Ly)能有效地协同 Cis 抑制 SMMC-7721 细胞增生并促进其凋亡, 其机制可能与 Ly 协同 Cis 降低 PCNA 和 bcl-2 的 mRNA 表达有关。

[关键词] 鸡蛋清溶菌酶; 顺铂; SMMC-7721 细胞; 凋亡

[中图分类号] R73-36 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)02-0130-05

Synergetic inhibition effects of lysozyme and cisplatin against proliferation of human liver cancer SMMC-7721 cells

WANG Li-juan, LI Lin-na, HE Jin-hua, LI Hai-cheng, LIU Yu

(Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To study the effect of lysozyme combined with conventional cytotoxic agent cisplatin on proliferation of human liver cancer cells SMMC-7721, and to evaluate the toxicity of lysozyme in normal human liver cell line LO₂. **Methods:** MTT assay was used to determine the inhibitory effect of the drugs on SMMC-7721 cells and RT-PCR used to determine the mRNA levels of PCNA and bcl-2. The toxic effect of lysozyme on proliferation of LO₂ cells was also evaluated by MTT assay, and apoptosis of the cells incubated with or without drugs was analyzed by flow cytometry. **Results:** Our results showed that a significantly synergetic inhibitory effect on proliferation of SMMC-7721 cells was produced by combination of lysozyme with cisplatin, in a time- and dose-dependent manner. The inhibition rate ranged from 36% to 82%. The mRNA levels of either PCNA or bcl-2 in SMMC-7721 cells were found decreased in the group of lysozyme combined with cisplatin, and apoptosis of the cells was found to be evidently induced by the combination of these two agents in a dose-dependent manner, the greatest apoptosis rate is 32.5%. **Conclusion:** Combination of lysozyme with conventional cytotoxic agent cisplatin can synergistically inhibit proliferation of SMMC-7721 cells in a time- and dose-dependent manner, and significantly induce apoptosis.

[收稿日期] 2007-12-11

[基金项目] 暨南大学科研基金资助项目(51204004)

[作者简介] 王利娟(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 多基因疾病的分子生物学研究。通讯作者: 刘 誉, Tel: 020-85220256; E-mail: xyliu07@126.com

of the cancer cells. These may be resulted from the decreased expression of PCNA and bcl-2 in SMMC-7721 cells caused by lysozyme-cisplatin combination.

[Key words] egg lysozyme; cisplatin; SMMC-7721 cells; apoptosis

溶菌酶(lysozyme, Ly)又称胞壁质酶(muramidase),广泛存在于高等动物、原生动物、昆虫、植物组织和各种微生物中。溶菌酶在医学领域具有很高的实用价值,例如溶菌酶可与血液中的病菌或病毒结合而抑制其增殖和致病作用,因而溶菌酶被认为具有消炎、抗病毒、抗肿瘤及止血等功效^[1-2]。顺铂(cisplatin, Cis)是一种具有抗癌谱广、作用强、与多种抗肿瘤药有协同作用且无交叉耐药的抗癌药物,为当前联合化疗中常用的药物之一;然而顺铂的副作用常常是限制该药剂量的重要因素,包括骨髓抑制、胃肠道反应、肾脏毒性和神经毒性等。因此,其效果与细胞毒性之间难以平衡。基于溶菌酶可作为一种较强的免疫调节因子用于预防和治疗恶性肿瘤的事实,推测溶菌酶可与顺铂联合应用以增加后者的抗癌效果,从而降低后者的毒性作用。本研究通过测定鸡蛋清溶菌酶与化疗药物顺铂联合应用对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的影响,以探讨两者的协同抗癌作用,寻找肝癌化疗的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 SMMC-7721 细胞株及人正常肝 LO₂ 细胞均由本实验室提供。RPMI-1640 培养基(展晨生物公司,中国),新生小牛血清(杭州四季青生物工程公司,中国),双抗(华北制药公司,中国),胰蛋白酶(Sigma 公司,美国),Trizol 试剂,DEPC,琼脂糖, RNA 酶(Sigma 公司,美国),100 bp DNA Ladder(天根公司,中国),鸡蛋清溶菌酶,MTT,二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司,美国),Cis(山东齐鲁制药厂,中国),溴化乙锭,三氯甲烷,异丙醇(北京鼎国生物技术有限公司,中国),RT-PCR 一套试剂(Promega 公司),碘化丙啶(PI 染料)(Sigma 公司,美国)。

1.2 实验方法

(1) 细胞培养 肝癌 SMMC-7721 细胞及肝正常细胞 LO₂ 用含体积分数 10% 新生小牛血清,100 IU/mL 青霉素及链霉素的 RPMI-1640 培养液中,置于 37℃,体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。

(2) MTT 法检测不同浓度溶菌酶对肝正常 LO₂ 细胞生长的影响 溶菌酶的浓度通过多次 MTT 调节,使溶菌酶的终浓度分别为 35.7、71.4、142.8、

285.6 μmol/L。取对数生长期的 LO₂ 细胞,以每孔 4 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板中,24 h 后换液,分别加入不同浓度溶菌酶使其终浓度分别为上述浓度。设不加细胞的空白对照组和只加等体积溶剂 DMSO 的对照组。每浓度每个时间点设 6 个复孔,继续培养。24、48、72 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL,37℃继续培养 4 h 后弃去孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min 使结晶物充分溶解。在 490 nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A 值)。实验重复 3 次。

细胞抑制率 = $[1 - A(\text{实验组})/A(\text{对照组})] \times 100\%$

(3) MTT 法检测不同浓度、不同药物对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的影响 溶菌酶的浓度与刺激 LO₂ 细胞的浓度相同,分别为 35.7、71.4、142.8、285.6 μmol/L。Cis 浓度参照其常用剂量时在人体达到最高峰的浓度(3.3 μmol/L),体外实验选择其高峰浓度的 1.5、3、6、12 倍(取其整数)分为 4 组,浓度分别为 5、10、20、40 μmol/L;联合用药(Ly + Cis)为相应浓度的叠加。取对数生长期 SMMC-7721 细胞,以每孔 4 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板中,24 h 后换液,分别加入不同浓度 Ly, Cis, Ly + Cis,其终浓度分别为上述浓度。设不加细胞的空白对照组和只加等体积溶剂 DMSO 的对照组。每浓度每个时间点设 6 个复孔,继续培养。第 24、48、72 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL,37℃培养 4 h 后弃去孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min 使结晶物充分溶解。在 490 nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A 值)。实验重复 3 次。

细胞抑制率 = $[1 - A(\text{实验组})/A(\text{对照组})] \times 100\%$

(4) 流式细胞仪检测肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,以 2.5 × 10⁵/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL。设未加干预的为阴性对照组细胞,每个浓度设 3 个复孔。培养 24 h 贴壁良好后加入不同浓度的 Ly, Cis, Ly + Cis,分别作用 72 h 后收集细胞,用预冷 PBS 洗涤 2 次,体积分数 70% 的乙醇于 4℃固定过夜,以 20 μg/mL RNase 37℃处理 30 min,加入碘化丙啶染色液至终浓度 50 μg/mL,避光染色 30 min,经流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

(5) RT-PCR 检测不同浓度药物对肝癌 SMMC-

7721 细胞 PCNA, bcl-2 mRNA 表达的影响 取经不同浓度 Ly、Cis、Ly + Cis 干预 24、48、72 h 后的实验组以及未干预的对照组细胞,离心去上清后,用 Trizol 法抽提总 RNA,再进行逆转录(RT)及多聚酶链式反应(PCR)。PCR 反应体系:10 × PCR buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP 1 μL, 上下游引物各 0.75

μL, Taq 酶 0.4 μL, cDNA 2 μL, 双蒸水 17.6 μL。2 对引物及内参扩增条件均为:预变性 94 ℃ 5 min, 变性 94 ℃ 45 s, 退火 60 ℃ 40 s, 延伸 72 ℃ 40 s, PCNA, bcl-2, β-actin 分别为 35、28、25 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。检测基因及内参照的引物序列见表 1。

表 1 检测基因引物序列

基因	正向引物	反向引物	产物长度
PCNA	5'-AAACCAGCTAGACTTTCTC-3'	5'-ATTGCCGGCGCATTTTAGTA-3'	314 bp
bcl-2	5'-CGACGACTTCTCCCGCGCTAC-3'	5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3'	318 bp
β-actin	5'-TGGCTCAGAAGATTCTATCT-3'	5'-CAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'	276 bp

分别取 8 μL PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察聚合酶链反应扩增结果,并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 软件对数据进行处理,行 χ^2 检验,数据以($\bar{x} \pm s$)表示;多个样本均数比较用单因素方差分析(one-way ANOVA);实验组之间的两两比较用最小显著差法(the least significant difference, LSD)分析;不同时间、多个样本比较用秩和检验(Kruskal-Wallis), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度溶菌酶对肝正常 LO₂ 细胞生长的影响

不同浓度溶菌酶作用 LO₂ 细胞 24、48、72 h 后,

MTT 法分别测定细胞生长,计算细胞的抑制率。结果显示,不同浓度溶菌酶对 LO₂ 细胞几乎没有抑制作用($P > 0.05$)。

2.2 不同浓度 Ly, Cis, Ly + Cis 对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的影响

不同浓度 Ly, Cis, Ly + Cis 干预 SMMC-7721 细胞 24、48、72 h 后, MTT 法分别测定细胞生长,计算细胞的抑制率。结果显示,不同浓度 Ly, Cis 单一用药组对 SMMC-7721 细胞生长均有抑制作用,但是 Ly + Cis 联合用药组抑制作用较单一用药组更强($P < 0.05$)(表 2);在 72 h 最高抑制率 Ly 28%, Cis 74%, 而 Ly + Cis 用药组达 82%, 高于单一用药组;而且这种抑制作用呈时间,剂量依赖性方式(见表 2)。

表 2 溶菌酶与顺铂联合应用对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的影响(MTT)

组别	24 h		48 h		72 h	
	<i>A</i> _{490 nm}	抑制率/%	<i>A</i> _{490 nm}	抑制率/%	<i>A</i> _{490 nm}	抑制率/%
对照组	0.245 ± 0.002		0.238 ± 0.018		0.211 ± 0.036	
Ly 35.7 μmol/L	0.228 ± 0.017	7 ± 0.146 ¹⁾	0.217 ± 0.002	9 ± 0.139 ¹⁾	0.186 ± 0.013	12 ± 0.143 ¹⁾
Ly 71.4 μmol/L	0.216 ± 0.011	12 ± 0.110 ¹⁾	0.202 ± 0.007	15 ± 0.124 ¹⁾	0.175 ± 0.019	17 ± 0.127 ¹⁾
Ly 142.8 μmol/L	0.206 ± 0.061	16 ± 0.115 ¹⁾	0.193 ± 0.026	19 ± 0.116 ¹⁾	0.158 ± 0.010	25 ± 0.106 ¹⁾
Ly 285.6 μmol/L	0.196 ± 0.013	20 ± 0.135 ¹⁾	0.183 ± 0.015	23 ± 0.132 ¹⁾	0.152 ± 0.001	28 ± 0.137 ¹⁾
Cis 5 μmol/L	0.180 ± 0.007	27 ± 0.126 ²⁾	0.143 ± 0.022	40 ± 0.114 ²⁾	0.101 ± 0.105	52 ± 0.131 ²⁾
Cis 10 μmol/L	0.159 ± 0.008	35 ± 0.112 ²⁾	0.129 ± 0.016	46 ± 0.126 ²⁾	0.072 ± 0.031	66 ± 0.115 ²⁾
Cis 20 μmol/L	0.138 ± 0.026	43 ± 0.105 ²⁾	0.113 ± 0.023	53 ± 0.118 ²⁾	0.065 ± 0.010	69 ± 0.103 ²⁾
Cis 40 μmol/L	0.112 ± 0.014	54 ± 0.113 ²⁾	0.079 ± 0.006	67 ± 0.120 ²⁾	0.054 ± 0.015	74 ± 0.124 ²⁾
Ly35.7 μmol/L + Cis5 μmol/L	0.157 ± 0.018	36 ± 0.135 ³⁾	0.117 ± 0.015	51 ± 0.142 ³⁾	0.074 ± 0.013	65 ± 0.117 ³⁾
Ly71.4 μmol/L + Cis10 μmol/L	0.139 ± 0.020	43 ± 0.144 ³⁾	0.093 ± 0.009	61 ± 0.110 ³⁾	0.062 ± 0.011	70 ± 0.108 ³⁾
Ly142.8 μmol/L + Cis20 μmol/L	0.107 ± 0.045	56 ± 0.139 ³⁾	0.076 ± 0.012	68 ± 0.121 ³⁾	0.044 ± 0.002	79 ± 0.127 ³⁾
Ly285.6 μmol/L + Cis40 μmol/L	0.098 ± 0.002	60 ± 0.123 ³⁾	0.055 ± 0.003	77 ± 0.117 ³⁾	0.039 ± 0.003	82 ± 0.136 ³⁾

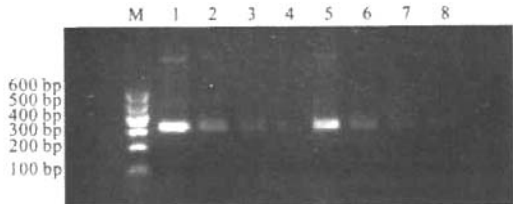
与对照组比较 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.05$; 与 Ly 组比较, 3) $P < 0.05$; 与 Cis 组比较, 3) $P < 0.05$

2.3 流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞凋亡

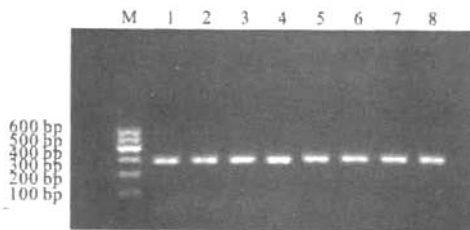
出现在 G_1 峰左侧的亚二倍体细胞群峰为凋亡峰。经药物干预 SMMC-7721 细胞 72 h 后,不同浓度 Ly 及 Cis 单一用药组均出现亚 G_1 峰,但联合干预组亚 G_1 峰显著高于单一用药组。亚 G_1 峰定量分析即为细胞凋亡率。Ly 和 Cis 单一用药组均可诱导 SMMC-77 凋亡, Ly 最高凋亡率为 12.5%, Cis 为 26.5%;而联合干预组诱导 SMMC-7721 细胞凋亡作用更强,最高为 32.5%;并呈剂量依赖性。

2.4 RT-PCR 检测药物对肝癌 SMMC-7721 细胞 PCNA, bcl-2 mRNA 的影响

经不同药物作用 SMMC-7721 细胞 72 h 后, Ly 和 Cis 单一干预组 PCNA 的表达水平较对照组减弱,而 Ly 和 Cis 联合干预后, PCNA 的 mRNA 表达水平减弱更加显著; bcl-2 也有类似结果(图 1)。



M: 相对分子质量参照标准(100 bp); 1-4 为 PCNA 基因, 5-8 为 bcl-2 基因。1, 5: 未干预 SMMC-7721 细胞对照组细胞; 2, 6: Ly 285.6 $\mu\text{mol/L}$; 3, 7: Cis 40 $\mu\text{mol/L}$; 4, 8: 联合用药组 Ly 285.6 $\mu\text{mol/L}$ + Cis 40 $\mu\text{mol/L}$



M: 相对分子质量参照标准(100 bp); 1-8 分别对应为上图 1-8 的内参照

图 1 RT-PCR 扩增 PCNA 与 bcl-2 基因的琼脂糖凝胶电泳图

3 讨论

溶菌酶作为机体非特异免疫因子之一^[3], 参与机体多种免疫反应, 在机体正常防御功能和非特异免疫中, 具有保持机体生理平衡的重要作用^[4], 可改善和增强巨噬细胞吞噬和消化功能^[5], 激活白细胞吞噬功能, 并能改善细胞抑制剂所导致的白细胞减少^[6], 从而增强机体的抵抗力。溶菌酶还具有激活血小板的功能, 可改善组织局部血液循环障碍, 分

解脓液, 增强局部防卫功能^[7], 从而体现其止血、消肿等作用, 还可作为一种宿主抵抗因子, 对组织局部起保护作用^[8]。

本实验主要研究溶菌酶与顺铂联合应用对肿瘤的抑制作用及其机制。在 1964 年, Sava 等^[9]应用溶菌酶治疗 10 例晚期癌症患者取得了一定的治疗效果; 有研究报道应用溶菌酶治疗一例已有腹部转移的小肠网状细胞肉瘤患者, 在手术和放疗后, 连续 3 个月经直肠滴注总量达 45g 的溶菌酶, 发现患者转移瘤消失且在 6 年存活并维持良好的健康状况。1978 年癌症的溶菌酶疗法申请并获得专利。另外, 溶菌酶的一个最大特点是口服与静脉注射同样有效果^[10]。

单一应用 Cis 和溶菌酶对 SMMC-7721 细胞生长均有不同程度的抑制作用, 但是溶菌酶与 Cis 联合应用, 有更强的抑制 SMMC-7721 细胞生长的作用, 说明溶菌酶与 Cis 有协同抑制作用; 而且呈时间、剂量依赖性方式。PCNA 是反映细胞增生良好的指标。本研究结果显示, 溶菌酶与 Cis 联合应用组 PCNA 的表达显著弱于单一用药组, 在 mRNA 分子水平上进一步验证了溶菌酶能协同 Cis 抑制 SMMC7721 细胞增生。

又用不同方法进一步研究了药物干预后 SMMC-7721 细胞凋亡情况, 结果显示 Ly 或 Cis, 单一用药组均可诱导 SMMC-7721 细胞发生凋亡, 但联合用药组细胞凋亡较单一用药组显著, 同样其凋亡率差别也具有统计学意义($P < 0.05$); 以上结果说明 Ly 联合 Cis 后, 能协同 Cis 发挥促凋亡作用。通过不同方法研究药物干预后, 药物对肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制增生及诱导凋亡作用。实验结果表明溶菌酶与顺铂联合应用对肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制增生及诱导凋亡作用较单一用药组效果明显, 差别有统计学意义($P < 0.05$)。

细胞凋亡与肿瘤的发生和抑制有密切的关系。化疗药物及化学抑制剂, 通过引发凋亡细胞死亡或细胞周期发生改变而发挥药理特性, 诱导肿瘤细胞凋亡已经成为肿瘤治疗的一个预测信号^[11]。传统化疗药物单一用药的毒副作用和抗癌耐药性, 限制了化疗药物的应用, 导致了临床化疗失败。为了增强化疗药物活性、降低毒性, 选用了溶菌酶和传统化疗药物顺铂联合应用(我们已经通过实验证实溶菌酶在一定浓度范围内对正常细胞几乎没有毒性作用), 表现了更为强大的以时间、剂量依赖性方式抑

(下转第 142 页)

- [5] NOR J, MITRA P, POLVERINI P J, et al. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway[J]. *J Vasc Res*, 2000, 37(3): 209-218.
- [6] LAWLER J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell Mol Med*, 2002, 6(1): 1-12.
- [7] O'SHEA K S, LIU L H, KINNUNEN L H, et al. Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo[J]. *J Cell Biol*, 1990, 111(6): 2713-2723.
- [8] MICHAEL W P, LORA W F, SUSAN P P, et al. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells[J]. *J Lab Clin Med*, 1998, 132(6): 519-529.
- [9] MIRNA T, GIULIA F, MICHELE A, et al. Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(10): 1789-1798.
- [10] REINSCH R C, MURPHY A A, MORALES A J, et al. The effects of RU486 and leuprolide acetate on uterine artery blood flow in the fibroid uterus: a prospective, randomized study[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 170(6): 1623-1627.

[责任编辑:李 弘,朱颖娜]

(上接第133页)

制肝癌 SMMC-7721 细胞增生的作用,并通过调节 PCNA, bcl-2 的表达水平,以剂量依赖性方式协同顺铂发挥对 SMMC-7721 细胞的细胞毒性作用。为临床进一步探索肝癌的药物治疗提供了实验依据。溶菌酶能明显抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖,可能与溶菌酶协同 Cis 降低 PCNA 和 bcl-2 的表达有关,提示溶菌酶有可能成为治疗肝癌的细胞凋亡诱导剂;另一方面也为深入研究溶菌酶治疗肝癌的机制提供了途径。

[参考文献]

- [1] 刘同军,徐文琳,张玉臻,等. 变溶菌素研究历史和发展前景[J]. *微生物学报*, 2000, 40(32): 224-227.
- [2] 张玉臻,刘同军,宋庆训,等. 球孢链霉菌溶菌酶的生产条件研究[J]. *食品与发酵工业*, 1997, 23(5): 16-18.
- [3] 杨保全,许 卫. 溶菌酶在口腔疾病中的作用[J]. *现代口腔医学杂志*, 1990, 4(1): 40-41.
- [4] 谢秩勋,刘 雄,陈 奉,等. 热负荷对血清溶菌酶活性的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 1997, 13(3): 148-149.
- [5] 邹京宁,韩一平,陈玉林,等. 溶葡萄球菌酶对烧伤小鼠吞噬细胞功能的影响[J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1995, 11(4): 255-257.
- [6] KRUSTEVA E, HRISTOVA S, DAMYANOV D, et al. Clinical study of effect of the preparation DEODAN on Leukopenia, induced by cytostatics[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1997, 19(9-10): 487-492.
- [7] ZHENG W, TIAN C, CHEN X. Molecular characterization of goose-type lysozyme homologue of large yellow croaker and its involvement in immune response induced by trivalent bacterial vaccine as an acute-phase protein[J]. *Immunol Lett*, 2007, 113(2): 107-116.
- [8] PÉREZ-CALDERÓN R, GONZALO-GARIJO M A, LAMILLA-YERGA A, et al. Recurrent angioedema due to lysozyme allergy[J]. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 2007, 17(4): 264-266.
- [9] SAVA G, CESCIA V, PACOR S. Mechanism of the antineoplastic action of lysozyme: evidence for host mediated effects[J]. *Anticancer Research*, 1989, 9(4): 1175-1178.
- [10] WARREN J S, RINE HART J J, ZILLING B S, et al. Lysozyme enhancement of tumor cell immunoprotection in a murine fibrosarcoma[J]. *Cancer Res*, 1981, 41(5): 1642-1645.
- [11] KO W G, KANG T H, KIM N Y, et al. Lavandulyl flavonoids: a new class of in vitro apoptogenic agents from *Sophora flavescens* [J]. *Toxicology in Vitro*, 2000, 14(5): 429-433.

[责任编辑:李 弘,朱颖娜]