

秦皮乙素对 BALB/c 裸鼠体内胶质瘤生长的影响

曹舒雯¹, 胡 杨, 朱小南, 陈汝筑, 汪雪兰*
(中山大学中山医学院药理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨秦皮乙素(Esc)的体内抗胶质瘤活性,为秦皮乙素进一步研究开发为抗胶质瘤药物提供实验依据。【方法】采用 C6 细胞前肢腋下皮下注射 BALB/c 裸鼠肿瘤构建荷瘤鼠模型;分为 4 组:模型组、50 mg/kg 秦皮乙素组、100 mg/kg 秦皮乙素组和阳性对照组;采用瘤体积、相对肿瘤增殖率、瘤质量、肿瘤生长抑制率和体质量 5 个指标评价秦皮乙素的体内抑瘤效果;采用 HE 染色鉴定瘤体。【结果】与模型组相比,秦皮乙素可显著抑制雄性荷瘤鼠的瘤体积约 10 倍,瘤质量约 8 倍,对其体质量无显著影响,与阳性对照药尼莫司汀(ACNU)相似;对雌性荷瘤鼠瘤体的生长无显著抑制作用。【结论】秦皮乙素在雄性荷瘤鼠体内具有显著抗胶质瘤活性,为秦皮乙素进一步开发为抗胶质瘤药物提供了实验依据。

关键词:秦皮乙素;胶质瘤;BALB/c 裸鼠;抑瘤效果

中图分类号:R979.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2014)05-0672-08

The Effect of Esculetin on Glioma Growth in BALB/c Nude: An in Vivo Study

CAO Shu-wen, HU Yang, ZHU Xiao-nan, CHEN Ru-zhu, WANG Xue-lan*

(Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】This study aimed to investigate the in vivo anti-glioma activity of Esculetin (Esc) to provide experimental evidences for further study of Esculetin as a potential anti-glioma drug. 【Method】Rat glioma C6 cell was subcutaneously injected into BALB/c nude mouse to set up the tumor-bearing mouse model. Four groups were taken in this experiment: model group, 50 mg/kg Esculetin group, 100 mg/kg Esculetin group and positive control group. Tumor volume, relative tumor proliferation rate, tumor weight, inhibition rate and body weight were measured to evaluate the in vivo anti-glioma activity of Esculetin. HE staining was used to identify the tumor tissue. 【Results】Comparing with the model group, Esculetin significantly inhibited tumor volume to 1/10, and tumor weight to 1/8 of the model group in male tumor-bearing mouse, similar to the positive control drug Nimusting (ACNU), while showed no significant anti-glioma activity in female tumor-bearing mouse.【Conclusion】Esculetin exhibits significant anti-glioma activity on male tumor-bearing mouse, thus provides experimental evidences for further study of Esculetin as a potential anti-glioma drug.

Key words: esculetin; glioma; BALB/c nude; anti-glioma effect

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(5):672-679]

秦皮乙素(esculetin, Esc)是一类广泛存在于自然界植物中的香豆素类化合物。现代药理学研究显示 Esc 具有多种药理作用,如抑制 5-脂氧合酶^[1]、抗炎^[2]、抗氧化^[3]、抗肿瘤^[4]等。文献报道 Esc 在体外具有抗多种非神经肿瘤的作用,如人白血病 HL-60 细胞^[5]、人白血病 U937G1 细胞^[6]和人膀胱癌 HCT116 细胞^[4],提示 Esc 可诱导非神经肿瘤

细胞凋亡,然而 Esc 对中枢神经系统肿瘤的作用却尚无文献报道。胶质瘤是目前临床发病率最高,也是最为常见的一类脑肿瘤,在所有中枢神经系统肿瘤中约占 30%^[7]。CBTRUS 公布的 2005-2009 年统计数据显示,在美国成人原发性胶质瘤发病率为 26.81/10 万人,两年生存率为 43.2%^[8],中位生存期仅为 14 个月^[9]。根据 CBTRUS 公布的治疗

收稿日期:2014-06-18

基金项目:美国中华医学基金会 CMB 资助项目(98-677)

作者简介:曹舒雯,硕士研究生,研究方向:神经药理,E-mail:caoshw@mail2.sysu.edu.cn; * 通信作者:汪雪兰,副教授,硕士生导师,
E-mail:mdswxl@mail.sysu.edu.cn

方案,治疗胶质瘤的药物主要为可透过血脑屏障或经肝脏代谢后可通过血脑屏障的小分子烷化剂,如:替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)、卡莫丝汀(carmustine, BCNU)、尼莫斯汀(Nimustine, ACNU)等^[8]。然而由于可透过血脑屏障的烷化剂较少,胶质瘤患者治疗后两年生存率(58.3%)和中位生存期(16~26个月)并无显著延长^[10],而且现有化疗药物的耐药性问题也越来越突出。因此,针对新靶点的抗胶质瘤药物开发的需求与日俱增。Esc在体外具有抗多种非神经肿瘤活性,又是脂溶性化合物,可透过血脑屏障,提示Esc可能具有抗胶质瘤活性。本课题旨在探讨Esc的体内抗胶质瘤活性,为Esc进一步研究开发为抗胶质瘤药物提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及饲养条件

四周龄 BALB/c 裸鼠 50 只(雌雄各半)购自中山大学实验动物中心,饲养于中山大学实验动物中心 SPF 级动物房,饲养环境的温度(25 ± 1)℃,相对湿度(70 ± 4)%,垫料为干木屑,每周更换 1~2 次。自由采食和饮水,昼夜节律按照 12 h: 12 h 的规律进行。经过一周的检疫后,选取体质量 18~20 g 的雄鼠和体质量 16~19 g 的雌鼠进行造模。

1.2 动物模型制备

采用 6 × 10⁶ 个/mL 浓度的 C6 细胞悬液于 BALB/c 裸鼠前肢腋下皮下注射 0.2 mL 肿瘤,制备荷瘤鼠模型。5 d 后,选取瘤体积在 13~80 mm³ 的荷瘤鼠(雌性 14 只,雄性 13 只),并进行随机分组。

1.3 分组与给药

分组与给药方式见表 1。

1.4 抑瘤效果评价

本实验采用体质量、瘤体积、瘤质量、相对肿

瘤增殖率 $\gamma_{T/C}$ 和肿瘤生长抑制率(γ_i)5 个指标评价 Esc 体内抑瘤效果,其中体质量与瘤体积在给药同时每天采集,而瘤质量则在给药结束(24 d)后处死荷瘤鼠,分离瘤体后称取。每日用游标卡尺量取肿瘤最长的轴长度,记为瘤长(L_{tumor} /mm);量取最窄的轴长度,记为瘤宽(W_{tumor} /mm);瘤体积(V_{tumor} /mm³)、相对肿瘤增值率(T/C ratio/%)和肿瘤生长抑制率(Tumor growth inhibition rate, γ_i)采用如下公式计算,记 T/C% ≤ 40% 为有效;肿瘤生长抑制率 ≥ 60% 为有效:

$$V_{\text{tumor}} = \frac{L_{\text{tumor}} \times W_{\text{tumor}}^2}{2}$$

$$\gamma_{T/C} = \frac{\overline{V_{t,treatment}} / \overline{V_{0,treatment}}}{\overline{V_{t,model}} / \overline{V_{0,model}}} \times 100\%$$

(V_t : 每日测量的瘤体积; V_0 : 给药第 1 天测量的瘤体积)

$$\gamma_i = \frac{\overline{W_{model}} / \overline{W_{treatment}}}{\overline{W_{model}}} \times 100\%$$

(W_{model} : 模型组瘤质量; $W_{treatment}$: 给药组瘤质量)

1.5 HE 染色

处死荷瘤鼠,剥离肿瘤,修块后投入 40 mL/L 甲醛溶液浸泡过夜,其后依次经酒精脱水,二甲苯透明后置于容器中,浸入已溶化的石蜡中包埋后冷却凝固成块。将包埋好的蜡块固定于切片机上,切成 5 μm 厚度的薄片,漂于温水中烫平,贴于载玻片上,于 45℃ 恒温箱中烘干,二甲苯脱蜡后经由高浓度到低浓度酒精,其后入蒸馏水,最后放入苏木精水溶液中染色数分钟,于酸水及氨水中各数秒以分色,流水冲洗 1 h 后入蒸馏水片刻,置于 70% 和 90% 酒精中脱水各 10 min,最后置于酒精伊红染色液染色 2~3 min。染色后的切片经纯酒精脱水,再经二甲苯透明,滴上中性树胶,盖上盖玻片封固。将封固好的切片置于正置显微镜下以 10 × 40 的放大倍数下拍照,并观察细胞形态、细

表 1 分组与给药方式

Table 1 Grouping and administration

Group	Solvent	ACNU(mg/kg)	Esc(mg/kg)	Administration	Dosing interval
Model		0	0	i.p	Per day
50 mg/kg Esc	PBS containing 2% Tween-80	0	50	i.p	Per day
100 mg/kg Esc		0	100	i.p	Per day
Positive control		25	0	i.v	Per week

胞核数目及多形性。

1.6 结果统计

所有计量资料均以均数 \pm 标准差表示, 每个实验重复至少 3 次, 实验数据采用 SPSS 13.0 统计分析, 组间比较采用重复测量的方差分析, Post Hoc Bonferroni 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤在雄性荷瘤鼠体内生长更快

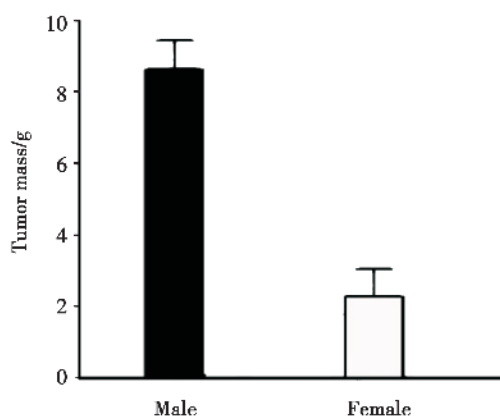
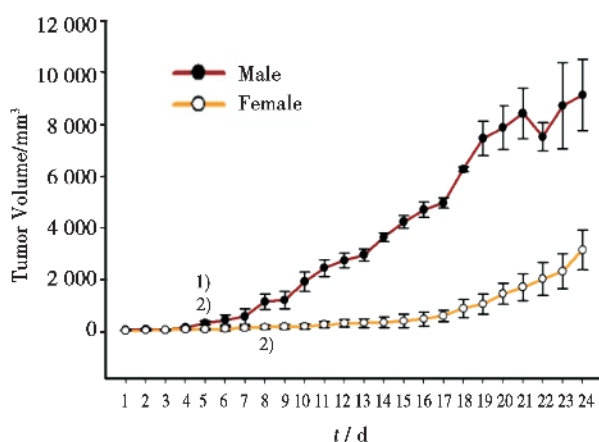


图 1 胶质瘤在雌雄荷瘤鼠体内生长情况

Fig.1 Tumor growth in male and female nude mice

$n \geq 3$, 1) $P < 0.05$ vs female group, 2) $P < 0.05$ vs first day

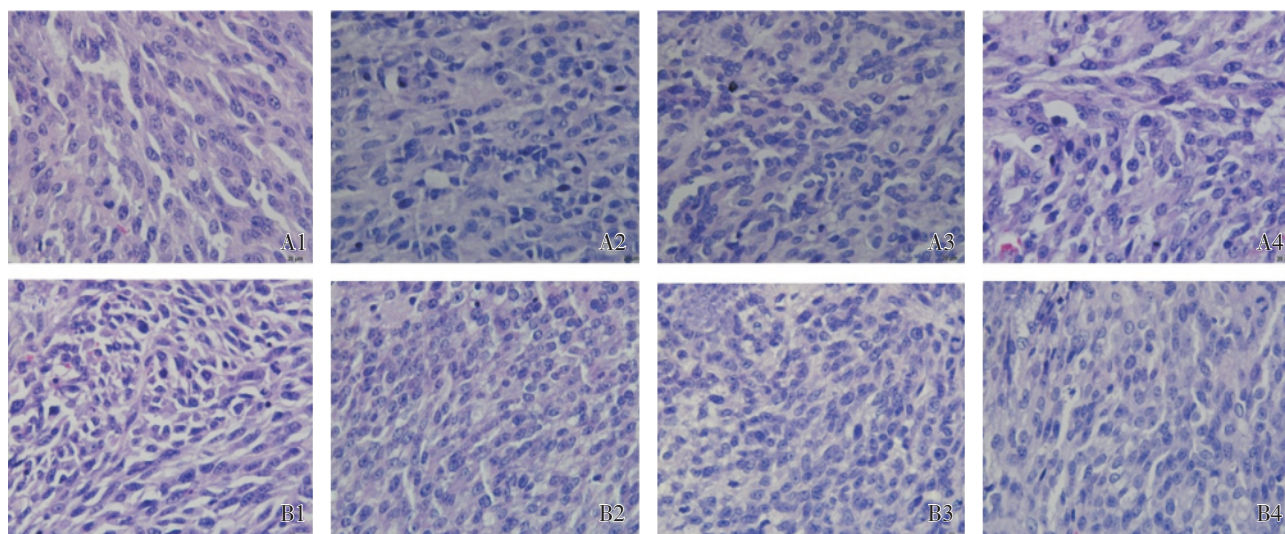


图 2 瘤体病理检查(HE 染色)

Fig.2 The pathology of tumor tissue(HE staining)

A: Male; B: Female; 1: Model group; 2: 50 mg/kg Esc group; 3: 100 mg/kg Esc group; 4: Positive control group. 400 \times

瘤体积结果显示, 雄性荷瘤鼠与雌性荷瘤鼠瘤体积增长速度不同, C6 细胞在雄性荷瘤鼠体内生长更快; 从第 5 天起, 雄性荷瘤鼠瘤体积与第 1 天差异有统计学意义; 从第 8 天起, 雌性荷瘤鼠瘤体积与第 1 天差异有统计学意义; 从第 5 天起, 雌雄荷瘤鼠瘤体积差异有统计学意义, 第 24 天时雄性鼠的瘤体积约是雌性的 3 倍(图 1A), 瘤质量约是雌性的 4 倍(图 1B)。

2.2 瘤体病理检查

HE 染色结果显示, 模型组、Esc 低、高剂量组和阳性对照组的瘤体组织可见细胞排列失去极

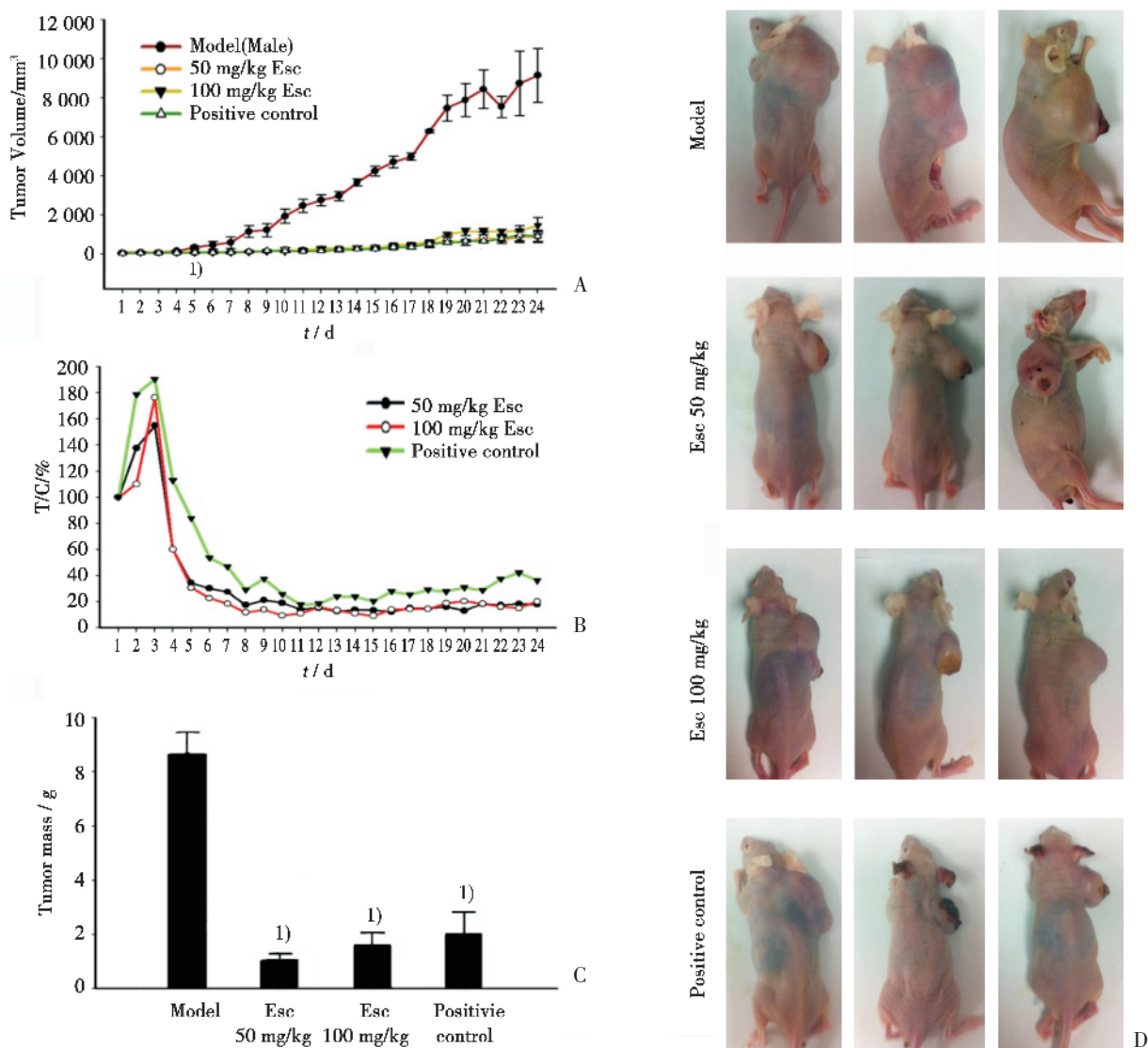


图 3 秦皮乙素在雄性荷瘤鼠体内抑瘤活性

Fig.3 Anti-glioma activity of Esc in male tumor-bearing nude mice

A: Tumor volume of male nude mice; B: Relative tumor proliferation rate of male nude mice; C: Tumor mass of male nude mice; D: Photograph of male nude mice; $n \geq 3$, 1) $P < 0.05$ vs Model group

表 2 Esc 对雄性荷瘤鼠瘤体积与相对肿瘤增殖率的影响

Table 2 The effect of Esc tumor volume and relative tumor proliferation rate in male tumor-bearing nude mice

	t / d					
	1	8	12	16	20	24
Tumor volume / mm ³						
Model	70 ± 11	1 164 ± 297 ²⁾	2 760 ± 285 ²⁾	4 716 ± 295 ²⁾	7 886 ± 845 ²⁾	9 149 ± 1377 ²⁾
50 mg/kg Esc	51 ± 23	125 ± 57 ¹⁾	239 ± 95 ¹⁾	327 ± 96 ¹⁾	603 ± 155 ¹⁾	898 ± 241 ¹⁾
100 mg/kg Esc	55 ± 14	100 ± 10 ¹⁾	288 ± 106 ¹⁾	478 ± 32 ¹⁾	1 154 ± 180 ¹⁾	1461 ± 407 ¹⁾
Positive control	22 ± 9	110 ± 27 ¹⁾	154 ± 33 ¹⁾	354 ± 36 ¹⁾	656 ± 21 ¹⁾	903 ± 314 ¹⁾
$\gamma_{T/C}$ (%)						
50 mg/kg Esc	100	17.7	15.5	12.5	13.2	17.8
100 mg/kg Esc	100	12	16	14.1	20.4	20.4
Positive control	100	29.3	18.6	28	31	36.3

1) $P < 0.05$ vs model group; 2) $P < 0.05$ vs first day, $n \geq 3$.

性,胞核明显变大(约与胞质呈 1:1),深染,呈现双核或多核,伴有病理性核分裂相,是明显的肿瘤细胞,提示剖取组织均为肿瘤组织(图 2)。

2.3 秦皮乙素对雄性荷瘤鼠瘤体生长的作用

瘤体积结果显示,模型组瘤体随着时间延长显著增大,给药组开始给药后瘤体不再增大,

表 3 雄性荷瘤鼠肿瘤生长抑制率

Table 3 Tumor growth inhibition rate in male tumor-bearing nude mice

	Model	50 mg/kg Esc	100 mg/kg Esc	Positive control
Tumor mass / g	8.7 ± 0.8	1.0 ± 0.2 ¹⁾	1.6 ± 0.5 ¹⁾	2.0 ± 0.8 ¹⁾
Tumor growth inhibition rate / %	0	87.89	81.77	77.01

1) $P < 0.05$ vs model group, $n \geq 3$.

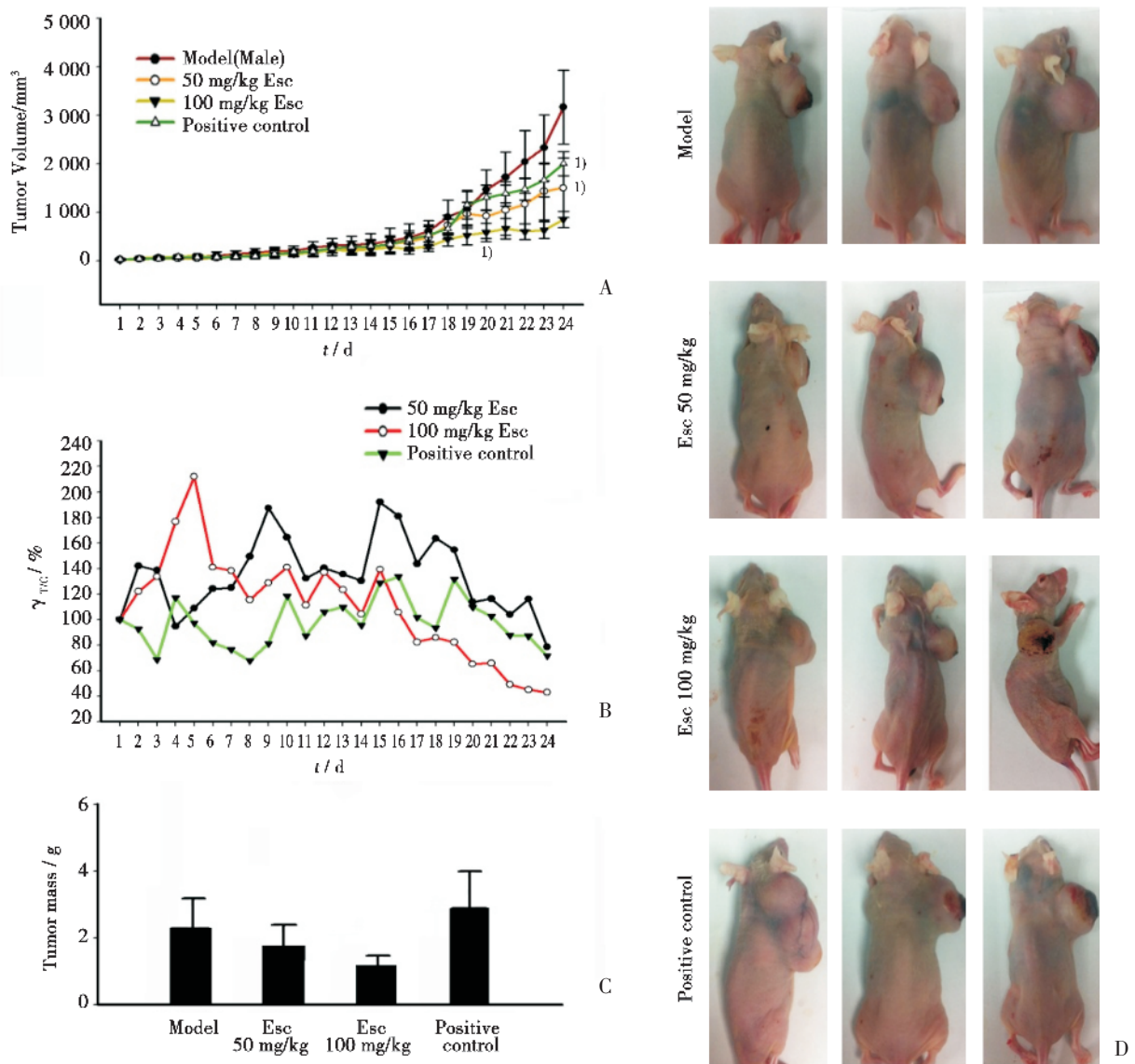


图 4 秦皮乙素在雌性荷瘤鼠体内的抑瘤作用

Fig.4 Anti-glioma activity of Esc in female tumor-bearing nude mice

A: Tumor volume of female nude mice; B: Relative tumor proliferation rate of female nude mice; C: Tumor mass of female nude mice; D: Photograph of female nude mice; $n \geq 3$, 1) $P < 0.05$ vs Model group

且从第5天开始与模型组差异有统计学意义;Esc低、高剂量给药组和阳性对照组间瘤体积差异无统计学意义(图3A、D;表2);Esc低、高剂量组 γ_{TC} 从第5天起小于40%,最低达12.5%(低剂量组)、9.3%(高剂量组),阳性对照组 γ_{TC} 从第8天起小于40%,最低达17.9%;低、高剂量Esc对雄性荷瘤鼠均有抑瘤效果(图3B;表2)。第24天时,模型组的瘤体积约是Esc给药组和阳性对照组的10倍。

瘤质量结果显示,Esc低剂量组瘤质量为 (1.0 ± 0.2) g,Esc高剂量组瘤质量为 (1.6 ± 0.5) g,阳性对照组的瘤质量为 (2.0 ± 0.8) g,与模型组 (8.7 ± 0.8) g相比差异均有统计学意义,然而Esc低、高剂量组及阳性对照组两两之间瘤质量差异并无统计学意义(图3C,表3);Esc低、高剂量组及阳性对照组肿瘤生长抑制率约为80%,低、高剂量Esc对雄性荷瘤鼠均有抑瘤效果(表3)。

2.4 秦皮乙素对雌性荷瘤鼠瘤体生长的作用

瘤体积结果显示,模型组瘤体积随着时间延长显著增大,Esc低、高剂量给药组开始给药后瘤体积不再增大,Esc低剂量组与阳性对照组仅在第24天瘤体积与模型组差异有统计学意义,而Esc

高剂量组从第20天开始瘤体积与模型组差异即有统计学意义(图4A、D;表4);第24天时,Esc低、高剂量组与阳性对照组 γ_{TC} 分别为43.0%(高剂量组)、78.6%(低剂量组)和71.6%(阳性对照组),均大于40%,Esc对雌性荷瘤鼠无抑瘤效果(图4B;表4)。

瘤质量结果显示,Esc低剂量组瘤质量为 (1.7 ± 0.7) g,Esc高剂量组瘤质量为 (1.1 ± 0.3) g,阳性对照组瘤质量为 (2.9 ± 1.1) g,与模型组 (2.3 ± 0.9) g相比均差异均无统计学意义(图4C);Esc低、高剂量组与阳性对照组肿瘤生长抑制率均小于60%,Esc对雌性荷瘤鼠无抑瘤效果(表5)。

2.5 秦皮乙素对雌雄荷瘤鼠体重的影响

对于雄性荷瘤鼠,Esc低、高剂量组和阳性对照组雄性荷瘤鼠体质量均无明显变化,与第1天相比也无明显下降,然而模型组荷瘤鼠体质量逐渐上升,并从第12天开始与Esc低、高剂量组和阳性对照相比差异有统计学意义(图5A;表6)。

对于雌性荷瘤鼠,Esc低剂量组和阳性对照组雌性荷瘤鼠体质量无显著变化,Esc高剂量组雌性荷瘤鼠体质量逐渐下降,从第19天开始与第1天体质量差异有统计学意义,从第12天开始与模型

表4 Esc对雌性荷瘤鼠瘤体积与相对肿瘤增殖率的影响

Table 4 The effect of Esc on tumor volume and relative tumor proliferation rate in female tumor-bearing nude mice

	t / d					
	1	8	12	16	20	24
Tumor volume / mm ³						
Model	42 ± 16	184 ± 79 ²⁾	328 ± 144 ²⁾	496 ± 274 ²⁾	1471 ± 412 ²⁾	3169 ± 759 ²⁾
50 mg/kg Esc	23 ± 12	133 ± 67	239 ± 123	398 ± 182	928 ± 462	1511 ± 614 ¹⁾
100 mg/kg Esc	24 ± 9	128 ± 58	236 ± 64	255 ± 101	592 ± 186 ¹⁾	857 ± 165 ¹⁾
Positive control	33 ± 8	100 ± 47	269 ± 101	442 ± 183	1308 ± 258	2009 ± 252 ¹⁾
γ_{TC} / %						
50 mg/kg Esc	100	149.4	140.3	181	113.8	78.6
100 mg/kg Esc	100	115.4	137	105.8	65.3	43
Positive control	100	67.8	106.2	133.8	109.9	71.6

1) $P < 0.05$ vs model group; 2) $P < 0.05$ vs first day, $n \geq 3$

表5 雌性荷瘤鼠肿瘤生长抑制率

Table 5 Tumor growth inhibition rate in female tumor-bearing nude mice

	Model	50 mg/kg Esc	100 mg/kg Esc	Positive control
Tumor mass / g	2.3 ± 0.9	1.7 ± 0.7	1.1 ± 0.3	2.9 ± 1.1
Tumor growth inhibition rate / %	0	24.18	50.08	-26.24

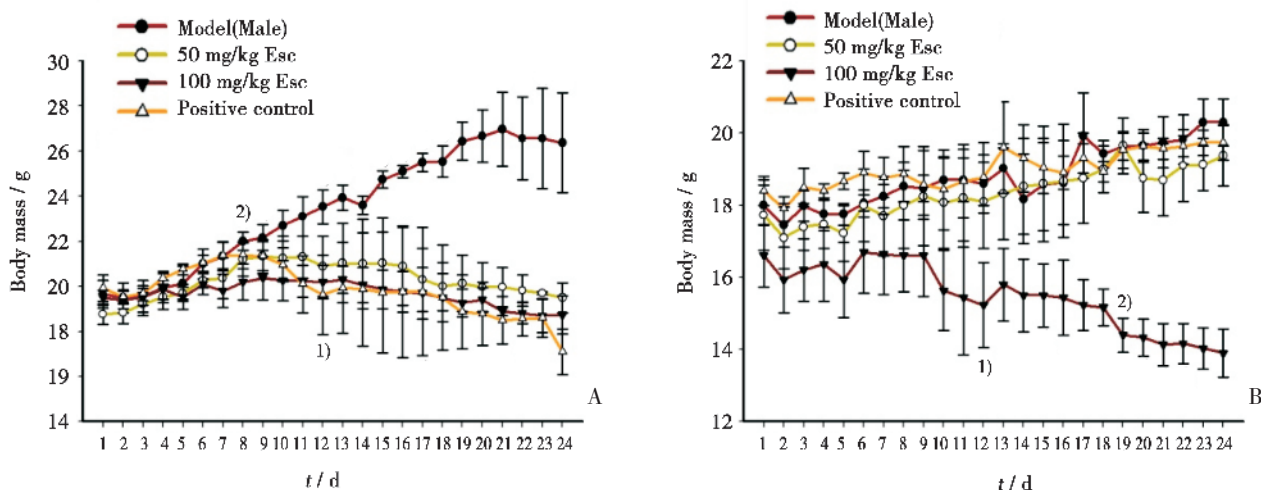


图 5 荷瘤鼠体质量变化

Fig.5 Body mass of tumor bearing nude mice

A: Male; B: Female; $n \geq 3$, $P < 0.05$ vs model group 2) $P < 0.05$ vs first day

表 6 雌性荷瘤鼠体质量变化

Table 6 Weight changes of male and female tumor-bearing nude mice

	t/d					
	1	8	12	16	20	24
Male body mass/g						
Model	19.7 ± 0.6	22 ± 0.4 ²⁾	23.5 ± 0.8 ²⁾	25.1 ± 0.3 ²⁾	26.7 ± 1.2 ²⁾	26.4 ± 2.2 ²⁾
50 mg/kg Esc	18.7 ± 0.4	21.2 ± 0.7	20.9 ± 1.3 ¹⁾	20.9 ± 1.7 ¹⁾	20.0 ± 1.1 ¹⁾	19.5 ± 0.7 ¹⁾
100 mg/kg Esc	19.5 ± 0.3	20.2 ± 0.8	20.2 ± 0.7 ¹⁾	19.8 ± 0.9 ¹⁾	19.4 ± 0.5 ¹⁾	18.7 ± 0.8 ¹⁾
Positive control	19.9 ± 0.6	21.4 ± 0.6	19.6 ± 1.8 ¹⁾	19.8 ± 2.9 ¹⁾	18.8 ± 1.4 ¹⁾	17.1 ± 1.0 ¹⁾
Female body mass/g						
Model	18 ± 0.6	18.5 ± 0.4	18.6 ± 0.6	18.6 ± 1.2	19.7 ± 0.5	20.3 ± 0.7
50 mg/kg Esc	17.7 ± 1.0	18.0 ± 1.2	18.1 ± 1.3	18.7 ± 1.6	18.8 ± 1.0	19.4 ± 0.8
100 mg/kg Esc	16.6 ± 0.9	16.6 ± 1.0	15.2 ± 1.2 ¹⁾	15.4 ± 1.0 ¹⁾	14.3 ± 0.5 ¹⁾²⁾	13.9 ± 0.7 ¹⁾²⁾
Positive control	18.4 ± 0.4	18.9 ± 0.8	18.8 ± 1.0	18.9 ± 0.5	19.6 ± 0.4	19.7 ± 0.5

1) $P < 0.05$ vs model group; 2) $P < 0.05$ vs first day, $n \geq 3$.

组差异有统计学意义(图 5B;表 6)。

3 讨论

本研究发现,胶质瘤在雄性荷瘤鼠体内生长更快,到第 24 天时其体积约为雌性荷瘤鼠瘤体积的 3 倍。这可能与胶质瘤在男性中的发病率比女性高有关^[11-12]。Esc 对雄性和雌性荷瘤鼠瘤质量、瘤体积和体质量均显示出不同的作用。对于雄性荷瘤鼠,Esc 可显著抑制瘤体的生长,给药后瘤体不再增大,相对肿瘤增值率降至约 15%,并从第 5

天开始与模型组比差异有统计学意义,肿瘤生长抑制率高达 87%,与阳性对照药物抑瘤活性相当。对于雌性荷瘤鼠,Esc 不能显著抑制瘤体的生长。仅高浓度 Esc 组从第 20 天开始,瘤体积与模型组差异有统计学意义,其他组瘤体积与模型组差异均无统计学意义,这种瘤体积差异可能与雌性荷瘤鼠严重消瘦而无法供给肿瘤生长有关。

Esc 对雌雄荷瘤鼠抑瘤作用的不同提示雌激素对胶质瘤可能有影响。2012 年, Jung 等^[13]的一项流行病学调查显示女性胶质瘤患者平均生存期较男性长 2 年。2013 年, Qi 等^[14]的一项 META 分

析结果显示曾使用外源性雌激素的女性罹患胶质瘤的概率显著低于未曾使用过的女性。提示雌激素可能具有抑制胶质瘤的作用。因此,在胶质瘤治疗方面,要考虑到患者性别差异;在抗胶质瘤药物的开发方面,也要分别探索药物对不同性别的治疗作用。

对于雄性荷瘤鼠,模型组体质量从第8天起显著增加,且随时间延长而增加,这可能是瘤体长大所致;其他组体质量无显著变化,这提示 Esc 对雄性荷瘤鼠无明显毒性。本实验显示 50 mg/kg 的 Esc 可有效抑制胶质瘤生长,却不减轻荷瘤鼠体质量,且实验过程中无死亡现象出现,因而比阳性对照药 ACNU 具有更广的治疗窗,在临床上具有更广阔的应用前景。对于雌性荷瘤鼠,高浓度 Esc 组体质量显著下降,其他组体质量无显著变化,提示雄性和雌性荷瘤鼠对 Esc 的敏感性不同,Esc 对雌性荷瘤鼠的毒性可能更大。这可能与 Esc 可部分激动雌激素受体^[15]有关,提示其可能在雄性体内发挥雌激素作用,而在雌性体内因与内源性雌激素竞争雌激素受体,反而发挥拮抗雌激素的作用。这可能也解释了 Esc 对雄性荷瘤鼠抑瘤效果更好的原因。

综上所述,Esc 在雄性荷瘤鼠体内具有显著抗胶质瘤活性。与模型组相比,Esc 可显著抑制雄性荷瘤鼠的瘤体体积约 10 倍和瘤质量约 8 倍,对其体质量无显著影响,与阳性对照药 ACNU 相似。本研究结果提示,在研究和开发抗胶质瘤药物时需要考虑性别因素,而秦皮乙素可能对男性患者效果更好,为秦皮乙素进一步开发为抗胶质瘤药物提供了实验依据。

参考文献

- [1] Kwon OS, Choi JS, Kim HP, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(9): 1561-1569.
- [2] Hu Y, Chen X, Mu X, et al. Chinese herbal medicinal ingredients inhibit secretion of IL-6, IL-8, E-selectin and TXB2 in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2009, 31(4): 550-555.
- [3] Wang C, Pei A, Xu X, et al. A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *J Neurochem*, 2012, 121(6): 1007-1013.
- [4] Park SS, Park SK, Moon SK, et al. Esculetin inhibits cell proliferation through the Ras/ERK1/2 pathway in human colon cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 223-230.
- [5] Chu CY, Tsai YY, Tseng TH, et al. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 416(1-2): 25-32.
- [6] Lee SH, Park C, Choi YH, et al. Involvement of extracellular signal-related kinase signaling in esculetin induced G1 arrest of human leukemia U937 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2008, 62(10): 723-729.
- [7] Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma [J]. *Cancer Genet*, 2012, 205(12): 613-621.
- [8] Dolecek TA, Propp JM, Kruchko C, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009 [J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14 Suppl 5: v1-49.
- [9] Iwamoto FM, Hormigo A. Unveiling YKL-40, from serum marker to target therapy in glioblastoma [J]. *Front Oncol*, 2014, 4(1): 90-97.
- [10] Hong B, Wiese B, Nakamura M, et al. Multiple microsurgical resections for repeated recurrence of glioblastoma multiforme [J]. *Am J Clin Oncol*, 2013, 36(3): 261-268.
- [11] Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(10): 2421-2427.
- [12] Barchana M, Margalio M, Liphshitz I. Changes in brain glioma incidence and laterality correlates with use of mobile phones; a nationwide population based study in Israel [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11): 5857-5863.
- [13] Jung KW, Yoo H, Lee SH. Population-based survival data for brain tumors in Korea [J]. *J Neurooncol*, 2012, 109(2): 301-307.
- [14] Qi ZY, Shao C, Wang Z, et al. Exogenous and endogenous hormones in relation to glioma in women: a meta-analysis of 11 case-control studies [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68695.
- [15] Jiménez-Orozco FA, Rosales AA, Mandoki JJ, et al. Differential effects of esculetin and daphnetin on in vitro cell proliferation and in vivo estrogenicity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668(1-2): 35-41.