

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01110

GHSC-73 对人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响

冯波¹, 郭跃伟², 黄才国^{1*}, 李亮², 焦炳华^{1*}

1. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

2. 中国科学院上海生命科学院药物研究所国家新药研究重点实验室, 上海 201203

[摘要] **目的:**观察来源于海芒果种子的强心苷化合物 β -D-glucosyl-(1-4)- α -L-thevetosides of 17 β -digitoxigenin(GHSC-73)对人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖和细胞周期的影响,并初步探讨其作用机制。**方法:**采用 MTT 法检测不同浓度 GHSC-73 对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的影响;采用流式细胞仪 Propidium Iodide(PI)单标法检测 GHSC-73 对 HepG2 细胞周期进程的影响;Real-time RT-PCR 检测 S 期相关基因在 GHSC-73 处理前后表达的变化。**结果:**GHSC-73 可抑制 HepG2 细胞增殖,其作用具有时间和浓度依赖性,作用 HepG2 细胞 24、48、72 h 后,IC₅₀ 分别为 (5.18±0.21)、(0.37±0.08)、(1.66±0.16) μ mol/L。与对照组相比,随着作用时间的延长,S 期细胞百分比逐渐增多,而 G₀/G₁ 期细胞百分比逐渐减少 ($P < 0.05$),G₂/M 期细胞百分比基本保持不变,表明 GHSC-73 阻滞 HepG2 细胞于 S 期。Real-time RT-PCR 检测 S 期相关基因的结果显示:GHSC-73 诱导后 HepG2 细胞 GADD153、cyclin D1、p21 基因表达上调,cyclin A2、DHFR、TYMS 基因表达下调。**结论:**GHSC-73 可通过 S 期阻滞来抑制 HepG2 细胞增殖,其阻滞作用可能与 GADD153、cyclin D1、p21、cyclin A2、DHFR 和 TYMS 基因表达变化有关。

[关键词] 肝肿瘤;强心苷类;GHSC-73;细胞增殖;细胞周期

[中图分类号] R 286.91; R 735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)10-1110-05

Effects of GHSC-73 on proliferation and cell cycle of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

FENG Bo¹, GUO Yue-wei², HUANG Cai-guo^{1*}, LI Liang², JIAO Bing-hua^{1*}

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of β -D-glucosyl-(1-4)- α -L-thevetosides of 17 β -digitoxigenin (GHSC-73), an isolate from the seeds of *Cerbera manghas* L., on cell growth and cell cycle regulation of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, and to discuss the related mechanism. **Methods:** HepG2 cells were treated with different concentrations (0-80 μ mol/L) of GHSC-73. Cell viability was determined using MTT assay at 24, 48, and 72 h after treatment. Cell cycle distribution was assessed by flow cytometry after propidium iodide (PI) staining. Expression of the S phase associated genes GADD153, cyclin D1, cyclin A2, DHFR, TYMS, and p21 was determined by real-time RT-PCR before and after GHSC-73 treatment. **Results:** GHSC-73 inhibited the cell proliferation of HepG2 cells in a dose- and time-dependent manner. The values of IC₅₀ were (5.18±0.21), (0.37±0.08), and (1.66±0.16) μ mol/L at 24, 48, and 72 h, respectively. Compared with control group, the proportion of cells in S phase increased in the treatment group with the prolongation of treatment, the cells in G₀/G₁ phase gradually decreased ($P < 0.05$), and cells in G₂/M phase remained unchanged, indicating that GHSC-73 blocked HepG2 cell in S phase. Real-time RT-PCR showed that cyclin A2, DHFR, and TYMS were down-regulated, and p21, GADD153, and cyclin D1 were up-regulated, which might be associated with the GHSC-73-induced S phase arrest in HepG2 cells. **Conclusion:** GHSC-73 can inhibit growth of HepG2 cells by inducing S phase arrest; down-regulation of cyclin A2, DHFR, and TYMS genes and up-regulation of p21, GADD153, and cyclin D1 genes might participate in the induction of arrest.

[KEY WORDS] liver neoplasms; cardiac glycosides; GHSC-73; cell proliferation; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(10):1110-1114]

[收稿日期] 2009-03-23 **[接受日期]** 2009-09-14

[基金项目] 国家高技术研究发展计划("863"计划, 2006AAD9Z447). Supported by National High-tech R & D Program("863" Program, 2006AAD9Z447).

[作者简介] 冯波, 博士生. E-mail: fengbo422@tom.com

* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81870970-8020, E-mail: huangcaiguo@hotmail.com; Tel: 021-81870965, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,是我国恶性肿瘤防治研究的重点^[1]。手术切除是目前治疗早期肝癌唯一有效的方法,但大多数患者就诊时已达病程中晚期,手术疗效有限,因而寻找新的治疗方法尤为重要。强心苷(cardiac glycoside)是一类具选择性强心作用的药物,临床上主要用于治疗心功能不全及某些心律失常,尤其是室上性心律失常。其在预防和治疗肿瘤方面正扮演着越来越重要的角色。许多研究^[2-3]表明强心苷对恶性细胞具有优先选择性杀伤作用,且不影响正常细胞的增殖。因此,强心苷有望成为一种靶向治疗肿瘤的新型药物。

海芒果(*Cerbera manghas* L.)属于夹竹桃科(Apocynaceae)海芒果属(*Cerbera*)。海芒果植株含有抗皮肤癌、乳腺癌和肺癌活性的强心苷。Laphookhieo 等^[4]已从白花海芒果种子中成功分离出一系列具有抗癌活性的强心苷类化合物。 β -D-glucosyl-(1-4)- α -L-thevetosides of 17 β -digitoxigenin (GHSC-73, 结构式见图 1)是从植物海芒果种子中提取的具有抗肿瘤活性的天然产物,属强心苷。HepG2 细胞来源于人肝癌组织,与正常肝细胞在细胞增殖动力学上具有同源性,因此本研究选取人肝癌细胞株 HepG2 作为研究对象,来探讨 GHSC-73 对其增殖和细胞周期的影响及作用机制。

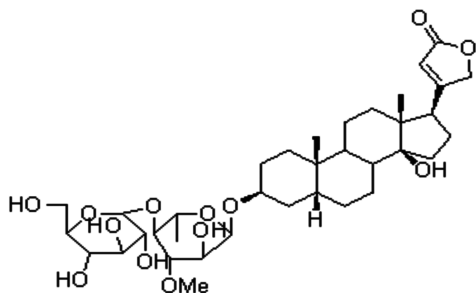


图 1 GHSC-73 的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of GHSC-73

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,常规培养于 MEM 培养基(含 10% 灭活的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 药物 海芒果样品于 2001 年 7 月采于我国广西北海,由中国科学院上海药物研究所沈金贵副研究员鉴定为海芒果(*Cerbera manghas* L.)。海芒果种子的分离纯化由中国科学院上海生命科学研究院药物研究所国家新药研究重点实验室郭跃伟研究员

课题组完成。氢谱和 LC-MS 分析表明 GHSC-73 的纯度大于 99%。GHSC-73 用二甲亚砜(DMSO)溶解,再用 PBS 稀释,使 DMSO 终浓度小于 0.1%。

1.3 主要试剂 四甲基偶氮唑盐 MTT(C₁₈H₁₆N₅SBr)、DMSO、5-Fu(C₄H₃FN₂O₂)均购自 Amresco 公司;MEM、青霉素/链霉素混合液(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μ g/ml)购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)和 RNase A 购自 Sigma 公司;异丙醇、氯仿、乙醇购自国药集团;TRIzol RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自 MBI Fermentas 公司;SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒购自 Toyobo 公司;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;其余试剂均为分析纯。

1.4 MTT 比色法检测细胞存活率 参照文献^[5]取对数生长期的 HepG2 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶消化,再加入含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基,用滴管将细胞吹打成单细胞悬液,以每孔 1×10^4 细胞数铺于 96 孔培养板中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,24 h 后换液,GHSC-73 组加入 GHSC-73 使其终浓度分别为 1、5、10、20、40、80 μ mol/L,另设终浓度为 25 μ g/ml 的 5-Fu 阳性对照组和不加药物的阴性对照组以及不接种细胞的空白对照组。每个浓度每个时间点均设 5 个复孔,分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 溶液(1 mg/ml)50 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后弃培养基;每孔加入 150 μ l DMSO 振荡 10 min,使结晶物完全溶解,用酶标仪在 550 nm 处测定光密度值。细胞存活率(%) = [(药物处理组 D_{550} - 空白组 D_{550}) / (阴性对照组 D_{550} - 空白组 D_{550})] $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期分布 取对数生长期的细胞以 1×10^6 的密度接种于 6 孔培养板中,细胞贴壁后,弃上清,各组加入终浓度为 5 μ mol/L 的 GHSC-73,孵育 0、24、48、72 h 后用 0.25% 胰酶消化收集所有细胞,用预冷的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)清洗 1 次,弃上清,加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇固定,4 $^{\circ}$ C 过夜。上机前,收集所有固定标本,离心弃上清,用 PBS 清洗 1 次,加入浓度为 1 mg/ml 的 RNase A,用 PI 染液(50 μ g/ml)室温下避光染色 30 min,流式细胞仪进行细胞周期 DNA 含量分析,确定细胞周期的分布。

1.6 Real-time RT-PCR 检测 S 期相关基因表达

1.6.1 细胞总 RNA 抽提 GHSC-73 药物处理组细胞和阴性对照组细胞分别加入 1 ml TRIzol,枪头

吹打,将裂解液转移至 1.5 ml 无酶 EP 管中;加入 0.2 ml 氯仿,剧烈震荡 15 s,静置 5 min;12 000 × g 4℃ 离心 15 min,可见分层;吸取上层水相于另一无酶 EP 管;加入 0.5 ml 异丙醇,颠倒数次,静置 10 min;12 000 × g 4℃ 离心 10 min;弃上清,加入 1 ml 75% 乙醇洗涤;7 500 × g 4℃ 离心 5 min;弃上清,空气中干燥 5~10 min;沉淀溶于适量 DEPC 水中,56℃ 水浴助溶,-80℃ 保存备用。

1.6.2 RNA 定量与鉴定 采用紫外分光光度法测定 RNA 样品在波长 260 nm 和 280 nm 处的光密度值。根据 1 D_{260} 相当于 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA 的量,以 D_{260}/D_{280} 比值判断 RNA 样品的纯度,选择 D_{260}/D_{280} 比值为 1.8~2.0 的 RNA 样品。本实验室用核酸/蛋白定量仪来检测,直接读出 RNA 的浓度和 D_{260}/D_{280} 比值。

1.6.3 RNA 逆转录 用 MBI 逆转录试剂盒在冰上进行操作。取 2 μg 模板 RNA,1 μl 随机引物,用 ddH₂O 补足体积至 12 μl ,混匀,70℃ 水浴 5 min,混匀,再加 4 μl 的 5×buffer,1 μl 的 Rnasin(RNA 抑制剂),2 μl 的 dNTP,1 μl RTase(逆转录酶),使总体积为 20 μl 。25℃ 放置 10 min,42℃ 60 min,最后 70℃ 10 min,冰上冷却。合成好的 cDNA 必须存放在 -20℃ 以下。

1.6.4 Real-time PCR 扩增 用 Toyobo SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒行 GADD153、cyclin D1、cyclin A2、DHFR、TYMS、p21 的 real-time PCR 扩增,以 GAPDH 为内参。用 Primer Express 软件设计引物序列,GADD153-F:5'-GAG CAT CAG TCC CCC ACT TG-3',GADD153-R:5'-ATG TGG GAT TGA GGG TCA CAT C-3'; cyclin D1-F:5'-AGG TCT GCG AGG AAC AGA AGT G-3', cyclin D1-R:5'-TGC AGG CGG CTC TTT TTC-3'; cyclin A2-F:5'-CAG CCT GCG TTC ACC ATT C-3', cyclin A2-R:5'-TTA AAA GCC AGG GCA TCT TCA-3'; DHFR-F:5'-TCA GCA GCA GGA CGA CTT GA-3',DHFR-R:5'-GCC CCA AAT CTG GCA ATA AG-3'; TYMS-F:5'-AAG GGT ACA ATC CGC ATC CA-3', TYMS-R:5'-TCC AGC CCA ACC CCT AAA G-3'; p21-F:5'-GCA GAC CAG CAT GAC AGA TTT C-3', p21-R:5'-GCG GAT TAG GGC TTC CTC TT-3'; GAPDH-F:5'-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA-3', GAPDH-R:5'-CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T-3'。反应总体积为 25 μl ,包括 2.5 μl DNA 模板,12.5 μl SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix,各 1 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物,8 μl

ddH₂O。采用 ABI 7300,按照仪器说明书进行 95℃ 60 s 预变性,45 个循环(95℃ 10 s,60℃ 31 s)。数据采用仪器自带软件(ABI Prism 7300 SDS Software)分析。

1.6.5 数据分析 以 GAPDH 为内参,采用相对定量的方法,得到 Ct 值(达到阈值的循环数)为原始数据,计算 Ct 值均值,应用相对定量法($\Delta\Delta\text{Ct}$)进行分析,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据处理和作图。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GHSC-73 对人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖的抑制作用 结果显示,不同浓度药物处理组分别培养 24、48、72 h,GHSC-73 对 HepG2 细胞的增殖具有抑制作用,且其抑制作用具有时间和浓度依赖性。随着作用时间的延长和药物浓度的增加,细胞抑制效果越来越明显,GHSC-73 对 HepG2 细胞的生长有量-效、时-效关系(图 2)。计算得到 GHSC-73 抑制 HepG2 细胞的半数抑制浓度 IC_{50} ,24、48、72 h 分别为 (5.18 ± 0.21)、(0.37 ± 0.08)、(1.66 ± 0.16) $\mu\text{mol/L}$ 。

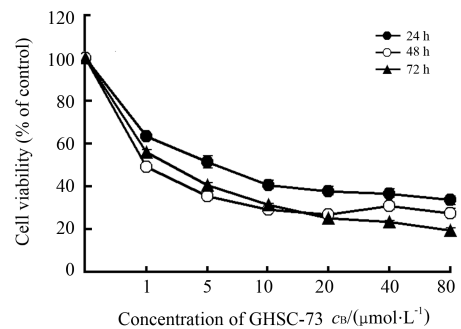


图 2 GHSC-73 对人肝癌细胞系 HepG2 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of GHSC-73 on cell viability of HepG2 cells

$n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 GHSC-73 对人肝癌 HepG2 细胞周期进程的影响 流式细胞仪细胞周期检测结果表明,5 $\mu\text{mol/L}$ GHSC-73 作用于人肝癌 HepG2 细胞 24、48、72 h 后,与对照组(0 h)相比, G_0/G_1 期细胞百分数逐渐减少,而 S 期细胞百分数逐渐增加,其差异具有统计学意义($P < 0.05$), G_2/M 期细胞百分数基本保持不变(图 3),说明 GHSC-73 能造成 HepG2 细胞 S 期阻滞,且这种阻滞具有时间依赖性。

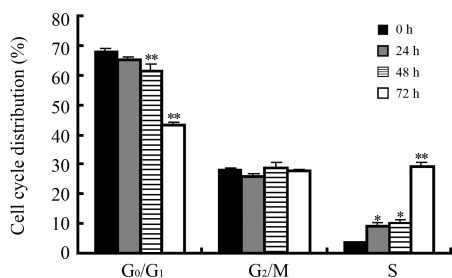


图 3 GHSC-73(5 μmol/L) 对人肝癌 HepG2 细胞周期的影响

Fig 3 Time-dependent effect of GHSC-73(5 μmol/L) on cell cycle distribution of HepG2 cells

* P<0.05, ** P<0.01 vs 0 h; n=3, $\bar{x} \pm s$

2.3 S 期相关基因的表达 通过 Real-time RT-PCR 对与 S 期相关的 6 个基因的表达进行检测。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行评估, 与对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为 1 相比, p21, cyclin D1 和 GADD153 基因在药物作用的不同时间点均表达上调, 而在 5 μmol/L GHSC-73 作用 24 h 后上调最明显, 分别为对照组的 (22.8 ± 3.6) 、 (10.9 ± 1.4) 、 (16.2 ± 1.3) 倍(图 4); TYMS, DHFR 和 cyclin A2 基因在药物作用的不同时间点均表达下调, 且在 GHSC-73 作用 24 h 后下调最明显, 分别为对照组的 (0.54 ± 0.04) 、 (0.20 ± 0.03) 和 (0.61 ± 0.04) 倍(图 4)。

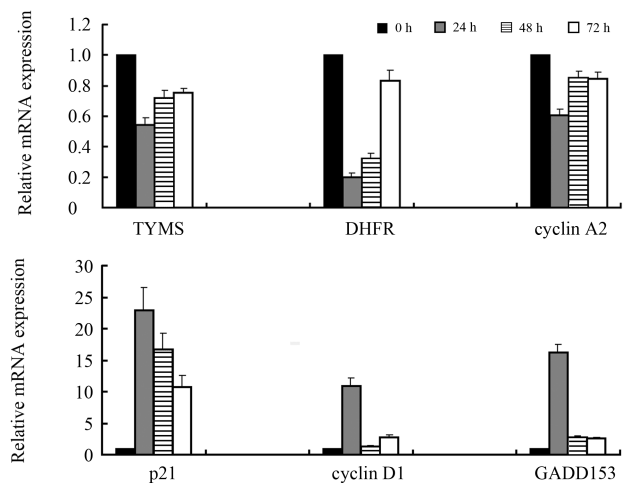


图 4 GHSC-73 处理后 HepG2 细胞 S 期相关基因的表达变化

Fig 4 Relative mRNA expression of p21, cyclin D1, GADD153, TYMS, DHFR, and cyclin A2 after 5 μmol/L GHSC-73 treatment

n=3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

细胞周期(cell cycle)是细胞生命活动的基本过

程,指从细胞分裂结束开始,到下一次细胞分裂结束为止的过程,DNA 合成和细胞分裂是细胞周期的两个主要事件。在进化过程中,细胞发展并建立了一系列的调控机制,以确保细胞周期严格有序地交替和有时相依次有序变更。已发现的与细胞周期调控有关的分子很多,主要有 3 大类:细胞周期蛋白(cyclin)^[6]、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase,CDK)^[7]、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor,CKI)^[8],其中 CDK 是调控网络的核心,cyclin 对 CDKs 具有正性调控作用,对 CKI 有负性调控作用,共同构成了细胞周期调控的分子基础。研究^[9]表明,细胞的增殖、分化、衰老和凋亡均是细胞周期依赖性的,抑制肿瘤细胞 cyclin 的表达,上调 CKI 表达,均可选择性地抑制肿瘤组织 CDKs 的活性,阻止肿瘤细胞的异常增殖,同时保护了正常细胞,是肿瘤治疗的新思路。几乎所有的肿瘤都有细胞周期调控机制的破坏导致细胞生长失控、分化受阻、凋亡异常的特征。选择保护正常组织并诱导肿瘤细胞分化和凋亡的新药和有效的治疗新方案,调节偏离正常细胞周期轨道的肿瘤细胞回到正常轨道上来,将是今后抗肿瘤治疗的新策略之一^[10]。

本实验探讨 GHSC-73 对人肝癌 HepG2 细胞增殖和细胞周期的影响及其可能机制。结果显示:GHSC-73 以剂量和时间依赖方式抑制 HepG2 细胞增殖;以时间依赖方式诱导 HepG2 细胞周期在 S 期阻滞。本研究显示 GHSC-73 诱导 HepG2 细胞中 DNA 损伤应答、细胞周期检查点和核酸合成相关基因表达变化,这些基因的变化与 GHSC-73 诱导 HepG2 细胞 S 期阻滞的流式细胞仪检测结果基本一致。

Real-time RT-PCR 结果显示,生长抑制与 DNA 损伤基因 153(growth arrest and DNA damage-inducible gene 153,GADD153),cyclin D1 基因 mRNA 在药物作用的不同时间点均表达上调,而在 GHSC-73 作用 24 h 后上调最明显。GADD153 在细胞周期进入 G₁、G₂ 期时会对受损的 DNA 进行修复。GADD153 属于修复酶之一,受损 DNA 刺激其表达上调。同时,GADD153 也是调控细胞凋亡的一种重要蛋白,在细胞内质网应激等状态下大量表达并转位于细胞核,与细胞核的转录因子结合,导致蛋白合成抑制,诱导细胞凋亡^[11-12]。Cyclin D1 在正常细胞的细胞周期 G₀ 期开始合成,其水平在 G₁ 中期达到高峰,S 期开始降解,与细胞增殖有关。当 cyclin D1 与细胞周期素依赖性激酶(CDK4 或 CDK6)结合

后,就可以激活后者的磷酸酶活性,使视网膜细胞瘤蛋白(retinoblastoma,Rb)磷酸化。高磷酸化的Rb蛋白因构象改变而与转录因子E2F分离,E2F被释放而发挥其转录因子的效应,促进与DNA合成有关的基因转录,从而促进细胞周期进入S期^[6,13-14]。

Real-time RT-PCR的结果显示:p21基因mRNA在药物作用的不同时间点均表达上调,而在GHSC-73作用24h后上调最明显,且随着作用时间的延长,表达上调呈递减趋势。一般认为p21基因是肿瘤抑制基因野生型p53的下游基因,当细胞受到损伤时,p53和p21相互诱导表达,p21第21~26及49~72位氨基酸处分别与cyclin-CDK结合,从而使cyclin-CDK复合物的激酶活性丧失。p21抑制cyclin D1-CDK2和cyclin E-CDK2活性,使Rb蛋白不能磷酸化,从而使细胞周期停滞在G₁期^[15]。这与GHSC-73诱导HepG2细胞S期阻滞不一致,但是也有研究表明p21可通过非依赖p53途径诱导细胞周期停滞。p21可作为CDK聚集因子正性调节CDK功能。体外实验显示,低浓度p21刺激有关功能基因磷酸化,促进G₁期到S期的转化;高浓度p21则抑制四聚体的激酶反应,使细胞周期停滞^[16]。p21协同激活激酶的作用,预示p21可能有另一个功能,p21可能作为CDK聚集因子,正性调节CDK。所以还需要进一步设计实验来证明p21基因上调在GHSC-73诱导HepG2细胞S期阻滞中所起的作用。

Real-time RT-PCR的结果还显示,二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase,DHFR)、胸腺嘧啶合成酶(thymidylate synthase,TYMS)和cyclin A2基因mRNA在药物作用的不同时间点均表达下调,而在GHSC-73作用24h后下调最明显。DHFR和TYMS是DNA生物合成反应中的关键酶。它们的活性受到抑制,就会影响细胞复制时DNA的合成,进而将细胞生长抑制在细胞周期中的DNA合成前期即G₁期及DNA合成期(S期)^[17]。Cyclin A2在G₁晚期出现,可分别与CDK2和CDK1结合,实验表明cyclin A2在S期能促进DNA合成,促进细胞越过G₂/M期转折点,进入M期^[18]。

总之,本研究发现,GHSC-73可抑制HepG2细胞增殖,阻滞HepG2细胞周期进程,其作用机制可能与上调p21、GADD153和cyclin D1表达和下调DHFR、TYMS和cyclin A2表达有关。

[参考文献]

[1] 张思维,李连弟,鲁凤珠,牧人,孙秀娣,皇甫小梅,等.中国

1990~1992年原发性肝癌死亡调查分析[J].中华肿瘤杂志,1999,21:245-249.

- [2] Newman R A, Yang P, Pawlus A D, Block K I. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents[J]. Mol Interv, 2008, 8: 36-49.
- [3] Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293: C509-C536.
- [4] Laphookhieo S, Cheenpracha S, Karalai C, Chantrapromma S, Rat-a-pa Y, Ponglimanont C, et al. Cytotoxic cardenolide glycoside from the seeds of *Cerbera odollam* [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 507-510.
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55-63.
- [6] Johnson D G, Walker C L. Cyclins and cell cycle checkpoints [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999, 39: 295-312.
- [7] Tannoch V J, Hinds P W, Tsai L H. Cell cycle control[J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 465: 127-140.
- [8] Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause[J]. Gene, 2000, 247: 1-15.
- [9] Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation[J]. Nature, 2001, 411: 1017-1021.
- [10] Blagosklonny M V, Pardee A B. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells[J]. Cancer Res, 2001, 61: 4301-4305.
- [11] Ubeda M, Habener J F. CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 40514-40520.
- [12] Maytin E V, Ubeda M, Lin J C, Habener J F. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and independent mechanisms[J]. Exp Cell Res, 2001, 267: 193-204.
- [13] 许宁,朱恩新,王莉红,刘婷姣. Cyclin D1表达异常与肿瘤的发生及预后[J]. 中国药物与临床, 2008, 8: 840-843.
- [14] Vermeulen K, Van Bockstaele D R, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. Cell Prolif, 2003, 36: 131-149.
- [15] 李作生,李保庆. p21和p27基因多态性与肿瘤的相关性[J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29: 317-320.
- [16] 李向荣,林星余,肖忠秀,蒋海霞,唐琼兰,刘馨. p21结构功能与研究新进展[J]. 医学综述, 2008, 14: 2094-2097.
- [17] Sakoff J A, Ackland S P. Thymidylate synthase inhibition induces S phase arrest, biphasic mitochondrial alterations and caspase-dependent apoptosis in leukaemia cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2000, 46: 477-487.
- [18] Fombonne J, Charrier C, Goddard I, Moysse E, Krantic S. Leptin-mediated decrease of Cyclin A2 and increase of Cyclin D1 expression: Relevance for the control of prepubertal rat leydig cell division and differentiation[J]. Endocrinology, 2007, 148: 2126-2137.

[本文编辑] 尹茶