

4'-甲醚-黄芩素诱导绒毛膜癌 JAR 细胞凋亡的实验研究

杨最素^{1,2}, 罗莉¹, 朱利群¹, 仇黎丽¹, 徐昌芬^{1*}

(1. 南京医科大学 组胚教研室, 江苏 南京 210029; 2. 浙江海洋学院医学院, 浙江 舟山 316004)

摘要:目的 探讨 4'-甲醚-黄芩素 (4-MS) 对人绒毛膜癌 JAR 细胞的增殖抑制作用及诱导凋亡的相关机制。方法 应用 MTT 法、激光共聚焦扫描显微镜、流式细胞术和实时定量 PCR 法, 体外观察 4-MS 对 JAR 细胞的影响。结果 不同质量浓度 (10、20、40 mg/L) 的 4-MS 对 JAR 细胞均有增殖抑制作用, 呈剂量依赖, 作用 72 h 后其增殖抑制率分别为 (14.14±0.75)%、(34.34±2.99)%、(61.11±2.99)% ($P<0.01$); 4-MS 作用 72 h 后细胞内 Ca^{2+} 浓度分别为 81.3±6.7、103.3±5.9、120.7±11.0, 与对照组相比差异有显著性 ($P<0.05$)。40 mg/L 4-MS 作用 12、24、36 h 后其早期凋亡率分别为 (2.36±0.19)%、(4.22±2.44)%、(7.34±0.56)%, 明显高于对照组 ($P<0.01$)。20、40 mg/L 4-MS 作用 48 h 后 hTERT mRNA 的表达量为 0.05±0.01 和 0.02±0.01, 明显低于对照组 ($P<0.01$)。结论 4-MS 能抑制人绒毛膜癌 JAR 细胞的增殖, 诱导凋亡, 其机制与提高细胞内 Ca^{2+} 浓度、降低 hTERT mRNA 的表达有关。

关键词: 4'-甲醚-黄芩素 (4-MS); JAR 细胞; 早期凋亡; 细胞内 Ca^{2+} 浓度; 人端粒酶逆转录酶 (hTERT)

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1203-04

Induction of 4'-methyl ether-scutellarein on apoptosis of human choriocarcinoma JAR cell

YANG Zui-su^{1,2}, LUO Li¹, ZHU Li-qun¹, QIU Li-li¹, XU Chang-fen¹

(1. Department of Histology and Embryology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

2. Medical College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibition and the mechanism of apoptosis inducement to the cell proliferation by 4'-methyl ether-scutellarein (4-MS) on human choriocarcinoma JAR cell line.

Methods The techniques of MTT assay, flow cytometry, laser scanning confocal microscopy (LSCM), and real-time quantitative PCR were used to study the effect of 4-MS on JAR cells *in vitro*. **Results** 4-MS had dose- and time-dependent inhibitory effects on proliferation of JAR cells. After the JAR cells were treated by 4-MS in different concentrations (10, 20, and 40 mg/L) for 72 h, the inhibitory rates were (14.14±0.75)%, (34.34±2.99)%, and (61.11±2.99)% ($P<0.01$), and the intracellular Ca^{2+} concentrations were 81.3±6.7, 103.3±5.9, and 120.7±11.0, with the significant difference compared to the control group ($P<0.05$), respectively. After the JAR cells were treated by 4-MS (40 mg/L) for 12, 24, and 36 h, the early apoptosis rates were (2.36±0.19)%, (4.22±2.44)%, and (7.34±0.56)%, much higher than that in the control group ($P<0.01$), respectively. After the JAR cells were treated by 4-MS (20 and 40 mg/L) for 48 h, the expressions of hTERT mRNA were 0.05±0.01 and 0.02±0.01, much lower than that in the control group ($P<0.01$). **Conclusion** The proliferation can be inhibited and the apoptosis of human choriocarcinoma JAR cell line can be induced by 4-MS. Its mechanism is related to the increase of intracellular Ca^{2+} concentration and the decrease of hTERT mRNA expression.

Key words: 4'-methyl ether-scutellarein (4-MS); JAR cell line; early apoptosis; intracellular Ca^{2+} concentration; human telomerase reverse transcriptase (hTERT)

绒毛膜癌为滋养细胞恶性肿瘤, 其破坏性强, 转移发生早, 对妇女的健康及生命危害极大。为寻找低毒、有效的抗绒毛膜癌药物, 本研究室对马鞭草 *Verbena officinalis* L. 抗绒毛膜癌 JAR 细胞进行

了系统的研究。前期的实验表明, 一定浓度的马鞭草醇提取液对 JAR 细胞具有明显的抑制作用, 并呈剂量依赖及时间依赖^[1]。醇提取液中有有效部位为氯仿萃取物, 命名为 C 部位, 能抑制 JAR 细胞增殖, 并

收稿日期: 2006-12-01

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2003104)

作者简介: 杨最素 (1967—), 女, 浙江定海人, 在职研究生, 讲师, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

Tel: (0580) 8285660 Fax: (0580) 2554781 E-mail: yzs@zjou.edu.cn

* 通讯作者 徐昌芬 Tel: (025) 86862904 E-mail: cfxu@njmu.edu.cn

促进细胞凋亡^[2,3]。4'-甲醚-黄芩素 (4'-methyl ether-scutellarein, 4-MS) 为马鞭草 C 部位中提取出的单体。为探讨 4-MS 对 JAR 细胞的作用, 本研究采用 MTT 法、激光共聚焦扫描显微镜 (LSCM)、流式细胞术和实时定量 PCR 法, 体外观察 4-MS 对 JAR 细胞的增殖抑制作用、诱导凋亡及细胞内 Ca^{2+} 浓度和人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) mRNA 表达的变化, 为抗绒毛膜癌中药的开发提供参考。

1 材料

1.1 细胞来源、药物与试剂: 人绒毛膜癌 JAR 细胞株, 由中国科学院上海细胞生物研究所提供。RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司) 加 20% 灭活的小牛血清 (杭州四季青生物工程公司), 内含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL。MTT 为美国 Fluka 公司产品。Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒 (Bio Vision Inc, 美国), 荧光探针 Flou-3/AM (Molecular probes, 美国)。Trizol 试剂 (Invitrogen Life Technologies), cDNA 合成试剂盒和定量 PCR 试剂盒 (Sybr Green PCR Kit) 均为美国 Promega 公司产品。PCR 引物由上海生物工程公司合成, 内参 β -actin 引物序列为: 上游 5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3', 下游 5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3', 扩增片段为 211 bp。hTERT mRNA 引物序列为: 上游 5'-CAGATTGCGCCATTGTTACCCC-3'; 下游 5'-TTTACTCCCACAGCACCTCCC-3', 扩增片段为 198 bp。4'-甲醚-黄芩素 (4-MS) 由江苏省中医药研究院提取, 其质量分数为 99%。

1.2 实验仪器: HERA cell 150 CO_2 培养箱 (德国 Heraeus 公司), 倒置相差显微镜 (Olympus), SunRise 酶标仪 (奥地利), 激光共聚焦扫描显微镜 (LSCM, LSM 150, 德国 Zeiss 公司), FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司), Rotor-Gene 3000 Realtime PCR 仪 (澳大利亚 Corbett Research 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养: JAR 细胞置于 RPMI-1640 培养液中, 37 °C、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养, 细胞呈单层贴壁生长, 0.25% 胰蛋白酶消化, 每 2~3 天传代 1 次, 实验时选用对数生长期细胞。

2.2 细胞形态观察: 6 孔培养板内放入盖玻片, JAR 细胞以 1×10^5 /mL 接种, 24 h 后换液, 设对照组及加药组, 在倒置显微镜下观察细胞形态的变化

并拍照。实验结束弃培养液, 用 95% 乙醇固定 10 min, 常规 HE 染色, 最后取盖玻片用中性树胶反面封于载玻片上, 光学显微镜下观察形态并拍照。

2.3 MTT 法: JAR 细胞以 1×10^4 /mL 接种至 96 孔板, 每孔 100 μL , 培养 24 h 后吸弃上清液。设对照组及 10、20、40 mg/L 4-MS 加药组, 每组设 3 个复孔, 分 24、48、72 h 共 3 个培养时间段。培养结束时弃上清, 加入 1 mg/mL MTT 100 μL , 继续培养 4 h, 吸弃 MTT, 加入 0.04 mol/L 盐酸-异丙醇 100 μL , 混匀, 酶标仪 570 nm 波长测定各孔吸光度 (A) 值, 重复实验 3 次。计算 4-MS 对 JAR 细胞的增殖抑制指数 (IR)。

$$\text{IR} = (\text{对照组 A 值} - \text{加药组 A 值}) / \text{对照组 A 值} \times 100\%$$

2.4 流式细胞仪检测早期凋亡: JAR 细胞以 1×10^6 /mL 接种于 25 mL 培养瓶中, 24 h 后换液。设对照组和加药组, 药物质量浓度为 20、40 mg/L, 培养时间为 12、24、36 h。检测方法按试剂盒说明书进行操作, 即培养结束时 0.25% 胰蛋白酶消化样品细胞, PBS 洗涤并悬浮细胞, 1 300 r/min 离心 5 min, 去上清后加试剂盒专用缓冲液 300 μL 振荡为细胞悬液, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀, 5 μL PI 振荡混匀, 暗室室温下孵育 5 min, 上机分析。流式细胞仪激发光波长为 488 nm, 每份标本收集 1×10^5 个细胞。

2.5 LSCM 测定细胞内 Ca^{2+} 浓度: 6 孔培养板内放入盖玻片, 接种 1×10^5 /mL 细胞, 培养 24 h 后换液, 培养时间与药物质量浓度同 MTT 法。操作方法按试剂盒说明书, 即取出盖玻片, PBS 液洗 2 次, 去除残留的营养液; 加入荧光染料 Flou-3/AM 以含钙 PBS 液调整浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$, 37 °C 温箱中孵育 30 min; 用 PBS 液洗 1~2 次, 洗去多余的染料。取盖玻片在 LSCM 下观察, 激发波长为 488 nm, 在 40 倍物镜下取任意 4 个视野, 根据荧光强度来反映细胞内 Ca^{2+} 的浓度。

2.6 hTERT mRNA 的检测: JAR 细胞接种 24 h 后, 分对照组和 20、40 mg/L 加药组, 继续培养 48 h, 分三步操作进行。按 Trizol 操作说明书提取总 RNA, 经分光光度计及电泳检测 RNA 的量、纯度与完整性。使用样品的 RNA 进行 cDNA 合成: 配制退火混合物和 RT 反应液, 加 10 μL RT 反应液到 10 μL 退火混合物中, 37 °C 水浴 60 min, 加热到 95 °C 维持 5 min, 得到的 RT 终溶液即为 cDNA 溶液, 置冰浴待用。最后以 cDNA 进行实时定量 PCR: 绘制标准曲线的梯度稀释 DNA 模板, 选择一个确

定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应,45 个 PCR 循环 (94 ℃、20 s;退火温度 72 ℃、30 s);72 ℃延伸 5 min。得到的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳确定为单一特异性扩增条带后进行 10 倍梯度稀释,然后进行 Real time PCR 反应,将梯度稀释的 cDNA 模板以及所有 cDNA 样品分别配制 Real time PCR 反应体系,于 Real time PCR 仪上进行 PCR 反应。反应条件为 β -actin:94 ℃、5 min;35 个 PCR 循环 (94 ℃、20 s;58 ℃、20 s;72 ℃、20 s;87 ℃收集荧光 10 s)。hTERT:94 ℃、5 min;35 个 PCR 循环 (94 ℃、20 s;58 ℃、20 s;72 ℃、20 s;86 ℃收集荧光 10 s)。最后根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线,样品目的基因 (hTERT mRNA) 和管家基因 (β -actin) 的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度与其管家基因的浓度比值,即为此样品此基因的校正后的相对水平。

表 1 4-MS 对 JAR 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 1 Inhibition of 4-MS on proliferation of JAR cells ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	$\rho/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	A 值			IR/%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照	—	0.71 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.02	—	—	—
4-MS	10	0.64 $\pm$ 0.04**	0.69 $\pm$ 0.02**	0.57 $\pm$ 0.02**	9.00 $\pm$ 3.75	9.98 $\pm$ 1.85	14.14 $\pm$ 0.75
	20	0.59 $\pm$ 0.02**	0.59 $\pm$ 0.01**	0.43 $\pm$ 0.02**	16.98 $\pm$ 1.33	24.36 $\pm$ 2.17	34.34 $\pm$ 2.99
	40	0.50 $\pm$ 0.02**	0.37 $\pm$ 0.01**	0.26 $\pm$ 0.02**	29.25 $\pm$ 2.16	51.73 $\pm$ 0.99	61.11 $\pm$ 2.99

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

3.3 流式细胞术检测结果:Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术可以将实验样本中正常、坏死和凋亡细胞等区分开。从表 2 可以看出随着作用时间和药物剂量的增加,早期凋亡细胞明显增加,差异非常显著 ($P<0.01$)。

表 2 4-MS 对 JAR 细胞早期凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of 4-MS on early apoptosis rate of JAR cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	$\rho/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	早期凋亡率/%		
		12 h	24 h	36 h
对照	0	1.68 $\pm$ 0.12	1.76 $\pm$ 0.12	1.86 $\pm$ 0.87
4-MS	20	1.96 $\pm$ 0.80**	3.21 $\pm$ 0.18** $\triangle\triangle$	5.95 $\pm$ 0.28** $\triangle\triangle$
	40	2.36 $\pm$ 0.19**	4.22 $\pm$ 2.44** $\triangle\triangle$	7.34 $\pm$ 0.56** $\triangle\triangle$

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与同组 12 h 比较: $\triangle\triangle P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; $\triangle\triangle P<0.01$ vs 12 h in same group

group

3.4 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化:Fluo-3/AM 荧光指示剂能与 Ca^{2+} 结合,它的荧光强度代表 Ca^{2+} 浓度。经 LSCM 检测显示,经不同质量浓度的 4-MS 作用后,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,呈剂量依赖性,与对照组比较差异显著。结果见表 3。

2.7 统计学处理:所有数据均采用 SPSS 11.5 for Windows 统计软件进行单因素方差分析。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

3 结果

3.1 JAR 细胞形态学改变:倒置显微镜下观察 JAR 细胞呈多边形,排列紧密,边界清楚,饱满。加入药物后,细胞体积缩小,胞体变圆,细胞周围有数个小突起,细胞间隙模糊,生长缓慢,细胞贴壁能力下降,部分细胞漂浮于培养液中。HE 染色观察,细胞形态基本一致,呈多边形,细胞核大小不一,呈圆形或卵圆形,核浆比例高;用药后细胞形态不规则,异形性明显,部分细胞质出现大小数目不等的空泡,细胞轮廓模糊,巨核细胞增多,染色质凝聚,核固缩。

3.2 MTT 法:JAR 细胞经 4-MS 作用后,呈现出增殖的抑制现象,且随药物质量浓度的增加和作用时间的延长,IR 明显上升。结果见表 1。

表 3 4-MS 对 JAR 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of 4-MS on concentration of intracellular Ca^{2+} in JAR cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	$\rho/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	荧光强度		
		24 h	48 h	72 h
对照	0	49.3 $\pm$ 4.0	57.0 $\pm$ 14.8	55.7 $\pm$ 8.0
4-MS	10	57.7 $\pm$ 13.2*	76.3 $\pm$ 2.1* $\triangle$	81.3 $\pm$ 6.7* $\triangle$
	20	84.0 $\pm$ 11.5*	86.7 $\pm$ 10.7* $\triangle$	103.3 $\pm$ 5.9* $\triangle$
	40	90.7 $\pm$ 10.7*	111.3 $\pm$ 10.0* $\triangle$	120.7 $\pm$ 11.0* $\triangle$

与对照组比较: * $P<0.05$; 与同组 24 h 比较: $\triangle P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; $\triangle P<0.05$ vs 24 h in same group

3.5 hTERT mRNA 的表达:实时定量 PCR 通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团 Sybr Green I,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行相对定量。4-MS 作用 JAR 细胞的 hTERT mRNA 相对水平见表 4,作用时间越长,剂量越大,hTERT mRNA 相对水平越少,差异具有显著性 ($P<0.01$)。

4 讨论

绒毛膜癌是一种对化疗药物敏感的实体肿瘤,但化疗药物的不良反应和多药耐药的产生常导致治

表 4 4-MS 作用 JAR 细胞后 hTERT mRNA 表达
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Expression of hTERT mRNA in JAR cells
after treated by 4-MS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	hTERT mRNA 表达水平	
		24 h	48 h
对照	0	0.57 ± 0.04	0.48 ± 0.06
4-MS	20	$0.25 \pm 0.01^*$	$0.05 \pm 0.01^*$
	40	$0.07 \pm 0.01^*$	$0.02 \pm 0.01^*$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

疗的失败^[4]。马鞭草系马鞭草科马鞭草属植物,马鞭草有效 C 部位能抑制 JAR 细胞增殖,阻滞细胞在 G₂/M 期,诱导凋亡,其机制可能与 FasL 的表达下调,Bax 表达水平增加和 Bcl-2 表达水平下降有关^[2,3]。本研究室从有效 C 部位中提取出了单体化合物 4-MS,该单体在黄酮类化合物中尚未见报道。应用 MTT 法表明该单体对 JAR 细胞具有明显的增殖抑制作用,并与药物质量浓度有剂量效应关系。

Annexin V-FITC/PI 流式细胞仪法是目前检测细胞凋亡和区分坏死细胞特异性较好的方法。正常活细胞带负电的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 定位于细胞膜的内侧,在细胞凋亡的早期,由于细胞膜失去极性,PS 从胞膜内侧暴露于胞膜外,可特异结合标记有异硫氰酸荧光素 (FITC) 的连接素 V (Annexin V) 而呈 Annexin V-FITC⁺/PI⁻。PS 的外翻是细胞凋亡早期的一个重要标志,也是细胞早期凋亡不可逆的特征,早于染色体凝聚和 DNA 断裂的发生^[5]。继发性坏死或凋亡晚期细胞要同时结合 Annexin V-FITC 和 PI 而呈双阳性 (Annexin V-FITC⁺/PI⁺)。从本实验中可以看出,JAR 细胞经 4-MS 作用 12 h 后出现少量的早期凋亡细胞,但随着作用时间和药物质量浓度的增加,凋亡细胞逐渐增加,由此说明 4-MS 抑制 JAR 细胞增殖,其机制与诱导 JAR 细胞凋亡有关。

诱导细胞凋亡的细胞外刺激必须通过细胞信号的传递才能发挥作用,信号传导通路已成为抗肿瘤药物研究的新热点。Ca²⁺作为信号传导过程中重要的信号分子,是各条信号传导途径的枢纽,病理状态下细胞内钙超负荷将造成一系列代谢紊乱,直至细胞坏死或凋亡^[6,7]。正常状态下细胞内游离钙的量很低,主要存在于细胞外。细胞内 Ca²⁺浓度增高可激活内源性内切酶,导致 DNA 在核小体间降解,从而阻断细胞生长周期的运行及促进细胞凋亡。本实验将 4-MS 作用于 JAR 细胞,引起细胞内 Ca²⁺浓度

上升,同时细胞的生长受到抑制,并出现凋亡,提示 4-MS 通过升高细胞内 Ca²⁺浓度引起细胞凋亡。对于 Ca²⁺浓度升高后引起的具体信号传导途径的改变有待于进一步的研究。

近来的研究表明,端粒酶的激活与肿瘤的发生密切相关,端粒酶是恶性肿瘤诊断的标志物和治疗的新靶点^[8]。人类端粒酶主要由 3 部分组成,包括人端粒酶 RNA、端粒酶相关蛋白和人端粒酶逆转录酶 (hTERT)。在端粒酶活性调节机制中,hTERT 是活性的限速步骤和决定因素^[9]。众多的实验研究都证实中药可抑制肿瘤端粒酶活性而发挥抗肿瘤作用^[10,11]。通过实时定量 PCR 检测,发现对照组 hTERT mRNA 的相对水平明显高于加药组,作用时间越长,剂量越大,下降越明显,进一步说明 4-MS 通过抑制 hTERT 的表达进而降低端粒酶活性而诱导 JAR 细胞的凋亡。

综上所述,4-MS 可抑制人绒毛膜癌 JAR 细胞的增殖,随着作用时间的延长、药物剂量的增加,IR 和早期凋亡细胞逐渐增加,其机制与提高细胞内 Ca²⁺浓度和降低 hTERT mRNA 的表达有关。

References:

- [1] Xu S, Jiao Z X, Xu X J, et al. Effects of alcohol extract of *Verbena officinalis* on proliferation and EGFR expression of choriocarcinoma JAR cells [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2000, 31(4): 281-284.
- [2] Zhang L P, Xia B L, Luo L, et al. The studies on the part C of *Verbena officinalis* induced human choriocarcinoma JAR cells apoptosis and its molecular mechanism *in vitro* [J]. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 2005, 32(19): 1089-1092.
- [3] Wang J J, Luo L, Zhang L P, et al. Effect of *Verbena officinalis* C on inhibiting secretion of hCG and intriguing apoptosis of JAR cell [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35(6): 569-572.
- [4] Yang J J, Xiang Y, Wan X R, et al. Analysis of death causes of gestational trophoblastic neoplasia patients [J]. *Chin J Obstet Gynecol* (中华妇产科杂志), 2006, 41(6): 403-407.
- [5] Tao D D, Leng Y, Qin J C, et al. Analysis of cell cycle specific apoptosis by FITC-Annexin V/PI [J]. *Chin J Lab Med* (中华检验医学杂志), 2002, 25(2): 78-81.
- [6] Scorrano L, Oakes S A, Opferman J T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis [J]. *Science*, 2003, 300: 135-139.
- [7] Ferrari D, Pinton P, Szabadkai G, et al. Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis [J]. *Cell Calcium*, 2002, 32: 413-420.
- [8] Pendino F, Tarkanyi I, Dudognon C, et al. Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies? [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006, 6(2): 147-180.
- [9] Elkak A E, Meligoni G, Salhab M, et al. hTERT Protein expression is independent of clinicopathological parameters and c-Myc protein expression in human breast cancer [J]. *J Carcinogenesis*, 2005, 4: 4-17.
- [10] Noguchi M, Yokoyama M, Watanabe S, et al. Inhibitory effect of the tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate on growth of cervical adenocarcinoma cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2006, 234(2): 135-142.
- [11] Guo J M, Kang G Z, Xiao B X, et al. Effect of daidzein on cell growth, cell cycle, and telomerase activity of human cervical cancer *in vitro* [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2004, 14(5): 882-888.