

长春新碱对人胃癌 BGC 细胞增殖与凋亡的影响及其机制

陈通克¹, 汤陌生^{2,3}, 姜程曦^{3,4}, 曾碧新^{2*}

1. 温州医科大学 实验动物中心, 浙江 温州 325035
2. 温州医科大学信息与工程学院, 浙江 温州 325035
3. 温州医科大学附属第六医院, 浙江 丽水 323000
4. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

摘要: 目的 通过体内外水平研究长春新碱对人胃癌 BGC 细胞增殖与凋亡的影响及其机制。方法 采用 MTS 法检测人胃癌 BGC 细胞的增殖情况; 采用 Hoechst 荧光染色法、流式细胞技术检测细胞凋亡和细胞周期的情况; 通过 Western blotting 法检测 BGC 细胞内增殖、周期和凋亡相关蛋白表达情况; 荷瘤裸鼠实验检测长春新碱抑制胃癌生长情况。结果 长春新碱明显抑制 BGC 细胞的生长, 其抑制率与药物浓度呈剂量和时间相关性, 将细胞周期阻滞于 G₁ 期, 并促进其凋亡, 下调了细胞增殖和周期相关蛋白 p-FAK、FAK、E2F1、CyclinE2、CyclinD2、CDK2、CDK6 的表达, 并激活了凋亡相关蛋白 Caspase-3。荷瘤裸鼠实验显示长春新碱能明显抑制胃癌生长。结论 长春新碱通过下调细胞增殖与周期相关蛋白的表达, 使细胞周期在 G₁ 期阻滞, 同时激活 Caspase-3 诱导细胞的凋亡。

关键词: 长春新碱; 胃癌; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)05-0703-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.015

Effect of vincristine on proliferation inhibiting and apoptosis inducing on BGC cells and study on their mechanisms

CHEN Tong-ke¹, TANG Mo-sheng^{2,3}, JIANG Cheng-xi^{3,4}, ZENG Bi-xin²

1. Laboratory Animal Centre, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China
2. College of Information and Engineering, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China
3. The Sixth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Lishui 323000, China
4. College of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective The effect and possible mechanism of vincristine on human gastric cancer cell BGC were investigated in *in vitro* and *in vivo* experiments. **Methods** MTS and Hoechst assay was used to evaluate the effects of vincristine on human gastric cancer cell proliferation and apoptosis, respectively. The proliferation of BGC cells was examined by cell proliferation assay; The apoptosis of BGC cells was assayed by Hoechst and flow cytometry; Cell cycle analysis was performed by flow cytometry. The expression level of cell proliferation, cell cycle, and apoptosis related proteins was determined by Western blotting. The treatment effect of vincristine was analyzed in nude mice. **Results** MTS and Hoechst assay showed vincristine could inhibit the growth of BGCs and promote the apoptosis of BGCs both in time-dependent and dose-dependent manners. The apoptosis rate of BGCs cells increased gradually and the cell cycle was arrested in G₁ phase after treated with vincristine. Vincristine could downregulate the expression of phosphorylated-FAK, FAK, E2F1, CyclinE2, CyclinD2, CDK2, CDK6, and activate apoptosis-related protein Caspase-3. Vincristine could suppress the growth of human gastric cancer in nude mice. **Conclusion** Vincristine could inhibit the proliferation and induce the G₁-arrest of BGC cells through its downregulation of cell proliferation and cell cycle related proteins and it also promotes the apoptosis of BGC cells through the activation of Caspase-3.

Key words: vincristine; gastric cancer; cell proliferation; cell cycle; apoptosis

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2011BAI04B04); 浙江省科技计划资助项目(2014C37006); 温州市科技计划资助项目(Y20140217)

作者简介: 陈通克(1982—), 男, 实验师, 硕士, 研究方向为药物新剂型的研究。Tel: 13736326845 Fax: (0577)86689908 E-mail: dry136@163.com

*通信作者 曾碧新, 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事药物对疾病诊断研究。Tel: 13567790933 Fax: (0577)86689908 E-mail: zbx@wzmc.edu.cn

胃癌是世界上第二大癌症死因,我国的胃癌发病率和死亡率均是世界平均水平两倍多,是最高国家之一^[1-2]。目前临床治疗胃癌的方法主要包括手术治疗、化学治疗、放射治疗等^[3-7]。常用的化疗试剂,如烷化剂、氮芥和代谢拮抗剂能有效地抑制肿瘤的生长^[8-10],但是不同的化疗药物对于胃癌的作用机制各不相同。

长春新碱是从长春花中提取的很重要的二聚吲哚类生物碱,具有很强的抗癌效果。近年来发现,长春新碱对宫颈癌^[11]、肺癌^[12]、结肠癌^[13]、乳腺癌^[14]等均有一定的抑制生长及诱导凋亡的作用,但目前针对长春新碱是否能影响人胃癌细胞增殖与凋亡的研究较少。本研究首先用不同质量浓度的长春新碱对人胃癌 BGC 细胞处理不同时间后,通过 MTS 法检测药物对 BGC 细胞增殖的影响;通过 Hoechst、流式细胞技术检测不同质量浓度长春新碱对细胞周期及凋亡的影响;采用 Western blotting 技术检测不同浓度长春新碱处理后 BGC 细胞中增殖、周期以及凋亡相关蛋白的表达情况。通过人胃癌裸鼠动物模型,研究长春新碱体内对胃癌生长抑制能力。以此初步阐明长春新碱影响胃癌细胞增殖及凋亡进程的调节机制,为长春新碱用于胃癌的临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验对象

人胃癌细胞系 BGC 购于中国典型培养物保藏委员科学院细胞库, Balb/c-nu 裸鼠(6 周龄)购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物生产许可证号 SCXK(沪)2012-0002。

1.2 试剂和仪器

注射用硫酸长春新碱(批号 130602)购于浙江海正药业股份有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、0.05% Trypsin-EDTA 均购于 Invitrogen 公司, MTS 细胞增殖分析试剂购于 Promega 公司,流式细胞仪及细胞周期检测试剂均购于 BD 公司, 蛋白抗体购于 Cell Signaling Technology 公司, 硝酸纤维素膜购于 GE 公司, Hoechst 试剂购于碧云天生物技术有限公司; SpectraMax M5 酶标仪购于 Molecular Devices 公司, Axiovent 40C 倒置显微镜和 Axiovent 200 荧光显微镜均购于 Carl Zeiss。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人胃癌细胞系 BGC 细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养液,置 37 °C、5% CO₂ 培

养箱中培养,细胞接近融合时用胰蛋白酶消化传代,同时接种细胞进行实验。

1.3.2 细胞形态学观察 将对数生长期的 BGC 细胞接种到 96 孔板中, 8×10^3 /孔, 每个实验组有 6 个复孔, 24 h 后细胞长至 60% 左右, 用生理盐水将长春新碱稀释不同质量浓度(0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 进行加药, 空白对照组不加生理盐水和药物, 阴性对照组加相同体积的生理盐水, 加药 24 h 后将细胞置于显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 细胞增殖实验 将对数生长期的 BGC 细胞接种到 96 孔板中, 8×10^3 /孔, 每个实验组有 6 个复孔, 24 h 后细胞长至 60% 左右, 质量浓度、加药方式同“1.3.2”项, 加药 24、48、72 h 后将细胞培养液换成无血清培养液 100 μL /孔, 加入 20 μL MTS 混合液 [PMS-MTS (1:20)], 37 °C 孵育 1 h 后, 用酶标仪在 490 nm 波长下读取吸光度(A)值, 计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率=(阴性对照组 A 值-实验组 A 值)/阴性对照组 A 值

1.3.4 Hoechst 荧光染色观察药物诱导细胞凋亡情况 将贴壁细胞以 2×10^4 /孔接种到 48 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后细胞长至 60% 左右进行加药, 质量浓度、加药方式同“1.3.2”项; 加药 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min; 去固定液, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min, 吸尽液体, PBS 清洗后, 加 Hoechst 染色液, 室温染色 10 min 后吸尽染液; 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min; 清洗后每孔加入适量的荧光淬灭剂, 在荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 将对数生长期的 BGC 细胞接种到 6 孔板中, 24 h 后加药, 质量浓度、加药方式同“1.3.2”项, 加药 24 h 后收集细胞, 70% 乙醇 4 °C 固定过夜, 碘化丙啶(PI)4 °C 避光染色 30 min, 400 目滤布滤过, 流式细胞仪检测细胞周期分布, 每样品获取 30 000 个细胞, Modfit 软件分析细胞周期各时期以及凋亡细胞的百分率。

1.3.6 Western blotting 检测细胞内相关蛋白的表达情况 将 BGC 细胞接种到 6 孔板中, 24 h 后加药, 加药质量浓度为 0.5、5、50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 阴性对照组和空白对照组同“1.3.2”项, 加药 24 h 后收集细胞, 用 RIPA 裂解液提取各实验组细胞的总蛋白, 蛋白溶液与上样缓冲液混合后进行 10% SDS-PAGE 电泳, 将电泳分离后的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,

用5%脱脂奶粉-PBST封闭液室温封闭3 h, 用1:800稀释的一抗混合液4℃孵育过夜, 用1:2000稀释的HRP标记的二抗混合液室温孵育2 h, 最后在暗室进行化学发光和显影。

1.3.7 体内肿瘤生成实验 将裸鼠饲养在严格的SPF级环境中, 将人胃癌BGC细胞接种至6周龄雌性裸鼠的背部脊柱右侧, 每侧注射细胞 6×10^6 个, 待肿瘤体积达到 100 mm^3 时, 将符合要求的裸鼠12只随机分成2组, 每组6只, 给药组隔天相同时间尾iv给药, 给药3次, 给药剂量为 $0.8 \text{ mg/kg}^{[15]}$, 阴性对照组给相同体积生理盐水, 分别于给药后第3、6、9、12、15、17天用游标卡尺测量肿瘤长径

与短径, 计算肿瘤体积 $[V=(\text{长径} \times \text{短径}^2)/2]$, 并观察裸鼠的生存状况。给药17 d后处死。

1.3.8 统计方法 所有数据均采用SPSS 10.0统计软件处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计学分析。

2 结果

2.1 长春新碱对BGC细胞形态的影响

不同质量浓度长春新碱(0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)处理BGC细胞24 h后, 显微镜下观察发现, 空白对照组和阴性对照组细胞贴壁良好, 形态规则饱满, 随着加药浓度增加, 细胞变圆, 变亮, 悬浮细胞增多, 细胞数也逐渐减少(图1)。

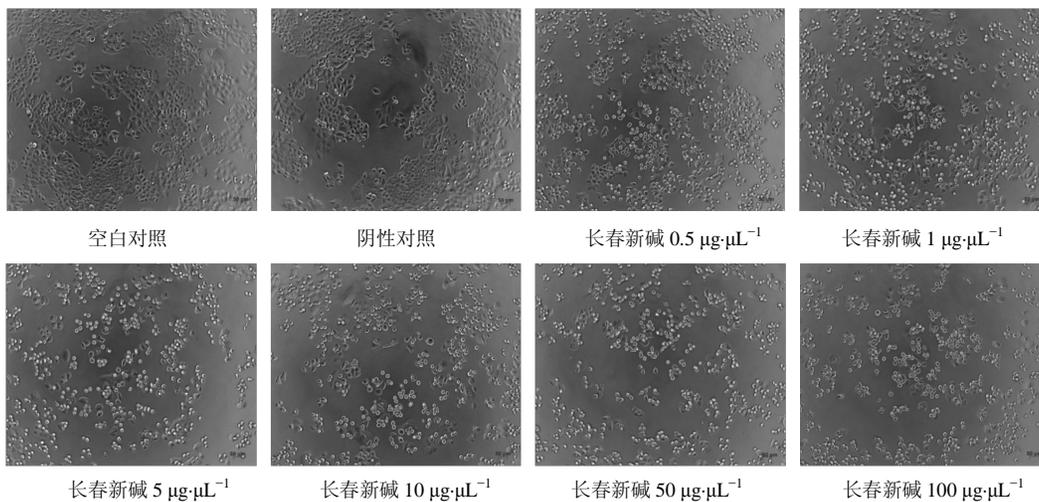


图1 不同质量浓度长春新碱对BGC细胞形态的影响

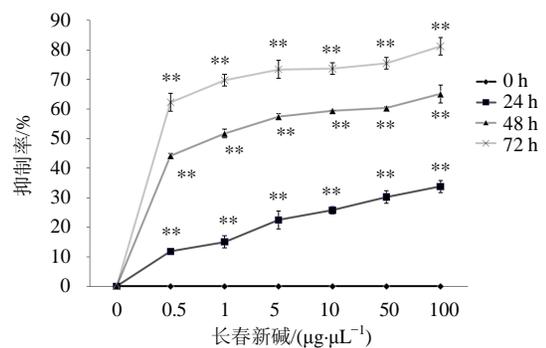
Fig. 1 Effect of vincristine at different concentration on cellular morphology of BGC cells

2.2 不同质量浓度长春新碱处理不同时间后BGC细胞增殖情况

与阴性对照组相比, 不同质量浓度长春新碱(0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)处理BGC细胞24、48、72 h后, 细胞增殖受到明显抑制($P < 0.01$), 其抑制作用具有剂量和时间相关性(图2), 且随着作用时间的增加, 细胞抑制率不断的增加。结果表明, 长春新碱对BGC细胞增殖具有明显的抑制效果, 并呈现时间和剂量的相关性。

2.3 长春新碱诱导细胞凋亡情况

将不同质量浓度长春新碱(0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)处理BGC细胞24 h后, 通过Hoechst染色实验结果显示(图3), 随着长春新碱质量浓度的增加, BGC细胞呈逐步减少的趋势, 且变化具有统计学意义($P < 0.05$), 在质量浓度大于 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时细胞减少量较明显。Hoechst染色后, 活细胞核呈弥



与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs negative control group

图2 MTS法检测不同质量浓度长春新碱处理不同时间后BGC细胞增殖情况($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 MTS determination of BGC cell proliferation treated by vincristine at different concentration in different times ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

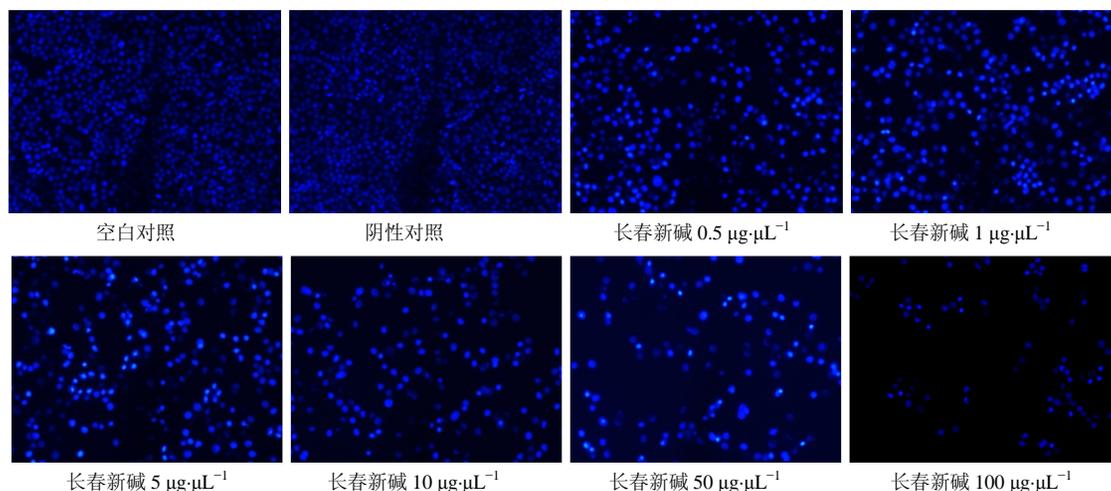


图 3 Hoechst 荧光染色观察长春新碱诱导细胞凋亡情况

Fig. 3 Hoechst fluorescence staining assay on apoptosis induced by vincristine

散均匀荧光，而细胞凋亡时，细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光。从图 3 可以看出，随着长春新碱浓度的不断增加，凋亡细胞数不断增加。

2.4 不同质量浓度长春新碱处理后 BGC 细胞周期及凋亡情况

流式细胞仪检测结果显示(图 4)，与空白对照组和阴性对照组相比，经不同质量浓度长春新碱(0.5、1、5、10、50、100 μg/μL)处理 24 h 后，细胞周期明显被阻滞在 G₁ 期，并且随着药物质量浓

度的增加细胞凋亡也明显增加。

2.5 不同质量浓度长春新碱处理后细胞内相关蛋白的表达情况

Western blotting 结果显示，随着长春新碱质量浓度的增加，Caspase-3 被激活而发生裂解生成的活性片段增加，细胞增殖以及周期相关蛋白 p-FAK、FAK、E2F1、CyclinE2、CyclinD2、CDK2、CDK6 的表达量也下调(图 5)。长春新碱是通过激活细胞内凋亡蛋白 Caspase-3 的活化，抑制增殖蛋白 p-FAK、FAK

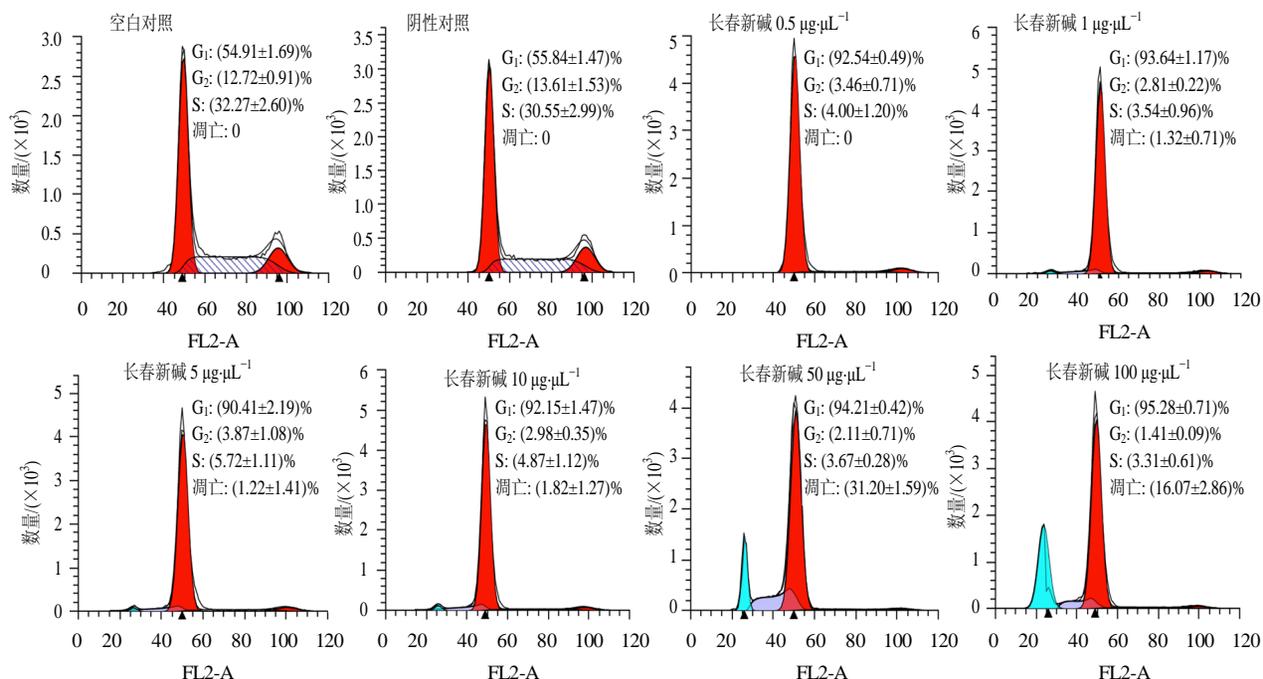


图 4 不同质量浓度长春新碱处理后 BGC 细胞周期及凋亡情况

Fig. 4 Effect of vincristine at different concentration on cell cycle and apoptosis of BGC cells

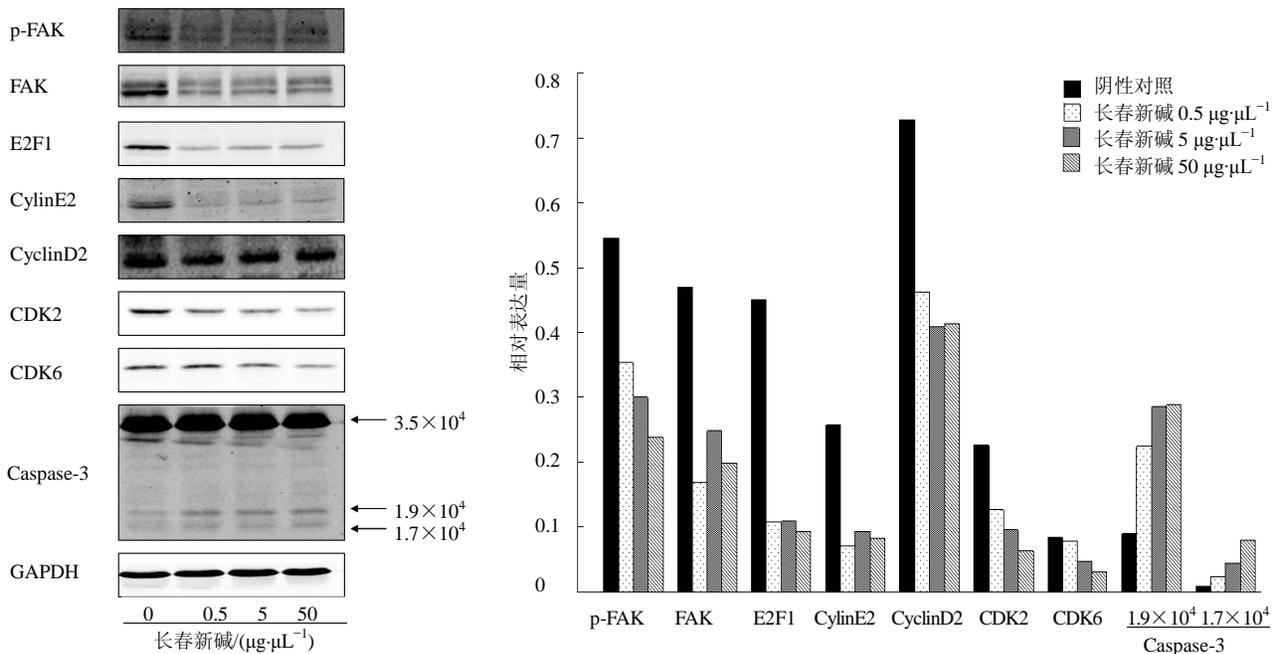


图 5 不同浓度长春新碱处理 24 h 后 BGC 细胞内蛋白表达情况及半定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Protein expression and semi-quantitative analysis of BGC cells after 24 h treatment by vincristine at different concentration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

的表达来抑制 BGC 细胞的增殖，同时通过抑制细胞周期相关蛋白 E2F1、CylinE2、CyclinD2、CDK2、CDK6 的表达来抑制 BGC 细胞的增殖。

2.6 长春新碱抑制荷瘤裸鼠肿瘤情况

结果显示，长春新碱能有效抑制肿瘤的生长，肿瘤体积与阴性对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)，见图 6。

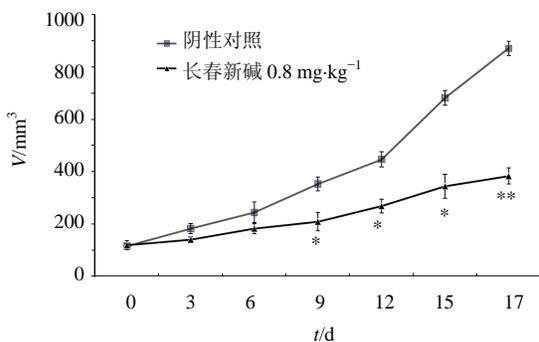
3 讨论

胃癌是世界上第二大癌症死因，是威胁人类健

康最常见的恶性肿瘤之一。化疗在胃癌综合治疗中占据着重要地位，长春新碱在化疗药物中属于常用药物，但是长春新碱对人胃癌 BGC 细胞的相关报道比较少。长春新碱是作用于细胞周期的一种特异性药物，通常在 S 期能通过微管蛋白结合，阻断细胞周期，进而抑制肿瘤细胞的增殖^[16-17]。长春新碱在其他方面也有显著的作用，如其可以影响细胞核酸或蛋白质代谢功能进而抑制细胞增殖诱导多种恶性肿瘤细胞发生凋亡。

本研究发现人胃癌细胞 BGC 在不同质量浓度长春新碱作用后，细胞形态发生了明显变化，细胞变圆、变亮，悬浮细胞增多，贴壁细胞数也逐渐减少，给药浓度越高，效果就越明显。从细胞形态观察，长春新碱具有抑制 BGC 细胞增殖、促进其凋亡的作用。

通过 MTS 法检测不同质量浓度长春新碱处理不同时间后 BGC 细胞的增殖情况发现， $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的长春新碱处理 BGC 细胞 48 h 后，细胞生长抑制率就达到 44%，且随着长春新碱给药浓度的增加，处理时间的延长，细胞生长抑制率逐渐升高。该实验结果显示，长春新碱能显著抑制 BGC 细胞的增殖，且抑制效果呈剂量和时间相关性。通过 Hoechst 染色实验结果显示，不同质量浓度长春新碱处理



与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs negative control group

图 6 长春新碱对 BGC 荷瘤裸鼠肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of vincristine on volume of tumors in BGC-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

BGC 细胞 24 h 后, 细胞出现明显的凋亡现象, 随着药物质量浓度的升高, 凋亡细胞也明显增加。通过流式细胞技术检测发现, 长春新碱将 BGC 细胞周期阻滞在 G₁ 期, 且阻滞效果显著, 不过低质量浓度和高质量浓度的长春新碱对细胞的周期的阻滞效果没有出现剂量相关性。同时该检测结果显示, 高质量浓度的长春新碱可以促进细胞凋亡的发生, 该结果与 Hoechst 染色实验结果显示一致。

为了进一步研究长春新碱抑制 BGC 细胞增殖、促进其凋亡的作用机制, 本实验收集了 0.5、5、50 μg/μL 长春新碱处理 24 h 后的 BGC 细胞, 检测了细胞增殖、周期、凋亡相关蛋白的表达情况。

FAK 是一种非受体酪氨酸蛋白激酶, 它在许多肿瘤中表达上调, 且通过多条信号通路参与细胞增殖、迁移和凋亡等生物学过程, 在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。本研究发发现长春新碱处理后, BGC 细胞中的 FAK 及 p-FAK 的表达明显下调。

细胞的增殖与细胞周期进程密切相关, 细胞周期是指亲代细胞分裂结束到子代细胞分裂结束所经历的过程, 由 G₁、S、G₂ 和 M 期组成 (G₁、S 和 G₂ 期又合称为分裂间期)^[18]。细胞周期时间的长短主要由 G₁ 期决定。根据流式细胞仪结果显示长春新碱能使 BGC 细胞大部分滞留在 G₁ 期, 这可能是使 BGC 细胞增殖受到抑制的原因之一。本实验检测了与 G₁ 期进程密切相关蛋白的表达情况, 发现 E2F1、CylinE2、CyclinD2、CDK2、CDK6^[19-22] 在长春新碱处理后的 BGC 细胞中表达出现不同程度的下调。

细胞相关的凋亡蛋白 Caspases 是一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶, Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 在细胞凋亡中起着不可替代的作用^[23-24]。正常情况下, 胞质中的 Caspase-3 以无活性的酶原形式存在, 当细胞发生凋亡时, 它将被激活切割形成有活性的 Caspase-3。Western blotting 结果显示, 长春新碱是通过激活细胞内凋亡蛋白 Caspase-3, 从而促进细胞凋亡。

通过建立人胃癌细胞 BGC 的裸鼠模型, 在体内研究长春新碱抑制荷瘤裸鼠肿瘤情况, 结果发现 0.8 mg/kg 的长春新碱能显著抑制肿瘤的生长。

综上所述, 长春新碱抑制人胃癌细胞 BGC 增殖、促进细胞凋亡的可能分子机制为通过下调 FAK 及 p-FAK 的表达抑制细胞的增殖, 促进细胞的凋亡; 同时长春新碱还抑制与 G₁ 期进程密切相关蛋白

E2F1、CylinE2、CyclinD2、CDK2、CDK6 的表达量, 使大量细胞的细胞周期滞留在 G₁ 期, 从而抑制了细胞增殖的进程; 而且长春新碱激活了细胞内凋亡蛋白 Caspase-3, 从而加速了细胞凋亡的进程。阐明长春新碱在胃癌细胞增殖与凋亡过程中的调控机制, 有助于为该疾病在临床上治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Bang Y J, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2010, 376(9742): 687-697.
- [2] 邹小农, 孙喜斌, 陈万青, 等. 2003—2007 年中国胃癌发病与死亡情况分析 [J]. *肿瘤*, 2012, 32(12): 109-114.
- [3] Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(6): 447-464.
- [4] Dhar S, Kolishetti N, Lippard S J, et al. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 1850-1855.
- [5] Moore T A, Berger A M, Dizona P. Sleep aid use during and following breast cancer adjuvant chemotherapy [J]. *Psycho-Oncol*, 2011, 20(3): 321-325.
- [6] Rejinold N S, Muthunarayanan M, Chennazhi K P, et al. Curcumin loaded fibrinogen nanoparticles for cancer drug delivery [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, 7(4): 521-534.
- [7] Zhang G, Zeng X, Li P. Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9(5): 741-750.
- [8] Cho K, Wang X, Nie S, et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1310-1316.
- [9] Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: The potential of nanomedicine [J]. *Nanomedicine*, 2010, 7(4): 597-615.
- [10] Kohanski M A, DePristo M A, Collins J J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis [J]. *Mol Cell*, 2010, 37(3): 311-320.
- [11] Fu J H, Gao Z, Ren C C, et al. Comparison of clinical efficacy of three different neoadjuvant approaches (chemotherapy combined vaginal intracavitary irradiation, neoadjuvant chemotherapy alone or radiotherapy) combined with surgery for patients with stage Ib2 and Ila2 cervical cancer [J]. *Asian Pac J Cancer*

- Prev*, 2013, 14(4): 2377-2381.
- [12] Von Pawel J, Schiller J H, Shepherd F A, *et al.* Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(2): 658-667.
- [13] Moon J W, Lee S K, Lee J O, *et al.* Demethylation of RUNX3 by vincristine in colorectal adenocarcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(1): 133-140.
- [14] Esmaeili-Mahani S, Falahi F, Yaghoobi M M. Proapoptotic and antiproliferative effects of *Thymus caramanicus* on human breast cancer cell line (MCF-7) and its interaction with anticancer drug vincristine [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, doi: 10.1155/2014/893247.
- [15] 卢 懿. 抗恶性淋巴瘤中药成分长春新碱透皮靶向给药系统及其转运机理的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [16] Novotny N M, Markel T A, Crisostomo P R, *et al.* Differential IL-6 and VEGF secretion in adult and neonatal mesenchymal stem cells: role of NF- κ B [J]. *Cytokine*, 2008, 43(2): 215-219.
- [17] Lecland N, Lüders J. The dynamics of microtubule minus ends in the human mitotic spindle [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(8): 770-778.
- [18] Viallard J F, Lacombe F, Belloc F, *et al.* Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology [J]. *Cancer Radiother*, 2001, 5(2): 109-129.
- [19] Boxem M, van den Heuvel S. Lin-35 Rb and cki-1 Cip/Kip cooperate in developmental regulation of G1 progression in *C. elegans* [J]. *Development*, 2001, 128(21): 4349-4359.
- [20] Van den Heuvel S. Cell-cycle regulation [J]. *Worm Book*, 2005, 21: 1-16.
- [21] Nishida N, Fukuda Y. Tumor suppressor RB gene and its related molecules in hepatocellular carcinoma [J]. *Nihon Rinsho*, 2001, 59(S6): 134-137.
- [22] 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(3): 131-149.
- [23] Barrezueta L F, Oshima C T, Lima F O, *et al.* The intrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas of Brazilian patients: Immuno- expression of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bak, Bax, Bad) determined by tissue microarray analysis [J]. *Mol Med Report*, 2010, 3(2): 261-267.
- [24] Xu J D, Cao X X, Long Z W, *et al.* BCL-2 L10 protein regulates apoptosis / proliferation through differential pathways in gastric cancer cells [J]. *J Pathol*, 2011, 223(3): 400-409.