

Blf-ADT对HeLa细胞的抑制作用及其机制的研究

王倩*, 潘望, 李伟*, 肖志一, 潘黎黎, 绪广林

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 研究 Blf-ADT(布洛芬硫化氢供体物)的抗肿瘤作用,并对其进行初步探讨.通过形态学观察、噻唑蓝(MTT)比色实验、集落形成实验测定 HeLa 细胞的增殖能力;细胞划痕实验测定 HeLa 细胞的迁移能力;Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪测定 HeLa 细胞的凋亡率;Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、Erk、P38 和 Procaspase-3 等)的表达.结果显示,Blf-ADT 能呈浓度或时间依赖性抑制细胞增殖、减少细胞集落的形成,降低细胞的迁移能力,同时能显著提高 HeLa 细胞的凋亡率,影响细胞凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、Erk、P38 和 Procaspase-3 等)的表达. Blf-ADT 对宫颈癌 HeLa 细胞的生长有显著的抑制作用,对治疗宫颈癌具有潜在的临床应用价值.

[关键词] HeLa, Blf-ADT, 细胞增殖, 细胞凋亡, 抗肿瘤作用

[中图分类号] Q4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)01-0067-06

Study on Anti-Tumor Activity and Mechanisms of Blf-ADT

Wang Qian, Pan Wang, Li Wei, Xiao Zhiyi, Pan Lili, Xu Guanglin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: The purpose of this study was to observe the activity and mechanisms of a new compound Blf-ADT on HeLa cells. The effects of Blf-ADT on HeLa cells was investigated by morphological observation, MTT assay and colony formation assay, respectively. Wound healing assay was used to detect the effect of Blf-ADT on the migration of HeLa cells. Meanwhile, the activities of Blf-ADT on apoptosis was measured by Flow cytometry. Furthermore, Western blot was performed to investigate the expressions of related proteins in HeLa cell line treated with Blf-ADT. As a result, we found that Blf-ADT could inhibit cell proliferation and reduce cell migration in a dose- and time-dependent manner. In addition, Blf-ADT could significantly increase the rate of apoptosis and affect the expression of apoptosis-related proteins. Taken together, the data indicate that Blf-ADT can significantly inhibit the growth of HeLa cells and have potential clinical value for treatment of cervical cancer.

Key words: HeLa, Blf-ADT, cell proliferation, cell apoptosis, anti-tumor effect

宫颈癌(Cancer of cervix)是女性最常见的、对健康最具危害性的恶性肿瘤之一,世界范围内每年新增的病例中,有 80% 发生在发展中国家,已经成为发展中国家妇女死亡的主要原因^[1]. 近年来,我国宫颈癌发病年龄有年轻化的趋势,因此进行宫颈癌的发病机制及药物治疗的研发具有十分重要的临床价值^[2].

非甾体抗炎药 NSAIDs(Non-steroidal anti-inflammatory drugs),是一类不含有甾体结构的抗炎镇痛药. 近年来,各种临床及实验研究显示,长期有效地服用 NSAIDs 能够降低肿瘤的发生率. 本课题组利用化学拼合原理合成了一种新型的具有抗炎作用的化合物 Blf-ADT,前期研究显示其具有良好的抗炎作用,但其抗肿瘤作用还不清楚,因此本文将以 HeLa 细胞为作用对象对 Blf-ADT 的抗肿瘤作用及机制作进一步研究.

收稿日期:2015-06-03.

基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2015]311 号)、南京师范大学留学回国人员启动基金项目.

通讯联系人:绪广林,副教授,研究方向:气体信号分子供体物的抗炎及抗肿瘤作用. E-mail: xudunlop@126.com

*: Wei Li and Qian Wang made equal contribution to the paper.

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

Bif-ADT 由本实验室自行合成提供,分子结构式如图 1 所示. 高糖 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)、Trypsin 溶液和青链霉素双抗购自美国 Invitrogen 公司;胎牛血清 FBS 购自杭州四季青有限公司;DMSO 购自美国 Amersco 公司;MTT 购自 Sigma Company(US);多聚甲醛、Giemsa 染液、TEMED 和 Tween-20 均购自北京 solarbio 科技有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自 Vazyme Company(US);实验用抗体(Bax, bcl-2, p38, p-p38, ERK, p-ERK, procaspase-3, COX-2 和 β -actin 一抗)购自美国 Cell Signaling;二抗均购自 Bioworld Technology;X-ray 胶片等购于南京丁贝生物技术有限公司;ECL 化学发光液购于北京普利莱基因技术有限公司;其他试剂如甲醇等均为国产分析纯.

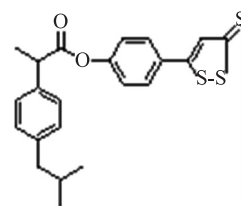


图 1 Bif-ADT 的分子结构式

Fig.1 Molecular structure of Bif-ADT

1.2 细胞株及其培养

人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞购自中科院上海细胞所. 细胞置于含 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,用含 10% 胎牛血清及 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基培养. 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代,2 d~3 d 传代一次.

1.3 细胞形态学观察

取指数生长期细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $2\times 10^5/\text{mL}$,接种于 6 孔板,分别用 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Bif-ADT 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的布洛芬进行处理,继续培养 48 h 后,与溶剂对照组细胞在倒置显微镜下观察其细胞形态,数码相机拍照.

1.4 MTT 检测

取指数生长期细胞,制成单细胞悬液,细胞浓度调整为 $3\times 10^4/\text{mL}$. 每孔细胞悬液 100 μL ,接种于 96 孔培养板常规培养. 药物处理终浓度分别为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Bif-ADT 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的布洛芬,同时设置含 0.1% DMSO 的完全培养液作为溶剂对照组,分别常规培养 24 h、48 h、72 h. 全自动酶标仪上 570 nm 处测定吸光度(A)值. 按公式计算药物作用后培养细胞的抑制率:相对细胞生长抑制率(%)=[(溶剂对照组 OD 值-实验组 OD 值)/溶剂对照组 OD 值] $\times 100\%$.

1.5 集落形成实验

取指数生长期细胞,制成单细胞悬液,细胞浓度调整为 $1.5\times 10^2/\text{mL}$. 每孔细胞悬液 2 mL,接种于 24 孔培养板常规培养. 药物处理终浓度分别为 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Bif-ADT 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的布洛芬,同时设置含 0.1% DMSO 的完全培养液作为溶剂对照组. 分别常规培养 24 h、48 h、72 h 后,将培养液换成含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 7 d~10 d. 无水甲醇固定 5 min,姬姆萨染色液染色 10 min,冲洗掉多余的染料,室温干燥、计数. 按公式计算培养细胞抑制率:抑制率(%)=[(对照组克隆数-实验组克隆数)/对照组克隆数] $\times 100\%$.

1.6 细胞划痕实验

不同终浓度的 Bif-ADT 处理培养细胞,待细胞生长至单层铺满孔内底部时,用 20 μL 的枪头在孔内底部中央划一条直线. 用无菌 PBS 溶液缓慢冲洗,再加入无血清培养液. 常规培养 24 h 后显微镜下观察、拍照.

1.7 流式细胞仪检测凋亡率

不同终浓度的 Bif-ADT 处理细胞 48 h 后,收集细胞,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min 弃上清,PBS 冲洗 3 次,每管加入 100 μL 1 \times Binding Buffer 重悬细胞,并将细胞浓度调整为 $1\times 10^6/\text{mL}$,再加入 5 μL Annexin V-FITC、5 μL PI 和 400 μL 1 \times Binding Buffer,轻轻混匀,1 h 内样品用流式细胞仪检测. 激发波长为 488 nm. 用 CellQuest 软件对实验数据进行分析,绘制散点图.

1.8 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达^[3]

1.8.1 细胞总蛋白提取

Bif-ADT 处理细胞 48 h 后,提取细胞总蛋白,-70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存. 采用 BCA 法,以一定浓度梯度的 BSA 溶液为标准,于 570 nm 处测定吸光度值,绘制标准曲线,同时测定样品的吸光度值,计算蛋白含量.

1.8.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白电转移

各取含相同浓度蛋白的细胞裂解上清液,与 5×SDS 上样缓冲液[250 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 6.8),10% SDS,500 mmol·L⁻¹ DTT,50% 甘油,0.5% 溴酚蓝]混合后,100℃水浴煮 5 min. 冷却后上样,蛋白上样量为 60 μg~120 μg,70 V(浓缩胶)或 90 V(分离胶)电泳. 将分离胶与提前处理好的 PVDF 膜采用汉堡包法叠加固定,在 35 V、130 mA 参数下,电泳分离 2.5 h,使目的蛋白转移到 PVDF 膜上.

1.8.3 免疫杂交检测靶蛋白

将 PVDF 膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST[0.1% Tween-20,10 mmol·L⁻¹ Tris-Cl(pH 7.5),150 mmol·L⁻¹ NaCl]缓冲液,常温下摇床震荡封闭 3 h. 封闭结束后,用 1×PBST 溶液摇床震荡洗膜 4 次,每次 15 min. 洗膜结束后,将 PVDF 膜放入稀释的一抗溶液中,4℃滚动孵育 16 h 左右. 1×PBST 溶液洗膜 3 次,每次 15 min. 然后放入对应的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗溶液中,4℃滚动孵育 8 h 左右. 最后 1×PBST 溶液摇床震荡洗膜 3 次,每次 15 min. 在暗室中,利用 ECL 化学杂交方法,曝光胶片以显示对应的目的蛋白条带.

1.9 统计学处理

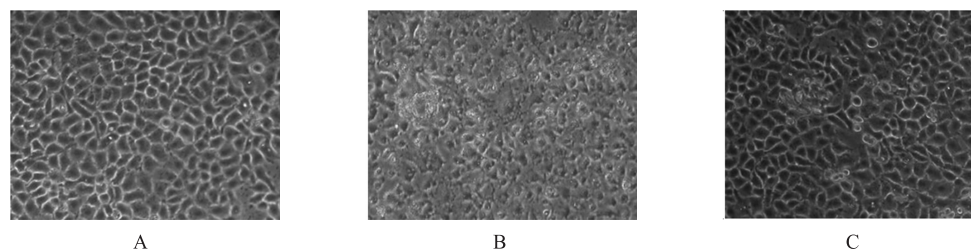
结果数据用($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析采用 Student's *t*-test.

2 结果

2.1 Bif-ADT 对 HeLa 细胞生长的影响

光镜下可见(图 2),未经 Bif-ADT 处理的溶剂对照组细胞形态呈几何多边形,细胞之间紧密生长,界限清晰. 经过 50 μmol·L⁻¹ Bif-ADT 处理后的细胞大多数皱缩成椭圆形或者圆形,布洛芬处理组与溶剂对照组细胞形态接近.

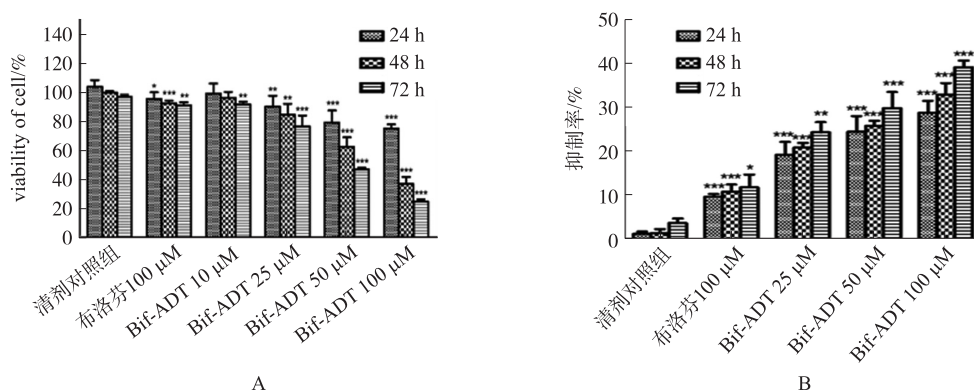
MTT 检测结果显示(图 3A),用 10 μmol·L⁻¹、25 μmol·L⁻¹、50 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹ 的 Bif-ADT 分别处理细胞 24 h、48 h、72 h 后具有明显的增殖抑制作用,呈剂量依赖,且随时间增加作用增强($P < 0.05$). 100 μmol/L 的布洛芬对细胞增殖的抑制作用效果低于 25 μmol·L⁻¹、50 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹ 的 Bif-ADT.



A: Ctrl; B: 100 μmol·L⁻¹ Bif-ADT; C: 100 μmol·L⁻¹ ibuprofen

图2 细胞形态学观察

Fig.2 Cell morphology changes were observed when treated with 100 μmol·L⁻¹ Bif-ADT and 100 μmol·L⁻¹ ibuprofen



A: The effects of Bif-ADT on viability of HeLa cells. HeLa cells were treated with Bif-ADT (10, 25, 50, 100) μmol·L⁻¹ and 100 μmol·L⁻¹ ibuprofen respectively for 24 h, 48 h and 72 h. Cell viability was detected by MTT. B: The effects of Bif-ADT on colony formation on HeLa cells. $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group (Cont.)

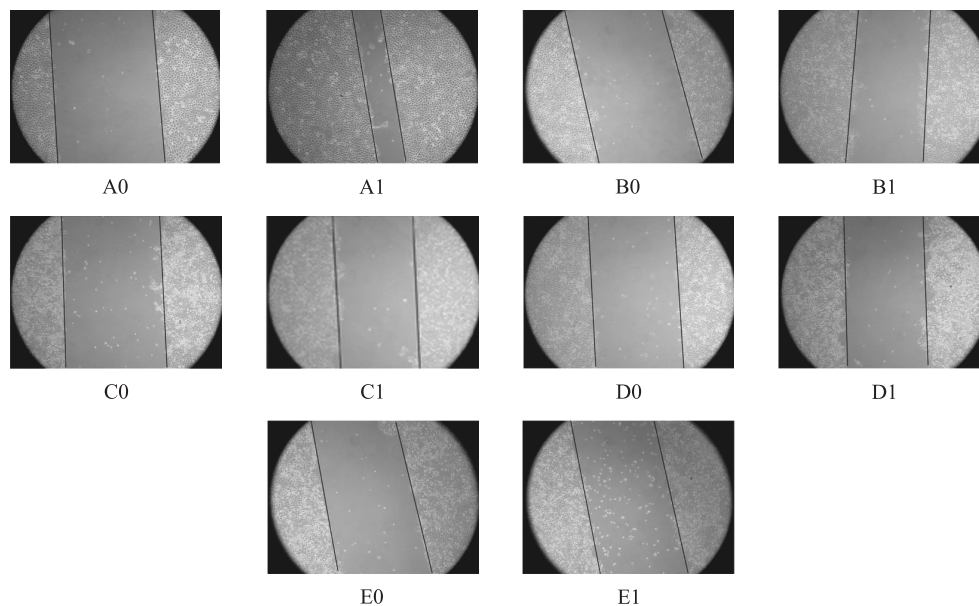
图3 Bif-ADT 对 HeLa 细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of Bif-ADT on proliferation of HeLa cell

集落形成实验结果显示,用 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bif-ADT 分别处理 HeLa 细胞 24 h、48 h、72 h 后具有明显的增殖抑制作用,呈时间、剂量依赖性(图 3B)($P < 0.05$), $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 布洛芬的抑制作用均弱于 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bif-ADT。

2.2 Bif-ADT 对 HeLa 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果显示,经过 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 布洛芬和不同浓度的 Bif-ADT 处理后,细胞向划痕损伤处迁移速度均显著慢于溶剂对照组(图 4),即细胞迁移能力呈不同程度的降低, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bif-ADT 处理组划痕损伤基本无“愈合”现象,表明 Bif-ADT 能有效抑制 HeLa 细胞的体外迁移能力。



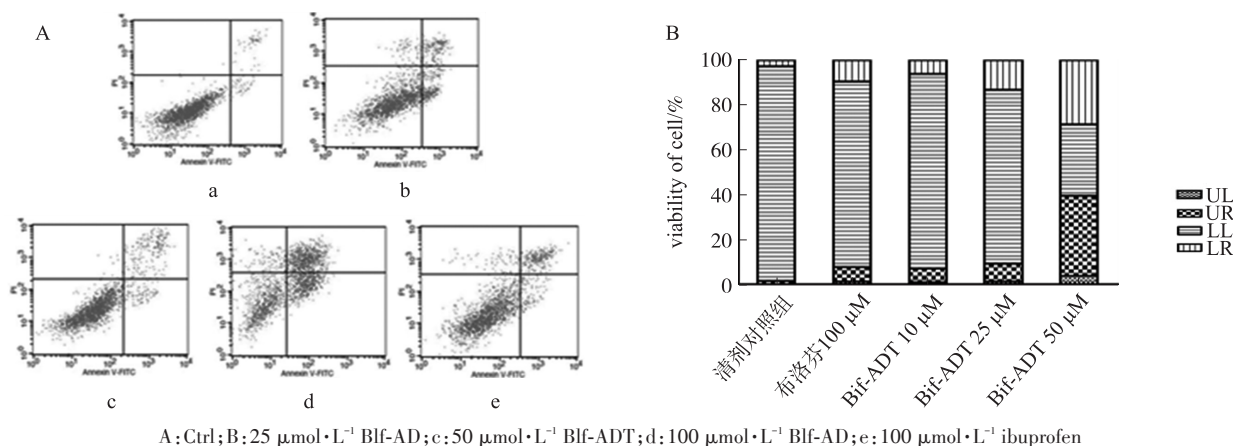
A0: Ctrl 0 h; A1: Ctrl 24 h; B0: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ibuprofen 0 h; B1: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ibuprofen 24 h;
C0: $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-ADT 0 h; C1: $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-ADT 24 h; D0: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ mBif-ADT 0 h;
D1: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-ADT 24 h; E0: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-ADT 0 h; E1: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-ADT 24 h

图4 Bif-ADT 对 HeLa 细胞迁移能力的影响

Fig.4 Cell migration changes were observed after HeLa cells treated with different concentrations of Bif-ADT ($n=3$)

2.3 Bif-ADT 对 HeLa 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,培养 48 h 后溶剂对照组的凋亡率(UL+UR)为 4.27%; $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bif-ADT 处理组凋亡率分别为 12.34%、21.17%、64.22%(见图 5)。由此可见, Bif-ADT 处理 HeLa 细胞后,会引起凋亡率提高,在本实验使用剂量范围内,与药物浓度呈正相关。而 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 布洛芬组效果较弱,凋亡率为 15.96%。



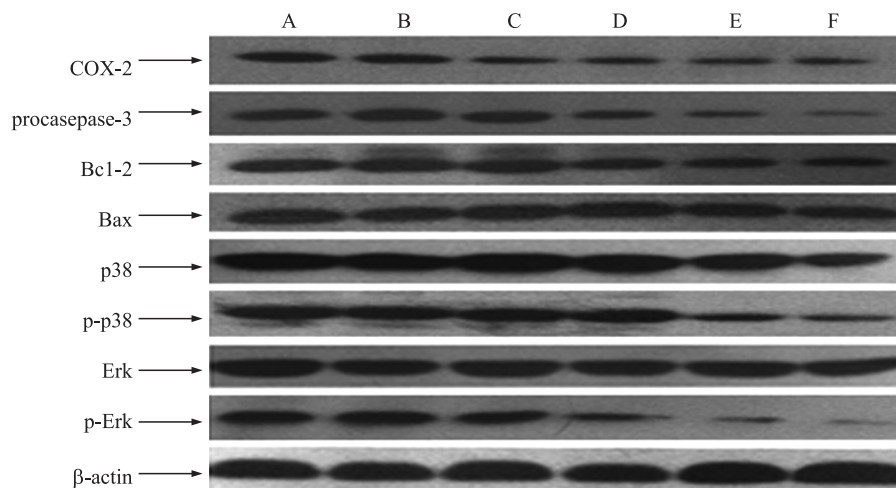
A: Ctrl; B: $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-AD; c: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-ADT; d: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bif-AD; e: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ibuprofen

图5 Bif-ADT 对 HeLa 细胞凋亡的影响

Fig.5 Effects of Bif-ADT on apoptosis of HeLa cells

2.4 Bif-ADT 对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白的影响

本实验以不同浓度 Bif-ADT 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的布洛芬处理细胞 48 h 后,Western Blotting 检测发现,随着药物处理浓度增高,COX-2、Bcl-2 和 procaspase-3 表达量显著降低,Bax 表达量无变化;p38 和 Erk、p-Erk 的表达量无变化,而 p-p38 和 p-Erk1/2 表达量降低(图 6)。



A:Ctrl;B:100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ibuprofen;C:10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bif-ADT;D:25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bif-ADT;E:50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bif-ADT;F:100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bif-ADT

图6 Western blot检测 HeLa 细胞中凋亡相关蛋白的表达变化

Fig.6 The changes of apoptosis proteins in HeLa cells by Western blotting analysis

3 讨论

宫颈癌(Cancer of cervix)是全球女性中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全世界范围内居女性恶性肿瘤第二位,仅次于乳腺癌,而在发展中国家和地区则位居第一位^[4]。据统计,每年全世界新增病例有 45.9 万,其中我国就有 13.15 万,占全球发病人数的 1/3^[5]。宫颈癌对女性的身体健康产生了严重的威胁。与其他恶性肿瘤相比,宫颈癌是可以预防的癌症,因为其具有明确的致病因素和较长的可逆转的癌前病变期。很多研究已经证实,炎症是一个明确可以导致肿瘤的危险因素。非甾体抗炎药(NSAIDs)主要通过阻断前列腺素(PGs)合成的机制实现抗炎、解热、镇痛等作用。近年来研究的热点集中在 NSAIDs 的抗肿瘤作用和机制上,并取得了一定进展。COX 是 PGs 合成的重要限速酶,至少存在 COX-1、COX-2 两种同工酶,近年来研究表明,COX-2 催化产生的 PGs 除了介导炎症、疼痛等外,还与某些肿瘤尤其是消化道肿瘤的发生密切相关。NSAIDs 通过多方面的机制来抑制肿瘤,可作用于多个靶点,环氧化酶-2(COX-2)是其中之一。由此可见,NSAIDs 的抗炎和抗肿瘤作用存在一定的内在联系,NSAIDs 的抑瘤作用体现在肿瘤发生过程的各个环节,如通过多条信号传导通路抑制 COX-2 活性、抑制肿瘤血管形成、促进肿瘤细胞凋亡等。

Bif-ADT 是本课题组利用化学拼合原理合成的一种新型的具有抗炎作用的化合物。在本研究中,分别从细胞增殖、迁移能力、细胞凋亡、细胞凋亡相关蛋白几个方面,探讨了新型非甾体抗炎药 Bif-ADT 对人宫颈癌 HeLa 细胞株的影响。MTT 检测和平板克隆形成实验分析结果表明,Bif-ADT 对 HeLa 细胞有显著的抑制作用,呈剂量和时间依赖性。此外,对细胞增殖的抑制作用还表现在细胞形态学方面(图 2)。

肿瘤细胞重要的生物学特征之一就是侵袭转移。本实验细胞划痕损伤实验结果表明,在同一时间范围内,随着药物处理浓度增加,细胞损伤“愈合”能力逐渐减弱,提示药物能明显抑制细胞迁移能力。

为了进一步探讨 Bif-ADT 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用是否由细胞凋亡引起,本研究利用流式细胞仪检测了 Bif-ADT 处理细胞后的凋亡变化。结果表明,随着 Bif-ADT 处理浓度增加,早期凋亡和晚期凋亡的细胞数目明显增多,说明 Bif-ADT 能诱导其凋亡,且呈剂量依赖性。肿瘤细胞另一主要特征是抗凋亡,因此诱导肿瘤细胞凋亡已成为治疗肿瘤的一个重要方向^[6]。根据功能和结构的不同,将 Bcl-2 基因家族分成两类:(1)促凋亡基因(pro-apoptotic),如 bax、bak、bad、bid、bim 等;(2)抗凋亡基因(anti-apoptotic),如 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、mcl-1 等。在调控凋亡的过程中,起关键性作用的是 Bcl-2 和 Bax 表达量比例^[7]。有研究表明,Bcl-2 蛋白表达量下降、Bax 蛋白表达量无变化,两者异二聚体比率降低,会促进肿瘤细胞凋亡^[8]。同

时,Bcl-2 蛋白家族能调控线粒体凋亡途径主要蛋白酶 caspase-3 活性^[9]. 为了进一步研究 Bif-ADT 诱导细胞凋亡是否和这些蛋白相关,作者利用 Western Blot 技术检测了细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、procaspase-3 表达量. 结果表明,Bcl-2/Bax 比值显著降低. 此外,Bif-ADT 作用后,未活化的 procaspase-3 表达量随着药物浓度增高而降低,则由此推测活化的 caspase-3 有所增加. 上述研究结果表明,Bif-ADT 通过降低 Bcl-2/Bax 比值,增加 caspase-3 活性,从而诱发 HeLa 细胞凋亡.

MAPK 途径相关蛋白被认为是细胞凋亡信号的重要介质^[10]. 绝大多数细胞中都存在 MAPK 途径,信号从胞外传递到胞内,MAPK 可促进血管内皮细胞增殖和新血管生成,刺激引起细胞增殖、分化、转化以及凋亡. 哺乳动物机体中已经发现 5 种不同的 MAPK 信号转导通路. 其中 Erk1/2 信号转导通路调控细胞生长和分化,p38MAPK 信号转导通路在炎症与细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用. 为此,本实验研究了 Erk1/2(磷酸化和非磷酸化)和 p38(磷酸化和非磷酸化)MAPK 激酶信号传导通路在 Bif-ADT 处理的 HeLa 细胞凋亡中的变化. 实验数据表明,随着药物浓度的增高,p-Erk1/2,p-p38 和 Cox-2 表达量有所下降,而 Erk1/2 和 p38 表达量无变化(图 5). 由此推测,Bif-ADT 可能是通过影响 MAPK 信号转导通路 Erk 和 P38 的表达来影响 Cox-2 的表达,从而诱发 HeLa 细胞凋亡.

综上所述,表明 Bif-ADT 对 HeLa 细胞具有显著的增殖抑制作用,主要与影响凋亡相关蛋白、COX-2 的表达以及 MAPK 信号通路有关. Bif-ADT 可能对宫颈癌治疗具有潜在的临床应用价值.

[参考文献]

- [1] LI X Y, WANG X. The role of human cervical cancer oncogene in cancer progression[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 15: 8 363-8 368.
- [2] 卢秀娥. 宫颈癌及癌前病变筛查现状及其研究进展[J]. 中国社区医师, 2013, 15: 9.
- [3] SAMBROOK J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Beijing: Science Press, 2008.
- [4] SCHIFFMAN M H, BRINTON L A. The epidemiology of cervical carcinogenesis[J]. Cancer, 2006, 76: 1 888-1 901.
- [5] PANKIN D M, PISAN I P, FERLAY J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers[J]. Int Cancer, 2007, 80: 827-841.
- [6] ABBOTT R G, FORREST S, PIENTA K J. Simulating the hallmarks of cancer[J]. Artif Life, 2006, 12: 617-634.
- [7] ADAMS J M, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. Science, 1998, 281(5 381): 1 322-1 326.
- [8] 徐美华, 张桂英, 谢兆霞, 等. 吡喹酮对结肠癌细胞 CDK2、CDK4、P21WAF/CIP1、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中化杂志, 2002, 22: 605-607.
- [9] DEVERAUX Q L, REED J C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis[J]. Genes Dev, 1999, 13: 239-252.
- [10] UEHLING D E, HARRIS P A. Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25: 4 047-4 056.

[责任编辑: 黄 敏]