

消化系统肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000235

载多西紫杉醇脂质微泡联合超声靶向微泡破裂对人肝癌细胞增殖和凋亡影响的初步研究

康娟¹, 吴小翎², 张大志¹, 周智¹, 胡鹏¹, 王志刚³

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝病治疗研究中心, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010; 3. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

【摘要】目的:初步研究载多西紫杉醇脂质微泡(docetaxel-loaded lipid microbubbles, LDLM)联合超声靶向微泡破裂(ultrasound targeted microbubbles destruction, UTMD)对人 SMMC-7721 肝癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**体外培养人 SMMC-7721 细胞, 确定适宜的多西紫杉醇浓度, 细胞分为 6 组, 比较各组的细胞增殖抑制率、超微结构改变、凋亡率和细胞周期分布。**结果:**载药微泡+超声组的细胞增殖抑制率明显高于其他组, 与其他各组相比差异有统计学意义($P=0.000$); 电镜下观察载药微泡+超声组的凋亡细胞最多; 流式细胞仪检测结果显示载药微泡+超声组的细胞凋亡率最高($P=0.000$), LDLM+US 组 G0/G1 期细胞比例明显减少, 为 $(0.79 \pm 0.27)\%$ ($P=0.000$), G2/M 期细胞比例升高最明显, 为 $(90.54 \pm 0.48)\%$ ($P=0.000$)。**结论:**LDLM 联合 UTMD 可抑制人 SMMC-7721 细胞的增殖、促进其凋亡, 为后续进一步从蛋白、基因层面探索其作用的机制奠定了重要基础。

【关键词】超声微泡; 多西紫杉醇; 人肝癌细胞系; 载药微泡; 人 SMMC-7721 细胞

【中图分类号】R454.3; R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-23

Influence of docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound targeted microbubbles destruction on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell

Kang Juan¹, Wu Xiaoling², Zhang Dazhi¹, Zhou Zhi¹, Hu Peng¹, Wang Zhigang³

(1. Treatment and Research Center of Liver Disease, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 3. Institute of Ultrasonic Imaging, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the influence of docetaxel-loaded lipid microbubbles (LDLM) combined with ultrasound targeted microbubbles destruction (UTMD) on proliferation and apoptosis of SMMC-7721 cells. **Methods:** Suitable concentration of docetaxel was chosen. SMMC-7721 cells were cultured in vitro and divided into 6 groups. Proliferating inhibition rate, ultrastructural change, apoptotic rate and cell cycle distribution were compared among all groups. **Results:** The proliferating inhibition rate and apoptotic rate of LDLM+US group were the highest compared with that of other groups ($P=0.000$, $P=0.000$). Great amount of apoptotic cells were observed in LDLM+US group by electron microscope and flow cytometry. Proportion of cells at G0/G1 phase was decreased obviously ($0.79 \pm 0.27\%$) ($P=0.000$) while that at G2/M phase was obviously increased ($90.54 \pm 0.48\%$) ($P=0.000$). **Conclusion:** LDLM combined with UTMD could inhibit the proliferation and promote the apoptosis of SMMC-7721 cells, which provide evidence for the further study of its mechanisms in protein and gene level.

【Key words】ultrasound microbubble; docetaxel; human hepatocellular carcinoma cell line; drug-loaded microbubble; SMMC-7721 cell

原发性肝癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 我国的乙肝、丙肝病毒的感染率高, 原发性肝癌

的发病率和死亡率居世界首位^[1-2]。目前的肝癌治疗手段存在疗效不佳、副反应大、费用昂贵等问题, 因此, 寻求一种高效、重复性好、简便、安全的治疗手段迫在眉睫。大量研究表明, 超声微泡造影剂不仅可用于肿瘤显影, 还可作为一种新型的基因或药物载体, 载药微泡联合超声靶向微泡破裂技术 (ultra-

作者简介: 康娟, Email: 68368892@qq.com,

研究方向: 肝病的治疗及相关机制。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: CSTC2012jjA10034)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000235.html>

sound targeted microbubbles destruction,UTMD)可使药物在癌组织局部靶向释放并被吸收,从而增强药物的疗效,降低全身副反应,具有较大的临床应用研究价值^[3-4]。本研究将初步探讨载多西紫杉醇脂质微泡(docetaxel-loaded lipid microbubbles,LDLM)联合 UTMD 对人 SMMC-7721 肝癌细胞的增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

LDLM(自制)^[5];多西紫杉醇原料药(重庆美联制药有限公司)、全氟丙烷(天津核工业理化工程研究所)、磷脂酰胆碱(Sigma)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(Sigma)和磷脂酸(Sigma);Annexin V-FITC 试剂盒(凯基生物科技发展有限公司产品)等;人 SMMC-7721 肝癌细胞株(重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供);RPMI1640 培养液(美国 GIBCO 公司);胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司);DMSO(重庆化学试剂厂);MTT(Sigma 分装)。

1.2 主要仪器

倒置荧光显微镜(Olympus CKX41,日本);CO₂ 培养箱(美国 SHELLAB 公司);电子天平(FA2004A)(上海精天电子仪器有限公司);超声治疗仪(1 MHz,重庆医科大学超声影像学研究所研制);YJT-银汞胶囊调合器(上海医疗器械股份有限公司);电热恒温水箱(BS60 型)(北京市医疗设备厂);台式灭菌器(2540)(山东新华医疗器械股份有限公司);全自动酶标仪 Model 680(美国 Bio-Rad 公司);细胞培养板(美国 COSTAR);微量加样枪(1~1 000 μl)(德国 Eppendorf 公司)等;超净工作台(CJ-2FD 型)(苏净集团安泰公司);日立 H-7500 透射电镜(日本日立公司);流式细胞仪(FACSscan Becton Dickinson,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人 SMMC-7721 肝癌细胞培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 的培养液中,置于孵箱,在 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度下培养。

1.3.2 多西紫杉醇药物浓度的确定 取对数生长期的细胞分为 9 个组,包括空白对照组和 8 个浓度组,多西紫杉醇的浓度依次为 5×10^{-7} 、 1×10^{-7} 、 5×10^{-8} 、 1×10^{-8} 、 5×10^{-9} 、 1×10^{-9} 、 5×10^{-10} 和 1×10^{-10} mol/L,用 MTT 法测定各组处理后 24、48 h 及 72 h 吸光度(absorbance,A)值,并计算细胞增殖抑制率(%)= $[(A_{\text{对照组}}-A_{\text{实验组}})/A_{\text{对照组}}] \times 100\%$,选择最适的药物浓度。

1.3.3 细胞分组及处理 细胞实验分 6 组:空白对照组(C)、载药微泡组(LDLM)、单纯药物组(Doc)、单纯微泡+超声组(PLM+US)、单纯药物+超声组(Doc+US)、载药微泡+超声组(LDLM+US)。其中 LDLM 组、Doc 组和 LDLM+US 组以选择的最适药物浓度给药;PLM+US、Doc+US 和 LDLM+US 组加入微泡或药物后即刻利用超声治疗仪进行辐照,根据前期的

研究基础确定辐照参数设为声强 0.5 W/cm²、频率 1 MHz、辐照时间 30 s。

1.3.4 MTT 法检测对细胞增殖的影响 取对数生长期的细胞接种于培养板培养 24 h 以后,给予各组干预因素后继续培养,分别于培养 24、48、72 h 时采用 MTT 法测定各组 A 值,并计算各组细胞增殖抑制率(%)= $[(A_{\text{对照组}}-A_{\text{实验组}})/A_{\text{对照组}}] \times 100\%$ 。

1.3.5 透射电镜观察 取对数生长期的细胞接种于培养板培养 24 h 以后,给予各组干预因素后继续培养 24 h 收集细胞(细胞量不少于 1×10^6 个/组),经 4%戊二醛、锇酸固定,乙醇、丙酮脱水等步骤后,显微镜下定位并制备成超薄切片,醋酸铅染色,透射电镜观察细胞超微结构。

1.3.6 Annexin V-FITC 荧光染色联合流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞接种于培养板培养 24 h 以后,给予各组干预因素后继续培养 24 h 收集细胞(细胞量不少于 1×10^6 个/组),以结合缓冲液悬浮细胞,取细胞悬液于流式管中,加 Annexin-V/FITC 和 PI 溶液,混匀后室温避光孵育 5~15 min,在反应管中加入 PBS 洗去多余的染料,利用流式细胞仪进行检测分析。

1.3.7 流式细胞仪检测细胞周期分布 取对数生长期的细胞接种于培养板培养 24 h 以后,给予各组干预因素后继续培养 24 h 后收集细胞(细胞量不少于 1×10^6 个/组),用乙醇固定细胞,弃固定液,PBS 清洗,离心,弃上清液,加入 DNA 荧光染料 PI 溶液,避光染色,流式细胞仪分析,并用 Modifit LT 2.0 软件分析细胞周期。

1.4 统计方法

运用 SPSS 13.0 进行相关统计学检验。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析;两两比较采用 LSD-*t* 法或 Dunnett-*t* 法,各组不同时间点对人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制率比较采用重复测量数据的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 多西紫杉醇药物浓度的确定

MTT 法检测结果见表 1。同一时间点,不同浓度的多西紫杉醇对肝癌细胞的作用随药物浓度的增大而逐渐增强;同一浓度组,随着作用时间延长增殖抑制率也逐渐增高。结果表明,单纯应用多西紫杉醇能够抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的生长,且呈现时间—浓度—效应关系,从抑制率结果确定 1×10^{-9} mol/L 为本实验多西紫杉醇的药物浓度。

2.2 细胞增殖抑制

MTT 法检测各组 24、48、72 h 时间点对人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制见表 2。结果显示,LDLM+US 组在各时间点的增殖抑制率均明显高于其他各组,与其他各组相比差异均有统计学意义($P=0.000$),除空白对照组外,其他各处理组对 SMMC-7721 细胞的增殖也有一定程度的抑制,随着作用时间的延长增殖抑制率逐渐增高。

表 1 不同浓度多西紫杉醇不同时间点对人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制

Tab.1 Proliferating inhibition rate of SMMC-7721 cell at different time points with different concentrations of docetaxel

多西紫杉醇药 物浓度 (mol/L)	不同时间点的增殖抑制率		
	24 h	48 h	72 h
空白对照	0	0	0
5×10^{-7}	0.923 ± 0.006	0.943 ± 0.006	0.986 ± 0.005
1×10^{-7}	0.817 ± 0.005	0.890 ± 0.004	0.951 ± 0.005
5×10^{-8}	0.747 ± 0.006	0.832 ± 0.004	0.879 ± 0.006
1×10^{-8}	0.652 ± 0.007	0.770 ± 0.005	0.810 ± 0.005
5×10^{-9}	0.590 ± 0.004	0.713 ± 0.006	0.752 ± 0.003
1×10^{-9}	0.506 ± 0.005	0.634 ± 0.004	0.692 ± 0.004
5×10^{-10}	0.398 ± 0.008	0.536 ± 0.006	0.599 ± 0.004
1×10^{-10}	0.314 ± 0.023	0.445 ± 0.008	0.503 ± 0.005

2.3 超微结构改变

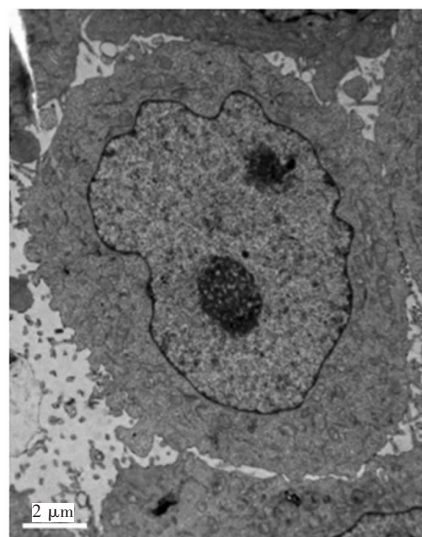
利用透射电镜观察各组肝癌细胞超微结构结果见图 1、2。空白对照组细胞表面微绒毛丰富,细胞膜完整,胞质浓密,线粒体等细胞器正常,核膜完整,清晰可见,核大,核物质结构致密,细胞形态正常;PLM+US 组细胞形态基本正常;Doc+US 组可见早期凋亡细胞,细胞基质电子密度加深,质膜表面呈泡状外突,细胞核异染色质边集;LDLM+US 组凋亡细胞最多,细胞连接及细胞表面微绒毛等异常或消失,内质网扩张呈囊泡状,线粒体不同程度肿胀,染色质浓缩分解,核仁碎裂成许多小块,可见许多大小不等典型的凋亡小体形成;Doc 组和 LDLM 组可见少许早期凋亡细胞。

2.4 Annexin V-FITC 荧光染色联合流式细胞仪检测细胞凋亡

检测结果见表 3,各组肝癌细胞在干预 24 h 后均有一定程度的凋亡,其中,空白对照组和 PLM+US 组的细胞凋亡率极低,LDLM+US 组细胞凋亡率最高,明显高于其他各组,Doc+US 组凋亡率也较高,但明显低于 LDLM+US 组。

2.5 细胞周期检测

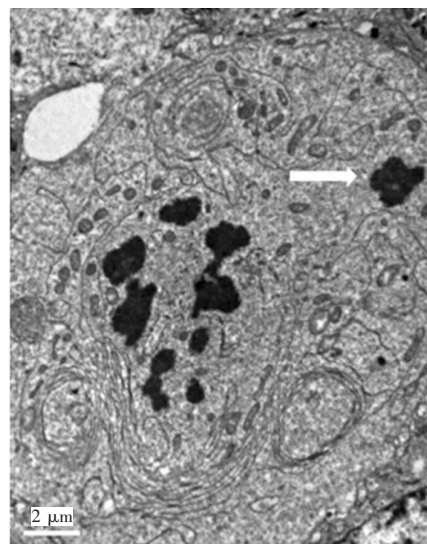
细胞周期分布结果见表 4、图 3,与空白对照组比较,各处理组 G2/M 期细胞比例有不同程度的增高,LDLM+US 组 G0/G1 期细胞比例减少最明显,G2/M 期细胞比例升高最明显;Doc+US 组 G2/M 期细胞比例也明显增高。



细胞表面微绒毛丰富,细胞膜完整,胞质浓密,线粒体等细胞器正常,核膜完整,清晰可见,核大,核物质结构致密,细胞形态正常

图 1 空白对照组肝癌细胞电镜图 (6 000 ×)

Fig.1 TEM of SMMC-7721 cell of C group (6 000 ×)



核仁碎裂成多个小块,图中箭头所指为凋亡小体

图 2 LDLM+US 组肝癌细胞电镜图 (6 000 ×)

Fig.2 TEM of SMMC-7721 cell of LDLM+US group (6 000 ×)

表 2 各组不同时间点对人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制率

Tab.2 Proliferating inhibition rate of SMMC-7721 cell of each group

组别	24 h	48 h	72 h	
C	0	0	0	
PLM+US	$0.120 1 \pm 0.003 9$	$0.181 6 \pm 0.001 1$	$0.243 3 \pm 0.003 6$	
LDLM	$0.301 9 \pm 0.003 5$	$0.402 5 \pm 0.002 2$	$0.522 9 \pm 0.004 4$	
Doc	$0.501 1 \pm 0.002 5$	$0.640 1 \pm 0.002 3$	$0.704 4 \pm 0.005 6$	$F_{\text{处理}}=174166.0$ $P_{\text{处理}}=0.000$
Doc+US	$0.778 8 \pm 0.002 3$	$0.831 3 \pm 0.001 5$	$0.912 7 \pm 0.004 8$	
LDLM+US	$0.901 5 \pm 0.002 7$	$0.951 3 \pm 0.002 2$	$0.990 3 \pm 0.001 0$	
$F_{\text{时间}}=12 446.8$ $P_{\text{时间}}=0.000$				$F_{\text{交互}}=868.4$ $P_{\text{交互}}=0.000$

表 3 Annexin V-FITC 荧光染色联合流式细胞术检测人肝癌细胞 SMMC-7721 的凋亡率

Tab.3 Apoptotic rate of each group detected by Annexin V-FITC fluorescence staining combined with flow cytometry	
组 别	凋亡率 (%)
C	2.475 ± 0.181
PLM+US	7.210 ± 0.727
LDLM	12.138 ± 1.142
Doc	16.798 ± 1.078
Doc+US	29.705 ± 3.665
LDLM+US	45.578 ± 8.495
F 值	69.591
P 值	0.000

注:LDLM+US 组和其他各组两两比较差异均有统计学意义, $P_{\text{均}}=0.000$

表 4 各组人肝癌细胞 SMMC-7721 的周期分布

Tab.4 SMMC-7721 cell cycle distribution of each group

组 别	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
C	60.62 ± 1.73	32.38 ± 1.56	6.88 ± 0.21
LDLM+US	0.79 ± 0.27	8.69 ± 0.30	90.54 ± 0.48
LDLM	14.54 ± 0.42	51.11 ± 0.69	34.42 ± 0.90
Doc	10.60 ± 0.96	47.01 ± 4.55	42.40 ± 5.39
Doc+US	8.70 ± 1.99	32.60 ± 2.49	58.77 ± 4.21
PLM+US	48.89 ± 2.41	25.83 ± 0.51	25.32 ± 1.92
F 值	1 035.72	186.14	390.68
P 值	0.000	0.000	0.000

注: F 为各组处于同一细胞周期的细胞所占比例的比较,差异有统计学意义($P=0.000$);LDLM+US 组处于各期的细胞比例与其他各组相比差异均有统计学意义($P_{\text{均}}=0.000$)

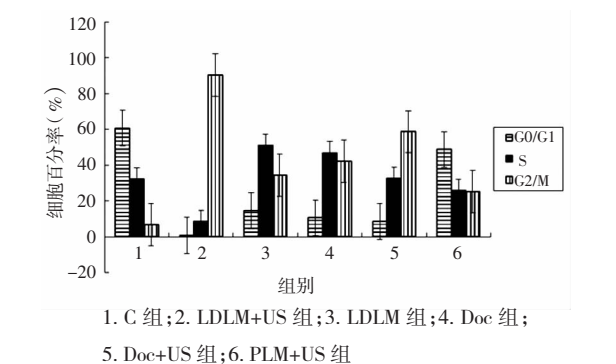


图 3 流式细胞仪检测各组人 SMMC-7721 肝癌细胞的周期分布

Fig.3 Cell cycle distribution of SMMC-7721 cells in each group detected by FCM

3 讨 论

人肝癌细胞 SMMC-7721 是细胞实验常用的肝癌细胞株,其培养方法相对简单,易于传代、冻存、

复苏等,该细胞生长迅速,在前期预实验中,确定了以 1×10^5 个/ml 的浓度进行细胞接种,并确定于接种 24 h 后予以处理因素。

多西紫杉醇能抑制微管解聚,促进微管蛋白装配成微管,从而抑制肿瘤细胞的有丝分裂,是目前临床常用的、最有前景的广谱抗癌药物之一^[6],因此本实验选择多西紫杉醇载入微泡。MTT 法是目前检测细胞增殖抑制的常用方法之一,本实验采用 MTT 法研究了 8 个不同浓度组的多西紫杉醇对人 SMMC-7721 肝癌细胞的增殖抑制作用。结果显示:该肝癌细胞的活性与药物的作用时间和药物浓度呈时间—浓度—效应关系,根据 MTT 法原则抑制率 < 50% 为无效,在作用 24 h 时 1×10^{-9} mol/L 以上浓度组的增殖抑制率均高于 50%,考虑到加入超声、微泡等处理因素后细胞的增殖抑制率可能会更高,若选择高药物浓度,药物本身的作用太强将影响后续实验中其他因素的可比性,因此,确定了后续试验的多西紫杉醇干预浓度为 1×10^{-9} mol/L。

细胞的凋亡抑制和增殖失控是肿瘤发生的两大重要原因^[7],因此,诱导细胞凋亡是肿瘤治疗的重要手段之一,凋亡诱导作用的强弱成为评价抗肿瘤药物疗效好坏的重要指标之一。BCL-2 蛋白是一种凋亡抑制剂,磷酸化可导致其凋亡抑制作用的消失,多西紫杉醇可有效地诱导 BCL-2 磷酸化^[8],通过这种作用促进肿瘤细胞凋亡,因此,多西紫杉醇的广谱抗肿瘤作用与其促进细胞凋亡密切相关,凋亡诱导作用可见于药物浓度达 10^{-9} mol/L。Annexin V-FITC 荧光染色联合流式细胞仪检测的各组细胞凋亡率结果显示:LDLM+US 组的细胞凋亡率最高,Doc+US 组、Doc 组次之,对照组最低。电镜观察结果显示:LDLM+US 组凋亡细胞最多,可见许多大小不等典型的凋亡小体形成;Doc+US 组可见早期凋亡细胞;Doc 组和 LDLM 组可见少许早期凋亡细胞;而 PLM+US 组细胞形态基本正常;空白对照组细胞形态正常。流式细胞仪检测和电镜观察的结果一致,均表明了 LDLM+US 组的促凋亡作用最强。

肿瘤发生发展的另一个重要原因是增殖失控,因此,抑制肿瘤细胞的增殖可控制、阻碍其生长。MTT 法检测干预因素对人 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的影响,结果显示:LDLM+US 组的细胞增殖抑制率明显高于其他各组,推测其可能是因为载药超声微泡增强了超声波的空化效应、声孔效应,使肝癌

细胞膜上产生明显的空隙,从而提高了细胞膜的通透性,使更多的抗癌药物进入肝癌细胞内,增高了细胞内的药物浓度,增强了抗癌药物的增殖抑制作用;单纯载药微泡组对肿瘤细胞也有增殖抑制作用,说明微泡所载多西紫杉醇仍能保持原有的抗癌活性,但该组抑制率低于单纯药物组,考虑其可能的原因为载药微泡未受到超声波的辐照,自身破裂缓慢,包裹于磷脂外壳中的药物无法充分释放,使药物浓度降低;PLM+US 组的细胞增殖抑制率低,说明空化效应、声孔效应等使细胞表面产生的空隙是短暂的、可逆的,未对肿瘤细胞的增殖产生根本的影响;Doc+US 组的增殖抑制作用也较明显,且强于 Doc 组,说明超声波本身具有的空化效应、声孔效应等促进了药物的吸收,提高了疗效。

无论是正常细胞还是恶性肿瘤细胞的细胞周期都是在细胞周期素、细胞周期素依赖激酶及依赖激酶抑制剂等构成的调控网络的控制下有序地演变,主要通过 G1/S 和 G2/M 两个关键点调节细胞周期进程^[9-12];干预肿瘤细胞固有的细胞周期进程,从而抑制细胞的恶性增殖已成为一种有效的抗癌方法。多西紫杉醇具有阻止细胞有丝分裂的作用,使恶性肿瘤细胞被阻滞在 G2/M 期^[13],阻止细胞从 G2 期(DNA 合成后期)进入 M 期(分裂期)进行分裂。细胞周期分布结果显示:LDLM+US 组的大部分细胞被阻滞在 G2/M 期,Doc+US、Doc、LDLM 组等亦有部分细胞被阻滞于 G2/M 期,但被阻滞的细胞比例明显低于 LDLM+US 组。因此,本实验的结果表明:多西紫杉醇使肝癌细胞阻滞于 G2/M 期,干扰了细胞的增殖进程,LDLM+US 组的阻滞作用最强,考虑可能与药物的抗癌作用、空化效应、声孔效应等综合因素有关。多西紫杉醇使肿瘤细胞阻滞于 G2/M 期与其他研究者的结果较一致。

本实验证实了 LDLM 联合 UTMD 对人肝癌细胞 SMMC-7721 具有明显的增殖抑制和凋亡促进作用,为后续进一步从蛋白、基因层面探索其作用的机制奠定了重要的基础,提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893–2917.
- [2] World Health Organization. Mortality database. WHO statistical information system[DB/OL]. <http://www.who.int/whosis>.
- [3] Kang J, Wu X, Wang Z, et al. Antitumor effect of docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble activation on rabbit VX2 liver tumor[J]. *J Ultrasound Med*, 2010, 29(1): 61–70.
- [4] Xing W, Gang WZ, Yong Z, et al. Treatment of xenografted ovarian carcinoma using paclitaxel-loaded ultrasound microbubbles[J]. *Acad Radiol*, 2008, 15(12): 1574–1579.
- [5] 康娟, 刘瑶, 吴小翎, 等. 载多西紫杉醇脂质微泡超声造影剂的制备及其性质[J]. *中华超声影像学杂志*, 2008, 17(8): 724–727.
- [6] Ramaswamy B, Puhalla S. Docetaxel: a tubulin-stabilizing agent approved for the management of several solid tumors[J]. *Drugs Today (Barc)*, 2006, 42(4): 265–279.
- [7] Dunne AL, Price ME, Mothersill C, et al. Relationship between clonogenic radio-sensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(12): 2277–2283.
- [8] Qian DZ, Rademacher BL, Pittsenger J, et al. CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity[J]. *Prostate*, 2010, 70(4): 433–442.
- [9] Chung JH, Bunz F. Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(2): e1000863.
- [10] Hosono T, Tanaka T, Tanji K, et al. NUB1, an interferon-inducible protein, mediates anti-proliferative actions and apoptosis in renal cell carcinoma cells through cell-cycle regulation[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(5): 873–882.
- [11] Li Q, Cheng H, Zhu G, et al. Gambogic acid inhibits proliferation of A549 cells through apoptosis-inducing and cell cycle arresting[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(3): 415–420.
- [12] Maddika S, Ande SR, Wiechec E, et al. Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt7): 979–988.
- [13] Lin HL, Liu TY, Chau GY, et al. Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species[J]. *Cancer*, 2000, 89(5): 983–994.

(责任编辑: 冉明会)