

生半夏、南星水提物对人胃癌 BGC823 细胞的侵袭力及
HIF-1 α mRNA 蛋白表达的影响

毛竹君 张慈安 武 峰 魏品康 Δ

(第二军医大学附属长征医院中医科 上海 200003)

摘要 目的 观察生半夏、南星中药水提物对缺氧环境中人胃癌细胞株 BGC823 细胞 HIF-1 α 蛋白表达和侵袭力的影响。方法 :运用 CoCl₂ (氯化钴)诱导 BGC823 细胞缺氧 ,使得细胞中 HIF-1 α 蛋白表达升高。实验组加入生半夏、南星水提物对细胞进行预处理 ,然后在进行缺氧诱导。通过甲基噻唑基四唑法(MTT)检测细胞活性 ,使用 Transwell 检测细胞侵袭能力变化 ,RT-PCR、Western blotting 分别检测 HIF-1 α mRNA 及蛋白含量及变化。结果 :生半夏、南星水提物能抑制人胃癌 BGC823 细胞的增殖 ,生半夏、南星水提物均能抑制缺氧诱导胃癌细胞的侵袭力 ,并且能降低 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达。结论 :生半夏、南星水提物可抑制人胃癌 BGC823 细胞的增殖 ,抑制人胃癌 BGC823 细胞侵袭力 ,可能通过降低 HIF-1 α 蛋白表达有关。

关键词 生半夏 ;南星 ;胃癌 ;侵袭 ;HIF-1 α

中图分类号 :R734.2 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)10-1861-04

Effects of Aqueous Extract of Chinese Medicine Raw Pinellia and Nanxing
on Human Gastric Cancer Cells BGC823

MAO Zhu-jun, ZHANG Ci-an, WU Feng, WEI Pin-kang Δ

(Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of the ethanol and nanxing extract from Rhizome Pinelliae Preparata on hypoxia-inducible -1 alpha protein expression and aggressive influence in human gastric cancer cells BGC823. **Methods:** CoCl₂ (chlorinated cobalt) was used to induce BGC823 cytopathic hypoxia approach, which leads the increasing the expression of hypoxia-inducible -1 alpha. The cell viability was detected by MTT chromatometry and cell growth curve was generated; Transwell small room was used to detect cells attack ability, RT-PCR, Western blotting was use to detect hypoxia-inducible-1 alpha mRNA expression and protein level. **Results:** The extraction of ethanol and nanxing can inhibit the proliferation of cells BGC823 human cancer;The ethanol and nanxing extract can inhibit the aggressive ability of cells BGC823 human cancer cells, the cause of which may be the decreasing of the expression of HIF-1 alpha mRNA and protein. **Conclusion :** Ethanol extract from Rhizome Pinelliae Preparata can inhibit the BGC823 cells proliferation and Restrain BGC823 human cancer cells aggressive influence by lowering hypoxia-inducible - 1 alpha mRNA and the protein expression.

Key words: Raw Pinellia; Nanxing ;Gastric cancer; Attack; HIF-1 α

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)10-1861-04

前言

在常见的恶性肿瘤中 ,胃癌位居第 4^[1]。近几年 ,虽然外科根治手术、化疗等方法使胃癌治疗水平已经有了很大的提高 ,但总体上胃癌患者生存率低。因此 ,抗胃癌的复发、侵袭转移是中晚期胃癌患者最重要治疗方向^[2-3]。中国古代医家提出肿瘤与中医学的病理产物“痰”关系密切 ,魏品康教授通过总结前人的经验 ,及自身四十余年的实验研究及临床实践成果 ,在中医痰证学说的基础上提出了胃癌痰证理论 ,并以消痰散结法为治则 ,创立以南星、半夏两味药为君药的消痰散结方^[9] ,经实验研

究和临床观察证明 ,通过清化痰浊污染 ,可有效抑制肿瘤侵袭、转移和复发 ,延长病人生存期^[4]。缺氧是一种重要的病理状态 ,其与肿瘤生长微环境的关系更是近年的热点^[5-6]。缺氧诱导因子 -1 α (HIF-1 α)基因由 Semenza 和 Wang 在 1992 年首次发现^[7] ,被认为是在哺乳类细胞中调控缺氧反应基因的主要转录因子 ,在恶性肿瘤的发生和发展等环节中发挥重要作用^[8]。为深入研究消痰散结方抗肿瘤的机制 ,本实验采用消痰散结方君药半夏、南星的水提物和 BGC823 细胞进行体外肿瘤抑制实验 ,观察其对胃癌 BGC823 细胞侵袭力的影响及可能存在的调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物 生半夏 ,生半夏各 100g 由长征医院药材科提供 ,产地明确 ,经第二军医大学药学院生药学教研室鉴定。

作者简介 毛竹君(1982-) ,女 ,博士 ,医师 ,主要从事消化系统肿瘤的防治工作 ,E-mail: czzyk@smmu.edu.cn ,

Δ 通讯作者 魏品康 ,E-mail: czzyk@smmu.edu.cn

(收稿日期 2011-03-07 接受日期 2011-03-31)

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、0.25%胰蛋白酶和胎牛血清(PAA 公司产品);甲基噻唑基四唑(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)(美国 Sigma 公司);BGC-823 细胞购于中科院上海细胞所,细胞培养皿等耗材为 Corning 公司产品;Trizol 为 Invitrogen 公司产品;反转录试剂 Reverse Transcriptase M-MLV、RNase Inhibitor、Oligo d(T)18、dNTP Mixture 和 RealTime PCR 检测试剂盒均为 TaKaRa 公司产品;蛋白提取定量试剂盒为 Pierce 公司产品;蛋白一抗、二抗均为 SantaCruz 公司产品;ECM554 细胞侵袭检测试剂盒购于 Chemicon 公司。氯化铬 Sigma 公司。

1.1.3 主要仪器及设备 细胞培养箱,日本(三洋)离心机、紫外分光光度计、荧光分光光度计和酶标仪,均购于美国 Thermo 公司;梯度 PCR 和 Real time PCR 仪均为日本 TaKaRa 公司产品;凝胶电泳槽和蛋白检测仪器均为上海 TANON 公司产品;倒置相差显微镜,日本 Olympus 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 模拟缺氧环境 缺氧组细胞在完全培养基中(RPMI 1640+10%FBS)加入终浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 氯化铬, 37°C 和 5% CO_2 条件培养;

1.2.2 药物制备与分组 将生半夏、南星各 100g 粉碎后,旋转蒸发仪煎煮成水煎剂,按照不同体积比例加入完全培养基。实验时将细胞分为空白组、缺氧组、药物干预组(分别加入不同体积浓度药物:0.05v/v,0.1v/v,0.15v/v,0.2v/v,0.25v/v),其中空白组使用不含药物的 RPMI 完全培养基培养,正常条件培养 4 小时后,药物干预组加入氯化铬,正常条件继续 24 小时,收集细胞样本进行 mRNA 及蛋白含量检测,取缺氧处理后不同时间点细胞样本进行细胞活性检测。

1.2.3 BGC823 细胞活性检测 将对数生长期的 BGC823 细胞使用胰酶消化 1 分钟,1000 $\times$ g 离心 5 分钟收集细胞沉淀,使用含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬细胞沉淀并调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL。接种于 96 孔板,每组设 5 个平行孔,每孔加入 100 μl 细胞悬液,正常条件培养,每隔 24 小时,对细胞进行 MTT 检测。每孔加入 20 μl 浓度为 15 mg/ml 的 MTT,缓慢晃动培养板,使其在培养基均匀分布,正常条件共孵育 4 小时,去上清液,每孔加入 150 μl 的 DMSO 溶液, 37°C 和 100rpm 震荡培养板,使用酶标仪进行吸光值检测,检测波长为 570nm。

1.2.4 Realtime-PCR 测定 HIF-1 α mRNA 含量 BGC823 各组细胞培养 24 小时,收集细胞样本,进行 mRNA 含量检测。使用 Trizol 法提取细胞样本的 Total RNA,琼脂糖凝胶电泳观察条带完整性,紫外分光检测 RNA 纯度及浓度。每样本取 1 μg RNA,使用 M-MLV 逆转录体系及 Oligo(dT)18 Primer 引物逆转录制备 cDNA。选取 β -actin 作为内参(GenBank, NM_0011101.3),设计用于定量检测的 PCR 引物,检测 HIF-1 α mRNA(GenBank, NM_001530.3)相对含量。引物要求跨内含子设计。引物序列如下: HIF-1 α -Forward primer: 5'-GCGCGAAC-GACAAGAAAAAGATAA-3' HIF-1 α -Reverse primer: 5'-CAC-ACGCAAATAGCTGATGGTAAG-3' β -actin-Forward primer: 5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3' β -actin-Reverse primer: 5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3' PCR 产物长度分别为 191bp 和 211bp。PCR 引物设计好之后,PCR 验证引物扩增效率和引物特异性,然后使用荧光染料法(SYBR)进行 PCR 反

应。反应结束后,获得实验曲线和数据,进行数据分析,以看家基因 β -actin mRNA 作为对照,通过 Ct 值进行数据分析。Ct 值通过交点法计算获得,即通过扩增曲线与阈值线的交点来计算 Ct 值(Thermal Cycler DICE Real Time System analysis software)。相对定量的结果则通过 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法来进行解析,目的基因相对于内参基因的表达式为 $2\Delta\text{Ct}=2\text{Ct}_{\text{m}}-\text{Ct}_{\text{n}}$,标本之间的基因表达量差异则通过 $2\Delta\Delta\text{Ct}=2\Delta\text{Ct}_1-\Delta\text{Ct}_2$ 计算分析。

1.2.5 Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白的表达 BGC823 各组细胞培养 24 小时,收集细胞样本,进行蛋白含量检测。使用细胞总蛋白提取试剂盒进行总蛋白提取,BCA 法进行蛋白浓度检测。然后进行 Western blot 检测:制胶,配制 10%的分离胶和 4%浓缩胶,蛋白样本 10 μl 上样。80V 恒压,样品跑至分离胶,改 120V 恒压样品跑到底,终止电泳,进行转膜。转膜完成后,使用 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液进行封闭,一抗 4°C 过夜孵育,二抗室温反应一小时。将 ECL 发光液滴加到 PVDF 膜上,静置 1 分钟,然后使用 X 光片曝光,显影、定影。蛋白实验选择 GAPDH 作为参照,一抗稀释比例分别为:GAPDH(sc-48166)为 1:500, HIF-1 α (sc-13515),二抗稀释比例均为 1:5000。扫描底片,使用分析软件 TotalLab v1.1.0 对目的条带进行光密度值分析。

1.2.6 胃癌细胞 BGC823 侵袭力检测 使用胰酶消化法制备细胞悬液,用不含血清的 RPMI 1640 重悬细胞并调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,取 200 μl 细胞悬液加入 Transwell 小室,每孔添加 500 μl ,下室加入 500 μl 含有 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基,每组设 6 个平行样, 37°C 5% CO_2 温箱孵育 24 h。使用手术刀切取 Transwell 小室底膜,一部分进行染色拍照,一部分进行荧光检测。使用细胞裂解缓冲液/染色试剂(Lysis Buffer/Dye Solution)裂解膜上的细胞,用 4X 裂解缓冲液以 1:7.5 的比例稀释 CyQuant GR 染料,向已含有 225 μl 细胞脱落试剂及侵袭透过膜的细胞的孔中加入 75 μl 稀释后的裂解液,室温孵育 15 分钟,使用荧光分光光度计进行荧光检测,检测条件:激发波长为 480nm,发射波长为 520nm。

1.3 统计学方法

数据以表示。采用方差分析(ANCOVA)及 LSD 两两比较法。应用 SAS9.1.3 软件进行方差分析及总体比较,SPSS 13.0 进行 LSD 两两比较法得出 P 值, $P<0.05$ 认为有统计学意义, $P<0.01$ 认为有极显著性差异。

2 结果

2.1 BGC-823 细胞增殖率检测

通过 MTT 检测可以发现,含不同药物体积的培养液均能不同程度的抑制 BGC 细胞的生长与增殖,且培养液内药物含量越高,培养时间越长,细胞生长受到的抑制作用也越明显。见表 1。不仅与对照组相比具有统计学差异($P<0.01$),而且高浓度药物组相比低浓度药物组的抑制率,也有明显统计学差异($P<0.01$)。见图 1。提示,半夏、半夏水提物具有抑制 BGC 细胞生长增殖的作用。使用公式法求出半夏、半夏水提物对于 BGC823 细胞的 IC₅₀:各药物浓度组的生长抑制率(%)=(1-实验孔平均 OD 值/对照孔平均 OD 值) $\times 100\%$, $\text{IC}_{50}=\lg^{-1}[\text{Xm}-i(\Sigma P-0.5)]$,重复 3 次,取平均值约为 7.930%。

表 1 半夏、南星水提物对 BGC 细胞增殖的影响(OD $\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of water extract of Raw Pinellia and Nan Sing on proliferation of BGC cell line(OD $\bar{x} \pm s$)

Group	N	OD Value	Inhibition%
Control	5	0.850 $\pm$ 0.036	0.000
0.01v/V	5	0.809 $\pm$ 0.007	4.81 $\pm$ 3.26
0.02v/V	5	0.741 $\pm$ 0.017*▲	12.76 $\pm$ 4.04
0.05v/V	5	0.555 $\pm$ 0.056*▲	34.73 $\pm$ 5.32
0.1v/V	5	0.394 $\pm$ 0.028*▲	53.62 $\pm$ 4.32
0.2v/V	5	0.162 $\pm$ 0.037*▲	80.86 $\pm$ 4.75

*P<0.05 vs control group, ▲P<0.05 vs 0.01v/V group

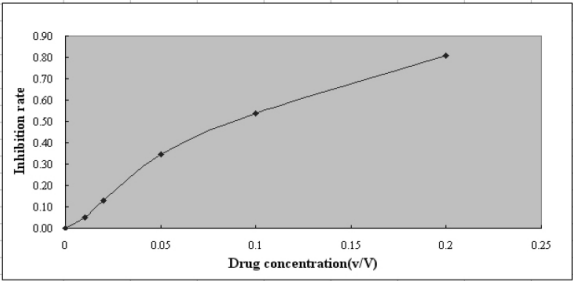


图 1 半夏、南星水提物对 BGC 细胞抑制的作用

Figure 1 Effects of water extract of Raw Pinellia and Nan Sing on inhibition of BGC cell line

2.2 BGC823 细胞 HIF-1 α mRNA 表达

通过 Rt-PCR 检测可发现, 两组进行缺氧造模的细胞, HIF-1 α mRNA 的表达明显高于对照组细胞, 而使用半夏、南星水提物的 48 小时 IC50 浓度干预细胞后, HIF-1 α mRNA 的表达则相比较未行药物干预的缺氧组升高程度明显减少 (P<0.05)。提示, 南星、半夏水提物具有抑制 BGC 细胞在缺氧环境下上调 HIF-1 α 基因表达的作用(P<0.05), 从而减弱细胞在缺氧环境下的生存能力(表 2 图 2)。

表 2 BGC823 细胞 HIF-1 α mRNA 表达
Table 2 Expression of HIF-1 α mRNA in BGC823 cells

Group	HIF-1 α /actin
Control group	0.014 $\pm$ 0.003
Hypoxia group	074 $\pm$ 0.016*
Hypoxia+IC50 group	0.048 $\pm$ 0.009*

* P<0.05 vs control group, ▲P<0.05 vs hypoxia group

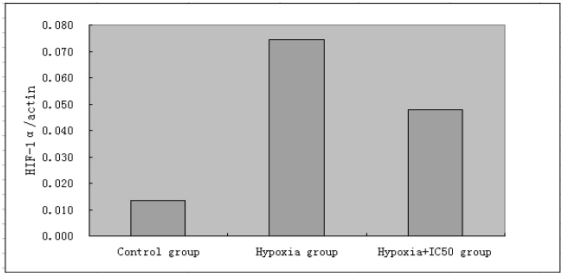


图 2 BGC823 细胞 HIF-1 α mRNA 表达

Figure 2 Expression of HIF-1 α mRNA in BGC823 cells

2.3 Western—blotting 试验

缺氧诱导后胃癌 BGC-823 细胞 HIF-1 α 蛋白表达的较前增加(见图 5)。使用南星半夏水提物干预 48 小时后, BGC-823 细胞 HIF-1 α 蛋白表达较缺氧组下降与 RT-PCR 结果基本一致(见图 3)。

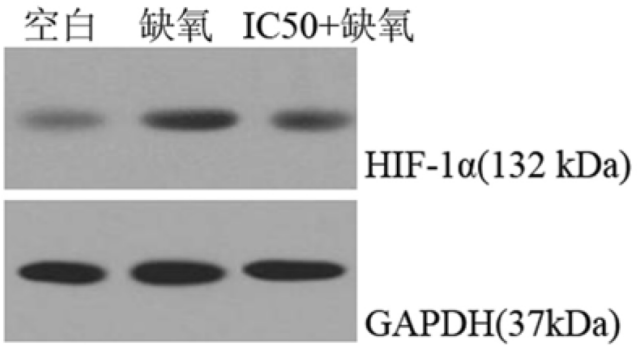


图 3 胃癌 BGC-823 细胞 HIF-1 α 蛋白表达

Fig.3 Expression of HIF-1 α protein in BGC823 cells

2.4 细胞侵袭力实验(Transwell 小室检测)

氯化钴缺氧诱导后细胞侵袭力明显高于正常环境细胞培养组(P<0.05), 使用南星半夏水提物干预 48 小时后, 侵袭力较缺氧诱导组下降, 差异显著(P<0.05)。见表 3 及图 4。

表 3 Transwell 小室细胞数检测

Table 3 Cell number counted by transwell chamber model

Group	HIF-1 α /actin
Control group	0.014 $\pm$ 0.003
Hypoxia group	074 $\pm$ 0.016*
Hypoxia+IC50 group	0.048 $\pm$ 0.009*

* P<0.05 vs control group, ▲P<0.05 vs hypoxia group

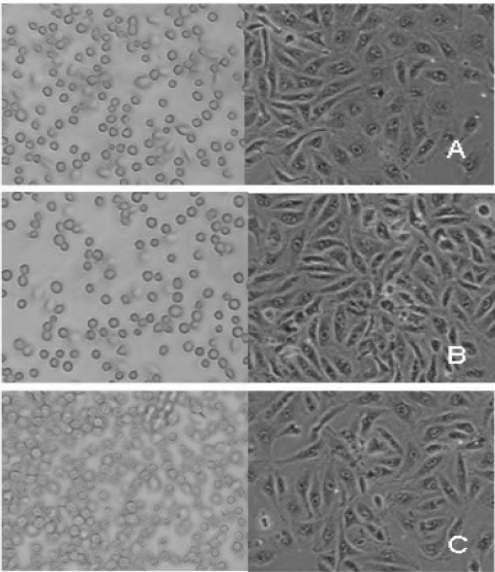


图 4 细胞侵袭检测(左 0%FBS;右 10%FBS)放大倍数均为 200 $\times$;

A:对照组 B 缺氧环境组 C 缺氧环境+IC50 组

Fig.4 Cell invasion assay was assessed by using transwell chamber model (left, 0%FBS;right,10%FBS) amplification: 200 $\times$;

A :Control group;B:Hypoxia group; C :Hypoxia+IC50 group

3 讨论

《黄帝内经》最早提出了痰浊与肿瘤的相关性,如《灵枢·刺节真邪篇》中提到“有所结,气归之,津液流之,邪气中之,凝结日以益甚,连以聚居,为兮瘤,以手按之坚”等,又言“癌瘤者,非阴阳正气所结肿,乃五脏瘀血浊气痰滞而成”。魏品康教授在前人研究的基础上,结合自身长期的实践成果,总结并提出了胃癌癌证组学。该理论认为胃癌的产生是由于六淫入侵(环境恶劣)、饮食失宜(致癌物质)、七情内伤(精神抑郁)造成的气机阻滞(细胞信号传导异常),进而津液停滞(细胞代谢紊乱),郁而化浊,痰浊内蕴(肿瘤循环代谢物质表达异常),淫浸细胞,最终造成细胞突变,产生肿瘤^[9]。在此理论指导下,魏品康教授立消痰散结法为治则,采用以导痰汤化裁而来的消痰散结方为主要方药治疗胃癌,其组方中的君药就是半夏和南星。

掌叶半夏(*Pinellia ternate* (Thunb.)Breit)为天南星科草本植物掌叶半夏的干燥块茎,具有燥湿化痰、消痞散结、降逆止呕的功效^[10]。由于生半夏、南星由于其味辛辣、麻舌而刺喉,具有“戟人咽”的刺激性,属于有毒中药^[14],研究证实其有效提取物能对人肝癌细胞(QGY7703-3和7402)、艾氏腹水癌和腹水型肝癌细胞,而对正常细胞无影响,但需要尽可能消除其毒性对人体的危害^[11]。刘喜平等使发现以半夏为主药的半夏泻心汤对胃癌BGC823细胞有明显的抑制作用,中药天南星(*Rhizoma Arisaematis*)属天南星科天南星属植物,天南星味、苦、辛、性温有毒,具有燥湿化痰、祛风止疼、散结消肿等功效^[12]。天南星是近几年来临床上常用的抗癌组方药物,张志林等研究发现天南星醇提取物对体内移植的小鼠肉瘤株(S180)和小鼠肝癌细胞株(H22)具有显著的抑制肿瘤增殖活性作用^[13]。通过实验发现,生半夏、南星水提取物对BGC823细胞的抑制,明显与药物干预时间和药物浓度成正比,提示生半夏、南星水提取物具有抗胃癌细胞BGC823增殖与生长的作用。

恶性肿瘤的生长依赖于宿主的氧气和营养物质的供应,肿瘤的异常增殖和过度生长使肿瘤组织缺氧虽然缺氧对肿瘤生长不利,但是肿瘤细胞会发生一系列基因和代谢改变得以存活并增殖。HIF-1 α 作为细胞氧平衡和缺氧诱导基因表达的中心调节子,能接受多种条件的刺激,同时又能调节多个酶或生长因子,促使肿瘤细胞在缺氧状态下获得更多的能量和血液供应。进而促进肿瘤的生长和转移,目前已HIF-1 α 为靶点的基因治疗药物已经在研制中^[15-19]。研究发现缺氧有助于各种实体瘤包括胃癌在内对于放化疗药物的抵抗,同时也是促进胃癌的浸润性生长及远处转移的主要原因之一^[20]。张鹏飞^[21]等研究显示,胃癌组织HIF-1 α 与VEGF的表达存在正相关性。提示缺氧与在胃癌的发生发展中具有重要作用,本课题组前期的研究发现,运用CoCl₂(氯化钴)诱细胞缺氧的方法对五种胃癌细胞(NCI-N87、HGC-27、MGC80-3、SGC-7901、BCG823)进行缺氧诱导,发现BCG823细胞的HIF-1 α 升高最为明显,在此次试验中,本研究中运用CoCl₂诱细胞缺氧的方法使得BCG823细胞的HIF-1 α 升高,再用生半夏、南星水提取物干预BGC823细胞48小时后,通过流式细胞仪检测发现,含不同药物体积的培养液均能不同程度的抑制BGC细胞的生长与增殖,且培养液内药物含量越高,培养时间越长,细胞生长受到的抑制作用也越明显,Transwell小室检测结果显示缺氧诱导后细胞侵袭力明

显高于正常环境细胞培养组使用南星半夏水提取物干预48小时后,侵袭力缺氧诱导组下降,这不仅提示生半夏、南星胃癌细胞的侵袭力作用是其治疗胃癌的重要机制,更是通过拆方研究进一步明确了消痰散结方的抗肿瘤疗效,也是对胃癌从痰论治理论的从实验层次的有力支持。

参考文献(References)

- [1] NCCN 胃癌临床实践指南(中国版)专家组,2010年NCCN胃癌临床实践指南(中国版)[EB/OL],2010,http://www.nccn.org Official Representative of NCCN in china, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology(China) [EB/OL],2010, http://www.nccn.org
- [2] Fitzgerald TL, Bradley CJ, Dahman B, et al. Gastrointestinal Malignancies: When Does Race Matter[J]. J Am Coll Surg, 2009,209(5):645-52
- [3] Tsuburaya A, Hayashi T, Arai T, et al. Current status of treatment for elderly patients with gastric cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2010,37(13):2817-2822
- [4] 魏品康,孙大志.胃癌痰发病学说的探讨[J].医学与哲学:临床决策论坛版,2008,29(10):47-49
WEI Pin-kang, SUN Da-zhi. Discussion of the Theory of Phlegm for Gastric Carcinoma Development [J]. Medicine and Philosophy, 2008, 29(10):47-49
- [5] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment[J]. Nat Rev. Cancer, 2004, 4(6):437-447
- [6] Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. [J]. Nat Rev Cancer, 2002,1(2): 38-47
- [7] Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia [J]. Proc Natl Acad Sci U- SA, 1993, 90(9): 4304-4308
- [8] Galanis A, Pappa A, Giannakakis A, et al. Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer[J]. Cancer Lett, 2008, 266(1):12-20
- [9] 魏品康,赵颖.从痰论治胃癌的理论与实践 [J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(5):477-480
WEI Pin-kang, ZHAO Ying. Theory and Practice of Gastric Cancer Treated by Resolving Phlegm[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2009,29(5): 477-480
- [10] 王桂芳.掌叶半夏有效提取物单独对体外培养肝癌HepG2细胞的作用[J].中国现代药物应用,2009,3(12):113-114
WANG Gui-fang. Effects of extract from Pedal Pinellia Tuber on hepatic cancer cells HepG2 cultured in vitro [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2009, 3(12):113-114
- [11] 毛子成.半夏研究进展[J].江西科学,2002,20(1):42-45
MAO Zi_cheng. Progress on Research of Pinellia ternate[J]. Jiangxi Science, 2002,20(1):42-45
- [12] 席时燕,刘喜平.半夏泻心方及其配伍药组含药血清对人胃癌BGC-823细胞增殖及bcl-2表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(4):20-22
XI Shi-Yan, LIU Xi-Ping. BanXiaXieXinTang and its compatibility of diarrhea in treatment group medicated for human cancer BGC-823 cell proliferation and bcl-2 express influence[J]. Chinese traditional Chinese medicine information magazine, 2006,13(4):20-22
- [13] 张志林,汤建华.中药天南星醇提取物抗肿瘤活性的研究[J].陕西中医,2010,31(2):242-243
ZHANG Zhi-lin, TANG Jian-hua. Research of activities in tian-nan-xing extract[J]. Shanxi Traditional Medicine, 2010, 31(2):42-243

(下转第1880页)

- 学杂志, 2008, 31(2): 111-114
- Yang Yang, Gao Yue-qiu. Effect of the PIK3CA Mutation in the Genesis of Human Cancer [J]. International Journal of Genetics, 2008, 31(2): 111-114
- [5] 蒋健坤, 莫维光. 结直肠癌组织中 PIK3CA 基因突变与 AKT1/2 蛋白的表达及其意义[J]. 广西医学, 2010, 1: 24-27
- Jiang Jian-kun, Mo Wei-guang. Mutation of PIK3CA Gene and Expression of AKT1/2 in Human Colorectal Cancer and their Biological Significance[J]. Guangxi Medical Journal, 2010, 1: 24-27
- [6] 廖绍光, 傅国平, 王雅杰. 上海地区妇女乳腺癌组织 PIK3CA 基因热点突变区域研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(18): 1365-1367
- Liao Shao-guang, Fu Guo-ping, Wang Ya-jie. Mutational hotspots of PIK3CA in breast cancer among Chinese women in Shanghai [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2009, 16(18): 1365-1367
- [7] 李扬扬, 吴淑华, 刘鲁英等. PIK3CA 蛋白在大肠癌变过程中的表达及临床意义[J]. 滨州医学院学报, 2010, 33(1): 5-8
- Li Yang-yang, Wu Shu-hua, Liu Lu-ying, et al. Expression and clinical significance of PIK3CA in the progress of colorectal canceration[J]. Journal of Binzhou Medical College, 2010, 33(1): 5-8
- [8] 陆兴热, 高仕萍, 刘孝文等. RNA 干扰介导的 PIK3CA 基因沉默抑制 Hep-2 细胞增殖和侵袭力 [J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(3): 83-84
- Lu Xing-re, Gao Shi-ping, Liu Xiao-wen, et al. PIK3CA mutation analysis in colon carcinoma [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2010, 33(3): 83-84
- [9] Li V, Wong C, Chan T, et al. Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 29
- [10] Troxell ML, Levine J, Beadling C, et al. High prevalence of PIK3CA /AKT pathway mutations in papillary neoplasms of the breast[J]. Mod Pathol, 2010, 23(1): 27-37
- [11] Kostakis GC, Papadogeorgakis N, Koumaki V, et al. Absence of hotspot mutations in exons 9 and 20 of the PIK3CA gene in human oral squamous cell carcinoma in the Greek population [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 109(5): 53-58
- [12] Hafner C, Landthaler M, Vogt T, et al. Activation of the PI3K/AKT signalling pathway in non-melanoma skin cancer is not mediated by oncogenic PIK3CA and AKT1 hotspot mutations [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(8): 222-227
- [13] Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA Mutations, PTEN, AREG, EREG Expression and Skin Rash in $\geq$ 2nd Line Cetuximab-Based Therapy of Colorectal Cancer Patients[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15980
- [14] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers [J]. Science 2004, 304: 554
- [15] Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer [J]. Nat Genet, 2007, 39(3): 347-351
- [16] Fumagalli D, Gavin PG, Taniyama Y, et al. A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 101
- [17] Rodi CP, Darnhofer Patel, Stanssens B, et al. A strategy for the rapid discovery of disease markers using the MassARRAY system [J]. BioTechniques 2002,32: S62-S69
- [18] MacConaill LE, Campbell CD, Kehoe SM, et al. Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples [J]. PLoS One, 2009, 4(11): 7887-7893
- [19] Ikeda S, Sasazuki S, Natsukawa S, et al. Screening of 214 single nucleotide polymorphisms in 44 candidate cancer susceptibility genes: a case-control study on gastric and colorectal cancers in the Japanese population [J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103: 1476-1487
- [20] Oeth P, del Mistro G, MarnellosG, et al. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY) [J]. Methods Mol Biol, 2009, 307-343
- [21] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74-108
- [22] Janku F, Tsimberidou AM, Garrido-Laguna I, et al. PIK3CA Mutations in Patients with Advanced Cancers Treated with PI3K/AKT/mTOR Axis Inhibitors[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(3): 558-565

(上接第 1864 页)

- [14] 吴皓, 束建清. 半夏姜制对 β -谷甾醇和总生物碱含量的影响[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 662-664
- WU Hao, SU Jian-qing. Effect of Ginger-processing on β -sitosterol and Total Alkaloid Contents in Rhizoma Pinelliae [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 1995, 20(11): 662-664
- [15] Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85: 9533-9537
- [16] Young SD, Hill RP. Effects of reoxygenation on cells from hypoxic regions of solid tumors: Anticancer drug sensitivity and metastatic potential[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1990, 82: 371-380
- [17] Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP. Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors [J]. Cancer Research, 2001, 61: 8903-8908
- [18] Postovit LM, Adams MA, Lash GE, et al. Oxygen-mediated regulation of tumor cell invasiveness. Involvement of a nitric oxide signaling pathway[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 35730-35737
- [19] Rofstad EK, Rasmussen H, Galappathi K, et al. Hypoxia promotes lymph node metastasis in human melanoma xenografts by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator receptor[J]. Cancer Research, 2002, 62, 1847-1853
- [20] Siegfried JA, Kennedy KA. The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug-resistant tumor cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1983, 258: 339-343
- [21] 张鹏飞. 胃癌中 HIF-1 α 、VEGF 及 Glut1 的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(1): 86-89
- ZHANG Peng-fei. Expression of HIF-1 α , VEGF and Glut1 in gastric cancer[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2010, 45(1): 86-89