

穿心莲内酯对人肺癌细胞增殖以及侵袭相关分子表达的影响

罗湘玉 郑雪松 罗卫民[△]

(湖北医药学院附属太和医院 湖北 十堰 442000)

摘要 目的 观察穿心莲内酯(Andrographolide, AD)对人非小细胞肺癌细胞系 H3255 细胞的生长抑制作用,并研究其对肿瘤生长相关标记物血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 1 的表达以及蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的活性有无影响。方法 体外培养 H3255 细胞,分别用 1.0、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 AD 在处理细胞 24h。MTT 法检测细胞的增殖,比色法检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的释放情况。ELISA 检测 DNA 片段化情况以及 VEGF 和 TGF- β 1 的产生,无机磷法检测 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性以及磷基转移法测得 PKC 活性。结果 AD 处理能呈剂量依赖性方式降低 H3255 细胞的活性以及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性($P<0.05$),同时也能促进 LDH 的释放和 DNA 片段的形成,并减少肺癌细胞 VEGF 和 TGF β 1 的水平和 PKC 的磷酸化。结论 AD 对肺癌细胞具有一定的抑制作用,有望成为一种潜在的肿瘤治疗药物。

关键词 穿心莲内酯 肺癌细胞 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性 蛋白激酶 C 血管内皮生长因子 转化生长因子 β 1

中图分类号: Q95-3, R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)17-3249-04

Effect of Andrographolide on Human Lung Cancer Cells Proliferation and Invasion-associated Molecular Expression

LUO Xiang-yu, ZHENG Xue-song, LUO Wei-min[△]

(Department of Cardiothoracic Surgery, Hubei University of Medicine affiliated Taihe hospital of Shiyan, 442000 Shiyan, China)

ABSTRACT Objective: To observe the growth suppression effect of Andrographolide (AD) on non-small cell lung cancer cell line H3255, and to study the expression of tumor growth associated biomarkers such as vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and the activity of protein kinase C (PKC). **Methods:** H3255 cells were cultured in vitro, and incubated with 1.0, 2.5 or 5.0 $\mu\text{mol/L}$ AD for 24h. MTT assay was performed to examine cell viability, LDH activity was determined by colorimetric methods. DNA fragmentation, expression of VEGF and TGF- β 1 were detected by ELISA. The ATPase activity and PKC activity were tested by inorganic phosphorus detection method and phosphoryl abevacuation, respectively. **Results:** AD treatments concentration-dependently decreased cell viability, and lowered $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity ($P<0.05$). This compound also increased DNA fragmentation and LDH releasing. It also reduced VEGF and TGF- β 1 levels, and inhibited protein kinase C activity in H3255 cells ($P<0.05$). **Conclusion:** AD can inhibit lung cancer cells growth, and thus it may be a potent anti-lung cancer agent.

Key words: Andrographolide; Lung cancer cells; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity; Protein kinase C; Vascular endothelial growth factor; Transforming growth factor β 1

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R734.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)17-3249-04

前言

肺癌是各类癌症死亡的首位。尤其是非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC) 最常见(占肺癌总数的 80%以上)。NSCLC 早期多无明显临床症状,就诊时往往处于中晚期且因远处发生转移而失去手术机会^[1]。在肺癌的发生当中, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在介导细胞黏附及信号转导过程中发挥重要作用,因此它的表达及活性与癌症的发生发展密切相关,目前已经成为抗癌药物的一个重要目标^[2]。另一方面,血管内皮生长因子

(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 1 也广泛参与癌症细胞的黏附,促进癌症转移^[3,4]。

近年来, NSCLC 的药物治疗策略已转向抑制肿瘤生长侵袭过程进程中的特异性分子和通路的分子靶向治疗。所以寻找对非小细胞肺癌低毒高效的药物,提高非小细胞肺癌对放疗、化疗的敏感性是改善非小细胞肺癌疗效及预后的重要研究方向之一^[5,6]。穿心莲内酯(Andrographolide, AD)是我国传统中草药穿心莲中提取出来的一类二萜类化合物。它通常作为一种消炎解毒药物用于治疗各种感染性疾病^[7]。近年来研究发现, AD 除了传统的抗病毒作用外,也具有抗肿瘤的潜能^[8]。但有关 AD 在 NSCLC 中的作用目前仍不清楚。本研究试图探讨 AD 对 NSCLC 细胞生长有无影响,同时从 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、VEGF、TGF- β 1 以及蛋白激酶 C(PKC)活性方面探讨其在 NSCLC 中的治疗价值。

作者简介: 罗湘玉(1972-),女,副主任护师,主要研究方向:心肺疾病的防治研究

[△]通讯作者: 罗卫民,电话: 0719-8801710

E-mail: luoweimin0803@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2012-02-27 接受日期: 2012-03-30)

1 材料与方法

1.1 实验试剂

穿心莲内酯(Andro)购自 Sigma-Aldrich 公司,以 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的浓度溶解在二甲基亚砜(DMSO)中作为贮存液。本研究细胞培养所用的培养基、培养板、抗生素均为 Invitrogen 公司产品。其他分析纯产品分别来源于上海生工和 AMERCO。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养与处理 人肺癌细胞系 H3255 购自 ATCC。用含 10% 牛胎儿血清、 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青霉素以及 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的链霉素的 RPMI-1640 培养基(pH7.4)中在 37°C 、5% CO_2 条件下培养。细胞 3 天换液 1 次。实验前将细胞密度调整于 10^8 L^{-1} 。实验分为阴性对照组和 AD 处理组。其中对照组加入等量的 RPMI-1640 培养基(含终浓度低于 0.5% 的 DMSO)。处理组加入 1.0 、 2.5 、 $5.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AD 在 37°C 下处理实验细胞 24h。

1.2.2 MTT 实验 H3255 细胞按照 10^8 L^{-1} 接种于 96 孔板中 ($180 \text{ } \mu\text{L}$ / 孔), 每组设立 6 个复孔。细胞处理结束后, 加入 $20 \text{ } \mu\text{L}$ MTT 溶液, 37°C 继续培养 4 h。弃上清, 加入 $200 \text{ } \mu\text{L}$ DMSO 避光振荡 15min, 用全自动酶标仪测量 570 nm 下的吸光度。细胞活性为各组 OD 值 / 阴性对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)实验 通过测量培养基中细胞外 LDH 的含量来评价细胞膜的损伤程度。细胞处理结束后, 获取 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 上清用于 LDH 活性分析。操作方法按照 Sigma 公司提供的试剂盒进行比色测定法在半自动生化分析仪上进行。

1.2.4 DNA 片段检测 采用 ELISA 法检测死亡细胞 DNA 片段。细胞经不同浓度的 AD 孵育之后, 获取细胞并加入裂解液处理 30 min。 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10min。取 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 上清液加入至链酶亲和素包被的 96 孔板中, 并加入 $80 \text{ } \mu\text{L}$ 新配制的反应试剂(试剂盒提供)室温下孵育 2 h。PBS 洗涤后, 加入底物并孵育 15 min。利用全自动酶标仪测量 405 nm 处的吸光度。DNA 片段用富集因子(enrichment factor)表示, 其计算公式 = 样本吸光度 / 对照组吸光度。

1.2.5 Na^+/K^+ -ATP 酶活性分析 测定酶促反应释放的无机磷(Pi)的含量来确定 ATP 酶的活性。反应体系包括 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP、 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)以及新鲜细胞线粒体分离物。体系加入 ATP 后, 30°C 孵育 15 min, 随后加入 15% 三氯乙酸终止反应。通过测量 640 nm 处的吸光度分析释放的 Pi。1 个单位 ATP 活性被定义为 1mg 蛋白质 1h 内催化 ATP 生成 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pi。计算处理组 / 对照组 ATP 酶活性的比值。

1.2.6 VEGF 和 TGF- β 1 水平的分析 不同浓度 AD 处理 H3255 细胞结束后, PBS 洗涤 1 次。加入终浓度为 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TNF- α 孵育 18h。ELISA(R&D 公司)测定 H3255 细胞上清中 VEGF 和 TGF- β 1 的浓度(单位: $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$)。

1.2.7 PKC 活性的测定 根据参考文献提供的原理, 利用一个能被 PKC 磷酸化的假底物间接测定 PKC 同工酶活性^[9]。即细胞处理结束后用 4°C PBS 洗涤 2 次, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心后加入 1ml

缓冲液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β - 巯基乙醇, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲胺, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF, pH 7.5) 中重悬浮细胞。测定上清浓度后, 根据试剂盒(EMD Biosciences)提供的方法测定 PKC 的相对酶活性($\lambda=492 \text{ nm}$)中进行悬浮。测定蛋白质浓度。根据商家的说明分析 PKC 的活性。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 用 SPSS10.0 软件处理数据, 组间比较采用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 AD 对 H3255 细胞活性的影响

如图 1 所示, 1.0 、 2.5 、 $5.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AD 能以剂量依赖性方式抑制 H3255 细胞的活性, 当 AD 浓度为 $5.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与对照组相比, H3255 细胞活性降低至 38%。此外, AD 也能促 H3255 细胞 LDH 的释放(图 2)。其中 $5.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AD 诱导产生 LDH 含量达 $(243.15 \pm 31.77) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

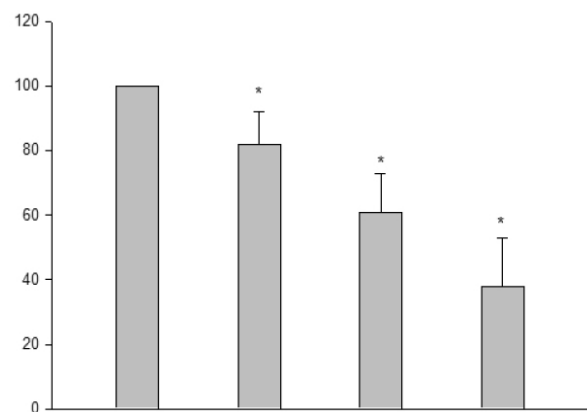


图 1 不同浓度 AD 对 H3255 细胞活性的影响

* $P<0.05$ VS 对照组

Fig.1 Effect of different concentration of AD upon cell viability

* $P<0.05$ VS Control group

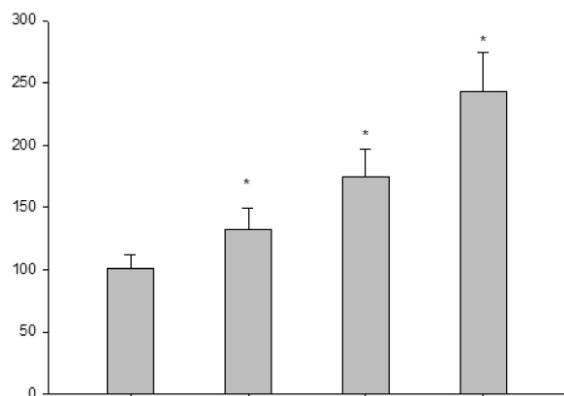


图 2 不同浓度 AD 对 H3255 细胞 LDH 活性的影响

* $P<0.05$ VS 对照组

Fig.2 Effect of different concentration of AD on LDH activity in H3255

cells

* $P<0.05$ VS Control group

2.2 不同浓度 AD 对 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响

不同浓度的 AD 能不同程度抑制 H3255 细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。其中 AD 浓度为 1.0 μmol·L⁻¹ 时, 能使酶活性降低至 85 % 2.5 μmol·L⁻¹ 能其活性为 65%, 而 5.0 μmol·L⁻¹ AD 能使 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性降低至 44% ,见图 3 所示。

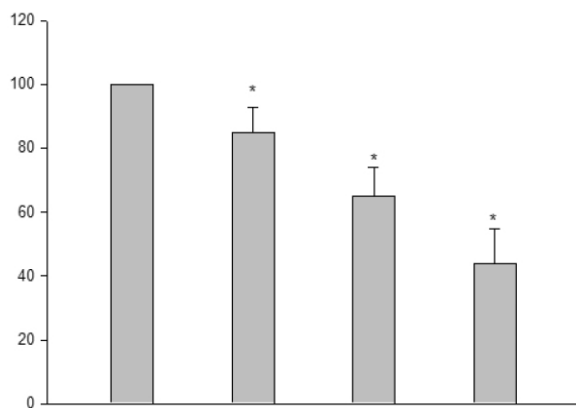


图 3 不同浓度 AD 对 H3255 细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响
*P<0.05 VS 对照组

Fig.3 Effect of different concentration of AD on Na⁺-K⁺-ATPase activity in H3255 cells
*P<0.05 VS Control group

2.3 AD 对 DNA 片段化损伤的影响

AD 对 H3255 细胞 DNA 片段化损伤的影响见图 4 所示。

1.0 μmol·L⁻¹ AD 处理无明显 DNA 片段产生, 当 AD 浓度为 2.5 μmol·L⁻¹ 和 5.0 μmol·L⁻¹ 时, 能明显诱导 DNA 片段化, 其富集因子分别为 1.46 和 1.71, 与对照组相比, P<0.05。

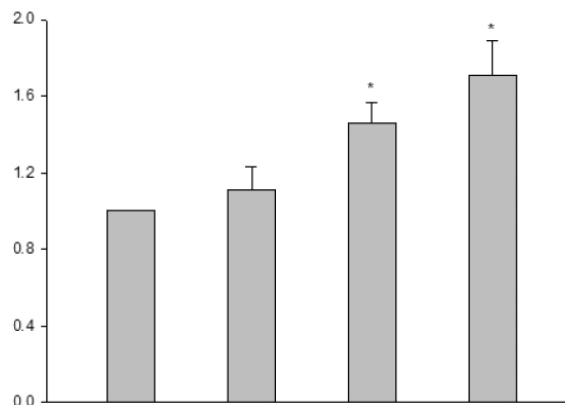


图 4 不同浓度 AD 对 H3255 细胞 DNA 片段化损伤的影响
*P<0.05 VS 对照组

Fig.4 Effect of different concentration of AD upon DNA fragment
*P<0.05 VS Control group

2.4 AD 对 VEGF 和 TGF-β1 表达的影响

1.0、2.5、5.0 μmol·L⁻¹ AD 可呈剂量依赖性减少 VEGF 及 TGF-β1 水平。见表 1 所示, 与对照组相比, 5.0 μmol·L⁻¹ AD 可将 VEGF 水平降低 50.4 %, TGF-β1 降低至 55.7%。

表 1 不同浓度 AD 对 H3255 细胞 VEGF 和 TGF-β1 表达的影响($\bar{X} \pm S$ n=6)

Table 2 Effect of different concentration of AD upon VEGF and TGF-β1 expression($\bar{X} \pm S$ n=6) in H3255 cells

	VEGF(pg/mg·protein)	TGF-β1(pg·mg ⁻¹ ·protein)
Control(0.1 % DMSO)	172.85± 12.75	229.93± 9.75
1.0 μmol·L ⁻¹ AD	150.32± 11.72*	208.23± 5.71*
2.5 μmol·L ⁻¹ AD	116.36± 8.44*	127.52± 7.15*
5.0 μmol·L ⁻¹ AD	85.62± 5.74*	101.87± 6.52*

注: *P<0.05 VS 对照组。

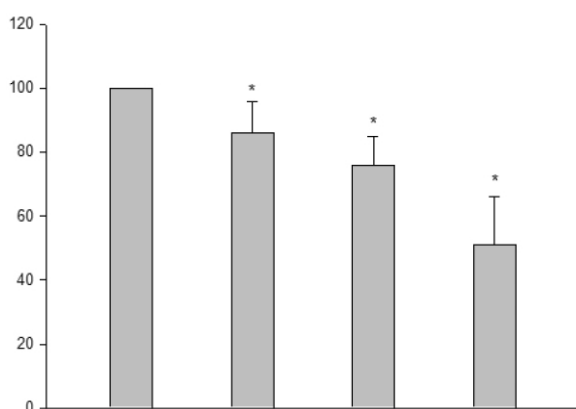


图 5 不同浓度 AD 对 H3255 细胞 PKC 活性的影响
*P<0.05 VS 对照组

Fig.5 Effect of different concentration of AD on PKC activity in H3255 cells
*P<0.05 VS Control group

2.5 AD 处理对 H3255 细胞 PKC 活性的影响。

AD 在 1.0~5.0 μmol·L⁻¹ 内可明显抑制 PKC 的活性。如图 5 所示, 与对照组相比, 1.0 μmol·L⁻¹ AD 处理能轻微降低 PKC 的活性, AD 浓度为 2.5 μmol·L⁻¹ 时, PKC 活性降至 76%, 而 5 μmol·L⁻¹ AD 能进一步抑制 PKC 活性至 51%, 经统计学分析, P<0.05。

3 讨论

在本研究当中, 我们证实浓度为 1.0~5.0 μmol·L⁻¹ 的 AD 对 H3255 细胞具有抗增殖效应, 并可明显增加 DNA 断裂, 降低 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性, 减少 VEGF 和 TGF-β1 的产生。这些实验研究结果表明, AD 是可能是一种能有效延缓肺癌进展的潜在药物, 同时也部分说明了该二萜类化合物可能是通过以上机制而实现的。

在肿瘤的治疗当中, 诱导相应的细胞凋亡是治疗的主要目标, 而 DNA 片段的形成是细胞凋亡的重要特征^[10,11]。在本研究

当中 AD 对细胞活性影响以及 DNA 片段的形成结果保持一致。其机制可能是由于 AD 渗入肺癌细胞当中,从而破坏了细胞膜的完整性,最终引起细胞凋亡^[12,13]。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶为三羧酸循环的关键酶,由 1 个 α -亚单位和 1 个 β 亚单位组成的异二聚体。 α -亚单位是一种跨膜蛋白,可介导细胞内 Na^+ 和细胞外 K^+ 交换^[14,15]。因此,该酶对于维持离子的动态平衡非常关键。因此各种因素引起 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性发生改变后,可触发线粒体跨膜势能的变化,从而导致细胞凋亡相关分子的释放^[16,17]。在本研究中 AD 能引起 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性降低,这表明肺癌细胞中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的 α -亚单位功能已经发生了异常,和 / 或破坏了线粒体膜的膜功能的完整性,这也意味着线粒体的功能障碍可能是 AD 诱导肺癌细胞凋亡的最终结果^[18]。VEGF 和 TGF- β 1 是血管生成因子^[19]。TGF- β 1 可通过它的免疫抑制效应而促进 NSCLC 转移^[20]。因此 VEGF 和 TGF- β 1 低表达表明 AD 能有效抑制肺癌细胞中血管生成和转移。

PCK 的活化与肿瘤细胞信号传导途径有关,从而促进肿瘤的增殖和侵袭^[21]。有研究显示,PCK 的过度表达以及活性的增加可促进 NSCLC 的转移。本研究证实 $1.0\sim 5.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AD 处理可有效抑制 PCK 在肺癌细胞中的活化。这表明 AD 可能潜在性地下调这些肿瘤生长相关通路的活性,从而延缓肺癌的进展。

此外,我们注意到,浓度为 $16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的穿心莲内酯在 A549 细胞中比其他细胞系中可引起更多 DNA 的断裂以及 PCK 的活性更低。这些结果表明,每种细胞系对该化合物的反应不同。因此,阶段以及可能的癌症分子。另一方面,尽管穿心莲内酯在很多植物食品中自然产生,但在对人类进行应用时,应该检验它的安全性。

总之,本研究证实 AD 处理能通过增加 DNA 断裂、降低 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,从而促进肺癌细胞凋亡,并降低 TGF- β 1 和 VEGF 的表达以及 PCK 的活性。这表明 AD 是潜在的抗癌药物,但作为一种抗肺癌治疗药物,癌细胞种类以及癌症的分期可能也有所不同。此外,虽然 AD 来源于自然植物,但作为一种治疗药物,其体内有效剂量以及安全性还需要进行进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Gamliel Z. Surgical staging for non-small cell lung cancer [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2011, 20(4):691-700
- [2] Bando T, Fujimura M, Kasahara K, et al. Significance of Na^+ , K^+ -ATPase on intracellular accumulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in human non-small-cell but not in small-cell lung cancer cell lines [J]. Anticancer Res, 1998, 18(2A):1085-1089
- [3] Zhao M, Gao FH, Wang JY, et al. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2011, 73(3):366-374
- [4] Jeon HS, Jen J. TGF-beta signaling and the role of inhibitory Smads in non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(4):417-419
- [5] Kulesza P, Ramchandran K, Patel JD. Emerging concepts in the pathology and molecular biology of advanced non-small cell lung cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2011, 136(2):228-238
- [6] Carbone DP, Felip E. Adjuvant therapy in non-small cell lung cancer: future treatment prospects and paradigms [J]. Clin Lung Cancer, 2011, 12(5):261-271
- [7] Lee KC, Chang HH, Chung YH, et al. Andrographolide acts as an anti-inflammatory agent in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages by inhibiting STAT3-mediated suppression of the NF-kappaB pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(3):678-684
- [8] Pratheeshkumar P, Kuttan G. Andrographolide inhibits human umbilical vein endothelial cell invasion and migration by regulating MMP-2 and MMP-9 during angiogenesis [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2011, 30(1):33-41
- [9] Jasinski P, Welsh B, Galvez J, et al. A novel quinoline, MT477: suppresses cell signaling through Ras molecular pathway, inhibits PKC activity, and demonstrates in vivo anti-tumor activity against human carcinoma cell lines [J]. Invest New Drugs, 2008, 26(3):223-232
- [10] Zhao H, Guo W, Peng C, et al. Arsenic trioxide inhibits the growth of adriamycin resistant osteosarcoma cells through inducing apoptosis [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(5):2509-2515
- [11] Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, et al. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators [J]. Int J Cancer, 2008, 122(1):138-143
- [12] Yang S, Evens AM, Prachand S, et al. Mitochondrial-mediated apoptosis in lymphoma cells by the diterpenoid lactone andrographolide, the active component of Andrographis paniculata [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(19):4755-4768
- [13] Panneerselvam S, Arumugam G, Karthikeyan NS. Effect of andrographolide on cysteamine-induced duodenal ulcer in rats [J]. Nat Prod Res, 2011, 25(16):1560-1564
- [14] Chung C, Mader CC, Schmitz JC, et al. The vacuolar-ATPase modulates matrix metalloproteinase isoforms in human pancreatic cancer [J]. Lab Invest, 2011, 91(5):732-743
- [15] Garcia-Garcia A, Perez-Sayans GM, Rodriguez MJ, et al. Immunohistochemical localization of C1 subunit of V-ATPase (ATPase C1) in oral squamous cell cancer and normal oral mucosa [J]. Biotech Histochem, 2012, 87(2):133-139
- [16] Rajasekaran SA, Huynh TP, Wolle DG, et al. Na,K-ATPase subunits as markers for epithelial-mesenchymal transition in cancer and fibrosis [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(6):1515-1524
- [17] Sanchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, et al. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype [J]. J Biol Chem, 2010, 285(33):25308-25313
- [18] Huang KH, Chow KC, Chang HW, et al. ATPase family AAA domain containing 3A is an anti-apoptotic factor and a secretion regulator of PSA in prostate cancer [J]. Int J Mol Med, 2011, 28(1):9-15
- [19] Cha HJ, Lee HH, Chae SW, et al. Tristetraprolin downregulates the expression of both VEGF and COX-2 in human colon cancer [J]. Hepatogastroenterology, 2011, 58(107-108):790-795
- [20] Soufla G, Sifakis S, Baritaki S, et al. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix [J]. Cancer Lett, 2005, 221(1):105-118
- [21] Bosco R, Melloni E, Celeghini C, et al. Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside [J]. Mini Rev Med Chem, 2011, 11(3):185-199