

干扰 RNA 沉默 ATP1A1 基因对 U251 胶质瘤干细胞增殖的影响

赵洪新¹, 张丽², 王玉玉¹, 李刚¹, 李毅^{1△}

(遵义医学院附属医院:1. 神经外科;2. 神经内科, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 探讨沉默 ATP1A1 基因对人 U251 胶质瘤干细胞增殖能力的影响。方法 采用 ATP1A1-shRNA 慢病毒感染人 U251 胶质瘤干细胞, 逆转录实时定量 PCR(RT-qPCR)及蛋白质印迹法(Western blot)分别检测 ATP1A1 的 mRNA 和蛋白表达, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡, MTT 法检测细胞体外的增殖情况。结果 通过 RT-qPCR 及 Western blot 分析表明, 感染后的细胞组 ATP1A1 的 mRNA 和蛋白表达均受到明显抑制, ATP1A1 mRNA 抑制率为 84.15%, 蛋白表达抑制率为 55.33%, 细胞生长变慢, 细胞凋亡比例显著增加, G₁ 期细胞增多, 而 S 期细胞减少, 二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 靶向 ATP1A1 基因干扰能够抑制人 U251 胶质瘤干细胞 ATP1A1 的表达, 诱导细胞凋亡, 调控细胞周期再分布, 抑制细胞增殖。

关键词: RNA, 小分子干扰; 神经胶质瘤; 干细胞; ATP1A1 基因; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.08.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)08-0949-03

The effect of silencing ATP1A1 gene expression by RNA interference on proliferation of human U251 glioma stem cells

Zhao Hongxin¹, Zhang Li², Wang Yuyu¹, Li Gang¹, Li Yi^{1△}

(1. Department of Neurosurgery; 2 Department of Neurology,

the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ATP1A1 knockdown by RNA interference(RNAi) on proliferation of human U251 glioma stem cells. **Methods** The human U251 glioma stem cells were infected with lentivirus expressing ATP1A1-shRNA. The mRNA and protein expressions of ATP1A1 in U251 glioma stem cells were detected by RT-qPCR and Western blotting, respectively. The cell cycle and apoptosis were evaluated by flow cytometry. The proliferation of U251 glioma stem cells was determined by MTT assay. **Results** The expressions of ATP1A1 in U251 glioma stem cells transfected with ATP1A1-shRNA were inhibited significantly at both mRNA and protein levels, with an inhibitory rate of 84.15% for ATP1A1 mRNA and of 55.33% for ATP1A1 protein respectively. The proliferation of cells was inhibited, the cell apoptotic rate was significantly increased and the cell cycle was arrested in G₁ phase and S phase decreased significantly in ATP1A1-shRNA cells ($P < 0.05$). **Conclusion** RNAi targeting ATP1A1 gene could down-regulates the ATP1A1 expression, induces cell apoptosis, regulates cell phase redistribution and inhibits cell proliferation in U251 glioma stem cells.

Key words: RNA, small interfering; glioma; stem cells; ATP1A1 gene; apoptosis

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤, 恶性程度高, 呈浸润性生长, 只有不到 5% 的确诊患者生存期能达到 5 年^[1-2]。其治疗方案一般采用外科手术、放射治疗、化学治疗、免疫治疗及综合治疗。近年来国内外学者相继从脑胶质瘤组织和细胞株中成功分离出脑胶质瘤干细胞^[3-4], 该学说认为在肿瘤中存在着一些数量不多但具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能的细胞, 称为肿瘤干细胞。目前认为胶质瘤干细胞在胶质瘤的发生、发展和复发中起决定性作用。最新研究证实, 肿瘤细胞膜表面 ATP1A1 可能是一种新颖的抗癌药物靶标, 强心甙类物质(一种 ATPase 抑制剂)对 ATP1A1 高表达的前列腺癌^[5]、非小细胞肺癌^[6]、乳腺癌^[7]等细胞有良好的治疗效果。本研究采用 ATP1A1-shRNA 慢病毒感染人 U251 胶质瘤干细胞, 观察 U251 胶质瘤干细胞增殖活性和细胞周期的变化。

1 材料与方 法

1.1 材料 人胶质瘤 U251 细胞系购自中国科学院细胞库。培养液为 DMEM/F12+10%胎牛血清, 内含青霉素 G 钠与硫酸链霉素各 100 μg/mL。白血病抑制因子(LIF)、表皮生长因子(EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 Peprotech

公司。DMEM 培养基、胎牛血清和 B27 购自 Gibco 公司。兔抗人巢蛋白(nestin)单克隆抗体、小鼠抗人 CD133 单克隆抗体购自 Santa 公司。Cy3 标记山羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔 IgG 购自美国 Sigma 公司。MTT 试剂盒购自吉美生物公司。AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自联科生物, ATP1A1-shRNA 慢病毒由上海吉凯公司构建。

1.2 方 法

1.2.1 U251 胶质瘤干细胞培养 将 U251 细胞置于细胞培养箱中培养, 待细胞处于对数生长期时用 0.125% 胰酶消化, 胎牛血清终止消化后用吸管收集于离心管, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入无血清培养基(内含 EGF、bFGF 各 20 ng/mL, LIF 10 ng/mL 以及 B27 20 μL/mL)后反复吹打成单细胞悬液, 计数后以 1×10^6 瓶接种于 50 mL 的培养瓶中, 在 37 ℃、5%CO₂、95%湿度条件下培养。待悬浮生长的细胞球出现 4 d 后收集该细胞球, 机械吹打并制成单细胞悬液, 重悬于上述无血清培养基继续培养, 按 1:2 的比例传代于 50 mL 培养瓶。

1.2.2 U251 胶质瘤干细胞的鉴定 将 U251 胶质瘤干细胞球植入放有盖玻片的 6 孔板内。玻片预先经 10% 无菌多聚赖

氨酸处理。待细胞完全贴壁后取出盖玻片,用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)小心漂洗 2 次。然后吸净液体后以 4%多聚甲醛固定约 30 min。胎牛血清封闭 30 min。抗 CD133 及抗人巢蛋白一抗孵育 40 ℃过夜,荧光素标记二抗孵育 37 ℃ 1 h,每步骤间均用 0.01 mol/L PBS 缓冲液漂洗 3 次。封片后置激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.2.3 慢病毒感染 U251 胶质瘤干细胞 对数生长期的 U251 胶质瘤干细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板,将 ATP1A1-shRNA 慢病毒或无意义 shRNA 慢病毒进行稀释,每孔加入 1 mL 稀释病毒液培养。观察细胞绿色荧光的产生。感染 72 h 后,去除含病毒载体的培养液,洗涤后,加入新鲜无血清培养基继续培养 48 h,供进一步分析。实验分组为:空白组,未作任何处理的 U251 胶质瘤干细胞;对照组,无意义 shRNA 慢病毒感染的 U251 胶质瘤干细胞;ATP1A1 沉默组 1、ATP1A1 沉默组 2、ATP1A1 沉默组 3、ATP1A1-shRNA 慢病毒感染的 U251 胶质瘤干细胞。

1.2.4 逆转录实时定量 PCR(RT-qPCR)检测 ATP1A1 mRNA 的表达 U251 胶质瘤干细胞感染后 5 d,收集各组细胞 1×10^6 个,Trizol 法提取细胞总 RNA。取 1 μ L 为模板,逆转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板,进行 PCR 反应。反应体系 25 μ L,扩增条件:94 ℃预变性 10 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共 40 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。ATP1A1 引物上游:5'-TGC CCT GGA ATG GGT GTT GCT-3',下游:5'-TTC TCC ACC CAG CCG CCA GG-3',内参为 18 s RNA,采用 SYBR RT-qPCR 试剂盒于 RT-qPCR 仪(bio-rad 公司)上检测细胞 ATP1A1 基因的 mRNA 水平。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测 ATP1A1 蛋白的表达 U251 胶质瘤干细胞感染后 5 d,收集各组细胞 4×10^6 个,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,分装后 -80 ℃保存。取 30 μ g 总蛋白以 10%分离胶和 5%浓缩胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,完后将蛋白电转印至聚偏二氟乙烯膜,用含 5%脱脂奶粉的磷酸盐吐温缓冲液(PBST)封闭 1 h 后加小鼠抗人 ATP1A1 一抗(稀释至 1:500)4 ℃过夜,次日用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,然后加辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 孵育 2 h(稀释至 1:1000)温育 2 h,再用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,化学发光法 BeyoECL Plus 显影。Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片,结果采用 Quantity One 软件进行光密度值分析,同时设置 β -actin 为内参对照。

1.2.6 MTT 绘制细胞生长曲线 U251 胶质瘤干细胞感染后 5 d,收集各组细胞,以每孔 200 μ L(含细胞数 5×10^3 个)接种于 96 孔板。分别培养 1、2、3 d 后,加入 5 mg/mL MTT 20 μ L,继续培养 4 h,吸去上清,再加入二甲基亚砜 100 μ L 于振荡器上振荡 10 min,待蓝色晶体完全溶解后,在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度值,以各时间点的吸光度值绘制细胞生长曲线。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期 U251 胶质瘤干细胞感染后 5 d,取各组细胞制成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集细胞,PBS 洗 2 次,用预冷的 70%的乙醇固定过夜,离心收集细胞沉淀,加入碘化丙啶 1 mL 后 40 ℃避光温育 30 min,于 1 h 行流式细胞检测每个样本中的细胞周期。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 U251 胶质瘤干细胞感染后 5 d,取各组细胞制成单细胞悬液,以 4×10^6 个/mL 接种于 6 孔培养板中,常规培养。培养 48 h 后常规消化,1 000 r/min

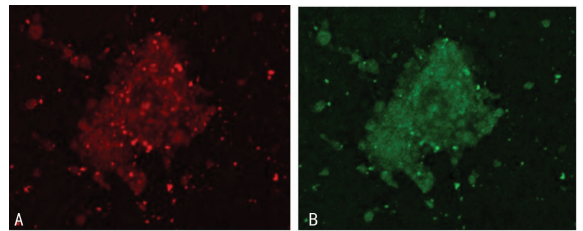
离心 5 min,弃上清,收集细胞,PBS 洗 2 次,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒说明书操作,置流式细胞仪测定每个样本中凋亡细胞所占的百分比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个独立样本均数之间的比较用 *t* 检验,因素分析用采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 U251 胶质瘤干细胞球的形成 将 U251 细胞接种于含多种生长因子的无血清培养基后,绝大多数细胞呈悬浮状态,仅极少数细胞贴壁分化。24 h 后开始出现为数不多的悬浮小细胞团。48 h 后悬浮的球状团数量明显增多,形态较为规则,接近球状,每个细胞团有几个到数十个细胞不等。此后悬浮于培养基中的细胞球逐渐增多,体积逐渐增大,形态更加规则。

2.2 U251 胶质瘤干细胞免疫荧光鉴定 对 U251 胶质瘤干细胞球行 CD133 和人巢蛋白免疫荧光染色后,在激光共聚焦显微镜下分别可见肿瘤干细胞出现红色(CD133)和绿色(人巢蛋白),表明该细胞 CD133 和人巢蛋白染色阳性,见图 1。CD133 被认为是最重要的干细胞标志物,人巢蛋白在神经干细胞或者前体细胞中高表达。



A:CD133 染色阳性;B:人巢蛋白染色阳性。

图 1 U251 胶质瘤干细胞免疫荧光鉴定(激光共聚焦显微镜 $\times 200$)

2.3 RT-qPCR 检测各组 ATP1A1 mRNA 的表达 结果显示,ATP1A1 沉默组 1 中 ATP1A1 mRNA 抑制率为 $(50 \pm 18)\%$,明显低于空白组及对照组,ATP1A1 沉默组 2 中 ATP1A1 mRNA 表达抑制率为 $(84 \pm 21)\%$,ATP1A1 沉默组 3 中 ATP1A1 mRNA 表达抑制率为 $(9 \pm 3)\%$,($P < 0.05$)。而空白组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。从结果中可以看出,ATP1A1 沉默组 3 的基因沉默效果很差,因此,排除 ATP1A1 沉默组 3 进行下一步实验。

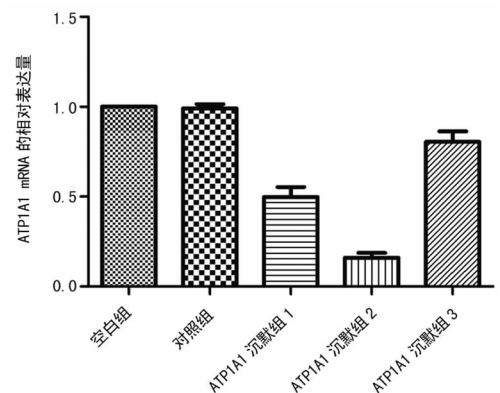
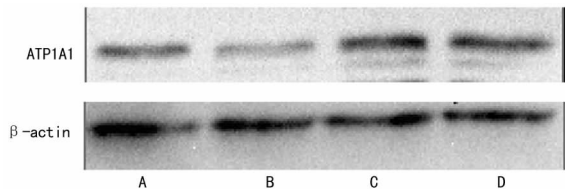


图 2 RT-qPCR 检测各组 ATP1A1 mRNA 的表达

2.4 Western blot 检测 ATP1A1 蛋白的表达 与空白组和对照组相比,ATP1A1 沉默组 1 中 ATP1A1 蛋白表达下调 $(33 \pm$

12), ATP1A1 沉默组 2 中 ATP1A1 蛋白表达下调(67±19), 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 但空白组与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 3。因此, 选用 ATP1A1 沉默组 2 进行下一步实验。



A: ATP1A1 沉默组 1; B: ATP1A1 沉默组 2; C: 对照组; D: 空白组。

图 3 Western blot 检测各组 ATP1A1 蛋白的表达

2.5 MTT 绘制细胞生长曲线 MTT 结果显示, 对照组与 ATP1A1 沉默组 2 比较, 细胞增殖差异有统计学意义($P < 0.05$)。由生长曲线可以看出, 第 2 天至第 3 天 ATP1A1 沉默组 2 的生长速度显著降低, 表明沉默 ATP1A1 表达能抑制 U251 胶质瘤细胞增殖, 见图 4。

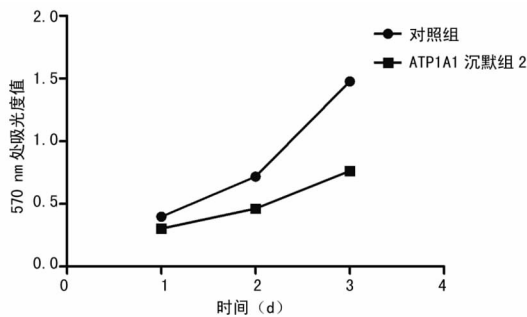
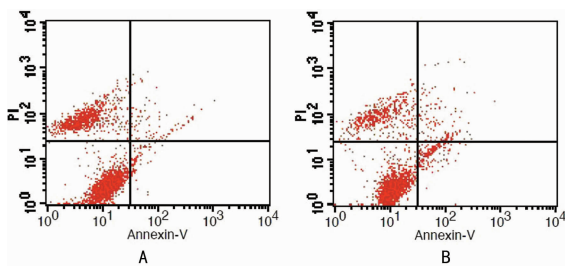


图 4 慢病毒载体感染 U251 胶质瘤细胞后的 MTT 检测结果

2.6 流式细胞仪检测细胞周期 流式细胞检测结果显示, ATP1A1 沉默组 2 G_0/G_1 期细胞比例增多, 而 S 期细胞减少, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 流式细胞仪检测细胞周期的结果 (%)

组别	G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	59.16±4.25	26.23±3.6	14.61±1.5
ATP1A1 沉默组	71.03±5.8	16.11±1.2	12.86±2.78



A: 对照组; B: ATP1A1 沉默组。

图 5 流式细胞仪检测细胞凋亡的结果

2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 为证实 ATP1A1-shRNA 能有效诱导胶质瘤干细胞的凋亡, 本文用 Annexin V 法检测 ATP1A1-shRNA 对 U251 胶质瘤干细胞的凋亡诱导情况。感染 ATP1A1-shRNA 后, ATP1A1 沉默组胶质瘤干细胞的凋亡率为(19.92±4.1)%, 而对照组胶质瘤干细胞的凋亡率为

(4.5±1.2)%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 具有高度的侵袭性、异质性、复发性和耐药性。尽管现有的治疗措施如外科手术切除、放射治疗、化学治疗和免疫治疗不断完善, 但是针对胶质瘤的治疗仍未取得实质性的进展, 使得胶质瘤还是难以根除, 复发率极高, 严重影响患者的生存质量和生存期。目前胶质瘤治疗失败的原因为: 目前的各种治疗手段针对的主要是不具有强增殖、转移、分化及侵袭能力的脑胶质瘤细胞, 因此, 尽管肿瘤体积缩小了, 但由于并不特异性地针对及杀灭存在于肿瘤组织中的干细胞, 肿瘤仍会复发。理论上以胶质瘤干细胞作为靶点进行治疗, 才有可能防止胶质瘤复发、转移, 进而从根本上治愈胶质瘤。但由于肿瘤干细胞与肿瘤细胞存在异质性, 其生物学特征、对治疗手段的敏感性也不完全一致。因此, 找到一个有效的靶点对于治疗胶质瘤至关重要。

作者在前期的蛋白组学研究发现, U251 胶质瘤干细胞高表达 ATP1A1, 而目前还没有针对 U251 胶质瘤干细胞 ATP1A1 研究的相关报道, 且近年来研究证实细胞膜表面钠泵的高表达与癌的发生、发展和恶性程度关系密切, 他对癌细胞的离子平衡、能量代谢和信号传递起着重要的作用^[8]。Chen 等^[9]发现 ATPase 抑制剂哇巴因能够诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡, 降低细胞黏附性, 易发生脱落和坏死。干扰 ATP1A1 表达能够抑制细胞周期素激酶的活性从而抑制 c-MYC 的表达, 进一步抑制细胞的增殖。Haas 等^[10]发现强心甙类药物通过降低细胞 ATP1A1 表达, 减少酪氨酸激酶 Src 与钠泵结合, 调控核转录因子- κ B 的活性影响细胞增殖。Mijatovic 等^[11]研究非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织与正常组织时发现, ATP1A1 在 NSCLC 组织中高表达, 干扰 A549 NSCLC 细胞 ATP1A1 表达后抑制了 NSCLC 细胞的增殖和迁移, 并使细胞内 Ca^{2+} 、活性氧自由基 (ROS) 浓度升高。

在本实验中, 作者利用 ATP1A1-shRNA 慢病毒感染 U251 胶质瘤干细胞, 有效降低了 U251 胶质瘤干细胞的 ATP1A1 基因和蛋白的表达, 抑制 U251 胶质瘤干细胞的增殖, 并引起细胞周期 G1 期阻滞和凋亡。推测这与抑制 ATP1A1 的表达可破坏细胞内的离子稳态环境关系密切。ATP1A1 抑制后, 直接引起细胞内 Na^+ 浓度上升, K^+ 浓度降低; Na^+ 细胞内的贮留, 可引起细胞膜超极化, 电压依赖性 Ca^{2+} 通道开放, Ca^{2+} 内流增加, 亦可通过激活 Na^+/Ca^{2+} 对向转运体, 升高细胞内 Ca^{2+} 浓度。游离性 Ca^{2+} 是细胞内重要的离子, 也是重要的第二信使物质, 高浓度 Ca^{2+} 可激活核酸内切酶, 引起 DNA 片段化, 诱导细胞凋亡^[12]。游离性 Ca^{2+} 的增加破坏了线粒体的内外膜引起细胞内 ROS 的增加, ROS 作为细胞内常见的 DNA 损伤剂可引起 DNA 双链断裂。且 ATP1A1 抑制后可阻碍肿瘤细胞的糖酵解途径, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸生成减少, 细胞内游离性 ROS 无法有效清除, 引起 DNA 损伤和细胞能量供应不足^[13]。

虽然 ATP1A1 所介导的抗癌机制尚未完全明确, ATP1A1 的 RNA 干扰在胶质瘤治疗中具有一定的研究价值, 值得进一步深入研究。

参考文献:

[1] Claus EB, Black PM. Survival rates and patterns of care for patients diagnosed with supratentorial (下转第 954 页)

($P < 0.05$),这与学生在校期间学习压力的增加、生活规律的失衡、个人素质的高低都有直接的关系。农村户口的学生在生活习惯和健康技能方面得分高于城市户口学生,这与以往的调查结果相反^[10],可能与城市户口学生更加直接面对现代社会生活节奏的改变,城市生活作息时间的多样化以及各种复杂信息的冲击,健康生活方式与行为的建立也受到很大挑战有关^[11]。

整体看来,该校学生对基本健康知识的掌握较好,但是健康生活习惯的养成很差,学校应对健康生活习惯加强教育。针对学生具有可塑性高的特点,定期开设健康教育讲座,制定科学有效的教育方案,规范日常生活习惯^[12]。

本次调查以卫生部 2008 年 1 月公布的《中国公民健康素养-基本知识及技能(试行)》作为参考,根据该职业教育中心学生生理、心理、年龄特点,设计了调查问卷,调查问卷只对该职业教育中心学生的健康知识、健康生活方式与行为习惯和健康技能的掌握现状进行了调查,没有涉及学生运用健康知识、技能的情况,因此,相关结论的推广还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 原寿基. 广泛深入开展健康科普教育提高公众健康素养[J]. 海峡科学, 2012, 3(3): 119-120.
- [2] Lynn NB, Allison MP, David AK. Health literacy: a prescription to end confusion[M]. Washington, DC: National Academies Press, 2004: 21-58.
- [3] 李现文, 李春玉. 健康素养对健康状况影响的中介效应分

析[J]. 现代预防医学, 2010, 37(6): 1076-1078.

- [4] 朱斌. 中国公民健康素养与学校健康教育资源的整合利用[J]. 中国学校卫生, 2009, 30(2): 161-162.
- [5] 中华人民共和国卫生部公告. 中国公民健康素养: 基本知识技能[EB/OL][2013-10-18]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohfybjysqwss/s7907/200804/18212.Htm>.
- [6] 王萍. 国内外健康素养研究进展[J]. 中国健康教育, 2010, 26(4): 298-302.
- [7] 刘国良, 杨小芝, 孙静, 等. 河南省某医学高等专科学校学生健康素养调查[J]. 中国健康教育, 2012, 3(3): 215-218.
- [8] 李莉, 邸泽青, 李雨波, 等. 我国三种人群常见多发传染病知识与预防技能调查[J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12(8): 677-681.
- [9] 邱心镜. 卫生部公布首次中国居民健康素养调查结果[J]. 旅行医学科学, 2009, 15(4): 16.
- [10] 如吉, 田旭, 梁兴梅, 等. 重庆市某高校大学生健康素养现状调查[J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(6): 95-96.
- [11] 沈莉, 孟国祥. 南京某高校大学生健康素养调查分析[J]. 南京医科大学学报: 社会科学版, 2011, 11(2): 123-126.
- [12] 李世明, 杨林林, 林洪芹, 等. 大学生健康与生活方式关系之研究[J]. 四川体育科学, 2010, 29(1): 113-118.

(收稿日期: 2013-11-18 修回日期: 2013-12-22)

(上接第 951 页)

- low-grade gliomas: data from the SEER program, 1973-2001[J]. Cancer, 2006, 106(6): 1358-1363.
- [2] Colombo F, Barzon L, Franchin E, et al. Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(10): 835-848.
- [3] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [4] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. Nature, 2004, 432(7015): 396-401.
- [5] Mijatovic T, De Nève N, Gailly P, et al. Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(5): 1285-1296.
- [6] Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, et al. The alpha1 subunit of the Sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers[J]. J Pathol, 2007, 212(2): 170-179.
- [7] Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, et al. Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast Cancer cells[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(6): 1131-1140.

- [8] Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, et al. Cardio-tonic steroids on the road to anti-cancer therapy[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1776(1): 32-57.
- [9] Chen JQ, Contreras RG, Wang R, et al. Sodium/Potassium ATPase(Na^+ , K^+ -ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: A new paradigm for development of anti-breast Cancer drugs[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 96(1): 1-15.
- [10] Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na^+ / K^+ -ATPase[J]. J Biol Chem, 2000, 275(36): 27832-27837.
- [11] Mijatovic T, Ingrassia L, Facchini V, et al. Na^+ / K^+ -ATPase alpha subunits as new targets in anticancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(11): 1403-1417.
- [12] Roderick HL, Cook SJ. Ca^{2+} signalling checkpoints in Cancer: remodelling Ca^{2+} for Cancer cell proliferation and survival[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(5): 361-375.
- [13] Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in Cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(5): 351-360.

(收稿日期: 2013-10-22 修回日期: 2014-01-29)