

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.23.005

表没食子儿茶素没食子酸酯对 IL-1 β 诱导 MIN6 细胞凋亡的保护作用*

刘 华¹, 曹第勇², 杨尚君³, 刘 红¹, 杨 梅⁴, 张 鑫⁴, 文柯力⁴, 郑 倩^{1 Δ}

(川北医学院:1. 生理教研室;2. 药理教研室;3. 寄生虫教研室;4. 2012 级临床医疗系, 四川南充 637000)

[摘要] **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对胰岛细胞的保护作用及机制。**方法** 实验分为正常对照组, IL-1 β 组, IL-1 β +EGCG1 组(低浓度), IL-1 β +EGCG2 组(高浓度)。CCK8 检测细胞活性, 酶联免疫吸附实验(ELISA)方法检测 MIN6 细胞基础胰岛素和葡萄糖刺激的胰岛素分泌量, Hoehst 染色及流式细胞术检测细胞凋亡, JC-1 流式细胞术检测线粒体膜电位, 比色法测定细胞腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量, 化学荧光法检测细胞活性氧簇(ROS)活性。**结果** 与正常对照组相比, IL-1 β 组细胞活性降低, 基础和葡萄糖刺激胰岛素分泌量显著减少, 细胞凋亡明显增加, 同时测得细胞线粒体膜电位降低, ATP 含量减少, 提示细胞线粒体功能损伤, 并且 ROS 活性增加。给予低浓度和高浓度 EGCG 作用后, 与 IL-1 β 组相比, 细胞活性明显提高, 基础和葡萄糖刺激胰岛素分泌量增加, 细胞凋亡率显著减少, 线粒体膜电位增加, ATP 含量增加, 同时 ROS 活性降低。且 IL-1 β +EGCG2 组作用更强。**结论** EGCC 可减轻 IL-1 β 诱导的 MIN6 细胞细胞凋亡率, 其机制可能与提高细胞 ATP 的含量, 线粒体膜电位及降低 ROS 活性有关。

[关键词] 儿茶素; 没食子酸; 腺瘤, 胰岛细胞; 线粒体膜电位; 腺苷三磷酸; 活性氧**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)23-3183-04

Effects of Epigallocatechin gallate on IL-1 β induced MIN6 cells apoptosis*

Liu Hua¹, Cao Diyoung², Yang Shangjun³, Liu Hong¹, Yang Mei⁴, Zhang Xin⁴, Wen Keli⁴, Zheng Qian^{1 Δ}

(1. Department of Physiology; 2. Department of Pharmacology; 3. Department of Parasitology;

4. 2012 Magnitude of Clinical, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Epigallocatechin gallate(EGCG) on IL-1 β induced MIN6 cells apoptosis. **M. Methods** The experiment group was divided into control group, IL-1 β group, IL-1 β +EGCG low concentration group and IL-1 β +EGCG high concentration group. Cell activity was detected by CCK8. Insulin secretion was detected by ELISA. cell apoptosis was detected by flow cytometry. The mitochondrial membrane potential was detected by flow cytometry. ATP content and cell activity of ROS were detected by colorimetry and chemiluminescence method. **Results** Compared with normal group, IL-1 β group showed much lower cell activity, insulin secretion, cell mitochondrial membrane potential and ATP content, and at the same time IL-1 β group had significantly higher cell apoptosis and ROS activities. After given EGCG, both low concentration group and high concentration group had higher cell activity, insulin secretion, cell mitochondrial membrane potential and ATP content, at the same time lower cell apoptosis and ROS activities was showed. And the IL-1 β +EGCG high concentration group worked more powerful. **Conclusion** EGCG has protective effects on IL-1 β induced MIN6 cells apoptosis. Its mechanism may be related to increasing the content of the ATP and mitochondrial membrane potential and protecting mitochondrial function as well reducing the activity of ROS.

[Key words] catechin; gallic acid; adenoma, islet cell; mitochondrial membrane potential; adenosine triphosphate; reactive oxygen species

目前全世界约有 2 亿以上糖尿病患者, 且糖尿病的发病率逐年提高。我国糖尿病患者已占总人数 9.6%, 总共已经超过 7 千万, 成为糖尿病患者最多的国家^[1]。研究证明, 在 1 型和 2 型糖尿病中, 白介素-1 β (IL-1 β) 均可诱导 β 细胞凋亡^[2-3], 最终导致糖尿病, 但机制并不清楚, 可能与增加 NO 的浓度^[4]、提高胰岛细胞内 Ca²⁺ 浓度^[5]、降低线粒体膜电位、增加活性氧簇(ROS)的生成^[6], 以及提高内质网应激等因素有关^[7]。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶叶特有的儿茶素, 是茶多酚的主体部分, EGCG 对癌症、肥胖、糖尿病、心血管疾病都具有预防功效。近年来, 研究发现 EGCG 可以调节血糖, 主要机制

与其具有类胰岛素作用, 并且能够改善胰岛素敏感性, 抑制糖异生, 调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)^[8]、细胞外调节蛋白激酶(ERK)的表达有关^[9]; 且其强抗氧化活性对 2 型糖尿病及并发症有良好的防治作用^[10]。有报道认为 EGCG 对 IL-1 β 作用的 RINm5F 细胞有保护作用^[11], 其机制与抑制核因子 κ B(NF- κ B)和 NO 活性有关, 但缺乏进一步的研究。本研究采用 MIN6 胰岛细胞进行实验, 低剂量和高剂量 EGCG 分别与 IL-1 β 共同孵育, 观察 EGCG 对胰岛细胞功能和凋亡率的影响, 同时观察细胞线粒体膜电位和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量的变化来判断线粒体功能, 探讨 EGCG 降低 IL-1 β 诱导的 MIN6

* 基金项目: 四川省教育厅项目(11ZB159); 南充市科技支撑项目资助(2010SF09); 川北医学院重点项目(CBY12-A-ZD06); 川北医学院创新团队项目(CBY13-TD02)。 作者简介: 刘华(1974—), 副教授, 硕士, 主要从事胰岛细胞保护的药物筛选研究。 Δ 通讯作者, E-mail: 373969568@qq.com。

细胞凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 EGCG 由上海雅吉公司提供(批号:A-0159); MIN6 细胞购自上海拜力公司; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒由 Beyotime 公司提供(批号:C1056); IL-1 β 为 Invitrogen 公司产品(批号:792008D); JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒购自 Beyotime 公司(批号:C2006); 活性氧检测试剂, ATP 检测试剂盒均购自南京建成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 MIN6 细胞选用第 28~35 代细胞。细胞培养基 DMEM, 其中含胎牛血清 150 mL/L, 青霉素 100 U/mL, 链霉素各 100 mg/mL, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度。细胞浓度为每孔 5×10^5 个/L, 细胞接种于细胞培养板。实验分为 4 组: (1) 正常对照组; (2) IL-1 β 组(IL-1 β 浓度为 20 nmol/L); (3) IL-1 β +EGCG1 组(EGCG 处理浓度为 1 mmol/L); (4) IL-1 β +EGCG2 组(EGCG2 处理浓度为 5 mmol/L), 平行孔为 6 孔。正常对照组处理因素为含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液; 其余 3 组每孔细胞中 IL-1 β (20 nmol/L) 共同培养 24 h 后, IL-1 β +EGCG1 组、IL-1 β +EGCG2 组分别加入不同浓度的 EGCG 继续培养 24 h, 进行各项指标的观察与检测。

1.2.2 CCK8 方法检测 MIN6 细胞活性 检测细胞活性方法用 CCK8 法检测, 实验步骤如下: 细胞培养板离心 5 min(500 r/min), 吸取上清液后, 弃去上清液, 细胞中加 200 μ L 培养液(不含胎牛血清), 然后再加入 20 μ L 的 CCK8, 孵育箱中培养 1 h 后检测, 全自动酶标仪上测出的数值为光密度值(OD 值)。仪器检测波长为 450 nm, OD 值可以说明细胞活性, 数值越大表明细胞活性就越强。

1.2.3 胰岛素分泌量测定 收集按 1.2.1 方法处理的各组细胞培养上清液, 待测基础胰岛素分泌。收集完上清液后的各组细胞中再加入高浓度葡萄糖(16.7 mmol/L) 培养, 2 h 后离心提取 MIN6 细胞培养上清液, 检测基础和高糖刺激胰岛素分泌量, 实验方法严格按照酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒步骤进行。

1.2.4 MIN6 细胞凋亡检测

1.2.4.1 Hoechst33258 染色法检测细胞凋亡 经不同处理方法培养的 MIN6 细胞中, 加入 Hoechst33258 (浓度为 10 μ g/mL)。细胞在 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 然后收集细胞, 荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.2.4.2 流式细胞方法检测细胞凋亡率 经不同处理因素后, 细胞收集数量约 5×10^5 个/L, 离心, 重悬, 加入 Annexin V-FIT 和 PI 染色液各 5 μ L, 混匀, 在室温下避光孵育 20 min, 流式细胞仪检测红色荧光和蓝色荧光的表达。

1.2.5 ATP 的检测 ATP 的含量按 ATP 检测试剂盒介绍的荧光素酶法测定。

1.2.6 ROS 的检测 按检测试剂盒介绍的化学荧光法测定。

1.2.7 线粒体膜电位检测 1×10^4 MIN6 细胞中加入 500 μ L 细胞培养液, 制备细胞悬液, 加入 JC-1 染色工作液 500 μ L。37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后, 4 $^{\circ}$ C 下以 600 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤沉淀细胞 2 次, 加入 1 mL JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 离心 4 min, 再用适量 JC-1 染色缓冲液重悬后, 上机进行流式细胞术检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *F* 检验(多个样本均数比较)和 Dun-

net-*t* 法检验(组间两两比较), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIN6 胰岛细胞活性的检测 实验结果见表 1, 正常对照组 OD 值为 0.872 ± 0.038 , IL-1 β 组 OD 值显著降低, 表明 IL-1 β 与细胞作用后明显抑制细胞活性($P < 0.01$); 而加入不同浓度 EGCG 共同孵育后, OD 值均有不同程度的提高。与 IL-1 β 组比较, IL-1 β +EGCG1 组($P < 0.05$)与 IL-1 β +EGCG2 组($P < 0.01$)OD 值较高。

表 1 MIN6 细胞 OD 值和胰岛素分泌水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	OD 值	基础胰岛素水平(IU/L)	高糖刺激胰岛素水平(IU/L)
正常对照组	0.872 ± 0.038	2.633 ± 0.077	3.742 ± 0.189
IL-1 β 组	0.423 ± 0.0302^a	0.905 ± 0.067^a	1.773 ± 0.139^a
IL-1 β +EGCG1 组	0.599 ± 0.029^b	1.878 ± 0.118^b	2.529 ± 0.173^b
IL-1 β +EGCG2 组	0.732 ± 0.0423^c	2.177 ± 0.192^c	3.007 ± 0.073^c

^a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 IL-1 β 组比较。

2.2 MIN6 细胞基础和高糖刺激胰岛素分泌量的检测 IL-1 β 可以降低胰岛细胞分泌功能, 具体表现为基础胰岛素分泌量和高糖刺激胰岛素分泌量均显著下降($P < 0.01$); EGCG 与细胞共同培养孵育后, MIN6 细胞的胰岛素分泌功能明显增强, IL-1 β +EGCG1 组、IL-1 β +EGCG2 组的基础胰岛素水平、高糖刺激胰岛素水平与 IL-1 β 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 JC-1 线粒体膜电位的变化 横轴代表的是绿色荧光, 纵轴代表的是红色荧光, 平均红色荧光值/平均绿色荧光值为 R 值, R 值越大, 说明线粒体膜电位越高; R 值越小, 说明线粒体膜电位越小。加入 IL-1 β 作用后胰岛细胞线粒体膜电位 R 值显著下降($P < 0.01$), 与不同浓度 EGCG 共同培养 24 h 后可见线粒体膜电位增高, 见图 1。

2.4 ATP 的含量 加入 IL-1 β 作用后胰岛细胞 ATP 含量降低, IL-1 β 组与正常对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 加入 EGCG 后, 细胞 ATP 的含量增强, 与 IL-1 β 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 且有剂量依赖性, IL-1 β +EGCG2 组 ATP 的增加高于 IL-1 β +EGCG1 组, 见表 2。

表 2 细胞 ATP 含量和 ROS 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ATP(pmol/mg)	ROS(μ mol/L)
正常对照组	12.11 ± 1.69	20.74 ± 1.82
IL-1 β 组	4.77 ± 0.90^a	60.23 ± 0.37^a
IL-1 β +EGCG1 组	6.95 ± 0.34^b	45.63 ± 2.78^b
IL-1 β +EGCG2 组	8.85 ± 0.42^c	32.64 ± 1.82^c

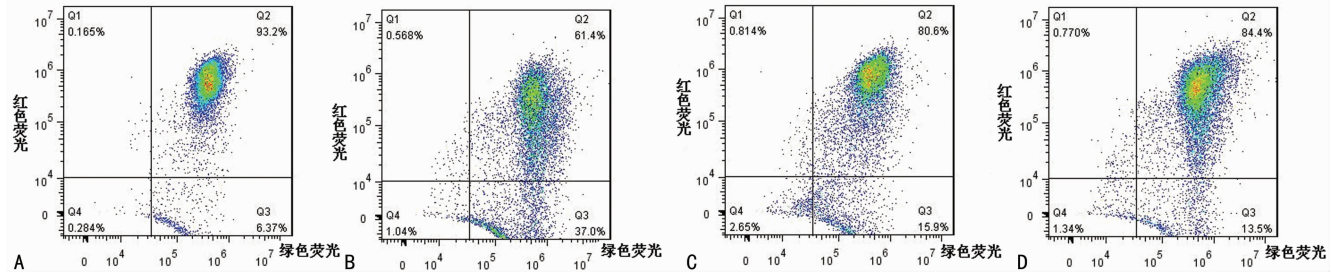
^a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 IL-1 β 组比较。

2.5 ROS 的含量 与正常对照组相比, IL-1 β 组共同孵育后 MIN6 细胞 ROS 活性显著增加($P < 0.01$); 加入不同浓度 EGCG 后, ROS 的活性降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且有剂量依赖性, IL-1 β +EGCG2 组 ROS 的活性低于 IL-1 β +EGCG1 组, 见表 2。

2.6 MIN6 细胞凋亡的变化 如图 2 所示, 正常 MIN6 细胞

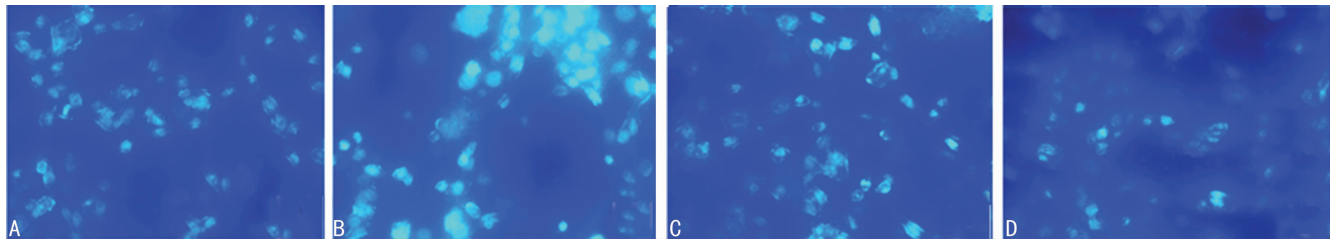
Hochest33258 染色颜色偏浅,并且是均匀蓝色,而在凋亡细胞中,细胞核为强度较高染色表现,有的细胞还可见明显的凋亡小体。采用流式细胞仪检测正常对照组与 IL-1 β 组比较差异

有统计学意义 ($P < 0.01$), IL-1 β + EGCG1 组、IL-1 β + EGCG2 组与 IL-1 β 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3, 图 3。



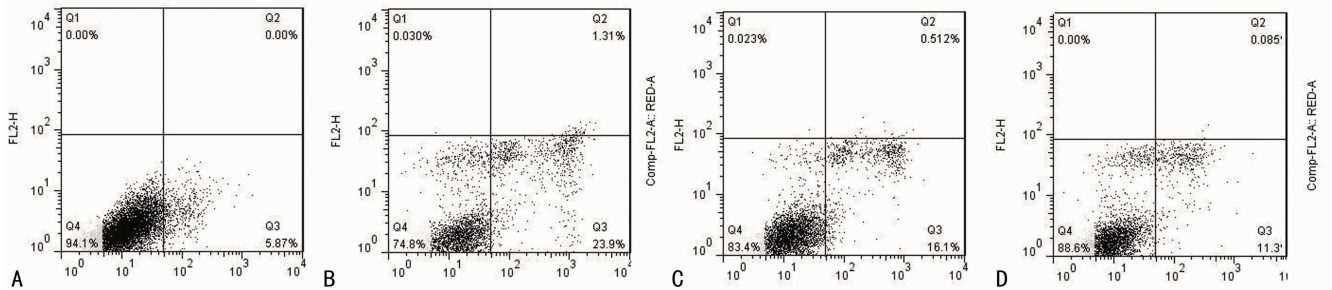
A: 正常对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β + EGCG1 组; D: IL-1 β + EGCG2 组。

图 1 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位



A: 正常对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β + EGCG1 组; D: IL-1 β + EGCG2 组。

图 2 Hoechst 染色检测细胞凋亡



A: 正常对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β + EGCG1 组; D: IL-1 β + EGCG2 组。

图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

表 3 细胞凋亡率和线粒体膜电位 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	线粒体膜电位 R	细胞凋亡率 (%)
正常对照组	2.10 \pm 0.36	5.03 \pm 0.78
IL-1 β 组	0.45 \pm 0.11 ^a	24.50 \pm 0.65 ^a
IL-1 β + EGCG1 组	0.89 \pm 0.06 ^b	15.80 \pm 0.72 ^b
IL-1 β + EGCG2 组	1.33 \pm 0.14 ^c	11.90 \pm 0.56 ^c

^a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 IL-1 β 组比较。

3 讨论

细胞凋亡是胰岛 β 细胞死亡的主要方式,胰岛细胞凋亡导致糖尿病的发生。目前越来越多的研究表明细胞因子 IL-1 β 对胰岛细胞凋亡有重要的作用,本课题组前期实验也证实 IL-1 β 可引起小鼠胰岛细胞凋亡,凋亡机制与增加 NO 生成^[12]、提高细胞内 Ca²⁺、影响 HO-1/CO 系统有关^[13]。本实验通过 IL-1 β 作用胰岛细胞系 MIN6,进一步观察其对胰岛细胞凋亡的影响,结果证实 IL-1 β 可增加 MIN6 细胞凋亡率,说明 IL-1 β 亦可诱导胰岛细胞 MIN6 凋亡。实验结果同时表明 IL-1 β 可降低 MIN6 细胞的活性,抑制胰岛细胞分泌胰岛素的功能,说明 IL-

1 β 可以增加 MIN6 细胞凋亡,降低胰岛细胞的活性和分泌功能。

目前研究认为 IL-1 β 在多种细胞中介导细胞凋亡机制与降低线粒体功能,增加 ROS 水平相关,Product-Zengaffinen 等^[14]在胰岛细胞 INS-1 细胞系也证实 IL-1 β 细胞凋亡是通过降低线粒体功能降低线粒体膜电位和 ATP 含量。本实验中也发现 IL-1 β 与 MIN6 胰岛细胞孵育后 ATP 水平降低,线粒体膜电位显著降低,ROS 明显增加,说明 IL-1 β 导致 MIN6 细胞线粒体功能障碍并产生大量 ROS。氧化应激与线粒体功能密切相关,线粒体既是活性氧产生的主要部位,也是活性氧攻击的首要靶点,由于 ROS 生成增加,而胰岛细胞 ROS 灭活酶含量相对较少,因此加重线粒体的损伤,最终导致细胞凋亡。

EGCG 具有广泛的生物活性,其对糖尿病的防治作用已经在多种动物模型被证实,可以降低链脲佐菌素 (STZ)、四氧嘧啶诱导的糖尿病动物血糖及自发性糖尿病动物模型的血糖,促进胰岛素分泌^[15],但其机制并没有得到深入研究。目前认为 EGCG 分子结构具有酚羟基,清除自由基能力较强,从而具有抗氧化活性,有研究证明 EGCG 可以通过减轻氧化损伤,保护线粒体完整性,从而保护细胞功能^[16-17]。

本实验结果显示,EGCG 可以减少 MIN6 胰岛细胞凋亡率,并且增加细胞活性以及提高细胞胰岛素分泌功能,说明 EGCG 可保护 MIN6 细胞的功能,减轻 IL-1 β 诱导的胰岛细胞凋亡。不同浓度 EGCG 与 IL-1 β 作用的细胞孵育后都表现出 ATP 的含量明显增加,线粒体膜电位也升高,同时活性氧降低,表明 EGCG 可通过增加抗氧化活性,清除氧自由基,减轻细胞的氧化应激,抑制胰岛细胞的氧化损伤,保护线粒体功能,从而减少 MIN6 细胞凋亡,达到保护胰岛细胞的作用。Lee 等^[18] 实验结果发现 EGCG 促进脂肪细胞 3T3-L1 的分化的机制与可增加 ROS 生成而,与本研究结果不一致,推测可能是与是实验采用不同的细胞种类有关。

参考文献

- [1] 翁建平. 对糖尿病流行病学、循证医学及基础研究的探索[J]. 中山大学学报:医学科学版,2010,31(2):166-171,178.
- [2] Santin I, Eizirik DL. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(3):71-81.
- [3] Wali JA, Masters SL, Thomas HE. Linking metabolic abnormalities to apoptotic pathways in Beta cells in type 2 diabetes[J]. *Cells*, 2013, 2(2):266-283.
- [4] Susick L, Veluthakal R, Suresh MV, et al. Regulatory roles for histone deacetylation in IL-1 β -induced nitric oxide release in pancreatic beta-cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5A):1571-1583.
- [5] Dula SB, Jecmenica M, Wu R, et al. Evidence that low-grade systemic inflammation can induce islet dysfunction as measured by impaired Calcium handling[J]. *Cell Calcium*, 2010, 48(2/3):133-142.
- [6] Mbaya E, Oulès B, Caspersen C, et al. Calcium signalling-dependent mitochondrial dysfunction and bioenergetics regulation in respiratory chain Complex II deficiency[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(12):1855-1866.
- [7] Verma G, Bhatia H, Datta M. JNK1/2 regulates ER-mitochondrial Ca²⁺ cross-talk during IL-1 β -mediated cell death in RINm5F and human primary β -cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(12):2058-2071.
- [8] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase[J]. *Nat Med*,

2002,8(11):1288-1295.

- [9] Hase M, Babazono T, Karibe S, et al. Renol protective effects of tea catechin in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Int Urol Nephrol*, 2006, 38(3/4):693-699.
- [10] Yao K, Ye P, Zhang L, et al. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells[J]. *Mol Vis*, 2008, 14(1):217-223.
- [11] Han MK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage[J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(2):136-139.
- [12] 郑倩,刘红,曹弟勇,等. 虫草菌丝提取物对白介素 1 β 损伤的胰岛细胞损伤保护作用的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2008,14(10):765-767.
- [13] 郑倩,刘红,曹弟勇,等. 血红素加氧酶/一氧化碳系统在 1,6-二磷酸果糖抗 IL-1 β 致胰岛细胞凋亡中的作用[J]. 中国应用生理学杂志,2009,25(4):548-552.
- [14] Prodiut-Zengaffinen N, Davis-Lamelose N, Perreten H, et al. Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(1):84-93.
- [15] Ortsäter H, Grankvist N, Wolfram S, et al. Diet supplementation with green tea extract epigallocatechin gallate prevents progression to glucose intolerance in db/db mice[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2012, 9:11.
- [16] Raza H, John A. In vitro protection of reactive oxygen species-induced degradation of lipids, proteins and 2-deoxyribose by tea catechins[J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(10):1814-1820.
- [17] Meng Q, Velalar CN, Ruan R. Regulating the age-related oxidative damage, mitochondrial integrity, and antioxidative enzyme activity in Fischer 344 rats by supplementation of the antioxidant epigallocatechin-3-gallate[J]. *Rejuvenation Res*, 2008, 11(3):649-660.
- [18] Lee H, Lee YJ, Choi H, et al. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(16):10601-10609.

(收稿日期:2015-02-08 修回日期:2015-07-16)

(上接第 3182 页)

- 与口腔鳞癌相关性分析[J]. 口腔医学研究,2011,27(7):630-632.
- [12] Qu Y, Qu H, Luo M, et al. MicroRNAs related polymorphisms and genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Genet Genomics*, 2014, 289(6):1123-1130.
- [13] 马杰,朴松林,陈红应,等. 口腔鳞状细胞癌组织中 USP22 的表达及其意义[J]. 口腔医学研究,2014,30(1):37-39,43.

- [14] Bowles DW, Senzer N, Hausman D, et al. A multicenter phase 1 study of PX-866 and cetuximab in patients with metastatic colorectal carcinoma or recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Invest New Drugs*, 2014, 32(6):1197-1203.

- [15] 王任钦,唐瞻贵. Skp2 和 P27 在口腔疣状癌中表达的研究[J]. 口腔医学研究,2014,30(3):230-231,234.

(收稿日期:2015-02-18 修回日期:2015-07-15)