

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.24.004

异甘草素诱导人宫颈癌细胞增殖的影响及作用机制的研究*

哈尼克孜·吐尔逊¹,古再丽努尔·麦麦提图尔荪²,木合布力·阿布力孜³,马依努尔·艾肯⁴,祖菲娅·艾力^{2△}
(1.新疆医科大学第一附属医院妇科,乌鲁木齐 830054;2.新疆维吾尔自治区喀什地区第二人民医院
医院妇产科 844000;3.新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011;
4.新疆维吾尔自治区第二人民医院妇科,乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 研究异甘草素(ISL)抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖作用及促进细胞凋亡的作用机制。**方法** 采用 0.025、0.050、0.100、0.200、0.300、0.400 mg/mL 浓度 ISL 处理 HeLa 细胞,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测 HeLa 细胞增殖;采用流式细胞仪检测 HeLa 细胞凋亡情况;应用罗丹明 123 染色法检测 HeLa 细胞线粒体跨膜电位的变化;采用 RT-PCR 检测 6 种不同浓度 ISL 对 Bcl-2、P53、P21、E6 mRNA 基因表达的影响。**结果** (1)MTT 检测结果显示:随着 ISL 浓度增加,对不同时间段 HeLa 细胞的抑制作用明显增加($P<0.05$);(2)流式细胞仪检测:相比于空白对照组,随着 ISL 浓度逐渐增加,HeLa 细胞凋亡率明显升高($P<0.01$),且凋亡率呈剂量依赖性;(3)罗丹明 123 荧光染色检测结果:随着 ISL 浓度逐渐增加,细胞线粒体膜电位下降($P<0.01$);(4)RT-PCR 结果显示:随着 ISL 浓度逐渐增加,E6、Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$),而 P53、p21 mRNA 表达水平越高($P<0.05$)。**结论** ISL 通过下调 E6、Bcl-2 的表达和上调 P21、P53 基因的表达来抑制宫颈癌细胞的增殖。

[关键词] 宫颈肿瘤;Hela 细胞;细胞凋亡;异甘草素
[中图法分类号] R711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)24-3324-04

Effect and mechanism of isoquiritigenin on proliferation of human cervical cancer cells*

Hanikezi · Tuerxun¹,Guzainuer · Maimaititursun²,Mourboul · Ablise³,Mayinuer · Aiken⁴,Zufeiya · Aili^{2△}
(1. Department of Gynecology,First Affiliated Hospital,Xinjiang Medical University,
Urumqi,Xinjiang 830054,China;2. Kashi Area Second People's Hospital,Kashi,Xinjiang 844000,China;
3. College of Pharmacy,Xinjiang Medical University Urumqi,Xinjiang 830011,China;
4. Department of Gynecology,Second People's Hospital of Xinjiang Autonomous Region,Urumqi,Xinjiang 830054,China)

[Abstract] **Objective** To study the effects and mechanism of isoquiritigenin (ISL) in inhibiting the proliferation and promoting the apoptosis of cervical cancer HeLa cells. **Methods** HeLa cells were treated with ISL of 0.025,0.050,0.100,0.200,0.300 and 0.400 mg/mL. The proliferation of HeLa cells was detected by MTT colorimetric assay,and the apoptosis of HeLa cells was detected by flow cytometry. Changes of mitochondrial transmembrane potential in HeLa cells were detected by rhodamine 123 staining method. RT-PCR was used to detect the effect of 6 different concentrations of ISL on the expression of Bcl-2,P53,P21 and E6mRNA genes. **Results** (1) MTT test showed that with the increase of ISL concentration,the inhibitory effect on HeLa cells in different time periods increased significantly ($P<0.05$). (2) Flow cytometry showed that compared with the blank control group,with the increase of ISL concentration,the apoptosis rate of HeLa cells increased significantly ($P<0.01$),and the apoptosis rate was dose-dependent. (3) Rhodamine 123 fluorescence staining showed that with the increase of ISL concentration,the mitochondrial membrane potential decreased ($P<0.01$). (4) RT-PCR showed that the expression levels of E6 and Bcl-2 mRNA decreased significantly ($P<0.05$),and the expression levels of P53 and p21mRNA increased ($P<0.05$) with the increase of ISL concentration. **Conclusion** ISL can inhibit the proliferation of cervical cancer cells by down regulating the expression of E6 and Bcl-2 and up regulating the expression of P21 and P53 genes.

[Key words] Cervical neoplasms;HeLa cells;apoptosis;isoquiritigenin

子宫颈癌(简称宫颈癌)为常见妇科恶性肿瘤,是威胁女性生殖系统健康的主要疾病之一,主要发病年龄为 50 岁左右^[1]。研究数据显示,全世界每年新发宫颈癌患者人数为 46.5 万,而我国宫颈癌每年新发病例数超过 13 万,且每年死于宫颈癌的患者占据女性癌症死亡人数第 2 位^[2]。异甘草素(2,2,4-三羟基查耳酮,isoliquiritigenin,ISL)是甘草黄酮的一种查耳酮类化合物,是甘草黄酮中主要活性成分之一。近年来研究报道显示,ISL 对肺癌、前列腺癌、结直肠癌等肿瘤具有明显的抑制作用,其主要通过抑制细胞周期诱导细胞凋亡来发挥作用^[3]。而少见国内关于 ISL 对宫颈癌的研究报道,通过本次实验探讨

ISL 对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制作用及凋亡机制,为肿瘤化疗及生物治疗提供新的思路及策略。

1 材料与方法

1.1 细胞株 体外培养宫颈癌细胞株 HeLa 细胞(HPV18⁺,野生型 p53)均购于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。

1.2 方法

1.2.1 相关药品与试剂 ISL 由新疆医科大学实验室合成并提供;高糖 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(T-EDTA,美国 HyClone 公司);磷酸盐缓冲液(PBS,美国 HyClone 公司);双抗(美国 Hy-

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2014211C064)。 作者简介:哈尼克孜·吐尔逊(1975—),副主任医师,硕士,主要从事妇科肿瘤方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:2428157641@qq.com。

Clone 公司);四甲基偶氮唑盐 (MTT,美国 Sigma 公司);二甲基亚砒 (DMSO,美国 Sigma 公司);逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司);PCR 引物 (上海生工生物技术有限公司);罗丹明 123 (美国 Sigma 公司);Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒 I 试剂盒 (美国 BD 公司)。

1.2.2 HelA 细胞培养 将细胞用完全培养液 (44.5 mL 高糖 DMEM+5 mL FBS+0.5 mL 双抗)培养在 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中,倒置显微镜下观察细胞形态、贴壁及融合等状态,一般在 2~3 d 进行传代。

1.2.3 MTT 实验 取对数生长期的 HeLa 细胞,进行消化、离心操作,重悬细胞并调整细胞数目为 1×10⁵ 个/毫升,然后接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL,培养箱中培养 24 h 后将配置好的不同浓度 ISL (0.025、0.050、0.100、0.200、0.300、0.400 mg/mL)加入培养板中,设立空白组 (仅细胞培养液)及阳性组 (0.025 mg/mL 顺铂),每组设 5 个复孔,分别培养 24、48、72 h。每孔中加入 5 mg/mL 20 μL MTT 溶液,37℃ 避光孵育 4 h,去除溶液后,加入 150 μL DMSO,室温下振荡,在酶标仪上选用 490 nm 测定吸光度值。实验重复 3 次,取 3 次实验的平均值作为实验结果,以不同浓度 ISL 为 X 轴,细胞数量为 Y 轴绘制细胞生长抑制曲线。利用计算公式计算不同浓度各个时间段药物对 HeLa 细胞增殖的抑制率,得出最佳时间段最佳药物浓度。其中抑制率 (%)=(空白组-不同浓度 ISL 处理组)/空白组×100%。

1.2.4 按 Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒 I 试剂盒说明书进行操作,用流式细胞仪上机检测。

1.2.5 ISL 诱导 HeLa 细胞凋亡的线粒体跨膜电位的变化 取对数生长期的 HeLa 细胞 2×10⁶ 个接种于 6 孔板中药物干预后,进行以下操作:(1)换液;(2)收集细胞;(3)加 1 mL 罗丹明 123 染色液 (终浓度 0.01 mg/mL)染色,避光孵育 30 min;(4)离心后洗涤细胞 2 次;(5)再加入 0.5 mL PBS 悬浮细胞后,直接用流式细胞仪上机检测。

1.2.6 RT-PCR 检测药物对 HeLa 细胞相关凋亡基因表达水平影响 取对数生长期的 HeLa 细胞,进行消化、离心操作,重悬细胞并调整细胞数目为 1×10⁶ 个/毫升,然后接种于培养皿中,培养 24 h 贴壁后各个组加药提取总 RNA 进行 RT-PCR。(1)提取总 RNA。(2)定量总 RNA。(3)逆转录反应:按照 Postscript II First-strand cDNA Synthesis Mix 试剂盒操作说明进行逆转录。(4)RT-PCR 检测 HPV16 E6、Bcl-2、P21、P53 及内参 β-actin 基因,每份样品设 3 个复孔,反应条件:①E6 反应条件,逆转录产物 95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 10 s,共 40 个循环,72℃ 延伸 10 min;②Bcl-2 反应条件,逆转录产物 95℃ 预变性 3min,95℃ 变性 30s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 10 s 共 40 个循环,72℃ 延伸 10 min;③P53 反应条件,逆转录产物 95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 10 s,共 40 个循环,72℃ 延伸 10 min;④β-actin 反应条件,逆转录产物 95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 10 s,共 40 个循环,72℃ 延伸 10 min;⑤P21 反应条件,逆转录产物 95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 10 s,共 40 个循环,72℃ 延伸 10 min。利用系统自带软件分析各基因溶解曲线、起峰曲线及 Ct 值,根据结果分析药物对细胞基因表达的影响。

1.2.7 Western blot 检测药物对 HeLa 细胞相关蛋白表达水平影响 取对数生长期细胞进行消化、离心,细胞重悬后以 1×

10⁶ 个/毫升细胞培养密度种植于培养瓶中,温箱中培养 24 h,待贴壁后加入 0.025、0.050、0.100 mg/mL ISL 和 0.025 mg/mL 顺铂干预 24 h,蛋白裂解液裂解细胞后提取总蛋白,采用 BSA 法进行蛋白质定量,简单步骤如下:(1)提取总蛋白;(2)BAS 法蛋白质定量;(3)蛋白质变性;(4)凝胶配制及电泳;(5)十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电流 (SDS-PAGE)凝胶配制;(6)转膜;(7)封闭;(8)一抗孵育;(9)二抗孵育;(10)显色。

1.3 统计学处理 通过 SPSS17.0 软件进行相关统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析在总体上存在显著性差异,方差齐时,多组间比较用 LSD 法、SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ISL 对 HeLa 细胞生长抑制作用 采用 0.025、0.050、0.100、0.200、0.300、0.400 mg/mL ISL 对 HeLa 细胞进行 24 h、48 h、72 h 处理后,结果显示,随着药物浓度的升高及时间的延长,抑制率越高。且作为阳性对照的顺铂对细胞也具有明显的增殖抑制作用 (表 1)。

表 1 不同浓度 ISL 对 HeLa 细胞不同时间的抑制率 (n=5, $\bar{x} \pm s$, %)

组别	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0	0	0
药物浓度 (mg/mL)			
0.025	16.971 0±2.132 7 ^{ab}	22.286 4±2.475 8 ^{ab}	23.154 1±2.145 8 ^{ab}
0.050	38.040 6±1.649 2 ^{ab}	45.556 4±2.273 6 ^{ab}	47.238 5±1.562 1 ^{ab}
0.100	66.215 5±1.633 4 ^a	86.196 9±1.160 8 ^a	82.130 5±1.981 2 ^a
0.200	77.318 3±0.987 9 ^a	88.677 9±2.140 1 ^a	86.198 5±1.135 8 ^a
0.300	81.462 3±1.417 4 ^a	88.855 3±1.425 6 ^a	88.257 4±1.598 6 ^{ab}
0.400	83.940 2±2.189 5 ^{ab}	88.179 8±1.510 7 ^a	89.145 2±3.872 5 ^{ab}
阳性组	64.057 9±4.473 6 ^a	72.266 8±3.964 7 ^a	70.521 4±3.365 4 ^a

^a: $P < 0.05$,与空白组比较;^b: $P < 0.05$,与阳性组比较。

2.2 HeLa 细胞凋亡率检测结果 从凋亡结果可知:空白组早期凋亡率只有 5.4%,0.025、0.050、0.100 mg/mL ISL 药物与顺铂 0.025 mg/mL 作用细胞后早期凋亡率分别为 19.13%、25.43%、56.63%、51.27%,与空白组相比凋亡率明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.3 ISL 诱导 HeLa 细胞凋亡的线粒体跨膜电位的变化结果 不同浓度的药物干预 HeLa 细胞后空白组线粒体膜电位荧光强度为 6 255.3%,而药物组 0.025、0.050、0.100 mg/mL 分别为 4 180.0%、3 328.3%、346.0%,阳性组为 1 238.7%,与空白组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.4 RT-PCR 检测药物对 HeLa 细胞相关凋亡基因表达的影响 药物干预 HeLa 细胞 24 h 后相关基因中 E6 和 Bcl-2 基因随着剂量的增加,基因表达下调;P53 和 P21 基因随着药物剂量的增加,基因表达反而上调。见图 3。

2.5 Western blot 检测药物对宫颈癌细胞 P53、P21 及 Bcl-2 蛋白表达影响结果 Bcl-2 蛋白药物表达与空白组相比较,随着 ISL 药物浓度增加,蛋白表达水平逐渐降低,P53 与 P21 蛋白的药物组表达与空白组相比较,随着 ISL 药物浓度增加,蛋白表达逐渐升高。见图 4、5。

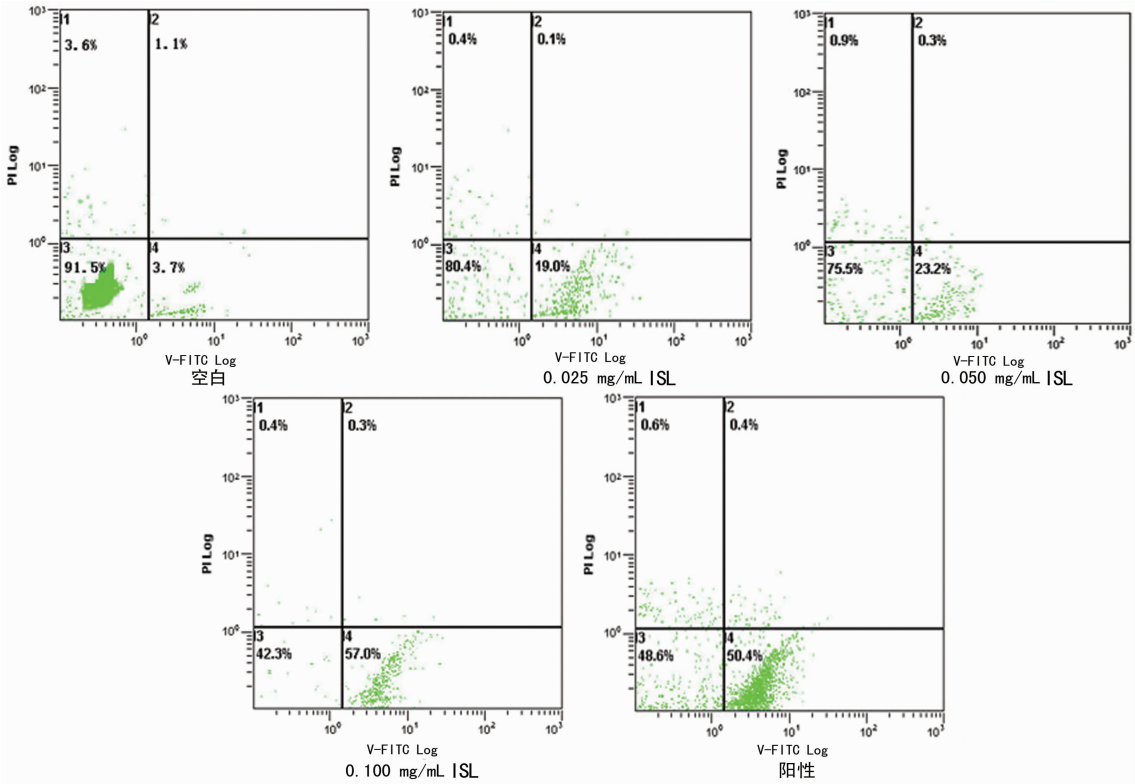


图 1 各个浓度药物干预 HeLa 细胞后凋亡率

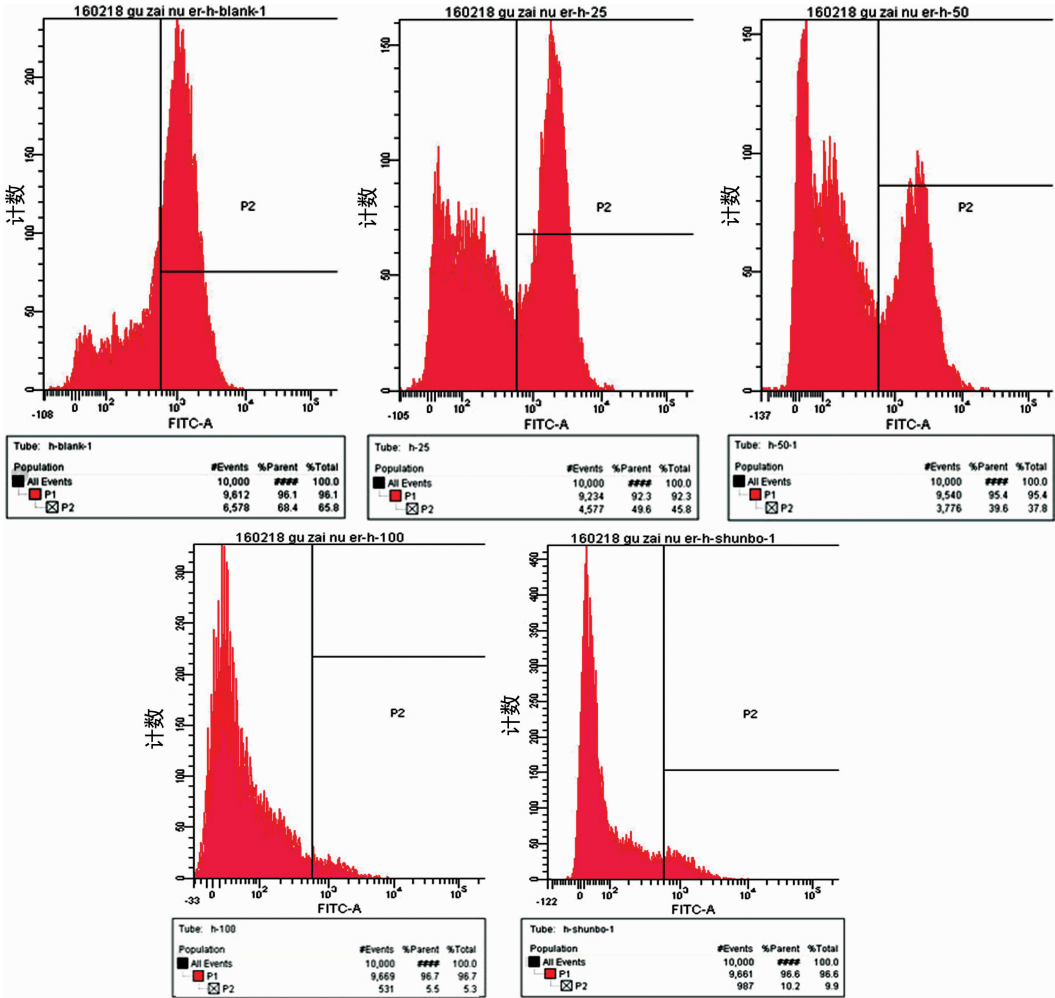


图 2 ILG 对 HeLa 细胞线粒体膜电位的影响 (罗丹明 123 标记)

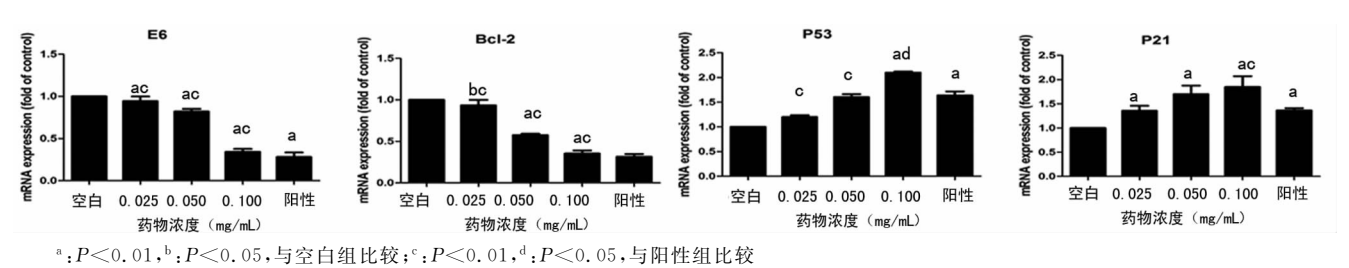


图 3 各个浓度药物对 HeLa 细胞凋亡基因的影响 (n=3)

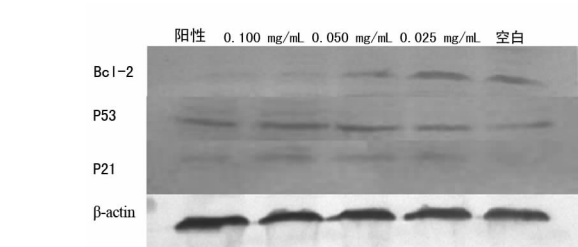


图 4 SL 对相关蛋白表达的影响

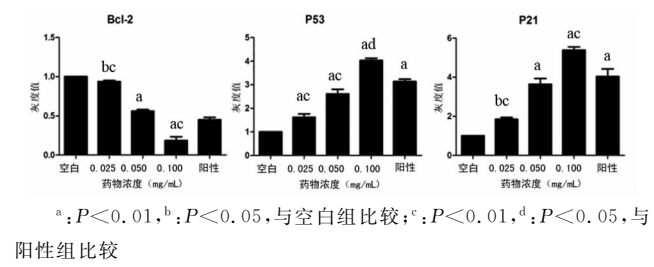


图 5 ISL 对相关蛋白表达影响的灰度值 (n=3)

3 讨 论

MTT 为黄色化合物,是一种接受氢离子的荧光染料,能够被活细胞体内琥珀酸脱氢酶还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓚(Formazan)并沉积在细胞中,而凋亡细胞丧失细胞中琥珀酸脱氢酶消失,不能将 MTT 还原成蓝紫色结晶,而采用 DM-SO 溶解细胞中的甲瓚,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其吸光度值,可间接反映活细胞数量^[4]。且活细胞数量越多,生成蓝紫色结晶越多,检测的吸光度值就越大,活细胞数量少,生成紫色结晶少,吸光度值越小,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。因此,MTT 法能够间接反映活细胞数及细胞生长活性,具有灵敏度高、操作简便、经济、快速等优点,被广泛用于生物活性因子、细胞毒性的检测^[5]。本研究结果显示,随着 ISL 浓度增加对 HeLa 细胞增殖抑制作用逐渐增强,且呈现出时间和剂量依赖性效应。

细胞凋亡是生物界广泛存在的一种基本生命现象,是指细胞在一定生理或病理条件下,受内在遗传机制控制自动结束生命的过程,细胞凋亡受凋亡相关基因调控,又称为细胞程序性死亡。近年来,有学者发现,机体内细胞凋亡机制的发生和进行受到精确调控,各种凋亡信号通过相应的信号传导通路传递到相关细胞核内的相关靶基因,靶基因通过表达相关蛋白引起细胞凋亡,细胞凋亡对肿瘤起着负调作用,而细胞凋亡的调控过程发生紊乱会导致细胞代谢紊乱,从而导致肿瘤恶性增殖的发生^[6]。本研究结果显示,将通过 Annexin V-FITC 和 PI 双标记法用流式细胞仪检测细胞凋亡可得到。因此得知,药物浓度与凋亡的发生呈正相关,随着药物浓度增加,HeLa 细胞出现致密染色的凋亡细胞增多,早期凋亡率明显升高,说明 ISL 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡。

细胞膜电位和细胞凋亡有着密不可分的关系,细胞凋亡的

过程中往往伴随着线粒体跨膜电位的破坏,这被广泛认为是细胞凋亡过程中最早发生的事件之一。有研究报道,在 ISL 诱导细胞凋亡的可能机制为,线粒体膜电位的耗散触发细胞色素 C 的释放和半胱天冬酶的活化^[7-9]。Yuan 等^[10] 研究报道显示,ISL 主要是通过改变细胞线粒体跨膜电位的变化来诱导细胞凋亡。本研究结果显示,ISL 能够降低 HeLa 细胞线粒体跨膜电位稳定性,从而诱导线粒体介导的细胞凋亡,且随着 ISL 浓度增加,凋亡程度显著增加。ISL 药物浓度越增加,罗丹明 123 荧光强度越明显下降,膜电位下降百分比也下降,表明 ISL 以浓度依赖方式降低 HeLa 细胞线粒体跨膜电位。

宫颈癌细胞中肿瘤抑制因子 P53 表达以野生型为主,P53 在不同的刺激下分别调节细胞周期或者细胞凋亡,通过转录活化相关靶基因,如 P21、Bax、P53DINP1 等,其作为一种重要抑癌基因与细胞生长、分化及死亡的生物调控具有密切联系^[11-12]。HPV 早期编码区 E6、E7 基因表达 E6、E7 蛋白是致癌的关键,其中 E6 蛋白能够与 E6 相关蛋白介导与抑癌蛋白 P53 结合,经过泛素途径使其降解,阻止细胞凋亡,导致细胞向恶性增殖发展;而 E7 蛋白能够结合细胞周期相关负向调节因子 P21 和 P16,导致其失活抑制细胞生长,造成细胞周期紊乱,引起细胞无限增殖并向恶性转化,最终导致子宫颈癌的发生^[13]。本研究结果显示:随着 ISL 药物浓度的增加,p53、p21 表达增加或者恢复功能,抑制 E6、Bcl-2 的表达,并呈现剂量依赖性效应。

综上所述,ISL 药物能够通过引起线粒体膜电位变化来诱导宫颈癌细胞凋亡,同时 ISL 还可以降低 HeLa 细胞中 E6 癌基因、Bcl-2 基因表达,增加 P53、P21 基因表达来促进肿瘤细胞凋亡,为进一步明确 ISL 的抗肿瘤活性和抗癌候选药物的筛选提供理论基础。

参考文献

- [1] 高淑平. 宫颈癌诊断与治疗的新进展[J]. 医学理论与实践, 2012, 25(12): 1446-1448.
- [2] 程大丽. β -谷甾醇对宫颈癌细胞株的抑制作用及其机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2012: 1-52.
- [3] 钱庆庆, 金辉, 孙光春, 等. 异甘草素抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 16(6): 908-910.
- [4] Karthikeyan S, Kanimozhi G, Prasad NR, et al. Radiosensitizing effect of ferulic acid on human cervical carcinoma cells in vitro[J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(1): 66-75.
- [5] 高洋. 茶多酚对宫颈癌 HeLa 细胞增殖及凋亡的影响和机制[D]. 天津: 天津医科大学, 2010: 1-73.
- [6] 杨俊. 蛋白酶体抑制剂 MG132 对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及 caspase-3 表达的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2007: 1-40.
- [7] 刘韦成. 低表达蛋白 HAX1 对肿瘤细胞线粒体膜电位及细胞凋亡的影响[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009: 1-39.
- [8] Jung JI, Lim SS, Cho HJ, et al. Isoliquiritigenin induce apoptosis by depolarizing mitochondrial (下转第 3331 页)

- [3] Kurnaz F,Kaynar L. Peripheral blood stem cell mobilization failure[J]. Transfus Apher Sci,2015,53(1):3-7.
- [4] Hopman K,Dipersio F. Advances in stem cell mobilization[J]. Blood Rev,2014,28(1):31-40.
- [5] 孙巍,高敏,谢嵘,等. 151 例淋巴瘤外周血造血干细胞采集影响因素分析[J]. 中国实验血液学杂志,2016,24(2):416-421.
- [6] Micallef IN,Apostolidis J,Rohatiner AZ,et al. Factors which predict unsuccessful mobilisation of peripheral blood progenitor cells following G-CSF alone in patients with non-Hodgkin's lymphoma[J]. Hematol J,2000,1(6):367-373.
- [7] Perseghin P,Terruzzi E,Dassi M,et al. Management of poor peripheral blood stem cell mobilization: incidence, predictive factors, alternative strategies and outcome. A retrospective analysis on 2177 patients from three major Italian institutions[J]. Transfus Apher Sci,2009,41(1):33-37.
- [8] Koenigsmann M,Jentsch-Ullrich K,Mohren M,et al. The role of diagnosis in patients failing peripheral blood progenitor cell mobilization[J]. Transfusion,2004,44(5):777-784.
- [9] Tricot G,Cottler-Fox H,Calandra G. Safety and efficacy assessment of plerixafor in patients with multiple myeloma proven or predicted to be poor mobilizers, including assessment of tumor cell mobilization[J]. Bone Marrow Transplant,2010,45(1):63-68.
- [10] Fruehauf S,Ehninger G,Hübel K,et al. Mobilization of peripheral blood stem cells for autologous transplant in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients by plerixafor and G-CSF and detection of tumor cell mobilization by PCR in multiple myeloma patients[J]. Bone Marrow Transplant,2010,45(2):269-275.
- [11] Calandra G,Mccarty J,Mcguirk J,et al. AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34⁺ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment; compassionate use data[J]. Bone Marrow Transplant,2008,41(4):331-338.
- [12] Kuittinen T,Nousiainen T,Halonen P,et al. Prediction of mobilisation failure in patients with non-Hodgkin's lymphoma[J]. Bone Marrow Transplant,2004,33(9):907-912.
- [13] Sheppard Dawn,Bredeson Christopher, Allan David, et al. Systematic review of randomized controlled trials of hematopoietic stem cell mobilization strategies for autologous transplantation for hematologic malignancies[J]. Biol Blood Marrow Transplant,2012,18(8):1191-1203.
- [14] 张曦,李忠俊,陈幸华,等. 血液病患者/健康供者外周血造血干细胞动员及采集效果分析[J]. 中国输血杂志,2010,23(12):1010-1013.
- [15] Cottler-Fox Michele,Lapidot Tsvee. Mobilizing the older patient with myeloma[J]. Blood Rev,2006,20(1):43-50.
- [16] Özkurt ZN,Yegin ZA,Suyani E,et al. Factors affecting stem cell mobilization for autologous hematopoietic stem cell transplantation[J]. J Clin Apher,2010,25(5):280-286.
- [17] 王铁军,骆群,刘景汉. 影响外周血干细胞采集的因素[J]. 临床输血与检验,2000,18(2):34.
- [18] Nichols L,Skerrett L. Peripheral blood stem cell mobilization and harvesting after fludarabine therapy for low-grade lymphoma and chronic lymphocytic leukemia[J]. Stem Cells Dev,2005,14(1):3-5.
- [19] Akhtar S,Weshi E,Rahal M,et al. Factors affecting autologous peripheral blood stem cell collection in patients with relapsed or refractory diffuse large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma;a single institution result of 168 patients[J]. Leuk Lymphoma,2008,49(4):769-778.
- [20] Pierelli L,Perseghin P,Marchetti M,et al. Best practice for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection in adults and children;results of a Società Italiana Di Emaferesi e Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo(GITMO) consensus process[J]. Transfusion,2012,52(4):893-905.

(收稿日期:2016-12-28 修回日期:2017-03-16)

(上接第 3327 页)

- membrances in prostate cancer cells[J]. Nutr Biochem,2006,17(5):689-696.
- [9] Hsu YL,Chia CC,Chen PJ,et al. Shallot and licorice constituent isoliquiritigenin arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and initiation of the mitochondrial system in human cervical carcinoma Hela cells[J]. Mol Nutr Food Res,2009,53(6):826-835.
- [10] Yuan X,Zhang B,Gan L,et al. Involvement of the mitochondrion-dependent and the endoplasmic reticulum stress-signaling pathways in isoliquiritigenin-induced apoptosis of hela cell[J]. Biomed Environ Sci,2013,26(4):268-276.
- [11] Hollstein M,Hainaut P. Massively regulated genes: the example of TP53[J]. Pathol,2010,220(2):164-73.
- [12] Kim E,Giese A,Deppert W. Wild-type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard[J]. Biochem Pharmacol,2009,77(1):11-20.
- [13] 卫莹. GRIM-19 诱导子宫颈癌细胞中 p53 蛋白积聚的机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2010:1-60.

(收稿日期:2017-01-11 修回日期:2017-03-21)