

ZIC1 基因转染联合姜黄素对人乳腺癌细胞生物学行为的影响

史春桃¹, 于民¹, 汪华兵¹, 韩玮¹, 曹方², 丁厚中²

(1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学附属昆山医院普外科, 江苏 昆山 215300)

[摘要] 目的: 探讨 ZIC1 基因转染联合姜黄素对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生物学行为的影响。方法: 将慢病毒载体 pLV-Zic1-PGK-Puro 稳定转染人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 通过蛋白质印迹法检测转染后 MDA-MB-231 细胞 ZIC1 蛋白的表达水平。通过 MTT 法检测抑制率在 50% 左右的姜黄素浓度, 并作为后续实验的标准加药浓度。以 ZIC1 空载不加姜黄素为对照组, 空载加姜黄素、转染不加姜黄素及转染加姜黄素为实验组, 以 MTT 法检测 ZIC1、姜黄素及 ZIC1 联合姜黄素对 MDA-MB-231 细胞黏附的影响; 用划痕实验检测各组细胞的迁移能力; 用流式细胞术检测各组细胞的凋亡率。结果: 乳腺癌细胞转染 ZIC1 质粒后, ZIC1 蛋白呈阳性表达, 而转染空载体细胞中 ZIC1 蛋白表达阴性。细胞增殖抑制率在 50% 左右的姜黄素浓度为 5 mg/L, 以此作为标准加药浓度。与对照组比较, 转染组、姜黄素组及转染联合姜黄素组乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖受到明显抑制, 凋亡率明显增高(均 $P < 0.05$)。其中, ZIC1 转染联合姜黄素对细胞增殖的抑制及凋亡诱导作用更明显($P < 0.05$)。结论: ZIC1 基因与姜黄素对乳腺癌的抑制存在协同作用。

[关键词] ZIC1; 姜黄素; 乳腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R73-36 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-7783(2016)02-0113-06

DOI: 10.13312/j.issn.1671-7783.y150272

Influence of ZIC1 gene combined with curcumin on biological behavior of human breast cancer MDA-MB-231 cell

SHI Chun-tao¹, YU Ming¹, WANG Hua-bing¹, HAN Wei¹, CAO Fang², DING Hou-zhong²

(1. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212013; 2. Department of General Surgery, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunshan Jiangsu 215300, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of ZIC1 gene combined with curcumin on biological behavior of human breast cancer cell MDA-MB-231. **Methods:** Lentivirus vector pLV-Zic1-PGK-Puro was constructed and transfected stably into MDA-MB-231 cell, Western blotting were applied to detect the expression of ZIC1 protein in stably transfected MDA-MB-231 cell. For the following experiments, MDA-MB-231 cell with no ZIC1 empty vector that we adding curcumin was defined as control group, and the groups of empty vector with adding curcumin, ZIC1 vector with no curcumin, ZIC1 vector with adding curcumin were used as experiment group. MTT assay was used to detect the effect of curcumin (various concentration) on cell proliferation, the standard concentration of curcumin was used in cell adhesion experiment and cell migration experiment when inhibition ratio was 50%, the two experiments were applied to detect differences of cell adhesion rate and migration ability. Cell apoptosis was then tested by FCM assay. **Results:** Expression of ZIC1 protein were positive in experiment group. The curcumin concentration was 5 mg/L when inhibition ratio was 50%. Compared with control group, ZIC1, curcumin, combination with ZIC1 and curcumin groups showed markedly cell proliferation repression and apoptosis induction (both $P < 0.05$). And then, compared with the groups of empty vector with adding curcumin, ZIC1 vector with no curcumin, the effect of experiment group (adding curcumin) for cell proliferation repression and apoptosis induction was more obvious

($P < 0.05$). **Conclusion:** The combination with transfection of *ZIC1* gene and curcumin worked most effectively in breast cancer MDA-MB-231 cell proliferation repression and apoptosis induction, so *ZIC1* gene and curcumin maybe has synergistic effect on tumor-suppressor.

[Key words] *ZIC1* gene; curcumin; breast cancer; cell proliferation; cell apoptosis

ZIC1 又称小脑锌指结构 1, 是 *ZIC* 家族中的重要成员, 在肝癌、结直肠癌、胃癌及甲状腺癌等多种恶性肿瘤中起抑制作用^[1-5]。国内已有 *ZIC1* 基因可显著抑制乳腺癌细胞增殖的相关报道^[6], 其抑癌作用主要受 PI3K/Akt、MAPK、Shh、Wnt/ β -catenin 等相关信号通路调控^[5,7]。姜黄素作为一种天然化合物, 广泛存在于姜黄、莪术、郁金香、菖蒲等多种植物的根茎中。姜黄素具有抗恶性细胞增生、抗炎以及促细胞凋亡等生物学活性, 对乳腺癌有明显疗效^[8]。其作用主要通过抑制 NF- κ B、EGFR、Wnt 以及 Akt/mTOR 等信号通路上相关靶基因的活性而发挥^[9-10]。目前, 关于 *ZIC1* 基因联合姜黄素在抗乳腺癌过程中的作用及相关机制尚不清楚。因此, 本文就姜黄素联合 *ZIC1* 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及凋亡的影响进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞培养基 DMEM (高糖), 胎牛血清 (FBS), 青霉素-链霉素双抗溶液, 磷酸缓冲生理盐水 (PBS), 胰蛋白酶及无血清培养基 (Opti-MEM) 均为 Gibco 公司产品; 嘌呤霉素、姜黄素以及二甲基亚砜 (DMSO) 均为 Sigma 公司产品; Matrigel 胶 (BD 公司)。ZIC1 慢病毒质粒 pLV-Zic1-PGK-Puro 由武汉巴菲尔公司构建包装; Trizol 试剂 (Invitrogen 公司), DL2000 DNA 标准参照物、Ex Taq™ (TaKaRa 公司), 抗人 *ZIC1* 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), HRP 标记羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司, BCA 蛋白测定试剂盒、RIPA 裂解液购自碧云天生物技术研究, *ZIC1* 引物和 GAPDH 内参引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 分组方案 先将乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分别转染空载体和 *ZIC1* 质粒, 并进行荧光显微镜下观察及蛋白质印迹法检测 *ZIC1* 表达。然后加入标准浓度姜黄素 (即 MTT 筛选出来的最接近 50% 抑制率的有效浓度), 并以此标准浓度为基准, 结合转染将 MDA-MB-231 细胞分为对照组 (空载不加药)、

空载加药组、转染组及转染加药组。再进行后续细胞黏附、划痕迁移力及流式细胞凋亡实验。

1.2.2 慢病毒载体 pLV-Zic1-PGK-Puro 转染人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 转染前 24 h 将处于对数生长期的细胞用胰酶消化, 按 3×10^3 /孔的细胞密度接种于 24 孔板内, 37 °C 培养至细胞密度为 50% 时, 用聚凝胺 (10 μ g/mL) 介导慢病毒转染 MDA-MB-231 细胞, 按慢病毒液试剂说明书进行操作。转染 48 h 后, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达分布。传代后, 换用含有嘌呤霉素 (8 μ g/mL) 的培养液加以筛选, 得到稳定传代的细胞克隆。

1.2.3 蛋白质印迹法检测转染后 MDA-MB-231 细胞 *ZIC1* 蛋白的表达 收集稳定转染的细胞, 按照细胞质蛋白提取试剂盒操作, 提取胞内蛋白, 经分光光度计定量, 取 50 μ g 蛋白上样进行 12% SDS-PAGE, 转移至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (封闭液) 室温摇床封闭 2 h。加封闭液稀释的 *ZIC1* 一抗 (1:200), 4 °C 孵育过夜。TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次, 5 min/次, 加封闭液稀释的 HRP 标记的二抗 (1:50 000), 室温摇床孵育 2 h。TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次, 5 min/次。滴加 ECL 底物液, 曝光, 显影。以 GAPDH 作为内参对照。

1.2.4 MTT 法检测不同浓度姜黄素对细胞增殖的影响 先将转染空载体的 MDA-MB-231 细胞提前种于 6 孔板, 并用 1, 2.5, 5, 10 和 20 mg/L 的姜黄素处理细胞 48 h, 用 0.25% 胰酶处理对数生长期细胞, 分别收集计数并调整细胞密度为 4×10^4 /mL, 96 孔板每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 同时设空白组及未给药组, 每个组设置 5 个复孔, 37 °C, 5% CO₂ 继续培养 24 h, 小心吸出孔内液体, 加入预先配置混匀的含 MTT 的 DMEM 100 μ L (DMEM : MTT = 90 μ L : 10 μ L), 在 96 孔板上未加入细胞悬液处再设 5 个复孔, 并加入此含 MTT 的 DMEM 每孔 100 μ L, 37 °C, 5% CO₂ 继续培养 4 h。小心吸出孔内液体, 每孔加入 150 μ L DMSO, 室温低速振荡 10~15 min, 使紫色结晶充分溶解, 酶标仪测定在 570 nm 波长处各孔光密度值 (D)。用同样方法处理转染 *ZIC1* 质粒细胞。抑制率 = $1 - (\text{给药组 } D \text{ 值} - \text{空白 } D \text{ 值}) / (\text{未给药组}$

D 值 - 空白 D 值) $\times 100\%$ 。选取细胞抑制率最接近 50% 的姜黄素浓度,作为后续实验的标准浓度。

1.2.5 MTT 法检测各组 MDA-MB-231 细胞的黏附率 将转染空载体的对数生长期 MDA-MB-231 细胞接种到 6 孔板,细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,放入 37°C ,5% CO_2 培养箱过夜,待其长至 70% ~ 80% 时,用 Opti-MEM 作用细胞 18 h 使之同步化后,取出 6 孔板,加入 2 mL 标准浓度的姜黄素,放入 37°C ,5% CO_2 培养箱培养处理 48 h。PBS 清洗 2 遍,并收集细胞。提前将 Matrigel 胶用基本培养基以 1 : 4 稀释,并平铺至 96 孔板内,体积为 $30 \mu\text{L}/\text{孔}$,室温过夜,并于实验当天放入 37°C ,5% CO_2 培养箱中活化,将细胞悬液 $100 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板内,使密度为 $2 \times 10^4/\text{孔}$,继续培养 1 h 后弃上清液,PBS 洗 2 遍,加入 $100 \mu\text{L}$ 培养基和 $20 \mu\text{L}$ MTT 置于培养箱培养 6 h。之后,吸去上清液,加入 DMSO $150 \mu\text{L}/\text{孔}$,振荡 10 min,用酶标仪在 492 nm 处测定 D 值。用同样方法处理转染 ZIC1 质粒的细胞。细胞黏附率 = (各组平均 D 值/对照组平均 D 值) $\times 100\%$ 。

1.2.6 划痕实验检测各组细胞的迁移能力 提前在 6 孔板背面用记号笔画平行线,保证每孔至少 6 横。取转染空载体的对数生长期 MDA-MB-231 细胞,制成密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种于 6 孔板内,放入 37°C ,5% CO_2 培养箱内过夜,待细胞生长至 70% ~ 80% 后,用 Opti-MEM 作用 18 h 使细胞同步化。取出 6 孔板,放在超净台上,用 1 mL 枪头在底部画线,吸净培养液,并用 PBS 洗 2 遍,加入标准浓度的姜黄素作用 0,24,48 和 72 h 后,在 400 倍显微镜下观察并拍照。测量划痕宽度,每条 3 次取平均值。同样方法处理转染 ZIC1 质粒细胞。细胞迁移相对距离 = $1 - \text{划痕后不同时间宽度}/\text{初始宽度}$ 。

1.2.7 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化转染空载体 48 h 后的 MDA-MB-231 细胞,终止消化后收集细胞悬液,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清液,加 PBS 重悬,润洗细胞 2 次,1 500 r/min 离心 5 min。按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒操作说明进行:加入 $500 \mu\text{L}$ 结合缓冲液,重悬细胞, $5 \mu\text{L}$ AnnexinV-FITC 混匀后加入 $5 \mu\text{L}$ PI,混匀,室温避光反应 5 ~ 15 min,然后在流式细胞仪上机进行检测细胞凋亡率。用同样方法处理其他 3 组细胞。

1.3 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有数据均应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,组间差异采

用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZIC1 基因转染结果

2.1.1 转染后 ZIC1 的表达 ZIC1 慢病毒表达载体 pLV-Zic1-PGK-Puro 转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,可以检测到绿色荧光蛋白,转染率达 90%,见图 1。



图 1 荧光显微镜下转染 pLV-Zic1-PGK-Puro 的 MDA-MB-231 细胞 ($\times 100$)

2.1.2 乳腺癌细胞 ZIC1 蛋白的表达 蛋白质印迹结果显示,ZIC1 蛋白在转染细胞中均有表达,而在空载细胞中均无表达,见图 2。

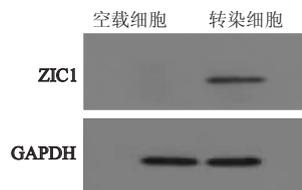


图 2 转染后 MDA-MB-231 细胞 ZIC1 蛋白的表达

2.2 姜黄素对人乳腺癌细胞的细胞毒作用

首先选择了 5 个浓度梯度的姜黄素 (1, 2.5, 5, 10, 20 mg/L) 作用于空载组与转染组 48 h。结果发现姜黄素对两组细胞增殖的抑制作用呈现剂量依赖性,并且浓度为 5 mg/L 的姜黄素作用于空载组、转染组 48 h 后抑制率在 50% 左右 (分别为 51.89% 和 49.20%)。于是选取 5 mg/L 的姜黄素作为下面实验的标准加药浓度。见图 3。

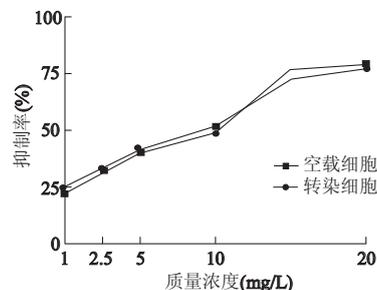


图 3 不同浓度姜黄素作用乳腺癌细胞 48 h 后的细胞抑制率

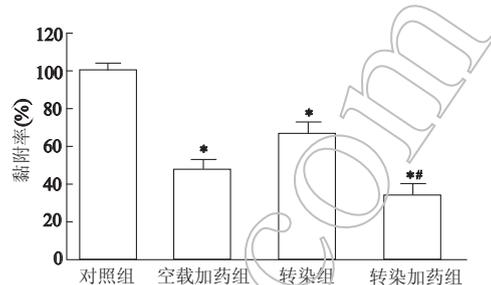
2.3 各组乳腺癌细胞的黏附率

MTT 法检测结果显示,与对照组比较,转染 ZIC1 基因或是加入 5 mg/L 姜黄素,均能够明显抑制 MDA-MB-231 细胞的黏附率(均 $P < 0.05$),且转染 ZIC1 联合姜黄素对细胞黏附的抑制作用明显强于单独转染组或空载加药组($P < 0.05$)。见图 4。

2.4 各处理组对人乳腺癌细胞迁移的影响

划痕实验结果显示,各组细胞的迁移距离随着时间的延长而增加;同一时间 MDA-MB-231 细胞迁移的距离,转染不加药组、空载加药组及转染加药组均比空载不加药的对照组明显缩短(均 $P < 0.05$)。因此,ZIC1 基因、姜黄素以及两者联合作用均能抑

制 MDA-MB-231 细胞的迁移能力,存在着时间依赖性,并且两者联合效果更为明显。见图 5,图 6。



*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与空载加药、转染组比较

图 4 各处理组乳腺癌细胞的黏附率

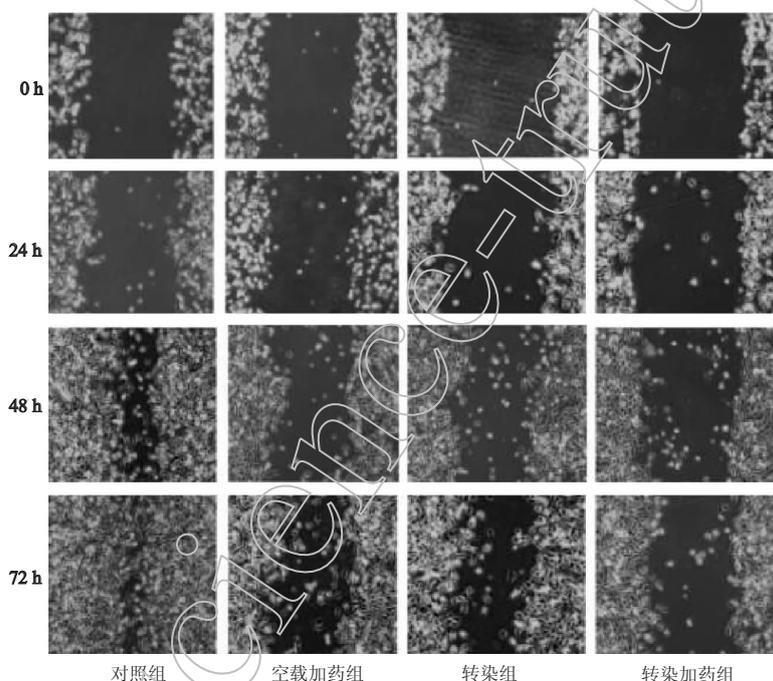
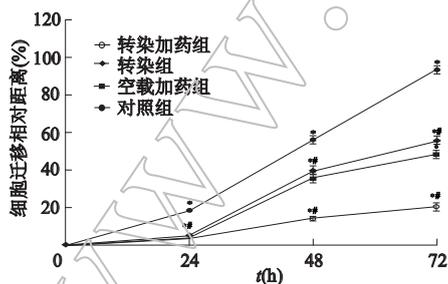


图 5 各组乳腺癌细胞不同时间的迁移($\times 400$)



*: $P < 0.05$,与 0 h 比较;#: $P < 0.05$,与同时点对照组比较

图 6 各处理组人乳腺癌细胞的迁移距离

2.5 各组乳腺癌细胞的凋亡率

流式细胞凋亡结果显示,转染加药组凋亡率为 $(15.17 \pm 1.17)\%$,明显高于空载加药组 $(7.34 \pm$

$1.33)\%$ 和转染组 $(5.41 \pm 1.43)\%$;3 组(空载加药组,转染组及转染加药组)的细胞凋亡率均明显高于空载不加药的对照组 $(2.49 \pm 0.83)\%$,均 $P < 0.05$ 。见图 7。

3 讨论

本研究结果显示,ZIC1、姜黄素及 ZIC1 联合姜黄素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有生长抑制及诱导凋亡作用,且 ZIC1 联合姜黄素作用最为明显,提示 ZIC1 基因与姜黄素在抑癌作用方面可能存在协同作用,由此我们推测 ZIC1 及姜黄素在抑癌作用发挥过程中可能存在相关作用机制及信号通路上的关联性。

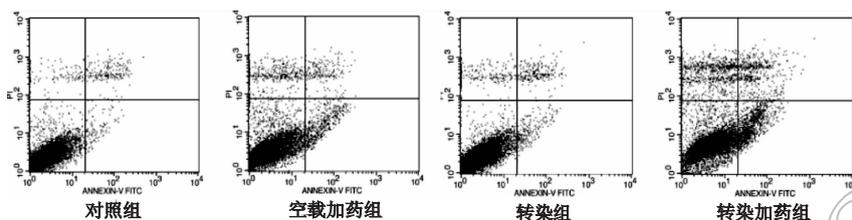


图 7 各组乳腺癌细胞的凋亡率

ZIC1 基因最早由 Aruga 等^[11]于 1994 年在成年鼠的小脑中发现,因小脑颗粒细胞里大量表达锌指蛋白而得名。近年来的研究表明,*ZIC1* 基因与多种肿瘤包括脑膜瘤、肝癌、结直肠癌、胃癌及甲状腺癌等的发生、发展密切相关,尤以对肿瘤发生过程中相关信号通路起调控作用为显著^[2-5,12]。Zhong 等^[5]在研究中证实 *ZIC1* 基因能够抑制胃癌 AGS、MKN28、BGC823 及 SGC7901 细胞的增殖及迁移能力,还通过蛋白质印迹法检测 PI3K/Akt 通路在胃癌中的作用,并发现过表达的 *ZIC1* 能够抑制 p-Akt 的表达,从而推断该信号通路在 *ZIC1* 调节胃癌细胞生物学行为方面起到重要作用。Aruga 等^[13]研究显示 *ZIC1* 可通过降低细胞周期蛋白 D1 表达,从而增强有丝分裂抑制蛋白 p27、p16 的表达,尤其 Wnt7a 的表达,从而通过调节 Wnt 通路抑制脑肿瘤细胞的增殖。本实验结果与以上报道结果中姜黄素对肿瘤细胞增殖及迁移能力的抑制作用相一致。此外,*ZIC1* 基因在肿瘤发生中的分子调控机制还包括 BMP、Shh 等信号通路^[7]。

姜黄素是一种酸性多酚类物质,为二酮类化合物^[14]。姜黄素的抗肿瘤活性于 1985 年由印度学者 Kuttan 等^[15]首次提出,其作用发挥受细胞内外多种途径及信号分子调控。Wong 等^[16]研究发现姜黄素对子宫平滑肌瘤 SKN、SK-UT-1 细胞有增殖抑制及诱导凋亡作用,并通过蛋白质印迹法检测 AKT-mTOR 信号通路,发现 p-mTOR 表达下调,从而推断该信号通路在姜黄素调节子宫平滑肌瘤细胞生物学行为方面有重要意义。另外,Sun 等^[16-17]研究发现,姜黄素通过抑制 PI3K/Akt 信号通路中相关蛋白如 mTOR 及 NF- κ B 等诱导腺样囊性癌细胞凋亡。Xu 等^[18]的实验显示姜黄素对肝细胞癌细胞有明显的增殖抑制及凋亡诱导作用,呈现一定的时间和剂量依赖性, β -连环蛋白表达下调,说明姜黄素通过抑制 β -连环蛋白的活性调控 Wnt 信号通路。本实验结果与以上实验结果中姜黄素对肿瘤细胞增殖抑制及凋亡诱导的影响一致。另外,姜黄素诱导细胞凋

亡的主要信号途径还包括线粒体/内质网途径、MAPK、NF- κ B、p53 等信号转导途径^[19]。

综上所述,*ZIC1* 与姜黄素对肿瘤发生、发展的影响存在共同的信号通路——PI₃K/Akt 及 Wnt 通路。由此我们认为,*ZIC1* 基因联合姜黄素在抑癌作用方面存在的协同作用与两者相关信号通路存在交叉、重叠有关。

【参考文献】

- [1] Wang N, Ren D, Deng S, et al. Differential effects of baicalein and its sulfated derivatives in inhibiting proliferation of human breast cancer MCF-7 cells[J]. Chem Biol Interact, 2014, 221:99 - 108.
- [2] Wang YY, Jiang JX, Ma H, et al. Role of *ZIC1* methylation in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. Tumour Biol, 2014, 35(8): 7429 - 7433.
- [3] Sohn SH, Cho K, Bae H, et al. Screening for herbal medicines that affect *ZIC1* gene methylation in colorectal cancer[J]. Mol Cell Toxicol, 2013, 9(3):211 - 218.
- [4] Qiang W, Zhao Y, Yang Q, et al. *ZIC1* is a putative tumor suppressor in thyroid cancer by modulating major signaling pathways and transcription factor FOXO3a[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(7): E1163 - E1172.
- [5] Zhong J, Chen S, Xue M, et al. *ZIC1* modulates cell-cycle distributions and cell migration through regulation of sonic hedgehog, PI₃K and MAPK signaling pathways in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 290.
- [6] 李鹏飞,王杰锋,曹方,等. *ZIC1* 基因在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响[J]. 江苏大学学报:医学版, 2015, 25(1): 53 - 56, 61.
- [7] 钟菁,王良静. *Zic* 基因在肿瘤发生中的作用和分子调控[J]. 实用肿瘤杂志, 2011, 26(6): 647 - 650.
- [8] 何静. 姜黄素对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、侵袭性及 VEGF-C 表达的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2011.
- [9] Lin JK. Molecular targets of curcumin[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 595:227 - 243.
- [10] Kim HJ, Park SY, Park OJ, et al. Curcumin suppresses

- migration and proliferation of Hep3B hepatocarcinoma cells through inhibition of the Wnt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(1): 282 - 286.
- [11] Aruga J, Yokota N, Hashimoto M, et al. A novel zinc finger protein, *zic*, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells [J]. *J Neurochem*, 1994, 63(5): 1880 - 1890.
- [12] Aruga J, Nozaki Y, Hatayamal M, et al. Expression of ZIC family genes in meningiomas and other brain tumors [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 79.
- [13] Aruga J, Inoue T, Hoshino J, et al. *Zic2* controls cerebellar development in cooperation with *Zic1* [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(1): 218 - 225.
- [14] 陈健, 张华, 张颂文, 等. 姜黄素治疗乳腺癌的研究进展 [J]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2013, 7(2): 39 - 43.
- [15] Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, et al. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*) [J]. *Cancer Lett*, 1985, 29(2): 197 - 202.
- [16] Wong TF, Takeda T, Li B, et al. Curcumin disrupts uterine leiomyosarcoma cells through AKT-mTOR pathway inhibition [J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(1): 141 - 148.
- [17] Sun ZJ, Chen G, Zhang W, et al. Curcumin dually inhibits both mammalian target of rapamycin and nuclear factor- κ B pathways through a crossed phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/I κ B kinase complex signaling axis in adenoid cystic carcinoma [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(1): 106 - 118.
- [18] Xu MX, Zhao L, Deng C, et al. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via the wnt signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(6): 1951 - 1959.
- [19] 苗久旺, 张钦德. 姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡的信号途径研究进展 [J]. *陕西中医*, 2014, 35(12): 1692 - 1694.

[收稿日期] 2015 - 12 - 09 [编辑] 陈海林

(上接第 112 页)

- Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5): 359 - 371.
- [13] Fournier NM, Lee B, Banasr M, et al. Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/Akt-dependent signaling [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 63(4): 642 - 652.
- [14] Zhang H, Wu J, Meng L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(6): 994 - 998.
- [15] Sase H, Watabe T, Kawasaki K, et al. VEGFR2-PLC γ 1 axis is essential for endothelial specification of VEGFR2⁺ vascular progenitor cells [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 18): 3303 - 3314.
- [16] Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, et al. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells [J]. *EMBO J*, 2001, 20(11): 2768 - 2778.
- [17] Wu Y, Chen Y, Qu R, et al. Type II cGMP-dependent protein kinase inhibits EGF-triggered signal transduction of the MAPK/ERK-mediated pathway in gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(2): 553 - 558.
- [18] Kataoka Y, Mukohara T, Tomioka H, et al. Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(4): 1352 - 1360.
- [19] Jiang L, Lan T, Chen Y, et al. PKG II inhibits EGF/EGFR-induced migration of gastric cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61674.
- [20] Wu M, Chen Y, Jiang L, et al. Type II cGMP-dependent protein kinase inhibits epidermal growth factor-induced phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signal transduction in gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(6): 1723 - 1728.

[收稿日期] 2015 - 11 - 23 [编辑] 陈海林