

# 华蟾素对胃癌细胞MKN-45细胞周期的影响

何孟奇<sup>1</sup> 邵淑丽<sup>1,2\*</sup> 冯元<sup>1</sup> 焦凯贺<sup>1</sup> 张伟伟<sup>1,2</sup> 张珍珠<sup>1,2</sup> 崔婷婷<sup>1</sup> 李铁<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006;

<sup>2</sup>抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室, 齐齐哈尔 161006)

**摘要** 该研究的目的在于研究不同浓度华蟾素对人胃癌MKN-45细胞增殖及细胞周期的影响, 分析其可能的分子机制。通过锥虫蓝拒染法检测华蟾素对细胞增殖的影响, 激光共聚焦显微镜下观察细胞形态, 流式细胞术检测细胞周期, qRT-PCR和Western blot分别检测细胞周期调控因子CCND1和CCNB1基因mRNA和蛋白表达情况。结果显示, 在一定浓度范围内, 华蟾素对人胃癌MKN-45细胞增殖的抑制作用呈时间和剂量依赖性。华蟾素作用人胃癌MKN-45细胞24 h、48 h和72 h的IC<sub>50</sub>值分别为102.797 μg/L、68.939 μg/L、60.563 μg/L。不同浓度的华蟾素作用人胃癌MKN-45细胞48 h后, 显微镜下MKN-45细胞出现明显的凋亡形态, G<sub>1</sub>期细胞所占比例降低, S期细胞所占比例逐渐升高, 细胞被阻滞在S期。细胞周期调控因子CCNB1和CCND1 mRNA和蛋白表达水平显著降低。综上所述, 华蟾素可以诱导细胞凋亡, 阻滞细胞周期并抑制MKN-45细胞增殖。

**关键词** 华蟾素; MKN-45; 胃癌; 细胞周期; 细胞周期调控因子

## Effects of Cinobufotalin on Cell Cycle of Human Gastric Cancer MKN-45 Cells

He Mengqi<sup>1</sup>, Shao Shuli<sup>1,2\*</sup>, Feng Yuan<sup>1</sup>, Jiao Kaihe<sup>1</sup>, Zhang Weiwei<sup>1,2</sup>, Zhang Zhenzhu<sup>1,2</sup>, Cui Tingting<sup>1</sup>, Li Tie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihaer 161000, China; <sup>2</sup>Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Protection of Biodiversity in Cold Areas, Qiqihar University, Qiqihaer 161000, China)

**Abstract** The study investigated the effects of cinobufotalin on the proliferation of human gastric cancer MKN-45 cell. The trypan blue exclusion was adopted to detect the effect of cinobufotalin on cell proliferation, the changes of cell morphology was observed under laser scanning confocal microscopy, the change of cell cycle were detected by FACS, and the expression of CCNB1, CCND1 gene mRNA and protein were tested by qRT-PCR and Western blot, respectively. The result showed that in a certain range, cinobufotalin inhibited the proliferation of human gastric cancer MKN-45 cell, which was dependent on time and dosage. After 48 h treatment with different concentrations of cinobufotalin on human gastric cancer MKN-45 cells, the cells showed obvious apoptosis characteristics, the decrease of G<sub>1</sub> phase and the increase of S phase cells. Compared with the control group, the mRNA and protein expression of CCND1, CCNB1 significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Together all, cinobufotalin can induce apoptosis, arrest cell cycle and inhibit cell proliferation of MKN-45 cells.

**Keywords** cinobufotalin; gastric carcinoma; MKN-45; cell cycle; cell cycle regulation factors

收稿日期: 2018-08-30 接受日期: 2019-01-21

黑龙江省自然科学基金(批准号: C201241)、黑龙江省教育厅基本业务专项重点项目(批准号: 135109104)、黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(植物性食品加工技术特色学科专项)(批准号: YSTSXX201809)和黑龙江省教育厅基本业务专项(粮头食尾)(批准号: LTSW201737)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

Received: August 30, 2018 Accepted: January 21, 2019

This work was supported by Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.C201241), Heilongjiang Provincial Department of Education's Basic Business Special Project (Grant No.135109104), Heilongjiang Province Provincial Higher Education Fundamental Research Business Expenses Research Project (Technology of Plant Food Processing Technology) Subject Special (Grant No.YSTSXX201809) and Heilongjiang Provincial Department of Education basic business special (Liangtoushiwei) (Grant No.LTSW201737)

\*Corresponding author. Tel: +86-452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

网络出版时间: 2019-05-10 14:01:22

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1040.004.html>

胃癌(gastric carcinoma, GC)作为一种死亡率极高的疾病,长期威胁着我们的身体健康。全球胃癌的发病存在极大的地理差异和人群分布差异,韩国、日本、中国等东亚国家胃癌发病率和死亡率明显高于北美、西欧及非洲地区<sup>[1]</sup>。不同时期的胃癌采取的治疗方式不同。治疗早期胃癌的方法主要为内镜下切除与外科手术<sup>[2]</sup>,尽管我国胃癌诊断治疗技术有了较大的发展,但目前胃癌根治性切除的患者术后五年生存率也只有43.4%<sup>[3]</sup>。当癌细胞开始扩散即晚期胃癌时,无法进行手术切除治疗,治疗方式则以化学治疗为主<sup>[4]</sup>,虽然化疗在一定程度上能够提高患者的生存概率,但是对患者的身体及心理造成很大的伤害且化疗对胃癌生存的改善也很有限,并且经济成本较高<sup>[5]</sup>。因此,寻找提高治疗胃癌效果且毒副作用小的药物具有重要的意义。华蟾素(cinobufotalin)是中华大蟾蜍表皮的水煎煮提取物<sup>[6]</sup>,在临床上应用广泛,有研究指出,华蟾素能用于缓解肿瘤导致的炎症等<sup>[7]</sup>。在华蟾素的各种复杂的成分中,蟾毒配基类成分是抗癌的主要活性物质<sup>[8]</sup>,随着近年来药物提纯工艺的不断提升使华蟾素的获取较之前更为方便,可较为广泛地应用于生活、医学等各个方面。但是,对于华蟾素能否用于抑制人胃癌MKN-45细胞增殖的研究尚未报道。因此,本实验以人胃癌MKN-45细胞为研究对象,探究华蟾素抑制人胃癌MKN-45细胞增殖和其对细胞周期的影响,为华蟾素治疗胃癌的进一步应用提供参考依据。

## 1 材料方法

### 1.1 实验材料

人胃癌MKN-45细胞购自中国医学科学院肿瘤医院研究所。华蟾素浓缩液购自安徽金蟾药业集团有限公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。RPMI-1640培养基干粉购自Gibico公司。UNIQ-10柱式Trizol总RNA提取试剂盒、全蛋白提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。CCNB1抗体、CCND1抗体、兔抗、Power 2×SYBR real-time PCR premixture试剂盒均购自北京百泰克生物技术有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及药物配制 将购买的人胃癌MKN-45细胞加入到含有10%胎牛血清的PRPMI1640培养液细胞瓶中,在37℃、5%二氧化碳

以及饱和湿度培养箱中培养。传代培养至对数生长期备用。华蟾素注射液经0.22 μm的滤器无菌过滤后,配制成母液于4℃保存。

1.2.2 细胞生长曲线的测定 取人胃癌MKN-45细胞,每瓶细胞以 $1 \times 10^5$ /mL的浓度为最佳传代数量,通过采用锥虫蓝拒染法计数。每天计数3瓶,连续计数7天后进行数据处理计算平均值,确定细胞对数生长期。

1.2.3 测定细胞IC<sub>50</sub>值 当细胞生长到对数生长期时,按照0、20、40、60、80、100 μg/L等不同浓度华蟾素作用于人胃癌MKN-45细胞,分别培养1天、2天和3天。收集细胞按照下列公式计算出细胞增殖抑制率并算出细胞的半数抑制浓度,即IC<sub>50</sub>值。细胞的增殖抑制计算公式为:细胞的增殖抑制率=1-(试验组的平均活细胞数/对照组的平均活细胞数)×100%。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察人胃癌细胞MKN-45细胞形态 将无菌盖玻片放入细胞培养皿中,接种人胃癌MKN-45细胞到培养皿中,当细胞生长到对数生长期时,加入不同浓度华蟾素处理48 h后,用PBS洗涤细胞,使用1 mL 4%多聚甲醛室温固定30~40 min,再次使用PBS洗涤细胞3次,每次5 min,弃掉PBS加入1 mL的0.1% Triton X-100,使细胞通透,再用PBS洗涤细胞3次,每次5 min。加入7.5% PBS脱脂奶粉封闭1 h,加入吖啶橙避光静置15 min染色,再次PBS洗涤细胞3遍。激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.5 流式细胞术检测人胃癌MKN-45细胞周期 人胃癌MKN-45细胞接种于培养皿内,待细胞贴壁良好,处于对数生长期时,弃原培养液,加入不同浓度的华蟾素24 h后,用0.25%的胰酶消化制成单细胞悬液,1 000 r/min离心弃上清,PBS洗涤后重悬细胞,调整细胞密度,PBS洗2次,再加入50 μg/mL PI染色液100 μL,4℃下避光染色30 min后上机测试,采用FC500流式细胞仪对样品进行检测,通过软件分析计算细胞周期各时相比比例。

1.2.6 qRT-PCR检测mRNA表达 取对数生长期人胃癌MKN-45细胞给予不同浓度的华蟾素处理,培养48 h后收集各组细胞,用Trizol提取总RNA。利用Prime Script™ RT试剂盒把总RNA反转录成cDNA,以反转录合成的cDNA为模板,β-actin为内参,进行qRT-PCR检测,每组实验设有3个重

复。得到的数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算获得细胞中*CCNB1*、*CCND1* mRNA的相对表达量。利用Primer Premier 5.0软件设计引物, *CCND1*(90 bp)上游引物为5'-TAT TGC GCT GCT ACC GTT GA-3', 下游引物为5'-CCA ATA GCA GCA AAC AAT GTG AAA-3'; *CCNB1*(156 bp)上游引物为5'-TCT GGA TAA TGG TGA ATG GAC A-3', 下游引物为5'-CGA TGT GGC ATA CTT GTT CT-3'; 内参 $\beta$ -actin(296 bp)上游引物为5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCC ATC TAC GA-3', 下游引物为5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'。

**1.2.7 Western blot检测蛋白表达** 收集不同浓度华蟾素处理过的MKN-45细胞, 用RIPA裂解液提取总蛋白, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 经电转移至NC膜上, 5%的脱脂奶粉封闭液室温封闭1 h后加入*CCND1*(1:1 000)和*CCNB1*(1:1 000)抗体于4 °C摇床上孵过夜。最后加入相应二抗在避光条件下孵育2 h, 以 $\beta$ -actin作为上样量的参照, 再用PBST漂洗后上机扫描检测, 记录数据。

**1.2.8 统计学处理** 实验数据以 $x \pm s$ 表示, 采用SPSS 19.0统计分析软件中的*t* test分析,  $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义, 所得数据采用Graph Pad prism5软件作图。

## 2 结果

### 2.1 人胃癌MKN-45细胞生长曲线

体外培养的人胃癌MKN-45细胞生长曲线如图1所示。由图可知, MKN-45细胞的对数生长期在2~4天, 依据细胞生长情况选择在接种后的第3天加药。

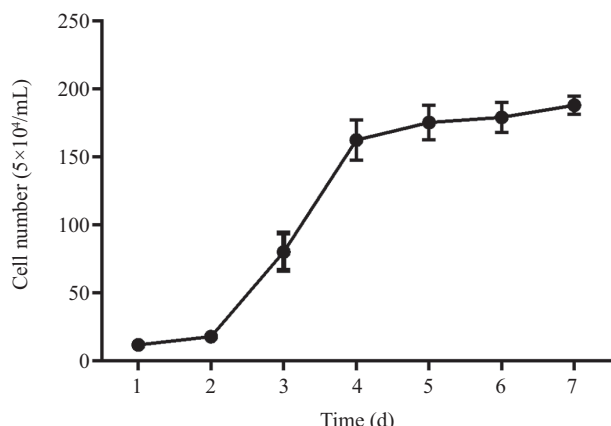


图1 MKN-45细胞的生长曲线

Fig.1 The curve of MKN-45 cells grown

### 2.2 华蟾素对人胃癌MKN-45细胞增殖的影响

采用锥虫蓝拒染法检测华蟾素对人胃癌MKN-45细胞的增殖抑制作用, 绘制增殖抑制曲线。由图2可知, 华蟾素可显著抑制人胃癌MKN-45细胞的增殖随着作用时间的延长(24、48、72 h)抑制作用增强, 且呈剂量依赖性, 48 h的 $IC_{50}$ 为68  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2.3 华蟾素对人胃癌MKN-45细胞形态的影响

经吖啶橙染色, 空白对照组细胞核呈均匀的绿色荧光, 不同浓度华蟾素的处理组均可见染色质的凝聚及固缩, 细胞膜表面出现皱缩、内陷, 细胞出现大小不等, 形态不规则的碎片, 出现明显的凋亡小体, 细胞慢慢瓦解。且随药物浓度增大, 细胞形态变化越明显。

### 2.4 华蟾素对人胃癌MKN-45细胞周期的影响

流式细胞术检测经不同浓度华蟾素处理后人胃癌MKN-45细胞周期的变化, 结果如图4所示。随着药物浓度的增加 $G_1$ 期细胞所占比例逐渐降低, S期细胞所占比例逐渐升高, 80  $\mu\text{g/L}$ 华蟾素处理组 $G_1$ 期细胞和S期细胞比例最低, 说明华蟾素可以将MKN-45细胞增殖阻滞在S期。

### 2.5 华蟾素对人胃癌MKN-45细胞*CCND1*和*CCNB1*基因表达的影响

采用qRT-PCR方法检测不同浓度华蟾素处理细胞48 h后细胞周期调控因子*CCND1*和*CCNB1* mRNA的表达。结果表明, 随着华蟾素浓度的增加, *CCND1*和*CCNB1* mRNA表达降低。

### 2.6 华蟾素对人胃癌MKN-45 *CCND1*和*CCNB1*蛋白表达的影响

华蟾素对MKN-45细胞*CCND1*和*CCNB1*蛋白表达的影响见图5。结果显示, 不同浓度的华蟾素作

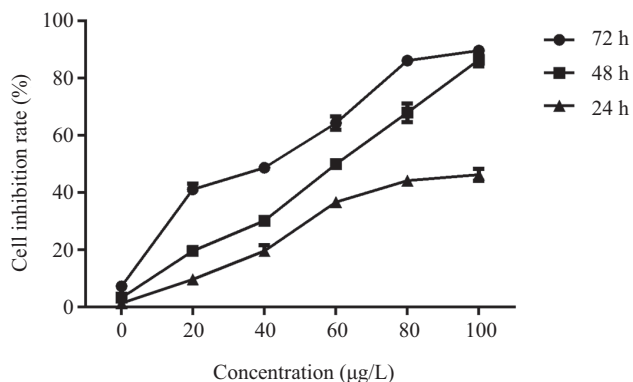
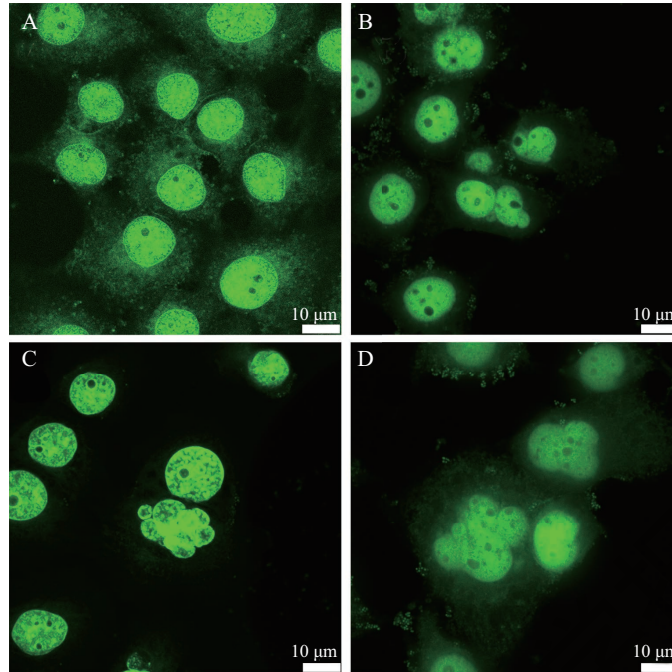


图2 华蟾素对MKN-45细胞的增殖抑制曲线

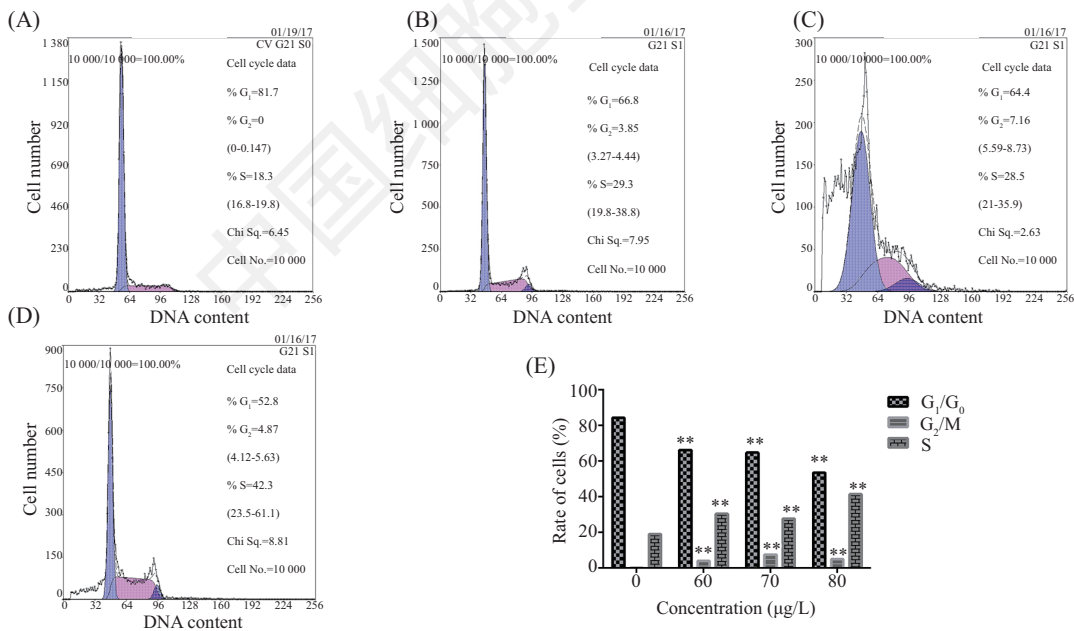
Fig.2 The control curve of cinobufacini on MKN-45 cells



A: 0 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的形态; B: 60 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的形态; C: 70 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的形态; D: 80 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的形态。  
 A: cellular morphology of MKN-45 cells treated with 0 µg/L cinobufacini for 48 h; B: cellular morphology of MKN-45 cells treated with 60 µg/L cinobufacini for 48 h; C: cellular morphology of MKN-45 cells treated with 70 µg/L cinobufacini for 48 h; D: cellular morphology of MKN-45 cells treated with 80 µg/L cinobufacini for 48 h.

图3 华蟾素作用MKN-45细胞48 h后各组细胞的形态

Fig.3 The nuclear morphological changes in cinobufacini-treated MKN-45 cells under fluorescence microscope

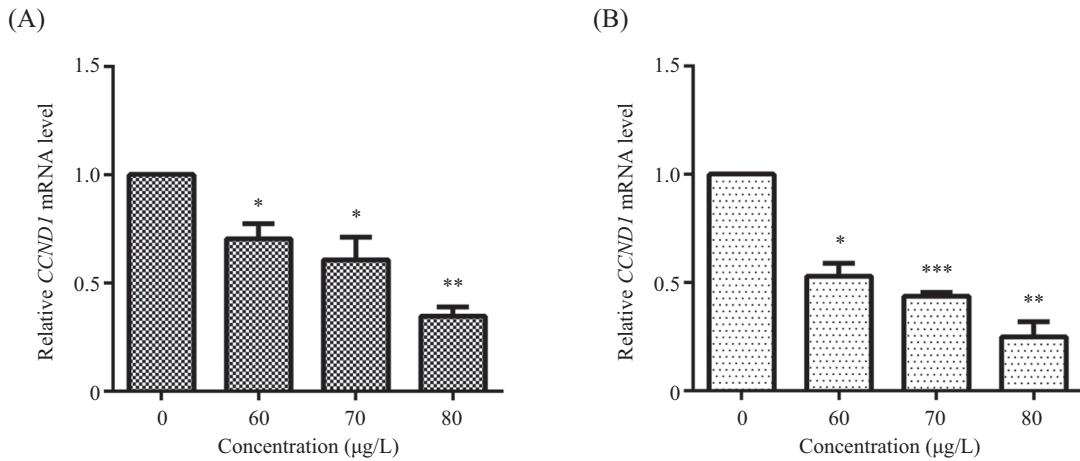


A: 0 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的周期分布; B: 60 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的周期分布; C: 70 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的周期分布; D: 80 µg/L华蟾素处理48 h后人胃癌MKN-45细胞的周期分布; E: 华蟾素作用人胃癌MKN-45细胞48 h后各周期细胞比率。\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, 与对照组比较。

A: cell cycle distribution of MKN-45 cells treated with 0 µg/L cinobufacini for 48 h; B: cell cycle distribution of MKN-45 cells treated with 60 µg/L cinobufacini for 48 h; C: cell cycle distribution of MKN-45 cells treated with 70 µg/L cinobufacini for 48 h; D: cell cycle distribution of MKN-45 cells treated with 80 µg/L cinobufacini for 48 h; E: the cell cycle of MKN-45 cells treated with cinobufacini for 48 h. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs control group.

图4 流式细胞术检测华蟾素对MKN-45细胞周期的影响

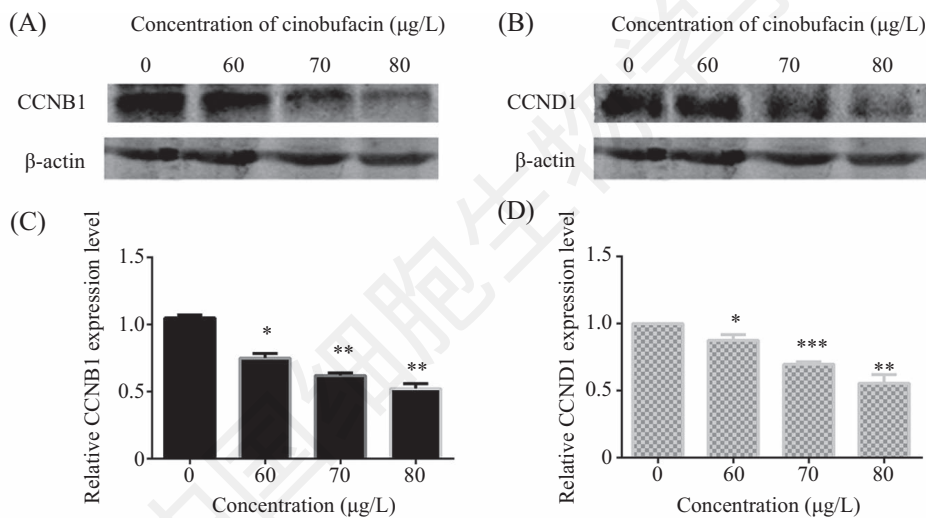
Fig.4 The cell cycle distribution of MKN-45 treated with cinobufacini for 48 h



A: qRT-PCR检测CCND1 mRNA表达水平; B: qRT-PCR检测CCNB1 mRNA表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组比较。

A: expression levels of CCND1 mRNA detected by qRT-PCR; B: expression levels of CCNB1 mRNA detected by qRT-PCR. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图5 华蟾素作用人胃癌细胞MKN-45细胞对CCND1、CCNB1 mRNA表达的影响  
Fig.5 The CCND1 and CCNB1 mRNA expression level of the MKN-45 cells



A: Western blot检测CCNB1蛋白表达水平; B: Western blot检测CCND1蛋白表达水平; C: CCNB1蛋白的相对表达量; D: CCND1蛋白的相对表达量。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

A: expression levels of CCNB1 protein detected by Western blot; B: expression levels of CCND1 protein detected by Western blot; C: the relative of CCND1 expression level; D: the relative of CCNB1 expression level. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图6 华蟾素对CCND1和CCNB1蛋白表达的影响

Fig.6 The effects of cinobufacini on protein levels of CCND1 and CCNB1

用MKN-45细胞48 h后, CCND1蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), CCNB1蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

目前, 辅助治疗是晚期胃癌化疗联合手术前后主要的治疗方案, 而中药在癌症辅助治疗中越来越被重视, 中药联合化学药物治疗可以增强治疗效果、减轻药物毒副反应。蟾皮是我国传统的中药材, 华

蟾素是中华大蟾蜍表皮的水煎煮提取物, 各种实验研究表明, 华蟾素及其活性成分蟾毒配基类成分具有一定的抗癌作用, 对肝癌、肺癌、肠癌等恶性肿瘤均有一定的作用, 张永伟等<sup>[9]</sup>证实了华蟾素能通过影响肝癌小鼠HGF/c-Met信号通路来影响肿瘤细胞的生长。Zhang等<sup>[10]</sup>发现, 华蟾素能通AKT通路诱导非小肺癌细胞的凋亡, 从而抑制肿瘤细胞的增生。史曦凯等<sup>[11]</sup>将50例肠癌患者分成两个实验组, 对照组为常规化疗治疗手段, 华蟾素联合常规化疗作为

实验组,证实了华蟾素联合化疗辅助治疗对肠癌术后的转移有着明显的抑制作用。另有研究表明,华蟾素增强癌症患者机体免疫力,华蟾素可促进脾淋巴细胞分泌白细胞介素-2(IL-2),从而增强T淋巴细胞免疫功能<sup>[12]</sup>。进一步研究表明,华蟾素能够抑制裸鼠体内肿瘤的生长和胸腺的增大,促进T淋巴细胞增殖,调节T淋巴细胞亚群,从而改善细胞免疫功能<sup>[13]</sup>。但华蟾素其对胃癌细胞作用及作用机制尚未明确。因此,本实验以人胃癌MKN-45细胞作为研究对象,探讨华蟾素作用人胃癌细胞对其细胞周期的影响及推测作用机制,通过显微镜观察细胞形态变化,检测细胞生长抑制率、细胞凋亡率、细胞周期变化及细胞周期调控因子CCNB1和CCND1 mRNA水平和蛋白水平的表达情况。结果表明,在一定浓度范围内,华蟾素作用MKN-45细胞48 h后,细胞形态出现凋亡特征,细胞增殖被抑制,细胞周期被阻滞在S期,并下调了CCNB1和CCND1基因表达。细胞周期是细胞生命活动的重要组成部分,是指由细胞分裂完成到下一次细胞分裂完成的全过程,主要包括了DNA合成和分裂出子细胞。并且细胞周期有一套完善的调控机制确保其有序地进行下去。目前已知的细胞周期调控因子主要分为3大类:细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclindependent kinase inhibitor, CKI)。现已知多种基因,包括CCND1和CCNB1,与细胞凋亡的信号转导相关。近年来,CCND1基因已被确立为癌基因,其过度表达可加速细胞的增殖,与多种肿瘤的发生和发展有关<sup>[4]</sup>。多项研究指出,G<sub>1</sub>期到S期,G<sub>2</sub>期到M期是细胞增殖的关键时期,特别是G<sub>1</sub>期到S期。而CCND1基因翻译的Cyclin D1蛋白是调控细胞周期G<sub>1</sub>期的关键蛋白,Cyclin D1是一种G<sub>1</sub>/S-特异性周期蛋白<sup>[15]</sup>,在细胞G<sub>1</sub>期到S期的过程中起到重要的作用<sup>[16]</sup>。在正常情况下,当细胞分裂至S期后Cyclin D1蛋白被分解;如果CCND1基因持续表达,则会导致细胞G<sub>1</sub>期持续时间变短,从而导致细胞增殖异常,有可能导致细胞癌变<sup>[17]</sup>。CCNB1基因翻译的蛋白质Cyclin B1是周期素依赖性蛋白激酶1(CDK1)的调节亚单位,也是细胞周期G<sub>2</sub>/M检测点关键的调控因子,与cdc2形成Cyclin B1/cdc2复合物,即有丝分裂促进因子(mitosis promoting factor, MPF),在细胞周期G<sub>2</sub>/M转换中发挥关键作用。目前

在人类多种肿瘤(如食管癌、非小细胞性肺癌、舌癌等)中发现Cyclin B1过表达。Cyclin B1影响肿瘤的程度、分化、转移及治疗效果,有可能成为靶向治疗的靶点<sup>[18]</sup>。

本实验希望通过研究不同浓度华蟾素对MKN-45细胞中CCNB1和CCND1基因表达的影响,探讨华蟾素对人胃癌细胞的作用机制。本研究表明,华蟾素可以在体外通过诱导MKN-45细胞凋亡,显著抑制人胃癌细胞的增殖并阻滞细胞周期于S期,使细胞周期调控因子CCND1和CCNB1的表达降低,其表达量的降低可能是诱导细胞凋亡的机制之一。但是究竟是华蟾素中的何种活性成分有诱导细胞凋亡的作用,以及其通过哪些信号通路发挥作用,均有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,张思维,陈万青. 中国胃癌流行病学现状. 中国肿瘤临床(Zuo Tingting, Zheng Rongshou, Zeng Hongmei, Zhang Siwei, Chen Wanqing. Epidemiology of stomach cancer in China. Chinese Journal of Clinical Oncology) 2017; 44(1): 52-8.
- 2 所剑,王大广,刘泽锋. 早期胃癌诊断和治疗. 中国实用外科杂志(Suo Jian, Wang Daguang, Liu Zefeng. Diagnosis and treatment of early gastric cancer. Chinese Journal of Practical Surgery) 2011; 31(8): 717-9
- 3 詹友庆,孙晓卫,李威,陈映波,徐立,关远祥,等. 影响根治术后胃癌预后的多因素分析. 癌症(Zhan Youqing, Sun Xiaowei, Li Wei, Chen Yingbo, Xu Li, Guan Yuanxiang, et al. Multivariate prognostic analysis in gastric carcinoma patients after radical operation. Chinese Journal of Cancer) 2005; 24(5): 596-9.
- 4 金懋林. 胃癌化学治疗进展. 中国处方药(Jin Maolin. Progress in chemotherapy for gastric cancer. China Prescription Drug) 2008; 3: 72-5.
- 5 徐瑞华,滕开原. 晚期胃癌化疗进展. 癌症(Xu Ruihua, Teng Kaiyuan. Progress in chemotherapy for advanced gastric cancer. Chinese Journal of Cancer) 2009; 28(10): 1108-13.
- 6 刘俊秋,司南,杨健,赵海誉,边宝林,王宏洁. HPLC-DAD-FT-ICR-MS法分析华蟾素中蟾毒配基类成分. 药学报(Liu Junqiu, Si Nan, Yang Jian, Zhao Haiyu, Bian Baolin, Wang Hongjie. Identification of bufadienolides profiling in cinobufacino by HPLC-DAD-FT-ICR-MS method. Acta Pharmaceutica Sinica) 2014; 49(2): 244-8.
- 7 Guo CJ, Yu TH, Zhang HP, Xing JH. The observation of clinical therapeutic effect of Cinobufacini combined with Docetaxel on advanced stomach cancer. China Medical Herald 2011; 8: 54-5.
- 8 韩玲玉,司南,刘俊秋,赵海誉,杨健,边宝林,等. 华蟾素注射液中毒配基类化学成分研究. 药学报(Han Lingyu, Si Nan, Liu Junqiu, Zhao Haiyu, Yang Jian, Bian Baolin, et al. Chemical constituents of bufadienolides in cinobufacino injection. Acta Pharmaceutica Sinica) 2014; 49(11): 1574-7.
- 9 张永伟,翟昌林,鲁广. 华蟾素对荷瘤小鼠肝癌生长及HGF/

- c-Met信号通路的影响. 中国中医药科技(Zhang Yongwei, Zhai Changlin, Lu Guang. Effects of cinobufotalin on tumor growth of hepatocarcinoma-bearing mice and HGF/c-Met signaling pathway. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology) 2014; 21(2): 154-6.
- 10 Zhang G, Wang C, Sun M, Li J, Wang B, Jin C, *et al.* Cinobufagin inhibits tumor growth by inducing intrinsic apoptosis through AKT signaling pathway in human nonsmall cell lung cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(20): 28935-46.
- 11 史曦凯, 程才, 郭力硕, 宋明君. 华蟾素防治大肠癌术后复发转移临床观察. 深圳中西医结合杂志(Shi Xikai, Cheng Cai, Guo Lishuo, Song Mingjun. Clinical observation of Cinobufotalin in prevention and treatment of recurrence and metastasis of colorectal cancer. Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine) 2016; 26(11): 72-3.
- 12 刘祥胜, 刘开俊, 杨业金. 华蟾素对Hela细胞生长和小鼠脾淋巴细胞分泌IL-2的影响. 免疫学杂志(Liu Xiangsheng, Liu Kaijun, Yang Yejin, Effects of cinobufacini on the growth of Hela cell and IL-2production of murine spleen lymphocytes. Immunological Journal) 2005; 21(3): 138-41.
- 13 薛瑞, 张青松, 张玉洁, 曹军华. 华蟾素对乳腺癌MCF-7移植瘤裸鼠的抗肿瘤作用及机制研究. 实用药物与临床(Xue Rui, Zhang Qingsong, Zhang Yujie, Cao Junhua. Anti-tumor effect and mechanism of cinobufacini on nude mice of human breast cancer cells. Practical Pharmacy and Clinical Remedies) 2014; 17(S1): 815-7.
- 14 Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 2009; 220(2): 292-6.
- 15 Lukaszewicz AI, Anderson DJ. Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(28): 11632-7.
- 16 Laine H, Sulg M, Kirjavainen A, Pirvola U. Cell cycle regulation in the inner ear sensory epithelia: Role of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Dev Biol* 2010; 337(1): 134-46.
- 17 Pestell RG. New Roles of Cyclin D1. *Am J Pathol* 2013; 183(1): 3-9.
- 18 Harada H, Omura K, Nakajima Y, Hasegawa S, Mogi S. Cyclin B1 is useful to predict occult cervical lymph node metastases in tongue carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25(3): 351-6.

中国细胞生物学学报