

熊果酸对肺癌细胞株 A549 及 SPCA1 细胞周期的抑制作用

付 伦 朱 敏 李招云 王 攀 朱 杰 卢德赵

摘 要 **目的** 研究熊果酸(ursolic acid, UA)对肺癌细胞株 A549 及 SPCA1 细胞周期的抑制作用,探讨其分子机制。**方法** 采用 MTS 法检测不同浓度 UA 作用不同时间对 A549 及 SPCA1 细胞的增殖抑制作用;光镜下观察细胞形态学变化;流式细胞仪检测不同浓度 UA 对 A549 及 SPCA1 细胞周期分布的影响;实时荧光定量 PCR 分析 UA 作用下 A549 及 SPCA1 的相关分子表达情况。**结果** MTS 结果显示 UA 对 A549 及 SPCA1 细胞具有增殖抑制作用,且呈时间和剂量依赖性。经 UA 作用后,光镜下可见 A549 及 SPCA1 细胞增殖受到抑制,细胞出现变圆、回缩和脱落。流式细胞仪结果显示在 UA 作用后, A549 及 SPCA1 细胞周期抑制在 G_0/G_1 期, S 期和 G_2/M 期的比例降低。实时荧光定量 PCR 结果表明, UA 作用后 A549 及 SPCA1 细胞 cyclinD1 mRNA、cyclinE mRNA、Ankrd17 mRNA 表达水平降低, p27 mRNA、p16 mRNA 表达增加, Ankrd17 mRNA 表达变化差异无统计学意义。**结论** UA 能明显抑制 A549 及 SPCA1 细胞增殖,呈时间和剂量依赖性,该作用是通过将细胞周期抑制在 G_0/G_1 期实现的。其分子机制可能与上调 p27 和 p16 的表达,下调 cyclinD1 和 cyclinE 的表达有关。

关键词 熊果酸 A549 细胞 SPCA1 细胞 细胞周期抑制

中图分类号 R737.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.018

Effects of Ursolic Acid on Cell Cycle of A549 Cells and SPCA1 Cells and Its Mechanism. Fu Lun, Zhu Min, Li Zhaoyun, et al. School of Medical Lab Science, School of Life Sciences, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract **Objective** To explore the cell cycle inhibition of ursolic acid in the lung cancer cell line A549 and SPCA1 and study its mechanisms. **Methods** The A549 cells and SPCA1 cells were treated with ursolic acid at different concentration for different duration. The cell inhibition rate was measured by MTS assay. The morphology of A549 cells and SPCA1 cells were observed under inverted microscope. The flow cytometry was used to detect cell cycle arrest. The expression of cell cycle arrest related genes were detected with real-time PCR. **Results** Ursolic Acid remarkably inhibited the proliferation of A549 cells and SPCA1 cells and there was a dose and time-dependent manner among them. The morphological changes of A549 cells and SPCA1 cells, such as proliferation inhibition, cell retraction, exfoliation and necrosis were obvious under light microscope. The cell cycle was blocked at G_0/G_1 phase and the cell population in S and G_2/M phase was decreased. Real-time PCR analysis indicated that expression level of cyclinD1 mRNA, cyclinE mRNA, Ankrd17 mRNA was decreased while expression level of P27 mRNA, P16 mRNA was increased. The differential expression of Ankrd17 mRNA was not statistically significant. **Conclusion** Ursolic acid can inhibit the proliferation of A549 cells and SPCA1 cells and there is a dose and time-dependent manner. The effect maybe related with cell cycle arrest, which maybe associated with downregulating the expression level of cyclinD1, cyclinE and upregulating the expression level of p27, p16.

Key words Ursolic Acid; A549 cells; SPCA1 cells; Cell cycle arrest

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 2013 年中国肿瘤登记年报显示肺癌在我国恶性肿瘤发生率中居首, 已连续多年成为我国恶性肿瘤的头号死亡杀手^[1]。目前治疗肺癌的化学药物不良反应大、长期

应用易产生耐受性, 在临床的运用中受到了很大限制。传统中医药在抗肿瘤方面疗效确切且不良反应小, 具有一定的独特性和优势。熊果酸(ursolic acid, UA), 又名乌索酸、乌苏酸, 是一种五环三萜类化合物, 存在于夏枯草、车前草、白花蛇舌草、枇杷叶、女贞子等多种中草药中, 具有抗肿瘤、抗氧化、肝脏保护、抗炎、降血糖、抗肥胖等多种生物活性作用^[2-7]。国内外研究表明, UA 对多种肿瘤细胞均有抑制作用, 抗肿瘤机制涉及抗 DNA 突变、抑制癌变启动、抗氧化

基金项目: 浙江省中医药科研计划项目(2011ZA114)

作者单位: 325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(付伦、李招云); 317000 浙江省台州医院(朱敏); 318000 台州市中心医院(李招云、王攀、朱杰); 310053 杭州, 浙江中医药大学(卢德赵)

通讯作者: 李招云, 主任技师, 电子信箱: lzy8151@163.com

作用、细胞毒作用、细胞周期阻遏、诱导肿瘤分化及抗侵袭性、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成等多个方面,其中细胞周期阻遏是抵抗癌变的重要调控途径^[8]。

本实验通过研究 UA 对肺腺癌 A549 及 SPCA1 细胞周期抑制作用,进一步阐明 UA 的抗肿瘤作用机制,为 UA 的临床应用提供理论基础。

材料与方法

1. 材料:(1)细胞系和细胞培养:人肺腺癌 A549 细胞及 SPCA1 细胞来自浙江省台州医院公共实验平台。以含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,细胞呈贴壁生长,3 天传代 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。(2)药物及制备:熊果酸(UA)购自美国 Sigma 公司,纯度≥90%,用 DMSO 配成 8mmol/L 母液,-20℃避光分装保存。使用前解冻,用完全高糖 DMEM 培养基稀释至所需浓度。DMSO 在培养基中的浓度不能超过 2‰。(3)主要试剂及仪器:高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(美国 HyClone 公司);0.25% 胰酶 EDTA、DMSO(美国 Sigma 公司);MTS 试剂(美国 Promega 公司);细胞周期检测试剂盒(杭州科联生物技术有限公司);荧光定量 PCR 所需引物(上海捷瑞生物工程有限公司);GAPDH 内参、DEPC 水、Trizol 购自大连宝生物工程有限公司;RevertAid First Strand Cdna Synthesis Kit(美国 Thermo 公司);FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(瑞士 Roche 公司);3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);SM-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);CKX41 型相差倒置显微镜(日本, Olympus 公司);ST16R 型低温高速离心机(美国 ThermoFisher 公司);RT-6000 酶标分析仪(德国 Rayto 公司);SmartSpec plus 核酸分析仪(美国 Bio-rad 公司);FACSCalibur 流式分析仪(B. D. 公司);7300 Real Time PCR System(美国 ABI 公司);T100™ Thermal Cycler(美国 Bio-rad 公司);无菌培养板(美国 Corning 公司)。

2. 方法:(1)MTS 法检测细胞增殖抑制率:取对数生长期的细胞,胰酶消化,调整细胞浓度至约 5 × 10⁴/ml,接种 96 孔板,100 微升/孔,37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24h 后,吸出培养基,加入 UA,终浓度分别为 40、60、80、100、120μmol/L,另设调

零组(只含等量培养基)和溶剂对照组(1.5‰DMSO),每组设 5 个复孔。将 96 孔板置于培养箱中分别培养 12、24、48h,每孔加 20μlMTS,继续培养约 2h,酶标仪测 490nm 波长处的吸光值(A 值)。实验重复 3 次,细胞增殖抑制率(IR%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。用软件 SPSS 17.0 对计算结果进行数据统计分析。(2)光镜下观察细胞形态学变化:A549 及 SPCA1 细胞分别在 60、80、100μmol/L 的 UA 作用 24h 后,置于相差倒置显微镜下,观察细胞形态学变化并拍照。(3)流式细胞仪检测细胞周期抑制作用:取对数生长期细胞,以约 5.5 × 10⁴/ml 的细胞浓度接种 6 孔板,2 毫升/孔,加入 UA 的终浓度分别是 60、80、100μmol/L,未加药组为对照组。24h 后,每组浓度收集约 10⁶ 个细胞,1000r/min,离心 5min,弃上清,用 PBS 洗涤 1 次。按照试剂说明书加入 1ml 试剂 A (DNA staining solution)和 10μl 试剂 B(permeabilization solution),室温避光孵育 30min,300 目筛网过滤 1 次,上流式细胞仪测定细胞周期分布。实验重复 3 次,取其平均值。用 Flow Jo 软件分析图形数据。(4)荧光定量 PCR 检测相关基因表达:在 60、80、100μmol/L 的 UA 作用细胞 24h 后,离心收集细胞(约 5 × 10⁶ 个细胞),用 PBS 洗涤 2 次。抽提细胞 RNA 过程如下:加 1ml Trizol,用移液枪反复吹打,室温静置 5min。加 200μl 氯仿,手动剧烈摇晃 15s,待液体变为乳白色,4℃、12000r/min,离心 15min。小心吸取上清 400μl,加入等体积异丙醇,轻轻颠倒混匀至澄清,4℃、12000r/min,离心 10min。倒掉上清,加 1ml 乙醇洗涤,4℃、12000r/min,离心 5min,重复 2 次。弃上清,待干燥后,加 20μl DEPC 水溶解。用核酸分析仪测定 RNA 的浓度和纯度。每个样品取 1μg 总 RNA,加 Oligo(dT)(100μmol/L)2μl,加水至 12μl,65℃,5min。冰浴 4min,短暂离心。加 5 × buffer 4μl,10mmol/L dNTP 1μl,反转录酶(M-MLV)0.5μl,RNA 酶抑制剂 0.5μl,加水至 20μl。42℃,60min;72℃,5min;4℃,10min,终止反应。real-time PCR 扩增 cyclinD1、cyclinE、p27、p16、Ankrd17、FOR20。基因引物的设计见表 1。real-time PCR 反应体系:模板 cDNA2μl,上下游引物各 0.3μl,2 × SYBR Green10μl,加水至 20μl。扩增条件:95℃,10min;95℃,15s;60℃,1min,共 45 个循环。融解曲线分析:95℃ 15s,60℃ 15s。

表 1 引物序列号

产物	引物序列	扩增片段长度(bp)
cyclinD1	上游引物:5'- GCTGCGAAGTGGAACCATC -3'	135
	下游引物:5'- CCTCCTTCTGCACACATTGAA -3'	
cyclinE	上游引物:5'- AAGGAGCGGGACACCATGA -3'	80
	下游引物:5'- ACGGTCACGTTTGCCTTCC -3'	
Ankrd17	上游引物:5'- CACGGCTGATGGTAAAGCCTT -3'	75
	下游引物:5'- TCCAACGCACAACAAACAGAC -3'	
p27	上游引物:5'- AACGTGCGAGTGCTAACGG -3'	209
	下游引物:5'- CCCTCTAGGGGTTTGTGATTCT -3'	
p16	上游引物:5'- ATGGAGCCTTCGGCTGACT -3'	108
	下游引物:5'- GTAACATTTCGGTGCGTTGGG -3'	

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct$ = 实验组(目的基因 Ct - 内参 Ct) - 对照组(目的基因 Ct - 内参 Ct), GAPDH 为内参。实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据比较采用 *t* 检验和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MTS 法检测细胞增殖抑制率:浓度为 40、60、80、100、120 $\mu\text{mol/L}$ 的 UA 分别作用 A549 及 SPCa1 细胞 12、24、48h 后,细胞的增殖抑制率随 UA 浓度增加、作用时间延长明显增强,呈浓度 - 时间依赖性,与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。两组细胞间的细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1、图 2,表 2)。细胞增殖抑制率(IR%) = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

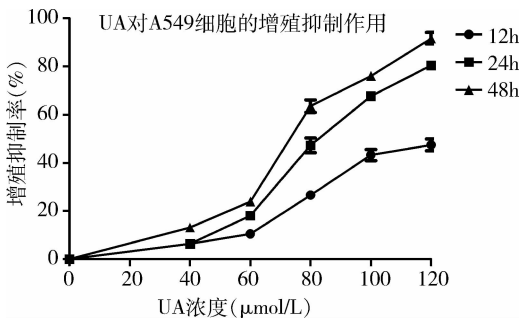


图 1 UA 对 A549 细胞增殖抑制作用

2. 光镜下细胞形态学变化:倒置显微镜下观察:正常细胞呈贴壁生长,增殖迅速,有伪足。加药组细

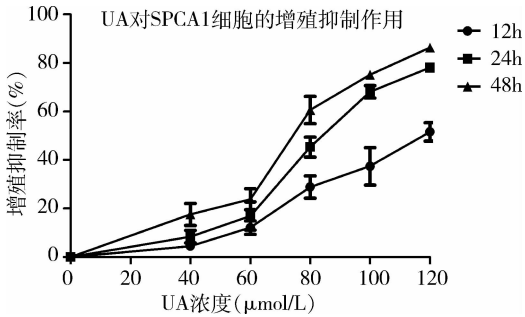


图 2 UA 对 SPCa1 细胞增殖抑制作用

表 2 UA 对 A549 及 SPCa1 细胞的增殖抑制作用(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

细胞株	UA ($\mu\text{mol/L}$)	12h	24h	48h
A549	40	6.36 ± 2.92 **	6.39 ± 2.69 *	13.18 ± 5.46 **
	60	10.56 ± 2.49 **	18.11 ± 5.62 **	23.98 ± 4.52 **
	80	26.66 ± 3.95 **	47.31 ± 7.79 **	63.50 ± 6.28 **
	100	43.26 ± 8.41 **	67.70 ± 5.02 **	76.07 ± 3.17 **
	120	47.46 ± 6.06 **	80.39 ± 3.92 **	91.67 ± 4.70 **
SPCa1	40	4.42 ± 1.07 **	6.98 ± 2.13	17.59 ± 7.83
	60	12.09 ± 4.90 *	19.30 ± 6.78 *	23.84 ± 7.51 *
	80	28.84 ± 8.03 **	45.35 ± 7.13 **	60.65 ± 9.80 **
	100	37.44 ± 13.35 **	68.14 ± 4.49 **	75.23 ± 3.18 **
	120	51.63 ± 6.66 **	78.14 ± 2.45 **	86.34 ± 3.03 **

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胞增殖受到抑制,细胞出现回缩、脱落、坏死(图 3、图 4)。

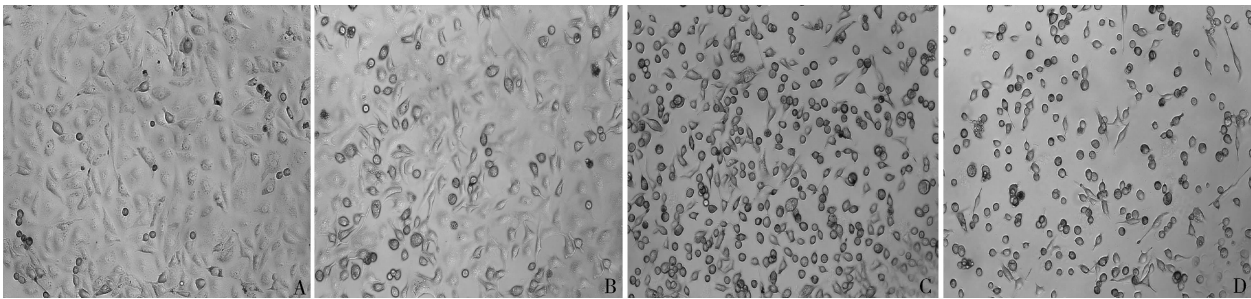


图 3 倒置显微镜下 A549 细胞形态变化 (×100)

A. 空白组; B. 60 $\mu\text{mol/L}$; C. 80 $\mu\text{mol/L}$; D. 100 $\mu\text{mol/L}$

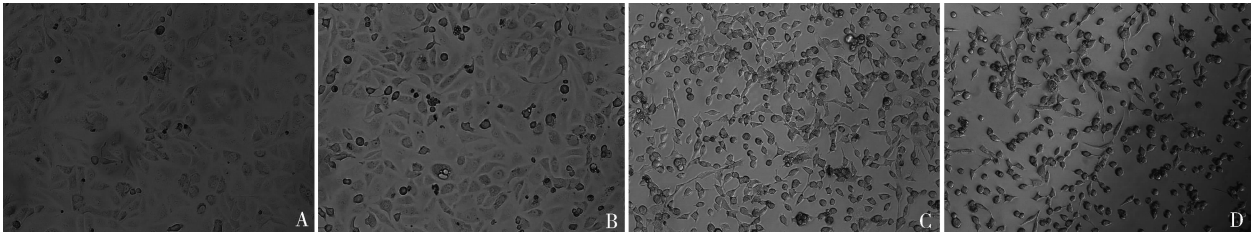


图 4 倒置显微镜下 SPCa1 细胞形态变化 (×100)

A. 空白组; B. 60 $\mu\text{mol/L}$; C. 80 $\mu\text{mol/L}$; D. 100 $\mu\text{mol/L}$

3. 流式测细胞周期:在 UA 作用下,细胞出现 G_1/S 期抑制(图 5、图 6,表 3)。与未加药组比较,80、

100 $\mu\text{mol/L}$ 组的差异有统计学意义($P < 0.01$)。

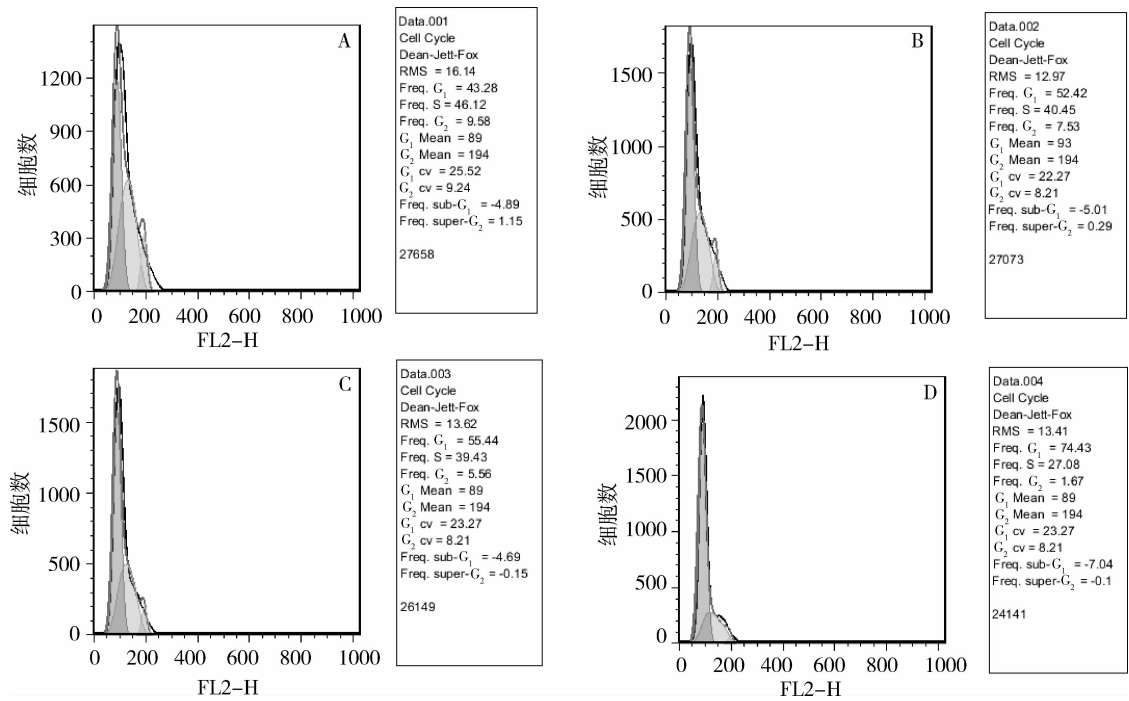


图 5 流式细胞仪检测不同浓度 UA 作用后 A549 细胞周期的变化

A. 对照组; B. 60 $\mu\text{mol/L}$; C. 80 $\mu\text{mol/L}$; D. 100 $\mu\text{mol/L}$

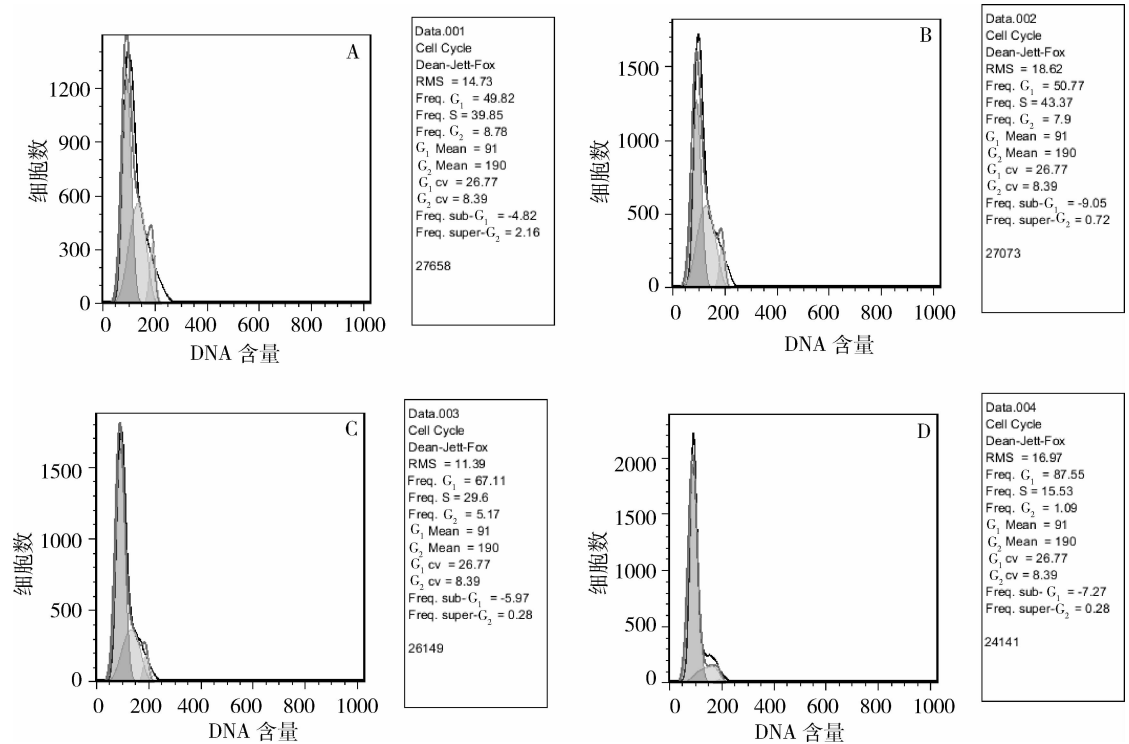


图 6 流式细胞仪检测不同浓度 UA 作用后 SPCA1 细胞周期的变化

A. 对照组; B. 60 $\mu\text{mol/L}$; C. 80 $\mu\text{mol/L}$; D. 100 $\mu\text{mol/L}$

表3 不同浓度 UA 作用 24h 后对细胞周期分布的影响 (% , $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

细胞株	UA ($\mu\text{mol/L}$)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
A549	对照组	43.28 $\pm$ 1.13	46.12 $\pm$ 1.33	9.58 $\pm$ 0.26
	60	52.42 $\pm$ 2.51	41.27 $\pm$ 2.64	7.53 $\pm$ 0.96
	80	55.44 $\pm$ 1.81 **	39.43 $\pm$ 2.53 **	5.56 $\pm$ 0.95 **
	100	74.43 $\pm$ 3.45 **	27.08 $\pm$ 4.87 **	1.67 $\pm$ 0.37 **
SPCA1	对照组	48.77 $\pm$ 0.98	38.80 $\pm$ 1.10	11.70 $\pm$ 2.59
	60	51.59 $\pm$ 1.02 *	42.69 $\pm$ 0.81 **	6.49 $\pm$ 1.65 *
	80	68.33 $\pm$ 1.21 **	28.03 $\pm$ 1.99 **	4.30 $\pm$ 1.13 *
	100	87.45 $\pm$ 1.19 **	13.56 $\pm$ 2.22 **	1.08 $\pm$ 0.06 *

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. 荧光定量 PCR 检测相关基因: 不同浓度 UA (60、80、100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24h 后, 与对照组相比, 各用药组 cyclinD1 mRNA、cyclinE mRNA、Ankrd17 mRNA 表达降低, p27 mRNA、p16 mRNA 表达增加, 与对照组相比, 差异有统计学意义, 详见表 4。

表4 不同浓度 UA 作用 24h 后细胞相关基因的表达式 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

细胞株	mRNA	60 $\mu\text{mol/L}$	80 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
A549	cyclinD1	0.55 $\pm$ 0.2	0.08 $\pm$ 0.02 **	0.03 $\pm$ 0.01 **
	cyclinE	0.17 $\pm$ 0.08 *	0.05 $\pm$ 0.01 *	0.01 $\pm$ 0.003 *
	p27	1.4 $\pm$ 0.16	3.28 $\pm$ 0.46 *	4.2 $\pm$ 0.98 **
	p16	2.19 $\pm$ 1.04	4.24 $\pm$ 1.23 *	8.6 $\pm$ 1.23 **
	Ankrd17	0.73 $\pm$ 0.21	0.71 $\pm$ 0.14	0.60 $\pm$ 0.21
SPCA1	cyclinD1	0.77 $\pm$ 0.27	0.28 $\pm$ 0.13 *	0.09 $\pm$ 0.04 **
	cyclinE	0.46 $\pm$ 0.14 *	0.16 $\pm$ 0.10 **	0.03 $\pm$ 0.01 **
	p27	0.58 $\pm$ 0.11 *	2.44 $\pm$ 0.20 **	4.99 $\pm$ 0.43 **
	p16	1.67 $\pm$ 1.05 *	6.05 $\pm$ 0.82 **	13.30 $\pm$ 1.38 **
	Ankrd17	0.80 $\pm$ 0.27	0.77 $\pm$ 0.10	0.69 $\pm$ 0.16

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

熊果酸对多种肿瘤细胞具有增殖抑制作用, 如肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、卵巢癌等, 通过抑制癌变启动、细胞周期阻遏、诱导肿瘤分化及抗侵袭性、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成等多个方面发挥抗肿瘤作用, 其中细胞周期阻遏是抵抗癌变的重要调控途径。本实验研究结果表明, 在不同浓度熊果酸作用后, 肺癌 A549 及 SPCA1 细胞增殖受到明显抑制, 细胞周期抑制在 G₀/G₁ 期, 细胞 cyclinD1 mRNA、cyclinE mRNA 以及 Ankrd17 mRNA 表达降低, p27 mRNA 和 p16 mRNA 表达增加, Ankrd17 mRNA 表达变化无统计学意义。

细胞周期分为 G₁、S、G₂ 和 M 期 4 个阶段, 调控因子分为: 周期素 (cyclins)、周期素依赖性激酶

(CDKs)、周期素依赖性激酶抑制因子 (CKIs) 3 类。cyclin - CDK 复合物正向调控细胞周期, CKI 则起到负性调控的作用。细胞周期的主要调控点分别是: G₁/S 期、S 期、G₂/M 期, 其中 G₁/S 期调控点最为关键。G₁ 早期, 细胞周期素 D1 (cyclinD1) 与 CDK4 或 CDK6 结合形成 cyclinD1 - CDK4/CDK6 复合物, 促进细胞向 S 期转换。G₁ 晚期, 细胞周期素 E (cyclinE) 与 CDK2 结合成 cyclin E - CDK2 复合物, 细胞进入 S 期。当 cyclinD1 和 cyclinE 过表达时, 细胞周期调控失调, 细胞异常增殖, 导致肿瘤形成。有研究报道, cyclin D1 过表达参与早期非小细胞肺癌的发生及发展, 同时可作为非小细胞肺癌患者预后不良的分子标志^[9]。在所有与 CDK2 结合的周期素中, cyclin E 是唯一能够作为早期非小细胞肺癌预后的独立指标, 且 cyclin E 过表达与非小细胞肺癌淋巴结转移有关^[10,11]。本研究结果显示, UA 作用后 A549 及 SPCA1 细胞周期 G₀/G₁ 期比例降低, S 期和 G₂/M 期比例升高, 细胞 cyclinD1 mRNA 和 cyclinE mRNA 表达降低, 提示 UA 抗肿瘤作用可能与下调 cyclinD1 和 cyclinE 表达有关。

CKI 分为两类, 一类是 Cip/Kip 蛋白 (p21、p27、p57), 主要抑制 cyclin - CDK2, 一类是 INK4 蛋白 (p15、p16、p18), 特异性抑制 cyclinD1 - CDK4/CDK6。p27 主要与 cyclin E - CDK2 结合, 抑制 cyclin E - CDK2 的活性, 负性调控细胞周期, 使细胞周期阻滞在 G₁ 期。有研究表明, p27 既可以是 cyclin E - CDK2 的抑制剂, 又可作为 cyclin E - CDK2 的作用底物^[12]。在非小细胞肺癌中 p27 呈现低表达, 促进肿瘤细胞增殖, p27 的表达高低与非小细胞肺癌预后有关^[13,14]。p16 能特异性抑制 cyclinD1 - CDK4 复合物, 阻止细胞向 S 期过渡。在肺癌患者中 p16 蛋白失活低表达, 其失活机制包括启动子异常甲基化、纯合子缺失、点突变等, 其中异常甲基化尤为重要^[15]。Belinsky 等^[16]首次证明 p16 基因异常甲基化是肺癌的早期事件, 并可作为肺癌早期诊断的分子标志物, 且监测并预防肺癌发生。Guzmán 等^[17]研究表明, 吸烟的肺癌患者 p16 甲基化程度明显高于健康者, 可以作为吸烟肺癌患者的早期诊断指标。此外, p16 低表达和 CDK4 高表达与肺癌细胞淋巴结转移有显著相关性。本研究结果显示 UA 可以使肺癌 A549 及 SPCA1 细胞的 p27 mRNA 和 p16 mRNA 表达升高, 影响细胞周期分布, 抑制肿瘤细胞增殖。Deng 等^[18]利用 TAP 亲和纯化技术证实 Ankrd17 (ankyrin repeat pro-

tein 17) 是 cyclinE/CDK2 的作用底物。Ankrd17 有 3 个磷酸化位点: Ser¹⁷⁹¹、Ser¹⁷⁹⁴、和 Ser²¹⁵⁰, 均可被 cyclinE/CDK2 磷酸化。Ankrd17 过表达可促使细胞向 G₁ 期转换, 正向调控细胞周期。在 UA 作用下, Ankrd17 mRNA 表达降低, 但差异无统计学意义, 说明 UA 的抗肺癌作用可能与调控 Ankrd17 的表达无关。

综上所述, UA 作用下, 肺腺癌 A549 及 SPCA1 细胞 cyclinD1 mRNA 和 cyclinE mRNA 表达降低, p27 mRNA 和 p16 mRNA 表达升高, 该基因皆与细胞周期的 G₁/S 期调控点有关, 其可能通过不同信号转导途径使 A549 及 SPCA1 细胞周期抑制在 G₀/G₁ 期, 肿瘤细胞增殖受到抑制, 发挥 UA 的抗肺癌作用, 从而为 UA 的临床应用提供了理论基础。

参考文献

- 赫捷, 陈万青. 2012 中国肿瘤登记年报 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2013
- Dar BA, Bhat BA, Qurishi MA. Synthesis and comparative bioevaluation of aliphatic and aromatic triazolyl derivatives of ursolic acid as anticancer agents [J]. J Appl Chem, 2014, 3 (2): 541 - 550
- do Nascimento PG, Lemos TL, Bizerra AM, *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives [J]. Molecules, 2014, 19 (1): 1317 - 1327
- Li S, Liao X, Meng F, *et al.* Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease rats [J]. PLoS One, 2014, 9 (1): e86724
- Córdova C, Gutiérrez B, Martínez-García C, *et al.* Oleanolic Acid Controls Allergic and Inflammatory Responses in Experimental Allergic Conjunctivitis [J]. PLoS One, 2014, 9 (4): e91282
- Benalla W, Bellahcen S, Bnouham M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors [J]. Curr Diabetes Rev, 2010, 6 (4): 247 - 254
- Wang Y, He Y. Ursolic acid, a promising dietary bioactive compound

- of anti-obesity [J]. FASEB, 2014, 28 (1): Supplement 1045.40
- 孙悦霖, 罗浩. 熊果酸抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20 (4): 656 - 658
- Keum JS, Kong G, Yang SC, *et al.* Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer [J]. Br J Cancer, 1999, 81 (1): 127 - 132
- Müller-Tidow C, Metzger R, Kügler K, *et al.* CyclinE is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61 (2): 647 - 653
- Ha SY, Kim HK, Im JS, *et al.* Expression of cyclinA, B1, D1, D3, and E in non-small lung cancers [J]. J Lung Cancer, 2012, 11 (1): 33 - 37
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, *et al.* Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27 Kip1 [J]. Genes Dev, 1997, 11 (11): 1464 - 1478
- Kawana H, Tamaru J, Tanaka T, *et al.* Role of p27^{Kip1} and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer [J]. Am J Pathol, 1998, 153 (2): 505 - 513
- Esposito V, Baldi A, De Luca A, *et al.* Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 1997, 57 (16): 3381 - 3385
- Nakata S, Sugio K, Uramoto H, *et al.* The methylation status and protein expression of CDH1, p16^{INK4A}, and fragile histidine triad in non-small cell lung carcinoma [J]. Cancer, 2006, 106 (10): 2190 - 2199
- Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, *et al.* Aberrant methylation of p16^{INK4a} is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (20): 11891 - 11896
- Guzmán L, Depix MS, Salinas AM, *et al.* Analysis of aberrant methylation on promoter sequences of tumor suppressor genes and total DNA in sputum samples: a promising tool for early detection of COPD and lung cancer in smokers [J]. Diagn Pathol, 2012, 7: 87
- Deng M, Li F, Ballif BA, *et al.* Identification and functional analysis of a novel cyclin E/Cdk2 substrate ankrd17 [J]. J Biol Chem, 2009, 284 (12): 7875 - 7888

(收稿日期: 2014 - 12 - 19)

(修回日期: 2015 - 01 - 20)

(接第 165 页)

- 顾昕, 史永振, 张立国, 等. 锁骨钩钢板与喙锁螺钉治疗锁骨远端 Neer II 型骨折的临床疗效比较 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2010, 25 (8): 676 - 678
- 陈焕庆, 徐志坚, 王飞雄. 缝合锚钉固定治疗不稳定型锁骨远端骨折 [J]. 临床骨关节杂志, 2012, 15 (1): 91 - 92
- Constant CR, Murley AH. A clinical method of functional assessment of the shoulder [J]. Clin Orthop Relat Res, 1987, 214: 160 - 164
- 吕建元, 陈勇, 陈吉, 等. AO 钛制弹性髓内钉在锁骨骨折中的临床应 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2010, 12 (1): 91 - 92
- Wang SQ, Gao YS, Mei J, *et al.* Migration of a broken Kirschner pin into thoracic spinal canal 4 years following internal fixation of a clavicle fracture [J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2010, 20: 493 - 495

- Flinkkilä T, Ristiniemi J, Hyvönen P, *et al.* Surgical treatment of unstable fracture of the distal clavicle: a comparative study of Kirschner wire and clavicular hook plate fixation [J]. Acta Orthop Scand, 2002, 73 (1): 50 - 53
- Samy M, Khanfour A. Extra-articular fixation of displaced fracture lateral end clavicle [J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2011, 21: 557 - 561
- 吴晓明, 高伟, 李凡, 等. 锁骨钩钢板内固定术后并发症分析与防治对策 [J]. 中华骨科杂志, 2012, 32 (4): 331 - 338
- Elmaraghy AW, Devereaux MW, Ravicbandiran K, *et al.* Subacromial morphometric assessment of the clavicle hook plate [J]. Injury, 2010, 41 (6): 613 - 619

(收稿日期: 2014 - 09 - 13)

(修回日期: 2014 - 11 - 04)