

- 10 Peng W, Gao W, Feng J. Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with pancreatic cancer[J]. *Med Oncol*, 2014;31(12):346
- 11 Ji P, Diederichs S, Wang W, *et al.* MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2003,22(39):8031-8041
- 12 Ren S, Liu Y, Xu W, *et al.* Long noncoding RNA MALAT-1 is a new potential therapeutic target for castration resistant prostate cancer[J]. *Jo Urol*, 2013,190(6):2278-2287
- 13 Jiao F, Hu H, Han T, *et al.* Long noncoding RNA MALAT-1 enhances stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2015,16(4):6677-6693
- 14 Xu C, Yang M, Tian J, *et al.* MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis[J]. *Int J Oncol*, 2011,39(1):169-175
- 15 Lai MC, Yang Z, Zhou L, *et al.* Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. *Med Oncol*, 2012,29(3):1810-1816
- 16 Chung S, Nakagawa H, Uemura M, *et al.* Association of a novel long non-coding RNA in 8q24 with prostate cancer susceptibility[J]. *Cancer Sci*, 2011,102(1):245-252
- 17 Petrovics G, Zhang W, Makarem M, *et al.* Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients[J]. *Oncogene*, 2004,23(2):605-611
- 18 Ukimura O, Coleman JA, de la Taille A, *et al.* Contemporary role of systematic prostate biopsies: indications, techniques, and implications for patient care[J]. *Eur Urol*, 2013,63(2):214-230
- 19 Mearini E, Antognelli C, Del Buono C, *et al.* The combination of urine DD3 (PCA3) mRNA and PSA mRNA as molecular markers of prostate cancer[J]. *Biomarkers*, 2009,14(4):235-243

(收稿日期:2016-01-22)

(修回日期:2016-02-11)

褪黑素联合顺铂对人胃癌细胞增殖及相关凋亡蛋白表达的影响

范梦迪 李为民 陈依娜 宋彩云 颜 页 吴建胜 郑 超

摘 要 **目的** 探究褪黑素(MLT)联合顺铂(CDDP)对人胃癌 AGS 细胞的疗效及相关凋亡蛋白表达的影响。**方法** 将体外培养的人胃癌细胞 AGS 细胞株分为 4 组,即 AGS 对照组、AGS MLT 组(2mmol/L)、AGS CDDP 组(4μg/ml)和 AGS MLT + CDDP 组(2mmol/L MLT 和 4μg/ml CDDP)。采用 CCK8 试验检测各组细胞增殖的抑制情况,Annexin V FITC/PI 凋亡试剂盒检测各组细胞早晚期细胞凋亡情况,Western blot 法检测各组细胞凋亡蛋白表达情况。**结果** MLT + CDDP 组细胞的生存率明显低于 AGS 对照组和 AGS 单药组;流式细胞术检测细胞凋亡情况表明,正常对照组、单药组和联合组细胞的早期凋亡率依次增加;蛋白水平研究表明,相比单药组和正常组,联合组的 Bcl-2、原形态 caspase-3 表达显著降低,Bax 及活化态 cleaved-caspase-3 表达明显增高。**结论** 与单用顺铂相比,褪黑素联合顺铂能明显抑制胃癌 AGS 细胞增殖并加强促凋亡能力,这可能与联合药影响相关凋亡蛋白表达有关。

关键词 褪黑素 顺铂 胃肿瘤 凋亡 增殖

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.010

Effect of Melatonin Combined with Cisplatin on Proliferation and Expression of Apoptotic Proteins in Human Gastric Cancer Cells. Fan Mengdi, Li Weimin, Chen Yina, *et al.* Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect of melatonin combined with cisplatin on treatment and expression of apoptotic proteins in human gastric cancer AGS cells. **Methods** Human gastric cancer AGS cell strains culture in vitro were divided into four groups,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200630);浙江省自然科学基金资助项目(LQ12H07001)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院内分泌科(范梦迪、郑超);温州医科大学附属第一医院消化内科(李为民、陈依娜、宋彩云、颜页、吴建胜)

通讯作者:郑超,副教授,硕士生导师,电子信箱:lwm900517@163.com

namely AGS control group, AGS MLT group (3mmol/L), AGS CDDP group (4 μ g/ml) and AGS MLT + CDDP group (2mmol/L MLT and 4 μ g/ml CDDP). CCK-8 assay was used to test cell proliferation of each group. Annexin V FITC/PI Apoptosis assay was used to test early or late apoptotic cells. Western blot was used to test the protein level of apoptotic proteins. **Results** The cell viability of AGS cells in MLT + CDDP group was the lowest in the whole groups. Results of Flow cytometry showed that the proportion of early apoptosis was increased in turn in normal control group, single drug groups and combination group. Compared with control group and single drug groups, the expression percentage of Bcl-2 and procaspase-3 decreased significantly in the combination group. On the contrary, the expression percentage of Bax and cleaved-caspase-3 increased significantly. **Conclusion** Compared with the effect of single cisplatin, the combination of melatonin and cisplatin is proved to be much more effective in the inhibition of proliferation and the induction of the apoptosis of human gastric cancer AGS cell strains, and the results perhaps were correlated with that combination drug could effect on the expression of apoptotic proteins.

Key words Melatonin; Cisplatin; Stomach neoplasms; Apoptosis; Cell proliferation

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,以老年患者居多。在中国,胃癌的发生率和病死率均居恶性肿瘤前列。目前,手术治疗是有效治疗胃癌的手段之一,但由于多数患者确诊胃癌多为中晚期,单纯手术治疗效果不佳,故常以手术结合化疗的综合治疗作为胃癌中晚期的主要治疗手段^[1]。顺铂(cisplatin, CDDP)及其其他铂类药物是胃癌化疗常用药物,其在胃癌化疗的不同时段都能发挥作用,包括辅助化疗的 ECF 方案,姑息化疗的 DCF 方案和分子靶向治疗的 PF + 曲妥珠单抗方案,在 NCCN 指南中都被作为 I 类证据推荐使用^[2-4]。

由于化疗药物不良反应明显及多药耐药的存在使得胃癌化疗预后不佳。因此,迫切需要寻找一种高效、低毒的药物,与顺铂联合治疗胃癌患者。褪黑素(melatonin, MLT)是存在于动物松果体内的一种吲哚类激素,也被认为是一种脑肠肽,除了松果体合成和分泌 MLT 的组织还有视网膜、泪腺、唾液腺、红细胞、肠道、胰腺等。近年来,已在有多方面研究关于这种低毒性的内分泌激素,并表面该化合物在体内外均可以抑制多种肿瘤细胞增长^[5-7]。本实验以探寻一种新的化疗联合方案为出发点,在人胃癌细胞株上进行检测褪黑素、顺铂及两者联合治疗的疗效,观察各药的促肿瘤细胞凋亡情况,并研究相关凋亡蛋白变化,包括半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、B 细胞淋巴瘤/白血病蛋白-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)。

材料与方法

1. 主要试剂:人胃癌 AGS 细胞株购自上海中科院细胞库和 GES-1 细胞株购自美国 ATCC 公司;1640 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶/EDTA、褪黑素均购自美国 Sigma 公司;顺铂购自齐鲁制药有限公司;细胞计数 CCK-8 细胞增殖分析试剂盒购自日本

株式会社同仁化学研究所;Annexin V FITC/PI 凋亡试剂盒购自浙江杭州联科公司;Bcl-2、caspase-3 蛋白抗体购自 Cell Signaling Technology (CST) 公司;Bax 抗体购自美国 Abcam 公司。

2. 细胞培养:使用含 10% 胎牛血清 1640 培养基培养细胞,置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。根据细胞的生长情况、培养基消耗情况进行换液,平均 1~2 天/次。若细胞生长到 80%~90% 时需进行传代培养,根据细胞的数量以及生长情况进行 1:(3~5) 传代培养。判断细胞活力使用台盼蓝染色法检测,确保细胞活力在 98% 以上。MLT 用二甲基亚砜(DMSO)溶解,CDDP 用生理盐水溶解。药物干预细胞时,先将细胞废液去除,PBS 洗两遍,然后将融有 MLT 或 CDDP 的含血清 1640 培养基加入细胞中,培养 24h。

3. 实验分组:主要分为 4 组:①正常对照组(normal control group, N):对 AGS 细胞只使用含血清 1640 培养基培养;②MLT (2mmol/L) 组:在常氧条件下培养 24h,培养基中加入 MLT,终浓度为 2mmol/L;③CDDP (4 μ g/ml) 组:在常氧条件下培养 24h,培养基中加入 4 μ g/ml CDDP;④联合 (2mmol/L MLT + 4 μ g/ml CDDP) 组:在常氧条件下培养 24h,培养基中同时加入 2mmol/L MLT 和 4 μ g/ml CDDP。

4. CCK-8 细胞增殖抑制检测:选取对数生长期 AGS,使用 0.25% 胰酶/EDTA 消化细胞,收集细胞并吹打成单细胞悬液,细胞计数后,按 10000 个/孔接种于 96 孔板,每孔 200 μ l 的细胞培养液,37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养 24h。细胞贴壁后换用无血清培养基进行饥饿 6h,再更换含血清培养基,并分别加入不同浓度 CDDP (2、4、6 μ g/ml)、MLT (2、3mmol/L) 和联合用药 (4 μ g/ml CDDP + 2mmol/L MLT、4 μ g/ml CDDP + 3mmol/L MLT),同时设置正常对照组和不含细

胞的孔为空白对照,每组设置 5 个复孔。在培养箱内培养 24h 后,吸尽 200 μ l 的培养液,而后每孔加入含 10 μ l CCK-8 溶液的培养液 100 μ l;37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内继续孵育;每隔 1h 用酶标仪测定 450nm 处吸光度值,用所测得的 A450 计算细胞增殖抑制率。按下列公式计算肿瘤细胞增殖抑制率。肿瘤细胞增殖抑制率 = (各加药孔吸光度均值 - 空白孔吸光度均值) / (对照组吸光度均值 - 空白孔吸光度均值) $\times$ 100%。同时,为研究褪黑素是否对人胃黏膜细胞 GES-1 存在毒性作用,分别使用 1、2、3mmol/L MLT 作用 GES-1 细胞,同上处理,检测细胞增殖抑制率。

5. Annexin V FITC/PI 凋亡试剂盒检测:使用 Annexin V FITC/PI 凋亡试剂盒检测早期细胞凋亡和坏死的程度,分析各组之间凋亡细胞差异。选取对数生长期 AGS 细胞,使用 0.25% 胰酶/EDTA 消化细胞,收集细胞并吹打成单细胞悬液,细胞计数后,按 400000 个/孔接种于 6 孔板,每孔 2ml 的细胞培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱培养 24h。细胞贴壁后换用无血清培养基进行饥饿 6h,再更换含血清培养基,并分别加入 2mmol/L MLT、4 μ g/ml CDDP 和 2mmol/L MLT + 4 μ g/ml CDDP 并分别设置正常对照组,在培养箱内培养。24h 后,吸尽培养液,用胰酶消化,1000r/min 离心 5min,弃上清,再用 PBS 洗两遍。用 500 μ l 的 1 $\times$ Binding 缓冲液重悬细胞,每组含 2 $\times$ 10⁵ ~ 1 $\times$ 10⁶ 个细胞,然后每组加入 5 μ l Annexin V FITC 和 10 μ l PI,在暗室下培养 5min。最后采用激发波长 488nm,分别以红色和绿色荧光通道检测细胞凋亡,并用 FlowJo 软件分析。结果被 Annexin V FITC 和 PI 划分为 4 个象限,分别是活细胞 (Annexin V FITC 阴性/PI 阴性),早期凋亡细胞 (Annexin V FITC 阳性/PI 阴性) 和晚期凋亡/部分坏死细胞 (Annexin V FITC 阳性/PI 阳性)。

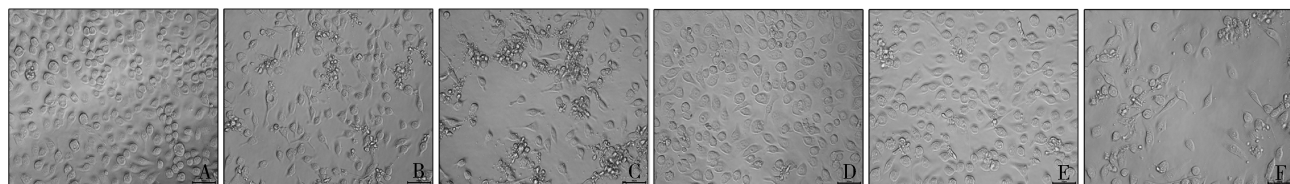


图 1 不同组细胞培养 24h 后形态观察

A. AGS 在 2 μ g/ml CDDP 中培养;B. AGS 在 4 μ g/ml CDDP 中培养;C. AGS 在 6 μ g/ml CDDP 中培养;D. AGS 在正常培养基中培养;
E. AGS 在 2mmol/L MLT 中培养;F. AGS 在 2mmol/L MLT + 4 μ g/ml CDDP 中培养

2. 各组细胞增殖抑制率比较:通过 CCK-8 检测显示 CDDP 从 2 μ g/ml 开始对 AGS 细胞的增殖有抑制作用,4 μ g/ml 浓度作用逐渐加强,6 μ g/ml 浓度对

6. 各凋亡蛋白表达:Western blot 法检测 Bcl-2、bax、caspase-3、cleaved-caspase-3 的蛋白表达。各组细胞通过药物干预后在培养箱培养 24h,PBS 清洗两遍后收集细胞。加入细胞裂解液,冰浴 30min,高速离心,吸取上层澄清液提取细胞总蛋白。采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定所收集样品中的蛋白浓度。定量后取等量蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),恒压电泳 100min。将检测蛋白转膜至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,将转膜槽置于冰浴中,恒流电泳 60min。转膜后用 5% 脱脂牛奶在室温下将膜封闭 90min,用 TBS 缓冲液洗膜 3 次,每次 5min。再将膜与一抗置于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。取出并洗膜 3 次,每次 10min,再用 5% 脱脂牛奶稀释二抗,将膜与相应的二抗置于室温下,孵育 60min 后,取出并洗膜 3 次,每次 10min。取等量的 ECL 发光剂 A、B,将其混匀后滴在膜上,弃去残余发光剂,将膜置于 X 线片夹中,先将 X 线进行显影后再进行定影,将胶片进行扫描。Bcl-2、bax、caspase-3、cleaved-caspase-3 蛋白水平以各目的蛋白条带吸光度值/内参照 β -actin 吸光度值表示。

7. 统计学方法:应用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 ANOVA 分析和 Dunnet 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞形态的变化:倒置显微镜下,观察各组细胞状态,细胞形态发生明显变化。AGS 细胞在单纯胎牛血清培养基中形态呈梭型,核圆,大小均一,分布密集。而无论是单用 CDDP 或 MLT 治疗还是联合用药细胞形态趋向变圆,分布扩散,细胞间隙较大,细胞碎片多 (图 1)。

细胞增殖抑制效果最明显,其细胞生存率分别是 67% (2 μ g/ml)、59% (4 μ g/ml)、44% (6 μ g/ml),各组与对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图

2A)。4 μ g/ml CDDP 可近似为 IC₅₀ 浓度,由此选择此浓度作为实验组。由图 2B 可发现,2mmol/L 和 3mmol/L MLT 均可抑制细胞增殖,而 MLT 联合 CD- DP 组干预细胞有明显的抑制作用(4 μ g/ml CDDP + 2mmol/L MLT 组生存率为 47%;4 μ g/ml CDDP + 3mmol/L MLT 组生存率为 22%),与正常对照组和单用 CDDP 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

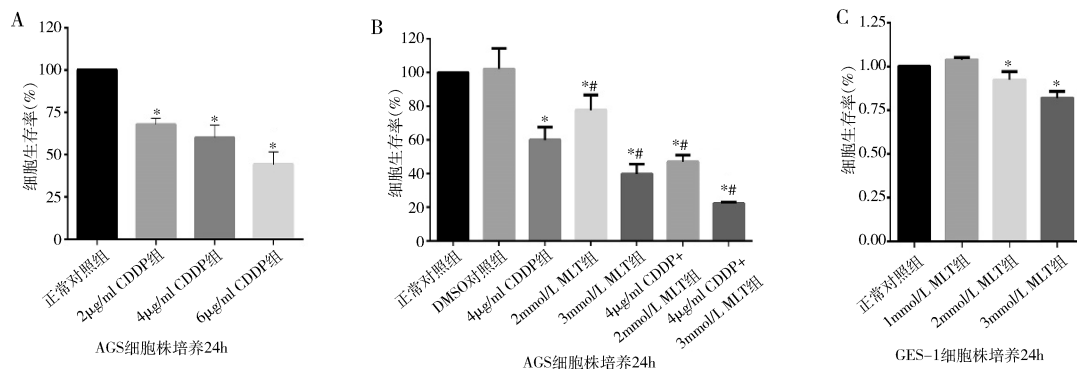


图2 AGS和GES-1细胞株在不同干预下24h后细胞增殖情况

与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与4 μ g/ml CDDP组比较,# $P < 0.05$

3. 各组细胞早晚期凋亡情况:药物作用于胃癌 AGS 细胞 24h 后,与对照组相比,CDDP(4 μ g/ml)组和 MLT(2mmol/L)组细胞凋亡率均高于正常对照组,分别为 47.9% (35.3% + 12.6%) 和 16.42% (9.70% + 6.72%)。而联合组在早期凋亡率(40.1%)和中晚期凋亡率(21.7%)均高于其他组。进一步证明联合用药能够有效促使胃癌细胞 AGS 凋亡增多(图 3)。

4. 各组细胞凋亡蛋白比较:药物处理 24h 后,与对照组相比,CDDP 组和 MLT 组的促凋亡相关蛋白(Bax)表达增加、抗凋亡蛋白(Bcl-2)表达减少,联合组凋亡表达最明显(图 4A)。通过计算 Bcl/Bax 构成比是判断细胞凋亡的有用指标,图 4B 表明 CDDP 联合 MLT 促凋亡作用高于单药组,且显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,采用 Western blot 法检测 AGS 细胞内 caspase-3 蛋白的表达。联合用药治疗细胞后原形态 caspase-3 下降明显,而具有凋亡活性的活化态 cleaved-caspase-3 表达升高。

讨 论

褪黑激素是一种松果体分泌的激素,早在 20 世纪中期就发现褪黑素。有研究报道,褪黑素也在视网膜、肾脏、呼吸道和消化系统内产生,尤其是在胃肠道黏膜细胞^[8,9]。褪黑激素的分泌存在生物节律性,受内源性昼夜节律钟的视交叉上核控制,除环境光制约

同时,加入 DMSO 组(与 MLT 溶剂相同量)来判断 DMSO 是否干扰 MLT 作用细胞,结果表明差异无统计学意义。由图 2C 可知,1mmol/L MLT 对正常胃黏膜细胞 GES-1 无影响,而 2mmol/L MLT 对 GES-1 细胞存在低毒性作用。从 CCK-8 结果证实联合用药组降低肿瘤细胞增殖率显著高于单用药组。

外,其他因素如老化和癌症药物也参与褪黑素的分泌调控。褪黑素在抗炎、抗氧化、免疫调节及促睡眠等方面都有很好的药理作用,近年来其抗肿瘤作用受到了人们的重视。研究表明,褪黑激素的抗肿瘤能力主要由几种机制组成,包括抗氧化应激激活、抑制迁移、诱导细胞凋亡及细胞增殖抑制^[10-13]。虽然不同的研究展示褪黑素对各类肿瘤的不同疗效及抗癌机制。然而,褪黑激素能够有效的抑制胃癌细胞增殖并促使细胞凋亡^[14]。同时本研究通过 CCK-8 检测褪黑素对正常胃黏膜细胞的作用,发现褪黑素在人胃黏膜 GES-1 细胞株中存在低毒性的表现,从而确定褪黑素的有效使用剂量(图 2C)。

顺铂是一种通过与肿瘤细胞 DNA 供价结合达到终止 DNA 复制的肿瘤化疗药,对胃癌、肠癌、食管癌等消化系统肿瘤均有效^[15-17]。本研究通过细胞增殖研究中证实顺铂能够有效的抑制人胃癌细胞 AGS 的生长,并促进细胞凋亡。同样,临床应用顺铂治疗肿瘤也在很大程度上改善患者病情,但肿瘤患者的生活质量并没有明显改善,尤其是晚期患者。并且顺铂本身存在细胞毒性,对正常的胃肠道和神经具有细胞毒性作用,随着剂量增加而增强趋势。因此,通过联合用药减少顺铂剂量,降低药物毒性,减少耐药性发生可能,并增强抗癌疗效已成为一种发展趋势。

本研究发现,同时使用褪黑素及顺铂联合治疗可

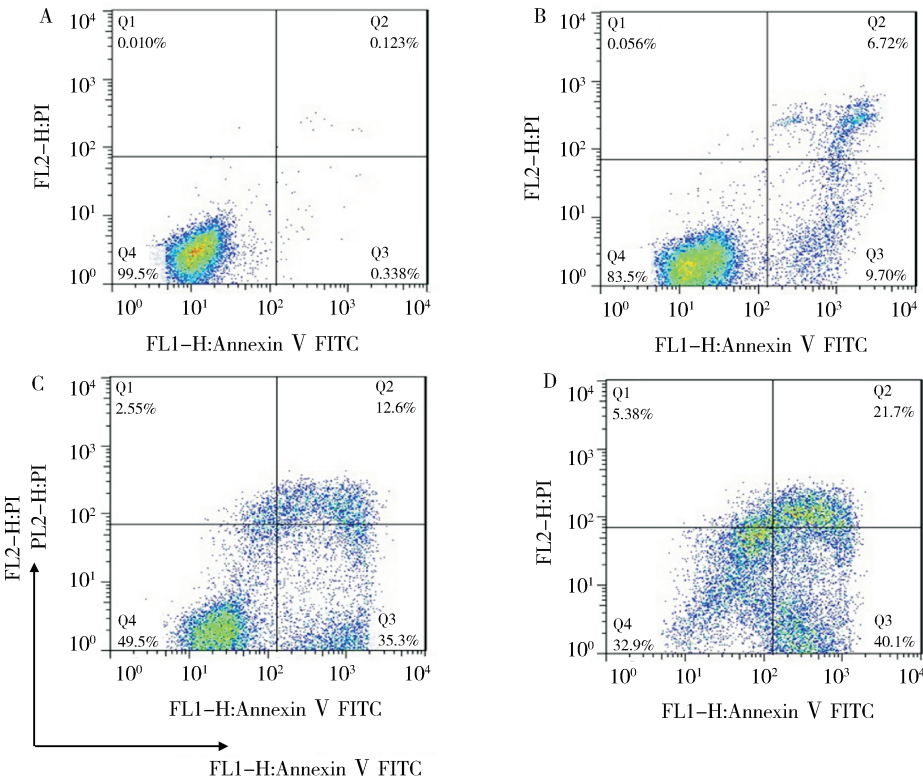


图 3 不同组 AGS 细胞早晚期细胞凋亡情况

A. 正常对照组; B. 单用 MLT 组; C. 单用 CDDP 组; D. MLT + CDDP 组

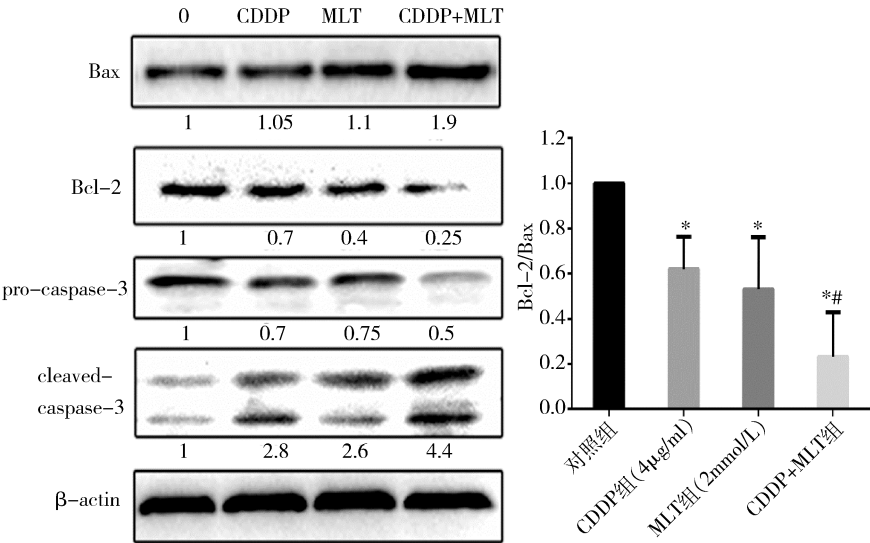


图 4 不同组 AGS 细胞 Bcl - 2、Bax、caspase - 3 等蛋白的表达

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 4 μ g/ml CDDP 组比较, # $P < 0.05$

以使人胃癌细胞 AGS 细胞增殖受抑制,并促使大量细胞凋亡,这可能是联合治疗通过降低 Bcl - 2,升高 Bax,促使凋亡蛋白 caspase - 3 产生增多,进一步发展细胞凋亡过程。联合用药是肿瘤化疗的一项基本原则,其优点在于能够减少大剂量的化疗药,而只需小

剂量就能达到高效应,并使药物不良反应大大减少。本研究通过联合褪黑素和顺铂治疗胃癌细胞,发现褪黑素能够减少顺铂的药物使用剂量,提高顺铂的抗肿瘤疗效。同时,褪黑素本身是一个体内分泌的内源性激素,对机体的毒性作用相当低,适合加入联合化疗

方案。

本研究的不足在于仅在体外细胞株上了解褪黑素联合顺铂的化疗方案的疗效,并未用于临床研究。顾良红等已发现褪黑素能够引起胃癌小鼠血清 caspase - 3 表达升高。基于褪黑素本在临床上已普遍用于促睡眠治疗上,今后笔者将设计褪黑素联合顺铂治疗胃癌患者的临床实验,这将为褪黑素在胃癌治疗中提供可靠的实验依据。

参考文献

- 1 Sasako M. Principles of surgical treatment for curable gastric cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(23 Suppl): 274s - 275s
- 2 Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer [J]. New Eng Med, 2006, 355(1): 11 - 20
- 3 Bang Y - J, Van Cutsem E, Feyereislova A, *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2 - positive advanced gastric or gastro - oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open - label, randomised controlled trial[J]. The Lancet, 2010, 376(9742): 687 - 697
- 4 Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, *et al.* Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first - line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(31): 4991 - 4997
- 5 Leja - Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, *et al.* Melatonin induces pro - apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC - 1) [J]. J Pineal Res, 2010, 49(3): 248 - 255
- 6 Lv D, Cui PL, Yao SW, *et al.* Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells[J]. Chinese J Cancer Res, 2012, 24(4): 310 - 316
- 7 Zhang S, Qi Y, Zhang H, *et al.* Melatonin inhibits cell growth and

migration, but promotes apoptosis in gastric cancer cell line, SGC7901 [J]. Biotechnic & Histochemistry, 2013, 88(6): 281 - 289

- 8 Bubenik GA. Review: gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance [J]. Diges Dis Sci, 2002, 47(10): 2336 - 2348
- 9 Bubenik G. Thirty four years since the discovery[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(2): 33 - 51
- 10 Xu L, Liu H, Zhang H, *et al.* Growth - inhibitory activity of melatonin on murine foregastric carcinoma cells in vitro and the underlying molecular mechanism [J]. Anato Rec, 2013, 296(6): 914 - 920
- 11 Xu L, Jin Q, Gong X, *et al.* Anti - gastric cancer effect of melatonin and Bcl - 2, Bax, p21 and p53 expression changes [J]. Shengli Xue bao: Acta Physiolo Sin, 2014, 66(6): 723 - 729
- 12 Ordoñez R, Carbajo - Pescador S, Prieto - Dominguez N, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase - 9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells [J]. J Pineal Res, 2014, 56(1): 20 - 30
- 13 徐丽, 金清东, 宫喜, 等. 褪黑素的抗胃癌效应及其引起的 Bcl - 2, Bax, p21 和 p53 的表达变化 [J]. 生理学报, 2014, 6: 012
- 14 Xin Z, Jiang S, Jiang P, *et al.* Melatonin as a treatment for gastrointestinal cancer: a review [J]. J Pineal Res, 2015, 58(4): 375 - 387
- 15 Cervantes A, Roda D, Tarazona N, *et al.* Current questions for the treatment of advanced gastric cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(1): 60 - 67
- 16 Lenz HJ. Pharmacogenomics and colorectal cancer. New trends in cancer for the 21st century [M]. New York: Springer, 2006: 211 - 231
- 17 Herskovic A, Russell W, Liptay M, *et al.* Esophageal carcinoma advances in treatment results for locally advanced disease: review [J]. Ann Oncol, 2012, 23(5): 1095 - 1103

(收稿日期: 2015 - 07 - 03)

(修回日期: 2015 - 07 - 15)

(上接第 5 页)

- 17 Mueller KL, Madden JM, Zoratti GL, *et al.* Fibroblast - secreted hepatocyte growth factor mediates epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance in triple - negative breast cancers through paracrine activation of Met [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14: R104
- 18 Oettle H, Hilbig A, Seufferlein T, *et al.* Trastuzumab (AP 12009) in the treatment of patients with advanced tumors: Completion of dose - escalation and first efficacy data [J]. J Clin Oncol, 2010, 28: 2611
- 19 Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, *et al.* Tumor - infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without Carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2 - positive and triple - negative primary breast cancers [J]. J Clin Oncol, 2015, 33: 983 - 991
- 20 Mittendorf EA, Philips AV, Meric - Bernstam F, *et al.* PD - L1 expression in triple - negative breast cancer [J]. Cancer Immunol Res,

2014, 2: 361 - 370

- 21 McNamara KM, Yoda T, Takagi K, *et al.* Androgen receptor in triple negative breast cancer [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 133: 66 - 76
- 22 Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, *et al.* Multiple molecular subtypes of triple - negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(3): 769 - 778
- 23 Tate CR, Rhodes LV, Segar HC, *et al.* Targeting triple - negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14: 79
- 24 Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours [J]. Nature, 2012, 490: 61 - 70

(收稿日期: 2016 - 01 - 20)

(修回日期: 2016 - 02 - 22)