

# 褪黑素联合顺铂对 A549 细胞凋亡 相关基因的影响

孙晓东<sup>1</sup>, 王 珺<sup>1</sup>, 桑 明<sup>1,2</sup>, 王 燕<sup>1</sup>, 罗 超<sup>1</sup>, 余明华<sup>3\*</sup>

(1. 湖北医药学院 基础医学研究所, 中国湖北 十堰 442000; 2. 武汉大学 动物实验中心/动物生物安全三级实验室, 中国湖北 武汉 430071; 3. 复旦大学附属浦东医院 肿瘤科, 中国上海 201399)

**摘 要:** 观察褪黑素以及褪黑素联合顺铂是否可以抑制 A549 细胞增殖并促进细胞凋亡, 探讨 *ERK1/2MAPK* 信号通路在这一过程中的作用, 为肺腺癌的研究提供实验依据。用不同浓度的褪黑素、不同浓度的顺铂、褪黑素联合顺铂刺激体外培养的肺腺癌细胞系 A549 细胞, MTT 法检测各组细胞的活性, 运用 Real-time RT-PCR 检测凋亡相关基因 *Bcl-2*、*Bax*、*p53* 的表达水平, Western-blot 检测 *ERK1/2MAPK* 的活性变化。结果: 1) 单纯使用褪黑素和顺铂均可抑制 A549 细胞增殖, 褪黑素联合顺铂时, 抑制作用更加显著, 一定浓度的褪黑素可降低顺铂的使用浓度; 2) 未经处理的 A549 细胞 *Bcl-2/Bax* 很高, *p53* 基因表达较低, 经褪黑素以及褪黑素联合顺铂刺激后 A549 细胞中 *Bcl-2/Bax* 明显下降, *p53* 基因表达明显升高, 并有浓度依赖; 3) 经褪黑素和顺铂刺激后 A549 细胞中磷酸化 *ERK1/2MAPK* 水平明显降低。褪黑素联合顺铂可抑制 A549 细胞增殖并且诱导凋亡相关基因表达, 褪黑素和顺铂对 A549 细胞的抑制作用可能与 *ERK1/2MAPK* 信号通路有关。

**关键词:** 褪黑素; 顺铂; 褪黑素联合顺铂; A549 细胞; 凋亡

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2014)01-0050-05

## Effects of Melatonin Combined with Cisplatin on Apoptosis Related Gene of Human Lung Cancer Cell Line A549

SUN Xiao-dong<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, SANG Ming<sup>1,2</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, LUO Chao<sup>1</sup>,  
YU Ming-hua<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Basic Medicine Department of Anatomy, Hubei Medicine University, Shiyan 442000, Hubei, China; 2. Center for Animal Experiment /ABSL-3 Lab, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China; 3. Department of Medical Oncology, Shanghai Pudong Hospital, Fudan University, Shanghai 201399, China)

**Abstract:** To observe the effects of melatonin and melatonin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human lung cancer cell line A549 and the dependent signaling pathway. Lung cancer cell A549 were con-cultured with different concentrations of melatonin, different concentrations of cisplatin, different concentrations of melatonin combined cisplatin for 24 h respectively. The activity of each group cells was detected by MTT assay; Real-time RT-PCR was used to analyze the expression of *Bcl-2*, *Bax* and *p53*; Western-blot was detected the changes of signal path *ERK1/2MAPK*. Results: 1) Melatonin and cisplatin significantly enhanced inhibition of cell proliferation of A549 cells, melatonin promoted the effects of cisplatin alone in A549 cells, reduced the using concentration of cisplatin; 2) The expression of *Bcl-2/Bax* was high but *p53* gene was low in untreated A549 cells, the expression of *Bcl-2/Bax* decreased by stimulating with melatonin and cisplatin in A549 cells, expression of *p53* gene after stimulation of the melatonin plus

收稿日期: 2013-09-28; 修回日期: 2013-11-12

基金项目: 上海市浦东新区卫生系统学科带头人培养计划资助项目(PWRd2012-15); 湖北省十堰市科技项目(十科发 2010-047S; 十科通 [2006]18K33; 十科发[2009]29S43)

作者简介: 孙晓东(1979-), 女, 甘肃靖远人, 湖北医药学院基础医学研究所实验师, 硕士研究生, 主要从事细胞分子生物学研究, E-mail: smxd2000@126.com; \* 通讯作者: 余明华(1975-), 男, 湖北十堰人, 复旦大学副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事肿瘤临床学, Tel: 021-68036012, E-mail: ymh3011@yahoo.com.cn.

cisplatin rised significantly and concentration-dependent; 3) Phosphorylation levels of *ERK1/2MAPK* were significantly lower after stimulation of melatonin and cisplatin in A549 cells. Melatonin potentiates the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of cisplatin in A549 cells by modulating *ERK1/2MAPK* signaling pathways.

**Key words:** melatonin; cisplatin; melatonin combined with cisplatin; A549 cell; apoptosis

(*Life Science Research*, 2014, 18(1): 050~054)

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤, 目前是世界癌症死因的首位。顺铂(DDP)是临床使用非常普遍的化疗药物, 具有抗癌谱广、作用强、与多种抗肿瘤药有协同作用、且无交叉耐药等特点, 是当前联合化疗中最常用的药物之一。但顺铂在骨髓抑制、胃肠反应、肾脏毒性等方面的毒副作用非常明显, 而且患者对不同用药剂量的有效反应差异较大。褪黑素(melatonin, MLT)主要是松果体分泌的一种吲哚胺类激素, 具有增强人体免疫系统的功能, 能有效清除自由基、抗衰老。研究发现, 褪黑素在肿瘤的预防和治疗方面有一定的效果<sup>[1]</sup>, 包括对乳腺癌、黑色素瘤、结肠癌、肺癌等肿瘤的细胞生长有抑制作用<sup>[2-7]</sup>。本课题以人肺腺癌 A549 细胞为例, 探讨褪黑素和顺铂单独使用以及褪黑素联合顺铂对 A549 细胞增殖和凋亡相关基因的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

DMEM、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Trizol、SYBR-Green 荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司; 噻唑蓝(MTT)和褪黑素均购自美国 Sigma 公司; 顺铂由湖北省十堰市太和医院药剂室提供; 兔抗 p-ERK 和 ERK 的多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 鼠抗 GAPDH 购自碧云天生物技术有限公司; 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔和马抗小鼠的二抗购自北京鼎国生物技术有限公司。

二氧化碳培养箱为美国 Thermo 公司产品; 倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司产品; 680 型酶标分析仪和垂直凝胶电泳槽为美国 Bio-Rad 公司产品; 高速冷冻离心机为德国 Heraeus Beckman 公司产品; Stepone plus Real-Time PCR System 为美国 ABI 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MTT 法检测细胞增殖

收集对数增长期的 A549 细胞, 接种于 96 孔板, 每孔  $3 \times 10^3$  个细胞, 待细胞贴壁后吸去培养基,

对照孔换上新鲜培养基, 其他孔按照 0.001、0.01、0.1、1、2 mmol/L 浓度梯度的褪黑素 (Melatonin 和 MTT 购自美国 Sigma 公司), 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 浓度梯度的顺铂 (DDP), 0.1 mmol/L 的 MLT 联合 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 浓度梯度的 DDP, 依次加入含有 MLT 和 DDP 的培养基, 每个实验组设 6 个复孔, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。每孔加入 20 μL MTT (5 g/L), 37 °C 继续培养 4~6 h, 取出 96 孔板, 小心地吸掉上清, 每孔加入 100 μL DMSO, 以溶解结晶, 溶解 10~20 min, 于 570 nm 测吸光度。

#### 1.2.2 逆转录和实时定量 PCR (Real-time PCR)

将 A549 以每孔  $3 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔培养板中, 培养 24 h; 无血清 DMEM 饥饿同步化 24 h 后分组进行实验。设空白对照组, DDP 对照组, 单纯 MLT 0.01、0.1、1 mmol/L 组, 以及以上各浓度联合 1.5 mg/L DDP 组。用适当体积的 Trizol (Invitrogen 公司) 裂解各组 A549 细胞, 提取总 RNA 并用逆转录试剂盒(Promega 公司)逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 检测, 以 GAPDH 为内参来调整模板的浓度。实验所用引物由上海生工合成, 见表 1。每个样品设 3 个复孔, 反应总体积 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环。然后进行数据分析, 各目的基因表达水平的变异用变化倍率( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) 来表示。

表 1 PCR 特异性引物序列

Table 1 Specific PCR primers

Gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
<i>Bcl-2</i>	catgctggggcctgacag	gaaccggacctgcacac
<i>Bax</i>	ttgccgcctggacacagac	ccgctccggagggaagtcca
<i>p53</i>	atgaaccgcgacctatc	tggcgaatccttaactctaa
<i>β-actin</i>	gcacagcttctcttaatgtcacgc	tggcaccacaccttctacaatgagc

#### 1.2.3 蛋白免疫印记检测

取对数增长期的 A549 细胞, 接种于 6 孔培养板, 无血清培养基同步化 24 h 后, 设对照孔、MLT 0.01 mmol/L 孔、MLT 1 mmol/L 孔、DDP 2 mg/L 孔、DDP 1 mg/L+MLT 0.1 mmol/L 孔, 24 h 后收集各组的 A549 细胞, 用冰 PBS 洗 3 次, 加入含有蛋

白酶抑制剂的细胞裂解液冰上处理 20 min, 离心后吸取上清。用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 蛋白上样量 30  $\mu\text{g}$ 。转膜后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h, 分别加兔抗 *p-ERK1/2MAPK* 和 *ERK1/2MAPK* 的多克隆抗体 1:1 000 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 鼠抗 GAPDH 的多克隆抗体 1:500 (碧云天生物技术有限公司), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; TBST 洗膜后加碱性磷酸酶标记的山羊抗兔和马抗小鼠的二抗 1:1 000 (北京鼎国生物技术有限公司), 室温摇床上孵育 2 h, 洗膜后用 5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐/四唑氮蓝(BCIP/NBT)显色液膜上显色, 扫描后进行图像灰度分析。

#### 1.2.4 统计学方法

各组间数据以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组数据间的差异用 student's *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性,  $P < 0.01$  为差异有高度显著性。

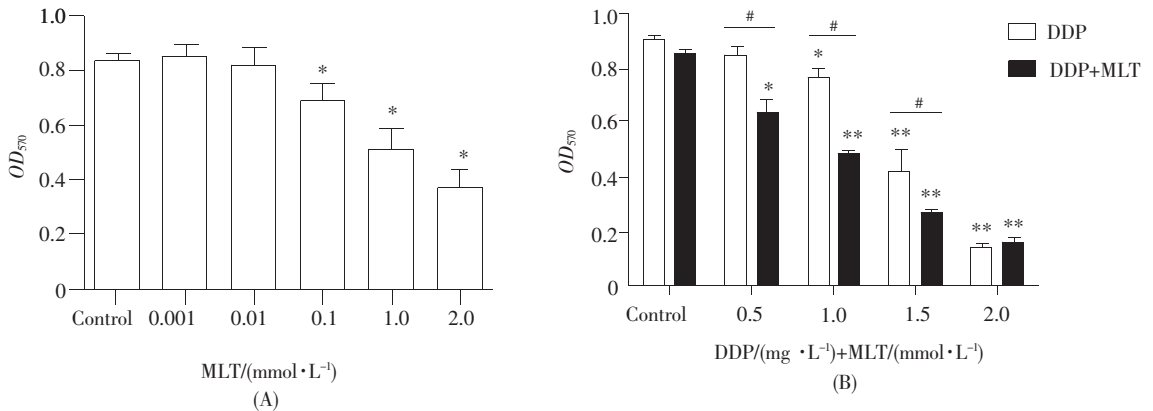


图 1 MLT、DDP 以及 MLT 联合 DDP 对 A549 细胞增殖的影响

(A) MLT 对 A549 细胞增殖的影响 (\* $P < 0.05$  vs control group); (B) MLT 联合 DDP 对 A549 细胞增殖的影响 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs the control group; # $P < 0.01$ , DDP vs DDP+MLT)。

#### Fig.1 The impact of MLT, DDP, MLT combined with DDP on proliferation of A549 cells

(A) The impact of MLT on proliferation of A549 cells (\* $P < 0.05$  vs control group); (B) The impact of MLT combined with DDP on proliferation of A549 cells (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.01$ , DDP vs DDP+MLT)。

#### 2.2 褪黑素联合顺铂可诱导 A549 细胞 *Bcl-2/Bax* 降低及 *p53* 基因表达升高

Real-time PCR 检测结果显示, 与溶剂组相比, 低浓度(0.01 mmol/L)、中浓度(0.1 mmol/L)、高浓度(1 mmol/L)各组 A549s 中 *Bcl-2* 表达均有下降, 而 *Bax* 基因的表达各组间没有显著差异; 各浓度的 MLT 联合 DDP 的各组 A549 细胞中 *Bcl-2* 表达下降更加显著,  $P < 0.05$ , 以 MLT (0.1 mmol/L) + DDP (1.5 mg/L) 组最显著; MLT (1 mmol/L) + DDP (1.5 mg/L) 组与 MLT (0.1 mmol/L) + DDP (1.5 mg/L) 组相比略有上升, 但没有统计学意义。与单独使

## 2 结果

### 2.1 褪黑素、顺铂以及褪黑素联合顺铂抑制 A549 细胞的活性

单纯褪黑素作用于 A549 细胞时, 生理剂量的 MLT 对细胞增殖没有影响, 当 MLT 的浓度达到 0.1 mmol/L 时 A549 细胞的增殖受到抑制, 并随浓度增大抑制作用增强。结果如图 1A 所示。DDP 对 A549 细胞的抑制作用随 DDP 浓度增大而逐渐增强, 最接近半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 1.5 mg/L; 以 MLT 的起效浓度 0.1 mmol/L 与不同浓度的 DDP 联合作用于 A549 细胞, 抑制效率明显提高, 最接近半数抑制的浓度(IC<sub>50</sub>)为 1.0 mg/L, 结果如图 1B 所示。结果显示, 以 0.1 mmol/L 的 MLT 联合不同浓度的 DDP 对 A549 细胞的抑制效果比单独使用 DDP 要明显, 各组之间均有显著性差异。

用 DDP(1.5 mg/L)的组比较, 各浓度的 MLT 联合 DDP 的各组 *Bcl-2* 表达均有下降, 但是没有显著性差异, 而 *Bax* 基因的表达均有显著性上升,  $P < 0.01$ , 以 MLT (0.1 mmol/L) + DDP (1.5 mg/L) 组最显著, 结果如图 2A 所示; *Bcl-2/Bax* 的变化如图 2B 所示, 与溶剂组相比, 低浓度(0.01 mmol/L)、中浓度(0.1 mmol/L)、高浓度(1 mmol/L) MLT 组 A549s 中 *Bcl-2/Bax* 均有下降,  $P < 0.05$ 。与 DDP (1.5 mg/L) 组相比, 各浓度 MLT 与 DDP 联合的各组 *Bcl-2/Bax* 差异特别显著,  $P < 0.01$ 。不同浓度的 MLT (0.01、0.1、1 mmol/L) 组与对照组相比 *p53* 基因的

表达显著上升,MLT (1 mmol/L)组最明显, $P<0.01$ ,结果如图 2C 所示;不同浓度的 MLT (0.01、0.1、1 mmol/L)与 DDP (1.5 mg/L)联合的各组与 DDP (1.5 mg/L)对

对照组相比  $p53$  基因的表达显著上升, $P<0.05$ ,MLT (1 mmol/L)+DDP (1.5 mg/L)组最显著,结果如图 2D 所示。

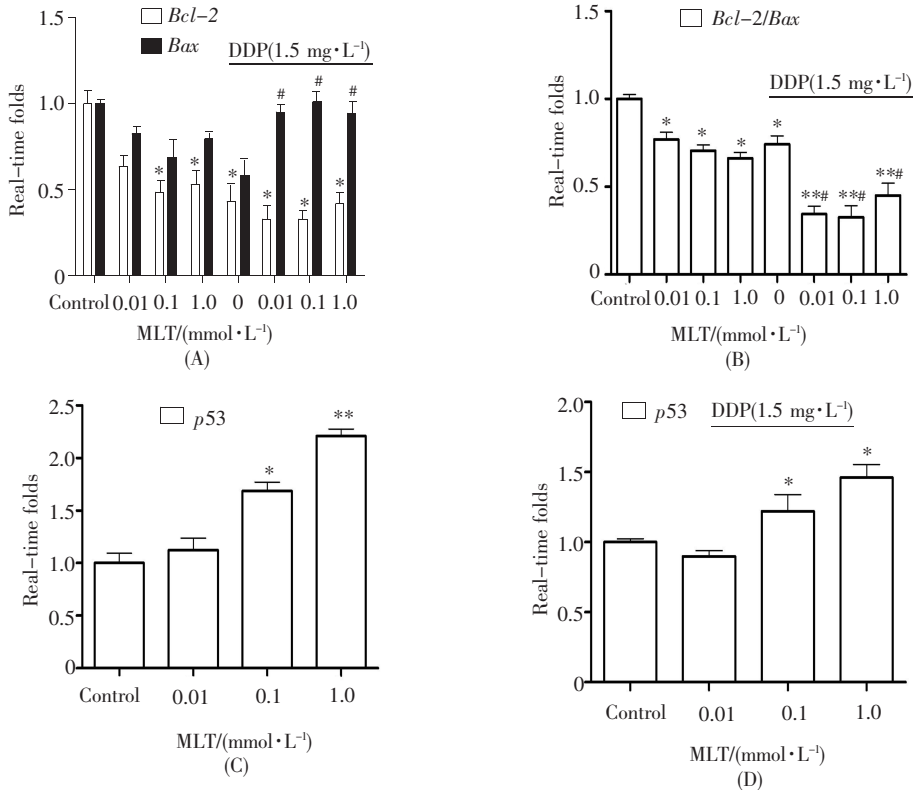


图 2 MLT 以及 MLT 联合 DDP 对 A549 细胞中  $Bcl-2$ 、 $Bax$ 、 $p53$  基因表达的影响

(A) MLT 以及 MLT 联合 DDP 对 A549 细胞中  $Bcl-2$ 、 $Bax$  基因表达的影响 (\* $P<0.05$  vs control group; # $P<0.01$  vs DDP 1.5 mg/L); (B) MLT 以及 MLT 联合 DDP 对 A549 细胞中  $Bcl-2/Bax$  的影响 (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group; # $P<0.01$  vs DDP 1.5 mg/L); (C) MLT 对 A549 细胞中  $p53$  基因表达的影响 (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group); (D) MLT 联合 DDP 对 A549 细胞中  $p53$  基因表达的影响 (\* $P<0.05$  vs control group)。

### Fig.2 Effects of MLT and MLT combined with DDP on expression of $Bcl-2$ , $Bax$ , $p53$ in A549 cells

(A) Effects of MLT and MLT combined with DDP on expression of  $Bcl-2$  and  $Bax$  in A549 cells (\* $P<0.05$  vs control group;  $P<0.01$  vs DDP 1.5 mg/L); (B) MLT and MLT combined with DDP influence  $Bcl-2/Bax$  (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group; # $P<0.01$  vs DDP 1.5 mg/L); (C) Effects of MLT on expression of  $p53$  in A549 cells (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group); (D) Effects of MLT combined with DDP on expression of  $p53$  in A549 cells (\* $P<0.05$  vs control group)。

### 2.3 褪黑素联合顺铂抑制 A549 细胞中 $p-ERK$ 的表达

Western blot 结果显示,MLT 作用 A549 细胞可以抑制  $p-ERK$  的表达,表达强度随 MLT 浓度增大而降低;以中等浓度 0.1 mmol/L 的 MLT 联合中等浓度 1 mg/L 的 DDP 作用 A549 细胞, $p-ERK$  的表达比单纯高浓度 1 mmol/L 的 MLT 组和高浓度 2 mg/L 的 DDP 组都显著降低,如图 3 所示。提示 MLT 和 DDP 对 A549 细胞的 ERK 信号通路起抑制作用,这种抑制作用在两种药物联合使用时更加显著。

## 3 讨论

实验发现,当 MLT 的浓度达到 0.1 mmol 时,

对 A549 细胞活性有明显抑制作用,在与顺铂联合使用时可以明显提高顺铂对 A549 细胞活性的抑制效果。那么这种抑制作用是否与细胞的凋亡相关基因有关?  $Bcl-2$  家族<sup>[8]</sup>是目前发现的与细胞凋亡关系密切的原癌基因之一,包括  $Bcl-2$ 、 $Bax$ 、 $Bad$ 、 $Bcl-x$  和  $Bak$  等,其中  $Bcl-2$  即细胞凋亡抑制基因,抑制细胞的凋亡,而  $Bax$  的主要作用是加速细胞凋亡。 $Bcl-2$  家族通常以二聚体形式来发挥作用, $Bax$  的过表达能对抗  $Bcl-2$  抑制细胞凋亡的活性,在促凋亡因素的刺激作用下, $Bcl-2/Bax$  的比值将决定细胞的存活。本实验发现,肺腺癌 A549 细胞在 MLT 作用 24 h 的过程中  $Bcl-2$  表达下调, $Bcl-2/Bax$  明显下调,差异显著( $P<0.05$ ),

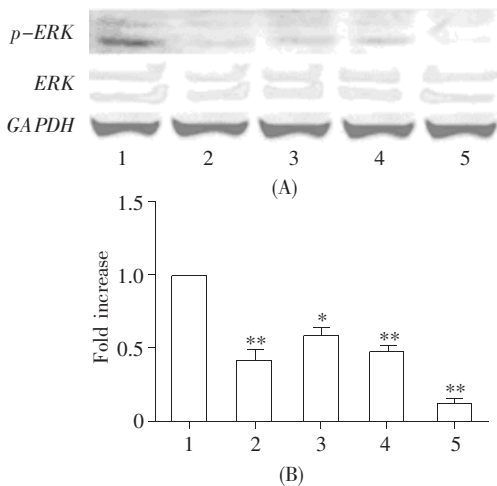


图3 MLT、DDP 以及 MLT 联合 DDP 对 A549 细胞中 *ERK1/2MAPK* 信号通路的影响

(A) Western blotting 检测结果;(B) 条带灰度值比较直方图(以 *GAPDH* 为内参照计算 *p-ERK/ERK*)

**Fig.3 MLT, DDP and MLT combined with DDP influence *ERK1/2MAPK* signal pathway in A549 cells**

(A)Results of western blotting;(B)Histogram of gray value(*p-ERK/ERK* normalized to *GAPDH*)

1:Control group;2:MLT 1 mmol/L treatment group;3:MLT 0.01 mmol/L treatment group;4:DDP 2 mg/L treatment group;5:DDP 1 mg/L combined with MLT 0.1 mmol/L treatment group. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  vs control group.

提示 MLT 通过下调 *Bcl-2/Bax* 的比例, 促进细胞凋亡。在与顺铂联合使用时可以明显提高下调 *Bcl-2/Bax* 的比例, 这说明褪黑素联合顺铂有增效的作用。*p53* 定位于人类 17p13.1 染色体上。*p53* 是细胞生长分化的关键抑癌基因<sup>[9]</sup>, 与一半以上人类癌症相关, 能调控 *p21*、*GADD45*、*MDM2* 等<sup>[10]</sup> 基因的表达, 在细胞增殖中起核心作用。罗志刚等<sup>[11]</sup> 报道了 *p53* 的表达在肺癌中有重要意义。本实验同时检测了 *p53* 基因, 发现单纯 MLT 能改变 *p53* 的表达, MLT 与 DDP 联合作用后, 与单纯 DDP 作用组相比, *p53* 的表达明显上调 ( $P < 0.05$ ), 这提示 MLT 可协同 DDP 促进肿瘤细胞凋亡。

在多种人类肿瘤组织及肿瘤细胞系中存在 *ERK1/2* 信号转导通路异常表达或异常活化, 此通路调控异常与肿瘤关系密切。目前研究显示<sup>[12,13]</sup>, *ERK* 在肝癌、乳腺癌、头颈部鳞癌、肺腺癌以及前列腺癌等多种肿瘤组织与细胞系中异常表达或活性增强。表明 *ERK* 调控异常与肿瘤发生发展密切相关。Shih 等<sup>[14]</sup> 通过阻断肺腺癌细胞 A549 中 *ERK1/2* 的活化, 可明显抑制 A549 细胞的侵袭和迁移。提示 *ERK1/2* 活化可能与肺癌的增殖、侵袭、转移等活动有关。本实验通过观察褪黑素以及

褪黑素联合顺铂对人肺腺癌 A549 细胞中 *ERK1/2* 磷酸化的抑制作用, 证实褪黑素确实可以通过抑制 *ERK1/2MAPK* 信号转导通路异常活化, 抑制下游增殖通路的激活, 从而发挥促肿瘤凋亡作用。这也为临床治疗肺癌的联合用药提供新的思路和实验依据。

**参考文献(References):**

- [1] SRINIVASAN V, SPENCE D W, PAND-PERUMAL S R, *et al.* Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms[J]. Integrative Cancer Therapies, 2008, 7(3):189-203.
- [2] UMIT U M, BERNA T, HANDAN K, *et al.* Role of melatonin and luzindole in rat mammary cancer[J]. Journal of Investigative Surgery, 2012, 25(6):345-353.
- [3] SRINIVASAN V, SPENCE D, PAND-PERUMAL S, *et al.* Melatonin, environmental light, and breast cancer[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2008, 108(3):339-350.
- [4] NAZIROGLU M, TOKAT S, DEMIRCI S. Role of melatonin on electromagnetic radiation-induced oxidative stress and  $Ca^{2+}$  signaling molecular pathways in breast cancer[J]. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2012, 32(6):290-297.
- [5] POZO M J, GOMEZ-PINILLA P J, CAMELLO-ALMARAZ C, *et al.* Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological conditions and aging[J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(34):4150-4165.
- [6] LISSONI P, VAGHI M, ARDIZZOIA A, *et al.* A phase II study of chemoneuroimmunotherapy with platinum, subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal neurohormone melatonin (PIM) as a second line therapy in metastatic melanoma patients progressing on dacarbazine plus interferon-alpha[J]. *In Vivo* (Athens, Greece), 2002, 16(2):93-96.
- [7] HU S, SHEN G, YIN S, *et al.* Melatonin and tryptophan circadian profiles in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Advances in Therapy, 2009, 26(9):886-892.
- [8] YIP K, REED J. *Bcl-2* family proteins and cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(50):6398-6406.
- [9] JACKSON J G, POST S M, LOZANO G. Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by *p53 in vivo*[J]. The Journal of Pathology, 2011, 223(2):127-136.
- [10] HE G, SIDDIK Z H, HUANG Z, *et al.* Induction of *p21* by *p53* following DNA damage inhibits both *Cdk4* and *Cdk2* activities[J]. Oncogene, 2005, 24(18):2929-2943.
- [11] 罗志刚, 王一, 宝建中. *p63* 和 *p53* 及 *PCNA* 在肺癌中的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床与康复(LUO Zhi-gang, WANG Yi, BAO Jian-zhong. Expression and significance of *p63*, *p53* and *PCNA* in lung cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology and Rehabilitation), 2008, 15(1):25-29, 32.
- [12] AFFOLTER A, FRUTH K, BROCHHAUSEN C, *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism[J]. Head & Neck, 2011, 33(10):1448-1457.
- [13] CHO H S, CHANG S H, CHUNG Y S, *et al.* Synergistic effect of *ERK* inhibition on tetrandrine-induced apoptosis in A549 human lung carcinoma cells[J]. Journal of Veterinary Science, 2009, 10(1):23-28.
- [14] SHIH Y W, WU P F, LEE Y C, *et al.* Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells: possible mediation by blocking the *ERK* signaling pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(9):3490-3499.