

Effect and Mechanism of Berberine on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hep-G2

Min Wang¹, Zhimin Zhang², Bicheng Zhang², Bo Yang², Lan Liu², Hongxing Fu², Zhiguo Rao²

¹2015 Graduate Class, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Hubei

²Department of Oncology, Wuhan General Hospital, Guangzhou Command of PLA, Wuhan Hubei

Email: 15072356537@163.com

Received: Mar. 6th, 2018; accepted: Mar. 18th, 2018; published: Mar. 26th, 2018

Abstract

Objective: To investigate the effect and mechanism of Berberine on inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis in Hepatocellular carcinoma Hep-G2 cell line. **Methods:** The inhibitory effect of Berberine on the proliferation of Hep-G2 cells was detected by CCK-8 method; effect of Berberine on cell apoptosis by flow cytometry (FCM); western blotting and real time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) analysis were used to detect the mRNA and protein expression of anti proliferation gene BTG2 and CyclinB1, cyclin D1. **Results:** The proliferation of Hep-G2 cell lines was inhibited by Berberine in a dose and time dependent manner, and compared with the control group, the difference was statistically significant ($p < 0.01$). Berberine promotes cell apoptosis, and the rate of apoptosis is proportional to the effect time of Berberine ($P < 0.01$). The expression of BTG2 mRNA increased with the time of Berberine treatment ($p < 0.01$), and compared with the control group, there's significant difference ($p < 0.01$); while the expression of CyclinB1, CyclinD1 mRNA was gradually decreased with the time of Berberine intervention ($p < 0.01$ or $p < 0.05$), and the difference was significantly compared with the control group ($p < 0.01$). Compared with the control group, the differential expression of BTG2 and CyclinB1, CyclinD1 protein was significant ($p < 0.05$). **Conclusions:** Berberine can inhibit the proliferation of Hep-G2 cells and induce cells apoptosis, which mechanism may be related to the up-regulation of BTG2 and down-regulation of CyclinB1, Cyclin D1 by berberine.

Keywords

Berberine, Hepatocellular Carcinoma, Cell Proliferation, Cell Apoptosis, BTG2, CyclinB1, Cyclin D1

黄连素对肝癌Hep-G2细胞株的作用研究

王 敏¹, 张志敏², 章必成², 杨 波², 刘 兰², 付红星², 饶智国²

¹湖北中医药大学2015级研究生班, 湖北 武汉

²解放军武汉总医院肿瘤科, 湖北 武汉

Email: 15072356537@163.com

收稿日期: 2018年3月6日; 录用日期: 2018年3月18日; 发布日期: 2018年3月26日

摘要

目的: 探讨黄连素(berberine, BBR)作用于肝癌Hep-G2细胞增殖和凋亡的机制。**方法:** CCK-8法检测BBR对Hep-G2细胞增殖的抑制作用; 流式细胞术检测BBR对细胞凋亡的影响; 蛋白印迹法(Western blotting)及实时荧光定量PCR (RT-PCR)检测抗增殖基因BTG2及细胞周期蛋白CyclinB1、CyclinD1的蛋白及mRNA表达的情况。**结果:** 与对照组相比, BBR可以抑制肝癌Hep-G2细胞的增殖, 且抑制率与BBR浓度成正比, 差异具有统计学意义($p < 0.01$); 与对照组相比, BBR可诱导细胞凋亡($p < 0.01$), 且凋亡率随着黄连素的作用时间的延长而增加($p < 0.01$); BTG2 mRNA的表达随着BBR作用时间的延长逐渐增强($p < 0.01$), 且与对照组相比, 差异具有显著性($p < 0.01$), 而CyclinB1、CyclinD1mRNA的表达则随着BBR作用时间的延长逐渐减弱($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$), 与对照组相比, 差异具有显著性($P < 0.01$); 与对照组相比, BTG2和CyclinB1、CyclinD1蛋白表达的差异具有显著性($p < 0.05$)。 **结论:** BBR可抑制肝癌细胞Hep-G2的增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与其上调抗增殖基因BTG2和下调细胞周期蛋白CyclinB1、CyclinD1的表达有关。

关键词

黄连素, 肝癌, 细胞增殖, 细胞凋亡, BTG2, 细胞周期蛋白B1, 细胞周期蛋白D1

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占90%以上, 最新资料显示 HCC 高居中国肿瘤发病的第3、4位和肿瘤死因的第2、3位[1] [2]。对于原发性肝癌的治疗, 最根本的方法是手术切除, 但由于起病隐袭、侵袭性高、进展迅速和早期诊断困难, 我国 HCC 患者确诊时多已为局部晚期或者发生远处转移, 往往不适合或不能够单独采取外科手术、肝动脉栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)或理化消融等局部治疗[3]。这类患者预后很差。

黄连素又称小檗碱, 1959年 Hano [4]报道了其具有抗肿瘤活性。近年研究发现黄连素及其衍生物可选择性诱导人肝癌细胞死亡, 但对人的正常肝细胞无细胞毒性, 表明黄连素及其衍生物具有肝癌靶向细胞毒性, 有可能成为有前途的多功能抗肝癌药物[5]。本文以体外细胞实验研究黄连素调节抑癌基因 BTG2 和细胞周期蛋白 CyclinB1、CyclinD1 的表达来探讨其抗肝癌细胞株 Hep-G2 作用机制及可能影响的信号通路的研究, 且该方面的研究及报道较少见, 为其临床应用于肝癌的治疗提供理论基础, 也为后期更为精确的用药提供理论支持。

2. 材料与方法

2.1. 药品和试剂

黄连素(盐酸小檗碱)购自成都艾特姆生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有

限公司; PI 染色试剂盒及 AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒均购自 Bio-Swamp 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 鼠抗 BTG2 和兔抗 CyclinB1、CyclinD1 抗体均购自 Abcam 公司; 引物由上海 Invitrogen 生物制品公司合成; Trizol 购自北京康为世纪生物科技有限公司, SYBR Green PCR 试剂盒购自 KAPA Biosystems 公司, 逆转录试剂盒购自 TAKARA 公司。

2.2. 细胞系与细胞培养

人肝癌细胞株 Hep-G2 由中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心)提供, 用 MEM Hyclone 培养基、10%胎牛血清、青霉素-链霉素溶液配制成的完全培养基, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 待细胞生长至对数生长期时备用。

2.3. CCK-8 检测 BBR 对 Hep-G2 细胞增殖的抑制作用

取对数生长期的 Hep-G2 细胞, 接种于三个 96 孔板中, 100 ul/孔, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 给予不同浓度的 BBR (12.5, 25, 50, 100, 200 μmol/L) 干预细胞, 另设阴性对照组(只有细胞和培养基)和空白组(没有细胞只有培养基), 每个浓度设五个复孔, 每个 96 孔板边缘孔均加入 PBS 100 ul, 分别培养 24 h、48 h、72 h 后, 吸出原液, 用遇冷的 PBS 洗涤一遍, 每孔加入用 MEM 培养基稀释的 CCK-8 100 ul, 置于细胞培养箱中孵育三小时。用酶联免疫检测仪测定每孔在 450 nm 处的吸光度值, 然后根据公式计算细胞增殖抑制率。实验重复三次。细胞增殖抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{阴性对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$ 。经加权直线回归方程计算出黄连素抑制细胞增殖率为 25% 时的对应浓度值。

2.4. 流式细胞术检测细胞周期变化及细胞凋亡率

取对数生长期的细胞, 制成 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 的单细胞悬液, 接种于三个 6 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 给予抑制率为 25% 的 BBR 用药浓度对细胞进行处理, 另设空白对照组, 继续孵育 24、48、72 小时。孵育时间到后用遇冷的 PBS 洗涤两遍, 胰酶消化, 离心收集细胞, 并重悬于 200 ul 的 Binding Buffer 中, 再根据 PI 染色试剂盒和 AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒的说明书进行细胞染色, 最后用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡细胞分布情况。实验重复三次。

2.5. Western Blot 检测 BTG2 和 CyclinB1、CyclinD1 的蛋白表达情况

取对数生长期的细胞, 制成 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 的单细胞悬液, 接种于三个 6 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 给予抑制率为 25% 的 BBR 用药浓度对细胞进行处理, 另设空白对照组, 继续孵育 24、48、72 小时。收集细胞后提取蛋白并根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定各组蛋白的含量, 每组样品各取 40 μg 蛋白进行上样。根据 10% SDS-PAGE 凝胶试剂盒制成分离胶和 5% 的浓缩胶, 进一步电泳、转膜, 将凝胶上的蛋白转移至 NC 膜上。用 5% 的 BSA 室温下于摇床上封闭 1 小时, 加入一抗(鼠抗 BTG2 和兔抗 CyclinB1、CyclinD1, 工作液的浓度分别为 1:500、1:1000 和 1:1000), 于 4℃ 冰箱里孵育过夜, $1 \times \text{TBST}$ 洗涤液洗膜后再加入相应的二抗(1:5000 HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG), 室温下于摇床上孵育 30 min, 以 β -actin 作为内参。仍然用 $1 \times \text{TBST}$ 洗涤液洗膜后, 用 ECL 化学发光法进行观察。实验重复三次。

2.6. RT-PCR 检测 BTG2 和 CyclinB1、CyclinD1 mRNA 的表达

取对数生长期的细胞, 制成 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 的单细胞悬液, 接种于三个 6 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 给予抑制率为 25% 的 BBR 用药浓度对细胞进行处理, 另

设空白对照组, 继续孵育 24、48、72 小时。孵育时间到后收集各组细胞, 提取蛋白后用 Trizol 提取总 RNA, 并测定 RNA 的质量, 根据逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA, 根据该试剂盒的说明书, 反转录的条件是: 20 uL 反应体系, 其反应程序是 42°C, 60 min; 70°C, 10 min; -20°C, hold。根据 PCR 试剂盒说明书及荧光定量 PCR 仪对 cDNA 进行扩增, 反应体系 20 uL: PreMix 10 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL、cDNA 模板 1 μL 及 ddH₂O 8 μL, PCR 扩增反应程序设置: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 15 s, 58°C 退火 20 s, 72°C 延伸 20 s, 循环 40 次; 72 终末延伸 5 min; 4°C 保温。最后运用 c-comparative2^{-ΔΔCT} 法分析各基因的相对表达。实验重复三次。所用引物序列见表 1。

2.7. 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行实验数据的统计学分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 若方差不齐则采用 Tamhane 检验, 以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. BBR 对肝癌 Hep-G2 细胞增殖的影响: 见表 2

各组 BBR 作用于 HepG-2 细胞 12 h、24 h、48 h、72 h 后, 细胞生长出现明显抑制, 且细胞生长抑制率随药物浓度的增加而升高。经加权直线回归方程计算出 BBR 作用于 HepG-2 细胞 24 h 的抑制率为 25% 的 BBR 用药浓度为 30 μmol/L。

3.2. BBR 对 Hep-G2 细胞凋亡的影响: 见图 1, 表 3

将浓度为 30 μmol/L 的 BBR 干预 Hep-G2 细胞 24 h、48 h、72 h 小时后, 与对照组相比, 实验组细胞凋亡率增加, 具有明显的时间依耐性, 差异具有显著性($P < 0.01$)。

3.3. BBR 对 Hep-G2 细胞 BTG2 mRNA 和 CyclinB1、CyclinD1mRNA 表达的影响: 见图 2

将浓度为 30 μmol/L 的 BBR 分别干预细胞 24 h、48 h、72 h 后, 与对照组相比, BTG2 mRNA 的相对表达量逐渐增加($P < 0.01$), 随着作用时间的延长增加更显著($P < 0.01$)。而 CyclinB1、CyclinD1mRNA 的表达, 与对照组相比, 逐渐减低($P < 0.01$)。

3.4. BBR 对 Hep-G2 细胞 BTG2 和 CyclinB1、CyclinD1 蛋白表达的影响: 见图 3

与对照组相比, 将浓度为 30 μmol/L 的 BBR 分别干预细胞 24 h、48 h、72 h 后, BTG2 蛋白的表达逐渐增高($P < 0.01$)。同时 CyclinB1、CyclinD1 蛋白的表达逐渐减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

4. 讨论

黄连素, 可从传统中药黄连、黄柏、三颗针等植物中提取, 黄连素及其衍生物在治疗心血管疾病、抗肿瘤、免疫调节、精神疾病、骨质疏松等多方面具有一定的药理作用。近年研究显示黄连素可通过诱导 ROS 生成[6]、调节 HIF-1α、抑癌因子 p21WAF1/CIP1、细胞周期蛋白 CyclinB1 的表达[7] [8]、触发 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-7 的活性[9]、抑制 NF-κB 的活性及其通路影响 VEGF mRNA 和蛋白的表达[10]、提高 GRP78/HSPA5 的表达[11]等多种途径影响肿瘤细胞的增殖、调控细胞周期、抑制侵袭及转移、调节自噬、增敏增效等方面发挥其抗肿瘤作用。

BTG2 (B-cell translocation gene-2)作为一种抗增殖基因, 是早期瞬时反应基因之一, 属于 BTG/Tob 抑癌基因家族成员之一。已有大量研究证实, BTG2 在许多肿瘤中的表达下调, 在多种肿瘤细胞的分化、

Table 1. Real-time fluorescence quantitative PCR primers were used in this study
表 1. 本研究使用的实时荧光定量 PCR 引物序列

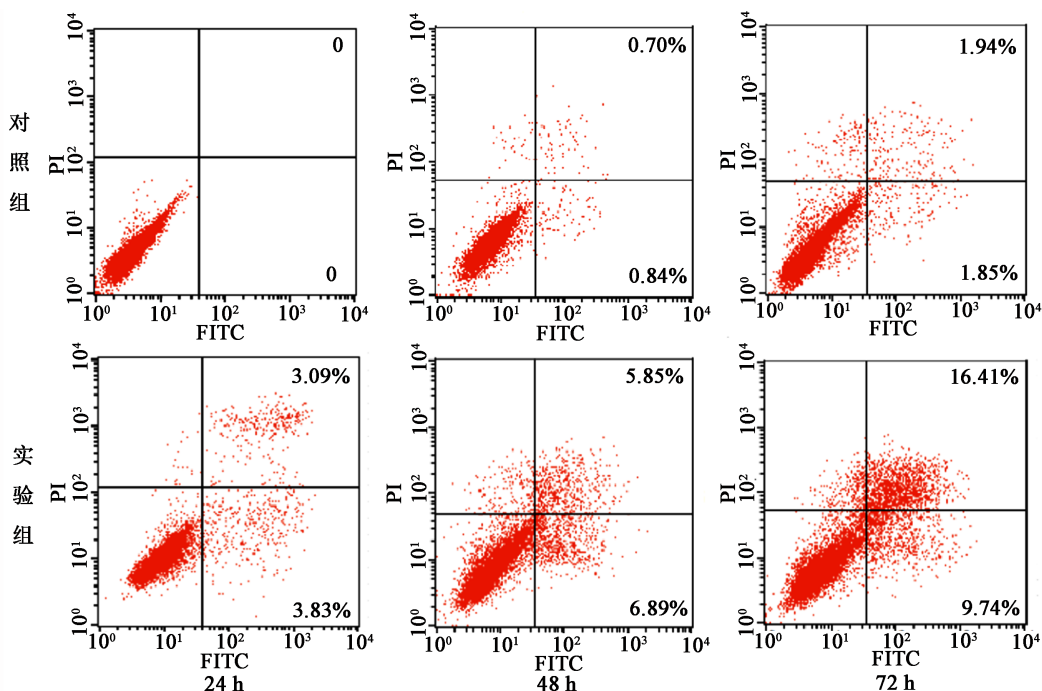
基因	序列(5'-3')	长度(bp)
BTG2	正向: GCCAGCCAGATCGGACTC 反向: TCGTACAAGACGCAGATGGAG	128
Cyclin B1	正向: GGTCGGAAGTCACTGGAAAC 反向: CAGCATCTTCTGGGCACAC	153
Cyclin D1	正向: CAATGACCCCGCACGATTC 反向: CATGGAGGGCGGATTGGAA	146
β -actin	正向: CTGGGCTACACTGAGCACC 反向: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	218

Table 2. Comparison of the growth inhibition rate of hepg2 cells with different concentrations of berberine at different time levels (% , $\bar{x} \pm s$)

表 2. 不同浓度的 BBR 培养 HepG2 不同时间后细胞生长抑制率的比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0	0
12.5 $\mu\text{mol/L}$	7.76 \pm 0.13 ^a	17.40 \pm 0.10 ^a	18.97 \pm 0.14 ^a	25.03 \pm 0.23 ^a
25 $\mu\text{mol/L}$	14.95 \pm 0.07 ^{ab}	22.97 \pm 0.04 ^{ab}	26.82 \pm 0.97 ^{ab}	37.16 \pm 0.21 ^{ab}
50 $\mu\text{mol/L}$	39.36 \pm 0.09 ^{abc}	52.49 \pm 0.04 ^{abc}	56.83 \pm 0.16 ^{abc}	62.27 \pm 0.13 ^{abc}
100 $\mu\text{mol/L}$	56.32 \pm 0.06 ^{abcd}	62.46 \pm 0.69 ^{abcd}	66.18 \pm 0.15 ^{abcd}	71.90 \pm 0.01 ^{abcd}
200 $\mu\text{mol/L}$	62.37 \pm 0.77 ^{abcde}	70.25 \pm 0.24 ^{abcde}	71.23 \pm 0.14 ^{abcde}	74.32 \pm 0.05 ^{abcde}

注: BBR 为黄连素; Hep-G2 为人肝癌细胞株; 每组每个时间点的样本量为 3; ^a 代表与空白对照组的比较 P < 0.01; ^b 代表与 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的比较 P < 0.01; ^c 代表与 25 $\mu\text{mol/L}$ 的比较 P < 0.01; ^d 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 的比较 P < 0.01; ^e 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 的比较 P < 0.01。



注: 左上象限为坏死细胞; 左下象限为正常细胞; 右上象限为凋亡中晚期细胞; 右下象限为凋亡早期细胞。

Figure 1. The effects of BBR on apoptosis of Hep-G2 cells measured by flow cytometry

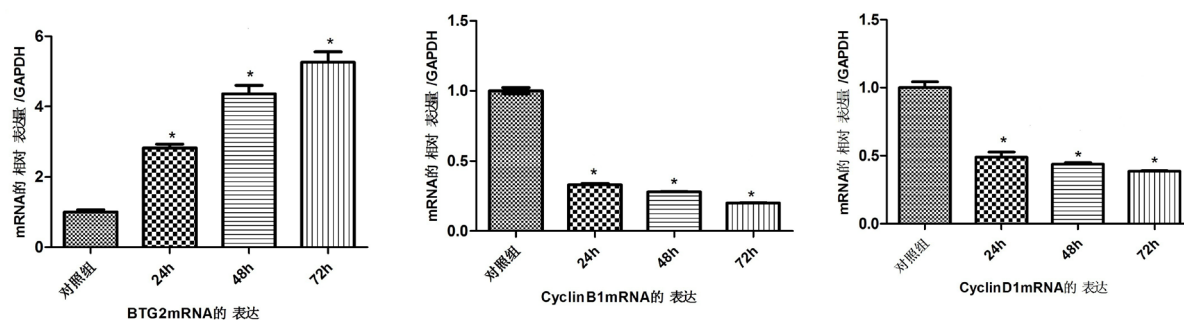
图 1. 流氏细胞仪测 BBR 对 Hep-G2 细胞凋亡的影响

Table 3. The comparison of the apoptosis rate of Hep-G2 cells with a certain concentrations of berberine at different time levels (% , $\bar{x} \pm s$)

表 3. 一定浓度的 BBR 培养 Hep-G2 不同时间后细胞凋亡率的比较(% , $\bar{x} \pm s$)

分组	凋亡期	24 h	48 h	72 h
对照组	早期	0.05 ± 0.09	2.20 ± 0.32	0.84 ± 0.15
实验组		3.72 ± 0.17 ^a	6.58 ± 0.39 ^{ab}	10.70 ± 1.20 ^{abc}
对照组	中晚期	0	2.16 ± 0.24	0.69 ± 0.27
实验组		3.13 ± 0.24 ^a	5.59 ± 0.28 ^{ab}	14.82 ± 1.43 ^{abc}

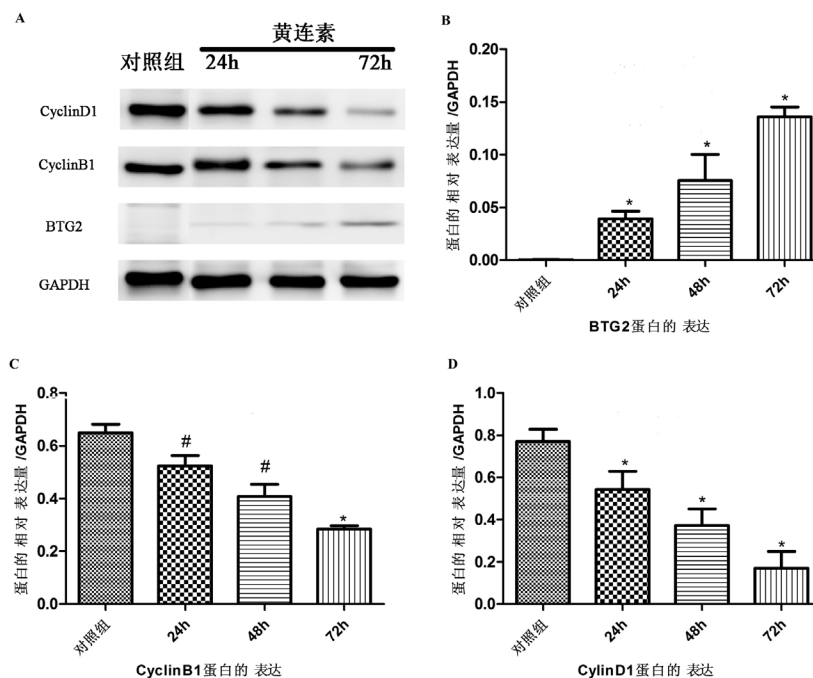
注: BBR 为黄连素; Hep-G2 为肝癌细胞株; ^a代表与对照组相比 $P < 0.01$; ^b代表实验组之间与 24 h 的比较 $P < 0.01$; ^c代表实验组之间与 48 h 的比较 $P < 0.01$ 。



注: *代表相对于对照组 $P < 0.01$ 。

Figure 2. The effects of BBR on the expression of Hep-G2 cells in BTG2 and CyclinB1 and CyclinD1 mRNA

图 2. BBR 对 Hep-G2 细胞 BTG2 和 CyclinB1、CyclinD1 mRNA 表达的影响



注: A. Western Blotting 检测 BTG2 和 CyclinB1、CyclinD1 蛋白表达情况; B、C、D 半定量分析 BTG2 和 CyclinB1、CyclinD1 蛋白表达情况(*代表相对于对照组 $P < 0.01$, #代表相对于对照组 $P < 0.05$)。

Figure 3. The effects of BBR on the expression of Hep-G2 cells in BTG2 and CyclinB1 and CyclinD1 protein

图 3. BBR 对 Hep-G2 细胞 BTG2 和 CyclinB1、CyclinD1 蛋白表达的影响

增殖、DNA 损伤修复以及凋亡中起重要作用[12] [13] [14] [15] [16]，且与肿瘤的大小、分级、转移、复发及预后不良都有一定关系[17]。多个实验研究表明上调 BTG2 的表达，可抑制乳腺癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤等肿瘤细胞的增殖、诱导细胞凋亡[18] [19] [20] [21]。目前，也有学者证实 BTG2 在肝癌组织中不表达或者表达非常低，而相应的癌旁组织或正常肝细胞中表达则较高，提示 BTG2 的高表达对肝癌的发生、进展均具有抑制作用[22] [23]。本实验结果发现一定剂量的黄连素干预 Hep-G2 细胞后，BTG2 蛋白及 mRNA 的表达都随着时间延长逐渐增强，差异具有统计学意义。

细胞周期蛋白 Cyclin B1 作为 Cyclins 家族的一员，活化并与 CDKs 即 CDC2 (cell division cycle)形成复合物，促使细胞进行 G2/M 期转变。有多项研究表明，Cyclin B1 的表达，在肿瘤细胞的增殖中起重要作用[24] [25]。有研究[26]发现人肝癌组织中 CyclinB1 mRNA 表达水平与临床分期、门静脉癌栓、术后复发、肿瘤直径和肿瘤低分化等成正相关。在本实验中当一定剂量的黄连素干预 HepG-2 细胞后，CyclinB1 mRNA 和蛋白的表达均随着时间延长逐渐增强，具有明显时间依赖性，差异具有统计学意义。

Cyclin D1 作为一种潜在的原癌基因蛋白，且是调控 G1 期的关键蛋白，并且在多种肿瘤中过表达。有研究表明下调 Cyclin D1 的表达，可使细胞周期阻滞在 G1 期，从而抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡[27] [28]。目前，另有学者研究 cyclin D1 在丙型肝炎相关性肝细胞肝癌组织中的表达较癌旁组织，以及基本正常肝脏组织明显增高，且与肝癌组织的病理学分级及患者的不良预后呈正相关，提示 cyclin D1 高表达的致癌作用[29]。在本实验中当一定浓度的黄连素干预 HepG-2 细胞后，CyclinD1 mRNA 和蛋白的表达均随着时间延长逐渐增强，具有明显的时间依耐性，差异具有统计学意义。

肿瘤发生的本质原因是癌基因的激活和(或)抑癌基因的失活。BTG2 作为抗增殖蛋白基因，是细胞周期动力学的重要调节因子，与细胞周期的控制和细胞对 DNA 损伤反应有关。研究[8] [28]发现提高 BTG2 的表达可抑制 CyclinD1 蛋白的转录活性，降低 CyclinD1 蛋白表达，然后通过视网膜母细胞瘤基因(Rb)途径使细胞阻滞在 G1 期，促使细胞凋亡。BTG2 也可通非 Rb 途径阻止 CyclinB1 和 Cdc2 的结合，抑制 Cdc2 激酶活性，导致 G2 期的停滞，而诱导 G2/M 期的细胞周期阻滞及细胞凋亡。在该实验中我们发现随着一定剂量的黄连素作用时间的延长，细胞的凋亡率逐渐增多，且 BTG2 蛋白表达逐渐上升，同时 CyclinB1、Cyclin D1 mRNA 及蛋白表达逐渐下调，引起细胞周期阻滞，诱导细胞凋亡。

由此我们推断，黄连素具有抑制肝癌细胞增殖，诱导细胞凋亡的作用。这与前期，我们实验组研究的 48 h 的半数抑制浓度 $IC_{50} = 41.18 \mu\text{mol/L}$ 的黄连素调节肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的结果相一致。其机制之一可能是通过上调抑癌基因 BTG2 的表达，同时引起 CyclinB1、Cyclin D1 的表达下调。但是在该实验中黄连素对抗增殖基因 BTG2 的作用机制并不清楚，有待进一步研究，且 BTG2 抗肿瘤的作用与 Cyclin B1、Cyclin D1 的表达抑制是否有直接相关性，也需要进一步实验来证实。若将黄连素用于肝癌的临床治疗，是否具有临床疗效，还需要临床试验及进一步深入探讨。

基金项目

国家自然科学基金青年项目(81301631)。

湖北省卫计委青年人才项目(WJ2017H0036)。

参考文献

- [1] Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., *et al.* (2015) Global Cancer Statistics, 2012. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, **65**, 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- [2] Chen, W., Zheng, R., Baade, P.D., *et al.* (2016) Cancer Statistics in China, 2015. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, **66**, 115. <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- [3] Gong, X.L. and Qin, S.K. (2016) Review and Present Status of Systematic Treatment of Advanced Hepatocellular Car-

- cinomain in 30 Years. *Practical Journal of Oncology*, **31**, 357-397.
- [4] Hano, K. (1959) The Carcinostatic Effects of Some Plant Components and Their Related Compounds. *Acta-Unio Internationalis Contra Cancrum*, **15**, 122.
- [5] Liu, B., Wang, G., Yang, J., *et al.* (2011) Berberine Inhibits Human Hepatoma Cell Invasion without Cytotoxicity in Healthy Hepatocytes. *PLoS ONE*, **6**, e21416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021416>
- [6] Ren, K., Zhang, W., Wu, G., *et al.* (2016) Synergistic Anti-Cancer Effects of Galangin and Berberine through Apoptosis Induction and Proliferation Inhibition in Oesophageal Carcinoma Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **84**, 1748-1759. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.111>
- [7] Zhang, Q., Wang, J.F. and Ma, J.X. (2013) Radiosensitizing Effect of Berberine on Nude Mice Transplanted with LNCaP Cells of Prostate Cancer. *Chinese Journal of Clinicians*, **7**, 11549-11552.
- [8] Eo, S.H., Kim, J.H. and Kim, S.J. (2015) Induction of G₂/M Arrest by Berberine via Activation of PI3K/Akt and p38 in Human Chondrosarcoma Cell Line. *Oncology Research*, **22**, 147-157. <https://doi.org/10.3727/096504015X14298122915583>
- [9] Seo, Y.S., Yim, M.J., Kim, B.H., *et al.* (2015) Berberine-Induced Anticancer Activities in FaDu Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Oncology Reports*, **34**, 3025-3034. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4312>
- [10] Lei, B.T. and Ma, C.Y. (2014) Research Progress on Anti-Hepatocarcinoma of Berberine. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, **32**, 254-256.
- [11] La, X., Zhang, L., Li, Z., *et al.* (2017) Berberine-Induced Autophagic Cell Death by Elevating GRP78 Levels in Cancer Cells. *Oncotarget*, **8**, 20909-20924. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14959>
- [12] Mao, B., Zhang, Z. and Wang, G. (2015) BTG2: A Rising Star of Tumor Suppressors (Review). *International Journal of Oncology*, **46**, 459-464. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2765>
- [13] Gao, S.S., Yang, X.H. and Wang, M. (2016) Inhibitory Effects of B-Cell Translocation Gene 2 on Skin Cancer Cells via the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Molecular Medicine Reports*, **14**, 3464-3468. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5596>
- [14] Rouault, J.P., Falette, N., Guéhenneux, F., *et al.* (1996) Identification of BTG2, an Antiproliferative p53-Dependent Component of the DNA Damage Cellular Response Pathway. *Nature Genetics*, **14**, 482-486. <https://doi.org/10.1038/ng1296-482>
- [15] Lee, J.C., Chung, L.C., Chen, Y.J., *et al.* (2015) Upregulation of B-Cell Translocation Gene 2 by Epigallocatechin-3-Gallate via p38 and ERK Signaling Blocks Cell Proliferation in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cancer Letter*, **360**, 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.034>
- [16] Micheli, L., Ceccarelli, M., Fariolivecchioli, S., *et al.* (2015) Control of the Normal and Pathological Development of Neural Stem and Progenitor Cells by the PC3/Tis21/Btg2 and Btg1 Genes. *Journal of Cellular Physiology*, **230**, 2881-2890. <https://doi.org/10.1002/jcp.25038>
- [17] Takahashi, F., Chiba, N., Tajima, K., *et al.* (2011) Breast Tumor Progression Induced by Loss of BTG2 Expression Is Inhibited by Targeted Therapy with the RrbB/HER Inhibitor Lapatinib. *Oncogene*, **30**, 3084-3095. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.24>
- [18] Karve, T.M. and Rosen, E.M. (2012) B-Cell Translocation Gene 2 (BTG2) Stimulates Cellular Antioxidant Defenses through the Antioxidant Transcription Factor NFE2L2 in Human Mammary Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 31503-31514. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367433>
- [19] Takahashi, M., Hayashida, T., Okazaki, H., *et al.* (2014) Loss of B-Cell Translocation Gene 2 Expression in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Predicts Tamoxifen Resistance. *Cancer Science*, **105**, 675-682. <https://doi.org/10.1111/cas.12410>
- [20] Tsui, K.H., Chung, L.C., Feng, T.H., *et al.* (2012) Up-Regulation of Prostate-Derived Ets Factor by Luteolin Causes Inhibition of Cell Proliferation and Cell Invasion in Prostate Carcinoma Cells. *International Journal of Cancer*, **130**, 2812-2823. <https://doi.org/10.1002/ijc.26284>
- [21] Li, W.Q., Yu, H.Y. and Zhong, N.Z. (2015) miR-27a Suppresses the Clonogenic Growth and Migration of Human Glioblastoma Multiforme Cells by Targeting BTG2. *International Journal of Oncology*, **46**, 1601-1608. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2843>
- [22] Ye, Y., Xiao, H., Luo, J., *et al.* (2017) Expression and Clinical Significance of B Cell Translocation Gene 2 in Primary Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Third Military Medical University*, **39**, 685-690.
- [23] Han, P., Wang, Q.L. and Zhang, X. (2016) Expression of TRAP1 in Gastric Cancer Tissue and Its Correlation with Malignant Biology. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **9**, 64-68. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.12.014>
- [24] Xia, H., Xiang, S.L., Zeng, Y., *et al.* (2016) Overexpression of Chk 1/2 Gene G₂/M Arrest in MGC803 Cells Induced by Affects Diallyl Disulfide. *Chinese Pharmacological Bulletin*, No. 2, 199-204.

- [25] Li, Q.Y., Hao, Y.R., Qin, J., *et al.* (2016) Effect of BIX-01294 on Cell Proliferation of Liver Cancer. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, **23**, 487-492.
- [26] Xu, T., Zhong, L., Gan, L.-G., *et al.* (2016) Effects of LG268 on Cell Proliferation and Apoptosis of NB4 Cells. *International Journal of Medical Sciences*, **13**, 517-523. <https://doi.org/10.7150/ijms.15507>
- [27] Liu, T., Li, W.-M., Wang, W.-P., *et al.* (2016) Inhibiting CREPT Reduces the Proliferation and Migration of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Down-Regulating Cell Cycle Related Protein. *American Journal of Translational Research*, **8**, 2097-2113.
- [28] Zhou, J., Li, L.U., Fang, L.I., *et al.* (2016) Quercetin Reduces Cyclin D1 Activity and Induces G1 Phase Arrest in HepG2 Cells. *Oncology Letters*, **12**, 516-522. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4639>
- [29] Zhang, Z., Chen, C., Wang, G., *et al.* (2011) Aberrant Expression of the p53-Inducible Antiproliferative Gene BTG2 in Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Overexpression of the Cell Cycle-Related Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **61**, 83-91. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9164-x>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-6067, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: tcm@hanspub.org