

应用基因芯片研究汉黄芩素对肝癌细胞的生长抑制作用机制

李美德¹,黎金浓¹,曹治云¹,陈旭征¹,杜建¹,黄宝康²,廖联明¹

(1.福建中医药大学中西医结合研究院,福建福州 350108;2.第二军医大学药学院生药学教研室,上海 200004)

摘要: [目的] 观察汉黄芩素对人肝癌细胞 HepG2 细胞株基因表达谱的影响,探索汉黄芩素的抗肿瘤机制。 [方法] 用不同浓度的汉黄芩素处理 HepG2 细胞。应用 Affymetrix HG-U133Plus2.0 全人类基因表达谱芯片,检测汉黄芩素作用于肝癌细胞 48h 后的基因表达差异。 [结果] 肝癌细胞经汉黄芩素作用 48h 后,筛出差异常表达 2 倍以上的基因共 406 个,其中 295 个基因上调,111 个基因下调。这些差异基因主要涉及 148 功能分类和 61 个基因通路,包括细胞凋亡、肿瘤发生、代谢、信号转导、细胞周期、物质运输等多个生物过程。 [结论] 汉黄芩素抑制肝癌细胞生长与其对 *GADD45α*、*CDKN1A*、*CDKN2B*、*JUN* 和 *EGFR* 等基因的表达调控有关。

关键词: 汉黄芩素;肝肿瘤;HepG2 细胞;基因芯片

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)03-0193-06

Molecular Mechanism of Wogonin Inhibiting Hepatocellular Cancer Cells Growth by Gene Chip

LI Mei-de, LI Jin-nong, CAO Zhi-yun, et al.

(Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

Abstract: [Purpose] To study the effects of wogonin on gene expression of human hepatocellular cancer cell line HepG2 and elucidate the anticancer mechanisms of Wogonin. [Methods] HepG2 cell line was treated in the presence of different concentrations of wogonin. Gene chip was applied to evaluate the gene expression profile of hepatocellular cancer cells by wogonin treated 48h. [Results] A total of 406 differentially expressed genes were observed. 295 genes up-regulated, and 111 genes down-regulated. These differently expressed genes mainly involved in 148 functional categories and 61 pathways, including apoptosis, tumorigenesis, metabolism, signal transduction, cell cycle and material transportation. [Conclusion] Regulation of expressions of *GADD45α*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *JUN*, *EGFR* might be associated with the antitumor effect of wogonin.

Subject words: wogonin; liver neoplasms; HepG2 cells; gene chip

汉黄芩素(wogonin, 分子式: $C_{16}H_{12}O_5$, 相对分子量: 284.26) 为唇形科植物黄芩的主要活性成分之一, 是一种黄酮类化合物^[1], 具有较强的抗炎活性^[2]、抗病毒^[3]和神经保护效应^[4]。近年来研究表明, 汉黄芩素还具有抗肿瘤生物活性, 能抑制多种肿瘤细胞生

长, 如白血病细胞^[5]、乳腺癌细胞^[6]、小鼠 S180 肉瘤^[7]和膀胱癌细胞^[8]。有趣的是, 汉黄芩素并不诱导外周血单核细胞和成纤维细胞凋亡^[9]。因此汉黄芩素能特异性地抑制肿瘤细胞的生长, 但其作用机制仍未明确。基因芯片技术具有检测通量高、速度快的特点, 为寻找新的药物作用靶点、明确药物作用机理提供了更简便快速的方法^[10]。因此, 本研究采用基因芯片技术来观察汉黄芩素对肝癌细胞株基因表达的影响, 分析汉黄芩素抑制肿瘤细胞增殖的分子机制。

基金项目: 国家自然科学基金(81102582)

通讯作者: 廖联明, 副教授, 博士; 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建省福州市闽侯上街华佗路 1 号(350112), E-mail: llm@fjtc.edu.cn.

黄宝康, 教授, 博士; 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海市杨浦区翔殷路 800 号(200004); E-mail: hbkc@163.com.

收稿日期: 2012-12-27; **修回日期:** 2013-02-27

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤细胞株

人肝癌 HepG2 细胞株购自中国医学科学院上海生命科学研究院。

1.1.2 主要试剂及仪器

汉黄芩素 (南京替斯艾么中药研究所, 纯度 99.05%) 溶于二甲亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司)中, 配制为母液(终浓度为 200mmol/L), 用一次性注射滤器过滤, -20℃冰箱冷冻保存备用。其他试剂包括四甲基偶氮唑盐(MTT, 美国 Sigma 公司); High-DMEM (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司)、GeneChip® 3'IVT Express Kit (美国 Affymetrix 公司) 和 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。高密度寡核苷酸芯片基因芯片 (Genechip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) 代表人类全基因组 47 400 转录本, 承载 38 500 条明晰的人类基因, 具有 54 000 个短寡核苷酸探针。使用的仪器包括全自动洗涤工作站 (Affymetrix Fluidics Station 450)、杂交炉 (Affymetrix Genechip Hybridization Oven 640) 和芯片扫描仪 (Affymetrix Gene Array Scanner 30007G)。

1.1.3 主要分析软件及数据库

GCOS 分析软件包 Affymetrix 公司 Dat.view 1.0 软件; NCBI 数据库; KEGG 数据库等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

肝癌 HepG2 细胞常规培养于含青霉素及链霉素、10%胎牛血清的 High-DMEM 培养液, 37℃、5% CO₂ 孵箱内贴壁生长, 每 2~3d 用 0.25%胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测汉黄芩素对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

用 0.25%胰蛋白酶消化 HepG2 细胞, 用完全培养基配单细胞悬液, 以每孔 4×10⁴ 个接种于 96 孔板中, 每孔 100μl。培养 24h, 待细胞贴壁并进入对数生长期后换液, 并进行实验干预, 实验分 6 组: 空白对照组和汉黄芩素处理组 (汉黄芩素终浓度分别为 12.5、25、50、100、200μmol/L)。其中, 每组设 8 个复孔, 于 37℃、5%CO₂ 的饱和湿度培养箱中继续培养 24、48、72h, 培养结束前 4h 每孔加入 100μl MTT

(1mg/ml), 37℃继续孵育 4h, 吸去培养液, 每孔加入 150μl DMSO, 在振荡器上振荡 15min, 用全自动酶标仪 (测定波长 490nm, 参考波长 630nm) 测定各孔吸光度 (A 值) 计算细胞生长抑制率, 并计算 IC₅₀ 值。各组细胞生长抑制率 (%) = (1 - 用药组平均 A 值 / 阴性对照组平均 A 值) × 100%。

1.2.3 Affymetrix Expression Array 芯片检测汉黄芩素对 HepG2 基因表达的影响

RNA 抽提、探针制备和芯片杂交: 采用一步法 TRIzol 分别提取实验组 (经汉黄芩素 100μmol/L 处理) 和对照组细胞总 RNA, 并用 RNeasy MiniKit 纯化, 1%琼脂糖电泳和分光光度计评价 RNA 的质量和完整性。每组各 3 个样品, 分别进行芯片实验。芯片实验按照 Affymetrix 公司提供的操作指南进行。以 RNA 为模板, 合成单链及双链 cDNA, 纯化; 再以双链 cDNA 为模板, 用 RNA 转录标记试剂盒进行体外转录合成生物素标记的 cDNA, 片段化处理; 分光光度计质控合格的 cDNA 与 Human Genome U133 Plus 2.0 基因芯片在杂交炉 640 中 45℃预杂交 10min, 取出杂交缓冲液加等体积处理好的杂交液 45℃杂交 16h, 然后于全自动洗涤工作站洗涤和染色。芯片扫描仪扫描基因芯片并拍照。

1.2.4 RT-PCR 验证

选取 2 个表达差异较明显的基因 (*GDF15* 和 *H19*), 采用半定量 RT-PCR 对基因芯片结果进行验证, 并为了进一步的研究做准备。检索 NCBI GenBank 数据库, 所设计引物分别针对不同的外显子, 以 *GAPDH* 作对照的校准基因。应用 Primer Premiers 3.0 软件分别设计其 PCR 引物。引物由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列分别为: *GDF15*: 上游引物: 5'-GGCCAACCAGAGCTGGG-AAG-3' 下游引物: 5'-GCCCCGAGAGATACGCAGGTG-3'; *H19*: 上游引物: 5'-CTTTACAACCACTGCACTACCTGC-3' 下游引物: 5'-CCTCCTTTGGTCTCAAATTGG-3'; *GAPDH*: 上游引物: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTC-GT-3' 下游引物: 5'-GACAAGCTTCCCCTTCTCAG-3'。

1.2.5 生物信息学分析及统计学处理

芯片数据处理与生物信息学分析: 芯片扫描仪扫描基因芯片, Image Viewer 软件提取杂交信号叠加图, 所有原始数据予以 Partek GS 6.5 软件进行均一化和数据校正。将实验组与对照组芯片上对应探

针之间的荧光信号强度比值进行转换,将所得商取以2为底的对数,其结果是正值为表达上调($\geq +2$ 为有意义的上调差异表达),负值为下调表达(≤ -2 为有意义的下调差异表达)。用SPSS16.0统计软件分析,同一指标的组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素对肝癌 HepG2 细胞增殖活性的影响

MTT测定法结果显示(Figure 1),汉黄芩素处理HepG2细胞24、48、72h后细胞的增殖抑制率随着药物浓度的增加及作用时间的延长显著增加($P < 0.05$),呈量效和时效关系。汉黄芩素作用48h的 IC_{50} 值为 $115.7\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 Affymetrix 表达谱芯片检测结果

2.2.1 基因芯片杂交后的扫描结果

芯片杂交后的原始扫描图,由AGCC软件直接生成。芯片整体背景较低、信噪比较高;从芯片信号点的质量上观察,所有信号点的大小以及形状规则程度呈均一化、信号点的信噪比以及信号点的背景强度、信号点的信号饱和程度均显现良好,近乎一致化。这说明芯片的实验结果理想(Figure 2)。

2.2.2 基因芯片检测后数据结果

对照组、实验组样本进行Human Genome U133 Plus 2.0基因芯片检测的结果显示,与对照组相比,实验组总共有406个基因发生显著性变化(上调或下调倍数大于2)。其中,295个基因上调,111个基因下调。利用生物注释数据库Gene Ontology(GO)对406个差异基因功能聚类分析共有148个功能类别。其中主要涉及以下通路:细胞凋亡(23个基因)、代谢(24个基因)、细胞增殖(21个基因)、细胞内信号转导(24个基因)、物质运输(20个基因)、细胞周期(20个基因)、转录调控(18个基因)等多

个生物过程。在6次比较中,差异倍数均明确达4倍以上的上调基因12个,如FAM129A、INHBE、GDF15等;差异倍数均达4倍以上的下调基因8个,包括Cox-1、H19等。同时,利用KEGG数据库对这些差异基因进行通路分析,共涉及61条生物学通路(Table 1)。在参与61条通路的基因中,有15个基因涉及3个癌症相关通路:细胞周期、p53信号通路和MAPK信号通路。细胞周期通路中GADD45 α 、CDKN1A、CDKN2B基因上调,MAPK通路的MAP4K4基因上调,ARPB1、JUN、EGFR、MAP2K7基因下调。

2.2.3 半定量 RT-PCR 验证结果

RT-PCR验证结果表明,经汉黄芩素干预后的肝癌细胞GDF15 mRNA表达增强;而经汉黄芩素干预后的肝癌细胞H19的mRNA表达降低(Table 3)。RT-PCR结果与芯片结果基本一致,表明芯片检测结果准确可靠。

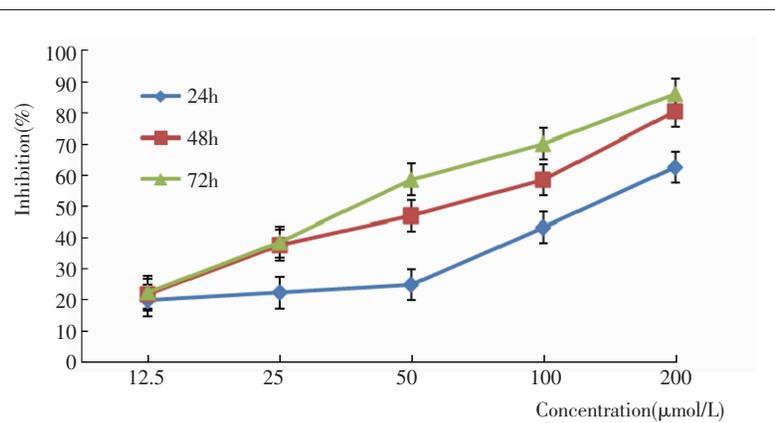


Figure 1 Growth inhibition of wogonin on HepG2 cells (n=3)

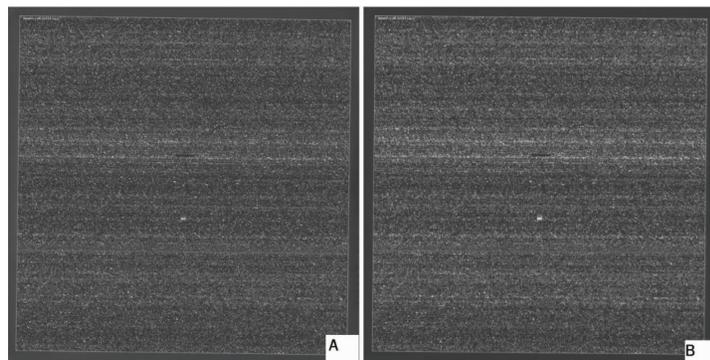
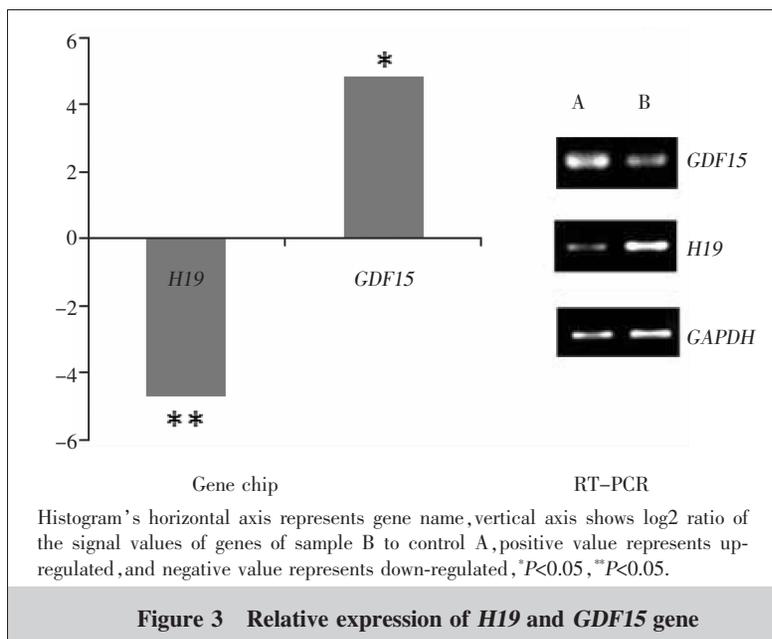


Figure 2 Scanning maps of sample B and control A

Table 1 Distribution of the 25 pathways of the genes with more than 2-fold change of expression after wogonin treatment

| Pathways | Gene name(Fold change) | |
|--|--|---|
| | Up-regulated | Down-regulated |
| p53 signaling pathway | <i>SESN2</i> (2.41), <i>RRM2B</i> (2.26), <i>CDKN1A</i> (2.58) | <i>CASP9</i> (-2.97) |
| ErbB signaling pathway | <i>AREG</i> (2.04), <i>CDKN1A</i> (2.58), <i>JUN</i> (2.09) | <i>EGFR</i> (-2.02), <i>MAP2K7</i> (-2.01), <i>AOX1</i> (-2.40) |
| MAPK signaling pathway | <i>PDGFC</i> (2.59), <i>GADD45α</i> (2.64), <i>DDIT3</i> (2.75), <i>MAP4K4</i> (2.18), <i>JUN</i> (2.09) | <i>ARRB1</i> (-2.34), <i>FOS</i> (-2.41), <i>EGFR</i> (-2.02), <i>AP2K7</i> (-2.05) |
| Pathways in cancer | <i>CDKN1A</i> (2.58), <i>JUN</i> (2.09), <i>CDKN2B</i> (2.63), <i>VEGFA</i> (2.23), <i>BCL2</i> (3.38) | <i>CASP9</i> (-2.97), <i>ARNT2</i> (-2.47), <i>FOS</i> (-2.41), <i>EGFR</i> (-2.02) |
| Cell cycle | <i>CDKN1A</i> (2.58), <i>CDKN2B</i> (2.63) | <i>CCNA2</i> (-2.10) |
| TGF-beta signaling pathway | <i>INHBE</i> (7.44), <i>CDKN2B</i> (2.63) | <i>ID1</i> (-2.10) |
| GnRH signaling pathway | <i>JUN</i> (2.09) | <i>MAP2K7</i> (-2.00), <i>EGFR</i> (-2.02) |
| PPAR signaling pathway | <i>ACSL1</i> (2.25), <i>PCK2</i> (2.06), <i>ME1</i> (2.52), <i>ACSL1</i> (3.13) | |
| Cytokine-cytokine receptor interaction | <i>INHBE</i> (7.44), <i>VEGFA</i> (2.23), <i>PDGFC</i> (2.59), <i>CXCL2</i> (2.06) | <i>EGFR</i> (-2.02), <i>TNFSF11</i> (-2.03), <i>CCL26</i> (-2.29) |
| Adherens junction | <i>INSR</i> (2.145) | <i>EGFR</i> (-2.02) |
| Gap junction | <i>PDGFC</i> (2.59), <i>ADRB1</i> (2.17) | <i>EGFR</i> (-2.02) |
| Pyruvate metabolism | <i>PCK2</i> (2.06), <i>ME1</i> (2.52) | |
| Focal adhesion | <i>VEGFA</i> (2.23), <i>PDGFC</i> (2.59), <i>BCL2</i> (3.38), <i>JUN</i> (2.09) | <i>EGFR</i> (-2.02) |
| Toll-like receptor signaling pathway | <i>JUN</i> (2.09) | <i>FOS</i> (-2.41), <i>MAP2K7</i> (-2.01) |
| Notch signaling pathway | <i>JAG1</i> (2.94) | |
| Non-small cell lung cancer | | <i>EGFR</i> (-2.02), <i>CASP9</i> (-2.97) |
| RNA degradation | <i>TTC37</i> (2.61), <i>EXOSC6</i> (2.06) | |
| Neurotrophin signaling pathway | <i>BCL2</i> (3.38), <i>JUN</i> (2.09) | <i>MAP2K7</i> (-2.00) |
| B cell receptor signaling pathway | <i>JUN</i> (2.09) | <i>FOS</i> (-2.41) |
| VEGF signaling pathway | <i>VEGFA</i> (2.23) | <i>CASP9</i> (-2.97) |
| Calcium signaling pathway | <i>PLCE1</i> (2.18), <i>ADRB1</i> (2.17) | <i>EGFR</i> (-2.02) |
| Chemokine signaling pathway | <i>CXCL2</i> (2.06) | <i>ARRB1</i> (-2.34), <i>CCL26</i> (-2.29) |
| Spliceosome | <i>PLRG1</i> (2.06) | <i>SRSF1</i> (-2.08) |
| Wnt signaling pathway | <i>JUN</i> (2.09) | |



3 讨论

近年来,传统的中药作为一种新型的抗癌药物获得了相当大的关注。黄酮类化合物以安全性强、来源广、种类多、抗肿瘤谱广泛、抗肿瘤细胞增殖作用效果明显、能够诱导肿瘤细胞凋亡,能提高机体免疫力等特点,成为国内外筛选抗肿瘤药物的重要资源之一。但是由于中药药理作用广泛,常涉及机体以及细胞的多个生理病理过程,若仅对单个或少数几个基因进行研究通常难以明确其作用靶点。基因芯片技术可以一次分析上千个基因的

表达水平变化,能够从基因组水平对某一刺激(如药物)进行检测,有助于发现药物的新的作用靶点,阐明药物作用的分子机制,确定药物靶基因以及新药开发提供依据。

汉黄芩素是从唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)、半枝莲(*Scutellaria rivularis* Wall.)以及夹竹桃科植物鳝藤 [*Anodendron affine* (Hook. Et Arn.) Druce] 等植物中分离得到的一种重要的黄酮类化合物,具有广泛的生物活性,如抗氧化^[1]、抗炎^[2]、神经保护^[4]和抗病毒^[3]。研究表明,汉黄芩素还具有抗肿瘤生物活性,能影响多种肿瘤细胞生长,如骨髓性白血病细胞^[5]、乳腺癌细胞^[6]、小鼠 S180 肉瘤^[7]和膀胱癌细胞^[8]。另一方面,汉黄芩素抗肿瘤的体内实验显示其对于荷瘤动物的正常上皮、外周血和正常髓细胞几乎没有毒性或只有轻微毒性。因此汉黄芩素作为一种新的化疗药物或辅助化疗药物有着广阔的前景。本研究证实汉黄芩素对肝癌 HepG2 细胞生长有较明显的抑制作用,且呈量效和时效依赖性。

基因芯片技术检测汉黄芩素作用 48h 的肝癌细胞株 HepG2 基因组表达发现:有 295 个基因上调,111 个基因下调。其中涉及细胞周期和凋亡、细胞内信号转导、物质运输、转录调控等多种生理功能。其中以 DNA 损伤修复、细胞周期和 MAPK 信号通路的基因表达水平变化最为显著。

生长阻滞及 DNA 损伤诱导 45(growth arrest and DNA damage inducible 45, *GADD45*) 是 *p53*、*BRCA1* 的下游基因,*GADD45* 基因家族是 DNA 损伤修复的重要相关基因,其亚家族包含 3 个结构相似的酸性核蛋白 *GADD45α*、*GADD45β* 和 *GADD45γ*^[11]。汉黄芩素作用于 HepG2 细胞后能上调 *GADD45α*。*GADD45α* 是一个受高度调控的基因,编码由 165 个氨基酸组成的核蛋白^[11]。*GADD45α* 含有 *p53* 转录调控特异位点,*p53* 基因是一个广谱抑癌基因,参与细胞周期、细胞生长、细胞凋亡、DNA 损伤修复,在基因调控网络中具有中枢地位。*p53* 蛋白与它结合后,以增强子的方式在转录水平调节 *GADD45α* 的表达^[12]。在环境损伤因子作用下 *GADD45α* 结合 MEKK4 的 N 末端结构域介导 MEKK4 激活 P38 和 JNK 细胞内信号通路,通过 P38MAPK/JNK 通路介导细胞凋亡^[13]。另外,研究发现 *GADD45* 编码的核

蛋白能与其他蛋白如 PCNA、*p21*、核组蛋白、MTK1/MEKK4 激酶以及 Cdk1 等相互作用^[14],并参与多种信号通路的调节,在 NF- κ B^[15]、*p38/JNK*^[16]等的通路中发挥作用。

肝癌的发生与发展与细胞周期调控密切相关。细胞周期调控,可分为外源性调控和内源性调控。外源性调控主要是细胞因子和其他外界刺激引起的,而内源性调控通过细胞周期蛋白—细胞周期蛋白依赖性激酶—细胞周期蛋白依赖抑制蛋白进行网络调控来实现。这些调节基因的异常和异常表达在肝癌的发病中起关键作用。汉黄芩素作用肝癌细胞后,能上调细胞周期调控的调节因子 *p21*(*CDKN1A*)和 *p15*(*CDKN2B*)。*p15* 与 *CDK4* 和 *CDK6* 结合,抑制 *CDK4-cyclinD* 和 *CDK6-cyclinD*,阻断细胞生长于 G_1 期,抑制细胞增殖。*p21* 基因是 CIP 家族中的一员,它是位于 *p53* 基因下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子。*p21* 可以和 *p53* 共同构成细胞周期 G_1 检查站,因 DNA 损伤后不经过修复则无法通过,*p21* 能够增强 DNA 的修复,可以用来消除由 DNA 损伤积累而引起的肿瘤的发生,减少了受损 DNA 的复制和积累,从而发挥抑癌作用^[17]。

肿瘤的病因非常复杂,细胞信号转导系统异常与肿瘤的发生发展密切相关。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)系统作为调控细胞信号的主要途径之一,控制着细胞的增殖、分化、凋亡等过程,其某个环节发生问题可引起细胞生长失控,肿瘤发生。MAPK 家族包括 8 个亚家族,其中 JNK/MAPK 通路尤为重要。MAPK 级联具有高度保守性,采用三级激酶级联传递信号:细胞外刺激通过某些环节使 MAPK 激酶(MAPKKK)激活,转而激活 MAPK 激酶(MAPKK),然后再通过双位点磷酸化激活 MAPK。MAPK 活化后,磷酸化其下游底物——转录因子、蛋白激酶、酶、结构蛋白等,以此调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡和粘附、迁移等过程,继而影响肿瘤的发生、侵袭、转移以及耐药^[18,19]。不同的刺激活化不同的 MAPK 亚型,两种或者更多种 MAPK 级联的活化也能同时发生^[20]。MAPK 的多条信号通路间存在着广泛的交叉作用(cross-talk),几乎涉及激酶级联信号传递的每个水平。汉黄芩素作用肝癌细胞后,*MAP4K4* 基因上调,*ARP1*、*JUN*、*EGFR*、*MAP2K7* 基因下调。*MAP4Ks* 是 STE20 相关激酶,*JNK* 强的特异性激活剂。*JUN* 是一

种癌基因,研究表明,c-fos 和 c-jun 在正常肝组织中只有低水平表达或不表达,而在癌旁异型增生肝组织中均有表达^[21]。JUN 和 Fos 家族为核内两种重要的转录因子,JUN 家族包括 c-jun、junA、junB、junD。JUN 蛋白可形成同源二聚体或与 Fos 蛋白形成异二聚体构成 AP-1,调节肿瘤细胞的侵袭性生长、肿瘤血管生成以及肿瘤转移^[22]。EGFR 是一种细胞膜蛋白激酶受体,对维持细胞的生长、增殖等起关键作用,其过度激活可以促使恶性肿瘤细胞增殖和抑制凋亡,还能促进肿瘤转移和血管形成。抑制 EGFR 酪氨酸激酶活性,阻断其信号转导可抑制肿瘤生长。

总之,通过本研究提示,汉黄芩素抑制肝癌细胞的分子机制,可能通过上调细胞周期调控的调节因子 GADD45 α 、CDKN1A、CDKN2B,抑制细胞恶性增殖,并通过下调癌基因 JUN、表皮生长因子受体 EGFR 的表达,抑制肿瘤生长转移。

参考文献:

- [1] Lan Y, Xue LZ, Hong S, et al. Catalase suppression-mediated H₂O₂ accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation and sensitizes apoptosis[J]. *Cancer Sci*, 2011, 4(102): 870-876.
- [2] Chi YS, Lim H, Park H, et al. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(7): 1271-1278.
- [3] Ma SC, Du J, But PP, et al. Antiviral Chinese medical herbs against respiratory syncytial virus[J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79(2): 205-211.
- [4] Lee H, Kim YO, Kim H, et al. Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia[J]. *FASEB J*, 2003, 17(13): 1943-1944.
- [5] Lee WR, Shen SC, Lin HY, et al. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(2): 225-236.
- [6] Chung H, Jung YM, Shin DH, et al. Wogonin induces apoptosis and down-regulates survivin in human breast cancer MCF-7 cells by modulating PI3K-AKT pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(2): 334-341.
- [7] Wang W, Guo QL, You QD, et al. The anticancer activities of wogonin in murine sarcoma S180 both in vitro and in vivo [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(6): 1132-1137.
- [8] Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, et al. Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalin, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines [J]. *Urology*, 2000, 55(6): 951-955.
- [9] Liu ZL, Tanaka S, Horigome H, et al. Induction of apoptosis in human lung fibroblasts and peripherallymphocytes in vitro by Shosaikoto derived phenolic metabolites[J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(1): 37-41.
- [10] Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(1 Suppl 1): 48-50.
- [11] Han MH, Feng YM. Advance in research on relation of GADD45 α and tumours[J]. *Modern Oncology*, 2010, 2(18): 418-421. [韩敏辉, 冯英明. GADD45 α 与肿瘤关系的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 2(18): 418-421.]
- [12] Dong M, Zhou JP, Kong FM, et al. Expressions of p53 and GADD45 α proteins in human pancreatic cancer and their clinicopathological significance[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2005, 27(5): 628-632. [董明, 周建平, 孔凡民, 等. p53 和 GADD45 α 蛋白在胰腺癌组织中的表达及临床病理学意义[J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(5): 628-632.]
- [13] Mori M, Benotmane MA, Tirone I, et al. Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(13): 1489-1501.
- [14] Li J, Pan ZM, Pan XL. Advance in the research of gene Gadd45 [J]. *International Journal of Genetics*, 2007, 6(30): 195-197. [李军, 潘泽民, 潘晓琳. Gadd45 基因研究进展[J]. *国际遗传学杂志*, 2007, 6(30): 195-197.]
- [15] Zheng X, Zhang Y, Chen YQ, et al. Inhibition of NF- κ B stabilizes GADD45 α mRNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(1): 95-99.
- [16] Aleman MJ, De Young MP, Tress M, et al. Inhibition of Single Minded 2 gene expression mediates tumor-selective apoptosis and differentiation in human colon cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (36): 12765-12770.
- [17] Zhang M, Meng HBLG, Guo LY, et al. Advance in the research of gene p21 and tumor [J]. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine*, 2011, 14(9): 1410-1411. [张明, 孟和宝力高, 郭兰英, 等. p21 基因与肿瘤的研究进展[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2011, 14(9): 1410-1411.]
- [18] Engelberg D. Stress-activated protein kinases 2 tumor suppressors or tumor initiators? [J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(4): 271-282.
- [19] Dent P, Yacoub A, Fisher PB, et al. MAPK pathways in radiation responses[J]. *Oncogene*, 2003, 22(37): 5885-5896.
- [20] Yang YP, Li M. Antineoplastic agents targeting on MAPK signal transduction system [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2008, 6(35): 178-188. [杨亚平, 李敏. 作用于 MAPK 信号转导系统的抗肿瘤药物研究[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 6(35): 178-188.]
- [21] Zhang YC, Han XC, Jia MK, et al. Expression of c-fos and c-jun in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2002, 28(1): 46-48. [张颖超, 韩喜春, 贾明库, 等. 癌基因 c-fos 和 c-jun 在肝细胞型肝癌中的表达及临床意义[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2002, 28(1): 46-48.]
- [22] Guo GM, Wang MR. C-Jun and c-Fos and human tumor[J]. *Foreign Medical Sciences Genetics Section*, 2005, 8(28): 207-211. [郭光明, 王明荣. c-Jun 和 c-Fos 及其与人类肿瘤[J]. *国外医学(遗传学分册)*, 2005, 8(28): 207-211.]