

bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控

于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧

于卉影, 孙黎光, 中国医科大学生物化学教研室 辽宁省沈阳市 110001
孙利平, 沈阳市第七人民医院内科 辽宁省沈阳市 110003
丁晓慧, 日本三重大学医学部解剖学第二讲座博士
于卉影, 女, 1972-07-26 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 1994 年沈阳医学院医学系毕业, 2000 年中国医科大学硕士毕业, 现为中国医科大学细胞生物学博士研究生, 主要从事细胞信号转导与细胞周期调控的研究. 工作单位在沈阳军区总医院医学实验科.
国家自然科学基金资助课题, No. 39870384
项目负责人: 孙黎光, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学生物化学教研室.
电话: 024-23256666-5297
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

Effect of basic fibroblast growth factor on growth regulation in Bel-7402 cell line

Hui-Ying Yu, Li-Ping Sun, Li-Gung Sun, Xiao-Hui Ding

Hui-Ying Yu, Li-Gung Sun, Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Li-Ping Sun, Department of Gastroenterology, Shenyang No.7 People's Hospital, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Xiao-Hui Ding, Department of Anatomy, School of Medicine, Mie University, Japan
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39870384
Correspondence to: Li-Guang Sun, Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China.
Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-08

Abstract

AIM: To investigate whether bFGF regulates p21^{WAF1} expression of Bel-7402 cell line via PI3K/PKB pathway.

METHODS: ³²P incorporation assay. The expression of p21^{WAF1}-mRNA was assessed by RT-PCR. The expression of p21^{WAF1} protein was detected by Western blot. Cell cycle analysis was performed on a FACScan.

RESULTS: Both membrane and cytosol activity of PKB in Bel-7402 cell which were treated with bFGF (25 μg/L) reached the peak at 10 min. p21^{WAF1} mRNA level was upregulated and peaked at 1 h (5.5 fold induction). Correspondingly, p21^{WAF1} expression was increased and peaked at 2 h (2.2 folds of reduction). Wortmannin efficiently inhibited the activity of PKB ($P < 0.05$), but not the level of p21^{WAF1} mRNA and the expression of p21^{WAF1} protein. FCM analysis showed bFGF induced S-phase entry ($0.14 \pm 0.01 \rightarrow 0.28 \pm 0.01$, $P < 0.01$), which was inhibited by wortmannin effectively ($0.28 \pm 0.01 \rightarrow 0.22 \pm 0.01$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: bFGF stimulates the proliferation of Bel-7402 cell line via PI3K/PKB pathway, and modulates p21^{WAF1} expression through separating signaling pathways.

Yu HY, Sun LP, Sun LG, Ding XH. Effect of basic fibroblast growth factor on growth regulation in Bel-7402 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1333-1336

摘要

目的: 探讨bFGF是否通过PI3K/PKB途径调节p21^{WAF1}的表达。

方法: ³²P 掺入法检测 PKB 酶活性, RT-PCR、Western blot 检测不同处理组 Bel-7402 细胞的 p21^{WAF1} 表达, 流式细胞术分析细胞周期。

结果: 25 μg/L bFGF 刺激细胞 10 min, 就可使胞液和膜性 PKB 酶活性达高峰. p21^{WAF1} mRNA 表达水平在 1 h 达高峰, 比对照升高了 5.5 倍. p21^{WAF1} 蛋白表达在 2 h 达高峰, 比对照升高了 2.2 倍. wortmannin 预处理后, PKB 活性在各时间点均明显降低 ($P < 0.05$), p21^{WAF1} mRNA 表达及 p21^{WAF1} 蛋白表达无明显变化. 流式细胞术分析显示, bFGF 处理组与对照组相比 G1 期细胞减少 ($0.65 \pm 0.01 \rightarrow 0.49 \pm 0.02$, $P < 0.01$), S 期细胞增多 ($0.14 \pm 0.01 \rightarrow 0.28 \pm 0.01$, $P < 0.01$), wortmannin 能抑制此促增生作用 (G1: 0.58 ± 0.01 ; S: 0.22 ± 0.01 , $P < 0.01$).

结论: PI3K/PKB 途径可介导 bFGF 对 Bel-7402 细胞的促增生作用, 但是 bFGF 对 p21^{WAF1} 表达的调节作用不依赖 PI3K/PKB 途径。

于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧. bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1333-1336
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1333.asp>

0 引言

成纤维细胞生长因子(FGFs)和成纤维细胞生长因子受体的信号转导通路与肿瘤发生发展的关系极为密切, 是细胞信号转导研究的热点^[1-20]. PI3K/PKB 是近年来发现的一个新的生长因子信号转导途径. 越来越多的证据表明, PKB 与细胞代谢, 生长、凋亡、恶变等密切相关^[21-29]. p21^{WAF1} 是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白^[30-32], 他通过依赖和非依赖 P53 途径, 对细胞内信号和细胞外信号均能作出反应, 参与细胞生长、发育、分化、衰老及 DNA 损伤修复等多种功能的调节^[33-35]. 我们采用外源性 bFGF 直接作用于 Bel-7402 肝癌细胞, 观察其对 p21^{WAF1} 表达的影响, 探讨生长因子通过 PKB 途径调控细胞周期进程的信号转导机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 Bel-7402 购自是中科院上海细胞所, DMEM 培养基为 Gibco 公司产品, 小牛

血清购自华美生物工程公司, TRIzol 为 Life-Technology 公司产品, 扶济复(重组人 bFGF)购自北京双鹭药业有限公司, 组蛋白 2B 为 Roche 公司产品, cAMP 蛋白激酶抑制剂为 Sigma 公司产品, $[\gamma - ^{32}P]$ ATP 购于北京福瑞生物工程公司, 单克隆鼠抗人 p21^{WAF1}、辣根过氧化物酶标记的二抗和 ECL 试剂盒购于北京中山生物技术公司, TaKaRa RNA PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 ³²P 掺入法检测 PKB 酶活性 将对数生长期细胞 $1 \times 10^8/L$, 接种于培养瓶, 待达到 70% 融合时换成无血清 DMEM 培养液孵育过夜, 使细胞同步化, 然后随机按下述时间点和浓度点分组施加因素. 分组如下: (1) 不同剂量组: 0, 25, 50, 75 $\mu g/L$, 处理时间 10 min; (2) 不同时间组: 0, 5, 10, 60 min, 剂量为 25 $\mu g/L$; (3) wortmannin 预处理组: 处理时细胞同步化同前, 空白对照以等量二甲亚砜替代 wortmannin, 加入 wortmannin 终浓度 100 nmol/L, 置于细胞培养箱中孵育 1 h, 然后按(2)的各时间点加 bFGF 处理. 处理期间细胞置于细胞培养箱中. 处理结束后, 收集细胞, 用冰 PBS 洗涤 3 次. 按照文献[36]方法进行 PKB 酶活性检测.

1.2.2 Western blot 分析 取各组细胞 40 μg 总蛋白上样于 150 g/L SDS - PAGE 电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜上, 加入一抗, 孵育 2 h, 洗膜, 加入羊抗鼠辣根过氧化物酶标二抗, 孵育 2 h, 按 ECL 免疫印迹检测试剂盒说明进行显色、曝光. 分组如下: (1) bFGF 组: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 剂量为 25 $\mu g/L$; (2) wortmannin+bFGF 组: 先加入 100 nmol/L wortmannin, 孵育 1 h, 然后按(1)的各时间点加 bFGF 处理.

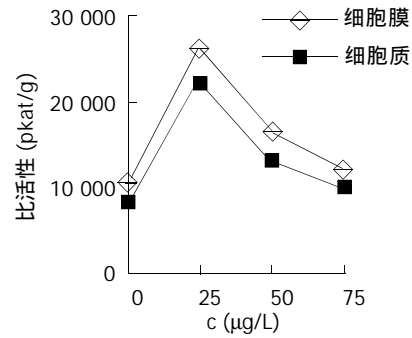
1.2.3 RT-PCR 检测 p21^{WAF1} mRNA 表达 应用 primer Primer5 软件设计引物, 由大连宝生物工程有限公司合成, p21^{WAF1}: 上游引物 5' -ACTTTGTCACCGAGACACA-3'; 下游引物 5' -CCTCAGCCTTCCAAGTAGC - 5'. β -actin: 上游引物 5' -GATGACCCAGATCATGTTTG-3'; 下游引物 5' -TGGAGTTGAAGGTAGTTTCG-3'. 按 Trizol 试剂操作说明提取各处理组细胞的总 RNA. 紫外检测仪分别在 260 nm 和 280 nm 波长下检测 RNA 的吸光度 A 值, 测定 RNA 的纯度. cDNA 合成后, 建立 25 μL 反应体系, 95 $^{\circ}C$ 预变性 90 s, 循环 28 次, 循环条件为: 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 58 $^{\circ}C$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min. 循环结束后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min. PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪扫描摄影. 分组如下: (1) bFGF 组: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 剂量为 25 $\mu g/L$; (2) wortmannin+bFGF 组: 先加入 100 nmol/L wortmannin, 孵育 1 h, 然后按(1)的各时间点加 bFGF 处理.

1.2.4 细胞周期分析 收集消化的贴壁细胞, 离心后重悬在含 100 mg/L RNA 酶和 10 g/L 碘化丙啶的 PBS 中, 用 FACScan 检测, 结果用 Cell-Quest 软件分析数据.

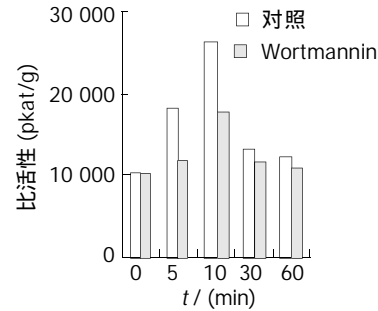
统计学处理 差异显著性采用 t 检验.

2 结果

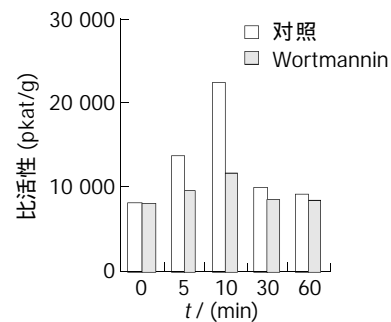
2.1 bFGF 激活 PKB 活性 采用外源性 bFGF 刺激细胞, 检测 PKB 酶活性, 计算比活性值绘制浓度曲线(图 1A)和时间曲线(图 1B, C). 结果发现, 不同浓度的 bFGF 孵育 Bel-7402 细胞迅速激活 PKB, 且膜性 PKB 活性高于胞液 PKB 活性. 25 $\mu g/L$ bFGF 刺激细胞 10 min, 就可使胞液和膜性 PKB 酶活性达高峰.



A 浓度曲线.

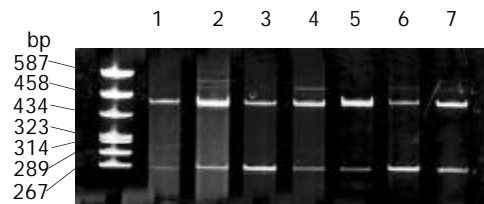


B 胞膜 PKB 活性.



C 胞液 PKB 活性.

图 1 bFGF 对 Bel-7402 细胞 PKB 活性的影响.



1: 对照; 2, 3, 4: bFGF 分别孵育 0.5, 1, 2 h; 5, 6, 7: wortmannin 预处理 1 h 后 bFGF 分别孵育 0.5, 1, 2 h.

图 2 RT-PCR 分析 bFGF 对 p21^{WAF1} 表达的影响.

2.2 bFGF 对 p21^{WAF1} 转录和表达的影响 经 25 $\mu g/L$ bFGF 处理后, Bel-7402 细胞 p21^{WAF1} mRNA 表达水平增高(见图 2), 在 1 h 达高峰, 与对照相比升高了 5.5 倍. Western

blot 分析显示, 经 25 $\mu\text{g/L}$ bFGF 处理后, Bel-7402 细胞的 p21^{WAF1} 蛋白表达增加, 在 2 h 达高峰, 与对照相比升高了 2.2 倍 (图 3).

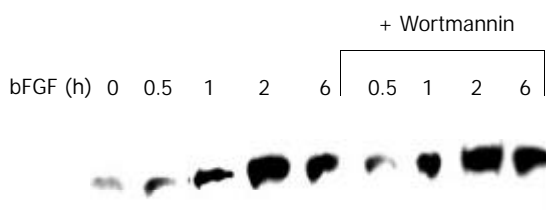


图 3 bFGF 对 p21^{WAF1} 蛋白表达的影响.

2.3 PI3K 抑制剂对 bFGF 作用的影响 经 PI3K 抑制剂 wortmannin 预处理与未经预处理的各组相比, PKB 活性在各时间点均存在显著差异 ($P < 0.05$), p21^{WAF1} mRNA 表达及 p21^{WAF1} 蛋白表达均无明显变化.

2.4 bFGF 调节细胞周期 FCM 显示, 经 25 $\mu\text{g/L}$ bFGF 孵育 16 h 后, 与对照组相比 G1 期细胞减少 ($0.65 \pm 0.01 \rightarrow 0.49 \pm 0.02$, $P < 0.01$), S 期细胞增多 ($0.14 \pm 0.01 \rightarrow 0.28 \pm 0.01$, $P < 0.01$), 但 wortmannin 能抑制此促增生作用 (G1: 0.58 ± 0.01 ; S: 0.22 ± 0.01 , $P < 0.01$).

3 讨论

大量研究表明, FGFS/FGFRS 信号传递与肿瘤发生发展的关系极为密切, 多种肿瘤细胞表达水平极高的 FGFR1 和 aFGF/bFGF, 以过量表达 FGFR1 和 aFGF/bFGF 为特征的自分泌信号环路是肿瘤细胞恶性增生的首要条件. 研究肿瘤细胞信号传导机制, 选择性的阻断肿瘤细胞自分泌或旁分泌的信号传导通路, 破坏其自控性生长调节机制, 正在成为极具吸引力的研究热点^[33]. p21^{WAF1} 是最早发现并克隆的周期素依赖性激酶抑制剂, 对细胞内信号和细胞外信号均能作出反应, 参加细胞多种功能活动^[30, 34]. p21^{WAF1} 通过抑制 Cyclin-CDK 复合物活性, 充当协调细胞周期转换、检查点控制的内部定时机制, 而外部生长控制信号通过影响 p21^{WAF1} 功能来控制细胞周期^[31, 35]. bFGF 作用于 MCF-7 细胞, 既能增加 p21^{WAF1} 的转录和表达并使 cdk2 失活及 Rb 去磷酸化, 降低 cyclin A 的表达, 同时又上调 G1 期蛋白如 cyclin D₁、cyclin E 和 cdk4 的表达, 此双重作用的结果是抑制 MCF-7 细胞的增生. FGF 通过不依赖 MAPK 的途径活化 STAT1, 上调 p21^{WAF1} 的 mRNA 水平和蛋白表达, 抑制 MCF-7 细胞增生^[18]. FGF-2 处理 NIH3T3 细胞后, 通过非依赖 MAPK 途径诱导 p21^{WAF1} 蛋白表达, 但 FGF-2 对 p21^{WAF1} mRNA 水平的上调作用部分依赖 MAPK 途径, 并且通过 MAPK 途径促进细胞进入 S 期^[19]. 我们采用外源性 bFGF 处理 Bel-7402 细胞, 结果表明 bFGF 能促进 p21^{WAF1} mRNA 水平升高, 导致 p21^{WAF1} 的表达增加. PI3K 抑制剂 wortmannin 预处理的细胞, 经 bFGF 刺激后, 在各时间点 p21^{WAF1} mRNA 水平无明显改变, 同时 p21^{WAF1} 表达水平也无明显变化, 表明 bFGF 对 Bel-7402

p21^{WAF1} 表达的影响是通过影响其转录活性实现的, 但是这种调节作用不依赖 PI3K/PKB 途径. FCM 检测细胞周期结果表明, bFGF 处理后细胞 G1 期比例下降, S 期比例增加, 这与 bFGF 促进细胞增生相符, 预先加入 PI3K 抑制剂 wortmannin 再用 bFGF 处理后, 这种促增生作用受到抑制 ($P < 0.01$), 提示 bFGF 通过 PI3K/PKB 途径促进细胞周期进程, 使细胞从 G1 期 \rightarrow S 期. 可见, bFGF 对 p21^{WAF1} 表达的诱导作用和对细胞周期进程的促进作用是通过不同途径实现的. 已知 p21^{WAF1} 是具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白, 可与几乎每一个 Cyclin-CDK 复合物结合. p21^{WAF1} 抑制 Cyclin D-CDK4 和 Cyclin E-CDK2 的活性, 使 Rb 蛋白不能磷酸化, 从而使细胞周期停止在 G1 期. p21^{WAF1} 通过与 Cyclin A-CDK2 结合间接抑制 DNA 合成^[32-36]. 本结果表明 bFGF 既能上调 p21^{WAF1} 的表达, 同时又促进细胞进入 S 期, 这似乎是矛盾的. 但是, 这两种作用是通过不同途径发生的. bFGF 能调节周期素和周期素依赖性激酶的表达^[17]. 因此, 我们可以初步推测如果 bFGF 诱导过量 Cyclin/CDK 的复合物形成, 超过了 p21^{WAF1} 的结合能力, 细胞将从 G1 期 \rightarrow S 期.

4 参考文献

- Zimering MB, Thakker-Varia S. Increased fibroblast growth factor-like autoantibodies in serum from a subset of patients with cancer-associated hypercalcemia. *Life Sci* 2002; 71: 2939-2959
- Keyes K, Cox K, Treadway P, Mann L, Shih C, Faul MM, Teicher BA. An in vitro tumor model: analysis of angiogenic factor expression after chemotherapy. *Cancer Res* 2002;62: 5597-5602
- Hu M, Nicolson GL, Trent JC 2nd, Yu D, Zhang L, Lang A, Killary A, Ellis LM, Bucana CD, Pollock RE. Characterization of 11 human sarcoma cell strains: evaluation of cytogenetics, tumorigenicity, metastasis, and production of angiogenic factors. *Cancer* 2002;95:1569-1576
- Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Makitaro R, Alftan H, Kinnula V, Leppa S. Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:5210-5217
- Coleman AB, Metz MZ, Donohue CA, Schwarz RE, Kane SE. Chemosensitization by fibroblast growth factor-2 is not dependent upon proliferation, S-phase accumulation, or p53 status. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1111-1123
- Jeffers M, LaRochelle WJ, Lichenstein HS. Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities. *Expert Opin Ther Targets* 2002;6:469-482
- Adriaenssens E, Lemoine J, El Yazidi-Belkoura I, Hondermarck H. Growth signaling in breast cancer cells: outcomes and promises of proteomics. *Biochem Pharmacol* 2002;64:797-803
- Dini G, Funghini S, Witort E, Magnelli L, Fanti E, Rifkin DB, Del Rosso M. Overexpression of the 18 kDa and 22/24 kDa FGF-2 isoforms results in differential drug resistance and amplification potential. *J Cell Physiol* 2002;193:64-72
- Glenjen N, Mosevoll KA, Bruserud O. Serum levels of angiogenin, basic fibroblast growth factor and endostatin in patients receiving intensive chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Int J Cancer* 2002;101:86-94
- Song Z, Wu X, Powell WC, Cardiff RD, Cohen MB, Tin RT, Matusik RJ, Miller GJ, Roy-Burman P. Fibroblast growth factor 8 isoform B overexpression in prostate epithelium: a new mouse model for prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 2002;62:5096-5105

- 11 Papanikolaou IS, Lazaris AC, Kavantzias N, Davaris PS. Minimal expression of the proto-oncogene int-2 encoded protein in a series of colorectal carcinomas. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:1084-1086
- 12 Pavlakovic H, Havers W, Schweigerer L. Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: implications for anti-angiogenic tumour therapy. *Angiogenesis* 2001;4:259-262
- 13 Berglund A, Molin D, Larsson A, Einarsson R, Glimelius B. Tumour markers as early predictors of response to chemotherapy in advanced colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1430-1437
- 14 Deniz ML, Kilic T, Almaata I, Kurtkaya O, Sav A, Pamir MN. Expression of growth factors and structural proteins in chordomas: basic fibroblast growth factor, transforming growth factor alpha, and fibronectin are correlated with recurrence. *Neurosurgery* 2002;51:753-760
- 15 Ngan ES, Ma ZQ, Chua SS, DeMayo FJ, Tsai SY. Inducible expression of FGF-3 in mouse mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11187-11192
- 16 Koh KR, Ohta K, Nakamae H, Hino M, Yamane T, Takubo T, Tatsumi N. Differential effects of fibroblast growth factor-4, epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 on functional development of stromal layers in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2002;26:933-938
- 17 Wang HS, Mark R, Eyal F, Anthony D, John M, Joachim Y, Robert W. Basic fibroblast growth factor causes growth arrest in MCF-7 human breast cancer cells while inducing both mitogenic and inhibitory G1 events. *Cancer Res* 1997;57:1750-1757
- 18 Johnson MR, Valentine C, Basilico C, Mansukhani A. FGF signaling activates STAT1 and p21 and inhibits the estrogen response and proliferation of MCF-7 cells. *Oncogene* 1998; 16:2647-2656
- 19 Kivinen L, Laiho M. Ras- and mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways in p21^{Cip1/Waf1} induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. *Cell Growth Differ* 1999;10:621-628
- 20 Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Gu XM, Jiang LX, Sun XQ, Sheng ZY. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol* 2000;6:353-355
- 21 Al-Sakkaf KA, Mooney LM, Dobson PR, Brown BL. Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *J Endocrinol* 2000;167:85-92
- 22 Demoulin JP, Grasso L, Atkins JM, Stevens M, Louahed J, Levitt RC, Nicolaidis NC, Renaud JC. Role of insulin receptor substrate-2 in interleukin-9-dependent proliferation. *FEBS Lett* 2000;482:200-204
- 23 Murao K, Ohyama T, Imachi H, Ishida T, Cao WM, Namihira H, Sato M, Wong NC, Takahara J. TNF-alpha stimulation of MCP-1 expression is mediated by the Akt/PKB signal transduction pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:791-796
- 24 Hixon ML, Muro-Cacho C, Wagner MW, Obejero-Paz C, Millie E, Fujio Y, Kureishi Y, Hassold T, Walsh K, Gualberto A. Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest* 2000; 106:1011-1120
- 25 Iynedjian PB, Roth RA, Fleischmann M, Gjinovci A. Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochem J* 2000;351:621-627
- 26 Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5991-6000
- 27 Ng SS, Tsao MS, Nicklee T, Hedley DW. Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2001;7:3269-3275
- 28 Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;107:80-88
- 29 Lorenzini A, Tresini M, Mawal-Dewan M, Frisoni L, Zhang H, Allen RG, Sell C, Cristofalo VJ. Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Exp Gerontol* 2002;37:1149-1156
- 30 Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol* 2000;48:190-202
- 31 Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21(WAF1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002;8:400-405
- 32 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
- 33 Yin F, Yao SK, Wu XM, Gao HS, Li ZH. Serapharmacological study of Ganzheng oral solution on proliferation and expression of ERK in SMMC-7721 cells with transforming growth factor α . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1017-1020
- 34 Hu PZ, Zhang CS, Ma FC, Yang SJ, Wang WL. Expressions of cyclin-dependent kinase inhibitor P21^{WAF1/CIP1} and PCNA in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:145-148
- 35 Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21^{WAF1} gene expression with P53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- 36 Liu SL, Liu GZ, Cheng J, Shi DY, Chen HL, Zhang YD. Influence of PKB on ROS regulation of proliferation in human 7721 hepatoma cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2002;34: 67-72