

胰岛素联合顺铂对人宫颈癌细胞株 HeLa 生长的影响

赵婷 张蓓

【摘要】 目的 观察胰岛素(INS)联合顺铂(DDP)对人宫颈癌 HeLa 细胞生长及凋亡的影响,并初步探讨其作用机制。方法 体外培养的人宫颈癌细胞株(HeLa)经 INS、DDP 单独或联合作用后,MTT 检测细胞增殖抑制情况;Annexin V-FITC 双染流式细胞术分析细胞凋亡;流式细胞仪检测不同加药处理组的细胞周期时相变化情况;Western blot 印迹方法检测细胞中 JNK2、p-JNK2 及 caspase-3 蛋白的表达情况。结果 MTT 结果显示:INS 无抑制细胞增殖作用,DDP 单药组与联合用药组均能抑制细胞的增殖,两药联合时细胞增殖抑制率明显高于 DDP 单药组,差异有统计学意义($P=0.000$),细胞凋亡结果显示:INS 无促细胞凋亡的作用,联合用药组的细胞凋亡率明显高于 DDP 单药组($P<0.01$)。细胞周期结果显示:DDP、INS 单药均能促进细胞由 G1 期向 S 期转变;联合用药组 HeLa 细胞 S 期比例增加更加明显,与 DDP 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 结果显示:实验组与对照组比较,JNK2 蛋白水平无明显变化,p-JNK2、caspase-3 于 DDP 组及 DDP+INS 组中表达增加,联合用药时增加更为明显,与 DDP 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),而在 INS 组中三种蛋白表达变化均不明显。结论 INS 可增强 DDP 对宫颈癌 HeLa 细胞的毒性作用,其机制可能与协同 DDP 促进细胞由 G0 期步入 S 期,上调 p-JNK2 及 caspase-3 蛋白表达有关。

【关键词】 胰岛素; 顺铂; 宫颈肿瘤; HeLa 细胞; 药物治疗

Enhancement of insulin on cisplatin sensitivity of HeLa cervical cancer cell line and the mechanism ZHAO Ting,ZHANG Bei. Graduate School, Xuzhou Medical College,Xuzhou 221002,China
Corresponding author:ZHANG Bei,Email:bettyzhang10@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect and mechanism of cisplatin(DDP) alone and in combination with Insulin upon the proliferation and cell apoptosis of human cervical cancer cells HeLa *in vitro*. **Methods** Cervical cancer cell line HeLa was incubated with 5 U/L INS, 7.26 mg/L DDP, and 5 U/L INS for 6 h followed by 7.26 mg/L DDP. Cell proliferation was determined by MTT assay. Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry was used to analyze apoptosis. Flow cytometry was used to study the cell cycle distribution of the HeLa cells of each group. The expression of JNK2, JNK2 phosphorylation and caspase-3 were detected by Western blot. **Results** The inhibiting rates of cells treated with the single DDP, and INS plus DDP for 12 h were $(21.11 \pm 1.36)\%$, $(48.06 \pm 2.66)\%$, respectively, the antiproliferation effect of INS combined with DDP group was superior to single DDP group($P=0.000$), but there was no significant difference between INS and control group. INS had no significant apoptosis-promoting effect. But the combined treatment group apoptosis rate was superior to single DDP group ($P<0.01$). Flow cytometry showed insulin can increase the S phase arrest induced by DDP. Western blot analysis showed that single group and INS combined with DDP group both unchanged the expression of total JNK2 protein, INS had no effect about the expression of JNK2 phosphorylation while DDP group and INS combined with DDP group increased the expression of JNK2 phosphorylation ($P<0.05$), and the effect was more obvious in INS combined with DDP group ($P<0.01$). The expression of caspase-3 had no significant difference between control group and INS group, but DDP group and INS combined with DDP group increased the expression of caspase-3 ($P<0.05$), and the effect was more obvious in INS combined with DDP group($P<0.01$). **Conclusion** INS combined with DDP can enable HeLa cells increased in S-phase, and DDP can activate the role of JNK signaling pathway to inhibit tumor cell's growth. Sensitizing effect of chemotherapy of insulin also may be related to synergies-DDP to enhance the level of phosphorylation of JNK2 and caspase-3.

【Key words】 Insulin; Cisplatin; Uterine cervical neoplasms; HeLa cells; Chemotherapy

有研究表明糖尿病患者发生各种恶性肿瘤的危险性明显高于正常人群^[1]。而众多化疗药物治疗量与中毒量相近,在杀灭肿瘤细胞的同时,对胰腺的正常组织亦有很大的损伤作用^[2],导致部分恶性肿瘤患者化疗过程中并发糖耐量异常乃至糖尿病,且增加了恶性肿瘤合并糖尿病患者的治疗风险。胰岛素(INS)作为治疗糖尿病的主要药物,它对化疗的影响是值得思考的问题。

增殖期(S期)细胞分裂旺盛,代谢活跃,对细胞毒药物敏感^[3]。分化差的细胞多处在增殖期,故化疗敏感性好,而分化好的细胞多处于休眠期(G₀期),往往能够躲过化疗药物的攻击,存活下来。但G₀期可以通过药物向S期转变,那么INS作为代谢促进剂,是否能够促进肿瘤细胞代谢和增殖,从而增强化疗效果呢?

顺铂(DDP)类药物在临床宫颈癌化疗中已取得肯定的疗效,但因其系统毒性和耐药性等问题,临床应用受到限制^[4],故无毒增效药物的研究具有深远的现实意义。本实验通过INS与DDP相互作用来探讨INS对宫颈癌是否存在化疗增敏作用及细胞增殖状态与DDP化疗敏感性的关系。

材料与方 法

一、材料

人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞株由徐州医学院药理学实验室提供。INS 购自江苏万邦生化医药有限公司。注射用 DDP 购自江苏豪森药业股份有限公司。噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司。细胞周期试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。兔源抗 SAPK/JNK2/3 (Ab-185) 抗体 (NO.B7129)、兔源抗 SAPK/JNK2/3 (p-Tyr185) 抗体 (NO.A7129) 均购自安博生物技术有限公司。兔抗原 Caspase-3 (D146) 抗体 (NO.BS1518) 购自上海起福生物科技有限公司。

二、方法

1. 细胞培养:人宫颈癌细胞 HeLa 在含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱内常规传代培养。实验用细胞均为对数生长期细胞。

2. 药物制备及实验分组:结合前期实验结果,INS 及 DDP 分别选取 5 U/L 及 7.26 mg/L,实验设有对照组(阴性对照),单药 INS (5 U/L) 处理组,单药 DDP (7.26 mg/L) 处理组,INS 联合 DDP 处理组 (5 U/L INS 预作用 6 h,再加入 7.26 mg/L DDP)。

3. MTT 实验:HeLa 细胞以 0.25%胰蛋白酶消化后,细胞计数,调整细胞密度为 8×10^4 /ml,以每孔 200 μ l 接种于一次性 96 孔培养板中,24 h 后弃上清,分别加

入 100 μ l 含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,然后加入含不同药物的培养液 100 μ l,使 INS 终浓度为 5 U/L,DDP 终浓度为 7.26 mg/L,联合用药组则先加入 INS (终浓度为 5 U/L),作用 6 h 后再加入 DDP,使其终浓度达到 7.26 mg/L,共同孵育 12 h,同时设只加培养液的调零孔和不加药物的对照组,每组设 5 个复孔。然后每孔加入 5 g/L MTT 25 μ l/L,避光继续孵育 4 h,终止培养,弃上清。每孔加入 DMSO 150 μ l,震荡 10 min 后测定各孔在 490 nm 处的光密度值(OD 值)。计算抑制率:抑制率=1-(实验组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。

4. Annexin V-FITC 双染结合流式细胞术检测 HeLa 细胞的凋亡:收集不同药物作用后的细胞及细胞培养液,按照 Annexin V-FITC 试剂盒说明,1000 r/min 离心 5 min (TGL-16 B 台式离心机上海安亭科学仪器厂),弃上清,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 1×10^6 个重悬的细胞,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 195 μ l Annexin V-FITC 结合液重悬细胞。加入 5 μ l Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育 10 min。1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 190 μ l Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10 μ l 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测。

5. 流式细胞仪测定细胞周期时相:HeLa 细胞以 0.25%胰蛋白酶消化后,细胞计数,调整密度为 6×10^6 个细胞移入离心管中,1000 r/min,离心 5 min, PBS 洗 2 次,1000 r/min,离心 5 min,弃上清后,在离心管中留约 0.5 ml PBS,将细胞混匀,加 70%乙醇到细胞悬液中,迅速混匀,置 4 °C 8 h 以上,然后 1000 r/min,离心 5 min,去乙醇,加适量 PBS 重悬细胞,1000 r/min,洗 1 次,留 0.4 ml PBS,重悬细胞,加入 RNA 酶 5 μ l (10 g/L),37 °C 作用 0.5 h,再加碘化丙啶 (PI) 100 mg/L,4 °C 下避光染色,30 min 后以流式细胞仪检测,分析各组细胞周期分布。

6. Western 印迹检测宫颈癌细胞 HeLa 内 JNK2、p-JNK2、caspase-3 蛋白表达变化:细胞加药后共同培养 12 h 提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度,定量后取 100 μ g/孔上样,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,转移蛋白至 NC 膜上,封闭液封闭 120 min,室温加入相应兔抗人 JNK 抗体 (1:2000)、兔抗人 p-JNK 抗体 (1:2000)、兔抗人 Caspase-3 抗体 (1:1000),4 °C 孵育过夜,Western 洗涤液洗涤 3 次,加入碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG (1:1500),室温孵育 2 h,洗涤液洗膜,BCIP/NBT 显色,GAPDH 为内对照。利用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析,以 JNK2、

p-JNK2 与相应 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达含量, Image J 软件将胶片上的蛋白特异性条带灰度值数字化并分析其与 GAPDH 条带灰度值的比值确定 JNK2、p-JNK2、caspase-3 的表达水平。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间均数比较用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 组间两两比较用 LSD 或 Dunnett T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MTT 法检测 INS、DDP 及二者联合对人宫颈癌细胞 HeLa 增殖的影响: 结果显示: INS 组、DDP 组与联合用药组抑制率分别为 $(1.02 \pm 0.05)\%$ 、 $(21.11 \pm 1.36)\%$ 、 $(48.06 \pm 2.66)\%$, INS 无抑制细胞增殖作用, 联合用药时细胞增殖抑制率明显高于 DDP 单药组, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。

2. Annexin V-FITC 双染结合流式细胞术检测 INS、DDP 及两者联合作用后人宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡率: 对照组细胞总凋亡率为 $(13.50 \pm 0.72)\%$, 5 U/L INS 组细胞总凋亡率为 $(9.92 \pm 1.91)\%$, 7.26 mg/L DDP 组细胞总凋亡率为 $(52.55 \pm 3.34)\%$, 5 U/L INS 联合 7.26 mg/L DDP 组细胞总凋亡率上升为 $(69.35 \pm 0.60)\%$ 。INS 组与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P = 0.221$)。其余各组与对照组相比均有统计学差异 ($P < 0.01$)。说明 INS 对细胞凋亡无明显影响, DDP 单药及联合用药均能促进细胞凋亡, 而联合用药组凋亡率明显高于 DDP 单药组, 两者相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

3. PI 法结合流式细胞术检测 INS、DDP 及两者联合作用后人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞周期的变化: 结果可见单药 INS 组、DDP 组 S 期细胞比例较对照组明显增高 ($P < 0.05$); 联合用药组 S 期细胞比例较前三组增加更加明显 ($P < 0.05$) (表 1, 图 2)。

表 1 INS、DDP 及两药联合对宫颈癌 HeLa 细胞周期的影响
(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

| 组别 | G0~G1 | S | G2~M |
|-------|--------------|----------------------------|-------------|
| 对照组 | 60.45 ± 0.48 | 31.55 ± 0.48 | 8.00 ± 0.00 |
| INS 组 | 49.85 ± 2.82 | 43.77 ± 1.16 ^a | 6.38 ± 1.89 |
| DDP 组 | 56.73 ± 1.37 | 38.40 ± 1.02 ^a | 4.87 ± 0.37 |
| 联合组 | 38.59 ± 2.81 | 61.41 ± 3.03 ^{ab} | 0.00 ± 0.00 |

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与 DDP 组相比, ^b $P < 0.05$

4. Western blot 检测人宫颈癌细胞 HeLa 细胞内 JNK2、p-JNK2、caspase-3 蛋白表达变化: 实验组与对照组比较, JNK2 蛋白水平无明显变化, p-JNK2、caspase-3 于 DDP 组及联合用药组中表达增加, 两药联

合时增加更为明显, 与 DDP 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在 INS 组中三种蛋白表达变化均不明显 (图 3, 4)。

讨 论

最新研究表明, 糖尿病患者罹患肝癌、胰腺癌、结直肠癌、乳腺癌及肾癌等恶性肿瘤的风险增加, 且有关糖尿病患者肿瘤死亡率的研究报道逐渐增多, 如 Meyerhardt 等^[5]研究显示罹患糖尿病严重影响结肠癌患者的存活率, 与非糖尿病肿瘤患者相比, 其死亡危险比为 1.41:1, 且肿瘤复发率明显升高。不仅如此, 癌症患者化疗时能严重影响患者血糖, 类似报道屡见不鲜。2006 年 8 月美国国立癌症研究所新版《常见不良事件评价标准》已将化疗对恶性肿瘤患者血糖的影响和化疗对恶性肿瘤合并糖尿病患者血糖的影响纳入了化疗毒副作用评价体系^[6]。而 INS 作为糖尿病患者的重要治疗药物, 其对化疗效果的影响在临床治疗中显得至关重要。

在肿瘤的治疗中发现恶性程度低的肿瘤细胞多处于休眠期 (G0 期), 化疗敏感性差, 恶性程度高的肿瘤细胞多处于增殖期 (S 期), 化疗敏感性好。且 G0 期细胞在一定的条件下也能进入增殖状态, 从而提高化疗敏感性。INS 作为一种代谢促进剂, 已被证实可提高脂质体紫杉醇对子宫内膜癌的抑制率^[7], 但在宫颈癌中尚未见报道。

人体所有细胞都含有 INS 受体, 一方面 INS 与细胞膜上的受体结合后能促使 DNA 复制, 引起细胞分裂增殖。另一方面, 它还可以刺激肿瘤细胞的生长增殖, 诱导肿瘤细胞进入增殖周期^[8-9]。由于 INS 受体在肿瘤组织中的表达高于相应正常组织 6~10 倍, 因而 INS 对化疗药物的增效作用主要是针对肿瘤组织, 而对正常组织的影响相对很小^[10]。

本实验 MTT 法证实 INS 对宫颈癌 HeLa 细胞具有较强的化疗增敏性, 5 U/L INS 联合 7.26 mg/L DDP 在体外能有效抑制人宫颈癌细胞 HeLa 的增殖, 与 DDP 单药相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。同时, 流式细胞仪检测细胞凋亡实验进一步证实了 INS 的化疗增敏作用。7.26 mg/L DDP 作用后 HeLa 细胞的凋亡率为 $(52.55 \pm 3.34)\%$, 5 U/L INS 预作用 6 h 后联合 DDP 用药, 细胞凋亡率上升为 $(69.35 \pm 0.60)\%$, 促凋亡作用明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

为了进一步探讨 HeLa 细胞增殖状态与化疗敏感性的关系, 本实验对细胞周期分布进行了检测。DDP 是广谱抗癌药, 为铂的金属络合物, 作用似烷化剂, 主要作用靶点为 DNA, 属细胞周期非特异性药物, 是最早被认同的对宫颈癌单药有效的药物, 对宫颈癌的单药有效率在 17%~38%^[11]。

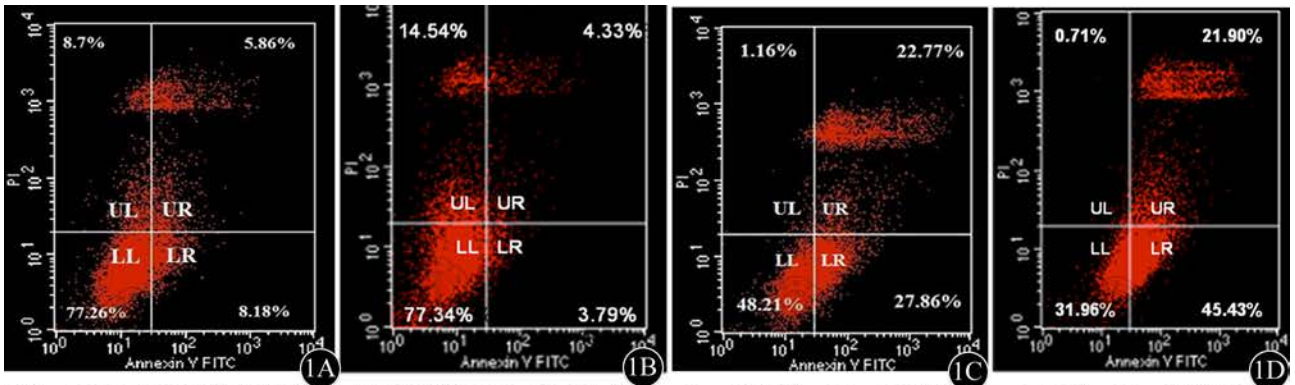


图1 DDP与INS单用及两者联合作用对细胞 HeLa 凋亡的影响。1A: 对照组; 1B: INS组; 1C: DDP组; 1D: 联合用药组

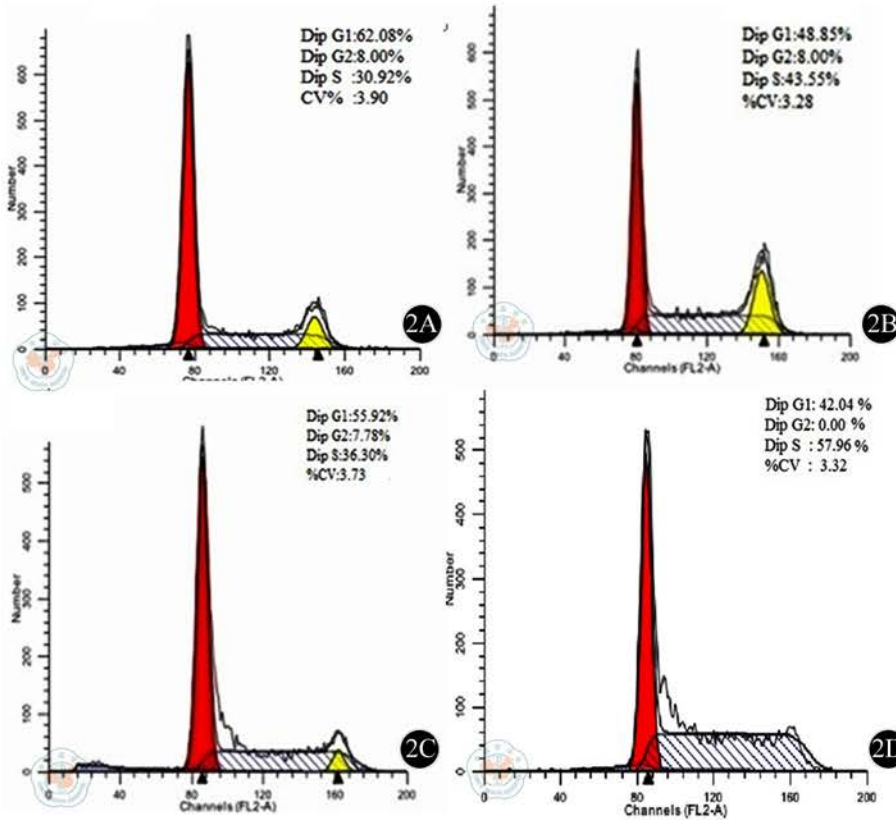


图2 DDP与INS单用及两者联合作用对细胞 HeLa 周期的影响。2A: 对照组; 2B: INS组; 2C: DDP组; 2D: 联合用药组

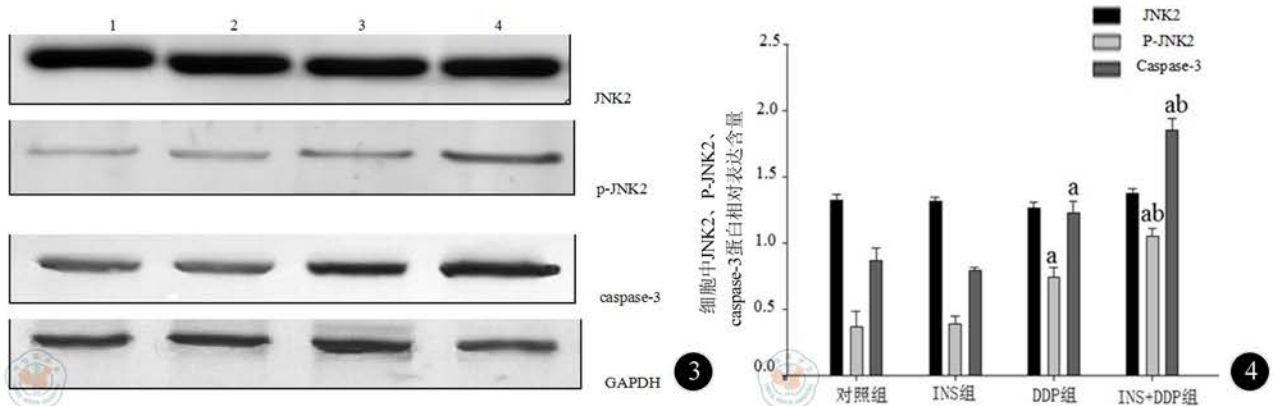


图3 DDP与INS单用及两者联合作用 JNK2、p-JNK2、caspase-3 蛋白表达。1: 对照组; 2: INS组; 3: DDP组; 4: 联合用药组 图4 DDP与INS单用及两者联合作用 JNK2、p-JNK2、caspase-3蛋白表达。与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 DDP组比较, ^b $P < 0.01$

已有研究发现将 DDP 作用于肝癌细胞发现随着药物浓度的升高, 细胞周期 S 期比例下降, G0/G1 期比例上升, PI 增殖指数下降, 从而得出 DDP 能使肝癌细胞周期 G0/G1 期阻滞, 使细胞分裂增殖活动受到抑制的结论。还有研究^[12]发现低浓度 DDP 将癌细胞阻滞在 G0-G1 期, 而高浓度的 DDP 则阻滞在 S-G2 期, 因此 DDP 对细胞周期的影响是多方面的, 细胞株种属、来源的不同以及 DDP 浓度的高低和作用时间的长短可能都会影响细胞周期的变化。而本实验中 DDP (7.26 mg/L) 作用于宫颈癌 HeLa 细胞后, 细胞 S 期比例明显增高, INS 亦能明显促进宫颈癌 HeLa 细胞步入 S 期, 而两者联用其 S 期阻滞效果具有协同作用, 有丝分裂活跃期可能为 DDP 作用于宫颈癌 HeLa 细胞的周期靶点, INS 能够促进癌细胞进入增殖状态, 使得敏感靶细胞增多, 从而起到化疗增敏作用。

目前, INS 的化疗增敏作用已被多名学者实验证实, 但其相关分子机制依然鲜少涉及。Miglietta 等^[13]发现 INS 能够增加乳腺癌细胞株 MCF-7 对紫杉醇的反应性, 并认为 INS 影响紫杉醇介导的微管重聚合, 是通过影响促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径, Raf-1 活性和 p53 表达而实现的。MAPK 是广泛表达的丝氨酸/酪氨酸激酶, 包含 3 个主要家族: ERKs, JNKs 和 p38 MAPKs, MAPK 信号转导通路在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有至关重要的作用。JNK 又被称为应激活化蛋白激酶 (stress activated kinases, SAPK), 是 1990 年被发现的促分裂原活化蛋白激酶, 为 MAPK 家族的主要成员之一。JNK 基因有 3 个亚型, 即 JNK1, JNK2 和 JNK3。JNK1 和 JNK2 在组织中广泛表达, 而 JNK3 仅在脑、心和睾丸中表达^[14]。有研究表明 INS 通过磷脂酰肌醇 3 激酶途径来调节各种代谢途径, 而 JNK 正是通过介导 INS 的代谢功能来发挥作用。JNK 激活还能增加 INS 受体底物 1 中丝氨酸磷酸化, 从而损害 INS 信号通路。Karpac 等^[15]曾报道: 在无脊椎动物中, 活化的 JNK 蛋白能主导性地抑制 INS 信号通路介导的细胞代谢生长作用并诱导 FoxO 基因的核异位。而在脊椎动物中, JNK 能使 INS 受体基质磷酸化, 抑制 INS 信号传导, 且磷酸化的 JNK 蛋白亦能直接活化 FoxO。Liu 等^[16]发现 INS 可以通过激活 JNK 信号通路减轻缺血再灌注心肌的损伤, 从而改善心肌功能。故透彻研究 JNK 与 INS 信号通路两者之间相互关系可以为治疗代谢及肿瘤疾病起到至关重要的作用。目前许多的实验都在肿瘤中观察到 JNK 的活性增高。Uhlirova 等^[17]通过致癌

物 Ras/Raf 诱导的果蝇肿瘤形成中发现, Raf 与 JNK 起协同作用, 诱导细胞的异常增生。另一项肝癌的实验表明, 由化学物质二乙基亚硝胺诱导的肝癌中, JNK 被持久激活, 而 JNK1 基因剔除的小鼠对二乙基亚硝胺诱导的肝癌敏感性降低。相反, 有些实验却发现 JNK 与抑制肿瘤有关系。Winn 等^[18]通过体外非小细胞肺癌的研究发现, JNK 的激活能够抑制肿瘤的形成、维持上皮的分化和抑制变异细胞的生长, 故 JNK 的激活与肿瘤细胞的生长之间的关系尚存在诸多争议。本实验中, 实验组与对照组比较, JNK2 蛋白水平无明显变化, p-JNK2、caspase-3 于 DDP 组联合用药组中表达增加, 以两药联合时增加更为明显, 与 DDP 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在 INS 组中三种蛋白表达变化均不明显。这说明磷酸化 JNK2 及 caspase-3 蛋白高表达可能为 INS 增强 DDP 对 HeLa 细胞抑制作用的机制。

一种药物虽不具有某种特殊的效应, 却能使相关组织或受体增强对其他药物的反应性, 称为敏感化作用。在宫颈癌 HeLa 细胞中, INS 具有显著的化疗增敏作用, INS 剂量与作用时间的适当选择至关重要。其增敏效应可能为: (1) 通过协同 DDP 阻滞细胞于 S 期, 为 DDP 化疗提供更多的敏感靶细胞; (2) 联合 DDP 后增高 JNK 蛋白磷酸化水平; (3) 增加凋亡蛋白 caspase-3 蛋白的表达。临床应用 INS 可作为一种辅助化疗药物, 减少 DDP 用量, 减轻其毒副作用, 提高恶性肿瘤合并糖尿病患者生存质量。

参 考 文 献

- [1] Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, et al. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol*, 2004, 159:1160-1167.
- [2] Kanitkar M, Gokhale K, Galande S, et al. Novel role of curcumin in the prevention of cytokine-induced islet death in vitro and diabetogenesis in vivo. *Br J Pharmacol*, 2008, 155:702-713.
- [3] Dunn SE, Torres JV, Nihei N, et al. The insulin-like growth factor-1 elevates urokinase-type plasminogen activator-1 in human breast cancer cells: a new avenue for breast cancer therapy. *Mol Carcinog*, 2000, 27: 10-17.
- [4] 赵树泉, 梁富程, 王晓谦, 等. 中西医对抑制顺铂毒副作用的研究进展. *使用癌症杂志*, 2011, 26:546-547.
- [5] Meyerhardt JA, Catalano PJ, Haller DG, et al. Impact of diabetes mellitus on outcomes in patients with colon cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21: 433-440.
- [6] Cancer Therapy Evaluation Program. Common terminology criteria for adverse events. Version 3.0. NCI, 2003: 18.
- [7] 杜璇. 胰岛素对子宫内膜癌化疗增敏的体外实验. 华中科技大学, 2009.
- [8] Barbour LA, Mizanoor Rahman S, Gurevich I, et al. Increased P85 alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem*, 2005, 280: 37489-37494.

- [9] Kamat AA, Merritt WM, Coffey D, et al. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, 13:7487-7495.
- [10] Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des*, 2007, 13:671-686.
- [11] Long HJ 3rd. Management of metastatic cervical cancer: review of the literature. *J Clin Oncol*, 2007, 25:2966-2974.
- [12] Crescenzi E, Chiaviello A, Canti G, et al. Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5:776-785.
- [13] Miglietta A, Panno ML, Bozzo F, et al. Insulin can modulate MCF-7 cell response to paclitaxel. *Cancer Lett*, 2004, 209:139-145.
- [14] Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res*, 2005, 15:36-42.
- [15] Karpac J, Jasper H. Insulin and JNK: optimizing metabolic homeostasis and lifespan. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20: 100-106.
- [16] Liu HT, Zhang HF, Si R, et al. Insulin protects isolated hearts from Ischemia/ reperfusion injury: Cross-talk between P13K/Akt and JNKs. *Sheng Li Xue Bao*, 2007, 59:651-659.
- [17] Uhlrova M, Jasper H, Bohmann D. Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a Drosophila tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:13123-13128.
- [18] Winn RA, Marek L, Han SY, et al. Restoration of wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. *J Biol Chem*, 2005, 280:19625-19634.

(收稿日期: 2013-04-19)

(本文编辑: 戚红丹)

赵婷, 张蓓. 胰岛素联合顺铂对人宫颈癌细胞株 HeLa 生长的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (14): 6495-6500.

