

· 经典名方 ·

基于 Cx32 探讨六味地黄丸增效自杀基因抗肝癌的 缝隙连接机制

易华¹, 苏俊芳¹, 李雪¹, 吴绍峰¹, 赵婷秀¹, 李巧¹, 邹一丹¹, 林国莉², 杜标炎^{1*}

(1. 广州中医药大学 基础医学院, 中药学院, 广州 510006;

2. 中山大学 附属第三医院, 广州 510630)

[摘要] 目的:探讨六味地黄丸对大鼠肝癌细胞株 CBRH7919 缝隙连接蛋白(connexin, Cx)32 及间隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)的影响,进一步研究其增强自杀基因旁杀伤效应的机制。方法:六味地黄丸(32 g·kg·d⁻¹)与等体积的生理盐水灌胃大鼠,取血制备含药血清及空白血清,采用不同浓度的六味地黄丸含药血清及空白血清分别对 CBRH7919 细胞进行处理。实验分为 4 组,即空白组(体积分数为 10% 空白鼠血清),六味地黄丸含药血清高、中、低浓度组(10%、5%、2.5% 含药鼠血清)。应用间接免疫荧光法、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肝癌细胞 Cx32 蛋白及 mRNA 表达,应用光漂白恢复技术检测各组肝癌 CBRH7919 细胞 GJIC 功能。结果:①间接免疫荧光检测结果显示,与空白组比较,六味地黄丸含药血清各浓度组对 CBRH7919 细胞 Cx32 的表达具有浓度依赖性上调作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),尤其在细胞膜上的表达增多。②Real-time PCR 结果表明,六味地黄丸各剂量组均可提高 Cx32 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),且具有一定的量效关系;③光漂白恢复技术检测结果表明,六味地黄丸各组的平均荧光恢复率高于空白组,并呈现出一定的浓度依赖趋势。结论:六味地黄丸增强自杀基因旁杀伤效应的机制与缝隙连接有关,可能是通过增加 CBRH7919 细胞 Cx32 在细胞膜上的定位,提高 Cx32 mRNA 及蛋白水平的表达,从而增强 GJIC 功能而达到增效作用。

[关键词] 肝癌细胞; 六味地黄丸; 血清药理学; 基因治疗; 旁杀伤效应; 缝隙连接

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0076-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190113

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181015.1719.008.html>

[网络出版时间] 2018-10-19 10:00

Mechanism of Liuwei Dihuangwan in Enhancing Hepatocarcinoma Suicide Gene Therapy from Cx32

YI Hua¹, SU Jun-fang¹, LI Xue¹, WU Shao-feng¹, ZHAO Ting-xiu¹, LI Qiao¹,

ZOU Yi-dan¹, LIN Guo-li², DU Biao-yan^{1*}

(1. School of Basic Medicine, School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of

Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Liuwei Dihuangwan on connexin 32 (Cx32) in hepatoma cell line CBRH7919 and its gap junction intercellular communication (GJIC), and furthermore study its mechanism of enhancing the bystander killing effect of suicide gene therapy. **Method:** Liuwei Dihuangwan

[收稿日期] 20180404(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403202);广东省自然科学基金项目(2014A030313416);广州中医药大学“青年英才培养工程”项目(QNYC20140103);广东省科技计划项目(2012B031800069)

[第一作者] 易华, 博士, 副教授, 从事中西医结合预防肿瘤研究, E-mail:020693@gzucm.edu.cn

[通信作者] * 杜标炎, 博士, 教授, 从事中西医结合抗肿瘤研究, Tel:020-39358015, E-mail:dubycbill@sohu.com

($32 \text{ g} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$) and the same volume of normal saline were given to the rats by intragastrical administration. Blood was taken to prepare the medicated serum of Liuwei Dihuangwan and blank control serum, respectively. The hepatoma cell line CBRH7919 were treated by control serum and medicated serum of Liuwei Dihuangwan in different concentrations. There were four groups in experiment: the blank control group (volume fraction of 10%), medicated serum high dose group of Liuwei Dihuangwan (the volume fraction of 10%), medicated serum middle dose group of Liuwei Dihuangwan (the volume fraction of 5%), and medicated serum low dose group of Liuwei Dihuangwan (the volume fraction of 2.5%). The expression levels of Cx32 protein and mRNA in hepatoma cell line CBRH7919 were detected by indirect immunofluorescence assay (IFA) and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) assay. The fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP) method was used to detect the function of GJIC of hepatoma cell line CBRH7919. **Result:** ① The indirect immunofluorescence assay (IFA) analysis indicated that as compared with the blank control group, the cx32 expression of CBRH7919 cells was up-regulated in a concentration-dependent manner in each dose group of the serum containing Liuwei Dihuangwan ($P < 0.05$ in low dosage group; $P < 0.01$ in middle dosage and high dosage group), especially on cell membrane. ② The results of Real-time PCR assay indicated that as compared with the blank control group, the expression of Cx32 mRNA was increased in each dose group ($P < 0.05$ in low dose group, $P < 0.01$ in middle and high dose group) in a dose-effect relationship. ③ The result of fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP) analysis indicated that the average fluorescence recovery rates of drug groups were significantly higher than that in blank control group, and also showed a certain concentration-dependent trend. **Conclusion:** The mechanism of medicated serum of Liuwei Dihuangwan in enhancing the bystander killing effect of suicide genes related to gap junction. Liuwei Dihuangwan may enhance the function of GJIC by increasing the localization of cx32 on the cell membrane of CBRH7919 cells and increasing the expression of cx32 mRNA and protein to achieve the synergistic action.

[**Key words**] hepatocarcinoma cell; Liuwei Dihuangwan; serum pharmacology; gene therapy; bystander killing effect; gap junction

自杀基因治疗系统在肿瘤治疗方面应用前景良好,但大多数单纯依赖自杀基因治疗的疗法难以达到完全治愈肿瘤的效果,自杀基因治疗与其他治疗方法进行联合成为未来肿瘤治疗的重要方向^[1-4]。研究显示,增强缝隙连接蛋白的表达可以改善间隙连接细胞间通讯(GJIC),从而增强自杀基因系统对肿瘤的杀伤作用^[5-6]。中药因资源广泛、毒性低、多靶点等特点在抗肿瘤中的作用日益受到人们的重视。

课题组前期系列研究表明,滋阴补肾的经典复方六味地黄丸对 HSV-tk/GCV 自杀基因系统治疗恶性肿瘤具有良好的协同增效作用,其增效作用主要与旁杀伤效应相关^[7-9]。在自杀基因杀伤肿瘤细胞过程中,缝隙连接(GJ)机制被认为旁杀伤效应的主要机制之一。近期课题组也发现六味地黄丸能影响肝癌细胞某些缝隙连接蛋白(Cx)43 的表达^[6]。另有研究表明,由正常肝组织向肝癌发展过程中,Cx32 蛋白的表达定位由细胞膜逐渐改变为细胞浆定位,在肝癌组织中 Cx32 在蛋白及 mRNA 水平均

降低^[6],六味地黄丸是否能影响 Cx32 的表达量及细胞膜定位未见报道。本研究以肝细胞缝隙连接蛋白 Cx32 为靶点,采用血清药理学方法,检测六味地黄丸含药血清对肝癌细胞 GJIC 功能和 Cx32 蛋白表达的影响,且对其影响 Cx32 蛋白在肝癌细胞的定位进行了探究,进一步明确其增强自杀基因治疗效果的缝隙连接机制。

1 材料

1.1 动物和细胞株 清洁级 SD 大鼠,雄性,体质量 230 ~ 280 g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2008-0020,实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审查和批准。大鼠肝癌细胞株 CBRH7919 购于中山大学动物中心细胞库。

1.2 药物与试剂 RPMI 1640 培养基,0.25% 含 EDTA 的胰酶消化液(Gibco 公司,货号分别为 12633012,25200-056);青-链霉素溶液(杭州吉诺生物医药技术有限公司,批号 GNM-15140);六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司,国药准字 Z11021283);牛血清蛋白(BSA, Sigma 公司,批号

MYA8020-100); RNA 提取试剂盒 trizol reagent, Superscript III Reverse Transcriptase(Invitrogen 公司,批号分别为 15596026,18080044); Revertra Acea, Real-time PCR Master Mix, Blend Taq, DNA 100 bp Marker (Toyobo 公司,批号分别为 FSK-100, QPK-101, BTQ-101, DNA-030); DNase I (RNase Free) [宝生物工程(大连)有限公司,批号 D2215]; Cx32 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Proteintech Group 公司,批号 10450-1-AP); FITC 标记的山羊抗兔多克隆抗体(KPL 公司,批号 4030-02)。

1.3 仪器 Icyler 5 色型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 仪, Icyler version3. 1. 7050 荧光定量分析软件(美国 Bio-Rad 公司); BNA-311 型 CO₂ 培养箱(日本 Espec 公司); LSM510 META DUO SCAN 型激光扫描共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司); GIS 数码凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 血清的制备 对 SD 大鼠(36 只)进行随机分组,分别为空白血清组和六味地黄丸含药血清组。参照本课题组前期使用的六味地黄丸含药血清的制备方法,六味地黄丸含药血清组采用六味地黄丸(32 g·kg·d⁻¹)对大鼠进行灌胃,空白血清组大鼠以等量生理盐水进行灌胃^[8];时间为早上给药 1 次,后 8 h 再给药 1 次,连续给药 4 d,第 5 天进行取血,取血前禁食 16 h(不禁水),上午灌胃 1 次,2 h 后再灌胃 1 次,1 h 后取血。将离心管中的全血于室温放置 3 h 后,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清;将同组血清吸取混合,后水浴 56 °C 灭活 30 min,在超净工作台内对血清进行过滤(0.22 μm),用 1.5 mL 离心管分装并于 -80 °C 冰箱保存。

2.2 细胞培养 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基培养 CBRH7919 细胞,恒温培养箱 37 °C 5% CO₂ 培养。

2.3 分组 实验设置 4 组,分别为空白组、六味地黄丸含药血清低、中、高浓度组。根据前期实验结果,实验确定各组均选择 10% 体积分数的血清浓度(此浓度对细胞生长和细胞形态影响较小),六味地黄丸含药血清分为低浓度组(7.5% 空白血清 + 2.5% 含药血清);中浓度组(5% 空白血清 + 5% 含药血清);高浓度组(10% 含药血清)。血清处理时间为 48 h。

2.4 指标检测

2.4.1 FITC 间接免疫荧光检测肝癌 CBRH7919 细胞 Cx32 蛋白表达 CBRH7919 细胞生长至对数期

后消化细胞并使用培养基混匀制成单细胞悬液,进行细胞计数,将细胞密度调节至 1 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板中;按照上述方法设置六味地黄丸含药血清低、中、高浓度组,空白血清组;各组分别加入对应血清放入培养箱中处理 48 h。弃去培养液,各组分别滴加磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL 漂洗标本,重复 3 次;使用 4% 多聚甲醛在室温条件下固定 10 min,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;使用抗体稀释液室温封闭 1 h;封闭完成后,滤纸吸去多余水分,使用 Cx32 抗体(1:1 000)在湿盒内 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min;滴加荧光二抗(1:1 000),湿盒内室温孵育 1 h(避光处理)。使用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加含 DAPI 的防淬灭甘油封片剂进行封片;使用 LSCM 进行观察并采集图片。每组样本随机取 8 个高倍视野,采用盲法拍摄图像并进行评分。

实验中判断标准,阳性细胞为细胞核呈蓝色荧光而胞膜和胞浆呈绿色荧光的细胞。荧光亮度评判具体标准由观察者掌握,本实验分为 4 级,即 - 表示无或可见微弱荧光。+ 表示仅能见明确可见的荧光。++ 表示明亮的荧光。+++ 表示耀眼的荧光;计分标准为 +++ 记 3 分,++ 记 2 分,+ 记 1 分,- 记 0 分。

2.4.2 Real-time PCR 检测 CBRH7919 细胞 Cx32 mRNA 表达 Cx32 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的引物序列于基因文库检索,应用 PRIMER 5.0 软件设计;其中 Cx32(295 bp):上游 5'-GACAGACACGCCTGCATACATT-3',下游 5'-CAGCACCATGATTCTGAAGATAAA-3';GAPDH(113 bp):上游 5'-AAGGCTGTGGGCAAGGTCAT-3',下游 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'。CBRH7919 细胞生长至对数期后消化并使用培养基混匀制成单细胞悬液,进行细胞计数,调整密度为 1 × 10⁵ 个/mL,接种于 6 孔板;实验分组同 2.4.1 项;各组细胞贴壁后分别加入对应血清放入培养箱中处理 48 h。各组细胞 RNA 通过 trizol reagent 试剂盒提取,琼脂糖凝胶电泳鉴定后储存于 -80 °C 冰箱保存待用。合成 cDNA,25 μL 的合成体系,逆转录的条件:42 °C 60 min,99 °C 5 min。PCR 反应为 30 μL 体系,扩增条件:95 °C 预热 10 min,95 °C 30 s,60 °C 30 s,45 s 循环后终止反应。以 GAPDH 作为内参。采用 2^{-ΔΔC_t} 进行数据统计和分析。

2.4.3 光漂白恢复技术(FRAP)检测 CBRH7919 细胞 GJIC 功能 CBRH7919 细胞生长至对数期后用 PBS 液清洗 2 次。实验分组同 2.4.1 项,各组

分别加入对应血清放入培养箱中处理 48 h。用 PBS 液清洗 2 次,加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-CFDA 1.0 mL 到培养皿中,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的恒温培养箱中孵育 15 min。用 PBS 液洗掉多余的 6-CFDA,加入少量培养液。上机后首先选择 3 种细胞:第 1 种细胞作实验数据的来源,此细胞与周围细胞紧密连接,存在缝隙连接通讯,需用使用激光进行淬灭;第 2 种细胞作实验对照,此细胞呈现孤立于其它细胞的状态,不存在缝隙连接通讯,也同样需要使用激光进行淬灭;第 3 种细胞作其它细胞的背景校正,此细胞与周围细胞紧密连接,但不需用使用激光进行淬灭。待以上 3 种细胞确定后,开始进行淬灭并在淬灭完成后,观察监测 4 min 内荧光恢复情况。

2.5 统计学分析 使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,等级资料采用秩和检验,多组间均数比较采用 One-way ANOVA 方法, $P < 0.05$ 表示数据具有统计学差异。

3 结果

3.1 对 CBRH7919 细胞 Cx32 蛋白荧光强度评分的影响 与空白组比较,六味地黄丸含药血清各剂量组表达 Cx32 的细胞明显增多,绿色荧光强度明显增加,以线状或颗粒状分布于细胞浆和细胞膜中,尤其在细胞连接处 ($P < 0.05, P < 0.01$);与六味地黄丸含药血清低浓度组比较,六味地黄丸含药血清中、高浓度组的荧光强度显著升高 ($P < 0.01$)。见表 1 和图 1。

表 1 六味地黄丸含药血清对 CBRH7919 细胞 Cx32 蛋白荧光强度评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

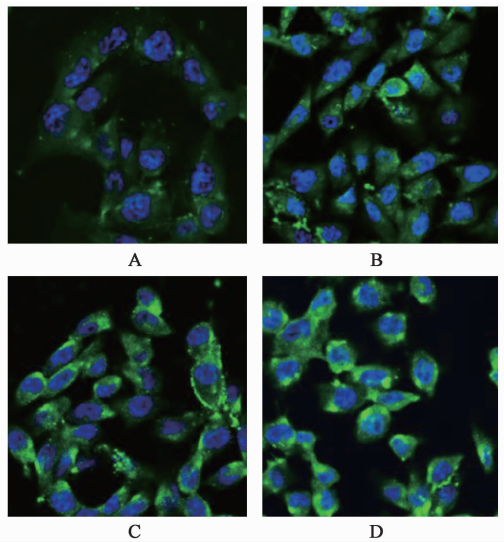
Table 1 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on fluorescence intensity scores of Cx32 protein in CBRH7919 cells ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	体积分数/%	荧光强度评分/分
空白血清	-	1.59 ± 0.74
六味地黄丸含药血清	2.5	$2.67 \pm 0.81^{1)}$
	5	$3.07 \pm 0.70^{2,3)}$
	10	$3.33 \pm 0.62^{2,3)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与六味地黄丸含药血清低浓度组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 CBRH7919 细胞内 Cx32 mRNA 表达的影响

六味地黄丸含药血清作用于 CBRH7919 细胞后,随着含药血清浓度增加, CBRH7919 细胞中 Cx32 mRNA 相对表达量相应增多,并呈现出一定的浓度依赖效应。Cx32 mRNA 表达以六味地黄丸含药血清中浓度组增加最明显 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。



A. 空白组; B~D. 六味地黄丸含药血清低、中、高浓度组(图 2 同)
图 1 六味地黄丸含药血清对 CBRH7919 细胞 Cx32 蛋白荧光强度的影响(激光共聚焦显微镜, $\times 630$)
Fig. 1 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on fluorescence intensity of Cx32 protein in CBRH7919 (LSCM, $\times 630$)

表 2 六味地黄丸含药血清对 CBRH7919 细胞内 Cx32 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on Cx32 mRNA expression in CBRH7919 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	Cx32 mRNA 相对表达量
空白血清	-	1
六味地黄丸含药血清	2.5	23.022 ± 12.102
	5	$345.037 \pm 154.216^{2)}$
	10	$73.685 \pm 26.251^{1)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 对 CBRH7919 细胞 GJIC 功能的影响

各组 CBRH7919 细胞在光漂白前均被激发出不同强度的荧光(图 2)。选择漂白细胞进行瞬间漂白处理后细胞内的荧光强度明显减弱。随着时间的推移荧光强度逐渐恢复。相同恢复时间内各组漂白细胞的荧光恢复率不同,其中漂白 240 s 后空白组的恢复率在 5% ~ 6%,六味地黄丸含药血清各浓度组的平均荧光恢复率均在 15% 以上,明显高于空白组 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 3。

4 讨论

原发性肝癌是目前严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,发现时多为中晚期阶段,临床常用的治疗方法主要包括手术、化疗、放疗等效果均不佳且容易复发。自杀基因疗法作为恶性肿瘤治疗的一种新手段,目前已成为恶性肿瘤基因治疗的研究热点和

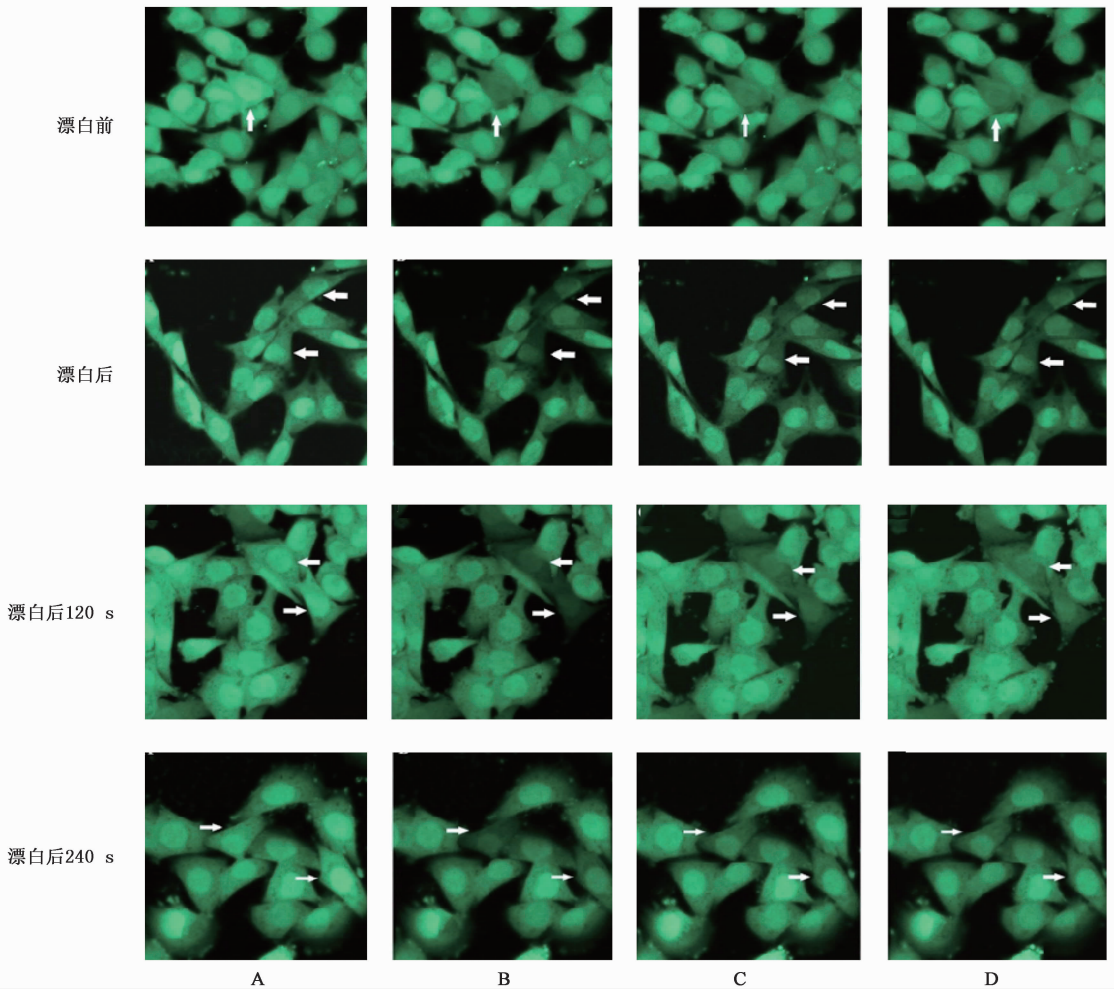


图 2 六味地黄丸含药血清对 CBRH7919 细胞细胞通讯功能的影响(光漂白恢复, ×630)

Fig. 2 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on GJIC in CBRH7919 cells(FRAP, ×630)

表 3 六味地黄丸含药血清对 CBRH7919 荧光恢复率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Table 3 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on fluorescence recovery rate of CBRH7919 cells($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	体积分数/%	荧光恢复率/%
空白血清	-	3.22 ± 1.78
六味地黄丸含药血清	2.5	12.33 ± 1.64 ¹⁾
	5	28.07 ± 1.49 ²⁾
	10	26.44 ± 1.23 ²⁾

极具应用前景的新疗法。大多数自杀基因系统均存在旁杀伤效应,但其仍然具有靶向性低等问题。研究发现,恢复或提高细胞间隙连接蛋白的表达可提高自杀基因系统的旁杀伤效应从而增强对肿瘤细胞的杀伤作用^[10]。因此,基于旁杀伤效应联合药物治疗成为提高其杀伤效果的重要方法。

GJ 通讯是旁杀伤效应的重要机制之一。GJ 是细胞之间的蛋白质通道,由通道连接蛋白 Cx 组成。

在几乎所有的实体瘤中,Cx 蛋白介导的细胞间隙连接通讯 GJIC 的表达出现下调或丧失,而使 Cx 的表达上调或者使细胞间隙连接通讯功能恢复,肿瘤细胞的生长将受到抑制、恶性表型出现逆转^[11-12]。肝癌组织中,Cx32 是主要的连接蛋白,研究表明 Cx32 表达下调及定位的异常是导致肝癌发生的重要机制之一^[13-14]。本研究采用六味地黄丸含药血清处理大鼠肝癌细胞 CBRH7919,FRAP 技术检测结果表明含药血清可提高 CBRH7919 的 GJIC 功能,尤其是六味地黄丸中、高浓度组。间接免疫细胞化学-激光共聚焦显微镜技术对 Cx32 蛋白表达进行定量、定位分析,发现六味地黄丸含药血清可使 CBRH7919 细胞 Cx32 的蛋白表达上调,并增加 Cx32 在细胞膜上的定位表达,Real-time PCR 结果提示其也可在转录水平促进 Cx32 的表达。

Cx32 基因在转录、翻译等过程的异常均可能是导致其在原发性肝癌中缺失的原因^[15]。本研究

结果表明六味地黄丸能促进肝癌细胞 Cx32 表达、增加其在细胞膜的定位,继而改善肝癌细胞的 GJIC 功能,结合前期研究结果提示六味地黄丸增强自杀基因旁杀伤效应的机制与缝隙连接有关,本研究为进一步阐述中药复方增效自杀基因疗法提供了实验依据,为经典中药名方六味地黄丸的开发利用及肿瘤的治疗提供新的思路。

[参考文献]

[1] 何炼图,汤庆,何小洪,等. 微泡造影剂超声辐照介导自杀基因系统治疗肝癌实验研究[J]. 广东医学, 2017,38(21):3235-3238.

[2] 贾琴,张玉英,吴爽,等. B7-2 基因联合自杀基因治疗乳腺癌移植瘤模型[J]. 解剖学研究, 2017,39(1):30-34.

[3] 鲁大鹏,叶园园,王保龙. 嵌合抗原受体修饰 T 细胞在肿瘤免疫治疗中的策略[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(9):1430-1434.

[4] 汤晗,聂建云,李文斌,等. 慢病毒载体系统的发展及在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(10):1659-1662.

[5] 陈思乡,姜庆,张俊勇. 恢复 connexin26 表达联合载酵母菌胞嘧啶脱氨酶自杀基因纳泡杀灭膀胱癌细胞[J]. 第三军医大学学报, 2018,40(4):322-327.

[6] 易华,王坤,邹一丹,等. 六味地黄丸调控肝癌 CBRH7919 细胞 Cx43 表达的体外研究[J]. 广州中医药大学学报,2017,34(6): 872-877.

[7] 田海飞,曾燕. 肝癌 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗的研究进展[J]. 重庆医学,2016, 45(12):1697-1700.

[8] 杜标炎,张爱娟,谭宇蕙,等. 六味地黄丸对自杀基因

系统杀伤肝癌细胞增效作用的量效关系[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(1): 59-62.

[9] 易华,杜标炎,谭宇蕙,等. 基因治疗联合六味地黄丸对肝癌荷瘤小鼠缝隙连接蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 114-118.

[10] XIAO J, ZHANG G, LI B, et al. Dioscin augments HSV-tk-mediated suicide gene therapy for melanoma by promoting connexin-based intercellular communication [J]. *Oncotarget*, 2017,8(1):798-807.

[11] 纪玉婷,杨燕,郑荣生,等. 慢病毒介导稳定高表达 Cx32 的 Huh7 细胞系建立及其对细胞增殖的影响[J]. 中国药理学通报, 2018,34(2):284-289.

[12] 王赛,霍继荣,王海琴,等. 间隙连接基因 Cx32 在肝细胞癌中的表达意义[J]. 中国医药导报, 2011, 20(8):22-24.

[13] LIN F L, CHANG C I, CHUANG K P, et al. Advanced glycation end products down-regulate gap junctions in human hepatoma SKHep 1 cells via the activation of Src-dependent ERK1/2 and JNK/SAPK/API signaling pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(15): 8636-8642.

[14] Leithe E, Sirnes S, Omori Y, et al. Downregulation of gap junctions in cancer cells [J]. *Crit Rev Oncog*, 2007, 12(3):225-256.

[15] Choung Y H, Choi S J, Joo J S, et al. Green tea prevents down-regulation of gap junction intercellular communication in human keratinocytes treated with PMA [J]. *Euro Arch Oto-Rhino-Laryngol*, 2010, 268(6): 885-892.

[责任编辑 张丰丰]