

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.003

食管癌血红素加氧酶-1 表达水平与氟尿嘧啶疗效的关系研究^{*}

张 健,马德华,陈保富,郭海谢,张 波,朱成楚[△]
(温州医科大学附属台州医院心胸外科,浙江临海 317000)

[摘要] 目的 本实验旨在探讨 Eca109 食管鳞癌细胞中血红素加氧酶-1(HO-1)的表达水平与 5 氟尿嘧啶(5-FU)化疗敏感性的关系。**方法** 培养 Eca109 食管鳞癌细胞,应用 RT-PCR 及 Western blot 方法分别检测不同浓度(0、20、80、100 $\mu\text{mol/L}$) Znpp IX 处理后细胞 HO-1 基因及 HO-1 蛋白表达水平,应用噻唑蓝(MTT)法检测各实验组细胞生长曲线及药物抑制率。**结果** 随着培养基 Znpp IX 浓度的增加,细胞抑制率显著增高,80 $\mu\text{mol/L}$ Znpp IX 组显著高于 20 $\mu\text{mol/L}$ Znpp IX 组($P<0.05$)。各组间 HO-1 mRNA 的表达量依次为 0.50 ± 0.17 、 0.55 ± 0.15 、 0.58 ± 0.09 、 0.55 ± 0.16 ,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组间 HO-1 的表达量依次为 0.85 ± 0.07 、 0.63 ± 0.11 、 0.43 ± 0.12 、 0.25 ± 0.10 ,组间差异有统计学意义($F=20.01$, $P<0.01$)。**结论** Eca109 食管癌细胞抑制率与 Znpp IX 浓度正相关,而 Znpp IX 不是从基因水平,而是从蛋白的表达水平抑制 HO-1 的表达。**[关键词]** 食管肿瘤;血红素加氧酶-1;氟尿嘧啶;药物疗法;耐受性
[中图分类号] R735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)06-0729-03

Study on HO-1 expression in hunman esophageal carcinoma and correlates with chemotherapy sensitivity of fluorouracil^{*}

Zhang Jian, Ma Dehua, Chen Baofu, Guo Haixie, Zhang Bo, Zhu Chengchu[△]
(Department of Cardio-Thoracic Surgery, TaiZhou Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Tai Zhou, Zhejiang 317000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the HO-1 expression levels with 5-FU chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** Eca109 cells used in all experiments, MTT assay was used in cell growth curve and inhibit rate. RT-PCR and Western blot was used to detect HO-1 in cells treated with different concentrations of Znpp IX (0, 20, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$). **Results** The inhibitory rate of cells was significantly increased when the concentration of Znpp IX increased. The inhibitory rate of cells in 80 $\mu\text{mol/L}$ Znpp IX was higher than 20 $\mu\text{mol/L}$ Znpp IX group ($P<0.05$). The expression of HO-1 mRNA in each group was 0.50 ± 0.17 , 0.55 ± 0.15 , 0.58 ± 0.09 and 0.55 ± 0.16 , respectively, there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$). The expression of HO-1 was 0.85 ± 0.07 , 0.63 ± 0.11 , 0.43 ± 0.12 and 0.25 ± 0.10 , respectively. The expression of HO-1 had significant difference ($F=20.01$, $P<0.01$). **Conclusion** Eca109 cells inhibition rate positive correlated with Znpp IX concentrations, and Znpp IX were inhibited the expression of HO-1, not from gene level, but after the translation level. **[Key words]** esophageal neoplasms; heme Oxygenase-1; fluorouracil; drug therapy; tolerance

目前在世界范围内,食管癌已成为癌症死亡的主要原因,严重危害人类健康和生命^[1]。这与食管癌细胞侵袭性和转移性的生物学特征密切相关,然而对其侵袭和转移机制的研究仍是一大难题。20 世纪 80 年代中末期, Müller 等^[2]率先在动物和人体的肝、脾、肺、脑和睾丸等组织中分离获得血红素加氧酶(HO)及 HO 的同工酶。HO 是体内降解血红素重要的限速酶,其可将血红素分解为一氧化碳、Fe²⁺、胆绿素。近年来相关研究还表明 HO 与肿瘤增殖、血管发生、凋亡、耐药等生物学行为密切相关。本文拟研究 HO-1 与食管癌 5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人食管癌 Eca109 细胞购自中国科学院细胞库,噻唑蓝(MTT)购自美国 Genaray BioTech 公司,兔抗人、鼠 HO-1 单克隆抗体购自美国 Epitomics 公司,锌原卟啉(Znpp IX)购自美国 Sigma 公司,5-FU(250 mg/10 mL)购自上海佳和生物科技有限公司,PT-PCR 试剂盒购自美国 Thermo Scientific Fermentas 公司。

1.2 实验分组 5-FU 浓度梯度分组:细胞接种 6 h 待其贴壁

后,分别加入正常培养基,含 12.5、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU 的培养基,每 24 小时检测 1 次,直至第 4 天;Znpp IX 实验分组:正常细胞接种 6 h 待其贴壁后,分别加入正常培养基,含 20、80、100 $\mu\text{mol/L}$ Znpp IX 的培养基培养 12 h,每 24 小时检测 1 次,直至第 4 天。

1.3 MTT 法绘制 Eca109 细胞生长曲线 选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,记录结果。以时间为横轴,A 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.4 RT-PCR 检测各组细胞中 HO-1 mRNA 表达水平 收集各组细胞,提取总 RNA,行 RT-PCR 检测。HO-1 基因上游引物为 5'-CCA GCA ACA AAG TGC AAG ATT C-3',下游引物为 5'-GGT AAG GAA GCC AGC CAA GAG-3',产物长度为 240 bp。扩增条件为在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94.0 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,64.5 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,72.0 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,循环 30 次;最后在 72.0 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。100 V 琼脂糖凝胶电泳 35 min。并用 AlphaImager2200 凝胶成像系统进行扫描分析。以 β -actin 为内参,用软件 Quantity One 行灰度值分析。

1.5 Western blot 分析 HO-1 蛋白表达 收集各组 Eca109 细

^{*} 基金项目:浙江省重大科技专项和优先主题项目(11C13039-2);浙江省台州市科技局项目(11KY11)。 作者简介:张健(1987-),主治医师,硕士,主要从事心胸外科工作。 [△] 通信作者,E-mail:zhucc.tzyy@gmail.com。

胞,提取总蛋白,一抗为 1 : 100 稀释的 HO-1,二抗为 1 : 200 稀释的辣根过氧化物酶标记的 IgG,DAB 显色,将胶片进行扫描及拍照,用凝胶图象处理系统分析。用 Quantity one 软件对电泳结果进行灰度分析,计算 HO-1/GAPDH 比值,进行统计分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 在不同浓度 5-FU 作用下的 Eca109 细胞生长情况 在体外细胞实验中,随着 5-FU 浓度的增加,细胞抑制率也随之增加,两者之间呈正相关(图 1)。在培养基 5-FU 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞培养 2 d(48 h)即出现 50%左右的细胞抑制率。

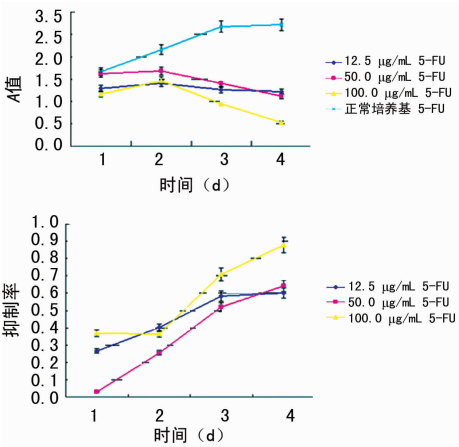


图 1 不同浓度 5-FU 作用下的 Eca109 细胞生长及抑制曲线

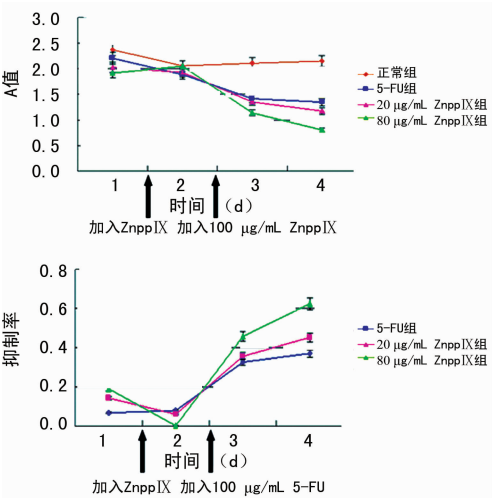


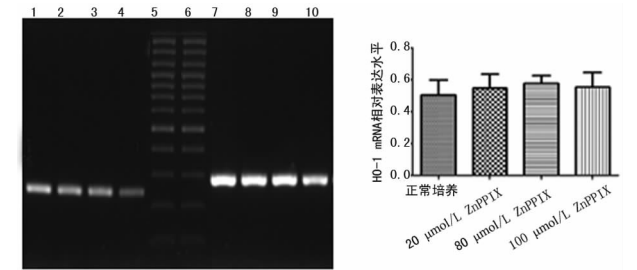
图 2 不同浓度 ZnppIX 处理后 Eca109 细胞生长及抑制曲线

2.2 不同浓度的 ZnppIX 处理后,Eca109 细胞在含 100 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU 的培养基培养下的细胞生长情况 细胞分正常组、5-Fu 组、20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组、80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组。在细胞接种后的第 1、2 天,4 组间的细胞存活情况差异无统计学意义($P > 0.05$),表明 ZnppIX 对细胞无明显毒性;于接种第 2 天结束,向各组细胞加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU(除正常组外),在接种第 3 天,正常组、5-FU 组、20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组、80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组细胞生长情况(A 值)分别为 2.11 ± 0.09 , 1.42 ± 0.02 , $1.32 \pm$

0.11 , 1.14 ± 0.51 ,5-FU 组与 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组显著低于 5-FU 组及 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组($P < 0.05$)。在接种第 4 天,正常组、5-FU 组、20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组、80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组细胞生长情况(A 值)分别为 2.15 ± 0.19 , 1.75 ± 0.10 , 1.35 ± 0.08 , 0.76 ± 0.06 ,80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组显著低于 5-FU 组及 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组($P < 0.05$),见图 2。

2.3 不同浓度 ZnppIX 干预细胞 HO-1 基因表达情况 在正常培养基及含有 20、80、100 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 培养基培养的 Eca109 细胞中,各组间 HO-1 mRNA 的表达量依次为 0.50 ± 0.17 , 0.55 ± 0.15 , 0.58 ± 0.09 , 0.55 ± 0.16 ,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

2.4 Eca109 细胞在不同浓度 ZnppIX 干预下 HO-1 蛋白表达情况 在含有正常培养基、20、80、100 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 培养基培养的 Eca109 细胞中,各组间 HO-1 的表达量依次为 0.85 ± 0.07 , 0.63 ± 0.11 , 0.43 ± 0.12 , 0.25 ± 0.10 。各组间 HO-1 的表达量差异有统计学意义($F = 20.01$, $P < 0.01$),表明在蛋白水平上,ZnppIX 能有效抑制 HO-1 的表达。通过两两之间 LSD 检验发现,HO-1 的表达水平显著高于含 20、80、100 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 培养基中的细胞 HO-1 的表达水平($P < 0.05$)。而 80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 与 100 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 之间 HO-1 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4。



1:正常培养;2:20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX;3:80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX;4:100 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX;5、6:DNA 分子标记物;7~10: β -actin。

图 3 各实验组 HO-1 基因表达情况

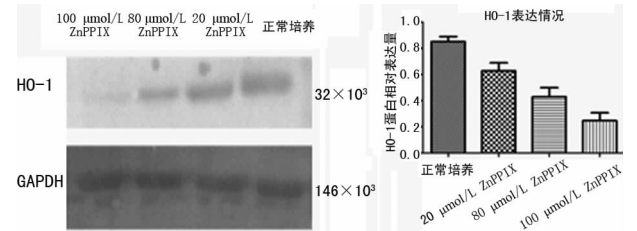


图 4 各实验组 HO-1 蛋白表达情况

3 讨 论

在前期研究中,笔者发现 HO-1 在食管癌细胞的细胞核、细胞质及细胞膜均有表达,但在正常组织中以细胞核表达为主,而食管组织发生癌变后,食管细胞质细胞膜的表达显著升高,细胞核的阳性率略降低,提示细胞内可能存在 HO-1 蛋白活化迁移。HO-1 的阳性表达程度在食管癌浸润程度(T 分期)、淋巴结转移(N 分期)中均有显著的差异性,表明 HO-1 在食管癌的淋巴结转移过程中扮演重要角色^[3]。HO-1 在喉鳞状细胞癌组织中过度表达^[4]。敲除 Nrf-2 后,顺铂诱导的 HO-1 表达被显著抑制,其诱导的氧化损伤显著提高。提示抑制 HO-1 的表达或抑制 Nrf-2,可显著增强顺铂的抗癌效果。在肺黏液表皮样癌中,应用 miRNA 抑制 HO-1 的表达可影响其

生长及转录调节^[5]。HO-1 通过影响细胞周期及细胞凋亡作用^[6],在结直肠癌中表达上调,而且 P53 蛋白参与其中。在耐药性方面,Kuroda 等^[7]研究表明,肺癌细胞系 A549 的抗顺铂耐药性与 HO-1 的表达呈正相关,并与包括 PI3K/AKT 及 NF- κ B(nuclear factor- κ b)信号系统在内的表皮生长因子受体介导的信号通路相关。在使用 HO-1 抑制剂 ZnppIX 的情况下,可增强结肠癌、肺癌和胰腺癌细胞对化疗的敏感性,减慢肿瘤生长速度。Hirai 等^[8]应用 ZnppIX 及 HO-1 激动剂钴原卟啉(CoPPIX)处理 C57BL 的 LL/2 肺癌小鼠后发现,ZnppIX 可以有效抑制肿瘤的微血管密度并增加肿瘤细胞的凋亡率,且与剂量呈正相关,CoPPIX 的作用则正好相反。HO-1 在乳腺癌中过度表达^[9],除 HO-1 可以提高阿奇霉素对乳腺癌细胞的疗效,提示 HO-1 可能通过阻止细胞凋亡和自噬调节乳腺癌细胞的耐药性。缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)可调节血管表皮生长因子(VEGF)的生成,而 HO-1 抑制剂 ZnPPIX 可抑制 HIF-1 α 和 VEGF 的表达。在动物实验中,也表明使用 ZnPPIX 后的实验动物具有较小的肿瘤结节和较轻程度的血管生成。提示 HO-1 的抑制剂 ZnPPIX 具有抗肿瘤的作用,可以显著减少 HIF-1 α 水平,阻断 VEGF 的产生从而影响肿瘤血管生成,抑制肿瘤生长^[10]。Ying Yang 1(YY1)是一种锌指转录因子,Luo 等^[11]发现在食管癌组织中,YY1 mRNA 表达量显著增加,其是通过抑制 HO-1 的转录发挥生物学作用。过度表达 YY1,可以增加食管癌 TE1 细胞的放疗敏感性。本实验针对 5-FU 对食管癌化疗敏感性的研究显示,在 Eca109 食管癌细胞接种后的第 1 天,4 组间的细胞存活率差异无统计学意义($P>0.05$);在用不同浓度 ZnppIX 处理细胞后,再加入 5-FU,细胞存活率呈下降趋势。第 4 天时(100 μ g/mL 5-FU 作用 2 d 后),20 μ mol/L ZnppIX 组及 80 μ mol/L ZnppIX 组细胞存活率显著低于 5-FU 组($P<0.05$),且 20 μ mol/L ZnppIX 组细胞存活率显著高于 80 μ mol/L ZnppIX 组($P<0.05$)。提示当 ZnppIX 浓度增加,细胞内 HO-1 表达水平下降时,有利于增强 Eca109 细胞对 5-FU 的敏感性,使得同一浓度的 5-FU 取得更大的细胞抑制率。

在基因水平的研究显示,不同浓度的 ZnppIX 处理后的 Eca109 食管癌细胞,其 HO-1 基因差异无统计学意义($P>0.05$),提示 ZnppIX 并不能从基因水平抑制 HO-1 的表达。但在对 HO-1 的基因多态性的研究中,Hu 等^[12]发现,饮酒组食管癌患者中 L 型等位基因(L/L)及 L 型等位基因携带者(S/L)的频率显著高于非饮酒组,且 HO-1 基因启动子区-(GT) n 的重复序列可能与男性饮酒者食管癌发生有关,减少饮酒量可以有效保护 L 型等位基因携带者。乙醇可以使得 Eca109 食管癌细胞中 HO-1 表达水平上调,同时伴随着 p38MAPK 及 mTOR 通路的激活^[13]。Kim 等^[14]从水生酸模草中提取出 QC,在对食管上皮细胞的研究中表明,其可有效增高 HO-1 的表达,并且可能与 Nrf2、ERK、PI3K-Akt 及 PKC 信号通路有关。

在蛋白水平,在含有 0、20、80、100 μ mol/L ZnppIX 培养基培养的 Eca109 细胞中,各组间 HO-1 的表达量依次为 0.85 $\pm$ 0.07、0.63 $\pm$ 0.11、0.43 $\pm$ 0.12、0.25 $\pm$ 0.10。各组间 HO-1 的表达量差异有统计学意义($P<0.01$),表明在蛋白水平上,ZnppIX 能有效抑制 HO-1 的表达。通过两两之间 LSD 检验发现,正常培养基中细胞 HO-1 的表达水平显著高于含 20、80、100 μ mol/L ZnppIX 培养基中细胞 HO-1 的水平(均 $P<0.05$)。而 80 μ mol/L ZnppIX 与 100 μ mol/L ZnppIX 组之间 HO-1 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。提示在一定范

围内(本实验为 20~100 μ mol/L),对比正常培养的细胞,ZnppIX 可以显著抑制细胞 HO-1 蛋白的表达水平。但随着培养基中 ZnppIX 浓度的增加(本实验为 80~100 μ mol/L),并不能进一步显著抑制 HO-1 的表达水平。

正常组织细胞 HO-1 可起到维持细胞稳态、减低氧化损伤、削弱炎症反应的作用。而在肿瘤细胞中,HO-1 的表达却与肿瘤的扩散转移、抗凋亡作用有密切联系。应用 HO-1 抑制剂可以有效地抑制细胞生长,而应用其诱导剂则使肿瘤细胞对于产生 ROS 的治疗方法产生抵抗效应^[8]。由于 HO-1 具有在体内极易被快速诱导合成的优点,HO-1 可作为潜在的抗肿瘤治疗靶点,对与临床抗肿瘤治疗有重要意义。进一步深入探讨 HO-1 在食管癌发生、侵袭和转移过程中的作用,及其与各化疗药物敏感性的相关关系,探究 HO-1 表达水平与个体化疗间的关系有重要意义。这为通过抑制或降低 HO-1 表达水平,进而抑制肿瘤细胞的增殖、转移,为临床寻找有效的治疗方案提供新思路。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Müller RM, Taguchi H, Shibahara S. Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene[J]. J Biol Chem, 1987, 262(14): 6795-6802.
- [3] 张健, 朱成楚, 陈保富, 等. 血红素加氧酶-1 在食管癌中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(20): 3635-3637.
- [4] Lv X, Song DM, Niu YH, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell cancer Hep-2 cells to cisplatin[J]. Apoptosis, 2016, 21(4): 489-501.
- [5] Tertilt M, Golda S, Skrzypek K, et al. Nrf2-heme oxygenase-1 axis in mucoepidermoid carcinoma of the lung; antitumoral effects associated with down-regulation of matrix metalloproteinases[J]. Free Radic Biol Med, 2015 (89): 147-157.
- [6] Andrés NC, Fermento ME, Gandini NA, et al. Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer; involvement of p53[J]. Exp Mol Pathol, 2014, 97(3): 321-331.
- [7] Kuroda H, Takeno M, Murakami S, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 with an epidermal growth factor receptor inhibitor and cisplatin decreases proliferation of lung cancer A549 cells[J]. Lung Cancer, 2010, 67(1): 31-36.
- [8] Hirai K, Sasahira T, Ohmori H, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 by Zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice[J]. Int J Cancer, 2007, 120(3): 500-505.
- [9] Zhu XF, Li W, Ma JY, et al. Knockdown of heme oxygenase-1 promotes apoptosis and autophagy and enhances the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells[J]. Oncol Lett, 2015, 10(5): 2974-2980.
- [10] Cheng CC, Guan SS, Yang HJ, et al. Blocking heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin reduces tumor hypoxia-mediated VEGF release and inhibits tumor angiogenesis as a potential therapeutic agent against colorectal cancer[J]. J Biomed Sci, 2016, 23(1): 18. (下转第 734 页)

是从芸香科植物枳橘中提取出来的中药单体,有抗癌、抗血小板聚集、抗炎、抗氧化等作用。近期发现 NOB 可通过降低 p38 丝裂原活化蛋白激酶的活性水平而抑制皮肤黑色素瘤的细胞增殖^[6];NOB 还有抗组胺的作用^[7],NOB 可改善阿尔茨海默病模型大鼠的认知功能^[8],有效改善脑缺血导致的认知功能下降。也有研究提出在实验性脑梗死大鼠中 9 mg/kg NOB 对其脑组织有保护作用,也可预防脑卒中^[9],故本实验选用 NOB 10 mg/kg 的剂量研究其对糖尿病认知作用是否也有所改善。

本研究得出 Nrf2 在正常组大鼠海马中即有少量表达,考虑是用来维持正常情况下的生理功能。与正常组相比,糖尿病组大鼠海马中 Nrf-2 的表达水平升高,但是认知功能明显下降,提示在脑内高血糖环境下,对氧化应激敏感的 Keap1 即释放 Nrf-2 入细胞核,Nrf-2 活性增强、表达量增加,启动下游抗氧化蛋白等表达(如 γ -GCS、SOD、NQO1 等),中和大量氧化应激产物、神经毒素等,以保护海马神经元,但是仍然不能抵抗高血糖导致的氧化应激状态,所以海马的损伤使大鼠出现认知功能障碍。而经过 NOB 治疗的糖尿病大鼠认知功能有所改善,海马中 Nrf-2 表达水平较糖尿病组显著增高,笔者推测 NOB 是 Nrf-2 的激活剂,可以诱导 Nrf-2 活性增强、表达量增加,从而产生更多的抗氧化蛋白等保护海马结构,激活 Nrf2-ARE 信号通路的抗氧化作用。NOB 对糖尿病大鼠的 DMCI 有一定的治疗作用。

在本研究中,NOB 药物剂量选用 10 mg/kg 治疗,可以提高 DMCI 大鼠海马 Nrf-2 转录活性及表达,Nrf2-ARE 信号通路激活,下游产生大量抗氧化蛋白及解毒酶,中和大量损害神经元的 ROS,从而神经元细胞的药物解毒能力、抗氧化应激的能力都被提高,这对保护海马神经元有重要的作用,可见 NOB 药物剂量是 10 mg/kg 时海马 Nrf-2 表达增加,改善了 DMCI。如果 NOB 药物剂量继续增大,如 20 mg/kg、30 mg/kg 或更多时,NOB 治疗对 DMCI 的作用如何呢?在正常细胞严格限制 Nrf-2 表达,除了氧化还原途径外,还有不依赖氧化还原反应的途径,如磷酸化途径;另外,Nrf-2 表达量增加也有不良影响,如 Nrf-2 在肿瘤组织中高表达易导致其预后不良,有报道发现 Nrf-2 持续高表达有致死性作用。综合以上,所以笔者推测 Nrf-2 表达在一定范围内随着 NOB 药物剂量的增加而增高,但当到达某一药量时即出现平台期,或者 Nrf-2 的持续高表达会造成极不利影响。如何找到这个效果最佳的药量范围,需要今后进一步的研究证实。

NOB 可以提高糖尿病大鼠海马 Nrf-2 表达水平,改善其认知功能。在糖尿病患者中,NOB 在某个合适的剂量是否对改善 DMCI 有此明显的作用,是否可以起到预防作用,这些都需要更多更深入的研究。

(上接第 731 页)

- [11] Luo J,Zhou X,Ge X,et al. Upregulation of Ying yang 1 (YY1) suppresses esophageal squamous cell carcinoma development through heme oxygenase-1[J]. Cancer Sci, 2013,104(11):1544-1551.
- [12] Hu JL,Li ZY,Liu W,et al. Polymorphism in heme oxygenase-1(HO-1) promoter and alcohol are related to the risk of esophageal squamous cell carcinoma on Chinese males[J]. Neoplasma,2010,57(1):86-92.
- [13] Hu JL,Xiao L,Li ZY,et al. Upregulation of HO-1 is ac-

参考文献

- [1] Lu YH,Su MY,Huang HY,et al. Protective effects of the citrus flavanones to PC 12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide[J]. Neurosci Lett,2010,484(1):6-11.
- [2] Mulvihill EE,Assini JM,Lee JK,et al. Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance[J]. Diabetes,2011,60(5):1446-1457.
- [3] Akachi T,Shiina Y,Ohishi Y,et al. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha(Citrus depressa) against D-galactosamine-induced liver injury in rats[J]. Nutr Sci Vitaminol(Tokyo),2010,56(1):60-67.
- [4] Koriyama Y,Nakayama Y,Matsugo S,et al. Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cellline[J]. Brain Res,2013,1499(5):145-157.
- [5] Izumi Y,Matsumura A,Wakita S,et al. Isolation,identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla(Perilla frutescens var. crispa f. viridis)[J]. Free Radic Biol Med,2012,53(4):669-679.
- [6] Yamamoto Y,Shioda N,Han F,et al. Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMK II and CREB phosphorylation[J]. Brain Res,2009(1295):218-229.
- [7] Kim JJ,Korm S,Kim WS,et al. Nobiletin suppresses MMP-9 expression through modulation of p38 MAPK activity in human dermal fibroblasts[J]. Biol Pharm Bull, 2014,37(1):158-163.
- [8] Jang SE,Ryu KR,Park SH,et al. Nobiletin and tangeretin ameliorate scratching behavior in mice by inhibiting the action of histamine and the activation of NF- κ B,AP-1 and p38[J]. Int Immunopharmacol,2013,17(3):502-507.
- [9] Yang EJ,Lim SH,Song KS,et al. Identification of active compounds from Aurantii Immatri Pericarpium attenuating brain injury in a rat model of ischemia-reperfusion[J]. Food Chem,2013,138(1):663-670.

(收稿日期:2016-10-11 修回日期:2016-11-23)

companied by activation of p38MAPK and mTOR in human oesophageal squamous carcinoma cells[J]. Cell Biol Int,2013,37(6):584-592.

- [14] Kim JS,Song HJ,Ko SK,et al. Quercetin-3-O-beta-D-glucuronopyranoside (QGC)-induced HO-1 expression through ERK and PI3K activation in cultured feline esophageal epithelial cells[J]. Fitoterapia,2010,81(2):85-92.

(收稿日期:2016-10-18 修回日期:2016-11-16)