

氨甲喋呤对映体药物对 A549 人肺腺癌细胞株增殖抑制作用及诱导凋亡作用

郭立方^{1,2}, 王荣^{1,2}, 贾正平^{1,2*}, 施有琴^{1,2}, 谢华¹, 孟宪栋¹ (1.兰州军区兰州总医院药理基地, 兰州 730050; 2.兰州大学药学院, 兰州 730000)

摘要: 目的 探讨氨甲喋呤对映体[(+)-MTX, (-)-MTX]对 A549 细胞的增殖抑制作用及诱导凋亡作用。方法 采用培养的 A549 细胞, 应用 MTT 比色法分析其活性; 用光学显微镜和荧光显微镜观察细胞的形态学变化; 碘化丙啶(PI)单染流式细胞术检测细胞周期; DNA 梯度电泳检测凋亡。结果 在 0.1~150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, (+)-MTX 和(-)-MTX 作用于 A549 细胞 24, 48, 72 h, 均抑制细胞 A549 增值, 但抑制强度为(+)-MTX>(-)-MTX, 倒置显微镜和荧光显微镜观察不同浓度(+)-MTX 和(-)-MTX 作用 A549 细胞不同时间后, 出现细胞不同程度的形态学改变; 用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的(+)-MTX 和(-)-MTX 作用 A549 细胞 48 h 后, PI 单染流式细胞术检测 A549 细胞周期的影响, 表明氨甲喋呤对映体干扰 A549 细胞 DNA 合成; DNA 梯度电泳检测结果发现 MTX 作用组有凋亡条带出现, 其中(+)-MTX 最为明显。结论 (+)-MTX 和(-)-MTX 对 A549 细胞的抗增殖作用具有化学结构的立体选择性, (+)-MTX 的抗 A549 细胞增殖作用明显强于(-)-MTX。

关键词: 氨甲喋呤; 对映体药物; A549 细胞; MTT 比色法; 流式细胞术; DNA 梯度电泳

中图分类号: R965.1; R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)08-0665-05

Effects of Methotrexate Enantiomers on Human Lung Cancer A549 Cells Inhibition and Its Apoptosis

GUO Lifang^{1,2}, WANG Rong^{1,2}, JIA Zhengping^{1,2*}, SHI Youqing^{1,2}, XIE Hua¹, MENG Xiandong¹ (1.Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China; 2.College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of methotrexate enantiomers [included (+)-MTX, (-)-MTX] on the proliferation and apoptosis of A549 cells. **METHODS** A549 cells were cultured. The cell proliferation was determined by MTT. The morphological changes were inspected by inverted microscope and fluorescence microscope. Cell cycle phases were assayed by propidium iodide staining flow cytometry. DNA ladder were used to detect the apoptosis. **RESULTS** A549 cells were treated with (+)-MTX and (-)-MTX at 1–150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24, 48, 72 h. The results showed that the proliferations of A549 cells were significantly inhibited under the different conditions. The order of the inhibited efficacy was (+)-MTX>(-)-MTX. The morphological of A549 cells were found changes by (+)-MTX and (-)-MTX treatment. After administration of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of (+)-MTX and (-)-MTX for 48 h, respectively, the cell cycle phases were assayed by propidium iodide staining flow cytometry. DNA ladder was the most recognized marker of apoptosis, and there was obvious DNA ladder in (+)-MTX treated group. The result showed DNA replication was interfered by (+)-MTX and (-)-MTX treatment. **CONCLUSION** The proliferation of A549 cells have the chiral selective effects by (+)-MTX and (-)-MTX treatment, and the inhibition on A549 cells proliferation of (+)-MTX was significantly stronger than (-)-MTX.

KEY WORDS: methotrexate; optical isomer; A549 cell; MTT; flow cytometry; DNA ladder

手性是自然界的基本特征之一, 生物大分子如核酸、蛋白质和酶普遍通过严格手性匹配识别对映体分子, 它们间的识别效应不同所产生的生物效应存在差异^[1-2]。氨甲喋呤(methotrexate, MTX)即对-苯甲基氨基[(2, 4-二氨基-6-喋啶)-N-甲基氨基], 其侧链第 4 个碳原子为手性碳原子, 存

在 2 种对映体形式, 分别为(+)-MTX 和(-)-MTX。到目前为止, 临床上 MTX 手性问题没有给予应有的重视, 仍以消旋体形式应用于临床^[3], 主要原因是人们对这 2 种构型的 MTX 对映体认识尚不深。它是一种细胞周期特异性的抗代谢药, 能竞争性地结合二氢叶酸还原酶(DHFR)抑制核苷酸代谢, 阻

基金项目: 国家科技部重大项目(2008ZXJ-09014-010)

作者简介: 郭立方, 男, 硕士生 Tel: (0931)8994675 E-mail: glf03@163.com

*通信作者: 贾正平, 男, 博导, 教授 Tel: (0931)8994675

E-mail: wangrong-69@163.com

断 DNA 的合成^[4]。文献报道研究了氨甲蝶呤对映体对 A549 细胞株的耐药性及其生物学特征^[5-7]。而有关(+)MTX、(-)MTX 直接作用 A549 后,对细胞抑制及周期阻滞且发生凋亡作用差异未见报道。本试验以 A549 人肺腺癌细胞株为研究对象,通过体外试验研究氨甲蝶呤对映体对肿瘤细胞的抑制作用及其机制,为开发 MTX 的单一体药物提供参考和理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);二氧化碳培养箱(美国 Forma Scientific 公司);OLMPUS IMT-2 倒置显微镜(日本 OLMPUS 公司);Tanon GIS-2008 凝胶成像系统(天能科技上海有限公司);6 孔、96 孔细胞培养板(美国 Corning 公司);AE 240 电子天平(十万分之一)(瑞士 Mettler 公司)。

1.2 材料

A549 细胞株(兰州军区总医院药材科);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);氨甲蝶呤对映体[美国 Sigma 公司, (+)MTX、(-)MTX 批号分别为 SIK1820、89H1296, 纯度均>98%];100 万单位注射用硫酸链霉素、160 万单位注射用青霉素钠(河北石家庄制药有限公司);甲基噻唑蓝四氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司);二甲基亚砷(DMSO)(美国 Sigma 公司);碘化丙啶(propidium iodide, PI)(美国 Sigma 公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

细胞常规培养于体积分数为 10%新生小牛血清(经 56 °C 水浴灭活 30 min)的 DMEM 高糖培养液中,其中含有青霉素 100 IU·mL⁻¹ 及链霉素 100 IU·mL⁻¹,在 37 °C 体积分数为 5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 孵箱内闭式培养。实验采用传代后第 3 天处于指数增殖期的细胞。

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制

将细胞悬液以 1.9×10^7 个·L⁻¹ 的细胞密度接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL,置于 CO₂ 培养箱中,37 °C 培养 24 h,待细胞附壁后小心吸出各孔内培养液,设置溶媒对照组(不加药物)及 6 个不同浓度(0.01, 0.1, 1, 10, 100, 150 μmol·L⁻¹)的(+)MTX、(-)MTX 给药组,每组均设 3 个复孔,分别培养 24, 48, 72 h。于培养结束前 4 h,各培养孔加入 MTT(5

mg·mL⁻¹)溶液 20 μL,培养结束后,弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min 后,用全自动酶标仪 570 nm 波长处测定吸收度 *A* 值,计算细胞抑制率(IR)。IR 用下式计算: IR(%)=[(对照组 OD 值均数-试验组 OD 值均数)/对照组 OD 值均数]×100%,实验重复 3 次,并计算各药物抑制细胞增殖 50% 的浓度 IC₅₀ 值。

2.3 细胞的形态学分析

A549 细胞培养在分别含有(+)MTX、(-)MTX (0, 0.1, 1, 10, 100 μmol·L⁻¹)的培养液中,24, 48, 72 h 后在倒置显微镜下观察细胞形态改变。

2.4 荧光显微镜观察

常规培养 A549 细胞,接种于 6 孔板内 48 h,分溶剂对照组和(+)MTX、(-)MTX(10 μmol·L⁻¹) 48 h 后进行 DAPI 染色,步骤如下: PBS 清洗 1 次,4%的多聚甲醛 PBS 在室温固定 20 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,加入 DAPI 染色液(1 μg·mL⁻¹ 无水甲醇)作用 15 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。荧光显微镜下观察。

2.5 细胞周期检测

分别收集空白组及各种药物作用 48 h 后的 A549 细胞,并制成 3.4×10^6 个·mL⁻¹ 的细胞悬液,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液, PBS 洗 2 次后再调整为 2×10^6 个·mL⁻¹。70%的乙醇(按 1:4 的比例)混匀,过夜待检。检测前用 PBS 洗涤,加入 RNase(1 g·L⁻¹)200 μL,37 °C 水浴 30 min,用 PI(50 mg·L⁻¹)800 μL 进行染色,室温避光 30 min,流式细胞仪评估细胞周期动力学变化,所用软件为 Cellquest。

2.6 DNA 琼脂糖凝胶电泳

实验分组:分溶剂对照组、10 μmol·L⁻¹ (+)MTX 组和 10 μmol·L⁻¹ (-)MTX 组,常规收集 10 μmol·L⁻¹ (+)MTX 和 10 μmol·L⁻¹ (-)MTX 处理 48 h 的 A549 细胞,按细胞 DNA 提取试剂盒(MoBio, USA)说明提取 DNA,2%琼脂糖凝胶,100 V 电泳约 40 min。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件对所有数据进行统计学处理。各组的组间均数比较用方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

3 结果

3.1 MTX 对映体对 A549 增值的影响

与对照组相比,1~150 μmol·L⁻¹ 的(+)MTX、

(-)-MTX 作用 A549 细胞 24, 48, 72 h 后, 表现出明显的抑制作用($P<0.01$), 呈剂量-效应和时间-效应依赖关系; 但(-)-MTX 作用 A549 细胞 24, 48, 72 h 后, 在高剂量浓度时呈剂量-效应和时间-效应

依赖关系, 且抑制作用明显弱于(+)-MTX; (+)-MTX 和(-)-MTX 对 A549 细胞抑制率结果见图 1。从药物的 IC_{50} 浓度也可以看出, 其细胞抑制强度为(+)-MTX > (-)-MTX, 结果见表 1。

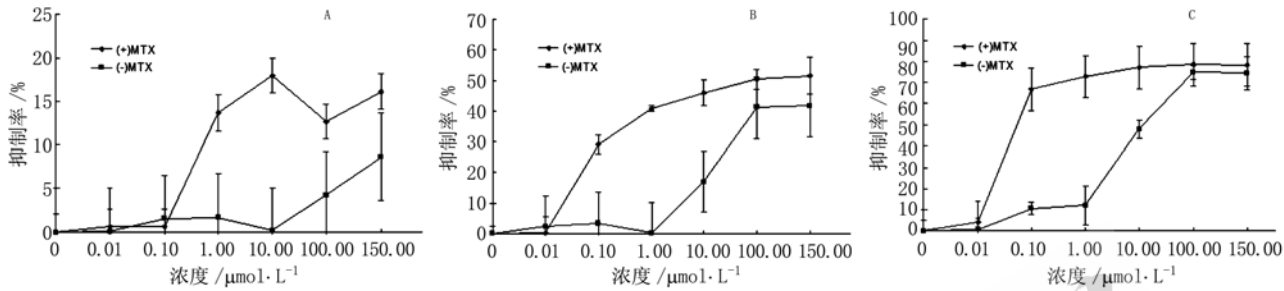


图 1 MTT 法检测 MTX 对映体作用 A549 细胞 24 h(A), 48 h(B), 72 h(C) 的抑制率

Fig 1 The inhibitory ratio (IR) of MTX enantiomers 24 h(A), 48 h(B), 72 h(C) on A549 by MTT

表 1 MTT 法检测 MTX 对映体作用于 A549 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})

Tab 1 The IC_{50} of MTX enantiomers on A549 by MTT colorimetry

组别	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	24 h	48 h	72 h
(+)-MTX	155.67	79.63	40.52
(-)-MTX	188.58	126.50	77.07

3.2 (+)-MTX、(-)-MTX 处理后 A549 细胞的形态改变

为了观察不同药物浓度和时间对细胞形态的影响, 用不同浓度的(+)-MTX、(-)-MTX 分别处理 A549 细胞不同时间(24, 48, 72 h)后, 倒置显微镜下观察, 结果显示 A549 细胞形态学均发生不同程度的改变, 其中 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的(+)-MTX、(-)-MTX 处理 A549 细胞 48 h 后观察二者差异较大, 与正常组比较, (+)-MTX 作用后, 细胞接触消逝, 且部分细胞变圆漂起、膜破裂浓聚、有大量漂浮的细胞碎片; 而(-)-MTX 与正常组比较则变化不明显, 结果见图 2。

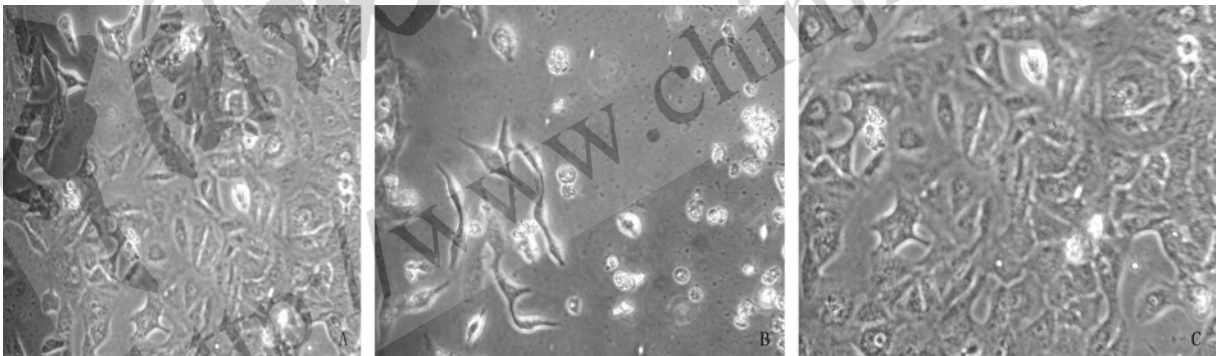


图 2 MTX 处理 A549 细胞 48 h 形态学改变($\times 200$)

A-溶剂组; B- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)-MTX 组; C- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)-MTX 组

Fig 2 Morphological changes on A549 for 48 h ($\times 200$)

A-control group; B- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)-MTX group; C- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)-MTX group

3.3 荧光显微镜观察 DAPI 细胞核染色结果

DAPI 荧光染料可与细胞内的 DNA 结合, 使细胞核发出淡蓝色荧光, 细胞发生凋亡时, 可见凋亡细胞的细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染。A549 细胞分别用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)-MTX、(-)-MTX 作用 48 h 后进行 DAPI 染色。荧光显微镜

下观察: 溶剂对照组细胞核近圆形、边缘清晰、染色均匀; (+)-MTX 组细胞核不规则, 可见细胞核呈致密浓染, 有凋亡小体产生; (-)-MTX 组亦发现细胞皱缩、胞核不规则、致密浓染, 有凋亡小体产生, 但凋亡小体少于(+)-MTX 组。见图 3。

3.4 流式细胞仪对细胞周期分析

流式细胞仪可进行活体细胞分析, 表现为 G_0/G_1 期峰, S 期峰和 G_2/M 期峰。为了观察 (+)MTX 和 (-)MTX 对 A549 细胞周期的影响, 用

流式细胞仪对细胞周期进行分析, 分别以 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 (+)MTX、(-)MTX 作用 A549 细胞 48 h 后, 结果见图 4。

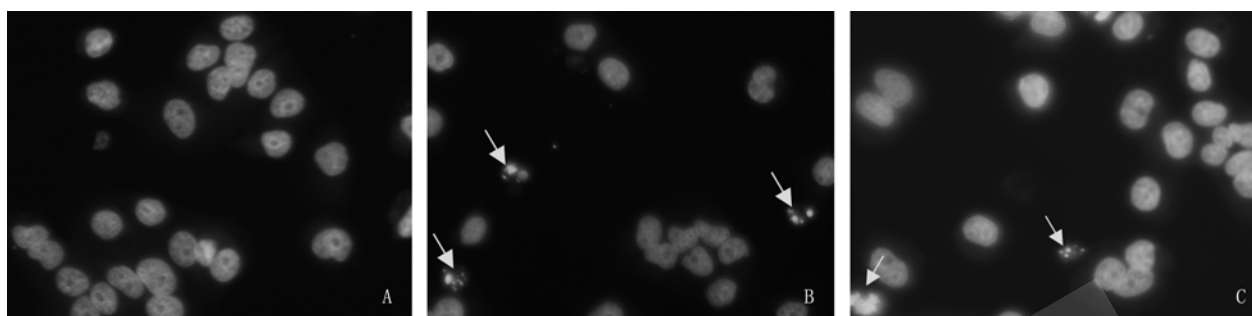


图 3 荧光显微镜观察 DAPI 细胞核染色结果($\times 400$)

A-溶剂组; B- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX 组; C- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)MTX 组

Fig 3 Fluorescent micrographs of A549 induced for 48 h indicated by DAPI($\times 400$)

A-control group; B- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX group; C- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)MTX group

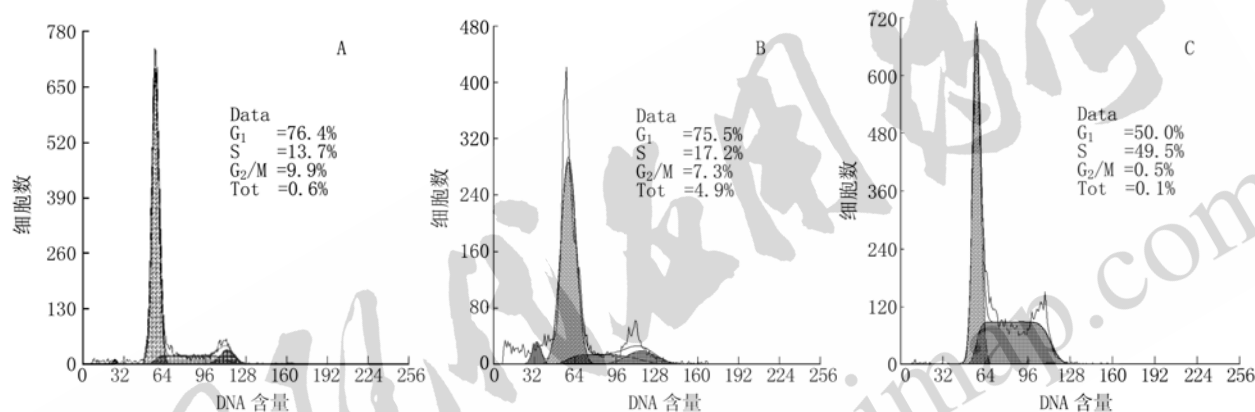


图 4 MTX 处理 A549 细胞 48 h 细胞周期分析

A-溶剂组; B- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX 组; C- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)MTX 组

Fig 4 Cell cycle analysis of A549 cells treated for 48 h by flow cytometry

A-control group; B- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX group; C- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)MTX group

流式细胞仪分析结果 A549 细胞 DNA 直方图显示, 与空白对照组比较, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX 组作用 A549 细胞 48 h 后, 出现 G_1 峰之前的特异的 apoptosis(Ap 峰)峰、而 (-)MTX 未出现。但 (-)MTX 组 A549 处理细胞 48 h 后 G_1 期下降、S 期上升、 G_2/M 期 A549 细胞的比率明显下降, 出现严重阻滞。

3.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

为进一步说明 MTX 作用 A549 细胞后引起细胞凋亡, 并证实细胞 DNA 发生降解。实验中用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 (+)MTX、(-)MTX 作用于 A549 细胞, 48 h 后检测凋亡细胞 DNA 发生降解情况见图 5。结果表明细胞 DNA 有序断裂成 180~200 bp 及其倍数的片段, 电泳后在琼脂糖凝胶上呈梯形条带, 与 (-)MTX 组比较 (+)MTX 组较为明显, 溶剂对照组未形成明显梯形条带。

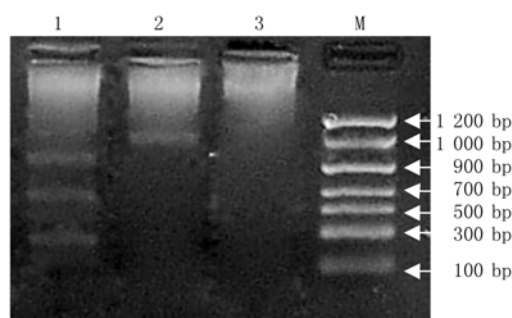


图 5 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果 MTX 作用 A549 细胞 48 h 1- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX 组; 2- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)MTX 组; 3-对照组; M-DNA 标记

Fig 5 The effect of MTX on DNA structure of A549 cells for 48 h determined by agarose gel electrophoresis

1- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX; 2- $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)MTX; 3-control group; M-DNA mark

4 讨论

MTX 消旋体对肿瘤细胞的抑制作用与药物在细胞中的浓度^[8-9]和主要靶酶的活性有关^[10], MTX 抑制肝癌细胞的增殖活动使其凋亡^[11-12], 且通过不同的途径即死亡受体介导的细胞凋亡途径^[13]、线粒体介导的细胞凋亡途径^[14]。同时, MTX 对映体在兔肠刷状缘膜囊^[15]和细胞水平^[16]的吸收存在差异。MTX 消旋体的 2 个对映体对 A549 细胞增殖与凋亡作用是否有差异成为本试验关注的主要问题。本试验研究结果表明(+)MTX 和(-)MTX 对 A549 细胞的抗增殖作用表现时间依赖性和浓度依赖性; (+)MTX 的 IC_{50} 浓度为 $40.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (-)MTX 的最小 IC_{50} 浓度为 $77.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其抗增殖作用明显弱于同浓度的(+)MTX。(+)MTX 和(-)MTX 抗 A549 细胞增殖抑制率分析亦得到同样的结果。 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MTX 对映体作用 A549 细胞 48 h 后, 在显微镜和荧光显微镜下观察(+)MTX 促使细胞出现明显的核固缩、核边集等形态学改变, 且部分细胞变圆漂起、膜破裂浓聚、有大量漂浮的细胞碎片, 明显多于(-)MTX。用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (+)MTX、(-)MTX 分别作用 A549 细胞 48 h 后, 流式细胞仪分析发现(-)MTX 使 A549 细胞 G_1 期下降, S 期上升, G_2/M 期出现不同程度的阻滞, 在相同时间浓度下(+)MTX 作用的细胞出现明显的 AP 峰, 而(-)MTX 未出现。DNA 琼脂糖凝胶电泳结果发现 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的(+)MTX、(-)MTX 作用于 A549 细胞 48 h 后, 凋亡细胞 DNA 发生降解, 有序断裂成 180~200 bp 及其倍数的片段, 电泳后在琼脂糖凝胶上呈梯形条带, 与(-)MTX 组比较(+)MTX 组较为明显。因此, 笔者认为(+)MTX 和(-)MTX 对 A549 细胞的抗增殖作用具有化学结构的立体选择性, (+)MTX 的抗 A549 细胞增殖作用明显强(-)MTX, 同时, (+)MTX, (-)MTX 作用 A549 细胞机制是其影响细胞的 G_1 期、S 期和 G_2/M 期, 最终引起细胞凋亡。结果与文献^[17]报道的 MTX 消旋体作用人腺癌细胞结果相似, 这一研究结果为开发出不良反应少、作用效果更好的(+)MTX 单一体药物提供一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] WU W Q, HE C, QI X F. The development of research and application of chiral drugs [J]. Chin J Mol Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(6): 452-455.
- [2] HU J P, ZHANG J L, SHENG X, et al. Pharmacokinetics of S(+)-ketamine in rats [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2009, 44(7): 532-537.
- [3] WANG R, JIA Z P, CHEN L R, et al. Determination of methotrexate enantiomers in human blood samples with capillary electrophoresis [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2005, 24(2): 19-23.
- [4] TREON S P, CHABNER B A. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy [J]. Clin Chem, 1996, 42(8 Pt 2): 1322-1329.
- [5] TAO S N, HE X D, DONG L, et al. Establishment of methotrexate enantiomers resistant A549 cell lines of human NSCCL and its biological characteristics [J]. Cancer Res Prev Treat(肿瘤防治研究), 2009, 36(4): 273-277.
- [6] DONG L, HE X D, TAO S N, et al. Differential expressions of VEGF and its receptor in methotrexate enantiomer-resistant lung cancer A549 cells [J]. Tumor(肿瘤), 2009, 5(29): 404-408.
- [7] HE X D, HU S H, SHEN Z J, et al. Chiral selectivity in differentiation of lung cancer A549 cells to vascular endothelial cells after drug resistance induced by D-or L-methotrexate enantiomers [J]. Natl Med J China(中华医学杂志), 2009, 89(10): 690-694.
- [8] ROTS M G, PIETERS R, PETERS G J, et al. Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia [J]. Blood, 1999, 9(3): 1677-1683.
- [9] BELKOV V M, KRYNETSKI E Y, SCHUETZ J D, et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation [J]. Blood, 1999, 93(5): 1643-1650.
- [10] MATHERLY L H, TAUB J W, WONG S C, et al. Increased frequency of expression of elevated dihydrofolate reductase in T-cell versus B-precursor acute lymphoblastic leukemia in children [J]. Blood, 1997, 90(2): 578-589.
- [11] WALKER T M, RHODES P C, WESTMORELAND C. The differential cytotoxicity of methotrexate in rat hepatocyte monolayers and spheroid cultures [J]. Toxicol In Vitro, 2000, 14(5): 475-485.
- [12] BOKHARI M, CARNACHAN R J, CAMERON N R, et al. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge [J]. J Anat, 2007, 211(4): 567-576.
- [13] KIM Y J, SONG M, RYU J C. Inflammation in methotrexate-induced pulmonary toxicity occurs via the p38 MAPK pathway [J]. Toxicology, 2009, 256(3): 83-190.
- [14] CHEN Y X, LÜ W G, CHEN H Z, et al. Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 143(2): 107-111.
- [15] ITOH T, ONO K, KOIDO K I, et al. Stereoselectivity of the folate transporter in rabbit small intestine: studies with amethopterin enantiomers [J]. Chirality, 2001, 13(3): 164-169.
- [16] NARAWA T, SHIMIZU R, TAKANO S, et al. Stereoselectivity of the reduced folate carrier in Caco-2 cells [J]. Chirality, 2005, 17(8): 444-449.
- [17] DABROWSKA M, MOSIENIAK G, SKIERSKI J, et al. Methotrexate-induced senescence in human adenocarcinoma cells is accompanied by induction of p21(waf1/cip1) expression and lack of polyploidy [J]. Cancer Lett, 2009, 284(1): 95-101.

收稿日期: 2009-11-30