

雪灵芝水提物对人胃癌 MGC-803 细胞增殖及细胞周期的影响

王刚¹, 张华¹, 杨歆睿², 王海燕¹, 贺菊香¹, 吉利宾¹

Effects of *Arenaria kansuensis* Aqueous Extract on Proliferation and Cell Cycle of Human Gastric Cancer Cell Line MGC-803

WANG Gang¹, ZHANG Hua¹, YANG Xinrui², WANG Haiyan¹, HE Juxiang¹, JI Libin¹

1. Department of Pathology, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China; 2. Department of Function, Huangshi Second Hospital

Abstract: Objective To investigate the effects of *arenaria kansuensis* aqueous extract (AKAE) on proliferation and cell cycle of human gastric cancer cell line MGC-803. **Methods** MGC-803 cells were treated with AKAE at different concentration. The effect on proliferation of MGC-803 cells was detected by MTT assay. The flow cytometry was used to test the cell cycle of MGC-803 cells. The protein and mRNA expressions of cyclin D1, p16 and p21 in MGC-803 cells were detected by western blot and real-time PCR respectively. **Results** The proliferation of MGC-803 cells was dose-dependently inhibited by AKAE treatment *in vitro* ($P < 0.05$), and the value of IC_{50} was (0.134 ± 0.005) mg/ml. After treated with AKAE at the dose of 0.8 mg/ml for 12 h, the ratio of G_1 phase in MGC-803 cell cycle was increased, and the ratio of S phase in MGC-803 cell cycle was decreased ($P < 0.05$). The protein and mRNA expressions of cyclin D1 in MGC-803 cells were obviously blocked by AKAE at the dose of $(0.2-0.8)$ mg/ml ($P < 0.05$). AKAE treatment could enhance the mRNA expressions of p16 and p21 in MGC-803 cells. Compared with control group, the relative expression values of p16 and p21 mRNA in 0.2 mg/ml group were 2.30 and 17.5 times higher, respectively. **Conclusion** AKAE could inhibit the proliferation of MGC-803 cells, and the mechanism is closely associated with G_1 -phase cell cycle arrest and expression of G_1 -phase related factors.

Key words: *Arenaria kansuensis*; MGC-803 cells; Proliferation; Cell cycle

摘要:目的 探讨雪灵芝水溶性提取物(*arenaria kansuensis* aqueous extract, AKAE)对人胃癌细胞株 MGC-803 细胞增殖及细胞周期的影响。**方法** 体外培养的 MGC-803 细胞经不同浓度 AKAE 处理,采用 MTT 法检测受试细胞增殖水平;应用流式细胞术检测 AKAE 处理 12 h 后各组细胞的细胞周期;Western blot 检测不同浓度、不同时间 AKAE 处理组 MGC-803 细胞中 cyclin D1 蛋白表达水平;实时定量 PCR 检测各组 MGC-803 细胞中 cyclin D1、p16 和 p21 基因的 mRNA 相对表达量。**结果** AKAE 对体外培养的 MGC-803 细胞增殖具有浓度依赖性抑制作用 ($P < 0.05$), IC_{50} 为 (0.134 ± 0.005) mg/ml;经 AKAE 处理 12 h, 0.8 mg/ml 组 MGC-803 细胞的 G_1 期细胞比例高于对照组, S 期细胞比例低于对照组 ($P < 0.05$); $(0.2 \sim 0.8)$ mg/ml 浓度的 AKAE 处理,对 MGC-803 细胞中 cyclin D1 的蛋白及 mRNA 表达具有明显抑制作用 ($P < 0.05$); AKAE 促进 MGC-803 细胞中 p16、p21 基因 mRNA 表达, 0.2 mg/ml 处理组 p16、p21 mRNA 相对表达量分别为对照组的 3.3 倍和 18.5 倍。**结论** 雪灵芝水提物(AKAE)对 MGC-803 细胞增殖具有抑制作用,其机制与 G_1 期阻滞和对 G_1 期相关因子表达的影响有关。

关键词: 雪灵芝; MGC-803 细胞; 增殖; 细胞周期

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-01-03; 修回日期: 2013-06-18

基金项目: 国家自然科学基金地区基金资助项目 (81060369); 青海省应用基础研究项目资助课题 (2010-Z-722)

作者单位: 1. 810001 西宁, 青海大学医学院病理学教研室; 2. 黄石市第二医院功能科

作者简介: 王刚 (1966-), 男, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤病理学研究

0 引言

雪灵芝 (*arenaria kansuensis*) 是生长于海拔 4 000 米以上高山草甸及砾石中的石竹科蚤缀属草本植物, 藏医典籍记载其具有“治疗胃肠溃疡、膨胀、癌症、瘰疬及健胃助消”的功效^[1]。近年来, 国内研究者对雪灵芝抗炎、抗氧化、促消化及肝脏保护等

药理作用进行了研究报道^[2-6]。赵鹏等^[7]进行的雪灵芝提取物体内抗肿瘤研究显示,雪灵芝对二乙基亚硝胺诱发的大鼠肝癌具有预防和抑制作用,雪灵芝可显著提高受试大鼠存活率和体重。本实验前期初步研究显示,雪灵芝提取物对体外培养的人胃癌细胞株 BGC823 和人肝癌细胞株 Smmc7721 具有增殖抑制作用,而对正常组织来源细胞(人羊膜 WISH 细胞、人肝细胞株 HL7702)的增殖不仅无抑制,而且具有一定的促进作用。为探索雪灵芝对胃癌细胞的增殖抑制效应与机制,本研究通过体外途径,观察雪灵芝水提取物(arenaria kansuensis aqueous extract, AKAE)对人胃癌细胞株 MGC-803 的增殖水平、细胞周期及其相关因子表达水平的影响,为进一步开展相关研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 MGC-803 购于中国科学院上海细胞库;雪灵芝水提取物冻干粉剂由本实验室制备,用 PBS 溶解,浓度 1 mg/ml;四甲基偶氮唑盐(MTT)、胰蛋白酶、RPMI1640 培养液均购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;鼠抗人 cyclin D1 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司;碘化丙啶(PI)、蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度试剂盒、ECL 化学发光试剂盒均购自碧云天生物技术研究;Trizol 购自 Invitrogen 公司;AMV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司;SYBR Green PCR 试剂盒购自 QIAGEN 公司;流式细胞仪(FACS calibur, BD 公司);荧光定量 PCR 仪(FQD-48A 型,杭州博日科技有限公司);酶标仪(Rayto RT-6000 型,深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 AKAE 对人胃癌细胞 MGC-803 增殖的影响 取对数生长期 MGC-803 细胞,用含 10%小牛血清的培养液配成 2×10^4 /ml 的细胞悬液,按 100 微升/孔接种于 96 孔培养板。培养 24 h 后,各处理组细胞分别加入含不同浓度 AKAE 的培养液(100 微升/孔),以 0 mg/ml 组为对照组,加入等体积培养液。每组设 5 个复孔,分别于药物作用 24、48 及 72 h 时终止培养,加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μ l,孵育 4h 后吸弃上清液,加入 DMSO 溶液(5 mg/ml)150 μ l,振荡溶解 10 min,酶标仪 490 nm 波长处测吸光度(A)值。细胞增殖抑制率(%) = $(1 - \text{实验孔 A 值} / \text{对照孔 A 值}) \times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞仪检测 AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞周期的影响 MGC-803 细胞经不同浓度 AKAE 处理 12 h,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,以 70%冷乙醇置 4℃固定保存;上机检测前离心沉淀细胞,PBS 洗涤 2 次后调整细胞密度至 1×10^4 cells/ml,加入含 RNaseA 的 50×PI 染色液,4℃避光染色 30 min,流式细胞仪(激发波长 488 nm)测定荧光强度,以 Modfit 软件进行细胞周期分析。

1.2.3 Western blot 检测 cyclin D1 蛋白表达 人胃癌 MGC-803 细胞经不同浓度 AKAE 处理 8、24 和 48 h,预冷 PBS 漂洗细胞,置冰上加入细胞裂解液,裂解 20 min,收集上清液。BCA 蛋白浓度试剂盒测蛋白质浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移样品至硝酸纤维素膜,经 5%脱脂奶粉(TBS-T 配制)4℃封闭过夜,加入 1:200 稀释的鼠抗人 cyclin D1 单抗(一抗),4℃孵育过夜。TBS 漂洗后加入 1:1000 稀释的辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(二抗),室温孵育 1 h, TBS 漂洗后滴加 ECL 化学发光液,暗室内曝光 X 胶片。

1.2.4 RT-PCR 及荧光定量 PCR 检测 cyclin D1、p16 和 p21 基因 mRNA 的表达 MGC-803 细胞经不同浓度 AKAE 处理 6 h, Trizol 法抽提总 RNA,合成 cDNA 第一链;引物序列: cyclin D1(上游 5'-GAACAGAAGTGCGAGG-3', 下游 5'-GCGG-TAGTAGGACA-3'); p16 (上游 5'-ACGCAC-CGAATAGTTA-3', 下游 5'-ATGGTTACTGCTCT-3'); p21 (上游 5'-CGTGAGCGATG-GAACT-3', 下游 5'-AATCTGTCATGCTGGTC-3');配制 25 μ l PCR 反应体系: ddH₂O 15.5 μ l, 10×PCR 缓冲液 2.5 μ l, dNTP 混合液(2.5 mmol/L)2 μ l, MgCl₂(25 mmol/L)1.5 μ l, Taq 酶(5 u/ μ l)0.5 μ l, cDNA 1.0 μ l, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ l; PCR 反应条件: 94℃变性 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s 扩增 33 个循环, 72℃延伸 5 min。扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳; 20 μ l 荧光定量 PCR 体系: ddH₂O 7 μ l, 2× QuantiFast SYBR Green PCR 预混液 10 μ l, cDNA 1 μ l, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ l。扩增条件: 95℃变性 5 min, 95℃ 15 s, 60℃ 45 s(测荧光 1 次)进行 40 个循环;之后从 60℃至 95℃,以 0.2℃台阶升温,进行熔解曲线分析。各组样品设 3 复孔,以管家基因 G3PDH 为内参照,以 0 mg/ml 组为标准对照比较,计算 Δ Ct 值及 $\Delta\Delta$ Ct 值: Δ Ct = Ct(目的基因) - Ct(管家基因), $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct(处理组) - Δ Ct(对照组), 以 $\Delta\Delta$ Ct 均值进行组间比较,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 以 Scheffe 法进行显著性检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响

在相同作用时间下, 各 AKAE 处理组人胃癌 MGC-803 细胞增殖抑制率呈浓度依赖性升高 ($P < 0.05$), 半数抑制浓度 (IC_{50}) = (0.134 ± 0.005) mg/ml; 而比较相同 AKAE 浓度组、不同作用时间下的 MGC-803 细胞增殖抑制率, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。

2.2 AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞周期的影响

经不同浓度 AKAE 处理 12 h, 人胃癌细胞株 MGC-803 细胞周期中 G_1 期细胞比例随 AKAE 浓度增加而呈逐渐上升的趋势, 0.8 mg/ml 组 G_1 期细胞比例明显高于 0 mg/ml 组 G_1 期细胞比例 ($P < 0.05$); 而细胞周期中 S 期细胞比例随 AKAE 浓度增加而呈逐渐下降的趋势, 0.8 mg/ml 组 S 期细胞比率明显低于 0 mg/ml 组 S 期细胞比例 ($P < 0.05$), 见图 2、表 1。

803 细胞中 cyclin D1 蛋白表达水平接近; 经 AKAE 作用 24 与 48 h, 不同浓度处理组 MGC-803 细胞中 cyclin D1 蛋白表达水平呈浓度-时间依赖性下降, 见图 3。

表 1 不同浓度雪灵芝水溶性提取物对 MGC-803 细胞周期的影响(%, $n = 3$)

Table 1 Effects of AKAE treatment at different concentration on cell cycle of MGC-803 cells (% , $n = 3$)

Concentration (mg/ml)	G_1	S	G_2
0	49.22 ± 4.87	35.55 ± 2.13	15.23 ± 1.56
0.2	49.35 ± 5.46	35.06 ± 2.06	15.58 ± 0.87
0.4	49.81 ± 3.89	33.40 ± 3.07	16.79 ± 2.09
0.8	54.59 ± 4.43★	30.54 ± 2.85★	14.86 ± 1.41

Note: ★: $P < 0.05$, compared with 0 mg/ml group

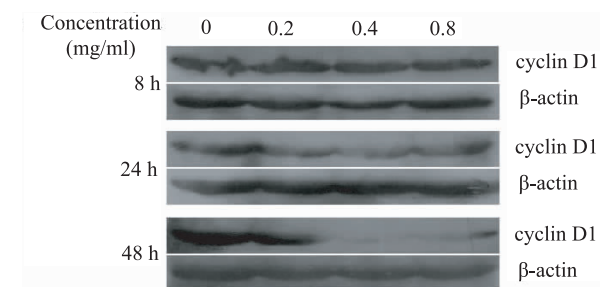
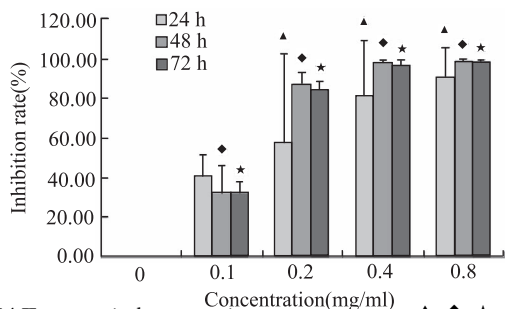


图 3 雪灵芝水溶性提取物对人胃癌 MGC-803 细胞 cyclin D1 蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of AKAE on expression of cyclin D1 protein in MGC-803 cells

2.4 AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞 cyclin D1、p16 和 p21 mRNA 表达的影响

MGC-803 细胞经 AKAE 作用 6 h, Trizol 法抽提总 RNA, RT-PCR 扩增出 477 bp cyclin D1 条带、311 bp p16 条带及 313 bp p21 条带。SYBR 荧光定量 PCR 检测结果显示, 在 0 mg/ml (对照) 组、0.1、0.2 及 0.4 mg/ml 处理组中, cyclin D1 基因 mRNA 相对表达量分别为 1、0.63、0.45 和 0.26, p16 基因 mRNA 相对表达量分别为 1、1.79、3.30 和 1.40, p21 基因 mRNA 相对表达量分别为 1、10.56、18.5

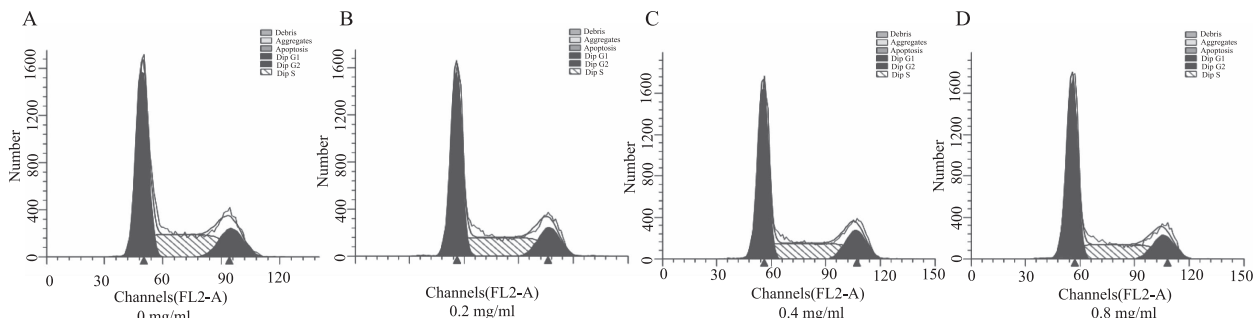


AKAE: arenaria kansuensis aqueous extract; ▲, ◆, ★: $P < 0.05$, compared with 0 mg/ml group

图 1 雪灵芝水溶性提取物对 MGC-803 细胞增殖的影响
Figure 1 Effects of AKAE on proliferation of MGC-803 cells

2.3 AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞 cyclin D1 蛋白表达的影响

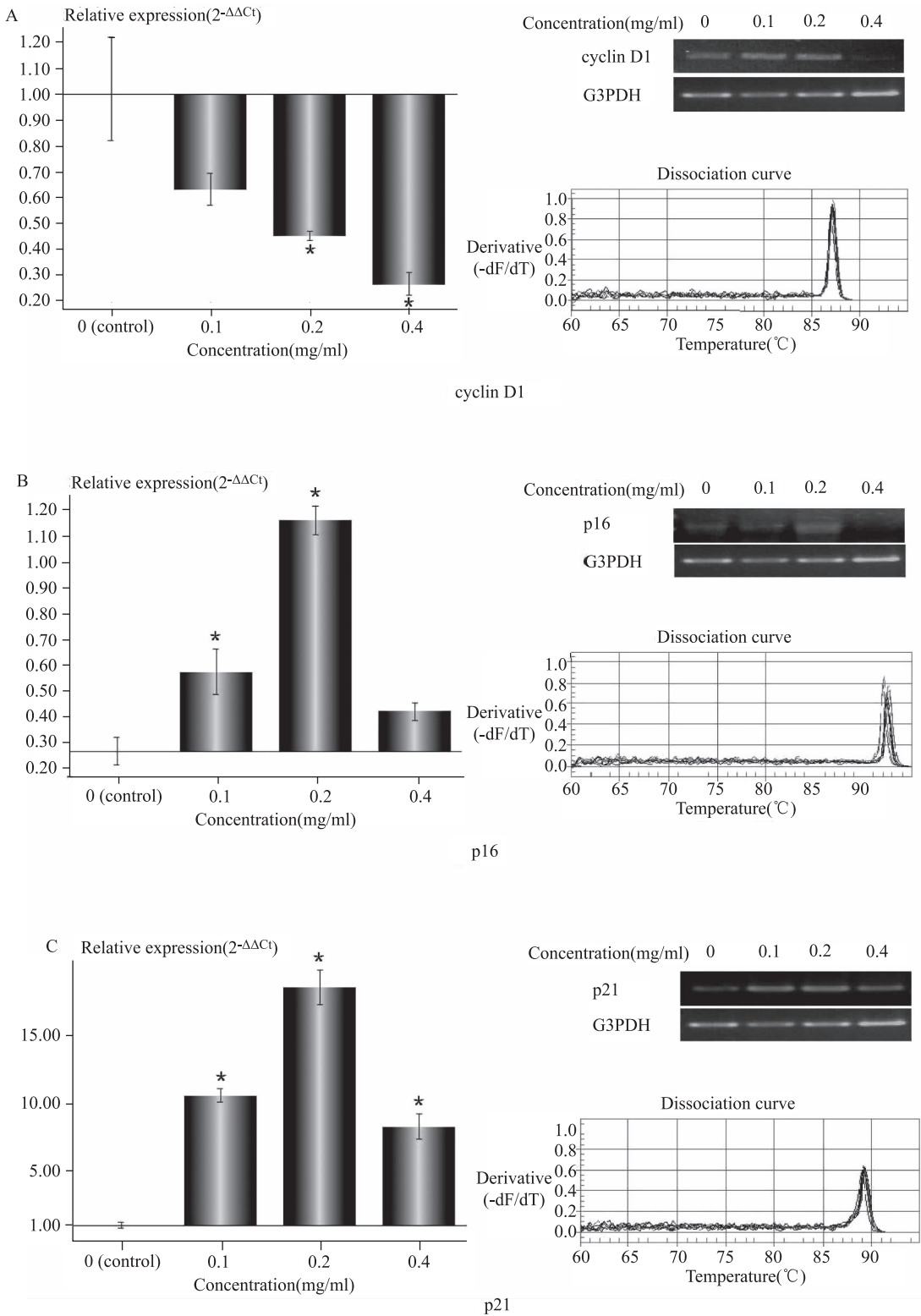
经 AKAE 作用 8 h, 不同浓度 AKAE 组 MGC-



A: 0 mg/ml AKAE; B: 0.2 mg/ml AKAE; C: 0.4 mg/ml AKAE; D: 0.8 mg/ml AKAE

图 2 不同浓度雪灵芝水溶性提取物对 MGC-803 细胞周期的影响

Figure 2 Effects of AKAE treatment at different concentration on cell cycle of MGC-803 cells



*: $P < 0.05$, compared with 0 mg/ml group; A: expression of cyclin D₁; B: expression of p16; C: expression of p21

图 4 雪灵芝水溶性提取物对人胃癌 MGC-803 细胞 cyclin D₁、p16 和 p21 mRNA 表达的影响
Figure 4 Effects of AKAE on mRNA expressions of cyclin D₁, p16 and p21 in MGC-803 cells

和 8.26。上述三种扩增产物溶解曲线峰值单一，表明无非特异性 DNA 扩增产物，见图 4。

3 讨论

雪灵芝在藏族民间又称“阿仲孕保”，是青藏高原

特有的野生藏药药材，根据近年来相关植化研究报告，雪灵芝含有皂甙、多糖、黄酮、生物碱及环肽等潜在的抗肿瘤成分^[8-9]。雪灵芝对肝癌细胞增殖影响方面的药理研究，也见诸于报道^[10]。本研究采用 MTT 法检测细胞增殖水平，结果显示，在 0.1~0.8 mg/ml

浓度范围,AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞增殖具有明显的浓度依赖性抑制作用,药物浓度梯度与抑制率之间呈良好的线性关系;比较相同 AKAE 浓度、不同作用时间下的 MGC-803 细胞增殖抑制率,结果显示差异无统计学意义,提示 AKAE 对 MGC-803 细胞增殖的影响不具有时间依赖性。

国内外研究表明,细胞周期调控紊乱是导致肿瘤细胞失控性增殖的主要因素。对肿瘤细胞的细胞周期进行干预,是抗肿瘤药物实现抑制肿瘤细胞增殖效应的途径之一。本研究通过流式细胞术检测细胞周期的结果显示,经不同浓度 AKAE 作用 12 h, MGC-803 细胞的细胞周期构成比例出现变化,0.8 mg/ml AKAE 处理组 G₁ 期细胞比例较对照组 G₁ 期细胞比例升高,而 0.8 mg/ml AKAE 处理组 S 期细胞比例低于对照组 S 期细胞比例, G₂ 期细胞比例也略有下降,提示 AKAE 对 MGC-803 细胞增殖具有一定的 G₁ 期阻滞作用。

细胞增殖过程中,细胞从 G₁ 期进入 S 期是细胞分裂的关键环节。细胞周期素 D1 (cyclin D1)、p16 蛋白及 p21 蛋白是 G₁ 期重要的调控因子^[11-12]。cyclin D1 作为 G₁ 期重要的正性调控因子,可与 CDK4 或 CDK6 结合并激活后者,继而使 Rb 蛋白磷酸化而释放出转录因子 E2F,从而启动 S 期 DNA 复制,促使细胞从 G₁ 期进入 S 期;p16 蛋白是 G₁ 期负性调节因子,它通过抑制 CDK4 的活性,阻止细胞进入 S 期,p16 蛋白表达降低或表达缺失可导致细胞发生恶性增殖。此外,p21 蛋白是近年来发现的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物家族成员,它与 p53 蛋白共同构成细胞周期 G₁ 检查点,当细胞 DNA 受损并未经修复情况下,则不能通过此检查点。因此,细胞内保持一定水平的 p21 蛋白对防止 DNA 受损细胞进入增殖周期具有重要意义。本研究显示,AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞中 cyclin D1 的蛋白及 mRNA 表达均有明显抑制作用;经蛋白印迹检测,0.4~0.8 mg/ml AKAE 处理对 MGC-803 细胞中 cyclin D1 的蛋白表达具有浓度-时间依赖性抑制作用;实时定量 PCR 结果显示,0.4 mg/ml AKAE 处理组 MGC-803 细胞的 cyclin D1 mRNA 相对表达量仅为对照组 cyclin D1 mRNA 表达量的 26%。此外,实时定量 PCR 检测结果还显示,AKAE 可促进 MGC-803 细胞中 p16 及 p21 基因的 mRNA 表达。经 AKAE 作用 6 h,0.2 mg/ml 浓度组人胃癌 MGC-803 细胞的 p16 与 p21 的 mRNA 相对表达量分别为对照组表达量的 3.3 倍和 18.5 倍。以上结果提示,AKAE 通过降低 cyclin D1 的表达水平而抑制其 G₁ 期正性调控作用,同时通过促进 p16 与 p21

蛋白的表达而增强它们的 G₁ 期负性调节作用。对上述 G₁ 期相关的正性、负性调节因子表达水平同时发挥干预效应,可能是 AKAE 对人胃癌 MGC-803 细胞发挥 G₁ 期阻滞、影响 MGC-803 细胞增殖的分子机制之一。

参考文献:

- [1] Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan Medicine [M]. Xi'ning: Qinghai People's Publishing House, 1991: 449. [中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁:青海人民出版社, 1991:449.]
- [2] Peng BZ, Feng WL, Wang LY, *et al.* Effect of Tibetan drug *Arenaria kansuensis* Maxim. var. *ovatipetala* Tsui on inflammation and immunological function[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 1991, 16(6):363-6, 383. [彭宝珠, 冯伟力, 王利彦, 等. 藏药雪灵芝对炎症和免疫功能的影响[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(6):363-6, 383.]
- [3] Fu X, Chen W, Duan XQ, *et al.* Free radical scavenging and antiliperoxidant properties of *Arenaria kansuensis* extracts [J]. *Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi*, 2010, 17(7):35-6. [付翔, 陈薇, 段小群, 等. 雪灵芝提取物清除羟自由基和抑制脂质过氧化作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(7):35-6.]
- [4] Zhang L, Li X, Huang YM. Protective effectes of Xuelingzhi (herb *arenariae*) on brain ischemia-reperfusion in rats[J]. *Sichuan Shi Fan Da Xue Xue Bao (Zi Ran Ke Xue Ban)*, 2007, 30(3):395-7. [张丽, 黎霞, 黄叶梅. 雪灵芝对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2007, 30(3):395-7.]
- [5] Tang QN, Feng M, Gong SJ, *et al.* The effects of extracts from *Arenaria kansuensis* on the levels of HBsAg and HBeAg in HepG2. 2. 15 cells[J]. *Zhong Yao Cai*, 2008, 31(8):1212-6. [唐庆年, 冯梅, 龚爱基, 等. 雪灵芝提取物对 HepG2. 2. 15 细胞株 HBsAg 与 HBeAg 表达的影响[J]. 中药材, 2008, 31(8):1212-6.]
- [6] Yao SY, Zhao P, Liu RZ, *et al.* Experiment study on effect of Tibetan *A. kansuensis* facilitating digestion [J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2007, 23(3):332-3, 364. [姚思宇, 赵鹏, 刘荣珍, 等. 西藏雪灵芝促进消化作用实验研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 23(3):332-3, 364.]
- [7] Zhao P, Yao SY, Wang YW, *et al.* Effect of *A. kansuensis* on inhibiting liver cancer induced by diethylnitrosamine in rats [J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2007, 11(38):7553-5. [赵鹏, 姚思宇, 王彦武, 等. 雪灵芝对二乙基亚硝酸胺诱导大鼠肝癌组织细胞的抑制作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(38):7553-5.]
- [8] Cheng L, Wu XX, Huang H, *et al.* Triterpenoid saponins from *Arenaria L. plants* [J]. *Zhong Cao Yao*, 2004, 35(9):1076-9. [成丽, 伍贤学, 黄浩, 等. 蚤缀属植物中的三萜皂苷化学成分[J]. 中草药, 2004, 35(9):1076-9.]
- [9] Lei N, Du SS, Li L, *et al.* Chemical constituents from a tibetan medicine *Arenaria kansuensis* I [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2007, 32(10):918-20. [雷宁, 杜树山, 李林, 等. 藏药甘肃蚤缀的化学成分研究 I [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10):918-20.]
- [10] Liu XX, Wan ZJ, Deng XB, *et al.* *In vitro* bioactivity of different extracts from *Arenaria kansuensis maxim* [J]. *Ying Yong Yu Huan Jing Sheng Wu Xue Bao*, 2010, 16(5):642-5. [刘笑笑, 万振江, 邓小波, 等. 雪灵芝不同提取物的生物活性[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(5):642-5.]
- [11] Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, *et al.* Abnormal expression of pRb, p16, and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival [J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(12):1276-82.
- [12] Shiozaki A, Otsuji E, Marunaka Y. Intracellular chloride regulates the G(1)/S cell cycle progression in gastric cancer cells [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2011, 3(8):119-22.