

厄洛替尼对肺癌模型小鼠的时辰药理学作用及相关机制研究

王培培^{1*}, 李明春^{2#}, 刘 姣¹, 张 彬¹, 刘 亮¹, 付青姐², 赵丽艳²(1.青岛大学医学院药理学系, 山东青岛 266000; 2.解放军第401医院药剂科, 山东青岛 266071)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0797-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.10

摘要 目的:研究厄洛替尼按不同时辰给药的抗肿瘤作用,并探讨其可能的作用机制。方法:建立Levis肺癌细胞皮下移植瘤小鼠模型,随机分为A、B、C、D、E、F 6个厄洛替尼用药组和模型组,A~F组小鼠分别在对应的8:00、12:00、16:00、20:00、24:00、次日4:00灌胃给予厄洛替尼30 mg/kg,模型组小鼠给予同体积的羧甲基纤维素钠溶液。检测20 d内各组小鼠肿瘤体积及第21天时肿瘤质量和肿瘤组织中表皮生长因子受体(EGFR)及其下游信号分子蛋白激酶B(PKB)、周期素依赖性激酶4(CDK-4)和细胞周期蛋白D1(Cyclin D1) mRNA的表达水平。结果:与模型组比较,A~F组小鼠肿瘤生长较缓慢($P<0.05$),明期(8:00—16:00)肿瘤生长较暗期(20:00—次日4:00)缓慢,其中C组小鼠肿瘤生长最慢,E组小鼠肿瘤生长最快($P<0.05$);A~F组小鼠肿瘤质量均降低,其中A、B、C组比D、E、F组降低明显,C组最明显;A、B、C组小鼠EGFR、PKB、Cyclin D1 mRNA表达较D、E、F组降低明显。结论:厄洛替尼对肺癌模型小鼠的抗肿瘤作用初步认为明期比暗期明显,其作用机制可能与EGFR/PKB/Cyclin D1/CDK-4介导的凋亡通路有关。

关键词 厄洛替尼;昼夜节律;时辰化疗;Levis肺癌细胞;抗肿瘤;机制

Chronopharmacology of Erlotinib in Lung Cancer Model Mice and Its Mechanism

WANG Pei-pei¹, LI Ming-chun², LIU Jiao¹, ZHANG Bin¹, LIU Liang¹, FU Qing-jie², ZHAO Li-yan²(1.Dept. of Pharmacology, Medical College, Qingdao University, Shandong Qingdao 266000, China; 2.Dept. of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Shandong Qingdao 266071, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the antitumor effects of erlotinib with different dosing time and its underlying mechanism. **METHODS:** Levis lung cancer cell subcutaneously implanted tumor mice model was established, and then mice were randomly divided into erlotinib groups (A, B, C, D, E, F) and model group. Group A-F were given 30 mg/kg erlotinib intragastrically at 8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00, 4:00 of the next day. The model group received the same volume of Sodium carboxymethyl cellulose solution. The 20 d tumor volume and tumor weight on the 21th day of mice were measured. The mRNA expressions of EGFR, PKB, CDK-4 and Cyclin D1 in tumor tissue were detected. **RESULTS:** Compared with model group, the tumor volume of mice decreased significantly in erlotinib group ($P<0.05$), more slowly in the light period (8:00—16:00) than dark period (20:00—4:00 of the next day); the tumor growth of group C was the lowest while that of group E was the highest ($P<0.05$). The tumor weight decreased significantly in groups A-F, and the decrease of groups A, B and C were more significant than those of groups D, E and F and the antitumor effect of group C was best; mRNA expression of EGFR, PKB and Cyclin D1 decreased significantly in group A, B, C, D, compared with group D, E and F. **CONCLUSIONS:** The antitumor effect of erlotinib on lung cancer mice is more significant in light period than in dark period. Its mechanism is partly related to EGFR-PKB-Cyclin D1-CDK-4 apoptosis pathway.

KEYWORDS Erlotinib; Circadian rhythms; Chronochemotherapy; Levis lung cancer cells; Antitumor; Mechanism

生物节律是近年来生命科学研究的热点,以此为基础的时辰药理学正在迅速发展,其研究结果将为高效低毒的时辰给药方式尤其是恶性肿瘤的时辰化疗提供实验基础和临床应用参考。目前,肿瘤的时辰化疗研究主要集中在传统化疗药物^[1],而对小分子靶向药物的研究国内外鲜少报道。厄洛替尼是新

一代的小分子靶向药物,能够选择性地作用于细胞内的靶标,阻断表皮生长因子受体(Epithelial growth factor receptor, EGFR)细胞传导通路,抑制肿瘤的发展,而对正常的细胞几乎无损伤作用^[2]。有研究发现,EGFR及其下游信号分子蛋白激酶B(PKB,又称AKT)、周期素依赖性激酶4(Cyclin dependent kinase 4, CDK-4)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)与恶性肿瘤的发生发展密切相关^[3-4]。研究上述信号分子在不同时间点的表达情况,将有助于探讨厄洛替尼的时辰药理学作用机制。本文拟通过初步研究厄洛替尼抗肿瘤作用的昼夜节律特点及其

* 硕士研究生。研究方向:分子免疫药理学。电话:0532-51872904。E-mail: xiaohaippw@163.com

通信作者:主任药师,教授。研究方向:分子免疫药理学。电话:0532-51870086。E-mail: lmc401y@163.com

相关作用机制,以期对其临床安全、合理用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

DW-86WHO型-86℃低温保存箱(中国澳柯玛公司);AE240型电子分析天平(美国Mettler公司);JM-A型电子天平(余姚市纪铭校验称重设备有限公司);光学显微镜(上海光学仪器厂);TGL16型台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司);CB150型CO₂培养箱(德国Binder公司);TL988型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(西安天隆公司);XS-800i全自动血液分析仪(希森美康医用电子有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸厄洛替尼片(商品名:特罗凯,瑞士罗氏有限公司,批号:10132222,规格:以厄洛替尼计每片150mg);胎牛血清(批号:NWK0489)、胰蛋白酶(批号:NWK0125)均购自美国HyClone公司;mRNA提取试剂盒(批号:AK7806)、cDNA提取试剂盒(批号:AK2001)、RNA扩增试剂盒(批号:AK3801)均购自大连Takara公司;实时定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 动物

C57BL/6小鼠,SPF级,体质量(20±3)g,♀,由北京维通利华实验功能技术有限公司提供,使用许可证号:SCXK(京)2012-0001。实验前两周至实验结束,将小鼠置于标准的明-暗周期下饲养(明期7:00-19:00,暗期19:00-7:00,明期、暗期各12h),明期光照500lx,暗期光照0,自由进水进食,维持室温为20~23℃,湿度为45%~65%。

1.4 细胞

Levis肺癌细胞,由北京北纳创联生物技术研究院提供,第4代,货号为ATCC CRL-1642。

2 方法

2.1 建立皮下移植瘤小鼠模型

Levis肺癌细胞系用含10%胎牛血清的高糖达尔伯克改良伊格格(DMEM)培养基在37℃、5%CO₂条件下培养,收集对数生长期的肺癌细胞,调整细胞悬液浓度至1×10⁷ ml⁻¹,于小鼠右后肢内侧皮下注射约0.2 ml细胞悬液,接种7 d后肉眼可见肿瘤生长,即模型建立成功。待肿瘤生长至0.5~1.5 cm³,进行随机分组实验。

2.2 分组与给药

取“2.1”项下模型小鼠70只,随机分为A、B、C、D、E、F 6个厄洛替尼用药组和模型组,每组10只,A~F组小鼠分别在对应的8:00、12:00、16:00、20:00、24:00、次日4:00 6个时间点灌胃给予厄洛替尼混悬液(以0.5%羧甲基纤维素钠为溶剂)30 mg/kg,模型组小鼠给予同体积的5%羧甲基纤维素钠溶液;另设10只未种瘤的正常小鼠给予同体积的蒸馏水为正常对照组。

2.3 常规指标检测

观察20 d内各组小鼠的食欲、运动、精神状态,测量小鼠肿瘤体积,用游标卡尺测量瘤体的长径和短径,计算瘤体积(公式:体积=短径²×长径/2)^[9],绘制瘤体的生长曲线。第21天,按不同时辰点眼眶内眦取血,做血常规检测。然后断颈处死小鼠,剥离肿瘤,称瘤质量,计算抑瘤率[公式:抑瘤率=(模型组瘤平均质量-用药组瘤平均质量)/模型组瘤平均质量×100%],再将肿瘤组织立即放入液氮中保存。

2.4 肿瘤组织中EGFR、PKB、CDK-4和Cyclin D1基因表达检测

2.4.1 组织样品的RNA提取。取超低温冻结的肿瘤组织,称量100 mg后迅速转移至用液氮预冷的研钵中,用研杵研磨组织。其间,不断加入液氮,直至研磨成粉末状,提取总RNA,充分匀浆,按试剂盒说明书操作提取总RNA。取每个样品4 μl进行反转录试验,逆转录条件为:37℃,15 min;98℃,5 s。逆转录后样品置于-80℃保存。

2.4.2 RT-PCR试验。按RT-PCR检测试剂盒说明书要求,分别检测肿瘤组织中EGFR、PKB、CDK-4和Cyclin D1 mRNA水平。用于RT-PCR扩增的所有引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成,EGFR上游引物:5'-CCTCCACTGTCCAGCT-CATTAC-3',下游引物:5'-TTCCAGGTAGTTCATGCCCTTT-3',片段大小140 bp;PKB上游引物:5'-TGAGGTTGCCCA-CACGCTTA-3',下游引物:5'-CCCGTTGGCATACTCCAT-GAC-3',片段大小127 bp;CDK-4上游引物:5'-CAGAGCTCT-TAGCCGAGCGTA-3',下游引物:5'-GGCACCACAC-CAATTCAG-3',片段大小87 bp;Cyclin D1上游引物:5'-TACCGACAACGCACCTTTC-3',下游引物:5'-AAGGGCTT-CAATCTGTTCTG-3',片段大小84 bp;内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物:5'-TGTGTCCGTCGTGGATCT-GA-3',下游引物:5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3',片段大小150 bp。反应参数:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环。每个标本重复3次,取平均表达量(C_i),按以下方法分别计算各基因表达量:ΔΔC_i=(实验组目的基因C_i-实验组内参C_i)-(对照组目的基因C_i-对照组内参C_i)。式中,实验组指A~F组,对照组指模型组。设对照组的基因表达量为1,以实验组的基因较对照组基因表达量的倍数2^{-ΔΔC_i}为指标评价各基因的表达水平。

2.5 统计学方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0软件进行统计分析,组间比较选择单因素方差分析和最小显著性差异(LSD)法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠基本情况

与正常对照组比较,明期A、B、C组小鼠给药后行动较灵活,反应较灵敏,精神饮食较给药前比较变化不大;暗期D、E、F组小鼠给药后,可观察到其行动较迟缓、反应较迟钝、精神饮食较给药前差。

3.2 肿瘤生长情况

各组小鼠移植瘤体积变化曲线见图1。

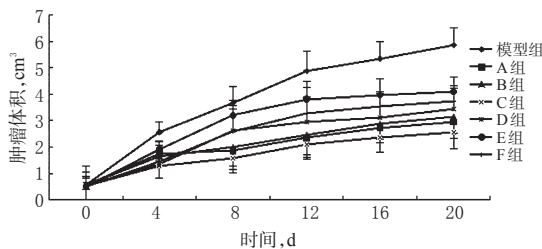


图1 各组小鼠移植瘤体积变化曲线

Fig 1 Growth curve of transplanted tumor in mice

由图1可见,模型组小鼠肿瘤呈持续迅速生长,生长曲线相对较陡直。与模型组比较,A~F组小鼠肿瘤生长较缓慢

($P < 0.05$), 明期肿瘤生长较暗期缓慢, 其中 C 组小鼠肿瘤生长最慢, E 组小鼠肿瘤生长最快 ($P < 0.05$)。

3.3 血常规指标情况

各组小鼠血常规指标比较见表 1。

表 1 各组小鼠血常规指标变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Comparison of routine blood test indicators in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	白细胞计数, $10^9 L^{-1}$	中性粒细胞计数, $10^9 L^{-1}$	淋巴细胞计数, $10^9 L^{-1}$	血红蛋白量, g/L
正常对照组	5.55 ± 0.58	4.14 ± 0.58	4.14 ± 0.58	161.55 ± 8.02
模型组	12.37 ± 1.17*	7.15 ± 0.87*	7.15 ± 0.87*	137.28 ± 20.78*
A 组	12.12 ± 2.54	5.98 ± 1.12	5.97 ± 1.12	117.75 ± 22.4
B 组	8.46 ± 2.23	4.69 ± 1.24	4.70 ± 1.24	124.00 ± 17.05
C 组	10.26 ± 0.64	4.91 ± 0.65	4.91 ± 0.65	103.25 ± 31.87 [#]
D 组	9.71 ± 1.34	4.83 ± 0.48	4.83 ± 0.48	98.50 ± 22.38 [#]
E 组	18.15 ± 2.51 [#]	11.36 ± 2.12 [#]	11.35 ± 2.17 [#]	118.25 ± 8.55
F 组	18.09 ± 1.11 [#]	10.26 ± 1.57 [#]	10.26 ± 1.51 [#]	130.25 ± 17.11
F	4.943	4.027	4.027	3.311
P	0.000	0.002	0.002	0.006

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: [#] $P < 0.05$

由表 1 结果可知, 与正常对照组比较, 模型组小鼠白细胞、中性粒细胞和淋巴细胞计数均明显增加, 血红蛋白量明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较, E、F 组小鼠白细胞、中性粒细胞和淋巴细胞计数均明显增加 ($P < 0.05$), C、D 组小鼠血红蛋白量均明显减少 ($P < 0.05$), 其余各组小鼠上述指标变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.4 瘤质量和抑瘤率情况

各组小鼠移植瘤质量及抑瘤率比较见表 2。

表 2 各组小鼠移植瘤质量及抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Comparison of transplanted tumor weight and inhibition rate in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	瘤质量, g	抑瘤率, %
模型组	3.84 ± 1.02	
A 组	2.32 ± 0.68*	39.58
B 组	2.61 ± 0.54*	32.03
C 组	1.96 ± 0.77*	48.95
D 组	2.93 ± 0.82*	23.70
E 组	3.17 ± 0.51	17.45
F 组	2.82 ± 0.45*	26.56

与模型组比较: * $P < 0.05$

vs. model group: * $P < 0.05$

由表 2 结果可知, 与模型组比较, A~F 组小鼠移植瘤质量均降低, 其中 A、B、C 组小鼠的瘤质量降低较 D、E、F 组明显, C 组最明显, 抑瘤率最高。

3.5 肿瘤组织中基因表达情况

与模型组比较, A、B、C、D 组小鼠肿瘤组织中 EGFR、PKB、Cyclin D1 mRNA 表达相对量明显降低 ($P < 0.05$)。上述指标 A、B、C 组降低较 D、E、F 组明显。各组小鼠肿瘤组织中 EGFR、PKB、CDK-4、Cyclin D1 mRNA 表达比较见表 3。

4 讨论

在本研究中, 应用盐酸厄洛替尼按时辰给药, 目的是期望最大限度提高疗效、降低毒副作用。细胞的分裂、增殖、代谢等生命活动与生物周期节律有关。有研究表明, 增殖期细胞

表 3 各组小鼠肿瘤组织中 EGFR、PKB、CDK-4、Cyclin D1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig 3 Comparison of mRNA expression of EGFR, PKB, CDK-4 and Cyclin D1 in tumor in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	EGFR	PKB	CDK-4	Cyclin D1
模型组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05
A 组	0.49 ± 0.02*	0.62 ± 0.08*	0.83 ± 0.13	0.52 ± 0.02*
B 组	0.53 ± 0.13*	0.63 ± 0.15*	0.99 ± 0.22	0.47 ± 0.06*
C 组	0.39 ± 0.09*	0.44 ± 0.09*	0.75 ± 0.17	0.61 ± 0.08*
D 组	0.72 ± 0.21*	0.60 ± 0.13*	0.88 ± 0.27	0.41 ± 0.09*
E 组	0.87 ± 0.16	1.11 ± 0.23	1.25 ± 0.23	0.81 ± 0.12
F 组	0.76 ± 0.11	0.80 ± 0.17	0.92 ± 0.14	0.99 ± 0.17

与模型组比较: * $P < 0.05$

vs. model group: * $P < 0.05$

对抗肿瘤药最为敏感, DNA 合成高峰通常在上午至下午, 低谷发生在午夜至凌晨^[6-7]。因此, 根据细胞 DNA 合成的昼夜节律、小鼠的昼夜节律及参考文献^[8], 笔者选取 24 h 中 8:00、12:00、16:00 为明期, 20:00、24:00、次日 4:00 为暗期, 根据药物剂量换算及预实验结果, 选取盐酸厄洛替尼抑瘤效果较好的剂量 30 mg/kg 进行实验。本研究结果表明, 厄洛替尼对小鼠的抗肿瘤作用明期较暗期显著, 其中模型组小鼠肿瘤生长最快, C 组小鼠肿瘤生长最慢, 抑瘤率最高; E、F 组小鼠血常规变化相对较明显。综上所述, 厄洛替尼时辰给药的抗肿瘤作用明期较暗期效果为佳。这可能与不同时期细胞对抗肿瘤药的敏感性不同有关。

厄洛替尼时辰化疗的作用机制尚不清楚, 可能与肺癌细胞合成的节律性变化、厄洛替尼作用靶点的昼夜节律性以及小鼠本身的昼夜节律性等机制相关^[9]。研究发现, 部分与物质代谢、细胞周期调节相关的酶也可能与抗肿瘤药昼夜节律性有关。厄洛替尼的作用靶点为 EGFR 酪氨酸激酶, 可抑制胞内 EGFR 酪氨酸激酶活性^[10]。有研究证明, EGFR 在细胞衍生、血管生成、肿瘤细胞转移和凋亡抑制等过程中起重要作用。在细胞周期进程中, Cyclin D1 含量受到生长因子等因素的调控, 呈周期性变化^[11]。Cyclin D1 是 G₁ 期细胞周期素, 与 CDK4 或 CDK6 在 G₁ 期结合形成复合物, 促进细胞增殖, 当 Cyclin D1 表达失控时, 可导致肿瘤的发生^[12]。研究药物的作用靶点 EGFR 及其下游相关信号分子 PKB、CDK-4 及 Cyclin D1, 发现随不同时辰点给药其基因表达明期比暗期降低显著。本研究结果表明, 厄洛替尼时辰化疗机制可能与 EGFR/PKB/Cyclin D1/CDK-4 介导的凋亡通路有关。此发现将有助于下一步时辰化疗临床部分的研究, 并为进一步指导临床用药提供实验依据。

参考文献

- [1] Liao C, Li J, Bin Q, et al. Chronomodulated chemotherapy versus conventional chemotherapy for advanced colorectal cancer: a meta-analysis of five randomized controlled trials[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25(3): 343.
- [2] Köhler J, Schuler M. Afatinib, erlotinib and gefitinib in the first-line therapy of EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma: a review[J]. *Onkologie*, 2013, 36(9): 510.
- [3] Xu C, Li X, Wang X, et al. Combination effects of paclitaxel with signaling inhibitors in endometrial cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(11): 2 951.
- [4] Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, et al. Epider-

两种齐墩果酸纳米粒的体外细胞摄取研究

鲍旭^{1*},高萌¹,徐红²,郭佳毅³,赵丹凤³,李德壮³,褚秋辰¹,田燕^{1#}(1.大连医科大学药学院,辽宁大连116044;2.大连医科大学技能实验室,辽宁大连116044;3.大连医科大学七年制2010级,辽宁大连116044)

中图分类号 R284.62;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0800-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.11

摘要 目的:研究人肝癌细胞株HepG2对同时包载齐墩果酸(OA)和香豆素6的乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒(OCPN)和乳酸羟基乙酸共聚物-水溶性维生素E纳米粒(OCPTN)的体外摄取情况。方法:以超声乳化-溶剂挥发法制备OCPTN和OCPN,其中香豆素6为荧光标记物;采用高效液相色谱法测定两种纳米粒中香豆素6的载药量,体外测定HepG2细胞对分别含100、200、400 μg/ml(低、中、高质量浓度)香豆素6的OCPTN、OCPN混悬液的摄取率,显微镜观察HepG2细胞对OCPTN的摄取情况。结果:OCPTN和OPTN中香豆素6的载药量分别为7.6%、6.3%;低、中、高质量浓度OCPTN的细胞摄取率为(62.1±1.2)%、(53.6±1.3)%、(40.9±1.5)%,分别是相同质量浓度OCPN的细胞摄取率[(36.8±1.5)%、(31.2±1.9)%、(22.4±1.3)%]的1.69、1.72、1.83倍;镜下观察OCPTN被HepG2细胞摄取,处于细胞核周围。结论:OCPN和OCPTN均能被HepG2细胞摄取,且OCPTN的被摄取性更强。
关键词 齐墩果酸;香豆素6;纳米粒;摄取率;HepG2细胞

Study on the Absorption of 2 Kinds of Oleanolic Acid Nanoparticles *in vitro*

BAO Xu¹, GAO Meng¹, XU Hong², GUO Jia-yi³, ZHAO Dan-feng³, LI De-zhuang³, CHU Qiu-chen¹, TIAN Yan¹(1. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 2. Skill Laboratory, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 3. Seven-year Grade 2010, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the absorption of Oleanolic acid (OA) and Coumarin-6-loaded polylactic-co-glycolic acid nano-particles (OCPN) and Polylactic-co-glycolic acid-watermiscible vitamin E nanoparticles (OCPTN) by human hepatic cell line (HepG2). METHODS: OCPTN and OCPN were prepared by ultrasonication emulsion-solvent evaporation technique using coumarin-6 as fluorescent marker. The amounts of coumarin-6 in OCPTN and OPTN were determined by HPLC. The absorption rates of 100, 200 and 400 μg/ml coumarin-6 (low, medium and high concentrations) in OCPTN and OCPN suspension by HepG2 were determined *in vitro*. The absorption rate of OCPTN was observed by microscope. RESULTS: The amounts of coumarin-6 in OCPTN and OCPN were 7.6% and 6.3%. The uptake rate of low, medium and high concentrations of OCPTN were (62.1±1.2)%, (53.6±1.3)% and (40.9±1.5)%, respectively, which were 1.69, 1.72, and 1.83 folds to those of OCPN at corresponding concentrations [(36.8±1.5)%, (31.2±1.9)% and (22.4±1.3)%]. FIM images showed that OCPTN was absorbed by HepG2 and closely located around the nuclei. CONCLUSIONS: OCPN and OCPTN can be absorbed by HepG2, and especially for OCPTN.

KEYWORDS Oleanolic acid; Coumarin-6; Nanoparticles; Absorption rate; HepG2 cells

- mal growth factor receptor is a common mediator of quinine-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40):360.
- [5] 周守兵,蒋华,李文娟,等.培美曲塞时辰给药治疗肺腺癌裸鼠移植瘤的疗效[J].实用医学杂志,2012,28(14):2330.
- [6] Bjamason GA, Jordan R. Rhythms in human gastrointestinal mucosa and skin[J]. *Chronobiol Int*, 2002, 19(1):129.
- [7] Smaaland R, Sothem RB, Laerum OD, et al. Rhythms in human bone marrow and blood cells[J]. *Chronobiol Int*, 2002, 19(1):101.
- [8] 钟皎,赵文艳,吴福林.吉西他滨治疗非小细胞肺癌的时辰药理学研究[J].中国药房,2010,21(2):145.
- [9] Abolmaali K, Balakrishnan A, Stearns AT, et al. Circadian variation in intestinal dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) expression: a potential mechanism for benefits of 5-FU chronochemotherapy[J]. *Surgery*, 2009, 146(2):269.
- [10] 贾守薇,刘韬,黄红兵.治疗非小细胞肺癌的分子靶向药物的研究进展[J].中国药房,2013,24(32):3064.
- [11] Wei Q, Sheng L, Shui Y, et al. EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(4):1193.
- [12] Morshed K, Skomra D, Korobowicz E, et al. An immunohistochemical study of cyclin D1 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(7):760.
- (收稿日期:2013-10-28 修回日期:2013-12-11)
- * 硕士研究生。研究方向:天然药物新制剂、新技术。电话:0411-86110420。E-mail:baoxu88@163.com
通信作者:教授。研究方向:天然药物新制剂、新技术。电话:0411-86110420。E-mail:tiany2004@126.com