

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.09.009

卵巢癌组织中 UHRF1 蛋白的表达及其与卵巢癌细胞增殖和侵袭的关系 *

丁虹¹ 庞燕芬¹ 唐雯静¹ 吕雯² 周磊^{1Δ}

(1 杭州疗养院海勤疗养区 浙江 杭州 310002; 2 浙江省立同德医院妇产科 浙江 杭州 310013)

摘要 目的:研究卵巢癌组织中泛素样含 PHD 和环指域 1(Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1, UHRF1)蛋白的表达及 UHRF1 对卵巢癌细胞增殖、侵袭的影响。**方法:**选取卵巢癌组织和癌旁正常组织,采用蛋白印迹法(Western blot)检测其 UHRF1 的蛋白表达。体外培养卵巢癌 SKOV-3 细胞株,分别转染 UHRF1 的 siRNA 和阴性对照 siRNA,采用 CCK-8 检测细胞活力,Transwell 检测细胞侵袭能力,荧光定量聚合酶链式反应法(FQ-PCR)检测 CyclinD1、CDK6、MMP2 和 MMP9 的 mRNA 表达。**结果:**卵巢癌组织中 UHRF1 蛋白表达水平显著高于癌旁正常组织($P<0.05$);与转染阴性对照 siRNA 的 SKOV-3 细胞相比,转染 UHRF1 的 siRNA 的 SKOV-3 细胞活力明显降低、侵袭细胞数目明显减少($P<0.05$),且细胞中 CyclinD1、CDK6、MMP2 和 MMP9 基因的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$)。**结论:**UHRF1 蛋白在卵巢癌组织中呈高表达状态,且可促进卵巢癌细胞的增殖和侵袭。

关键词:卵巢癌;泛素样含 PHD 和环指域 1;增殖;侵袭

中图分类号:R-33;R737.31 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)09-1642-04

Expression of UHRF1 Protein in Ovarian Cancer Tissue and Its Correlation with the Proliferation and Invasion of Ovarian Cancer Cells*

DING Hong¹, PANG Yan-fen¹, TANG Wen-jing¹, LV Wen², ZHOU Lei^{1Δ}

(1 Department of convalescent of Hangzhou Sanatorium of PLA, Hangzhou, Zhejiang, 310002, China;

2 Tong de Hospital affiliated to Zhejiang province, Hangzhou, Zhejiang, 310013, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 (UHRF1) protein in ovarian cancer tissue and the effect of UHRF1 on the proliferation and invasion of ovarian cancer cells. **Methods:** Ovarian cancer tissue and adjacent normal tissue were collected, the expression of UHRF1 protein were detected by Western blot. Ovarian cancer SKOV-3 cell was cultured in vitro, UHRF1 siRNA and negative control siRNA were transfected. Then the cell viability was assayed by CCK-8 kit, cell invasion capability was assayed by Transwell. Expressions of CyclinD1, CDK6, MMP2 and MMP9 mRNA were assayed by FQ-PCR. **Results:** The expression of UHRF1 protein in ovarian cancer tissue was higher than that in adjacent normal tissue. The cell viability of SKOV-3 cells and number of migrated cells transfected by UHRF1siRNA was significantly lower than that of SKOV-3 cell transfected by negative control siRNA, the expressions of CyclinD1, CDK6, MMP2 and MMP9 mRNA were significantly decreased. **Conclusions:** The expression of UHRF1 protein was significantly increased in ovarian cancer; UHRF1 could promote the proliferation and invasion of ovarian cancer cell.

Key words: Ovarian cancer; UHRF1; Proliferation; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)09-1642-04

前言

泛素样含 PHD 和环指域 1 (Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1, UHRF1)是近年来新发现的一类参与细胞生长调控的核蛋白基因,能够通过影响泛素化、甲基化、乙酰化等分子修饰过程调节多种基因的表达,进一步改变细胞的生物学行为^[1-3]。国内外研究表明^[4-6]UHRF1 在结肠癌、胃癌、肝癌等多种消化道恶性肿瘤细胞中表达上调。本研究通过测定卵巢癌组织中 UHRF1 的表达,分析沉默 UHRF1 基因对卵巢癌肿

细胞增殖、侵袭的影响,研究 UHRF1 蛋白在卵巢癌发生、发展中的作用,旨在为探究卵巢癌的新的治疗手段提供线索。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 6 月-2016 年 10 月入浙江省立同德医院接受卵巢癌手术治疗的 50 例患者作为研究对象,34~69 (51.29±11.18)岁,所有患者均未出现远处转移,术前均未接受化、放疗。术中收集患者卵巢癌组织和癌旁正常组织,所有标本经免疫组

* 基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金项目(2009B081);浙江省自然科学基金项目(Y2090319)

作者简介:丁虹(1971-),研究方向:妇科肿瘤, E-mail: 3531268422@qq.com

Δ 通讯作者:周磊(1983-),研究方向:特种医学、中毒,电话:13989468335, E-mail: zhoulei_venus@hotmail.com

(收稿日期:2017-10-09 接受日期:2017-10-31)

化确定组织性质后用生理盐水洗净,吸尽水分后转移进入冻存管中,在液氮中短暂冷冻 10-15 min, -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 实验材料

UHRF1 兔抗人抗体(Santa Cruze 公司)、羊抗兔二抗(MBL 公司)、ECL 发光试剂 (Pierce Biotechnology 公司)、卵巢癌 SKOV-3 细胞株(中科院细胞库)、UHRF1 的 siRNA(吉玛公司)、阴性对照 siRNA(吉玛公司)、转染试剂(Thermo 公司)、CCK-8 细胞毒性分析试剂盒 (碧云天公司)、RPMI1640 培养基(Sigma 公司)、细胞培养用胎牛血清(Sigma 公司)、DAPI 细胞核免疫荧光试剂盒(碧云天公司)、RNA 提取试剂盒(北京天根生物公司)、SYBRPremixEx TaqTMII 荧光 PCR 反应试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Western blot 检测蛋白表达 取卵巢组织标本,加入 RIPA 蛋白裂解液后匀浆得到组织蛋白标本;取转染 siRNA 的细胞标本,加入 RIPA 蛋白裂解液后用细胞刮刀刮碎细胞、得到细胞蛋白标本。取适量蛋白标本,加入上样缓冲液后进行高温变性,将变性后的标本加入预先配置好的 SDS-PAGE 凝胶中,依次进行垂直电泳、电转膜、抗原位点封闭。加入 UHRF1 多克隆抗体(1:2000)和 β -actin 的兔抗人抗体(1:800)4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜三次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:2000)室温下孵育 2 h, TBST 洗膜三次后 ECL 显影, X 片曝光。采用 Image J 软件对条带灰度值进行分析,以 β -actin 为内参照对蛋白含量进行半定量分析。

1.3.2 卵巢癌细胞株的处理 常规培养卵巢癌细胞株 SKOV-3,传代并分瓶培养,取对数期生长的细胞进行处理。处理方法如下:用转染试剂分别将 UHRF1 的 siRNA 和阴性对照 siRNA 转染进入细胞, siRNA 的终浓度为 20 nmol/L。

1.3.3 卵巢癌细胞活力的检测 细胞转染后 0 h、12 h、18 h、24 h 时,弃去培养基并在无菌条件下加入 CCK-8 检测试剂,培养箱中继续孵育 4 h 后, 在多功能酶标仪读取 450 nm 波长处的吸光值(OD 值)。

1.3.4 卵巢癌细胞侵袭细胞数目的检测 取 Transwell 培养板 (Corning 公司), 在 Transwell 小室中加入基质胶, 后加入 200 μ L 消化后的细胞悬液。细胞贴壁生长 24 h 后, 弃去培养基, RPMI1640 培养基清洗两遍, 按细胞转染方法将 UHRF1 的 siRNA 和阴性对照 siRNA 转染进入细胞;在细胞孔内加入 500 μ L 含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 处理 24 h 后, 取出 Transwell 小室并取下薄膜。多聚甲醛固定 5 min 后用 PBS 洗涤 3 遍, 最后用 DAPI 染色液进行染色并在荧光显微镜下观察高倍视野下的细胞数目。

1.3.5 FQ-PCR 检测 mRNA 表达 取转染 siRNA 的卵巢癌细胞标本 2 g, 采用 TRIzol RNA 提取试剂盒抽提组织和细胞中的总 RNA。将纯度高、完整性好的总 RNA 根据试剂盒要求逆转录合成 cDNA, 采用荧光定量 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增, 扩增基因包括 CyclinD1、CDK6、MMP2、MMP9 以及 β -actin。反应体系为 20 μ L(SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μ L、引物上游 0.8 μ L、引物下游 0.8 μ L、ROX Reference Dye 0.4 μ L、cDNA 2 μ L、ddH₂O 6 μ L), 依次 95℃ 预变性 30 min、95℃ 变性 5 s、60℃ 退火 30 s, 共 40 个循环周期;每个循环周期结束后进行荧光检测, 采用 ABI StepOne 软件进行数据收集, 对 CyclinD1、CDK6、MMP2、MMP9 基因的 mRNA 表达水平进行相对定量计算。

1.4 统计学方法

统计学软件采用 SPSS 20.0 分析, 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 组内不同时间点的比较采用重复测量的方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织和癌旁正常组织中 UHRF1 的蛋白表达

采用 western blot 检测卵巢癌组织及癌旁正常组织中的 UHRF1 的蛋白表达, 结果显示: 卵巢癌组织中 UHRF1 的蛋白表达明显高于癌旁正常组织($P < 0.05$), 见图 1。

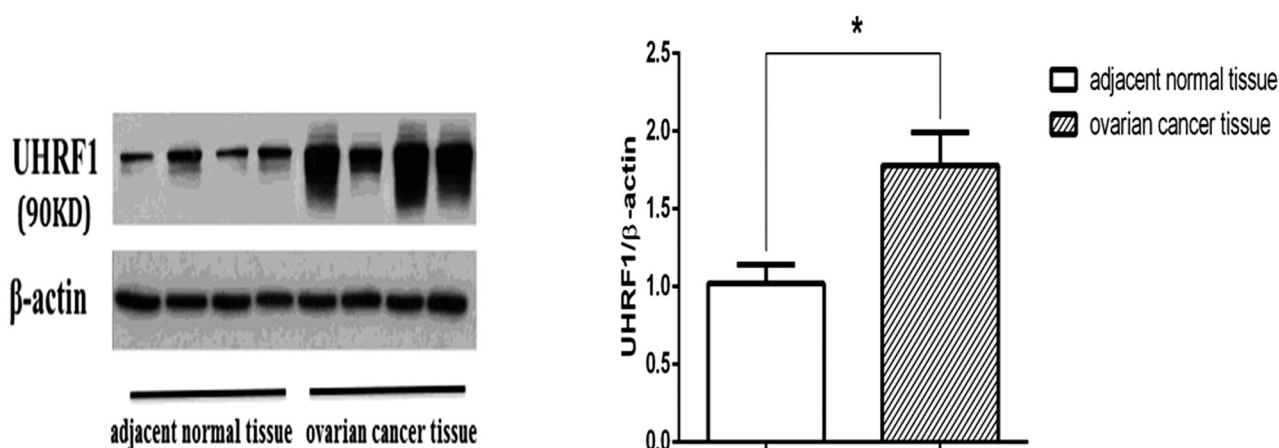


图 1 卵巢癌组织和癌旁正常组织中 UHRF1 的蛋白表达

Fig.1 Expression of UHRF1 protein in the ovarian cancer tissues and adjacent normal tissues

2.2 转染 UHRF1-siRNA 后 SKOV-3 细胞中 UHRF1 蛋白的表达

转染 UHRF1 的 siRNA 后, SKOV-3 细胞中 UHRF1 的蛋

白表达显著低于转染阴性对照 siRNA 的 SKOV-3 细胞, UHRF1 蛋白的抑制率为 77.8% ($P < 0.05$)。

2.3 UHRF1 表达下调对 SKOV-3 细胞活力的影响

转染 12 h、18 h、24 h 时, 转染 UHRF1 siRNA 的细胞 OD 且在 24 h 内细胞 OD 值逐渐降低, 结果见表 1。
值在各个时间点均低于转染阴性对照 siRNA 的细胞($P<0.05$),

表 1 UHRF1 表达下调对 SKOV-3 细胞活力的影响
Table 1 Influence of downregulation of UHRF1 expression on the viability of SKOV-3 cells

	0 h	12 h	18 h	24 h
Negative control siRNA	1.49± 0.18	1.26± 0.15	1.53± 0.12	1.94± 0.20
UHRF1siRNA	1.52± 0.16	0.92± 0.10 ^a	0.68± 0.08 ^a	0.42± 0.06 ^a

Note: ^a $P<0.05$, compared with the negative control siRNA group.

2.4 UHRF1 表达下调对 SKOV-3 细胞侵袭的影响 侵袭数目在各个时间点均少于转染阴性对照 siRNA 的细胞
转染 siRNA 12 h、18 h、24 h 时, 转染 UHRF1 siRNA 的细胞 ($P<0.05$), 结果见表 2。

表 2 UHRF1 表达下调对 SKOV-3 细胞侵袭的影响
Table 2 Influence of downregulation of UHRF1 expression on the invasion of SKOV-3 cells

	0 h	12 h	18 h	24 h
Negative control siRNA	24.62± 4.18	52.26± 6.23	76.12± 8.95	104.34± 12.45
UHRF1siRNA	23.15± 3.79	41.34± 5.24 ^a	49.34± 5.95 ^a	61.49± 7.73 ^a

Note: ^a $P<0.05$, compared with the negative control siRNA group.

2.5 UHRF1 表达下调对 SKOV-3 细胞增殖和侵袭相关基因的 mRNA 表达的影响 MMP2 和 MMP9 的 mRNA 表达明显低于转染阴性对照 siRNA 的细胞($P<0.05$), 结果见表 3。

转染 UHRF1 siRNA 的 SKOV-3 细胞 CyclinD1、CDK6、

表 3 UHRF1 表达下调对 SKOV-3 细胞 CyclinD1、CDK6、MMP2、MMP9 mRNA 表达的影响
Table 3 Influence of downregulation of UHRF1 expression on the expressions of CyclinD1, CDK6, MMP2, MMP9 mRNA in SKOV-3 cells

	CyclinD1	CDK6	MMP2	MMP9
Negative control siRNA	100± 14.85	100± 12.59	100± 13.47	100± 15.03
UHRF1siRNA	16.69± 1.95 ^a	32.45± 4.49 ^a	28.58± 3.49 ^a	40.19± 5.59 ^a

Note: ^a $P<0.05$, compared with the negative control siRNA group.

3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 每年我国新发卵巢癌 5.21 万例, 死亡病例约为 2.25 万人, 死亡率居妇科恶性肿瘤的首位^[7,8]。传统的手术治疗、化疗、放疗、生物治疗等综合治疗手段在一定程度上提高了卵巢癌患者的生存率, 但卵巢癌细胞具有极强的增殖和侵袭倾向, 能够造成肿瘤发生远处转移以及术后复发, 影响了卵巢癌的治疗效果, 故亟需在基因水平阐明卵巢癌发生、发展的机制。

泛素样含 PHD 和环指域 1(UHRF1) 是近年来新发现的一类与细胞生长密切相关的核蛋白基因, 所编码的蛋白 ICBP90 包含 N 末端的 UBL 结构域、亮氨酸拉链结构域、PHD 型锌指结构域、SRA-YDG 结构域以及 C 末端的环状锌指结构域^[9-12]。国内外研究显示^[13,14] UHRF1 基因的表达具有细胞周期特异性且与细胞增殖能力相关, 由 UHRF1 编码的蛋白能够参与以下生物学过程: (1) 对 PEST 含核蛋白进行泛素化并影响细胞周期相关蛋白的表达^[15]; (2) 通过 SRA 结构域、PHD 结构域与 DNA 甲基转移酶、组蛋白去乙酰化酶相互作用, 调节 DNA 甲基化过程、组蛋白乙酰化过程, 进而保证 DNA 正确复制、调控染色质功能^[16,17]。研究表明^[18,19] 胃癌组织和食管癌组织中 UHRF1 的表达显著升高且与肿瘤的分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、远

处转移等情况密切相关。UHRF1 基因表达增多可能通过增强细胞增殖能力、加速细胞周期 G1/S 期和 G2/M 期的转换、抑制细胞凋亡过程并使细胞逃避机体免疫监视等机制来造成正常细胞癌变并发生免疫逃逸^[20-22]。

本研究为了明确 UHRF1 与卵巢癌发生发展的关系, 我们首先检测了卵巢癌组织和癌旁正常组织中 UHRF1 蛋白的表达, 结果显示卵巢癌组织中 UHRF1 的蛋白含量高于癌旁正常组织, 说明 UHRF1 蛋白高表达状态与卵巢癌的发生有关。为了进一步明确 UHRF1 蛋白与卵巢癌细胞恶性生物学行为的关系, 我们采用 SKOV-3 细胞株通过转染 UHRF1 siRNA 的方式来降低 UHRF1 基因表达, 其能够显著降低卵巢癌肿瘤细胞活力、降低发生侵袭的细胞数目, 同时这种趋势在 24 h 内呈时间依赖性。以上结果提示 UHRF1 蛋白高表达状态参与卵巢癌的发生, 降低 UHRF1 蛋白的表达水平能够抑制卵巢癌肿瘤细胞的增殖和侵袭。

细胞周期蛋白参与细胞周期的调控, 进而影响细胞的增殖过程。金属蛋白酶能够降解细胞外基质成分, 进而促进细胞的侵袭过程^[23]。目前, 国内外研究显示 CyclinD1 以及 CDK6 参与卵巢癌细胞的细胞周期调控, MMP2 和 MMP9 参与卵巢癌细胞的侵袭过程调控^[24-26]。如前所述, UHRF1 基因所编码的蛋白可能同过泛素化、甲基化以及乙酰化等途径来调节多种分子的

表达。为了明确 UHRF1 调节卵巢癌细胞增殖、侵袭过程的分子机制,我们通过荧光定量 PCR 的方法检测了与细胞增殖、侵袭相关基因 CyclinD1、CDK6、MMP2 和 MMP9 的 mRNA 的表达。结果显示转染 UHRF1 siRNA 能够显著降低卵巢癌肿瘤细胞中 CyclinD1、CDK6、MMP2 和 MMP9 的 mRNA 表达,提示 UHRF1 蛋白可能通过调节 CyclinD1、CDK6、MMP2 和 MMP9 等参与细胞增殖、侵袭过程的基因的表达,进而改变肿瘤细胞的恶性生物学行为,参与卵巢癌肿瘤发生、发展的过程。

综上所述,UHRF1 高表达通过 CyclinD1、CDK6、MMP2 和 MMP9 等分子调控卵巢癌细胞的增殖、侵袭过程,参与卵巢癌的浸润、转移等恶性生物学行为,UHRF1 可能作为卵巢癌个体化治疗的新的作用靶点,为卵巢癌的治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] 魏飞龙,焦点,郑国旭,等.泛素样含 PHD 和环指域蛋白 1(UHRF1)的功能及其参与肿瘤发生发展机制的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(6): 858-862
Wei Fei-long, Jiao Dian, Zheng Guo-xu, et al. Advances in function and mechanism involved in the development in tumor of UHRF1[J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2017, 33(6): 858-862
- [2] Ding G, Chen P, Zhang H, et al. Regulation of ubiquitin-like with plant homeodomain and ring finger domain 1 (UHRF1) protein stability by heat shock protein 90 chaperone machinery [J]. J Biol Chem, 2016, 291(38): 20125-20135
- [3] Zhang ZM, Rothbart SB, Allison DF, et al. An allosteric interaction links USP7 to deubiquitination and chromatin targeting of UHRF1[J]. Cell Rep, 2015, 12(9): 1400-1406
- [4] 张伟,周林,李乃义,等.胃癌组织 UHRF1 表达与预后相关性分析[J].中华肿瘤防治杂志,2015,22(2): 109-112
Zhang Wei, Zhou Lin, Li Nai-yi, et al. Association between expression of UHRF1 and prognosis in gastric cancer tissues [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2015, 22(2): 109-112
- [5] 吴李飞,郝佳洁,张彤彤,等.UHRF1 蛋白在结直肠癌中的表达情况及其预后判断价值[J].癌变·畸变·突变,2015,27(1): 20-34
Wu Li-fei, Hao Jia-jie, Zhang Tong-tong, et al. Expression and prognostic value of UHRF1 in colorectal cancer [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis, 2015, 27(1): 20-34
- [6] Ge M, Gui Z, Wang X, et al. Analysis of the UHRF1 expression in serum and tissue for gastric cancer detection[J]. Biomarkers, 2015, 20(3): 183-188
- [7] 洪澜,李成学,贺国丽,等.卵巢癌生物治疗的现状与进展[J].现代生物医学进展,2016,16(6): 1180-1183
Hong Lan, Li Xue-cheng, He Guo-li, et al. Current situation and progress of biotherapy for ovarian cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(6): 1180-1183
- [8] 陈仲波,朱冕青.卵巢癌筛查的研究进展[J].中国现代医生,2016,54(35): 164-168
Chen Zhong-bo, Zhu Jian-qing. Research progress of ovarian cancer screening[J]. China Modern Doctor, 2016, 54(35): 164-168
- [9] Wang X, Wu Q, Xu B, et al. MiR-124 exerts tumor suppressive functions on the cell proliferation, motility and angiogenesis of bladder cancer by fine-tuning UHRF1[J]. FEBS J, 2015, 282(22): 4376-4388
- [10] 桂珍,严枫.UHRF1 在表观遗传调控和肿瘤诊治中的研究进展[J].南京医科大学学报:自然科学版,2016,15(2): 129-134
Gui Zhen, Yan Feng. The progress of UHRF1 in epigenetics regulation as well as in tumorigenesis and theranostics [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2016, 15(2): 129-134
- [11] Jia L, Zhou J, Zhao H, et al. Corilagin sensitizes epithelial ovarian cancer to chemotherapy by inhibiting Snail glycolysis pathways [J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2464-2470
- [12] 杨从蓉,赵学涛,王军,等.UHRF1 基因沉默可促进人肺腺癌 A549 细胞的凋亡[J].肿瘤,2015,35(11): 1222-1229
Yang Cong-rong, Zhao Xue-tao, Wang Jun, et al. UHRF1 gene silencing can promote the apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Tumor, 2015, 35(11): 1222-1229
- [13] 杨从蓉,王雅隼. UHRF1 与肿瘤[J].癌变·畸变·突变,2014,26(2): 151-154
Yang Cong-rong, Wang Ya-di. UHRF1 and cancer[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis, 2014, 26(2): 151-154
- [14] Goto Y, Kurozumi A, Nohata N, et al. The microRNA signature of patients with sunitinib failure: regulation of UHRF1 pathways by microRNA-101 in renal cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 59070-59086
- [15] Greiner VJ, Kovalenko L, Humbert N, et al. Site-Selective Monitoring of the Interaction of the SRA Domain of UHRF1 with Target DNA Sequences Labeled with 2-Aminopurine [J]. Biochemistry, 2015, 54(39): 6012-6020
- [16] Abu-Alainin W, Gana T, Liloglou T, et al. UHRF1 regulation of the Keap1-Nrf2 pathway in pancreatic cancer contributes to oncogenesis [J]. J Pathol, 2016, 238(3): 423-433
- [17] Atala A. Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p): inhibition of bladder cancer cell aggressiveness[J]. J Urol, 2016, 196(4): 1314
- [18] 张战胜,徐东为.UHRF1 蛋白在胃癌组织中表达及其与胃癌患者临床病理特征关系[J].临床误诊误治,2017,30(5): 89-93
Zhang Zhan-sheng, Xu Dong-wei. UHRF1 protein expression in gastric cancer tissues and its relationship with clinicopathological characteristics of gastric cancer [J]. Clinical Misdiagnosis and Mistherapy, 2017, 30(5): 89-93
- [19] 吴清泉,黄建峰.UHRF1 基因在食管癌中的表达和意义[J].同济大学学报(医学版),2011,32(6): 39-43
Wu Qing-quan, Huang Jian-feng. Expression of UHRF1 in esophageal cancer and its clinicopathological significance [J]. Journal of Tongji University(Medical Science), 2011, 32(6): 39-43
- [20] Ge M, Gui Z, Wang X, et al. Analysis of the UHRF1 expression in serum and tissue for gastric cancer detection[J]. Biomarkers, 2015, 20(3): 183-188
- [21] 周林,李伟,韩东升,等.耐药人胃癌细胞 UHRF1 基因的表达变化及其与多药耐药的关系[J].山东医药,2016,56(39): 1-4
Zhou Lin, Li Wei, Han Dong-sheng, et al. Expression of UHRF1 gene in gastric cancer resistant cells and its relationship with multidrug resistance[J]. Shandong Medical Journal, 2016, 56(39): 1-4
- [22] Zhou L, Shang Y, Jin Z, et al. UHRF1 promotes proliferation of gastric cancer via mediating tumor suppressor gene hypermethylation[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(8): 1241-1251

- sociation. The diagnosis and treatment guide for cough [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory diseases, 2016, 39 (5): 323-354
- [5] 国家药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 267-269
- The State Food and Drug Administration (SFDA). Clinical guideline of new drugs for traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2002: 267-269
- [6] Omar S, Clarke R, Abdullah H, et al. Respiratory virus infection up-regulates TRPV1, TRPA1 and ASIC3 receptors on airway cells [J]. PLoS One, 2017, 12(2): 1-21
- [7] Braman S S. Postinfectious cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines[J]. Chest, 2006, 129(1): 138-146
- [8] Morice A H. The cough hypersensitivity syndrome: a novel paradigm for understanding cough[J]. Lung, 2010, 188(1): 87-90
- [9] Yilmaz O, Bakirtas A, Ertoyl Karagol H I, et al. Children With Chronic Nonspecific Isolated Cough[J]. Chest, 2014, 145(6): 1279-1285
- [10] Hakim F, Vilozni D, Adler A, et al. The effect of montelukast on bronchial hyperactivity in preschool children [J]. Chest, 2007, 131 (1): 180-186
- [11] Wang K, Birring S S, Taylor K, et al. Montelukast for postinfectious cough in adults: a double-blind randomised placebo-controlled trial [J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(1): 35-43
- [12] 李柯, 陈元穆, 韩春明. 桑杏汤(散)及其加减方治疗呼吸系统疾病疗效的系统评价[J]. 中国医药指南, 2015, (29): 194
- Li Ke, Chen Yuan-miu, Han Chun-ming. Afiled evaluation of the efficacy of Sangxing granule in the treatment of respiratory disease: a clinical meta analysis[J]. Guide of China Medicine, 2015, (29): 194
- [13] 丁建中, 倪圣, 张六通, 等. 桑杏汤对干燥模型小鼠肺呼吸膜超微结构、表面活性物质及炎性细胞因子的影响[J]. 中医杂志, 2016, (12): 1057-1060
- Ding Jian-zhong, Ni Sheng, Zhang Liu-tong, et al. Impact of Sangxing Decoction on Ultra Microstructure, Surface Active Substance and Inflammatory Cytokines of Pulmonary Respiratory Membrane of Mice Model of Warm Dryness[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, (12): 1057-1060
- [14] 程莹, 赵骏. 桑叶多糖含量测定与成分分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, (18): 1803-1805
- Cheng Ying, Zhao Jun. Determination the content and analysis the composition of Polysaccharides from mulberry leaves[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2017, (18): 1803-1805
- [15] 赵静. 枇杷核苦杏仁苷提取、纯化及其抗氧化活性研究[D]. 南京农业大学, 2010
- Zhao Jing. Extraction, purification and antioxidant activity of amygdalin in loquat seed[D]. College of food science and technology Nanjing Agricultural University, 2010
- [16] 马杰. 桃仁苦杏仁苷的提取及其抑菌活性研究[J]. 食品工业, 2015, (05): 116-120
- Ma Jie. Extraction of Amygdalin from Semen persicae and Its Antibacterial Activity[J]. The Food Industry, 2015, (05): 116-120
- [17] 呼敏, 马珊珊, 王荣. 杏仁药对配伍规律及临床应用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, (02): 116-118
- Hu Min, Ma Shan-shan, Wang Rong. Almond Medicine Compatibility Rule and Clinical Application Research [J]. Journal of liaoning university of TCM, 2016, (02): 116-118
- [18] 杨冰月, 李敏, 任敏, 等. 基于灰色关联度分析法对半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系研究 [J]. 中草药, 2016(13): 2301-2307
- Yang Bing-yue, Li min, Ren Min, et al. Spectrum-effect relationship of antitussive effect by total organic acids in crude and four processed Pinellia ternate based on gray relative analysis method [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, (13): 2301-2307
- [19] 黄斯, 潘雨薇, 蓝海, 等. 茯苓酸药理学研究进展[J]. 中成药, 2015, (12): 2719-2721
- Huang Si, Pan Yu-wei, Lan Hai, et al. Pachymic acid pharmacology research progress Chinese Traditional Patent Medicine, 2015, (12): 2719-2721
- [20] 吴巧珍, 汤颖, 张剑峰, 等. 甘草酸对支气管哮喘小鼠气道炎症的影响机制[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(42): 3338-3344
- Wu Qiao-zhen, Tang Ying, Zhang Jian-feng, et al. Therapeutic effects of glycyrrhizic acid on asthma airway inflammation in mice and its mechanism[J]. National medical of China, 2014, 94(42): 3338-3344
- [21] CS U, Y N R X. Differential requirements of CD4⁺T-cell signals for effector cytotoxicT-lymphocyte(CTL)priming and functional memory CTL development at higher CD8⁺T- cell precum or frequency [J]. Immunology, 2013, (138): 298-306
- [22] 齐瑞, 张欢, 李瑞婷, 等. 桑杏汤加味治疗小儿感染后咳嗽 51 例[J]. 陕西中医, 2017, 38(4): 454-455
- Qi Rui, Zhang Huan, Li Rui-ting, et al. Sangxing Granules for Treating Child postinfectious cough in 51 Cases [J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 38(4): 454-455
- [23] Dar S, Chhina J, Mert I, et al. Bioenergetic adaptations in chemoresistant ovarian cancer cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8760
- [24] Rosanò L, Cianfrocca R, Sestito R, et al. Targeting endothelin-1 receptor/ β -arrestin1 network for the treatment of ovarian cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(10): 925-932
- [25] Kim HJ, Lee HM, Kim MK, et al. Prognostic assessment of sarcomatous histologic subtypes of ovarian carcinosarcoma [J]. Obstet Gynecol Sci, 2017, 60(4): 350-356
- [26] Bacalbasa N, Balescu I, Dima S. Rectosigmoidian involvement in advanced-stage ovarian cancer - intraoperative decisions [J]. In Vivo, 2017, 31(5): 973-977

(上接第 1645 页)