维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2008)05-0536-05

RNAi 沉默 PLCε 对 Crocin 抑制人膀胱癌 BIU-87 细胞增殖作用调控的研究

冀慧莹[1],吴绮思[2],郭永灿[1],吕纯芳[1],赵 培[1],罗春丽[1]

(1.重庆医科大学检验系临床检验诊断学省部共建重点实验室,重庆 400016;2.重庆医科大学基础医学院七年制,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察 RNAi 沉默膀胱癌 BIU-87 细胞磷脂酶 C-ε (Phospholipase C epsilon,PLC ε)表达后对藏花素(Crocin)抑制人膀胱癌 BIU-87 细胞增殖作用的影响。方法:将携有 siRNA 基因的真核表达质粒 PGenesil-PLC ε 转染 BIU-87 细胞后,分为 5 组:未转染组、pGenesil-NP 阴性质粒组、pGenesil-PLC ε 质粒组、Crocin 组、pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组。MTT 法观察不同处理组对 BIU-87 细胞的生长抑制作用。RT-PCR 法检测转染后对 PLC ε mRNA 表达的影响及各处理组 PCNA(Proliferating cell nuclear antigen)、CyclinD1 mRNA 表达。Western-blot 检测 PCNA、CyclinD1 蛋白表达。结果:RNAi 可抑制 BIU-87 细胞 78.06%的 PLC ε mRNA 表达。pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组可增强 Crocin 对 BIU-87 细胞的生长抑制作用,48h 抑制率达 45.30%,且与 pGenesil-PLC ε 质粒组和 Crocin 组相比较有显著性差异($P<0.01$)。RT-PCR 和 Western-blot 结果显示与 RNAi 沉默 PLC ε 组比较,RNAi PLC ε 联合 Crocin 组明显下调了 PCNA、Cyclin D1 基因和蛋白的表达($P<0.05$);较单独 Crocin 组比较,RNAi PLC ε 联合 Crocin 组显著降低了 PCNA 基因和蛋白的表达($P<0.05$),降低了 Cyclin D1 蛋白的表达($P<0.05$),Cyclin D1 mRNA 表达变化两组间无显著性差异($P>0.05$)。结论:沉默 PLC ε 基因可增强 Crocin 对 BIU-87 细胞的抑制作用,其机制与进一步下调 PCNA、CyclinD1 的表达有关。

【关键词】RNA 干扰;膀胱癌;Crocin;增殖

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-25

Effects of silencing PLC ε gene by RNA interference on crocin-induced proliferation regulation of human bladder cancer cell line BIU-87

JI Hui-ying, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Crocin on proliferation regulation after silencing PLC ε gene expression by RNAi interference in human bladder cancer cells BIU-87. *Methods*: BIU-87 cells were transfected with plasmid pGenesil-PLC ε. The experiment was designed as five groups to compared with each other, they were non-transfected cells as control group, pGenesil-NP negative plasmid transfected group, pGenesil-PLC ε plasmid transfected group, Crocin group, pGenesil-PLC ε plasmid transfected together with Crocin group. The influence on proliferation of every group was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The expression of PLC ε mRNA of BIU-87 cells after transfection with the plasmid pGenesil-PLC ε was observed by RT-PCR. RT-PCR and Western-blot were used to detect cyclin D1 and PCNA expression. *Results*: 78.06% mRMA of PLC ε was reduced clearly after transfected with plasmid pGenesil-PLC ε in BIU-87 cells. pGenesil-PLC ε plasmid transfected together with crocin group could enhance the inhibitive effect of Crocin on proliferation up to 45.30% at 48h, which was strikingly compared with the pGenesil-PLC ε plasmid transfected group and the Crocin group ($P<0.01$). Both RT-PCR and western-blot indicated that the expression of PCNA、CyclinD1 both in mRNA and protein were markedly decreased in the RNAi together with Crocin group compared with the RNAi group ($P<0.05$). Compared with the Crocin group, The expression of PCNA both in mRNA and protein were reduced remarkably ($P<0.05$), the expression of CyclinD1 protein was decreased clearly ($P<0.05$) in the RNAi together with Crocin group, but the expression of CyclinD1 mRNA had no significant difference between the two groups ($P>0.05$). *Conclution*: RNAi PLC ε together with Crocin can enhance the inhibit effect of Crocin, they can further reduce PCNA、CyclinD1 expressionthe was the mechanism.

【Key words】RNAi; Bladder cancer; Crocin; Proliferation

作者介绍:冀慧莹(1982-),女,硕士,
研究方向:膀胱癌的基因诊断与治疗。

通讯作者:罗春丽,女,教授,E-mail:luochunli79@hotmail.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金(NO CSTC2005 BB5309)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

膀胱癌是我国最为常见的泌尿系统肿瘤，如何有效地干预、阻断膀胱癌的发生发展是亟待解决的问题。ras 基因突变广泛存在于人类实体瘤中，ras 基因与膀胱癌的关系已被有关的基因学研究证实[1,2]，H-Ras 为其编码的突变蛋白之一。PLC ε 是近来发现的一新型 PLC 同工酶，其特有的 Ras 结合(Ras-associating,RA)结构域及 Ras 鸟甘酸交换因子(Ras guanine nucleotide exchange factor,RasGEF)结构域可以与H-Ras 结合，激活突变的 H-Ras。前期研究表明体外阻断膀胱癌细胞株 PLC ε 基因表达，能抑制膀胱肿癌细胞增殖，及膀胱癌侵袭转移[3-5]。藏花素是中草药藏红花的有效单一成分，其对多种人源恶性肿瘤细胞表现出剂量依赖性的抑制作用，且不损害正常细胞[6]。抑制 PLC ε 基因表达，是否可以有效地增强 Crocin 的抗癌作用呢？本研究应用 RNAi 技术特异性地沉默 BIU-87 细胞 PLC ε 基因表达，观察 Crocin 对其增殖抑制作用，并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人膀胱癌 BIU-87 细胞，重庆医科大学附属第二医院超声研究所惠赠。Crocin 购自 Sigma 公司。RT—PCR 试剂盒购自宝生物(大连)有限公司、PCR 引物由宝生物(大连)有限公司合成。PGenesil-PLC ε 绿色荧光蛋白表达质粒购自武汉晶赛公司。脂质体 lipofectamine 2 000 为美国 Invitrogen 公司产品。四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司。质粒抽提试剂盒购自天为时代。CyclinD1、PCNA 鼠抗人单克隆抗体购于 eBioscience 公司，β-actin 羊抗人单克隆抗体购于 SANTA CRUZ。

1.2 实验分组

设立未转染组、pGenesil-NP 阴性质粒组、pGenesil-PLC ε 质粒组、Crocin 组、pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组。

1.3 方法

1.3.1 Crocin 溶液的配制 无菌条件下将 1 000mgCrocin 溶于 20mlPBS(0.01mol/L、pH=7.2)中，并加 62.5mg EDTA(Crocin 的稳定剂)配成 50mg/ml(50mmol/L)储存液，4℃贮存。临用时 PBS(0.01mol/L、pH=7.2)稀释为适当浓度。

1.3.2 细胞培养 BIU-87 细胞由本室冻存，复苏后以含有 10%FCS 的 RPMI1640 培养液，于 37℃、5%CO_2 恒温培养箱中培养，接种 48~72h 进入对数生长期，待细胞长至瓶底 80%~90%时用 0.25%的胰酶将贴壁生长的细胞消化 1~3min，待细胞变圆，轻轻拍打细胞培养瓶将细胞传代。

1.3.3 细胞转染 细胞生长至对数生长期，0.25%的胰酶消化细胞并计数，用无抗生素 RPMI1640 培养液调整细胞浓度(0.5~2)×10^5/ml，用吸管加入 24 孔板，每孔 500μl。轻轻混匀室温静置 10min 后于 37℃、5%CO_2 恒温培养箱中培养。16~24h 后，细胞融合达 70%~80%时用 PBS 清洗 2 次，加入 500μl 无血清、无抗生素 RPMI1640 培养液。每孔细胞，分别用 50μl 无血清及抗生素 RPMI1640 培养液稀释真核表达质粒 1.0μl 及 1~4μl 转染试剂，37℃保温 5min 混合稀释质粒和转染试剂，在室温放置 20min，然后每孔加入 100μl 质粒—脂质体复合物，轻轻摇动培养板混匀。37℃、5%CO_2 恒温培养箱中培养 6h，取出细胞培养板，吸去上层细胞培养液，加入 10%FCS RPMI1640 培养液 500μl，继续 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养。

1.3.4 MTT 法观察细胞增殖抑制 转染 pGenesil-NP 阴性质粒组、pGenesil-PLC ε 质粒组 BIU-87 细胞，48h 后存活的细胞分别制成 1×10^4 个/ml 单细胞悬液，每孔接种 200μl每组设 5 个复孔，同时接种 4 板。根据实验分组：未转染组、pGenesil-NP 阴性质粒组、pGenesil-PLC ε 质粒组、Crocin 组、pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组，加入 Crocin 调整终浓度为 3.2mol/L，其余分组加入新鲜含 10%FCS 的 RPMI1640 培养液，继续放入培养箱中培养 48h。实验结束前 4h 每孔加入 5mg/ml MTT10μl，继续培养 4h。平板离心 2 000r/10min，去上清，每孔加入 DMSO 100μl 终止反应，振荡器振荡至结晶完全溶解，酶标仪测定 570nm 吸光度。计算不同处理因素对 BIU-87 细胞的增殖抑制率。细胞抑制率 =(对照组 A 值 - 实验组 A 值)/对照组 A 值×100%。

1.3.5 RT-PCR 检测 CyclinD1、PCNA 及 PLC ε mRNA 表达 收集各处理组细胞，Trizol 法提取总 RNA，逆转录为 cDNA。引物序列 β-actin：上游：5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3'；下游：5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3' 长度 =543bp；CyclinD1：上游：5'-GCTGGAGCCCGTGAAAAAGA-3'；下游：5'-CTCCGCCTCTGGCATTTT G-3' 长度 =247bp；PCNA：上游：5'-GGCACTCAAGGACCTCATCA-3'；下游：5'-CCAGAAGGCATCTTTACTACAC-3' 长度 =375bp；PLC ε：上游：5'-CATGGAAGGATAAGCGTTGGT-3'；下游：5'-CCCAAGTCCCGT GTTAAGA-3' 长度 =395bp。β-actin 反应条件为 94℃预变性 3min，94℃变性 1min、56℃退火 1min、72℃延伸 1min，共 30 循环，最后 72℃延伸 5min；CyclinD1 反应条件为 94℃预变性 3min，94℃变性 1min、64℃退火 1min、72℃延伸 1min，共 30 循环，最后 72℃延伸 5min；PCNA 反应条件为 94℃预变性 3min，94℃变性 1min、57℃退火 1min、72℃延伸 1min，共 30 循环，最后 72℃延伸 5min；PLC ε 反应条件为 94℃预变性 3min，94℃变性 1min、退火 56℃1min、72℃1min 延伸 1min 共 30 循环，最后 72℃延伸 5min。扩增产物电泳。将所有凝胶电泳结果用 Quantity one 4.5.0 软件进行分析，求得 CyclinD1、PCNA、PLC ε 和 β-actin 的平均 OD 值，将 CyclinD1、PCNA、PLC ε 的 OD 值与相应 β-actin 的 OD 值参比后比值作为 CyclinD1/PCNA/PLC ε mRNA 表达量。

1.3.6 Western-blot 检测 Cyclin D1 和 PCNA 蛋白表达 收集各组细胞，按常规方法抽提各组细胞总蛋白，SDS-PAGE

维普资讯 http://www.cqvip.com

方法电泳,半干转法转膜,封闭后加入鼠抗人 Cyclin D1,PCNA 单克隆抗体,再用 HRP- 羊抗鼠 lgG 为二抗。特异性的反应条带通过化学发光系统显色。结果由 BIO-RAD 图像分析仪分析。

1.3.7 数据处理 所有数据采用 SPSS11.5 统计软件包进行方差分析,组间均数比较采用 SNK 法检验。结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P<0.05$ 表示有显著统计学差异。

2 结 果

2.1 RNAi 沉默 PLCε 及 Crocin 处理对 BIU-87 细胞增殖抑制作用

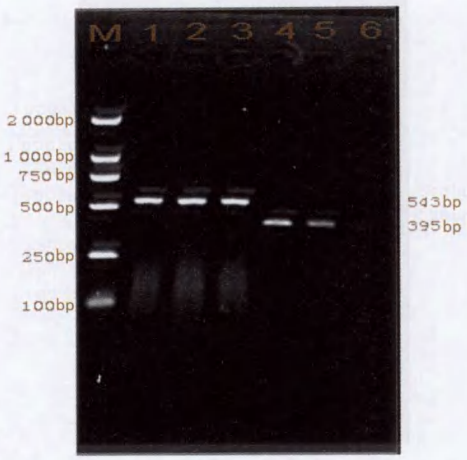
MTT 法结果显示,RNAi 沉默 PLC ε、Crocin、RNAi 沉默 PLC ε 联合 Crocin 组均能抑制细胞增殖,Crocin 的抑制作用强于 RNAi 沉默 PLC ε 组;RNAi 沉默 PLC ε 联合 Crocin 组的抑制作用高于单独因素的抑制作用($P<0.01$),见表 1。

2.2 RT-PCR 检测 PLCε、Cyclin D1、PCNA mRNA 表达

如图 1 所示,pGenesil-PLC ε 转染质粒有效抑制了 PLC ε mRNA 的表达($P<0.01$)。PLC ε 的表达被抑制了 78.06%,见表 2。RNAi 沉默 PLC ε 48h,3.2mmol/L Crocin 作用 48h,及 RNAi PLC ε 联合 Crocin48h 处理组均使 PCNAmRNA 表达下调,联合作用组使其下调程度显著高于单独因素处理组($P<0.05$)。RNAi 沉默 PLC ε 48h,3.2mmol/L Crocin 作用 48h,及 RNAi 沉默 PLC ε 联合 Crocin 48h 处理组均使 Cyclin D1 mRNA 表达下调,联合作用组使其下调程度高于单独 RNAi 沉默 PLC ε 处理组($P<0.01$),但与 Crocin 处理组比较无统计学差异($P>0.05$),见表 3。

2.3 Western blot 检测 Cyclin D1、PCNA 蛋白表达

如图 4 结果显示,与对照组相比 RNAi 沉默 PLC ε 联合 Crocin 处理组使 PCNA 蛋白表达明显下调,其



注:M. DNA Marker; 1-3. 未转染组 β-actin、pGenesil-NP 组 β-actin、pGenesil-PLC ε 组 β-actin; 4-6. 未转染组 PLC ε、pGenesil-NP 组 PLC ε、pGenesil-PLC ε 组 PLC ε

图 1 PLCε 扩增产物电泳图



注:M. DNA Marker; 1. 未转染组; 2. pGenesil-NP 组;3. pGenesil-PLC ε 组; 4. Crocin 组; 5. pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组

图 2 PCNA 扩增产物电泳图

下调程度高于 RNAi 沉默 PLC ε 组,差异有统计学意义($P<0.05$);高于 Crocin 48h 处理组,但无显著性

表 1 RNAi 沉默 PLCε 及 Crocin 处理对 BIU-87 细胞增殖的抑制

组别	24h 抑制率(%)	48h 抑制(%)	72h 抑制(%)
pGenesil-NP 组	1.35*	9.97*#	3.63*b
pGenesil-PLC ε 组	19.32*#	22.65*#	10.59*#
Crocin	16.35*#	38.26*#	40.93a#
pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组	33.61#	45.30#	48.35#

注:与 pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组比较 *$P<0.01$;与 pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组比较 a$P>0.05$ 与未转染组比较 #$P<0.01$;与未转染组比较 b$P>0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 RNAi 沉默 PLCε 后 BIU-87 细胞 PLCε mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

	未转染组	pGenesil-NP 组	RNAiPLC ε 组
PLC ε	0.793 ± 0.046	0.699 ± 0.044*	0.174 ± 0.035*#

注:与未转染组比较 *P<0.01;与未转染组和 pGenesil-NP 组比较 #P<0.01

表 3 RNAi 沉默 PLCε 及 Crocin 处理 BIU-87 细胞后 Cyclin D1、PCNA mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

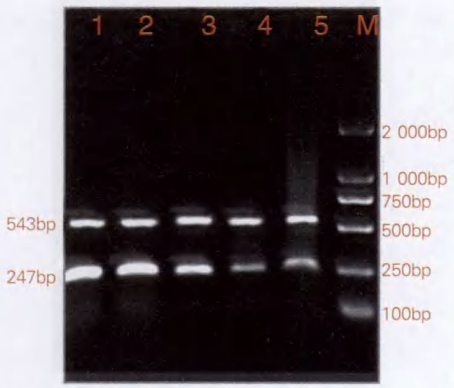
	未转染组	pGenesil-NP 组	pGenesil-PLC ε 组	Crocin 组	pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组
CyclinD1	1.698 ± 0.168[a]	1.852 ± 0.128[a]	1.081 ± 0.051*[a]	0.881 ± 0.081*	0.874 ± 0.042*
PCNA	0.596 ± 0.014[a]	0.542 ± 0.032*[a]	0.394 ± 0.035*[a]	0.322 ± 0.042*[a]	0.242 ± 0.005*

注:*P<0.05 与未转染组比较;[a]P<0.05 各处理组与 pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组比较

表 4 RNAi 沉默 PLCε 及 Crocin 处理 BIU-87 细胞后 Cyclin D1、PCNA 蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

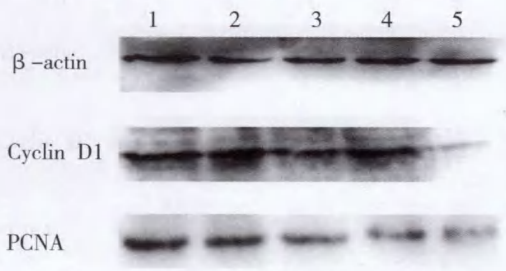
	未转染组	pGenesil-NP 组	pGenesil-PLC ε 组	Crocin 组	pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组
CyclinD1	0.773 ± 0.031[a]	0.774 ± 0.042[a]	0.665 ± 0.047*[a]	0.686 ± 0.021*[a]	0.328 ± 0.014*
PCNA	0.431 ± 0.021[a]	0.425 ± 0.038[a]	0.393 ± 0.017[a]	0.281 ± 0.041*[a]	0.224 ± 0.046*

*P<0.05 与未转染组比较;[a]P<0.05 其余各处理组与 pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组比较



注:M. DNA Marker; 1. 未转染组; 2. pGenesil-NP 组;3. pGenesil-PLC ε 组; 4. Crocin 组; 5. pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组

图 3 Cyclin D1 扩增产物电泳图



注:1. 未转染组; 2. pGenesil-NP 组; 3. pGenesil-PLC ε 组; 4. Crocin 组; 5. pGenesil-PLC ε 联合 Crocin 组

图 4 RNAi 沉默 PLCε 及 Crocin 处理 BIU-87 细胞对 cyclin D1、PCNA 蛋白表达的影响

差异(P>0.05)。与对照组相比 RNAi 沉默 PLC ε 联合 Crocin 处理组使 Cyclin D1 蛋白表达明显下调,且与各单因素处理组比较,差异有显著性(P<0.05),见图 4,表 4。

3 讨 论

PLC ε 是近来发现的一新型 PLC 同工酶,除具有 PLC 家族成员典型的结构以外,且有其特殊的结构域:C 端含有 2 个 RA 结构域(RA1、RA2),N 端含有 1 个 RasGEF 结构域。Ras 基因是最早发现与膀胱移行细胞癌相关的基因之一,H-ras 的突变在膀胱癌中最为常见。它编码的细胞膜蛋白(H-Ras)是 1 个鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白),该蛋白保留了 GTP 结合活性,失去了 GTP 水解活性,使 G 蛋白持续激活,有丝分裂信号持续传入,细胞过度增殖而恶性转变。PLC ε RasGEF 结构域能作为 Ras 鸟甘酸交换因子,促进 Ras-GTP 的形成,从而激活 Ras[7]。RA 结构域中 RA2 能与富含 GTP 的 Ras 家族成员(如 Ras、Rho、G α β γ 等)以相互作用的方式结合而激活 PLC ε[8,9]。而 PLC ε 被 Ras 激活后,能水解细胞膜上 PIP2 为 IP3 和 DAG 两种胞内重要信使,进而通过其下游信号通路加速立早基因表达,产生第三信使,第三信使跨越核膜进入核内经磷酸化修饰后,活化晚期反应基因,并转录,导致细胞增

维普资讯 http://www.cqvip.com

生或核型改变。本实验利用 RNAi 技术特异性沉默 PLC ε 78.06%的 mRNA 表达后，膀胱癌 BIU-87 细胞的生长明显减缓，在转染 24h 和 48h 后细胞增殖抑制率分别达到 19.32%和 22.65%，说明 PLC ε 在调控细胞分裂增殖中有重要作用。藏红花为我国传统中药，Nair SC 等[10]报道了藏红花体内外抗肿瘤的实验研究：发现其对白血病、卵巢癌、结肠癌、乳头癌、扁平细胞癌和软组织肉瘤都有剂量依赖性的抑制作用，而且几乎无毒性。将藏红花萃取物经口给予荷瘤小鼠，可以抑制小鼠来源肉瘤 180(S-180)、艾氏腹水癌(EAC)和道氏淋巴组织瘤腹水(DLA)的腹水瘤的生长，并显著延长经过治疗的荷瘤小鼠的生存寿命达 2~3 倍。口服藏红花萃取物可强烈抑制小鼠 DLA 和 S-180 肿瘤细胞的生长[11]。Crocin 是藏红花特定有效成分，动物实验表明对于提前给予服用 Crocin 的小鼠，Crocin 可以显著逆转致瘤小鼠病理学改变，肿瘤发生率和组织病理学研究均表明 Crocin 是一种潜在的抗肿瘤试剂[12]。应用 RNAi 技术沉默 PLC ε 基因表达联合 Crocin 作用于膀胱癌 BIU-87 细胞，观察其体外抑制增殖效果。

研究表明，RNAi PLC ε 联合 Crocin 处理组与 RNAi 沉默 PLC ε 组和单独 Crocin 组比较对 BIU-87 细胞的生长抑制作用显著增强($P<0.01$)。并且，与 RNAi 沉默 PLC ε 组比较，明显的下调了 PCNA、Cyclin D1 基因和蛋白的表达($P>0.05$)；较单独 Crocin 组比较，显著降低 PCNA 基因和蛋白的表达($P<0.05$)，Cyclin D1 蛋白的表达($P<0.05$)，降低 Cyclin D1 mRNA 的表达，但差异不显著($P>0.05$)。PCNA，是 DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白和 DNA 合成必不可或缺的细胞因子，其表达水平与细胞增殖活性密切相关，在静止期细胞内其含量很少，G_1 晚期开始增加，S 期达到高峰，G_2/M 期明显下降。PCNA 蛋白表达下调，提示进入 S 期或 G_1 晚期细胞减少，说明细胞增殖受到抑制。Cyclin D1 蛋白表达的减少使细胞 Cyclin D1-CDK4 复合物的形成也减少，从而 CDK4 活性下降，转录因子 E2F 释放减少，致使 S 期进程相关基因转录水平降低，细胞周期阻滞。同时，Cyclin D1 及 PCNA 转录水平和蛋白表达水平的不一致，可能由于细胞周期的调控是在不同水平上，多途径多因素作用的结果，信号通路之间的交互作用、代偿机制也许是 Cyclin D1 mRNA 下调显著而蛋白表达变化不显著的因素。本研究表明沉默 PLC ε 基因的表达显著增强了 Crocin 的抗增殖作用，其机制与进一步下调 PCNA、Cyclin D1 表达有关，但它们两者作用的机制尚不清楚，仍需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Knowles MA.The genetices of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application[J]. BJU Int,1999;84(4):412-427.

[2] Cordon-Cardo C.Molecular alterations in bladder cancer [J]. Cancer Surv,1998;32:115-131

[3] 欧俐苹，罗春丽，郭永灿，等. PLC ε siRNA 转染对膀胱癌细胞株 T24 侵袭能力的影响[J]. 重庆医科大学学报，2007;32(5):503-505.

[4] 曾 柯，吴小侯，杜 虎. survivin 靶向 siRNA 对膀胱癌细胞增殖和凋亡作用的体外研究[J]. 重庆医学，2007;36(14):1360-1362.

[5] 吴 跃，苟 欣，吕天兵，等. 3 种不同的 surivivin siRNA 对 EJ28 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2007;29(22):2152-2155.

[6] Abdullaev FI,Riveron Negrette L,Caballero Ortega H,et al.Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (Crocus sativua L.)[J]. Toxicol In Vitro,2003;17(5-6):731-736.

[7] Jin TG,Satoh T,Liao Y,et al. Role of the CDC25 homology domain of phospholipase C in amplification of Rap1-dependent signaling[J]. Biol. Chem,2001;276(32):30301-30307.

[8] Wing MR,Bourdon DM,Harden TK.A shared effector protein in Ras,Rho,G α β γ mediated signaling[J]. Molecular,2003;5(3):277-279.

[9] Song C,Satoh T,Edamatsu H,et al. Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipaseC ε [J]. Oncogene,2002;21(53):8105-8113.

[10] Nair SC,Kurumboor SK,Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine-A review[J]. Cancer Biotherapy,1995;10(4):257.

[11] Nair SC,Varghese CD,Pannikar KR,et a1. Efects of saffron on vitamin A levels and its antitumor activity of the growth of solid tumors in mice[J]. Int J Pharmacog,1994;32(2):105-114.

[12] Magesh V,Singh JP. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence,a ntioxidant status,drug metabolizing enzymes and histopathological studies[J]. Mol Cell Biochem,2006;287(1-2):127-135.

(责任编辑：关蕴良)