

## LPS 通过调节 Cdc2 蛋白表达诱导 HeLa 细胞凋亡的研究\*

赵丽君, 周 辉, 赵 明<sup>△</sup>

(南方医科大学病理生理教研室/广东省休克微循环重点实验室, 广州 510515)

**摘要:**目的 构建细胞分裂周期蛋白 2(Cdc2)真核表达载体,并在 P16 基因缺失的肿瘤细胞 HeLa 细胞中表达,利用 LPS 诱导细胞凋亡,并探讨 LPS 诱导 HeLa 细胞凋亡的机制。方法 从人 U2OS 细胞中提取 RNA,反转录克隆 Cdc2 cDNA 片段,利用 Gateway 技术构建 pDEST27-Cdc2 质粒。将 pDEST27-Cdc2 质粒瞬时转染人宫颈癌 HeLa 细胞,免疫印迹分析 Cdc2 的表达情况,并用 LPS 刺激,观察其对 LPS 引起的细胞凋亡和细胞周期的影响。结果 成功构建 pDEST27-Cdc2 质粒,质粒酶切及测序结果完全正确。LPS 刺激 HeLa 细胞 24 h 后,流式细胞仪检测发现大量细胞凋亡,而转染 pDEST27-Cdc2 质粒的细胞凋亡率明显降低,提示 Cdc2 的重要作用。免疫印迹分析研究发现,LPS 诱导 HeLa 细胞 Cdc2 蛋白水平下降,进一步研究发现 LPS 诱导 HeLa 细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,过表达 Cdc2 可以降低 G<sub>2</sub> 期细胞阻滞的发生。结论 LPS 诱导 HeLa 细胞凋亡是由于其导致 Cdc2 表达下降,细胞分裂停止在 G<sub>2</sub>/M 期,过表达 Cdc2 可以阻止死亡信号诱导的细胞凋亡。

**关键词:**细胞周期蛋白质类;周期素依赖性激酶 1;细胞凋亡;细胞周期

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-2012-04

## LPS induces HeLa cells apoptosis by regulating expression of Cdc2 protein\*

Zhao Lijun, Zhou Hui, Zhao Ming<sup>△</sup>

(Department of Pathophysiology, Southern Medical University/Key Lab for Shock and Microcirculation Research of Guangdong, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Objective To construct the ukaryotic vector of cell division cycle 2(Cdc2), to express it in the HeLa cells which lack p16genes, to induce cell apoptosis by using LPS, and to investigate the apoptosis mechanism of HeLa cells induced by LPS. **Methods** Cdc2 cDNA fragments were cloned from human U2OS cells by reverse transcription, the pDEST27-Cdc2 plasmid was constructed by Gateway technology. To transiently transfect the pDEST27-Cdc2 plasmid into the HeLa cells by liposome. The expression of Cdc2 was analyzed by Western blot and its influence on the cell cycles and cell apoptosis stimulated by LPS was observed. **Results** pDEST27-Cdc2 plasmid was constructed successfully. Restriction analysis and sequencing proved the same as the design. After 24 h stimulation on HeLa cells by LPS, a large number of apoptosis cells were found by the flow cytometry, the apoptosis of HeLa cells transfecting pDEST27-Cdc2 plasmid was significantly decreased, which prompted the important role of Cdc2. Western blot study found that the expression of Cdc2 in HeLa cells stimulated by LPS was decreased. Further study found that LPS could induce the G<sub>2</sub>/M phase retardation in HeLa cells. And overexpression of Cdc2 could reduce the occurrence the G<sub>2</sub>/M phase retardation. **Conclusion** LPS induces the apoptosis of HeLa cells by down-regulating the expression of Cdc2 protein and stopping the cell division in G<sub>2</sub>/M phase. Overexpression of Cdc2 can prevent the cell apoptosis induced by death signal.

**Key words:** cell cycle proteins; cyclin-dependent kinase 1; cell apoptosis; cell cycle

多数肿瘤细胞 P16 蛋白缺失,导致肿瘤细胞中细胞分裂周期蛋白 2(cell division cycle 2, Cdc2)过度表达,从而引起细胞过度增殖发生癌变<sup>[1]</sup>。Cdc2 又叫细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinases1, CDK1),是一个高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。Cdc2 在真核生物细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期检查点起着正性调节作用,它与细胞周期素 B1(cyclin B1)相互作用形成有丝分裂促进因子(mitosis promoting factor, MPF)促进细胞进入 M 期<sup>[2]</sup>。P16 基因产物属于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CDKI),能阻断 cdk4/6 的活性,引起去磷酸化的 Rb 积聚,从而抑制转录因子 E2F 的活性。E2F 调节 Cdc2 的表达,因而 Cdc2 的表达受到抑制。P16 基因突变导致 P16 蛋白缺失,抑制了 Rb 的活性,激活 E2F,从而导致 Cdc2 大量表达,是肿瘤发生的机制之一。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是一种基因控制的细胞自

主性的死亡过程,是多细胞个体移除有害细胞的机制,广泛存在于多细胞生物的各种组织中。各种因素诱导的细胞凋亡主要涉及两种信号通路:死亡受体通路和线粒体信号通路。LPS 可以诱导大多数细胞凋亡,其引起肿瘤细胞凋亡的机制尚不明确。本研究采用 P16 基因缺失的 HeLa 细胞探讨 Cdc2 在 LPS 诱导的细胞凋亡中可能的机制,通过反转录克隆 Cdc2 mRNA,构建了 Cdc2 表达载体,通过免疫印迹等实验技术证明,LPS 诱导 HeLa 细胞凋亡与其降低 HeLa 细胞 Cdc2 蛋白表达有关。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** HeLa 细胞株和 U2OS 细胞株购自中科院上海细胞库。大肠埃希菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  为本科室保留。DNA 片段凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、质粒提取试剂盒、转染脂质体 Lipofectamine 2000 和 TOPO TA 克隆试剂盒购自 Invitrogen 公

司; Xba I 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 琼脂粉(agar)、胰蛋白胨(tryptone)、酵母浸出粉(yeast extract)购自英国 Oxoid 公司; 氨苄青霉素购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶、新生牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司。所用仪器如下: PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); 电泳仪(北京百晶); 凝胶图像分析仪(法国 Vilber Lourmat 公司); 高速离心机(美国 Beckman 公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司); Western blot(北京百晶生物技术有限公司); 凝胶成像系统(Tanon 公司); 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成** 根据 NCBI 上公布的 Cdc2 的 CDS 序列(NM\_001786.4), 用 Primer 5.0 软件设计上、下游引物, 引物序列如下: Cdc2 上游引物 5'-GAAGATTATAC-CAAAATAGAGAAAA-3', 下游引物 5'-CTACATCTTCT-TAATCTGATTGTCC-3'。PCR 引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

**1.2.2 Cdc2 片段的 PCR 扩增** 培养人骨肉瘤 U2OS 细胞至对数生长期, 用总 RNA 提取试剂盒提取细胞的总 RNA, 用 qRT-PCR 试剂盒逆转录总 RNA 为第一链 cDNA。用 KOD FX 高保真聚合酶进行 PCR 反应; 反应条件为 94 °C 预变性 2 min, 98 °C 变性 10 s, 62 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 50 s, 共进行 30 个循环。将上述反应产物加 0.5 μL Taq 酶, 72 °C 10 min。反应结束后, 将 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳。

**1.2.3 Cdc2 TA 亚克隆载体与 pDEST-Cdc2 载体的构建** 将上述 PCR 产物插入到 TOPO-TA 载体中, 再将重组的 TOPO-TA-Cdc2 载体转化氯化钙感受态细胞 DH5α, 挑选单克隆载体, 测序正确后进行扩增; 用质粒抽提试剂盒制备扩增 TOPO entry vector 入门载体质粒, 用紫外分光光度计测定纯度和浓度, 用 Xba I 限制性内切酶对 TA 克隆进行酶切鉴定。按 Mammalian Expression System with Gateway Technology 的程序将 TOPO entry vector 与目的载体 pDEST27 进行重组反应, 再将重组产物转化氯化钙感受态细胞 DH5α, 挑取阳性克隆于含有氨苄青霉素抗性的 LB(Luria-Bertani) 液体培养基中, 37 °C 220 r/min 震荡 14 h, 菌液测序正确后进行大量扩增, 用质粒抽提试剂盒制备扩增 pDEST27-Cdc2 质粒。

**1.2.4 pDEST-Cdc2 质粒转染人宫颈癌 HeLa 细胞** 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HeLa 细胞。在转染前 1 d 将 HeLa 细胞以  $1 \times 10^5$  的密度接种于 24 孔板并换用无抗生素的含 10% 胎牛血清培养基, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养, 直至细胞密度达到 80%。按照 Lipofectamine 2000 试剂盒操作说明, 瞬时转染 pDEST27-Cdc2 质粒入 HeLa 细胞。转染 48 h 后, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 法对蛋白质含量进行测定。取 60 μg 蛋白质, 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 鼠抗人一抗 1:2 000 稀释, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 3 次后, 孵曝光液上机显色。

**1.2.5 流式细胞仪 BD FACS-Verse 检测 HeLa 细胞凋亡率** 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HeLa 细胞, 将细胞分为转染组与未转染组, 培养细胞生长至 85% 时, 用浓度为 100 ng/mL 的 LPS 刺激 HeLa 细胞 24 h; 按照凯基生物公司的 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书, 用不含乙二胺

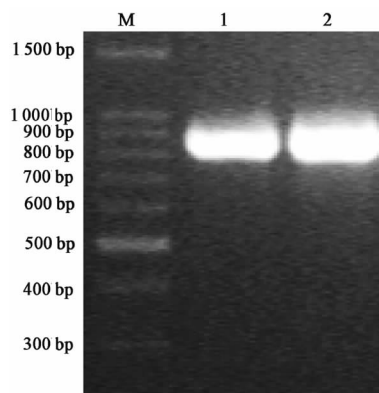
四乙酸(EDTA)的胰酶消化收集 HeLa 细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 r/min 离心 5 min), 收集  $4 \times 10^5$  细胞; 加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞; 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀; 室温避光反应 15 min 后上 BD FACS-Verse 流式细胞仪检测。为了研究 Cdc2 与 LPS 刺激引起的细胞凋亡的关系, 采用免疫印迹法检测 LPS 刺激以后 Cdc2 的变化。

**1.2.6 流式细胞仪 BD FACS-Verse 检测 HeLa 细胞周期** 将 HeLa 细胞分为转染组与未转染组, 培养细胞生长至 85% 时, 用浓度为 100 ng/mL 的 LPS 刺激 HeLa 细胞 24 h; 24 h 后消化收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 1 次(离心 2 000 r/min, 5 min), 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /mL, 取 1 mL 单细胞悬液; 制备的单细胞悬液离心后, 去除上清液, 在细胞中加入体积分数为 70% 冷乙醇 500 μL 固定, 4 °C 过夜; 染色前去除固定液, 用 PBS 洗 2 次(2 000 r/min, 2 min); 加 100 μL RNase A 37 °C 水浴 30 min; 再加入 400 μL PI 染色混匀, 4 °C 避光 30 min 后上机检测。

**1.3 统计学处理** 上述实验所取得的数据采用 Graphpad Prism 5.0 统计软件分析比较, 数值采用  $\bar{x} \pm s$  表示。单因素方差分析结合 Bonferroni 校正分析多组间的统计差异, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

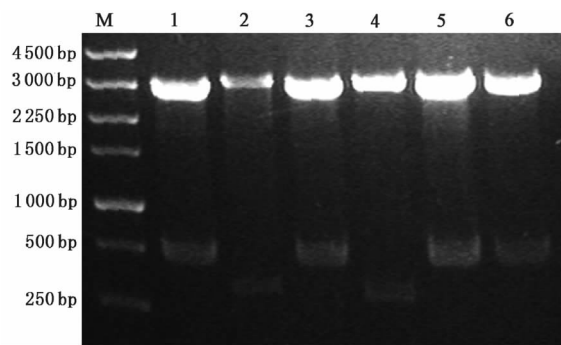
## 2 结果

**2.1 Cdc2 的 PCR 扩增** 以人骨肉瘤 U2OS 细胞 cDNA 为模板, 克隆 Cdc2 的 CDS 片段, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见 1 条约 900 bp 大小条带, 见图 1。



M: DNA 标记物; 1, 2: Cdc2 的 PCR 扩增结果。

图 1 Cdc2 的 PCR 琼脂糖凝胶电泳图



M: DNA 标记物; 1, 3, 5, 6: 正向插入序列(正确); 2, 4: 反向插入序列(不正确)。

图 2 限制性内切酶 Xba I 对 TA 克隆直行的酶切鉴定结果

**2.2 成功构建了 pDEST27-Cdc2 质粒** 将 PCR 产物进行 TOPO TA 克隆后, 用 Xba I 限制性内切酶对 TA 克隆进行酶

切鉴定 Cdc2 PCR 片段插入的正反,见图 2。将 TOPO entry vector 与目的载体 pDEST27 进行重组反应,转化感受态细胞 DH5 $\alpha$  后,挑单克隆细菌进行测序,测序结果显示,Cdc2 基因成功插入到 pDEST27 载体中,见图 3,且未发现碱基突变。

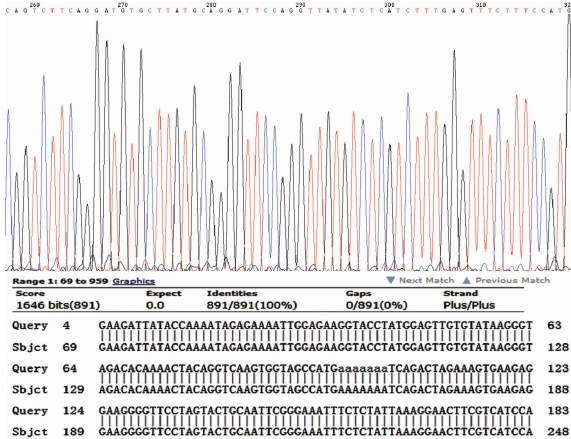
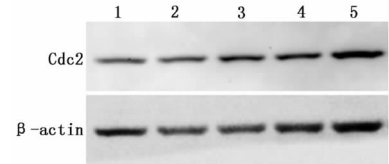


图 3 Cdc2 的测序峰图及 BLAST 比对结果

2.3 在 HeLa 细胞中成功表达了 pDEST27-Cdc2 载体 用 pDEST27-Cdc2 质粒转染 HeLa 细胞后,用蛋白印迹法检测转染效果,结果显示,转染 48 h 之后 Cdc2 蛋白表达量明显增加,见图 4,与转染前相比,转染后 Cdc2 蛋白表达量平均升高达

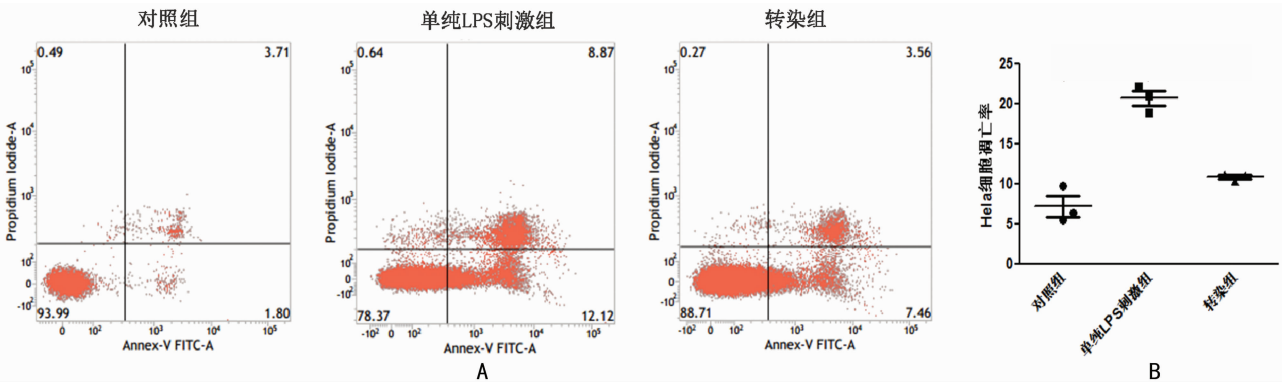
39.33%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.4 过表达 Cdc2 可明显抑制 LPS 诱导的细胞凋亡 采用 Annexin-V/PI 双染流式细胞计数检测细胞凋亡,结果显示,在含 10% FCS 的 DMEM 中培养时,HeLa 细胞自然凋亡率 ( $7.16 \pm 2.19$ )%;在 LPS 刺激 24 h 之后,HeLa 细胞凋亡率增高至 ( $20.65 \pm 1.66$ )% ( $P < 0.05$ );而经过转染 pDEST27-Cdc2 质粒的 HeLa 细胞仅为 ( $10.80 \pm 0.38$ )% ( $P < 0.05$ ),见图 5。为了研究 Cdc2 与 LPS 刺激引起的细胞凋亡的关系,采用免疫印迹法检测 LPS 刺激以后 Cdc2 的变化,发现经 LPS 刺激以后 HeLa 细胞中 Cdc2 蛋白表达明显下降,见图 6。



1: 未经转染的对照组;2: 转染 pDEST27-Cdc2 质粒 0.4  $\mu$ g;3: 转染 pDEST27-Cdc2 质粒 0.6  $\mu$ g;4: 转染 pDEST27-Cdc2 质粒 0.8  $\mu$ g;5: 转染 pDEST27-Cdc2 质粒 1.0  $\mu$ g。

图 4 不同剂量 pDEST27-Cdc2 质粒转染 HeLa 细胞后 Cdc2 的表达



A: Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡结果分析;B: HeLa 细胞凋亡率。

图 5 细胞凋亡情况

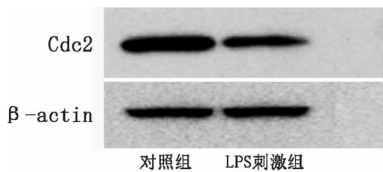


图 6 LPS 刺激后 Cdc2 在 HeLa 细胞中的表达

表 1 HeLa 细胞经 pDEST27-Cdc2 质粒转染 48 h、LPS 刺激后的细胞周期变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

LPS	Cdc2 质粒	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期
-	-	91.08 $\pm$ 1.40	6.67 $\pm$ 1.26	2.25 $\pm$ 0.15
+	-	34.27 $\pm$ 10.13**	33.79 $\pm$ 15.10	31.94 $\pm$ 7.84*
+	+	54.68 $\pm$ 1.00*	43.53 $\pm$ 0.76	1.79 $\pm$ 0.25 $\Delta$

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与未刺激和未转染组比较; $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与单纯 LPS 刺激组比较。

2.5 Cdc2 可明显减轻 LPS 刺激后的 G<sub>2</sub> 期阻滞 以 pD-

EST27-Cdc2 转染 HeLa 细胞,转染 48 h 后用 LPS 刺激 24 h,与未经转染但经 LPS 刺激的 HeLa 细胞相比,pDEST27-Cdc2 转染组明显减轻 LPS 刺激后的 G<sub>2</sub> 期阻滞,G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显减低( $P < 0.01$ ),见表 1。

### 3 讨论

Cdc2 是细胞周期 G<sub>2</sub>/M 点的核心调控分子,它与细胞周期蛋白 cyclinB1 结合形成 Cdc2-cyclinB 复合物(即 MPF)<sup>[3-5]</sup>。有文献报道,在 CDK2 敲除的情况下,Cdc2 可与 cyclin E 形成复合物,代替 CDK2 的功能,促进 G<sub>1</sub>/S 的转换<sup>[6]</sup>。细胞凋亡与细胞周期紊乱密切相关,它对于细胞的发生和组织稳定性至关重要,其非正常调节可以导致许多肿瘤的发生,如肝癌、肺癌、胃癌、宫颈癌<sup>[7-10]</sup>。近年有文献报道,LPS 也可通过 Fas/FasL 途径诱导单核细胞、T 细胞、血管内皮细胞和肝细胞凋亡<sup>[11-13]</sup>。

为了进一步明确 Cdc2 在细胞凋亡以及细胞周期中发挥的作用,本实验通过成功构建 pDEST-Cdc2 真核表达载体,并在 HeLa 细胞中转染使之过表达 Cdc2,再用凋亡诱导剂 LPS 来

诱导其凋亡后进一步验证它们之间的关系。流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示, LPS 能够引起 P16 基因缺乏的 HeLa 细胞凋亡, 而经转染 pDEST-Cdc2 之后的 HeLa 细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ )。由此, 推测 LPS 诱导 HeLa 细胞凋亡可能与 Cdc2 蛋白表达有关, 于是本研究检测了经 LPS 刺激以后 HeLa 细胞的 Cdc2 蛋白表达情况。结果发现经 LPS 刺激以后, HeLa 细胞中 Cdc2 蛋白表达水平明显降低。此结果表明, Cdc2 能够抑制 LPS 引起的 HeLa 细胞凋亡, 这可能与引起的一系列信号通路的改变有关, 尤其是可能与 Rb-E2F 复合物以及 PcG 蛋白家族相关。

Rb 基因家族在细胞周期的调控过程中发挥了重要作用, 主要通过调节 E2F 转录因子发挥作用<sup>[14]</sup>。E2F 的结合区域位于 Cdk2 的调节亚基 cyclinA 和 cyclinE 的基因启动子区域。Rb 与 E2F 结合后不仅掩盖了 E2F 的反式激活域, 而且在细胞周期调控基因启动子部位形成的 Rb-E2F 复合物能募集染色质重构酶(如组蛋白去乙酰基酶, histone deacetylase, HDAC)来抑制转录。因此 Rb-E2F 复合物引起的细胞增殖抑制作用又可分为 HDAC 依赖与 HDAC 非依赖两种形式。PcG 蛋白是非依赖 HDAC 发挥作用的 Rb 辅抑制物, 能与 Rb-E2F 复合物共同作用, 特异地抑制 cyclin A 和 Cdc2 表达, 使细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期。有研究发现, Rb 基因家族引起的 cyclin A 和 Cdc2 表达抑制能阻碍 cyclin B/Cdc2 复合体的形成, 而 cyclin B/Cdc2 复合体在细胞进入有丝分裂过程中发挥了重要的作用<sup>[15]</sup>。流式细胞仪检测细胞周期结果显示, 在 HeLa 细胞增殖过程中, 用 LPS 刺激以后 G<sub>2</sub>/M 期细胞数比未刺激与未转染组明显增多 ( $P < 0.05$ ), 而转染组经 LPS 刺激以后, G<sub>2</sub>/M 期细胞数明显下降 ( $P < 0.01$ )。这些结果提示, Cdc2 在细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期发挥了重要作用, 其高水平表达可促使受过凋亡诱导剂诱导的 HeLa 细胞通过有缺陷的 G<sub>2</sub>/M 期检测点进入 M 期, 并迅速步入下一个增殖周期。本研究发现 Cdc2 能够抑制 LPS 引起的 HeLa 细胞凋亡, 得出 LPS 能够通过调节 Cdc2 蛋白来诱导 HeLa 细胞凋亡的结论, 此分子机制可能与 Rb-E2F 复合物有关, 但确切的机制还有待进一步研究, 这也是本课题组下一阶段要深入进行的工作。

综上所述, 本实验成功构建了 pDEST27-Cdc2 真核表达载体, 并将其转染至 HeLa 细胞中, 初步对其功能机制进行了探讨, 证实 Cdc2 在细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期发挥了重要作用, 得出 LPS 通过调节 Cdc2 蛋白表达诱导 HeLa 细胞凋亡的结论。从而为深入研究 Cdc2 的功能和机制奠定了良好的理论基础, 为临床治疗肿瘤提供了新的线索。

#### 参考文献:

- [1] Sugarman JL, Schönthal AH, Glass CK. Identification of a cell-type-specific and E2F-independent mechanism for repression of cdc2 transcription[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(6):3282-3290.
- [2] Naihan XU, Donald C. Different thresholds of MPF inactivation are responsible for controlling different mitotic events in mammalian cell division[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(13):1639-1645.
- [3] Hu X, Moscinski LC. Cdc2: a monopotent or pluripotent CDK? [J]. *Cell Prolif*, 2011, 44(3):205-211.
- [4] Fimognari C, Nüsse M, Berti F, et al. A mixture of isothiocyanates induces cyclin B1-and p53-mediated cell-cycle arrest and apoptosis of human T lymphoblastoid cells[J]. *Mutat Res*, 2004, 554(1/2):205-214.
- [5] Planz O, Pleschka S, Oesterle K, et al. Borna disease virus nucleoprotein interacts with the CDC2-cyclin B1 complex [J]. *J Virol*, 2003, 77(20):11186-11192.
- [6] Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition [J]. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(8):831-836.
- [7] Gao F, Fu Z, Tian H, et al. The *Euphorbia lunulata* Bge extract inhibits proliferation of human hepatoma HepG2 cells and induces apoptosis[J]. *J Buon*, 2013, 18(2):491-495.
- [8] Zhao ZH, Lin L, Liang A, et al. UNC5H4-induced apoptosis in non-small cell lung cancer is not dependent on p53 status only[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(5):1363-1369.
- [9] Zhang H, Sun K, Ding J, et al. Harmine induces apoptosis and inhibits tumor cell proliferation, migration and invasion through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer[J]. *Phytomedicine*, 2013, 7113(13):364-374.
- [10] Yang PY, Hu DN, Liu FS. Cytotoxic effect and induction of apoptosis in human cervical cancer cells by *Androea camphorata* [J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(5):1169-1180.
- [11] Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2006, 177(9):6540-6547.
- [12] Zhong J, Deaciuc IV, Burikhanov R, et al. Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762(4):468-477.
- [13] Koide N, Morikawa A, Tumorakhuu G, et al. Lipopolysaccharide and interferon-gamma enhance Fas-mediated cell death in mouse vascular endothelial cells via augmentation of Fas expression[J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 150(3):553-560.
- [14] Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(19):2393-2409.
- [15] Dorée M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division [J]. *Faseb J*, 1994, 8(14):1114-1121.