

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.21.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210820.1320.011.html\(2021-08-20\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210820.1320.011.html(2021-08-20))

永生生化人肝细胞中 TNK1 介导细胞凋亡的机制研究*

黄金羽¹, 韩小莹¹, 闫 骏², 蒋 媛¹, 雷 蕾³, 林荣团^{1△}

(1. Lady Davis Institute, McGill University, Montreal, Canada, H3T 1E2;

2. 天津市第一中心医院病理科 300192; 3. 陆军军医大学护理学院, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 探究酪氨酸激酶非受体 1(TNK1)在永生生化人肝细胞中介导细胞凋亡的机制。**方法** 采用免疫组织化学法检验 TNK1 在人肝细胞癌和正常组织中的表达水平,流式细胞术检测被激活细胞凋亡的细胞比例,逆转录病毒载体包装感染法构建人永生生化肝细胞系 IHH rtTA-TNK1 细胞模型,免疫印迹法检测 TNK1 和细胞凋亡相关蛋白的表达。**结果** TNK1 在人肝细胞癌细胞组织中表达水平明显低于正常组织;TNK1 激活 c-含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)-3、c-caspase-9 的表达;TNK1 使线粒体中的细胞色素 C 部分转移至细胞质中;TNK1 上调 Bak 并降低 B 淋巴细胞瘤(Bcl)-xL、Mcl-1 的蛋白水平。**结论** 在永生生化人肝细胞中 TNK1 介导了 Bcl-2 家族蛋白表达水平使线粒体外膜通透性增加,导致细胞色素 C 释放从而激活 caspase-9 和 caspase-3,最终诱导细胞凋亡。

[关键词] 肝细胞癌;TNK1;Bcl-2 家族蛋白;细胞凋亡**[中图法分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)21-3601-05

Mechanism research of TNK1 mediated apoptosis in immortalized human hepatocytes*

HUANG Jinyu¹, HAN Xiaoying¹, YAN Jun², JIANG Yuan¹, LEI Lei³, LIN Rongtuan^{1△}

(1. Lady Davis Institute, McGill University, Montreal, Canada, H3T 1E2; 2. Department of Pathology, Tianjin Municipal First Central Hospital, Tianjin 300192, China;

3. School of Nursing, Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of TNK1-mediated apoptosis in immortalized human hepatocytes. **Methods** The immunohistochemical method was adopted to detect the expression level of TNK1 in human hepatocellular carcinoma (HCC) and normal tissues. The flow cytometry was used to examine the proportion of cells activated to apoptosis. The retrovirus vector packaging and infection method was used to construct the immortalized human hepatocytes line IHH rtTA-TNK1 cell model. Immunoblotting was used to examine the expressions of TNK1 and apoptosis-related proteins. **Results** The level of TNK1 in human hepatocellular carcinoma cellular tissue was significantly lower than that in normal tissues. TNK1 activated the expressions of c-caspase-3 and c-caspase-9. TNK1 caused the partial translocation of cytochrome C in mitochondria into cytoplasm. TNK1 up-regulated the expression of Bak, while down-regulated the expression of Bcl-xL and Mcl-1. **Conclusion** In immortalized human hepatocytes, TNK1 mediates the expression level of Bcl-2 family proteins, makes the increase of mitochondrial outer membrane permeability, causes the release of cytochrome C, thus activates caspase-9 and caspase-3, and eventually induces apoptosis.

[Key words] hepatocellular carcinoma; TNK1; Bcl-2 family proteins; apoptosis

众所周知,原发性肝癌是全球第六常见的癌症类型^[1],但其恶性程度较高,易早期转移,病死率高居第 2 位,应重点关注。原发性肝癌最常见的类型为肝细胞癌,有资料显示约占总病例数的 80%^[2]。细胞凋亡是机体为维持体内环境稳定,由基因控制的细胞自主死亡的主动调控方式,是机体抑制细胞癌变的重要机制之一。在癌细胞中细胞凋亡机制多被破坏,其生长

不再受限制,从而形成肿瘤。前期研究已证实,内源性途径是细胞凋亡的主要机制,其关键步骤之一是由 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)基因调节的线粒体外膜通透性增加导致细胞色素 C 释放,从而激活下游含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteine-specific proteinase, caspase),该通路在诱导细胞凋亡过程中至关重要^[3]。酪氨酸激酶非受

体 1 (tyrosine kinase non-receptor 1, TNK1) 是目前已被发现的首个具有抑制肿瘤特性的酪氨酸激酶, TNK1 能促进细胞凋亡, 并在人胚胎肾细胞 HEK293 中获得初步证实, 在人胰腺癌细胞中被发现具有致癌作用, TNK1 在不同细胞类型中的功能和作用尚需进行个体化精准研究^[4-7]。目前, 对 TNK1 在肝癌细胞中介导细胞凋亡的机制尚少见文献报道, 对该领域的深入研究必要而迫切。但由于前期研究已发现, 人肝癌细胞中 TNK1 的表达受到明显抑制, 极可能导致其引发的细胞凋亡途径无法激活, 故本研究选择同一种属、同一器官的正常细胞系——人永生生化肝细胞作为研究对象进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

人永生生化肝细胞系 IHH 购于美国 AcceGen Biotechnology 公司; 人胚胎肾细胞系 HEK293、人肝癌细胞系 HepG2、Huh7、Huh7.5 均购于美国菌种保藏中心。盐酸多西环素粉末 (#D9891) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 依托泊苷粉末 (#E1383) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 线粒体蛋白分离试剂盒 (#89874) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 人体组织标本由天津第一中心医院病理科闫骏博士提供, 免疫组织化学法试剂盒购于美国 Cell Signaling Technology 公司, 使用的抗体和染色包括 anti-Glypican-3 (#ab216606; Abcam)、anti-TNK1 (#PA5-14795; Thermo Fisher Scientific)、H&E Staining Kit (#ab245880; Abcam) 等; 一抗 [anti-TNK1 (#4507)、anti-cleaved-PARP (Asp214; #5626S)、anti-caspase-3 (#9662)、anti-cleaved-caspase-3 (Asp175; #9661S)、anti-caspase-9 (#9502)、anti-cleaved-caspase-9 (Asp315; #20750S)、anti-Cytochrome c (#11940S)、anti-Bax (#5023S)、anti-Bak (#12105S)、anti-Bcl-2 (#15071S)、anti-Bcl-xL (#2764S)、anti-Mcl-1 (#94296S)] 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; anti-微管蛋白 (sc-5286) 购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; anti- β -actin (ABT264) 购于美国 Millipore 公司; Annexin V APC、SYTOX™ Green 试剂盒 (#V35113) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司, BD Fortessa 流式细胞分析仪购于美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 建立 IHH rtTA-TNK1 细胞模型

逆转录病毒载体由 pTight-TNK1、pMLV-gag-pol、pVSV-G 质粒瞬转染于 HEK293 细胞中包装完成; IHH rtTA-TNK1 细胞模型由逆转录病毒载体感染 IHH 细胞制成。具体步骤: 在 100 mm 细胞盘中铺入 2×10^6 HEK293 细胞并培养 24 h 后用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂 (#L3000015; Invitrogen) 转染 6 μ g pTight-TNK1、6 μ g pMLV-gag-pol、2 μ g pVSV-G 质粒并培养 48 h 后过滤并收集上清液。在 6 孔细胞板中铺入 3×10^5 IHH 细胞后培养 24 h, 加

入上清液和 10 μ g/mL Polybrene (#638133; Millipore) 并培养 24 h。将细胞转移至 100 mm 细胞盘中并用 2 μ g/mL Puromycin (#A1113803; Thermo Fisher) 筛选 2 周。收集储存被检验多西环素激活 TNK1 表达阳性后的存活细胞。

1.2.2 多西环素处理

将多西环素粉末溶于水中制成多西环素溶液 (1 mg/mL)。将多西环素溶液加入新鲜培养基至 100 ng/mL (或其他指定质量浓度) 后加入细胞板中, 37 $^{\circ}$ C 处理 24 h。

1.2.3 依托泊苷处理

将依托泊苷粉末溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中制成依托泊苷溶液 (50 mmol/L)。将依托泊苷溶液加入新鲜培养基至 100 μ mol/L (或其他指定浓度) 后加入细胞板中, 37 $^{\circ}$ C 处理 24 h。

1.2.4 线粒体分离

收集 2×10^7 细胞并在常温 3 000 r/min 离心 2 min 后移除上清液, 加入 800 μ L 试剂 A 并以中速振荡 5 s 后置于冰上处理 2 min, 加入 10 μ L 试剂 B 并以高速振荡 5 s 后置于冰上处理 5 min 且高速振荡 1 次, 加入 800 μ L 试剂 C 来回晃动混匀后 4 $^{\circ}$ C、2 500 r/min 离心 10 min。将上清液转移至新离心管中于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min 后分离并保存上清液 (细胞质部分), 用 500 μ L 试剂 C 洗涤沉淀 (线粒体部分) 后 10 000 r/min 离心 5 min 移除上清液。分离后样品加入 $2 \times$ 十二烷基硫酸钠 (twelve alkyl sodium sulfate, SDS) 上样缓冲液并进行免疫印迹法处理。

1.2.5 免疫组织化学法

对组织切片进行预处理, 以 3% 过氧化氢去离子水孵育 10 min, 用磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 冲洗; 滴加一抗, 室温孵育 1 h, PBS 浸泡冲洗 3 min, 重复 5 次; 滴加 enhancer 增强剂, 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min 后 PBS 浸泡冲洗 3 min, 重复 5 次; 滴加通用型免疫球蛋白 G 抗体, 室温孵育 1 h, PBS 冲洗 3 min, 重复 5 次; 使用二氨基联苯胺溶液显色; 蒸馏水冲洗、复染、脱水、透明后封片, 拍照。

1.2.6 免疫印迹法

(1) 细胞蛋白制备, 收集细胞后以 PBS 洗涤 1 次, 加入 RIPA 裂解液 50 μ L 后置于冰上 30 min, 并且每 10 分钟振荡破碎 1 次。4 $^{\circ}$ C、13 200 r/min 离心 15 min 后吸取上清液, 转入灭菌离心管, 测定蛋白浓度并标记, 计算上样量与上样浓度后用 PBS 将样品稀释至统一浓度并置于 -80 $^{\circ}$ C 保存待用。(2) SDS-聚丙烯酰胺 (polyacrylamide, PAGE) 电泳, 解冻样品后按已计算出的各样品 1/2 体积加入 $2 \times$ SDS 上样缓冲液, 充分混匀, 在金属加热混样器上将蛋白样品进行 99 $^{\circ}$ C 加热处理 10 min。按测定的蛋白相对分子质量大小制备 10% 的 SDS-PAGE 胶, 冲洗上样孔 2 次后上样, 80 V 恒压电泳, 待样品中溴酚蓝条带迁移到凝胶底部时, 终止电泳。(3) 电泳转移蛋白质, 预先制备电泳转移缓冲液, 将其放置于 4 $^{\circ}$ C 预冷, 将已完成电

泳后的蛋白胶根据 Marker 指示按需要切取适当大小贴于硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, NC) 上,以三明治法两面覆盖 3 层滤纸、赶尽气泡后使用半干转仪 (Bio-Rad) 进行半干印迹转移。(4) 抗原抗体反应,将 NC 膜浸泡于封闭液[含 5% 脱脂奶粉的磷酸盐吐温缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBST) 液]中,于垂直摇床上室温封闭 1 h 后用 PBST 洗涤 5 min,将待检测蛋白的一抗以 1 : 1 000 比例稀释于封闭液中并覆盖在 NC 膜上,摇床 4 °C 过夜孵育。将已完成一抗孵育处理的 NC 膜用 PBST 在水平摇床上洗涤 3 次,每次 10 min。将相应二抗以 1 : 3 000 (鼠抗) 或 1 : 5 000 (兔抗) 比例稀释于封闭液中,覆盖在 NC 膜上并置于垂直摇床上室温孵育 1 h 后洗膜 3 次,进行蛋白显影检测。

1.2.7 流式细胞术

收集细胞后用 PBS 洗涤 1 次,加入 1 × Annexin V 结合缓冲液后于常温以 4 200 r/min 离心 3 min 并吸走上清液,向底部细胞加入 1 × Annexin V 结合缓冲液重悬浮并将浓度调至 1 × 10⁶/mL。取 1 mL 样品加入 5 μL APC-Annexin V 和 1 μL SYTOX[®] Green 染色剂,于 37 °C 处理 15 min,并采用流式细胞仪进行测定。

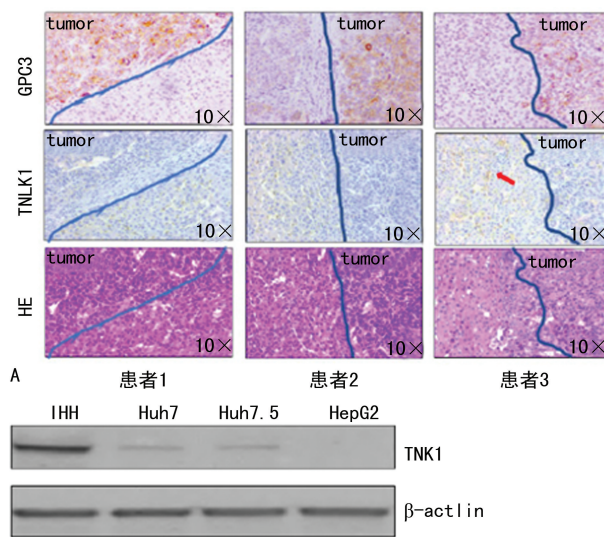
2 结 果

2.1 TNK1 在人肝细胞癌组织和细胞中的表达均明显下降

3 例患者肝细胞癌组织免疫组织化学法检测显示,苏木精-伊红染色标记的细胞核呈蓝色,细胞外基质呈粉色,显示了组织切片中细胞的分布趋势;磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (glypican-3, GPC-3) 抗体染色标记的肝细胞癌细胞呈黄褐色,从而区分了组织切片中的癌组织和正常组织;TNK1 抗体染色标记的 TNK1 蛋白呈浅红色,癌组织区域中 TNK1 表达明显低于周边正常组织,见图 1A。免疫印迹法检测结果也同样证实, TNK1 在人肝细胞癌细胞系 Huh7、Huh7.5、HepG2 中的表达程度均明显低于人肝细胞系 IHH 对照组,见图 1B。

2.2 多西环素诱导 IHH rtTA-TNK1 细胞模型中的细胞凋亡和 TNK1 表达升高

IHH rtTA-TNK1 细胞以 0、25、50、100 ng/mL 多西环素处理 48 h 后行流式细胞测试显示,细胞凋亡现象 (Annexin-V 信号阳性) 的细胞比例分别为 6.4%、24.2%、52.7%、74.7%,见图 2。IHH rtTA-TNK1 细胞由 100 ng/mL 多西环素处理 24 h 后经细胞裂解处理并进行免疫印迹法检测 TNK1 和细胞凋亡相关蛋白 (c-PARP、caspase-3、c-caspase-3、caspase-9、c-caspase-9) 表达水平;IHH 细胞由 100 μmol/L 依托泊苷予以相同处理作为阳性对照。结果显示,在 IHH rtTA-TNK1 细胞模型中多西环素能诱导 TNK1 表达升高;同时,多西环素诱导还引起了细胞凋亡相关 c-PARP、c-caspase-3、c-caspase-9 蛋白表达水平提高,见图 3。



A: 人肝细胞癌组织免疫组织化学法检测; B: 免疫印迹法检测 IHH、Huh7、Huh7.5、HepG2 细胞系中 TNK1 和 β-actin 表达水平。

图 1 人肝细胞癌组织和细胞中 TNK1 表达水平低于正常人肝细胞

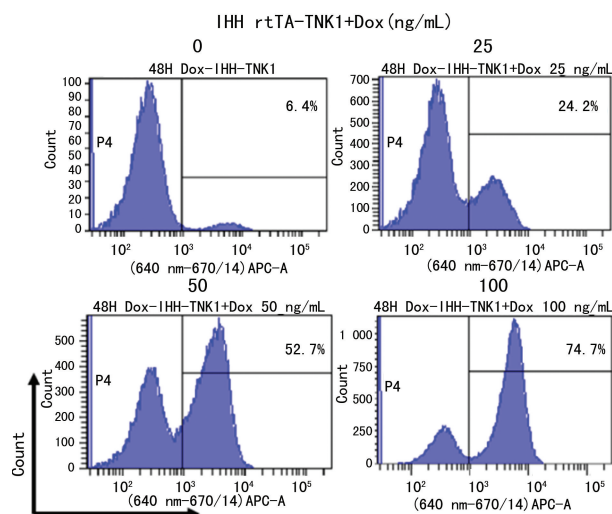


图 2 多西环素诱导 IHH rtTA-TNK1 细胞产生细胞凋亡现象

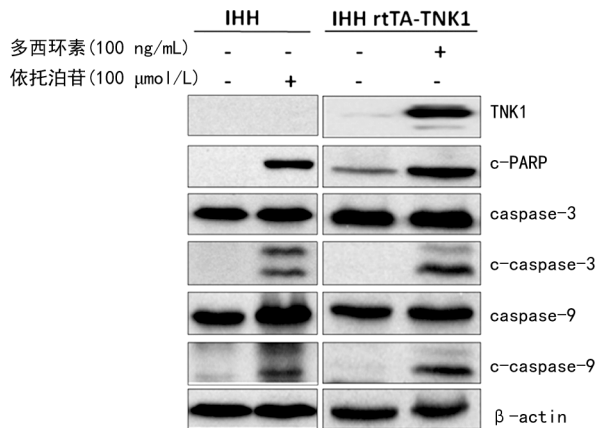
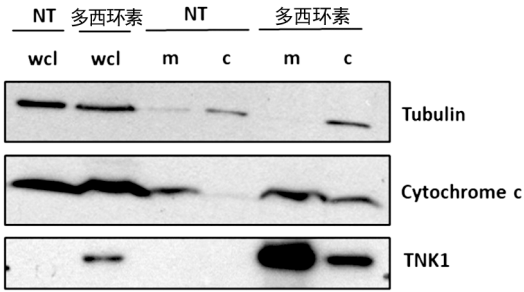


图 3 在 IHH rtTA-TNK1 细胞中多西环素激活产生的 TNK1 诱导细胞凋亡相关蛋白

2.3 IHH rtTA-TNK1 细胞模型中多西环素诱导表达的 TNK1 导致 Cytochrome C 转移

IHH rtTA-TNK1 细胞被多西环素处理后分别

通过全细胞溶解和线粒体分离处理,免疫印迹法检测显示,在全细胞溶解标本中多西环素促进 TNK1 表达而不影响微管蛋白和 Cytochrome C 的表达。经线粒体分离处理后微管蛋白集中在细胞质部分而多西环素处理不影响微管蛋白的分布;多西环素使 TNK1 大量出现于线粒体部分,少量出现于细胞质部分;未经多西环素处理时 Cytochrome C 集中在线粒体部分,而多西环素处理使线粒体和细胞质中均检测到 Cytochrome C,见图 4。在 IHH rtTA-TNK1 细胞模型中多西环素处理诱导 TNK1 表达,并使部分 Cytochrome C 从线粒体转移至细胞质中。



wcl:全细胞裂解产物;m:线粒体分离产物;c:细胞质分离产物。

图 4 在 IHH rtTA-TNK1 细胞中多西环素激活生产的 TNK1 使 Cytochrome C 转移

2.4 IHH rtTA-TNK1 细胞模型中多西环素诱导表达的 TNK1 能介导 Bcl-2 家族蛋白水平变化

IHH rtTA-TNK1 细胞由 100 ng/mL 多西环素处理 0、24、48 h 后经细胞裂解处理并用免疫印迹法检测 Bcl-2 家族蛋白(Bax、Bak、Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1)表达水平;IHH 细胞由 100 μ mol/L 依托泊苷予以相同处理作为阳性对照。结果显示,在 IHH rtTA-TNK1 细胞模型中多西环素诱导的 TNK1 在促进 Bak 蛋白表达的同时降低了 Bcl-xL 和 Mcl-1 蛋白水平,而对 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达水平无显著影响,见图 5。

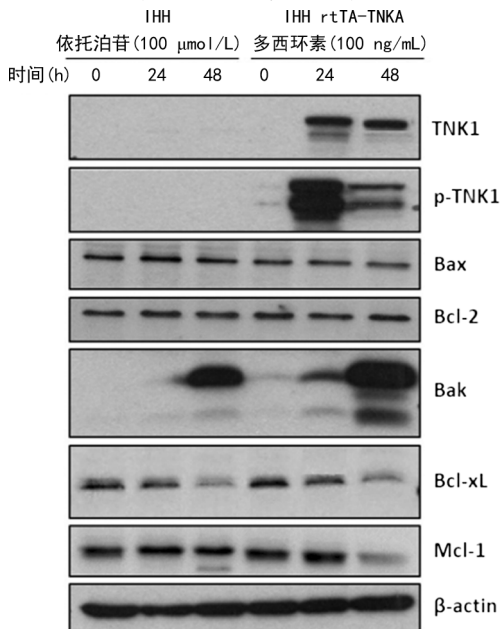


图 5 在 IHH rtTA-TNK1 细胞中多西环素激活生产的 TNK1 调节 Bcl-2 家族蛋白表达

3 讨论

TNK1 是被发现的首个具有抑癌作用的酪氨酸激酶,通过同源重组生产的 TNK1+/- 和 TNK1-/- 小鼠均会自发地形成肿瘤,另外在患有弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的小鼠中 TNK1 表达水平显著下降^[4]。然而,TNK1 也可帮助肿瘤形成。LIERMAN 等^[6]使用逆转录病毒插入突变扫描鉴定 TNK1 为致癌基因。另外也有研究证明,TNK1 对霍奇金淋巴瘤细胞和胰腺癌细胞的生存和生长至关重要^[7-8]。因此,确认 TNK1 在人肝细胞癌细胞中具有抑癌或致癌作用是必要的。本研究免疫组织化学法和免疫印迹法检测均证明了 TNK1 在人肝细胞癌细胞和组织中的表达水平明显低于正常细胞组织(图 1),证实 TNK1 在人肝组织中应扮演着抑癌角色,另外 TNK1 也据此可能作为未来诊断早期人肝细胞癌的重要生物标志物。

多西环素属常见四环素类抗菌药物,具有抗感染、抗肿瘤等作用,其机制主要为抑制磷酸化哺乳动物雷帕霉素(phosphorylated mammalian target of rapamycin, P-mTOR)水平^[9]。本研究构建了 IHH rtTA-TNK1 细胞系,多西环素可激活其 tet-on 基因表达系统,从而使细胞表达 TNK1。依托泊苷可与 DNA 拓扑异构酶 II 结合,使 DNA 复制过程中产生的瞬间链的断裂难以修复,导致细胞产生依托泊苷剂量依赖性 DNA 损伤,促进细胞凋亡^[10]。因此,本研究将依托泊苷作为诱导剂,促使细胞发生凋亡现象,从而作为阳性对照。本研究流式细胞法和免疫印迹法检测均证明,在人肝细胞中 TNK1 过表达能使 Annexin V 信号呈阳性并诱导产生 c-caspase-3 和 c-PARP,因此, TNK1 可激活人肝细胞的凋亡程序(图 2、3),鉴于细胞凋亡是抑制肿瘤产生和治疗癌症的重要机制之一,结合免疫组织化学法检测结果,作者认为 TNK1 在人肝组织中具有抑癌作用的结论成立,未来可通过过表达 TNK1 激活细胞凋亡程序抑制肝癌细胞增殖。但本研究发现,未经含 IHH 基因的逆转录病毒感染的正常 IHH 肝细胞 TNK1 表达无法通过蛋白印迹法被检测出来(图 3),同样未经逆转录病毒感染的正常肝细胞 TNK1 表达也未能顺利被检出来(图 5),作者认为这是由于激活 TNK1 后 IHH 细胞出现凋亡,导致收样细胞的总量大幅下降、样品蛋白浓度较低,为保持上样量的统一,图 3、5 的对照组上样蛋白总量相对图 1 组织蛋白总量较低所致。

内源性通路和外源性通路是激活细胞凋亡的主要机制^[3,11],其中内源性通路的核心机制是由 Bcl-2 家族蛋白调节的线粒体外膜通透性提高导致线粒体中促凋亡酶被释放进细胞质,最终激活 caspase-9 并形成 c-caspase-9^[3,12-13]。本研究为确认 TNK1 是否通过内源性通路激活细胞凋亡,检测了 TNK1 对内源性通路内重要蛋白的影响:(1)TNK1 表达激活并切割了 caspase-9 从而产生了内源性通路的重要终产

物——c-caspase-9(图 3);(2) TNK1 促使线粒体中 Cytochrome C 被释放到细胞质中(图 4);(3) TNK1 上调了 Bak 并下调了 Bcl-xL 和 Mcl-1 蛋白水平,而不影响 Bax 和 Bcl-2 的表达(图 5)。在 Bcl-2 家族蛋白中促凋亡的 Bax 和 Bak 与抗凋亡的 Bcl-2、Bcl-xL 和 Mcl-1 相互平衡,进而调节线粒体外膜通透性^[14]。

综上所述,在人肝细胞中 TNK1 通过调节 Bcl-2 家族蛋白中 Bak、Bcl-xL 和 Mcl-1 的平衡,提高了线粒体外膜通透性,进而使 Cytochrome C 转移至细胞质并激活 caspase-9,最终导致细胞凋亡。2015 年常虹等^[15]研究表明,三氧化二砷联合丹参酮胶囊能通过明显抑制细胞增殖、提高凋亡率、显著下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 等表达、上调 c-caspase-9 等促凋亡蛋白表达等机制影响肝癌细胞的增殖和凋亡,TNK1 在人肝细胞中通过内源性通路激活细胞凋亡上述机制研究也或可为新型抗肝癌药物的开发提供一种新思路。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] MCGUIRE S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015[J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(2): 418-419.
- [3] ELMORE S. Apoptosis; a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516.
- [4] MAY W S, HOARE K, HOARE S, et al. Tnk1/Kosl: a novel tumor suppressor[J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2010, 121: 281-293.
- [5] AZOITEI N, BREY A, BUSCH T, et al. Thirty-eight-negative kinase 1 (TNK1) facilitates TNF- α -induced apoptosis by blocking NF- κ B activation [J]. *Oncogene*, 2007, 26(45): 6536-6545.
- [6] LIERMAN E, Van MIEGROET H, BEULLENS E, et al. Identification of protein tyrosine kinases with oncogenic potential using a retroviral insertion mutagenesis screen [J]. *Haematologica*, 2009, 94(10): 1440-1444.
- [7] HENDERSON M C, GONZALES I M, ARO-RAS, et al. High-throughput RNAi screening identifies a role for TNK1 in growth and survival of pancreatic cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(6): 724-732.
- [8] GU T L, CHERRY J, TUCKER M, et al. Identification of activated Tnk1 kinase in Hodgkin's lymphoma [J]. *Leukemia*, 2010, 24(4): 861-865.
- [9] 孙健, 泰娥, 唐吉仙. 等. 多西环素通过上调自噬调控脂多糖诱导的 THP-1 细胞炎症因子水平 [J]. *中华病理生理杂志*, 2019, 35(8): 1489-1494.
- [10] YUAN X W, ZHU X Y, LIANG S G, et al. Interferon- α enhances etoposide-induced apoptosis in human osteosarcoma U2OS cells by a p53-dependent pathway [J]. *Life Sci*, 2008, 82(7/8): 393-401.
- [11] RICCI M S, EL-DEIRY W S. The extrinsic pathway of apoptosis [M]. New Jersey: Humana Press, 2007.
- [12] KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 3-11.
- [13] KERR J F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept [J]. *Toxicology*, 2002, 181(24): 471-474.
- [14] BURLACU A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7(3): 249-257.
- [15] 常虹, 张光霁. 三氧化二砷联合丹参酮胶囊抗肝癌细胞 bel-7404 的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11): 3881-3885.

(收稿日期: 2021-02-18 修回日期: 2021-05-08)