

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.007

· 基础研究 ·

PUMA 基因对胰腺癌细胞 BxPC-3 的促凋亡作用及其可能机制

莫小恒¹, 李 军², 张克君^{3*}, 李德春² (1. 海南省农垦八一总医院 消化内科, 海南 儋州 571727; 2. 海南医学院附属医院 普外科, 海南 海口 527000; 3. 苏州大学 第一附属医院 普外科, 江苏 苏州 215006)

[摘要] 目的: 研究 P53 正向凋亡调节因子基因(P53 up-regulate modulator of apoptosis, PUMA)对胰腺癌细胞株 BxPC-3 凋亡的影响及其可能的作用机制。方法: 以 100 MOI 的携 PUMA 基因重组腺病毒(Ad-PUMA)感染 BxPC-3 细胞 0~96 h, 流式细胞术检测 BxPC-3 细胞凋亡率, Western blotting 检测 BxPC-3 细胞中 PUMA、Bcl-2、Bax、Cytochrome C 和 Caspase-3 蛋白的表达, Western blotting 检测 BxPC-3 细胞中细胞质和线粒体内 Bax 的表达及 Bax 寡聚体。结果: 随着 Ad-PUMA 感染时间的延长, BxPC-3 细胞凋亡率逐渐增加, 48 h 时最高。Ad-PUMA 感染促进 BxPC-3 细胞中 PUMA、Cytochrome C 和 Caspase-3 蛋白的表达, 抑制 BxPC-3 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达。Ad-PUMA 感染后 BxPC-3 细胞的凋亡率与 BxPC-3 细胞中 PUMA 蛋白的表达具有明显的相关性。Ad-PUMA 感染不影响 BxPC-3 细胞中 Bax 蛋白的总表达量, 但细胞质中的 Bax 几乎完全消失, 而线粒体中的 Bax 表达明显增加; Ad-PUMA 感染诱导 BxPC-3 细胞中 Bax 蛋白的寡聚化。结论: PUMA 基因通过线粒体途径促进胰腺癌细胞凋亡。

[关键词] 胰腺肿瘤; P53 正向凋亡调节因子基因(PUMA); 凋亡; 线粒体

[中图分类号] R735.9; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)04-0353-05

PUMA promotes apoptosis of pancreatic carcinoma BxPC-3 cells and the possible mechanism

MO Xiao-heng¹, LI Jun², ZHANG Ke-jun^{3*}, LI De-chun² (1. Department of Gastroenterology, General Hospital of "81" Reclamation District in Hainan Province, Zhanzhou 571727, Hainan, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 527000, Hainan, China; 3. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of P53 up-regulate modulator of apoptosis (PUMA) on the apoptosis of pancreatic carcinoma BxPC-3 cells and the possible mechanism. **Methods:** BxPC-3 cells were infected with recombinant adenovirus containing PUMA gene (Ad-PUMA) at 100 MOI for 0-96 h. Apoptosis of BxPC-3 cells was examined by FCM. Expressions of PUMA, Bcl-2, Bax, Cytochrome C and Caspase-3 proteins in BxPC-3 cells were detected by Western blotting. Bax expression in the cytoplasm and mitochondrion and Bax oligomer expression in BxPC-3 cells were determined by Western blotting. **Results:** Apoptosis rates of BxPC-3 cells were significantly increased with the time of Ad-PUMA infection, and peaked after 48 h. Ad-PUMA infection increased the expressions of PUMA, Cytochrome C and Caspase-3 proteins in BxPC-3 cells, and decreased the expression of Bcl-2 protein. Apoptosis rate of BxPC-3 cells after Ad-PUMA infection was correlated with PUMA expression. Ad-PUMA did not affect the expression of total Bax protein in BxPC-3 cells, but Bax expression in cytoplasm was dramatically decreased after infection, and Bax expression in mitochondrion was markedly increased. Furthermore, Ad-PUMA infection induced Bax oligomerization in BxPC-3 cells. **Conclusion:** PUMA can promote apoptosis of pancreatic carcinoma cells through mitochondrion pathway.

[Key words] pancreatic neoplasms; P53 up-regulate modulator of apoptosis (PUMA); apoptosis; mitochondrion

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 353-357]

P53 正向凋亡调节因子基因(P53 up-regulate modulator of apoptosis, PUMA)是 P53 下游的促凋亡基因, 其促凋亡作用是通过线粒体途径进行的。本课题前期研究发现^[14], PUMA 明显抑制体内外胰腺癌细胞增殖, 并能增强胰腺癌细胞对放、化疗的敏感性, 但其作用机制未见文献报道。本实验旨在研究 PUMA 体外对

[基金项目] 卫生部科学研究基金项目(No. WKJ-2006-01-010)。Supported by the Scientific Research Foundation from Ministry of Health (No. WKJ-2006-01-010)

[作者简介] 莫小恒(1974-), 男, 海南省海口市人, 硕士, 主要从事恶性肿瘤的生物治疗研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: wlsdermyy@163.com

胰腺癌 BxPC-3 细胞株的促凋亡作用, 并探讨其作用机制, 为胰腺癌的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

胰腺癌细胞株 BxPC-3 购自中科院上海细胞所。携 PUMA 重组腺病毒 Ad-PUMA 和 Ad-GFP 由苏州大学第一附属医院赠送。细胞裂解试剂盒购自 Bio Vision 公司, Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒购自上海元象医疗器械有限公司, 硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司, 蛋白质分子量标准购自中国科学院上海生物化学研究所。抗人 PUMA 多克隆抗体与 Bcl-2、Caspase-3、Cytochrome C 多克隆抗体购自 Cell Signals 公司, 抗人 Bax 多克隆抗体、Actin 抗体购自 Santa Cruz 公司, 线粒体和胞浆蛋白分离制备试剂盒、总蛋白提取试剂盒购自北京五洲元业科贸公司。交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)购自博励阳(北京)生物医学技术发展有限公司。

1.2 流式细胞术检测 Ad-PUMA 感染对胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡的影响

将 BxPC-3 细胞按 1×10^6 /孔接种于 24 孔培养板, 培养 24 h 后按 Ad-PUMA 或 Ad-GFP 100 MOI 值感染细胞 6、12、18、24、36、48 h。在不同的时间点收集贴壁细胞。PBS 洗涤细胞 2 次, 收集细胞 (1×10^6)。用 500 μ l 结合缓冲液悬浮细胞。加入 1 μ l Annexin V-EGFP、5 μ l propidium iodide, 混匀。避光室温 5 min, 用流式细胞仪检测细胞的凋亡。

1.3 Western blotting 检测 PUMA、Bax、Bcl-2、Cytochrome C、Caspase-3 蛋白的表达

细胞总蛋白提取: Ad-PUMA 或 Ad-GFP 以 100 MOI 感染 BxPC-3 细胞, 分别于 6、12、18、24、36、48 h 后收集细胞, 加入冷 lysis buffer。冰上操作, 刮下细胞, 与 lysis buffer 一同转移至预冷 Ep 管中, 4 $^{\circ}$ C 振荡 15 min, $14\ 000 \times g$ 、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清蛋白定量(BCA 法)。分装后保存于 -70 $^{\circ}$ C。

Western blotting 检测: SDS-PAGE, 转膜, 按试剂盒说明操作, 检测感染后细胞中 PUMA、Bax、Bcl-2、Cytochrome C、Caspase-3 蛋白的表达。

1.4 Western blotting 检测胰腺癌细胞线粒体和细胞质内 Bax 蛋白的表达

100 MOI 的 Ad-PUMA 感染 BxPC-3 细胞 48 h, 收集细胞, PBS 洗涤后计数。每次提取需要 5×10^7 个细胞, 加入 1.5 ml 冰预冷 mito-cyto buffer 重悬, 将细胞悬液以小容量匀浆器内, 研磨 30~40 次。细胞匀浆物离心, 上清含胞质, 线粒体沉淀管底, 将

上清转移到 Ep 管。洗涤线粒体, 清除管内壁粘连的液体和碎片, 加入 0.2 ml mito-cyto buffer 重悬线粒体沉淀, 离心后重悬线粒体沉淀, 测定蛋白浓度, 立即 -70 $^{\circ}$ C 保存。Western blotting 检测线粒体和细胞质中 Bax 蛋白表达。

1.5 Western blotting 检测胰腺癌细胞中 Bax 寡聚体的表达^[5]

100 MOI 的 Ad-PUMA 感染细胞, 分别在 6、12、24、48 h 收集细胞。细胞沉淀用 PBS 重悬后离心, 用 DSS 交联缓冲液重悬, 室温放置 30 min, 加 Tris-HCl (pH 7.5) 至终浓度 20 mmol/L 以终止交联反应, 室温 15 min, 加入 0.5% NP-40 裂解缓冲液, $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 收取蛋白上清。Bax 寡聚体的 Western blotting 检测方法同上。

2 结果

2.1 Ad-PUMA 感染后胰腺癌细胞中 PUMA 蛋白表达的变化

Western blotting 测定结果发现: 随着时间的延长, PUMA 蛋白表达逐渐增高, 48 h 后表达最明显, 72 h 表达开始下降, 96 h PUMA 蛋白下降较明显。在 BxPC-3 细胞内, 各个时间点 PUMA 相对表达值 (PUMA 灰度/Actin 灰度) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

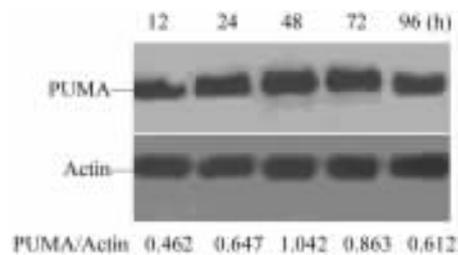


图 1 Western blotting 检测 Ad-PUMA 感染后 BxPC-3 细胞中 PUMA 蛋白的表达

Fig. 1 Expression of PUMA protein in BxPC-3 cells infected with Ad-PUMA as detected by Western blotting

2.2 Ad-PUMA 对 BxPC-3 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示, 随着时间的延长, 细胞凋亡率逐渐增加, 48 h 后细胞凋亡率达到最高值 (60.26%)。细胞的细胞凋亡率与 Ad-PUMA 感染呈明显的时间依赖性(图 2)。

2.3 Ad-PUMA 感染后 BxPC-3 细胞的凋亡率与 PUMA 蛋白表达的关系

感染 Ad-PUMA 后, BxPC-3 细胞的凋亡率与 PUMA 蛋白表达具有明显的相关性, $Y = 0.6974X -$

0.0844, $R^2 = 0.9943$ (图3)。

2.4 Ad-PUMA 感染后细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化

Western blotting 检测 Ad-PUMA 感染后细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达,结果发现,随着时间的延长,PUMA 蛋白表达逐渐增加,Bcl-2 蛋白表达逐渐减少,而 Bax 蛋白表达无明显变化。PUMA 蛋白表达在 48 h 达到最高点,而 Bcl-2 蛋白表达在 48 h 降低到最低点,不同时间点的 PUMA 和 Bcl-2 蛋白表达差异有统计学意义(分别 $P = 0.01, P = 0.0001$)。提示 Ad-PUMA 感染细胞后降低了 Bcl-2 的活性,而 Bax 蛋白总量没有变化($P = 0.060$,图4)。

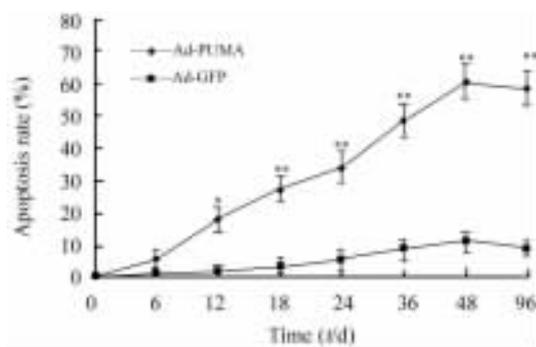


图2 Ad-PUMA 对 BxPC-3 细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of Ad-PUMA on apoptosis of BxPC-3 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ad-GFP

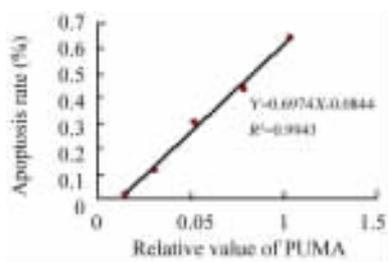


图3 感染 Ad-PUMA 后 BxPC-3 细胞中 PUMA 蛋白表达与凋亡率的关系

Fig.3 Relationship between PUMA protein expression and apoptosis rate of BxPC-3 cells infected with Ad-PUMA

2.5 Ad-PUMA 转染后 BxPC-3 细胞质和线粒体中 Bax 的表达

Western blotting 结果显示:正常细胞的细胞质和线粒体都存在 Bax 蛋白表达,细胞感染 Ad-PUMA 48 h 后,细胞质中的 Bax 几乎完全消失,线粒体中的 Bax 明显增多,说明细胞质中 Bax 转移到线粒体。

结果表明,PUMA 转染细胞后使 Bax 激活而转位于线粒体中(图5)。

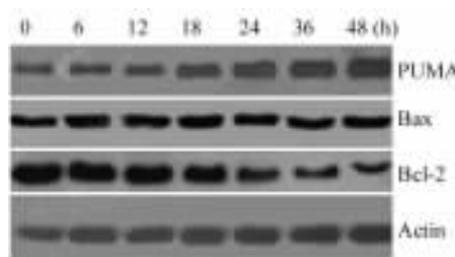


图4 Western blotting 检测 Ad-PUMA 感染后 BxPC-3 细胞中 PUMA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

Fig.4 Expressions of PUMA, Bax and Bcl-2 proteins in BxPC-3 cells infected with Ad-PUMA as detected by Western blotting

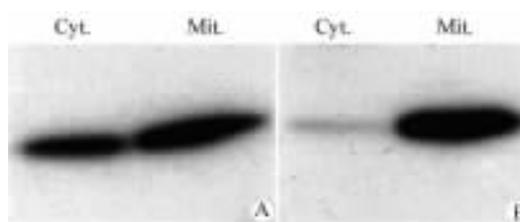


图5 Western blotting 检测 Ad-PUMA 感染后 BxPC-3 细胞中 Bax 在细胞质和线粒体中的表达

Fig.5 Bax expression in cytoplasm and mitochondrion of BxPC-3 cells after infection with Ad-PUMA as detected by Western blotting

A: Control; B: Ad-PUMA

2.6 PUMA 对 Bax 寡聚化的作用

DSS 交联剂处理细胞后 12 h 可以见到 Bax 的二聚体,24 h 可以见到明显的四聚体,并且寡聚化的 Bax 随着感染时间的延长而逐渐增多,感染 48 h 寡聚化最明显,说明 PUMA 是通过诱导 Bax 寡聚化而起作用(图6)。

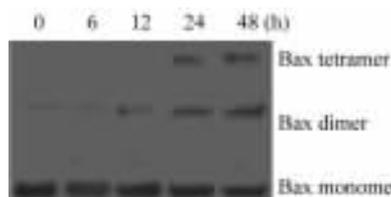


图6 PUMA 诱导 BxPC-3 细胞中 Bax 的寡聚化

Fig.6 PUMA induced Bax oligomerization in BxPC-3 cells

2.7 Western blotting 检测 BxPC-3 细胞中 Cytochrome C 和 Caspase-3 的表达

为研究 PUMA 是否通过 caspase 途径诱导细胞

凋亡, 本实验用 Western blotting 检测 Ad-PUMA 作用后细胞中 Cytochrome C、Caspase-3 的激活片段表达。分析发现, Ad-PUMA 作用细胞后, 12 h 明显可见 Cytochrome C 由线粒体进入细胞质, 24、48 h 细胞质中 Cytochrome C 表达明显增加; 激活的 Caspase-3 在 12 h 开始产生, 48 h 活性最高。实验表明, Cytochrome C 是 PUMA 诱导的关键凋亡因子, 其可激活下游的 Caspase-3, 最终引发凋亡的产生(图 7)。

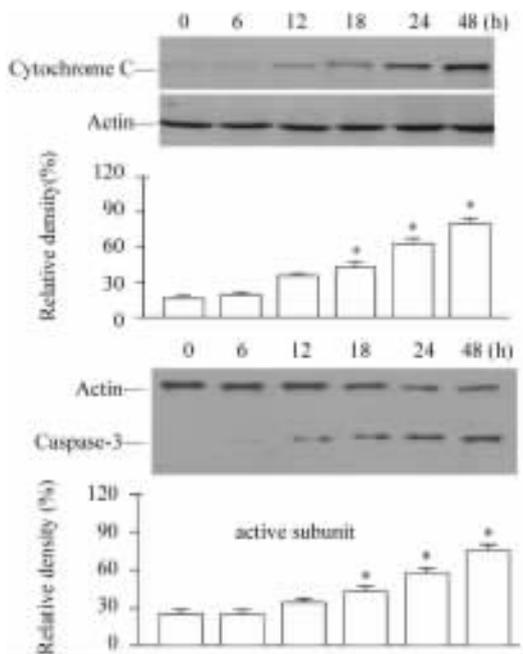


图 7 Ad-PUMA 感染后 BxPC-3 细胞中 Cytochrome C 和 Caspase-3 蛋白的表达

Fig. 7 Expression of Cytochrome C and Caspase-3 protein in BxPC-3 cells infected with Ad-PUMA

* P < 0.05 vs 0 h

3 讨论

细胞凋亡受阻是胰腺癌发生的重要原因^[6-9], 因此靶向阻碍胰腺癌凋亡的基因是胰腺癌治疗的可行措施, 但是迄今为止凋亡的确切机制尚不完全清楚。一般认为凋亡主要包括两个途径, 即细胞表面死亡受体途径和 DNA 损伤因子诱导的线粒体依赖途径^[10-11]。研究发现^[12-15], 线粒体是细胞凋亡最主要的发起者和执行者, 线粒体凋亡通路中的 Bcl-2 家族成员发挥了重要的调节功能^[16-17]。研究^[18-20]揭示, Bcl-2 家族蛋白由抗凋亡和促凋亡成员组成, 这些成员之间通过相互协同作用调节了线粒体结构与功能的稳定性, 并通过控制线粒体促凋亡因子 Cytochrome C 和凋亡诱导因子等的释放而决定细胞的生死。在此过程中, Bcl-2 家族中仅含有 BH3 结构

域的促凋亡蛋白发挥决定性的作用。

本实验将 Ad-PUMA 感染胰腺癌细胞, 随着病毒作用时间的延长, 细胞凋亡越来越明显, 说明 PUMA 具有胰腺癌细胞凋亡促进作用并表现出时间依赖性。同时发现, 随着时间的延长, 感染后细胞内 PUMA 蛋白表达依次增加。同时显示, PUMA 蛋白表达与细胞凋亡率明显相关 ($R^2 = 0.9943$)。

PUMA 通过 BH3 结构域与其他 Bcl-2 家族蛋白相互作用, 诱导 Cytochrome C 释放, 激活 Caspase-9、3 等酶, 引起细胞凋亡^[21-22]。PUMA 诱导的凋亡完全依赖于完整 Bax 的存在^[23-24]。Liu 等^[25]对白血病 k562 细胞研究发现, PUMA-BH3 肽能诱导 Bax 构象改变, 引起 Cytochrome C 释放, 使线粒体膜能降低。研究^[26-27]表明, p73 诱导的凋亡也是通过 PUMA-Bax-Cytochrome C 这一路径完成, 显示了 Bax 在 PUMA 诱导细胞凋亡中的主导地位。通过同源重组敲除 Bax 基因的 HCT116 细胞能完全抵制 PUMA 引起的凋亡作用, 即使它们仍表达 Bax。在 Bax 敲除细胞中与凋亡有关的生化改变如线粒体外膜的去极化和 Caspase 的激活都彻底消失了。与亲本细胞相比, 在感染 Ad-PUMA 后 Bax 敲除细胞也形成了更多的克隆。Bcl-X(L) 在抑制 PUMA 诱导的凋亡尤其在多柔比星所致的依赖 PUMA 的凋亡过程中发挥抗凋亡作用。

本研究中, 细胞内 Bax 表达总量并不随着 PUMA 表达的增强而改变; 虽然细胞内 Bax 蛋白总量没有明显变化, 但细胞质内 Bax 表达减少, 线粒体内 Bax 表达增多, 提示细胞质内的 Bax 几乎全部转移到线粒体中。并且, 随着 PUMA 表达的增强, Bax 构象发生明显改变, 寡聚体逐渐增多, 说明 PUMA 通过活化 Bax 发生作用。过去研究认为, Bcl-2 在 PUMA 诱导凋亡过程中并不起重要作用, 但现在有报道认为, Bcl-2 在 PUMA 有的的凋亡过程中起关键性作用^[28]。本研究中, 随着 PUMA 表达逐渐增加, 细胞内 Bcl-2 蛋白表达逐渐减少, 活性逐渐下降。Bcl-2 变化与细胞凋亡变化规律相反, 提示 Bcl-2 在 PUMA 诱导的凋亡过程中也起很重要的作用。PUMA 通过与 Bcl-2 结合, 一方面抑制了 Bcl-2 的活性, 拮抗了 Bcl-2 的抗凋亡作用, 另一方面激活 Bax, 导致 Bax 移位到线粒体并形成同源二聚体蛋白通道, 这种插入到线粒体外膜的 Bax 通道足以促进 Cytochrome C 的释放, 接着导致 Caspase 的激活和细胞凋亡, 本研究与 Luo^[23]和 Liu^[25]等的研究结果相一致。

Cytochrome C 是重要的线粒体凋亡诱导蛋白, 研究^[29]显示, Bcl-2 家族蛋白是 Cytochrome C 释放

的调节子,过度表达 Bcl-2、Bcl-XL 可阻断各种凋亡刺激引发的 Cytochrome C 的释放,而凋亡诱导蛋白 Bax 和 Bid 促进 Cytochrome C 释放。骨骼肌星状细胞研究发现^[30],干扰 *PUMA* 基因表达后,Cytochrome C 的释放被抑制;Caspase-3、9 的活化受到阻滞,最终导致细胞凋亡的抑制,恢复 *PUMA* 的功能后,细胞凋亡也随着被恢复。本研究发现,随着细胞内 *PUMA* 表达的增多,Cytochrome C 的释放逐渐增多,Procaspase-3 的活性片段以及活性越来越强,并在 36~48 h 达到高峰,其变化规律符合 FCM 的检测结果。综上所述,*PUMA* 基因明显地促进胰腺癌细胞凋亡,其机制很有可能是通过线粒体途径发挥作用。

[参 考 文 献]

- [1] 张克君,李德春,朱新国. 外源野生型正向细胞凋亡调控因子基因对人胰腺癌细胞生长的作用 [J]. 中华消化杂志, 2006, 26(11): 778-779.
- [2] 张克君,李德春. p53 正向凋亡调节因子(*PUMA*)重组腺病毒载体的构建及对胰腺癌细胞增殖的抑制作用 [J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2009, 28(1): 126-128.
- [3] 张克君,李德春,朱东明. *PUMA* 基因转染胰腺癌 AsPC-1 细胞增强对 5-FU 致凋亡的敏感性 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(2): 139-141.
- [4] 张克君,李德春,朱东明. 重组腺病毒介导野生型 *PUMA* 基因对胰腺癌细胞的放射增敏作用 [J]. 中国辐射卫生, 2008, 17(1): 47-48.
- [5] Ozaki Y, Tatebe S, Ikeguchi M. Molecular mechanism in pathogenesis of pancreatic neoplasms: p-Akt, PTEN [J]. Nippon Rinsho, 2006, 64(12): 41-43.
- [6] Welsch T, Kleeff J, Friess H. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges [J]. Curr Mol Med, 2007, 7(5): 504-521.
- [7] Adrian TE. Inhibition of pancreatic cancer cell growth [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(19-20): 2512-2521.
- [8] Mimeault M, Brand RE, Sasson AA, et al. Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies [J]. Pancreas, 2005, 31(4): 301-316.
- [9] Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer [J]. Mol Cancer, 2003, 7(2): 256-259.
- [10] Stepień A, Izdebska M, Grzanka A. The types of cell death [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2007, 61: 420-428.
- [11] Gradzka I. Mechanisms and regulation of the programmed cell death [J]. Postepy Biochem, 2006, 52(2): 157-165.
- [12] Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, et al. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores [J]. Braz J Med Biol Res, 2007, 40(8): 1011-1124.
- [13] Karunakaran D, Joseph J, Kumar TR. Cell growth regulation [J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 5(5): 245-268.
- [14] Kakkar P, Singh BK. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 305(1-2): 235-253.
- [15] Armstrong JS. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death [J]. Mitochondrion, 2006, 6(5): 225-234.
- [16] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 29(21): C45-51.
- [17] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. Oncogene, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [18] Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(24): 7254-7263.
- [19] Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program [J]? Apoptosis, 2007, 12(5): 869-876.
- [20] Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8): 1378-1386.
- [21] Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer [J]. Gut, 2007, 56(8): 1134-1152.
- [22] Kelley JR, Fraser MM, Hubbard JM. CaSm antisense gene therapy: a novel approach for the treatment of pancreatic cancer [J]. Anti-cancer Res, 2003, 23(3A): 2007-2013.
- [23] Luo X, He Q, Huang Y, et al. Transcriptional upregulation of *PUMA* modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis via Bax activation [J]. Cell Death Differ, 2005, 12(10): 1310-1318.
- [24] Hao H, Dong Y, Bowling MT, E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via *PUMA* up-regulation and Bax translocation [J]. BMC Cancer, 2007, 30(7): 24-32.
- [25] Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for *PUMA*-mediated apoptosis in human leukemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(3): 956-962.
- [26] Melino G, Bernassola F, Ranalli M. p73 Induces apoptosis via *PUMA* transactivation and Bax mitochondrial translocation [J]. J Biol Chem, 2004, 279(9): 8076-8083.
- [27] Simões-Wüst AP, Sigrist B, Belyanskaya L, et al. p73 antisense activates *PUMA* and induces apoptosis in neuroblastoma cells [J]. J Neurooncol, 2005, 72(1): 29-34.
- [28] Yee KS, Vousden KH. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of *PUMA* [J]. Apoptosis, 2008, 13(1): 87-95.
- [29] Häcker G, Weber A. BH3-only proteins trigger Cytochrome C release, but how [J]? Arch Biochem Biophys, 2007, 462(2): 150-155.
- [30] Shaltouki A, Freer M, Mei Y, et al. Increased expression of the pro-apoptotic Bcl(2) family member *PUMA* is required for mitochondrial release of Cytochrome C and the apoptosis associated with skeletal myoblast differentiation [J]. Apoptosis, 2007, 12(12): 2143-2121.

[收稿日期] 2009-05-07

[修回日期] 2009-06-25

[本文编辑] 王莹