

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.006

## 藻蓝蛋白协同全反式维甲酸影响人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和凋亡

李冰, 杨帆, 吕丛仪, 杨鹏, 刘媛, 李仁飞( 青岛大学医学院 生物学教研室, 山东 青岛 266021 )

**[摘要]** **目的:**探讨全反式维甲酸(all-transretinoic acid, ATRA)和钝顶螺旋藻藻蓝蛋白(C-phycoeyanin, C-PC)联合用药对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响及其诱导细胞凋亡可能的分子机制。**方法:**实验分4组:对照组, C-PC组, ATRA组, C-PC + ATRA联合用药组。MTT法检测 ATRA 和 C-PC 单独及联合用药对 HeLa 细胞增殖的影响并计算它们的  $IC_{50}$ , TUNEL 法检测单独及联合用药后 HeLa 细胞凋亡情况, 免疫组化法检测 Bcl-2 的表达, Western blotting 法检测 Caspase-3 的表达。**结果:**ATRA 和 C-PC 均具有抑制 HeLa 细胞增殖的作用,  $IC_{50}$  分别为  $(0.158 \pm 0.036)$  mmol/L 和  $(192.75 \pm 5.79)$   $\mu$ g/L。采用不同浓度的 ATRA 分别联合 40 或 80  $\mu$ g/L C-PC 处理 HeLa 细胞, ATRA 的  $IC_{50}$  分别为  $(0.095 \pm 0.007)$  mmol/L 和  $(0.062 \pm 0.004)$  mmol/L, 明显低于 ATRA 单独用药时的  $IC_{50}$  值; 当达到相同的抑制率时, 联合 C-PC 用药可以显著降低 ATRA 的使用剂量。与对照组相比, 两种药物单独用药增加了 HeLa 细胞凋亡水平 ( $IOD_{C-PC} = 63.12$ ,  $IOD_{ATRA} = 59.98$ ,  $P < 0.05$ ); 当两种药物联合用药时, 凋亡水平增加更加显著 ( $IOD = 89.52$ ,  $P < 0.01$ )。两药联合使用后 HeLa 细胞显著下调 Bcl-2 和上调 Caspase-3 的表达水平 (均  $P < 0.01$ )。**结论:**ATRA 和 C-PC 联合用药可抑制 HeLa 细胞增殖和诱导其凋亡, 其分子机制可能是通过抑制 Bcl-2 表达、促进 Caspase-3 表达来实现的。

**[关键词]** 全反式维甲酸; 藻蓝蛋白; 宫颈癌; HeLa 细胞; 凋亡; 增殖抑制

**[中图分类号]** R737.33; R730.5; R979.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)05-0516-05

## Effects of C-phycoeyanin combined with all-trans retinoic acid on cervical cancer cells proliferation and apoptosis

Li Bing, Yang Fan, Lv Congyi, Yang Peng, Liu Yuan, Li Renfei( Department of Biology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong, China )

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of all-transretinoic acid ( ATRA ) and C-phycoeyanin ( C-PC ), either each alone or two in combination on cervical cancer cell growth and apoptosis *in vitro*. **Methods:** Immortalized human cervical cancer HeLa cells were treated with ATRA and C-CP, either each at various concentrations or two in various dose combinations. After treatment for 48 h, cell viability was assessed by MTT assay, apoptosis by TUNEL assay, and changes in Caspase-3 and Bcl-2 protein contents by Western blotting and immunohistochemistry staining, respectively. **Results:** C-PC and ATRA each alone significantly inhibited the growth of HeLa cells; and  $IC_{50}$  was  $0.158 \pm 0.036$  mmol/L for C-CP and  $192.75 \pm 5.79$   $\mu$ g/L for ATRA ( $P < 0.05$ ). When ATRA was combined with C-PC, the  $IC_{50}$  was significantly lower than that when ATRA was used alone. Compared with non-treatment control, C-PC and ATRA each alone induced significant HeLa cell apoptosis ( $P < 0.05$ ), and in the apoptotic effect was more pronounced when C-PC and ATRA were used together ( $P < 0.01$ ). ATRA and C-PC each alone significantly decreased Bcl-2 protein content ( $P < 0.01$ ) but significantly increased Caspase-3 protein content ( $P < 0.01$ ) in HeLa cells, and both changes became more significant when ATRA and C-CP were used together ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** C-PC combined with ATRA may induce cervical cancer cell

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目( No. 81471546, No. 81001346 );山东省医药卫生科技发展计划项目( No. 2011HZ023 );青岛市公共领域科技支撑计划项目( No. 2012-1-3-5(4)-nsh )。Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 81471546, No. 81001346 ), the Medical Health Science and Technology Development Plan of Shandong Province ( No. 2011HZ023 ), and the Science and Technology Development Plan of Qingdao City Public Realm ( No. 2012-1-3-5(4)-nsh )

**[作者简介]** 李冰( 1980 - ), 女, 山东东营市人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤生物治疗研究

**[通信作者]** 李冰( Li Bing, corresponding author ), E-mail: libing\_516619@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1510.006.html>

apoptosis by down-regulation of *Bcl-2* gene and up-regulation of *Caspase-3* gene more effectively than each alone.

[ **Key words** ] all-transretinoic acid; C-phycoyanin; cervical cancer; HeLa cell; apoptosis; proliferation inhibition

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 516-520 ]

钝顶螺旋藻藻蓝蛋白(C-phycoyanin, C-PC)是一类普遍存在于螺旋藻中的光合辅助色素蛋白,在螺旋藻中的含量高达10%~20%。C-PC具有抗氧化<sup>[1]</sup>、抗肿瘤<sup>[2-3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>和清除自由基<sup>[5]</sup>等作用,被广泛用于保健食品、化妆品和染料等领域。早期研究<sup>[2,6]</sup>发现,C-PC在体内和体外均具有抑制癌细胞增殖的作用。

诱导分化治疗是肿瘤化学治疗的一个重要领域。维甲酸类化合物是被临床应用最为广泛的分化诱导剂<sup>[7]</sup>,其中全反式维甲酸(all-transretinoic acid, ATRA)是维生素A的衍生物,在急性早幼粒细胞性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的治疗中起到重要作用;ATRA对多种肿瘤细胞的生长均具有抑制作用。然而,由于ATRA的毒性作用<sup>[8]</sup>,使得该药物的临床使用受到很大的限制。为了解决这一问题,有学者通过将多种化疗药物如三氧化二砷( $As_2O_3$ )<sup>[9]</sup>、氟达拉滨(fludarabine)<sup>[10]</sup>等与ATRA联合用药来减轻其毒性作用。基于C-PC的抗肿瘤和无毒性作用的特点,本实验中将C-PC与ATRA联合用药,观察其是否可以降低ATRA的用药剂量达到减毒的功效,并探讨联合应用对宫颈癌HeLa细胞增殖和凋亡的影响,揭示其抗肿瘤作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人宫颈癌HeLa细胞株由青岛大学医学院附属医院惠赠于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,37℃ 5% CO<sub>2</sub>条件下常规培养传代。C-PC购于中国海洋大学,ATRA购自Sigma公司,MTT购自北京Solarbio科技有限公司,生物素化兔抗人Bcl-2抗体、Caspase-3抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司,细胞凋亡检测试剂盒、DAB染色试剂盒和免疫组化染色试剂盒均购于武汉博士德生物公司。C-PC按照常规方法提取<sup>[11]</sup>,溶于PBS中-20℃保存备用。ATRA 100 mg溶于33.3 ml乙醇中配成10 mmol/L母液-20℃保存备用。

### 1.2 MTT法检测 ATAR 和 C-PC 单独及联合用药对 HeLa 细胞增殖抑制的 IC<sub>50</sub>

取对数生长期HeLa细胞接种96孔培养板中,分为三组:ATAR组(ATAR 0、0.05、0.1、0.15、0.02、0.25 mmol/L)、C-PC组(C-PC 0、20、40、80、

160 μg/L)和 ATRA + C-PC(C-PC 固定为 40 或 80 μg/L, ATRA 0、0.05、0.075、0.1、0.15、0.2、0.25 mmol/L)组,每组 5 个平行孔。每组加入不同浓度的药物处理 48 h,实验终止前加入 MTT 20 μl,弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,震荡 10 min。酶标仪于 490 nm 处检测光密度( $D_{490}$ )。计算三组细胞增殖的抑制率以及单独和联合用药的半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值。取 ATRA 和 C-PC 单药的 1/2 IC<sub>50</sub> 作为后续用药剂量,联合用药组取两单药 1/2 IC<sub>50</sub> 之联合。

### 1.3 TUNEL 法检测 ATAR 和 C-PC 单独及联合用药对 HeLa 细胞凋亡的影响

实验分四组:(1)无药物处理对照组;(2)C-PC组;(3)ATRA组;(4)C-PC联合ATRA组。药物处理后4组细胞爬片浸入3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中室温处理10 min。1:200蛋白酶K 37℃消化10 min,每片滴加标记缓冲液20 μl和标记液20 μl,37℃ 2 h,TBS洗3次,每次2 min。滴加1:100生物素化抗地高辛50 μl/片,37℃ 30 min,TBS洗3次,每次2 min。滴加1:100 SABC 50 μl/片,37℃ 30 min,TBS洗4次,每次5 min。DAB显色。显微镜下观察,拍照。用IPP软件分析,以累积光密度(integrated optical density, IOD)作为凋亡水平评判指标。

### 1.4 免疫组化法检测 HeLa 细胞 Bcl-2 蛋白的表达

爬片经药物处理后,TBS洗3次,每次2 min。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温处理10 min,水洗,微波抗原修复。5% BSA封闭液封闭20 min,滴加适当稀释的一抗37℃ 2 h,TBS洗3次,每次2 min。滴加生物素化山羊抗兔二抗,37℃ 20 min,TBS洗3次,每次2 min。滴加试剂SABC,37℃ 20 min,TBS洗4次,每次5 min。DAB显色,显微镜下观察,拍照。用IPP软件分析,以IOD值作为Bcl-2量化指标。

### 1.5 Western blotting 检测 HeLa 细胞 Caspase-3 蛋白的表达

药物处理后离心收集细胞,冰上裂解2 h,离心取上清,测蛋白浓度。SDS-PAGE分离蛋白后转移至PVDF膜上,封闭2 h。分别加入兔抗人Caspase-3和兔抗人β-actin的一抗,4℃过夜。辣根过氧化物酶标记二抗孵育2 h。化学发光显色。将胶片扫描,用Image J图像软件测定各条带的灰度值。

### 1.6 统计分析

采用SPSS 12.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ATRA 与 C-PC 单独及联合用药均明显抑制 HeLa 细胞的增殖

MTT 法检测结果(图 1)显示,ATRA 和 C-PC 均有抑制 HeLa 细胞增殖的作用,两者单独用药的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别为( $0.158 \pm 0.036$ )和( $192.75 \pm 5.79$ ) $\mu\text{g/L}$ 。

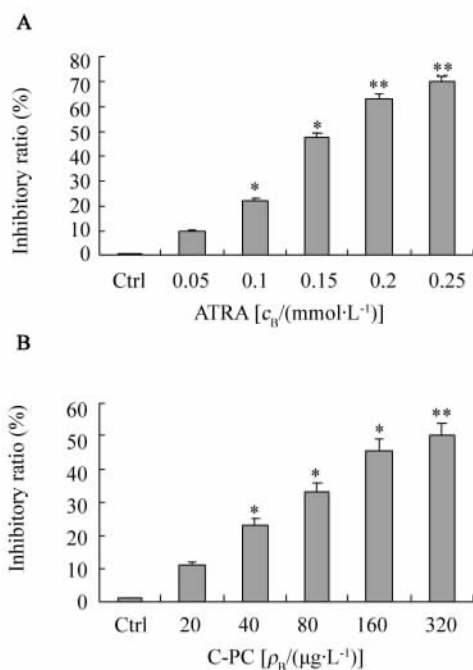


图 1 ATRA( A)或 C-PC( B)对 HeLa 细胞增殖的抑制率  
Fig. 1 Proliferation inhibitory ratio of HeLa cells treated with ATRA ( A) or C-PC ( B)  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl

采用不同浓度的 ATRA(图 2)联合 40  $\mu\text{g/L}$  或 80  $\mu\text{g/L}$  C-PC 作用,ATRA 的半数抑制浓度  $IC_{50}$  分别为( $0.095 \pm 0.007$ )和( $0.062 \pm 0.004$ )mmol/L,明显低于 ATRA 单独用药时的  $IC_{50}$  值。并且在达到相同的抑制效应时,C-PC 浓度越高,ATRA 浓度越低。

### 2.2 C-PC 和 ATRA 单独及联合用药可诱导 HeLa 细胞的凋亡

本实验采用 TUNEL 法检测两种药物单独及联合用药后细胞的凋亡水平,凋亡细胞被染成棕褐色,颜色越深 IOD 值越高,说明凋亡程度越大。结果(图 3)显示,与对照组相比,两种药物单独用药时都

可促进 HeLa 细胞凋亡程度[ ( IOD( C-PC ) = 63. 12, IOD( ATRA ) = 59. 98,与对照组相比均  $P < 0.05$  ]。当两种药物联合用药时,凋亡程度增加更加显著 ( IOD = 89. 52,与对照组比  $P < 0.01$  )。结果说明,两种药物联合用药可更显著地诱导细胞凋亡。

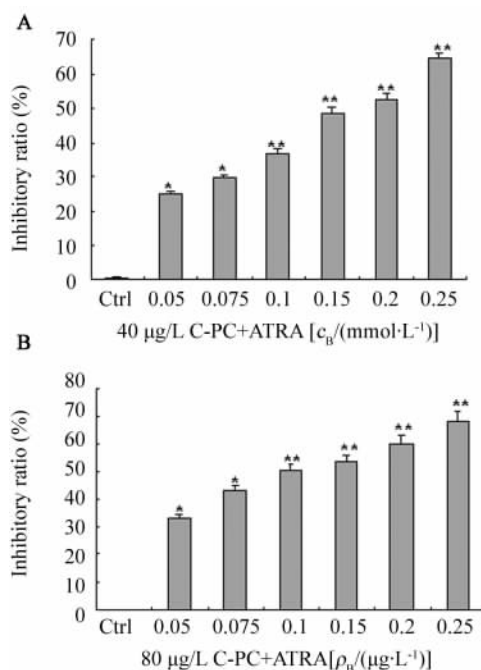


图 2 C-PC 联合 ATRA 对 HeLa 细胞的抑制率  
Fig.2 Proliferation inhibitory ratio of HeLa cells treated with combination of C-PC and ATRA

A: HeLa cells were treated with 40  $\mu\text{g/L}$  C-PC and different concentration of ATRA; B: HeLa cells were treated with C-PC at 80  $\mu\text{g/L}$  and different concentration of ATRA  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl group

### 2.3 C-PC 和 ATRA 可协同抑制 HeLa 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达

免疫组化法检测结果(图 4)显示,与对照组相比,C-PC 和 ATRA 单独处理组 Bcl-2 的表达水平较低( $P < 0.05$ ),当两者联合用药时,Bcl-2 的表达水平更低( IOD = 18. 91,  $P < 0.01$  )。表明两种药物都可抑制 HeLa 细胞 Bcl-2 蛋白的表达,联合用药时抑制作用更为明显。

### 2.4 C-PC 和 ATRA 可协同促进 HeLa 细胞 caspase-3 的表达

通过 Western blotting 的方法检测用药前后 HeLa 细胞 caspase-3 的表达情况,结果(图 5)显示,与对照组相比,C-PC 处理组与 ATRA 处理组 caspase-3 的表达量均有明显升高,分别为 0. 529 和

0.491 ( $P < 0.05$ ); 而联合用药组 caspase-3 的表达量为 0.824, 又显著高于单独用药组 ( $P < 0.01$ )。结果表明, 两种药物单独使用均可促进 HeLa 细胞 caspase-3 的表达水平, 两者联合用药时促进作用更为显著。

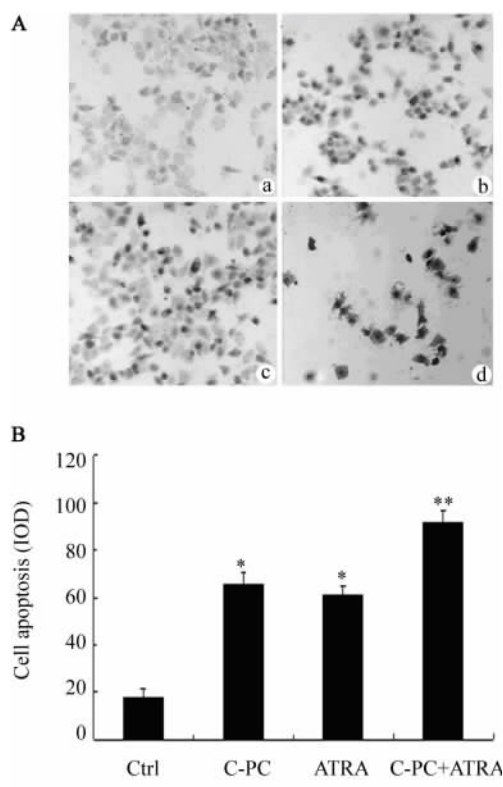


图3 C-PC 和 ATRA 单独或联合作用诱导 HeLa 细胞的凋亡

Fig. 3 Apoptosis analysis of HeLa cells induced by single C-PC or ATRA and by C-PC combined with ATRA

A: Photos of TUNEL ( $\times 200$ ); B: IOD value of each group

a: Ctrl group; b: C-PC treated group;

c: ATRA treated group; d: C-PC + ATRA treated group

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl group

### 3 讨论

肿瘤是一类细胞增殖和分化异常的疾病, 也是细胞凋亡异常的疾病。化疗是临床上治疗肿瘤的主要手段之一, 然而, 化疗药物由于毒副作用大无法进行太大剂量的使用, 从而限制了其应用<sup>[12]</sup>。因此, 探寻一种合适的药物组合, 最大限度地降低化疗药物的毒副作用, 是目前肿瘤治疗研究的重点。

ATRA 属于维生素 A 的衍生物, 在肿瘤的治疗过程中能够抑制肿瘤细胞的增殖, 促进细胞分化和凋亡<sup>[13]</sup>。在临床上, ATRA 主要用于 APL 的治疗。但是 ATRA 抗肿瘤的作用机制目前尚不十分明

确<sup>[14]</sup>。此外, 随着 ATRA 治疗 APL 耐药性的产生, 特别对复发的 APL 再诱导治疗的失败, 使得人们开始探寻该药物潜在的新的功能。在本课题组前期研究中, 发现 C-PC 在体外和体内均具有抗肿瘤作用, 并且无毒副作用, 因此在不久的将来 C-PC 很有可能成为新型的抗肿瘤辅助药物应用于临床。本实验中将 C-PC 与 ATRA 联合用药, 筛选出两种药物单独使用的最佳作用浓度, 并且探索两种药物联合用药诱导 HeLa 细胞凋亡的分子机制。

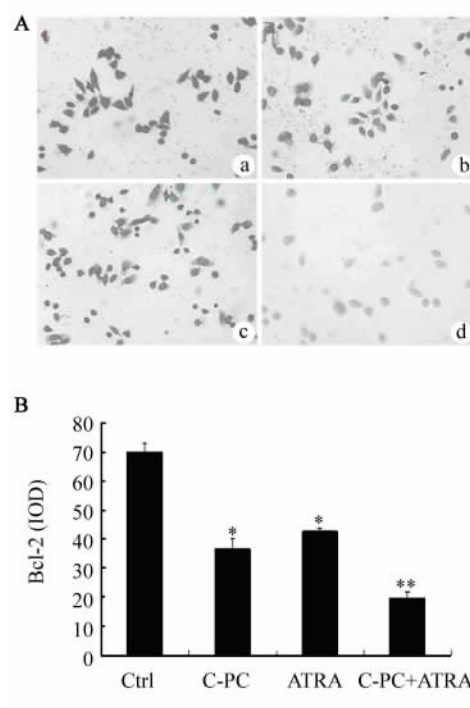


图4 C-PC 和 ATRA 对 HeLa 细胞中 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of C-PC and ATRA on Bcl-2 protein expression in HeLa cells

A: Photos of immunohistochemical staining ( $\times 200$ );

B: IOD values. a: Ctrl group; b: C-PC treated group;

c: ATRA treated group; d: C-PC + ATRA treated group

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl group

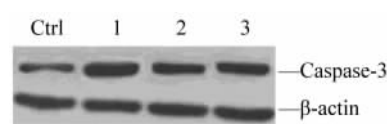


图5 Western blotting 检测 HeLas 细胞中 caspase-3 表达量

Fig. 5 Caspase-3 expression in HeLa cells detected by Western blotting

Ctrl: Control group; 1: C-PC treated group;

2: ATRA treated group; 3: C-PC + ATRA treated group

MTT 结果表明,两种药物单独作用时均具有抑制 HeLa 细胞增殖的作用,且存在浓度剂量效应。联合用药时,在达到相同抑制率的情况下,可通过联合 C-PC 的方法来降低 ATRA 的使用剂量,从而达到降低毒副作用的目的。肿瘤是一类细胞凋亡异常的疾病。研究表明,细胞凋亡信号转导途径是细胞发生凋亡的关键,在此过程中,Caspase 蛋白酶家族起到关键作用<sup>[15-16]</sup>。Caspase 依赖性细胞凋亡途径包括死亡受体引起的外源途径和由线粒体引起的内源途径两大类。这两类凋亡途径均是通过最终活化 Caspase-3 而使细胞发生凋亡的。Bcl-2 蛋白家族与肿瘤细胞凋亡的调控有密切关系,包括 Bcl-2 和 Bax 两个亚族。其中 Bcl-2 亚族具有抑制细胞凋亡的作用<sup>[17-18]</sup>。在线粒体引起的内源凋亡途径中,Bcl-2 可抑制线粒体膜的通透性,阻止凋亡因子 Cyt C 的释放,从而对凋亡起到抑制作用。

本研究利用 TUNEL 法检测两种药物单独及联合用药前后 HeLa 细胞的凋亡情况,发现单独用药可诱导 HeLa 细胞发生凋亡,联合用药时,凋亡更为显著。进一步研究发现,两种药物单独使用可抑制 Bcl-2 和促进 Caspase-3 的表达,联合用药时,该抑制与促进作用更为明显。由此推测,两种药物均具有诱导 HeLa 细胞发生凋亡的作用,联合用药可显著增强对肿瘤细胞凋亡的促进作用。因此,两种药物诱导 HeLa 细胞发生凋亡的分子机制可能是通过抑制 Bcl-2 的表达、促进 Caspase-3 的表达来实现,但是否与起始 Caspase 的活化有关,尚需进一步研究。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Thangam R, Suresh V, Asenath Princy W, et al. C-Phycocyanin from *oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro anti-proliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest [ J ]. *Food Chem*, 2013, 140( 1/2 ): 262-272.
- [ 2 ] Li B, Chu X, Gao M, et al. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin [ J ]. *Acta Biochim Biophys Sin ( Shanghai )*, 2010, 42( 1 ): 80-89.
- [ 3 ] Gupta NK, Gupta KP. Effects of C-Phycocyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate [ J ]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 34( 3 ): 941-948.
- [ 4 ] Cherg SC, Cheng SN, Tam A, et al. Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [ J ]. *Life Sci*, 2007, 81( 19/20 ): 1431-1435.
- [ 5 ] Bhat VB, Madyastha KM. C-phycocyanin: A potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275( 1 ): 20-25.
- [ 6 ] Saini MK, Sanyal SN. Targeting angiogenic pathway for chemoprevention of experimental colon cancer using C-phycocyanin as cyclooxygenase-2 inhibitor [ J ]. *Biochem Cell Biol*, 2014, 92( 3 ): 206-218.
- [ 7 ] Congleton J, Jiang H, Malavasi F, et al. ATRA-induced HL-60 myeloid leukemia cell differentiation depends on the CD38 cytosolic tail needed for membrane localization, but CD38 enzymatic activity is unnecessary [ J ]. *Exp Cell Res*, 2011, 317( 1 ): 910-919.
- [ 8 ] Siddikuzzaman, Grace VM. Inhibition of metastatic lung cancer in C57BL/6 mice by liposome encapsulated all trans retinoic acid ( ATRA ) [ J ]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14( 4 ): 570-579.
- [ 9 ] Zhao W, Wang H, Wang X, et al. Effects of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on the hemostatic disturbance associated with acute promyelocytic leukemia [ J ]. *Thromb Res*, 2001, 102( 3 ): 197-204.
- [ 10 ] Montillo M, Ricci F, Tedeschi A, et al. Twice daily fludarabine/ Ara-C associated to idarubicin, G-CSF and ATRA is an effective salvage regimen in non-promyelocytic acute myeloid leukemia [ J ]. *Leuk Res*, 2009, 33( 8 ): 1072- 1078.
- [ 11 ] 李冰. 纯顶螺旋藻/节旋藻藻蓝蛋白的提取纯化及抗肿瘤免疫效应研究 [ D ]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [ 12 ] Pathan RA, Singh BK, Pillai KK, et al. Naproxen aggravates doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats [ J ]. *Indian J Pharmacol*, 2010, 42( 1 ): 44-49.
- [ 13 ] Xiang L, Dong W, Wang R, et al. All-trans retinoic acid enhances the effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on p16INK4a demethylation, and the two drugs synergistically activate retinoic acid receptor  $\beta$  gene expression in the human erythroleukemia K562 cell line [ J ]. *Oncol Lett*, 2014, 8( 1 ): 117-122.
- [ 14 ] Marzinke MA, Clagett-Dame M. The all-trans retinoic acid ( ATRA )-regulated gene Calmin ( Clmn ) regulates cell cycle exit and neurite outgrowth in murine neuroblastoma ( Neuro2a ) cells [ J ]. *Exp Cell Res*, 2012, 318( 1 ): 85-93.
- [ 15 ] 岳原亦,张扬,张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡 [ J ]. *中国医疗前沿*, 2011, 6( 6 ): 25-26.
- [ 16 ] Yu Z, Zhang C, Wang H, et al. Multidrug resistance-associated protein 3 confers resistance to chemoradiotherapy for rectal cancer by regulating reactive oxygen species and caspase-3-dependent apoptotic pathway [ J ]. *Cancer Lett*, 2014, 353( 2 ): 182-193.
- [ 17 ] Heiser D, Labi V, Erlacher M, et al. The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease [ J ]. *Exp Gerontol*, 2004, 39( 8 ): 1125-1135.
- [ 18 ] Yan W, Suominen J, Samson M, et al. Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 165( 1/2 ): 115-129.

[ 收稿日期 ] 2014 - 04 - 30

[ 修回日期 ] 2014 - 07 - 10

[ 本文编辑 ] 阮芳铭