

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.007

Bestrophin 3 高表达促进人肝癌细胞株 HepG2 的凋亡

王雷¹, 王煜霞², 姬明丽³, 薛会朝¹(1. 新乡医学院第一附属医院 普外科, 河南 新乡 453100; 2. 新乡医学院 基础医学院 病理生理学教研室, 河南 新乡 453003; 3. 新乡医学院 基础医学院 生理学教研室, 河南 新乡 453003)

[摘要] **目的:** 研究 Bestrophin 3 高表达对人肝癌细胞株 HepG2 凋亡能力的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法:** 将 Bestrophin 3 腺病毒以感染复数(multiplicity of infection, MOI)10、20、40、80 转染 HepG2 细胞株, Western blotting 检测转染细胞内 Bestrophin 3 的表达, 确定最佳 MOI 值。设对照组(未转染病毒)、LacZ 组(转染携带 LacZ 的对照腺病毒载体)、Ad-Best3 组(以最佳 MOI 值转染 Bestrophin 3 腺病毒), CCK-8 法和流式细胞术分别检测 Bestrophin 3 过表达对 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响, Western blotting 检测 Bestrophin 3 过表达对 HepG2 细胞内 Bcl-2、Bax 以及细胞色素 C 表达的影响, JC-1 染色观察 Bestrophin 3 过表达对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响。**结果:** Bestrophin 3 腺病毒转染 HepG2 细胞的最佳 MOI 为 40, 转染后细胞过表达 Bestrophin 3。Ad-Best3 组的细胞存活率显著低于对照组和 LacZ 组[(79.37 ± 1.76)% vs (98.67 ± 3.02)%、(99.67 ± 3.25)% , 均 $P < 0.05$], 而其细胞凋亡率显著升高[(29.47 ± 2.37)% vs (5.47 ± 0.37)%、(4.95 ± 0.44)% , 均 $P < 0.05$]。Ad-Best3 组 HepG2 细胞内 Bcl-2 的蛋白表达显著减少, Bax 的蛋白表达显著增加, 导致 Bcl-2/Bax 比值显著降低(0.32 ± 0.047 vs 1.00 ± 0.00, $P < 0.05$); Ad-Best3 组 HepG2 细胞的线粒体膜电位显著降低[(0.64 ± 0.09)% vs (1.00 ± 0.00)% , $P < 0.05$], 同时线粒体中细胞色素 C 明显减少($P < 0.05$), 而细胞质中细胞色素 C 水平显著升高($P < 0.05$)。**结论:** 过表达 Bestrophin 3 可能通过促使线粒体释放细胞色素 C 从而促进肝癌细胞株 HepG2 的凋亡。

[关键词] Bestrophin 3; 肝癌; HepG2 细胞; 凋亡; 细胞色素 c

[中图分类号] R735.7; R730.59

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)04-0448-06

Enforced expression of Bestrophin 3 promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cell HepG2

Wang Lei¹, Wang Yuxia², Ji Mingli³, Xue Huichao¹(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, Henan, China; 2. Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China; 3. Department of Physiology, College of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Bestrophin 3 on the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell HepG2. **Methods:** HepG2 cells were transfected with various multiplicity of infection (MOI = 10, 20, 40 and 80) of adenovirus expressing Bestrophin 3, LacZ, or control. The infection efficiency of the adenovirus was measured by Western blotting. Proliferation and apoptosis rates of the transfected cells were measured with CCK-8 assay and flow cytometry. Effects of Bestrophin 3 on the expression of Bcl-2 and Bax and the release of cytochrome C (Cyt C) were determined by using immunoblotting. Influence of Bestrophin 3 overexpression on mitochondrial membrane potential was assessed by JC-1 and fluorescence microscopy. **Results:** The expression of Bestrophin 3 reached the maximal level after adenoviral infection at 40 MOI. Compared with the control and LacZ-expressing groups, the cell viability of the Bestrophin 3-expressing group was significantly reduced [(79.37 ± 1.76)% vs (98.67 ± 3.02)% and (99.67 ± 3.25)% , $P < 0.05$], whereas the apoptosis rate was significantly increased [(29.47 ± 2.37)% vs (5.47 ± 0.37)% and (4.95 ± 0.44)% , $P < 0.05$]. In the cells infected with the adenovirus expressing Bestrophin 3, there were decreased level of Bcl-

[基金项目] 河南省教育厅自然科学资助项目(No. 13A320854)。Project supported by the Natural Science Foundation from the Education Bureau of Henan Province(No. 13A320854)

[作者简介] 王雷(1977 -), 男, 河南唐河人, 硕士, 主治医师, 主要从事肝癌多药耐药治疗的研究, E-mail: wleixxy@126.com

[通信作者] 王煜霞(Wang Yuxia, corresponding author), E-mail: drwangyuxia@126.com

2 and increased level of Bax, leading to a significant reduction of Bcl-2/Bax ratio. In HepG2 cells overexpressing Bestrophin 3, the mitochondrial membrane potential was also significantly lower compared with that of controls (1.00 ± 0.00)% vs 0.64 ± 0.09 %, $P < 0.05$), and Cyt C content was reduced in mitochondria and elevated in cytoplasm (all $P < 0.05$).

Conclusion: Enforced expression of Bestrophin 3 increases the apoptosis of HepG2 through reducing Bcl-2/Bax ratio and promoting cytochrome C release from the mitochondria.

[**Key words**] Bestrophin 3; hepatocellular carcinoma; HepG2 cell; apoptosis; cytochrome C

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 448-453]

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的致死性恶性肿瘤之一,在全球恶性肿瘤发病率中排第 5 位,且发病率在世界范围内呈上升趋势^[1]。而肝癌具有发病隐匿,早期诊断困难,恶性程度高,侵袭能力强等特点,手术治疗后的复发率很高^[2]。近年来,基因治疗和分子靶向治疗的临床研究日益开拓,已有多种靶向药物用于肝细胞肝癌的临床治疗中,并取得了良好的治疗效果。Bestrophin 是一类与卵黄样黄斑病变相关的基因,该基因的突变可引起 II 型卵黄样黄斑变性(VMD2)^[3-4]。其中 Bestrophin 3 在组织中广泛分布,在血管平滑肌细胞, Bestrophin 3 是 cGMP 依赖的 Ca^{2+} 激活 Cl-通道的分子基础。研究^[5]发现,过表达 Bestrophin 3 能使得 A10 细胞凋亡增加,使得血管重组; Bestrophin 3 还参与肿瘤细胞周期运行和细胞生存^[6-7]。目前尚未见到 Bestrophin 3 在肿瘤细胞中的作用及机制的报道。本研究采用 Bestrophin 3 腺病毒转染人肝癌细胞株 HepG2,探讨过表达 Bestrophin 3 对 HepG2 细胞凋亡能力的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肝癌细胞株 HepG2 购于武汉大学典型物种保藏中心,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基常规培养。Bcl-2、Bax、细胞色素 C、 β -actin、Cox IV 抗体均购于 Cell Signaling Technology 公司, Bestrophin 3 抗体购于 Fab Gennix 公司, Western blotting 二抗购于碧云天公司,胎牛血清、DMEM 培养基购于 Gibco 公司,线粒体分离试剂盒购于 Thermo Fisher Scientific 公司, CCK-8 kit 购于日本同仁化学公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 Bestrophin 3 腺病毒最佳感染复数的确定

将 HepG2 细胞悬液 2 ml(2×10^3 细胞/孔)均匀接种在 6 孔板中,用含有 10% 甘油的无菌 PBS 将 Bestrophin 3 腺病毒稀释成适当浓度,以 MOI 10、20、40、80 感染 HepG2 细胞,轻轻摇匀,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 5 h,更换完全培养基,继续培养

48 h。设对照组,未转染病毒的 HepG2 细胞; LacZ 组,以 MOI 80 转染对照腺病毒载体(LacZ)。收集细胞,用裂解液裂解细胞,离心得到蛋白, Western blotting 检测各组细胞内 Bestrophin 3 蛋白的表达。蛋白定量后,取适量裂解产物行 SDS-PAGE 后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,室温用脱脂牛奶封闭 2 h,加入 Bestrophin 3 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 30 min; 加入对应二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 30 min 后荧光显色,条带使用 Image J(1.38U)分析系统进行灰度扫描分析,计算 Bestrophin 3 蛋白相对表达量,随后得出最佳 MOI 值。

1.3 CCK-8 法检测 Bestrophin 3 腺病毒感染对 HepG2 细胞增殖的影响

以最佳 MOI 值(MOI = 40)将 Bestrophin 3、LacZ 转染 HepG2 细胞作为 LacZ 组和 Ad-Best3 组,设不转染的对照组。各组细胞常规培养至对数期(后续实验分组均与此相同),以 2×10^3 细胞/孔的密度接种入 96 孔培养板,在 0、12、24、36、48 h 时加入 10 μ l CCK-8 溶液,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 30 min 酶标仪检测 450 nm 波长处各孔光密度(D)值,每组设 6 个复孔。另设单孔只加入培养基不加入 HepG2 细胞作为空白对照,计算细胞存活率。细胞存活率(%) = (实验组 D 值 - 空白组 D 值) / (0 h D 值 - 空白组 D 值) $\times 100$ %。

1.4 流式细胞术检测 HepG2 细胞的凋亡率

取对数期的对照组、LacZ 组和 Ad-Best3 组细胞,换无血清培养液培养 12 h 使细胞周期同步化,用常规培养基继续培养 24 h。用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并收集细胞,离心后弃去上清液,沿管壁缓缓加入预冷 70% 乙醇,过夜。检测前采用 RNA 酶消化,再加入 PI 染色液, 4 °C 避光 30 min, 上流式细胞仪检测凋亡率。

1.5 Western blotting 检测 Bestrophin 3 腺病毒感染对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达和线粒体细胞色素 C 释放的影响

取对数期的对照组、LacZ 组和 Ad-Best3 组细胞,换无血清培养液培养 12 h 使细胞周期同步化,

用常规培养基继续培养 24 h。收集各组细胞, 分为两部分, 一部分提取细胞总蛋白, Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达; 另一部分根据线粒体分离试剂盒说明书进行操作, 简述如下: 收集大约 5×10^7 个细胞, 用冰浴预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀, 取少量细胞计数, $600 \times g, 4^\circ C$ 离心 5 min, 弃上清。加入 800 μl 试剂 A, 离心 10 s, 冰上孵育 1 min, 加入 10 μl 试剂 B, 离心 10 s, 冰上孵育 4 min, 其中每隔 1 min 涡旋震荡 1 次, 加入 800 μl 试剂 C, $700 \times g, 4^\circ C$ 离心 5 min, 沉淀为线粒体部分。上清以 $11\ 000 \times g, 4^\circ C$ 离心 5 min, 为胞浆部分。随后采用 Western blotting 方法, 用细胞色素 C 抗体分别检测线粒体和胞浆中细胞色素 C 的表达。

1.6 JC-1 染色法检测 Bestrophin 3 腺病毒感染对 HepG2 细胞线粒体跨膜电位的影响

取对数期的对照组、LacZ 组和 Ad-Best3 组细胞, 换无血清培养液培养 12 h 使细胞周期同步化, 用常规培养基继续培养 24 h, 检测细胞膜电位。线粒体跨膜电位检测根据碧云天跨膜电位检测试剂盒说明书进行。通过 JC-1 荧光染料指示剂检测线粒体膜电位的改变, 并在荧光显微镜下观察红色荧光与绿色荧光强度, 使用两者荧光强度比值代表线粒体膜电位的改变, 荧光强度使用 Image J (1.38 U) 分析系统进行扫描分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS15.0 统计软件分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Bestrophin 3 腺病毒最佳转染数筛选

Bestrophin 3 腺病毒以不同 MOI 转染 HepG2 细胞, Western blotting 检测各组细胞内 Bestrophin 3 蛋白表达, 结果 (图 1) 显示, MOI 值为 20、40、80 时, Bestrophin 3 的蛋白表达均显著高于对照组 ($2.49 \pm 0.14, 3.57 \pm 0.21, 3.61 \pm 0.19$ vs 1.00 ± 0.00 , 均 $P < 0.05$)。并且, MOI 为 40、80 时两组 Bestrophin 3 表达量无显著差异, 且均高于 MOI = 10 组, 表明 40 MOI 已达到有效转染效果, 因此在后面的实验中均采用 40 MOI 作为 Bestrophin 3 过表达腺病毒转染最佳 MOI。

2.2 Bestrophin 3 过表达降低 HepG2 细胞存活率

CCK-8 检测结果 (图 2) 显示, 12 h 时, Ad-Best3 组的细胞存活率即显著低于对照组和 LacZ 组 [$(79.37 \pm 1.76)\%$ vs $(98.67 \pm 3.02)\%$ 、 $(99.67 \pm$

$3.25)\%$, $P < 0.05$], 且随时间延长, 细胞存活率逐步降低; 对照组和 LacZ 组细胞存活率间始终无显著差异 ($P > 0.05$), 且随时间延长, 细胞存活率逐步升高。

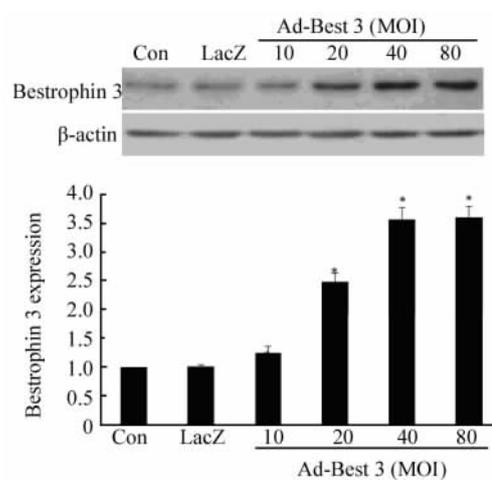


图 1 Bestrophin 3 腺病毒最佳 MOI 值的确定 ($n = 6$)
Fig. 1 Transfection efficiency of Bestrophin 3 adenovirus
* $P < 0.05$ vs control ($n = 6$)

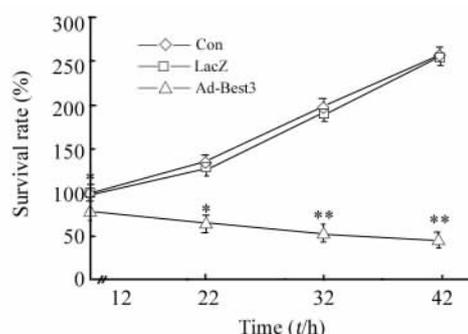


图 2 过表达 Bestrophin 3 降低 HepG2 细胞的存活率
Fig. 2 Inhibit effects of Bestrophin 3 over-expression on cell viability of HepG2 cells
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Con or LacZ group

2.3 过表达 Bestrophin 3 促进 HepG2 细胞的凋亡

流式细胞术检测结果 (图 3) 表明, Ad-Best-3 组细胞凋亡率显著高于对照组和 LacZ 组 [$(29.47 \pm 2.37)\%$ vs $(5.47 \pm 0.37)\%$, $(4.95 \pm 0.44)\%$, $P < 0.05$], 而 Con 组与 LacZ 组相比没有统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.4 过表达 Bestrophin 3 对 HepG2 细胞内 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

Western blotting 检测结果 (图 4) 表明, Ad-Best3 组 HepG2 细胞 Bax 的蛋白表达较对照组显著增加 (1.69 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), Bcl 的蛋白

表达显著减少(0.47 ± 0.02 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$),从而导致 Bcl-2/Bax 比率显著减少($1.00 \pm$

0.00 vs 0.32 ± 0.047 , $P < 0.05$);Con 组和 LacZ 组之间没有显著性差异($P > 0.05$)。

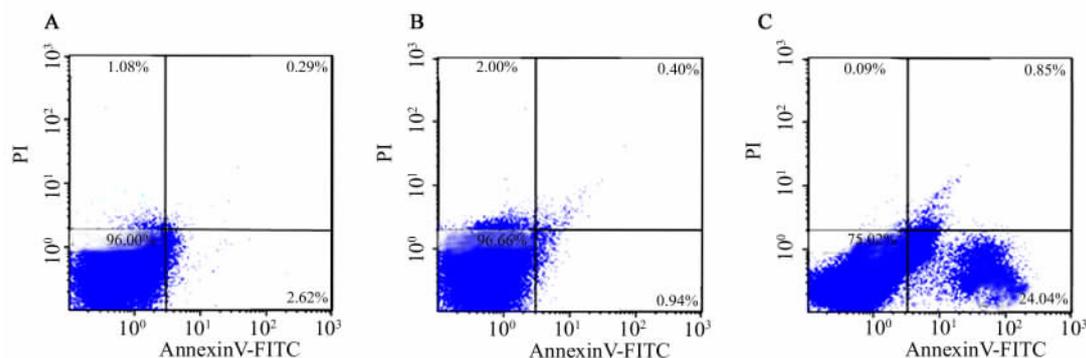


图3 过表达 Bestrophin 3 促进 HepG2 细胞凋亡

Fig. 3 Bestrophin 3 overexpression promoted the apoptosis of HepG2 cells

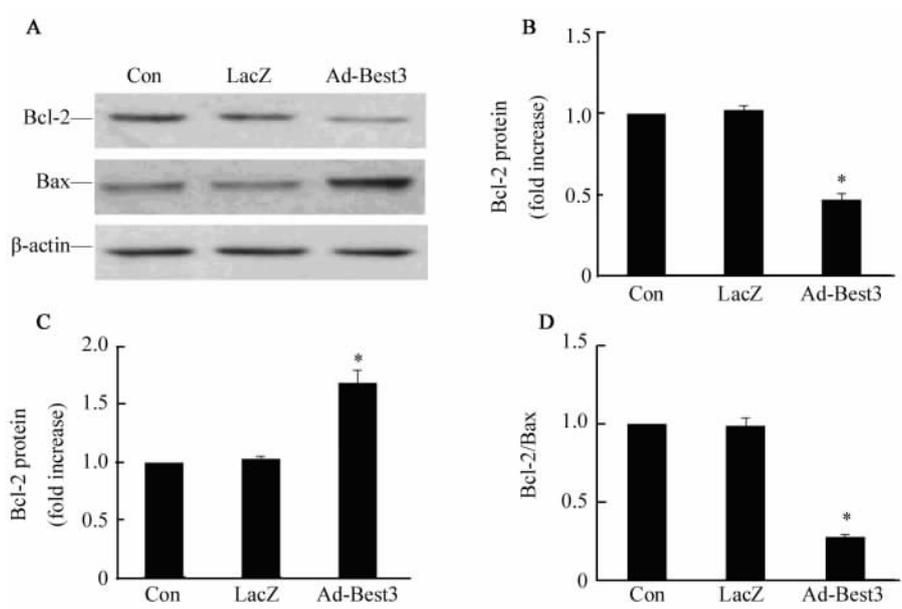


图4 过表达 Bestrophin 3 对 HepG2 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Bestrophin 3 overexpression on the expression of Bcl-2 and Bax in HepG2 cells

A: Bcl-2 and Bax expression; B: Densitometric analysis of Bcl-2; C: Densitometric analysis of Bax; d the ratio of Bcl-2/Bax

* $P < 0.05$ vs Con ($n = 6$)

2.5 过表达 Bestrophin 3 对线粒体膜电位的影响

JC-1 染料是线粒体膜电位指示剂,在正常情况下,JC-1 形成聚合物,产生红色荧光;当细胞发生凋亡,线粒体膜电位降低,JC-1 形成单体,产生绿色荧光。通过荧光显微镜观察 JC-1 红色荧光与绿色染色比值,结果(图5)发现 Ad-Best3 组 HepG2 细胞红色荧光明显减弱,绿色荧光明显增强,红色荧光与绿色染色比值明显低于空白对照组[$(1.00 \pm 0.00)\%$ vs $(0.64 \pm 0.09)\%$, $P < 0.05$],而转染 LacZ 对

HepG2 细胞线粒体膜电位并没有明显的影响。

2.6 过表达 Bestrophin 3 对细胞色素 C 表达的影响

Western blotting 检测结果(图6)显示,Ad-Best3 组 HepG2 细胞线粒体(mito)中细胞色素 C 的含量较对照组明显降低(0.42 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$),而胞质(cyto)中细胞色素 C 的含量明显升高(2.86 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$),胞质和线粒体中细胞色素 C 的比值增加为(6.84 ± 0.15 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$)。

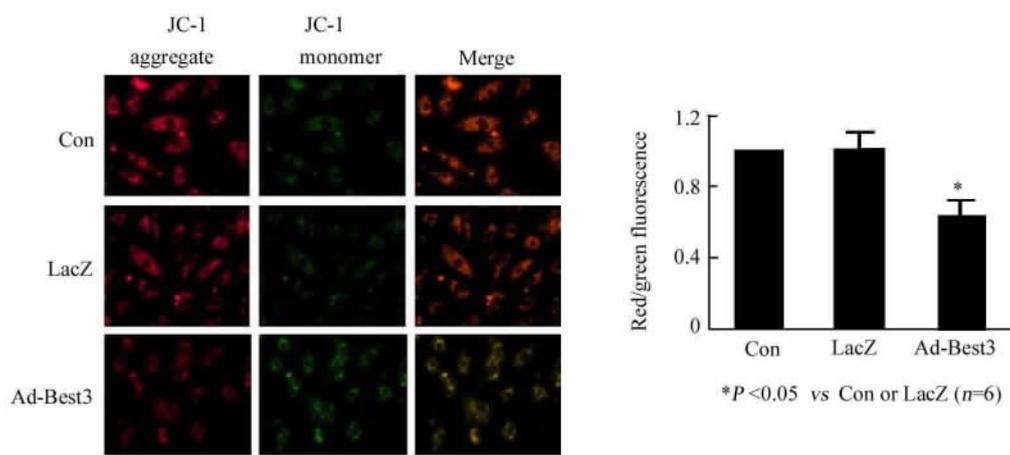


图 5 过表达 Bestrophin 3 降低 HepG2 细胞线粒体膜电位

Fig. 5 Effect of Bestrophin 3 overexpression on mitochondrial membrane potential

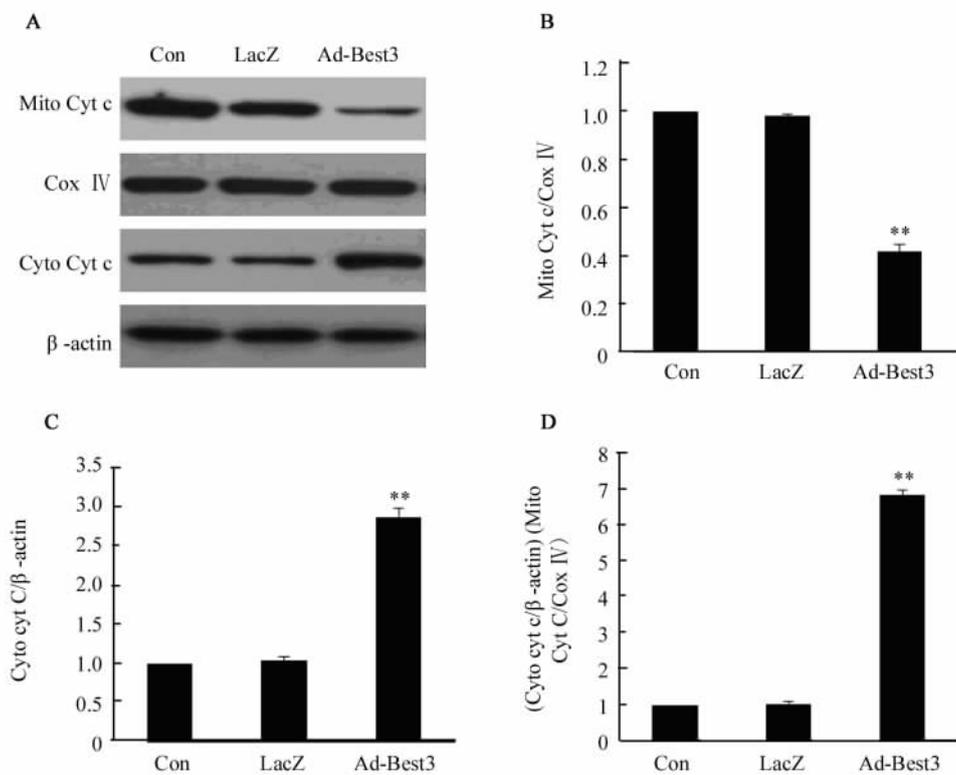


图 6 过表达 Bestrophin 3 引起 Cyt C 向胞质转移

Fig. 6 Effect of Bestrophin 3 on Cyt C release from mitochondria to cytosol

A: Western blotting; B: Densitometric analysis of Cyt C in mitochondria; C: Densitometric analysis of Cyt C in cytosol; D: The ratio of cytosol Cyt C/mitochondrial Cyt C

** P < 0.01 vs Con or LacZ (n = 6)

3 讨论

Broequer 等^[8]研究认为, Bestrophin 3 是 cGMP

依赖的 Ca²⁺ 激活 Cl⁻通道的分子基础。Cl⁻ 通道参与调控多种细胞凋亡进程^[9-10]。并且有研究^[11]发现, Bestrophin 1 在结肠癌中的表达与正常组织相比

明显升高,过表达 Bestrophin 3 可明显抑制肾脏集合管细胞的增殖反应,提示 Bestrophin 3 参与调控细胞的增殖反应。Bestrophin 3 还可以通过抑制 CHOP (C/EBP-homologous protein) 的表达减少肾脏上皮细胞上内质网应激引起的细胞死亡^[12]。但是 Bestrophin 3 在肝癌研究领域中的功能尚未见报道。Bestrophin 3 在肿瘤组织中的表达谱将在后续实验中进行。

本研究通过采用腺病毒转染的方法,通过试验筛选,选择 40 MOI 腺病毒感染 HepG2 细胞,成功构建过表达 Bestrophin 3 的人肝癌细胞株 HepG2,发现过表达 Bestrophin 3 24 h 即可显著降低 HepG2 细胞的存活率,同时可明显增加 HepG 细胞的凋亡率,说明 Bestrophin 3 参与了 HepG2 癌细胞的凋亡过程并促进细胞的凋亡。

Bcl-2 家族构成一个复杂的相互作用的控制细胞凋亡的网络,家族成员由抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w 等)和促凋亡蛋白(Bax、Bak、Bad、Bim、Bit 等)组成,是细胞凋亡内源性线粒体通路的重要调节因子^[13-14]。Bcl-2 是最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因,定位于线粒体外膜、内质网膜等,有研究^[15]表明在淋巴瘤中,Bcl-2 呈高表达,通过延长肿瘤细胞生存而抑制细胞凋亡。Bax 基因的功能与 Bcl-2 功能相反,二者相对浓度(Bcl-2/Bax)的变化可以作为判断肿瘤细胞的凋亡、耐药及复发的重要依据。本研究发现,过表达 Bestrophin 3 可降低抗凋亡因子 Bcl-2 的表达,同时增加促凋亡因子 Bax 的表达,从而减少 Bcl/Bax 的比值。提示 Bestrophin 3 可促进细胞存活,并抑制细胞凋亡。另一方面,细胞凋亡会导致细胞质密度增加,线粒体膜电位消失,而 JC-1 是目前常用的线粒体膜电位指示剂。在正常情况下,JC-1 形成聚合物,产生红色荧光,当线粒体膜电位降低,JC-1 形成单体,产生绿色荧光,因此可用红色荧光与绿色荧光的比值反应线粒体膜电位的异常。再者,当线粒体膜通透性改变,线粒体内的 Cyt C 将释放到胞质中^[16]。通过进一步体外实验表明,Bcl/Bax 浓度比值改变后,线粒体膜电位显著降低,线粒体中 Cyt C 含量显著减少,胞质内 Cyt C 含量显著增加,导致胞质和线粒体 Cyt C 含量比值明显升高说明过表达 Bestrophin 3 促进了线粒体 Cyt C 向胞质释放。

综上所述,本研究发现 Bestrophin 3 可能通过内源性线粒体凋亡途径参与了肝癌细胞 HepG2 的凋亡,为 Bestrophin 3 可作为肝癌治疗靶基因提供了实验依据,而更深入的作用机制需待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 张健,邵初晓. 原发性肝癌早期诊断研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志,2014,20(9):689-693.
- [2] 陆世锋,赫军. 原发性肝癌外科治疗及非手术治疗研究进展[J]. 医学综述,2014,20(12):2151-2153.
- [3] 刘婧妹,张勇进. Best 卵黄样黄斑营养不良临床特点及 Best1 基因突变研究进展[J],国际眼科杂志,2015,15(4):612-614.
- [4] Macdonald IM, Gudiseva HV, Villanueva A, et al. Phenotype and genotype of patients with autosomal recessive bestrophinopathy [J]. *Ophthalmic Genet*, 2012, 33(3):123-129.
- [5] Jiang L, Liu Y, Ma MM, et al. Mitochondria dependent pathway is involved in the protective effect of bestrophin-3 on hydrogen peroxide-induced apoptosis in basilar artery smooth muscle cells [J]. *Apoptosis*, 2013,18(5):556-565.
- [6] Eksandh L, Adamus G, Mosgrove L, et al. Autoantibodies against bestrophin in a patient with vitelliform paraneoplastic retinopathy and a metastatic choroidal malignant melanoma [J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(3):432-435.
- [7] Kuo YH, Abdullaev IF, Hyzinski-García MC, et al. Effects of alternative splicing on the function of bestrophin-1 calcium-activated chloride channels [J]. *Biochem J*. 2014, 458(3):575-583.
- [8] Broegger T, Jacobsen JC, Secher Dam V. Bestrophin is important for the rhythmic but not the tonic contraction in rat mesenteric small arteries [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(4):685-693.
- [9] Berglund E, Akcakaya P, Berglund D, et al. Functional role of the Ca²⁺ activated Cl⁻ channel DOG1/TMEM16A in gastrointestinal stromal tumor cells [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 326(2):315-325.
- [10] Wanitchakool P, Wolf L, Koehl GE, et al. Role of anoctamins in cancer and apoptosis [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369(1638):20130096.
- [11] Kunzelmann K, Kongsuphol P, Chootip K, et al. Role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channels bestrophin and anoctamin in epithelial cells [J]. *Biol Chem*, 2011, 392(1/2):125-134.
- [12] Lee WK, Chakraborty PK, Roussaet E, et al. ERK1/2-dependent Bestrophin -3 expression prevents ER-stress-induced cell death in renal epithelial cells by reducing CHOP [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(10):1864-1876.
- [13] 许茸茸,李应东. Bcl-2 家族与线粒体凋亡通路相互作用研究进展 [J]. 中国老年杂志,2013,33(12):2977-2979.
- [14] 张磊,王京,李文斌,等. Bcl-2 家族蛋白小分子抑制剂的研究进展 [J]. 国外医药:抗生素分册,2014,35(5):196-200.
- [15] 陆锦标,季菊玲,鄂群,等. 弥漫大 B 细胞性淋巴瘤中(t14;18)易位及 BCL2 表达的意义 [J]. 中国肿瘤临床,2012,39(7):396-403.
- [16] 刘亮,左连富,王静. 青蒿琥酯对食管癌 E69706 细胞线粒体膜电位及凋亡的影响 [J]. 解放军医学杂志,2014,39(1):25-29.

[收稿日期] 2015-03-10

[修回日期] 2015-06-25

[本文编辑] 黄静怡