

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.011

· 基础研究 ·

上调 2 型大麻素受体诱导子宫颈癌 HeLa 细胞凋亡

谭晓玲¹, 李晶², 钟序素¹ (1. 第三军医大学新桥医院妇产科, 重庆 400016; 2. 重庆三峡中心医院中心实验室, 重庆 404000)

[摘要] **目的:** 通过构建基因真核表达载体, 探讨人 2 型大麻素受体(human cannabinoid receptor 2, hCB2R)对人子宫颈癌 HeLa 细胞体外凋亡的作用及机制。 **方法:** 选用人脑组织的 cDNA 作为模板, 进行 hCB2R 基因的 RT-PCR 扩增, 构建重组质粒 GV230-hCB2R 及其对照空质粒 GV230 并转染 HeLa 细胞, Western blotting 法及免疫荧光细胞化学染色联合激光扫描共聚焦显微镜技术检测 hCB2R 表达及细胞内定位; 流式细胞术检测 HeLa 细胞凋亡, Western blotting 法及实时荧光定量 PCR 检测 HeLa 细胞中 hCB2R、Bcl-2、Bax、Bad 的表达。 **结果:** 与空质粒转染组相比, GV230-hCB2R 转染 HeLa 细胞后表达相对分子量 40 000 的 hCB2R 蛋白, 且细胞膜和细胞质中均有 hCB2R 的表达; GV230-hCB2R 转染组的细胞凋亡率显著高于 GV230 空质粒对照组 [(14.51 ± 4.51)% vs (6.29 ± 0.57)% , $t = 1.72$, $P < 0.05$]; 与空质粒对照组相比, hCB2R 转染组细胞内 Bax 和 Bad 的表达水平明显上调 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 的表达明显下调 ($P < 0.05$)。 **结论:** hCB2R 对子宫颈癌 HeLa 细胞的生长表现出明显的抑制作用, 其作用机制可能与 hCB2R 直接参与了细胞凋亡相关蛋白的表达变化有关。

[关键词] 人 2 型大麻素受体; HeLa 细胞; 子宫颈癌细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R739.5; R730.51; R967

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)05-0651-05

Up-regulation of human cannabinoid receptor 2 induces apoptosis of cervical cancer HeLa cells

TAN Xiaoling¹, LI Jing², ZHONG Xusu¹ (1. Department of Gynaecology and Obstetrics, Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Laboratory Center, Chongqing Three Gorges Medical Hospital, Chongqing 404000, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a eukaryotic expression vector containing human cannabinoid receptor 2 (hCB2R) gene and investigate its effect on the apoptosis of cervical cancer HeLa cells as well as the possible mechanism. **Methods:** cDNA of human brain tissues was selected as template for the amplification of hCB2R gene by RT-PCR; recombinant plasmid GV230-hCB2R was constructed to transfect HeLa cells, and the empty vector GV230 was used as control vector. Western blotting and immunofluorescence staining combined with laser scanning and co-confocal microscope technology were used to detect hCB2R expression and intra-ecellular localization; Flow cytometry was used to determine the apoptosis of HeLa cells; Western blotting and real-time fluorescence quantitative PCR were used for the detection of expression of hCB2R, Bcl-2, Bax and Bad in HeLa cells. **Results:** Compared with empty plasmid group, GV230-hCB2R transfected HeLa cells expressed hCB2R protein with relative molecular weight (Mr) 40 000, on both cell membrane and cytoplasm; cell apoptosis rate of GV230-hCB2R group was significantly higher than that of the GV230 empty plasmid group ([14.51 ± 4.51]% vs [6.29 ± 0.57]% , $t = 1.72$, $P < 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of Bax and Bad were significantly increased ($P < 0.05$) while the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.05$) in GV230-hCB2R group. **Conclusion:** hCB2R has a significant inhibitory effect on the growth of cervical cancer HeLa cell line, and its mechanism may be directly related to the involvement of hCB2R in the expression of apoptosis related proteins.

[基金项目] 重庆市科委前沿与基础研究资助项目(No. cstc2014jcyjA1215); 重庆市卫生局医学科研项目(No. 2012-1-096)。 Project supported by the Frontier and Basic Research of Chongqing(No. cstc2014jcyjA1215), and the Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (No. 2012-1-096)

[作者简介] 谭晓玲(1984 -)女, 重庆市人, 硕士生, 主要从事妇产科临床研究, E-mail: 543938599@qq.com

[通信作者] 李晶(LI Jing, corresponding author), E-mail: mybestdorthy@hotmail.com

[**Key words**] human cannabinoid receptor 2; HeLa cell; cervical cancer cell; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 651-655. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.011]

子宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,占女性生殖系统恶性肿瘤的半数以上,其病死率居女性恶性肿瘤的首位^[1-2]。近年来,随着人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染率的上升,子宫颈癌的发病率呈上升趋势,且高发年龄趋于年轻化,成为严重危害妇女健康的疾病^[3]。目前该病的治疗方法为放疗或手术治疗,但患者会出现预后不佳、肿瘤的复发等问题^[4-5]。为寻求更多有效治疗方法,国内外学者正在研究各种靶向治疗的方法^[6]。大麻素受体有 2 种类型:人大麻素受体 1 (human cannabinoid receptor 1, hCB1R) 和 hCB2R (human cannabinoid receptor 2)。有研究^[7]表明,大麻素(cannabinoids)对癌细胞具有生长抑制作用,但是,能否通过大麻素受体抑制子宫颈癌细胞的生长还未能得到充分证实。本研究通过构建 hCB2R 真核表达载体,确定其在子宫颈癌 HeLa 细胞内的表达,研究 hCB2R 对子宫颈癌细胞凋亡的作用机制,旨在为大麻素在肿瘤治疗中的应用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人脑组织 cDNA、子宫颈癌 HeLa 细胞、GV230

质粒均由重庆三峡中心医院中心实验室保存。总 RNA 提取试剂盒和 RNA 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; T 载体连接试剂盒、T4 DNA 连接酶、DH5 α 感受态细菌、胶回收试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司; *Xho* I 和 *Kpn* I 酶购自 NEB 公司; 质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司; LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司; 兔源 CB2R 抗体、兔源 Bcl-2 抗体、兔源 Bax 抗体、兔源 Bad 抗体购自 Abgent 公司; 兔源 GAPDH 抗体购自 Bioword 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司; 红色荧光标记的山羊抗兔 IgG 购自 Abbkine 公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚及防荧光淬灭剂购自碧云天公司。流式细胞仪购自 Coulter 公司; GeneGnome5 化学发光成像仪购自 Syngene 公司; iQ5 型荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 CB2R 引物设计与合成

根据 GenbanNM_016083.4 基因序列号,采用 Primer premier 5.0 软件设计引物。在上游引物的 5' 加入 *Xho* I 酶切位点,下游引物 5' 加入 *Kpn* I 酶切位点,引物由上海 Invitrogen Life Technologies 公司合成。*hCB2R*、*Bcl-2*、*Bax*、*Bad* 以及 *GAPDH* 的上、下游引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 相关引物

Tab. 1 Real-time quantitative PCR primer

Gene	Upstream primer (5'-3')	Downstream primer(3'-5')
<i>hCB2R</i>	GACCGCCATTGACCGATAACC	GGACCCACATGATGCCAG
<i>Bcl-2</i>	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC	GCATCCAGCCTCCGTTATC
<i>Bax</i>	GCTGTTGGGCTGGATCCAAG	TCAGCCCATCTTCTTCCAGA
<i>Bad</i>	CC AGTGAGCAGGAAGACTC	GGTAGGAGCTGTGGCGACT
<i>GAPDH</i>	GCCTCAAGATCATCAGCAATGC	CATGGACTGTGGTCATGATCCT

1.3 CB2R PCR 扩增及产物纯化

以人脑组织 cDNA 为基因模板,PCR 扩增 hCB2R 编码序列(coding sequence, CDS)片段。PCR 反应条件:50 μ l 体系;94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,按凝胶回收试剂盒说明回收纯化目的片段。

1.4 CB2R 真核表达载体的构建及鉴定

用 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶对 CB2R PCR 纯化产物和真核载体质粒 GV230 进行酶切,回收、纯化酶切产

物。按 T4 DNA 连接酶试剂盒说明连接,连接产物转 DH5 α 感受态细胞,接种于含卡那霉素的 LB 培养基培养,筛选阳性克隆,再接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基,菌液按质粒提取试剂盒说明提取质粒,质粒用 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶进行酶切,并送上海 Invitrogen 公司测序。

1.5 Western blotting 及免疫荧光细胞化学染色法检测 CB2R 在 HeLa 细胞的表达

接种 HeLa 细胞到含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养基的 35 mm 培养皿中,37 $^{\circ}$ C, 50 ml/L

CO₂ 培养过夜, 细胞的汇合度在 50% ~ 70% 后, 设 CB2R 组和空质粒组, 按 Lipofectamine™2000 转染说明书分别转染 GV230-hCB2R 和 GV230, 48 h 后收获细胞, 超声裂解, 获取蛋白。蛋白样品 100 °C 变性 10 min, 5 μl 蛋白样本上样, 100 μg/L SDS-PAGE, 转膜, 含 5 μg/L 脱脂牛奶的 TBST 封闭 2 h, 兔抗 CB2 抗体(1:500) 4 °C 孵育过夜, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h, ECL 法显影。Western blotting 法检测 CB2R 在 HeLa 细胞中的表达情况。

转染质粒 HeLa 细胞 48 h 后, 去上清, 加 1 ml 冰甲醇 20 min; 30 ml/L H₂O₂ 室温 20 min; 50 ml/L 胎牛血清封闭 1.5 h; 兔抗 CB2R 抗体(1:100) 4 °C 过夜, 红色荧光标记的山羊抗兔 IgG(1:50) 37 °C 孵育 2 h, DAPI 染色 5 min, 防荧光淬灭剂封片, 激光共聚焦显微镜下定位 CB2R 在 HeLa 细胞中定位。

1.6 流式细胞术检测 HeLa 细胞的凋亡

Lipofectamine™2000 转染按说明转染子宫颈癌 HeLa 细胞, 胰酶消化, PBS 清洗, 11.19 × g 离心 10 min, 细胞处理后进样流式细胞术检测细胞凋亡情况, 转染空质粒 HeLa 细胞做对照。

1.7 Western blotting 法检测 CB2R 及凋亡相关因子蛋白的表达

分别提取转染 48 h 后 CB2R 组与空质粒对照组 HeLa 细胞总蛋白, BCA 法定量, 各取含 20 μg 总蛋白的样品加入上样缓冲液煮 10 min, 10% SDS-PAGE 分离蛋白后转移蛋白至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 分别加入 CB2 一抗(1:500)、Bcl-2 一抗(1:1000)、Bax 一抗(1:1000)、Bad 一抗(1:1000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:1000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 暗室曝光拍照。Western blotting 法检测不同转染组 CB2R 及 Bcl-2、Bax、Bad 蛋白的表达情况, 以 GAPDH 为内参, 以各检测蛋白与 GAPDH 条带的灰度值之比表示蛋白的相对表达量。每个实验均重复 3 次。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 CB2R 及凋亡相关因子的 mRNA 表达

收集 CB2R 组与空白组细胞, 按 RNA 提取试剂盒、RNA 逆转录试剂盒操作得到 cDNA, 按实时荧光定量 PCR 试剂盒说明操作, 25 μl 反应体系, PCR 反应条件: 95 °C, 10 min; 94 °C 20 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。实验数据采用 2^{-ΔΔCt} 分析, ΔΔCt = (Ct 目的基因 - Ct 内参) 实验组 - (Ct 目的基因 - Ct 内参) 空白组, 相对定量(relative quantification, RQ), 以 RQ 实验组 = 2^{-ΔΔCt}, RQ 对照组 = 1 计算。

1.9 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用完全随机设计的单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 GV230-hCB2R 重组质粒的酶切鉴定

hCB2 基因的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约 1 128 bp 的目的条带, 与预期一致(图 1A); 构建的重组表达质粒 GV230-hCB2R 双酶切(*Xho* I / *Kpn* I 酶) 后检测发现, 在约 1 128 bp 的位置出现目的片段, 大小与序列分析预测一致(图 1B)。测序结果表明, 各连接位点及阅读框架正确, 序列与对应已知序列相符, 表明重组表达质粒构建成功。

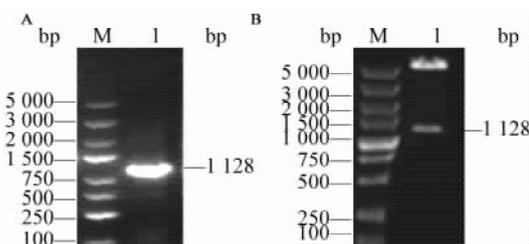


图 1 *CB2R* 基因 PCR 产物及 GV230-*hCB2R* 酶切检测

Fig. 1 PCR product of *hCB2* gene and GV230-*hCB2R* digestion with *Xho* I and *Kpn* I

A: PCR product of *hCB2R* gene; B: Recombinant plasmid GV230-*hCB2R* digestion with *Xho* I and *Kpn* I.

M: DNA marker DL5000

2.3 *CB2R* 在 HeLa 细胞中的表达

Western blotting 结果(图 2)显示, *CB2R* 转染组目的蛋白有表达, 条带位于 Mr 40 000 处, 与预期结果一致; 而空质粒对照组未检测到有 *CB2R* 的表达。

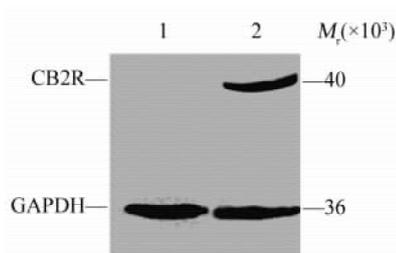


图 2 HeLa 细胞转染后 *CB2R* 的蛋白表达

Fig. 2 Expressions of *CB2R* protein in HeLa cells after transfection

1: Blank group; 2: *CB2R* group

2.4 CB2R 在 HeLa 细胞中的定位

激光扫描共聚焦显微镜技术检测结果(图3)显示,CB2R 表达于细胞膜和细胞质上。

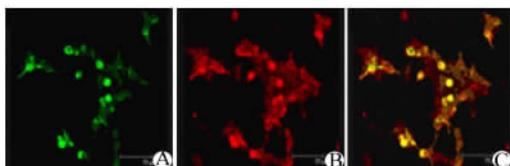


图3 CB2R 在 HeLa 细胞中的定位(×200)

Fig.3 Localization of CB2R proteins in HeLa cells after transfection (×200)

A: Green fluorescence; B: Red fluorescence;

C: Compact fluorescence

2.5 hCB2R 组 HeLa 细胞的凋亡率增高

流式细胞术检测结果(图4)显示, hCB2R 组 HeLa 细胞凋亡率高于空质粒组[(14.51 ± 4.51)% vs (6.29 ± 0.57)% , $t = 1.72$, $P < 0.05$]。

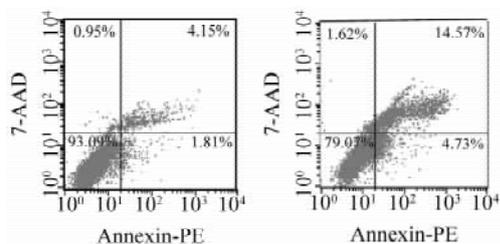


图4 hCB2R 组 HeLa 细胞的凋亡率

Fig. 4 Apoptosis rate of HeLa cells in hCB2R group

A: Empty plasmid group; B: hCB2R group

2.6 CB2R 组 HeLa 细胞 CB2、Bcl-2、Bax、Bad 蛋白的表达

Western blotting 结果(图5)显示,CB2R 组和空质粒组 HeLa 细胞中 Bcl-2、Bax、Bad 均有表达。CB2R 组中参与细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bad 的表达高于空质粒组[(0.58 ± 0.03)% vs (0.21 ± 0.01)% , (0.58 ± 0.03)% vs (0.18 ± 0.01)% , $P < 0.05$],但 Bcl-2 蛋白表达低于空质粒组[(0.17 ± 0.01)% vs (0.52 ± 0.03)% , $P < 0.05$]。

2.7 CB2R 组 HeLa 细胞 Bcl-2、Bax、Bad mRNA 的表达

荧光定量 PCR 检测结果显示, CB2R 组 HeLa 细胞中参与细胞凋亡相关基因 Bax、Bad mRNA 表达高于空质粒组[(1.02 ± 0.07)%、(1.14 ± 0.10)% vs (0.46 ± 0.03)% , $P < 0.05$],但 Bcl-2

mRNA 表达低于空质粒组[(0.19 ± 0.01)% vs (0.46 ± 0.03)% , $P < 0.05$]。

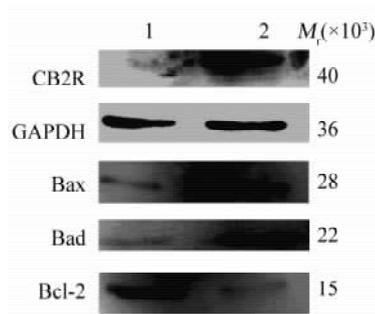


图5 HeLa 细胞转染后 Bcl-2、Bax、Bad 蛋白表达

Fig. 5 Expressions of Bcl-2, Bax, Bad proteins in HeLa cells after transfection

1: Empty plasmid group; 2: hCB2R group

3 讨论

CB1R 分布于脑部、生殖系统等;CB2R 存在免疫系统中,二者均为 7 次穿膜 G 蛋白受体,有 68% 同源性。大麻素是大麻植物中的有效成分,具有止痛、镇静、抗痉挛、抗呕吐等多种药理作用,并具有明显抗肿瘤活性,对皮肤癌、乳腺癌、神经胶质瘤等有抗肿瘤的作用^[7]。大麻素分为内源性(如 2-AG 和 anandamide)、天然的(如四氢大麻酚,THC)及合成的大麻素(如氨基吡啶大麻生物 WIN55,212-2, WIN)3 种。有研究^[8-9]发现,大麻素类化合物通过刺激增加组织中大麻素受体下调基质金属蛋白酶 1 的表达,选择性抑制肿瘤细胞恶性增殖,对乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌等具有明显的抑制作用。此外,国内外临床前实验发现,CB2R 除具有减轻患者疼痛及恶心、提高心情以及刺激食欲生物效应外,它还具有预防癌症发生的功能。CB2R 在人类直肠癌中扮演着抑癌基因(tumor-suppressing gene)的角色,通过甲基化基因启动子消弱直肠 CB2R 表达加快肿瘤细胞增长,反之,激活 CB2R 调节 cAMP 依赖性 PKA 信号通路,下调抗凋亡因子的存活率,则诱导肿瘤凋亡^[10]。有研究^[11-12]表明,CB2R 在肝癌细胞内高表达,体内外实验均证实 Δ^9 -THC 对肝癌细胞 HepG2/BEL-7402 具有抑制作用。在小鼠模型中,内源性大麻素 AEA 可减少结肠异常隐窝灶的形成,CB1R 和 CB2R 在结肠癌 CaCo-2 细胞中都有表达,CB2R 表达量远远高于 CB1R。AEA 可通过 CB2R 及脂筏介导抑制结肠癌 CaCo-2 细胞 p-AKT 蛋白和 caspase-3 等信号分子的表达^[13],抑制增殖并促进其凋亡,而

受体抑制剂能部分拮抗该抑制效应^[14-15]。

激活大多数信号通路,如 p38MAPK、PI3K、ERK 调节凋亡级联 Bcl-2/Bcl-xL 或 Bad 蛋白影响细胞凋亡,而调节细胞凋亡主要通过两条途径:一是细胞表面的死亡受体 Fas 介导的细胞凋亡;二是线粒体信号系统如 Bcl-2 家族^[16]。Bcl-2 家族是研究最为深入和广泛的凋亡调节基因,一般分为抗凋亡基因和促凋亡基因。其中抗凋亡基因中包括 *Bcl-2*、*Mcl* 等,促凋亡基因包括 *Bax*、*Bad* 等。*Bcl-2* 基因产物抑制细胞色素 C 的释放,从而发挥抗凋亡效能^[17-18]。

对于子宫颈癌的治疗药物及其作用机制的研究开发一直是子宫颈癌研究的热点。本实验首先构建了 hCB2R 真核表达载体,转染 HeLa 细胞并检测 CB2R 在细胞中表达。检测转染后 HeLa 细胞中 *Bax*、*Bad*、*Bcl-2* 的 mRNA 和蛋白表达变化,结果显示 CB2R 组中促凋亡因子 *Bad*、*Bax* 在 mRNA 和蛋白水平的表达量高于空白组,而抗凋亡因子 *Bcl-2* 的表达量低于穿质粒组,表明 CB2R 通过上调 *Bax*、*Bad* 的表达,同时下调 *Bcl-2* 的表达促进 HeLa 细胞的凋亡。本实验表明, CB2R 能诱导细胞凋亡是通过激活不同的信号通路,调节与细胞凋亡相关蛋白的表达。

本实验成功构建了 GV230-hCB2R 质粒,为进一步研究 CB2R 的生物活性提供了载体基础。hCB2R 通过调节 Bcl-2 家族相关因子诱导子宫颈癌细胞 HeLa 凋亡,为肿瘤的基因治疗及机制研究提供了实验基础。大麻素在子宫颈癌的发生、发展中起重要作用,其介导细胞增殖和凋亡方面均起着重要作用,有望成为治疗子宫颈癌的新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] 蒋静,邓青. 宫颈癌的筛查方法及其评价 [J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(20): 2900-2902. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-4411. 2008. 20. 061.
- [2] ARMAROLI P, VILLAIN P, SUONIO E, et al. European code against cancer, 4th edition: cancer screening [J]. Cancer Epidemiol, 2015, 39(1): 139-152. DOI: 10. 1016/j. canep. 2015. 10. 021.
- [3] HERNANDEZ D M, APRESA G T, PATLAN P R M, et al. Epidemiological overview of uterine cervical cancer [J]. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 2015, 53(12): 154-161. DOI: 10. 1017/cbo9780511570094. 003.
- [4] 朴金霞,徐娜,浦建文. 多西紫杉醇联合顺铂治疗宫颈癌放疗后复发的临床研究 [J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(33): 4682-4683. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-4411. 2007. 33. 015.
- [5] 沈李伟,翟爱民,杜利力,等. 同步放化疗治疗中晚期宫颈癌的临床疗效观察 [J]. 中国医药导刊, 2010, 12(11): 1877-1877. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-0959. 2010. 11. 026.
- [6] QU Y, DANG S, HOU P. Gene methylation in gastric cancer [J]. Clin Chim Acta, 2013, 23(424): 53-65. DOI: 10. 1016/j. cca. 2013. 05. 002.
- [7] PROTO M C, GAZZERRO P, CROCE D L, et al. Interaction of endocannabinoid system and steroid hormones in the control of colon cancer cell growth [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(1): 250-258. DOI: 10. 1002/jcp. 22727.
- [8] WANG D, WANG H W, BACKLUND M, et al. Loss of cannabinoid receptor accelerates intestinal tumor growth [J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6468-6476. DOI: 10. 1158/0008-5472. can-08-0896.
- [9] JUNG H W, PARK I, GHIL S. Cannabinoid receptor activation inhibits cell cycle progression by modulating 14-3-3 β [J]. Cell Mol Biol Lett, 2014, 19(3): 347-360. DOI: 10. 2478/s11658-014-0200-x.
- [10] GREENHOUGH A, PATSOS H A, WILLIAMS A C, et al. The cannabinoid delta (9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells [J]. Int J Cancer, 2007, 121(10): 2172-2180. DOI: 10. 1002/ijc. 22917.
- [11] RAMER R, HINZ B. Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 [J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(1): 59-69. DOI: 10. 1093/jnci/djm268.
- [12] PUCCI M, PASQUARIELLO N, BATTI N, et al. Endocannabinoids stimulate human melanogenesis via type-1 cannabinoid receptor [J]. J Biol Chem, 2012, 287(19): 466-478. DOI: 10. 1074/jbc. ml11. 314880.
- [13] FONSECA B M, CORREIA S G, TEIXEIRA N A. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation [J]. Apoptosis, 2013, 18(12): 1526-1535. DOI: 10. 1007/s10495-013-0892-9.
- [14] RIMMERMAN N, BEN H D, PORAT Z, et al. Direct modulation of the outer mitochondrial membrane channel, voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) by cannabidiol: a novel mechanism for cannabinoid-induced cell death [J/OL]. Cell Death Dis, 2013, 4(6): e949 [2016-07-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3877544/>. DOI: 10. 1038/cddis. 2013. 471.
- [15] BROWN I, CASCIO M G, ROTONDO D, et al. Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators [J]. Prog Lipid Res, 2013, 52(1): 80-109. DOI: 10. 1016/j. plipres. 2012. 10. 001.
- [16] GUSTAFSSON A B, GOTTLIEB R A. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C45-51. DOI: 10. 1152/ajpcell. 00229. 2006.
- [17] HARTMAN M L, CZYZ M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival [J]. Cancer Lett, 2013, 331(1): 24-34. DOI: 10. 1016/j. canlet. 2013. 01. 010.
- [18] WAIBEL M, SOLOMON V S, KNIGTE D A, et al. Combined targeting of JAK2 and Bcl-2/Bcl-xL to cure mutant JAK2-driven malignancies and overcome acquired resistance to JAK2 inhibitors [J]. Cell Rep, 2013, 5(4): 1047-1059. DOI: 10. 1016/j. celrep. 2013. 10. 038.

[收稿日期] 2016-04-26

[修回日期] 2016-08-21

[本文编辑] 党瑞山