姜黄素对结肠癌细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用研究

吴亚丽[1]，谢俊霞[2]，卢楠[2]，郭立达[3]，梁世中[4]

（1.广东轻工职业技术学院食品与生物工程系，广东高校特色调味品工程技术开发中心，广东广州 510300）（2.河北化工医药职业技术学院制药系，河北石家庄 050026）（3.河北工业职业技术学院环境与化学工程系，河北石家庄 050091）（4.华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510641）

摘要：本文研究了姜黄素对结肠癌 LoVo 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用。不同浓度姜黄素作用体外培养的人结肠癌 LoVo 细胞后，倒置显微镜观察 LoVo 细胞的形态学变化，采用 MTT 法检测姜黄素对 LoVo 细胞的增殖抑制能力；RT-PCR 技术检测 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的 mRNA 表达水平；Annexin V-FITC/PI 标记检测细胞凋亡率；Western blotting 和免疫荧光细胞化学染色检测姜黄素作用前后 c-myc 蛋白表达的差异。结果表明，姜黄素可显著抑制人结肠癌 LoVo 细胞的增殖，具有明显的量效和时间依赖性，24、48 和 72 h 姜黄素抑制 LoVo 细胞的 IC_{50} 分别为（26.45±0.41）、（19.13±0.09）和（10.12±0.04）μmol/L；姜黄素可激活细胞中 Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 表达，抑制 Bcl-2 的 mRNA 和 c-myc 蛋白的表达，姜黄素可诱导 LoVo 细胞发生凋亡。姜黄素通过上调 Bax 和 Caspase-3 表达，下调 Bcl-2 和 c-myc 的表达来抑制人结肠癌 LoVo 细胞的增殖并促使其凋亡。

关键词：姜黄素；结肠癌；LoVo 细胞；增殖；凋亡

文章篇号：1673-9078(2014)4-74-79

Effects of Curcumin on Proliferation and Apoptosis of Colorectal Carcinoma LoVo Cells

WU Ya-li[1], XIE Jun-xia[2], LU Nan[2], GUO Li-da[3], LIANG Shi-zhong[4]

(1.Department of Food and Biological Engineering, Guangdong Industry Technical College, Centre of Guangdong Higher Education for Engineering and Technological Development of Speciality Condiments, Guangzhou 510300, China) (2.Department of Pharmaceutical Engineering, Hebei Chemical and Pharmaceutical Vocational Technology College, Shijiazhuang 050026, China) (3.Department of Environment and Chemical Engineering, Hebei College of Industry and Technology, Shijiazhuang 050091, China) (4.College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To study the biological function and regulation mechanism of curcumin on proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma cells LoVo, the LoVo cells were cultured and treated by curcumin in different concentrations in vitro. Effect of Curcumin on cell proliferation level was examined by MTT colorimetry method. The morphological changes of curcumin-treated LoVo cells were observed under inverted microscope. The mRNA levels of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were tested by RT-PCR. The cell apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. Western blotting and immunofluorescence staining were used to detect the different expressions of c-myc protein of LoVo cells before and after curcumin treatment. MTT test indicated curcumin could inhibit the growth and proliferation of LoVo cells in a time- and concentration-dependent manner. The inhibitory concentration 50% (IC_{50}) of curcumin were 26.45±0.41 μmol/L, 19.13±0.09 μmol/L and 10.12±0.04 μmol/L in LoVo cells at 24, 48 and 72 h, respectively. Flow cytometry instrument analysis showed that curcumin induced apoptosis of LoVo cells. Curcumin activated the expression of Bax and Caspase-3 genes, while inhibited the expression of Bcl-2 gene and c-myc protein. Curcumin significantly inhibited the proliferation and induced the apoptosis of human colorectal carcinoma cells LoVo. Such biological effect may be associated with activating Caspase-3 signal channel by activating Bax expression and inhibiting Bcl-2 and c-myc expression.

Key words: curcumin; colorectal cancer; LoVo cells; proliferation; apoptosis

收稿日期：2013-10-23

基金项目：广东高校特色调味品工程技术开发中心建设项目（GCZX-B1103）；河北省教育厅自然科学青年基金资助项目(Q2012055)；河北工业职业技术学院引进人才科研启动基金资助项目（BZ1201）

作者简介：吴亚丽（1981-），女，讲师，研究方向：生物技术、检测技术等方面研究；通讯作者：郭立达（1980-），女，博士，讲师

姜黄素是从中药姜黄的根茎中提取的一种天然植物多酚，为姜黄的主要活性成分。姜黄素药理活性作用十分广泛，据中国和印度的民间医药史书记载，姜黄素可以治疗许多疾病，比如胆囊疾病、肝脏疾病、糖尿病、呼吸道疾病、厌食、风湿、鼻窦炎、癌症等；此外，姜黄素在许多体外建株肿瘤细胞和动物模型中还发挥着抗炎、抗氧化、抗肿瘤和化学预防作用[1~2]。作为一种极具前景的天然活性物质，姜黄素有望在将来成为一种新型的抗肿瘤药物。由于姜黄素的抗肿瘤机制较为复杂，在不同类型肿瘤细胞中诱导凋亡的分子机制也有所不同，甚至有些结果相反的报道出现[3~4]。因此，姜黄素的抗肿瘤研究已日渐成为肿瘤预防和治疗研究中的一个热点。

结肠癌是一种严重威胁人类生命和健康的恶性肿瘤，普遍发生于胃肠道中。随着人们生活习惯和饮食结构的改变，我国结肠癌的发病率呈逐年递增趋势，虽然外科手术切除和放射治疗是目前较为常用的一种治疗手段，但其单独治疗并不能达到十分理想的治疗效果，为了预防癌的复发和转移，减轻患者痛苦，提高生活质量，越来越多的医务科研工作者将目光投向了植物来源的物质，将广泛存在食物中的植物源化合物用于癌的药物治疗或化学预防。Newman 等统计在1981~2006 年，所有被批准的抗癌药物中几乎有 73%的药物是属于天然产品药物，或者是基于天然产品的系列药物[5]。天然药物因其多靶点、多环节和多途径的抗肿瘤作用，日渐成为临床抗肿瘤药物研究的热点[6~8]。本研究拟探讨姜黄素对结肠癌细胞株 LoVo 的增殖抑制和凋亡诱导作用机制，为进一步阐明姜黄素的抗肿瘤机制提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠腺癌细胞株 LoVo 由广州军区广州总医院医学实验科惠赠。姜黄素购自 Sigma 公司；RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司；胰蛋白酶、噻唑蓝（MTT）和二甲基亚砜（DMSO）均购自索来宝生物技术有限公司；AxyPrep™ Multisource 总 RNA 小量制备试剂盒购自美国 Axygen Biosciences 公司；逆转录试剂盒购自北京 BioTeke 公司；Annexin V/PI 凋亡试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司；c-myc 单抗购自 abcam 公司；S-P 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人结肠腺癌细胞株 LoVo 培养于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液中，置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。每 2~3 d 更换培养液一次，待细胞生长融合率达到 90%左右时，用 0.25%胰蛋白酶消化，按 1:2 进行传代培养。全部实验均选用对数生长期状态良好的细胞。

1.2.2 细胞增殖抑制试验

参考 Yamaue 等的方法[9]，取处于对数生长期，状态良好的 LoVo 细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化，收集细胞，调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL，接种于 96 孔培养板，200 μL/孔。培养 24 h 细胞完全贴壁后，将培养液更换为含 0、5、10、20、40、80 μmol/L 不同浓度姜黄素的培养液，接种 6 个复孔，为实验组（T）；另设置不加姜黄素的 3 个孔为阴性对照组（C，只加等量培养液）和不加培养液的 3 个孔为空白对照组（B，只加等量 PBS）。加药完毕后，置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下继续孵育培养 24、48、72 h。待培养结束后，每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL，37 ℃继续孵育 4 h，小心地吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μL DMSO，静置于 37 ℃温箱孵育 20 min，使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上测定各孔 570 nm 波长处光吸收值。每组实验重复三次。计算细胞抑制率：

$$IR=[1-(A_{570}T-A_{570}B)/(A_{570}C-A_{570}B)]\times100\%$$

并根据 IR 用 82798-IC_{50} 软件计算出半数抑制浓度（Inhibitory concentration 50%，IC_{50}）。

1.2.3 反转录-聚合酶链式反应法（RT-PCR）检测

将 0~20 μg/mL 浓度姜黄素处理 24 h 的 LoVo 细胞消化离心，收集细胞，选用 AxyPrep™ Multisource 总 RNA 小量制备试剂盒提取细胞总 RNA，操作步骤按照试剂盒说明书进行。提取的总 RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸蛋白检测仪检测纯度和质量。取 0.6 μg 总 RNA 应用逆转录试剂盒进行 cDNA 的合成。其余总 RNA 存于-80 ℃冰箱备用；合成的 cDNA 进行 PCR 检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3 和 Bcl-xL 的 mRNA 表达水平，以 β-actin 为内参。PCR 引物序列如下：Bax (169 bp)上游引物：5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3'；下游引物 5'-GGCGGCAATCATCCTCTG-3'；Bcl-2 (746 bp)上游引物：5'-GCTCTGAACAGATCATGAAGACAG-3'；下游引物：5'-CAATCCAAAGTGGACCTGAGG-3'；Caspase-3 (683 bp)上游引物：5'-C

TCGGTCTGGTA CAGATGTCGATG-3'；下游引物：5'-GGTTAACCC GGGTAAGAATGTGCA-3'；β-actin (450 bp) 上游引物：5'-CTACAATGAGCTGCGTG TGG-3'；下游引物：5'-TAGCTCTTCTCCAGG GAGG A3'。反应体系为 20 μL：10 μL Premix Taq，0.4 μL cDNA，0.4 μL 上游引物，0.4 μL 下游引物，8.8 μL 双蒸水，将上述所加的样品混匀，离心，利用 PCR 仪进行扩增。反应条件：94 ℃，预变性 4 min；94 ℃，变性 30 s；52 ℃，退火 30 s；72 ℃，延伸 1 min；循环 30 次；72 ℃，终末延伸 10 min；4 ℃保温。取出 PCR 产物，利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果，通过凝胶成像系统扫描分析各条带，依据各条带的光密度和面积对 PCR 扩增产物进行定量分析，计算目的基因与内参（β-actin）扩增条带光强度比值，可得出目的基因 mRNA 相对表达的高低。

1.2.4 Annexin V-FITC 和 PI 双标检测细胞凋亡[10]

将 0、5、10、20、40、80 μmol/L 梯度浓度姜黄素处理 24 和 48 h 的 LoVo 细胞消化离心，收集各组细胞，用 PBS 洗 2 次；1000 r/min 离心 5 min，弃上清，用 500 μL 1×膜联蛋白结合缓冲液重悬细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 避光染色 10 min，再加入 10 μL PI 于室温下避光孵育 5 min；上流式细胞仪检测荧光强度，分析细胞凋亡率。

1.2.5 免疫蛋白印迹

收集经不同浓度姜黄素（0、5、10、20、40、80 μmol/L）处理的 LoVo 细胞，PBS 清洗，参照刘安军等的方法[11]，RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30 min，12000 r/min 离心 10 min，检测蛋白浓度，进行 SDS-PAGE 电泳，将蛋白转移至 PVDF 膜上，常温封闭 1 h，与一抗（c-myc、actin）室温孵育 3 h，TBST 洗膜 3 次（每次 10 min），二抗室温孵育 1 h，洗膜后，ECL 避光反应 3~5 min，用化学发光分析系统观察并扫描图像，利用 Fujifilm Las-4000 分析软件统计目标条带的光密度。

1.2.6 免疫荧光细胞化学染色

将 0、10、20、40 μmol/L 姜黄素处理 24 h 的 LoVo 细胞爬片，用生理盐水冲洗 2 遍，参照秦永伟等的方法[12]，加入 4%甲醛固定液室温固定 1 h 后，用牛血清蛋白封闭非特异性结合位点；特异性兔抗人 c-myc 抗体 37 ℃孵育 40 min，荧光素标记二抗（羊抗兔 IgM）37 ℃孵育 40 min，缓冲甘油封片，荧光显微镜成像系统成像。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析，数据均以平均值±标准差（$\bar{x}$±SD）表示。计量资料经方差齐性检验为方差齐性，两组间差异采用 t 检验，多组资料应用单因素方差分析。P<0.05 被认为结果具有统计学显著性。

2 结果与讨论

2.1 光镜下观察细胞形态的变化

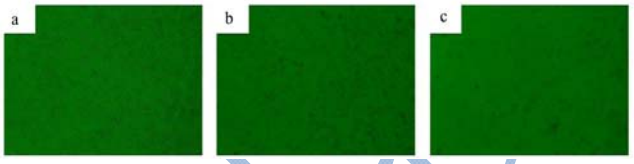


图 1 姜黄素作用 48 h 对 LoVo 细胞形态的影响（×100）

Fig.1 The effects of morphology of LoVo cells treated with curcumin for 48 h

注：a：空白对照组 LoVo 细胞培养 48 h；b：20 μmol/L 姜黄素处理 LoVo 细胞 48 h；c：40 μmol/L 姜黄素处理 LoVo 细胞 48 h。

倒置显微镜下可以观察到正常培养的阴性对照组 LoVo 细胞生长状态良好，多呈梭形或多角形，表面有细长的足突，胞质均匀透明，贴壁生长，随培养时间延长形态基本变化不大。不同浓度姜黄素对 LoVo 细胞的作用也不相同，主要表现在对细胞的贴壁能力、集落性及细胞形态和大小影响不同。随着姜黄素浓度的增加和作用时间的延长，活细胞数逐渐减少，细胞膜出现皱缩，细胞表面细长足突回缩，胞体皱缩、变圆，间隙增宽，有的细胞甚至出现胞膜出芽，细胞体积也有所变小，可见较多的凋亡细胞，部分细胞脱落、漂浮于培养液中，见图 1（细胞形态观察结果为三次重复实验的最终结果）。

2.2 姜黄素对 LoVo 细胞增殖的抑制作用

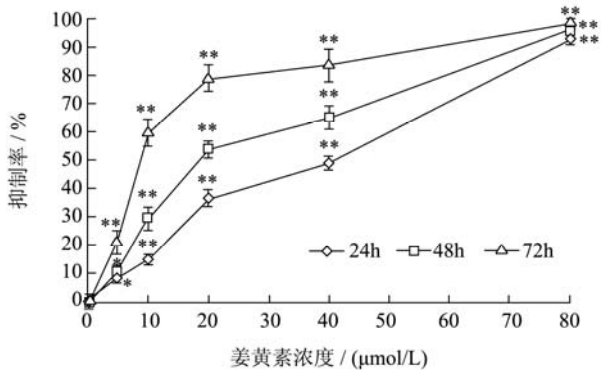


图 2 姜黄素对 LoVo 细胞生长增殖的抑制作用

Fig.2 The effects of curcumin on the growth and proliferation of LoVo cells

Note: Time×concentration interaction was significant (*P< 0.05 and **P<0.01 vs control).

测定经过倍比稀释浓度的姜黄素在不同时间点对 LoVo 细胞生长的抑制作用，分别绘出生长抑制曲线，得出在 24、48 和 72 h 对 LoVo 细胞抑制的 IC_{50} 分别为（26.45±0.41）、（19.13±0.09）和（10.12±0.04）μmol/L；随着姜黄素浓度和处理时间的延长，姜黄素对 LoVo 细胞的抑制率逐渐增加（P<0.05），呈浓度和时间依赖效应，见图 2。

2.3 姜黄素对 LoVo 细胞凋亡基因 mRNA 表达水平的影响

应用 RT-PCR 技术检测结果如图 3 和表 1 所示。Bcl-2 基因家族是目前很受重视的细胞凋亡调控基因家族，是线粒体途径诱导细胞凋亡的调控中心[13]。凋亡抑制基因 Bcl-2 与凋亡促进基因 Bax 可形成异源二聚体，两者的比例关系与凋亡调控相关，直接决定着细胞的凋亡与否[14~15]。与对照组相比，20、40 和 80 μmol/L 姜黄素作用 LoVo 细胞 24 h 后，能够显著降低凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达（P<0.05），20、40 和 80 μmol/L 姜黄素可以提高促凋亡基因 Bax 的表达（P<0.05），且还发现 Bcl-2/Bax 值显著降低。

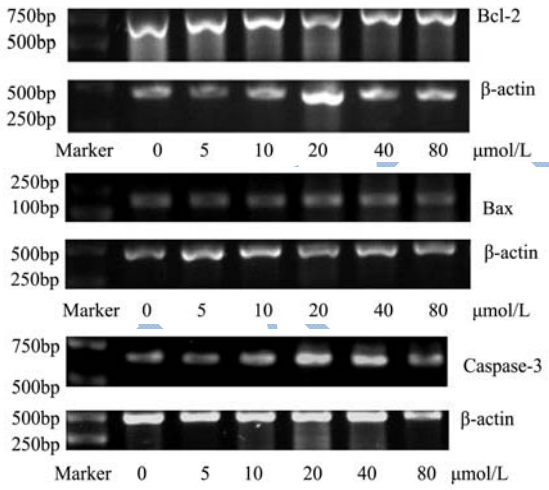


图 3 姜黄素对 LoVo 细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 基因 mRNA 表达的影响

Fig.3 Effects of curcumin on mRNA expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 genes in LoVo cells

Caspase-3 是一个重要的凋亡效应子[16~20]，能被上游始动子激活，作用于特异性底物使细胞发生生化改变和形态学改变，引起细胞凋亡。结果显示，20、40 和 80 μmol/L 姜黄素作用 LoVo 细胞 24 h 后，相对于对照组，能够显著提高促凋亡因子 Caspase-3 的表达（P<0.05），呈现一定的浓度依赖效应。

表 1 姜黄素对 LoVo 细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 基因表达的影响

Table 1 Effects of curcumin on expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 genes in LoVo cells

Curcumin /(μg/mL)	Bcl-2 /β-actin	Bax /β-actin	Caspase-3 /β-actin	Bcl-2 /Bax
0	1.21±0.06	0.54±0.01	0.38±0.07	2.24
5	1.30±0.14	0.53±0.03	0.40±0.03	2.45
10	1.01±0.12	0.56±0.05	0.51±0.04	1.80
20	0.72±0.07[b]	0.76±0.03[b]	0.73±0.05[a]	0.95
40	0.68±0.04[a]	0.72±0.05[b]	0.61±0.03[b]	0.94
80	0.61±0.04[a]	0.80±0.04[a]	0.78±0.04[a]	0.76

注：与对照组相比，[a]P<0.01，[b]P<0.05。

2.4 细胞凋亡率的检测

Annexin V/PI 双标后流式细胞仪检测结果显示，在经过 5、10、20、40 和 80 μmol/L 不同浓度的姜黄素处理 24 h 后，姜黄素能诱导 LoVo 细胞凋亡，其细胞凋亡率随姜黄素浓度递增而增加（P<0.05），呈现剂量依赖性凋亡。作用 48 h 其细胞凋亡率峰值浓度为 40 μmol/L，之后增加药物浓度其凋亡率反而下降（P<0.05）。这可能是高作用强度的姜黄素对肿瘤细胞产生直接的杀伤作用，肿瘤细胞在被诱导凋亡之前就被姜黄素杀死（依据作用强度=药物浓度×作用时间推导）。实验表明诱导细胞凋亡是低浓度姜黄素抑制 LoVo 细胞增殖的主要机制之一。诱导凋亡是姜黄素抗肿瘤作用的一个重要机制[21]。但是，不同报道显示，姜黄素诱导细胞凋亡的效应在不同细胞系中所得的结果差别较大，甚至相反[3~4, 22]。这种差异的原因目前还不清楚，有待进一步研究。

2.5 姜黄素对 LoVo 细胞 c-myc 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示，在对照组中，c-myc 高表达；与对照组相比，姜黄素能下调 c-myc 的表达，其中 40 和 80 μmol/L 姜黄素处理组能显著抑制 c-myc 的表达（P<0.01）与对照组相比，40 和 80 μmol/L 的姜黄素抑制 c-myc 蛋白表达降低到了 0.16 和 0.22 倍，见图 4。

2.6 姜黄素对 LoVo 细胞中荧光标记 c-myc 表达的影响

用兔抗人 c-myc 单克隆抗体检测人结肠癌细胞

LoVo 中 c-myc 的表达，阴性对照组 c-myc 的表达呈强阳性，与对照相比，10 和 20 μmol/L 姜黄素处理组可见逐渐减弱的红色荧光，个别细胞部位很强，阳性细胞同对照比占到了 85%和 65%。LoVo 细胞中 c-myc 阳性表达呈现下降趋势，见图 5（细胞形态观察结果为三次重复实验的最终结果）。

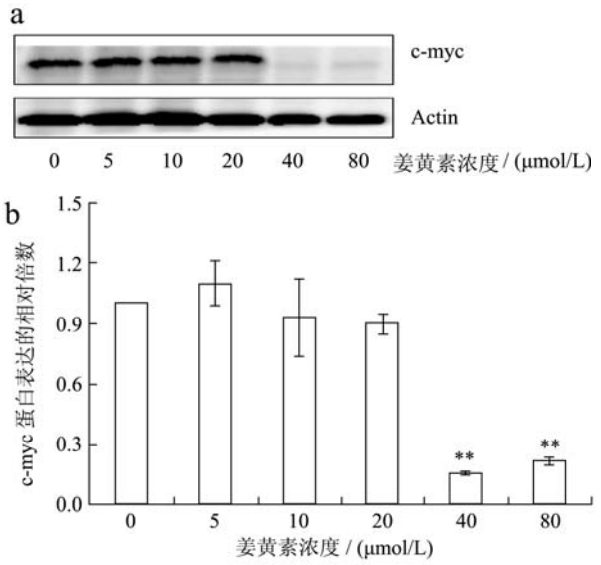


图 4 姜黄素对 LoVo 细胞 c-myc 表达的影响

Fig.4 Effect of curcumin on expression of c-myc in LoVo cells

注：a：免疫印迹检测 c-myc 蛋白表达水平；b：c-myc 条带扫描光密度结果与空白对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

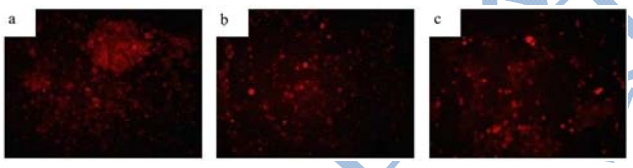


图 5 人 LoVo 细胞的 c-myc 免疫荧光染色（×200）

Fig.5 Immunofluorescence of c-myc in human LoVo cells

注: a: 空白对照组; b: 20 μmol/L 姜黄素处理; c: 40 μmol/L 姜黄素处理。

c-myc 是定位在人类第 8 号染色体的一种基因，编码 2 个核酸蛋白（p62 和 p63），其在不同类型细胞中的不同时期或不同组织细胞中的不同时期的表达均不相同。c-myc 基因与鸟类逆转录病毒 MC-29 的 v-myc 基因同源，所以被认为是癌基因（v-myc 能诱发多种肿瘤）[23]，并在造血系统及其它系统肿瘤中得到证实。作为原癌基因，c-myc 的激活可导致细胞无限增殖，与肿瘤的发生发展密切相关，其在结肠癌中高度表达[24]，western blotting 和免疫荧光化学染色结果提示，姜黄素可使 c-myc 蛋白的表达量显著下降，推测通过该蛋白显著下调，来抑制结肠癌细胞增殖，进而诱导细胞发生凋亡。

3 结论

姜黄素可显著抑制结肠癌细胞 LoVo 的生长、增殖，并呈现剂量和时间效应关系，并使 LoVo 细胞发生形态学改变，进而诱导 LoVo 细胞发生凋亡，表现出典型的凋亡细胞特征。另外，姜黄素可显著激活 Bax 和 Caspase-3 基因 mRNA 的表达，抑制 Bcl-2 基因 mRNA 表达，同时抑制 c-myc 蛋白的表达，从而使 LoVo 细胞发生凋亡，这说明姜黄素诱导 LoVo 细胞凋亡与调控 Bax、Bcl-2 和 c-myc 表达，激活 Caspase-3 信号通路有关。随着对姜黄素药理作用的深入研究及对其作用机制的进一步阐明，姜黄素这一传统中药必将为癌症的临床治疗发挥更大的作用。

参考文献

[1] Sharma R A, Gescher A J, Steward W P. Curcumin: the story so far [J]. Eur. J. Cancer, 2005, 41(13):1955-1968

[2] Shishodia S, Chaturvedi M M, Aggarwal B B. Role of curcumin in cancer therapy [J]. Curr. Probl. Cancer, 2007, 31(4): 243-305

[3] Somasundaram S, Edmund N A, Moore D T, et al. Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer [J]. Cancer research, 2002, 62(13): 3868-3875

[4] Imaida K, Tamano S, Kato K, et al. Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(3):467-472

[5] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years [J]. J. Nat. Prod., 2007, 70(3): 461-477

[6] Xu G, Ren G, Xu X, et al. Combination of curcumin and green tea catechins prevents dimethylhydrazine- induced colon carcinogenesis [J]. Food Chem. Toxicol., 2010, 48, 390-395

[7] Nautiyal J, Banerjee S, Kanwar S S, et al. Curcumin enhances dasatinib-induced inhibition of growth and transformation of colon cancer cells [J]. Int. J. Cancer, 2011, 128: 951-961

[8] Martin R C, Aiyer H S, Malik D, Li Y. Effect on pro-inflammatory and antioxidant genes and bioavailable distribution of whole turmeric vs curcumin: Similar root but different effects [J]. Food Chem. Toxicol., 2012, 50, 227-231

[9] Yamaue H, Tanimura H, Nakamori M, et al. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay [J]. Diseases of the colon & rectum, 1996, 39(4): 416-422

[10] 刘扬清,高勇,万一元,等.大蒜素对结肠癌LoVo细胞增殖的影响[J].临床肿瘤学杂志,2009,14(2):139-143
LIU Yang-qing, GAO Yong. Effect of allicin on proliferation of colon cancer LoVo cell line in vitro [J]. Chinese Clinical Oncology, 2009, 14(2): 139-143

[11] 刘安军,方菁菁,马姗婕.乳腺癌疫苗中肿瘤抗原的鉴定[J].现代食品科技,2013,29(8):1751-1760
LIU An-jun, FANG Jing-jing, MA Shan-jie. Identification of Tumor Antigen in the Breast Cancer Vaccine [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1751-1760

[12] 秦永伟,沈爱国,王海波,等.LPS 对大鼠雪旺氏细胞 TNF-α 合成和释放的影响[J].中国免疫学杂志,2007, 23(11): 1004-1008
QIN Yong-Wei,SHEN Ai-Guo, WANG Hai-bo, et al. Effect of LPS on TNFs synthesis and release in rat Schwann cells [J]. Chinese Journal of Immunology, 2007, 23(11): 1004-1008

[13] Reed J C. Bcl-2 family proteins [J]. Oneogene, 1998, 17(25): 3225-3236

[14] Sun L, Xie P, Wada J, et al. Rap1b GTPase ameliorates glucose-induced mitochondrial dysfunction [J]. J. Am. Soc. Nephrol., 2008, 19(12): 2293-2301

[15] Li J, Sun G Z, Lin H S, et al. The herb medicine formula "Yang Wei Kang Liu" improves the survival of late stage gastric cancer patients and induces the apoptosis of human gastric cancer line through Fas/Fas ligand and Bax/Bcl-2 pathways [J]. Int. Immuno. Pharmacol., 2008, 8(9): 1196-1206

[16] Nieholson D W, Thornberry N A. Caspases: killer proteases [J]. Trends Bioehem. Sci., 1997, 22(8): 299-306

[17] Rotonda J, Nicholson D W, Fazil K M, et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis [J]. Nat. Struct. Biol., 1996, 3(7): 619-625

[18] Nicholson D W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(11): 1028-1042

[19] Muzio M, Stockwell B R, Stennicke H R, et al. An induced proximity model for caspase-8 activation [J]. J. Biol. Chem., 1998, 273(5): 2926-2930

[20] Yang J, Chang H Y, Baltimore D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(5381): 1355-1357

[21] Kuo M L, Huang T S, Lin J K. Curcumin, an antioxidant and antitumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells [J]. Bioehim. Biophys. Acta., 1996, 1317(2): 95-100

[22] Cory S, Adams J M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. Nat. Rev. Cancer, 2002, 2(9): 647-656

[23] Ryan K, Birnie G. Myc oncogenes: the enigmatic family [J]. Biochem. J., 1996, 314(Pt3): 713-721

[24] Arango D, Mariadason J M, Wilson A J, et al. c-Myc overexpression sensitises colon cancer cells to camptothecin-induced apoptosis [J]. British Journal of Cancer, 2003, 89(9): 1757-1765