论著

文章编号:1000-5404(2014)02-0110-05

依布硒诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡及其机制的研究

张 亮,杜 佳,周立为,程 燚,王 东,谢家印 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 探讨依布硒对多发性骨髓瘤细胞增殖、凋亡的影响及其机制。**方法** 应用 CCK-8 法观察不同浓度依布硒作用于人多发性骨髓瘤细胞株 U266 细胞 8、24、48、72 h 后细胞活力及增殖情况,同时应用 Hoechst 染色检测细胞凋亡,JC-1检测细胞线粒体膜电位,ROS 探针观察依布硒对细胞内活性氧的影响,Western blot 检测 Bcl-2、Bax、细胞色素 C 等凋亡相关蛋白及 Caspase9 激活情况。**结果** 依布硒能够显著抑制多发性骨髓瘤细胞增殖,并诱导细胞凋亡,40 μmol/L 依布硒使凋亡率达(80.8±3.9)%;同时依布硒能升高细胞内 ROS 水平,降低线粒体膜电位;此外依布硒可诱导细胞色素 C 从线粒体向胞浆释放但并不激活 Caspase9。**结论** 依布硒可诱导多发性骨髓瘤细胞发生非 Caspase 依赖的细胞凋亡,其机制可能与 ROS 水平升高有关。

[关键词] 依布硒;多发性骨髓瘤;凋亡;活性氧
[中图法分类号] R393-361;R733.3;R977.5 [文献标志码] A

Ebselen induces apoptosis in human multiple myeloma cell line U226

Zhang Liang, Du Jia, Zhou Liwei, Cheng Yi, Wang Dong, Xie Jiayin (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 4000042, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of ebselen on the proliferation and apoptosis in multiple myeloma (MM) cells and its probably mechanism. Methods Cell viability of human MM cell line U266 was examined by CCK-8 assay kit after treated by ebselen at 0, 5, 10, 20, 25, 30, 35 and 40 μmol/L for 8, 24, 48 or 72 h. The production of reactive oxygen species (ROS) was measured by Singlet ROS Probe. JC-1 dye was used to assay the mitochondrial membrane potential (△Ψm). The apoptosis assay was done through Hoechst staining. The protein levels of Bcl-2, Bax, caspase 9 and cytochrome C were detected by Western blotting. Results Ebselen was found to significantly decrease cell viability and increase apoptosis accompanied by enhancing production of ROS in U266 cells. Further studies revealed cytochrome C was released from the mitochondria to cytosol accompanied by mitochondrial membrane potential △Ψm decrease, while caspase 9 was not observed to be activated. Conclusion Ebselen may enhance the production of endogenous ROS, and induce MM cell apoptosis *via* mitochondria-mediated apoptotic pathway.

[**Key words**] ebselen; multiple myeloma; apoptosis; reactive oxygen species

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81172258). Corresponding author: Xie Jiayin, Tel: 86-23-68757157, E-mail: xiejia505@sina.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)是一种以骨髓内外浆细胞异常增生为特征的克隆性 B 细胞恶性肿瘤[1]。该疾病临床表现以骨损害、肾损害为主,具有难治、易复发等特点。其发病率占所有恶性肿瘤1%,血液系统肿瘤 10%,好发于老年人,中位发病年龄为65岁[2]。随着我国人口结构逐渐步入老龄化,罹患该病人群数量不断上升。虽然以硼替佐米为代表的蛋白酶体抑制剂应用于临床后,该病治疗有了很大的进展,但难治、复发、耐药等问题仍未解决,多发性骨髓瘤仍是一种无法治愈的疾病,因此,针对该病的新药研发具有重要意义。

依布硒[ebselen 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one]是一种人工合成的含硒有机化合物,具有抗炎、抗氧化功能,收录于美国国立卫生研究院(NIH)分子库,被认为是一种安全但未被临床证明使用的药物[3]。早期研究[4]证明依布硒能够通过清除细胞内氧自由基(ROS),抑制脂质过氧化等过程保护多种组织细胞。近期研究发现,依布硒的生物活性并不局限于 ROS 清除作用,其潜在的临床应用范围不断扩大:Singh 等[5]研究证实依布硒能够模拟锂离子发挥抗躁

[基金项目] 国家自然科学基金(81172258)
[通信作者] 谢家印,电话:(023)68757157,E-mail:xiejia505@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131011.1728.004.html(2013-10-11)

狂作用;Wang 等[6]提出依布硒能够应用于胰岛素分泌失调;Okoh 等[7]证实依布硒能够抑制 4-羟基雌二醇诱导的乳腺上皮细胞癌变。另有一些基于人类肿瘤细胞的研究[8-9]表明较高浓度的依布硒对多种肿瘤细胞均有杀伤作用,考虑已有多项研究[10-11]证实依布硒能够减低常用化疗药物及放射治疗的毒副作用,且 Lynch 等[12]通过动物实验证实依布硒和别嘌呤醇联用能够在减低多顺铂药物副作用的同时增强其抗肿瘤效应,因此,依布硒具有成为理想的抗肿瘤或辅助抗肿瘤药物的潜能。本研究拟探讨依布硒对多发性骨髓瘤细胞增殖与凋亡影响并对其机制进行初步研究,以期为依布硒应用于多发性骨髓瘤临床治疗提供部分基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基购于 HyClone 公司,胎牛血清购于 Gibco 公司。Ebselen、N-乙酰半胱氨酸(NAC)购于 Sigma 公司,CCK8、JC-1、还原型谷胱甘肽(GSH)、儿茶水和素(Catechin hydrate)、硫辛酸(Lipoic acid)和线粒体分离试剂盒均购于碧云天公司,Hoechst 与 Singlet ROS Probe 购于 Invitrogen 公司,抗体 Bcl-2 购于 Thermo 公司,Bax 和细胞色素 C 购于碧云天公司,aspase9 cleaved 购于 Cell signaling。

1.2 细胞培养

人多发性骨髓瘤细胞株 U266 细胞培养于含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基培养中,培养条件为 37 ℃、5% CO_2。

1.3 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期 U266 细胞,按每孔 5×10^3 个细胞数量接种 96 孔板,共 24 孔,每孔终体积 200 μL,加入依布硒使其浓度分别达到 0、5、10、20、25、30、35、40 μmol/L,另接种无细胞空白对照孔,按此法重复接种 96 孔板共 4 块,放入细胞培养箱内培养。8 h 后取出一块 96 孔板,每孔加入 CCK-8 试剂使 CCK-8 浓度为 10%,混匀后放回细胞培养箱继续培养,4 h 后用酶联仪检测波长 450 nm 处各孔光密度值[D(450)],计算细胞活力。于 24、48、72 h 重复上述过程,计算细胞活力。

1.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将 U266 细胞按每孔 2×10^5 个细胞数量接种 12 孔板,每孔终体积 1 mL,共 4 孔。加入依布硒使各孔药物浓度分别为 0、10、20、40 μmol/L,混匀后放入细胞培养箱内培养,4 h 后分别收集细胞,PBS 洗涤,2 次,用含 Hoechst33258 浓度为 50 μg/mL 的 PBS 重悬细胞,室温避光 5 min,PBS 洗涤 2 次,调整好细胞密度涂于载玻片上在荧光显微镜下观察。

1.5 ROS 探针检测活性氧

将 U266 细胞用浓度为 0、1、5、10、20、40 μmol/L 依布硒处理 2 h,另用 40 μmol/L 依布硒分别处理细胞 0、0.5、1、2、4 h,PBS 分别洗涤细胞 2 遍,用浓度为 5 μg/mL 的 Singlet ROS Probe PBS 溶液 200 μL 重悬细胞,37 ℃避光孵育 30 min 后 PBS 洗涤 2 遍,分别用流式细胞仪和荧光显微镜检测平均荧光强度。

另将 U266 细胞分成 5 组,分别用 GSH(3 mmol/L)、NAC(15 mmol/L)、儿茶水合素(100 μg/mL)、硫辛酸(100 μmol/L)及等体积 PBS(对照)预处理 2 h,再将各组分别分成 40 μmol/L 依布硒处理和未处理 2 组,药物作用 2 h 后再用上述方式加载 ROS 探针,用流式细胞仪对各样品平均荧光强度进行检测分析。

1.6 JC-1 检测细胞线粒体膜电位

将 U266 细胞用浓度为 40 μmol/L 的依布硒处理 2 h,而后 PBS 洗涤 2 遍,用浓度为 10 μg/mL 的 JC-1 PBS 溶液 200 μL 重悬细胞,37 ℃避光孵育 30 min 后 PBS 洗涤 2 遍,调整细胞浓度后将细胞悬液均匀涂于载玻片,在荧光显微镜下观察红色荧光和绿色荧光。

1.7 细胞线粒体和胞浆分离

将 U266 细胞按照 1×10^6/mL 浓度接种于 4 只 100 mm 细胞培养皿内,每皿终体积 8 mL,分别用浓度为 0、40 μmol/L 依布硒处理细胞 4 h 后,PBS 洗涤细胞 2 次,按照线粒体分离试剂盒说明书分别提取线粒体和胞浆蛋白。

1.8 Western blot 检测凋亡相关蛋白

细胞处理同活性氧检测,PBS 洗涤细胞 2 次后加入细胞裂解液,提取细胞总蛋白,将蛋白用 10% Page 胶电泳分离后转移至 PVDF 膜,10% 脱脂奶粉溶液封闭后根据蛋白分子大小敷一抗,抗体浓度 Bax、Bcl-2、Caspase9、COXⅣ、细胞色素 C(Cyt C)均为 1∶500,β-actin 为 1∶5 000,4 ℃过夜后敷相应二抗,二抗浓度为 1∶3 000,37 ℃孵育 1 h 后进行发光显影。检测 Caspase 9-cleaved 表达时应用 10 μmol/L 依托泊苷处理后的人宫颈癌细胞株 Hela 蛋白提取物做阳性对照。检测 Cyt C 表达时应用 COXⅣ蛋白作为线粒体蛋白的内参。

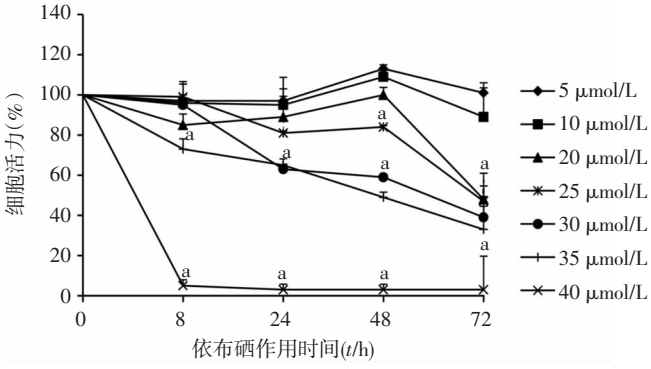
1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 19.0 软件分析,两组间比较采用独立样本 t 检验分析,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 依布硒对多发性骨髓瘤细胞活力的影响

不同浓度依布硒分别作用 U266 细胞 8、24、48、72 h 后,细胞活力随着依布硒浓度的增高和作用时间的延长逐渐减低,当依布硒浓度达到 40 μmol/L 时,作用仅 8 h 后细胞活力即下降 90% 以上(图 1)。

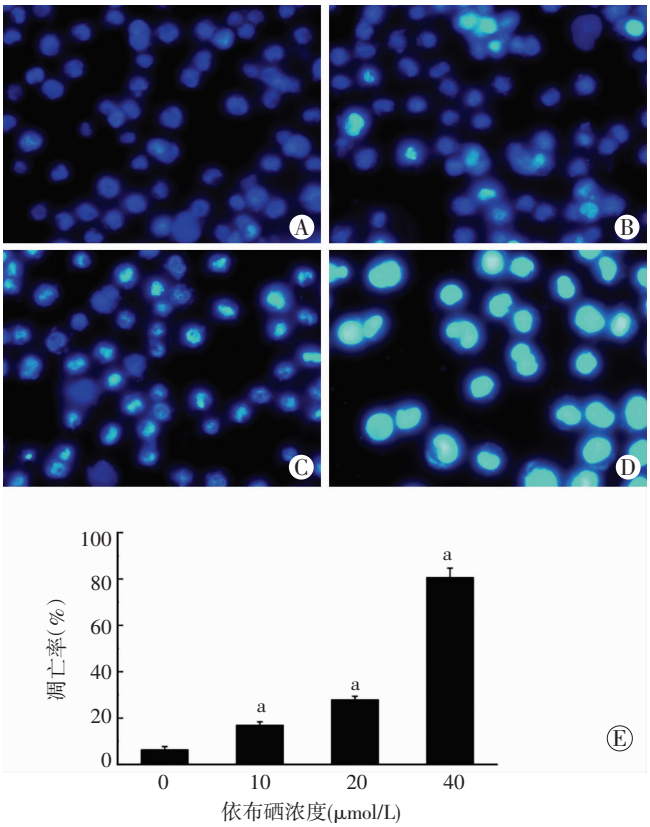


a: $P<0.05$,与 0 h 时比较

图 1 CCK-8 法检测依布硒对 U266 细胞活力的影响

2.2 依布硒对多发性骨髓瘤细胞凋亡的影响

Hoechst染色结果显示,不同浓度依布硒作用于U266细胞4 h后,细胞核凝聚,荧光强度增强,呈现典型的凋亡特征。且随着浓度增高,凋亡阳性细胞数目逐渐增加,当依布硒浓度达到40 μmol/L时,细胞凋亡率达到(80.8±3.9)%,见图2。



A~D: Hoechst染色(×100);A:对照;B:10 μmol/L依布硒;C:20 μmol/L依布硒;D:40 μmol/L依布硒;E:不同浓度依布硒处理后U266细胞凋亡率 a:$P<0.05$,与0 μmol/L依布硒(对照)比较

图2 Hoechst染色检测不同浓度依布硒作用于U266细胞4 h后凋亡情况

2.3 依布硒对U266细胞ROS的影响

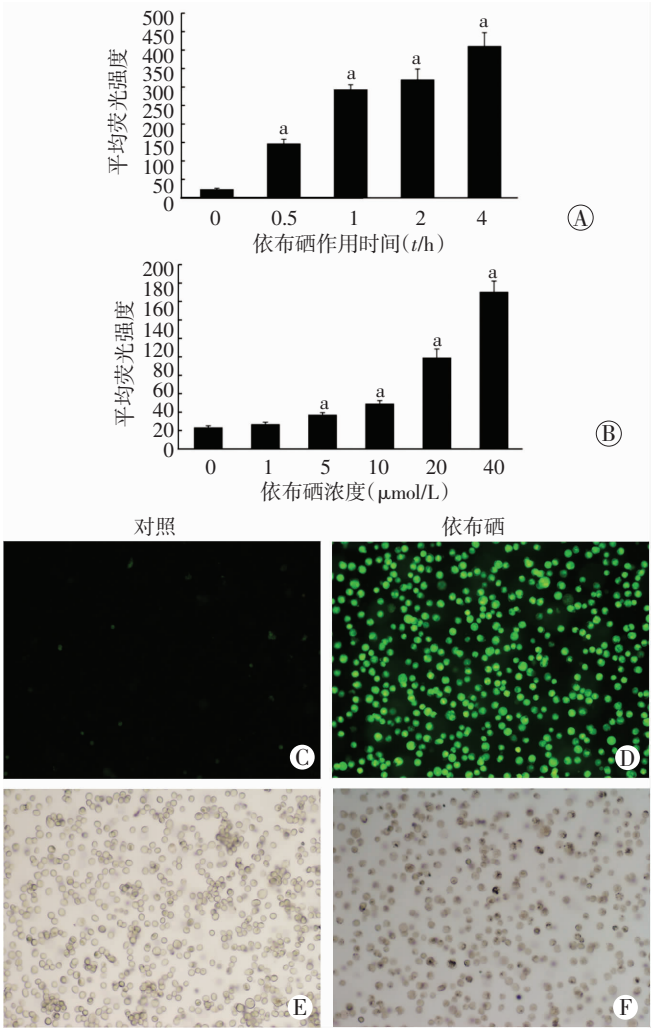
活性氧探针检测结果显示依布硒能明显提高U266细胞内ROS水平,且这种作用呈浓度和时间依赖性(图3A、B)。荧光显微镜下观察40 μmol/L依布硒处理细胞4 h加载ROS探针后细胞绿色荧光强度较对照组明显增强(图3C~F)。

2.4 依布硒对U266细胞线粒体膜电位的影响

40 μmol/L依布硒作用于U266细胞2 h后,通过JC-1检测线粒体膜电位发现依布硒处理后细胞内绿色荧光较对照组明显增强,红色荧光则明显减弱,说明依布硒能明显降低U266细胞线粒体膜电位(图4)。

2.5 依布硒对U266细胞凋亡相关蛋白的影响

Western blot检测发现依布硒处理后的U266细胞,抗凋亡蛋白Bcl-2随着依布硒浓度增加而表达量逐渐上升(图5A),促凋亡蛋白Bax呈现出与Bcl-2相反的趋势,即表达量逐渐减少(图5B)。在40 μmol/L依布硒作用4 h后,U266细胞线粒体内的细胞色素C蛋白释放到胞浆,呈现出线粒体内减少胞浆内增多的趋势(图5C)。而Caspase 9在依布硒诱导的U266凋亡中并没有被发现激活(图5D)。



A: 40 μmol/L依布硒作用不同时间对U266细胞内ROS的影响 a:$P<0.05$,与0 h比较;B:不同浓度依布硒作用2 h对U266细胞内ROS的影响 a:$P<0.05$,与0 μmol/L依布硒(对照)比较;C~F:40 μmol/L依布硒作用于U266细胞4 h后荧光显微镜下观察荧光强度(×40)

图3 依布硒对U266细胞内ROS水平的影响

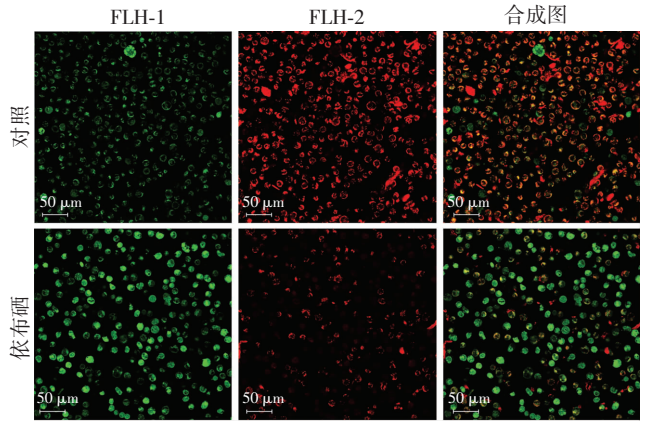
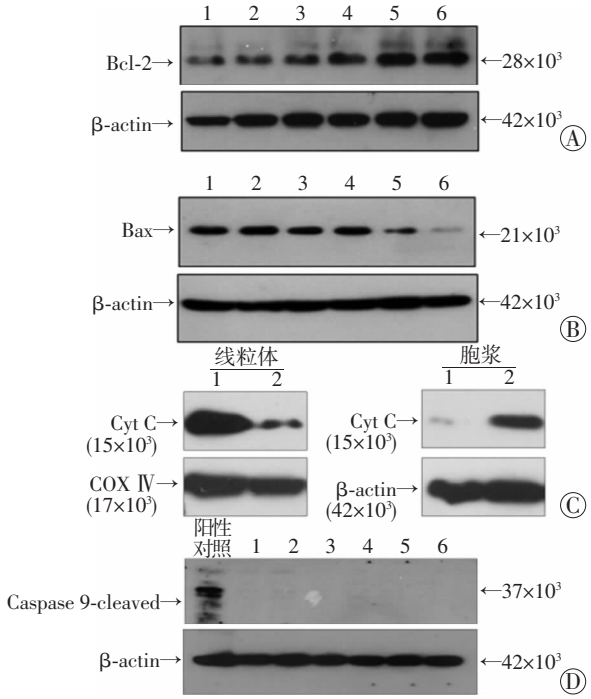


图4 JC-1检测40 μmol/L依布硒对U266细胞线粒体膜电位的影响



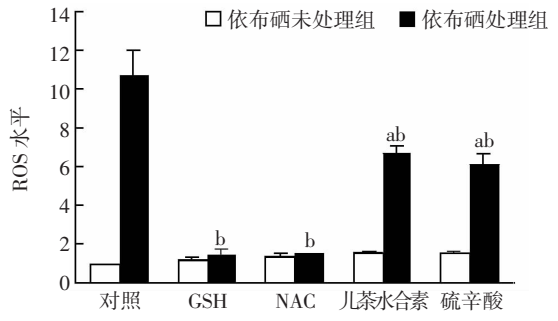
1～6：分别为依布硒 0、1、5、10、20、40 μmol/L

A：不同浓度依布硒作用 4 h 对 U266 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响；B：不同浓度依布硒作用 4 h 对 U266 细胞 Bax 蛋白表达的影响；C：依布硒处 4 h 后 U266 细胞线粒体和胞浆内细胞色素 Cyt C 的变化 1：0 μmol/L 依布硒；2：40 μmol/L 依布硒；D：不同浓度依布硒对 U266 细胞内 Caspase 9 激活情况的影响

图 5 Western blot 检测依布硒对 U266 细胞凋亡相关蛋白的影响

2.6 抗氧化剂对依布硒促 ROS 的影响

以与对照中依布硒未处理荧光强度的比值反映 ROS 的水平，结果见图 6。应用 GSH、NAC 预处理细胞 2 h 能完全拮抗依布硒对细胞内 ROS 的影响；硫辛酸和儿茶水合素能降低 ROS 水平，但不能完全拮抗依布硒促 ROS 的作用。



a：$P<0.05$，与依布硒未处理组比较；b：$P<0.05$，与对照中依布硒处理组比较

图 6 抗氧化剂预处理 2 h 40 μmol/L 依布硒对 U266 细胞 ROS 水平的影响

3 讨论

本研究发现依布硒能够诱导多发性骨髓瘤细胞株 U266 凋亡，且 ROS 在其中发挥重要作用。细胞内 ROS 主要来源于线粒体内膜上呼吸链电子传递过程，在细胞内氧化还原调节系统的调节下 ROS 水平处于动态平衡，ROS 在细胞中可以发挥信号因子作用参与调节细胞增殖、分化、凋亡等各种生命进程[13]。病理条件下，细胞内 ROS 生成过多或清除过少，过量 ROS 引起氧化应激，破坏细胞内 DNA，蛋白质等重要大分子，扰乱线粒体、内质网等重要细胞器功能，启动细胞凋亡途径，最终使细胞死亡[14]。有研究[15]证实，肿瘤细胞内 ROS 水平高于正常细胞，这使其较正常细胞更容易达到 ROS 致死水平阈值，这为临床应用提高细胞 ROS 水平选择性杀伤肿瘤细胞治疗策略提供了理论依据。另一方面，高水平 ROS 可能是肿瘤细胞维持恶性增殖与耐药的重要分子基础，因此，一些抗氧化剂可能通过降低肿瘤细胞内 ROS 水平发挥预防和抑制肿瘤的作用[16-17]。

依布硒作为传统的抗氧化剂，其在诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡过程中没有发挥抗氧化活性反而展现出强大的促氧化功能，其机制可能与依布硒浓度密切相关。依布硒自身没有抗氧化功能，其发挥抗氧化活性要依赖细胞自身的氧化还原体系，主要为 GSH 和 Trx 系统。依布硒在细胞内首先作为 GSH 和 Trx 系统的底物被还原成硒醇化合物，或二联硒化合物，而后发挥 GSH 和 Trx 过氧化物酶模拟物的活性，催化提高细胞自身抗氧化能力，同时自身氧化成依布硒形式[18]。因此，我们推测较高浓度的依布硒首先将细胞自身具有氧化还原功能的蛋白消耗殆尽，无法清除细胞正常产生的 ROS。另一方面，依布硒能够自由通过线粒体膜，通过氧化线粒体内含巯基基团抑制呼吸链复合体[19]，损害线粒体功能，增加 ROS 生成，最终造成细胞内 ROS 蓄积升高使细胞凋亡。但依布硒浓度的高低是相对的，不同细胞对同一浓度依布硒的反应存在差异。因此，有的研究应用 40 μmol/L 甚至更高浓度的依布硒作为抗氧化剂[20]，依布硒这种具有细胞选择性的促氧化作用机制值得进一步探讨。

本研究利用不同的抗氧化剂预处理细胞后检测 40 μmol/L 依布硒对 ROS 水平的影响，结果发现 GSH 和 NAC（含巯基化合物，均是细胞内氧化还原体系的组成部分）能够完全拮抗依布硒的促氧化作用，而儿茶水合素（一种植物来源的天然抗氧化剂）和硫辛酸（细胞内天然存在的抗氧化剂，是多种酶复合物的辅酶）仅能部分降低 ROS 水平，不能完全拮抗依布硒的促氧化作用。我们推测依布硒是或至少部分是通过破坏细胞自身的氧化还原体系，造成 ROS 水平升高进而诱导细胞凋亡的。

凋亡是细胞程序性死亡的一种形式，是机体自身清除老化、受损细胞维持正常新陈代谢的重要手段，细

胞凋亡过少或者过度均会引发多种疾病[21]。研究[22]证实肿瘤的发生、发展与凋亡异常密切相关,干预凋亡途径,诱发肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的重要手段。线粒体是凋亡途径中重要的细胞器,线粒体损伤是凋亡早期事件[23]。本研究发现依布硒诱导U266凋亡过程中,细胞线粒体膜电位显著下降,说明依布硒对线粒体有损害的作用。Bcl-2家族蛋白是细胞内调控凋亡的一类膜相关蛋白,其中Bax通过在细胞内质膜结构上打孔而促进凋亡,Bcl-2则通过与Bax形成复合物阻断其功能而抑制凋亡[24]。通过实验我们发现依布硒处理后U266细胞内Bcl-2表达增加,Bax表达降低。这表明Bcl-2和Bax可能不是依布硒促凋亡过程中的关键蛋白。细胞色素C从线粒体释放到胞浆是凋亡途径中十分关键的一步。正常细胞的细胞色素C定位于线粒体,是呼吸链的组成部分,当细胞受到致死性打击触发凋亡时细胞色素C会从线粒体释放到胞浆,在胞浆中激活Caspase系统,裂解胞浆内重要蛋白,最终使细胞凋亡[25]。本实验检测到了细胞色素C从线粒体向胞浆释放,但没有检测到Caspase 9被激活,因此,依布硒诱导的可能是一种非Caspase依赖的凋亡。

本研究通过研究依布硒对多发性骨髓瘤细胞株U226增殖、凋亡的影响,发现依布硒能够抑制U266细胞增殖并诱导细胞凋亡。进一步研究提示依布硒促凋亡作用与细胞内ROS水平增高密切相关,依布硒可能通过损害细胞自身氧化还原体系,造成ROS增加并最终诱导细胞发生非Caspase依赖的凋亡,这为依布硒走向临床成为治疗多发性骨髓瘤的药物提供了初步的理论基础。

参考文献:

[1] Mahindra A, Hideshima T, Anderson K C. Multiple myeloma: biology of the disease[J]. Blood Rev, 2010, 24(Suppl 1): S5 - S11.

[2] Rajkumar S V. Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. Am J Hematol, 2012, 87(1): 78 - 88.

[3] Austin C P, Brady L S, Insel T R, *et al*. NIH Molecular Libraries Initiative[J]. Science, 2004, 306(5699): 1138 - 1139.

[4] Chew P, Yuen D Y, Stefanovic N, *et al*. Antiatherosclerotic and renoprotective effects of ebselen in the diabetic apolipoprotein E/GPx1-double knockout mouse[J]. Diabetes, 2010, 59(12): 3198 - 3207.

[5] Singh N, Halliday A C, Thomas J M, *et al*. A safe lithium mimetic for bipolar disorder[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1332.

[6] Wang X, Yun J W, Lei X G. Glutathione Peroxidase Mimic Ebselen Improves Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Murine Islets[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, [Epub ahead of print].

[7] Okoh V O, Felty Q, Parkash J, *et al*. Reactive oxygen species via redox signaling to PI3K/AKT pathway contribute to the malignant growth of 4-hydroxy estradiol-transformed mammary epithelial cells[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e54206.

[8] Guerin P J, Gauthier E R. Induction of cellular necrosis by the glutathione peroxidase mimetic ebselen[J]. J Cell Biochem, 2003, 89(1): 203 - 211.

[9] Yang C F, Shen H M, Ong C N. Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 374(2): 142 - 152.

[10] Tak J K, Park J W. The use of ebselen for radioprotection in cultured cells and mice[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(8): 1177 - 1185.

[11] Tripathi D N, Jena G B. Ebselen attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage in mice[J]. Free Radic Res, 2008, 42(11/12): 966 - 977.

[12] Lynch E D, Gu R, Pierce C, *et al*. Combined oral delivery of ebselen and allopurinol reduces multiple cisplatin toxicities in rat breast and ovarian cancer models while enhancing anti-tumor activity[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(5): 569 - 579.

[13] Thannickal V J, Fanburg B L. Reactive oxygen species in cell signaling[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(6): L1005 - L1028.

[14] Simon H U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction[J]. Apoptosis, 2000, 5(5): 415 - 418.

[15] Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy[J]. J Pharm Sci, 2007, 96(9): 2181 - 2196.

[16] Behrend L, Henderson G, Zwacka R M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(Pt 6): 1441 - 1444.

[17] Lamson D W, Brignall M S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies[J]. Altern Med Rev, 1999, 4(5): 304 - 329.

[18] Pearson J K, Boyd R J. Density functional theory study of the reaction mechanism and energetics of the reduction of hydrogen peroxide by ebselen, ebselen diselenide, and ebselen selenol[J]. J Phys Chem A, 2007, 111(16): 3152 - 3160.

[19] Puntel R L, Roos D H, Seeger R L, *et al*. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens[J]. Toxicol *In Vitro*, 2013, 27(1): 59 - 70.

[20] Hassan W, Ibrahim M, Rocha J B. Diphenyl diselenide behaves differently than ebselen under different pH media in rat's liver preparations[J]. Pathol Res Pract, 2010, 206(6): 357 - 360.

[21] Brunelle J K, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 4): 437 - 441.

[22] Allan D J, Howell A, Roberts S A, *et al*. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast[J]. J Pathol, 1992, 167(1): 25 - 32.

[23] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, *et al*. Mitochondria, oxidative stress and cell death[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 913 - 922.

[24] Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, *et al*. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2[J]. Science, 1997, 277(5324): 370 - 372.

[25] Liu X, Kim C N, Yang J, *et al*. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c[J]. Cell, 1996, 86(1): 147 - 157.

(**收稿**:2013-07-31;**修回**:2013-09-03)

(编辑 汪勤俭)