DOI:10.16016/j.1000-5404.202001055

丙戊酸钠通过激活 miR-148a-3p/Mcl-1 通路促进 SH-SY5Y 细胞凋亡

戴旭芳[1,2],闫小晶[3],谢 鹏[3],连继勤[3] 400047 重庆,重庆师范大学:教育科学学院特殊教育系[1],重庆市特殊儿童心理诊断与教育技术重点实验室[2];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院生物化学与分子生物学教研室[3]

[摘要] **目的** 探讨抗癫痫药丙戊酸钠(sodium valproate,VPA)对神经细胞的凋亡诱导作用及相关机制。**方法** 将人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)用不同剂量 VPA 处理,流式分析细胞凋亡水平变化,Western blot 检测 Mcl-1 蛋白水平变化,定量 PCR 分析 Mcl-1 mRNA 与 miR-148a-3p 水平变化,报告基因实验检测 Mcl-1 启动子活性变化。用 miR-148a-3p 抑制剂联合 VPA 处理细胞,观察 miR-184a-3p 在 VPA 下调 Mcl-1 表达中的作用及对 VPA 促 SH-SY5Y 细胞凋亡效果的影响。**结果** VPA 可促进 SH-SY5Y 细胞凋亡,并抑制 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 的蛋白和 mRNA 水平($P<0.05$)。VPA 处理不影响 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 的启动子活性($P>0.05$)。VPA 可显著增强 SH-SY5Y 细胞中 miR-148a-3p 的表达($P<0.05$),使用 miR-148a-3p 抑制剂可减轻 VPA 对 Mcl-1 表达的抑制作用,并减弱 VPA 的促细胞凋亡效果。**结论** VPA 可能通过激活 miR-148a-3p/Mcl-1 信号通路促进 SH-SY5Y 细胞凋亡。

[关键词] 丙戊酸钠;SH-SY5Y 细胞;Mcl-1;miR-148a-3p;凋亡

[中图法分类号] R322.81;R965;R971.6 [文献标志码] A

Sodium valproate promotes the apoptosis of SH-SY5Y cells by activating miR-148a-3p/Mcl-1 signaling pathway

DAI Xufang[1,2], YAN Xiaojing[3], XIE Peng[3], LIAN Jiqin[3] [1]Faculty of Education for Children with Special Needs, [2]Chongqing Key Laboratory of Psychological Diagnosis and Educational Technology for Children with Special Needs, College of Education Science, Chongqing Normal University, Chongqing, 400047; [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To investigate the apoptosis-inducing effect of sodium valproate (VPA) on nerve cells and the underlying mechanism. Methods Human neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with VPA of difterent doses were examined for apoptosis and Mcl-1 protein expression using flow cytometry and Western blotting, respectively. The mRNA expression of Mcl-1 and miR-148a-3p in the treated cells was detected with qRT-PCR, and the promoter activity of Mcl-1 gene was analyzed using a reporter gene assay. The changes of cell apoptosis and Mcl-1 expression in SH-SY5Y cells were analyzed following combined treatment with VPA and a miR-148a-3p antagonist. Results VPA treatment significantly promoted apoptosis and down-regulated Mcl-1 expression at both the mRNA and protein levels in SH-SY5Y cells. VPA treatment did not significantly affect the transcriptional activity of Mcl-1 promoter but up-regulated the expression of miR-148a-3p in SH-SY5Y cells. The application of the miR-148a-3p antagonist obviously attenuated the inhibitory effect of VPA on Mcl-1 expression and VPA-induced apoptosis in the cells. Conclusion VPA promotes the apoptosis of SH-SY5Y cells by activating miR-148a-3p/Mcl-1 signaling pathway.

[**Key words**] sodium valproate; SH-SY5Y cells; Mcl-1; miR-148a-3p; apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (31201068). Corresponding author: DAI Xufang, E-mail: xufangd@aliyun.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(31201068)

[通信作者] 戴旭芳,E-mail:xufangd@aliyun.com

孤独症(autism),又称自闭症,主要表现为社会交往障碍、语言交流障碍、刻板行为及兴趣狭窄等。研究表明,孤独症患者的大脑皮质结构紊乱,皮质下神经细胞结构异常,小脑与脑干区的蒲肯野细胞萎缩或丢失,边缘系统神经细胞发育异常且数量减少[1]。这提示脑神经细胞发育成熟延迟及异常可能是导致孤独症发病的重要原因。在脑发育的关键期,一些环境因素很可能通过影响神经细胞中的关键信号通路而导致神经元的成熟延迟或发育异常。在影响脑神经发育的诸多环境因素中,丙戊酸钠(sodium valproate,VPA)暴露是一种重要的独立危险因素。VPA 是一种常用抗癫痫药,对各种癫痫均有疗效[2],但它的不良反应也比较重,除常见的胃肠道反应外,还会损害儿童的认知功能[3]。VPA 会损害儿童的学习、记忆及智力等,表现为智商降低和学习成绩下降[4]。另外,研究表明 VPA 还会影响胎儿脑发育,容易导致先天脑畸形[5]。那么,VPA 究竟是通过何种机制影响脑神经细胞的功能并最终导致孤独症发病目前还不太清楚。

Mcl-1 是 Bcl-2 抗凋亡蛋白家族中一个重要成员,通过结合促凋亡蛋白 Bak、Bax 而发挥抗凋亡作用[6]。研究表明,VPA 可在多种肿瘤细胞中促进 Mcl-1 表达下调并诱导细胞凋亡,但在神经细胞中是否具有类似作用尚不清楚。本研究旨在探讨 VPA 暴露对神经细胞中 Mcl-1 表达的影响及可能机制,以期为阐明 VPA 致儿童脑发育异常的相关机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养

SH-SY5Y 细胞株为人神经母细胞瘤细胞,购买自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 5% CO_2、37 ℃条件下培养。

1.2 试剂及药品

DMEM 培养基与胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司,胎牛血清购自 HyClone 公司,VPA 购自 Sigma 公司,miRNA 提取试剂盒购自天根公司,蛋白定量试剂盒购自碧云天公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司,定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,蛋白分子量标准购自北京中杉公司,miR-148a-3p 抑制剂购自 Thermo 公司,PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司,Mcl-1、GAPDH 抗体购自 Cell Signaling 公司。

1.3 细胞处理

将细胞分为 3 组:①对照组用 PBS 处理;②低剂量组用 0.3 mmol/L 的 VPA 处理;③高剂量组用 0.6 mmol/L 的 VPA 处理。处理 24 h 后收集细胞进行分析。

1.4 细胞凋亡检测

VPA 处理完后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,再用 Annexin V/PI 标记细胞,于室温避光孵育 10 min,然后经流式细胞仪检测分析。实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测

细胞处理结束后,在冰上用 RIPA 溶液裂解 15 min。于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。然后取上清,将蛋白定量后行电泳分析,上样量为每孔总蛋白 40 μg。电泳结束后,用半干转法将蛋白从凝胶中转移至 PVDF 膜上,在室温用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,再分别用 Mcl-1 (1∶1 000 稀释)与 GAPDH 抗体(1∶5 000 稀释)4 ℃孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,然后分别用山羊抗兔二抗(1∶10 000 稀释)在室温孵育 1 h,最后经 PBST 洗膜后再用化学发光法显影曝光。

1.6 microRNA 的提取与测定

根据试剂盒说明书提取 microRNA 并利用 qRT-PCR 进行测定,以 U6 基因为内参照。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对 microRNA 的相对表达量进行计算。

1.7 定量 PCR 分析

细胞处理结束后,用 TRIzol 法提取总 RNA,经 M-MLV 反转录酶逆转录为 cDNA,再利用 SYBR 法进行定量 PCR 检测,检测结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析作图。

1.8 报告基因检测

待细胞生长至 80%左右融合度时,将 pGL3-Mcl-1 质粒与 pRL-TK 质粒共转染,以 pRL-TK/pGL3-Basic 共转染作对照。转染后 36 h,在冰上用 1×PLB 裂解液裂解细胞 20 min,于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。然后取 20 μL 上清,加入 50 μL 萤火虫荧光素酶底物并混匀,立即在报告基因检测系统检测荧光素酶活性,检测完后加入 50 μL 反应终止液,继续检测海肾荧光素酶活性。以荧光素酶活性值对海肾荧光素酶活性值的比值进行量化分析。

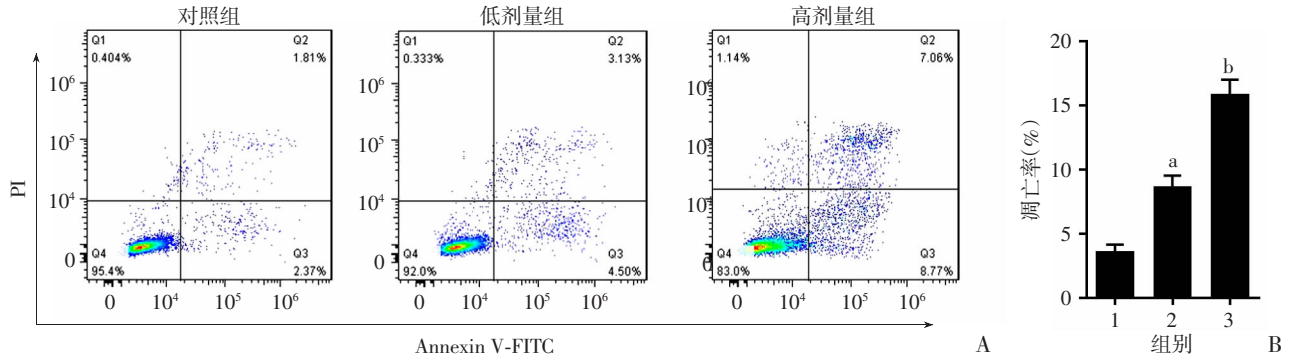
1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 VPA 促进 SH-SY5Y 细胞凋亡

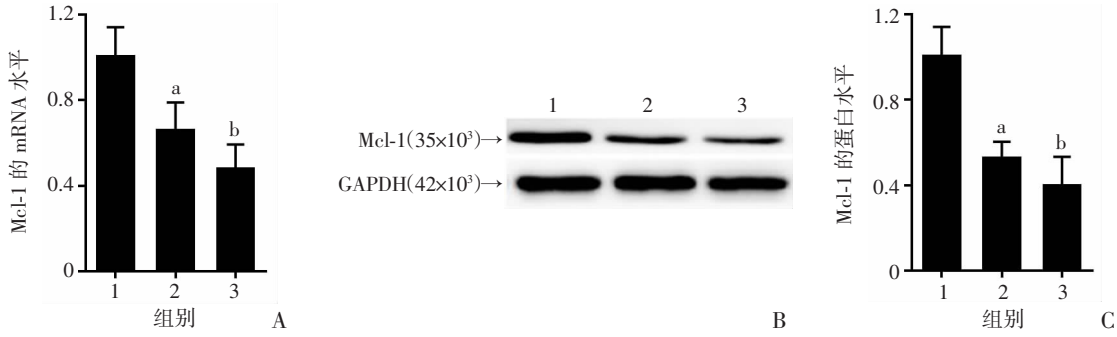
为验证 VPA 能否促进神经细胞凋亡,分别使用不同浓度处理 SH-SY5Y 细胞 24 h,然后流式分析细胞凋亡水平。结果显示,VPA 可显著促进 SH-SY5Y 细胞凋亡($P<0.05$),且剂量越高效果越显著(图 1)。



1:对照组;2:低剂量组;3:高剂量组

A:流式细胞检测结果;B:各组凋亡率统计分析　a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与对照组比较

图 1　流式细胞检测 VPA 促进 SH-SY5Y 细胞凋亡



A:定量 PCR 分析 VPA 对 Mcl-1 mRNA 表达的影响;B:Western blot 检测 VPA 对 Mcl-1 蛋白表达的影响;C:半定量分析

1:对照组;2:低剂量组;3:高剂量组; a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与对照组比较

图 2　VPA 下调 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 表达

2.2　VPA 下调 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 表达

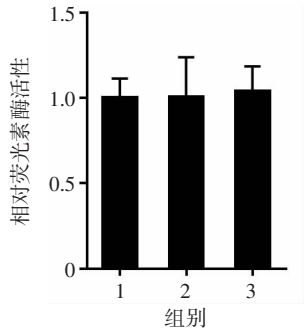
为进一步分析 Mcl-1 在 VPA 促 SH-SY5Y 细胞凋亡中的作用,用不同剂量 VPA 处理 SH-SY5Y 细胞,然后分别使用定量 PCR 与 Western blot 检测 Mcl-1 的 mRNA 与蛋白水平变化。结果显示,不论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平,VPA 处理可以显著下调 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 的表达($P<0.05$),且剂量越高下调效果越明显(图 2)。

2.3　VPA 处理不改变 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 启动子活性

为探讨 VPA 下调 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 表达的可能机制,首先克隆了 Mcl-1 的启动子片段,构建报告基因载体 pGL3-Mcl-1 质粒,将 pGL3-Mcl-1 质粒转染 SH-SY5Y 细胞 12 h 后再用 VPA 处理细胞 24 h,然后以空载体 pGL3 为对照,通过荧光素酶报告基因检测系统测定报告基因活性,结果显示,VPA 处理并不能改变 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 启动子活性(图 3)。

2.4　VPA 处理上调 SH-SY5Y 细胞中 miR-148a-3p 水平

在导致 mRNA 与蛋白水平均下调的诸多因素中,microRNA 的作用比较明确。序列对比分析发现,miR-148a-3p 与 Mcl-1 mRNA 的 3′-UTR 区存在互补(图 4)。因此,用 VPA 处理 SH-SY5Y 细胞,采用定量 PCR 法检测 miR-148a-3p 的水平变化,结果发现 VPA 处理可以显著上调 SH-SY5Y 细胞中 miR-148a-3p 水平($P<0.05$,图 5)。



1:对照组;2:低剂量组;3:高剂量组

图 3　报告基因检测系统分析 VPA 对 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 启动子活性的影响

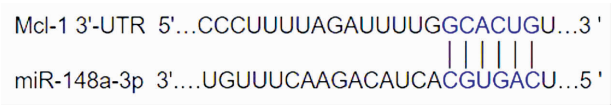
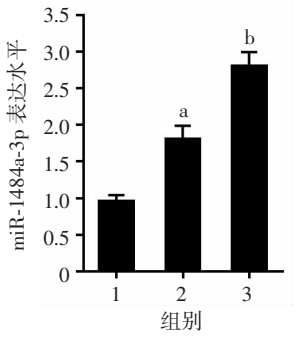


图 4　序列对比分析发现 Mcl-1 mRNA 的 3′-UTR 区与 miR-148a-3p 存在互补



1:对照组;2:低剂量组;3:高剂量组
a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,均与对照组比较

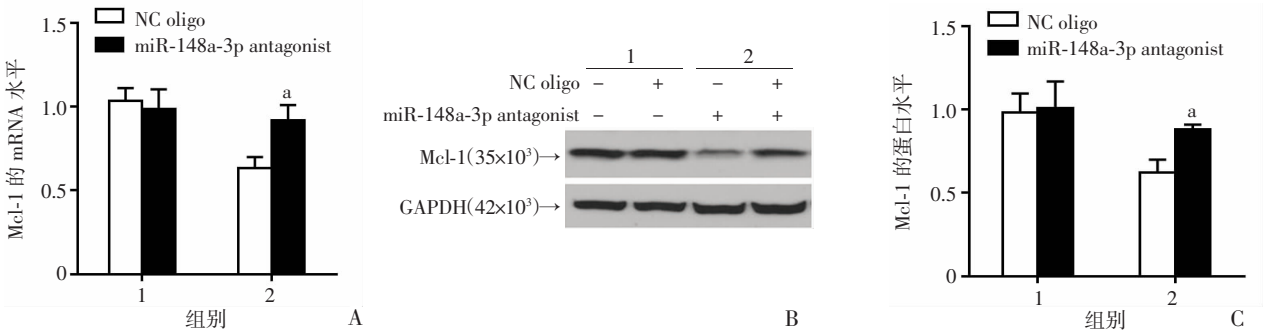
图 5　VPA 处理上调 SH-SY5Y 细胞中 miR-148a-3p 水平

2.5　抑制 miR-148a-3p 可逆转 VPA 对 Mcl-1 的下调作用

为探讨 VPA 诱导的 miR-148a-3p 上调在其下调 Mcl-1 中发挥的作用,将 miR-148a-3p 的特异抑制剂 miR-148a-3p antagonist 转染 SH-SY5Y 细胞,12 h 后用 VPA 处理细胞,然后分别用定量 PCR 与 Western blot 检测 Mcl-1 的 mRNA 与蛋白水平变化。结果显示,miR-148a-3p 抑制剂可以在 mRNA 与蛋白水平均逆转 VPA 对 Mcl-1 的下调作用($P<0.05$,图 6)。

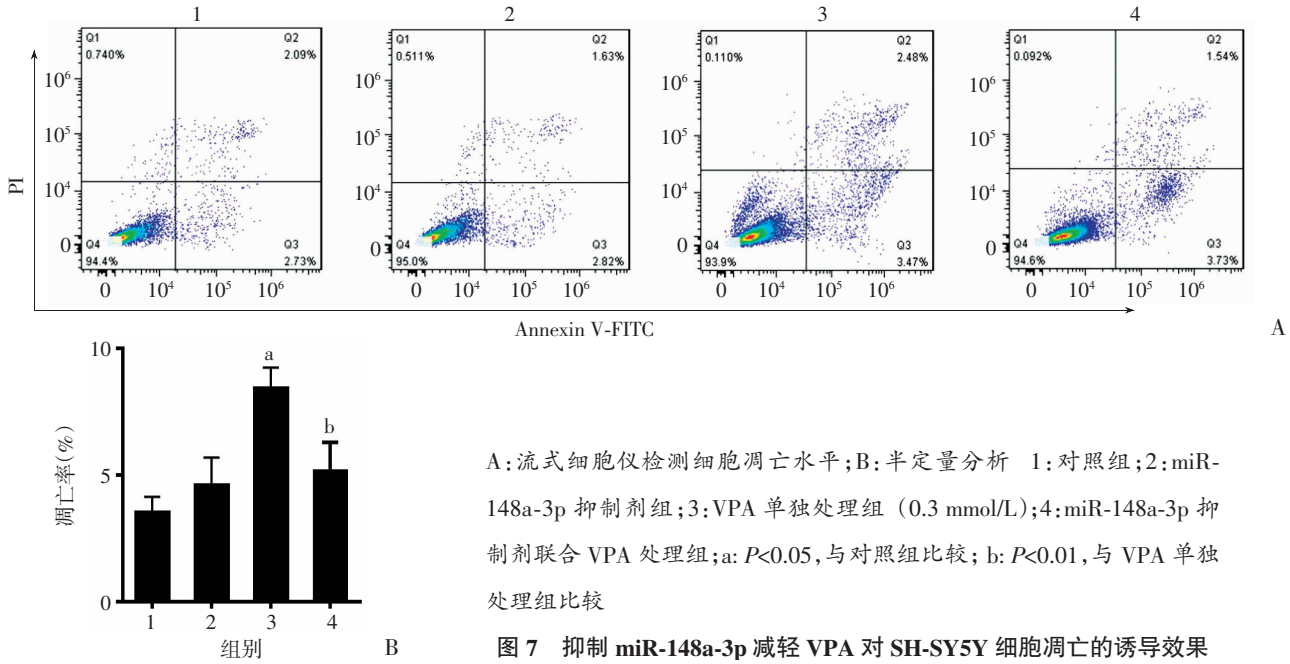
2.6　抑制 miR-148a-3p 减轻 VPA 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的诱导效果

为明确抑制 miR-148a-3p 后对 VPA 诱导细胞凋亡作用的效果,将 miR-148a-3p 的特异抑制剂 miR-148a-3p antagonist 转染 SH-SY5Y 细胞,12 h 后再用 VPA 处理细胞,然后流式分析细胞凋亡水平。结果显示,抑制 miR-148a-3p 后 SH-SY5Y 细胞凋亡水平得到显著减少($P<0.05$,图 7)。



A:定量 PCR 分析 Mcl-1 mRNA 水平;B:Western blot 检测 Mcl-1 蛋白水平;C:半定量分析　1:对照组;2:低剂量组;a: $P<0.05$,与对照组比较

图 6　miR-148a-3p 抑制剂逆转 VPA 对 SH-SY5Y 细胞中 Mcl-1 表达的下调



A:流式细胞仪检测细胞凋亡水平;B:半定量分析　1:对照组;2:miR-148a-3p 抑制剂组;3:VPA 单独处理组 (0.3 mmol/L);4:miR-148a-3p 抑制剂联合 VPA 处理组;a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.01$,与 VPA 单独处理组比较

图 7　抑制 miR-148a-3p 减轻 VPA 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的诱导效果

3 讨论

人群调查发现,VPA 的产前暴露会显著提高胎儿患孤独症的风险[7]。并且,产前注射 VPA 也是目前制备孤独症动物模型的常用方法。VPA 注射产生的孤独症模型动物不仅具有孤独症的特征行为,而且脑组织中神经细胞的形态变化也与孤独症患者尸检报告相似[8]。但 VPA 暴露到底如何导致孤独症发病的机制还有待深入研究。研究表明,VPA 可能通过抑制分解 γ-氨基丁酸的酶活性,升高脑组织中的 γ-氨基丁酸水平,来影响抑制性神经细胞的正常信号传递功能而干扰学习记忆过程[9];VPA 还可能通过影响组蛋白乙酰化水平而调节 AKT 激酶信号通路[10]、mTOR 信号通路[11]等影响脑组织的发育。本课题组研究也发现,VPA 产前暴露可引起仔鼠脑组织中神经细胞凋亡率增加、自噬水平下降,且该现象与孤独症的发病关系密切[12-13]。并且,VPA 诱导神经细胞凋亡的机制可能与 Bcl-2 的表达下调有关。本研究进一步证实,VPA 还能通过下调 Mcl-1 而诱导神经细胞凋亡,而其中 Mcl-1 是影响细胞凋亡的关键分子。因此,miR-148a-3p/Mcl-1 信号轴可能是 VPA 诱导神经细胞凋亡的一条重要通路。本研究使用的 VPA 剂量 0.3 mmol/L 和 0.6 mmol/L 均在临床正常用药范围之内[14],所以相关实验结果能够在一定程度上反映 VPA 的临床效应。

Mcl-1 作为 Bcl-2 抗凋亡家族的重要成员,尽管在结构和功能上都与 Bcl-2 类似,但两种蛋白的组织分布与表达调控都不同,提示它们在调控细胞凋亡的过程中发挥的功能也有不同。如 Mcl-1 敲除鼠会导致的胚胎发育致死,而 Bcl-2 敲除鼠则不会[15]。研究表明,Mcl-1 与 Bcl-2 在脑组织中均有表达,且与脑组织的发育密切相关[16]。Mcl-1 对于神经系统的发育是必不可少的,在神经系统中条件性敲除 Mcl-1 则引起神经细胞的过度凋亡而导致神经系统不能正常发育[17]。Mcl-1 的表达下调还是阿尔茨海默症、帕金森病等多种神经退行性疾病发病的重要原因[18-19]。研究也表明,VPA 可在胰腺癌、白血病等肿瘤细胞中下调 Mcl-1 而发挥抗肿瘤作用[20-21]。但 VPA 能否在神经细胞中下调 Mcl-1,以及 Mcl-1 的下调是否与 VPA 的促神经细胞凋亡作用相关尚少见报道。本研究证实,VPA 能在 SH-SY5Y 细胞中下调 Mcl-1,且这种下调是导致 SH-SY5Y 细胞凋亡的重要原因。

进一步的分析显示,VPA 并不能在 SH-SY5Y 细胞中改变 Mcl-1 的启动子活性,但可以通过增加 miR-148a-3p 的表达来降低 Mcl-1 的 mRNA 和蛋白水平。MicroRNA 是细胞内的一种小分子 RNA,通常与靶基因 mRNA 的 3′-UTR 结合而促进其降解。miR-148a-3p 是特异调控 Mcl-1 的一种 microRNA,对 Mcl-1 mRNA 的调控作用在食管鳞状细胞癌细胞中已有报道[22]。本研究进一步确认,VPA 能够在 SH-SY5Y 细胞中通过上调 miR-148a-3p 的表达而下调 Mcl-1 的 mRNA 和蛋白水平。

综上,本研究发现 VPA 可在 SH-SY5Y 细胞中通过激活 miR-148a-3p/Mcl-1 信号轴而促进神经细胞凋亡,相关研究结果可能为揭示 VPA 在神经系统的作用机制及可能的副作用提供理论依据。

参考文献:

[1] CAREAGA M, MURAI T, BAUMAN M D. Maternal immune activation and autism spectrum disorder: from rodents to non-human and human Primates[J]. Biol Psychiatry, 2017, 81(5): 391-401. DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.10.020.

[2] 中国抗癫痫协会精准医学与药物不良反应监测专业委员会. 抗癫痫药物所致不良反应的研究进展[J]. 癫痫杂志,2019, 5(4): 280-283. DOI: 10.7507/2096-0247.20190047.
Precision Medicine and ADR Monitoring Committee of China Anti Epilepsy Association. Research progress of adverse reactions caused by anti-epileptic drugs[J]. J Epilepsy, 2019, 5(4): 280-283. DOI: 10.7507/2096-0247.20190047.

[3] 胡美玲, 孙红斌. 丙戊酸钠所致震颤的临床特征及诊治进展[J]. 癫痫杂志, 2019, 5(3): 205-208. DOI: 107507/2096-0247-20190037.
HU M L, SUN H B. The clinical characteristics, diagnosis and treatment of tremor caused by sodium valproate[J]. J Epilepsy, 2019, 5(3): 205-208. DOI: 107507/2096-0247-20190037.

[4] AUVIN S. Advancing pharmacologic treatment options for pharmacologic treatment options for children with epilepsy[J]. Expert Opin Pharmacother, 2016, 17(11): 1475-1482. DOI: 10.1080/14656566.2016.1195809.

[5] KUO H Y, LIU F C. Molecular pathology and pharmacological treatment of autism spectrum disorder-like phenotypes using rodent models[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 422. DOI: 10.3389/fncel.2018.00422.

[6] SENICHKIN VV, STRELETSKAIA A Y, ZHIVOTOVSKY B, *et al*. Molecular comprehension of mcl-1: from gene structure to cancer therapy[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(7): 549-562. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.03.004.

[7] ROULLET F I, LAI J K, FOSTER J A. In utero exposure to valproic acid and autism: a current review of clinical and animal studies[J]. Neurotoxicol Teratol, 2013, 36: 47-56. DOI: 10.1016/j.ntt.2013.01.004.

[8] CHO H, KIM C H, KNIGHT E Q, *et al*. Changes in brain

metabolic connectivity underlie autistic-like social deficits in a rat model of autism spectrum disorder[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13213. DOI: 10.1038/s41598-017-13642-3.

[9] LI X, RISBROUGH V B, CATES-GATTO C, *et al*. Comparison of the effects of the GABAB receptor positive modulator BHF177 and the GABAB receptor agonist baclofen on anxiety-like behavior, learning, and memory in mice[J]. Neuropharmacology, 2013, 70: 156-167. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.01.018.

[10] YANG E J, AHN S, LEE K, *et al*. Early behavioral abnormalities and perinatal alterations of PTEN/AKT pathway in valproic acid autism model mice[J]. PLoS ONE, 2016, 11(4): e0153298. DOI: 10.1371/journal.pone.0153298.

[11] HU G W, MCQUISTON T, BERNARD A, *et al*. A conserved mechanism of Tor-dependent RCK-mediated mRNA degradation regulates autophagy[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(7): 930-942. DOI: 10.1038/ncb3189.

[12] QIN L Y, DAI X F, YIN Y H. Valproic acid exposure sequentially activates Wnt and mTOR pathways in rats[J]. Mol Cell Neurosci, 2016, 75: 27-35. DOI: 10.1016/j.mcn.2016.06.004.

[13] DAI X F, YIN Y H, QIN L Y. Valproic acid exposure decreases the mRNA stability of Bcl-2 via up-regulating miR-34a in the cerebellum of rat[J]. Neurosci Lett, 2017, 657: 159-165. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.08.018.

[14] 刘沙, 金梅, 傅川, 等. 丙戊酸钠血药浓度与抗癫痫疗效及影响因素分析[J]. 重庆医学, 2016, 45(27): 3805-3807. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.020.
LIU S, JIN M, FU C, *et al*. Association of blood concentration of sodium valproate and anti-epileptic effect and influencing factors[J]. Chongqing Med, 2016, 45(27): 3805-3807. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.020.

[15] ROBINSON E J, AGUIAR S P, KOUWENHOVEN W M, *et al*. Survival of midbrain dopamine neurons depends on the Bcl2 factor Mcl1[J]. Cell Death Discov, 2018, 4: 107. DOI: 10.1038/s41420-018-0125-7.

[16] DAWE G B, YU H, GU S Y, *et al*. A7 nicotinic acetylcholine receptor upregulation by anti-apoptotic Bcl-2 proteins[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2746. DOI: 10.1038/s41467-019-10723-x.

[17] FOGARTY L C, FLEMMER R T, GEIZER B A, *et al*. Mcl-1 and Bcl-xL are essential for survival of the developing nervous system[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(8): 1501-1515. DOI: 10.1038/s41418-018-0225-1.

[18] NIKHIL K, SHAH K. The Cdk5-Mcl-1 Axis promotes mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in a model of Alzheimer's disease[J]. J Cell Sci, 2017, 130(18): 3023-3039. DOI: 10.1242/jcs.205666.

[19] CARROLL R G, HOLLVILLE E, MARTIN S J. Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1[J]. Cell Rep, 2014, 9(4): 1538-1553. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.10.046.

[20] GILARDINI MONTANI M S, GRANATO M, SANTONI C, *et al*. Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2017, 40(2): 167-180. DOI: 10.1007/s13402-017-0314-z.

[21] YOON J Y, SZWAJCER D, ISHDORJ G, *et al*. Synergistic apoptotic response between valproic acid and fludarabine in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells involves the lysosomal protease cathepsin B[J]. Blood Cancer J, 2013, 3: e153. DOI: 10.1038/bcj.2013.50.

[22] TANG Y, YANG P, ZHU Y F, *et al*. LncRNA TUG1 contributes to ESCC progression via regulating miR-148a-3p/MCL-1/Wnt/β-catenin Axis *in vitro*[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(1): 82-94. DOI: 10.1111/1759-7714.13236.

(**收稿**:2020-01-08;**修回**:2020-03-04)

(编辑 汪勤俭)