doi:10.11659/jjssx.03E018041

·基础研究·

冬凌草甲素减轻自噬对阿霉素诱导心肌细胞凋亡的保护作用

张秀萍,钟 诚,张 鹏 (榆林市第二医院心血管内科二病区,陕西 榆林 719000)

[摘 要] **目的** 探究冬凌草甲素对阿霉素诱导心肌细胞凋亡的作用及机制。**方法** 将细胞随机分为 H9C2 组、Adriamycin 组、Oridonin(5 μM)组、Oridonin(10 μM)组和 Oridonin(20 μM)组,除 H9C2 组外,其余组用阿霉素处理,Oridonin(5,10,20 μM)组同时给予相应浓度的冬凌草甲素,试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)浓度,CCK8 检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin1、P62 和 LC3 的表达,免疫荧光检测 LC3 表达。**结果** 与 H9C2 组比较,Adriamycin 组 SOD 浓度明显降低,MDA 浓度明显升高;与 Adriamycin 组比较,Oridonin(5,10,20 μM)组 SOD 浓度明显升高,MDA 浓度明显降低;同时,Adriamycin 组细胞增殖速度明显低于 H9C2 组,细胞凋亡率明显增高;Oridonin(5,10,20 μM)组细胞增殖速度与 Adriamycin 组比较明显升高,细胞凋亡率明显降低;此外,阿霉素能显著升高 Beclin1 表达水平和 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 的比值,抑制 P62 表达;冬凌草甲素(5,10,20 μM)能显著减弱阿霉素对 Beclin1、LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 和 P62 表达的调控作用。**结论** 冬凌草甲素能通过抑制自噬减轻阿霉素诱导的心肌细胞凋亡。

[关键词] 冬凌草甲素;心肌细胞;氧化应激;自噬;凋亡;阿霉素
[中图分类号] R965 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-03-19

Protective effects of oridonin on adriamycin-induced myocardial apoptosis through inhibiting autophagy

ZHANG Xiu-ping, ZHONG Cheng, ZHANG Peng (Second Department of Cardiovascular Medicine, Second Hospital of Yulin, Yulin Shaanxi 719000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of oridonin on adrimycin-induced myocardial apoptosis. **Methods** Cells were divided into H9C2, adriamycin, oridonin(5 μM), oridonin(10 μM) and oridonin(20 μM) group. Cells were treated with adriamycin except H9C2 group and cells in oridonin(5,10,20 μM) group were treated with oridonin at the same time. The concentrations of superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) were detected and the cell proliferation was detected by CCK8 assay. Cell apoptosis was determined by flow cytometry. The expressions of autophagy-related proteins(Beclin1, P62 and LC3) were measured by western blot. And the expression of LC3 also detected by immunofluoresence. **Results** Compared with H9C2 group, the concentration of SOD decreased and MDA increased in adriamycin group; compared with adriamycin group, SOD increased but MDA decreased in oridonin(5,10,20 μM) group significantly. Meanwhile, cell proliferation was inhibited and apoptosis was induced in adriamycin group compared with H9C2 group; but cell proliferation rate was increased and apoptosis rate was decreased in oridonin(5,10,20 μM) group compared with adriamycin group. In addition, adriamycin up-regulated the protein level of Beclin1 and ratio of LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ, and inhibited the expression of P62; oridonin(5,10,20 μM) attenuated the effects of adriamycin on Beclin1, ratio of LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ and P62 notably. **Conclusion** Oridonin alleviated adriamycin-indued myocardial apoptosis by inhibiting autophagy.

Keywords: oridonin; myocardial cell; oxidative stress; aotuphagy; apoptosis; adriamycin

阿霉素(Adriamycin)是一类蒽环类的抗生素,具有广谱的抗癌活性,能减缓乳腺癌、肺癌、膀胱癌及甲状腺癌等癌症的发展进程,被广泛地应用于癌症的治疗,但其不良反应限制了阿霉素的应用[1-3],其中心脏毒性是其最主要的不良反应。研究表明,连续2~3 d使用阿霉素即可造成心肌损伤[4],最终可发展为心律不齐和心脏衰竭,甚至导致患者死亡[5],因此探究阿霉素诱导心肌损伤的机制,发现具有心肌保护作用的新药物是降低阿霉素不良反应的关键。有研究表明,自噬在调控心脏的结构和功能方面发挥了重要作用[6];也有研究表明,自噬是阿霉素诱导心肌细胞损伤的主要作用机制之一,异常的自噬可导致心肌细胞凋亡[7]。因此,抑制自噬可能有利于减轻阿霉素诱导心肌损伤。冬凌草甲素(Oridonin)是从中药冬凌草中提取的一类二萜类化合物,具有抗癌、抗菌、免疫调节及抗氧化活性,具有调控细胞自噬的作用[8-9],但是否能通过调控自噬减轻阿霉素诱导的心肌细胞损伤还未见报道。本文采用阿霉素诱导心肌细胞凋亡并给予冬凌草甲素,探究冬凌草甲素对阿霉素诱导心肌细胞凋亡的作用及机制。

[基金项目] 陕西省自然科学基金(20130115S)

1 材料与方法

1.1 主要试剂

大鼠心肌细胞细胞株 H9C2 由中国科学院上海细胞库提供。细胞培养液 DMEM 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。冬凌草甲素购自河南济世药业,纯度 99.5%。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD,货号:A001-1-1)和丙二醛(malondialdehyde,MDA,货号:A003-1)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,CCK8 试剂盒(货号:C0037)和 Annexin V-FITC 试剂盒(货号:C1063)购自碧云天生物技术公司。RIPA 裂解液(货号:R0010)和 BCA 试剂盒(货号:PC0020)购自北京索莱宝科技公司。Beclin1(货号:ab207612)、P62(货号:ab109012)和 LC3(货号:ab192890)一抗及实验所用二抗购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞分组及模型复制

用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液将大鼠心肌细胞系 H9C2 细胞培养于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中,隔天换液,细胞融化率达到 85% 以上时进行传代培养。将细胞随机分为 H9C2 组、Adriamycin 组、Oridonin(5 μM)组、Oridonin(10 μM)组和 Oridonin(20 μM)组,每组 6 个复孔。除 H9C2 组外,其余组加入阿奇霉素进行处理,使其终浓度为 1 μM。同时,Oridonin(5 μM)组、Oridonin(10 μM)组和 Oridonin(20 μM)组分别加入 5 μM、10 μM 和 20 μM 的冬凌草甲素,其余 2 组给予等量溶剂处理,48 h 后进行相应检测。

1.3 试剂盒检测氧化应激分子的浓度

用冬凌草甲素处理细胞 48 h 后,收集细胞上清液,以 1 000 r/min 的转速离心 4 min 后取上清液根据试剂盒说明书检测细胞上清液中抗氧化酶 SOD 和氧化产物 MDA 的浓度。

1.4 CCK8 检测细胞增殖

将细胞以 1×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL 细胞悬液,同时加入 1 μM 的阿霉素和 5 μM、10 μM、20 μM 的冬凌草甲素分别处理 0 d、1 d、2 d、3 d 和 4 d 后,每孔加入 10 μL 的 CCK8 试剂,室温孵育 4 h 后,用酶标仪检测各组细胞吸光度,计算细胞增殖倍数(增殖倍数 = 细胞吸光度/0 h H9C2 组细胞吸光度 ×100%)。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

用阿霉素和冬凌草甲素处理细胞 48 h 后,弃去细胞培养液,用缓冲液清洗细胞 3 次并用胰酶收集细胞,将细胞密度调整至 1×10^6 个/mL,用 70% 预冷的乙醇于 4 ℃固定 2 h 后,加入 PI 染色液和 FITC-Annexin V 避光室温孵育 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白并用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度、调平。每组取等量蛋白,用 10% SDS-PAGE 分离蛋白,采用半干法将蛋白转移到 PVDF 膜,用 5% BSA 封闭蛋白,加入适宜浓度一抗 4 ℃孵育过夜,第 2 天洗去未结合一抗(Beclin1:1∶1 200;P62,1∶1 000;LC3,1∶1 000),加入二抗室温封闭 1 h。随后洗去未结合二抗,滴加化学发光显色液于暗室曝光显影。

1.7 免疫荧光检测 LC3 表达

将用冬凌草甲素处理后的细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,随后滴加 TritonX-100 对细胞膜进行打孔。15 min 后弃去 TritonX-100,滴加 10% 封闭用山羊血清,室温孵育 2 h。封闭完成后,加入 LC3 一抗 4 ℃封闭过夜,抗体浓度为 1∶200。第 2 天洗去未结合一抗,加入 FITC 标记的荧光二抗(1∶300)室温孵育 1 h,随后洗去未结合二抗,滴加 DAPI 即用液室温处理 15 min,洗净后于荧光显微镜下观察染色情况。

1.8 统计学分析

用统计软件 SPSS 19.0 对所有实验数据进行统计分析,组间差异采用单因素方差分析进行分析。所有实验结果采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对氧化应激的影响

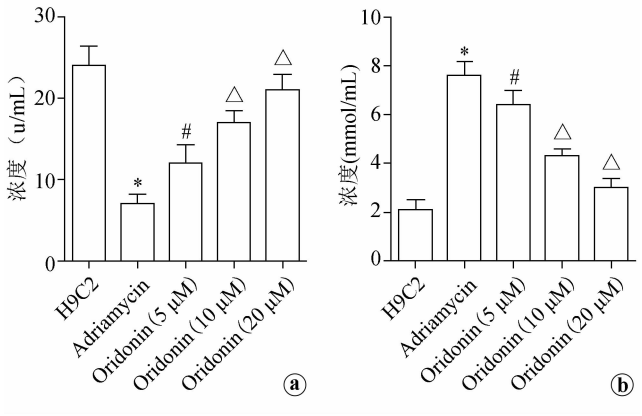
与 H9C2 组比较,Adriamycin 组细胞上清液中抗氧化酶 SOD 的浓度显著降低,氧化产物 MDA 浓度显著升高;与 Adriamycin 组比较,Oridonin(5,10,20 μM)组 SOD 浓度明显升高,MDA 浓度明显降低,表明冬凌草甲素能抑制阿霉素诱导的 H9C2 细胞氧化应激(图 1)。

2.2 冬凌草甲素对细胞增殖的影响

与 H9C2 组比较,Adriamycin 组细胞增殖速度明显降低;用冬凌草甲素处理细胞 4 d 后,Oridonin(5,10,20 μM)组细胞增殖速度与 Adriamycin 组比较均明显升高,表明冬凌草甲素能促进 H9C2 细胞增殖(图 2)。

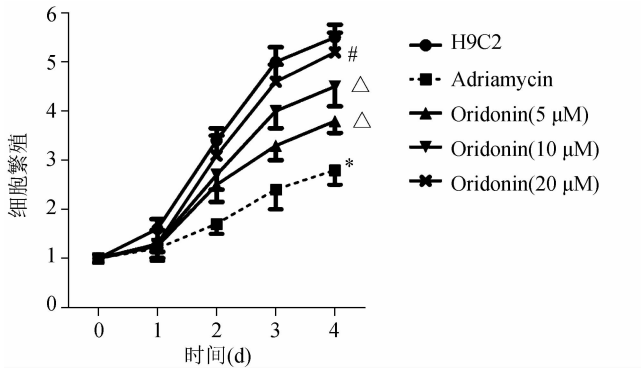
2.3 冬凌草甲素对细胞凋亡的影响

流式细胞术实验结果表明,阿霉素能显著提高 H9C2 细胞的凋亡率,冬凌草甲素(5,10,20 μM)能显著减弱阿霉素对 H9C2 细胞凋亡的诱导作用,表明冬凌草甲素能抑制心肌细胞凋亡(图 3、4)。



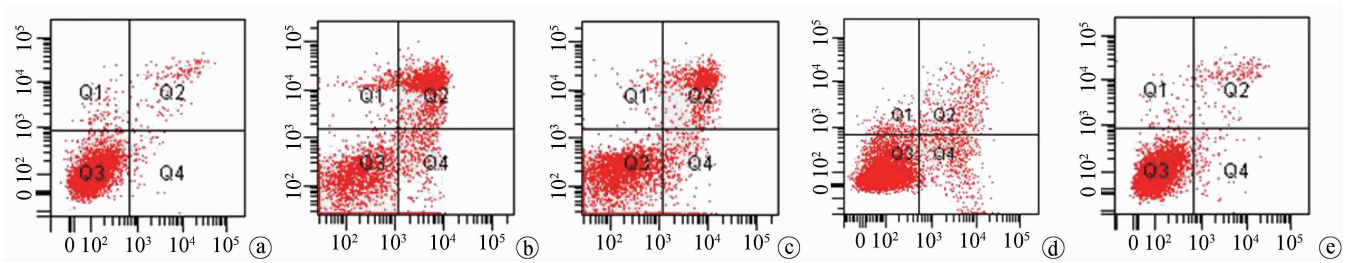
a:SOD 浓度;b: MDA 浓度　*:与 H9C2 组比较,$P<0.01$;#:与 Adriamycin 组比较,$P<0.05$;△:与 Adriamycin 组比较,$P<0.01$

图 1　冬凌草甲素对上清液中 SOD 和 MDA 浓度影响



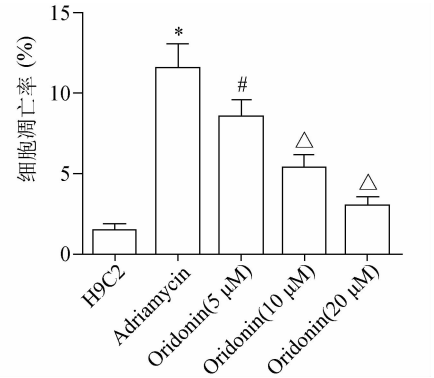
*:与 H9C2 组比较,$P<0.01$;#:与 Adriamycin 组比较,$P<0.01$;△:与 Adriamycin 组比较,$P<0.01$

图 2　冬凌草甲素对 H9C2 细胞增殖的影响



a:H9C2 组;b:Adriamycin 组;c:Oridonin(5 μM)组;d:Oridonin(10 μM)组;e:Oridonin(20 μM)组

图 3　流式细胞术检测细胞凋亡

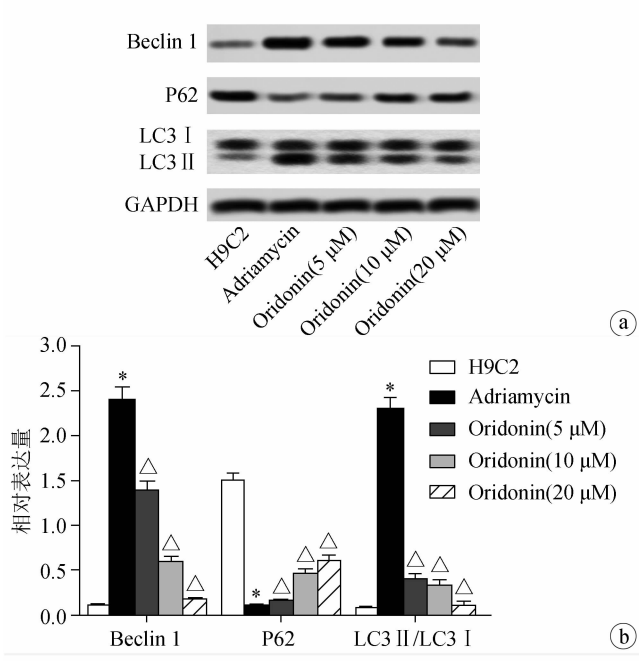


*:与 H9C2 组比较,$P<0.01$;#:与 Adriamycin 组比较,$P<0.05$;△:与 Adriamycin 组比较,$P<0.01$

图 4　冬凌草甲素对 H9C2 细胞凋亡的影响

2.4　冬凌草甲素对自噬的影响

Western blot 实验结果表明,与 H9C2 组比较,Adriamycin 组细胞 Beclin1 表达水平和 LCⅡ/LC3Ⅰ的比值明显升高,P62 表达水平明显降低;与 Adriamycin 组比较,Oridonin(5,10,20 μM)组细胞 Beclin1 表达水平和 LCⅡ/LC3Ⅰ的比值明显降低,Oridonin(10, 20 μM)组 P62 表达水平明显升高(图 5)。同时,免疫荧光实验结果显示,Adriamycin 组细胞 LC3 的表达量显著高于 H9C2 组,Oridonin(5,10,20 μM)组细胞 LC3 表达量明显高于 Adriamycin 组,表明冬凌草甲素能减弱阿霉素诱导的 H9C2 细胞自噬(图 6、7)。



a:Western blot 检测;b:蛋白相对表达量分析　*:与 H9C2 组比较,$P<0.01$;△:与 Adriamycin 组比较,$P<0.01$

图 5　Western blot 检测冬凌草甲素对 Beclin1、P62 和 LC3 蛋白表达的影响

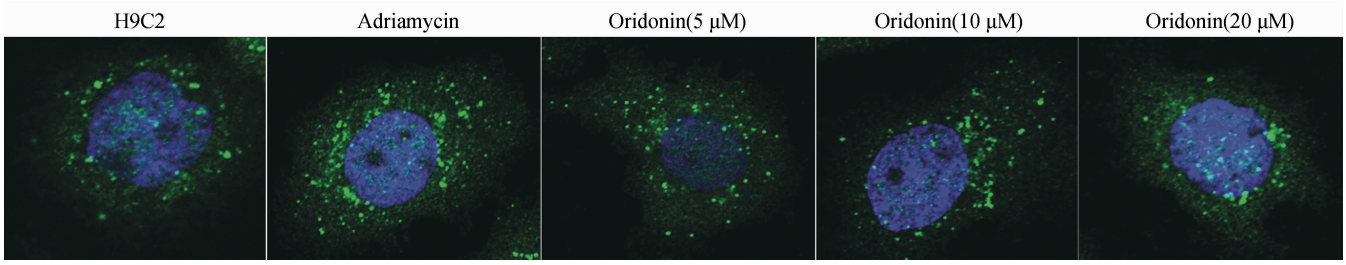
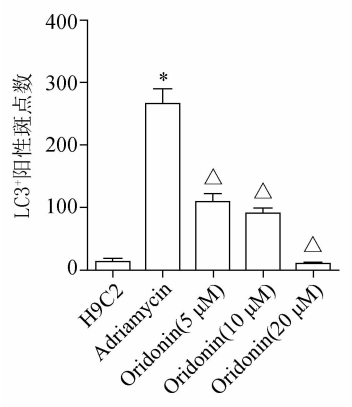


图 6 免疫荧光检测冬凌草甲素对 LC3 表达量的影响



*:与 H9C2 组比较,$P<0.01$;△:与 Adriamycin 组比较,$P<0.01$

图 7 LC3 表达量定量分析

3 讨论

阿霉素是一类蒽环类药物,临床常用于各类癌症的治疗,但因其具有较强的心脏毒性而限制了应用[10-11]。研究表明,15~25 mg/kg 的阿霉素即具有心脏毒性,24 mg/kg 及以上剂量的阿霉素可导致小鼠心脏严重损伤[12]。静脉连续给予癌症患者阿霉素数月可导致左心室重构,发展为慢性心肌病和充血性心力衰竭,导致患者死亡[13]。临床研究表明,心肌阿霉素积累量达到 650 mg/m^2 的患者中有超过 70% 的患者都会发生充血性心力衰竭[3]。目前只能通过降低阿霉素使用剂量、终止阿霉素使用和与右雷佐生联用减轻阿霉素的心脏毒性[14],并且还没有研究证明这些方法及药物既能显著改善阿霉素的心脏毒性又能不影响阿霉素的抗癌活性。因此,寻找降低阿霉素心脏毒性的新方法及新药物显得尤为重要。冬凌草甲素是中药冬凌草的有效成分之一,研究表明冬凌草甲素具有广谱的抗癌活性,并且能防止放射治疗的副反应,增强癌细胞对放疗的敏感性[15-16]。但冬凌草甲素是否能减轻抗癌药物阿霉素的心脏毒性还未见报道。本研究采用阿霉素直接诱导心肌细胞损伤并给予不同剂量的冬凌草甲素,以期探究冬凌草甲素对阿霉素心脏毒性的作用。

氧化应激是阿霉素诱导心肌损伤的主要机制之一。研究表明,阿霉素的使用可诱导线粒体活性氧的大量产生和心肌的损伤[17]。大量氧化自由基可造成细胞线粒体功能障碍和 DNA 损伤,导致细胞凋亡和坏死[18]。心肌细胞凋亡和坏死是导致心功能衰竭的最直接原因[19]。研究发现,中药提取物黄芪素能通过减轻心肌细胞氧化应激抑制小鼠心肌细胞凋亡,从而减轻阿霉素对小鼠的心毒性[20]。本研究发现,冬凌草甲素能显著升高阿霉素处理后细胞上清液中 SOD 的浓度,降低 MDA 的浓度。SOD 是一类抗氧化酶,能够通过清除氧化自由基减轻氧化应激对机体的损伤。MDA 是脂质过氧化过程中的一类重要的中间产物,与氧化损伤程度呈正相关,提示冬凌草甲素能减弱阿霉素诱导的心肌 H9C2 细胞氧化应激。此外,阿霉素还能显著抑制增殖、诱导凋亡,冬凌草甲素能减轻阿霉素对心肌细胞增殖和凋亡的作用,并具有剂量依耐性,表明冬凌草甲素能对抗阿霉素诱导的心肌 H9C2 细胞凋亡,并随浓度升高作用逐渐增强,提示冬凌草甲素可能具有减轻阿霉素化疗所带来的心脏毒性的作用。

自噬是清除蛋白质聚集体和受损细胞器的重要机制。在正常生理条件下,自噬可维持心肌细胞内环境的稳定,异常的自噬可导致心肌细胞细胞器损伤及心肌细胞的凋亡和坏死[21]。已有研究表明,自噬在阿霉素导致的心功能衰竭过程中发挥着重要的调控作用[22]。Beclin1 是自噬体形成的重要调节蛋白之一,与 LC3 共同参与自噬体的形成[23]。研究表明,Beclin1 在自噬体的形成的启动阶段发挥重要作用,能诱导 LC3 Ⅰ向 LC Ⅱ转化,参与自噬溶酶体膜的延伸,指导自噬体的形成,因此常被作为自噬体形成的标志[24]。P62 则主要参与蛋白质的泛素化,随着自噬的进行不断地被降解,表达水平与自噬呈负相关[24]。本研究中,Western blot 和免疫荧光实验结果均表明阿霉素能显著升高心肌细胞 H9C2 的 Beclin1 蛋白表达水平和 LC Ⅱ/LC3 Ⅰ的比值,抑制 P62 的表达,表明阿霉素诱导了 H9C2 细胞自噬。冬凌草甲素能显著减弱阿霉素对 Beclin1、LC Ⅱ/LC3 Ⅰ和 P62 的调控作用,提示冬凌草甲素能抑制阿霉素诱导的自噬。

综上所述,冬凌草甲素能升高阿霉素处理后 H9C2 细胞上清液中 SOD 的浓度,降低 MDA 浓度,并

促进 H9C2 增殖、抑制细胞凋亡;同时,冬凌草甲素还能显著减弱阿霉素对 Beclin1、LC Ⅱ/LC3 Ⅰ 和 P62 的调控作用和阿霉素对 LC3 表达的促进作用,表明冬凌草甲素能抑制阿霉素诱导的心肌 H9C2 细胞氧化应激和自噬,从而抑制心肌细胞凋亡。本研究首次初步探究了冬凌草甲素对阿霉素诱导的心肌细胞凋亡的作用和机制,提示冬凌草甲素可能改善阿霉素用于癌症患者治疗的不良反应,为临床减轻阿霉素心脏毒性副作用提供了新的潜力药物。

[参考文献]

[1] Weiss RB. The anthracyclines:will we ever find a better doxorubicin? [J]. Semin Oncol,1992,19(6):670 - 686.

[2] Xing M, Yan F, Yu S, et al. Efficacy and cardiotoxicity of liposomal doxorubicin-based chemotherapy in advanced breast cancer: a meta-analysis of ten randomized controlled trials [J]. PloS One, 2015, 10(7):e0133569. doi:10.1371/journal.pone.0133569.

[3] Kouzi SA, Uddin MN. Aerobic exercise training as a potential cardioprotective strategy to attenuate doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. J Pharm Pharm Sci,2016,19(3):399 - 410. doi:10.18433/J3JS5R.

[4] Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, et al. Doxorubicin cardiomyopathy[J]. Cardiology,2010,155(2):155 - 162. doi:10.1159/000265166.

[5] Sin TK, Tam BT, Yung BY, et al. Resveratrol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in aged hearts through the SIRT1-USP7 axis[J]. J Physiol, 2015, 593(8): 1887 - 1899. doi: 10.1113/jphysiol.2014.270101.

[6] Nemchenko A, Chiong M, Turer A, et al. Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(4):584 - 593. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.010.

[7] Lu L, Wu W, Yan J, et al. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure[J]. Int J Cardiol, 2009, 134(1): 82 - 90. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.01.043.

[8] Bae S, Lee EJ, Lee JH, et al. Oridonin protects HaCaT keratinocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress by altering microRNA expression[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(1): 185 - 193. doi: 10.3892/ijmm.2013.1561.

[9] Li Y, Wang Y, Wang S, et al. Oridonin phosphate-induced autophagy effectively enhances cell apoptosis of human breast cancer cells[J]. Med Oncol,2015,32(1):365. doi:10.1007/s12032 - 014 - 0365 - 1.

[10] Alsuhailbani E, Menon A, Nair CK. Protective effect of ayurvedic formulations against doxorubicin-induced cardiotoxicity: preliminary studies on brahma rasayana and chyavanaprash[J]. J Cancer Res Ther, 2016,12(2):561 - 564. doi:10.4103/0973 - 1482.151931.

[11] Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, et al. NLRP3 deficiency reduces macrophage interleukin-10 production and enhances the susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26489. doi:10.1038/srep26489.

[12] Desai VG, Herman EH, Moland CL, et al. Development of doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in the B6C3F1 mouse model[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2013,266(1):109 - 121. doi:10.1016/j.taap.2012.10.025.

[13] Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials[J]. Cancer,2003,97(11):2869 - 2879. doi:10.1002/cncr.11407.

[14] Scott JM, Khakoo A, Mackey JR, et al. Modulation of anthracycline-induced cardiotoxicity by aerobic exercise in breast cancer: current evidence and underlying mechanisms[J]. Circulation,2011,124(5):642 - 650. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.021774.

[15] Murayama C, Nagao Y, Sano S, et al. Effect of oridonin, a Rabdosia diterpenoid, on radiosensitization with misonidazole[J]. Experientia, 1987,43(11/12):1221 - 1223.

[16] Liermann J, Naumann P, Fortunato F, et al. Phytotherapeutics oridonin and ponicidin show additive effects combined with irradiation in pancreatic cancerin vitro[J]. Radiol Oncol,2017,51(4):407 - 414. doi:10.1515/raon - 2017 - 0048.

[17] Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, et al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection[J]. Antioxid Redox Signal,2013,18(8):899 - 929. doi:10.1089/ars.2012.4795.

[18] Zhang S, Liu X, Bawakhalfe T, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Nat Med,2012,18(11):1639 - 1642. doi:10.1038/nm.2919.

[19] Gottlieb RA, Finley KD. Cardioprotection requires taking out the trash[J]. Basic Res Cardiol,2009,104(2):169 - 180. doi:10.1007/s00395 - 009 - 0011 - 9.

[20] Sahu BD, Kumar JM, Kuncha M, et al. Baicalein alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppression of myocardial oxidative stress and apoptosis in mice[J]. Life Sci,2015,144:8 - 18. doi:10.1016/j.lfs.2015.11.018.

[21] Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy[J]. Annu Rev Physiol,2010,72(72):45 - 59. doi:10.1146/annurev - physiol - 021909 - 135757.

[22] Cao Y, Shen T, Huang X, et al. Astragalus polysaccharide restores autophagic flux and improves cardiomyocyte function in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Oncotarget, 2016, 8(3):4837 - 4848. doi:10.18632/oncotarget.13596.

[23] Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. J Clin Invest, 2003,112(12):1809 - 1820. doi:10.1172/JCI20039.

[24] Park JM, Huang S, Wu TT, et al. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy[J]. Cancer Biol Ther,2013,14(2):100 - 107. doi:10.4161/cbt.22954.

(编辑:魏 源)